ชื่อแผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อโครงการวิจัย การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์

ชื่อกิจกรรมที่ 1 รวบรวม พัฒนาสายพันธุ์ สารสำคัญ และผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร

รหัสการทดลองที่ 03-07-54-01-01-00-05-54

ชื่อการทดลอง 1.5 คัดเลือกชนิดสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ที่เหมาะสมกับการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

คณะผู้วิจัย

นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้าการทดลอง 70%
นางสาวภรณี สว่างศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมงานวิจัย 10%
นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมงานวิจัย 10%
นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมงานวิจัย 10%

บทคัดย่อ

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่ได้รับความนิยมในการนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพสำหรับในอนาคต เนื่องจากคุณสมบัติของสาหร่ายมีน้ำมันและสลายตัวได้เร็ว จัดเป็นพลังงานจากพืช หรือพลังงานสะอาด ศักยภาพของสาหร่ายกับชีวมวลจากพืชที่ให้เซลลูโลส เช่น มันสำปะหลัง พบว่าสาหร่ายมีศักยภาพสูงกว่าเนื่องจากไม่ใช่พืชอาหาร ตลอดจนกระบวนการผลิตมีความบริสุทธิ์ สามารถย่อยสลายได้ ขณะที่ชีวมวลจากพืช มีโครงสร้างทำลายยาก ทำให้มีของเสียหลงเหลือจากกระบวนการผลิต ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตน้ำมันหรือเอทานอลในสาหร่ายก็ขึ้นอยู่กับชนิด สภาวะในการเลี้ยง และวิธีการเลี้ยง ซึ่งในการทดลองนี้ได้เก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทย จำนวน 16 จังหวัด 32 แหล่ง จากนั้นนำไปจำแนกชนิดสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง พบสาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน ดิวิชั่น Cyanophyta 8 สกุล และกลุ่มสาหร่ายสีเขียว ดิวิชั่น Chlorophyta จำนวน 18 สกุล ดิวิชั่น Chromophyta จำนวน 6 สกุล รวมทั้งหมด 32 สกุล และนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์จำนวน 2 สูตร ได้แก่ สูตร BG 11 คัดเลือกสาหร่ายในกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน และสูตร Bold basal medium คัดเลือกสาหร่ายในกลุ่มสีเขียว สามารถคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆได้จำนวน 13 ไอโซเลท และจำแนกโดยใช้เทคนิคทาง ชีวโมเลกุลในส่วนของ 16S rDNA และ 18S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 11 คู่ พบว่าไพรเมอร์ที่จำแนกได้มี 3 คู่ ได้แก่ NS3 คู่กับ NS6 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 750 bp และ CS1 คู่กับ CS2 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500 bp และ CS3 คู่กับ CS4 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 450-500 bp และนำชิ้นดีเอ็นเอถอดรหัสพันธุกรรมเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank (NCBI) พบว่าเป็นชนิด *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO1, *Chlorella* sp. CAUP H8701, *Chlorella*

sorokiniana, Chlorella sorokiniana genes SSU rRNA, *Chlorella sorokiniana* strain AnSeong จำนวน 2 ไอโซเลท, *Crucigenia lauterbornii* UTX LB1735 จำนวน 2 ไอโซเลท, *Dictyosphaerium* sp., *Masaia oloidia* strain CB2008/72 จำนวน 2 ไอโซเลท, *Scenedesmus* sp. GDK. มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 97-100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเพิ่มปริมาณในแต่ละชนิดศึ กษาอัตราการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงสลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง มีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในระยะ log phase ในช่วงวันที่ 5-10 และศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จำนวน 8 ระดับ พบว่าเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ pH 7-8 และพบว่าไอโซเลทที่ 4 *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO1 มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว เจริญเติบโตได้ยาวนานในช่วง log phage และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต และกลูโคสสูงที่สุดเช่นเดียวกัน คือ คาร์โบไฮเดตรทมีค่าเท่ากับ 74.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และปริมาณกลูโคสเท่ากับ 5.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับดังนั้นจึงเป็นชนิดที่เหมาะสมในการคัดเลือกไปเพิ่มปริมาณและศึกษาเทคโนโลยีการผลิตเป็นเอทานอลต่อไปในอนาคต

คำนำ

สาหร่ายจัดเป็นพืชชั้นต่ำที่มีคลอโรฟิลล์สูง จึงใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมากเพื่อสังเคราะห์แสง ทั้งยังอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารไม่ว่าจะเป็นคาร์โบไฮเดรต โปรตีน แร่ธาตุ และวิตามินหลายชนิด ที่สำคัญคือมีน้ำมันในปริมาณมากพอที่จะสกัดออกมาใช้ หากมีการปลูกและการควบคุมตัวแปร รวมถึงสภาพแวดล้อมเป็นอย่างดีจะมีส่วนช่วยทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่าพืชชนิดอื่นๆ ทำให้เห็นถึงความเป็นไปได้หากนำมาศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นพืชพลังงานต่อไป ได้มีรายงานเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อพื้นที่ขนาดเท่ากับพื้นที่ปลูกสบู่ดำ 1 ต้น เป็นเวลา 7 ปี สบู่ดำจะให้น้ำมันร้อยละ 25 ในขณะที่สาหร่ายให้น้ำมันมากถึงร้อยละ 1,000 ปริมาณน้ำมันนี้อาจเพียงพอกระทั่งผลิตเพื่อส่งออกต่างประเทศได้ (พลังที่ยั่งยืนเพื่อไทย, 2552) น้ำมันดิบเข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินชีวิตของมนุษย์และนับวันยิ่งมีความต้องการใช้เพิ่มมากขึ้น ปัญหาวิกฤติราคาน้ำมันตลอดจนสถานการณ์เป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป รวมทั้งเป็นสาเหตุของปัญหาสิ่งแวดล้อม ทำให้หลายประเทศทั่วโลกคิดค้นพลังงานใหม่ๆ ขึ้นมาทดแทน และหนึ่งในนั้นคือ พลังงานจากพืช หรือพลังงานสะอาด แม้ราคาน้ำมันจะปรับตัวลดลง แต่ความสำคัญของพลังงานทดแทน ก็ยังไม่คงไม่แปรเปลี่ยน นั่นเป็นเพราะซัพพลายน้ำมันโลกที่เหลือน้อย กลายแรงผลักดันให้ภาคเอกชนวิจัยพลังงานทดแทน โดยเฉพาะอย่าง ปตท. ที่ทุ่มเงินไม่น้อยกว่าปีละ 1,000 ล้านบาท ความสนใจของ ปตท. มีเป้าหมายไปที่การวิจัยพืชที่ไม่ได้ใช้เป็นอาหารคน นั่นเพราะไม่ต้องการสร้างปัญหาการแย่งชิงทรัพยากร ซึ่งจะเกิดปัญหาต่างๆตามมามากมาย โดยเฉพาะจะทำให้เกิดปัญหาขาดแคลนพืช ส่งผลให้ราคาผันผวนมาก หากเปรียบเทียบศักยภาพของสาหร่ายกับชีวมวลจากพืชที่ให้เซลลูโลส เช่น มันสำปะหลัง พบว่าสาหร่ายมีศักยภาพสูงกว่า เนื่องจากไม่ใช่พืชอาหาร ตลอดจนกระบวนการผลิตมีความบริสุทธิ์ สามารถย่อยสลายได้ เป็นเทคโนโลยีที่สะอาดอย่างแท้จริง ขณะที่ชีวมวลจากพืช มีโครงสร้างทำลายยาก ทำให้มีของเสียหลงเหลือจากกระบวนการผลิต นอกจากนี้สาหร่ายยังช่วยลดภาวะโลกร้อนอีกด้วยเนื่องจากสามารถสังเคราะห์แสงได้ ก็

