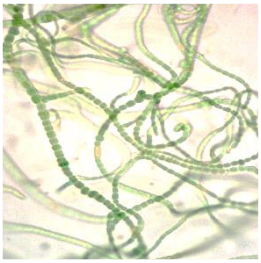
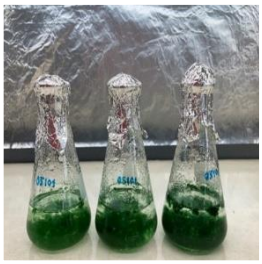
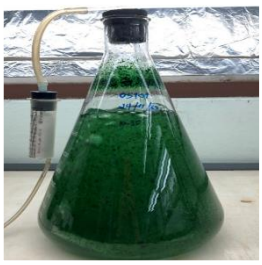
การเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Hapalosiphon ในอาหารเหลว BG-11 ในระดับห้องปฏิบัติการ



ISBN : 978-974-436-977-2

โครงการวิจัยการจัดการธาตุอาหารพืชร่วมกับการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพ
จากจุลินทรีย์และชีวมวลในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชปลอดภัย

กรมวิชาการเกษตร 2565

การเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Hapalosiphon
ในอาหารเหลว BG-11 ในระดับห้องปฏิบัติการ

ISBN : 978-974-436-977-2

คณะผู้จัดทำ

นางประไพ	ทองระอา	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
นางสาวณัฐนันท์	ไกรเลิศรัตนชัย	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
นางสาวศิริลักษณ์	แก้วสุรลิขิต	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
นางสาวแววตา	พลกุล	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
นางสาววนิดา	โนบรรเทา	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
นางสาวศุภกาญจน์	ล้วนมณี	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

จัดทำโดย : กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

พิมพ์ครั้งที่ : 1

ออกเผยแพร่ : วันที่ 21 กรกฎาคม 2566

ลิขสิทธิ์ของกรมวิชาการเกษตร ห้ามคัดลอกข้อความหรือส่วนใดส่วนหนึ่งของหนังสือไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

พิมพ์เมื่อ : กรกฎาคม 2566

สถานที่ติดต่อ : กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
โทรศัพท์ 02-579-4116 โทรสาร 02-940-5942

คำนำ

ประเทศไทยมีทรัพยากรชีวภาพจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้ กรมวิชาการเกษตรเป็นแหล่งรวบรวมและเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรที่มีศักยภาพสูงสามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ประโยชน์ในการผลิตพืชได้ เช่น ชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืช และผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพ เป็นต้น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (Nitrogen fixing blue-green algae) สกุล Hapalosiphon มีศักยภาพในการเลี้ยงขยายเพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลได้ดี จัดเป็นแหล่งชีวมวลที่สำคัญที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีวันหมด (renewable biomass source) สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ดังนั้นกระบวนการเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Hapalosiphon ในอาหารเหลว BG-11 ในระดับห้องปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นขั้นตอนเบื้องต้นในการนำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากแหล่งรวบรวมและเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ในการผลิตพืช

คณะนักวิจัย
มกราคม 2566

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	1
เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี	1
วิธีการ	2
เอกสารอ้างอิง	4
ภาคผนวก	5

การเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Hapalosiphon ในอาหารเหลว BG-11_0 ในระดับห้องปฏิบัติการ

1. บทนำ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกลุ่มที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ จำพวกที่มีเฮเทอโรซีสต์จัดเป็นแหล่งชีวมวลที่สำคัญที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีวันหมด (renewable biomass source) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Hapalosiphon อยู่ในกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีเฮเทอโรซีสต์และเป็นเส้นสาย (filament) สามารถสร้างสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ หรือสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ เช่น สารคล้ายฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน จิบเบอเรลลิน และกรดอะมิโน เป็นต้น (Zulpa *et al.*, 2003; ประไพ และคณะ, 2560) ซึ่งสารดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชได้ กระบวนการเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Hapalosiphon ในอาหารเหลว BG-11_0 ในระดับห้องปฏิบัติการ เป็นวิธีการขั้นต้นในการนำเอาสาหร่าย สีเขียวแกมน้ำเงินที่อนุรักษ์ไว้ไปใช้ประโยชน์ในการผลิตพืช

