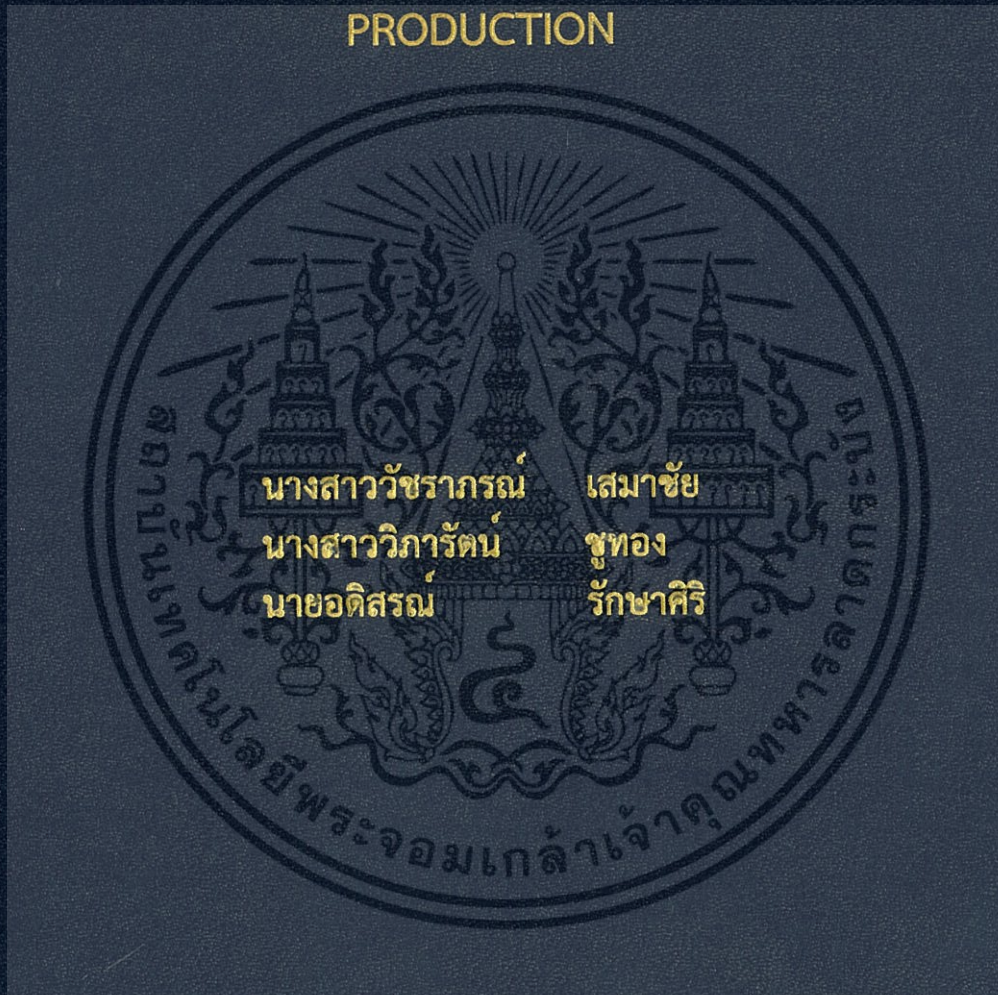


การคัดแยกสาหร่ายในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบังเพื่อการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

ISOLATION OF ALGAE IN KING MONGKUT'S INSTITUTE
OF TECHNOLOGY LADKRABANG FOR HYDROGEN
PRODUCTION



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การคัดแยกสาหร่ายในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบังเพื่อการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

ISOLATION OF ALGAE IN KING MONGKUT'S INSTITUTE
OF TECHNOLOGY LADKRABANG FOR HYDROGEN
PRODUCTION



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 149500
วันเดือนปี - 8 ส.ค. 2561

b. 12884495
i.

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF ALGAE IN KING MONGKUT'S INSTITUTE
OF TECHNOLOGY LADKRABANG FOR HYDROGEN
PRODUCTION



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL CHEMISTRY)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในของนักศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การคัดแยกสาหร่ายในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบังเพื่อการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ
Isolation of algae in King Mongkut's Institute of
Technology Ladkrabang for hydrogen production

ชื่อนักศึกษา

นางสาววัชรภรณ์ เสมาชัย รหัสนักศึกษา 56050596
นางสาววิภารัตน์ ชูทอง รหัสนักศึกษา 56050601
นายอดิสรณ์ รักษาศิริ รหัสนักศึกษา 56050645

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

เคมี

ปีการศึกษา

2559

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ประธานกรรมการ	
ดร. รุฐวรรธน์ แดงเงิน กรรมการ	
ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกสาหร่ายในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
	เจ้าคุณทหารลาดกระบังเพื่อการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ
ชื่อนักศึกษา	นางสาววีชราภรณ์ เสมาชัย รหัสนักศึกษา 56050596
	นางสาววิภารัตน์ ชูทอง รหัสนักศึกษา 56050601
	นายอดิสรณ์ รักษาศิริ รหัสนักศึกษา 56050645
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	เคมี
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

พลังงานทางเลือกไฮโดรเจนสามารถผลิตได้จากสาหร่ายสีเขียวผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โครงการพิเศษนี้จึงได้ทำการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำจืดในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) พบว่าสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้มี 11 ไอโซเลท ได้แก่ KS01, KS02, KS03, VV01, VV02, VY01, VY02, KR01, KR02, TP01 และ TP02 ซึ่งได้ถูกนำมาศึกษาลักษณะสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าสาหร่ายมีลักษณะเป็นเซลล์กลมเดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระทั้งหมด และได้เลือกสาหร่ายที่โตไวมา 5 ไอโซเลท ได้แก่ KS01, KS02, KS03, VY01 และ VY02 จากการวิเคราะห์ Bootstrap NJ phylogenetic tree โดยใช้ยีน 18S rDNA พบว่า สาหร่าย KS02, KS03, VY01 และ VY02 มีความใกล้เคียงกับ *Chlorella sorokiniana* KU948991 มากที่สุด จึงคาดว่าทั้ง 4 สายพันธุ์นี้จะถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Chlorella* จากนั้นศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่า KS03 มีการเจริญเติบโตสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะ KS03 มาทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนต่อ ผลการทดลองพบว่าอายุเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว KS03 ในช่วง 12, 18 และ 24 ชั่วโมง จะมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และพบว่าเวลาอัตราของการผลิตไฮโดรเจนในช่วง 6 ถึง 12 ชั่วโมงก็ไม่แตกต่างกันเช่นกัน ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนสูงสุด คิดเป็น 0.47 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่น 730 นาโนเมตรต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้แล้วยังศึกษาผลของน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส, ซูโครส, แลคโตส และ ไรโบส ที่ความเข้มข้น 0 – 50 มิลลิโมล พบว่า สาหร่ายสีเขียว KS03 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในน้ำตาลไรโบส และซูโครส ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ซึ่งมีค่าการผลิตไฮโดรเจนเป็น 0.52 และ 0.50 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่น 730 นาโนเมตรต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นศึกษาการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่อง พบว่า ไรโบสจะให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เมื่อปัมที่ 6 ถึง 12 ชั่วโมง ส่วนซูโครสจะให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อปัมที่ 18 ชั่วโมง

เอกสาร**คำสำคัญ:** การคัดแยกสาหร่าย การปรับสภาวะการผลิต การผลิตไฮโดรเจน สาหร่ายสีเขียว การดำเนินการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation of algae in King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for hydrogen production
Students	Miss. Watcharaphon Semachai Student ID 56050596 Miss. Wiparat Choothong Student ID 56050601 Mr. Adisron Raksasiri Student ID 56050645
Degree	Bachelor of Science Industrial chemistry (Industrial chemistry)
Department	Chemistry
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2559
Advisor	Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj

Abstract

Hydrogen as an alternative energy sources can be produced by green algae through photosynthesis process. This study aims to isolate green algae from fresh water sources in King Mongkut's institute of Technology Ladkrabang (KMITL). Eleven isolates including KS01, KS02, KS03, VV01, VV02, VY01, VY02, KR01, KR02, TP01 and TP02 were isolated and observed for morphology under light microscope. The results showed that they are all unicellular green algal strain. Five isolates were randomly selected for rapid growth observation to further continue including KS01, KS02, KS03, VY01 and VY02. 18S rDNA Bootstrap NJ phylogenetic tree showed a close relation between KS02, KS03, VY01 and VY02 to *Chlorella sorokiniana* KU948991 making all 4 strains are belonging to *Chlorella* genus. A growth study showed that KS03 has the highest growth capability. Thus, only KS03 was chosen for further experiment in hydrogen production. KS03 in the age of 12, 18 and 24 hr showed no insignificant difference at 95% confidence and the production rate remained the same at the production time of 6 to 12 hr. Light intensity of 2,500 lux resulted in the highest production yielding of 0.47 $\mu\text{mol}/\text{OD}730/\text{mL}/\text{hr}$. Moreover, glucose, sucrose, lactose and ribose in a range of 0 – 50 mM were studied for the effect in enhancing production. The concentration of 10 mM of ribose and sucrose could increase the yield hydrogen to 0.52 and 0.50 $\mu\text{mol}/\text{OD}730/\text{mL}/\text{hr}$, respectively. Time-course analysis indicated the highest of hydrogen was obtained when incubated cells with ribose in 6 to 12 hr, where as with sucrose in 18 hr.

Keywords: Algal isolation, production optimization, hydrogen production, green algae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สามารถดำเนินมาได้สำเร็จลุล่วง เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำติชมที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งกำลังใจที่ดีจากบุคคลหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ สำหรับ คำแนะนำ ความรู้ที่เป็นประโยชน์ คอยให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ การตรวจทาน และติชมผลงานใน การจัดทำโครงการพิเศษ รวมทั้งคอยเอาใจใส่และให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารย์ และ ดร. รัฐวรรณ แดงเงิน ที่กรุณาเป็นกรรมการ สอบโครงการพิเศษ และได้ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องการตรวจทาน รวมไปถึงคำแนะนำที่เป็น ประโยชน์ เพื่อแก้ไขให้โครงการพิเศษเล่มนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วย จัดจำแนกพันธุ์สาหร่ายที่คัดแยกจากการเก็บตัวอย่างน้ำจากบริเวณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบคุณ นางสาวปราณี บุญวัฒน์ และนายณัฐพล ไกรธรรม นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ วิทยาศาสตร์ ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้ออำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ในการทำโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณ นางสาวธนาภรณ์ มาศวรรณานักศึกษาปริญญาโท สำหรับคำปรึกษา และ คำแนะนำที่มีประโยชน์ในการทำโครงการพิเศษ

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยอบรมสั่งสอน คอยแนะนำให้คำปรึกษา ให้ความรักความอบอุ่น กำลังใจที่ดี ตลอดจนความอุปการะและให้การสนับสนุนมาโดยตลอด รวมถึง เพื่อนๆทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คอยให้กำลังใจในทุกๆเรื่อง จนสามารถทำโครงการพิเศษเล่ม นี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

วัชรภรณ์	เสมาชัย
วิภารัตน์	ชูทอง
อดิสรณ์	รักษาศิริ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สาหร่าย (Algae).....	3
2.1.1 สาหร่ายสีเขียว (Chlorophytes).....	3
2.1.2 การจำแนกหมวดหมู่.....	3
2.1.2.1 Class Chlorophyceae สาหร่ายสีเขียว (green algae).....	3
2.1.2.2 Class Prasinophyceae หรือเรียกว่า “Prasinophytes”.....	4
2.1.2.3 Class Euglenophyceae ยูกลีโนอยด์ (euglenoids).....	5
2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	5
2.2.1 การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	6
2.2.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	8
2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	9
2.2.4 การแยกเชื้อสาหร่าย.....	11
2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย.....	12
2.3.1 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว.....	12
2.3.2 การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย.....	13
2.3.2.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจน.....	13
2.3.2.2 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง.....	14
2.4 เทคนิคการวิเคราะห์โดยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer.....	15
2.4.1 ส่วนประกอบของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer.....	15
2.4.2 หลักการของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer.....	16
2.5 เทคนิคการวิเคราะห์โดยเครื่อง Gas Chromatograph with Thermal Conductivity Detector.....	17
2.5.1 ส่วนประกอบของเครื่อง Gas Chromatograph.....	17
2.5.2 หลักการของเครื่อง Gas Chromatography.....	18

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6 เทคนิคการวิเคราะห์โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction.....	19
2.6.1 หลักการทำงานของเทคนิค Polymerase Chain Reaction.....	19
2.7 เทคนิคการวิเคราะห์โดยใช้วิธี Gel Electrophoresis	20
2.7.1 หลักการทำงานของเทคนิค Gel Electrophoresis.....	20
2.7.2 อุปกรณ์ในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	20
2.7.3 ขั้นตอนการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	20
2.7.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ.....	21
2.8 ไฟโลเจนี (Phylogeny).....	22
2.9 การสร้างไฟโลจีนิติกทรี (Phylogenetic tree).....	23
2.9.1 การวิเคราะห์ข้อมูลพันธุศาสตร์เพื่อนำไปสร้าง Phylogenetic tree.....	25
2.9.2 วิธีการจัดกลุ่มข้อมูล (Phylogenetic analysis).....	25
2.9.3 Bootstrap.....	25
2.9.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยาโดยใช้ software บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต	26
2.10 ประโยชน์ของ Phylogenetics.....	26
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	27
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	29
3.1 จุลชีพสาหร่าย.....	29
3.2 สารเคมี.....	29
3.2.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP-Medium (Tris Acetate Phosphate).	29
3.2.2 ยาปฏิชีวนะ.....	30
3.2.3 น้ำตาล.....	30
3.2.4 ก๊าซที่ใช้วิเคราะห์ไฮโดรเจน.....	30
3.2.5 เอนไซม์.....	30
3.2.6 ชุดทดสอบ kit.....	30
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	31
3.3.1 เครื่องมือ.....	31
3.3.2 อุปกรณ์.....	31
3.4 วิธีการเตรียมสารเคมี.....	33
3.4.1 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP-medium).....	33
3.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tris Acetate Phosphate (TAP).....	33
3.6 การวางแผนการเก็บตัวอย่างน้ำ.....	34
3.7 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	35
3.8 การแยกเชื้อสาหร่ายให้บริสุทธิ์.....	35
3.9 การส่องกล้องจุลทรรศน์.....	36
3.10 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย.....	36

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.11 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction).....	37
3.12 วิธีการวิเคราะห์ DNA โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	38
3.13 วิธีการทำ Phylogenetics tree	38
3.14 วิธีการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์	40
3.15 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืด....	41
3.16 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันความเข้มข้นของแสง..	42
3.17 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาล	43
3.18 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยแปรผันตามความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลภายใต้ความเข้มข้นแสง 2,500 ลักซ์	43
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	45
4.1 ผลการคัดแยกสาหร่ายจากแหล่งน้ำจืดในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.....	45
4.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืด	48
4.3 ผลการเพิ่มปริมาณยีน 18s rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์	49
4.4 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืด	51
4.5 ผลการศึกษาอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03	51
4.6 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มข้นแสง.....	52
4.7 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำตาล.....	53
4.8 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลภายใต้ความเข้มข้นแสง 2500 ลักซ์	54
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	57
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	57
5.2 ข้อเสนอแนะ	58
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก.....	63
ภาคผนวก ก.....	64
ภาคผนวก ข.....	65
ภาคผนวก ข-1: การคำนวณขนาดเซลล์จากการส่องกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง.....	65
ภาคผนวก ข-2: การคำนวณ starter 0.1	66
ภาคผนวก ข-3: การคำนวณการเก็บเซลล์ $OD_{730} = 0.2$	67
ภาคผนวก ข-4: การคำนวณน้ำตาล	67
ภาคผนวก ข-5: ตัวอย่างการคำนวณไฮโดรเจน.....	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ข-6: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ทำ PCR สำเร็จ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันจากสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นอีก 9 สายพันธุ์.....	69
ภาคผนวก ข-7: โปรแกรมคำนวณสถิติ.....	74



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สารเคมีที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย	7
3.1 การเตรียมสารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ปริมาณ 2 ลิตร	33
3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำจืดจำนวน 6 แหล่งน้ำในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.....	34
3.3 ส่วนประกอบในการเพิ่มยีน 18S rDNA ของสาหร่ายที่คัดเลือกด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส	37
3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 18s rDNA ของสาหร่ายที่คัดเลือกด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส.....	37
3.5 การตั้งค่าอุณหภูมิภายในเครื่อง Gas Chromatography Thermal Conductivity Detector (GC-TCD) ก่อนฉีด	41
3.6 การตั้งค่าอุณหภูมิภายในเครื่อง Gas Chromatography Thermal Conductivity Detector (GC-TCD) หลังฉีด.....	42
3.7 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายที่คัดเลือกด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส	42
4.1 จำนวนไอโซเลทของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำบริเวณต่างๆ.....	42
4.2 รูปร่างและลักษณะของสาหร่าย isolate ต่างๆที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืดบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.....	44
4.3 สาหร่ายสีเขียวที่มีการเจริญเติบโตไวที่สุดและนำมาใช้ในการทดลองต่อไป	45
4.4 ช่องของตัวอย่างสาหร่ายในแต่ละไอโซเลทใน Agarose gel	49
ก-1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP	62

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก.....	9
2.2 ลักษณะการลากเส้นบนอาหารวุ้น.....	11
2.3 ขั้นตอนการคัดแยกเชื้อบนอาหารวุ้น.....	12
2.4 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์แสง.....	13
2.5 กระบวนการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย.....	14
2.6 กระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย.....	15
2.7 หลักการทำงานของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer.....	16
2.8 วงจรของ Thermal Conductivity Detector.....	18
2.9 หลักการทำงานของเครื่อง Gas chromatography.....	18
2.10 หลักการทำงานของเทคนิค Polymerase Chain Reaction.....	19
2.11 หลักการทำงานของเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis.....	22
2.12 องค์ประกอบที่สำคัญของโพลีเมติกทรี.....	24
3.1 การตากจานเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ.....	34
3.2 แหล่งน้ำจากคณะวิศวกรรมศาสตร์.....	35
3.3 แหล่งน้ำจากคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม.....	35
3.4 แหล่งน้ำจากคณะวิทยาศาสตร์.....	35
4.1 ตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำจืดในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	46
4.2 อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว KS01, KS02, KS03, VY01 และ VY02 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP.....	48
4.3 Agarose gel ที่ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV).....	49
4.4 Bootstrap NJ phylogenetic tree ของยีน 18s จากสาหร่าย KS02, KS03, VY01 และ VY02 เทียบกับยีน 18S ของสาหร่ายอื่นๆ อีก 9 สายพันธุ์.....	50
4.5 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS01, KS02, KS03, VY01 และ VY02 โดยมี <i>Tetraspora sp.</i> เป็น control.....	51
4.6 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 กับ อายุเซลล์ที่ 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ที่เวลาการบ่มเซลล์ 6 และ 12 ชั่วโมง.....	52
4.7 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มแสงที่ 0 ถึง 3,000 ลักซ์.....	53
4.8 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไรโบส น้ำตาลแลคโตส และ น้ำซูโครส (ครั้งที่ 1).....	54
4.9 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไรโบส น้ำตาลแลคโตสและ น้ำตาลซูโครส (ครั้งที่ 2).....	55
4.10 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไรโบส น้ำตาลแลคโตสและ น้ำตาลซูโครสภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์.....	56
ข.1 นำไม้บรรทัดเหล็กสองกล่องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า.....	65

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข.2 รูปตัวอย่างเซลล์สำหรับ KS01 ที่ทำการส่งกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า....	66
ข.3 ข.3 ภาพแสดงโปรแกรม IBM SPSS statistics Version 23.....	74



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันพลังงานมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์เป็นอย่างมาก ทำให้เกิดความ สะดวกสบายในชีวิตประจำวัน พลังงานส่วนใหญ่ที่ผลิตขึ้นจะถูกนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม การคมนาคมและการผลิตกระแสไฟฟ้า โดยผลิตจากน้ำมัน ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ ซึ่งพลังงาน เหล่านี้เป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัด และคาดว่าจะกำลังจะหมดไปในระยะเวลาอีกไม่นาน นอกจากนี้ การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของพลังงานเหล่านี้ยังก่อให้เกิดมลพิษ เช่น ก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ฝุ่นและฝุ่นละออง เป็นต้น (ชัย ชาญ ฤทธิเกริกไกร, 2547) เพื่อป้องกันปัญหาการขาดแคลนพลังงานในอนาคต จึงต้องมีการศึกษา ค้นคว้าพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ โดยพลังงานทดแทนนั้นจะต้องไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษ ต่อสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างพลังงานทดแทน ได้แก่ พลังงานลม พลังงานความร้อนใต้พิภพ พลังงาน น้ำพุร้อน พลังงานในมหาสมุทร พลังงานคลื่นทะเล รวมถึงพลังงานก๊าซไฮโดรเจน เป็นต้น (ชัชวาล ชัยชนะ, 2547 ; ภาณุทัตน์ อินใจมา, 2550)

พลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen, H₂) ถือได้ว่าเป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับการเผาไหม้ที่มี ประสิทธิภาพสูง สะอาด และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ได้รับการคาดการณ์และยอมรับว่าจะเป็ นแหล่ง ของพลังงานเชื้อเพลิงที่สำคัญอย่างมากในอนาคต ทั้งนี้เนื่องจากไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อ เกิดการเผาไหม้กับก๊าซออกซิเจน โดยจะมีเพียงไอน้ำเป็นผลพลอยได้ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อเพลิงอื่นๆ ที่ ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้ที่เป็นก๊าซเรือนกระจกอื่น ส่งผลกระทบต่อการทำ ให้โลกร้อนขึ้น (กฤษณา แซ่เฮ้ง, 2554)

การผลิตแก๊สไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูงด้วยกระบวนการทางชีวภาพผ่านสิ่งมีชีวิตจำพวก จุลินทรีย์ (microorganism) สารตั้งต้นหลักของกระบวนการ ได้แก่ น้ำ ของเสียอินทรีย์ (Organic Waste) หรือชีวมวล จุลินทรีย์ที่มีการใช้งานในกระบวนการ ได้แก่ สาหร่าย (Algae) แบคทีเรีย (Bacteria) หรืออาร์เคีย (Archaea) โดยอาจต้องใช้เอนไซม์ (Enzyme) หรือสารประกอบจำพวก โปรตีนช่วยเร่งปฏิกิริยา(กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557)

ปัจจุบันมีการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย หนึ่งในนั้นคือนำสาหร่ายมาเป็น แหล่งผลิตสารที่มีคุณค่าต่างๆ เช่น ไฮโดรเจน (H₂) (เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์, 2554), Astraxanthin (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2555), Anthocyanin (เหมือนขวัญ กงนอก, 2556) เป็นต้น มาเป็นวัตถุดิบในการ ผลิต และภายหลังจากการสกัดจะมีเศษซากเซลล์หรือขยะของเซลล์เกิดขึ้น ซึ่งจะนำไปทิ้ง

งานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่แยกได้ จากแหล่งน้ำในบริเวณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัด กรุงเทพมหานคร โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป ต่อการ เจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจน โดยแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน แปรผันระยะเวลา ในการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้น และ ความเข้มข้นของน้ำตาล เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อค้นหาและคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวชนิดใหม่จากแหล่งน้ำบริเวณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 2) เพื่อระบุชื่อและสายพันธุ์ของสาหร่ายที่คัดแยกได้
- 3) เพื่อนำสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำมาทำการวัดการผลิตไฮโดรเจน
- 4) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำภายในบริเวณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 2) นำน้ำมาคัดแยกสาหร่ายและทำให้สาหร่ายมีความบริสุทธิ์ ซึ่งคาดว่าจะได้สาหร่ายขนาดเล็กจำนวนไม่น้อยกว่า 1 สายพันธุ์ พร้อมระบุชื่อสายพันธุ์
- 3) ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ได้จากการคัดแยกภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป
- 4) สาหร่ายที่คัดแยกได้จะต้องเจริญเติบโตภายใน 5 วันและสามารถผลิตไฮโดรเจนได้
- 5) ทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำ
- 6) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโดยแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน แปรผันระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ความเข้มแสงและ ความเข้มข้นของน้ำตาล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบชนิดของสาหร่ายซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งน้ำในบริเวณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง
- 2) ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดเลือก
- 3) ผลิตไฮโดรเจนจากชีวมวลสาหร่ายที่ค้นพบ
- 4) เป็นแนวทางในการนำสาหร่ายที่คัดเลือกมาผลิตไฮโดรเจนให้มีปริมาณที่สูงขึ้นในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่าย (Algae)

สาหร่าย (Algae) เป็นชื่อเรียกสิ่งมีชีวิตหลายชนิดในอาณาจักรโครมาลวีโอลาตา เอกซ์คาวาตาไรซาเรีย มีลักษณะคล้ายพืช แต่ไม่มีส่วนที่เป็นราก ลำต้นและใบ ที่แท้จริง มีขนาดตั้งแต่เล็กมากมีเซลล์เดียวไปจนถึงขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก อาจเป็นเส้นสายหรือมีลักษณะคล้ายพืชชั้นสูงก็มีการแบ่งพวกสาหร่ายแบ่งตามรูปร่างลักษณะภายนอกหรือดูตามสี จึงมีสาหร่ายสีเขียว สีเขียวแกมน้ำเงิน สีน้ำตาล และ สีแดง สาหร่ายมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ

2.1.1 สาหร่ายสีเขียว (Chlorophytes) (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544)

ลักษณะของสาหร่ายสีเขียว คือ คลอโรพลาสต์ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ a และ b สารสีประกอบได้แก่ carotene (เบต้า-แคโรทีน) ส่วน xanthophyll ได้แก่ lutein, diatoxanthin และ neoxanthin สารสีรวมอยู่ในคลอโรพลาสต์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน

- สาหร่ายสีเขียวมีหรือไม่มีผนังเซลล์ ถ้าไม่มีก็จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ pellicle, periplast หรือเป็นแบบ scale
- หนวด (flagella) มีจำนวน 1, 2, 4, 8, 16 เส้น ลักษณะของหนวดมีหลายแบบเช่นแบบ acronematic, pantonematic หรือแบบมีเกล็ดอยู่บนหนวด จุดตั้งต้นของหนวดอยู่ที่ apical cell หรือ subapical cell ความยาวอาจเท่ากันหรือไม่เท่ากันก็ได้
- อาหารสะสม (starch) ได้แก่ true starch หรือ paramylon (แป้งที่พบในพืชชั้นสูง) อยู่ในไซโทพลาสซึมหรือคลอโรพลาสต์
- รูปร่าง (form) ของเซลล์มีหลายแบบเช่น กลม รี กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ โคโลนี บางชนิดเป็นเส้นสาย filament บางกลุ่มมี gullet อยู่ที่ด้านบนสุดของเซลล์ เช่น Euglenoids

2.1.2 การจำแนกหมวดหมู่

Christensen (1962, 1966) จำแนกหมวดหมู่ของสาหร่ายสีเขียวตามรูปร่างลักษณะของเซลล์ได้ 3 Class ได้แก่ Class Chlorophyceae, Class Prasinophyceae และ Class Euglenophyceae

2.1.2.1 Class Chlorophyceae สาหร่ายสีเขียว (Green algae)

1. ลักษณะสำคัญ

สารสีสำหรับการสังเคราะห์แสงประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ a และ b ส่วน carotene ได้แก่ แอลฟา-แคโรทีน, เบต้า-แคโรทีน และ แกรมมา-แคโรทีน ส่วน xanthophyll ได้แก่ lutein, violaxanthin และ neoxanthin สารสีจะอยู่ในคลอโรพลาสต์ซึ่งมีหลายแบบเช่น cup-shape(รูปถ้วย) girdle-shape (รูปเกือกม้า) reticulate (เป็นตาข่าย) spiral (ขดเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
แม้ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั้นในเป็นพวกเซลลูโลส ชั้นนอกเป็นพวกเพคติน บางชนิดเช่น Volvox เป็นโคโลนี ไม่มีเซลลูโลส มีแต่เพคติน Desmids สามารถผลิตสารเมือก (mucilaginous substances) มาห่อหุ้มเซลล์ หนวดพบเฉพาะพวกที่เคลื่อนไหวได้มีจำนวน 1, 2, 4, 8 เส้น หรือเป็นวงรอบเซลล์ มีลักษณะคล้ายแส้ (acronematic) ถ้ามี หนวดมากกว่า 2 เส้น ความยาวหนวดจะเท่ากัน ตำแหน่งของหนวด มี 2 ตำแหน่งคือ apical และ subapical cell อาหารสะสมส่วนใหญ่คือแป้ง amylose และ amylopectin สะสมอยู่ใน pyrenoid ซึ่งอยู่บนคลอโรพลาสต์ ที่เหลือจะสะสมอาหารอยู่ในรูปน้ำมันและกลีเซอรอล

2. รูปร่างลักษณะ

สาหร่ายสีเขียวมีรูปร่างหลายแบบ มีทั้งเซลล์เดี่ยว (unicell) โคโลนี (colony) และเส้นสาย (filament) พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีมีทั้งที่เคลื่อนไหวได้และไม่ได้ พวกที่เป็นเส้นสายมีทั้งที่ แตกแขนงและไม่แตกแขนง สาหร่ายสีเขียวมีนิวเคลียส 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 พวกที่มีหนวด จะมีออร์กาเนลล์ที่มีสีเขียวเรียกว่า ตา (eye spot or stigma) ทำหน้าที่รับแสงแล้วส่งไปยังหนวด

3. วัฏจักรชีวิต (Life cycle)

วัฏจักรชีวิตมี 2 แบบคือ แบบ แฮพลอนติก (haplontic type) การลดจำนวนโครโมโซมเกิดในระยะไซโกต แบ่งตัวเพื่อสร้างสปอร์ พบใน Order Volvocales และแบบ ดิบพลอนติก (diplontic type) การลดจำนวนโครโมโซมเกิดในระยะสร้างแกมีตพบในบางสกุลของ Order Chlorococcales

4. การสืบพันธุ์

การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวมีทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศกล่าวคือแบบอาศัยเพศ โดยการรวมกันของแกมีต ซึ่งมีทั้งแบบ isogamy, anisogamy และ oogamy ส่วนแบบไม่อาศัยเพศ มีทั้งการแบ่งเซลล์, สร้างสปอร์ และสร้าง akinete

2.1.2.2 Class Prasinophyceae หรือเรียกว่า “Prasinophytes”

เป็นสาหร่ายที่มีหนวดมีขนาดเล็กมาก 1-50 ไมโครเมตร เดิมรวมอยู่ใน Order Volvocales, Class Chlorophyceae แต่มีผู้ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จึงพบความแตกต่างจึงแยกออกมาจัดตั้งเป็นคลาสใหม่คือ Class Prasinophyceae ซึ่งมีความแตกต่างคือ เซลล์และหนวดมีเกล็ดหุ้ม แต่มีขนาดเล็กมากและอัดกันแน่น

1. ลักษณะที่สำคัญของคลาส

เซลล์มีรูปร่างเป็นรูปสี่เหลี่ยมหรือแบนข้าง compressed หรือแบนเล็กน้อยจากบนลงล่าง ผนังเซลล์ส่วนใหญ่เซลล์มีเกล็ดหุ้มซึ่ง ประกอบด้วย สารอินทรีย์ บางชนิดก็ไม่มี หนวด มี หนวด 1, 2, 4, 6 และ 8 เส้น บนหนวดมีขนแข็งและหนา นอกจากนี้หนวดยังมีเกล็ดขนาดเล็กปกคลุมคลอโรพลาสต์มีรูปร่างเป็นแผ่นจำนวน 1-2 แผ่น หรือเป็นเม็ดกลมๆจำนวนมาก ส่วนใหญ่มีจุดตาและอยู่บน chloroplast มี ejectosome เป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ป้องกันตัวพบในสกุล Pyramimonas อาหารสะสม ได้แก่ แป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.3 Class Euglenophyceae ยูกลีนอยด์ (Euglenoids)

ยูกลีนอยด์มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ว่ายน้ำเป็นอิสระมีชื่อสามัญคือ euglenoids เซลล์มีสีเขียวสด บางชนิดไม่มีสีจัดเป็นพวก saprophytic และ holozoic form (กินสิ่งเน่าเปื่อยหรือ ตะกอนเป็นอาหาร) พบทั่วไปในน้ำจืด ทำให้เกิดการบูดของน้ำได้

1. ลักษณะที่สำคัญของคลาส

ชนิดที่มีสี (colored form) พวกที่มีสารสีประกอบด้วยคลอโรฟิลล์ a และ b แคโรทีน ได้แก่ เบต้าแคโรทีน ส่วน xanthophylls ได้แก่ lutein, neoxanthin และ astaxanthin ไม่มีผนัง เซลล์แต่มีเยื่อหุ้มเซลล์ (plasmalemma) ซึ่งมี pellicle ประกอบด้วย แผ่นโปรตีนแบนๆ จำนวน หลายแผ่นต่อกันเป็นแถวบางชนิดมี lorica หุ้มพวกที่ว่ายน้ำเป็นอิสระมีขนาด 2 เส้นหรือมากกว่า ขนาดเป็นแบบ pantonematic ความยาวไม่เท่ากันและอยู่ที่ apical cell เคลื่อนที่แบบ euglenoid movement อาหารสะสมเป็นพวกแป้ง (paramylon) colored form แป้งจะไม่ทำให้เกิดสีดำเมื่อทดสอบกับหมึกอินเดีย colorless form เป็นเม็ดแป้งลอยอยู่ใน cytoplasm

2. ลักษณะที่สำคัญของ euglenoid

- โครงสร้างของเซลล์ในช่วงชีวิต (life cycle) คือถ้าไม่ได้สร้างซีสต์หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มแล้วจะมีขนาด 2 เส้นสั้นสั้น เรียกว่า nonemergent flagellum ซึ่งยาวไม่เกิน gullet และ เส้นยาว เรียกว่า emergent flagellum บางชนิดบริเวณข้างโคนขนาดจะหนาเรียกว่าบริเวณนี้ ว่า flagella swelling
- Eye spot หรือ stigma มีหน้าที่ในการรับแสงอยู่ด้านบนของ gullet ส่วน contractile vacuole ทำหน้าที่รับของเสียจากเซลล์
- การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยการแบ่งเซลล์ทั้งในระยะที่เคลื่อนที่และในระยะที่เรียกว่า palmella (ระยะที่เซลล์ไม่มีขนาดและอยู่รวมกันเป็นกลุ่มที่มีเมือกหุ้ม)
- การดำรงชีวิตของยูกลีนอยด์มี 2 แบบคือ แบบ photoautotrophic คือ มีคลอโรพลาสต์สามารถสังเคราะห์แสงได้ มีขนาดจึงเคลื่อนที่ได้ และต้องการวิตามินบี 1 ชนิด ตัวอย่างเช่น *Euglena* sp. และ *Phacus* sp. และแบบ heterotrophic ไม่มีคลอโรพลาสต์จึงสังเคราะห์แสงไม่ได้และเจริญเติบโตในที่มืด เช่น *Astasia* sp. และ *Hyalophacus* sp.

