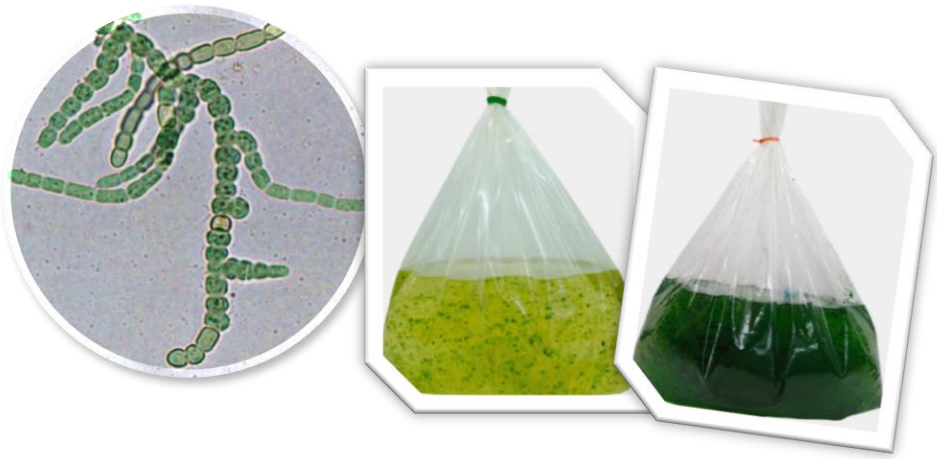
ISBN : 978-616-358-651-3

# การผลิตหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแบบใหม่ ในระดับห้องปฏิบัติการ



**โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพ**
**เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชปลอดภัย**
**แผนงานวิจัยการจัดการธาตุอาหารพืชร่วมกับการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพจากจุลินทรีย์**
**และชีวมวลในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชปลอดภัย**

กรมวิชาการเกษตร 2566

**การผลิตหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแบบใหม่ในระดับห้องปฏิบัติการ**

ISBN : 978-616-358-651-3

**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 :** กุมภาพันธ์ 2567

ลิขสิทธิ์ของกรมวิชาการเกษตร ห้ามคัดลอกข้อความหรือส่วนใดส่วนหนึ่งของหนังสือไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

**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) สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือสารเพิ่มประสิทธิภาพพืชได้ วิธีการผลิตหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Hapalosiphon แบบใหม่ในระดับห้องปฏิบัติการให้มีปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีชีวิตเพิ่มขึ้น ตามเกณฑ์การขึ้นทะเบียนปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งต้องมีปริมาณไม่น้อยกว่า $10^5$ โคโลนีต่อน้ำหนักปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม จะทำให้สามารถนำไปเลี้ยงขยายเพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

คณะนักวิจัย

มกราคม 256**7**

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 1 |
| เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี | 1 |
| วิธีการ | 2 |
| เอกสารอ้างอิง | 5 |
| ภาคผนวก | 6 |

# การผลิตหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแบบใหม่ในระดับห้องปฏิบัติการ

## 1. บทนำ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกลุ่มที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ จำพวกที่มีเฮเทอโรซีสต์จัดเป็นแหล่งชีวมวลที่สำคัญที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีวันหมด (renewable biomass source) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล Hapalosiphon อยู่ในกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีเฮเทอโรซีสต์และเป็นเส้นสาย (filament) สามารถสร้างสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ หรือสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ เช่น สารคล้ายฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน และกรดอะมิโน เป็นต้น (Zulpa *et al.*, 2003; ประไพ และคณะ, 2560) ซึ่งสารดังกล่าวสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มการดูดใช้ธาตุอาหารแก่พืช ทำให้ได้ผลผลิตที่ดีมีคุณภาพวิธีการผลิตหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล Hapalosiphon แบบใหม่ให้มีปริมาณตามเกณฑ์การขึ้นทะเบียนปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินซึ่งจะต้องมีปริมาณไม่น้อยกว่า $10^5$ โคโลนีต่อน้ำหนักปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม จะทำให้การเลี้ยงขยายเพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

