การทดลองที่ 1.5 คัดเลือกชนิดสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ที่เหมาะสมกับการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

Selection of microalgae for the production of ethanol using molecular techniques.

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวภรณี สว่างศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นางบุญเรือนรัตน์รัตน์ เรืองวิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ (keywords)

สาหร่ายขนาดเล็ก ไบโอเอทานอล ชีวมวล SSrDNA primer ethanol algae

บทคัดย่อ (Abstracts)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล และเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กในห้องปฏิบัติการและสภาพกลางแจ้ง ดำเนินการทดลองที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ได้เก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยและบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานน้ำตาล จำนวน 15 จังหวัด 32 แหล่ง นำไปจำแนกชนิดสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง พบสาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน ดิวิชั่น Cyanophyta 8 สกุล กลุ่มสาหร่ายสีเขียว ดิวิชั่น Chlorophyta จำนวน 18 สกุล และ ดิวิชั่น Chromophyta จำนวน 6 สกุล รวมทั้งหมด 32 สกุล สามารถคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวได้ 13 ไอโซเลท ในอาหารสังเคราะห์สูตร Bold's Basal medium จำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในส่วนของ rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ 11 คู่ พบว่าไพรเมอร์ที่จำแนกได้มี 3 คู่ ได้แก่ NS3 คู่กับ NS6 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 750 bp และ CS1 คู่กับ CS2 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500 bp และ CS3 คู่กับ CS4 มีขนาดชิ้น ดีเอ็นเอประมาณ 450-500 bp และนำชิ้นดีเอ็นเอถอดรหัสพันธุกรรมเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank (NCBI) 13 ไอโซเลท จำแนกชนิดได้ดังนี้ *Crucigenia lauterbornii* UTX LB1735 จำนวน 2 ไอโซเลท *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO18SrDNA, *Chlorella sorokiniana* strain AnSeong จำนวน 2 ไอโซเลท *Chlorella sorokiniana, Chlorella sorokiniana* genes SSU rRNA, *Chlorella* sp. CAUP H8701, *Chlorella* sp. KMMCC FC-21, *Dictyosphaerium* sp., *Masaia oloidia* strain CB2008/72 จำนวน 2 ไอโซเลท และ *Scenedesmus* sp. GDK. จากการคัดเลือกและแยกเซลล์สาหร่าย พบว่า สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็วที่สุด มีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีระยะ log phase ในช่วงวันที่ 8-12 ใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงสลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ pH 7-8 สามารถขยายและเลี้ยงในสภาพกลางแจ้งได้ในอ่างพลาสติกขนาด 600 ลิตร เก็บเกี่ยวเซลล์ได้ในวันที่ 4-8 ได้น้ำหนักเฉลี่ย 1.65 กก.น้ำหนักแห้ง/ลบ.ม. มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต และกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 74.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 5.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงเป็นชนิดที่เหมาะสมในการคัดเลือกไปเพิ่มปริมาณและศึกษาเทคโนโลยีการผลิตเป็นไบโอเอทานอลต่อไปในอนาคต

บทนำ (Introduction)

สาหร่ายเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสภาพแวดล้อมของโลกและความเป็นอยู่ของมนุษย์ เป็นส่วนหนึ่งของต้นทางห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศน์ เป็นตัวการในการรักษาสมดุลทางธรรมชาติ สามารถสร้างสารพิเศษบางชนิดที่มีประโยชน์และโทษต่อมนุษย์ เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารได้ด้วยตนเองโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไปและโดยกระบวนการออโทรฟ สาหร่ายถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Procaryote และ eukaryote กลุ่ม Procaryote ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน กลุ่มนี้มีลักษณะเหมือนแบคทีเรีย ส่วนกลุ่ม eukaryote เป็นสาหร่ายแท้ มีขนาดเล็กตั้งแต่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็นจนกระทั่งถึงขนาดใหญ่มีความยาวหลายเมตร สาหร่ายมีรูปร่างหลายแบบ อาจเป็นแบบเซลล์เดี่ยว หลายเซลล์มารวมกลุ่มกันเรียกว่าโคโลนี เป็นเส้นสายทั้งแตกแขนงและไม่แตกแขนง เป็นทัลลัสที่มีราก ลำต้นและใบคล้ายพืชชั้นสูงแต่ไม่มีระบบท่อลำเลียง ทุกเซลล์ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงเพื่อการดำรงชีวิตเหมือนๆกัน (ยุวดี, 2548 ลัดดา, 2544 ไปรมา, 2546 และ Edward and Sigee, 2010) สาหร่ายมีคลอโรฟิลล์สูง ทั้งยังอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารไม่ว่าจะเป็นคาร์โบไฮเดรต โปรตีน แร่ธาตุ และวิตามินหลายชนิด ที่สำคัญคือมีน้ำมันในปริมาณมาก และมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่าพืชหลายเท่า ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อพื้นที่ขนาดเท่ากับพื้นที่ปลูกสบู่ดำ 1 ต้น เป็นเวลา 7 ปี สบู่ดำจะให้น้ำมันร้อยละ 25 ในขณะที่สาหร่ายให้น้ำมันมากถึงร้อยละ 1,000 ปริมาณน้ำมันนี้อาจเพียงพอกระทั่งผลิตเพื่อส่งออกต่างประเทศได้ (นิรนาม, 2552) ทำให้สาหร่ายมีศักยภาพมากต่อการผลิตพลังงานทดแทนน้ำมันดิบ ซึ่งคาดการณ์ว่าจะหมดไปภายใน 30 ปีข้างหน้า Lali (2008) และ Anonymous (2009) ได้กล่าวว่า วิวัฒนาการของการผลิตพลังงานชีวมวล (biomass) ได้มาถึงยุคที่ 4 แล้วคือ การผลิตพลังงานจากสาหร่ายหรือสาหร่ายดัดแปรพันธุกรรม น้ำมันดิบเข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินชีวิตของมนุษย์และนับวันยิ่งมีบทบาทมากยิ่งขึ้น ทำให้เกิดวิกฤตน้ำมันและปัญหาสิ่งแวดล้อมสืบเนื่องมาจากน้ำมัน ทำให้หลายประเทศทั่วโลกพยายามคิดค้นพลังงานใหม่ๆ ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ พลังงานจากพืช หรือพลังงานสะอาดขึ้นมาทดแทนพลังงานจากน้ำมันดิบที่กำลังจะหมดไป แม้ว่าสถานการณ์ปัจจุบันราคาน้ำมันจะปรับตัวลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ความสำคัญของพลังงานทดแทนยังคงไม่แปรเปลี่ยน ซึ่งเป็นเพราะซัพพลายน้ำมันโลกที่เหลือน้อย กลายเป็นแรงผลักดันให้หลายประเทศทั่วโลกวิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนต่อไป ในส่วนของประเทศไทยสัญญาณที่เห็นได้ชัดเจน คือ บริษัทการปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย จำกัด (มหาชน) (ปตท.) ซึ่งเป็นบริษัทน้ำมันแห่งชาติได้ทุ่มเงินไม่น้อยกว่าปีละ 1,000 ล้านบาท ทำการวิจัยพลังงานทดแทนโดยใช้วัตถุดิบที่ไม่ใช่พืชอาหาร การเพราะไม่ต้องการสร้างปัญหาการแย่งชิงทรัพยากร ซึ่งจะเกิดปัญหาต่างๆตามมามากมาย โดยเฉพาะจะทำให้เกิดปัญหาขาดแคลนพืชอาหาร ส่งผลให้ราคาผันผวนมาก และหากเปรียบเทียบศักยภาพของสาหร่ายกับชีวมวลจากพืชที่ให้เซลลูโลส เช่น มันสำปะหลัง พบว่าสาหร่ายมีศักยภาพสูงกว่า เนื่องจากไม่ใช่พืชอาหารตลอดจนกระบวนการผลิตมีความบริสุทธิ์ สามารถย่อยสลายได้ เป็นเทคโนโลยีที่สะอาดอย่างแท้จริง ขณะที่ชีวมวลจากพืช มีโครงสร้างทำลายยาก ทำให้มีของเสียหลงเหลือจากกระบวนการผลิต ปัญหาสำคัญของการผลิตพลังงานทดแทนจากสาหร่ายให้มีคุณภาพดีและปริมาณมาก คือ สายพันธุ์สาหร่ายที่เหมาะสมต่อการผลิต การเพาะเลี้ยง และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Patrick *et al*., 2015)

การศึกษาการคัดเลือกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล ซึ่งมีการเก็บรวบรวมตัวอย่างสาหร่าย การจำแนกชนิด การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายในอาหาร การศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย การเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายที่คัดเลือกได้ จะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตพลังงานทดแทนของไทยต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กในห้องปฏิบัติการและสภาพกลางแจ้ง

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

1.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติในประเทศไทยและบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานน้ำตาล

ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติในประเทศไทยและบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานน้ำตาล โดยใช้ถุงเก็บตัวอย่างที่มีความถี่ของผ้าไนลอนขนาด 40 ไมครอน ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายสดโดยการแช่น้ำแข็งเพื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และเก็บตัวอย่างสาหร่ายดองด้วยสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำมาจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ภาพที่ 1)

1.2 การคัดเลือกและแยกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กให้บริสุทธิ์ในสภาวะที่เหมาะสม

<u>วิธีการ</u>

ก. <u>บนอาหารแข็ง</u>

นำตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บรวบรวมไว้ มาแยกชนิดโดยวิธี dilution plate technique บนอาหารแข็ง 2 สูตร คือ อาหารสูตร BG11 สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และ สูตร Bold’s Basal medium (BBM) สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว แล้วนำมาวางให้เจริญเติบโตใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ (ปิยะรัตน์, 2554) เป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำให้บริสุทธิ์โดยการ Streak plate บนอาหาร BG11 และ BBM บ่มไว้ใต้แสงฟลูออแรสเซนต์ 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 3 วัน เก็บโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง BG และ BBM ผิวหน้าเอียง (ภาพที่ 2)

ข. <u>ในอาหารเหลว</u>

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว 13 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเหลวทั้ง 2 สูตร บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บนชั้นเลี้ยงสาหร่ายด้วยแสงไฟฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลาประมาณ 7-10 วัน จากนั้นทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายทุกวัน ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

