

การผลิตชีวมวลและสารประกอบชีวเคมีของสาหร่าย

*Anabaenopsis elenkinii* NUACC2.57

ภายใต้สภาวะปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

Biomass Production and Biochemical Compounds of

*Anabaenopsis elenkinii* NUACC2.57

under Different Nitrogen Concentrations

วิทยา ทาวองศ์\*, พงศนาถ ผ่องเจริญ, ปฏิพัทธ์ สันป่าเป้า,

ปิยวัฒน์ ปองผดุง และสุพัฒน์ พลชา

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม  
มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

Wittaya Tawong\*, Pongsanat Pongcharoen, Patipat Sanpapao,

Piyawat Pongpadung and Supat Ponsa

Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment,  
Naresuan University, Tha Pho, Muang, Phitsanulok 65000

**บทคัดย่อ**

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการเจริญเติบโต การผลิตชีวมวล และสารประกอบชีวเคมีของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ NUACC2.57 ที่คัดแยกได้ในแม่น้ำลา จังหวัดสิงห์บุรี ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น เฮทเทอโรซิสต์ที่ปลายสายทั้งสองข้าง ร่วมกับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *16S rDNA* แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ NUACC2.57 จัดอยู่ในสกุล *Anabaenopsis* การศึกษานี้ไม่สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *16S rDNA* ในการจัดจำแนกได้ถึงระดับชนิด แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสัณฐานวิทยา เช่น รูปร่างและขนาดของเซลล์และไทโรคอม ทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ NUACC2.57 เป็น *A. elenkinii* เมื่อนำสายพันธุ์ที่ศึกษามาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG ในปริมาณไนโตรเจนต่างกัน 3 ความเข้มข้น (0, 1.5 และ 3.0 g/L) โดยทดลองในแต่ละชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ เป็นระยะเวลา 28 วัน ผลการศึกษาพบว่าสาหร่าย *A. elenkinii* NUACC2.57 เจริญเติบโตได้ทุกชุดการทดลอง แต่สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน (0 g/L) มีค่าน้ำหนักชีวมวล ( $2.48 \pm 0.07$  g DW/L) ปริมาณไฟโคไซยานิน ( $68.27 \pm 11.90$  mg/g DW) ปริมาณโปรตีนรวม ( $537.07 \pm 8.36$

\*ผู้รับผิดชอบบทความ : wittayat@nu.ac.th

mg/g DW) และปริมาณคาร์โบไฮเดรต ( $39.55 \pm 8.19$  mg/g DW) สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *A. elenkinii* NUACC 2.57 จึงเป็นแนวทางหนึ่งสำหรับการผลิตสารที่มีมูลค่า เช่น โปรตีนหรือไฟโคไซยานินและสามารถช่วยลดต้นทุนของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีไนโตรเจนต่ำต่อไป

**คำสำคัญ :** *Anabaenopsis*; สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน; ชีวมวล; ไฟโคบิลิโปรตีน; สารชีวเคมี

## Abstract

This study aimed to assess growth, biomass production, and biochemical compounds of a cyanobacterial strain NUACC 2.57 isolated from Mae La River, Sing Buri. The results obtained from morphological examinations such as terminal heterocyst cells. Together with the phylogenetic relationship based on the partial *16S rDNA*, it was shown that the studied strain belongs to the genus *Anabaenopsis*. In this study, the partial *16S rDNA* sequences could not identify a strain NUACC2.57 at the species level; however, the tested strain could be identified as *A. elenkinii* according to the morphological comparison based on the shape and cell dimensions of cell and trichome. Then, the effects of nitrogen concentrations on growth and biochemical compounds of a strain NUACC2.57 were studied. The strain was cultured in BG medium with three different nitrogen concentrations (0.0, 1.5, and 3.0 g/L). Each treatment was run in triplicate for 28 days. The results exhibited that the strain could grow in all nitrogen concentrations tested. Moreover, the maximum values of biomass ( $2.48 \pm 0.07$  g DW/L), phycocyanin ( $68.27 \pm 11.90$  mg/g DW), total protein ( $537.07 \pm 8.36$  mg/g DW), and carbohydrate ( $39.55 \pm 8.19$  mg/g DW) contents were obtained significantly ( $p < 0.05$ ) from the strain NUACC 2.57 cultured in BG medium without nitrogen (0 g/L). Considering the results obtained in the present study, the cyanobacterium *A. elenkinii* NUACC2.57 could be utilized for production of high-value compounds such as protein and phycocyanin. Moreover, the cultivation of *A. elenkinii* NUACC2.57 without nitrogen also could reduce the cost of nutrient.

**Keywords:** *Anabaenopsis*; cyanobacteria; biomass; phycobliprotein; biochemical compound

## 1. บทนำ

ปัจจุบันประชากรโลกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและคาดว่าจะสูงถึง 9.6 พันล้านคน ในปี ค.ศ. 2050 ทำให้การเกษตรและการเพาะปลูกจึงจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อผลิตอาหารให้เพียงพอต่อประชากรโลก [1] แต่การเพาะปลูกพืชนั้นต้องใช้พื้นที่บริเวณกว้างซึ่งส่งผลกระทบต่อ

พื้นที่อยู่อาศัย แนวทางการผลิตแหล่งอาหารทางเลือกอื่นจึงเป็นที่น่าสนใจ โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กรวมทั้งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง มีผลิตชีวมวลต่อพื้นที่ได้สูง เป็นแหล่งสารชีวเคมีที่มีมูลค่า โปรตีน กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน สารต้านอนุมูลอิสระ

และอื่น ๆ ที่สามารถใช้เชิงอุตสาหกรรม และใช้เป็นแหล่งอาหารทดแทนของสัตว์และมนุษย์ได้ในอนาคต [2-4] อย่างไรก็ตาม องค์ความรู้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีการศึกษาไว้เพียงแค่ 10 % ของชนิดสาหร่ายที่ค้นพบเท่านั้น [3,5] ดังนั้นการเพิ่มองค์ความรู้เหล่านี้จึงจำเป็นสำหรับการเลือกใช้ประโยชน์จากสาหร่ายต่อไปในอนาคต

