การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถสร้างโปรตีนและมวลชีวภาพสูง
Selection of Nitrogen Fixing Cyanobacteria Strains for High Biomass and Protein Production

ประไพ ทองระอา[1] สมปอง หมื่นแจ้ง[1] ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต[1] กัลยกร โปร่งจันทึก[1]

บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria) เป็นปุ๋ยชีวภาพที่ช่วยเพิ่มไนโตรเจนให้แก่ดินและพืช โดยเฉพาะพวกที่มีเฮเทอโรซีสต์ที่ดำรงชีวิตอยู่อย่างอิสระ(free-living cyanobacteria) สามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ การรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อให้ได้สกุล ชนิด สายพันธุ์ ที่มีความหลากหลายในด้านการสร้างปริมาณโปรตีน และมวลชีวภาพได้ดี ได้ทำการรวบรวมจากห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร ซึ่งแยกเชื้อได้จากดินนา รากข้าว และพื้นที่ปลูกพืชไร่ จำนวน 8 สกุล 58 สายพันธุ์ และของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 8 สกุล 11 สายพันธุ์ รวม 69 สายพันธุ์ ทุกสายพันธุ์ถูกนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนสูตร BG-11 นาน 30 วัน จากนั้นนำซัสเพนชั่นเชื้อที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน และน้ำหนักแห้ง ที่สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างได้ นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจเบื้องต้นหาสารคล้าย IAA (indole-3-acetic acid)ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืช ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถสร้างโปรตีนและมวลชีวภาพได้ดี มีจำนวน 4 สกุล รวม 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สกุล *Anabaena, Calothrix, Hapalosiphon* และ *Nostoc* โดยมีปริมาณโปรตีน และน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 200.5-298.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.80-1.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสายพันธุ์ที่สร้างโปรตีนและน้ำหนักแห้งได้สูงสุดมีจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Anabaena cylindrica* DASH N01101 และ *Hapalosiphon* sp. DASH N05101 ส่วนผลการตรวจหาการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ พบว่ามีสาหร่ายจำนวน 4 สกุล รวม 10 สายพันธุ์ ตรวจพบสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง และทุกสายพันธุ์ให้ความเข้มของสีปฏิกิริยาอ่อนหรือตรวจพบน้อย

[1] สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

คำนำ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria) ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ที่ดำรงชีวิตอยู่อย่างอิสระจะเป็นประโยชน์แก่พืชได้เมื่อถูกจุลินทรีย์ย่อยสลายเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนให้แก่พืช ซึ่งความเป็นประโยชน์แก่พืชจะมากหรือน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสกุล ชนิด และสายพันธุ์ของสาหร่ายที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ แล้วเปลี่ยนเป็นโปรตีนภายในเซลล์ นอกจากนี้ความสามารถในการเจริญเติบโตเพื่อสร้างมวลชีวภาพก็มีความสำคัญ เนื่องจากจะสามารถพัฒนาการเพาะเลี้ยงขยายไปสู่ระบบที่มีขนาดใหญ่ขึ้นได้ นอกจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะให้ไนโตรเจนแก่พืชแล้ว ยังมีข้อสงสัยว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถสร้างสารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืช (PGRs)ได้ (Whitton, 2000) ซึ่งจากการตรวจเอกสารงานวิจัยเกี่ยวกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในช่วงปี 2000 เป็นต้นมา พบว่ามักศึกษาถึงอิทธิพลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในการช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว การปรับปรุงการงอกของเมล็ดพืชอื่นๆ นอกจากนั้นยังมีการทดสอบระดับเรือนทดลองและสภาพไร่นา กับข้าวและพืชผักอื่นๆ ซึ่งพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของผลผลิตแต่ไม่สามารถอธิบายได้ด้วยการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่างๆ เพียงอย่างเดียว (Roger, 1995) ดังนั้นจึงได้ทำการรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากแหล่งต่างๆ นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและมวลชีวภาพที่สาหร่ายผลิตได้ คัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างโปรตีนและมวลชีวภาพได้สูง ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมเพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ในการพัฒนาเป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่อไป นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจเบื้องต้นหาสายพันธุ์สาหร่ายที่สามารถปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยงได้ เพื่อให้ได้ข้อมูลของสายพันธุ์สำหรับใช้ในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ตู้เขี่ยเชื้อ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องบดเนื้อเยื่อ (Tissue glider)

2.เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ หลอดทดสอบ (test tube) ที่ดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (auto pipette) ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)