สามารถดูดซับเอาคาร์บอนไดออกไซด์ที่อยู่น้ำ หรือในมหาสมุทรมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับต้นไม้ สามารถกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการสังเคราะห์แสงได้มากพอๆกับต้นไม้ทุกต้นในโลกรวมกัน Lali (2008) ได้รายงานว่า วิวัฒนาการของการผลิตพลังงานชีวมวล (biomass) แบ่งออกเป็น 4 ยุค ดังนี้ ยุคที่ 1 ได้แก่ ข้าวโพด อ้อย ผ่านกระบวนการหมักด้วยยีสต์ถึงจะได้เอทานอล มีคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำเป็น ผลพลอยได้ (by-products) กว่าจะได้น้ำมันไบโอฟิวส์ 1 แกลลอน ต้องใช้ข้าวโพด 21 ปอนด์ กว่าจะได้ข้าวโพด 21 ปอนด์ การปลูก ปุ๋ย การขนส่ง ฯลฯ ต้องใช้น้ำมันปิโตรเลียม 1/2 แกลลอน หมักออกมาแล้วคุณภาพก็ยังดีไม่เท่าน้ำมันปิโตรเลียม ต้องนำมาผสมใช้ร่วมกัน ทำให้ราคาพืชแพงขึ้น ยุคที่ 2 เซลลูโลสจากพืชผ่านกระบวนการหมักยีสต์หรือแบคทีเรียจึงจะได้เอทานอล หรือ บิวธานอล มีคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำเป็นผลพลอยได้ ยุคที่ 3 สาหร่ายหรือแบคทีเรียที่ดูดพลังงานจากคาร์บอนไดออกไซด์และแสงแดด สังเคราะห์แสงแล้วแปลงเป็นไขมันสะสมไว้ จากนั้นใช้สารเคมีทำละลายเพื่อสกัดเอาไขมันออกมา ให้ได้ไบโอดีเซลเดี่ยวๆ ไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์จากการผลิต ข้อเด่นของ ยุคนี้ก็คือสาหร่าย/แบคทีเรียพวกนี้โตเร็วมากๆ สกัดไขมันออกมาได้มากกว่า มากกว่าการผลิตไขมันจากถั่ว 250 เท่าตัวในพื้นที่เท่าๆ กัน แต่ถึงกระนั้นก็ตาม ก็ยังคงมีความยุ่งยากในการปลูกสาหร่ายพวกนี้ให้ได้มากพอใช้งานและไม่กระทบกับพืชอาหารอื่นๆ และไม่ถูกสาหร่ายและแบคทีเรียอื่นๆ ที่เราไม่ต้องการมาปนเปื้อนในแปลงปลูก และยุคที่ 4 สาหร่ายและแบคทีเรียที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมซึ่งสามารถสังเคราะห์แสงแล้วแปลงเป็นไขมันจากนั้นไขมันถูกสกัดออกมาเองโดยไม่ต้องใส่สารเคมีทำละลาย และได้ไบโอดีเซล โดยที่สาหร่าย /แบคทีเรียนั้นๆ ยังไม่ตาย ยังคงสังเคราะห์แสงและปล่อยไขมันออกมาให้เราใช้ต่อไปได้เรื่อยๆ ไม่ต้องใช้เนื้อที่เพาะปลูกมากมาย และสาหร่าย /แบคทีเรียเหล่านี้จะตายถ้าไม่ได้รับสารเคมีที่เลี้ยงสาหร่ายและช่วยให้ตัวสาหร่ายเองสกัดไขมันออกมาได้ แปลว่า สาหร่ายจะไม่มีแพร่พันธุ์ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมข้างนอก จัดเป็นพลังงานจากพืชหรือพลังงานสะอาด ไม่ใช่พืชอาหาร ตลอดจนกระบวนการผลิตมีความบริสุทธิ์ สามารถย่อยสลายได้ เป็นเทคโนโลยีที่สะอาดอย่างแท้จริง ขณะที่ชีวมวลจากพืช มีโค รงสร้างทำลายยาก ทำให้มีของเสียหลงเหลือจากกระบวนการผลิต ดังนั้นสาหร่ายเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในการลดปัญหาสภาวะแวดล้อมและการผลิตชีวมวล (biomass) สำหรับเชื้อเพลิงชีวภาพ (bio-fuels) ที่เป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์ ซึ่งสอดคล้องกับ Scientific American EARTH (2009) ได้กล่าวไว้ว่า พลังงานทางเลือกเพื่อใช้ทดแทนน้ำมันได้ถูกพัฒนาอย่างต่อเนื่องมาถึงยุคที่ 4 นั่นคือ การผลิตเชื้อเพลิงจากสาหร่าย ซึ่งจะไม่กระทบพืชเศรษฐกิจ อย่างข้าวโพด ถั่ว ที่มนุษย์ยังต้องใช้เป็นอาหาร เชื่อมั่นว่าในอนาคตจำเป็นต้องใช้พลังงานทางเลือกจากเชื้อเพลิงชีวภาพ (bio-fuels) และอีกไม่เกิน 30 ปีข้างหน้า จะขาดแคลนน้ำมันดิบอย่างแน่นอน ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ การออกแบบระบบการเพาะเลี้ยง และวิธีการผลิตสาหร่ายเพื่อได้เป็นพลังงานทดแทนได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นวัตถุดิบอีก ทางเลือกหนึ่งของพืชพลังงานที่เตรียมพร้อมไว้ใช้ในอนาคต จะสามารถเป็นทางออกให้กับวิกฤตทางด้านพลังงานได้

อุปกรณ์และวิธีการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer ยี่ห้อ PERKIN ELMER รุ่น MBA 2000)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง รุ่น GeneAmp@ PCR System 9700
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
5. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Incubator shaker)
6. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
7. เครื่องแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (Electrophoresis) และตรวจสอบดีเอ็นเอบนแผ่นวุ้น ด้วยเครื่องให้กำเนิดแสงอัลตร้าไวโอเลต (UV Transilluminator)
8. เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพ (Multiparameter Bioanalytical System YSI 7100)
9. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P20 และ P2 ไมโครลิตร
10. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ chloroform : isoamyl alcohol (24:1), 10% SDS, 3M NaOAc, isopropanol, 70% ethanol, 5M NaCl, 2X CTAB (ภาคผนวก), TE buffer (ภาคผนวก)
11. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ได้แก่ ไพรเมอร์, Go Taq® Green Master Mix
12. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
13. สารเคมีที่ใช้ในแยกดีเอ็นเอจากเจลให้บริสุทธิ์ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
14. เครื่องแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอแบบแนวราบ (Horizontal Electrophoresis Apparatus)
15. ชุดถ่ายภาพเจล และเครื่องให้กำเนิดแสงอัลตร้าไวโอเลต (UV Transiluminator)
16. เครื่องควบคุมการสั่นของคลื่น Ultrasonic (Ultrasonic Processor) ใช้สำหรับทำให้เซลล์สาหร่ายแตก รุ่น VCX130 PB
17. อุปกรณ์ที่ใช้คัดเลือกและเลี้ยงสาหร่ายให้บริสุทธิ์ ได้แก่ ชั้นเลี้ยงสาหร่ายที่ควบคุมแสงได้ จานเขี่ยเชื้อ (petridish) ลูปเขี่ยเชื้อ ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)
18. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสูตร BG11 (ภาคผนวก)
19. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายสีเขียว Bold’s Basal medium (ภาคผนวก)

<u>วิธีดำเนินการวิจัย</u>

1. รวบรวมตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากจากแหล่งน้ำจืดตามธรรมชาติในพื้นที่ต่างๆของประเทศไทย เปรียบเทียบกับชนิดของสาหร่ายที่ได้จากคลังสาหร่ายแห่งประเทศไทย (วว.)

รวบรวมเก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำจืดตามธรรมชาติที่มีสีเขียวจากการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วยถุงเก็บตัวอย่างที่มีความถี่ของผ้าไนลอนขนาด 40 ไมครอน ทำการเก็บตัวอย่างสดโดยการแช่น้ำแข็งเพื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างดองด้วยสารละลายฟอร์มัลดิไฮด์ ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำมาส่องกล้องจุลทรรศน์จำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา

2. คัดเลือกและแยกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กให้บริสุทธิ์ในสภาวะที่เหมาะสม

นำตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บได้ในข้อ 1 ทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อ (spread plat) เลี้ยงบนอาหารแข็งจำนวน 2 สูตร คือ อาหารสูตร BG11 สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และ สูตร Bold basal medium สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว ตั้งไว้ให้เจริญเติบโตภายใต้ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ จากนั้นคัดเลือกโคโลนี เดี่ยวๆเลี้ยงในอาหารเหลวทั้ง 2 สูตร เลี้ยงตั้งไว้ที่มีแสง และเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 7-10 วัน จากนั้นทำการวัดหาอัตราการเจริญเติบโตทุกวัน โดยทำการวัดค่าความขุ่นเริ่มต้นที่ 0.1 และที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