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Anabaenopsis* เป็นสาหร่ายกลุ่มเส้นสายที่เซลล์ปกติเชื่อมต่อกันขดเป็นเกลียว เซลล์เฮเทอร์โรซิสต์ส่วนใหญ่อยู่บริเวณปลายของโทรโคม มีเซลล์อะคินิตที่ผนังหนาอยู่ระหว่างเซลล์เฮเทอร์โรซิสต์ โดยมี *Anabaenopsis elenkinii* V.V. Miller (1923: 125) เป็นชนิดต้นแบบ [6] พบแพร่กระจายได้ในเขตร้อนในแหล่งน้ำที่มีปริมาณอาหารปานกลางถึงสูง พบได้ในลักษณะของแพลงก์ตอนบลูม [7-10] รายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสาหร่าย *Anabaenopsis* สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในด้านจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในปลาและมนุษย์สูงถึง 81.18 % รวมทั้งกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนั้นยังสามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารไฟโคไซยานิน [11] ขณะที่ Singh และคณะ [1] พบว่าสาหร่าย *Anabaenopsis* สามารถผลิตสารออกซิน (auxin) และสารจิบเบอเรลลิน (gibberellin) ที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaenopsis* จะเป็นแหล่งทางเลือกของการผลิตสารจากธรรมชาติเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมได้ แต่โดยส่วนใหญ่แล้วในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายนั้นไนโตรเจนถือเป็นปัจจัยสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่าย [5,12,13] ถึงแม้ว่าการเพิ่มไนโตรเจนอาจไม่มีความจำเป็นสำหรับกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศ แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าทั้ง

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถและไม่สามารถตรึงไนโตรเจนยังมีความต้องการสารไนโตรเจนในอาหาร ซึ่งจะช่วยให้ผลผลิตให้สูงขึ้น ดังนั้นการตรวจสอบปริมาณไนโตรเจนจึงเป็นปัจจัยแรกที่ต้องพิจารณาสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย [3,14,15]

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต จึงทำให้ประเทศไทยมีทรัพยากรชีวภาพความหลากหลายสูง ซึ่งเป็นฐานสำคัญต่อการพัฒนาประเทศไทย ทั้งการเกษตร อาหาร ยารักษาโรค และเศรษฐกิจ ในประเทศไทยพบสาหร่าย *Anabaenopsis* ได้ทั้งในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรือแหล่งน้ำธรรมชาติ [16,17] งานวิจัยที่ผ่านมาพบสาหร่าย *Anabaenopsis* sp. ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีความเค็มต่ำ (2.5-6.0 ppt) ในจังหวัดสุพรรณบุรีมีการแพร่กระจายสูงมากกว่า 10-20 % ของปริมาณแพลงก์ตอนทั้งหมดที่พบในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน [16] นอกจากการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญดังที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว สาหร่าย *Anabaenopsis* sp. จัดเป็นกลุ่มสาหร่ายที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศ ซึ่งอาจเป็นแหล่งอาหารธรรมชาติให้กับสัตว์น้ำ แต่การศึกษาและระบุชนิดร่วมกันระหว่างข้อมูลฐานฐานวิทยาและเทคนิคทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุล รวมทั้งการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายชนิดนี้ยังมีน้อย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบชนิดของสาหร่ายโดยใช้ข้อมูลทางฐานฐานวิทยาและเทคนิคทางวิวัฒนาการทางข้อมูลอนุชีววิทยาของสาหร่าย NUACC2.57 และประเมินการเจริญเติบโตการผลิตชีวมวลและองค์ประกอบสารชีวเคมีของสาหร่ายที่ศึกษาในสภาวะปริมาณไนโตรเจนต่างกัน ซึ่งความรู้ดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาคความหลากหลายของชนิดของสาหร่ายและแนวทางการเลือกใช้ประโยชน์จากสาหร่ายสำหรับอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อมต่อไปในอนาคต

## 2. วิธีการศึกษา

### 2.1 การคัดแยกและการเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย

เก็บตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำแม่ลา จังหวัดสิงห์บุรี ปริมาณ 50 L กรองผ่านถุงกรองแปลงกตอน ขนาดความถี่ตา 20  $\mu\text{m}$  แล้วคัดแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยวิธีการ micropipette ตาม Tawong [18] เซลล์เดี่ยวที่ได้เพาะเลี้ยงเริ่มต้นในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารสูตร BG11 [19] ที่ไม่มีการเติม  $\text{NaNO}_3$  ปริมาณ 5 mL ในสภาวะค่าความเป็นกรดต่าง 8.2 อุณหภูมิ 25  $^{\circ}\text{C}$  ให้แสงสีขาวที่ความเข้มแสงที่ 3,000 Lux ช่วงการให้แสงที่ 16 ชั่วโมงต่อวัน ต่อมาตรวจวัดความบริสุทธิ์ของหัวเชื้อสาหร่ายที่ใช้ทดลองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การคัดแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากแม่น้ำแม่ลา ไม่น้อยกว่า 30 สายพันธุ์ และพบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ NUACC 2.57 มีการเจริญเติบโตดี มีปริมาณชีวมวลสูงที่สุด จึงมีแนวโน้มว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรมและผลิตสารที่มีมูลค่า ดังนั้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ NUACC 2.57 จึงถูกคัดเลือกศึกษาในครั้งนี้ เมื่อเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจึงขยายขนาดการเลี้ยงเป็น 1 L ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเดิมให้อากาศตลอด 24 ชั่วโมง จนสาหร่ายมีความขุ่นเซลล์เริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 750 nm ( $\text{OD}_{750}$ ) เท่ากับ 1 ในปริมาณที่สาหร่ายเพียงพอจึงทดลองต่อไป

### 2.2 การระบุชนิดและสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

เซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ NUACC 2.57 ซึ่งอยู่ในระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) (ประมาณ 14 วัน) ถูกนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ Olympus รุ่น BX-50 พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ DP1 ตรวจวัดขนาด (ความยาว  $\times$