2. วัตถุประสงค์

เพื่อให้ได้วิธีการเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Hapalosiphon ในอาหารเหลว BG-11 แขวนลอยที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้เป็นหัวเชื้อในการเลี้ยงขยายเพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในระดับห้องปฏิบัติการได้เพิ่มขึ้น 10 เท่า

3. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ ได้แก่

3.1.1 เครื่องชั่งอย่างละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.1.2 ตู้ปลอดเชื้อ

3.1.3 ตู้อบ

3.1.4 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

3.1.5 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound

3.1.6 เครื่องวัดแสง (Lux meter)

3.1.7 ห้องควบคุมอุณหภูมิและแสง

3.1.8 ปั๊มลม 4 ทาง

3.1.9 เครื่องวัดอัตราการไหลของลม

3.1.10 สายยางซิลิโคน

3.1.11 ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 125 และ 5,000 มิลลิลิตร

3.1.12 บีกเกอร์แก้วขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.1.13 ชุดจุกยางดำเบอร์ 18 เจาะรู พร้อมหลอดแก้วให้อากาศ

3.1.14 กระบอกฉีดยาขนาด 50 มิลลิลิตร

3.1.15 ถุงพลาสติกซิบใส ขนาด 15x23 เซนติเมตร

3.1.16 เชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH05101 จากแหล่งรวบรวมและเก็บรักษาสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3.2 สารเคมีสำหรับเลี้ยงเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้ สูตร BG-11_0 (Allen and Arnon, 1955)

-สูตรอาหารสำหรับเตรียมอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

3.2.1 Magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$) 0.037 กรัม

3.2.2 Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3) 0.020 กรัม

3.2.3 Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$) 0.035 กรัม

3.2.4 Citric acid anhydrous 6 มิลลิกรัม

3.2.5 Ferric ammonium citrate ($FeNH_4$ citrate) 6 มิลลิกรัม

3.2.6 Ethylenediamine tetraacetic acid (Na_2 EDTA) 1 มิลลิกรัม

3.2.7 di-Potassium hydrogen phosphate anhydrous (K_2HPO_4) 0.038 กรัม

3.2.8 Stock A-5 micronutrient จำนวน 1 มิลลิลิตร

- ละลายสารเคมีในน้ำกรอง deionized ปริมาตร 900 มิลลิลิตร กวนผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.8 ด้วย 1.0 N NaOH และปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. วิธีการ

4.1 การเตรียมอาหาร BG-11_0 แบบเหลวแขวนลอยในถุงพลาสติกซิบสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

อาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนสูตร BG-11_0 ตามข้อ 3.2 จากนั้นเติมผงวุ้นในอาหารเหลวให้มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ กวนสารละลายให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่ออาหารเหลวเย็นลงแบ่งใส่ถุงพลาสติกซิบขนาด 15x23 เซนติเมตร ถุงละ 324 มิลลิลิตร

4.2 การเลี้ยงหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Hapalosiphon สำหรับปลูกเชื้อในถุงอาหารเหลวแขวนลอย

4.2.1 นำลูปเขี่ยหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH05101 ในหลอดอาหารวุ้นเอียงต่อเชื้อลงในขวดแก้วรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวBG-11_0ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ภายใต้สภาพควบคุมแสงที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ นาน 24 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะเจริญเติบโตถึงระยะที่เหมาะสมสำหรับนำไปเลี้ยงขยายได้

4.2.2 นำหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากข้อ 4.2.1 จำนวน500 มิลลิลิตร ปลูกเชื้อลงในขวดแก้วรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว BG-11_0ปริมาตร 4,500 มิลลิลิตร (ให้มีความเข้มข้นของหัวเชื้อ 10%) นำไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณภายใต้สภาพควบคุมแสงที่ความเข้มแสง4,000 ลักซ์ นาน 24ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส มีการเติมอากาศอย่างต่อเนื่องด้วยปั๊มลมที่อัตราการไหลของลม 300 คิวบิกฟุตต่อนาทีเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 7 วันสามารถนำไปปลูกเชื้อในถุงอาหารเหลวแขวนลอยได้