1.3 การจำแนกชนิดสาหร่าย

1.3.1 การจำแนกชนิดของสาหร่ายทางสัณฐานวิทยา

ทำการจำแนกชนิดของสาหร่ายทางสัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามหลักการจัดหมวดหมู่ของ Desikachary (1959) Prescott (1982) และ Christensen (1966)

1.3.2 การจำแนกชนิดของสาหร่ายโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

ก. <u>การสกัดดีเอ็นเอ</u>

ทำการเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายที่คัดเลือกไว้ ในอาหารเหลว BG11 และ BBM ใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 3,000 ลักซ์ ปริมาณออกซิเจน 80 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 วัน นำอาหารเลี้ยงสาหร่ายมาปั่นแยกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นำตะกอนเซลล์ไปสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (Kang *et al*., 1998) ตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer และโดยวิธี run gel เพื่อนำไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) ต่อไป

ข. <u>การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ</u>

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ribosomal DNA โดยใช้ไพรเมอร์ 63F และ 1,387R เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และไพรเมอร์อีก 11 คู่ สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสาหร่ายสีเขียว (ตารางที่ 1)

<u>ตารางที่ 1</u> ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 12 คู่ไพรเมอร์

คู่ที่	ชื่อ	ลำดับเบสจากด้าน 5′ → 3′	จำนวน (bp)
1	63 (F)	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC	21
	1387 (R)	GGG CGG WGT GTA CAA GGC	18
2	NS3 (F)	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	19
	NS6 (R)	GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC	21
3	CS1 (F)	CGG CTG ATT AGC TTG TTG G	19
	CS2 (R)	GAG TGC TTT CGC CTT TGG	18
4	CS3 (F)	AAG GCC AAA GCA CTC TGC	18
	CS4 (R)	TTC CTC CGG CTT ATC ACC	18
5	UCP1 (F)	CAA GCW CCD GCA GAA GAC C	19
	UCP1 (R)	CCM AAA CAT AAA CAA MSW CAG G	22
6	UCP2 (F)	CCT TGW CKT TGT TTA TGT TTK GG	23
	UCP2 (R)	GCT CAT GTY TCH GGB AAA ATW CG	23

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กจำนวน 12 คู่ไพรเมอร์ (ต่อ)

คู่ที่	ชื่อ	ลำดับเบสจากด้าน 5′ → 3′	จำนวน (bp)
7	UCP3 (F)	CGW ATT TTV CCD GAG ATA TGG GC	23
	UCP3 (R)	ATG TAT GCK TTT TTA GAT CGT	21
8	UCP4 (F)	ACG ATC TAA AAA MGC ATA CAT	21
	UCP4 (R)	AAT TGT WTC DTT DGC ACC DGA AGT	24
9	UCP5 (F)	ACT TCH GGT GCH AGH GAW ATA ATT	24
	UCP5 (R)	GAA ACH CGD ATG GGD TCK GG	20
10	UCP6 (F)	CCM GAH CCC ATH CGD GTT TC	20
	UCP6 (R)	GGB MGH TTW AAT GGH GCH GAW AT	23
11	UCP7 (F)	ATW TCD GCD CCA TTW AGD CKV CC	23
	UCP7 (R)	ATG GTW GGW CAW AAA TTD GGT GAG TTT	24
12	UCP8 (F)	AAA TTC GCC HAG TTT WTG WCC WAT CAT	24
	UCP8 (R)	GCH CAA HTD GTD GCN AAA GAG GG	20

การเตรียมปฏิกิริยา 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 Initial denaturation : 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation : 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 Annealing : 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 Extension : 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
} จำนวน 30 รอบ

ขั้นตอนที่ 5 Final extension : 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ

และตั้ง 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษา (hold) ไว้ที่อุณหภูมินี้ตลอด

ค. <u>การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่เพิ่มปริมาณได้</u>

ตรวจสอบโดยใช้เทคนิคอิเลคโตรโฟริซิส (Electrophoresis) ใช้วุ้นอากาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใส่ 1kb DNA Ladder maker จำนวน 1 ไมโครลิตรลงในหลุมแรก ตามด้วยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร จนครบทุกหลุมของแผ่นวุ้น เติม 1X TBE buffer ให้สูงกว่าหน้าแผ่นวุ้นเล็กน้อย ตั้งกระแสไฟ 150 โวลต์ นาน 40 นาที ย้อมแผ่นวุ้นด้วยเอทธิเดียมโบร์ไมด์ (ethidium bromide) แล้วนำชิ้นแผ่นวุ้นที่ได้ไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมในแผ่นวุ้น (Gel documention) จากนั้นทำความสะอาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยชุด GeneJET^{TM} PCR Purification Kit แล้วนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปถอดรหัสพันธุกรรมด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Automate Sequencer)

ง. <u>เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลในธนาคารยีน (GenBank) โดยวิธี blastn</u>

นำลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์ผลมาจำแนกชนิดสาหร่าย โดยเข้าไปที่เวปไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ ต้องการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบส ให้เลือกไปที่ BLAST เลือก nucleotide blast เข้าไปที่ Browse และเลือก Sequence ที่ต้องการเปรียบเทียบ จากนั้นเลือกฐาน Database เป็น Nucleotide collection (nr/nt) และเลือก BLAST รอการประมวลผลจะเห็นผลการเปรียบเทียบ sequence และผลของชนิดสาหร่ายที่ได้เปรียบเทียบกับ GenBank

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก

2.1 การศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

เนื่องจากความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย สาหร่ายแต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วง pH ที่ต่างกัน เมื่อสาหร่ายได้รับธาตุอาหารในการเจริญเติบโตเต็มที่ระยะหนึ่งแล้วจะมีการปลดปล่อยสารภายในเซลล์ออกมาทำให้มีค่า pH ลดลง นอกจากนี้มีรายงานของ Patrick *et al*. (2015) และ Megerle and Wayne (2013) ว่าถ้ามีการเลี้ยงสาหร่ายโดยให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมด้วยจะทำให้มีค่า pH สูงขึ้น ดังนั้นการศึกษา pH เบื้องต้นของสาหร่ายที่คัดเลือกได้จะสามารถประยุกต์การให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือการเติมสารอาหารบางอย่างเพื่อให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องและสามารถเก็บเซลล์ได้ตลอดในการทดลอง

เทอาหาร BBM ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงใน Flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี จากนั้นทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้เป็น 4 5 6 7 8 9 10 และ 11 ตามกรรมวิธีที่ได้วางแผนไว้เสร็จแล้วดูดเซลล์สาหร่ายปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหาร แล้วนำไปวัดค่า OD เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ให้เท่ากันทุก Flask นำไปเลี้ยงให้เจริญเติบโตบนชั้นเลี้ยงสาหร่ายด้วยแสงไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงเวลาให้แสง 16 ชั่วโมง สลับช่วงมืด 8 ชั่วโมง (รุ่งนภา, 2543) ค่าออกซิเจน 80 เปอร์เซ็นต์ ทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายทุกวันเป็นระยะเวลา 21 วัน ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง นำค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตของสาหร่ายตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงช่วงที่สาหร่ายมีการเจริญคงที่ (stationary phase) คือวันที่ 12 ไปหาค่าเฉลี่ย แล้วนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IRRI Stat

2.2 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายในสภาพกลางแจ้ง

ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ในอาหาร BBM pH 7-8 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด มีวิธีการเลี้ยงเช่นเดียวกับการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในห้องปฏิบัติการ ต่างกันที่อุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเป็นอ่างขนาด 200-400 ลิตร มีความแข้มแสง 4,000-6,000 ลักซ์ ให้ออกซิเจนโดยใช้ใบพัดกวน 150 รอบต่อนาที ทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 15 วัน ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

2.3 การวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย

ทำการหาปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) โดยชั่งถ้วยเปล่าที่อบแห้งแล้วก่อน แล้วใส่ตัวอย่างสาหร่ายที่ปั่นตกตะกอนแล้วจำนวน 1 กรัม 5 ซ้ำ จากนั้นนำไปอบแห้งในตู้อบ (oven) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ใช้ที่คีบนำถ้วยมาใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นคีบถ้วยจากโถดูดความชื้นมาชั่งอีกครั้งและคำนวณค่าน้ำหนักแห้งที่ได้

2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (คาร์โบไฮเดรทและกลูโคส) ในเซลล์สาหร่าย

ก. <u>การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรท</u>

วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ กรรมวิธีคือ คาร์โบไฮเดรทของสาหร่าย 15 ไอโซเลท ทำการวัดปริมาณาร์โบไฮเดรต ตามวิธีการของ Borowitzka (1991) โดยชั่งตัวอย่างสาหร่าย 1 กรัม ใส่หลอดแก้ว และทำสาหร่ายให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการเติม 1M H_2SO_4 จำนวน 2 มิลลิลิตร และไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer นำไปใส่หลอด centrifuge ขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย 1M H_2SO_4 ให้ได้ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ตั้งที่อุณหภูมิห้องให้เย็น และนำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำใสเก็บไว้เพื่อวัดหาปริมาณคาร์โบไฮเดรทปรับความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรทในน้ำใสไม่เกิน 50 ไมโครกรัม (เริ่มต้นอาจจะเจือจางดูดน้ำใส 0.1-05 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ได้ 2 มิลลิลิตร) เตรียม standard glucose ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัม และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันโดยการ vortex เติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้นทันทีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็นประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร และนำมาคำนวณหาค่าคาร์โบไฮเดรทกับค่า standard curve

ข. <u>การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส</u>

วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ กรรมวิธีคือ กลูโคสของสาหร่าย 15 ไอโซเลท ทำการวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพ (Multiparameter Bioanalytical System YSI 7100) จากนั้นนำมาผลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งที่ได้

ระยะเวลา เดือน ตุลาคม 2554 – กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ต.รังสิต อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

ผลการวิจัย (Results)

1. การคัดเลือกสาหร่ายขนาดเล็กที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