3. สารเคมีชนิด Analytical grade

-สำหรับวิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ Sodium chloride, Copper sulphate, Sodium potassium tratrate, Sodium hydroxide, Sodium carbonate, Folin- Ciocalteau reagent และ Bovine Serum Albumin (BSA) และสำหรับวิเคราะห์สารคล้าย indole-3 – acetic acid ได้แก่ DL-tryptophan, indole-3-acetic acid(IAA) และ Ferricchloride

4.ซัสเพนชั่นเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบริสุทธิ์ จำนวน 69 สายพันธุ์

วิธีการ

1. การรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

รวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากห้องปฏิบัติการสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตรที่ได้แยกเชื้อจากตัวอย่างดินนา รากข้าว และดินที่ปลูกพืชไร่ และทำการจำแนกเชื้อโดยวิธีสัณฐานวิทยา ได้จำนวน 8 สกุล 58 สายพันธุ์ ได้แก่ สกุล *Anabaena , Calothrix Cylindrospermum, Fischerella, Hapalosiphon, Nostoc, Scytonema* และ *Tolypothrix* และได้ทำการจัดซื้อสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 8 สกุล 11 สายพันธุ์ ได้แก่ สกุล *Anabaena , Calothrix Cylindrospermum, Fischerella, Hapalosiphon, Nostoc, Tolypothrix* และ *Stigonema* รวมมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 9 สกุล 69 สายพันธุ์ สำหรับใช้ในการทดลอง

2. การวัดปริมาณโปรตีนและมวลชีวภาพ

2.1 การเพาะเลี้ยงสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและมวลชีวภาพ

นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบริสุทธิ์ที่รวบรวมได้จำนวน 69 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนสูตร BG-11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่หัวเชื้อตั้งต้น(Starter) จำนวน 1 มิลลิลิตร ทำจำนวน 3 ซ้ำ ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสภาพควบคุม โดยให้แสงที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ และอุณหภูมิ 25+1 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะเจริญเติบโตจะได้ซัสเพนชั่นเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

2.2 การวิเคราะห์โปรตีน

ดำเนินการตามวิธีการของ Lowry *et al*. (1951) โดยนำซัสเพนชั่นเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 40 มิลลิลิตร มาปั่นตกตะกอน นำตะกอนเซลล์ที่ได้ละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85 % จำนวน 0.9 มิลลิลิตร และเติม 1 N NaOH 0.1 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปบดเซลล์ด้วยเครื่องบดเนื้อเยื่อ และนำไปต้มนาน 5 นาที ปรับปริมตรให้ได้ 1มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ใส่สารละลาย C (สารละลาย Na หรือ K Tartrate 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลาย $CuSO_4$ 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำส่วนผสมนี้ จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 50 มิลลิลิตร ของสารละลาย $NaCO_3$ 2 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 N NaOH) ลงในหลอดตัวอย่าง หลอดละ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 10 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteau reagent(ผสมน้ำ 1:1) หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกันทันที และตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที วัดความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้ NaOH 0.1 N เป็น Blank เปรียบเทียบกับ Standard curve ของปริมาณ

โปรตีนจาก Bovin Serum Albumin(BSA) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ รายงานผลเป็นหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณมวลชีวภาพ

ทำโดยวิธีการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินตามวิธีการของ ประกิต (2536) โดยกรองซัสเพนชั่นเชื้อสาหร่ายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 (ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และทราบน้ำหนักแน่นอน) นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำการชั่งหาปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้ รายงานผลเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร

3. การตรวจพบสารคล้าย IAA (indole-3-acetic acid) ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อตรวจหาสารคล้าย IAA ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์(exogenous)

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 69 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจนสูตร BG-11 ที่เติมสาร DL-tryptophan 0.5 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพควบคุมเช่นเดียวกับข้อ 2.1 นาน 21 วัน (Sergeeva *et al*., 2002) นำซัสเพนชั่นเชื้อที่ได้มาทำการปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บ culture supernatant สำหรับตรวจวัดเบื้องต้นหาสารคล้าย IAA ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์