2.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย (นุชนาถ แซ่มช้อย, 2557)

- ระยะเวลาของการเลี้ยง แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ
- การเลี้ยงระยะยาว (Long term culture) วัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงระยะยาว เพื่อเก็บหัวเชื้อสาหร่ายไว้สำหรับการเพาะเลี้ยงครั้งต่อไป
- การเลี้ยงระยะสั้น (Short term culture) เหมาะสำหรับการศึกษาสาหร่ายเป็นครั้งคราว อาหารที่ใช้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับว่าจะใช้สาหร่ายในด้านใด และต้องเลือกอาหารให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เหมาะสมกับสาหร่ายแต่ละชนิดเพื่อการศึกษานั่น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- รูปแบบของการเพาะเลี้ยง แบ่งตามความบริสุทธิ์ได้ 3 ประเภท คือ
 - การเลี้ยงสาหร่ายแบบยูนิอัลกัลป์ (Unialgal culture) เป็นการเลี้ยงสาหร่ายเพียงชนิดเดียว ไม่มีสาหร่ายชนิดอื่นปน แต่อาจมีสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นปนได้ เช่น แบคทีเรีย โปรโตซัว
 - การเลี้ยงสาหร่ายแบบปลอดเชื้อ (Axenic culture) เป็นการเลี้ยงสาหร่ายชนิดเดียวหรือหลายชนิด ก็ได้ แต่ต้องไม่มีแบคทีเรียปนอยู่เลย ฉะนั้นจึงเรียกการเลี้ยงแบบนี้อีกชื่อหนึ่งว่า การเพาะเลี้ยงแบบฟรีแบคทีเรีย (Bacteria free culture)
 - การเลี้ยงสาหร่ายแบบบริสุทธิ์ (Pure culture) เป็นการเลี้ยงสาหร่ายชนิดใดอาหารที่ใช้เลี้ยง แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบคือ อาหารเหลว (Liquid media) และ อาหารแข็งหรืออาหารวุ้น (Solid or agar media)

- วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กมีรูปแบบหลายลักษณะที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับแบ่งออกได้ 3 รูปแบบ คือ

1. การเพาะเลี้ยงแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว (Batch culture)
2. การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous culture)
3. การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous culture)

ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 รูปแบบมีความเชื่อมโยงกันเนื่องจากสรีรวิทยาการเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กในสภาพแวดล้อมทั้งทางกายภาพและเคมีไม่มีความแตกต่างกันและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบต่อเนื่องก็จะต้องการข้อมูลเบื้องต้น โดยเฉพาะอัตราการเติบโตจำเพาะมาจากการเลี้ยงแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว มาจัดสภาวะการเลี้ยงและอัตราการเจือจางที่เหมาะสมจึงจะทำให้การเพาะเลี้ยงได้ผลตามเป้าหมาย

2.2.1 การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (ขจรเกียรติ ศรีนวลสม, 2550)

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ผู้เพาะเลี้ยงจำเป็นต้องทำการเก็บสาหร่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติและคัดแยกสายพันธุ์ของสาหร่ายที่ทำการคัดแยกได้จะต้องอยู่ในสภาพบริสุทธิ์ (axenic culture) เพื่อนำสาหร่ายนั้นเป็นหัวเชื้อในการเพาะเลี้ยงต่อไปซึ่งเทคนิคการคัดแยกเชื้อสาหร่ายและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์มีหลายวิธี การที่จะเลือกเทคนิคใดนั้นก็ขึ้นอยู่กับชนิด ขนาด รูปร่างของสาหร่าย และสิ่งที่สำคัญก็คือ อุปกรณ์ทุกอย่างต้องปราศจากเชื้อ (sterile)

ปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย คืออาหารหรือสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงทั้งนี้จำเป็นจะต้องทราบว่าสาหร่ายชนิดที่เพาะเลี้ยงมีความต้องการธาตุอาหารแต่ละชนิดมากน้อยเพียงใด ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่ายธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) ประกอบด้วยธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการใช้ในปริมาณมากเพื่อการเจริญเติบโต ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์โซเดียม โปแตสเซียม แมกนีเซียมและ แคลเซียม
2. ธาตุอาหารรอง (Micronutrient หรือ Trace metals) ประกอบด้วยธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการใช้ในปริมาณที่ค่อนข้างน้อยซึ่งเมื่อเติมลงในอาหารจะช่วยให้สาหร่ายเจริญเติบโตดีขึ้น แต่ถ้าไม่มีการเติมลงไป ในอาหาร การเจริญเติบโตของสาหร่ายจะช้าลงกว่าเล็กน้อยโดยปกติสูตรอาหารที่ดีและเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายควรประกอบด้วยธาตุอาหารทั้ง 2 ประเภท ซึ่งส่วนใหญ่สารเคมีที่มีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมี ดังนี้

ตารางที่ 2.1 สารเคมีที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (อาภารัตน์, 2549)

ธาตุอาหารหลัก (Macronutrients)	ธาตุอาหารรอง (Trace metals)
NaCl	H ₃ BO ₃
KCl	MnCl ₂ ·4H ₂ O
CaCl ₂ ·2H ₂ O	MnSO ₄ ·7H ₂ O
MgCl ₂ ·6H ₂ O	FeCl ₃ ·6H ₂ O
Na ₂ SO ₄	FeSO ₄ ·7H ₂ O
K ₂ SO ₄	CoCl ₂ ·6H ₂ O
MgSO ₄ ·7H ₂ O	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
NaNO ₃	CuSO ₄ ·5H ₂ O
KNO ₃	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Vitamins
NH ₄ NO ₃	Vitamin B12
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Biotin
KH ₂ PO ₄	Nicotinic acid

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั่วไปมี 2 ลักษณะ คือ

1. อาหารเหลว (Liquid media: broth)
2. อาหารแข็งหรือ อาหารวุ้น (Solid or agar media)

เตรียมได้จากการเติมวุ้น (Bactoagar) ลงไปในอาหารเหลวประมาณ 1 – 1.5% นอกจากนี้ ยังมีอาหารลักษณะอื่นๆ ได้แก่

- Semisolid media: อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวเตรียมได้โดยเติมวุ้นปริมาณน้อยๆ ประมาณ 0.5% ลงไปในอาหารเหลว
- Differential media: อาหารที่ใช้เพาะเชื้อสาหร่ายแล้วเห็นความแตกต่างของเชื้อที่ขึ้นได้ชัดเจน
- Selective media: อาหารที่คัดเลือกชนิดสาหร่ายซึ่งจะมีเพียงสาหร่ายบางชนิดเท่านั้นที่ขึ้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Enrichment media: อาหารที่ส่งเสริมหรือเกื้อหนุนให้สาหร่ายบางชนิดเจริญดีกว่าสาหร่ายชนิดอื่นๆทำให้ สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ของสาหร่ายชนิดที่ต้องการได้
- Complete media: อาหารที่นำมาจากธรรมชาติโดยไม่รู้สัดส่วนที่แน่นอน เช่น น้ำเสียจากบ่อบำบัด น้ำซุปล้นฝรั่ง
- Synthetic media: อาหารสังเคราะห์ที่ทราบชนิดและปริมาณขององค์ประกอบที่แน่นอน จึงสามารถเตรียมอาหารนี้เมื่อไรก็ได้

สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงเจริญอยู่ในอาหารมีหลายลักษณะดังนี้

Unialgal culture: สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงมีชนิดเดียว (แต่อาจมีแบคทีเรียปนเปื้อน)

Axenic culture: สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงมีชนิดเดียวไม่มีสิ่งมีชีวิตอื่นปะปน (ปลอดแบคทีเรีย) ซึ่งอาจเจริญมาจากหลายเซลล์ซึ่งเป็นชนิดเดียวกัน

Monoxenic culture: สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงมีสิ่งมีชีวิตอื่นอีก 1 ชนิด ปะปนอยู่ด้วย

Pure culture: สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงมีชนิดเดียว (ปลอดแบคทีเรีย) ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียวนับเป็น genetic purity Stock culture: การเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ทราบชนิดเพาะเอาไว้เพื่อใช้ในการศึกษาทดลองหรือการนำไปใช้ประโยชน์

2.2.2 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

การเจริญเติบโตของสาหร่ายจะทำให้ทราบอัตราการเติบโตหรือ “Growth rate” ของเซลล์สาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีความสำคัญต่อการตรวจสอบประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงสาหร่ายตลอดจนระบบการจัดการเพาะเลี้ยงให้ได้ผลผลิตของสาหร่ายสูงสุด ทั้งนี้การเจริญเติบโตของสาหร่ายมีลักษณะกราฟโค้งรูปตัว “S” (sigmoid curve) ซึ่งเรียกว่า เส้นโค้งการเติบโต (growth curve) โดยเส้นกราฟหรือเส้นโค้งการเจริญเติบโตแบ่งออกได้ 5 ระยะ คือ

1. ระยะปรับตัว (Lag or inductional phase) เป็นระยะที่เซลล์ปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ เช่น แสง อุณหภูมิ และธาตุอาหาร ฯลฯ ระยะนี้สาหร่ายไม่มีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นเซลล์ที่ไม่สามารถปรับตัวได้จะตายลง การที่สาหร่ายจะผ่านระยะปรับตัวนี้เร็วมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของเซลล์และความอุดมสมบูรณ์ของอาหารที่เลี้ยงถ้าสภาพทั้งสองอย่างเหมาะสมสาหร่ายจะผ่านเข้าสู่ระยะที่ 2 เร็วขึ้น

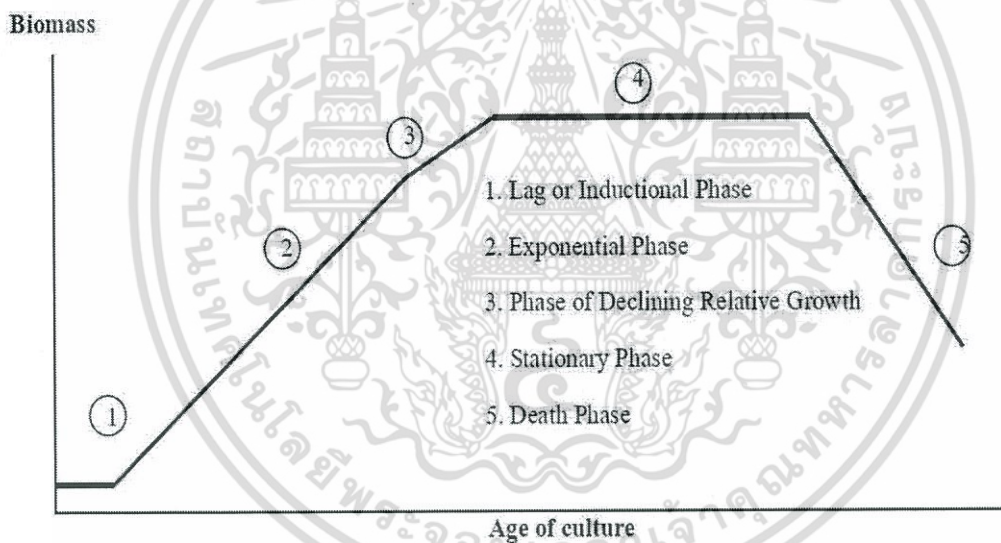
2. ระยะเอ็กซีโพเนนเชียล (Exponential Phase) เป็นระยะที่สาหร่ายเจริญเติบโตและแพร่ขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ความยาวนานของระยะนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารและสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงแสงสว่างรวมทั้งผลผลิตนอกเซลล์ของสาหร่ายและสภาวะรวมของสิ่งแวดล้อม เป็นต้น ลักษณะการเจริญเติบโตในระยะนี้เป็นแบบที่รวดเร็วในระยะแรกและจะค่อยๆช้าลงตามลำดับ

3. ระยะเฉื่อย (Phase of Declining Relative Growth) เป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตช้าลงเพราะขาดแคลนอาหาร เช่น ไนโตรเจน เหล็ก คาร์บอน หรือออกซิเจนเนื่องจากปริมาณเซลล์ไม่จำกัดทุกสิ่ง ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดหนาแน่นเกินไป การเสียดุลของค่า pH เพราะเกิดแอมโมเนียขึ้นมากหรือแสงสว่างลดลง เนื่องจากเซลล์เกิดการบังกันเอง (Auto-shading) วิธีแก้ไขให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็นปกติทำได้โดยเติมธาตุอาหารที่ขาดแคลนถ้ามีการตกตะกอนของเฟอร์ริกฟอสเฟตอาจแก้ไขได้โดยการเติมสารคีเลเตอร์ เช่น เกลือได-โซเดียมอีดีทีที่เอลงไปละลายตะกอนเหล็ก ส่วนการป้องกันการขาดแคลนคาร์บอนและออกซิเจนทำได้โดยการเขย่าภาชนะตลอดเวลาหรือการใช้การพ่นอากาศ ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มคาร์บอนและออกซิเจนแล้วยังช่วยให้เกิดการผสมผสานของมวลน้ำในภาชนะเลี้ยงทำให้เซลล์สาหร่ายได้รับแสงสว่างโดยทั่วถึงอีกด้วย

4. ระยะคงที่ (Stationary Phase) เป็นระยะที่การเจริญเติบโตของสาหร่ายหยุดนิ่งเนื่องจากธาตุอาหารลดน้อยลงและเกิดสารพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือการสลายตัวของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

5. ระยะตาย (Death Phase) เป็นระยะที่เซลล์หยุดการเจริญเติบโตโดยสิ้นเชิงเนื่องจากธาตุอาหารหมดลงเซลล์จะเริ่มตายและการตายจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ



รูปที่ 2.1 กราฟการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก (สัตดา วงศ์รัตน์, 2544)

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

1. สารอาหาร

- แหล่งคาร์บอน (Carbon source) เป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายซึ่งสาหร่ายสามารถใช้ได้ทั้งในรูปของอินทรีย์และอนินทรีย์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายได้ในน้ำซึ่งอยู่ในรูปของคาร์บอนเนตและไบคาร์บอนเนต กลูโคส เป็นต้น โดยคาร์บอนจะอยู่ในรูปใดนั้นขึ้นอยู่กับค่าความเป็น กรดต่าง (pH) ของอาหาร ซึ่งโดยทั่วไปสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Scenedesmus* sp. มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 6.5-8.5

- แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยง สาหร่ายซึ่งส่งผลต่อการชักนำให้สะสมน้ำมัน โดยจำเป็นต้องมีการควบคุมการเพาะเลี้ยงให้อยู่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะที่ขาดไนโตรเจนหรือมีไนโตรเจนในปริมาณที่จำกัดจะมีผลทำให้อัตราการสังเคราะห์น้ำมันของสาหร่ายเพิ่มสูงขึ้นนอกจากนี้ไนโตรเจนมีบทบาทที่สำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์สาหร่าย อีกทั้งยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ในกรดอะมิโน โปรตีน และเอนไซม์ภายในเซลล์ โดยความสามารถในการใช้แหล่ง ของไนโตรเจนแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย ในสาหร่ายที่ขาดแคลน ไนโตรเจน หรือมีปริมาณไนโตรเจนที่จำกัดจะทำให้อัตราการสังเคราะห์น้ำมันเพิ่ม สูงขึ้นมีผลทำให้เกิดการสะสมน้ำมันภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (Hammond and Glatz,1988; Thompson, 1996; Illman et al., 2000; Scragg et al., 2002; Rosenberg et al., 2008; Widjaja et al., 2009 อ้างในผกาดี แก้วกันเนตร และคณะ, 2552) และถ้าสาหร่ายขาดไนโตรเจนจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสงและปริมาณรงควัตถุของเซลล์ทำให้สาหร่ายมีสีที่เปลี่ยนไป

2. แสง (Light) มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายในการสังเคราะห์แสงการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีการให้แสงมี 2 แบบ คือ แบบใช้แสงอาทิตย์ และแบบให้แสงด้วยหลอดไฟ ควรให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เพราะแสงที่ได้จะมีอุณหภูมิไม่สูงเหมือนแสงจากหลอดไฟชนิดอื่น นอกจากนี้การควบคุมช่วงเวลาในการให้แสงสลับกับการหยุดให้แสงจะส่งผลให้สาหร่าย เจริญเติบโตได้ดีกว่าการให้แสงตลอดเวลา (ยูวดี พิรพรพิศาล และคณะ, 2546)

3. อุณหภูมิ (Temperature) อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆภายในเซลล์สาหร่าย การทำงานของเอนไซม์โครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆในเซลล์สาหร่าย ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำมันในเซลล์สาหร่ายซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ของสาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยทั่วไปสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella sp.* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25 -27 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงถึง 30 องศาเซลเซียส จะเป็น อันตรายต่อเซลล์

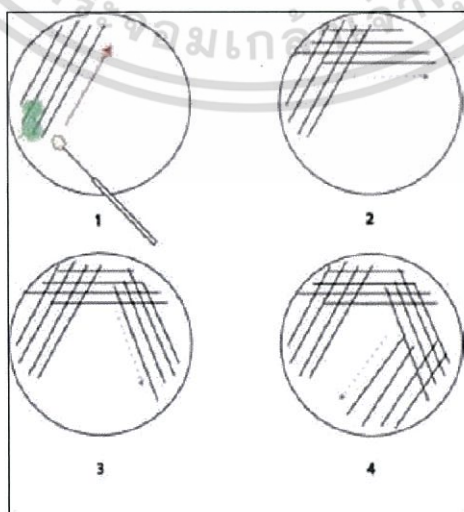
4. การกวน การกวนเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างมากในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเนื่องจากช่วยทำให้สาหร่ายที่ถูกบดบังด้านล่าง ขึ้นมารับแสงและช่วยเพิ่ม การละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศลงสู่อาหารเลี้ยงได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังช่วยให้เกิดการหมุนเวียนของสาหร่ายทำให้สาหร่ายสัมผัสกับธาตุอาหารได้อย่างทั่วถึง ลดการตกตะกอนของสาหร่าย และป้องกันการยับยั้งการสังเคราะห์แสงได้ด้วย (ผกาดี แก้วกันเนตร และคณะ, 2552)

5. ความเข้มข้นเริ่มต้นของสาหร่ายที่นำมาเพาะเลี้ยง (Starter culture) การทดลองส่วนใหญ่จะใช้สาหร่ายตั้งต้นที่เจริญเติบโต OD ที่ 560 nm เท่ากับ 1.00 แล้วใช้สาหร่ายปริมาณ 2-5 % ของอาหารที่เตรียม (นฤมล, 2532 อ้างใน ยูวดี พิรพรพิศาล, 2546)

6. การปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ ต้องควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสาหร่ายและจุลินทรีย์ชนิดอื่นจะต้องป้องกันไม่ให้มีสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ เช่น สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นหรือ สาหร่ายสายพันธุ์อื่นที่ปะปนมากับน้ำเลี้ยงที่นำมาเลี้ยงสาหร่าย

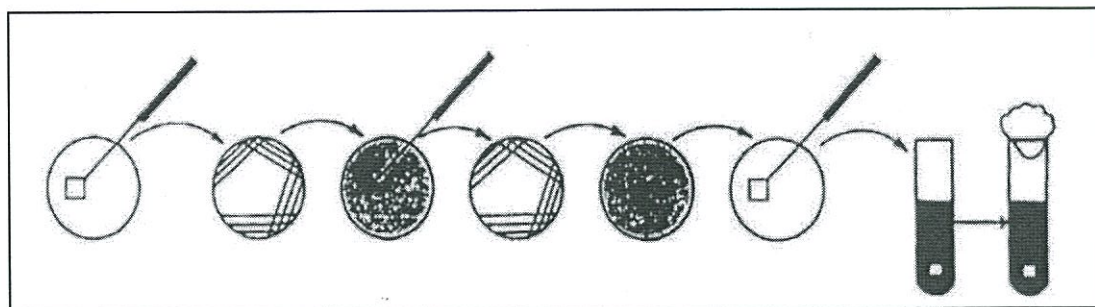
2.2.4 การแยกเชื้อสาหร่าย

1. หยดน้ำตัวอย่างที่มีสาหร่ายที่ต้องการแยกในงานเพาะเชื้อที่มีอาหารวัน 1 - 2 หยด บริเวณใกล้ขอบจานเพาะเชื้อ
2. นำปลายห่วงเช็ยเชื่อมเปลวไฟ แล้วแตะที่หยดน้ำ ลากเส้นขนานออกไปสัก 3 - 4 เส้น โดยลากเส้นบนอาหารวันเป็นรูปห้าเหลี่ยม เมื่อลากห่วงเช็ยเชื่อมมาสุดแต่ละมุมของรูปห้าเหลี่ยมนี้ ต้องเผาห่วงเช็ยเชื่อมซ้ำทุกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อและให้ใช้เซลล์ที่ปลายสุดของการลากครั้งสุดท้ายเป็นเชื้อสำหรับการลากเส้นต่อไป
3. ปิดฝาจานเพาะเชื้อ พลิกเอาก้นจานเพาะเชื้ออยู่ข้างบน รินน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไป ในจานเล็กน้อย เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารวันแห้ง จากนั้นนำไปวางที่มีแสงสว่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม ประมาณ 1 - 2 อาทิตย์ วิธีนี้จะทำให้จำนวนเซลล์สาหร่ายที่อยู่บนเส้นที่ลากจะลดน้อยลง ฉะนั้นเมื่อทำการเลี้ยงสาหร่ายประมาณ 1 - 2 อาทิตย์ จะมีกลุ่มเซลล์สาหร่าย (colony) ขึ้นมา โดยจะมีช่องว่างห่างกันมาก ในบริเวณเส้นที่ลากท้ายๆ จนสามารถเก็บเซลล์เพียงเซลล์เดียวจากจานเพาะเชื้อได้
4. เช็ยเซลล์สาหร่ายเดี่ยวๆ มาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ห่วงเช็ยเชื่อมเผาไฟแล้วเช็ยเซลล์สาหร่ายบางส่วนของโคโลนี ไปทำ wet mount
5. ถ้าเซลล์สาหร่ายที่เช็ยมาตรวจเป็นชนิดเดียวกัน (บริสุทธิ์) ให้ถ่ายเชื้อสาหร่าย (subculture) ลงในอาหารวันชุดใหม่ โดยให้ทำ ข้อ 2 อีกครั้งในอาหารวันจานใหม่ การถ่ายเชื้อสาหร่ายในครั้งที่ 2 นี้ จะช่วยให้ได้สาหร่ายที่บริสุทธิ์ขึ้น จนอยู่ในสภาพ axenic culture แต่ถ้าเชื้อไม่บริสุทธิ์ให้ทำข้อ 2 - 4 ซ้ำ อีกครั้ง หรือจนกว่าจะได้ที่เชื้อบริสุทธิ์
6. ให้ถ่ายเชื้อสาหร่ายที่บริสุทธิ์ลงในหลอดแก้วที่มีอาหารวันเอียง (slant) และหลอดแก้วที่มีอาหารเหลว (broth) สำหรับเก็บไว้เป็น stock culture ต่อไป



รูปที่ 2.2 ลักษณะการลากเส้นบนอาหารวัน (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการคัดแยกเชื้อบนอาหารวัน (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2544)

2.3 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย (สุรัตน์ดิพร รัตนะ, 2554)

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่ายสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์ยูคาริโอตที่สังเคราะห์ด้วยแสง ได้แก่ สาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีเขียว และสาหร่ายสีน้ำตาล การผลิตไฮโดรเจนจากเซลล์โพรคาริโอตที่มีกลไกการสังเคราะห์ด้วยแสงแบบเดียวกับพืช ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรีย

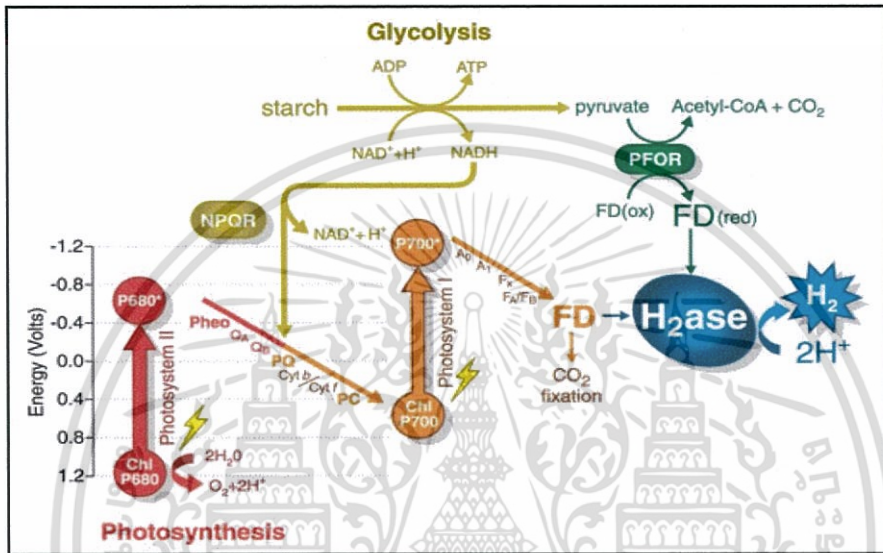
2.3.1 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว (วิทวัส แจ็งเอี่ยม, 2553)

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการบ่มที่ปราศจากออกซิเจนทั้งในที่มืดและที่มีแสง สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Codium* sp., *Chlamydomonas* sp. และ *Chlorella* sp. เป็นต้น ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสงต่ำ เซลล์จะเกิดการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้น กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง

สาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยใช้เพียงแสงและน้ำในการผลิตไฮโดรเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นที่บริเวณคลอโรพลาสต์ของเซลล์ ในระบบแสงจะมีหน่วยรับพลังงานแสง (Antenna complex) ซึ่งประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด คือ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี ที่ทำงานร่วมกันในการรับพลังงานแสง จากนั้น จึงส่งต่อพลังงานนั้นเข้าสู่ศูนย์กลางปฏิกิริยา (Reaction center) ซึ่งอยู่ภายในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ เมื่อโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ ได้รับพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ เอ จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้นและพร้อมที่จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวถัดไป เมื่อมีพลังงานในรูปของแสงตกกระทบในบริเวณระบบแสงสอง (PS II) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ระบบแสงสองจะถูกกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่ควิโนน ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรก (Q : Primary electron acceptor of PS II) อิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปยังพลาสโตควิโนน (PQ : Plastoquinone) ต่อมาเมื่อน้ำมีการแตกตัวออกได้เป็นโมเลกุลของออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงสองไป

แทนที่อิเล็กตรอนในคลอโรฟิลล์ที่มีการสูญเสียไปในระบบ จากนั้นอิเล็กตรอนจากพลาสโตควิโนนจะก้าว
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถูกส่งต่อไปยังไซโตโครม บี (Cytochrome b) ไซโตโครม เอฟ (Cytochrome f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) และเข้าไปยังระบบแสงหนึ่ง (PS I) ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยสังเคราะห์แสงที่มีศูนย์กลางปฏิกิริยาที่สามารถรับพลังงานในช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อระบบแสงหนึ่งถูกกระตุ้นจะปลดปล่อยอิเล็กตรอนหรือแสงมากระตุ้นคลอโรฟิลล์ภายในระบบแสงหนึ่ง คลอโรฟิลล์จะปล่อยอิเล็กตรอนออกมาที่เฟอร์รีดอกซิน (Ferredoxin : Fd) อิเล็กตรอนจากเฟอร์รีดอกซินจะไปรวมกับโปรตอนที่มาจากการแตกตัวของน้ำ โดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการผลิตไฮโดรเจนขึ้น (รูปที่ 2.4)



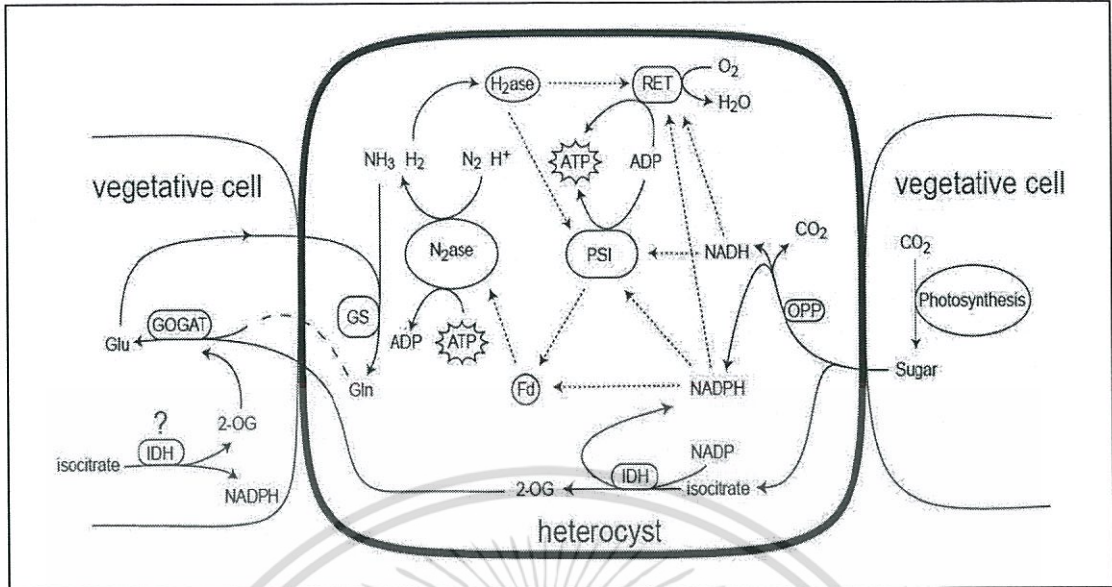
รูปที่ 2.4 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Posewitz MC, 2009)

2.3.2 การผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นเซลล์โพรคาริโอตที่สังเคราะห์แสงได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (Oxygenic phototrophic prokaryote) มีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ และมีคลอโรฟิลล์ เอ เป็นรงควัตถุเหมือนในสาหร่ายสีเขียวและพืช ไซยาโนแบคทีเรียมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจาก 2 กระบวนการ คือ กระบวนการตรึงไนโตรเจนและกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย

2.3.2.1 กระบวนการตรึงไนโตรเจน

กลไกการเกิดปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) จากอากาศเริ่มจากการรีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และอาศัยพลังงานจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งในระหว่างการตรึงไนโตรเจนจะได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (รูปที่ 2.5) และในสภาวะที่เหมาะสม ไฮโดรเจนที่ได้จะถูกออกซิไดซ์กลับไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอนจากการกระตุ้นการทำงานด้วยเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส

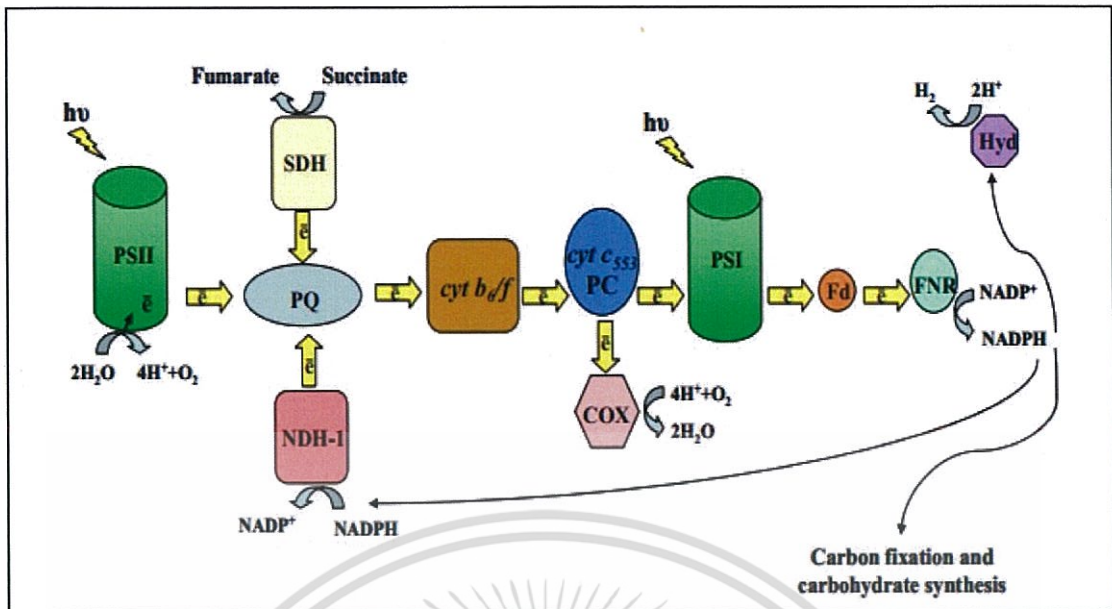


รูปที่ 2.5 กระบวนการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย (Lindberg P, 2003)

เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกยับยั้งการทำงานในสถานะที่มีออกซิเจนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ด้วยเหตุนี้ เอนไซม์ไนโตรจีเนสจึงทำงานเฉพาะในสถานะที่ไม่มีอากาศและไม่มีแสงเท่านั้น ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดจึงได้พัฒนากลไกที่ป้องกันการการทำงานของเอนไซม์ จากการยับยั้งของออกซิเจน โดยการสร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (Heterocyst cell) ขึ้นมาแยกจากเซลล์ปกติ โดยภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์จะไม่มีระบบแสงสอง และมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ และส่งสารประกอบไนโตรเจนไปสู่เซลล์ข้างเคียง (Fay, 1992) ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะอยู่ภายในเซลล์ปกติ (Vegetative cell) กระบวนการตรึงไนโตรเจนจะทำงานในขณะที่ไม่มีแสงเท่านั้น (Bergman et al, 1997)

2.3.2.2 กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

กระบวนการสังเคราะห์แสงประกอบไปด้วยระบบแสง 2 ระบบ โดยกระบวนการสังเคราะห์แสงเริ่มจากระบบแสงสองรับพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร เพื่อกระตุ้นให้มีการแตกตัวของน้ำเป็นออกซิเจน โปรตอน และอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนที่ได้จะถูกส่งผ่านไปยังไซโตโครม (Cytochrome complex) และส่งต่อไปยังระบบแสงหนึ่ง ซึ่งจะรับพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรและส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังเฟอร์ริดอกซิน กระตุ้นให้เกิดการรีดิวซ์ NADP^+ ให้กลายเป็น NADPH และ H^+ และโปรตอนที่สะสมภายในเซลล์จะถูกกระตุ้นให้ส่งถ่ายออกไปภายนอกเซลล์จากการทำงานของเอนไซม์ ATP synthase และได้ ATP เป็นผลิตภัณฑ์ พลังงานที่ได้จะถูกใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านวิถี Calvin-Benson เพื่อผลิตเป็นสารประกอบอินทรีย์ ในสถานะที่ไม่มีแสงและออกซิเจน เซลล์จะกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเพื่อออกซิไดซ์โปรตอนและอิเล็กตรอนที่มีมากภายในเซลล์ไปเป็นไฮโดรเจนและขับออกนอกเซลล์โดยพลังงานจากเฟอร์ริดอกซิน กระตุ้นการทำงานปฏิกิริยานี้สามารถย้อนกลับได้ (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 กระบวนการสังเคราะห์แสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย (Kufryk K, 2013)

กระบวนการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรตจะเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และได้ตัวรีดิวซ์เป็นผลพลอยได้. ตัวรีดิวซ์ที่ได้จะกระตุ้นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์เฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส (Ferredoxin oxidoreductase) ได้เหมือนกับตัวรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเช่นกัน

2.4 เทคนิคการวิเคราะห์โดยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer (จินดาพร บุญญวัฒนา, 2555)

2.4.1 ส่วนประกอบของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

1. แหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์จะต้องให้รังสี ในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลา รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอด้วยหลอดกำเนิดแสงมีหลายชนิดตามความยาวคลื่นแสงที่เปล่งออกมาซึ่งต้องเลือกใช้ให้ถูกต้องเหมาะสมกับของเหลวที่นำมาวัดค่า ดูดกลืนแสง ตัวอย่างแหล่งกำเนิดแสง ช่วง UV ใช้หลอด H_2 และ D_2 lamp ให้ความยาวคลื่นอยู่ในย่าน 160-380 นาโนเมตร ชนิดของสเปกโทรสโกปี UV molecular Absorption และช่วง visible ใช้หลอด Tungsten/Halogen ให้ความยาวคลื่นในช่วง 240-2,500 นาโนเมตร ชนิดของสเปกโทรสโกปี เป็นแบบ UV/visible/near-IR molecular absorption

2. Monochromator ส่วนประกอบนี้เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสงซึ่งเป็นพอลิโครเมติก ให้เป็นแสงโมโนโครเมติกซึ่งเป็นแถบแสงแคบๆ หรือมีความยาวคลื่นเดียว ใช้ฟิลเตอร์ (กระจกสี) ปริซึม (Prism) หรือเกรตติง (Grating)

3. เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง (Cell sample) บางครั้งอาจเรียกว่า คิวเวทท์ (Cuvettes) รูปแบบที่ใช้กันทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วธรรมดาจะใช้ได้เฉพาะเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

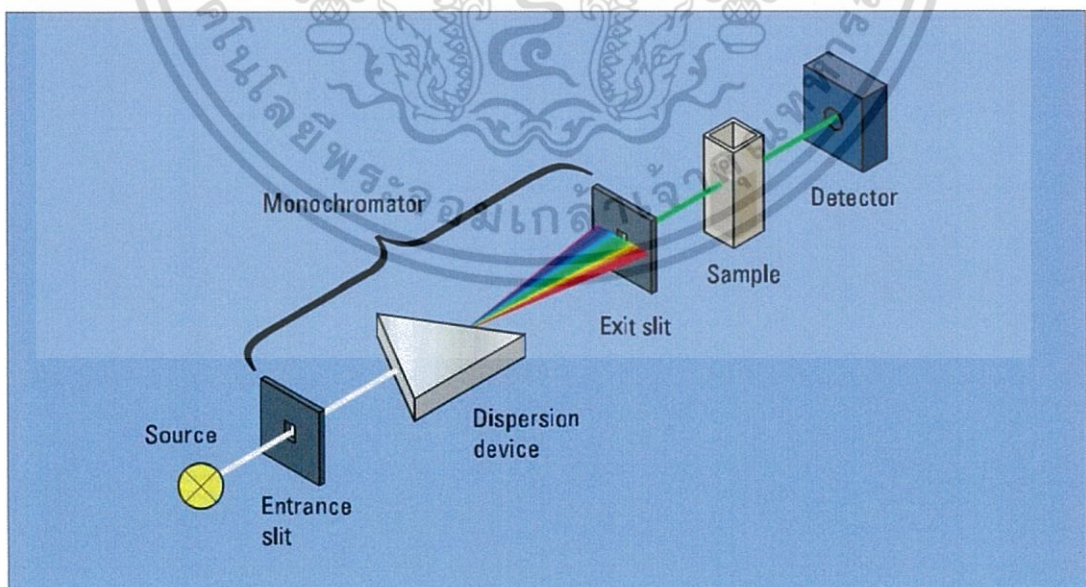
ในช่วงวิสิเบิลเพราะเนื้อแก้วธรรมดาถูกดูดกลืนแสงในช่วงยูวีได้ และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกาและควอตซ์ (Quartz) ใช้ได้ทั้งช่วงยูวีและวิสิเบิล

4. Detector ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้าเครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูงคือแม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อยก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ เครื่องวัดแสงที่ยังนิยมกันในปัจจุบัน คือ หลอดโฟโตมัลติพลายเออ (Photomultiplier tube, PMT) และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด

2.4.2 หลักการของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer (สุภาพร แสงศรีจันทร์, 2557)

UV-VIS Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า Intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน และสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้

สมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่าเมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิด และปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้



รูปที่ 2.7 หลักการทำงานเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 เทคนิคการวิเคราะห์โดยเครื่อง Gas Chromatograph with Thermal Conductivity Detector (ต้นกล้า อินสว่าง, 2558 ; รัชชัย ศรีวิบูลย์, 2551)

2.5.1 ส่วนประกอบของเครื่อง Gas Chromatograph

1. Carrier gases หรือแก๊สพา มีหน้าที่ นำแก๊สตัวอย่างจากจุดฉีด (injection port) ผ่านเข้าสู่คอลัมน์และไปยัง detector แก๊สที่ใช้ร่วมกับเครื่อง GC เป็นแก๊สเฉื่อยที่ไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารตัวอย่าง เช่น แก๊สฮีเลียม ไฮโดรเจน หรือไนโตรเจน

2. Injector port เป็นส่วนที่ใช้ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์โดยทั่วไปส่วนที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไป (inlet) มักจะมีตัวให้ความร้อน (heater) ติดตั้งอยู่ด้วย เพื่อให้สารตัวอย่างกลายเป็นไอ การเลือกใช้งานว่าจะใช้ inlet แบบใดนั้น ขึ้นอยู่กับสารตัวอย่าง หากสารตัวอย่างเป็นแก๊สมักจะฉีดตัวอย่างเข้าไปด้วย gas sampling valve หากสารตัวอย่างเป็นของเหลวโดยมากจะใช้ micro syringe ฉีดสารตัวอย่างขึ้นมาตามปริมาตรที่ต้องการแล้วฉีดผ่าน silicone septum ที่ injection port ไปยังปลายของคอลัมน์

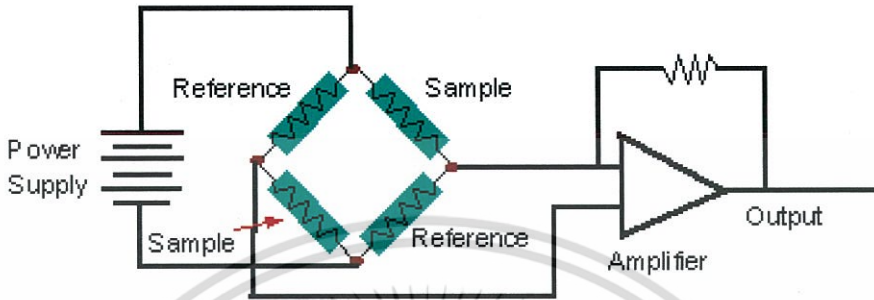
3. Column เป็นส่วนที่ใช้แยกสารตัวอย่าง คอลัมน์ที่ใช้กันทั่วไปใน GC นั้นมีอยู่ 2 ประเภท คือ packed column และ capillary column การเลือกใช้คอลัมน์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารผสม ไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน แต่สามารถพิจารณาเลือกจาก catalog ที่บริษัทผู้ผลิตคอลัมน์ออกมาจำหน่าย และค้นคว้า จากงานวิจัยในวารสารด้านโครมาโทกราฟี

4. Detector หรือส่วนตรวจวัด เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารเชิงเดี่ยวที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์แล้วส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยังระบบประมวลผลสามารถจำแนกประเภทของส่วนตรวจวัดได้เป็นหลายประเภทตามคุณสมบัติการตรวจวัด โดยรูปแบบตรวจวัดที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในที่นี้จะใช้ Thermal conductivity detector

4.1 Thermal conductivity detector (ธราธร มงคลศรี, 2552)

เป็นตัวตรวจวัดชนิดหนึ่งที่มีการประยุกต์ใช้งานในอุปกรณ์ต่าง ๆ เพื่อใช้ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารหรืออัตราการไหล เป็นต้น การทำงานของ TCD อาศัยการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการระบายความร้อนของแก๊สที่ไหลผ่านขดลวดไฟฟ้าของตัวตรวจวัด ตัวตรวจวัดประกอบด้วยขดลวดไฟฟ้าที่ต่อเป็นวงจรวีตสโตนบริดจ์ (wheatstone bridge) โดยมี 2 ขดลวดที่มีแก๊สไหลผ่าน (ขดลวด sample ด้านซ้ายล่าง ซึ่งต่อไปขอเรียกว่า ขดลวด A) และขดลวดอ้างอิงด้านขวาล่าง (ขดลวด reference ซึ่งต่อไปขอเรียกว่า ขดลวด B ของรูปที่ 2.8) TCD ทำงานโดยอาศัยหลักการ คือเมื่อให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านขดลวดไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ค่าหนึ่ง กระแสไฟฟ้าจะทำให้ขดลวดไฟฟ้ามีอุณหภูมิสูงขึ้น (พลังงานความร้อนแปรตามสมการ $E = I^2R$ เมื่อ I คือกระแส และ R คือความต้านทาน) และเมื่อขดลวดไฟฟ้ามีอุณหภูมิสูงขึ้น ความต้านทานไฟฟ้าก็จะสูงขึ้น และเมื่อความต้านทานไฟฟ้าสูงขึ้น ก็จะทำให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านได้น้อยลง (พอกระแสไฟฟ้าไหลผ่านได้น้อยลง ขดลวดก็เย็นตัวลง พอขดลวดเย็นตัวลง กระแสไฟฟ้าก็ไหลผ่านมากขึ้น ทำให้ขดลวดร้อนขึ้นไปอีก และกลับไปกลับมาอย่างนี้ไปเรื่อย ๆ จนกว่าระบบจะเข้าสู่จุดสมดุล ซึ่งถ้าเป็นในกรณีของเครื่อง GC แล้วไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การที่ต้องเปิดเครื่องรอถึง 2-3 ชั่วโมงเพื่อให้สัญญาณนิ่งก็ไม่ใช่เรื่องผิดปกติ) และถ้าขดลวดไฟฟ้านั้นมีแก๊สไหลผ่านอยู่รอบนอก อุณหภูมิและกระแสไฟฟ้าที่สภาวะสมดุลของขดลวดจะขึ้นอยู่กับค่าการนำความร้อนและอัตราการไหลของแก๊สที่ไหลผ่าน กล่าวคือขดลวดที่มีแก๊สที่มีค่าการนำความร้อนต่ำไหลผ่าน ก็จะร้อนกว่าขดลวดที่มีแก๊สที่มีค่าการนำความร้อนสูงกว่าไหลผ่าน และขดลวดที่มีแก๊สไหลผ่านเร็วกว่า ก็จะเย็นกว่าขดลวดที่มีแก๊สไหลผ่านช้ากว่า

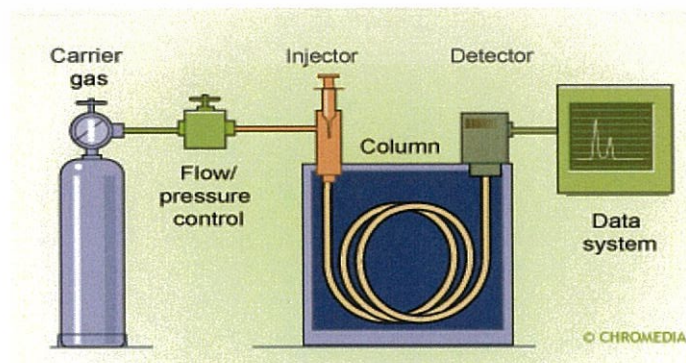


รูปที่ 2.8 วงจรของ Thermal conductivity detector

5. Data system หรือระบบประมวลผล เป็นส่วนที่ประมวลผลและข้อมูลต่างๆ ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ซึ่งคำนวณและรายงานผลเป็น retention time คือเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ผ่านคอลัมน์จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสูงสุดของของพีคที่ได้จากโครมาโตแกรม retention time สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อระบุว่าเป็นสารชนิดใดเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานนอกจากนี้ ลักษณะและขนาดของพีคที่ได้จากโครมาโตแกรมใช้เป็นข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้

2.5.2 หลักการของเครื่อง Gas Chromatography

Gas Chromatography (GC) เป็นเทคนิคสำหรับแยกสารตัวอย่างที่เป็นสารผสม โดยตัวอย่างจะถูกทำให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง แล้วให้ไอของสารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยัง column ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ carrier gas องค์ประกอบของสารผสมที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และกระจายตัวผ่านเฟสคงที่ต่างกันจะแยกออกจากกัน โดยองค์ประกอบภายในเครื่อง GC แสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 หลักการทำงานเครื่อง Gas Chromatograph

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

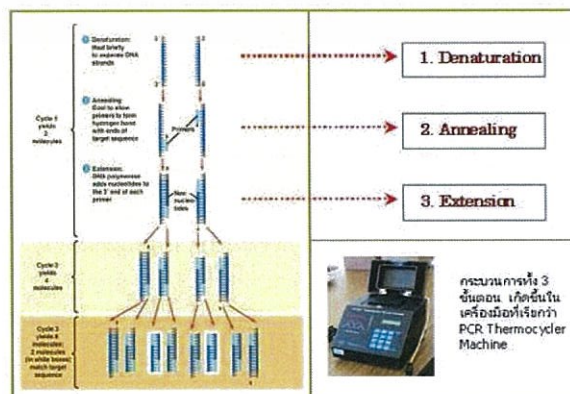
ในการวิเคราะห์สารผสมตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าที่ sample injection port สารผสมจะถูกให้ความร้อนจนกลายเป็นไอแล้วถูกพาเข้าไปใน column ด้วยเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบของสารผสมจะแยกออกจากกันเคลื่อนที่ผ่าน column และถูกตรวจวัดโดย detector สัญญาณการตรวจวัดที่ได้จาก detector จะถูกบันทึกและแสดงออกมาในรูปของ chromatogram ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography สามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยในเชิงคุณภาพสามารถหาชนิดของสารได้จากการเปรียบเทียบกับค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานที่ศึกษา ส่วนในเชิงปริมาณสามารถคำนวณปริมาณความเข้มข้นสารได้จากการเปรียบเทียบพื้นที่ความสูงของพีคกับพีคของสารละลายมาตรฐานที่ศึกษา

2.6 เทคนิคการวิเคราะห์โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2557)

2.6.1 หลักการทำงานของเทคนิค Polymerase Chain Reaction

หลักการพื้นฐานในการเพิ่มดีเอ็นเอด้วยการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสาย ด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นหรือไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ ทำให้สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน ประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน (เมฆิณี นาขวัญ และคณะ, 2555)

1. ขั้นแรก เรียกว่า Denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิในช่วง 92-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นที่สอง เรียกว่า Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงอยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส และใช้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 17-24 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน
3. ขั้นที่สาม เรียกว่า Extension หรือ Synthesis of new DNA ซึ่งเป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลายของไพรเมอร์ (ที่ใส่เข้าไปในขั้นที่สอง) ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส ดังรูป 2.10



รูปที่ 2.10 หลักการทำงานของเทคนิค Polymerase Chain Reaction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการเชิงงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (One cycle) ให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (หรือเข้ากัน) กับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และเมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวนมาก ประมาณว่าปฏิกิริยา 30 - 40 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอได้ไม่น้อยกว่าพันล้านเท่า ดังนั้น แม้ตัวอย่างที่นำมาศึกษามีปริมาณสารพันธุกรรมน้อยมาก ก็สามารถใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มจำนวนได้หลายเท่าทวีคูณ

2.7 เทคนิคการวิเคราะห์โดยใช้วิธี Gel Electrophoresis (ลินดา บุหงาเรือง, 2547)

2.7.1 หลักการทำงานของเทคนิค Gel Electrophoresis

อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่ประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ก็ยังขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้าและตัวกลางที่ใช้ด้วย โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอ (RNA) จึงมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้น จะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอด้วย

2.7.2 อุปกรณ์ในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. เครื่อง Electrophoresis และ power supply
2. เจลที่ใช้ทดสอบ
3. Sample combs
4. Electrophoresis buffer ซึ่งโดยปกติจะใช้ Tris-acetate-EDTA (TAE) หรือ Tris-borate-EDTA (TBE)
5. Loading buffer
6. Ethidium bromide
7. Transilluminator

2.7.3 ขั้นตอนการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (อภิรดี สวรรค์นคร, 2551)

1. ขั้นตอนการรินเจล

นำผง agarose ผสมกับ electrophoresis buffer จากนั้นก็นำเข้า microwave เพื่อให้ความร้อนจนหลอมเป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ง่ายจะใช้ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่เข้าไปในเจล จากนั้นทำให้เย็นถึงอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส จึงเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจลสารที่ได้ลงใน sample comb และจึงปล่อยให้เย็นตามอุณหภูมิห้องหลังจากที่เจลแข็งตัว เจลจะอยู่ในลักษณะคล้าย พลาสติก

2. ขั้นตอนการแยก DNA ด้วยไฟฟ้า

นำเจลที่ได้ไปวางบนถาดและใส่ลงในเครื่อง electrophoresis ในแนวตั้ง และใส่สาร DNA ตัวอย่างลงไปด้วย จากนั้นก็ให้กระแสไฟเข้าในเครื่อง DNA ก็จะมีการเคลื่อนย้ายไปยังขั้ว anode ตามน้ำหนักโมเลกุล ระยะทางที่ DNA ได้เคลื่อนไปในเจลสามารถเห็นได้ชัดจากการย้อมสี และส่วนต่าง ๆ ของ DNA ที่แยกออกมาจะมีค่า ตั้งแต่ 300- 4000 bp จากนั้นก็จะได้ภาพการแยกที่ชัดเจน ส่วนของ DNA ที่เคลื่อนไปใน agarose gels เป็นระยะทางต่าง ๆ แปรผกผันกับ \log_{10} ของน้ำหนักโมเลกุลของมัน นั่นคือถ้าคุณ plot กราฟระหว่างส่วนต่าง ๆ ของ DNA ที่เคลื่อนที่ได้กับกับ \log_{10} ของน้ำหนักโมเลกุล จะได้แนวโน้มของแต่ละจุดคล้าย ๆ เส้นตรง จุดนี้มีความสำคัญในการหาค่า น้ำหนักโมเลกุลของแต่ละส่วนของ DNA ใน agarose gel ที่ต้องการ

2.7.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ

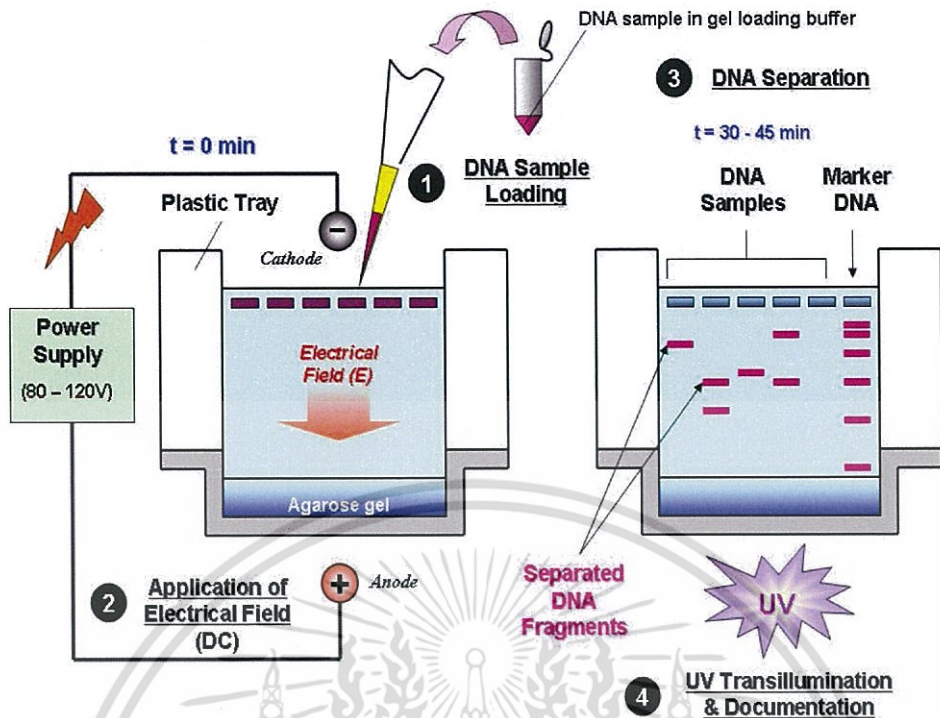
1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลแบบเส้นตรง (linear) เคลื่อนที่ได้ระยะทางที่แปรผกผันกับขนาดโมเลกุล ถ้านำระยะทางที่โมเลกุลเคลื่อนที่ (mobility) มาเขียนกราฟคู่กับค่า \log ของโมเลกุล (molecular weight) จะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ ซึ่งมีความสัมพันธ์ลักษณะเส้นตรงอยู่ช่วงหนึ่ง ดังนั้น ถ้าต้องการทราบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอสามารถทำได้ โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดแล้ว นำมาเขียนกราฟระหว่างระยะทางที่เคลื่อนที่และ \log ของน้ำหนักโมเลกุลเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน ทั้งนี้จะต้องเปรียบเทียบในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสครั้งเดียวกันเท่านั้น เนื่องจากเป็นค่าแบบสัมพันธ์