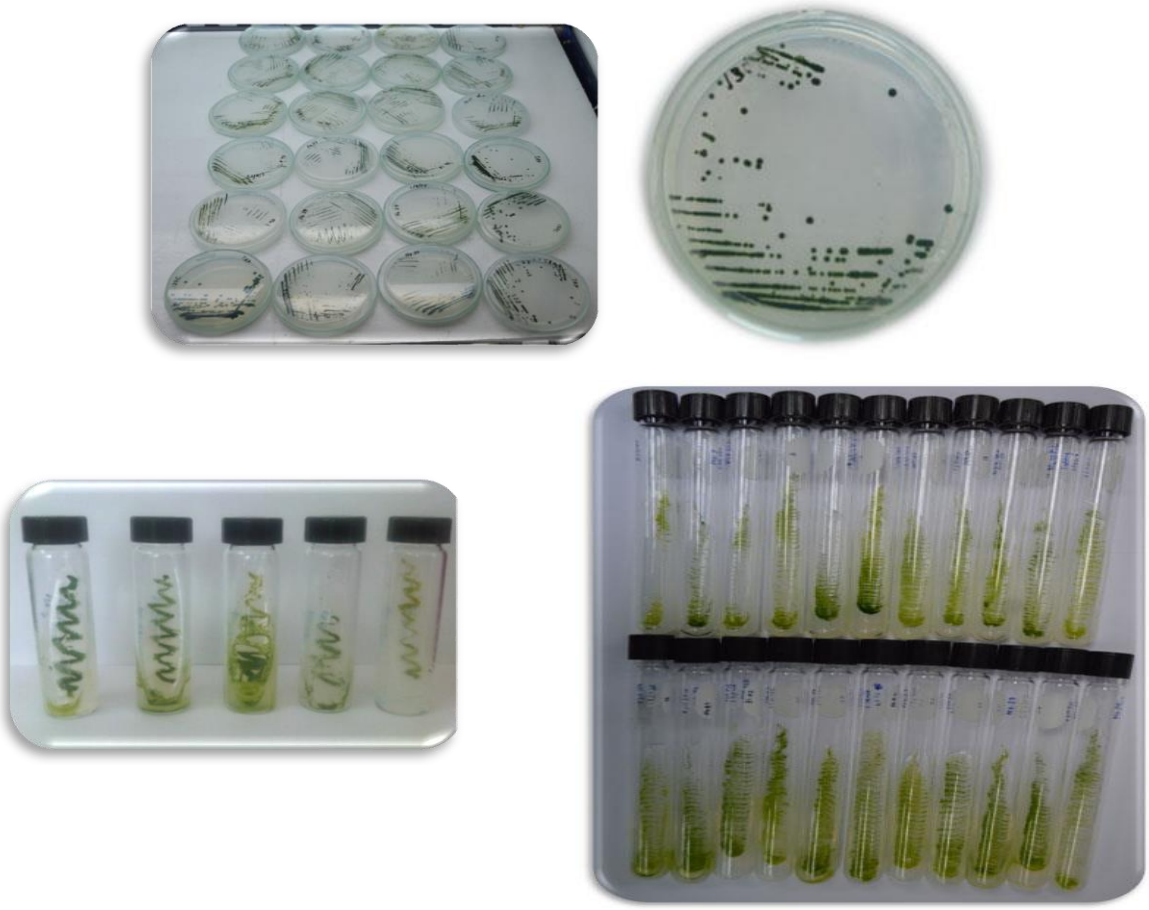
1.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติในประเทศไทยและบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานน้ำตาล

สามารถเก็บตัวอย่างสาหร่ายจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติและบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานน้ำตาลได้จำนวน 15 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 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1)

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

1.2 การคัดเลือกและแยกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กให้บริสุทธิ์ในสภาวะที่เหมาะสม

สามารถแยกและคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวที่เป็นโคโลนีเดี่ยวได้จำนวน 266 ไอโซเลท ในอาหารสูตร Bold's Basal medium (ภาพที่ 2 และ ตารางที่ 1) ไม่สามารถแยกและเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินให้บริสุทธิ์ได้ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวอย่างสาหร่ายในกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงินที่สุ่มนำมาเลี้ยงอาจมีปริมาณไม่มากเพียงพอต่อการเจริญเติบโต และมีบางส่วนถูกแพลงก์ตอนสัตว์กินในระหว่างการการเก็บรักษาก่อนนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ



<u>ภาพที่ 2</u> การคัดเลือกและแยกสาหร่ายให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็งสูตร Bold's Basal medium

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนไอโซเลทสาหร่ายขนาดเล็กที่เก็บได้จากแหล่งต่างๆ

ชื่อตัวอย่าง	แหล่งเก็บ	จังหวัด
ADOA1	บ่อประปา มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ขอนแก่น
ADOA2	อ่างเก็บน้ำบ้านกุฏิพระ	เพชรบูรณ์
ADOA3	เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์	ลพบุรี
ADOA4	แม่น้ำบริเวณสันเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์	สระบุรี
ADOA5	เขื่อนภูมิพล	ตาก
ADOA6	อ่างเก็บน้ำกาแล	เชียงใหม่
ADOA7	เขื่อนแม่กวง	เชียงใหม่
ADOA8	อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้	เชียงใหม่
ADOA9	โรงงานน้ำตาลมิตรผล	ชัยภูมิ
ADOA10	โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อน้ำเสียที่ 4	ชัยภูมิ
ADOA11	โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อน้ำเสียที่ 9	ชัยภูมิ
ADOA12	อ่างเก็บน้ำธรรมชาติลำน้ำพอง	ขอนแก่น
ADOA13	บึงพลาญชัย	ร้อยเอ็ด

1.3 การจำแนกชนิดสาหร่าย

1.3.1 การจำแนกชนิดของสาหร่ายทางสัณฐานวิทยา

จากการจำแนกลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายขนาดเล็กใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง พบสาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน ดิวิชั่น Cyanophyta 8 สกุล และกลุ่มสาหร่ายสีเขียว ดิวิชั่น Chlorophyta จำนวน 18 สกุล ดิวิชั่น Chromophyta จำนวน 6 สกุล รวมทั้งหมด 32 สกุล (ตารางที่ 2) สาหร่ายที่พบในแต่ละแหล่ง มีดังนี้

1. อ่างเก็บน้ำบางพระ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี พบสาหร่ายทั้งหมด 16 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 6 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Chroococcus* sp. *Merismopedia* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. Division Chlorophyta 7 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Pediastrum* sp. *Chlamydomonas* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. และ Division Chromophyta 3 สกุล ได้แก่ *Navicula* sp. *Nitzchia* sp. และ *Peridinium* sp.

2. เขื่อนลำตะคอง อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา พบสาหร่ายทั้งหมด 20 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 6 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Chroococcus* sp. *Merismopedia* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. Division Chlorophyta 11 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Dictyosphaerium* sp. *Selenastrum* sp. *Botryococcus* sp. *Golenkinia sp. Pediastrum* sp. *Chlamydomonas* sp. *Volvox* sp. *Euglena* spp. และ Division Chromophyta 3 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Navicula* sp. และ *Peridinium* sp.

3. เขื่อนอุบลรัตน์ อ.อุบลรัตน์ จ.ขอนแก่น พบสาหร่ายทั้งหมด 24 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 7 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Chroococcus* sp. *Merismopedia* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. *Spilulina* sp. Division Chlorophyta 13 สกุล ได้แก่ *Actinastrum* sp. *Crucigenia* sp. *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Dictyosphaerium* sp. *Oocystis* sp. *Golenkinia sp. Pediastrum* sp. *Chlamydomonas* sp. *Volvox* sp. *Staurastrum* sp. *Euglena* spp. และ Division Chromophyta 4 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. *Navicula* sp. และ *Peridinium* sp.

4. บ่อประปามหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น พบสาหร่ายทั้งหมด 12 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 4 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Anabaenopsis* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. Division Chlorophyta 5 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Chlorella* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. *Trachelomonas* spp. และ Division Chromophyta 3 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Navicula* sp. และ *Nitzchia* sp.

5. บึงประตูสีฐานมหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น พบสาหร่ายทั้งหมด 11 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 4 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Spilulina* sp. Division Chlorophyta 6 สกุล ได้แก่ *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Oocystis* sp. *Selenastrum* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. และ Division Chromophyta 1 สกุล ได้แก่ *Nitzchia* sp.

6. บึงแก่นนคร อ.เมือง จ.ขอนแก่น พบสาหร่ายทั้งหมด 12 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 5 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Chroococcus* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp.

Spilulina sp. Division Chlorophyta 5 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Oocystis* sp. *Euglena* spp. และ Division Chromophyta 2 สกุล ได้แก่ *Navicula* sp. และ *Synedra* sp. (ตารางที่ 1)

7. บึงบ้านดงหมี จ.ขอนแก่น พบสาหร่ายทั้งหมด 10 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 3 สกุล ได้แก่ *Chroococcus* sp. *Merismopedia sp. Oscillatoria* spp. Division Chlorophyta 6 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Dictyosphaerium* sp. *Oocystis* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. และ Division Chromophyta 1 สกุล ได้แก่ *Navicula* sp.

8. คลองขุดลอกหนองแวง จ.ขอนแก่น พบสาหร่ายทั้งหมด 8 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 2 สกุล ได้แก่ *Chroococcus* sp. *Oscillatoria* spp. Division Chlorophyta 6 สกุล ได้แก่ *Crucigenia* sp. *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Oocystis* sp. *Chlamydomonas* sp. *Euglena* spp.

9. อ่างเก็บน้ำบ้านกุฎิพระ อ.ชนแดน จ.เพชรบูรณ์ พบสาหร่ายทั้งหมด 22 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 6 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Merismopedia* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. *Spilulina* sp. Division Chlorophyta 12 สกุล ได้แก่ *Actinastrum* sp. *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Dictyosphaerium* sp. *Oocystis* sp. *Selenastrum sp. Golenkinia sp. Volvox* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. *Trachelomonas* spp. และ Division Chromophyta 4 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. *Navicula* sp. และ *Peridinium* sp.

10. เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี พบสาหร่ายทั้งหมด 25 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 7 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Chroococcus* sp. *Merismopedia* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. *Spilulina* sp. Division Chlorophyta 13 สกุล ได้แก่ *Actinastrum* sp. *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Dictyosphaerium* sp. *Oocystis* sp. *Tetraedron* sp. *Botryococcus* sp. *Golenkinia* sp. *Pediastrum* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. *Trachelomonas* spp. และ Division Chromophyta 5 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. *Navicula* sp. *Synedra* sp. และ *Peridinium* sp.

11. สันเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี พบสาหร่ายทั้งหมด 21 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 7 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Chroococcus* sp. *Merismopedia* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. *Spilulina* sp. Division Chlorophyta 10 สกุล ได้แก่ *Crucigenia* sp. *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Dictyosphaerium* sp. *Oocystis* sp. *Golenkinia* sp. *Pediastrum* sp. *Volvox* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp.และ Division Chromophyta 4 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. *Navicula* sp. และ *Peridinium* sp.