4.3 การปลูกเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Hapalosiphon ในถุงอาหารเหลวแขวนลอยและการบ่มเชื้อที่ระยะเวลาที่เหมาะสม

นำหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon*sp. DASH05101ปริมาตร 36มิลลิลิตร ปลูกเชื้อลงในถุงอาหารBG-11_0แบบเหลวแขวนลอยปริมาตร 324มิลลิลิตร โดยให้มีความเข้มข้นของหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มไว้ภายใต้สภาพควบคุมแสงที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ นาน 24 ชั่วโมง

ต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27องศาเซลเซียสนาน7 วัน จะได้หัวเชื้อตั้งต้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Hapalosiphon ในอาหารเหลว BG-11_0แขวนลอย ปริมาตร 360มิลลิลิตร ที่มีปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีชีวิตทั้งหมด (viable cell) 10^4โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถนำไปเลี้ยงขยายเพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้เพิ่มขึ้น 10 เท่า

เอกสารอ้างอิง

ประไพ ทองระอา ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต กานดา ฉัตรไชยศิริ กัลยาณี สุวิทวัส พิมพ์นิภา เพ็ญช่าง นิศารัตน์ ทวีนุต และภาสันต์ ศารทูลทัต. 2560. การใช้สารสกัดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินร่วมกับปุ๋ยทางใบต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ากล้วยน้ำว้า ‘ปากช่อง 50’ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. *ว. พืชศาสตร์สงขลานครินทร์*. 4(4): 16-21.

Allen, M. B. and D. I. Arnon. 1955. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. Plant Physiol. 30: 366-372.

Zulpa, G., M.C. Zaccaro, F. Boccazzi, J.L. Parada and M. Storni. 2003. Bioactivity of intra and extracellular substances from cyanobacteria and lactic acid bacteria on “wood blue stain” fungi. *Biol.Control*. 27:345-358.

ภาคผนวก

1. การเตรียม Stock A-5 micronutrient ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1.1 Boric acid (H_3BO_3)	2.8 กรัม
1.2 Manganese sulphate monohydrate ($MnSO_4$. H_2O)	1.56 กรัม
1.3 Molybdenum trioxide (MoO_3)	0.15 กรัม
1.4 Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.22 กรัม
1.5 Copper (II) sulfate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$)	0.08 กรัม
1.6 Potassium chromium sulfate (K_2Cr_2 $(SO_4)_4.24H_2O$)	0.10 กรัม
1.7 Nickel sulfate hexahydrate ($NiSO_4$. $6H_2O$)	0.045 กรัม
1.8 Cobalt (II) nitrate hexahydrate (Co $(NO_3)_2$ $.6H_2O$	0.05 กรัม
1.9 Sodium tungstate dihydrate (Na_2 WO_4. $2H_2O$)	0.018 กรัม
1.10 Titanium dioxide (TiO_2)	0.017 กรัม
1.11 Ammoniummonovanadate (NH_4 VO_3)	0.02 กรัม

- ละลายสารเคมีในน้ำกรอง deionized กวนผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินให้มีปริมาณและคุณภาพดี

2.1 แสง สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มของแสงต่ำ ตั้งแต่ 300-3,000 ลักซ์ ถ้าความเข้มของแสงสูงมากเกินไปอาจมีผลทำให้เซลล์สาหร่ายเกิดความเสียหายได้ นอกจากนี้การให้แสงอย่างต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง จะให้น้ำหนักเซลล์สาหร่ายสูงกว่าการให้แสงนาน 13 ชั่วโมง ทำให้มีระยะ lag phase ที่สั้นกว่าสามารถเข้าสู่ระยะ log phase ได้เร็วกว่าจึงทำให้การเลี้ยงในสภาพห้องปฏิบัติการได้ผลผลิตเซลล์สาหร่ายสูงกว่าการเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ (Allen and Arnon, 1955)

2.2 อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอยู่ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส ถ้าหากอุณหภูมิสูงมากจะเป็นอันตรายต่อการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจน

2.3 ความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย อยู่ระหว่าง 7.5-9.0 เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพเป็นด่าง

2.4 ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรองและจุลธาตุต่างๆ

-ธาตุไนโตรเจน สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ สามารถใช้แก๊สไนโตรเจน (N_2) จากอากาศเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้

-ธาตุฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และซัลเฟอร์

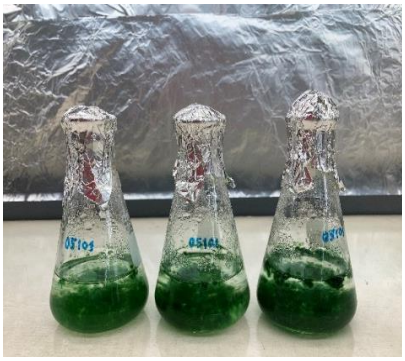
-จุลธาตุอาหารอื่นๆ ได้แก่ โคบอลต์ โมลิบดีนัม เหล็ก และนิกเกิล เป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความต้องการในปริมาณน้อยมากแต่ขาดไม่ได้ เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำเป็นต้องใช้ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน

ภาพที่ 1 อาหาร BG-11_0 แบบเหลวแขวนลอยในถุงพลาสติกซิบสำหรับเลี้ยงเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

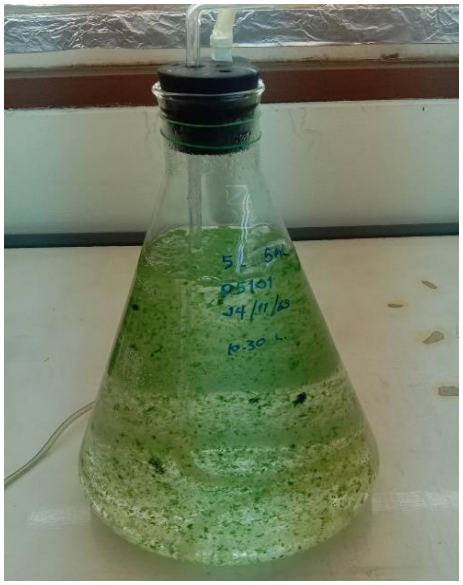
ภาพที่ 2 หัวเชื้อตั้งต้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH 05101 ในอาหาร BG-11_0 แบบเหลวแขวนลอย ในถุงพลาสติกซิบเมื่อบ่มเชื้อไว้ภายใต้สภาพความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ นาน 24 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน หลังจากปลูกเชื้อ

(ก)

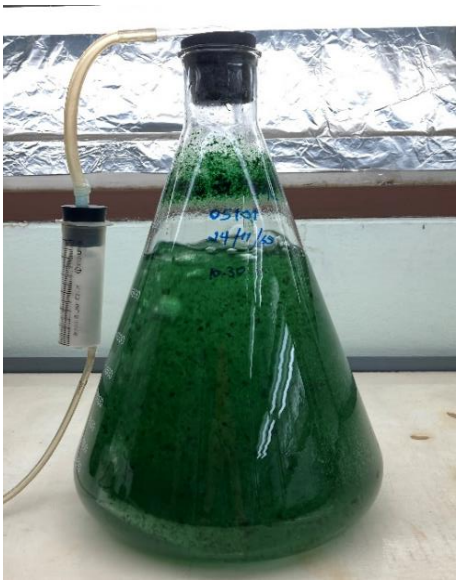
(ข)



(ค)



(ง)



(จ)

ภาพที่ 3 การต่อเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH 05101 จากอาหารวุ้นเอียงและการเลี้ยงขยายหัวเชื้อสำหรับปลูกเชื้อในอาหาร BG-11_0 แบบเหลวแขวนลอย

(ก) หัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH 05101 ในหลอดอาหารวุ้นเอียง

(ข, ค) การต่อเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH05101 จากอาหารวุ้นเอียงลงใน ฟลาสต์อาหารเหลว BG-11_0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มเชื้อภายใต้สภาพควบคุมแสงและอุณหภูมิ นาน 14 วัน หลังจากปลูกเชื้อ

(ง, จ) หัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH 05101 เพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาพความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ นาน 24 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และเติมอากาศอย่างต่อเนื่องด้วยปั๊มลมอัตราการไหลของลม 300 คิวบิกฟุตต่อนาที เพาะเลี้ยงนาน 0 และ 7 วัน หลังจากปลูกเชื้อ