2. รูปแบบของดีเอ็นเอ (configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันนั้นดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อนจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดซึ่งจะพบรูปแบบทั้ง 3 ของดีเอ็นเอได้ในการศึกษาสัปดาห์ถัดไป

3. เพอร์เซ็นต์ของชนิดเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจลโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิกหรือโพลีอะครีลาไมด์เจลและ อะกาโรสเจล

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสนี้ ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไปดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดี แต่ถ้าแรงเคลื่อนไฟฟ้าต่ำ ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้า การแยกตัวได้ดีแต่แถบดีเอ็นเอจะไม่ชัด เพราะเกิดการแพร่

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TEA (Tris-acetate), TBE (Tris- borate), และ TPE (Tris- phosphate) นิยมใช้ที่มีความเข้มข้น 0.5 เท่า ใช้แยกดีเอ็นเอได้ คือ TPE มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอ็นเอได้เร็ว การเลือกบัฟเฟอร์แต่ละชนิดจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของคุณเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 หลักการทำงานของเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis

2.8 ไฟโลเจนี (Phylogeny)

ไฟโลเจนีเป็นสมมติฐานที่สร้างขึ้นเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตในลักษณะแผนภูมิรูปต้นไม้ (tree diagram) ความสัมพันธ์ดังกล่าวผนวกขึ้นจากความรู้ทางชีววิทยาสาขาต่าง ๆ และความรู้ทางด้านวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (พัตนี จันทรโรทัย, 2547)

แผนภูมิที่มีรากประกอบด้วยส่วนต่างๆดังนี้

ราก (root) เป็นตำแหน่งเริ่มต้น ซึ่งเป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษร่วมของกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่กำลังศึกษาทั้งหมด

แขนง (branch) เป็นตัวแทนกลุ่มอนุกรมวิธาน 1 กลุ่ม (single taxonomic group)

ปม (node) เป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษที่แยกออกเป็นกลุ่มลูก 2 กลุ่มหรือมากกว่าถ้ามีกลุ่มลูกมากกว่า 2 กลุ่มเกิดจาก 1 ปม ปมนั้นเรียกว่า โพลิโทมี (polytomy)

ยอด (tip) เป็นส่วนปลายสุดของปม เป็นจุดที่แสดงถึงกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ยังคงมีชีวิตอยู่หรือสูญพันธุ์ไปแล้ว

การสร้างความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตมีได้ 2 รูปแบบ

1. Phenetic เป็นการสร้างรูปแบบความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยวัดจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะภายนอกโดยรวมทั้งหมด (overall morphological similarity) การวัดในลักษณะนี้บางครั้งเรียกว่า อนุกรมวิธานเชิงจำนวน (numerical taxonomy) การวัดความคล้ายคลึงกันของลักษณะจะวัดออกมาในลักษณะที่เป็นค่าเดี่ยว (discrete characteristic) และลักษณะที่เป็นค่าต่อเนื่อง (continuous) ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

characteristic) ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา จากนั้นจะเปลี่ยนค่าความแตกต่างให้เป็นค่าระยะทาง (distance) ระหว่างสิ่งมีชีวิตแล้วนำค่าดังกล่าวไปสร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ที่เรียกว่า ฟิโนแกรม (phynogram) โดยใช้วิธีทางสถิติ (พัฒน์ จันทรโรทัย, 2547)

2. Cladistic เป็นการสร้างรูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตบนพื้นฐานของการมีลักษณะที่พัฒนาขึ้นมาร่วมกัน (synapomorphy) โดยลักษณะนั้นเปลี่ยนแปลงจากลักษณะดั้งเดิม (primitive state ; plesimology) ไปสู่ลักษณะที่พัฒนาแล้ว (derived state ; apomorphy) การสร้างความสัมพันธ์ในรูปแบบนี้จะแสดงออกมาในรูปแบบแผนภูมิลำดับชั้น (hierarchich listing) ที่เรียกว่า คาโดแกรม (cladogram) วิธีการจัดกลุ่มที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบนี้ คือ maximum parsimony เป็นวิธีที่ใช้จำนวนของการเปลี่ยนแปลงทางการกลายพันธุ์น้อยที่สุด เพื่อค้นหา tree ที่สั้นที่สุด และ maximum likelihood เป็นวิธีที่มีการคำนวณหาความน่าจะเป็นที่ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่เรา กำลังศึกษาอยู่จะเกิดขึ้น จากแผนภูมิวิวัฒนาการที่เป็นไปได้ประกอบกับแบบจำลอง (model) ต่างๆ ของการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการ โครงสร้าง (topology) ของแผนภูมิต้นไม้ใดที่ทำให้ความน่าจะเป็นดังกล่าวมีค่าสูงสุด แผนภูมิต้นไม้นั้นจะเป็นแผนภูมิต้นไม้ที่เป็นไปได้ที่สุด (maximum likelihood tree) (พัฒน์ จันทรโรทัย, 2547)

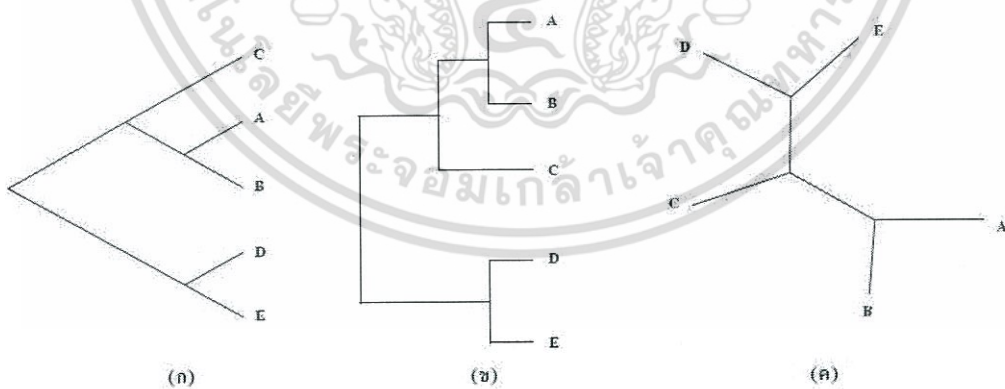
2.9 การสร้างไฟโลจีนติกทรี (Phylogenetic tree)

ไฟโลจีนติกทรีสามารถสร้างโดยอาศัยข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยา ชาคติคตาบรรพ์หรือข้อมูลระดับโมเลกุล โดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับโปรตีนของยีนต่างๆ ที่เป็นออร์โธล็อก (orthologue) ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ข้อมูลระดับโมเลกุล ก่อนที่จะกล่าวถึงขั้นตอนต่างๆ ควรจะต้องทำความเข้าใจองค์ประกอบที่สำคัญของไฟโลจีนติกทรี และคำศัพท์ที่เกี่ยวข้อง

ไฟโลจีนติกทรี มีองค์ประกอบคล้ายต้นไม้ คือ ประกอบด้วย กิ่งก้านหรือแขนง (branch) ก้านอาจแตกเป็นกิ่งย่อยแบบสองทาง (bifurcation) หรือหลายทาง (multifurcation) ซึ่งแบบหลังนี้พบน้อยมาก ตำแหน่งที่ก้านแตกเป็นกิ่งย่อยเป็นจุดต่อ เรียกว่า โหนด (node) ที่ปลายสุดของกิ่งจะเป็นลำดับเบส หรือโปรตีนสายพันธุ์หรือสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิต เรียกว่า ใบ (leaf) หรือแทกซอน (taxon) หรือ หน่วยอนุกรมวิธานเชิงปฏิบัติการ (OTU; operational taxonomic unit) อาจจะมีพิจารณาที่เป็นกราฟชนิดหนึ่งซึ่งมีส่วนยอด (vertex) เป็นโหนด และแขนงที่ต่อโหนดเป็นเส้นขอบ (edge) แต่หรืออาจมี จุดกำเนิดร่วมหรือราก (rooted tree) ซึ่งเป็นส่วนยอดที่เป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษร่วมของแทกซา (taxa) ทั้งหมดหรือไม่มีราก (unrooted tree) ก็ได้ ทรีที่มีรากจะทำให้ทราบทิศทาง เวลา และบรรพบุรุษ ในการวิวัฒนาการความยาวของก้านที่แตกต่างกัน แสดงระยะห่างของวิวัฒนาการ ซึ่งแต่ละก้านอาจมีอัตราเร็วของวิวัฒนาการแตกต่างกัน ระยะห่างอาจแสดงเป็นตัวเลขบนแต่ละก้านหรืออาจเขียนเป็นสเกลความยาวบอกขนาดในภาพหรืออาจเขียนในลักษณะเส้นตรงที่แยกออกจากกัน (รูปที่ ก) หรืออาจเขียนด้วยเส้นแนวตั้งและแนวนอน (รูปที่ ข) เพื่อให้เปรียบเทียบความยาวของก้านได้ง่าย ในกรณีเส้นในแนวตั้งเป็นเส้นเชื่อมต่อไม่มีความหมายอื่นใด หรืออาจจะเขียนในลักษณะที่ส่วนของใบเสมอกัน และโดยความยาวของก้านไม่มีความหมายในลักษณะนี้ เรียกว่า เคลดโดแกรม (cladogram) ถ้าพิจารณาโดยสนใจเพียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต หากมีข้อผิดพลาดประการใด ขออภัยเป็นอย่างสูง และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างการแตกกิ่งก้าน ไม่สนใจความยาวของขอบสามารถจะกล่าวว่า ทรีนั้นมีโทโพโลยี (topology) เดียวกันหรือเรียก topological trees เมื่อสามารถบิดหรือยืดขอบต่างๆ แล้วทำให้ทรีที่มีลักษณะโครงสร้างของกิ่งก้านแบบเดียวกัน หรืออาจเรียกว่าเป็น additive tree ถ้าระยะห่างของวิวัฒนาการของสองแตกขาที่แยกมา จากโนดเดียวกันเท่ากับผลบวกของระยะห่างทั้งสองจากโนดนั้น ถ้าตั้งสมมุติฐานให้ทรีมีอัตราการกลายพันธุ์ (mutation rate) คงที่สำหรับทุกสายทาง (lineages) สำหรับการวิวัฒนาการของลำดับเบสหรือโปรตีน จะเรียกสมมุติฐานนี้ว่า สมมุติฐานนาฬิกาของโมเลกุล (molecular clock assumption) เนื่องจากอัตราการกลายพันธุ์คงที่ ดังนั้น ปริมาณการกลายพันธุ์ของแต่ละเส้นขอบจะเป็นสัดส่วนกับเวลาที่ผ่านไป ดังนั้น ไม่ว่าจะใช้ความยาวของเส้นแทนปริมาณการกลายพันธุ์ หรือ เวลาที่ผ่านไปจะได้ตัวเลขเดียวกัน แต่ถ้า ไม่ใช่สมมุติฐาน นาฬิกาของโมเลกุลที่ขอบที่มีระยะเวลาเท่ากัน แต่มีอัตราเร็วของการกลายพันธุ์แตกต่างกัน ขอบที่มีอัตราเร็วการกลายพันธุ์มากกว่าจะมีปริมาณการกลายพันธุ์มากกว่าในช่วงเวลาที่ผ่านไปเท่ากันนั้น กลุ่มของแตกขาที่กำเนิดมาจากบรรพบุรุษร่วมกันเรียกว่า เคลด (clad) หรืออาจมีเพียงเคลดเดียวเรียกว่า monophyletic tree หรือ มีหลายเคลดเรียกว่า polyphyletic tree และแต่ละคู่ ของสปีชีส์ หรือ แยกจากกันและกันหนึ่งช่วงโนดที่อยู่ภายในทรี (internal node) หรือ กล่าวอีกอย่างก็คือ แยกจากกันโดยที่เส้นขอบวิ่งไปบรรจบกัน เรียกว่า เป็นเพื่อนบ้านกัน (neighbors) สำหรับสปีชีส์หรือแตกขาที่แยกออกจากสปีชีส์อื่นที่กำลังศึกษาในระยะแรกๆ ของการวิวัฒนาการ เรียกว่า พวกนอกกลุ่ม (outgroup) ซึ่งสปีชีส์เหล่านี้สามารถนำมาใช้เพื่อสร้างทรีแบบมีรากได้ องค์ประกอบที่สำคัญของไฟโลเจเนติกทรี ดังแสดงในรูปที่ 1 จำนวนของทรีทั้งชนิดมีรากและไม่มีราก สามารถคำนวณหาได้ เมื่อทราบจำนวนของแตกขา ซึ่งจะมีจำนวนมากมาย ดังนี้ โปรแกรมสำหรับสร้างไฟโลเจเนติกทรีจึงมุ่ง ไปสู่การสร้างหรือ ค้นหาทรีที่เหมาะสมหรือดีที่สุด ซึ่งบางวิธีจะใช้เวลาและกำลังคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์มาก



รูปที่ 2.12 องค์ประกอบที่สำคัญของไฟโลเจเนติกทรีใน รูป ก และ ข เป็นแบบชนิดมีราก โดยรูป ข หรืออยู่ในลักษณะเส้นนอน และเส้นตั้ง ส่วนรูป ค เป็นแบบไม่มีราก ทั้งสามทรีนี้มีโทโพโลยี เหมือนกัน A-E คือ แยกขา โดย A, B แยกมาจากโนดหนึ่ง และ D, E จากอีกโนดหนึ่ง และแตกขา A, B, C อยู่ในเคลดหนึ่ง ส่วนแตกขา D, E อยู่อีกเคลดหนึ่งต่างเคลดกัน

2.9.1 การวิเคราะห์ข้อมูลพันธุศาสตร์เพื่อนำไปสร้าง phylogenetic trees

รูปแบบของข้อมูล แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. ข้อมูลแสดงลักษณะ (discrete characters) ของสิ่งเปรียบเทียบ (operational taxonomic unit, OTUs) ข้อมูลลักษณะนี้ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำการเปรียบเทียบ หรือจาก restriction site polymorphism ซึ่งข้อมูลแบบนี้จัดเป็นข้อมูลปฐมภูมิ (primary data) สามารถนำไปสร้าง phylogenetic trees ได้โดยตรง โดยวิธี maximum parsimony หรือ maximum likelihood หรือสามารถแปลงเป็นข้อมูลทุติยภูมิ ซึ่งแสดงเป็นค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) แล้วนำไปสร้าง phylogenetic trees ต่อไป

2. ข้อมูลที่แสดงความแตกต่างหรือความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic distance or similarity) ของสิ่งเปรียบเทียบ ข้อมูลลักษณะนี้จะเป็นข้อมูลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงข้อมูลปฐมภูมิ (secondary data) มาเป็นข้อมูลทุติยภูมิ ซึ่งการแสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งเปรียบเทียบ ข้อมูลแบบนี้จะได้มาจาก restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของ ยีนหรือซันดีเอ็นเอ และ VNTR (minisatellite หรือ microsatellite), AFLP, DNA fingerprint และ RAPD (ศิริราช กลิ่นบุหงา และคณะ, 2544)

2.9.2 วิธีการจัดกลุ่มข้อมูล (phylogenetic analysis)

1. Distance matrix method เป็นวิธีการคำนวณค่า similarity หรือ distance ของตัวอย่างแต่ละคู่ที่ทำการศึกษา จากนั้นนำมาจัดกลุ่มโดยเริ่มจากคู่ที่มีค่า similarity สูงที่สุด หรือมีค่า distance ต่ำที่สุด ผลลัพธ์จะได้ 1 dendrogram/tree

2. Maximum parsimony เป็นการเปรียบเทียบและค้นหา tree ที่สั้นที่สุด นั่นคือจำนวน mutation เกิดขึ้นน้อยที่สุดในบรรดากลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา ซึ่งแตกต่างจากวิธีที่ 1 คือ จะพิจารณาจากข้อมูลทุกค่าร่วมกันเพื่อค้นหา evolutionary tree ที่สั้นที่สุด

3. Maximum likelihood วิธีการนี้จะคล้ายคลึงกับ maximum parsimony คือใช้ข้อมูลทั้งหมด แตกต่างตรงที่จะมีการวิเคราะห์ทางสถิติเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย (จินตนา อิงคินันท์, 2550)

2.9.3 Bootstrap

ค่าความน่าเชื่อถือของกลุ่มที่จัดนั้นมีมากน้อยเท่าไรโดยค่าที่คำนวณได้แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของโอกาสที่จะมีการจัดกลุ่มเหมือนเดิมเท่าไร เมื่อมีการสุ่มเอาตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการคำนวณการจัดกลุ่มออกตามจำนวนครั้งที่ต้องการ กลุ่มตัวอย่างที่มีค่า bootstrap มากแสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่จัดได้มีความน่าเชื่อถือ โอกาสที่การจัดกลุ่มจะเปลี่ยนไปน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีค่า bootstrap น้อย ตัวอย่างที่แยกออกเป็นกลุ่มเดี่ยวไม่สามารถคำนวณค่า bootstrap ได้ (จินตนา, 2550)

2.9.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางอนุชีววิทยาโดยใช้ software บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

ปัจจุบันวิทยาการด้านเทคโนโลยีสารสนเทศได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เครือข่ายอินเทอร์เน็ตจึงเริ่มมีบทบาทสำคัญกับงานทางอนุชีววิทยา เป็นการเปิดโอกาสให้นักวิจัยทั่วโลกมีโอกาสแลกเปลี่ยนความรู้ จึงมีการนำฐานข้อมูลทางอนุชีววิทยา ที่มีอยู่แล้วในระบบคอมพิวเตอร์ เชื่อมต่อกับระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต เรียกว่า Public Domain ซึ่งผู้ที่สนใจข้อมูลใดในฐานข้อมูลดังกล่าวสามารถเรียก access และทำการคัดลอก (download) ข้อมูลที่ต้องการมาเก็บไว้ในคอมพิวเตอร์ส่วนตัวเพื่อใช้ในงานวิจัย

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ให้บริการสร้าง phylogenetic tree บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ตซึ่งเป็นที่นิยมมาก คือโปรแกรม PHYLIP เพราะเป็นโปรแกรมที่ดาวน์โหลดมาใช้งานโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย ถูกเขียนขึ้นโดย Joe Felsenstein ซึ่งขณะนั้นศึกษาในคณะ Genome Sciences ที่ Washington University โปรแกรมสนับสนุนการทำงานในระบบปฏิบัติการ คือ Window3.x /9x/Me/NT/XP, DOS, PowerMac และ 68k Macintosh systems (วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ, 2547)

โปรแกรม PHYLIP มีวิธีการวิเคราะห์ phylogeny หลายวิธี เช่น distance matrix, parsimony, likelihood method อีกทั้งยังมีความยืดหยุ่นในการปรับค่าการทำงาน โปรแกรมถูกออกแบบให้ทำงานในลักษณะของ DOS โหมด ที่มีรายละเอียดที่กำหนดจำนวนมาก เช่น ต้องทำการเปลี่ยนชื่อไฟล์ ที่จะนำมาใช้กับแอปพลิเคชันของ PHYLIP เป็นชื่อ infile ทุกครั้ง

2.10 ประโยชน์ของ Phylogenetics

1. Comparative genomics คือ การเปรียบเทียบ genome ของสิ่งมีชีวิตตั้งแต่ 2 genomes ขึ้นไป เพื่อตอบคำถามหลักๆ ว่า สิ่งมีชีวิตในกลุ่มที่ศึกษา มี orthologous gene อะไรบ้าง ในงานวิจัยด้าน comparative genomics นั้น ถ้าเราไม่สามารถระบุได้ว่ายีนใดเป็น orthologous ก็จะทำให้ผลการเปรียบเทียบมีความผิดพลาดและเชื่อถือไม่ได้ ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน นักวิจัยคงใช้ phylogenetics มาเป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ว่ายีนที่สงสัยนั้นเป็น orthologous หรือไม่ แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ในลักษณะนี้ทำได้ยาก และใช้เวลานาน นักวิจัยส่วนมากจึงเลือกใช้วิธีอื่นที่รวดเร็วกว่า แต่ก็มีความถูกต้องลดลงกว่า phylogenetic analysis

2. Forensic Medicine ในการพิสูจน์หลักฐานทางนิติเวช

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชิดศักดิ์ (2554) : การคัดกรองสาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนและการปรับภาวะให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตไฮโดรเจน โดยทำการศึกษาจากแหล่งน้ำจืดในธรรมชาติและจากนาข้าวที่อยู่ในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทยถูกเก็บและนำมาใช้ในการคัดกรองเพื่อหาจุลสาหร่ายที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสาหร่ายสายพันธุ์หนึ่งจากทั้งหมด 210 สายพันธุ์ พบว่า *Tetraspora* sp. มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุด ต่อมาได้มีการแสดงลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าเป็นสายพันธุ์ *Tetraspora* พร้อมทั้งชื่อสาหร่ายนี้ใหม่ว่า *Tetraspora* sp. CU2551 ซึ่งสาหร่ายนี้มีความใกล้เคียงความเข้มแสงช่วง 37 - 92 ไมโครฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาทีที่อุณหภูมิกับสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวชนิดอื่น พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์นี้เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ภายใต้อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สุรัตน์ดิพร (2554) : ศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงอย่างเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายที่คัดแยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในบรรดาสาหร่ายที่แยกได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลท พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ 18S rDNA พบว่าสาหร่ายสีเขียวไอโซเลท GA8 มีความเหมือนกับสาหร่ายในจีนัส *Scenedesmus* sp จึงตั้งชื่อว่า *Scenedesmus* sp. KMITL-01 ในสองสภาวะการเพาะเลี้ยงคือสภาวะโฟโตออโตโทรปและสภาวะเฮเทอโรโทรป พบว่าที่สภาวะโฟโตออโตโทรปสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร เหลว BMM สูตรที่ปราศจากแหล่งคาร์บอนและแมกนีเซียมซัลเฟต มีโซเดียมไนเตรทและเฟอร์รัสซัลเฟตผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BMM สูตรปกติ ในสภาวะเฮเทอโรโทรป สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TAP ที่มีโซเดียมอะซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟตและเฟอร์รัสซัลเฟต ในที่มีแสง ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP สูตรปกติ อุณหภูมิและความเข้มแสงที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส และ 2,000 ลักซ์

Graffon and Rubin (1942) : ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. โดยพบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp ในอาหารที่มีการเติมกลูโคส เซลล์สาหร่ายจะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายจะสร้างและสลายไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นตามความเข้มแสง และเมื่อเติมสารไดโรโตพินอลไปยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนในที่มืด พบว่าเซลล์จะถูกกระตุ้นให้ผลิตไฮโดรเจนในสภาวะที่มีแสงได้เช่นกัน

สร้อยญา (2556) : ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวจำนวน 59 ไอโซเลทจากแหล่งดินและแหล่งน้ำในนาข้าวของประเทศไทย เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์พบว่าสามารถคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ได้ 9 ไอโซเลท และสาหร่ายสีเขียวที่บริสุทธิ์ได้ 9 ไอโซเลทเช่นกัน ในบรรดาไอโซเลททั้งหมด ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวไอโซเลท AngS1 มีอัตราการ

ผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด โดยมีอัตราการผลิตไฮโดรเจน เท่ากับ 389.630 ± 72.084 นาโนโมล ไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11₀ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาบ่มในอาหาร BG11₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและปรับตัวภายใต้สภาวะปราศจากอากาศใน ที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลกลูโคส แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และเหล็กไอออน คือ ความเข้มข้น 0.189 มิลลิโมลคาร์บอนต่อลิตร 3 มิลลิโมลาร์ และ 20 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ไชยาโนแบคทีเรียไอโซเลท AngS1 มีการสะสมไฮโดรเจน สูงสุดเท่ากับ $4,174.364 \pm 278.324$ นาโนโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เมื่อบ่มใน อาหารที่เหมาะสมเป็นเวลา 11 วัน

Zhong และคณะ (2012) : ศึกษาอัตราการผลิตแก๊สชีวภาพโดยใช้สาหร่ายสีน้ำเงินจากทะเลสาบ Taihu ได้แก่ *Microcystis* spp. เป็นสปีชีส์หลักและใช้ฟางข้าวโพด (corn straw) เป็นแหล่ง คาร์บอนเพื่อใช้ในการปรับสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนภายในระบบ โดยแปรสัดส่วนของ คาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 16, 20 และ 25 ปรากฏว่าสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 20 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพได้ร้อยละ 61.69 เมื่อเทียบกับการใช้สาหร่ายเพียง อย่างเดียว โดยสามารถผลิตได้ 325 มิลลิลิตรต่อกรัมของแข็งระเหย (สาหร่ายสามารถผลิตแก๊ส มีเทนได้ 201 มิลลิลิตรต่อกรัมของแข็งระเหย)

Zhe Qu (2009) : ได้คัดแยกสาหร่ายบริเวณน้ำทะเลที่เก็บจากชายฝั่งชิงเต่าที่ประเทศจีน โดยที่ สาหร่ายชนิดนี้เติบโตได้ดีที่ pH 6.0-10.5 และ 0-25.0 เฟอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) NaCl จากนั้นทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 16-42 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 28 องศา เซลเซียส ต่อมาได้ทำการหาลำดับ 16S rRNA พบว่า สาหร่ายชนิดนี้อยู่ในจีนัสเดียวกับ *Salinicoccus* มีความใกล้เคียงกัน 92.2-97.1 เฟอร์เซนต์ และได้ทำการตั้งชื่อสาหร่ายใหม่ว่า *Salinicoccus kunmingensis* YIM Y15^T

Dayananda และคณะ (2012) : ศึกษาการแยกสาหร่าย คุณสมบัติ และการเพาะเลี้ยงใน โรงเรือนของสาหร่าย *Botryococcus* sp. พบว่าเมื่อแยกสาหร่ายและดูลักษณะทางสัณฐานโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์ SEM (Scanning Electron Microscopic) สาหร่ายที่แยกได้เป็น *Botryococcus* sp. และวิเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนโดยใช้ Hexane พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ เป็น Hexadecane (10.15 เฟอร์เซนต์), Heptadecane (17.82 เฟอร์เซนต์) และ Pentacosane (18.74 เฟอร์เซนต์)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 จุลชีพสาหร่าย

สาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืดในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ Tris Acetate Phosphate (ภาคผนวก ก)

1. ทริส-ไฮดรอกซีเมทิล-อะมิโนมีเทน (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane) $H_2NC(CH_2OH)_3$ เกรตวิเคราะห้ บริษัท Carlo ERBA Reagents SAS ประเทศฝรั่งเศส
2. แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เกรตวิเคราะห้ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
3. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) เกรตวิเคราะห้ บริษัท Loba Chemie Pvt.Lt ประเทศอินเดีย
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) เกรตวิเคราะห้ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
5. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) เกรตวิเคราะห้ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
6. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เกรตวิเคราะห้ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
7. อีดีทีเอไดโซเดียม ไดไฮเดรต ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$)
8. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) เกรตวิเคราะห้ บริษัท Loba Chemie Pvt.td ประเทศอินเดีย
9. กรดบอริก (H_3BO_3) เกรตวิเคราะห้ บริษัท Loba Chemie Pvt.td ประเทศอินเดีย
10. แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) เกรตวิเคราะห้ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย

11. ไอร์ออนซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) เกรตวิเคราะห้ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) เกรตวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
13. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) เกรตวิเคราะห์ บริษัท Loba Chemie Pvt.Ltd ประเทศอินเดีย
14. แอมโมเนียมโมลิบเดตไฮเดรต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
15. Acetic acid, conc. CH_3COOH
16. วุ้น (Agar-Agar Bacto) เกรตวิเคราะห์ บริษัท S.D. Fine-Chem Limited ประเทศอินเดีย

3.2.2 ยาปฏิชีวนะ

1. แอมพิซิลลิน (Ampicillin)

3.2.3 น้ำตาล

1. กลูโคส (Glucose)
2. แลคโตส (Lactose)
3. ไรโบส (Ribose)
4. ซูโครส (Sucrose)

3.2.4 ก๊าซที่ใช้วิเคราะห์ไฮโดรเจน

1. ก๊าซมาตรฐานไฮโดรเจน 4% ในอาร์กอน (TIG Thailand)
2. ก๊าซอาร์กอน ความบริสุทธิ์ 99.999% (TIG Thailand)

3.2.5 เอนไซม์

1. เอนไซม์ Taq DNA polymerase

3.2.6 ชุดทดสอบ kit

1. ชุดทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 เครื่องมือ

1. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น JSAC-60
2. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet) ยี่ห้อ Astecair 3000E
3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope) ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น CH30
4. เครื่องเขย่าแบบใช้แสง (Illumination orbital shaker)
5. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น ML 204/01ชนิด New Classic MF
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) ยี่ห้อ Thermo-Scientific รุ่น Heraeus-Megafuge 8R
7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Spectrophotometer) ยี่ห้อ Thermo-Scientific รุ่น Genesys 10S UV-VIS
8. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
9. ไมโครเวฟ (Microwave)
10. Gas Chromatography Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)
11. อุปกรณ์แปรผันความเข้มแสง ได้แก่ กระดาษฟอยล์ ทิชชู และ กระจกใส
12. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycle)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge)

3.3.2 อุปกรณ์

1. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 2000 มิลลิลิตร
2. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร
3. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร
4. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
5. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
6. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 10 มิลลิลิตร
7. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร
8. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร
9. หลอดเซนติฟิวพลาสติก (Centrifuge Tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. หลอดเซนติฟิวลาสติค (Centrifuge Tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
11. ไมโครปิเปต (Micropipettes) ขนาด 5000 ไมโครลิตร
12. ไมโครปิเปต (Micropipettes) ขนาด 1000 ไมโครลิตร
13. ไมโครปิเปต (Micropipettes) ขนาด 200 ไมโครลิตร
14. ไมโครปิเปต (Micropipettes) ขนาด 20 ไมโครลิตร
15. ขวดแก้ว (Headspace vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร
16. ขวดแก้ว (Headspace vial) ขนาด 100 มิลลิลิตร
17. ปิเปต (Pipette) ขนาด 2 มิลลิลิตร
18. ปิเปต (Pipette) ขนาด 5 มิลลิลิตร
19. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 500 มิลลิลิตร
20. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 250 มิลลิลิตร
21. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 150 มิลลิลิตร
22. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100 มิลลิลิตร
23. กระจกปิดสไลด์ (Cover Slide)
24. ช้อนตักสารพลาสติก (Plastic spatula)
25. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (Petri Dish)
26. ตะแกรงใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ (Rack)
27. แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Triangle)
28. กรวยกรอง (Funnel)
29. หลอดเอปเพนดอร์ป (Eppendorf Tube)
30. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
31. ปิเปตทิป (Pipette Tips)
32. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Tip)
33. คิวเวตพลาสติก (Cuvette)
34. คีมคีบ (Forceps)
35. แผ่นสไลด์ (Glass slide)
36. เข็มเย็บเย็บปลายกลม (Loop)
37. กระจกนาฬิกา (Watch)
38. ขวดแก้ว (Duran bottle)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการเตรียมสารเคมี

3.4.1 สารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP)

(คำนวณโดยใช้การเทียบบัญญัติไตรยางค์)

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารละลาย Tris-Acetate-Phosphate (TAP) ปริมาณ 2 ลิตร จากสารเคมีข้อ 3.2.1

Stock solution	Chemical Name	Stock Concentration (กรัม/100มิลลิลิตร)	Final Concentration (กรัม)	Stock Volume (มิลลิลิตร)
Tris base	$H_2NC(CH_2OH)_3$		24.20	100
TAP – salts (Beijerinck salts)	NH_4Cl	15.0	3.75	250
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4.0	1.00	
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.0	0.50	
Phosphate solution	K_2HPO_4	28.8	2.88	10
	KH_2PO_4	14.4	1.44	
Trace elements	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	5.0000	0.5000	10
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.2000	0.2200	
	H_3BO_3	1.1400	0.1140	
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.5000	0.0500	
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5000	0.0500	
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1600	0.0160	
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.1600	0.0160	
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.0077	0.0077		
Acetic acid, conc.	CH_3COOH			1

3.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tris Acetate Phosphate (TAP)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tris Acetate Phosphate (TAP) สามารถเตรียมได้โดยการผสมสารเคมีตามสูตรใน ตารางที่ 3.1 ซึ่งในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องทำโดยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ในการเตรียม TAP สามารถเตรียมได้ 2 แบบ คือ อาหารเหลว (TAP broth) และอาหารวุ้น (TAP agar) โดยการทำให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในสภาพของอาหารวุ้น ในขั้นตอนการเตรียมต้องผสมผงวุ้น (Agar) ลงไป และนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 แบบ ไปทำการฆ่าเชื้อโดยเข้าเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น JSAC-60 ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รองจนกว่าอุณหภูมิลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส เขย่าอย่างให้มีฟองอากาศ และใส่แอมพิซิลลินในอัตราส่วน 1 ไมโครลิตร ต่อ 1 มิลลิลิตร จากนั้น เพรมที่ปากขวด TAP Agar และทำการเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) และทำการตากงานเลี้ยงเชื้อไว้ในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet) ยี่ห้อ Astec รุ่น Astecair

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3000E (รูปที่ 3.1) รองนกว่าวุ่นจะแข็งตัว เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บงานเลี้ยงเชื้อใส่ถุงพลาสติกเข้าตู้เย็นเพื่อไว้ใช้งานครั้งต่อไป



รูปที่ 3.1 การตากงานเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ

3.6 การวางแผนการเก็บตัวอย่างน้ำ

เก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำจืดภายในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัด กรุงเทพมหานคร บริเวณที่ทำการเก็บน้ำตัวอย่างทั้งหมด 6 แหล่งน้ำ ดังตารางที่ 3.2 ซึ่งได้ทำการเก็บน้ำในช่วงเดือนสิงหาคม ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 โดยใช้กระบวย (dipper) ตักน้ำจากแหล่งน้ำใส่หลอดเซนต์ปีฟัวขนาด 50 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.2, 3.3 และ 3.4) เพื่อนำมาคัดแยกสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด

ตารางที่ 3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำจืด 6 แหล่งน้ำในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

แหล่งน้ำ	code
เกษตรศาสตร์	KS
วิทยาศาสตร์	VY
สถาปัตยกรรมศาสตร์	TP
ตึกพระเทพ	PT
วิศวกรรมศาสตร์	VV
ครุศาสตร์	KR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 แหล่งน้ำจากคณะวิศวกรรมศาสตร์



รูปที่ 3.3 แหล่งน้ำจากคณะครุศาสตร์



รูปที่ 3.4 แหล่งน้ำจากคณะวิทยาศาสตร์

3.7 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

จากแหล่งน้ำที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างมาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อสาหร่าย นำมาเลี้ยงใน TAP Agar โดยใช้ไมโครปิเปต ขนาด 200 ไมโครลิตร ทำการปิเปตตัวอย่างน้ำมา 150 ไมโครลิตร 15 ไมโครลิตร และ 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 150 ไมโครลิตร เป็นจำนวน 3 เฟลท ตามลำดับ โดยทำการผสมในหลอด eppendorf โดยใช้ไมโครปิเปตดูดจากหลอด eppendorf ลงจานเลี้ยงเชื้อ และใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Triangle) เกลี่ยตัวอย่างน้ำให้ทั่วผิวหน้าของอาหารวุ้น จากนั้นนำไปปั่นที่ตู้เลี้ยงเชื้อ (Illumination orbital shaker) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.8 การแยกเชื้อสาหร่ายให้บริสุทธิ์

จากตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากแหล่งน้ำจืดในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ ทำให้สาหร่ายไม่บริสุทธิ์จึงต้องทำการแยกเชื้อสาหร่ายให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียอื่นในสาหร่าย โดยวิธีการแยกเชื้อสาหร่ายให้บริสุทธิ์ (Streak plate method) โดยจะใช้ เข็มเขี่ยเชื้อ ป้ายกลม (aluminium loop) โดยนำปลายท่วงเขี่ยเชื้อลงแปลงไฟจุนร้อนแดง รอจนกว่าป้ายท่วงไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะหายร้อนแดง แล้วแต่ที่หยดน้ำที่มีสาหร่ายขึ้นบนจานเลี้ยงเชื้อ 1-2 จุด นำมา ขีดในแนวขนานบน เพลทใหม่ 3 – 4 เส้น เมื่อลากห้วงเขี่ยเชื้อมาสุดของแต่ละมุม ทำการเผาปลายห้วงเขี่ยเชื้อจนร้อนแดง อีกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อ และลากเส้นโดยใช้เซลล์ที่ปลายสุดของการลากครั้งสุดท้ายเป็นเชื้อสำหรับลากเส้น ต่อไป ลากบนอาหารวุ้นจนเป็นรูป 4 เหลี่ยม จากนั้นปิดฝาจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่ตู้เลี้ยงเชื้อ (Illumination orbital shaker) โดยวิธีนี้จะทำจนกว่า เซลล์สาหร่ายจะบริสุทธิ์และขึ้นเป็นโคโลนี เดียวจำนวนมาก จากนั้นนำเชื้อสาหร่ายที่เป็นโคโลนีเดียวไปศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย

3.9 การส่องกล้องจุลทรรศน์

ทำการส่องกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย โดยทำการเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลว (TAP broth) เตรียมโดย ใส่ TAP broth 20 มิลลิลิตร และผสม แอมพิซิลลินในอัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อ 1 มิลลิลิตร และเซลล์สาหร่าย ใส่ขวดรูปชมพู่ จากนั้น นำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อจนเซลล์สาหร่ายเพิ่มมากขึ้น นำน้ำสาหร่ายที่บ่มมาทำการส่องกล้องโดยปิเปต น้ำสาหร่ายมา 2 ไมโครลิตร ลงในแผ่นสไลด์ ปิดแผ่นใสลงบนแผ่นสไลด์อย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้น หยดน้ำมันลงบนแผ่นใส และทำการส่องกล้องจาก 10x ปรับความชัด และขยาย เลื่อนไปจนถึง 100x โดยให้ปลายเลนส์กล้องหัว 100x แตะน้ำมันบนแผ่นสไลด์และทำการปรับเลื่อนหาเซลล์สาหร่าย นอกจากนี้ ในการใช้เลนส์ทุกครั้งต้องเช็ดเลนส์ด้วย Ethanol ก่อนส่องสาหร่ายตัวต่อไป

3.10 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย

นำสาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงใน TAP Agar มาเลี้ยงใน TAP broth โดยการ ใส่ TAP broth 50 มิลลิลิตร ผสมแอมพิซิลลินในอัตราส่วน 1 ไมโครลิตร ต่อ 1 มิลลิลิตร และ นำเซลล์สาหร่ายใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้เพาะเชื้อจนเซลล์สาหร่ายเพิ่มมากขึ้น นำน้ำสาหร่ายที่บ่มมาทำการปิเปตใส่ eppendorf 100 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 900 ไมโครลิตร (เจือจาง 10 เท่า) โดยปรับค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เริ่มต้นที่ประมาณ 0.1 จากนั้น ทำการวัดการเจริญเติบโตของ สาหร่าย โดยใส่ TAP broth 50 มิลลิลิตร ผสมแอมพิซิลลินในอัตราส่วน 1 ไมโครลิตรต่อ 1 มิลลิลิตร และ น้ำสาหร่าย ที่มีค่าความขุ่น 730 นาโนเมตร เริ่มต้นประมาณ 0.1 นำน้ำสาหร่ายมาทำการปิเปตใส่ eppendorf 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร (เจือจาง 2 เท่า) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุกๆ 6 ชั่วโมง

เหตุผลที่เลือกใช้ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร แทนค่าการเจริญเติบโตของสาหร่าย เนื่องจากที่ ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับการวัดค่าความขุ่น (Optical Density : OD) ของสารละลาย พบว่าเมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตมากขึ้นจะส่งผลให้ภายในสารละลายมี ปริมาณสารแขวนลอยเพิ่มขึ้น ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ภายในสารละลายเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ดังนั้น ค่า OD₇₃₀ ก็จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามไปด้วย แต่ในทางตรงกันข้าม เมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตน้อยลง จะ ส่งผลให้ภายในสารละลายมีสารแขวนลอยน้อยลง ส่งผลให้ความหนาแน่นภายในสารละลายน้อยลงตามไป ด้วย ดังนั้นค่า OD₇₃₀ ก็จะมีค่าน้อยลงตามไปด้วย จึงสรุปได้ว่า การเจริญเติบโตของสาหร่ายแปรผัน ตรงกันกับค่าความขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction) หรือ PCR reaction

การทำ PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA โดยจะทำการเพิ่มปริมาณ 18S gene ของสาหร่ายที่ทำการคัดเลือกด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ 18SF และ 18SR และใช้ Taq DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาแสดงใน ตารางที่ 3.3 และทำการเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ 3 ขั้นตอน ในตารางที่ 3.4 จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย Agarose gel electrophoresis technique

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการเพิ่มยีน 18S rDNA ของสาหร่ายที่คัดเลือกด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
เซลล์สาหร่าย	1.00
2 มิลลิโมลาร์ dNTP	5.00
10X buffer	5.00
10 มิลลิโมลาร์ primer forward	2.00
10 มิลลิโมลาร์ primer reverse	2.00
Taq polymerase	0.25
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	34.75
ปริมาตรสุทธิ	50.00

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA ของสาหร่ายที่คัดเลือกด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial Denaturation	95.0	1 นาที
Denaturation	95.0	20 วินาที
Annealing	55.0	20 วินาที
Primer Extension	72.0	90 วินาที
Final Extention	72.0	5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.12 วิธีการวิเคราะห์ DNA โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยในขั้นตอนแรก ทำการเตรียม อะกาโรสเจล 1 กรัม ผสมกับ 0.5x TAE buffer 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้า microwave เพื่อให้ความร้อนจนหลอมเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้เย็นถึงอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส และใส่สีย้อม serva DNA stain G 3 ไมโครลิตร และเท อะกาโรสเจลที่เตรียมเสร็จแล้วใส่ใน sample comb ปล่อยให้เย็นตามอุณหภูมิห้องจนเจลแข็งตัว จากนั้นนำเจลมาวางบนอ่าง (chamber) เท 0.5x TAE buffer ที่เจือจาง 1000 เท่า ลงไปในอ่างจนท่วมเจล และหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานและดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผสมสีย้อมลงไปในหลุม และให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3.13 วิธีการทำ Phylogenetics tree

ขั้นตอนที่ 1: นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ที่ได้ทั้งหมดมาเตรียมไว้ในรูป FASTA format (ดูข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ ในภาคผนวก ข-6)

ขั้นตอนที่ 2: ค้นหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวอีก 9 ชนิด ได้แก่

>Actinastrum_hantzschii_LC192144

>Chlorella_pyrenoidosa_AB240151

>Chlorella_sorokiniana_KU948991

>Chlorella_vulgaris_AY591515

>Crucigenia_lauterbornii_LC129524

>Diacanthos_belenophorus_AY323837

>Heynigi_sp_JQ315541

>Micractinium_sp_KT279453

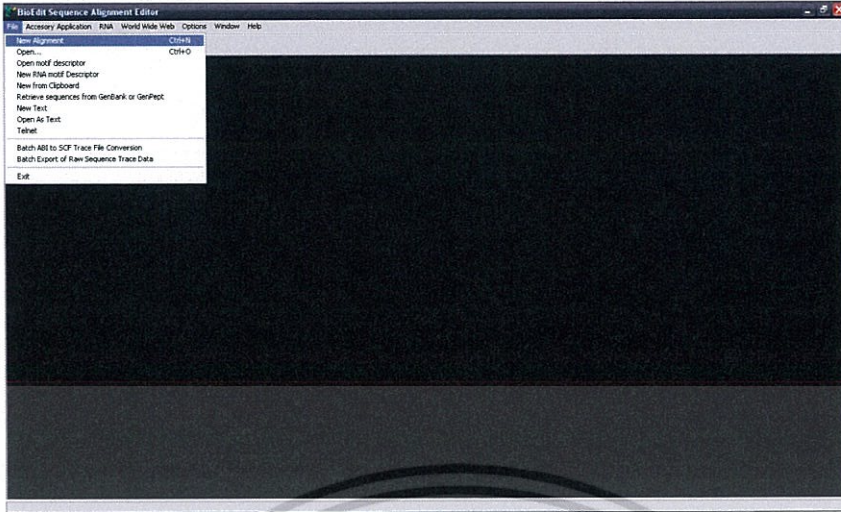
>TetrasporaCU2551_KT984853

ขั้นตอนที่ 3: นำ FASTA ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกสาหร่ายมารวมไว้ในไฟล์ *.txt เดียวกัน

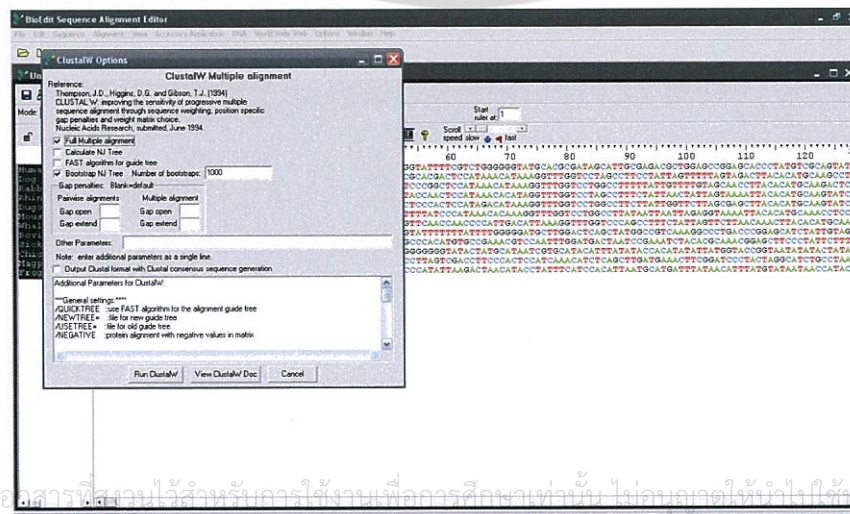
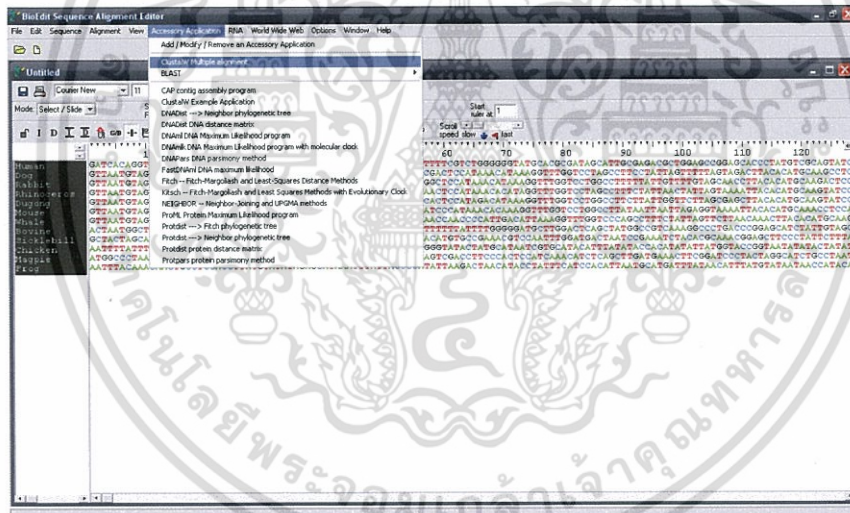
ขั้นตอนที่ 4: เปิดโปรแกรม BioEdit, ซึ่งสามารถ Download ได้จาก

<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> เพื่อโหลดไฟล์จากขั้นที่ 3 โดยเลือก File > New Alignment ที่แถบเมนู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

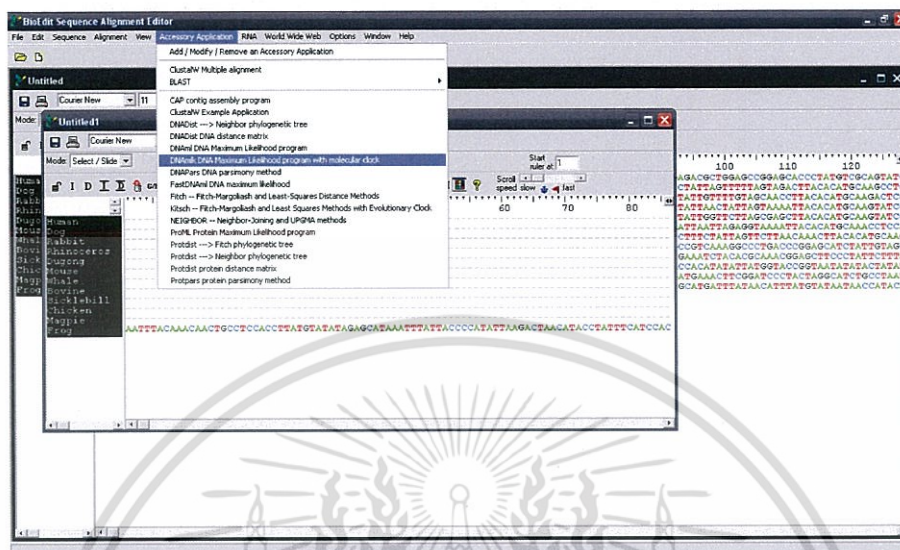


ขั้นตอนที่ 5: หน้าต่างจะเปลี่ยนไป หลังจากนั้น เลือก Accessory application > ClustalW Multiple alignment โดยเลือก Full multiple alignment และกำหนด Number of bootstrap ให้เป็น 1000 จากนั้นกดปุ่มสั่ง “Run ClustalW”



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 6: หลังจากนั้น เลือก Accessory Application>DNAmk DNA Maximum likelihood program with molecular clock จากนั้นกดปุ่ม Run Application โปรแกรมจะขึ้นหน้าต่าง Command ขึ้นมารอจนเสร็จ



ขั้นตอนที่ 7: รอจนโปรแกรมทำงานเสร็จ ให้ออกไฟล์ output นามสกุล dnd ซึ่งจะเป็นไฟล์ของ phylogenetic tree

ขั้นตอนที่ 8: ปรับแต่งแก้ไขชื่อ taxa (หากต้องการ) จากนั้นสร้างเป็นชื่อไฟล์ใหม่นามสกุล txt เพื่อเปิดดู แผนภูมิต้นไม้ในโปรแกรม treeview (ดาวน์โหลดที่ <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>)

3.14 วิธีการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

หลังจากวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังวิธีข้อ 3.13 แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR Purification kit โดยเติม บัฟเฟอร์ FADF 250 ไมโครลิตร ลงในผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิดเตาสารละลายทั้งหมดลงคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้าง column ด้วย wash buffer (ethanol added) 750 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวทิ้งและปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าที่ 18,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้น ย้าย column ลงในหลอดใหม่ ปิดเตา Elution Buffer หรือ น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ FADF ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 18,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.15 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืด

นำสาหร่ายโตไวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืดมาทำการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เริ่มต้นประมาณ 0.1 แล้วนำไปเลี้ยงที่ตู้เลี้ยงเชื้อ (Illumination orbital shaker) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ โดย นำสาหร่ายที่ทำการเลี้ยง 24 ชั่วโมง มาใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) ยี่ห้อ Thermo-Scientific รุ่น Heraeus-Megafuge 8R เมื่อพบว่าเซลล์สาหร่ายตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดแล้ว เทส่วนใสทิ้ง ให้เหลือเซลล์สาหร่ายอยู่ประมาณ 5 – 10 มิลลิลิตร จากนั้น ใช้ไมโครปิเปตดูดเซลล์สาหร่ายมา 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร (เจือจาง 100 เท่า) ใส่หลอด eppendorf นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และนำมาคำนวณหาปริมาณของตัวอย่างสาหร่ายที่จะต้องปิเปตใส่ลงใน TAP broth ที่มีค่าความขุ่นเริ่มต้นที่ประมาณ 0.2 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ส่วนที่เหลือนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรอีกครั้งเพื่อนำไปคำนวณ จากนั้น ปิดจุกแดงและฝาลูมิเนียม นำไปพ่นอาร์กอน 5 นาที และนำไปปั่นในตู้เลี้ยงเชื้อ 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปฉีด Gas chromatography Thermal conductivity detector (GC-TCD) โดยตั้งค่าอุณหภูมิภายในเครื่อง ดังตารางที่ 3.5 และสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนดังตารางที่ 3.7 เมื่อฉีดเสร็จแล้วทำการปิดเครื่องโดยตั้งอุณหภูมิ ดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.5 การตั้งค่าอุณหภูมิภายในเครื่อง Gas Chromatography Thermal Conductivity Detector (GC-TCD) ก่อนฉีด

ตั้งค่า	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
Oven temperature	50.0
INJECT temperature A	100.0
INJECT temperature B	100.0
DETFECTOR A temperature	120.0
DETFECTOR B temperature	50.0

ตารางที่ 3.6 การตั้งค่าอุณหภูมิภายในเครื่อง Gas Chromatography Thermal Conductivity Detector (GC-TCD) หลังฉีด

ตั้งค่า	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
Oven temperature	35.0
INJECT temperature A	50.0
INJECT temperature B	50.0
DETACTOR A temperature	50.0
DETACTOR B temperature	50.0

ตารางที่ 3.7 สภาพที่ใช้ในการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatography Thermal Conductivity Detector (GC-TCD)

Parameter	Condition System
Carrier gas	Argon flow rate 20 มิลลิลิตร/นาที (99.999% purity)
Temperature Program	Inject temperature : 100 องศาเซลเซียส Column temperature : 50 องศาเซลเซียส Detector temperature : 100 องศาเซลเซียส
Column	Molecular sieve 13X ,Pack column
Detector	Thermal conductivity detector (TCD)

3.16 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันความเข้มข้น

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มี TAP broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เริ่มต้นที่ประมาณ 0.1 แล้วนำไปเลี้ยงที่ตู้เลี้ยงเชื้อ (Illumination orbital shaker) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ โดยนำสาหร่ายที่ทำการเลี้ยง 24 ชั่วโมง มาใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยง เพื่อให้สาหร่ายตกตะกอนลงไปอยู่ที่ก้นหลอดเซนตริฟิวจ์ โดยจะทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อ นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) เมื่อพบว่าเซลล์สาหร่ายตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง ให้เหลือเซลล์สาหร่ายอยู่ประมาณ 5 – 10 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดเซลล์สาหร่ายมา 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร (เจือจาง 100 เท่า) ใส่หลอด eppendorf นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และนำมาคำนวณหาปริมาณของตัวอย่างสาหร่ายที่จะต้องปิเปตใส่ลงใน TAP broth โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เริ่มต้นที่ประมาณ 0.2 จากนั้นปิดจุกแดงและฝาอลูมิเนียม นำไปปั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการค้นคว้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาร์กอน 5 นาที และนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 11 ชั่วโมง โดยแปรผันความเข้มข้นในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 และ 3000 ลักซ์ เพื่อนำไปฉีด Gas chromatography Thermal conductivity detector (GC-TCD)

3.17 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาล

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว KS03 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มี TAP broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เริ่มต้นที่ประมาณ 0.1 แล้วนำไปเลี้ยงที่ตู้เลี้ยงเชื้อ (Illumination orbital shaker) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ โดยนำสาหร่ายที่ทำการเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง มาใส่หลอดเซนทริฟิวจ์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) เมื่อพบว่าเซลล์สาหร่ายตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้งให้เหลือเซลล์สาหร่ายอยู่ประมาณ 5 – 10 มิลลิลิตร จากนั้น ใช้ไมโครปิเปตดูดเซลล์สาหร่ายมา 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร (เจือจาง 100 เท่า) ใส่หลอด eppendorf นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาปริมาตรของเซลล์สาหร่ายที่จะต้องปิเปตใส่ลงใน TAP broth โดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เริ่มต้นที่ประมาณ 0.2 และแบ่งใส่หลอดเซนทริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วโดยใส่ TAP ที่ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลโรโบส น้ำตาลแลคโตส และน้ำตาลซูโครสที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครลิตร (ภาคผนวก 4 : ตัวอย่างการคำนวณน้ำตาล) ทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและปิเปตใส่ vial ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นปิดจุกแดงและฝาอลูมิเนียม นำไปบ่มอาร์กอน 5 นาที และนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อ 9 ชั่วโมง (ครั้งที่ 1) และ 12 ชั่วโมง (ครั้งที่ 2) เพื่อนำไปฉีด Gas chromatography Thermal conductivity detector (GC-TCD)

3.18 วิธีการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวโดยแปรผันตามความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มี TAP broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เริ่มต้นที่ประมาณ 0.1 แล้วนำไปเลี้ยงที่ตู้เลี้ยงเชื้อ (Illumination orbital shaker) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ โดยนำสาหร่ายที่ทำการเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง มาใส่หลอดเซนทริฟิวจ์ แล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) เมื่อพบว่าเซลล์สาหร่ายตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดแล้ว เทส่วนใสทิ้ง ให้เหลือเซลล์สาหร่ายอยู่ประมาณ 5 – 10 มิลลิลิตร จากนั้น ใช้ไมโครปิเปตดูดเซลล์สาหร่ายมา 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร (เจือจาง 100 เท่า) ใส่หลอด eppendorf นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาตรของเซลล์สาหร่ายที่จะต้องปิเปตใส่ลงใน TAP broth โดยให้มีค่าความขุ่นของเซลล์สาหร่ายที่ประมาณ 0.2 และแบ่งใส่หลอดเซนทริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วโดยใส่ TAP ที่ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่น้ำตาลที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ได้แก่ น้ำตาลไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคส น้ำตาลโรโบส น้ำตาลแลคโตส และ น้ำตาลซูโครส ที่ 10 มิลลิโมลาร์ ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 50 มิลลิลิตร และปิเปตใส่ vial ที่ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นปิดจุกแดงและฝาลูมิเนียม นำไปฟอนอาร์กอน 15 - 20 นาที และนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เพื่อนำไปฉีด Gas Chromatography Thermal Conductivity Detector (GC-TCD) อย่างต่อเนื่องทุกๆ 6 ชั่วโมง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำจืดในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำแบบสุ่มจากแหล่งน้ำจืดที่มีลักษณะสีเขียวของสาหร่ายเจริญเติบโตอยู่ในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทั้งสิ้น 6 แหล่งน้ำ ได้แก่ แหล่งน้ำบริเวณคณะเกษตรศาสตร์ (KS) แหล่งน้ำบริเวณคณะวิทยาศาสตร์ (VY) แหล่งน้ำบริเวณหน้าคณะครุศาสตร์ (KR) แหล่งน้ำบริเวณคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ (TP) แหล่งน้ำบริเวณตึกพระเทพ (PT) และแหล่งน้ำบริเวณคณะวิศวกรรมศาสตร์ (VV) ในระหว่างเดือนสิงหาคม ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 โดยใช้กระบวย (dipper) ปั่นกวนน้ำให้มีรัศมีการปั่นกวน 0.5 – 1 เมตร จำนวน 5 รอบ ทำการตักน้ำจากแหล่งน้ำใส่หลอดเซนต์ปีศาจขนาด 50 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.1) จากนั้น นำน้ำตัวอย่างมาทำการเพาะเชื้อสาหร่ายในจานเลี้ยงเชื้อที่มี TAP Agar เป็นเวลา 1 อาทิตย์ พบว่า สามารถแยกสาหร่ายสีเขียวได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลท จากแหล่งน้ำทั้งหมด 5 บริเวณ โดยสาหร่ายสีเขียวที่แยกได้มาจาก บ่อน้ำบริเวณคณะเกษตรศาสตร์ 3 ไอโซเลท (KS01, KS02, KS03) คณะวิทยาศาสตร์ 2 ไอโซเลท (VY01, VY02) คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ (TP01, TP02) คณะวิศวกรรมศาสตร์ (VV01, VV02) และคณะครุศาสตร์ (KR01, KR02) และ ตึกพระเทพ (PT) ไม่มีสาหร่ายขึ้น เนื่องจากว่า บ่อน้ำที่ไปเก็บตัวอย่างมีการเปลี่ยนน้ำใหม่ทำให้มีปริมาณของเซลล์สาหร่ายน้อยจนตรวจไม่พบ หรืออาจจะมีสาหร่ายอยู่จริงแต่โตช้ามากจึงยากต่อการสังเกตเห็นเซลล์สาหร่ายเดี่ยวๆ แสดงในตารางที่ 4.1 จากนั้น นำสาหร่ายที่คัดแยกได้มาศึกษารูปร่างลักษณะของสาหร่ายแต่ละไอโซเลท โดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 11 ไอโซเลท

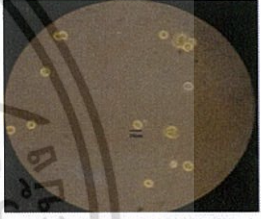
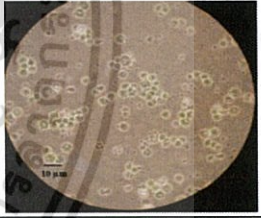
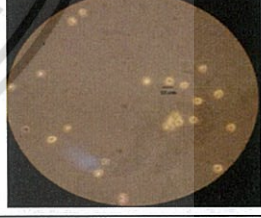
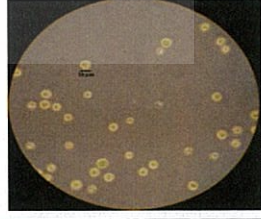
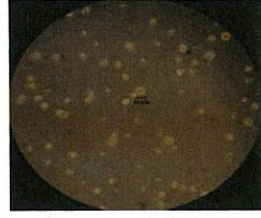
ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลทของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำบริเวณต่างๆ

แหล่งน้ำ	code	จำนวนของสาหร่ายสีเขียว (ไอโซเลท)
คณะเกษตรศาสตร์	KS	3
คณะวิทยาศาสตร์	VY	2
คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์	TP	2
คณะวิศวกรรมศาสตร์	VV	2
คณะครุศาสตร์	KR	2
ตึกพระเทพ	PT	0



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำจืดในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 4.2 รูปร่างและลักษณะของสาหร่าย ไอโซเลท ต่างๆที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืดบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (กำลังขยาย 1,000x)

ไอโซเลท	บริเวณเก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	ภาพถ่าย
KS01	บริเวณสระน้ำหลัง ตึกเทคโนโลยีเกษตร	เซลล์กลม เดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระ	
KS02	บริเวณสระน้ำหลัง ตึกเทคโนโลยีเกษตร	เซลล์กลม เดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระ	
KS03	บริเวณสระน้ำหลัง ตึกเทคโนโลยีเกษตร	เซลล์กลม เดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระ	
VV01	บริเวณบ่อน้ำพุ คณะวิศวกรรมศาสตร์	เซลล์กลม เดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระ	
VV02	บริเวณบ่อน้ำพุ คณะวิศวกรรมศาสตร์	เซลล์กลม เดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) รูปร่างและลักษณะของสาหร่ายไอโซเลทต่างๆที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (กำลังขยาย 1,000x)

ไอโซเลท	บริเวณเก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	ภาพถ่าย
KR01	บริเวณบ่อน้ำหน้า คณะครุศาสตร์	เซลล์กลม เดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระ	
KR02	บริเวณบ่อน้ำหน้า คณะครุศาสตร์	เซลล์กลม เดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระ	
TP01	บริเวณบ่อน้ำใน คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์	เซลล์กลม เดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระ	
TP02	บริเวณบ่อน้ำใน คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์	เซลล์กลมเดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระ	
VY01	บริเวณบ่อน้ำหน้าอาคาร อุตสาหกรรมเคมี และ พอลิเมอร์เทคโนโลยี	เซลล์กลม เดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระ	
VY02	บริเวณบ่อน้ำหน้าอาคาร อุตสาหกรรมเคมี และ พอลิเมอร์เทคโนโลยี	เซลล์กลม เดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระ	

นอกจากนี้ นำสาหร่ายทั้ง 11 ไอโซเลท ไปทำการเลี้ยงใน TAP broth พบว่า สาหร่าย KS01, KS02, KS03, VY01, VY02, VV01, VV02 และ KR01 โตใน TAP broth แต่ KR02, TP01 และ TP02 ไม่โตใน TAP broth เป็นเพราะ อาจเกิดจากสาหร่ายโตช้ามาก จึงไม่สนใจเลือกมาทำการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

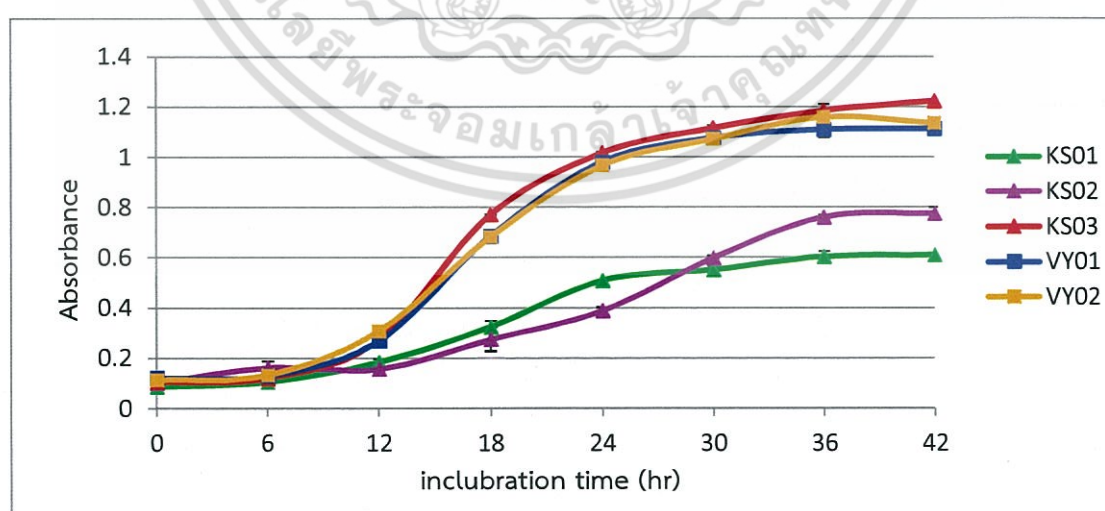
ทดลอง เราจึงเลือกสายรหัสที่โตไวที่สุด มา 5 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ KS01, KS02, KS03, VY01 และ VY02 (ตารางที่ 4.3) เพื่อสะดวกในการทำการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.3 สายรหัสสีเขียวที่มีการเจริญเติบโตไวที่สุดและนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

แหล่งน้ำ	Code	จำนวนของสายรหัสสีเขียว (ไอโซเลท)
เกษตรศาสตร์	KS	3
วิทยาศาสตร์	VY	2

4.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสายรหัสสีเขียวที่คัดเลือกได้จากแหล่งน้ำจืด

นำสายรหัสสีเขียวทั้ง 5 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ KS01, KS02, KS03, VY01 และ VY02 มาทดลองโดยการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสายรหัสสีเขียวแต่ละไอโซเลท โดยเฉพาะเลี้ยงสายรหัสสีเขียวในพลาสติก ขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีอาหาร TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำสารละลายของเซลล์สายรหัสไปบ่มทุกๆ 6 ชั่วโมง ที่สภาวะ 36 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ที่ค่าความขุ่นเริ่มต้นที่ ประมาณ 0.1 เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของสายรหัสสีเขียวแต่ละไอโซเลท พบว่ามีช่วงการเจริญเติบโตในระยะ log phase ที่แตกต่างกัน ซึ่งจากการทดลองพบว่า KS03, VY02 และ VY01 มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว เพราะ สภาวะที่ใช้บ่มมีความเหมาะสมกับการแบ่งเซลล์ ส่วน KS02 และ KS01 มีการเจริญเติบโตน้อยกว่า เนื่องจากว่า เซลล์สายรหัสอาจจะทำงานได้ดีที่สภาวะอื่น ทำให้พบว่าที่สภาวะ 36 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ไม่เหมาะกับเซลล์สายรหัสสีเขียว KS02 และ KS01 (รูปที่ 4.2) ซึ่งจากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นว่าสายรหัสหลายชนิดมีความเจริญเติบโตไม่เท่ากัน (ภัทรระ ทรวงสุรัตน์กุล และคณะ, 2555)

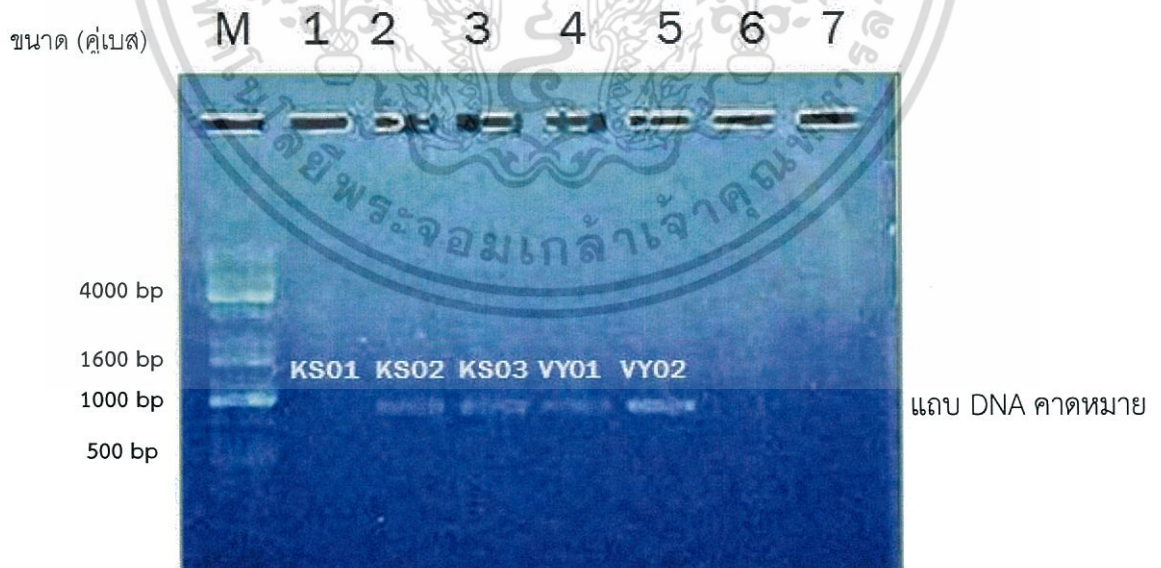


รูปที่ 4.2 อัตราการเจริญเติบโตของสายรหัสสีเขียว KS01, KS02, KS03, VY01 และ VY02 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการเพิ่มปริมาณยีน 18s rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR)

เมื่อเราทราบการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ KS01, KS02, KS03, VY01 และ VY02 นำสาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลท มาทำการเพิ่มปริมาณยีน 18S rDNA โดยมี *Tetraspora* sp. (+) และ Control (-) มาใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ 18SF และ 18SR และใช้อุณหภูมิในการจับตัว (annealing temperature) ที่ 55 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยจะใส่ผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งหมด 7 หลุม (ตารางที่ 3.8) พบว่า แถบ DNA เป้าหมายของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายสีเขียวทั้ง 5 ไอโซเลทขึ้น 4 แถบ ซึ่งได้แก่ KS02, KS03, VY01 และ VY02 จากการส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และเมื่อเปรียบเทียบขนาดผลิตภัณฑ์ PCR กับ DNA มาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 18s rDNA ของสาหร่ายสีเขียว ทั้ง 4 ไอโซเลทมี ขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส (รูปที่ 4.3) ซึ่งใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ คือ 995 คู่เบส จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR Purification kit นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่า แถบ KS01ไม่ขึ้นเนื่องจากว่า เซลล์สาหร่าย KS01 อาจจะน้อยเกิน และตัวเปรียบเทียบ *Tetraspora* sp. (+) และ control (-) ไม่ขึ้น เนื่องจากว่า เซลล์สาหร่ายของ *Tetraspora* sp. (+) แยกเกินไปทำให้ไม่เกิดแถบ และ control (-) เป็นช่องสุดท้ายที่ใส่ ทำให้ตัวอย่าง DNA เหลือน้อย จึงไม่เกิดแถบขึ้น ตารางที่ 4.4 แสดงถึงชื่อตัวอย่างในแต่ละช่อง



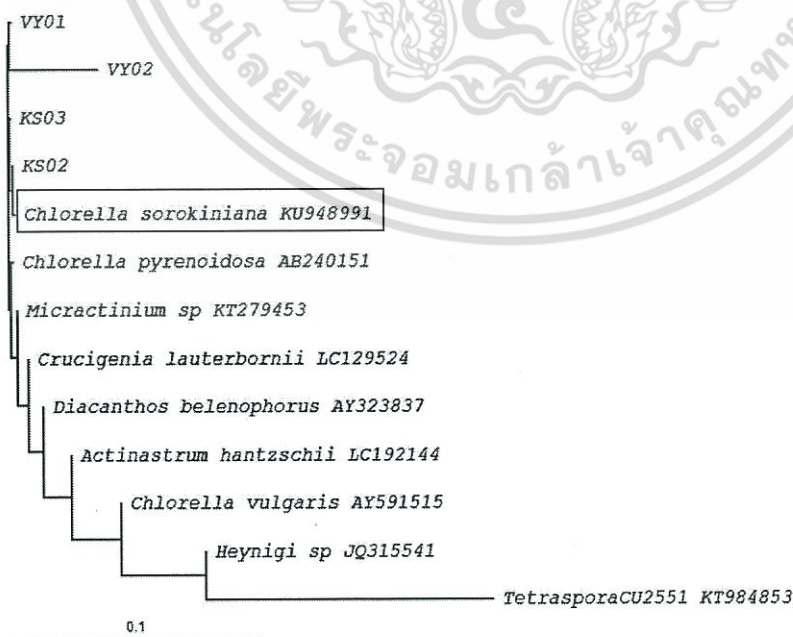
รูปที่ 4.3 Agarose gel ที่ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ช่องของตัวอย่างสาหร่ายในแต่ละไอโซเลทใน Agarose gel ดังแสดงในรูปที่ 4.3

ช่องที่	ตัวอย่างสาหร่าย
M	KAPA Universal Ladder
1	KS01
2	KS02
3	KS03
4	VY01
5	VY02
6	<i>Tetraspora</i> sp. (+)
7	Control (-)

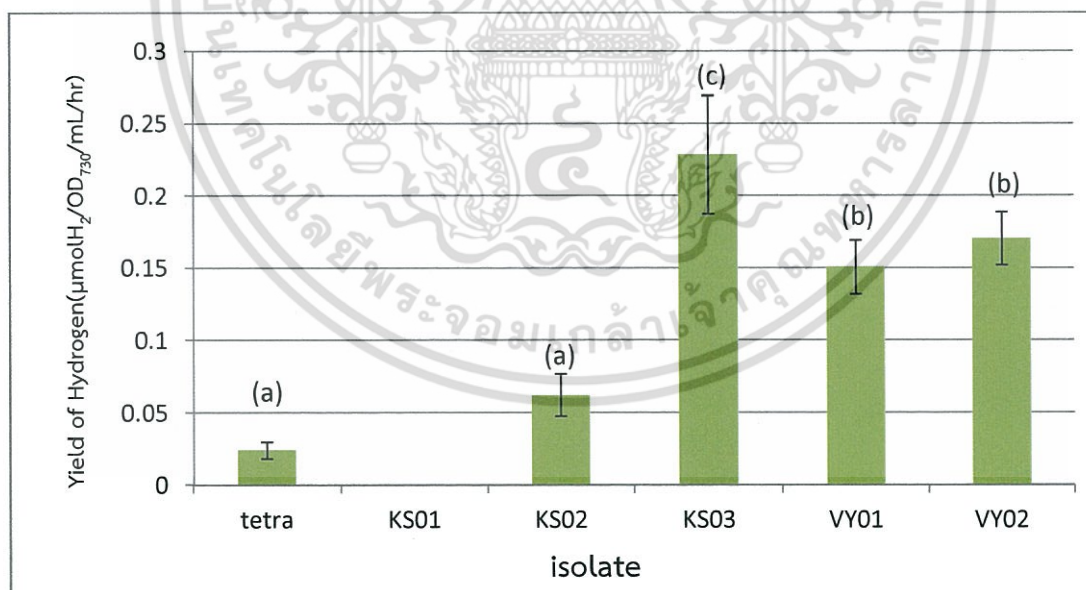
ขึ้นดีเอ็นเอของแต่ละช่อง เมื่อทำบริสุทธิ์แล้วก็ได้ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างได้แสดงไว้ที่ภาคผนวก ข-6 เมื่อได้ลำดับ 18S rDNA มาแล้วก็มาทำ phylogenetic tree โดยเริ่มจากการ alignment ตามด้วย Bootstrap NJ โดยกำหนดรอบของการทำ Bootstrap เป็น 1,000 รอบ จากนั้นพบว่า ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.4 พบว่าสาหร่ายสีเขียว VY01 และ VY02 อยู่บน clade เดียวกัน มีความเป็นไปได้ว่าสาหร่ายจากบ่อเดียวกัน (คณะวิศวกรรมศาสตร์) น่าจะมีความใกล้เคียงกัน ในขณะที่สาหร่าย KS02 มีความใกล้เคียงกับ KS03 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับสาหร่าย *Chlorella sorokiniana* ดังที่อยู่บน clade เดียวกัน จึงคาดว่าสาหร่ายทั้งสองชนิดนี้มีความเป็นไปได้ที่จะอยู่ในวงศ์ *Chlorella* sp. ส่วนสาหร่ายที่เหลือถูกจัดอยู่บน clade เดียวกัน โดยเฉพาะ *Tetraspora* sp. ที่มีระยะทางวิวัฒนาการห่างออกจากสาหร่ายชนิดอื่นๆ ตัวเลขรหัสที่อยู่ท้ายชื่อวิทยาศาสตร์แต่ละชื่อคือรหัส accession number อ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI



รูปที่ 4.4 Bootstrap NJ phylogenetic tree ของยีน 18s จากสาหร่าย KS02, KS03, VY01, และ VY02 เทียบกับยีน 18s ของสาหร่ายอื่นๆ อีก 9 สายพันธุ์ ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืด

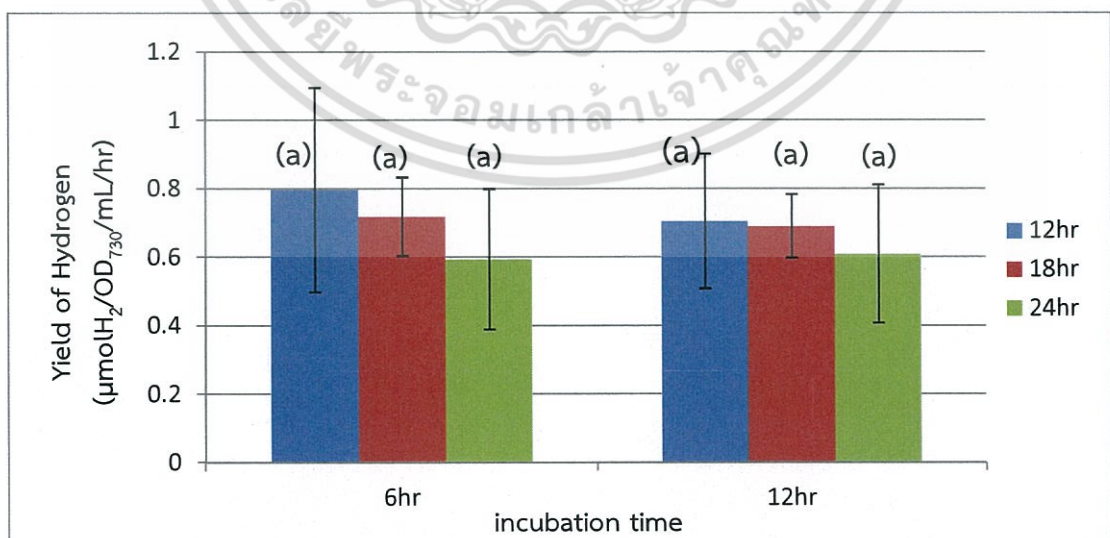
นำสาหร่ายสีเขียวที่คัดแยกได้ทั้ง 5 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ KS01, KS02, KS03, VY01 และ VY02 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์พร้อมกับทำการปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรที่ประมาณ 0.2 จากนั้น ถ่ายน้ำสาหร่ายลง vial ปิดฝาด้วยจุกยาง และปิดด้วยฝาอะลูมิเนียม เป่าด้วยอาร์กอนเป็นเวลา 5 นาที จากนั้น นำไปบ่มเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ และนำไปวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง gas chromatography thermal conductivity detector (GC-TCD) ดังนั้น จะพบว่าสาหร่ายสีเขียว KS03 ผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด เท่ากับ 0.23 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่น 730 นาโนเมตรต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง โดยผลิตได้มากกว่า *Tetraspora* sp., KS02, VY01 และ VY02 ซึ่งผลิตไฮโดรเจนได้ 0.02, 0.06, 0.15 และ 0.17 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่น 730 นาโนเมตรต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้น จะเห็นได้ว่า สาหร่าย KS03, VY02 และ VY01 มีค่าการผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สภาวะนี้ ทำให้เซลล์สาหร่ายทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ ส่วนสาหร่ายสีเขียว KS01 ไม่พบการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากว่า เซลล์ของสาหร่าย KS01 อาจจะไม่เจริญเติบโตที่สภาวะ 36 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ทำให้เซลล์สาหร่ายทำงานได้ไม่เต็มที่ (รูปที่ 4.5) ดังนั้น เราจึงเลือกสาหร่ายสีเขียว KS03 มาทำการทดลองต่อไป เนื่องจาก มีค่าการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด ซึ่งผลการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นว่าสาหร่ายมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้ไม่เท่ากัน (Maneeruttanarungroj, Lindblad and Aran Incharoensakdi, 2010)



รูปที่ 4.5 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS01, KS02, KS03, VY01 และ VY02 โดยมี *Tetraspora* sp. เป็น control (+)

4.5 ผลการศึกษาอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว KS03 ในพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 เลี้ยงไว้ในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง 18 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์พร้อมกับทำการปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรที่ประมาณ 0.2 จากนั้น ถ่ายน้ำสาหร่ายลง vial ปิดฝาด้วยจุกยาง และปิดด้วยฝาอะลูมิเนียม เป่าด้วยอาร์กอนเป็นเวลา 5 นาที จากนั้น นำไปบ่มเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรือ 12 ชั่วโมง และวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง gas chromatography thermal conductivity detector (GC-TCD) ดังนั้น จะพบว่าสาหร่ายสีเขียว KS03 ที่อายุเซลล์ 12 ชั่วโมง 18 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมงที่ใช้เวลาในการบ่มเซลล์ 6 ชั่วโมง สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 0.80, 0.72 และ 0.59 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่น 730 นาโนเมตรต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเวลาในการบ่มเซลล์ 12 ชั่วโมง สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 0.70, 0.69 และ 0.61 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่น 730 นาโนเมตรต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมงซึ่งจะสังเกตเห็นได้ว่าค่าการผลิตไฮโดรเจนในช่วงเวลาการบ่มเซลล์ที่ 6 ชั่วโมงและ 12 ชั่วโมงมีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 0.59 – 0.80 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่น 730 นาโนเมตรต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจากผลการทดลองของอายุเซลล์ที่เท่ากันนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ช่วงเวลาบ่มเซลล์จะให้ผลผลิตไฮโดรเจนไม่แตกต่างกัน (Maswana, Phunpruch and Maneeruttanarungroj, 2017) จากการวิเคราะห์ทางสถิติ (IBM SPSS statistics version 23, Dancan) พบว่ามีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยพิจารณาจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอายุเซลล์ต่อการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม (a) เหมือนกัน (รูปที่ 4.6) ดังนั้น จะพบว่าอายุเซลล์ของสาหร่ายสีเขียว KS03 ในช่วง 12, 18 และ 24 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนไม่แตกต่างกัน และพบว่าเวลาการบ่มของสาหร่ายสีเขียว KS03 ในช่วง 6 ถึง 12 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนไม่แตกต่างกัน เช่นกัน

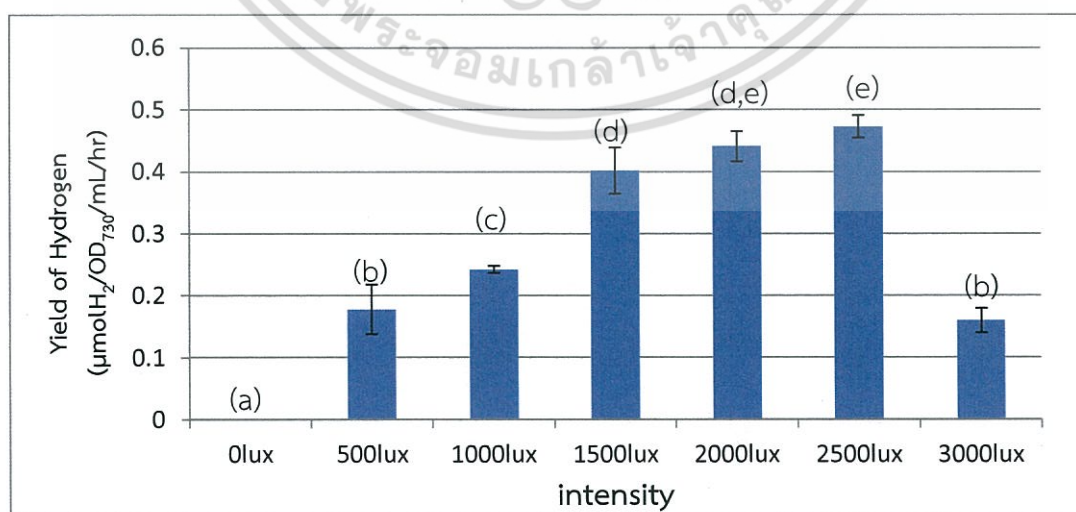


รูปที่ 4.6 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 กับ อายุเซลล์ที่ 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ที่เวลาบ่มเซลล์ 6 และ 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มแสง

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว KS03 ในพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรเริ่มต้นประมาณ 0.1 เลี้ยงไว้ในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์พร้อมกับทำการปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรที่ประมาณ 0.2 จากนั้น ถ่ายน้ำสาหร่ายลง vial ปิดฝาด้วยจุกยาง และปิดด้วยฝาอะลูมิเนียม เป่าด้วยอาร์กอนเป็นเวลา 5 นาที จากนั้น นำไปบ่มเซลล์เป็นเวลา 11 ชั่วโมง ภายใต้ความเข้มแสงที่ 0, 500, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500 และ 3,000 ลักซ์ และนำวิเคราะห์การผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง gas chromatography thermal conductivity detector (GC-TCD) ดังนั้น จะพบว่าสาหร่ายสีเขียว KS03 มีค่าการผลิตไฮโดรเจนได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว KS03 ที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ โดยผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดถึง 0.47 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่น 730 นาโนเมตรต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง เนื่องจากว่า เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของเซลล์สาหร่าย KS03 ซึ่งมีค่าการผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 500, 1,000, 1,500, 2,000 และ 3,000 ลักซ์ ซึ่งสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ 0.18, 0.24, 0.40, 0.44, 0.47 และ 0.16 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่น 730 นาโนเมตรต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งจะสังเกตได้ว่าที่ 3,000 ลักซ์ มีค่าการผลิตไฮโดรเจนน้อยลงอย่างมาก เนื่องจากว่า เซลล์สาหร่าย KS03 ที่ 3,000 ลักซ์ นั้นได้รับแสงมากเกินไปทำให้มีออกซิเจนมาก ออกซิเจนนี้เองจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไฮโดรเจน ดังนั้น เซลล์สาหร่ายที่บ่มภายใต้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ จึงมีค่าการผลิตไฮโดรเจนที่น้อยลง นอกจากนี้ ที่ภายใต้ความเข้มแสง 0 ลักซ์ ไม่มีแสงไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงทำให้ไม่พบการผลิตไฮโดรเจน (รูปที่ 4.7) ซึ่งจากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่พบว่า เมื่อให้แสงที่มากขึ้นจะทำให้ สาหร่ายสามารถผลิตไฮโดรเจนได้มากขึ้น (เชิดศักดิ์, 2554) และจากการวิเคราะห์ทางสถิติ (IBM SPSS statistics version 23, Dancan) พบว่าค่าการผลิตไฮโดรเจนที่ 2,500 ลักซ์ ซึ่งอยู่ในกลุ่ม (e) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 2,000 ลักซ์ ซึ่งอยู่ในกลุ่ม (d,e) แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 0, 500, 1,000, 2,500 และ 3,000 ลักซ์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ซึ่งอยู่ในกลุ่ม (a), (b), (c) และ (d) ดังนั้น เราจึงเลือกที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ไปทำการทดลองต่อไป

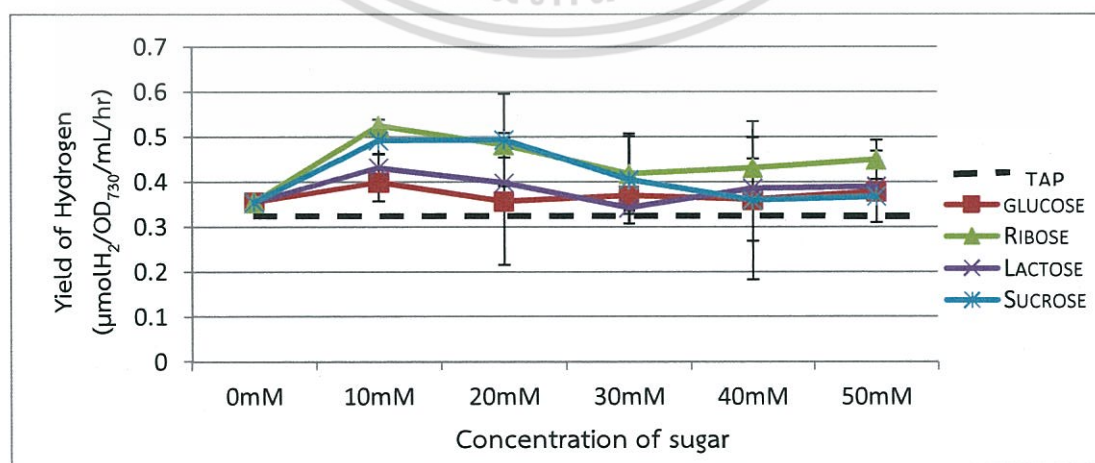


รูปที่ 4.7 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มแสงที่ 0 ถึง 3,000 ลักซ์

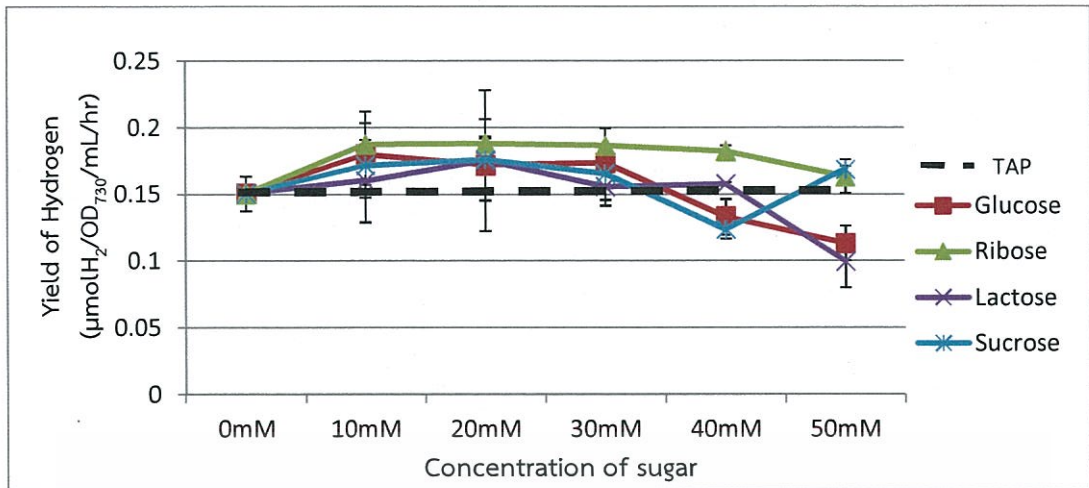
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำตาล

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว KS03 ในพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เริ่มต้นที่ประมาณ 0.1 เลี้ยงไว้ในตู้ปัมเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทำการปั่นเก็บเซลล์ โดยแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำตาล 4 ชนิดที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ได้แก่ กลูโคส ซูโครส แลคโตส และ ไรโบส ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เริ่มต้นที่ประมาณ 0.2 และนำไปปัมเซลล์เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ของการทดลองการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลครั้งที่ 1 และ 12 ชั่วโมงของการทดลองการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลครั้งที่ 2 โดยการทดลองการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลนี้จะทำการทดลอง 2 ครั้ง เพื่อเปรียบเทียบผลของการทดลองครั้งที่ 1 (รูปที่ 4.8) และ การทดลองครั้งที่ 2 (รูปที่ 4.9) และ นำไปวัดค่าการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatography Thermal Conductivity Detector (GC-TCD) จากการทดลองการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลครั้งที่ 1 พบว่า สาหร่ายสีเขียว KS03 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดของน้ำตาลไรโบส ซูโครส แลคโตส และ กลูโคสที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.52, 0.50, 0.43 และ 0.40 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่น 730 นาโนเมตรต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้น น้ำตาลไรโบสมีการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ น้ำตาลกลูโคสมีการผลิตไฮโดรเจนต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ในรูปที่ 4.8 และ จากการทดลองการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลครั้งที่ 2 พบว่า สาหร่ายสีเขียว KS03 มีการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุดของน้ำตาลไรโบส กลูโคส ซูโครส และแลคโตส ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์, 10 มิลลิโมลาร์, 20 มิลลิโมลาร์ และ 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 0.20, 0.18, 0.17 และ 0.17 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อค่าความขุ่น 730 นาโนเมตรต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดลองทั้ง 2 ครั้ง พบว่าน้ำตาลไรโบสมีการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด เมื่อเทียบกับน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดซึ่งแสดงในรูปที่ 4.8 และ 4.9 ดังนั้น จากกราฟการทดลองการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 พบว่าน้ำตาลไรโบส มีการผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และแลคโตส และพบว่า น้ำตาลทั้ง 4 ชนิด ผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นจึงเลือก น้ำตาลกลูโคส ซูโครส แลคโตส และไรโบส ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ไปทำการทดลองต่อไป



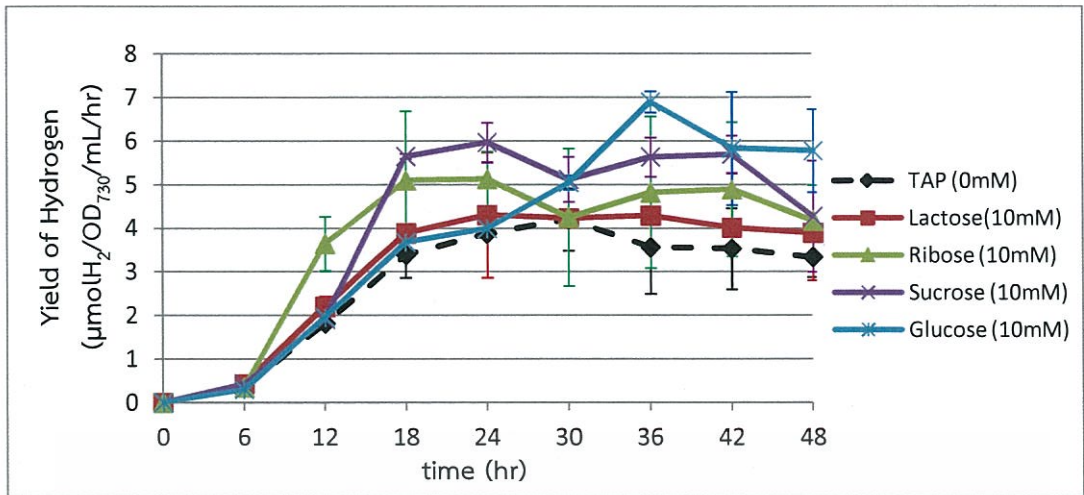
รูปที่ 4.8 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไรโบส น้ำตาลแลคโตส และน้ำตาลซูโครส (ครั้งที่ 1) ระโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไรโบส น้ำตาลแลคโตส และ น้ำตาลซูโครส (ครั้งที่ 2)

4.8 ผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มข้นต่างๆ ของน้ำตาลภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว KS03 ในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TAP ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เริ่มต้นที่ประมาณ 0.1 เลี้ยงไว้ในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทำการปั่นเก็บเซลล์ โดยแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไรโบส น้ำตาลแลคโตส และ น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เริ่มต้นที่ประมาณ 0.2 นำไปบ่มเซลล์ทุกๆ 6 ชั่วโมง และนำไปวัดค่าการผลิตไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatography Thermal Conductivity Detector (GC-TCD) และพบว่า ช่วงเวลาการบ่มที่ 6 ถึง 12 ชั่วโมง ไรโบสมีค่าการผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด และในช่วงเวลาการบ่ม 18 ชั่วโมง พบว่า ซูโครสให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด และจะผลิตไฮโดรเจนน้อยลงในช่วง 30 ชั่วโมงขึ้นไปซึ่งซูโครสให้ค่าการผลิตไฮโดรเจนมากกว่า TAP 58.90% และไรโบสให้ค่าการผลิตไฮโดรเจนมากกว่า TAP 49.85% แต่ในทางทฤษฎี น้ำตาล C5 ซึ่งได้แก่ ไรโบส และ จะต้องเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาล C6 ก่อนที่จะสลายได้พลังงาน ATP ผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส, Kreb's cycle และ Electron Transpot Chain (ETC) แต่น้ำตาล C6 ซึ่งได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลแลคโตส สามารถสลายได้พลังงาน ATP โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการแบบ น้ำตาล C5 ซึ่งหมายความว่า ในความเป็นจริงแล้ว น้ำตาล C6 สลายตัวได้ไวกว่าน้ำตาล C5 แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองไม่เป็นไปตามข้อสันนิษฐานเนื่องจากในความเป็นจริงสาหร่าย KS03 มีระบบมีซับซอนมากกว่านี้ ดังนั้น คำอธิบายที่แน่ชัดยังไม่สามารถระบุได้ อย่างไรก็ตามผลการทดลองทำให้เห็นว่ากลูโคสส่งผลเชิงลบต่อการผลิตไฮโดรเจนซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น (Rashid, Choi and Lee, 2012)



รูปที่ 4.10 การผลิตไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียว KS03 โดยแปรผันตามความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาล กลูโคส น้ำตาลไรโบส น้ำตาลแลคโตส และ น้ำตาลซูโครสภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. จากผลการทดลองการคัดแยกสาหร่ายในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเพื่อการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ โดยทำการทดลองการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำจืดในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในอาหาร TAP agar พบว่า ได้สาหร่าย 11 ไอโซเลท จากแหล่งน้ำเกษตรศาสตร์จำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ KS01, KS02, KS03 แหล่งน้ำวิทยาศาสตร์จำนวน 2 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ VY01, VY02 แหล่งน้ำวิศวกรรมศาสตร์จำนวน 2 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ VV01, VV02 แหล่งน้ำสถาปัตยกรรมศาสตร์จำนวน 2 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ TP01, TP02 และ แหล่งน้ำครุศาสตร์จำนวน 2 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ KR01, KR02 จากนั้นนำมาศึกษารูปร่างลักษณะของสาหร่ายโดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ขนาด 1,000x พบว่า สาหร่ายที่พบมีลักษณะกลม เดี่ยว อยู่กันอย่างอิสระ

2. เมื่อศึกษารูปร่างลักษณะของสาหร่ายแล้วนำไปเลี้ยงใน TAP broth พบว่า สาหร่ายสีเขียวจากแหล่งน้ำวิศวกรรมศาสตร์ แหล่งน้ำสถาปัตยกรรมศาสตร์ และ แหล่งน้ำครุศาสตร์ โตช้ามาก จึงไม่นำมาทำการทดลองต่อ แต่เลือกสาหร่ายจากแหล่งน้ำเกษตรศาสตร์ และ แหล่งน้ำจากวิทยาศาสตร์ มาทำการทดลองเนื่องจากสาหร่ายโตไว และสะดวกต่อการใช้งาน ดังนั้น จึงเหลือสาหร่ายที่ทำการทดลองต่อไป 5 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ KS01, KS02, KS03, VY01 และ VY02

3. นำสาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ KS01, KS02, KS03, VY01 และ VY02 มาทำการศึกษากิจกรรมเติบโตของสาหร่ายพบว่า KS03 มีการเจริญเติบโตได้เร็วที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายตัวอื่น จากนั้น นำสาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลท ไปทำการวัดผลการผลิตไฮโดรเจนพบว่า KS03 ผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุด

4. นำสาหร่ายทั้ง 5 ไอโซเลทมาหาลำดับยีน 18s rDNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction : PCR จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR นำมา Run gel ด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า ขึ้นแถบ DNA 4 แถบของ KS02, KS03, VY01 และ VY02 แต่ KS01 ไม่ขึ้น แถบ DNA และ ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR Purification kit นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ส่ง sequence จากนั้น นำลำดับ 18S rDNA มาทำ Bootstrap NJ phylogenetic tree พบว่า สาหร่าย KS02, KS03, VY02 และ VY01 มีความใกล้เคียงกับสาหร่ายชนิด "*Chlorella sorokiniana* KU948991"

5. นำสาหร่ายสีเขียว KS03 มาศึกษาอายุเซลล์พบว่า อายุเซลล์ของสาหร่าย KS03 ที่อยู่ในช่วง log phase พบว่าอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติ (IBM SPSS statistics version 23, Duncan) พบว่า ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงสามารถเลือกเวลาในการบ่มเซลล์ในช่วงที่ 6 ถึง 12 ชั่วโมงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. นำสาหร่ายสีเขียว KS03 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยการแปรผันตามความเข้มแสงที่ 0, 500, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500 และ 3,000 ลักซ์ พบว่า สาหร่ายสีเขียว KS03 ผลิตไฮโดรเจนได้ดีที่สุดที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ และศึกษาการแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำตาล 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ กลูโคส ซูโครส แลคโตส และ ไรโบส ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งจะมีผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

7. นำสาหร่ายสีเขียว KS03 มาศึกษาการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องที่สภาวะที่เหมาะสมของความเข้มแสง และความเข้มข้นน้ำตาล พบว่า ช่วงเวลาการบ่มที่ 6 ถึง 12 ชั่วโมง ไรโบสมีค่าการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด และช่วงเวลาการบ่มที่ 18 ชั่วโมง ซูโครสให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดสอบสาหร่าย KS03 เปรียบเทียบอัตราการผลิตไฮโดรเจนกับหน่วยงานอื่น โดยสกัด chlorophyll ออก ด้วยสารละลาย methanol เพื่อดูแนวโน้มของการสกัดคลอโรฟิลล์
2. ควรมีห้องปฏิบัติการที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยตรง เพื่อให้เซลล์สาหร่ายมีความปลอดภัยมากที่สุด ซึ่งจะส่งผลให้ผลการทดลองมีความแม่นยำมากขึ้น
3. ควรกำหนดความลึกของบ่อ ความขุ่นของน้ำที่เก็บ อุณหภูมิขณะเก็บ ช่วงเวลาในการเก็บ ความถี่ และจำนวนครั้งในการเก็บตัวอย่างน้ำ เพราะสาหร่ายบางชนิดเจริญเติบโตในช่วงความลึกเวลาในการเก็บและอุณหภูมิที่ต่างกัน จึงทำให้การคัดแยกสาหร่ายที่ได้เซลล์ของสาหร่ายที่มีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน (ไพฑูริย์ หมายถึงมันสมสุข. 2553; สำนักวิเคราะห์ผลกระทบสิ่งแวดล้อม. 2551)
4. ควรเก็บตัวอย่างน้ำจากสถานที่ต่างๆภายในสถาบันให้มากขึ้นเพื่อให้ครอบคลุมทั้งสถาบัน
5. ควรเพิ่มไอโซเลทของสาหร่ายให้มากกว่าเดิมเพื่อให้สาหร่ายมีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น
6. ควรนำสาหร่าย KS03 มาจำแนก ชื่อเพื่อให้ทราบ species ที่แน่ชัด
7. ควรออกแบบการทดลองการเลี้ยงสาหร่ายแบบใช้แสงอาทิตย์แล้วนำมาเปรียบเทียบกับการเลี้ยงสาหร่ายแบบใช้แสงฟลูออเรสเซนต์เพื่อดูผลการผลิตไฮโดรเจน และควรออกแบบการเลี้ยงสาหร่ายแบบไม่ใช้แสง และนำมาเปรียบเทียบกับการเลี้ยงสาหร่ายแบบใช้แสงเพื่อดูปริมาณการผลิตไฮโดรเจนที่ได้
8. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเซลล์สาหร่าย KS01 และ KS02 เพื่อให้แบ่งเซลล์ได้
9. ติดตามการอธิบาย Ribose มากกว่า Sucrose

เอกสารอ้างอิง

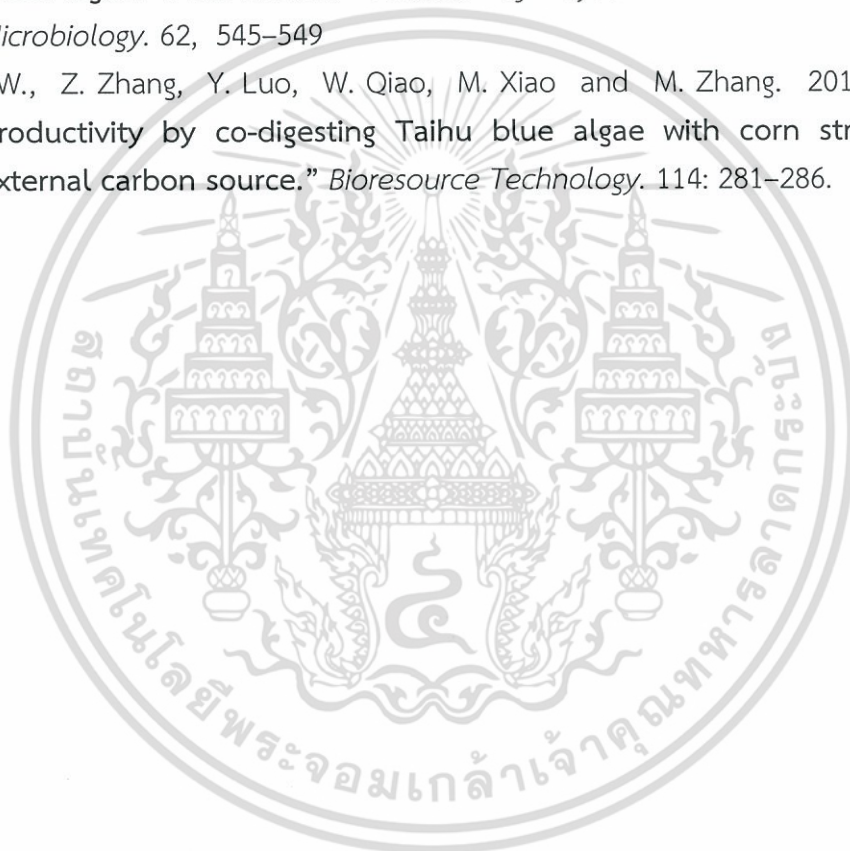
- กรมพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2557. การผลิตไฮโดรเจน. [Online]. Available: <http://ienergyguru.com/2015/07/hydrogen-production>.
- กฤษณา แซ่เฮ้ง. 2554. พลังงานไฮโดรเจน แรงขับเคลื่อนใหม่ที่ใช้น้ำมันและก๊าซธรรมชาติ. [Online]. Available: <http://www.manager.co.th/daily/ViewNews.aspx?NewsID=9540000077925>.
- ขจรเกียรติ ศรีนวลสม. 2550. บทปฏิบัติการที่1 การเตรียมอาหารสำหรับการเลี้ยงสาหร่าย. [Online]. Available: <http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/files/TUjI3IXThu25949.pdf>
- ขจรเกียรติ ศรีนวลสม. 2550. บทปฏิบัติการที่2 เทคนิคการคัดแยกเชื้อสาหร่ายและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์. [Online]. Available: <http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/files/BOXCL6LThu25957.pdf>
- ขจรเกียรติ ศรีนวลสม. 2550. บทปฏิบัติการที่3 การวัดมวลชีวภาพและการเจริญเติบโตของสาหร่าย. [Online]. Available: <http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/files/TmBcVklThu30003.pdf>
- ขจรเกียรติ ศรีนวลสม. 2550. บทปฏิบัติการที่4 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก. [Online]. Available: <http://www.fishtech.mju.ac.th/FishNew1/OSS/files/LKJ6JYXThu30027.pdf>
- จินดาพร บุญญวัฒนา. 2555. UV-Visible spectrophotometer. [Online]. Available: <http://web2.mfu.ac.th/center/stic/spectroscopy-chem-analysis-instrument/item/140-uv-visible-spectrophotometer.html>
- จินตนา อิงคนินันท์. 2550. “เอกสารประกอบคำสอนวิชาการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.” นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
- ชัชวาลย์ ชัยชนะ. 2547. “การพัฒนาพลังงานทดแทนและความเป็นไปได้ในประเทศไทย.” *วารสารโลกพลังงาน*. 7 (24): หน้า 29-34
- ชัยชาญ ฤทธิเกริกไกร. 2547. “ความเข้าใจที่ถูกต้องเกี่ยวกับการอนุรักษ์พลังงาน.” *วารสารโลกพลังงาน*. 7(24): หน้า 42-47.
- ต้นกล้า อินสว่าง. 2558. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี. [Online]. Available: <http://mdresearch.kku.ac.th/files/news/filesnews/IEgrflgJ5tKqdsU.pdf>
- ธรรณ มงคลศรี. 2552. Thermal Conductivity Detector. [Online]. Available: <http://tamagozilla.blogspot.com/2009/08/mo-memoir-thermal-conductivity-detector.html>.
- ธวัชชัย ศรีวิบูลย์. 2551. ก๊าซโครมาโทกราฟี. [Online]. Available: <http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM334/CM334-6.pdf>
- นุชนาถ แซ่มซ้อย. 2557. “สาหร่ายขนาดเล็ก : การเพาะเลี้ยงและการนำมาใช้ประโยชน์.” *วารสารมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ วิชาการ*. 17(34): หน้า 169-183

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผกาดี แก้วกันเนตร. 2552. ศักยภาพการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ได้จากสาหร่าย. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- พัฒน์ จันทร์โรทัย. 2547. วัตตนาการความเป็นมาและกระบวนการกำเนิดสิ่งมีชีวิต. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ไพฑูรย์ หมายมั่นสมสุข. 2553. บทที่ 2 การเก็บและการรักษาสภาพตัวอย่างน้ำ. [Online]. Available: <http://www2.diw.go.th/Research/%E0%B9%80%E0%B8%AD%E0%B8%81%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%80%E0%B8%9C%E0%B8%A2%E0%B9%81%E0%B8%9E%E0%B8%A3%E0%B9%88/2-Sampling-w.pdf>
- ภานุทัศน์ อินใจมา. 2550. “ภาวะโลกร้อนกับทางออกของการแก้ไขปัญหาคอ.” *วารสารโลกพลังงาน*. 9 (32): หน้า 48-50
- ภาสกร สกุลศิลปกร. 2549. สาหร่ายสีเขียว. [Online]. Available: <http://knowledge.eduzones.com/knowledge-2-5-28773.html>
- เมษิณี นาขวัญ, จารุมาศ ยี่เจริญ, ประภาศรี ศุภกุล, เรณูภา เพชรฤทธิ และ รุจิรา มีสวัสดิ์. 2555. เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA. [Online]. Available: <https://sites.google.com/site/biology2012science/what-is-dna/the-khnikh-pcr-ni-kar-pheim-canwn-dna>
- ยุวดี พิรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2544. แพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ลินดา บุหงาเรือง. 2547. บทที่ 9 : อีเล็กโทรโฟรีซิส. [Online]. Available: [http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM457\(L\)\(47\)/CM457\(L\)-9.pdf](http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM457(L)(47)/CM457(L)-9.pdf)
- วันเพ็ญ ภูติจันทร์. 2549. วิทยาศาสตร์สาหร่าย (Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- วิทวัส แจ่มเอี่ยม. 2553. “กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยจุลสาหร่าย.” *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ*. 13(1): หน้า 68-77
- วสันต์ จันทร์อาทิตย์, วีระพงศ์ ลุติตานนท์, พุทธภูมิ ลาเจียกเทศ, สมหญิง พรหมไส, วงศกร พูนพิริยะ, เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์ และ สยาม คุณเศษ. 2547. เรียนรู้โปรแกรมชีวสารสนเทศด้วยตนเอง. กรุงเทพฯ : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- ศิริวรุฒ กลิ้นบุหงา, วิเชียร ริมพนิชยกิจ และ อัญชลี ทศนาขจร. 2544. การวิเคราะห์ลักษณะและความแปรผันของไมโครแซเทลไลต์ในจีโนมของกิ้งกูดดำและความเป็นไปได้ในการใช้จำแนกพันธุกรรม. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- สุภาพร แสงศรีจันทร์. 2557. UV-Visible Spectroscopy (UV-Vis). [Online]. Available: http://www.science.mju.ac.th/chemistry/download/s_sangsrichan/05UV-Visible%20Spectroscopy-UV-Vis-292557.pdf
- สุรัตน์ดิพร รัตน์. 2554. การผลิตไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว SCENEDESMUS SP.KMITL-01. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- สร้อยญา พันธุ์ฤกษ์ และ อรัญ อินเจริญศักดิ์. 2557. การผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากนาข้าวของประเทศไทย. [Online]. Available: http://doi.nrct.go.th/ListDoi/Download/185516/4ac9330eb6eac7e4f283bf28e7e7d5d9?Resolve_DOI=10.14457/KMITL.res.2014.81.
- สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงศึกษาธิการ. 2557. PCR คืออะไร. [Online]. Available: <http://biology.ipst.ac.th/?p=830>.
- สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2552. สถานการณ์พลังงานในปี 2551 และแนวโน้มปี 2552. [Online]. Available: http://www.eppo.go.th/Thaienergynews/Energy_Policy/WatchingShowDetail.aspx?watchingOID=50.
- สำนักวิเคราะห์ผลกระทบสิ่งแวดล้อม สำนักงานนโยบายและทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2551. การติดตามตรวจสอบด้านนิเวศทางน้ำ. [Online]. Available: http://eiadoc.onep.go.th/eialibrary/1mine/52/SITHATA/Appendix%20Document/9.4.2/Aquatic%20Flora%20&%20Fauna_ST-A_FINAL_TH.doc.
- เหมือนขวัญ กงนอก. 2556. การใช้วิธีโคพิกเมนต์เทชันเพื่อเพิ่มความคงตัวของรงควัตถุจากกระเจี๊ยบแดงและดอกอัญชัน. [Online]. Available: http://www.thapra.lib.su.ac.th/objects/thesis/fulltext/snamcn/Miankwan_Kongnork/fulltext.pdf
- อภิรดี สวรรค์นคร. 2551. บทปฏิบัติการที่ 2 Isolation of Genomic DNA and Agarose Gel Electrophoresis. [Online]. Available: <https://www.l3nr.org/posts/222478>.
- Bergman B, Gallon JR, Rai AN, Stal LJ. 1997. "N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria." *Federation of European Microbiological societies*. 19 (1): 139–185
- Bryant , D.A. and Frigaard , N.U. 2006. "Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated." *Trends in Microbiology*. 14 (11) : 488.
- Cherdsak Maneeruttanarungroj. 2554. Screening of hydrogen-producing algae and optimization for enhanced hydrogen production. [Online]. Available: <http://thesis.grad.chula.ac.th/readfile1.php?fn=ab5173811123.doc>
- Cherdsak Maneeruttanarungroj, Peter Lindblad and Aran Incharoensakdi. 2010. "A newly isolated green alga, Tetraspora sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production." *International journal of hydrogen energy*. 35 (2010): 13193 – 13199.
- Dayanada, C., Kumudha, A., Sarada, R. and Ravishankar, A. 2010. "Isolation, characterization and outdoor cultivation of green microalgae *Botryococcus* sp." *Scientific Research*. 5: 2497 - 2505.
- Fay P.1992. "Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria." *Microbiological and Molecular Biology Reviews*. 56: 340-373

- Lindberg P. 2003. Cyanobacterial hydrogen metabolism-Uptake hydrogenase and hydrogen production by nitrogenase in filamentous cyanobacteria. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations. Faculty of Science and Technology
- Posewitz MC, Dubini A, Meuser JE, Seibert M and Ghirardi ML. 2009. Hydrogenases, hydrogen production and anoxia. 2nd ed. Organellar and Metabolic Processes : Stern DB.
- Zhe Qu, Zhao Li, Xiuming Zhang and Xiao-Hua Zhang. 2012. “*Salinicoccus qingdaonensis* sp. nov., isolated from coastal seawater during a bloom of green algae.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62, 545–549
- Zhong, W., Z. Zhang, Y. Luo, W. Qiao, M. Xiao and M. Zhang. 2012. “Biogas productivity by co-digesting Taihu blue algae with corn straw as an external carbon source.” *Bioresource Technology*. 114: 281–286.





ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
Tris Acetate Phosphate (TAP)

ตารางที่ ก-1 : องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Tris Acetate Phosphate (TAP) ใน 2 ลิตร ประกอบด้วย

สารเคมี	ชื่อสารเคมี	ปริมาณที่ใช้
$H_2NC(CH_2OH)_3$	ทริส-ไฮดรอกซีเมทิล-อะมิโนมีเทน	24.2000 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	3.7500 กรัม
$MgSO_4 \cdot 2H_2O$	แมกนีเซียมซัลเฟตไดไฮเดรต	1.0000 กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.5000 กรัม
K_2HPO_4	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.8800 กรัม
KH_2PO_4	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.4400 กรัม
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	อีดีทีเอไดโซเดียม ไดไฮเดรต	0.5000 กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2200 กรัม
H_3BO_3	กรดบอริก	0.1140 กรัม
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	แมงกานีสคลอไรด์เทตระไฮเดรต	0.0500 กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	ไอร์ออนซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.0500 กรัม
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.0160 กรัม
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	0.0160 กรัม
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	แอมโมเนียมโมลิบเดตไฮเดรต	0.0077 กรัม
CH_3COOH	กรดอะซิติก	2.0000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข-1 : การคำนวณขนาดเซลล์จากการส่องกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง

โดยการนำไม้บรรทัดเหล็กไปส่องกล้องจุลทรรศน์ โดยที่ 1 ช่องของไม้บรรทัด มีค่าเท่ากับ 1.00 มิลลิเมตร จากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกล้องจุลทรรศน์มีค่าเท่ากับ 9.50 มิลลิเมตร



รูปที่ ข.1 นำไม้บรรทัดเหล็กไปส่องกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

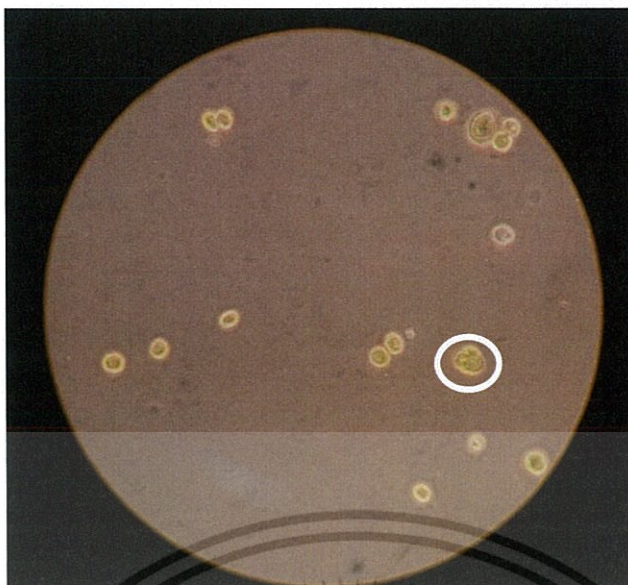
ที่เลนส์ 40 เท่า วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของภาพได้ 9.50 มิลลิเมตร หรือเท่ากับ 9.50×10^{-3} เมตร
นั่นคือ เส้นผ่านศูนย์กลางที่กำลังขยาย 40 เท่า = 9.50×10^{-3} เมตร

ดังนั้น ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ($\frac{1,000}{40} = 25$ เท่า) จะเห็นเส้นผ่านศูนย์กลางของภาพ

$$\frac{9.50}{25} = 0.38 \text{ มิลลิเมตร}$$

$$= 380 \text{ ไมโครเมตร}$$

จึงทำการวัดขนาดเซลล์แบบสัมผัส โดยเทียบบัญญัติไตรยางศ์ ให้เส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมด เป็น 380 ไมโครเมตร แล้วหาขนาดของเซลล์ต่อไป



รูปที่ ข.2 รูปตัวอย่างเซลล์สาหร่ายKS01 ที่ทำการส่องกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

จากนั้น วัดภาพกำลังขยาย 1,000x จากคอมพิวเตอร์ วัดได้ 7.20 เซนติเมตร นำมาเทียบ
บัญญัติไตรยางศ์

7.20 เซนติเมตร = 380 ไมโครเมตร

เซลล์สาหร่ายมีขนาด 0.40 เซนติเมตร จะได้ $\frac{0.40 \text{ เซนติเมตร} \times 380 \text{ ไมโครเมตร}}{7.20 \text{ เซนติเมตร}}$ เท่ากับ 21 ไมโครเมตร

ดังนั้น เซลล์ของสาหร่ายจะมีขนาดเท่ากับ 21 ไมโครเมตร

ภาคผนวก ข-2 : การคำนวณ starter 0.10

วัดค่าการดูดกลืนแสงจาก starter ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า นำค่าที่วัดการดูดกลืนแสงได้
มาคำนวณ

ตัวอย่างการคำนวณ ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ $0.232 \times 10 = 2.32$ ----- (1)

จากนั้นนำค่า 2.32 (1) มาคำนวณหาปริมาตรจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$2.32 \times V_1 = 0.10 \times 50.0 \text{ มิลลิเมตร}$$

$$V_1 = 2.156 \text{ มิลลิเมตร}$$

$$= 2156 \text{ ไมโครเมตร}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข-3 : การคำนวณการเก็บเซลล์ OD = 0.20