12. รองแม่น้ำเก่า สันเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ จ.สระบุรี พบสาหร่ายทั้งหมด 17 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 5 สกุล ได้แก่ *Chroococcus* sp. *Merismopedia* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. Division Chlorophyta 9 สกุล ได้แก่ *Crucigenia* sp. *Scenedesmus* sp. *Chlorella* sp. *Oocystis* sp. *Tetraedron* sp. *Volvox* sp. *Staurastrum* sp.

Euglena spp. *Phacus* spp.และ Division Chromophyta 3 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Navicula* sp. และ *Peridinium* sp.

13. คลองหก อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี พบสาหร่ายทั้งหมด 9 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 2 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. Division Chlorophyta 6 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Oocystis* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. *Trachelomonas* spp. และ Division Chromophyta 1 สกุล ได้แก่ *Navicula* sp.

14. เขื่อนภูมิพล จ.ตาก พบสาหร่ายทั้งหมด 20 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 5 สกุล ได้แก่ *Chroococcus* sp. *Merismopedia* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. Division Chlorophyta 10 สกุล ได้แก่ *Actinastrum* sp. *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Dictyosphaerium* sp. *Oocystis* sp. *Tetraedron sp. Chlamydomonas sp. Volvox* sp. *Euglena* spp. และ Division Chromophyta 5 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. *Navicula* sp. *Synedra* sp. และ *Peridinium* sp.

15. อ่างเก็บน้ำกาแล จ.เชียงใหม่ พบสาหร่ายทั้งหมด 14 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 3 สกุล ได้แก่ *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Spilulina* sp. Division Chlorophyta 5 สกุล ได้แก่ *Chlorella* sp. *Selenastrum* sp. *Pediastrum* sp. *Volvox* sp. *Euglena* spp. และ Division Chromophyta 5 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. *Navicula* sp. *Synedra* sp. และ *Peridinium* sp.

16. เขื่อนแม่งัด อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ พบสาหร่ายทั้งหมด 17 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 5 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Chroococcus* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Spilulina* sp. Division Chlorophyta 9 สกุล ได้แก่ *Actinastrum* sp. *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Dictyosphaerium* sp. *Oocystis* sp. *Chlamydomonas sp. Euglena* spp. *Phacus* spp. และ Division Chromophyta 3 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. และ *Peridinium* sp.

17. เขื่อนแม่กวง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ พบสาหร่ายทั้งหมด 22 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 7 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Anabaenopsis* sp. *Chroococcus* sp. *Merismopedia* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. Division Chlorophyta 12 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Dictyosphaerium* sp. *Oocystis* sp. *Pediastrum* sp. *Chlamydomonas* sp. *Volvox* sp. *Staurastrum* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp *Trachelomonas* spp. และ Division Chromophyta 3 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. และ *Peridinium* sp.

18. เขตสำนักงานชลประทาน เขื่อนแม่กวง จ.เชียงใหม่ พบสาหร่ายทั้งหมด 13 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 5 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. *Spilulina* sp. Division Chlorophyta 5 สกุล ได้แก่ *Crucigenia* sp. *Oocystis* sp. *Staurastrum* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. และ Division Chromophyta 3 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Navicula* sp. และ *Peridinium* sp.

19. อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้ อ่างที่ 1 อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ พบสาหร่ายทั้งหมด 11 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 2 สกุล ได้แก่ *Oscillatoria* spp. *Spilulina* sp. Division Chlorophyta 6 สกุล ได้แก่ *Actinastrum* sp. *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Selenastrum* sp. *Chlamydomonas* sp. และ Division Chromophyta 3 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. และ *Peridinium* sp.

20. อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้ อ่างที่ 2 อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ พบสาหร่ายทั้งหมด 8 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 1 สกุล ได้แก่ *Oscillatoria* spp. Division Chlorophyta 3 สกุล ได้แก่ *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Oocystis* sp. และ Division Chromophyta 4 สกุล ได้แก่ *Fragilaria* sp. *Navicula* sp. *Nitzchia* sp. และ *Peridinium* sp.

21. อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้ อ่างที่ 3 อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ พบสาหร่ายทั้งหมด 13 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 3 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. Division Chlorophyta 7 สกุล ได้แก่ *Actinastrum* sp. *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Dictyosphaerium* sp. *Oocystis* sp. *Selenastrum* sp. *Euglena* spp. และ Division Chromophyta 3 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Navicula* sp. และ *Peridinium* sp.

22. โรงงานน้ำตาลมิตรผล อ.ภูเวียง จ.ขอนแก่น พบสาหร่ายทั้งหมด 7 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 1 สกุล ได้แก่ *Oscillatoria* spp. Division Chlorophyta 5 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Selenastrum* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. *Trachelomonas* spp. และ Division Chromophyta 1 สกุล ได้แก่ *Navicula* sp.

23. โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อเก็บน้ำเสียที่ 4 อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ พบสาหร่ายทั้งหมด 6 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 1 สกุล ได้แก่ *Oscillatoria* spp. Division Chlorophyta 5 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Chlorella* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. *Trachelomonas* spp.

24. โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อเก็บน้ำเสียที่ 9 อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ พบสาหร่ายทั้งหมด 6 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 1 สกุล ได้แก่ *Oscillatoria* spp. Division Chlorophyta 5 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Oocystis* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. *Trachelomonas* spp.

25. อ่างเก็บน้ำธรรมชาติลำน้ำพอง จ.ขอนแก่น พบสาหร่ายทั้งหมด 16 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 5 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Chroococcus* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. Division Chlorophyta 7 สกุล ได้แก่ *Actinastrum* sp. *Scenedesmus* sp. *Chlorella* sp. *Oocystis* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp *Trachelomonas* spp. และ Division Chromophyta 4 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. *Navicula* sp. และ *Peridinium* sp.

26. บึงพลาญชัย อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด พบสาหร่ายทั้งหมด 12 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 5 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Anabaenopsis* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. Division Chlorophyta 7 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Chlorella* sp. *Oocystis* sp. *Chlamydomonas* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. *Trachelomonas* spp.

27. อ่างเก็บน้ำห้วยเสนง อ.เมือง จ.สุรินทร์ พบสาหร่ายทั้งหมด 13 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 4 สกุล ได้แก่ *Chroococcus* sp. *Merismopedia* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp.

Division Chlorophyta 6 สกุล ได้แก่ *Crucigenia* sp. *Chlorella* sp. *Oocystis* sp. *Pediastrum* sp. *Chlamydomonas* sp. *Euglena* spp. Division Chromophyta 4 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. *Navicula* sp. และ *Peridinium* sp.

28. หนองทุ่งทอง อ.เคียนซา จ.สุราษฎร์ธานี พบสาหร่ายทั้งหมด 8 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 2 สกุล ได้แก่ *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. Division Chlorophyta 6 สกุล ได้แก่ *Crucigenia* sp. *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Pediastrum* sp. *Euglena* spp.

29. อ่างเก็บน้ำศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการเกษตร อ.ยานตาขาว จ.ตรัง พบสาหร่ายทั้งหมด 14 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 4 สกุล ได้แก่ *Merismopedia* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. Division Chlorophyta 7 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Dictyosphaerium* sp. *Oocystis* sp. *Selenastrum* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. Division Chromophyta 3 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. และ *Navicula* sp.

30. อ่างเก็บน้ำศูนย์วิจัยประมงน้ำจืด จ.ตรัง พบสาหร่ายทั้งหมด 13 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 4 สกุล ได้แก่ *Chroococcus* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. Division Chlorophyta 6 สกุล ได้แก่ *Actinastrum* sp. *Scenedesmus* sp. *Oocystis* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. *Trachelomonas* spp. Division Chromophyta 3 สกุล ได้แก่ *Navicula* sp. *Nitzchia* sp. และ *Peridinium* sp.

31. เขตห้ามสัตว์ป่าทะเลน้อย จ.พัทลุง พบสาหร่ายทั้งหมด 7 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 4 สกุล ได้แก่ *Oscillatoria* spp. Division Chlorophyta 6 สกุล ได้แก่ *Scenedesmus* sp. *Chlorella* sp. *Oocystis* sp. *Euglena* spp. *Phacus* spp. *Trachelomonas* spp.

32. เขื่อนรัชประภา อ.บ้านตาขุน จ.สุราษฎร์ธานี พบสาหร่ายทั้งหมด 18 สกุล แบ่งออกเป็น Division Cyanophyta 5 สกุล ได้แก่ *Anabaena* sp. *Chroococcus* sp. *Microcystis* sp. *Oscillatoria* spp. *Phormidium* sp. Division Chlorophyta 10 สกุล ได้แก่ *Actinastrum* sp. *Scenedesmus* sp. *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. *Oocystis* sp. *Selenastrum* sp. *Chlamydomonas sp. Euglena* spp. *Phacus* spp. และ Division Chromophyta 4 สกุล ได้แก่ *Amphora* sp. *Fragilaria* sp. *Navicula* sp. *Synedra* sp. และ *Peridinium* sp.

ผลจากการทดลองพบสาหร่ายสกุล *Oscillatoria* spp. ในทุกแหล่ง แสดงว่า *Oscillatoria* spp. สามารถเจริญได้ในทุกแหล่งน้ำไม่ว่าจะเป็นแหล่งน้ำที่มีคุณภาพดีจากเขื่อน อ่างเก็บน้ำ หรือน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์สูง (organic polluted) เช่น บ่อเก็บน้ำเสียจากโรงงานน้ำตาล แสดงว่าสกุลนี้มีโครงสร้างของเซลล์ที่ทนต่อทุกสภาพแหล่งน้ำ (Palmer, 1969) และสาหร่ายสกุลที่พบน้อยที่สุด คือ *Botryococcus* sp. พบเพียง 2 แหล่ง คือ เขื่อนลำตะคอง อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา และ เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี เป็นสกุลที่น่าสนใจที่จะนำมาแยกเชื้อและเลี้ยงให้บริสุทธิ์ เพราะเป็นสกุลที่ให้น้ำมันสูง เหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล (http://en.wikipedia.org/wiki/Botryococcus_braunii)

แหล่งน้ำจากเขื่อน และอ่างเก็บน้ำ ได้แก่ อ่างเก็บน้ำบางพระ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี เขื่อนลำตะคอง อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา เขื่อนอุบลรัตน์ อ.อุบลรัตน์ จ.ขอนแก่น อ่างเก็บน้ำบ้านกุฎิพระ อ.ชนแดน จ.เพชรบูรณ์ เขื่อนภูมิพล จ.ตาก เขื่อนแม่งัด อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ เขื่อนแม่กวง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ และ เขื่อนรัชประภา อ.บ้านตาขุน จ.สุราษฎร์ธานี มีความหลากหลายของสาหร่ายค่อนข้างสูง จำนวน 16-24 สกุล จากการรายงานของ Edward and David (2010) พบว่าแหล่งน้ำที่มีสารอินทรีย์น้อย จะมีความหลากหลายของสาหร่ายสูง โดยเฉพาะสาหร่ายในกลุ่มเดสมิด เช่น *Staurastrum Cosmarium Closterium* ฯลฯ และชนิดที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำจืด ได้แก่ *Chlorella* เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวสามารถล่องลอยเป็นอิสระในน้ำและทนได้ในสภาพที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งน้ำที่มีสารอินทรีย์สูง หรือบ่อเก็บน้ำเสีย ได้แก่ โรงงานน้ำตาลมิตรผล อ.ภูเวียง จ.ขอนแก่น โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อเก็บน้ำเสียที่ 4 อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อเก็บน้ำเสียที่ 9 อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ พบว่ามีความหลากหลายของสาหร่ายน้อยมาก พบเพียง 6-7 สกุล และส่วนใหญ่จะพบในกลุ่ม *Oscillatoria*, *Euglena* spp. *Phacus* spp. และ *Trachelomonas* spp. ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Palmer (1969) ที่พบว่าแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนสารอาหารสูง พบสาหร่ายสกุล *Oscillatoria, Euglena, Scenedesmus, Chlamydomonas, Navicula, Nitzschia, Stigeoclonium* และ *Ankistrodesmus* สอดคล้องกับรายงานของ Ratnasabapathy (1975) พบสาหร่าย *Oscillatoria, Euglena* และ *Ankistrodesmus* ในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของมลพิษสูง และรายงานของ Patrick (1965) พบสาหร่าย *Euglena* และ *Oscillatoria* ทนต่อแหล่งน้ำที่มีมลพิษสูงมาก นอกจากนี้มีรายงานของ ShanKar (2013) ศึกษาสาหร่ายน้ำจืดที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์สูงซึ่งใช้เป็นดัชนีบ่งบอกถึงคุณภาพน้ำจากทั้งหมด 20 แหล่งน้ำของรัฐ Karnataka สาหร่ายที่พบเกือบทุกแหล่งคือ *Euglena, Oscillatoria, Scenedesmus* และ *Sysnedra*

ตารางที่ 2 ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ในแหล่งน้ำที่ศึกษาจำนวน 32 แหล่ง

ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งน้ำ																																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																																	
Order Nostocales																																	
Family Nostocaceae																																	
Anabaena sp.	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	17
Anabaenopsis sp.	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3
Order Chlorococcales																																	
Family Chroococcaceae																																	
Chroococcus sp.	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	16
Merismopedia sp.	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	12
Microcystis sp.	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	24
Order Nostocales																																	
Family Oscillatoriaceae																																	
Oscillatoria spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32
Phormidium sp.	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	15
Spilulina sp.	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Division Chlorophyta																																	
Class Chlorophyceae																																	
Order Chlorococcales																																	
Family Scenedesmaceae																																	
Actinastrum sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	12
Crucigenia sp.	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	7
Scenedesmus sp.	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	27
Family Oocystaceae																																	
Ankistrodesmus sp.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	20
Chlorella sp.	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	22
Dictyosphaerium sp.	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	10
Oocystis sp.	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	23
Selenastrum sp.	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	11
Tetraedron sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3

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

ตารางที่ 2 ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ในแหล่งน้ำที่ศึกษาจำนวน 32 แหล่ง (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งน้ำ																																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	
Family Botryococcaceae																																	
Botryococcus sp.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Family Chlorococcaceae																																	
Golenkinia sp.	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Family Hydrodictyaceae																																	
Pediastrum sp.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	9
Order Volvocales																																	
Family Chlamydomonadaceae																																	
Chlamydomonas sp.	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	11
Family Volvocaceae																																	
Volvox sp.	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
Order Zygnematales																																	
Family Desmidiaceae																																	
Staurastrum sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Class Euglenophyceae																																	
Order Euglenales																																	
Family Euglenaceae																																	
Euglena spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	29
Phacus spp.	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	21
Trachelomonas spp.	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	12
Division Chromophyta																																	
Class Bacillariophyceae																																	
Order Bacillariales																																	
Family Fragilarineae																																	
Amphora sp.	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	18
Fragilaria sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	13
Family Naviculaceae																																	
Navicula sp.	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	23
Nitzchia sp.	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	6
Synedra sp.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5

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

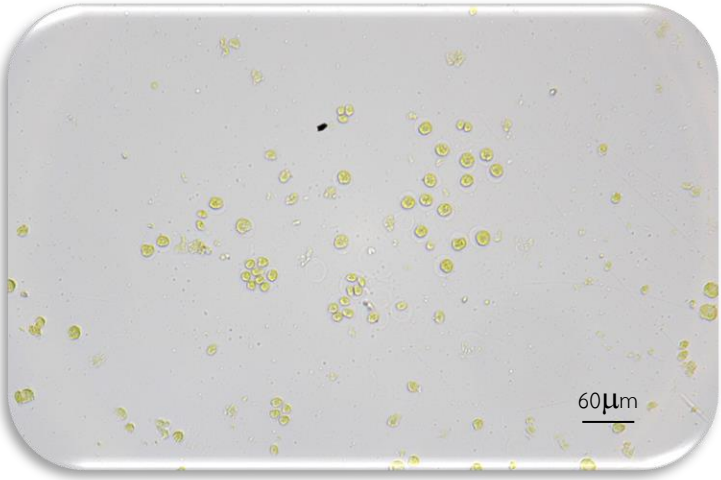
ตารางที่ 2 ชนิดของสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ในแหล่งน้ำที่ศึกษาจำนวน 32 แหล่ง (ต่อ)

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 Dinophyceae Order Peridinales Family Peridinaceae *Peridinium* sp.	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	19
รวม	16	20	24	12	11	12	10	8	22	25	21	17	9	20	14	17	22	13	11	8	13	7	6	6	16	12	13	8	14	13	7	18	

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

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

จากการคัดเลือกและแยกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กให้บริสุทธิ์ข้อ 1.2 พบว่า สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) (ภาพที่ 3) มีการเจริญเติบโตเร็วกว่าสาหร่ายชนิดอื่นๆ จึงได้คัดเลือกให้เป็นตัวแทนของสาหร่ายทั้งหมดที่แยกได้ในการทดลองนี้ เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป



<u>ภาพที่ 3</u> ลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* strain (ADOA4) ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (X40, X100) มีขนาดของเซลล์ 30-40 ไมครอน รูปร่างเป็นลักษณะเซลล์เดี่ยว หรืออยู่รวมเป็นกลุ่มเซลล์ รูปกลมรี คลอโรพลาสต์รูปถ้วยหรือเป็นแผ่นอยู่ริมเซลล์

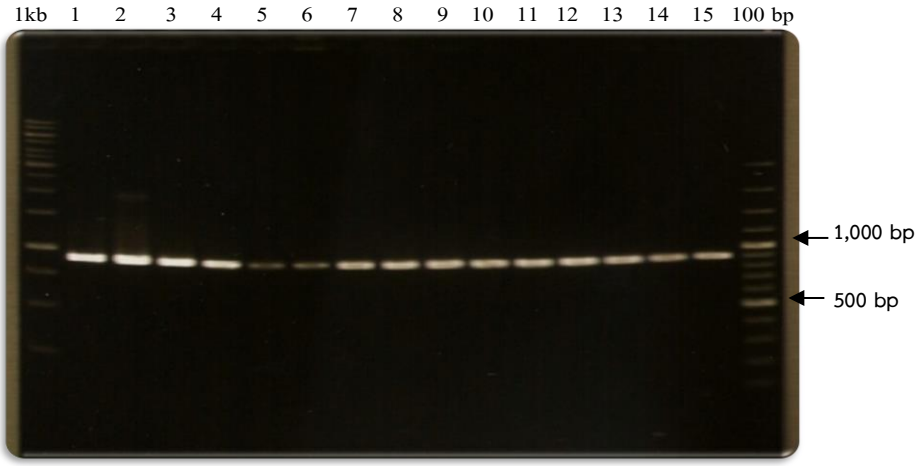
1.3.2 การจำแนกชนิดของสาหร่ายโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงมี 3 คู่ ได้แก่ NS3 คู่กับ NS6 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 750 bp CS1 คู่กับ CS2 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500 bp และ CS3 คู่กับ CS4 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 450-500 bp (ภาพที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลของ GenBank (NCBI) พบว่าเป็นชนิด *Crucigenia lautebornii* UTX LB1735 จำนวน 2 ไอโซเลท *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO18SrDNA, *Chlorella sorokiniana* strain AnSeong จำนวน 2 ไอโซเลท *Chlorella sorokiniana, Chlorella sorokiniana* genes SSU rRNA, *Chlorella* sp. CAUP H8701, *Chlorella* sp. KMMCC FC-21, *Dictyosphaerium* sp., *Masaia oloidia* strain CB2008/72 จำนวน 2 ไอโซเลท *Scenedesmus* sp. GDK. มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 97-100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับการรายงานของ Edward and David (2010) วิธีการจำแนกชนิดของสาหร่ายที่ใช้กันโดยทั่วไป คือ การวิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ ทั้งในส่วนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-geen algae) ใช้ในส่วนของ 16S rRNA genes และสาหร่ายในกลุ่มยูคาริโอต ศึกษาในส่วนของ 18S rRNA และ chloroplast DNA) ซึ่ง Hsiuan *et al.* (2001) ได้ศึกษาความแตกต่างของ *Chlorella* spp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ซึ่งเก็บรวบรวมได้จากไตหวันและอินโดนีเซีย โดยการหาลำดับเบสในส่วนของ SSU rDNA บริเวณนิวเคลียส และคลอโรพลาสต์ พบว่ามีความแตกต่างบริเวณ NS12 โดยใช้ไพรเมอร์จำแนกในส่วนของนิวเคลียส คือ NS1 คู่กับ NS2 มีขนาดความยาวประมาณ 550 bp และใช้ไพรเมอร์จำแนกในส่วนคลอโรพลาสต์ คือ CS1 คู่กับ CS2 มีขนาด 500 bp และ CS3 คู่กับ CS4 มีขนาด 450-500 bp ซึ่งสามารถนำมาใช้แยกและหาความสัมพันธ์ในแต่ละชนิดได้ และจาก

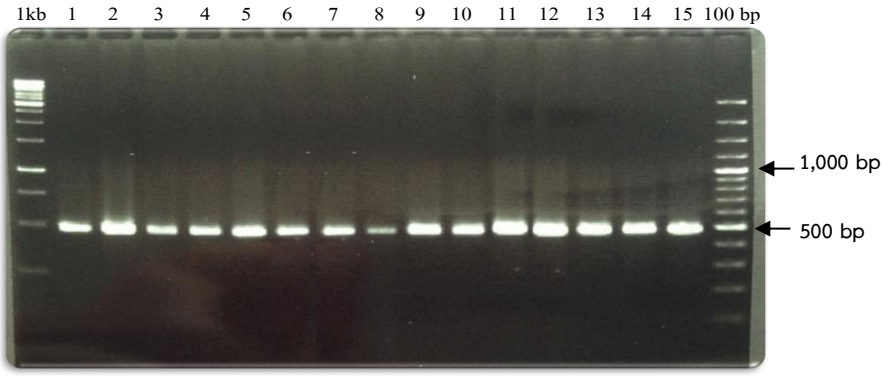
การรายงานของ Reynaldo (2012) ได้ศึกษาการจำแนกชนิดของสาหร่ายเพื่อผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ในส่วนของ 16S rRNA และ 18S rRNA gene เพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ผลจากการหาลำดับเบสเปรียบเทียบกับ NCBI มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน *Synechococcus* sp., 99% *Sellaphora pupula* 98% *Chlorella sorokiniana* 99% *Scenedesmus abudans* 99% และ *Chlorella vulgaris* 99%

<u>ตารางที่ 3</u> แสดงการจำแนกชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กจากพื้นที่ต่างๆ โดยใช้วิธีถอดรหัสพันธุกรรมในส่วนของ ribosomal DNA

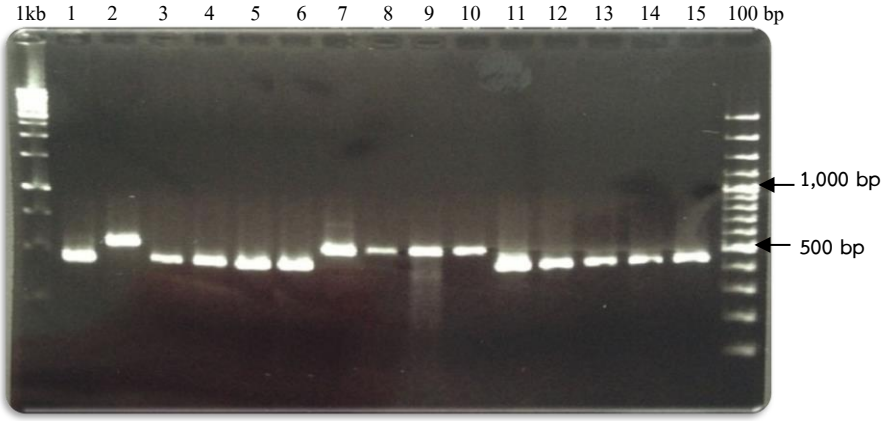
ลำดับที่	ชื่อตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	รหัสที่เหมือน GenBank	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเทียบกับ NCBI	แหล่งที่พบ
1	Control1	*Chloerlla vulgaris* TISTR 8580	-	-	คลังสาหร่ายแห่งประเทศไทย (วว.)
2	Control2	*Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260	-	-	คลังสาหร่ายแห่งประเทศไทย (วว.)
3	ADOA1	*Crucigenia lautebornii* UTEX LB1735	JQ356710.1	100%	บ่อประปา ม.ขอนแก่น จ.ขอนแก่น
4	ADOA2	*Masaia oloidia* strain CB2008/72	HQ322128.1	97%	อ่างเก็บน้ำบ้านกุฎิ-พระ จ. เพชรบูรณ์
5	ADOA3	*Crucigenia lautebornii* UTEX LB1735	JQ356710.1	100%	สันเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ จ.ลพบุรี
6	ADOA4	*Chlorella pyrenoidosa* strain XJO18SrDNA	KC416209.1	100%	แม่น้ำบริเวณสันเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ จ.สระบุรี
7	ADOA5	*Chlorella* sp. CAUP. H8701	HF677200.1	99%	เขื่อนภูมิพล จ.ตาก
8	ADOA6	*Masaia oloidia* strain CB2008/72	HQ322128.1	99%	อ่างเก็บน้ำกาแล จ.เชียงใหม่
9	ADOA7	*Dictyosphaerium* sp.	GQ487253.1	99%	เขื่อนแม่กวง จ.เชียงใหม่
10	ADOA8	*Chlorella* sp. KMMCC FC-21	GQ122372.1	99%	อ่างเก็บน้ำห้วยฮองไคร้ จ. เชียงใหม่
11	ADOA9	*Chlorella sorokiniana* genes SSU rRNA	AB731602.1	99%	โรงงานน้ำตาลมิตรผล จ.ชัยภูมิ
12	ADOA10	*Chlorella sorokiniana* strain AnSeong	KF864472.1	99%	โรงงานน้ำตาล มิตรผล บ่อเก็บน้ำเสีย ที่ 4 จ.ชัยภูมิ
13	ADOA11	*Chlorella sorokiniana* strain AnSeong	KF864472.1	99%	โรงงานน้ำตาลมิตรผล บ่อเก็บน้ำเสียที่ 9 จ.ชัยภูมิ
14	ADOA12	*Scenedesmus* sp. GDK	KF879588.1	98%	อ่างเก็บน้ำธรรมชาติ ลำน้ำพอง จ.ขอนแก่น
15	ADOA13	*Chlorella sorokiniana*	KJ149805.1	97%	บึงพลาญชัย จ.ร้อยเอ็ด



ไพรเมอร์ NS3 คู่กับ NS6



ไพรเมอร์ CS1 คู่กับ CS2



ไพรเมอร์ CS3 คู่กับ CS4

<u>ภาพที่ 4</u> แสดงผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Product) ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กจำนวน 15 ไอโซเลทโดยใช้ไพรเมอร์ NS3 คู่กับ NS6 ไพรเมอร์ CS1 คู่กับ CS2 และ ไพรเมอร์ CS3 คู่กับ CS4

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก

2.1 การศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ความเป็นกรด-ด่าง มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$, $F = 258.1^{**}$, $CV = 4.9\%$) pH ที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย คือ pH 7 มีอัตราการเจริญเฉลี่ย 3.771 รองลงมา คือ pH 8 มีอัตราการเจริญเฉลี่ย 3.328 ส่วน pH อื่นๆสาหร่ายยังคงเจริญได้แต่ไม่ดี ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้ (ตารางที่ 4 ภาพที่ 5) การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายช่วงดีที่สุดสามารถเก็บได้ตั้งแต่วันที่ 8-12 ช่วงนี้สาหร่ายมีการเจริญสูงสุด ทำให้อาหารเลี้ยงสาหร่ายหมดไปอย่างรวดเร็ว และทำให้การเจริญของสาหร่ายในวันต่อๆมาลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ตารางที่ 4 ภาพที่ 5) สอดคล้องกับการรายงานของ Patrick *et al*. (2015) ว่า pH ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอยู่ในช่วง 7-9 Megerle and Wayne (2013) ได้ศึกษาการควบคุม pH ให้มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlamydomonas reinhardtii* เลี้ยงใน Bioreactor ขนาด 1.5 ลิตร ที่มีการสมดุลโดยการเติมอาหารที่มีแอมโมเนียม ไนเตรทและควบคุม pH ให้มีความพอดีต่อการเจริญเติบโต พบว่า การเติมแอมโมเนียม 0-4.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องที่ pH 7 ถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียมากกว่า 9 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเจริญเติบโตจะลดลงต่อเนื่อง และมีค่า pH น้อยกว่า 4 รุ่งนภา (2543) ได้ศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายน้ำจืดในแหล่งน้ำยูโทรฟิค และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *Microcystis aeruginosa* Kutzing พบว่า M. *aeruginosa* Kutzing ที่คัดเลือกได้จาก 4 แหล่งพันธุ์ คือ แหล่งพันธุ์กรุงเทพฯ ปทุมธานี นนทบุรี และราชบุรี มีการเจริญเติบโตได้ดีเมื่อให้ช่วงแสงสว่าง : มืด เท่ากับ 16 : 8 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 70-80 μ photon $m^{-2}s^{-1}$ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเท่ากับ 9-10 นอกจากนี้ Katie (2013) ศึกษา pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *Scenedesmus quadricauda* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก ลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์หรือโคโลนี เพื่อนำมาผลิตชีวมวลสำหรับผลิตไขมันเป็นพลังงานชีวมวล พบว่า เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ NaCl 0.30 M ในอาหารที่เพาะเลี้ยง *S. Quadricauda* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับ pH 7.5-8 เจริญเติบโตถึงวันที่ 11-14 ได้มีการปรับระดับ pH สูงขึ้นเป็น 9.5 สามารถเจริญเติบโตได้ดีและพบว่าหลัง 1 เดือนจากการเริ่มเพาะเลี้ยง สาหร่ายมีการผลิตไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 690 μg/ml

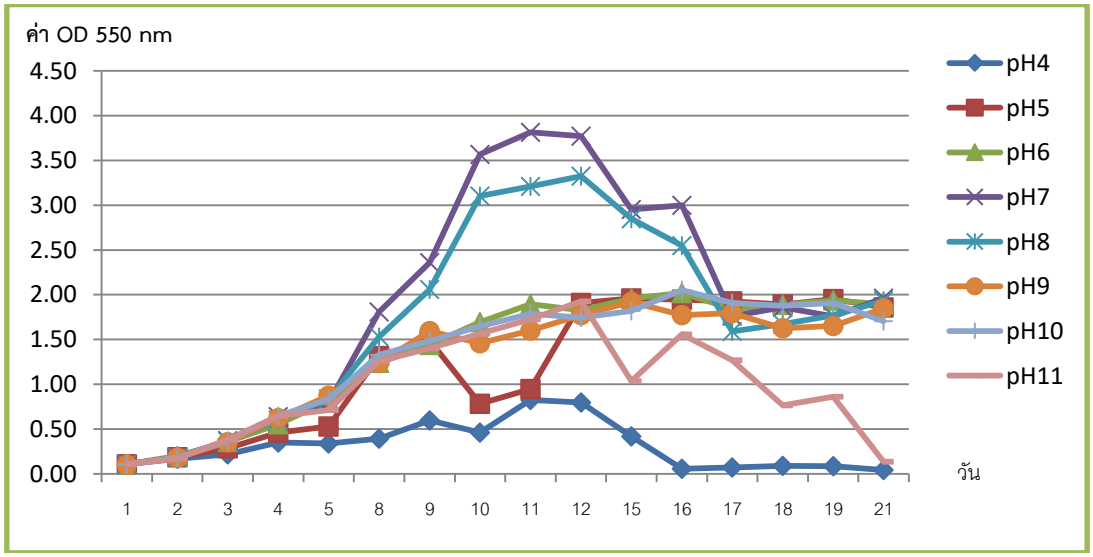
ตารางที่ 4 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ที่ค่าความขุ่น OD 550 นาโนเมตร ที่ pH 8 ระดับ ได้แก่ pH 4 5 6 7 8 9 10 11 ใน อาหารสูตร Bold's Basal mediumเป็นระยะเวลา 12 วัน

	ปริมาณความขุ่นของค่า OD ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร[1/]										
วัน / pH	1	2	3	4	5	8	9	10	11	12	ค่าเฉลี่ย
pH4	0.104	0.165	0.215	0.351	0.339	0.393	0.594	0.459	0.826	0.794d[2/]	0.424
pH5	0.106	0.183	0.284	0.461	0.528	1.315	1.491	0.782	0.946	1.910c	0.801
pH6	0.104	0.199	0.358	0.554	0.814	1.240	1.441	1.692	1.894	1.826c	1.012
pH7	0.104	0.183	0.369	0.640	0.794	1.807	2.359	3.568	3.815	3.771a	1.741
pH8	0.107	0.181	0.364	0.599	0.835	1.529	2.060	3.101	3.209	3.323b	1.531
pH9	0.103	0.182	0.352	0.621	0.870	1.241	1.592	1.459	1.602	1.771c	0.979
pH10	0.106	0.180	0.366	0.645	0.832	1.330	1.482	1.647	1.788	1.744c	1.012
pH11	0.109	0.170	0.380	0.645	0.710	1.257	1.399	1.564	1.726	1.926c	0.988
ค่าเฉลี่ย	0.105	0.180	0.336	0.565	0.715	1.264	1.552	1.784	1.976	2.133	1.061
F-test										258.01**	
SE										0.19	
CV (%)										4.9	

1/ = ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

2/ = ในแนวตั้งอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดย DMRT

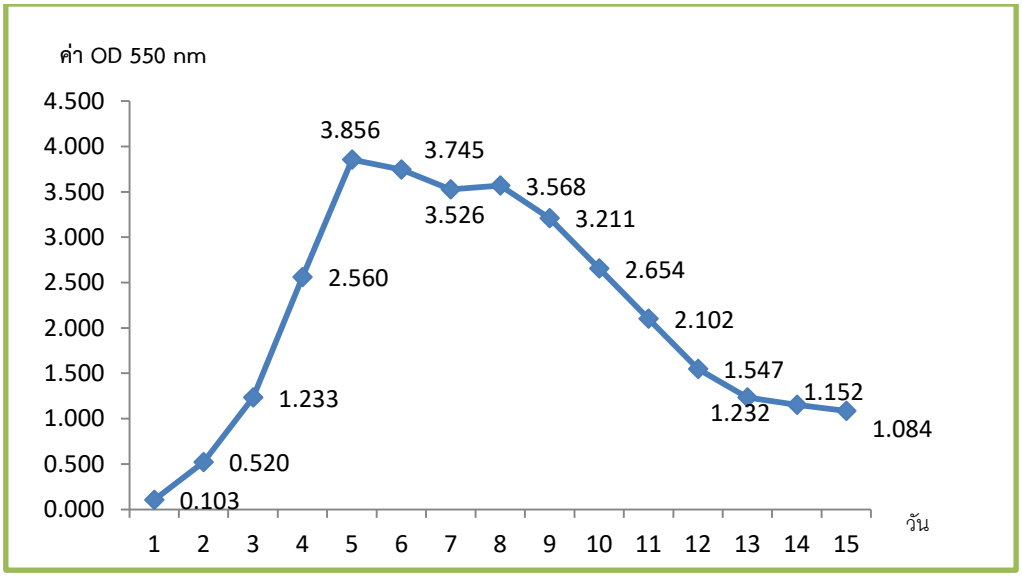
** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 5 อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ที่ค่าความขุ่นของค่า OD 550 นาโนเมตร ที่ pH 8 ระดับ ได้แก่ pH 4 5 6 7 8 9 10 11 ใน อาหารสูตร Bold's Basal mediumเป็นระยะเวลา 21 วัน

2.2 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายในสภาพกลางแจ้ง

จากผลการทดลอง พบว่า ได้กรรมวิธีการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ในสภาพกลางแจ้ง โดยใช้อ่างพลาสติกปริมาตร 600 ลิตร ซึ่งสภาวะที่ใช้เลี้ยงที่เหมาะสมคือ ความเข้มแสง 4,000-6,000 ลักซ์ ให้ออกซิเจนโดยใช้ใบพัดกวน 150 รอบต่อนาที มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ช่วงระยะที่มีการเจริญเติบโตได้ดี (log phase) วันที่ 4-5 ซึ่งในวันที่ 5 มีอัตราการเจริญสูงสุดเฉลี่ย 3.856 และสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายได้สูงสุด 584.21 กรัมน้ำหนักสดต่อ 200 ลิตร หรือ 2.92 กรัมน้ำหนักสดต่อลิตร ส่วนในวันที่ 6-9 การเจริญอยู่ในช่วงคงที่ และเจริญลดลงอย่างต่อเนื่องหลังวันที่ 10 (ภาพที่ 6) จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงในสภาพกลางแจ้งสาหร่ายได้รับความเข้มของแสงแดดสูงกว่าเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้จากสภาพอากาศธรรมชาติ ทำให้ลดต้นทุนในการผลิตในเรื่องของการใช้พลังงานแสงไฟ นอกจากนี้ข้อมูลการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่เลี้ยงในสภาพกลางแจ้งในการทดลองนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับกรรมวิธีการเลี้ยงเพิ่มขยายเซลล์สาหร่ายให้สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ในระยะยาวอย่างต่อเนื่อง มีรายงานของ Megerle and Wayne (2013) ว่าการเติมอาหารที่มีแอมโมเนียม ไนเตรทและควบคุม pH ให้มีความพอดีต่อการเจริญเติบโต พบว่า การเติมแอมโมเนียม 0-4.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องที่ pH 7 นอกจากนี้ Katie (2013) ศึกษาการเจริญเติบโตของ *Scenedesmus quadricauda* ได้ขยายเพิ่มปริมาณเซลล์สำหรับผลิตไขมันเพื่อใช้เป็นพลังงานชีวมวล พบว่า เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ NaCl 0.30 M ในอาหารที่เพาะเลี้ยง *S. Quadricauda* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับ pH 7.5-8 เจริญเติบโตถึงวันที่ 11-14 ได้มีการปรับระดับ pH สูงขึ้นเป็น 9.5 สามารถเจริญเติบโตได้ดีและเก็บเกี่ยวเซลล์ได้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลาอีก 1 เดือน



<u>ภาพที่ 6</u> อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ในสภาพกลางแจ้ง ที่ค่าความขุ่นของค่า OD550 นาโนเมตร ในอ่างพลาสติกปริมาตร 600 ลิตร อาหารสูตร Bold's Basal medium (pH 7) เป็นระยะเวลา 15 วัน

ขยายและเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายในระดับห้องปฏิบัติการ

ขยายเพิ่มปริมาณสาหร่ายในอ่างขนาด 500 ลิตรในสภาพกลางแจ้ง เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย

<u>ภาพที่ 7</u> การขยายสาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO18SrDNA (ADOA4) ในอ่างพลาสติกปริมาตร 200 ลิตร ในอ่างขนาด 600 ลิตร และเก็บเกี่ยวเซลล์ในวันที่ 4-5

2.3 การวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย

ผลการหาน้ำหนักแห้งของสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) พบว่า สาหร่ายสด 1 กรัม มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 0.567 กรัม น้ำหนักเซลล์สสาหร่ายหายไปประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการทดลองสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายได้ทั้งหมด 584.21 กรัมน้ำหนักสดต่อ 200 ลิตร หรือ 2.92 กรัมน้ำหนักสดต่อลิตร คิดเป็น 1.65 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร สอดคล้องกับรายงานของ ณัฐวุฒิ และคณะ (2554) ได้ศึกษาสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์ *Chlorella* RMUTT01 เพื่อผลิตไขมันสามารถเจริญโตได้ดีในอาหาร AM และมีปริมาณน้ำหนักแห้งสูงสุดเฉลี่ย 1.28 กรัมต่อลิตร

2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (คาร์โบไฮเดรทและกลูโคส) ในเซลล์สาหร่าย

ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต และกลูโคสของสาหร่ายที่คัดเลือกได้จำนวน 13 ไอโซเลท และ สาหร่าย Control จำนวน 2 ไอโซเลท รวม 15 ไอโซเลท พบว่า *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต และกลูโคสสูงที่สุด คือ คาร์โบไฮเดรทมีค่าเท่ากับ 74.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01, F = 628.63**, CV = 3.1%) และปริมาณกลูโคสเท่ากับ 5.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01, F = 439.52**, CV = 3.9%) ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณคาร์โบไฮเดรตและกลูโคสของสาหร่าย 15 ไอโซเลท

ชื่อตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	ปริมาณคาร์โบไฮเดรต[1/] (mg/g น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณกลูโคส[1/] (mg/ml)
Control 1	*Chlorella vulgaris* TISTR 8580	49.01 c[2/]	4.53 b[2/]
Control 2	*Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260	25.20 i	1.84 g
ADOA1	*Crucigenia lautebornii* UTEX LB1735	28.93 h	3.71 d
ADOA2	*Masaia oloidia* strain CB2008/72	15.86 k	2.23 f
ADOA3	*Crucigenia lautebornii* UTEX LB1735	12.32 l	1.95 g
ADOA4	*Chlorella pyrenoidosa* strain XJO18SrDNA	74.05 a	5.80 a
ADOA5	*Chlorella* sp. CAUP. H8701	21.08 j	1.19 i
ADOA6	*Masaia oloidia* strain CB2008/72	53.04 b	2.34 f
ADOA7	*Dictyosphaerium* sp.	45.14 d	3.22 e
ADOA8	*Chlorella* sp. KMMCC FC-21	37.09 f	1.97 g
ADOA9	*Chlorella sorokiniana* genes SSU rRNA	24.61 i	3.13 e
ADOA10	*Chlorella sorokiniana* strain AnSeong	37.61 f	2.00 g
ADOA11	*Chlorella sorokiniana* strain AnSeong	51.81 b	4.20 c
ADOA12	*Scenedesmus* sp. GDK	42.30 e	1.86 g
ADOA13	*Chlorella sorokiniana*	34.63 g	1.46 h
	F-test	628.63 **	439.52**
	SE	2.45	0.19
	CV (%)	3.1	3.9

1/ = ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

2/ = ในแนวตั้งอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดย DMRT

** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

1. เก็บตัวอย่างและคัดเลือกชนิดของสาหร่ายขนาดเล็กที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากแหล่งน้ำต่างๆในประเทศไทยจำนวน 15 จังหวัด 32 แหล่ง พบสาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน ดิวิชั่น Cyanophyta 8 สกุล และกลุ่มสาหร่ายสีเขียว ดิวิชั่น Chlorophyta จำนวน 18 สกุล ดิวิชั่น Chromophyta จำนวน 6 สกุล รวมทั้งหมด 32 สกุล
2. สามารถคัดเลือกสาหร่ายให้บริสุทธิ์ได้จำนวน 13 ไอโซเลท จำแนกโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในส่วนของ 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 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank (NCBI) พบว่าเป็นชนิด *Crucigenia lauterbornii* UTX LB1735 จำนวน 2 ไอโซเลท *Chlorella pyrenoidosa* strain XJO18SrDNA, *Chlorella sorokiniana* strain AnSeong จำนวน 2 ไอโซเลท *Chlorella sorokiniana, Chlorella sorokiniana* genes SSU rRNA, *Chlorella* sp. CAUP H8701, *Chlorella* sp. KMMCC FC-21, *Dictyosphaerium* sp., *Masaia oloidia* strain CB2008/72 จำนวน 2 ไอโซเลท *Scenedesmus* sp. GDK. มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 97-100 เปอร์เซ็นต์
3. สาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ที่คัดเลือกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ มีอัตราการเจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงสลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง มีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในระยะ log phase ในช่วงวันที่ 8-12 และเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ pH 7-8
4. *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) เลี้ยงในสภาพกลางแจ้งสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ในวันที่ 4-8 ได้น้ำหนักเฉลี่ย 1.65 กก.น้ำหนักแห้ง/ลบ.ม. และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต และกลูโคสสูงที่สุดเท่ากับ 74.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 5.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การนำไปใช้ประโยชน์

1. จากการสำรวจชนิดสาหร่ายในแหล่งน้ำต่างๆสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดถึงคุณภาพน้ำได้ ได้แก่ *Oscillatoria*, *Euglena* spp. *Phacus* spp. และ *Trachelomonas* spp. บ่งบอกถึงแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนสารอินทรีย์สูง
2. สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ที่คัดเลือกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ จำนวน 13 ไอโซเลท สามารถนำไปศึกษาองค์ประกอบที่สำคัญต่อไปได้ในอนาคต เพื่อนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฮอร์โมน หรือการหาสารควบคุมกำจัดวัชพืชโดยวิธี Allelopathy
3. สาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* (ADOA4) ที่ขยายและเพิ่มปริมาณได้ในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต เลี้ยงง่าย สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อนำไปเพิ่มปริมาณและศึกษาเทคโนโลยีการผลิตเป็นไบโอเอทานอลจากสาหร่าย ซึ่งจะนำไปใช้เป็นพลังงานทางเลือกต่อไปได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง (References)

ณัฐวุฒิ หวังสมนึก รวีพร รุพันธ์ สิทธากร กันโอภาส และยุวดี พีรพรพิศาล. 2554. การเปรียบเทียบความเข้มข้นของสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อการผลิตไขมัน. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2 หน้า.

นิรนาม. 2552. “สาหร่าย” พลังงานใหม่จากโลกใต้น้ำ. *ว. สื่อพลัง.* 1: 46 - 48.

นุชนาถ แช่มช้อย. 2557. สาหร่ายขนาดเล็ก : การเพาะเลี้ยงและการนำไปใช้ประโยชน์. *ว. มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติวิชาการ*. 34: 169-183.

ปิยรัตน์ มูลศรี. 2554. การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายในท้องถิ่นของจังหวัดเพชรบูรณ์. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์. http://research.pcru.ac.th/rdb/pro_data/files/5401027.pdf

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

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2548. สาหร่ายน้ำจืดในภาคเหนือของประเทศไทย. โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย. 361 หน้า.

รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล. 2543. ความหลากหลายของสาหร่ายน้ำจืดในแหล่งน้ำยูโทรฟิค และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *Microcystis aeruginosa* Kutzing. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 188 หน้า.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2544. แพลงก์ตอนพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 851 หน้า.

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

Ann S.R.H. and A. Godhe. 2013. BIOTECHNOLOGY – Genetic Engineering of Algal Species. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). Goteborg University, Goteborg, Sweden http://www.eolss.net/ebooks/Sample%20Chapters/C17/E6-58-03-03.pdf

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

Christensen, T. 1962. (2ed edition 1966.). Alger. *In : Botanik*., 2(2) : 1-178. Systematik Botanik. Boecher, T.W., M. Lange, and T. Sorensen (Eds). Munksgaard, Koebenhavn.

Desikachary, T.V. 1959. Cyanophyta. ICAR Publications, New Delhi. 562 p.

Edward G.B. and D.C. Sigee. 2010. Introduction to Freshwater algae : Identification and Use as Bioindicators. John Wile & Sons, Ltd. 40 p.

Hsiuan, L.W., R.S. Hseu and L.P. Lin. 2001. Identification of Chlorella spp. Isolates using ribosomal DNA sequence. Bot. Bull. Acad. Sin. 42:115-121.

Kang H.W, Y.G. Cho, U.H.Yoon and M.U. Eun. 1998. A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. Plant Mol Biol 16: 1-9.

Katie, M. 2013. Optimizing Growth of Microalgae for Use as a Potential Biofuel Feedstock. Lawrence Berkeley National Laboratory. Berkeley, California. 22 p.

Lali, A. 2008. Biotechnology for next generation biofuels/bioenergy. ICS Workshop Trieste. DBT-UICT centre of energy biosciences. Institute of chemical technology. Matunga, Mumbai. 20 p.

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.

Megerle, L.S. and R.C.Wayne. 2013. Achieving pH control in microalgal cultures through fed-batch addition of stoichiometrically-balanced growth media. Scherholz and Curtis BMC Biotechnology. 13 : 39.

Palmer, C.M. 1969. A composite rating of algae tolerating organic pollution. Phyco. 15 : 78-82.

Patrick, R. 1965. Algae as indicator of pollution In biological problems in water pollution In biological problems in water pollution. 3nd Seminar Bot. A. Tuft. Sanitory Eng. Centre Cincinati Ohio. pp 223-232.

Patrick L. and P. Sorgeloos. 2015. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture : Algae Growing Conditions. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Ghent, Belgium.

Prescott, G.W. 1982. Algae of the Western Great Lkes Area. Otto Kaetz Science Publishers. W. Germany. 977 p.

Ratnasabapathy, M. 1975. Biological aspects of Wardiebum sewage oxidation pond. *Malaysian Sci*. 3 (a) : 75-87.

Reynaldo, M. 2012. Identification of algal strains by PCR amplification and evaluation of their fatty acid profiles for biodiesel production (Thesis). Louisiana State University. 88 p.

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

Seifert, K. A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Mol. Ecol. Resour*. 9: 83-89.

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.

http://en.wikipedia.org/wiki/Botryococcus_braunii

http://www.neutron.rmutphysics.com/news/index.php?option=com_content&task=view&id=2654

ภาคผนวก (Appendix)

ตารางผนวกที่ 1.1 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

ตารางผนวกที่ 1.2 อาหารเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวสูตร Bold's Basal medium (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

ภาคผนวก 2

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

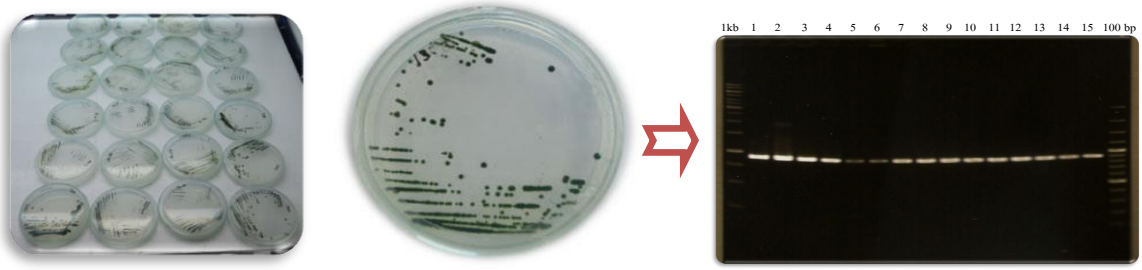
NaCl	292.2	กรัม
เติมน้ำให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

10XTBE buffer เตรียม 1,000 มิลลิลิตร

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

เก็บตัวอย่างน้ำที่มีสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

นำมาเลี้ยงในอาหารแข็งและอาหารเหลวในห้องปฏิบัติการ



แยกเชื้อสาหร่ายให้บริสุทธิ์ วิเคราะห์และจำแนกชนิดในส่วนของ rDNA

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

ขยายและเพิ่มปริมาณขนาด 200 ลิตรในสภาพกลางแจ้ง เก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายและนำไปวิเคราะห์

<u>ภาพ</u> สรุปขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง จำแนก คัดเลือกเซลล์และเลี้ยงขยายเพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์สาหร่าย