ความกว้าง) ของเซลล์ปกติ เซลล์เฮเทอร์โรซิสต์ และเซลล์อะคินิต จากเซลล์สาหร่ายอย่างน้อย 50 ไทโคม เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้ออกกับแนววิถิจำนวนของ Komárek [6] ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางอนุชีววิทยาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (หรือ PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอตามวิธีการของ Tawong [18] โดยใช้ไพรเมอร์ 16S 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 16S 809R (5'-GCTTCGGCAGGCTCGGGTCGAT-3') [20] ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ทำไปบริสุทธิ์ด้วยชุด Gel and PCR Clean-up จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี automate DNA sequencing โดยใช้ชุดไพเมอร์เดียวกับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสและนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายที่ใกล้เคียงจากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (basic local alignment search tool) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากสาหร่ายที่ศึกษา และของชนิดสาหร่ายที่ใกล้เคียงที่ได้รับจาก GenBank มาจัดเรียงโดยใช้วิธีการ MUSCLE วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุล และสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้วิธีการ maximum likelihood (ML) และ neighbor joining (NJ) วิเคราะห์ Bootstrap analyses 1,000 ครั้ง ในโปรแกรม MEGA X [21]

### 2.3 ผลของปริมาณไนโตรเจน ( $\text{NaNO}_3$ ) ต่อการเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวล และสารประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

วางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งชุดการทดลองโดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ NUACC 2.57 ในอาหารสูตร BG11 ที่มีปริมาณไนโตรเจนในรูป  $\text{NaNO}_3$  ต่างกัน แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ 0.0 (ชุดควบคุม), 1.5 และ 3.0 g/L

ทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำโดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 1 L บรรจุอาหารตามชุดทดลอง เติมหิวเชื้อสาหร่ายที่เตรียมไว้ 10 % ของปริมาตรการเลี้ยงทั้งหมด 500 mL ค่า OD<sub>750</sub> เริ่มต้น 0.1 และน้ำหนักชีวมวลเริ่มต้น 0.084 g DW/L สภาวะการเลี้ยงตามเช่นเดียวกับการเตรียมหิวเชื้อ พร้อมให้อากาศตลอด 24 ชั่วโมง เก็บข้อมูลทุก ๆ 3 วัน ได้แก่ การเจริญเติบโตจากข้อมูลของน้ำหนักผลผลิตชีวมวลด้วยการชั่งน้ำหนักแห้งตามวิธีการของ Nakthong [22] คำนวณอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด (growth rate;  $\mu$  max) และการผลิตชีวมวล (biomass productivity; g DW/L/day) ตามสมการที่อธิบายไว้โดย Zhang และคณะ [23] เมื่อครบระยะเวลาการเลี้ยงที่ 28 วัน เก็บเกี่ยวสาหร่ายทั้งหมดอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เวลา 12 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารรงควัตถุ ได้แก่ ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) แอลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) และไฟโคอีริทริน (phycoerythrin) ด้วยวิธีการสกัดการแช่เยือกแข็งสลับการละลาย [24] กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 จากนั้นจึงนำไปหมุนเหวี่ยงแล้วนำส่วนใสไปตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (Abs) 562, 615 และ 652 nm นำค่าที่ได้คำนวณตามสมการของ Bennett และ Bogorad [25] วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมดของสาหร่ายโดยใช้วิธีการ Lowry และคณะ [26] ชั่งสาหร่ายที่ผ่านการอบแห้ง 100 mg เติมสารละลาย 0.1 N NaOH ปริมาตร 5 mL นำไปแช่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 80 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อสกัดโปรตีน จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัด 0.2 mL เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 1 mL เติมสารละลาย alkaline copper sulphate ปริมาตร 4.5 mL และสารละลาย 1 N Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 mL บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750

nm เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนรวมโดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน และวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของสาหร่ายด้วยวิธี phenol-sulfuric acid ตามวิธีการของ DuBois และคณะ [27] โดยชั่งสาหร่ายที่ผ่านการอบแห้ง 100 mg เติมสารละลาย 2.5N HCl ปริมาตร 5 mL นำไปแช่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 100 °C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อสกัดคาร์โบไฮเดรตจากตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัด 0.2 mL เติมสารละลาย phenol 5 % ปริมาตร 1 mL และกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ปริมาตร 5 mL บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm เปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน ผลผลิตของปริมาณสารรงควัตถุ โปรตีนรวม และคาร์โบไฮเดรตรายงานในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

#### 2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลด้วยวิธี one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรม R-statistic version 3.2.4 [28]

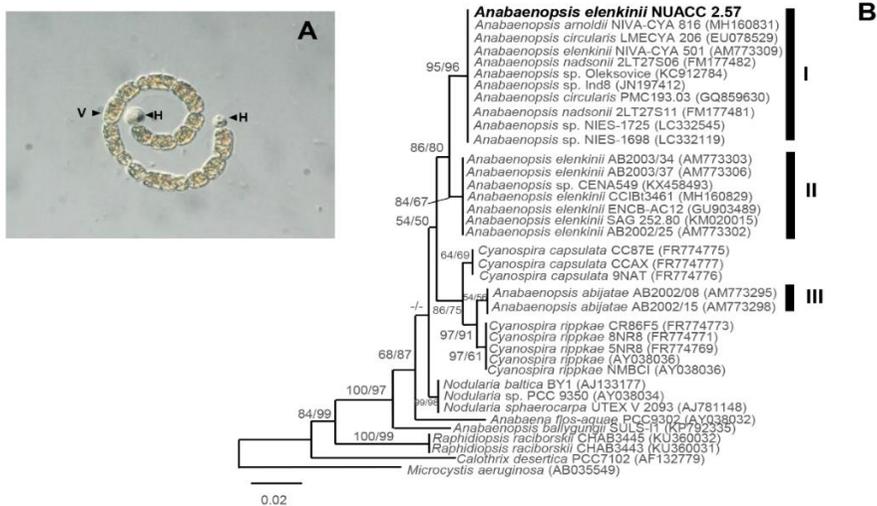
### 3. ผลการทดลอง

#### 3.1 ชนิดและสกุลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

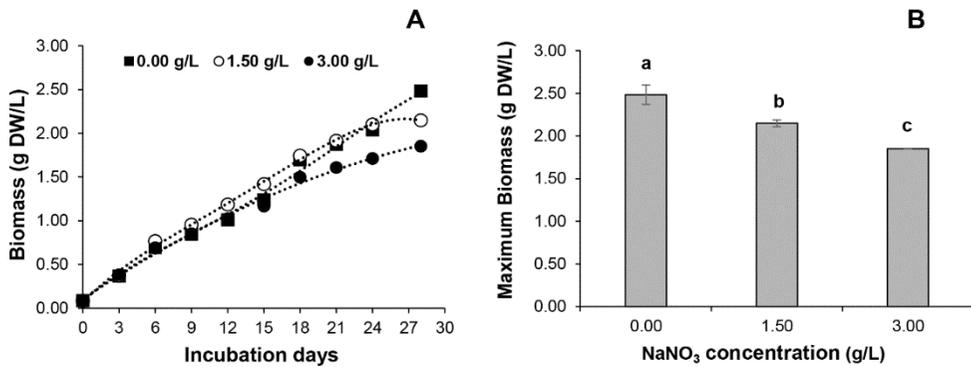
นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ NUACC 2.57 ที่คัดแยกได้จากแม่น้ำแม่ลา จังหวัดสิงห์บุรี มาจำแนกชนิดตามลักษณะสัณฐานวิทยา ร่วมกับการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA เมื่อพิจารณาลักษณะสัณฐาน