3. การจำแนกชนิดของสาหร่ายโดยหาลำดับเบสในส่วนของ ribosomal DNA

นำตัวอย่างที่คัดเลือกและแยกได้ในข้อ 2 เลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่าย จากนั้นเก็บเซลล์ในระยะที่มีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวอย่างรวดเร็วใดีที่สุดในระยะ log phase เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี CTAB ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer และตรวจวัดคุณภาพโดยวิธี run gel ตรวจสอบแถบ genomic DNA ที่ได้ เพื่อนำไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) ต่อไป โดยนำดีเอ็นเอของตัวอย่างสาหร่ายที่คัดเลือกได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ribosomal DNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) สำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 1 คู่ และ ไพรเมอร์สำหรับสาหร่ายสีเขียว จำนวน 11 คู่ ซึ่งการเตรียมปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดจำนวน 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารดังต่อไปนี้

- น้ำ (ddH_2O)	4	ไมโครลิตร
- Go Taq® Green Master Mix	10	ไมโครลิตร
- Primer Forward (5 ไมโครโมล)	2	ไมโครลิตร
- Primer Reverse (5 ไมโครโมล)	2	ไมโครลิตร
- DNA Template (100 นาโนกรัม)	2	ไมโครลิตร
รวม (Total)	20	ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermal Cycler (GeneAmp PCR System 9700) โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Denaturation : 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นตอนที่ 2 Annealing : 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที; 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที; 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 Extension : 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้ง 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษา (hold) ไว้ที่อุณหภูมินี้ตลอด

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่เพิ่มปริมาณได้ โดยใช้เทคนิคอิเลคโตรโฟริซิส (Electrophoresis) ด้วยวุ้นอากาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยนำ PCR product จำนวน 2 ไมโครลิตร และ 1kb DNA Ladder maker จำนวน 1 ไมโครลิตรลงในหลุมแรก และตามด้วย PCR product จนครบทุกหลุมของแผ่นวุ้น และเติม 1X TBE buffer ให้สูงกว่าหน้าแผ่นวุ้นเล็กน้อย ตั้งกระแสไฟ 150 โวลต์ นาน 40 นาที ย้อม แผ่นวุ้นด้วยเอทธิเดียมโบร์ไมด์ (ethidium bromide) แล้วนำชิ้นแผ่นวุ้นที่ได้ไปตรวจสอบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องให้กำเนิดแสงอัลตร้าไวโอเลต (UV Transilluminator) ด้วยชุดถ่ายภาพ gel document เพื่อดูขนาดชิ้น PCR product ที่ได้เทียบกับ 1kb DNA Ladder maker หลังจากทำปฏิกิริยา PCR แล้ว ให้ทำความสะอาด PCR product ด้วยชุด GeneJET™ PCR Purification Kit จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปถอดรหัสพันธุกรรมด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Automate Sequencer)

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่คัดเลือกได้

คัดเลือกตัวอย่างที่แยกและจำแนกได้จากข้อ 3 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโต และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ได้แก่ pH 4 5 6 7 8 9 10 11 ช่วงเวลาให้แสง 16 ชั่วโมง สลับช่วงมืด 8 ชั่วโมง และระดับความเข้มของแสงที่ 3,000 ลักซ์

5. การเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายที่คัดเลือกได้

เลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายที่คัดเลือกได้ในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4 ในอุปกรณ์การเลี้ยงขนาด 200 500 1,000 และ 5,000 มิลลิลิตร ในระดับห้องปฏิบัติการ และขยายเลี้ยงในสภาพกลางแจ้งขนาด 200-400 ลิตร เก็บเกี่ยวเซลล์ในช่วงระยะที่มีการเจริญได้ดีและคงที่ (log phase) เพื่อนำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของสาหร่าย โดยชั่งถ้วยอบเปล่าก่อน แล้วใส่ ตัวอย่างสาหร่ายที่ปั่นตกตะกอนแล้วจำนวน 0.1 กรัม 3 ซ้ำ จากนั้นทำให้แห้งในตู้อบ (oven) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ใช้ที่คีบนำถ้วยอบที่มีสาหร่ายย้ายใส่โถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นคีบถ้วยอบจากโถดูดความชื้นมาชั่งอีกครั้งและคำนวณค่าน้ำหนักแห้งที่ได้

6. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญจากสาหร่ายที่คัดเลือกได้

นำเซลล์สาหร่ายที่ตกตะกอนได้ในข้อ 5 ชั่งตัวอย่างละ 0.5 กรัมใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์สาหร่ายแตกโดยใช้เครื่อง Ultrasonic Processor และหาปริมาณาร์โบไฮเดรต ตามวิธีการของ (Borowitzka, 1991) และวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส โดยใช้เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพ (Multiparameter Bioanalytical System YSI 7100) จากนั้นนำมาผลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งที่ได้

ระยะเวลา

เดือน ตุลาคม 2554 – กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ต.รังสิต อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. รวบรวมตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำจืดตามธรรมชาติในพื้นที่ต่างๆของประเทศไทย

รวบรวมเก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีสีเขียวจากการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วยถุงเก็บตัวอย่างที่มีความถี่ของผ้าไนลอนขนาด 40 ไมครอน ทำการเก็บตัวอย่างสดโดยการแช่น้ำแข็งเพื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างดองด้วยสารละลายฟอร์มัลดิไฮด์ ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำมาส่องกล้องจุลทรรศน์จำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา ดังภาพที่ 1 สามารถรวบรวมแหล่งน้ำที่มีสาหร่ายได้จำนวน 16 จังหวัด ได้แก่ ภาคกลาง 4 จังหวัด (ปทุมธานี สระบุรี ลพบุรี เพชรบูรณ์) ภาคตะวันออก 1 จังหวัด (ชลบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5 จังหวัด (นครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น ร้อยเอ็ด สุรินทร์) ภาคเหนือ 2 จังหวัด (ตาก เชียงใหม่) และภาคใต้ 3 จังหวัด (สุราษฎร์ธานี ตรัง พัทลุง) รวมทั้งหมด 32 สถานี ได้แก่

สถานีที่ 1 อ่างเก็บน้ำบางพระ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี
สถานีที่ 2 เขื่อนลำตะคอง อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา
สถานีที่ 3 เขื่อนอุบลรัตน์ อ.อุบลรัตน์ จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 4 บ่อประปามหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 5 บึงประตูสีฐานมหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 6 บึงแก่นนคร อ.เมือง จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 7 บึงบ้านดงหมี จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 8 คลองขุดลอกหนองแวง จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 9 อ่างเก็บน้ำบ้านกุฎิพระ อ.ชนแดน จ.เพชรบูรณ์
สถานีที่ 10 เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี
สถานีที่ 11 สันเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี
สถานีที่ 12 รองแม่น้ำเก่า สันเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ จ.สระบุรี
สถานีที่ 13 คลองหก อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี
สถานีที่ 14 เขื่อนภูมิพล จ.ตาก
สถานีที่ 15 อ่างเก็บน้ำกาแล จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 16 เขื่อนแม่งัด อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่

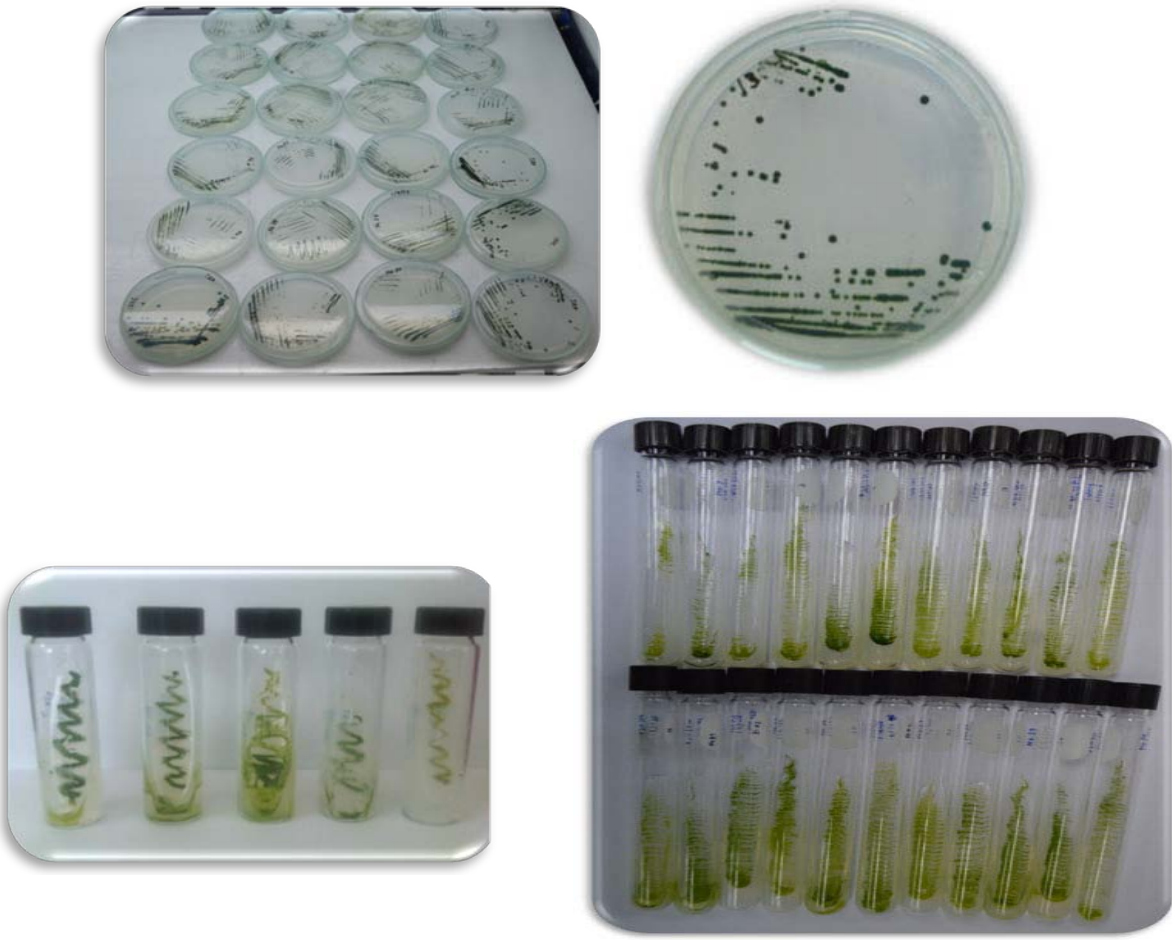
สถานีที่ 17 เขื่อนแม่กวง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 18 เขตสำนักงานชลประทาน เขื่อนแม่กวง จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 19 อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้ อ่างที่ 1 อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 20 อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้ อ่างที่ 2 อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 21 อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้ อ่างที่ 3 อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 22 โรงงานน้ำตาลมิตรผล อ.ภูเวียง จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 23 โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อเก็บน้ำเสียที่ 4 อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ
สถานีที่ 24 โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อเก็บน้ำเสียที่ 9 อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ
สถานีที่ 25 อ่างเก็บน้ำธรรมชาติลำน้ำพอง จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 26 บึงพลาญชัย อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด
สถานีที่ 27 อ่างเก็บน้ำห้วยเสนง อ.เมือง จ.สุรินทร์
สถานีที่ 28 หนองทุ่งทอง อ.เคียนซา จ.สุราษฎร์ธานี
สถานีที่ 29 อ่างเก็บน้ำศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการเกษตร อ.ยานตาขาว จ.ตรัง
สถานีที่ 30 อ่างเก็บน้ำศูนย์วิจัยประมงน้ำจืด จ.ตรัง
สถานีที่ 31 เขตห้ามสัตว์ป่าทะเลน้อย จ.พัทลุง
สถานีที่ 32 เขื่อนรัชประภา อ.บ้านตาขุน จ.สุราษฎร์ธานี

<u>ภาพที่ 1</u> การเก็บตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำธรรมชาติด้วยถุงผ้าไนลอนขนาด 40 ไมครอน และนำตัวอย่างสดมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

จากการจำแนกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง พบสาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน ดิวิชั่น Cyanophyta 8 สกุล และกลุ่มสาหร่ายสีเขียว ดิวิชั่น Chlorophyta จำนวน 18 สกุล ดิวิชั่น Chromophyta จำนวน 6 สกุล รวมทั้งหมด 32 สกุล พบว่าสกุล *Oscillatoria* spp. พบทั้ง 32 สถานี และสกุลที่พบน้อยที่สุด คือ *Botryococcus* sp. พบเพียงแค่ 2 สถานี คือ สถานีที่ 2 เขื่อนลำตะคอง อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา และสถานีที่10 เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี ดังตารางที่ 1

2. คัดเลือกและแยกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กให้บริสุทธิ์ในสภาวะที่เหมาะสม

ผลจากการนำตัวอย่างสาหร่ายสดขนาดเล็กที่เก็บได้ในข้อ 1 ทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อ (spread plat) เลี้ยงบนอาหารแข็งจำนวน 2 สูตร คือ อาหารสูตร BG11 สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และ สูตร Bold basal medium ตั้งไว้ให้เจริญเติบโตภายใต้ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ พบว่าสามารถแยกและคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่เป็นโคโลนีเดี่ยวได้จำนวน 13 ไอโซเลท ในอาหารสูตร Bold basal medium ดังภาพที่ 2 และ ตารางที่ 3



<u>ภาพที่ 2</u> คัดเลือกและแยกเชื้อสาหร่ายให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็งสูตร Bold basal medium

ตารางที่ 1 ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ในแหล่งน้ำที่ศึกษา

ชื่อวิทยาศาสตร์	สถานี																																รวม
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
Division Cyanophyta																																	
Class Cyanophyceae																																	
Anabaena sp.	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	17
Anabaenopsis sp.	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3
Chroococcus sp.	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	16
Merismopedia sp.	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	12
Microcystis sp.	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	24
Oscillatoria spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32
Phormidium sp.	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	15
Spilulina sp.	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Division Chlorophyta																																	
Class Chlorophyceae																																	
Actinastrum sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	12
Ankistrodesmus sp.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	20
Botryococcus sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Chlamydomonas sp.	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	11
Chlorella sp.	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	22
Crucigenia sp.	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	7
Dictyosphaerium sp.	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	10
Golenkinia sp.	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Oocystis sp.	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	23
Pediastrum sp.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	9
Scenedesmus sp.	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	27
Selenastrum sp.	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	11
Staurastrum sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Tetraedron sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Volvox sp.	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8

<u>หมายเหตุ</u> : + = ชนิดสาหร่ายที่พบ, - = ชนิดสาหร่ายที่ไม่พบ

ตารางที่ 1 ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ในแหล่งน้ำที่ศึกษา (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	สถานี																																รวม
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
Class Euglenophyceae																																	
Euglena spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	29
Phacus spp.	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	21
Trachelomonas spp.	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	12
Division Chromophyta																																	
Class Bacillariophyceae																																	
Amphora sp.	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	18
Fragilaria sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	13
Navicula sp.	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	23
Nitzchia sp.	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	6
Synedra sp.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Class Dinophyceae																																	
Peridinium sp.	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	19

<u>หมายเหตุ</u> : + = ชนิดสาหร่ายที่พบ, - = ชนิดสาหร่ายที่ไม่พบ

สถานีที่ 1 อ่างเก็บน้ำบางพระ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี
สถานีที่ 2 เขื่อนลำตะคอง อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา
สถานีที่ 3 เขื่อนอุบลรัตน์ อ.อุบลรัตน์ จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 4 บ่อประปามหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 5 บึงประตูสีฐานมหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 6 บึงแก่นนคร อ.เมือง จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 7 บึงบ้านดงหมี จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 8 คลองขุดลอกหนองแวง จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 9 อ่างเก็บน้ำบ้านกุฎิพระ อ.ชนแดน จ.เพชรบูรณ์
สถานีที่ 10 เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี
สถานีที่ 11 สันเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี
สถานีที่ 12 รองแม่น้ำเก่า สันเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ จ.สระบุรี
สถานีที่ 13 คลองหก อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี
สถานีที่ 14 เขื่อนภูมิพล จ.ตาก
สถานีที่ 15 อ่างเก็บน้ำกาแล จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 16 เขื่อนแม่งัด อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 17 เขื่อนแม่กวง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 18 เขตสำนักงานชลประทาน เขื่อนแม่กวง จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 19 อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้ อ่างที่ 1 อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 20 อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้ อ่างที่ 2 อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 21 อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้ อ่างที่ 3 อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
สถานีที่ 22 โรงงานน้ำตาลมิตรผล อ.ภูเวียง จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 23 โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อเก็บน้ำเสียที่ 4 อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ
สถานีที่ 24 โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อเก็บน้ำเสียที่ 9 อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ
สถานีที่ 25 อ่างเก็บน้ำธรรมชาติลำน้ำพอง จ.ขอนแก่น
สถานีที่ 26 บึงพลาญชัย อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด
สถานีที่ 27 อ่างเก็บน้ำห้วยเสนง อ.เมือง จ.สุรินทร์
สถานีที่ 28 หนองทุ่งทอง อ.เคียนซา จ.สุราษฎร์ธานี
สถานีที่ 29 อ่างเก็บน้ำศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการเกษตร อ.ยานตาขาว จ.ตรัง
สถานีที่ 30 อ่างเก็บน้ำศูนย์วิจัยประมงน้ำจืด จ.ตรัง
สถานีที่ 31 เขตห้ามสัตว์ป่าทะเลน้อย จ.พัทลุง
สถานีที่ 32 เขื่อนรัชประภา อ.บ้านตาขุน จ.สุราษฎร์ธานี

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนไอโซเลทสาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บได้จากแหล่งต่างๆ

ลำดับที่	No.ไอโซเลท	แหล่งเก็บ	จังหวัด
1	7	บ่อประปา ม.ขอนแก่น	ขอนแก่น
2	12	อ่างเก็บน้ำบ้านกุฏิพระ	เพชรบูรณ์
3	14	เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์	ลพบุรี
4	15	แม่น้ำบริเวณสันเขื่อนป่าสัก	สระบุรี
5	17	เขื่อนภูมิพล	ตาก
6	18	อ่างเก็บน้ำกาแล	เชียงใหม่
7	21	เขื่อนแม่กวง	เชียงใหม่
8	22	อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้	เชียงใหม่
9	26	โรงงานน้ำตาลมิตรผล	ชัยภูมิ
10	27	โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อน้ำเสียที่ 4	ชัยภูมิ
11	28	โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อน้ำเสียที่ 9	ชัยภูมิ
12	29	อ่างเก็บน้ำธรรมชาติลำน้ำพอง	ขอนแก่น
13	30	บึงพลาญชัย	ร้อยเอ็ด

3. การจำแนกชนิดของสาหร่ายโดยหาลำดับเบสในส่วนของ ribosomal DNA

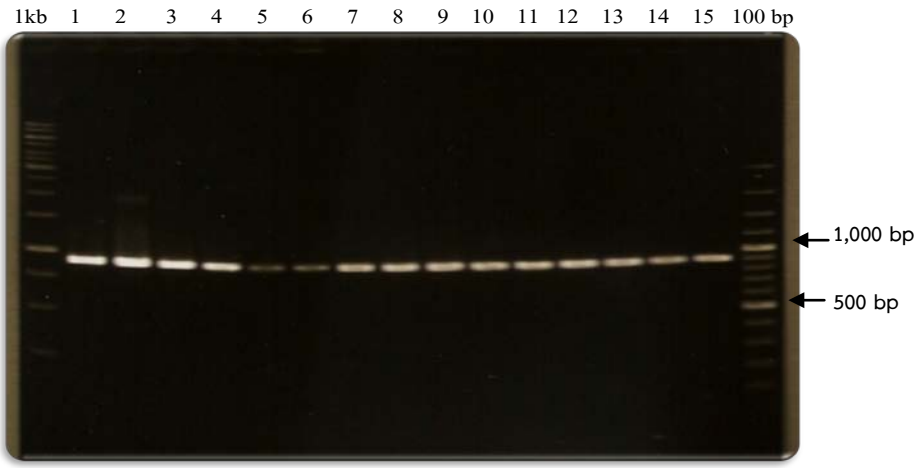
จากการคัดเลือกตัวอย่างที่ได้ในข้อ 2 จำนวน 13 ไอโซเลท นำมาจำแนกโดยใช้เทคนิคทาง ชีวโมเลกุล ในส่วนของ 16S rDNA และ 18S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 11 คู่ ดังตารางที่ 3 พบว่าไพรเมอร์ที่จำแนกได้มี 3 คู่ ได้แก่ NS3 คู่กับ NS6 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 750 bp และ CS1 คู่กับ CS2 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500 bp และ CS3 คู่กับ CS4 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 450-500 bp ดังภาพที่ 3 และนำชิ้นดีเอ็นเอถอดรหัสพันธุกรรมเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank (NCBI) พบว่าเป็นชนิด *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO1, *Chlorella* sp. CAUP H8701, *Chlorella sorokiniana, Chlorella sorokiniana* genes SSU rRNA, *Chlorella sorokiniana* strain AnSeong จำนวน 2 ไอโซเลท, *Crucigenia lautebornii* UTX LB1735 จำนวน 2 ไอโซเลท, *Dictyosphaerium* sp., *Masaia oloidia* strain CB2008/72 จำนวน 2 ไอโซเลท, *Scenedesmus* sp. GDK. มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 97-100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4

<u>ตารางที่ 3</u> แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ในการจำแนกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 2 กลุ่ม

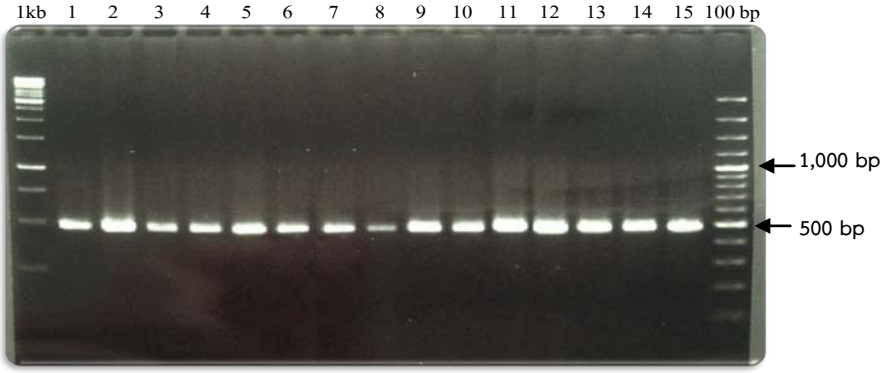
ลำดับ	ชื่อ	ลำดับเบสจากด้าน 5' → 3'	จำนวน (bp)
1	63 (F)	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC	21
2	1387 (R)	GGG CGG WGT GTA CAA GGC	18
3	NS1 (F)	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	19
4	NS2 (R)	GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC	21
5	CS1 (F)	CGG CTG ATT AGC TTG TTG G	19
6	CS2 (R)	GAG TGC TTT CGC CTT TGG	18
7	CS3 (F)	AAG GCC AAA GCA CTC TGC	18
8	CS4 (R)	TTC CTC CGG CTT ATC ACC	18
9	UCP1 (F)	CAA GCW CCD GCA GAA GAC C	19
10	UCP1 (R)	CCM AAA CAT AAA CAA MSW CAG G	22
11	UCP2 (F)	CCT TGW CKT TGT TTA TGT TTK GG	23
12	UCP2 (R)	GCT CAT GTY TCH GGB AAA ATW CG	23
13	UCP3 (F)	CGW ATT TTV CCD GAG ATA TGG GC	23
14	UCP3 (R)	ATG TAT GCK TTT TTA GAT CGT	21
15	UCP4 (F)	ACG ATC TAA AAA MGC ATA CAT	21
16	UCP4 (R)	AAT TGT WTC DTT DGC ACC DGA AGT	24
17	UCP5 (F)	ACT TCH GGT GCH AGH GAW ATA ATT	24
18	UCP5 (R)	GAA ACH CGD ATG GGD TCK GG	20
19	UCP6 (F)	CCM GAH CCC ATH CGD GTT TC	20
20	UCP6 (R)	GGB MGH TTW AAT GGH GCH GAW AT	23
21	UCP7 (F)	ATW TCD GCD CCA TTW AGD CKV CC	23
22	UCP7 (R)	ATG GTW GGW CAW AAA TTD GGT GAG TTT	24
23	UCP8 (F)	AAA TTC GCC HAG TTT WTG WCC WAT CAT	24
24	UCP8 (R)	GCH CAA HTD GTD GCN AAA GAG GG	20

<u>ตารางที่ 4</u> แสดงการจำแนกชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กจากพื้นที่ต่างๆ โดยใช้วิธีถอดรหัสพันธุกรรมในส่วนของ ribosomal DNA

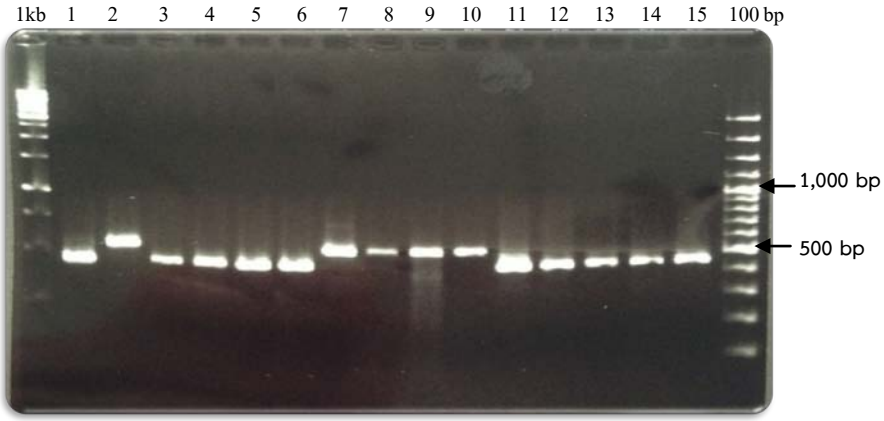
ลำดับที่	ชื่อตัวอย่าง	ชนิด	รหัสที่เหมือน GenBank	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเทียบกับ NCBI	แหล่งที่พบ
1	C1	*Chloerlla vulgaris* TISTR 8580	-	-	คลังสาหร่ายแห่งประเทศไทย (วว.)
2	C2	*Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260	-	-	คลังสาหร่ายแห่งประเทศไทย (วว.)
3	ADOA1	*Crucigenia lautebornii* UTEX LB1735	JQ356710.1	100%	บ่อประปา มหาวิทยาลัยขอนแก่น
4	ADOA2	*Masaia oloidia* strain CB2008/72	HQ322128.1	97%	อ่างเก็บน้ำบ้านกุฏิพระ
5	ADOA3	*Crucigenia lautebornii* UTEX LB1735	JQ356710.1	100%	สันเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์
6	ADOA4	*Chlorella pyrenoidosa* strain XJO18SrDNA	KC416209.1	100%	รองแม่น้ำเก่า สันเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์
7	ADOA5	*Chlorella* sp. CAUP. H8701	HF677200.1	99%	เขื่อนภูมิพล
8	ADOA6	*Masaia oloidia* strain CB2008/72	HQ322128.1	99%	อ่างเก็บน้ำกาแล
9	ADOA7	*Dictyosphaerium* sp.	GQ487253.1	99%	เขื่อนแม่กวง เขตสำนักงานชลประทาน
10	ADOA8	*Chlorella* sp. KMMCC FC-21	GQ122372.1	99%	อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้ อ่างที่ 1
11	ADOA9	*Chlorella sorokiniana* genes SSU rRNA	AB731602.1	99%	โรงงานน้ำตาลมิตรผล อ. ภูเวียง
12	ADOA10	*Chlorella sorokiniana* strain AnSeong	KF864472.1	99%	โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อเก็บน้ำเสียที่ 4
13	ADOA11	*Chlorella sorokiniana* strain AnSeong	KF864472.1	99%	โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อเก็บน้ำเสียที่ 9
14	ADOA12	*Scenedesmus* sp. GDK	KF879588.1	98%	อ่างเก็บน้ำธรรมชาติลำน้ำพอง
15	ADOA13	*Chlorella sorokiniana*	KJ149805.1	97%	บึงพลาญชัย



ไพรเมอร์ NS3 คู่กับ NS6



ไพรเมอร์ CS1 คู่กับ CS2



ไพรเมอร์ CS3 คู่กับ CS4

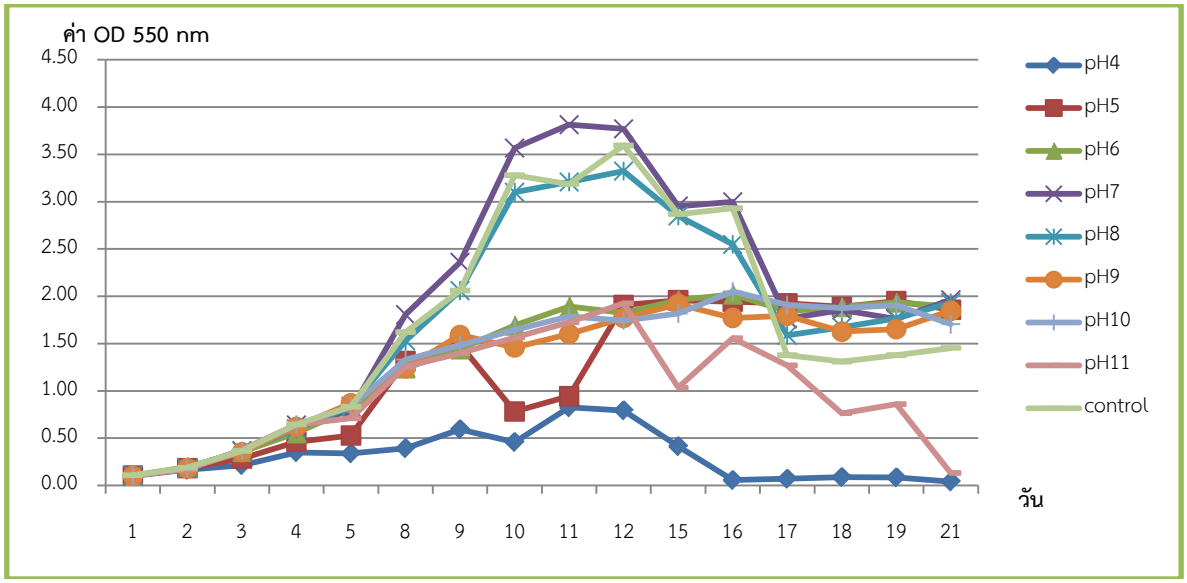
<u>ภาพที่ 3</u> แสดงผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Product) ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจำนวน 15 ไอโซเลทโดยใช้ไพรเมอร์ NS3 คู่กับ NS6 ไพรเมอร์ CS1 คู่กับ CS2 และ ไพรเมอร์ CS3 คู่กับ CS4

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้

ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จำนวน 8 ระดับ ตั้งแต่ pH 4 5 6 7 8 9 10 11 ใน อาหารสูตร Bold Basal medium ช่วงแสง 16 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่าสาหร่ายที่คัดเลือกได้มีการเจริญเติบโตดีในช่วง pH 6-10 ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมง ช่วงมืด 8 ชั่วโมง และมีการเจริญเติบโตดีที่สุดในระยะ log phase ในช่วงวันที่ 5-10 ดังตารางที่ 5 และภาพที่ 2

<u>ตารางที่ 5</u> แสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO18SrDNA (ADOA4) ที่ pH 8 ระดับ ได้แก่ pH 4 5 6 7 8 9 10 11 ใน อาหารสูตร Bold Basal medium เป็นระยะเวลา 21 วัน

	ปริมาณความขุ่นของค่า OD ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร															
pH \ วัน	1	2	3	4	5	8	9	10	11	12	15	16	17	18	19	21
pH4	0.104	0.165	0.215	0.351	0.339	0.393	0.594	0.459	0.826	0.794	0.415	0.057	0.070	0.088	0.085	0.041
pH5	0.106	0.183	0.284	0.461	0.528	1.315	1.491	0.782	0.946	1.910	1.958	1.945	1.927	1.890	1.950	1.858
pH6	0.104	0.199	0.358	0.554	0.814	1.240	1.441	1.692	1.894	1.826	1.959	2.020	1.842	1.888	1.936	1.893
pH7	0.104	0.183	0.369	0.640	0.794	1.807	2.359	3.568	3.815	3.771	2.953	2.999	1.762	1.857	1.759	1.963
pH8	0.107	0.181	0.364	0.599	0.835	1.529	2.060	3.101	3.209	3.323	2.849	2.549	1.589	1.674	1.768	1.932
pH9	0.103	0.182	0.352	0.621	0.870	1.241	1.592	1.459	1.602	1.771	1.918	1.772	1.795	1.627	1.652	1.847
pH10	0.106	0.180	0.366	0.645	0.832	1.330	1.482	1.647	1.788	1.744	1.818	2.052	1.909	1.876	1.907	1.705
pH11	0.109	0.170	0.380	0.645	0.710	1.257	1.399	1.564	1.726	1.926	1.035	1.558	1.269	0.764	0.860	0.134
control	0.108	0.189	0.365	0.647	0.83	1.622	2.06	3.279	3.187	3.596	2.868	2.932	1.38	1.311	1.38	1.45



<u>ภาพที่ 4</u> แสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO18SrDNA (ADOA4) ที่ pH 8 ระดับ ได้แก่ pH 4 5 6 7 8 9 10 11 ใน อาหารสูตร Bold Basal medium เป็นระยะเวลา 21 วัน

5. การเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายที่คัดเลือกได้

ผลที่ได้จากการคัดเลือกสาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO18SrDNA (ADOA4) พบว่ามีการเจริญเติบโตได้รวดเร็วและมีระยะ log phase ยาวนานที่สุด จึงนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Bold Basal medium สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4 ในอุปกรณ์การเลี้ยงขนาด 200 500 1 ,000 และ 5,000 มิลลิลิตร ในระดับห้องปฏิบัติการ จากนั้นสามารถขยายเลี้ยงในอ่างสภาพกลางแจ้งขนาด 200-400 ลิตร โดยเริ่มต้นเชื้อสาหร่ายที่ค่า OD_{550} เท่ากับ 0.5 และเก็บเกี่ยวเซลล์ในช่วงระยะที่มีการเจริญได้ดีและคงที่ (log phase) ในวันที่ 4-8 นำสาหร่ายที่ได้ทำให้ตกตะกอนเพื่อนำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป ดังภาพที่ 5

ขยายและเพิ่มปริมาณขนาด 200, 500, 1,000 และ 5,000 มิลลิลิตร ในระดับห้องปฏิบัติการ

ขยายและเพิ่มปริมาณขนาด 200 ลิตรในสภาพกลางแจ้ง เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายและนำไปวิเคราะห์

<u>ภาพที่ 5</u> การขยายสาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO18SrDNA (ADOA4) ในอุปกรณ์ขนาด 200 500 1,000 และ 5,000 มิลลิลิตร ในระดับห้องปฏิบัติการ ในอ่างสภาพกลางแจ้งขนาด 200-400 ลิตร และเก็บเกี่ยวเซลล์ในวันที่ 4-5

6. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญจากสาหร่ายที่คัดเลือกได้

6.1 การหาปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่ายขนาดเล็ก

ก่อนวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญจากสาหร่ายที่คัดเลือกได้ ได้ทำการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่ายขนาดเล็ก โดยสุ่มตัวอย่างสาหร่ายที่คัดเลือกได้จำนวน 5 ไอโซเลทๆ ละ 3 ซ้ำ พบว่า สาหร่ายสด 0.1 กรัม มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยประมาณ 0.0567 กรัม จะเห็นได้ว่าน้ำหนักจะหายไปประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยการหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายขนาดเล็กที่คัดเลือกได้

No. สาหร่าย	น้ำหนัก Can (g)	น้ำหนักสาหร่ายก่อนอบ (g)	น้ำหนักรวมก่อนอบ (g)	น้ำหนักรวมหลังอบ (g)	น้ำหนักสาหร่ายหลังอบ (g)	น้ำหนักเฉลี่ย (g)
1.1	11.01	0.1	11.11	11.04	0.07	0.0633
1.2	11.2	0.1	11.3	11.24	0.06	
1.3	11.9	0.1	12	11.94	0.06	
7.1	11.2	0.1	11.3	11.24	0.06	0.0733
7.2	10.9	0.1	11	10.92	0.08	
7.3	10.9	0.1	11	10.92	0.08	
15.1	16	0.1	16.1	16.07	0.03	0.0433
15.2	13.7	0.1	13.8	13.75	0.05	
15.3	14.9	0.1	15	14.95	0.05	
21.1	16.1	0.1	16.2	16.15	0.05	0.0467
21.2	15	0.1	15.1	15.06	0.04	
21.3	16.3	0.1	16.4	16.35	0.05	
30.1	13.7	0.1	13.8	13.74	0.06	0.0567
30.2	16.3	0.1	16.4	16.34	0.06	
30.3	16.3	0.1	16.4	16.35	0.05	
					ค่าเฉลี่ย	0.0567

6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตและวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสของสาหร่ายที่คัดเลือกได้

จากการวิเคราะห์หาปริมาคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีการของ (Borowitzka, 1991) และวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส โดยใช้เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพ (Multiparameter Bioanalytical System YSI 7100) ของสาหร่ายที่คัดเลือกได้จำนวน 13 ไอโซเลท และ Control 2 ไอโซเลท รวม 15 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลทที่ 4 *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO1 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต และกลูโคสสูงที่สุด คือ คาร์โบไฮเดตรทมีค่าเท่ากับ 74.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และปริมาณกลูโคสเท่ากับ 5.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลปริมาณคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลกลูโคสของสาหร่ายที่คัดเลือกได้

ไอโซเลทสาหร่าย	ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (mg/ml)	ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (mg/g น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณกลูโคส (mg/ml)
Control 1	86.43	49.01	4.53
Control 2	44.44	25.20	1.84
1	51.03	28.93	3.71
2	27.97	15.86	2.23
3	21.72	12.32	1.95
4	130.60	74.05	5.80
5	37.17	21.08	1.19
6	93.54	53.04	2.34
7	79.62	45.14	3.22
8	65.41	37.09	0.97
9	43.40	24.61	3.13
10	66.33	37.61	2.00
11	91.37	51.81	4.20
12	74.61	42.30	1.86
13	61.07	34.63	1.46

สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้ได้เก็บตัวอย่างและคัดเลือกชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล จำนวน 2 กลุ่ม ได้แก่สาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน และกลุ่มสีเขียว จากแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวน 16 จังหวัด 34 แหล่ง นำไปจำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง พบสาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน ดิวิชั่น Cyanophyta 8 สกุล และกลุ่มสาหร่ายสีเขียว ดิวิชั่น Chlorophyta จำนวน 18 สกุล ดิวิชั่น Chromophyta จำนวน 6 สกุล รวมทั้งหมด 32 สกุล นำมาเลี้ยงในอาหาร BG 11 และ Bold basal medium สามารถคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวได้จำนวน 13 ไอโซเลท และจำแนกโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในส่วนของ 16S rDNA และ 18S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 11 คู่ พบว่าไพรเมอร์ที่จำแนกได้มี 3 คู่ ได้แก่ NS3 คู่กับ NS6 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 750 bp และ CS1 คู่กับ CS2 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500 bp และ CS3 คู่กับ CS4 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 450-500 bp และนำชิ้นดีเอ็นเอถอดรหัสพันธุกรรมเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank (NCBI) พบว่าเป็นชนิด *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO1, *Chlorella* sp. CAUP H8701, *Chlorella sorokiniana, Chlorella sorokiniana* genes SSU rRNA, *Chlorella sorokiniana* strain AnSeong จำนวน 2 ไอโซเลท, *Crucigenia lauterbornii* UTX LB1735 จำนวน 2 ไอโซเลท, *Dictyosphaerium* sp., *Masaia oloidia* strain CB2008/72 จำนวน 2 ไอโซเลท, *Scenedesmus* sp. GDK. มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 97-100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเพิ่มปริมาณในแต่ละชนิดศึกษาอัตราการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงสลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง มีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในระยะ log phase ในช่วงวันที่ 10-15 และศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จำนวน 8 ระดับ พบว่าเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ pH 7-8 และพบว่าไอโซเลทที่ 4 *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO1 มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว เจริญเติบโตได้ยาวนานในช่วง log phage และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต และกลูโคสสูงที่สุดเช่นเดียวกัน คือ คาร์ โบไฮเดตรทมีค่าเท่ากับ 74.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และปริมาณกลูโคสเท่ากับ 5.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ

นำไปใช้ประโยชน์

สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ที่คัดเลือกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติที่พบในประเทศไทยในการทดลองนี้ สามารถนำมาเลี้ยงและแยกให้บริสุทธิ์ และเพิ่มปริมาณได้ในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต เลี้ยงง่าย และมีองค์ประกอบภายในเซลล์ที่เหมาะสมนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อนำไปเพิ่มปริมาณและศึกษาเทคโนโลยีการผลิตเป็นไบโอเอทานอลจากสาหร่าย ซึ่งจะนำไปใช้เป็นพลังงานทางเลือกต่อไปได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

พลังที่ยั่งยืน...เพื่อไทย. 2552. “สาหร่าย” พลังงานใหม่จากโลกใต้น้ำ. วารสารสื่อพลัง. 46 - 48.

พิไลวรรณ เจริญชัย และ กัลยา อุดมวิทิต. 2552. สาหร่ายกับการปฏิวัติพลังงาน. เล่าสู่กันฟัง 2. 7 น.

Bold, H.C. and M.J. Wynne. 1978. Introduction to the Algae. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 706 p.

Borowitzka, M.A. 1991. Extraction techniques. Algal Biotechnol. Lab. Murdoch University, New York. 25 p.

Bush, R.A., K.M. Hall. 2006. Process for the production of ethanol from algae. United States Patent 7135308

Lali, A. 2008. Biotechnology for next generation biofuels/bioenergy. ICS Workshop Trieste. DBT-UICT centre of energy biosciences. Institute of chemical technology. Matunga, Mumbai.

Matsumoto, M., H. Yokouchi, N. Suzuki, H. Ohata and T. Matsunaga. 2003. Saccharification of marine microalgae using marine bacteria for ethanol production. Applied Biochemistry and Biotechnology. Humana Press Inc. p. 247.

Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Baca Raton. 536 p.

Scientific American EARTY. 2009. น้ำมันในอนาคตสกัดจากสาหร่าย. Vol.19, No.1, 2 น. http://www.Green.in.th.

Shin, H., Yuji, N., Tasuyuki,O., Ryohei, U., Atsushi, H. 2002. Carbon dioxide fixation and ethanol production with marine microalgae (in Japanese). www. http://ci.nii.ac.jp/naid.

ภาคผนวก

TE buffer

เตรียม 100 มิลลิลิตร

2 M Tris-HCl pH 8.0	500	ไมโครลิตร
0.5 M EDTA pH 8.0	200	ไมโครลิตร
เติมน้ำให้ครบ	100	มิลลิลิตร

10% SDS

เตรียม 100 มิลลิลิตร

SDS	10	กรัม
น้ำ	100	มิลลิลิตร

chloroform : isoamyl alcohol (24:1)

เตรียม 250 มิลลิลิตร

chloroform	240	มิลลิลิตร
isoamyl alcohol	10	มิลลิลิตร

3M NaOAc (pH 5.2)

เตรียม 1,000 มิลลิลิตร

Sodium acetate trihydraet	408.1	กรัม
น้ำ	750	มิลลิลิตร
ปรับค่า pH 5.2		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้	1,000	มิลลิลิตร

2XCTAB

เตรียม 200 มิลลิลิตร

NaCl	16.36	กรัม
CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)	4	กรัม
2M Tris-HCl (pH 8.0)	10	มิลลิลิตร
0.5M EDTA	8	มิลลิลิตร
PVP-40	2	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 200 มิลลิลิตร

5M NaCl

เตรียม 1,000 มิลลิลิตร

NaCl	292.2	กรัม
เติมน้ำให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

10XTBE buffer

เตรียม 1 ลิตร

Tris-base	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40	มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสูตร BG11 (Richmond, 1986)

สารอาหาร	**ความเข้มข้น**
$NaNo_3$	1.500 กรัม/ลิตร
$K_2HPO_4.3H_2O$	0.040 กรัม/ลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.075 กรัม/ลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.036 กรัม/ลิตร
Citric acid	0.006 กรัม/ลิตร
Ferric ammonium citrate	0.006 กรัม/ลิตร
Ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA)	0.001 กรัม/ลิตร
Na_2Co_3	0.020 กรัม/ลิตร
Trace metal mix	1.000 มิลลิลิตร/ลิตร
น้ำกลั่น	999 มิลลิลิตร
pH	7.4
Trace metal mix	
H_3BO_3	2.860 กรัม/ลิตร
$MnCl_2.4H_2O$	1.810 กรัม/ลิตร
$ZnSO_4.7H_2O$	0.222 กรัม/ลิตร
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.390 กรัม/ลิตร
$CuSO_4.5H_2O$	0.079 กรัม/ลิตร
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.0494 กรัม/ลิตร
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสูตร Bristol (Bold และ Wynne, 1978)

สารอาหาร	ความเข้มข้น
$NaNo_3$	0.025 กรัม/ลิตร
$K_2HPO_4.3H_2O$	0.075 กรัม/ลิตร
KH_2PO_4	0.175 กรัม/ลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.075 กรัม/ลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.025 กรัม/ลิตร
NaCl	0.025 กรัม/ลิตร
Ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA)	0.050 กรัม/ลิตร
KOH	0.031 กรัม/ลิตร
$FeSO_4$	0.050 กรัม/ลิตร
H_3BO_3	0.0114 กรัม/ลิตร
Trace element	1.000 มิลลิลิตร/ลิตร
น้ำกลั่น	999 มิลลิลิตร
pH	7.0
Trace element	
$MnCl_2.4H_2O$	0.0014 กรัม/ลิตร
$ZnSO_4.7H_2O$	0.0088 กรัม/ลิตร
MoO_3	0.0007 กรัม/ลิตร
$CuSO_4.5H_2O$	0.0016 กรัม/ลิตร
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.0005 กรัม/ลิตร
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรท (Total Carbohydrate Assay)

สารเคมี

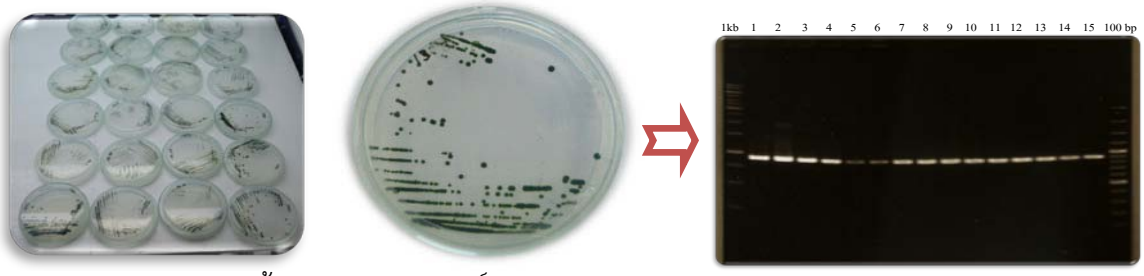
1. Glucose standard 2.5 มิลลิกรัม glucose/100 ml
2. Phenol solution 5 กรัม / 100 ml
3. Concentrated H_2SO_4 (AR grade)
4. 1M H_2SO_4 (AR grade)

วิธีการ

1. กรองตัวอย่างและเก็บเซลล์ไว้ตู้ –20 องศาเซลเซียส
2. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่หลอดแก้ว และทำสาหร่ายให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการเติม 1M H_2SO_4 จำนวน 2 มิลลิลิตร และไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer
3. นำไปใส่หลอดแก้ว centrifuge ขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย 1M H_2SO_4 ให้ได้ 5 มิลลิลิตร
4. นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
5. ตั้งที่อุณหภูมิห้องให้เย็น และนำไปปั่นที่ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
6. ดูดน้ำใสเก็บไว้เพื่อวัดหาปริมาณคาร์โบไฮเดรทและปรับปริมาณเจือจางกับน้ำกลั่นให้อยู่ในช่วงปริมาณคาร์โบไฮเดรทไม่เกิน 50 ไมโครกรัม (เริ่มต้นอาจจะเจือจางดูดน้ำใส 0.1-05 ml และปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ได้ 2 ml)
7. เตรียม standard glucose 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัม และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2 มิลลิลิตร
8. เติมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 1 ml และผสมให้เข้ากันโดยการ vortex
9. เติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้นทันที 5 มิลลิลิตร
10. ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็นประมาณ 30 นาที
11. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร และนำมาคำนวณหาค่าคาร์โบไฮเดรทกับค่า standard curve

เก็บตัวอย่างน้ำที่มีสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

นำมาเลี้ยงในอาหารแข็งและอาหารเหลวในห้องปฏิบัติการ



แยกเชื้อสาหร่ายให้บริสุทธิ์ วิเคราะห์และจำแนกชนิดในส่วนของ rDNA

ขยายและเพิ่มปริมาณขนาด 200, 500, 1,000 และ 5,000 มิลลิลิตร ในระดับห้องปฏิบัติการ

ขยายและเพิ่มปริมาณขนาด 200 ลิตรในสภาพกลางแจ้ง เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายและนำไปวิเคราะห์

ภาพ สรุปขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง จำแนก คัดเลือกเซลล์และเลี้ยงขยายเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่าย