วัดค่าการดูดกลืนแสงจาก starter ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 100 เท่า (ตัวอย่างสาหร่าย 10.0 ไมโครเมตร + น้ำ 990.0 ไมโครเมตร) นำค่าที่วัดการดูดกลืนแสงได้ มาคำนวณ

ตัวอย่างการคำนวณ ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ $0.673 \times 100 = 67.3$
จากนั้นนำค่า (1) มาคำนวณหาปริมาตรจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$67.3 \times V_1 = 0.20 \times 800 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$V_1 = 2.38 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$= 2,380 \text{ ไมโครลิตร}$$

ภาคผนวก ข-4 : การคำนวณน้ำตาล

ตัวอย่างการคำนวณน้ำตาล เตรียมปริมาณของ Glucose ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (MW = 180 กรัม)

คำนวณจากสูตร $\frac{CV}{1000} = \frac{g}{MW}$

เตรียม Glucose ที่ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร จะได้

$$\frac{(1)(10.0 \text{ มิลลิลิตร})}{1000} = \frac{g}{180}$$

$$g = 1.80 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น จะต้องชั่ง Glucose 1.80กรัม เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10.0 มิลลิลิตร

คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาล Glucose ความเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ ที่ปริมาตร 30.0 มิลลิโมลาร์

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$(20.0 \text{ มิลลิโมลาร์}) (30.0 \text{ มิลลิลิตร}) = (1000 \text{ มิลลิโมลาร์}) (V_2)$$

$$V_2 = 0.60 \text{ มิลลิลิตร}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายใน 600 ไมโครลิตรเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข-5 : ตัวอย่างการคำนวณไฮโดรเจน

ยกตัวอย่าง peak area (V.s) ของ Sample 0.4 มิลลิลิตร = 341.29 mV.s

4% ของ H₂ มาตรฐาน 0.4 มิลลิลิตร = 1,746.98

ดังนั้น ถ้ามีพื้นที่ 1,746.98 จะเข้มข้น 4%

ถ้า พื้นที่ 1,746.98 จะมี ความเข้มข้นของไฮโดรเจน = 4%

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ } 341.29 \quad \text{จะมี ความเข้มข้นของไฮโดรเจน} &= \frac{341.29}{1,746.98} \times 4\% \\ &= 0.78\% \end{aligned}$$

แสดงว่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะมีไฮโดรเจน 0.78%

ถ้ามีปริมาตร head space 94.8841 จะมีไฮโดรเจน เท่ากับ

$$\frac{94.88 \times 0.78}{100} = 0.74 \text{ มิลลิลิตร}$$

แก๊ส 22.4 ลิตร มีปริมาณ 1 โมล

$$\text{ถ้ามี } 0.74 \text{ มิลลิลิตร จะมีปริมาณ } \frac{0.74 \text{ มิลลิลิตร}}{22.40 \text{ โมล}} \times 1000 = 33.06 \text{ ไมโครโมล}$$

$$\text{ค่าการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ } \frac{33.06 \text{ ไมโครโมล}}{\frac{0.245}{6} \text{ ชั่วโมง}} = 22.49 \text{ ไมโครโมล/OD}_{730}\text{/ชั่วโมง}$$

$$\frac{26.77 \text{ ไมโครโมล/OD}_{730}\text{/ชั่วโมง}}{25.00 \text{ มิลลิลิตร}} = 0.90 \text{ ไมโครโมล/OD}_{730}\text{/มิลลิลิตร/ชั่วโมง}$$

ดังนั้น ค่าการผลิตไฮโดรเจน เท่ากับ 0.90 ไมโครโมล/OD₇₃₀/มิลลิลิตร/ชั่วโมง

ภาคผนวก ข-6 : ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA ของสาหร่ายทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ทำ PCR สำเร็จ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันจากสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่นอีก 9 สายพันธุ์ (ข้อมูลจาก NCBI)

>VY01

GCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGGGCCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGCCCACCTT
GTTGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAA
TTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCT
ATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTTCATTGTC
AGAGGTGAAATTCCTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTCGCAAGGATGTTTTTCATTA
ATCAAGAACGAAAGTTGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCG
ACTAGGGATCGGCGGATGTTTTCTTCGATGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTT
CCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC
CTGCCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGA
GAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCCTTGTCAGGTT
GATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGTTCCGCAGCCGGCGGACTTCT
TAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAACAG

>VY02

GCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGGGCCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGCCCACCTT
GTTGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAAT
TAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTA
TCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTTCATTGTCT
GAGGTGAAATTCCTGGATTTATGAATTACGAAGAAATTTTTGGATTTATGAAAGACGAAATTAAGTGGCA
AGCATTTCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGT
CCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTTCTTCGATGACTCCGCCGGCACC
TTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGA
CGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCC
AGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCT
TAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACG
GTTGGTTCCGCAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATGGCGA

>KS02

GCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGGGCCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGCCCACCTT
GTTGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAAT
TAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTA
TCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTTCATTGTCA
GAGGTGAAATTCCTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTCGCAAGGATGTTTTTCATTA
TCAAGAACGAAAGTTGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGA
CTAGGGATCGGCGGATGTTTTCTTCGATGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTT
CGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCC
TGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAG
AGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCCTTGTCAGGTTG
ATTCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCTCGCCAGCCGGCGGACTTCTT
AGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAACAGGTCGTG

>KS03

CGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGT
GGGGCCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGCCCACCTTGTGCCGGGGACGGGCTCCTG
GGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCT
ACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCG
GAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGACTTCGTATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTA
TGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGC
TCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTT
TTCGATGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAG
GCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCCGGCTTAATTTGACTCAAC
ACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGG
GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACC
TCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCTCGCCAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATGGCGACTAGC
CAATGGAAGCATGAGGCAATAACAGGTCGTG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

>Chlorella_sorokiniana_KU948991

CTGCATGTCTAGTATAAACTGTTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTA
 TTTGATGGTACCTACTACTCGGATACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGCAAATCCCGACTTC
 TGGAAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCCGACCGGGCTTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACT
 TCACGAATCGCATGGCCTCGTGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA
 GGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGA
 GAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGT
 GACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCCTTAA
 CGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTT
 AAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGCCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTG
 CACTGGCAGGGCCACCTTGTGCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGC
 GCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAAC
 ACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGG
 CATTCGTATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTG
 CCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAACCGTCCTAGTCT
 CAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGACTCCGCCGGCACCTTATGAGA
 AATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAAGG
 CACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAGACATAG
 TGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT
 GGGTTGCCCTTGTCAAGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCTC
 GCCAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAACAGGTC
 TGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTATCCTTGGC
 CGAGAGGCCCGGTAATCTTTGAATCTGCATCGTATGGGGATAGATTATTGCAATATTAATCTTCAA
 CGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGATTACGTCCTTGTACACACCGC
 CCGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTGTTCGGATTGGCGACCGGGGGCGGTCTCCGCTCT
 CGGCCGCCGAGAAGTTCATTAACCCCTCCACCTAGACGAAGAGAGTCGACCC

>Crucegenia_lauterbornii_LC129524

AGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATA
 GTTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGATACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCG
 ACTTCTGGAAGGGACGTATATATTAGATAAAAAGGCCGACCGGGCTTGCCCGACTCGCGGTGAATCATG
 ATATCTTCACGAATCGCATGGCCTCGTGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCG
 ATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA
 GCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGA
 GGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAACC
 CCTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGT
 ATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGCCTGCCGGTCCGCCGTTTC
 GGTGTGACTGGCAGGGCCACCTTGTGCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGA
 GTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGG
 AATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGT
 CGGGGGCATTTCGATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAG
 CATTGTTCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATAACCGTCC
 TAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGACTCCGCCGGCACCTT
 ATGAGAAATCAAAGTTTTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACG
 GAAGGGCACCACAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAG
 ACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTA
 GTTGGTGGGTTGCCTTGTCAAGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGT
 TGGCTCGCCAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAA
 CAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTAGC
 CTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTATGGGGATAGATTATTGCAATTTAAT
 CTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGATTACGTCCTTGCCTTTGTACA
 CACCGCCCGTGCCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTGTTCGGATTGGCGACCGGGGGCGGTCTC
 CGCTCTCGGCCGCCGAGAAGTTCATTAACCCCTCCACCTAGAGGAAGGAGAAG

>Micractinium_sp_KT279453

CTGCTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTAC
 TCGGATACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTAT
 TAGATAAAAGACCCGACCGGGCTTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCT
 CGTGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATG
 GTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCC
 AAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATAC
 TGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCCTTAAACGAGGATCAATTGGAGGG

CAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAA
 AGCTCGTAGTTGGATTTTCGGGTGGGGCCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCAGTGGCAGGGCCCACCT
 TGTATGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAA
 TTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGCTACTTGCCCT
 ATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCCGGGGCATTGCTATTTTCATTTGTC
 AGAGGTGAAATTTCTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTTCATTA
 ATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCG
 ACTAGGGATCGGCGGATGTTTTCTTCGATGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAAACAAAGTTTTTGGGTT
 CCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC
 CTGCCGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGA
 GAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTGCTTGTGAGGTT
 GATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCTCGCCAGCCGGCGGACTTCT
 TAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGT
 TCTGGGCCGACGCGGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATC
 TTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAG
 CGCAAGTCATCAGCTTGCCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCCGTCCCTACCGATT
 GGGTGTGCTGGTGAAGTGTTCGGATTGGCGACCCGGGGCGGTCTCCGCTCTCGGCCGCCGAGAAGTTCA
 >Heynigi_sp_JQ315541

GGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGATACCCGTAGTAAATCTAGAGC
 TAATACGTGCGTAAATCCCAGCTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCCGACCGGGCTCTGC
 CCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGTTTCATTCAAAT
 TTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAG
 GGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGCAGCAGGCGCGCAAATTT
 ACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGCCTTTTCAGGTCGTGTAATTTG
 AAATGAGTACAATCTAGACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGG
 GCCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGCCACCTTGTTCGCCGGGACGGGCTCTGGGC
 TTCCTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACG
 CTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAG
 TAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTTCGATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATGA
 AAGACGAACACTGCGAAAGCATTTCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCG
 AAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTC
 GATGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAAACAAAGTTTTTTGGGTTCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCT
 GAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACG
 GGAAAACCTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTG
 GTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTGAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCA
 GCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCTCGCCAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCA
 ATGGAAGCATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTG
 ATGCATTCACGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGAT
 AGATTAATGCAATTATTAATCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGATT
 ACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTGTTCGGAT
 TGGCGACTGGGGGCGGTCTCCGCTCTCAGCCGCCGAGAAGTTCATTAACCCTCCACCTAGAGGAAGG
 AGAAATCGTAACAAGG

>Chlorella_pyrenoidosa_AB240151

TAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAA
 ACTGCTTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTA
 CTCGGATACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTA
 TTAGATAAAAAGGCCGACCGGGCTCTGCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGC
 CTTGTGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCA
 TGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACAT
 CCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTAACCAATCCTGACACAGGAGGATAGTGACAATAAATAACAAT
 ACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCTTAACGAGGATCAATTGGAG
 GGCAAGTCTGGTGAACGCTCATCAGTGTTTTTTTTGTGTTGACGCCAGAGATAGTAGGGCATCGCTCA
 GTCGATGCTATGCCTGCTAGTCGAGCAGTCACAACATGGATCGGGTAGACTGCCGGCGAGGTGACCTGG
 TACGGGGGAGGCCTTCACTTTGTTAGTTGGTTAATCCCGTGGCGAGCCCTTGAAGAGCGATCTTCTCTG
 GGCCGTCGTAACGCACGCAAAGGCACCGGGTACTCATTGAGTCGCCCTCAAGGGACGTGCTAAACCCAC
 ACGATGACAAAGTGTGCTCTGTGCAATAGCTCCCGATCAGCAAAGGCACGGAGGGGCCAAAGTGCATGG
 AGGAAATGCCATGCACTGCCCGGTATGAATTGGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTAT
 ATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGCCTGCCGGTCCGCGTTTCGG
 TGTGCACTGGCAGGGCCACCTTGTTCGCCGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGT
 CGGGCCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAA

เอกสารนี้
 ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCCG
 GGGGCATTCGTATTTTCATTTGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCA
 TTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTTA
 GTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGACTCCGCCGGCACCTTAT
 GAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGA
 AGGGCACCACCAGGCGTGGAGCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTTCCAGAC
 ATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGT
 TGGTGGGTTGCCCTTGTACAGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTG
 GCTCGCCAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAACA
 GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTAGCCT
 TGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCT
 TCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
 CCGCCCGTGCCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTGTTCGGATTGGCGACCGGGTGGGTCTCCG
 CTCTCAGCCGCCGAGAAGTTCATTAACCCTCCCACCTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTCCG
 TAGTGAACCTGCAGAAGGATCA

>Chlorella_vulgaris_AY591515

TGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTTATACTGTGAAA
 CTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGATACCCGTAGTAAA
 TCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCAGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGCCGACCG
 GGCTCTGCCCCACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGTTTC
 ATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGG
 AGGATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCG
 CGCAAAATACCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCT
 GGTAAATGGAATGAGTACAATCTAAACCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCAGCA
 GCCGCGTAAATCCAGTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTT
 CGGGTGGGGCCTGCCGGTCCGCCGTTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGCCACCTTGTGCCCCGGGACGGGC
 TCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCCGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCA
 GGCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGGTCTGTAG
 GACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGCATTTCGATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGG
 ATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTG
 GGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGAT
 GTTCTTCGATGACTCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTC
 GCAAGGTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGAC
 TCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTTC
 TATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTGCCTTGTGAGTTGATTCCGGTAACGAACG
 AGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCTCGCCAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCG
 ACTAGCCAATGAAGCATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGC
 TACACTGATGCATTCAACGAGCTTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGA
 TGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGC
 GTTATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTGCCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTG
 TTCGGATTGGCGACCGGGGGCGGTCTCCGCTCTCGGCCGCCGAGAAGTTCATTAACCCTCCCACCTAG
 AGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA

>Actinastrea_hantzschii_LC192144

AGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATA
 GTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGATACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCCG
 ACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGCCGACCGGGCTCTGCCCGACTCGCGGTGAATCATG
 ATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCG
 ATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGA
 GCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAATACCAATCCTGACACAGGGA
 GGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAAATGGAATGAGTACAATCTAAACC
 CCTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGT
 ATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGCCTGCCGGTCCGCCGTTTC
 GGTGTGCACTGGCAGGGCCACCTTGTGCCCCGGGACGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGA
 GTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTACGCTCTGAATACATTAGCATGG
 AATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGT
 CGGGGGCATTTCGATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAG
 CATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCC
 TAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTTTTTCGATGACTCCGCCGGCACCTT
 ATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACG
 GAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAG
 ACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTA

GTTGGTGGGTGTCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGT
 TGGCTCGCCAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAA
 CAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGGCCGACCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTAGC
 CTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAAT
 CTTCAACGAGGAATGCCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTGATTACCTCCCTGCCCCTTTGTACA
 CACCGCCCGTGCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTGTTCGGATTGGCGACCGGGTGGCGTCTC
 CGCTCTCGGCCGCGAGAAGTTCATTAACCCTCCACCTAGAGGAAGGAGAAG

>Diacanthos_belenophorus_AY323837

GTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTT
 TATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGAT
 ACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATA
 AAAGGCCGACCGGGCTCGCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCC
 GGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGCCTACCATGGTGGTA
 ACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAA
 GGCAGCAGGCGCAAATTAACCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCC
 TTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTC
 TGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCG
 TAGTTGGATTTCCGGTGGGGCCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGGCCCACCTTGTTCG
 CGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACCCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAATTAGAG
 TGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTG
 TTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTTCATTGTCAGAGGT
 GAAATCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAG
 AACGAAAGTTGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGG
 GATCGGCGGATGTTTCTTCGATGACTCCGCCGACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTGGGTTCCGGGG
 GGAGTATGGTTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCGGCTGGAGCCTGCGG
 CTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTC
 TTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCCTGTCAGGTTGATTCC
 GGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGCTCGCCAGCCGGCGGACTTCTTAGAGG
 GACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGG
 CCGCACGCGGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAA
 ACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAG
 TCATCAGCTTGCCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTGCCTCCTACCGATTGGGTGT
 GCTGGTGAAGTGTTCGGATTGGCGACCGGGTGGCGTCTCCGCTCTCGGCCGCGAGAAGTTCATTAAC
 CCTCCACCTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT

>TetrasporaCU2551

acctggtgatcctgcccagtagtcatatgcttgtctcaaagattaagccatgcatgtctaagtataaac
 tgcttatactgtgaaactgcaaatggctcattaaatcagttatagtttatttgggtgtaccttactact
 cggataaccgtagtaattctagagctaatacgtgcgtaaatcccgaacttctggaagggacgtataat
 agataaaaagccgaccgagccttctgctgaccccggtgaatcatgatatcttcacgaagcgcagtgccct
 tgtgcccggcgtgttccattcaaatttctgcccctatcaacttctgatggttaggtagagggcctaccatg
 gtggttaacgggtgacggaggattagggttcgattccggagagggagcctgagaaacggctaccacatcc
 aaggaaggcagcaggcgcgcaaatcaaccaatcctgatacggggaggtagtgacaataaataacaatac
 cgggcatctcatgtctggttaattggaatgagtaacaatcctaataacgaggaatcatttggagggc
 aagtctggtgcccagcagcgcggtaattccagctccaatagcgtatatttaagttgtgagtttaaaaa
 gctcgtagttggtatttcgggttcttagcgtccgcctatggtgagtagtctgctatggccttccttct
 tgtcggggacgggcttctgggcttactgtccgggactcggagtcgacgtggttactttgagtaaat
 gagtgttcaaagcaggcttacgccctgaatactttagcatggaataacacgataggactctggcctatc
 ttgttggctctgtaggactggagtaatgattaagagggacagtcgggggcatctgattttcattgtcaga
 ggtgaaattcttggatttatgaaagacgaactactgcaaaagcatttgccaaggatgttttcattaatc
 aagaacgaaagtgggggctcgaagacgattagataccgtcgtagctcaaccataaacgatgccgact
 agggattggcgaatgttttttaatgacttccgacaccttatgagaaatcaaagtttttgggttccg
 gggggagtagtggctgcaaggctgaaacttaaaggaattgacggaagggcaccaccaggcgttaaataca
 tagctgaacatagctctagcggcagtgagaggaactctctgctagtcagtggtggcataatagtcaca
 ttggcaacaccttcaaattgctgggaaacctaaagcattgcataccaaggcagacatggaacattc
 tgctggccagggttaacgacctcgggtacgggtgacaactgcaatggatttagtagttacaactgctagaa
 tgggcaaccagcagccaagtccataacatgggacagacgcctatgcacggatgcagttcacagactaaa
 tggaggtgggcccgtatactatgatacggcttaagatagtcgggtccctatcgagagatagccgggtgag
 aggacgtctgaaacaatcggactgagagctcatcggacaccggaatagtagtctgcccagtgcaagctggt
 tagggctcccccgatggtggagcctccgggtgtgggtgaaacgggagcctgcccgttaattttagctcaa
 caggggaaaacttaccaggtccagacatagtgaggattgacagattgagagctcttctttagtctatg
 ggtggtggtgcatggcgttcttagttggtgggttgccttgcaggtttagtctccggtaacgaaacgagac

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชไร่นานาชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ctcagcctgctaaatagtcctagttgctttttgagctagctgacttcttagaggactattggcgctt
 agtcaatggaagtatgaggcaataacaggtctgtgatgcccttagatgttctgggcccacgcgcgcta
 cactgatgcattcaacaagcctatccttgaccgaaaggtccgggtaatctttgaaactgcatcgtgatg
 gggatagattattgcaattatttagtcttcaacgaggaatgcctagtaagcgcgaagtcacagcttgctg
 tgattacgtccctgcccctttgtacacaccgcccgtcgctcctaccgattgggtgtgctggtgaagtgtt
 cggattggcagcttaggggtggcaacacctcaggtctgccgagaagttcattaaaccctcccacctagag
 gaaggagaagtcgtaacaaggtctccgtaggtgaacctgcccggggatcattgaattattaaaaccaca
 atgcgaacctcaacgttccgtgccctggcttgccagtgggggcggtggctaaactcccagtcgtactcac
 agctgggtgggcattgatgctgctcagtgggcgccttggcatgatcatacaccagtgctaaccactgat
 aaaaccaaactctgaagtttgattgctattaactggcaatcctaaccaaagacaactctcaacaacgga
 tatcttggctctcgcaacgatgaagaacgcagcgaatgcgatacgtagtgtgaattgcagaattccgt
 gaacctcgaatctttgaacgcatattgctgctcgagccttcgggcaagagcatgtctgcctcagcgtcg
 gtttacacctggccgctcgttctgcccggatcctacc

ภาคผนวก ข-7 : โปรแกรมคำนวณสถิติ

โปรแกรมที่ใช้ คือ IBM SPSS statistics 23



Licensed Materials - Property of IBM Corp. © Copyright IBM Corporation and its licensors 1989, 2015. IBM, IBM logo, ibm.com, and SPSS are trademarks or registered trademarks of International Business Machines Corp., registered in many jurisdictions worldwide. A current list of IBM trademarks is available on the Web at www.ibm.com/legal/copytrade.shtml. Other product and service names might be trademarks of IBM or other companies. This Program is licensed under the terms of the license agreement accompanying the Program. This license agreement may be either located in a Program directory folder or library identified as "License" or "Non_IBM_License", if applicable, or provided as a printed license agreement. Please read the agreement carefully before using the Program. By using the Program you agree to these terms.



รูปที่ ข.3 ภาพแสดงโปรแกรม IBM SPSS statistics Version 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการใช้โปรแกรมคำนวณ Dancan

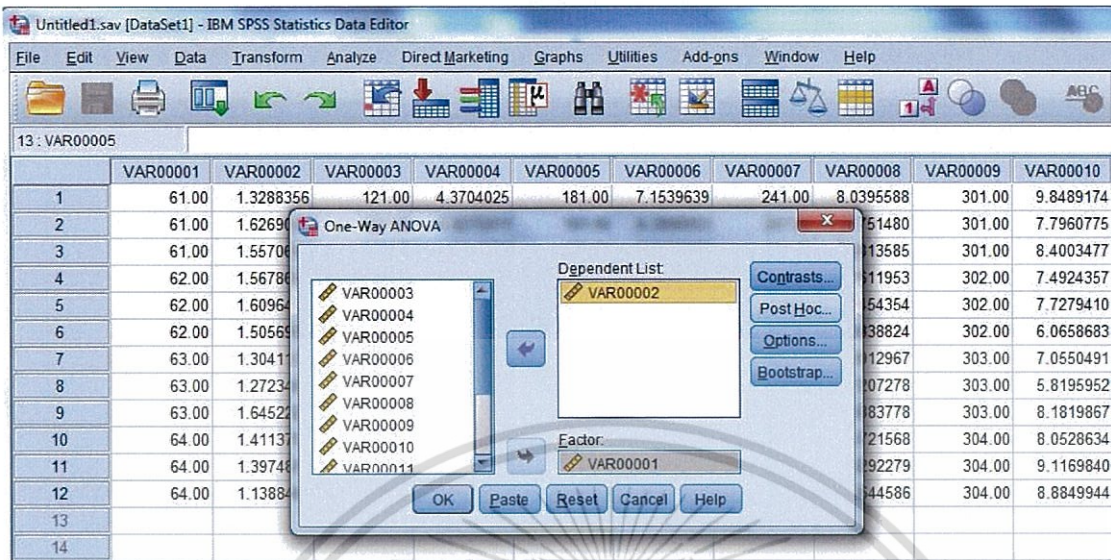
	VAR00001	VAR00002	VAR00003	VAR00004	VAR00005	VAR00006	VAR00007	VAR00008	VAR00009	VAR00010
1	61.00	1.3288356	121.00	4.3704025	181.00	7.1539639	241.00	8.0395588	301.00	9.8489174
2	61.00	1.6269028	121.00	4.0275011	181.00	6.3806953	241.00	6.7751480	301.00	7.7960775
3	61.00	1.5570672	121.00	4.6643003	181.00	7.5276989	241.00	7.4813585	301.00	8.4003477
4	62.00	1.5678664	122.00	3.8704133	182.00	6.3774331	242.00	6.1611953	302.00	7.4924357
5	62.00	1.6096457	122.00	4.5655606	182.00	6.5224698	242.00	7.8454354	302.00	7.7279410
6	62.00	1.5056976	122.00	4.5761149	182.00	5.5402490	242.00	6.8338824	302.00	6.0658683
7	63.00	1.3041138	123.00	3.8625634	183.00	5.5832375	243.00	6.9012967	303.00	7.0550491
8	63.00	1.2723406	123.00	3.9167048	183.00	5.7342033	243.00	4.1207278	303.00	5.8195952
9	63.00	1.6452226	123.00	4.6763189	183.00	6.9129220	243.00	4.8383778	303.00	8.1819867
10	64.00	1.4113753	124.00	4.0057085	184.00	7.3640042	244.00	4.5721568	304.00	8.0528634
11	64.00	1.3974839	124.00	4.7741897	184.00	7.2763895	244.00	5.8292279	304.00	9.1169840
12	64.00	1.1388465	124.00	4.6126452	184.00	6.2404322	244.00	6.5644586	304.00	8.8849944
13										

ขั้นตอนที่ 1 : ใส่ข้อมูลในตารางโดย ช่องเลขคือเป็นช่องชนิดของกลุ่ม และ ช่องเลขคู่เป็นช่องที่ใส่ข้อมูลตัวเลขที่คำนวณได้จาก Excel

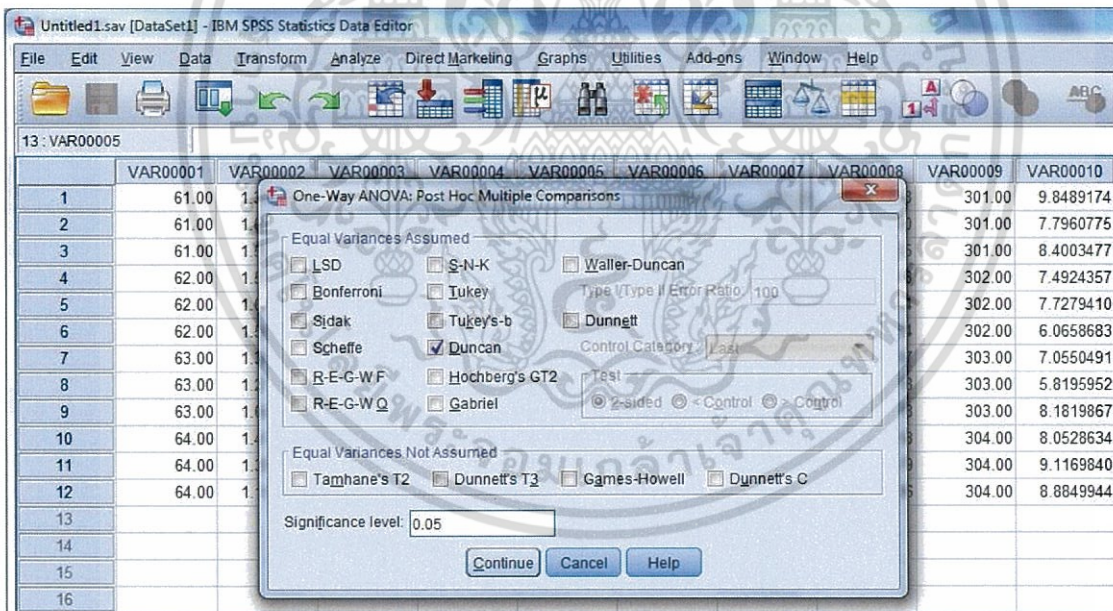
	VAR00001	VAR00002	VAR00003	VAR00004	VAR00005	VAR00006	VAR00007	VAR00008	VAR00009	VAR00010
1	61.00	1.3288356	121.00	4.3704025	181.00	7.1539639	241.00	8.0395588	301.00	9.8489174
2	61.00	1.6269028	121.00	4.0275011	181.00	6.3806953	241.00	6.7751480	301.00	7.7960775
3	61.00	1.5570672	121.00	4.6643003	181.00	7.5276989	241.00	7.4813585	301.00	8.4003477
4	62.00	1.5678664	122.00	3.8704133	182.00	6.3774331	242.00	6.1611953	302.00	7.4924357
5	62.00	1.6096457	122.00	4.5655606	182.00	6.5224698	242.00	7.8454354	302.00	7.7279410
6	62.00	1.5056976	122.00	4.5761149	182.00	5.5402490	242.00	6.8338824	302.00	6.0658683
7	63.00	1.3041138	123.00	3.8625634	183.00	5.5832375	243.00	6.9012967	303.00	7.0550491
8	63.00	1.2723406	123.00	3.9167048	183.00	5.7342033	243.00	4.1207278	303.00	5.8195952
9	63.00	1.6452226	123.00	4.6763189	183.00	6.9129220	243.00	4.8383778	303.00	8.1819867
10	64.00	1.4113753	124.00	4.0057085	184.00	7.3640042	244.00	4.5721568	304.00	8.0528634
11	64.00	1.3974839	124.00	4.7741897	184.00	7.2763895	244.00	5.8292279	304.00	9.1169840
12	64.00	1.1388465	124.00	4.6126452	184.00	6.2404322	244.00	6.5644586	304.00	8.8849944
13										

ขั้นตอนที่ 2 : เมื่อใส่ข้อมูลตัวเลขเรียบร้อยแล้ว เลือก Analyze > Compare Means > One-Way ANOVA..

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ขั้นตอนที่ 3 : ใส่ช่องเลขคี่ใน Factor และ ใส่ช่องเลขคู่ใน Dependent List แล้วเลือก Post Hoc..



ขั้นตอนที่ 4 : เลือก Duncan และ ใส่ Significance level = 0.05 > Continue > OK

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Output1 [Document1] - IBM SPSS Statistics Viewer

File Edit View Data Transform Insert Format Analyze Direct Marketing Graphs Utilities Add-ons Window Help

Output

- Log
- Oneway
 - Title
 - Notes
 - Active Dataset
 - ANOVA
- Post Hoc Tests
 - Title
- Homogeneous
 - Title
 - VAR0000

→ **Oneway**

[DataSet1] C:\Users\PC-User\Documents\Untitled1.sav

ANOVA

VAR00002

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.105	3	.035	1.503	.286
Within Groups	.187	8	.023		
Total	.292	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

VAR00002

Duncan^a

VAR00001	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
64.00	3	1.315901885	
63.00	3	1.407225666	
61.00	3	1.504268538	
62.00	3	1.561069892	
Sig.			.102

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

ขั้นตอนที่ 5 : เมื่อเสร็จแล้วหน้าจจะแสดงดังภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