วิทยาของสาหร่ายสายพันธุ์ NUACC2.57 พบว่า ไทรโคมมีลักษณะเป็นเส้นสายขดกันเป็นเกลียว 1-2 ชั้น รูปร่างเซลล์ปกติทรงรียาวตัดปลาย (รูปที่ 1A) มีขนาดเซลล์ปกติ (ความยาว x ความกว้าง) เฉลี่ย 7.13 x 5.58  $\mu\text{m}$  มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง (L/W) เฉลี่ย 1.37 เซลล์เฮเทอโรซิสต์มีลักษณะกลมพบที่บริเวณปลายไทรโคมทั้งสองข้างหรือระหว่างกลางของเส้นไทรโคม มีขนาด (ความยาว x ความกว้าง) เฉลี่ย 5.93 x 5.49  $\mu\text{m}$  มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง (L/W) เฉลี่ย 1.09 ช่วงศึกษาสาหร่ายสายพันธุ์ NUACC 2.57 ไม่มีการผลิตเซลล์อะซีนิต เมื่อวินิจฉัยลักษณะสัณฐานวิทยาแล้วสอดคล้องกับลักษณะของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaenopsis elenkinii* [6] ขณะที่ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *16S rDNA* จากเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ NUACC 2.57 (ความยาว 699 คู่เบส) โดยวิธี BLAST

สามารถบ่งชี้ว่าสาหร่าย NUACC 2.57 จัดอยู่ในสกุล *Anabaenopsis* และมีค่าความเหมือน (% identity) สูงมากกว่า 98.5 % กับสาหร่าย *Anabaenopsis* sp. NIES-1725 และ *Anabaenopsis* sp. NIES-1698 จากแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *16S rDNA* แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสกุล *Anabaenopsis* แบ่งเป็น 3 กลุ่ม (clade I, II & III) (รูปที่ 1B) โดยสาหร่าย NUACC 2.57 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 (clade I) ร่วมกับ สาหร่าย *Anabaenopsis* ชนิดอื่น ๆ (ML = 95 และ NJ = 96) (รูปที่ 1B) ทำให้ไม่สามารถจำแนกสาหร่าย *Anabaenopsis* NUACC 2.57 ถึงระดับชนิด (species) ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *16S rDNA* ดังนั้นผลการศึกษาดังนี้จึงจำแนกชนิดของสาหร่าย *Anabaenopsis* NUACC 2.57 อ้างอิงข้อมูลทางสัณฐานวิทยา (morphotype) ภายใต้ชื่อ *A. elenkinii* NUACC2.57



**Figure 1** The morphological features of *Anabaenopsis elenkinii* NUACC 2.57 (A) and maximum likelihood (ML) phylogenetic tree analyzed based on the partial *16S rDNA* sequences among a new isolate and other cyanobacterial taxa (B). The tested strain was indicated by bold letter. *Microcystis aeruginosa* (AB035549) was used as an outgroup. Only bootstrap values >50 % from ML and NJ analyses were exhibited at nodes. H: heterocyst cell; V: vegetative cell.



**Figure 2** Growth characteristics (A) and the maximum biomass (B) of *Anabaenopsis elenkinii* NUACC 2.57 cultured in BG11 medium with the different NaNO<sub>3</sub> concentrations. Different letters (a, b and c) show significant differences ( $p < 0.05$ ).

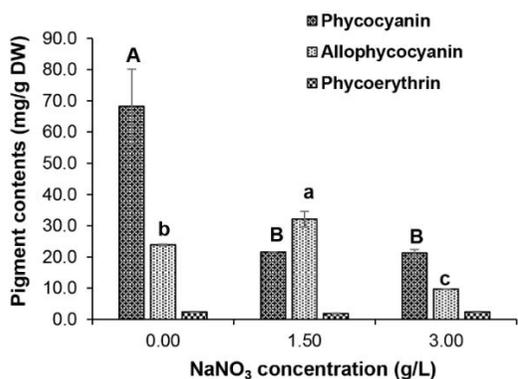
### 3.2 การเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวล และสารประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

เมื่อศึกษาผลของปริมาณไนโตรเจน (NaNO<sub>3</sub>) ที่ต่างกัน (0.0, 1.5 และ 3.0 g/L) ต่อการเจริญเติบโต ผลผลิตชีวมวลและสารประกอบชีวเคมีภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *A. elenkinii* NUACC2.57 พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ NUACC 2.57 แสดงการเจริญเติบโตได้ในทุกปริมาณไนโตรเจนที่ทดสอบ (รูปที่ 2A) โดยช่วงการเลี้ยงระหว่างวันที่ 0 ถึง 15 สาหร่ายทุกชุดการทดลองมีการเจริญเติบโตไม่ต่างกัน ขณะที่ช่วงการเลี้ยงระหว่างวันที่ 21 ถึง 28 สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจน 3.0 g/L มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นแต่จะช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในชุดทดลองอื่น ๆ และหลังจากระยะเวลาการเลี้ยงช่วงวันที่ 24 สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนที่ 0.0 g/L มีการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน (รูปที่ 2A) เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายจนครบ 28 วัน พบว่าปริมาณผลผลิตชีวมวลที่สูงที่สุดของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนในแต่ละระดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

( $p < 0.05$ ) โดยสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมไนโตรเจน (0.0 g/L) มีปริมาณผลผลิตชีวมวลมากที่สุด ( $2.48 \pm 0.07$  g DW/L) รองลงมา คือ สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจน 1.5 และ 3.0 g/L โดยมีค่า  $2.20 \pm 0.14$  และ  $1.85 \pm 0.01$  g DW/L ตามลำดับ (รูปที่ 2B) สอดคล้องกับค่าการผลิตชีวมวลของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมไนโตรเจน 0.0, 1.5 และ 3.0 g/L มีค่า  $0.086 \pm 0.004$ ,  $0.074 \pm 0.001$  และ  $0.064 \pm 0.001$  g DW/L/day ตามลำดับ ( $p < 0.05$ ) ขณะที่อัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด ( $\mu_{max}$ ) ของเซลล์สาหร่ายในแต่ละชุดการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) โดยมีค่า 0.50-0.52 /day

เมื่อตรวจสอบการสะสมของปริมาณรงควัตถุกลุ่มไฟโคบิลินโปรตีน ได้แก่ ไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริทริน หลังจากระยะเวลาการเพาะเลี้ยงครบ 28 วัน พบว่าปริมาณไฟโคไซยานินและอัลโลไฟโคไซยานินที่สะสมในสาหร่ายที่แต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 3) โดยปริมาณไฟโคไซยานินที่สูงที่สุดมาจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร

ที่ไม่เติมไนโตรเจน รองลงมา คือ สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจน 1.5 และ 3.0 g/L ตามลำดับ โดยมีค่า  $68.27 \pm 11.00$ ,  $21.62 \pm 0.00$  และ  $21.34 \pm 1.01$  mg/g DW ตามลำดับ ส่วนปริมาณอัลโลไฟโคไซยานินมีปริมาณมากที่สุดจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจน 1.5 g/L รองลงมา คือ สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.0 และ 3.0 g/L โดยมีค่า  $32.09 \pm 2.50$ ,  $23.86 \pm 0.28$  และ  $9.75 \pm 0.05$  mg/g DW ตามลำดับ ปริมาณไฟโคอิริทรินพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ของสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนที่ต่างกัน แต่พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ระดับ 0.0 g/L จะมีปริมาณไฟโคอิริทรินสูงสุด รองลงมา คือ สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจน 3.0 และ 1.5 g/L โดยมีค่า  $2.38 \pm 0.22$ ,  $2.36 \pm 0.28$  และ  $1.83 \pm 0.15$  mg/g DW ตามลำดับ (รูปที่ 3)



**Figure 3** Contents of phycocyanin (PC), allophycocyanin (APC) and phycoerythrin (PE) of *Anabaenopsis elenkinii* NUACC 2.57 cultured in BG11 medium with the different NaNO<sub>3</sub> concentrations. Different letters (a, b and c or A, B and C) in the same type show significant differences ( $p < 0.05$ ).

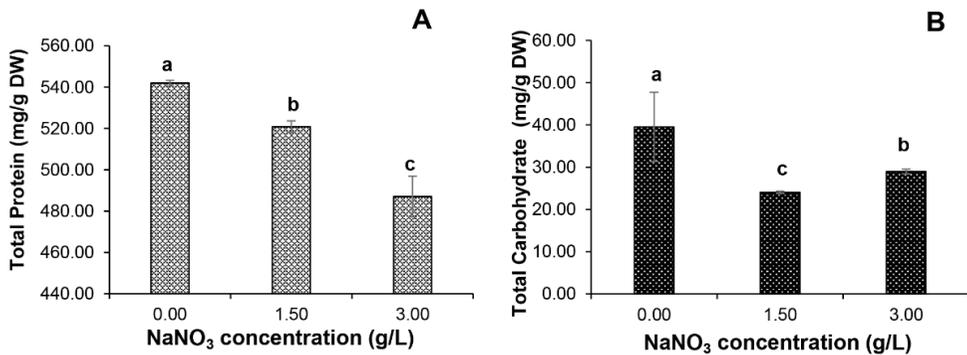
เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีนรวมและคาร์โบไฮเดรตที่สะสมภายในเซลล์ของสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่แต่ละชุดการทดลอง พบว่าปริมาณโปรตีนรวมและคาร์โบไฮเดรตมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีปริมาณไนโตรเจน มีปริมาณโปรตีนรวมสูงสุด รองลงมา คือ สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจน 1.5 และ 3.0 g/L โดยมีปริมาณโปรตีนรวม  $537.07 \pm 8.36$ ,  $520.83 \pm 2.87$  และ  $487.00 \pm 9.91$  mg/g DW ตามลำดับ (รูปที่ 4A) ขณะที่ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่สะสมภายในเซลล์ทุกชุดการทดลองมีน้อยกว่าปริมาณโปรตีนรวม โดยปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีสูงที่สุดจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน รองลงมา คือ สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ระดับ 3.0 และ 1.5 g/L โดยมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต  $39.55 \pm 8.19$ ,  $28.95 \pm 0.60$  และ  $24.05 \pm 0.23$  mg/g DW ตามลำดับ (รูปที่ 4B)

#### 4. วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันมีการสาหร่ายนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง ฉะนั้นการจำแนกชนิดสาหร่ายจึงมีความจำเป็นสำหรับการเลือกใช้นิเวศและสายพันธุ์ของสาหร่ายได้อย่างถูกต้อง โดยการจำแนกชนิดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินใช้วิธีการตรวจสอบทั้งทางลักษณะ สัณฐานวิทยาร่วมกับข้อมูลอนุชีววิทยาเพื่อความถูกต้องในการจำแนกชนิดมากที่สุด [29] การศึกษานี้การจำแนกชนิดของสาหร่าย NUACC2.57 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือก เนื่องจากที่มีอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณชีวมวลที่สูง มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สอดคล้องกับลักษณะของ *Anabaenopsis elenkinii* เช่น มีลักษณะไตรโคมส่วนใหญ่ขดเป็นวง เซลล์ปกติคล้ายกระสวยตัดปลายแคบขนาด (ความยาว x กว้าง)  $4-9 \times 4-6$   $\mu\text{m}$  เซลล์เฮเทอร์โรซิสต์กลมหรือรียาวยาว

เล็กน้อย ตามการวินิจฉัยของ Komárek [6] ขณะที่การปรากฏของเซลล์อะคินิตไม่พบระหว่างการศึกษาซึ่ง Santos และคณะ [8] รายงานว่าส่วนใหญ่เซลล์อะคินิตของสาหร่าย *A. elenkinii* ในแหล่งน้ำของประเทศบราซิลจะพบในธรรมชาติช่วงฤดูร้อน (อุณหภูมิ 25-32 °C) และมีความเป็นกรดต่าง 9.5-9.9 ซึ่งเป็นสภาวะเครียด สิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต จึงเป็นไปได้ว่าการศึกษานี้สาหร่ายที่ศึกษาไม่อยู่ในสภาวะที่เครียด ทำให้ไม่สร้างเซลล์อะคินิตออกมา การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S

*rDNA* ซึ่งเป็นข้อมูลอนุชีววิทยาพื้นฐานสำหรับการจำแนกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ขณะที่ผลของการศึกษาค้นคว้าสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S *rDNA* [7,9] หรือยีน *PC-IGS* [7] ไม่สามารถบ่งชี้ถึงระดับชนิดของสกุล *Anabaenopsis* ดังนั้นการเพิ่มสายพันธุ์ที่ตรวจสอบและการพัฒนาข้อมูลทางอนุชีววิทยาสำหรับการจำแนกชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในพื้นที่อื่น ๆ จึงจำเป็นเพื่อช่วยแก้ไขระบบการจำแนกสาหร่ายสกุล *Anabaenopsis* ได้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น



**Figure 4** Total protein (A) and carbohydrates (B) contents of *Anabaenopsis elenkinii* NUACC 2.57 cultured in BG11 medium with the different NaNO<sub>3</sub> concentrations. Different letters (a, b and c) in each parameters show significant differences ( $p < 0.05$ ).

การศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นปริมาณของไนโตรเจนที่ต่างกันมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *A. elenkinii* NUACC2.57 โดยไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่เป็นแหล่งสร้างพลังงานและสารประกอบที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ ผลของการศึกษาค้นคว้านี้พบว่า *A. elenkinii* NUACC2.57 มีการเจริญเติบโต ปริมาณผลผลิตชีวมวล และสารประกอบชีวเคมีที่สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีไนโตรเจน คล้ายคลึงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Nostoc* LAUN005 และ *Nostoc* UAM206 ที่ให้ปริมาณชีวมวล  $1.32 \pm 0.12$  และ  $1.56 \pm$

$0.16$  mg/g DW ตามลำดับ ในสภาวะการเลี้ยงที่ไม่เติม NaNO<sub>3</sub> ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ ในสภาวะที่เติม NaNO<sub>3</sub> ปริมาณ 2.20 g/L ที่ให้ปริมาณชีวมวลเพียง  $0.98 \pm 0.13$  และ  $1.09 \pm 0.12$  mg/g DW ตามลำดับ [3] แสดงให้เห็นว่าสาหร่าย *A. elenkinii* NUACC2.57 มีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจนในอากาศได้ดีกว่าการใช้ไนโตรเจนในสูตรอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่ากลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ที่ช่วยตรึงไนโตรเจนจากอากาศและนำไปใช้ในการเจริญ

เติบโตได้เช่นเดียวกับสาหร่าย *Nostoc commune* สามารถตรึงไนโตรเจนมากที่สุด 6.35 nmole C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/hr/mg DW (0.059 mg-N/hr/mg DW) [30] ขณะที่สาหร่าย *Anabaena volzii* S5 และ *Calothrix* sp. S3 สามารถตรึงไนโตรเจนสูงสุด 0.70 และ 0.66 nmole C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/hr/mg DW ตามลำดับ (0.0065 และ 0.0061 mg-N/hr/mg DW ตามลำดับ) [31] ซึ่งต่างกันอย่างชัดเจนกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน เช่น *Oscillatoria willei* BDU 130511 ที่พบว่าเมื่อนำมาเลี้ยงในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนจะทำให้ชีวมวลและสารองค์ประกอบทางชีวเคมี (ไฟโคบิลิน โพรตีน โปรตีน และไขมัน) ลดลงอย่างชัดเจน [14] อย่างไรก็ตาม แม้ว่ากลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนบางชนิด เช่น สาหร่าย *Anabaena* sp. [3] มีปริมาณชีวมวลและองค์ประกอบทางเคมีสูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าลักษณะการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนั้นมีความแตกต่างกัน ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจึงควรคำนึงถึงระดับไนโตรเจนที่เหมาะสมรวมทั้งปัจจัยการเพาะเลี้ยงอื่น ๆ เช่น ความเข้มแสง อุณหภูมิ และความเป็นกรดเป็นด่าง เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตชีวมวลให้สูงขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบสารประกอบทางเคมีพบว่าสาหร่าย *A. elenkinii* NUACC2.57 ที่เลี้ยงในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนมีปริมาณไฟโคไซยานิน โพรตีนรวม และคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าในสภาวะการเลี้ยงที่มีไนโตรเจน ซึ่งลักษณะนี้สามารถพบได้ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลาย ๆ ชนิดเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ขาดสารอาหาร [3,32] โดยทั่วไปแล้วการผลิตไฟโคไซยานินจะลดต่ำลงในสภาวะที่ที่ขาดไนโตรเจนเนื่องจากสาหร่ายจะนำไนโตรเจนไปใช้ในการเจริญเติบโต [33] ขณะที่ ปริมาณไฟโคไซยานินของ *A. elenkinii*

NUACC2.57 เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่ไม่เติมไนโตรเจน แสดงให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงอากาศเพียงพอต่อการเจริญเติบโต และเป็นไปได้ว่ามีปริมาณความเข้มข้นเซลล์สูงทำให้เกิดการบดบังแสงทำให้เซลล์เร่งสร้างไฟโคไซยานินขึ้นมาเพื่อปกป้องตัวเองจากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีความเครียดจากปริมาณแสงต่ำ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไฟโคไซยานินของสาหร่าย *A. elenkinii* NUACC2.57 ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าใกล้เคียงกับการผลิตไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Euhalothece* sp. (75 mg/g DW) [34] *Synechococcus* sp. (41.1-102.4 mg/g DW) [35] แต่ยังมีน้อยกว่าสาหร่าย *Spirulina platensis* (176 mg/g DW) [36] และ *Limnothrix* sp. 37-2-1 (180 mg/g DW) [37] อย่างไรก็ตาม การผลิตไฟโคไซยานินของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ สายพันธุ์ ปริมาณแสง ระยะเวลาการให้แสง เป็นต้น จึงควรศึกษาปัจจัยการเลี้ยงอื่น ๆ ร่วมด้วยต่อไป

นอกจากนี้พบว่าปริมาณโปรตีนรวมและคาร์โบไฮเดรตของ *A. elenkinii* NUACC2.57 เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่ไม่เติมไนโตรเจน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Vargas และคณะ [12] ซึ่งรายงานกว่า *Anabaenopsis* sp. ที่คัดแยกจากชายฝั่งของทะเลสาบ Albufera de Valencia ประเทศสเปน ช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตคงที่สาหร่ายมีการสะสมสารประกอบชีวเคมี ได้แก่ โปรตีนรวมและคาร์โบไฮเดรตในเซลล์ 522 และ 163 mg/g DW นอกจากนี้สายพันธุ์ NUACC2.57 ยังมีปริมาณโปรตีนรวมใกล้เคียงกับสาหร่ายชนิดอื่น ๆ เช่น *Anabaena cylindrica* (430-560 mg/g DW), *Aphanizomenon flos-aquae* (620 mg/g DW), *Spirulina platensis* (558 mg/g DW), *Chlorella vulgaris* (533 mg/g DW), *Dunaliella salina* (570 mg/g DW) และ *Secene-*

*desmus obliquus* (480-550 mg/g DW) [38] นอกจากนี้ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตยังเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับ Hu [39] ที่พบว่าในสภาวะการเลี้ยงที่ขาดไนโตรเจนสามารถกระตุ้นให้สาหร่ายเกิดการสะสมคาร์โบไฮเดรต ซึ่งพบได้ในกลุ่มสาหร่ายที่มีการผลิตโพลีแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ได้แก่ *Merimopedia tenuisima* [40], *Anabaena* sp. [41] และ *Oscillatoria* sp. [42] เป็นต้น ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนรวมและคาร์โบไฮเดรตของสาหร่าย *A. elenkinii* NUACC2.57 ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนเกี่ยวข้องกับความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศของสาหร่ายมาใช้ได้ดีกว่าการใช้ไนโตรเจนในรูป  $\text{NaNO}_3$  และเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียที่เซลล์สาหร่ายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อการเจริญเติบโต และยังเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนสะสมภายในเซลล์ และกระตุ้นการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตสะสมเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการดำรงชีวิต [43] เมื่อพิจารณาผลการศึกษาค้นคว้านี้พบว่าเป็นประโยชน์ในการผลิตโปรตีน คาร์โบไฮเดรต หรือปริมาณไฟโคไซยานินจากสาหร่ายในระดับอุตสาหกรรม โดยช่วยลดต้นทุนของอาหารที่มีไนโตรเจนต่ำต่อไปในอนาคต

## 5. สรุป

สาหร่ายสายพันธุ์ NUACC 2.57 ที่คัดแยกจากแม่น้ำแม่เฒ่า จังหวัดสิงห์บุรี เมื่อจำแนกชนิดโดยใช้ในการตรวจสอบลักษณะสัญญาณวิทยาและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *16S rDNA* พบว่าสายพันธุ์ NUACC 2.57 จัดอยู่ในสกุล *Anabaenopsis* และมีลักษณะสัญญาณวิทยาที่สอดคล้องกับสายหว่าย *A. Elenkinii* ดังนั้นจึงสามารถจำแนกสาหร่ายที่ทดสอบในชื่อ *A. elenkinii* NUACC 2.57 เมื่อทดสอบการการเจริญเติบโตและองค์ประกอบสารชีวเคมีของสาหร่าย *A. elenkinii* NUACC 2.57 ในอาหาร BG ที่มีปริมาณ

ไนโตรเจนต่างกัน (0.0, 1.5 และ 3.0 g/L) เป็นระยะเวลาการเลี้ยง 28 วัน สาหร่ายสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถเจริญเติบโตในทุกความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ศึกษา แต่พบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดไนโตรเจนมีผลผลิตชีวมวล ปริมาณไฟโคไซยานิน ปริมาณโปรตีนรวม และปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุด ( $p < 0.05$ ) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *A. elenkinii* NUACC 2.57 จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถใช้การผลิตสารที่มีมูลค่า ได้แก่ ไฟโคไซยานิน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในระดับอุตสาหกรรม รวมทั้งสามารถช่วยลดต้นทุนของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงที่มีไนโตรเจนต่ำ

## 6. References

- [1] Singh, J.S., Kumar, A., Rai, A.N. and Singh, D.P., 2016, Cyanobacteria: A precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability, *Front. Microbiol.* 7: 529.
- [2] Ooms, M.D., Dinh, C.T., Sargent, E.H. and Sinton, D., 2016, Photon management for augmented photosynthesis, *Nature Comm.* 7: 12699.
- [3] Rosales Loaiza, N., Vera, P., Aiello-Mazzarri, C. and Morales, E., 2016, Comparative growth and biochemical composition of four strains of *Nostoc* and *Anabaena* (Cyanobacteria, Nostocales) in relation to sodium nitrate, *Acta Biol. Colomb.* 21: 347-354.
- [4] Rajneesh, P.J., Maurya, P.K., Singh, S.P., Häder, D.P. and Sinha, R. P., 2018, Cyanobacterial farming for environment

- friendly sustainable agriculture practices: Innovations and perspectives, *Front. Environ. Sci.* 6: 7.
- [5] Rasmussen, R.S. and Morrissey, M.T., 2007, Marine biotechnology for production of food ingredients, *Adv. Food Nutr. Res.* 52: 237-292.
- [6] Komárek, J., 2005, Phenotype diversity of the heterocytous cyanoprokaryotic genus *Anabaenopsis*, *Czech Phycology, Olomouc* 5: 1-35.
- [7] Ballot, A., Dadheech, P.K., Haande, S. and Krienitz, L., 2008, Morphological and phylogenetic analysis of *Anabaenopsis abijatae* and *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales, Cyanobacteria) from tropical inland water bodies, *Microbial. Ecol.* 55: 608-618.
- [8] Santos, K.R.S., Jacinavicius, F.R. and Sant'Anna, C.L., 2011, Effects of the pH on growth and morphology of *Anabaenopsis elenkinii* Miller (Cyanobacteria) isolated from the alkaline shallow lake of the Brazilian Pantanal, *Fottea* 11: 119-126.
- [9] Krienitz, L., Dadheech, P.K. and Kotut, K., 2013, Mass developments of the cyanobacteria *Anabaenopsis* and *Cyanospira* (Nostocales) in the soda lakes of Kenya: ecological and systematic implications, *Hydrobiologia* 703: 79-93.
- [10] Aguilera, A., Komárek, J. and Echenique, R.O., 2016, *Anabaenopsis* morphospecies (Cyanobacteria, Nostocales) from Los Patos shallow lake (province of Buenos Aires, Argentina), *Phytotaxa* 272: 173-183.
- [11] Asan-Ozusaglam, M., Cakmak, Y.S. and Kaya, C., 2013, Bioactivity and antioxidant capacity of *Anabaenopsis* sp. (Cyanobacteria) extracts, *J. Algal Biomass Utiln.* 4: 50-58.
- [12] Vargas, M.A., Rodriguez, H., Moreno, J., Olivares, H., del Campo, J.A., Rivas, J. and Guerrero, M.G., 1998, Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria, *J. Phycol.* 34: 812-817.
- [13] Liu, Y., Chen, T., Song, S. and Li, C., 2019, Variation in biochemical composition during encystment of the planktonic dinoflagellate *Akashiwo sanguinea* in N-limited cultures, *Mar. Biol.* 166: 120.
- [14] Saha, S.K., Uma, L. and Subramanian, G., 2003, Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511, *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 263-272.
- [15] Patel, V.K., Sundaram, S., Patel, A.K. and Kalra, A., 2018, Characterization of seven species of cyanobacteria for high-quality biomass production, *Arab. J. Sci. Eng.* 43: 109-121.
- [16] Pluemsab, W., Charoenhongthong, M., Purungcharoen, J. and Vongyara, T., 2001, Distribution of cyanobacteria in shrimp ponds, Supanburi province, pp. 161-167, *Proceeding of the 39th Kasetsart*

- University Annual Conference: Sciences, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- [17] Chaicharoen, R. , 2016, Diversity of phytoplankton and zooplankton in Bang Phra Reservoir, Burapha Sci. J. 21(3): 58-72. (in Thai)
- [18] Tawong, W., 2017, Diversity of the potential 2- methylisoborneol- producing genotypes in Thai strains of *Planktothricoides* (Cyanobacteria), Braz. Arch. Biol. Technol. 60: e17160567.
- [19] Andersen, R. A. , 2005, Algal Culturing Techniques, Elsevier Academic Press, New York, 578 p.
- [20] Jungblut, A.D., Hawes, I., Mountfort, D., Hitzfeld, B., Dietrich, D.R., Burns, B.P. and Neilan, B.A., 2005, Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica, Environ. Microbiol. 7: 519-529.
- [21] Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. , 2018, MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, Mol. Biol. Evol. 35: 1547-1549.
- [22] Nakthong, K., 2013, Optimization and Production of Phycocyanin from Cyanobacterium *Oscillatoria* sp., Master Thesis, Srinakharinwirot University, Bangkok, 89 p.
- [23] Zhang, J.Y. , Lin, G.M. , Xing, W.Y. and Zhang, C.C. , 2018, Diversity of growth patterns probed in live cyanobacterial cells using a fluorescent analog of a peptidoglycan precursor, Front. Microbiol. 9: 791.
- [24] Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U. and Madamwar, D., 2006, Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix*, Proc. Biochem. 41: 2017-2023.
- [25] Bennett, A. and Bogorad, J., 1973, Complementary chromatic adaptation in filamentous blue-green alga, J. Cell Biol. 58: 419-435.
- [26] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- [27] DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Anal. Chem. 28: 350-356.
- [28] R Development Core Team, 2009, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Available Source: <http://www.R-project.org>, June 1, 2019.
- [29] González-Resendiz, L., Johansen, J.R., Alba-Lois, L., Segal-Kischinevzky, C., Escobar-Sánchez, V., Garcia, L.F.J., Hauer, T. and León-Tejera, H., 2018, *Nunduva*, a new marine genus of Rivulariaceae (Nostocales, Cyanobacteria) from marine rocky shores, Fottea, Olomouc 18: 86-105.

- [30] Anjana, K., Kiran, B., Mona, S. and Kaushik, A., 2012, Biological photohydrogen production by Cyanobacteria: Future prospects as fuel, *J. Environ. Res. Devel.* 6: 779-783.
- [31] Tassayanonchai, A. and Mala, T., 2015, The selection of some heterocystous cyanobacteria as nitrogen source for rice growing cultivation, *J. Sci. Technol. Kasetsart Univ.* 4(3): 1-12. (in Thai)
- [32] Otero, A. and Vincenzini, M., 2003, Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity, *J. Biotechnol.* 102: 143-152.
- [33] Lewitus, A.J. and Caron, D.A., 1990, Relative effects of nitrogen or phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation chemical composition, and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae), *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61: 171-181.
- [34] Mogany, T., Kumari, S., Swalaha, F.M. and Bux, F., 2018, Extraction and characterization of analytical grade C- phycocyanin from *Euhalothece* sp., *J. Appl. Phycol.* 31: 1661-1674.
- [35] Takano, H., Arai, T., Hirano, M. and Matsunaga, T., 1995, Effects of intensity and quality of light on phycocyanin production by a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 042902, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 1014-1018.
- [36] Güroy, B., Karadal, O., Mantoğlu, S. and Cebeci, I.O., 2017, Effects of different drying methods on C-phycocyanin content of *Spirulina platensis* powder, *Ege. J. FAS.* 34: 129-132.
- [37] Gantar, M., Simović, D., Djilas, S. and Gonzalez, W.W., Mikšovska, J., 2012, Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1, *J. Biotechnol.* 159: 21-26.
- [38] Barka, A. and Blecker, C., 2016, Microalgae as a potential source of single-cell proteins, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 20: 427-436.
- [39] Hu, Q., 2004, Environmental Effects on Cell Composition, pp. 83-94, In Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture, Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Publishers, Oxford.
- [40] Konopka, A. and Schnur, M., 1981, Biochemical composition and photosynthetic carbon metabolism of nutrient limited cultures of *Merismopedia tenuissima* (Cyanophyceae), *J. Phycol.* 17: 118-122.
- [41] Singh, S. and Das, S., 2011, Screening, production, optimization and characterization of cyanobacterial polysaccharide, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1971-1980.
- [42] Jindal, N., Singh, D. and Khattar, J., 2011, Kinetics and physico-chemical characterization of exopolysaccharides produced

- by the cyanobacterium *Oscillatoria Formosa*, World J. Microbiol. Biotechnol. 27: 2139-2146.
- [43] de Philippis, R., Sili, C., Paperi, R. and Vincenzini, M., 2001, Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review, J. Appl. Phycol. 13: 293-299.