3.2 การทำปฏิกิริยาด้วย Salkowski reagent

Salkowski–positive indolic compounds เป็นสารประกอบที่คล้ายกับเป็นตัวแทนของออกซิน (Glickmann and Dessaus, 1995) ในการทำปฏิกิริยาทำโดยผสม culture supernatant กับ Salkowski reagent (ตามวิธีของ Crozier *et al*., 1988) ในสัดส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่สภาพอุณหภูมิห้อง นำไปบ่มในที่มืดนาน 20 นาที ทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของสารคล้ายออกซินที่เกิดขึ้นโดยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 530 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับคอนโทรลที่ใช้อาหารที่ไม่เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ผสมกับ Salkowski reagent โดยแทนสัญลักษณ์ความเข้มสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ดังนี้คือ +++ = เข้มมาก, ++ = ปานกลาง, + = อ่อน และ - = ไม่ทำปฏิกิริยา

ระยะเวลา ตุลาคม 2553 - กันยายน 2554

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สร้างโปรตีนและมวลชีวภาพสูง

จากผลค่าวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (protein content) และปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 9 สกุล รวม 69 สายพันธุ์ พบว่า มีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 4 สกุล 10 สายพันธุ์ ที่มี

ปริมาณโปรตีนสูงและสร้างน้ำหนักแห้งได้ดี ได้แก่ สกุล *Anabaena, Calothrix, Hapalosiphon* และ *Nostoc* ซึ่งคิดเป็นเพียงร้อยละ 14.5 ของปริมาณสาหร่ายทั้งหมดโดยมีปริมาณโปรตีน และน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 200.5-298.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.80-1.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ตรวจพบดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่พบในทะเลซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.1-0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Azra and Pirzada, 2004) และสายพันธุ์ที่สามารถสร้างโปรตีนและน้ำหนักแห้งได้สูงสุดมีจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Anabaena cylindrica* DASH N01101 และ *Hapalosiphon* sp. DASH N05101 (ตารางที่1) ส่วนสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุลอื่นๆ ได้แก่ *Cylindrospermum, Fischerella, Scytonema, Tolypothrix* และ *Stigonema* สามารถสร้างโปรตีนและน้ำหนักแห้งได้ปานกลางถึงต่ำ (ตารางผนวกที่1-4) ซึ่งจากข้อมูลข้างต้นสามารถคัดเลือกสกุลและสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ดีสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์หัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่อไป

ตารางที่ 1 สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถสร้างโปรตีนและมวลชีวภาพสูง โดยกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ

สกุล/ชนิด/สายพันธุ์	ปริมาณน้ำหนักแห้ง(กรัม/ลิตร) เมื่ออายุ 30 วัน	ปริมาณโปรตีน(ไมโครกรัม/มล.) เมื่ออายุ 30 วัน
Anabaena		
Anabaena cylindrica DASH N01101	0.94	298.0
Anabaena siamensis DASH 01201	0.92	209.2
Calothrix		
Calothrix sp. DASH 02107	0.85	219.4
Calothrix sp. DASH 02109	0.85	200.5

Hapalosiphon		
Hapalosiphon sp. DASH N05101	1.00	285.4
Nostoc		
Nostoc sp. DASH 06125	0.87	223.0
Nostoc sp. DASH 06144	0.86	260.5
Nostoc sp. DASH N06125	0.85	241.0
Nostoc sp. DASH N06151	0.80	200.5
Nostoc sp. DASH N061*53*(No.15)	0.85	227.2

DASH = สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร

2. การตรวจพบสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ผลการตรวจพบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยการทำปฏิกิริยาด้วย Salkowski reagent พบว่าในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 9 สกุล รวม 69 สายพันธุ์ สามารถตรวจพบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพียง 4 สกุล รวม 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สกุล *Anabaena* 1 สายพันธุ์ สกุล *Calothrix* 2 สายพันธุ์ สกุล *Nostoc* 6 สายพันธุ์ และสกุล *Tolypothrix* 1 สายพันธุ์ โดยทุกสายพันธุ์ให้ความเข้มข้นของสีปฏิกิริยาอ่อน ซึ่งหมายความว่ามีการปลดปล่อยปริมาณน้อย (ตารางที่ 2) และจากข้อมูลข้างต้นจะสังเกตได้ว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ที่สามารถสร้างโปรตีนและมวลชีวภาพสูงจะตรวจไม่พบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง(ยกเว้น *Nostoc* sp. DASH 06125 ที่มีการตรวจพบทั้งหมด) ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแต่ละสกุล/สายพันธุ์ มีความสามารถในการเปลี่ยนทริปโตเฟน(tryptophan)ไปเป็น IAA ได้แตกต่างกัน (สมบุญ, 2544) และจากผลการทดลองข้างต้นให้ผลคล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Sergeeva *et al*.(2002) ที่ตรวจพบสารคล้าย IAA ในสาหร่ายสกุล *Calothrix* 2 สายพันธุ์ และ *Nostoc* 2 สายพันธุ์ คือ *Calothrix* PCC 7504 *Calothrix* PCC 7103 *Nostoc* PCC 6310 และ *Nostoc* 268 แต่ตรวจไม่พบในสาหร่ายสกุล *Fischerella* และ *Scytonema*

ตารางที่ 2 สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรวจพบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เมื่ออายุ 21 วัน

สกุล/ชนิด/สายพันธุ์	การตรวจพบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง (Auxin-like Salkowski reaction)
Anabaena	
Anabaena siamensis TISTR 8012	+

Calothrix	
Calothrix sp. DASH 02101	+
Calothrix sp. DASH 02105	+
Nostoc	
Nostoc sp. DASH 06125	+
Nostoc sp. DASH 06148	+
Nostoc sp. DASH N06116	+
Nostoc sp. DASH N06122	+
Nostoc sp. DASH N06146	+
Nostoc entophylum TISTR 8161	+
Tolypothrix	
Tolypothrix sp. TISTR 8256	+

สัญลักษณ์แทนความเข้มสีของปฏิกิริยา : + = อ่อน

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1.สามารถคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถสร้างโปรตีนและมวลชีวภาพได้ดี ได้จำนวน 4 สกุล รวม 10 สายพันธุ์ ได้แก่สกุล *Anabaena, Calothrix, Hapalosiphon* และ *Nostoc* โดยมีปริมาณโปรตีน และน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 200.5-298.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.80-1.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสายพันธุ์ที่สร้างโปรตีนและน้ำหนักแห้งได้สูงสุดมีจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Anabaena cylindrica* DASH N01101 และ*Hapalosiphon* sp. DASH N05101

2. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง มีจำนวน 4 สกุล รวม 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สกุล *Anabaena* 1 สายพันธุ์ สกุล *Calothrix* 2 สายพันธุ์ สกุล *Nostoc* 6 สายพันธุ์ และสกุล *Tolypothrix* 1 สายพันธุ์ โดยทุกสายพันธุ์ให้ความเข้มของสีปฏิกิริยาอ่อนหรือตรวจพบน้อย

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำสายพันธุ์ที่สามารถสร้างโปรตีนและมวลชีวภาพได้สูง ที่มีความทนทานสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีมาทดสอบผลิตเป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อทดลองให้เกษตรกรที่ทำการผลิตพืชระบบเกษตรอินทรีย์ได้นำไปทดลองเพาะเลี้ยงขยายเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ปริมาณมาก เพื่อใช้สำหรับเพิ่มการเจริญเติบโตให้แก่พืชผักซึ่งเป็นแหล่งธาตุอาหารหรือสารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืชในฟาร์มเกษตรอินทรีย์อีกทางหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

ประกิต สมัยค้า. 2536. ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่ออัตราการเจริญเติบโตและจำนวนเฮทเทอโรซีสต์ของ Anabaena spp. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัยม, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2544.สรีรวิทยาของพืช.ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Azra, B. and J. A. S. Pirzada. 2004. Characterization of five marine cyanobacterial species with respect to their pH and salinity requirements. Pak. J. Bot. 36(1): 133-143.

Crozier, A., P. Arruda, J. Jasmim, A. M. Monteiro and G. Sandberg. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. Appl. Eviron. Microbiol. 54:2833-2837.

Glickmann, E. and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Appl Environ Microbiol. 61:793-796.

Lowry, O.H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275

Roger, P.A. 1995. Biological N_2-fixation and its management in wetland rice cultivation. Fet. Res. 42: 261-276.

Sergeeva, E., A. Liaimer and B. Bergman. 2002. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. Planta. 215: 229-238

Whitton, B. A. 2000. Soils and rice-fields, pp.233-255. *In* B. A. Whitton and M. Potts(eds). The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ปริมาณน้ำหนักแห้ง และโปรตีนที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินผลิตได้ และการตรวจพบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Anabaena* และ *Calothrix*