## 2. วัตถุประสงค์

เพื่อให้ได้วิธีการผลิตหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล Hapalosiphon ในอาหารเหลว $BG\text{-}11_0$ แขวนลอยแบบใหม่ที่มีปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีชีวิตตามเกณฑ์การขึ้นทะเบียนปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสามารถนำไปเลี้ยงขยายเพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## 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 เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter)
3.1.7 ห้องควบคุมอุณหภูมิและแสง
3.1.8 ปั๊มลม
3.1.9 เครื่องวัดอัตราการไหลของลม
3.1.10 เครื่องปั่นผสม

3.1.11 สายยางซิลิโคน
3.1.12 ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 125 และ 5,000 มิลลิลิตร
3.1.13 บีกเกอร์แก้วขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
3.1.14 ชุดจุกยางดำเบอร์ 18 เจาะรู พร้อมหลอดแก้วให้อากาศ
3.1.15 กระบอกฉีดยาขนาด 50 มิลลิลิตร

3.1.16 ขวดพลาสติกใสขนาด 1 ลิตร

3.1.17 ถุงพลาสติกใสขนาด 14x22 นิ้ว

3.1.18 สายยางให้อากาศขนาด 4 มิลลิเมตร

3.1.19 ปุ๋ยหมักมูลไก่แห้งบดละเอียด

3.1.20 ผ้ากรองแพลงตอนขนาด 30 ไมครอน

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

3.2 สารเคมีสำหรับเลี้ยงเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้ สูตร $BG\text{-}11_0$ (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 micronutrient จำนวน 1 มิลลิลิตร

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

**4. วิธีการ**

4.1 การเตรียมอาหาร BG-$11_0$ แบบเหลวแขวนลอยในขวดพลาสติกสำหรับผลิตหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

เตรียมอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนสูตร BG-$11_0$ ตามข้อ 3.2 จากนั้นเติมผงวุ้นในอัตรา 1 กรัมต่อลิตร กวนสารละลายให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่ออาหารเหลวเย็นลงแบ่งใส่ขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร ขวดละ 850 มิลลิลิตร

4.2 การเลี้ยงหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล Hapalosiphon สำหรับใช้ปลูกเชื้อในขวดอาหารเหลวแขวนลอย

4.2.1 นำลูปเขี่ยหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH05101 ในหลอดอาหารวุ้นเอียงต่อเชื้อลงในขวดแก้วรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว BG-$11_0$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ภายใต้สภาพควบคุมแสงที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ นาน 24 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะเจริญเติบโตถึงระยะที่เหมาะสมสำหรับนำไปเลี้ยงขยายได้

4.2.2 นำหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากข้อ 4.2.1 จำนวน 500 มิลลิลิตร ปลูกเชื้อลงในขวดแก้วรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว BG-$11_0$ ปริมาตร 4,500 มิลลิลิตร (ให้มีความเข้มข้นของหัวเชื้อ 10%) นำไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณภายใต้สภาพควบคุมแสงที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ นาน 24 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส มีการเติมอากาศอย่างต่อเนื่องด้วยปั๊มลมที่อัตราการไหลของลม 300 คิวบิกฟุตต่อนาที เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน ปั่นตัดเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่าย และนำไปปลูกเชื้อในขวดอาหารเหลวแขวนลอยได้

4.3 การปลูกเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล Hapalosiphon ในขวดอาหารเหลวแขวนลอยและการบ่มเชื้อที่ระยะเวลาที่เหมาะสม

นำหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH05101 จากข้อ 4.2.2 ปริมาตร 150มิลลิลิตร ปลูกเชื้อลงในขวดอาหาร BG-$11_0$ แบบเหลวแขวนลอย จากข้อ 4.1 โดยให้มีความเข้มข้นของหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มไว้ภายใต้สภาพควบคุมอุณหภูมิและแสงที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ นาน 24 ชั่วโมงต่อวัน บ่มเชื้อนาน 14 วัน จะได้หัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Hapalosiphon ในอาหารเหลว BG-$11_0$ แขวนลอย ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีชีวิตทั้งหมดไม่น้อยกว่า $10^5$ โคโลนีต่อน้ำหนักปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม สามารถนำไปเลี้ยงขยายเพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้เพิ่มขึ้น 10 เท่า

4.4 การเลี้ยงขยายชีวมวลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในถุงพลาสติกโดยใช้น้ำปุ๋ยหมักมูลไก่เจือจาง

4.4.1 การเตรียมอาหารเหลวน้ำปุ๋ยหมักมูลไก่เจือจาง 250 เท่า สำหรับเลี้ยงขยายชีวมวลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ประกอบด้วย