สกุล/ชนิด/สายพันธุ์	อาหารเพาะเลี้ยง	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร) เมื่ออายุ 30 วัน	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม/มล.) เมื่ออายุ 30 วัน	การตรวจพบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่ออายุ 21 วัน (Auxin-like Salkowski reaction)[1/]
Anabaena				
Anabaena ambiqua TISTR 8001	N-free (BG-11)	0.43	62.0	-
Anabaena cylindrica DASH N01101	N-free (BG-11)	0.94	298.0	-
Anabaena siamensis DASH 01201	N-free (BG-11)	0.92	209.2	-
Anabaena siamensis DASH 01301	N-free (BG-11)	0.95	192.0	-
Anabaena siamensis TISTR 8012	N-free (BG-11)	0.53	200.9	+
Calothrix				
Calothrix sp. DASH 02101	N-free (BG-11)	0.63	166.3	+
Calothrix sp. DASH 02105	N-free (BG-11)	0.75	176.7	+
Calothrix sp. DASH 02107	N-free (BG-11)	0.85	219.4	-
Calothrix sp. DASH 02109	N-free (BG-11)	0.85	200.5	-
Calothrix weberi TISTR 8102	N-free (BG-11)	0.76	56.9	-
Calothrix marchica TISTR 8016	N-free (BG-11)	0.40	101.1	-

DASH = สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร

TISTR = สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

N-free (BG-11) = อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน สูตร BG-11

สัญลักษณ์แทนความเข้มสีของปฏิกิริยา : + = อ่อน , - = ไม่ทำปฏิกิริยา , [1]/ วิเคราะห์โดยวิธี Colorimetric

ตารางผนวกที่ 2 ปริมาณน้ำหนักแห้ง และโปรตีนที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินผลิตได้ และการตรวจพบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Cylindrospermum, Fischerella, Hapalosiphon* และ *Nostoc*

สกุล/ชนิด/สายพันธุ์	อาหารเพาะเลี้ยง	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร) เมื่ออายุ 30 วัน	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม/มล.) เมื่ออายุ 30 วัน	การตรวจพบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่ออายุ 21 วัน (Auxin-like Salkowski reaction)[1/]
Cylindrospermum				
Cylindrospermum sp. DASH 03101	N-free (BG-11)	0.48	151.0	-
Cylindrospermum sp. DASH 03105	N-free (BG-11)	0.67	219.8	-
Cylindrospermum sp. TISTR 8158	N-free (BG-11)	0.65	175.1	-
Fischerella				
Fischerella sp. DASH 04101	N-free (BG-11)	0.77	158.6	-
Fischerella minatum TISTR 8215	N-free (BG-11)	0.30	87.4	-
Hapalosiphon				
Hapalosiphon sp. DASH N05101	N-free (BG-11)	1.0	285.4	-
Hapalosiphon sp. DASH 05108	N-free (BG-11)	0.55	125.6	-
Hapalosiphon sp. DASH 05112	N-free (BG-11)	0.52	105.9	-
Hapalosiphon sp. DASH 05118	N-free (BG-11)	0.58	136.7	-

Hapalosiphon welwitschii TISTR 8284	N-free (BG-11)	0.53	122.2	-
Nostoc				
Nostoc sp.DASH 06106	N-free (BG-11)	0.69	176.4	-
Nostoc sp.DASH 06113	N-free (BG-11)	0.69	195.7	-
Nostoc sp.DASH 06118	N-free (BG-11)	0.54	185.9	-
Nostoc sp.DASH 06119	N-free (BG-11)	0.61	184.2	-
Nostoc sp.DASH 06122	N-free (BG-11)	0.58	152.4	-
Nostoc sp.DASH 06125	N-free (BG-11)	0.87	223.0	+
Nostoc sp.DASH 06126	N-free (BG-11)	0.81	132.0	-
Nostoc sp.DASH 06129	N-free (BG-11)	0.81	42.6	-

DASH = สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร

TISTR = สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

N-free (BG-11) = อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน สูตร BG-11 ,

สัญลักษณ์แทนความเข้มสีของปฏิกิริยา : - = ไม่ทำปฏิกิริยา

ตารางผนวกที่ 3 ปริมาณน้ำหนักแห้ง และโปรตีนที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินผลิตได้ และการตรวจพบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Nostoc*

สกุล/ชนิด/สายพันธุ์	อาหารเพาะเลี้ยง	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร) เมื่ออายุ 30 วัน	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม/มล.) เมื่ออายุ 30 วัน	การตรวจพบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่ออายุ 21 วัน (Auxin-like Salkowski reaction)[1/]
Nostoc sp.DASH 06133	N-free (BG-11)	0.58	146.2	-
Nostoc sp.DASH 06135	N-free (BG-11)	0.65	135.8	-
Nostoc sp.DASH 06138	N-free (BG-11)	0.57	110.6	-
Nostoc sp.DASH 06139	N-free (BG-11)	0.41	84.4	-
Nostoc sp.DASH 06144	N-free (BG-11)	0.86	260.5	-
Nostoc sp.DASH 06148	N-free (BG-11)	0.58	131.7	+
Nostoc sp.DASH N06105	N-free (BG-11)	0.70	135.6	-
Nostoc sp.DASH N06108	N-free (BG-11)	0.58	198.9	-
Nostoc sp.DASH N06109	N-free (BG-11)	0.57	196.3	-
Nostoc sp.DASH N06110	N-free (BG-11)	0.61	103.3	-
Nostoc sp.DASH N06112	N-free (BG-11)	0.58	95.3	-
Nostoc sp.DASH N06113	N-free (BG-11)	0.65	174.9	-
Nostoc sp.DASH N06114	N-free (BG-11)	0.64	142.0	-
Nostoc sp.DASH N06115	N-free (BG-11)	0.61	123.6	-
Nostoc sp.DASH N06116	N-free (BG-11)	0.64	119.0	+
Nostoc sp.DASH N06117	N-free (BG-11)	0.65	110.8	-
Nostoc sp.DASH N06118	N-free (BG-11)	0.70	148.3	-

Nostoc sp.DASH N06121	N-free (BG-11)	0.68	114.6	-
Nostoc sp.DASH N06122	N-free (BG-11)	0.94	177.5	+
Nostoc sp.DASH N06125	N-free (BG-11)	0.85	241.0	-
Nostoc sp.DASH N06132	N-free (BG-11)	0.76	135.7	-
Nostoc sp.DASH N06134	N-free (BG-11)	0.44	178.0	-
Nostoc sp.DASH N06137	N-free (BG-11)	0.81	142.1	-
Nostoc sp.DASH N06140	N-free (BG-11)	0.91	168.7	-
Nostoc sp.DASH N06141	N-free (BG-11)	0.65	182.4	-
Nostoc sp.DASH N06142	N-free (BG-11)	0.57	167.7	-
Nostoc sp.DASH N06144	N-free (BG-11)	0.69	137.7	-
Nostoc sp.DASH N06146	N-free (BG-11)	0.74	116.1	+
Nostoc sp.DASH N06149	N-free (BG-11)	0.81	122.5	-
Nostoc sp.DASH N06151	N-free (BG-11)	0.80	200.5	-
Nostoc sp.DASH N06152	N-free (BG-11)	0.66	198.4	-
Nostoc sp.DASH N06153	N-free (BG-11)	0.84	227.2	-
*Nostoc entophylum*TISTR8161	N-free (BG-11)	0.40	170.4	+
Nostoc punctiforme TISTR8167	N-free (BG-11)	0.53	195.7	-

DASH = สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร

N-free (BG-11) = อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน สูตร BG-11

สัญลักษณ์แทนความเข้มสีของปฏิกิริยา : + = อ่อน , - = ไม่ทำปฏิกิริยา , [1]/ วิเคราะห์โดยวิธี Colorimetric

ตารางผนวกที่ 4 ปริมาณน้ำหนักแห้ง และโปรตีนที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินผลิตได้ และการตรวจพบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Scytonema* , *Tolypothrix* และ *Stigonema*

สกุล/ชนิด/สายพันธุ์	อาหารเพาะเลี้ยง	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร) เมื่ออายุ 30 วัน	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม/มล.) เมื่ออายุ 30 วัน	การตรวจพบการปลดปล่อยสารคล้าย IAA ในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่ออายุ 21 วัน (Auxin-like Salkowski reaction)[1/]
Scytonema				
Scytonema sp. DASH 07101	N-free (BG-11)	0.54	39.0	-
Scytonema sp. DASH 07103	N-free (BG-11)	0.45	140.6	-
Tolypothrix				
Tolypothrix sp. DASH 08102	N-free (BG-11)	0.81	101.6	-
Tolypothrix sp. TISTR 8985	N-free (BG-11)	0.60	160.6	-
Tolypothrix sp.	N-free (BG-11)	0.20	108.3	+

TISTR 8256				
Stigonema				
Stigonema hormoides	N-free (BG-11)	0.06	12.0	-
TISTR 8984				

DASH = สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร

TISTR = สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

N-free (BG-11) = อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากไนโตรเจน สูตร BG-11

สัญลักษณ์แทนความเข้มสีของปฏิกิริยา : + = อ่อน , - = ไม่ทำปฏิกิริยา , [1]/ วิเคราะห์โดยวิธี Colorimetric