4.4.1.1 น้ำสะอาด ปริมาตร 30 ลิตร

4.4.1.2 ปุ๋ยหมักมูลไก่แห้งบดละเอียดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 120 กรัม

ละลายปุ๋ยหมักมูลไก่แห้งบดละเอียดในน้ำสะอาด กวนผสมให้เข้ากันนาน 10 นาที กรองสารละลายผ่านผ้ากรองแพลงตอนขนาด 30 ไมครอน จากนั้นนำน้ำปุ๋ยหมักมูลไก่ที่ได้ไปใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

4.4.2 การเลี้ยงขยายหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล Hapalosiphon ในน้ำปุ๋ยหมักมูลไก่และการผลิตชีวมวลสด

นำน้ำปุ๋ยหมักมูลไก่เจือจางปริมาตร 4,500 มิลลิลิตร ใส่ถุงพลาสติกใส จากนั้นนำหัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH05101 ในอาหาร BG-$11_0$ จากข้อ 4.3 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปลูกเชื้อลงในถุงอาหารเหลวโดยให้มีความเข้มข้นของหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากันและนำไปเพาะเลี้ยงในโรงเรือน โดยให้ได้รับแสงในช่วงวันความเข้มแสงประมาณ 4,000-7,000 ลักซ์ (หากได้รับแสงที่มีความเข้มแสงสูงเกินไป ให้ใช้ตาข่ายพรางแสงกาง เพื่อลดความเข้มแสงและอุณหภูมิของอาหารเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม (30-35 องศาเซลเซียส)) ทำการเติมอากาศอย่างต่อเนื่องด้วยปั๊มลมที่อัตราการไหลของลมเท่ากับ 300 คิวบิกฟุตต่อนาที เลี้ยงขยายนาน 45 วัน ในช่วงฤดูฝน เดือนมิถุนายน-สิงหาคม (อุณหภูมิ 26-35 องศาเซลเซียส) ให้ผลผลิตชีวมวลสดเฉลี่ย 14 กรัมต่อลิตร ฤดูหนาวเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม (อุณหภูมิ 24-32 องศาเซลเซียส) ให้ผลผลิตชีวมวลสดเฉลี่ย 17 กรัมต่อลิตร และฤดูร้อนเดือนมีนาคม-เมษายน (อุณหภูมิ 28-38 องศาเซลเซียส) ให้ผลผลิตต่ำ เฉลี่ย 12.4 กรัมต่อลิตร เนื่องจากอุณหภูมิอากาศสูงไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจึงควรหลีกเลี่ยงการเพาะเลี้ยงในช่วงฤดูร้อน นอกจากนี้ผลผลิตชีวมวลสดสาหร่ายที่ได้สามารถนำไปเตรียมเป็นสารสกัดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อใช้เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืช หรือสารเพิ่มประสิทธิภาพพืชให้แก่พืชผักรับประทานใบได้

# 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 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 นำไปปรับปริมาตรให้เท่ากับ 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** หัวเชื้อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH 05101 ในอาหาร BG-$11_0$ แบบเหลวแขวนลอยบ่มเชื้อภายใต้สภาพควบคุม นาน 14 วัน มีปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไม่น้อยกว่า $10^5$ โคโลนีต่อน้ำหนักปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม

**ภาพที่ 2** การเลี้ยงขยายชีวมวลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH05101 โดยใช้น้ำปุ๋ยหมักมูลไก่เจือจาง 250 เท่า ปริมาตร 5 ลิตร ในสภาพโรงเรือน

**ภาพที่ 3** การเลี้ยงขยายชีวมวลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH05101 โดยใช้น้ำปุ๋ยหมักมูลไก่เจือจาง 250 เท่า ปริมาตร 5 ลิตร ในสภาพโรงเรือน และใช้ตาข่ายพรางแสงเพื่อลดความเข้มแสงให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

**ภาพที่ 4** ผลผลิตชีวมวลสดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon* sp. DASH 05101 ที่มีความชื้นต่อน้ำหนักสดประมาณ 93 เปอร์เซ็นต์

**ภาพที่ 5** ผลิตภัณฑ์สารสกัดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเข้มข้นที่เตรียมได้จากชีวมวลสดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน