สำนักหอสมุดกลาง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อนบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

นางสาว กนกวรรณ การเจริญดี
นางสาว กุลพัฒน์ คมกฤส
นางสาว สุมาลี ปานทอง

ปพ
ก125ก
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72579
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

.b 11769646
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cultivation of Blue-green Algae from Hot Springs in the Upper Part of Northern Thailand

Miss Kanogwan Kanjarerndee

Miss Kullaphat Komkris

Miss Sumalee Panthong

Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อนบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

นักศึกษา นางสาวกนกวรรณ การเจริญดี

นางสาวกุลพัฒน์ คมกฤส

นางสาวสุมาลี ปานทอง

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา อ. ดนึงกานต์ กลั่นบุศย์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ดร.จิตาภา ทิน้อย	
กรรมการ	ดร.จิตติ ท่าไว	
กรรมการ	อ. ดนึงกานต์ กลั่นบุศย์	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อนบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย	
นักศึกษา	นางสาวกนกวรรณ	การเจริญดี
	นางสาวกุลพัฒน์	คมกฤส
	นางสาวสุมาลี	ปานทอง
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม	
ปีการศึกษา	2549	
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ดนึงกานต์ กลั่นบุศย์	

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จากน้ำพุร้อน 2 แหล่งบริเวณภาคเหนือตอนบนของของประเทศไทย คือโป่งน้ำร้อนดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ และโป่งน้ำร้อนบ้านห้วยทรายขาว จ.เชียงราย โดยทำการเก็บตัวอย่างจากช่วงอุณหภูมิ 30 - 80 ˚C pH 7-10 จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงและแยกด้วยอาหารสูตร BG-11 ภายใต้หลอดฟลูออเรสเซนต์ สามารถแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินให้เป็นสกุลเดี่ยวๆได้ 3 สกุล คือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 และ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52

หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ทนอุณหภูมิสูง โดยการศึกษาอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่า *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30˚C และ pH ที่เจริญได้ดีที่สุดคือ pH 9 ส่วน *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 และ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 27 ˚C และ pH ที่เจริญได้ดีที่สุดคือ pH 9

ในการเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยการทำการเก็บรักษาพันธุ์สาหร่าย ด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง สามารถเก็บรักษาสาหร่ายไว้ในลักษณะที่ยังมีชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานาน ภายใต้อุณหภูมิ 4 ˚C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Cultivation of Blue-green algae from Hot Spring in the Upper Part of Northern Thailand
Name	Miss Kanogwan Kanjarerndee
	Miss Kullaphat Komkris
	Miss Sumalee Panthong
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2006
Special Project Advisor	Khanungkan Klanbut

Abstract

According to collected blue-green algae, samples were taken from two hot springs in the upper part of northern Thailand, Pong Num Roan Doi-Saket in Chiang Mai province and Pong Num Roan Ban Huaysaikaw in Chiang Rai province, that had temperatures ranging from 30 - 80 °C and pH levels from 7 to 10. All samples were cultivated in BG-11 medium under fluorescent light. Three genera of blue-green algae were isolated in clonal culture as single colony group such as *Synechococcus* sp. strain DSK 72, filamentous group such as *Phormidium* sp. strain DSK 48 and *Oscillatoria* sp. strain DSK 52.

The optimizations for thermotolerant and alkali-tolerant of blue-green algae were determined. The optimum temperature for growth of *Synechococcus* sp. strain DSK 72, *Phormidium* sp. strain DSK 48 and *Oscillatoria* sp. strain DSK 52 were 30, 27 and 27 °C respectively and the optimum pH level of them were 9.

The samples were kept using lyophilization technique that could preserve these strains in live-attenuated form for many years under 4 °C.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลงได้เพราะความช่วยเหลือจากบุคลากรหลายท่าน ผู้เขียนจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง โดยเฉพาะอาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ที่ได้ให้คำแนะนำ คำชี้แจง คำแก้ไข ตักเตือน ตลอดจนความเมตตาและให้กำลังใจ จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร.จิดาภา ทิน้อย และ ดร.จิตติ ท่าไว ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำต่างๆในการแก้ไขและตรวจทานงานวิจัยให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการสาหร่าย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่และพี่ๆในห้องปฏิบัติการทุกท่าน โดยเฉพาะพี่อุดมลักษณ์ สมพงษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องวิธีการและสถานที่เก็บตัวอย่าง รวมทั้งคำแนะนำต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย และข้อเสนอแนะดีๆที่ช่วยให้โครงงานพิเศษของเราสำเร็จลุล่วงได้

ขอขอบพระคุณพี่เอส ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องอุปกรณ์ สถานที่ และคำแนะนำทุกอย่าง ซึ่งช่วยให้การทำโครงงานพิเศษของเรามีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ เจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการทุกท่าน โดยเฉพาะ คุณประสิทธิ์ คุณวิทยา คุณเอกภพ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้ความสะดวกในเรื่องอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ รวมทั้งสถานที่ในการปฏิบัติงาน ที่ทำให้เราทำงานได้อย่างสมบูรณ์และได้รับความสะดวกยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณห้องสมุดมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยเฉพาะเจ้าหน้าที่ประจำห้องสมุดคณะประมง ที่ให้ความเอื้อเฟื้อและให้ความสะดวกแก่เราในการค้นคว้าหนังสือและเอกสารต่างๆ ซึ่งทำให้เราได้รับความสะดวก รวดเร็วในการค้นคว้ามากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความดูแล ให้กำลังใจ และให้ความสนับสนุนทางด้านทุนสนับสนุนค่าเล่าเรียนและสนับสนุนการทำงานด่างๆ ซึ่งช่วยให้โครงงานพิเศษของเราลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้ และขอบคุณสำหรับกำลังใจที่เพื่อนๆ ได้มอบให้ ซึ่งทำให้เราทำโครงงานพิเศษนี้ได้เสร็จสิ้นสมบูรณ์

กนกวรรณ การเจริญดี
กุลพัฒน์ คมกฤส
สุมาลี ปานทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	28
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	66
เอกสารอ้างอิง	68
ภาคผนวก	71
ภาคผนวก ก	72
ภาคผนวก ข	76
ภาคผนวก ค	86
ประวัติผู้เขียน	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	การเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C	77
2	ค่าลอการิทึมการเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C	77
3	ค่า specific growth rate (μ_{max}) และค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C	78
4	การเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C	78
5	ค่าลอการิทึมการเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C	79
6	ค่า specific growth rate (μ_{max}) และค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C	79
7	การเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C	80
8	ค่าลอการิทึมการเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C	80
9	ค่า specific growth rate (μ_{max}) และค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C	81
10	การเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C	81
11	ค่าลอการิทึมการเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C	82
12	ค่า specific growth rate (μ) และค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C	82
13	การเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C	83
14	ค่าลอการิทึมการเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27°C	83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
15	ค่า specific growth rate (μ_{max}) และค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9,10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C	84
16	การเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C	84
17	ค่าลอการิทึมการเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C	85
18	ค่า specific growth rate (μ_{max}) และค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27°C	85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Order Chroococcales Family Chroococcaceae	23
2	สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Order Nostocales Family Oscillatoriaceae	24
3	สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Order Nostocales Family Nostocaceae	25
4	แหล่งน้ำพุร้อนที่ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย	29
5	การเก็บตัวอย่างสาหร่ายจากน้ำพุร้อนโดยใช้ปากคีบและปิเปต	31
6	การแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อน	32
7	การเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization)	36
8	*Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72	38
9	*Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48	38
10	*Oscillatoria sp.* สายพันธุ์ DSK 52	39
11	การเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 °C	41
12	กราฟลอการิทึมการเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 จากที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 °C	42
13	ค่า specific growth rate (μ) ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 °C	43
14	ค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 °C	43
15	การเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C	45
16	กราฟลอการิทึมการเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C	46
17	ค่า specific growth rate (μ) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
18	ค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C	47
19	การเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C	50
20	กราฟลอการิทึมการเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C	51
21	ค่า specific growth rate (μ) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C	52
22	ค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C	52
23	การเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C	54
24	กราฟลอการิทึมการเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9 และ 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C	55
25	ค่า specific growth rate (μ) ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C	56
26	ค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C	56
27	การเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C	58
28	กราฟลอการิทึมการเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
29	ค่า specific growth rate (μ) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK48 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C	60
30	ค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C	60
31	การเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C	62
32	กราฟลอการิทึมการเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C	63
33	ค่า specific growth rate (μ) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C	64
34	ค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C	64
35	ลักษณะของสาหร่ายที่ทำการเก็บรักษาโดยวิธี วิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization) ในหลอด ampoule	65
36	ลักษณะของ *Synechococcus* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	87
37	ลักษณะของ *Phormidium* sp.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	88
38	ลักษณะของ *Phormidium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

มนุษย์รู้จักน้ำพุร้อนและใช้ประโยชน์ของน้ำพุร้อนกันมานานแล้ว โดยเฉพาะคุณประโยชน์ที่มนุษย์นำมาใช้อาบและใช้รักษาโรคทางการแพทย์แผนโบราณ เช่น โรคปวดข้อตามกล้ามเนื้ออักเสบ โรคผิวหนัง เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งพลังงานใต้พิภพที่สำคัญ โดยสามารถนำไปผลิตกระแสไฟฟ้า นำไปใช้กับเครื่องบ่มแห้งผลิตผลทางการเกษตร และใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆอีกมากมาย น้ำร้อนที่ผ่านการใช้ประโยชน์ต่างๆจนมีอุณหภูมิต่ำลงยังสามารถระบายลงสู่แปลงเพาะปลูกเป็นประโยชน์ต่อการเกษตรได้โดยตรงอีกด้วย

เมื่อน้ำร้อนใต้พื้นดินไหลขึ้นสู่ผิวดิน ทำให้เกิดการละลายของแร่ธาตุตามชั้นหินทำให้น้ำพุร้อนมีปริมาณสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆซึ่งบางชนิดสามารถสร้างอาหารจากการสังเคราะห์แสงเองได้ และเมื่อสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นได้รับแสงอย่างเพียงพอจะทำให้สามารถสังเคราะห์แสงได้ดี ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตเบื้องต้นของระบบนิเวศนั้นๆ

ในจำนวนจุลินทรีย์ต่างๆ ที่สามารถเจริญได้ในที่ๆมีสภาพแวดล้อมผิดปกติ เช่น ในน้ำพุร้อนมีหลายประเภท สาหร่าย เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทหนึ่งที่สามารถเจริญได้ในน้ำพุร้อนเหล่านี้ เราเรียกสาหร่ายเหล่านี้ว่า สาหร่ายทนร้อน หรือ thermophilic algae

ส่วนใหญ่ของสาหร่ายในน้ำพุร้อนเป็นพวกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant blue-green algae หรือ thermotolerant cyanobacteria) จะพบอยู่ทั่วไปตามบ่อน้ำร้อนและน้ำพุร้อน วราภรณ์ (2545) ได้กล่าวว่า การสำรวจความหลากหลายของสาหร่ายในน้ำพุร้อน ในประเทศไทยได้มีผู้ศึกษาและสำรวจสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายท่าน ดังนี้ ในปี 2523 สระบุรี ได้ทำการสำรวจสาหร่ายและจุลินทรีย์ชนิดอื่นในน้ำพุร้อนโป่งฮ่อม ตำบลออนหลวย อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ พบสาหร่ายทั้งหมด 10 สปีชีส์ ตัวอย่าง เช่น *Chroococcus turgidus* , *Navicula* sp., *Oscillatoria* spp. และ *Spirogyra* sp. หลายปีต่อมา กาญจนา และคณะ (2532) ศึกษาและสำรวจความหลากหลายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในน้ำพุร้อนบริเวณภาคเหนือ 3 แหล่งในจังหวัดเชียงใหม่และกำแพงเพชร พบสาหร่ายสปีชีส์เด่นคือ *Calothrix* sp., *Oscillatoria terebriformis* และ *Synechococcus* sp. จากนั้นในปี 2535 กาญจนา และสุทธิรักษ์ สำรวจสปีชีส์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในบ่อน้ำร้อนหินดาด อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี และบ่อน้ำร้อนท่าไม้แดง จังหวัดกำแพงเพชร ซึ่งมีอุณหภูมิ 40-49°C พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ตัวอย่างเช่น *Calothrix* sp, *Mastigocladus* sp., *Oscilliatoria* spp. และ *Synechococcus* sp. ซึ่งพบ *Oscillatoria* spp. เป็นสปีชีส์เด่น และในปี 2544 อุดมลักษณ์ ได้สำรวจความหลากหลายของสาหร่ายในน้ำพุร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9 แหล่งใน 4 จังหวัดบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย คือ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน และลำปาง พบสาหร่ายทั้งหมด 78 สปีชีส์ สาหร่ายที่พบส่วนใหญ่เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน พบทั้งหมด 39 สปีชีส์ ซึ่งสปีชีส์ที่พบมากที่สุด คือ *Phormidium boryanum*, *Synechococcus lividus* และ *Synechococcus* sp. ช่วงอุณหภูมิที่พบสาหร่ายมากที่สุด คือ 30-39 °C และช่วงอุณหภูมิ 70-80 °C พบสาหร่ายน้อยที่สุด

ในต่างประเทศนั้นได้มีการศึกษากันมานานแล้ว โดยในปี 1973 Castenholz ทำการสำรวจสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในน้ำพุร้อน Hunter รัฐโอริกอน น้ำพุร้อน Yellowstone National Park ประเทศสหรัฐอเมริกา และน้ำพุร้อนในประเทศไอซ์แลนด์และนิวซีแลนด์ พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechococcus lividus* ที่อุณหภูมิ 73-74 °C *Oscillatoria terebriformis* ที่อุณหภูมิ 35-38 °C และ *Mastigocladus laminosus* ที่อุณหภูมิ 63-64 °C ต่อมา วราภรณ์(2545) อ้างถึง Brock (1978) ว่ามีการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechococcus lividus* ที่เก็บมาจากอุณหภูมิต่างๆในน้ำพุร้อน Hunter รัฐโอริกอน พบว่าสามารถแบ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 สายพันธุ์ที่เก็บมาจากอุณหภูมิ 45°C, 48°C และ53°C อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 45°C กลุ่มที่ 2 สายพันธุ์ที่เก็บมาจากอุณหภูมิ 55°C และ 60°C อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 55°C และกลุ่มสุดท้ายสายพันธุ์ที่เก็บมาจากอุณหภูมิ 75°C อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 65°C นอกจากนั้นยังอ้างถึง Brock (1975) ว่าได้สำรวจความหลากหลายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เจริญในน้ำพุร้อนที่อุณหภูมิตั้งแต่ 10-75°C พบว่าจำนวนสปีชีส์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมากที่สุด คือ 90 สปีชีส์ และจะลดลงเมื่ออุณหภูมิมากหรือน้อยกว่านี้ ในขณะที่อุณหภูมิ 60-70°C และ 70-75°C จะมีจำนวนและสปีชีส์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินน้อยที่สุดเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Synechococcus* sp. ที่สามารถเจริญได้

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีคุณค่าสูง ได้มีการนำเอนไซม์ สารปฏิชีวนะ กรดอะมิโน รงควัตถุ และอื่นๆ มาใช้ในระดับอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และทางด้านการแพทย์ เนื่องจากคุณสมบัติของการคงความสามารถในการทำงานที่อุณหภูมิสูงและเอนไซม์บางชนิดยังสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของเอนไซม์ที่มีจุดประสงค์ในการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้เพราะสามารถเพาะเลี้ยงและสกัดที่อุณหภูมิสูง โดยที่เอนไซม์ไม่เสียสภาพและไม่สูญเสียความสามารถในการทำงาน นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงยังเป็นการประหยัดต้นทุนในการผลิต เพราะไม่ต้องใช้ระบบความเย็นควบคุมอุณหภูมิ (cooling system) และอุณหภูมิสูงยังเป็นการป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. แยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทนอุณหภูมิสูงจากน้ำพุร้อนในบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยให้เป็นจีนัสเดี่ยวๆ สำหรับนำไปศึกษาและใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

2. หาลักษณะเฉพาะของการทนอุณหภูมิสูงโดยการศึกษาอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ สำหรับเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปศึกษาและใช้ประโยชน์

3. เพื่อทดลองเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้เป็นจีนัสเดี่ยวๆ โดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization) เพื่อจะนำกลับมาเลี้ยงในลักษณะมีชีวิต

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

แยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อนบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย และหาลักษณะเฉพาะของการทนอุณหภูมิสูงโดยการศึกษาอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญ ผลสำเร็จจากโครงงานพิเศษนี้จะสามารถแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากแหล่งน้ำพุร้อนให้เป็นจีนัสเดี่ยวๆและทราบถึงข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการเจริญ เพื่อนำไปวิจัยถึงการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านโภชนาการ อุตสาหกรรม การแพทย์ และการเกษตรในอนาคตต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. คัดแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทนอุณหภูมิสูงจากน้ำพุร้อนบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย แล้วนำมาเพาะเลี้ยงให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น เพื่อนำไปศึกษาและใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

2. เพื่อทราบถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากแหล่งน้ำพุร้อน

3. เพื่อทราบถึงความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากแหล่งน้ำพุร้อน

4. เพื่อทราบถึงวิธีการเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้เป็นจีนัสเดี่ยวๆได้ในลักษณะมีชีวิต

1.5 ขั้นตอนในการทำโครงงานพิเศษ

ขั้นที่ 1 การเก็บตัวอย่างจากน้ำพุร้อน

เก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำพุร้อนบริเวณภาคเหนือดอนบนของประเทศไทย กำหนดการเก็บที่ช่วงอุณหภูมิ 30 - 80°C ที่ค่า pH 7-10 โดยเก็บตัวอย่างจากน้ำพุร้อนจากดอยสะเก็ด อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ และน้ำพุร้อนบ้านห้วยทรายขาว อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเก็บตัวอย่างมาแยกในห้องปฏิบัติการ

- สาหร่ายที่เป็นเส้นสาย เก็บโดยใช้ปากคีบใส่ขวดเก็บตัวอย่าง

- สาหร่ายที่อยู่บริเวณพื้นท้องน้ำไม่สามารถใช้ปากคีบ คีบได้ จะเก็บโดยใช้ pipette ดูดใส่ขวดเก็บตัวอย่าง

- สาหร่ายที่เกาะอยู่บนหิน จะเก็บโดยการใช้ปากคีบหรือมีดขูด ใส่ขวดเก็บตัวอย่าง หรือบางครั้ง ถ้า substrate ที่สาหร่ายเกาะมีขนาดเล็กจะเก็บใส่ถุงพลาสติกทั้งหมด

ขั้นที่ 2 การเตรียมอาหารและแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินให้เป็นจีนัสเดี่ยวๆ

- การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ใช้อาหารสูตร BG-11 เตรียมทั้งอาหารเหลวและอาหารแข็ง

- นำตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บจากช่วงอุณหภูมิต่างๆใส่ลงในอาหาร BG-11 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม จนสาหร่ายเจริญจึงทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate และ enrichment culture สังเกตการณ์เจริญและเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ทำซ้ำหลายๆครั้งจนกว่าจะได้สาหร่ายโคโลนีเดี่ยวๆ

ขั้นที่ 3 บ่งชี้ลักษณะของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่แยกได้เป็นจีนัสเดี่ยวๆ

บ่งชี้ชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการจำแนกเป็นหมวดหมู่ในระดับจีนัส

ขั้นที่ 4 หาลักษณะเฉพาะของการทนอุณหภูมิสูงโดยการศึกษาอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเจริญ

- ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญ เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยสูตรอาหาร BG-11 ที่อุณหภูมิต่างๆ เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความขุ่นของเซลล์

- ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการเจริญ เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยสูตรอาหาร BG-11 ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

ขั้นที่ 5 เก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้เป็นจีนัสเดี่ยวๆ ด้วยวิธีต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

ในธรรมชาติสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง มีอยู่หลายแห่ง แต่ละแห่งก็แตกต่างกัน ที่รู้จักดีก็คือ บ่อน้ำพุร้อน (Hot spring/geysers) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีซัลเฟอร์อยู่มาก (Solfataras) และในสภาวะ Hydrithermal environments เช่น ปล่องภูเขาไฟ (vent) และภูเขาไฟใต้ทะเล (seamount/ Underwater volcanoes) ซึ่งในสภาพแวดล้อมเช่นนี้เป็นที่ที่สิ่งมีชีวิตเจริญอยู่ได้ยากแต่ยังมีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถอาศัยและเจริญได้ดีในสภาพแบบนี้ บ่อน้ำพุร้อนมากมายที่อุณหภูมิของน้ำอยู่ที่จุดเดือดของน้ำ คือ 92-93 °C ธารน้ำที่ไหลออกจากบ่อน้ำพุร้อนนี้ อุณหภูมิของน้ำจะลดลงตามระยะทางที่ห่างออกมาจากบ่อ ช่องทางน้ำไหล (effluent chanal) ของน้ำพุร้อนจะมี microbial mats เจริญในลักษณะเป็นรูปตัววี โดยที่ขอบลำธารอุณหภูมิต่ำกว่าตรงกลางทางน้ำ การที่อุณหภูมิค่อยๆลดลงเป็นอันดับทำให้สามารถพบจุลินทรีย์หลายชนิดที่เจริญได้ดีแตกต่างกัน จุลินทรีย์ทนร้อนที่พบในน้ำพุร้อนต่างๆ มีทั้งพวกที่เจริญแบบมีอากาศ (aerobe) และพวกที่เจริญในที่ไม่มีอากาศ (anaerobe) จากการศึกษาจุลินทรีย์ที่เจริญตามบ่อน้ำพุร้อนต่างๆทำให้ทราบถึงอุณหภูมิสูงสุดที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ ซึ่งจะเห็นว่าจุลินทรีย์ที่พบมีทั้ง Algca, Fungi, Protozoa, Cyanobacteria, Eubacteria และ Archaeabacteria

ชัชชฎาและปริณดา (2545) กล่าวว่า อุณหภูมินับเป็นปัจจัยทางธรรมชาติที่สำคัญที่สุด และความสามารถในการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ที่อุณหภูมิสูงนั้นแตกต่างกัน ได้มีการจำแนกสิ่งมีชีวิตออกได้ 3 กลุ่มใหญ่คือ Eucary Archaea และ bacteria ชนิดที่พบในสภาพทนร้อนสูงกว่า 100 °C โดยจัดให้อยู่ในกลุ่ม Extreme thermophile ซึ่งมีเยื่อหุ้มเซลล์และเอนไซม์ที่สามารถคงตัวอยู่ได้ที่อุณหภูมิสูง และเป็นที่ยอมรับว่า Thermophilic microorganisms จะต้องมีอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum growth microorganisms) เกิน 45 °C (115 องศาฟาเรนไฮต์)

Thermophilic eubacteria จะถูกแบ่งออกเป็น 3 ชนิด

1. Facultative thermophiles สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิที่ 45-65°C ได้แต่ก็ยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30°C ได้เช่นกัน ในกลุ่มนี้เรามักพบว่าเป็นต้นเหตุของการเน่าเสียของอาหารกระป๋อง เช่น *Bacillus coagulans*

2. Extreme thermophilies (Caldoactive bacteria) เป็นพวกที่เจริญได้ดีในช่วงตั้งแต่ 40 °C ถึงประมาณ 70 °C ประกอบด้วย Gram-positive Endospore – forming Bacteria เช่น *Bacillus caldolyticus* และ Gram-negative เช่น *Genera thermus*

3. Hyperthermophiles สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิช่วง 55°C ถึง 80-110°C ในกลุ่มนี้เป็นที่สนใจมาก โดยมีส่วนน้อยที่เป็นพวก Eubacteria โดยส่วนใหญ่เป็นพวก Archaeabacteria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ลักษณะทั่วไป ชนิดและการเกิดของน้ำพุร้อน

น้ำพุร้อนเป็นแหล่งน้ำธรรมชาติ ส่วนใหญ่เกิดในบริเวณที่หินเลื่อนและรอยแตกซึ่งมีขนาดใหญ่และมีการเคลื่อนที่ ทำให้เกิดการแผ่ความร้อนระหว่างรอยเลื่อนและรอยแตกของหิน จากการพิจารณาคุณสมบัติทางเคมีพบว่า น้ำพุร้อนมีต้นกำเนิดมาจากน้ำฝนที่ตกลงมาสู่ผิวโลกและบริเวณข้างเคียง ซึ่งมักจะเกิดในบริเวณที่น้ำไหลออกมาตามธรรมชาติ ปริมาณน้ำพุร้อนที่ไหลขึ้นมาหรือถูกปล่อยออกมาตามธรรมชาติจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับบริเวณ ปกติแล้วปริมาณของน้ำที่ไหลออกมาจะสม่ำเสมอไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล (วราภรณ์, 2545)

อุดมลักษณ์ (2544) กล่าวว่า น้ำพุร้อน (hot spring water) คือน้ำที่ไหลหรือขึ้นมาจากใต้พื้นดิน โดยอาศัยความกดดันของของเหลว (hydrostatic pressure) ที่มีอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิของน้ำบนผิวโลกทั่วไป ความร้อนของน้ำพุอาจเกิดเมื่อน้ำบาดาลไหลซอนลึกลงไปใต้ผิวโลก แล้วได้รับความร้อนจากภายในโลก หรือเกิดจากน้ำที่กระจายออกจากหินหลอมเหลวแล้วพุขึ้นมาตามรอยแยก

การเกิดน้ำพุร้อนโดยทั่วไปจะต้องมีองค์ประกอบสำคัญ ดังนี้

- แหล่งความร้อนใต้ดิน เกิดจากการถ่ายเทความร้อนของหินอุ้มน้ำใต้ดินไปยังน้ำเย็นจากผิวดินซึ่งไหลซึมลงไปใต้โลก ทำให้น้ำเย็นเปลี่ยนเป็นน้ำร้อน แล้วพุ่งขึ้นมาตามรอยแยก
- น้ำใต้ดินและน้ำผิวดิน
- แหล่งเก็บกักน้ำหรือชั้นหินอุ้มน้ำในดิน

เกณฑ์ในการจำแนกน้ำพุร้อนมีการจำแนกตามสภาพความเป็นกรด-ด่างไว้ดังนี้

1. Alkaline springs มี pH 9.0 มีมวลชีวภาพของสาหร่ายมากที่สุด น้ำพุร้อนมักเป็นน้ำพุร้อนประเภทนี้

2. Calcium carbonate spring มีแคลเซียมคาร์บอนเนตทับถมเป็นชั้นๆ มวลชีวภาพของสาหร่ายมีน้อยกว่าน้ำพุร้อนแบบ alkaline springs

3. Acid spring มี pH 2.1 ไม่พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน แต่พบสาหร่ายเซลล์เดียว พวก eukaryotic คือ *Cyanidium* sp. เป็นจำนวนมาก

การจำแนกน้ำพุร้อนตามลักษณะที่ปรากฏได้ 3 ชนิด ดังนี้

1. Seep spring มีลักษณะเป็นแหล่งเป็นแอ่งเล็กๆมีน้ำขัง หรือเป็นร่องเล็กๆที่มีน้ำไหล

2. Pool spring มีลักษณะเป็นบ่อหรือแอ่ง ซึ่งอาจจะมีน้ำใส หรือโคลนตมผสมอยู่ด้วย

3. Geyser มีลักษณะเป็นบ่อหรือแอ่ง มีน้ำพุพุ่งขึ้นมาจากบริเวณเหนือผิวดิน

น้ำพุร้อนบริเวณภาคเหนือของประเทศไทยส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นแบบ alkaline springs และแบบ pool springs อุณหภูมิตั้งแต่ 45 – 100 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งน้ำพุร้อนในภาคเหนือของประเทศไทยแบ่งออกเป็น 3 ระบบ ดังนี้

1. ระบบน้ำพุร้อน (hot spring system)

อุณหภูมิของน้ำพุร้อนอยู่ระหว่าง 50 - 100 °C และมีปริมาณสารละลายค่อนข้างสูง ได้แก่ แหล่งสันกำแพง ฝาง จังหวัดเชียงใหม่

2. ระบบน้ำพุร้อนอุ่น (warm spring system)

คือระบบที่อุณหภูมิของน้ำพุร้อนต่ำกว่า 50 °C และมีปริมาณสารละลายค่อนข้างต่ำ ได้แก่ แหล่งบ้านแม่ฮี

3. ระบบน้ำพุร้อนไกเซอร์ (geyser)

คือระบบน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิสูงแรงดันสูงมาก น้ำพุร้อนจะพุ่งเหนือระดับพื้นดินตลอกเวลา หรือครั้งคราว ได้แก่ แหล่งน้ำพุร้อนโป่งเดือด จังหวัดเชียงใหม่

2. องค์ประกอบทางกายภาพของน้ำพุร้อน

สุมาลีและวิไล (2525) และวิลิศ (2547) กล่าวว่า องค์ประกอบทางกายภาพที่มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของสิ่งมีชีวิตในบริเวณน้ำพุร้อน มีดังนี้

2.1 อุณหภูมิ

จำนวนชนิด (species) ของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำพุร้อนมีจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับแหล่งน้ำอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากสิ่งมีชีวิตบางชนิดไม่อาจดำรงชีวิตอยู่ได้ในแหล่งน้ำที่มีระดับอุณหภูมิสูง สิ่งมีชีวิตชนิดนี้สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแหล่งที่อยู่ที่มีอุณหภูมิสูงเท่านั้นที่จะสามารถดำรงชีวิตอยู่และกระจายพันธุ์ได้

2.2 แสง

แสงเป็นปัจจัยสำคัญยิ่งปัจจัยหนึ่งต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต แสงมีผลโดยตรงต่อการสร้างอัตราการผลิต (productivity) ของสิ่งมีชีวิต

Iceland ซึ่งเป็นน้ำพุร้อนขนาดใหญ่ มีระดับอุณหภูมิคงที่ แต่ได้รับแสงในปริมาณต่ำ พบว่าปริมาณแสงมีผลต่อการสังเคราะห์อาหารมาก ทำให้ประชากรสาหร่ายในช่วงฤดูหนาวมีจำนวนลดลง และผลที่ตามมาก็คือประชากรสัตว์ในบริเวณนั้นลดจำนวนลงด้วยเพราะขาดอาหารและออกซิเจน

2.3 ความขุ่น (turbidity)

สีและความใสของน้ำพุร้อนขึ้นกับการปรากฏตัวของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

2.4 อัตราการไหลของน้ำ

อัตราการไหลของน้ำพุช่วยให้สะดวกต่อการคำนวณหาอัตราการนำน้ำร้อนไปใช้ประโยชน์ในกิจการต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

pH หมายถึง ค่าลบของ log ของ activity ของไฮโดรเจน

$$pH = - \log [H^+]$$

ช่วงของ pH จะเกี่ยวกับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิดในน้ำ มีผลต่อการควบคุมการปล่อยสารอาหารออกมาลงสู่แหล่งน้ำ

2.6 ความเป็นด่างของน้ำ

สภาพความเป็นด่างของน้ำหมายถึงความสามารถของน้ำที่รับ H^+ เพื่อให้กรดเป็นกลาง ปริมาณของสภาพด่างมีค่าเท่ากับปริมาณของกรดแก่และทั้งคู่มีความสัมพันธ์กับความเป็นกรด-ด่าง โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่างยิ่งสูงยิ่งมีค่าความเป็นด่างมาก

2.7 ความนำไฟฟ้า (specific conductance or conductivity)

ความนำไฟฟ้าหมายถึงความสามารถของน้ำในการเป็นสื่อนำกระแสไฟฟ้า ตัวการที่เป็นสื่อในการนำไฟฟ้าในน้ำคือ อิออน ของสารประกอบอนินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอนินทรีย์ ด่างและเกลือ ความนำไฟฟ้าจะมีปริมาณมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปริมาณความหนาแน่นของสารประกอบอนินทรีย์

2.8 ความกระด้าง (Hardness)

ความกระด้างของน้ำ (water hardness) โดยทั่วไปหมายถึง ปริมาณของเกลือแคลเซียมและแมกนีเซียม (calcium and magnesium salts) ที่ละลายอยู่ในน้ำ แต่จะหมายถึงแร่ธาตุอื่นๆความกระด้างของน้ำแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ความกระด้างชั่วคราว (Temporary hardness) โดยเกิดจากสารละลายของแคลเซียม (calcium) หรือแมกนีเซียมไบคาร์บอเนต (magnesium bicarbonate) ซึ่งเมื่อถูกความร้อนจะตกตะกอนกลายเป็นหินปูน (carbonate) ส่วนความกระด้างถาวร (permanent hardness) เกิดจากสารละลายพวก calcium หรือ magnesium carbonate และอาจเป็นเกลือของกรดบางชนิด เช่น calcium sulfate สามารถแบ่งประเภทของน้ำตามระดับความกระด้างได้ดังต่อไปนี้

0-75	mg/l	น้ำอ่อน
75-150	mg/l	น้ำกระด้างปานกลางหรือเล็กน้อย
150-300	mg/l	น้ำกระด้าง
300	mg/l	น้ำกระด้างมาก

3. ประโยชน์ที่ได้รับจากน้ำพุร้อน

วราภรณ์ (2545) กล่าวว่า น้ำพุร้อนเป็นแหล่งพลังงานใต้พิภพที่สำคัญ นำมาใช้ให้เกิดประโยชน์แก่มนุษย์อย่างมากมาย โดยสามารถนำไปผลิตกระแสไฟฟ้า นำไปใช้กับเครื่องบ่มแห้ง ผลิตผลทางการเกษตร และใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย ทางด้านชีววิทยามีผู้สนใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในน้ำพุร้อน ทั้งชนิด จำนวน และสรีรวิทยา เพื่อนำมาวิเคราะห์ถึงประโยชน์และโทษจากสิ่งมีชีวิตเหล่านี้

บริเวณน้ำพุร้อนจะมีการไหลของน้ำพุร้อนไปตามลำธาร คลอง ทำให้มีระดับความร้อนแตกต่างกัน สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อนจึงมีการปรับตัว (adaption) โดยสาหร่ายแต่ละชนิดจะเจริญได้ในระดับอุณหภูมิที่ต่างกันและการที่สิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถเจริญได้นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยดังนี้

- ปัจจัยทางกายภาพ (physical factor)
- ปัจจัยทางเคมี (chemical factor)
- ปัจจัยทางชีวภาพ (biology factor)

1. ปัจจัยทางกายภาพ

ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิต ในน้ำพุร้อน มีหลายประการ เช่น แสงสว่าง เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต ความเข้มแสงมีผลต่อผู้ผลิตขั้นปฐมภูมิ อุณหภูมิ การวัดการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อุณหภูมิต่างๆ สามารถวัดได้จาก ปริมาณคลอโรฟิลล์ โปรตีน และ RNA เป็นเครื่องบ่งชี้ โดยกำหนดสิ่งแวดล้อมอื่นๆคงที่ และความเป็นกรด-ด่าง ยังมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีกด้วย

2. ปัจจัยทางเคมี

การละลายของออกซิเจนในน้ำ ปริมาณการละลายของออกซิเจนในน้ำ จะแปรผันตามอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการละลายของออกซิเจนได้ลดลง ซึ่งมีผลต่อชนิดและจำนวนของสิ่งมีชีวิตในน้ำพุร้อน นอกจากนั้นยังมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ซึ่งมีผลต่อการกระจายตัวของจุลินทรีย์ ในน้ำพุร้อนส่วนใหญ่จะมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ต่ำจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์แต่มีผลน้อยต่อสาหร่าย

3. ปัจจัยทางชีวภาพ

ความสมดุลของมวลชีวภาพเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงการแทนที่ของสิ่งมีชีวิตจึงทำให้สิ่งมีชีวิตอยู่ในสภาวะคงตัว นอกจากนั้นยังมีการถ่ายทอดพลังงานภายในแหล่งน้ำพุร้อน

4. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ยุวดี (2546) กล่าวว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีชื่อเรียกว่า cyanophytcs จัดอยู่ใน Division Cyanophyta แต่ผู้เชี่ยวชาญทางแบคทีเรียจะเรียกว่า cyanobacteria หรือ blue green bacteria ทั้งนี้เพราะสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีโครงสร้างของนิวเคลียสคล้ายคลึงกับนิวเคลียสของแบคทีเรีย และบางชนิดยังสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายแบคทีเรียด้วย แต่อย่างไรก็ตามนักสาหร่ายก็ยังจัดกลุ่มสาหร่ายพวกนี้แยกออกมาจากแบคทีเรีย เพราะสาหร่ายชนิดนี้มีคลอโรฟิลล์เอ และมีการปล่อยออกซิเจนสู่สิ่งแวดล้อมจากกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งไม่พบในแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการพบซากดึกดำบรรพ์ (fossil) ในยุค Archaezoic ซึ่งเป็นเวลากว่า 2 พันล้านปีมาแล้ว ทำให้เข้าใจว่าสาหร่ายใน division นี้ เป็นสิ่งมีชีวิตที่โบราณที่สุดในบรรดาสิ่งมีชีวิตทั้งหลายที่มีคลอโรฟิลล์อยู่ในเซลล์ และจะพบสาหร่ายพวกนี้บริเวณอุณหภูมิสูงมาก เช่น ในบ่อน้ำพุร้อน หรือบริเวณที่มีอากาศหนาวเย็น เช่น ในหิมะ หรือบริเวณขั้วโลก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ของสาหร่ายชนิดนี้มีเมือก (gelatinous sheath) หุ้ม จึงสามารถเก็บความชื้นไว้ในเซลล์ และสามารถเป็นฉนวนกันความร้อน ความเย็นให้กับเซลล์ได้ อีกประการหนึ่ง คือ โมเลกุลของโปรตีนภายในโปรโตพลาสซึมจับตัวกันแน่น จึงอาจจะเป็นเหตุช่วยให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้นาน

4.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ขุวดี (2546) กล่าวถึงลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไว้ดังนี้

4.1.1 รงควัตถุ รงควัตถุของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ประกอบด้วย

a. คลอโรฟิลล์ เป็นคลอโรฟิลล์เอ

b. แคโรตินอยด์ ประกอบด้วย

- เบต้าแคโรทีน
- แซนโทฟิลล์หลายชนิด ส่วนใหญ่จะเป็นมิกโซแซนทิน มิกโซแซนโธฟิลล์

c. ไฟโคบิลิน ประกอบด้วย

- ซี – ไฟโคไซยานิน
- อัลโลไฟโคไซยานิน
- ซี – ไฟโคเออริทริน

การที่สาหร่ายมีทั้งคลอโรฟิลล์และซี - ไฟโคไซยานิน จึงทำให้มองเห็นเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน ถ้าสาหร่ายชนิดไหนมีซี - ไฟโคเออริทรินมากอาจมองเห็นเป็นสีแดงปนอยู่ด้วย สัดส่วนของรงควัตถุดังกล่าวมีต่างกัน ทำให้สาหร่ายชนิดนี้มีสีแตกต่างกันไป เช่น มีสีตั้งแต่สีเขียว (grass-green) ไปจนถึงดำหรือแดง และสีที่เป็นสีกึ่งกลางของสีเหล่านี้

4.1.2 ส่วนประกอบของเซลล์

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีผนังเซลล์ 2 ชั้น ชั้นในบาง จะประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลส ผนังชั้นนอกหนา ประกอบด้วยสารพวกเจลาติน

ชัชชฎาและปริณดา (2545) อ้างถึง Holt และคณะ (1994) ซึ่งกล่าวว่าผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) บางชนิดจะคล้ายกับพวกแบคทีเรียแกรมลบและสามารถพบ peptidoglycan ได้ที่ผนังเซลล์ มีไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หลายชนิดที่สร้างเปลือก (sheath) ที่เป็นเมือกเหนียวมาหุ้ม ซึ่งจะเชื่อมกลุ่มของเส้นใยเอาไว้ด้วยกัน Photosynthetic lamellar membrane system ส่วนมากจะซับซ้อนและมีหลายชั้น ดังนั้นในไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) บางชนิด lamellae จะรวมกลุ่มอยู่รอบๆผิวนอกของไซโตพลาสซึม (cytoplasm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 รูปร่าง

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีรูปร่าง 2 แบบ คือ

a. รูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยวหรือโคโลนีไม่เป็นเส้นสาย (non filamentous form)

อาจจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เช่น *Chroococcus* หรืออาจอยู่รวมกันเป็นโคโลนีแบบพาล์เมลลา (palmellate form) เช่น *Merismopedia*, *Eucapsis*, *Anacystis* เป็นต้น เซลล์ของพวกนี้มีรูปร่างต่างๆกัน เช่น กลม รูปไข่ ทรงกระบอก หรือรูปไข่แบบแหลมหัวแหลมท้าย พวกที่อยู่เป็นโคโลนีแบบพาล์เมลลาอาจมีลักษณะของโคโลนีกลม แบน สี่เหลี่ยม หรือมีรูปร่างที่แน่นอนก็ได้

b. รูปร่างเป็นเส้นสาย (filamentous form)

เกิดจากเซลล์หลายเซลล์มาต่อกันจนมีรูปร่างเป็นสายยาว เส้นสายนี้อาจจะตรงและเรียบ ไม่มีการแตกแขนง เช่น *Oscillatoria*, *Lyngbya* เป็นต้น บางชนิดเส้นสายนั้นอาจมีปลายโค้งงอหรือบิดเป็นเกลียว เช่น *Arthrospira* เป็นต้น บางชนิดเป็นเส้นสายที่แตกแขนง ในพวกที่เป็นเส้นสายนี้ ส่วนของเซลล์ที่เรียงกันเป็นแถวเรียกว่า ไตรโคม (trichrome) ดังนั้น ในแต่ละเส้นสายจึงประกอบด้วยไตรโคมและซีทรวมกัน

4.1.4 การเคลื่อนที่ (movement of motility)

การเคลื่อนที่ของสาหร่ายเกิดจากปัจจัยหลายประการ คือ

1. สาหร่ายจะผลิตสารเมือก แล้วขับออกมาทางรูเล็กๆ บริเวณผนังเซลล์ ทำให้เกิดแรงผลักดันน้ำรอบๆ สาหร่ายจึงเคลื่อนที่ไปได้

2. เกิดจากการยืดและหดตัวของเซลล์ในสายไม่เท่ากัน บางเซลล์ยืดตัว บางเซลล์หดตัว ทำให้เกิดเป็นคลื่นจึงเคลื่อนที่ไปได้

3. เกิดจากการแลกเปลี่ยนน้ำกับสารละลายภายในเซลล์ด้วยกระบวนการออสโมซิส ซึ่งมีไม่เท่ากันตลอดทั้งสาย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแรงตึงผิว (surface tension) ทำให้สาหร่ายเคลื่อนที่ไปได้

การเคลื่อนที่ของสาหร่ายจะขึ้นอยู่กับปัจจัยของสิ่งแวดล้อม อันได้แก่ อุณหภูมิ และความเข้มแสง พบว่าถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นและความเข้มแสงมีมากขึ้น จะทำให้การเคลื่อนที่มีมากขึ้นด้วย

4.1.5 การเปลี่ยนสี (chromatic adaptation)

การเปลี่ยนสีของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จะขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นแสง (wave length) และความเข้มของแสง (intensity) Gaidukov ได้ตั้งสมมุติฐานที่เรียกว่า "Gaidukov phenomenon" ซึ่งอธิบายว่า สาหร่ายสามารถเปลี่ยนสีได้ดี เมื่อเลี้ยงในที่ที่มีแสงสีต่างๆกัน (ซึ่งมีความยาวคลื่นแสงต่างกัน) ทั้งนี้เพราะแสงสีต่างกันทำให้สาหร่ายสร้างรงควัตถุปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน

Gaidukov ได้ใช้ *Oscillatoria* ทดลองให้แสงสีเขียว สาหร่ายชนิดนี้จะมีสีแดง เพราะแสงสีเขียวไปกระตุ้นให้สร้างรงควัตถุสีแดงพวกไฟโคเอออริทริน แต่ถ้าเลี้ยงในแสงสีแดงจะทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายมีสีน้ำเงินมากขึ้น เพราะแสงสีแดงกระตุ้นให้สร้างไฟโคไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุสีน้ำเงิน เป็นต้น ส่วนอีกการทดลองหนึ่งให้ความเข้มของแสงต่างกัน พบว่าถ้าให้ความเข้มของแสงสูง สาหร่ายจะมีสีน้ำเงิน ถ้าความเข้มของแสงต่ำจะเป็นสีแดง ซึ่งตรงกับความจริงตามธรรมชาติที่ว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ขึ้นในระดับน้ำลึกๆ จะมีสีแดงหรือสีม่วง ส่วนที่ขึ้นอยู่ที่ผิวหน้าน้ำ หรือผิวดินจะมีสีน้ำเงินเข้ม

4.2 Microbial Mats

ชัชชฎาและปริณดา (2545) กล่าวถึง microbial mat ว่า microbial mat เป็นตัวอย่างของที่อาศัยของสิ่งมีอยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตในน้ำ ซึ่งมีชีวิตหลายกลุ่มอาศัยอยู่ร่วมกันจนเกิดเป็น mat บางๆ ซึ่งสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้จะทำปฏิกิริยากับตัวอื่นที่อยู่ในช่องว่างและเกิดการเจริญร่วมกันที่เรียกว่า temporal physiological coupling ระดับความหนาของ mat เป็นสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเจริญอยู่ร่วมกันในสิ่งแวดล้อม เช่น surface - planktonic interface ของน้ำพุร้อน ร่องลึกในทะเล ทะเลสาบที่มีปริมาณเกลือสูง และอ่าวทะเล ได้มีอธิบายลักษณะเป็นชั้นของ microbial mat ไซยาโนแบคทีเรียอาศัยอยู่บนชั้นของ mat ซึ่งสามารถรับแสงได้เพียงพอ ไซยาโนแบคทีเรียทำหน้าที่เป็น primary producer คือเป็นแหล่งสำคัญที่ผลิตสารประกอบอินทรีย์ภายใน microbial mat การสังเคราะห์แสงของไซยาโนแบคทีเรียจะทำให้เกิดออกซิเจนบนผิวชั้นบนของ mat การสังเคราะห์แสงสร้างสภาวะ Oxygen - supersaturated ในตอนกลางวัน แต่ตอนกลางคืนไม่มีแสง จุลินทรีย์จะเกิดการหายใจโดยใช้ออกซิเจน ขบวนการสำคัญที่ใช้ออกซิเจนคือการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ โดยใช้ไซยาโนแบคทีเรียและรวมถึงกิจกรรมของ sulfate - reducting แบคทีเรียด้วย อย่างไรก็ตามใน microbial mat พวก sulfate-reducing แบคทีเรีย จะมีประสิทธิภาพเมื่ออยู่ชั้นบนที่มีออกซิเจน แหล่งไนโตรเจนสำหรับ mat ได้จากการตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งจะทำหน้าที่ภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจนเท่านั้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการรีดิวซ์ไนโตรเจนและซัลเฟอร์ของพวกไม่ใช้ออกซิเจนจะเป็นแหล่งพลังงานสำหรับ nitrifying แบคทีเรียและ sulfur-oxidizing แบคทีเรีย ความสัมพันธ์แบบใกล้ชิดระหว่าง nitrification bacteria และ sulfur oxidizing bacteria กับไซยาโนแบคทีเรียและขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนที่จะทำให้วัฏจักรไนโตรเจนและซัลไฟด์สมบูรณ์

ชั้นของตะกอนที่มีปริมาณเหล็กออกไซส์สูงจะอยู่ได้ชั้นของไซยาโนแบคทีเรีย แหล่งกำเนิดของชั้นเหล็กออกไซส์ยังไม่เป็นที่ทราบ แต่จะปรากฏอยู่ในชั้นระหว่างพวกสังเคราะห์แสงแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน purple sulfur แบคทีเรียสามารถสร้างขึ้นอยู่ข้างล่างจุดเชื่อมของพวกออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน purple sulfur แบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ แต่เมื่อเทียบกับไซยาโนแบคทีเรีย purple sulfur แบคทีเรียมีการพัฒนาด้านกระบวนการสังเคราะห์แสงต่ำกว่า และไม่สามารถเกิดขบวนการ photolysis ของน้ำ purple sulfur แบคทีเรียจะใช้ซัลไฟด์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งซัลไฟด์นี้ได้มาจากกิจกรรมของ sulfate- reducing แบคทีเรีย จะพบ purple

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sulfur แบคทีเรีย ใน microbial mat หรือสิ่งแวดอมแบบไม่ใช้ออกซิเจนอื่นๆ เพราะว่ารงควัตถุสีม่วงที่เห็นชัด ชั้นข้างล่าง purple sulfur แบคทีเรียจะมีสีดำเนื่องจากการเกิดตะกอนของ FeS

microbial mat เป็นสิ่งมีชีวิตมีลักษณะพิเศษเพราะว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกันมีองค์ประกอบของรูปแบบแบ่งเป็นชั้นๆและเห็นแถบสีชัดเจน จะพบ mat ได้บ่อยไซยาโนแบคทีเรียเป็นพวกที่ทนสภาวะที่ผิดปกติได้ เช่น อุณหภูมิสูง ฟอสซิลของ microbial mat ที่รู้จักกันดีคือ stromatolite มีอายุ 3.5 พันล้านปี ซึ่งในขณะบรรยากาศของโลกยังไม่มีออกซิเจน และ stromotolite เป็น anoxyenic phototrophic แบคทีเรีย คือ purple และ green sulfur แบคทีเรีย

4.3 ปัจจัยที่ผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

จริญ (2547) และ นิติมา (2547) ได้กล่าวถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไว้ ดังนี้

4.3.1 ปัจจัยทางกายภาพ

ก. แสงสว่าง (Illumination) ช่วงแสงสว่างเป็นเรื่องที่จำเป็นมากในการเลี้ยงสาหร่าย โดยการใช้แสงที่ช่วงเวลาหนึ่งและหยุดการใช้แสงช่วงเวลาหลังจะทำให้การเลี้ยงได้ผลดีกว่าการให้แสงดิดต่อกันตลอดเวลา แสงสว่างที่นิยมใช้คือ 12 ชั่วโมงให้แสง 12 ชั่วโมงหยุดการให้แสง หรือ 12 ชั่วโมงสว่างสลับกับ 8 ชั่วโมงมืด

แสงจากหลอดไฟธรรมดาจะให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือ แสงแดดและแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ แต่แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์จะมีข้อดีที่ไม่ทำให้เกิดความร้อน

ข. อุณหภูมิ (Temperature) สาหร่ายทุกชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับอุณหภูมิตั้งแต่ 15-25 °C ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 30 °C สาหร่ายจะตาย สำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเจริญได้ดีในช่วง 30-35 °C

ค. ปริมาณออกซิจนที่ละลายในแหล่งน้ำ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีความเกี่ยวข้องกับความยาวเส้นสายของ *Oscillatoria tenuis* ในทุกฤดูกาล ซึ่งในช่วงฤดูใบไม้ผลิ จะมีค่าเฉลี่ยความยาวเส้นสายดีที่สุด และเมื่อค่าออกซิเจนสูงทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเจริญเติบโตได้ดี

4.3.2 ปัจจัยทางเคมี

ก. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยทั่วไปสาหร่ายส่วนมากจะเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่มีสภาพเป็นด่าง ส่วนสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะเจริญได้ดีในน้ำที่มีสภาพเป็นกลางจนถึงสภาพเป็นด่าง หรือมีค่าของ pH ประมาณ 6.5-7.5

ข. ความเค็มเมื่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ได้รับความเข้มข้นของ NaCl จะมีผลกระทบทำให้เกิดการลดลงของน้ำหนักแห้งที่สะสม และทำให้คลอโรฟิลล์ลดลง จึงทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีการสังเคราะห์แสงน้อยลง ส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค. ไนโตรเจน สาหร่ายที่ขาดไนโตรเจนจะสร้างสารประกอบคาร์บอน เช่น น้ำมัน หรือแป้ง มาทดแทน สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่พืชนำไปใช้ได้แก่ ยูเรีย (urea) เอไมด์ (amide) กลูตามีน (glutamine) และแอสพาราจีน (asparagine) ซึ่งจัดว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดดี ถ้าสาหร่ายขาดไนโตรเจนจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสง และปริมาณรงควัตถุ หรือสารสีของเซลล์ รวมทั้งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดลดลงด้วย

ง. ฟอสฟอรัส เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เพราะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆของเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายเทพลังงาน และกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิค ถ้าสาหร่ายขาดฟอสฟอรัสจะมีผลต่อการเจริญเติบโต คือปริมาณโปรตีน รงควัตถุชนิดคลอโรฟิลล์เอ RNA และ DNA จะลดลง แต่แป้ง หรือคาร์โบไฮเดรตกลับเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

จ. ซัลเฟอร์ เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายทุกชนิด ซัลเฟอร์ที่สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้อยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ ได้แก่ เกลือของโลหะ คือซัลเฟต ซัลไฟท์ และซัลไฟด์

ฉ. แคลเซียม เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

ช. โซเดียม โปแทสเซียม และคลอรีน โซเดียมเป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายบางชนิดต้องการ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต้องการโซเดียมในปริมาณมากกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่นที่อยู่ในน้ำจืด โซเดียมเป็นธาตุอาหารที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด โปแตสเซียมเป็นธาตุอาหารที่มีส่วนประกอบของเอนไซม์หลายชนิดอัตราส่วนของโซเดียมและโปแตสเซียมจะมีผลต่อการใช้คลอรีนของสาหร่าย

ซ. แมกนีเซียม แมกนีเซียมเป็นธาตุอาหารที่มีส่วนสำคัญยิ่งต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยทั่วไปจะเป็นตัวกำหนดการทำงานของระบบเอนไซม์ไนโตรจีเนสและกลูตา-มีนซินเธเตส แมกนีเซียมซัลเฟต จะไปมีผลยับยั้งการเจริญของสาหร่ายถ้าใช้กับสาหร่ายโดยไม่มีสารประกอบพวกฟอสเฟต

ฌ. เหล็ก ในสภาพเป็นกรดเหล็กจะมีผลยับยั้งการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้

4.4 การวัดการเจริญเติบโตและชีวมวล (Growth and biomass measurement)

การวัดการเจริญของสาหร่าย แบ่งออกเป็น 4 วิธี ดังนี้ (นิติมา, 2547)

4.4.1 การนับเซลล์ (cell counts)

เป็นวิธีที่นิยมใช้มากในการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย อุปกรณ์ที่ใช้คือ กล้องจุลทรรศน์ และสไลด์นับเซลล์

4.4.2 การวัดการกระจายของแสงหรือความขุ่น (Light scattering or turbiditty)

นิยมใช้มากในการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อสาหร่ายบริสุทธิ์ ข้อดีของวิธีนี้คือ วัดง่ายและสะดวก ข้อมูลที่ได้เป็นค่าของชีวมวล (biomass) ที่เพิ่มขึ้นโดยการวัดจากค่าน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์ที่ใช้เรียกว่า colorimeter หรือสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ความเข้มแสงจะลดลงเมื่อจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น

4.4.3 การวัดน้ำหนักแห้ง (Dry weight measurement)

เหมาะกับสาหร่ายที่ไม่ใช่เซลล์เดี่ยวที่นับจำนวนเซลล์ไม่ได้ ฉะนั้นจึงนิยมใช้กับสาหร่ายชนิดที่เป็นเส้น วิธีวัดควรจะวัดทุกวันแล้วนำผลมาพล็อตกราฟ เริ่มการวัดโดยเก็บตัวอย่างจากภาชนะเลี้ยง กรองสาหร่ายออกจากน้ำโดยการปั่นให้ตกตะกอนรินน้ำใสข้างบนออก นำตัวอย่างไปอบให้แห้ง อุณหภูมิที่ใช้อบแห้งประมาณ 70-110 °C นานประมาณ 10-12 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่

4.4.4 การวัดคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll determination)

เป็นวิธีวัดชีวมวลที่รวดเร็ว เริ่มแรกให้เก็บตัวอย่างจากภาชนะเลี้ยง แยกเซลล์ออกโดยการปั่นให้ตกตะกอน ต่อจากนั้นจึงสกัดสารสีโดยเติมสารละลายเคมี ชนิดที่นิยมใช้ได้แก่ อะซิโตน เมธานอล อีเธอร์ เมื่อสกัดสารสีออกจากเซลล์แล้วให้กรองอีกครั้งหนึ่งเพื่อกำจัดตะกอนหรือสิ่งปนเปื้อนออกให้หมด นำสารละลายที่กรองได้ใส่ในหลอดแก้วที่สะอาดสำหรับวัดค่าคลอโรฟิลล์

ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิสูงนั้น วราภรณ์ (2545) อ้างถึง Cambell and Pace (1968) ซึ่งได้กล่าวไว้ว่า จุลินทรีย์พวก thermophile สามารถมีชีวิตอยู่รอดและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงเนื่องจากมีคุณสมบัติดังนี้คือ

คุณสมบัติที่ 1 เอนไซม์และโครงสร้างที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมีคุณสมบัติทนต่อความร้อนสูง ซึ่งเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูงแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้คือ กลุ่มแรก กลุ่มเอนไซม์ที่ทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิไม่เกิน 55-60 °C เช่น malic dehydrogenase, adenosine triphosphalase, inorganic pyrophosphapase, aldolas และ peptidase กลุ่มที่สอง กลุ่มเอนไซม์ที่จะทำงานเมื่อมีสารเริ่มต้นในปฏิกิริยาเท่านั้นเช่น asparagines deaminase, catalase, pyruvic acid oxidase และ isocitratelyase และกลุ่มสุดท้ายกลุ่มเอนไซม์และโปรตีนที่ต้านต่อความร้อนสูงเช่น α-amylase, protease, glyceraldehydes - 3 - phosphate dehydrogenase และ เอนไซม์ที่กระตุ้นการทำงานของกรดอะมิโน

คุณสมบัติที่ 2 เยื่อหุ้มเซลล์คงตัวเมื่อความร้อนสูง เนื่องจากพวก thermophile จะมีลิปิด (lipid) ที่ละลายในกรดไขมันเป็นจำนวนมาก การที่ลิปิดละลายในกรดไขมันทำให้เยื่อหุ้มเซลล์คงตัวจึงสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง ตรงข้ามกลับพวก psychrophile (สิ่งมีชีวิตที่เจริญในที่อุณหภูมิต่ำ) ที่ลิปิดไม่ละลายในกรดไขมันจึงทำงานได้เฉพาะที่อุณหภูมิต่ำและไม่คงตัวในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงนอกจากนี้จุดหลอมเหลวของลิปิดพวก thermophile จะสูง เยื่อหุ้มเซลล์ยืดหยุ่นได้บ้างเมื่อได้รับความร้อน รูมีขนาดใหญ่ขึ้น และเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีจึงยอมให้สารผ่านได้และทนต่อ osmotic shock

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติที่ 3 สามารถสร้างส่วนประกอบของเซลล์ขึ้นใหม่ได้อย่างรวดเร็ว เซลล์จะมีอัตราเมตาบอลิซึมสูงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง ทำให้มีการขนส่ง substrate และของเสียเข้าออกเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว

คุณสมบัติที่ 4 สามารถปรับตัวทางสรีรวิทยาให้ทำงานได้ดีในอุณหภูมิสูงหรือเท่ากับสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่อาศัยอยู่ในน้ำพุร้อนจะปรับตัวทางสรีรวิทยาให้ทำงานได้ดีในสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ และมีบางชนิดที่สามารถปรับตัวให้ทำงานได้ดีมากกว่าสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ เช่น *Cyanidim caldarium*

5. การแยกและการเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อน

เนื่องจากว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เจริญในน้ำพุร้อนมีความแตกต่างทางด้านสรีรวิทยาที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงซึ่งแตกต่างจากสาหร่ายชนิดอื่นอย่างชัดเจนวิธีการแยกและเก็บรักษาสาหร่ายชนิดนี้จึงแตกต่างไปจากสาหร่ายปกติ

การแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อนตามวิธีของวราภรณ์ (2545) สามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้

5.1 Enrichment culture เป็นการปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับสาหร่ายที่ต้องการการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากแหล่งน้ำทั่วไปด้วยการเพิ่ม cycloheximide ความเข้มข้น 50 mg/l ในสูตรอาหาร BG-11 สามารถกำจัดพวก eukaryote ที่ปนเปื้อนได้ แต่การเติม cycloheximide จะเติมเมื่อมีการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 °C เท่านั้น ส่วยการเติม NH_4Cl จะเป็นการกำจัดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางสปีชีส์เนื่องจากแอมโมเนียมีความเป็นพิษต่อสาหร่ายบางสปีชีส์เท่านั้น นอกจากนี้ยังมีการเติมสารเคมีบางตัว เช่น ไนโตรเจน จะเหมาะสำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Mastigocladus* spp. สปีชีส์ที่ไม่แตกแขนง ชนิด High Temperature Form ทำให้สามารถแยกสาหร่ายสปีชีส์นี้ออกจากสาหร่ายสปีชีส์อื่นได้

5.2 Direct isolation เป็นการแยกตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวจากน้ำพุร้อนโดยตรงด้วยหลายๆวิธี โดยไม่มีการปรับสภาวะก่อน ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 วิธี

5.2.1 Self-isolation of motile cells and trichom เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดในการแยกสาหร่ายที่เป็นเส้นสาย โดยการอาศัยการเคลื่อนที่ได้ของเซลล์ หรือ trichom บนอาหารแข็ง โดยการวางสาหร่ายบนจานอาหารเพาะเลี้ยงควรว่างตรงกึ่งกลางจาน และควรตรวจสอบการเคลื่อนที่ออกไปของเส้นสายด้วยกล้อง steriomicroscope สาหร่ายที่คัดแยกได้ในที่นี้ เช่น *Oscillatoria* spp. , *Pseudanabaena* spp. , *Phormidium* spp. , และ *Spirulina* spp. เป็นต้น

5.2.2 Micromanipulation หรือ หลอด capillary ที่ดูดเซลล์สาหร่ายขึ้นมาแล้วถ่ายลงในหลุมเล็กบนจานแก้วที่มีอาหารอยู่ จากนั้นทำการถ่ายต่อไปยังหลุมใหม่ประมาณ 3-5 ครั้ง แล้วจึงถ่ายลงอาหารเหลวในหลอดทดลองหรือขวดรูปชมพู่ การแยกด้วยวิธีการนี้สามารถลดจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ต้องการได้ แต่บางครั้งอาจใช้วิธี liquid dilution technique ในการแยกสาหร่ายเหล่านี้

5.2.3 Streaking and agar dilutions เป็นวิธีการแยกสาหร่ายโดยการ streak หรือ spread บนอาหารแข็ง ซึ่งสาหร่ายที่นำมาแยกอาจมาจากธรรมชาติ โดยตรงหรือผ่านขั้นตอนการปรับสภาวะแล้วก็ได้ ซึ่งการเตรียมอาหารที่ใช้ในการแยกสาหร่ายจากน้ำพุร้อนมีความสำคัญมาก ควรแยกนึ่งฆ่าเชื้อโรค อาหารวุ้น จากนั้นนำมาผสมกันที่อุณหภูมิประมาณ 45- 50 °C แล้วจึงเทลงในจานอาหาร ส่วนวิธี Agar dilutions หรือ agar shake เป็นการแยกโดยการนำตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้ว ผสมกับอาหารแข็งที่เติม $NaHCO_3$ ที่อุณหภูมิ 45 °C เขย่าให้ผสมกันในหลอดทดลองปล่อยให้แข็งตัว จะสามารถแยกสาหร่ายพวกเส้นสายออกจากสาหร่ายเซลล์เดียวได้

5.2.4 Isolation on filters เป็นวิธีที่ใช้ในการแยกสาหร่ายเซลล์เดียวๆ ชนิด high-temperature เช่น *Synechococcus lividus* ที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธี streak plate และ shake culture การแยกจะทำโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวเพื่อเป็นการปรับสภาวะก่อน จากนั้นจึงนำมาเจือจางให้เซลล์มีความเข้มข้นน้อยกว่า 10 เซลล์ต่อมิลลิตร ด้วยอาหารที่ปราศจากเชื้อ แล้วจึงนำมารองผ่านกระดาษกรอง GF/C นำกระดาษกรองที่มีสาหร่ายไปใส่อาหารเหลวในขวดรูปชมพู่ บ่มที่อุณหภูมิ 60 – 70 °C จนสังเกตเห็นโคโลนีของสาหร่ายเจริญขึ้น ให้รีนเอาอาหารออก แล้วใช้ปากคีบคีบโคโลนีของสาหร่ายถ่ายลงในอาหารใหม่

5.3 การเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็น Stock culture

สมบูรณ์ (2539) ได้กล่าวถึงวิธีการเก็บรักษาเชื้อไว้ ดังนี้

5.3.1 การต่อเชื้อ (subculture)

วิธีการนี้ทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารที่เหมาะสมภายในหลอดหรือขวดแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิเหมาะสม เพื่อใช้เชื้อเจริญแล้วนำไปเก็บรักษาภายใต้ภาวะเหมาะสม และต้องต่อเชื้อลงบนอาหารใหม่อีกครั้งก่อนที่เชื้อจะตาย ระยะเวลาของการต่อเชื้อ เชื้อหลายชนิด เช่น *Staphylococci* และ Coliforms จะรอดชีวิตได้หลายปี เชื้อหลายชนิดบอบบางจำพวก *Neisseria* spp. ตายเร็วจึงต้องต่อเชื้ออีกภายในสองถึงสามอาทิตย์

วิธีการนี้ใช้อุปกรณ์ราคาถูก แต่ต้องใช้แรงงานมาก ถ้าต้องการต่อเชื้อบ่อยๆ การเลี้ยงทำได้ง่ายหากต้องการให้เชื้ออยู่ในสภาพสดพร้อมที่จะใช้งานเป็นวิธีการที่ใช้กว้างขวางกับจุลินทรีย์หลายชนิด อย่างไรก็ตามการปะปนของเชื้อเป็นปัญหาสำคัญ และเกิดได้ทุกครั้งที่มีการต่อเชื้อ เชื้อที่ไม่ต้องการนอกจากจะปะปนแล้ว เชื้อนั้นอาจเจริญมากขึ้นทำให้เชื้อที่เก็บรักษาตายได้ การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและการบ่ม (incubate) อาหารไว้ก่อนใช้จะช่วยลดการปะปนของเชื้อ ควรเก็บเชื้อไว้สองหลอด โดยเก็บหลอดหนึ่งไว้เป็นเชื้อสต๊อก (seed stock) และอีกหลอดหนึ่งเป็นเชื้อใช้งาน และการตรวจสอบเชื้อบ่อยๆจะช่วยลดการปะปนของเชื้ออื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

72579

ความเสี่ยงของการเขียนรหัสเชื้อผิดหรือการวางเชื้อผิดที่ โดยเฉพาะเชื้อที่ต้องต่อบ่อยๆ ความเสี่ยงเพิ่มขึ้นเมื่อดูแลไม่ดีและวางภาชนะที่มีเชื้อแบบสุ่มตามใจของผู้ดูแล ควรพิมพ์รหัสเชื้อการเขียนด้วยลายมือ ทำให้อ่านผิดพลาดและรหัสหายไปเมื่อเก็บไว้นาน

การรอดชีวิตต่ำทำให้เสี่ยงต่อการเก็บวิธีนี้ ควรทราบรายละเอียดการรอดชีวิตของเชื้อชนิดนั้น เช่น ระยะเวลาการต่อเชื้อและชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยง การแห้งของอาหารอาจเกิดขึ้นเมื่อปิดภาชนะไม่สนิท หลอดฝาเกลียวอาจไม่ทำให้เกิดปัญหามากนักแต่ฝาพลาสติกอาจปิดได้ไม่สนิท

เชื้อที่เก็บรักษาด้วยวิธีการนี้เสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะเมื่อต่อเชื้อบ่อยๆ เชื้อเริ่มต้นมีเซลล์จำนวนมากช่วยลดความเสี่ยงของการคัดเลือก แต่เพิ่มความเสี่ยงของการปะปนเชื้ออื่น ไม่สะดวกต่อการส่งเชื้อไปให้ผู้อื่น เพราะต้องมีการเตรียมต่อเชื้อและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อก่อนส่งและภาวะช่วงส่งทางไปรษณีย์อาจมีผลต่อระยะเวลาการรอดชีวิตของเชื้อ มีความพยายามใช้อาหารที่ไม่อุดม (unenriched) ซึ่งมีสารอาหารจำกัด การเก็บเชื้อในน้ำเปล่า พบว่าเหมาะกับเชื้อบางชนิด ไม่ควรเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตมาก เพราะเชื้อจะสร้างกรดทำลายเซลล์

ควรยืดระยะเวลาการเก็บรักษาเชื้อโดยลดอัตราการสร้างและสลาย (metabolic rate) ของเชื้อ ทำโดยการจำกัดอากาศ เช่น ใช้พาราฟินเหลว (liquid paraffin) เททับเปิดผิวเชื้อราบนอาหารวุ้นเอียง (agar slant) ทำให้ metabolic activity ลดลงโดยการเก็บที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 5 °C ใช้ได้กับเชื้อหลายชนิด อย่างไรก็ตามเชื้อบางชนิด เช่น *Neisseria* spp. รอดชีวิตได้ดีที่ 37 °C

5.3.2 การทำแห้ง (drying)

มีการใช้วิธีทำแห้งเพื่อเก็บรักษาจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง โดยการนำน้ำออกและไม่ให้เกิดความชื้นอีก ส่วนใหญ่ใช้เก็บเชื้อรา ซึ่งต้านทานต่อความแห้งมากกว่าเชื้อกลุ่มอื่น วิธีการนี้ใช้ได้กับเชื้อรา ซึ่งต้านทานต่อความแห้งมากกว่าเชื้อกลุ่มอื่น วิธีการนี้ใช้ได้กับเชื้อยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น การทำแห้งโดยใช้วัตถุต่างๆมีดังนี้

5.3.2.1 ทราย ดิน ซิลิกาเจล และดินเบา

เชื้อราที่สร้างสปอร์รอดชีวิตแบบแห้งในดิน หลายเชื้อเก็บได้นานถึงห้าปีโดยลักษณะไม่เปลี่ยนแปลง ยีสต์รา และแบคทีเรียบางชนิดรอดชีวิตโดยลักษณะไม่เปลี่ยนแปลง แต่เชื้อมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป

5.3.2.2 แผ่นกระดาษหรือดิสก์ (paper disc)

การเก็บเชื้อบนแผ่นกระดาษใช้ได้กับเชื้อยีสต์และ *Staphylococci* หลังจากทำแห้งแล้วเก็บแผ่นกระดาษหรือดิสก์ไว้ในห่อฟอยล์ภายในภาชนะปิดไม่ให้อากาศเข้า หรือระหว่างแผ่นทางไปรษณีย์ได้จำนวนมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3.2.3 predried plugs

วัสดุหลายชนิด เช่น แป้ง เปปโตนหรือเดกซ์แตรน เมื่อสัมผัสกับซัสเพนชันเชื้อจะช่วยดูดซับก่อนนำไปทำแห้งอีกครั้ง และเก็บภายใต้สุญญากาศ วิธีการนี้ใช้กับเชื้อที่บอบบาง เช่น *Neisseria gonorrhoeae* และ *Vibrio cholerae* ซึ่งเก็บรักษาด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งไม่ได้ผล

5.3.2.4 เจลาตินดิสก์ (gelatin disc)

ทำโดยผสมเชื้อลงในอาหารเหลวเจลาตินนำไปหยดและปล่อยให้แข็งบนจานเลี้ยงเชื้อ แล้วทำให้แห้งหรือทำแห้งแบบเยือกแข็ง นำดิสก์ที่แห้งเก็บไว้ในที่มีซิลิกาเจลหรือฟอสฟอรัส เพนตาออกไซด์ (P_2O_5) มีการเติมสารหลายชนิดลงในอาหารเหลวเจลาติน ใช้เก็บแบคทีเรียหลายชนิดได้นานหลายปี

5.3.3 การทำแห้งจากของเหลว (liquid drying หรือ L- drying)

เป็นวิธีการทำแห้งภายใต้สุญญากาศเพื่อถนอมจุลินทรีย์ที่ไว (sensitive) ต่อการเยือกแข็ง โดยไม่ต้องเยือกแข็งเชื้อจึงเป็นวิธีการที่ดี และเหมาะกับแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Spirilla* และ *Azomonas insignis* เก็บรักษาไว้รักษาไว้ได้นานถึง 10 ปี การทำแห้งโดยตรงจากของเหลวนั้นโดยเตรียมหลอด (ampoule) พิมพ์รหัสเชื้อ วันเดือนปี ลงบนกระดาษกรองขนาดเล็ก ใส่เข้าไปในหลอดและอุดจุกสำลีแล้วทำให้ปราศจากเชื้อเตรียมซัสเพนชันเชื้อโดยผสมในสารละลายซีรัม (ใช้ซีรัม 75 ml อาหารเหลว nutrient 25 ml และกลูโคส 7.5 กรัม) ที่ปราศจากเชื้อโดยวิธีการกรอง บรรจุเชื้อลงในหลอดดังกล่าว หลอดละ 0.1 ml โดยใช้ปิเปต ตัดปลายจุกสำลีที่ปิดหลอดแล้วดันเข้าไปด้วยแท่งแก้วปราศจากเชื้อ นำหลอดที่มีซัสเพนชันเชื้อไปเชื่อมเข้ากับ manifold ซึ่งตั้งเหนืออ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 20 ° C โดยให้หลอดแช่อยู่ในน้ำลึกประมาณ 40-50 มิลลิเมตร จาก manifold เปิดปั๊มแล้วเปิดปิด valve อย่างรวดเร็วเพื่อดึงอากาศออกจากระบบ โดยไม่ทำให้ซัสเพนชันเสียหาย เปิด valve ทีละน้อยจนซัสเพนชันเริ่มเกิดฟอง ควบคุมอัตราการเกิดฟองที่ valve ภายหลังจาก 5 นาที ให้เปิด valve ไว้จนซัสเพนชันแห้งใช้เวลา 30 นาที นำหลอดไปคอด (constrict) และทำให้แห้งขั้นที่สองแล้วจึงปิดหลอด

5.3.4 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying)

เป็นกระบวนการทำให้น้ำระเหยไปจากซัสเพนชันที่เยือกแข็งแล้ว โดยเตรียมซัสเพนชันเชื้อนำไปทำให้เยือกแข็งและเข้าสู่ระบบสุญญากาศไอน้ำที่ระเหยไปจะถูกจับไว้ที่เครื่องควบแน่นซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ หรือฟอสฟอรัสเพนตาออกไซด์ หลังจากทำแห้งแล้ว เก็บเชื้อไว้ภายใต้สุญญากาศหรือในก๊าซเฉื่อย โดยทั่วไปเชื้ออยู่ภายในขวดหรือหลอด

ถึงแม้จะมีการทดลองทำแห้งแบบเยือกแข็งหลายวิธี และทราบข้อผิดพลาดแล้ว โดยสามารถควบคุมพารามิเตอร์หลายอย่างเท่าที่ทำได้เวลาหนึ่งและเหมาะสมต่อเชื้อชนิดนั้น แต่มีแฟคเดอร์ทางกายภาพที่ต้องควบคุม เช่น ช่วงการเจริญของเชื้อ อุณหภูมิของการเจริญ องค์ประกอบของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซัสเพนชันเชื้อ อัตราการทำแห้ง อุณหภูมิการทำเยือกแข็ง อัตราและระยะเวลาการทำแห้ง ความชื้นสุดท้าย

ข้อดีของการทำแห้งแบบเยือกแข็งนั้นเหมาะสมต่อการเก็บรักษาเชื้อจำนวนมากและการแจกจ่ายเชื้อ สามารถเก็บรักษาได้นานไม่ต้องเอาใจใส่อีกและไม่สิ้นเปลืองระหว่างการเก็บ พบว่านิยมใช้ในศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อ วิธีการนี้มีข้อเสีย คือ ค่าใช้จ่ายสูงถ้าซื้อเครื่องมืออย่างดี ต้องใช้แรงงานมาก ถ้าเก็บเชื้อจำนวนมาก แต่ค่าเฉลี่ยแรงงานต่อชั่วโมงและต่อหลอดเชื้อค่อนข้างต่ำ โดยทั่วไปเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะ แต่อาจเกิดการคัดเลือกประชากรเพิ่มขึ้นในการเตรียมเชื้อเพื่อเก็บครั้งต่อๆไป เช่น การเก็บเชื้อครั้งที่สองและต่อไปเรื่อยๆ หลีกเลี่ยงวิธีการนี้โดยเตรียมเชื้อสำหรับเก็บครั้งต่อไปจากเชื้อที่เก็บไว้ครั้งแรก ระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็งบางชนิด อาจพบการเปลี่ยนแปลงของประชากร การกลายพันธุ์ และการสูญเสียพลาสมิดวิธีการนี้ต้องเสียเวลาเปิดหลอดและนำไปเพาะเลี้ยงและต้องต่อเชื้อหลายครั้งเพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อนั้น

5.3.5 การเยือกแข็งหรือแช่แข็ง (freezeing)

การเก็บรักษาเชื้อโดยทำให้เยือกแข็ง น้ำจะมีผลต่อเซลล์เมื่อน้ำถูกดึงออกกลายเป็นน้ำแข็ง ความเสียหายเกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการทำให้เย็นลงและทำให้หายแข็ง เมื่อต้องการนำเชื้อไปเพาะเลี้ยงใหม่ ความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์เพิ่มขึ้นขณะน้ำถูกดึงออกไปหรือการเกิดผลึกน้ำแข็งจะทำลายเซลล์ ลดความเสียหายโดยปรับอัตราการทำให้เย็นและการเพิ่มอุณหภูมิ และการเติมสารป้องกันความเย็น เช่น dimethyl sulfoxide หรือกลีเซอรอลลงในซัสเพนชันเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 5 % และ10 % ตามลำดับ

การทำเยือกแข็งแบ่งตามอุณหภูมิที่ใช้ ได้แก่ -20 ˚C, -30 ˚C, -40 ˚C, -70 ˚C, -140˚C และ -196˚C แต่โดยทั่วไปอุณหภูมิสูงกว่า -30˚Cให้ผลไม่ดี เพราะเกิดส่วนผสมของเชื้อและสารประกอบในน้ำ ทำให้ความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นและมีผลต่อเซลล์ การเก็บไว้ที่ -70 ˚C ใช้ได้กับจุลินทรีย์หลายชนิดและที่ -140 ˚C และ -196 ˚C ก็ใช้ได้ผลดีกับจุลินทรีย์

5.3.5.1 การเก็บบนเม็ดแก้วที่ -70 ˚C

เก็บโดยเตรียมซัสเพนชันเนื้อเยื่อในกลีเซอรอล หยดลงบนเม็ดแก้วภายในขวด (vial) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70˚C พบว่าได้ผลดีสำหรับแบคทีเรียบางชนิด วิธีนี้ทำได้ง่ายและรวดเร็วไม่ต้องใช้เครื่องมือมาก เม็ดแก้วแต่ละสีใช้เก็บเชื้อได้แต่ละชนิดและเก็บได้มากไม่จำกัด ข้อเสีย คือ ต้องใช้ตู้เยือกแข็ง (freezer) ที่ -70 ˚C ซึ่งบางครั้งไฟฟ้าดับจะทำให้เครื่องหยุดทำงาน จึงจำเป็นต้องเก็บเชื้อไว้สองชุด วิธีนี้ไม่เหมาะสมในการให้บริการเชื้อ เพราะต้องต่อเชื้อใหม่ก่อนส่งไปยังแหล่งอื่น

5.3.5.2 การเก็บในไนโตรเจนเหลว (-196 ˚C) หรือไอไนโตรเจน (-140 ˚C)

แม้ว่าจุลินทรีย์บางชนิดจะมีเซลล์บางส่วนตายไประหว่างการทำให้เย็นและทำให้หายแข็ง แต่จะไม่สูญเสียอีกระหว่างการเก็บรักษา การลดการตายของเชื้อทำได้โดยเติมสารป้องกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเย็น การปรับภาวะการเจริญและอัตราการทำให้เย็นและทำให้หายแข็ง แม้ลักษณะของเชื้อทั่วไปจะถูกรักษาไว้ มีบางรายงานว่า DNA และพลาสมิดเปลี่ยนไป การรอดชีวิตและความคงที่ของเชื้อโดยการเก็บรักษาด้วยวิธีนี้มีสูง ทุกวันนี้นิยมใช้สำหรับเก็บรักษา seed stock culture

อย่างไรก็ตามมีข้อเสีย คือ ไนโตรเจนเหลวระเหยได้และต้องเติมใหม่อยู่เสมอ หากขาดไนโตรเจนเหลวจะทำให้เซลล์เสียหาย ค่าใช้จ่ายสูงแต่ใช้แรงงานน้อย เสี่ยงต่อการระเบิดหรือแตกของภาชนะที่เป็นแก้ว โดยไนโตรเจนเหลวอาจเข้าไปตามรูรั่วและขยายตัวอย่างรวดเร็ว การเก็บในไอไนโตรเจนจะช่วยลดปัญหานี้แต่อุณหภูมิสูงกว่า ทำให้ไม่เหมาะสำหรับบางเชื้อ วิธีการนี้ไม่สะดวกต่อการบริการเชื้อ เพราะต้องต่อเชื้อใหม่ เชื้อที่ใช้เก็บอาจเป็นปัญหาเมื่อเก็บเชื้อที่ใช้งาน (working culture) รวมกับ seed stock culture ปัจจุบันมีการปรับปรุงเพื่อสามารถลดเนื้อที่ได้โดยใช้ polypropylene straws บรรจุซัสเพนชันเชื้อ

6. การจำแนกหมวดหมู่

Desikachary (1959) จำแนกหมวดหมู่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินพบว่ามีสมาชิก 150 สกุล 1500 ชนิด มีทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำกร่อย มีเพียงคลาสเดียวคือ Class Cyanophyceae ประกอบด้วย 2 Order ที่เป็นแพลงก์ตอน คือ

- Order Chroococcales
- Order Nostocales

การจำแนกหมวดหมู่ ใน Class Cyanophyceae มีดังนี้

1. เซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่กันเป็นโคโลนี สืบพันธุ์โดยการสร้างเอนโดสปอร์ซึ่งไม่อยู่ใน sporangia ไม่มีการสร้างเอกโซสปอร์.....Chroococcales

2. เซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว เกาะอยู่กับวัตถุต่างๆ โดยทั่วไปแบ่งส่วนออกมาเป็นส่วนฐานและส่วนยอด สืบพันธุ์โดยการสร้างเอนโดสปอร์หรือเอกโซสปอร์.....Chamaesiphonales

3. มีลักษณะคล้ายเส้นสาย มักเกาะอยู่กับวัตถุต่างๆ ประกอบด้วย ส่วนฐานที่เป็นแผ่น (prostrate) ส่วนที่เป็นเส้นไม่มี heterocyst สืบพันธุ์โดยการสร้างเอนโดสปอร์.....Pleurocapsales

4. มีทั้งที่เป็นเส้นสายไม่แตกแขนงและแตกแขนง ถ้าเป็นแบบแตกแขนงจะเป็นแบบแขนงเทียม บางชนิดมี heterocyst สืบพันธุ์โดยการขาดท่อน (fragmentation) สร้างฮอร์โมโกนหรือสร้าง akinete .....Nostocales

5. เป็นเส้นสายที่แตกแขนงได้หลายแบบและหลายทิศทาง มีทั้งแขนงแท้และแขนงเทียม สร้าง heterocyst ได้ ซึ่งอาจมีตุ่ม (polar notch) ถึง 3 อัน ส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยการสร้างฮอร์โมโกน .....Stigonematales

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

Order 1 Chroococcales

Family Chroococcaceae Genus *Anacystis, Chroococcus, Coelosphaerium, Gloeocapsa, Merismopedia, Microcystis*

Order 2 Chamaesiphonales

Order 3 Pleurocapsales

Order 4 Nostocales

Family 1 Oscillatoriaceae Genus *Oscillatoria, Lyngbya, Spirulina*

Family 2 Nostocalccae Genus *Anabaena, Anabaenopsis, Richelia, Raphidiopsis*

Family 3 Scytonemataceae Genus *Scytonema, Tolypothrix*

Family 4 Rivulariaceae Genus *Rivularia, Calothrix, Gloeotrichia*

Order 5 Stigonematales

1. Order Chroococcales

Family Chroococcaceae

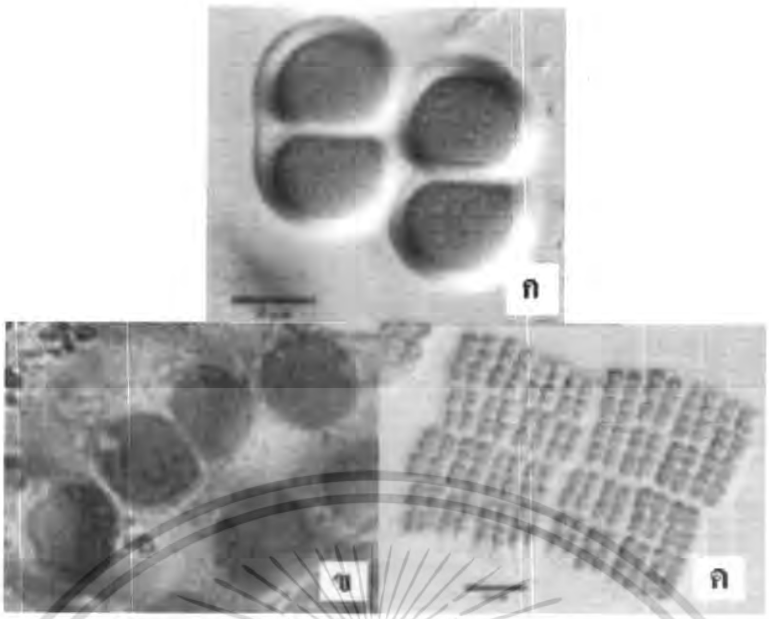
1. Genus *Chroococcus* ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ อาจพบอยู่เป็นกลุ่มๆ 2-4 เซลล์ ไม่เกิน 16 เซลล์ เมื่อแบ่งเซลล์จะไม่แยกออกจากกัน เพราะมีสารเมือก (มีสีหรือใสไม่มีสี) หนาหุ้มอยู่ เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรี มีสารเมือกลักษณะใสและโปร่งแสงหุ้มอยู่ (ภาพ 1 ก)

2 Genus *Anacystis* ลักษณะเป็นโคโลนีที่มีลักษณะกลมรี หรือรูปร่างไม่แน่นอน ทุกเซลล์มีชีทหุ้มและเซลล์อยู่รวมกันเป็นในสารเมือกที่มีรูปร่างต่างกัน (ภาพ 1 ข)

3. Genus *Merismopedia* ลักษณะเป็นโคโลนี ที่มีการเรียงตัวกันเป็นแผ่นสี่เหลี่ยม หนาเพียง 1 ชั้นของเซลล์ การแบ่งเซลล์เกิดขึ้นเพียง 2 แนว (กว้างและยาว) กลุ่มเซลล์จะฝังตัวอยู่ในสารเมือก รูปแบบการจัดเรียงตัวเป็นแบบกลุ่มๆ 4 เซลล์ แต่ละเซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ แต่ละกลุ่มจะเรียงกันเป็นระเบียบ สกุลนี้เพิ่มจำนวนโดยการขาดท่อน พบทั้งน้ำนิ่งและน้ำไหล (ภาพ 1 ค)

4. Genus *Microcystis* ลักษณะเป็นโคโลนีที่มีรูปร่างไม่แน่นอน (amorphous colony) เช่น รูปวงแหวน เลขแปด หรือเบี้ยวๆ ในแต่ละเซลล์รูปร่างจะกลม เซลล์กระจายอยู่ทั่วไปในสารเมือกที่หุ้มโคโลนี ภายในเซลล์มี gas vacuole (40X) จะเห็นเป็นจุดดำๆ เป็นสกุลที่ก่อให้เกิดการบลูมของน้ำในแหล่งน้ำจืด เช่น *Microcystis aeruginosa*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ 1 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Order Chroococcales Family Chroococcaceae

(ก) *Chroococcus* sp.

(ข) *Anacystis* sp.

(ค) *Merismopedia* sp.

ที่มา: http://www.cyanobact-microalgae.sc.chula.ac.thprofile.phpid=TA-CY-48-0001.htm

2. Order Nostocales

2.1 Family Oscillatoriaceae

2.1.1 Genus *Oscillatoria* (สาหร่ายขนแมว) ลักษณะเป็นเส้นสายเดี่ยวๆ หรืออาจอยู่รวมกันเป็นกลุ่มหนาแน่น ไม่มีชีทหุ้ม แต่ละสายไม่แตกแขนง trichome ประกอบด้วยเซลล์แถวเดียวเรียงต่อกันเป็นสาย และความกว้างของเซลล์สม่ำเสมอตลอดทั้งสาย แต่ละเซลล์มีความกว้างมากกว่าความยาว apical cell อาจมี calytra สกุลที่มีชีทหุ้มอาจมี น้ำใสๆ หุ้มอยู่ การเคลื่อนที่ ได้ทั้งแบบ gliding และ oscillating (แกว่งซ้ายขวา) สืบพันธุ์โดยการเกิดเซลล์ตายและสร้าง separation disc พบทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย ทะเล หรือตามที่ชื้นแฉะ (ภาพ 2 ก)

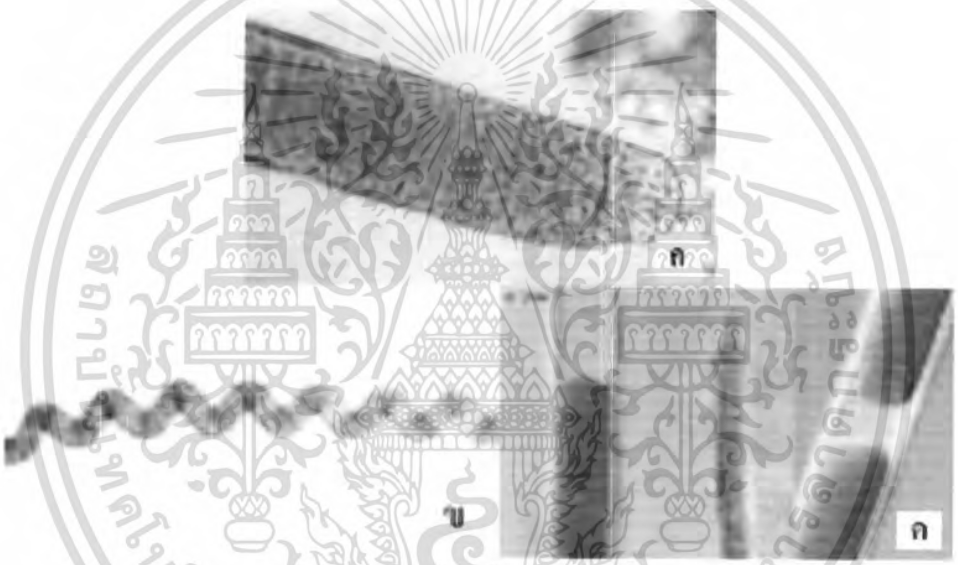
2.1.2 Genus *Spirulina* ลักษณะ trichome ขดเป็นเกลียวไม่มีชีทหุ้ม เดิมเชื่อว่าเป็นสกุลที่ไม่มีผนังกั้น แต่ Holmgren et.al. ศึกษา Spirulina โดยละเอียดโดยใช้กล้องอิเลคตรอน (EM) พบว่าเซลล์มีผนังบางๆ กั้นเซลล์ เป็นสกุลที่มีโปรตีนสูง 50-70% ของน้ำหนักแห้ง (Snatillanze, 1982) ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงในขั้นอุสาหกรรม ผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ ชนิดที่นิยมเลี้ยง *S. platensis* และ *S. platensis* trichome ขดเป็นเกลียวห่างๆ สูง 35-50 ไมครอน ยาว 300-500 ไมครอนโดยมากมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แก๊สแวคิวโอลอยู่ในเซลล์มาก จึงลอยน้ำได้ดี นำมาผลิตอาหารเสริมสุขภาพและสกัดเป็นเม็ดสีเพื่อเลี้ยงปลาสวยงาม (ภาพ 2 ข)

2.1.3 Genus *Lyngbya* ลักษณะคล้าย Oscillatoria แต่จะมีชีทหนาหุ้มอยู่ ใสหรือไม่มีสี หรือมีสีน้ำตาลปนเหลือง ทุกเซลล์ใน trichome มีขนาดเท่ากันตลอด สืบพันธุ์โดยการสร้างฮอร์โมน พบได้ทั่วไปในน้ำจืด ทะเล และน้ำกร่อย เป็นสกุลที่ทำให้เกิดกลิ่นโคลนในตัวกุ้ง (ภาพ 2 ค)

2.1.4 Genus *Phormidium* ลักษณะ trichome ประกอบด้วยเซลล์เรียงกันเป็นแถว มีชีทบางๆ ไม่มีสีหุ้ม เซลล์รูปร่างทรงกระบอก มีรอยคอดระหว่างรอยต่อของแต่ละเซลล์ apical cell มักจะแหลม เส้นสายไม่ขดเป็นเกลียว มักอยู่รวมกันหลายๆ เส้น เกาะอยู่กับวัสดุในน้ำหรือลอยอยู่อย่างอิสระ



ภาพ 2 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Order Nostocales Family Oscillatoriaceae

(ก) *Oscillatoria* sp.

(ข) *Spirulina* sp.

(ค) *Lyngbya* sp.

ที่มา: http://www.cyanobact-microalgae.sc.chula.ac.thprofile.phpid=TA-CY-48-0001.htm

2.2 Family Nostocaceae

2.2.1 Genus *Anabaena* ลักษณะ trichome ชนิดเดี่ยวๆ มีชีทหุ้ม เส้นสายตรง ม้วนเป็นวงหรือบิดเป็นเกลียว บางชนิดมีรูปร่างเป็นถังเบียร์ กลม หรือสี่เหลี่ยม มี intercalary heterocyst สืบพันธุ์โดยการสร้าง akinete สกุลนี้เป็นแพลงก์ตอนน้ำจืด ทำให้เกิดการบลูมเป็นครั้งคราว บางชนิดผลิตสารพิษ anatoxin ซึ่งเป็นสารพิษประเภท neurotoxin ทำอันตรายสัตว์เลี้ยงถึงตายได้เช่น วัว

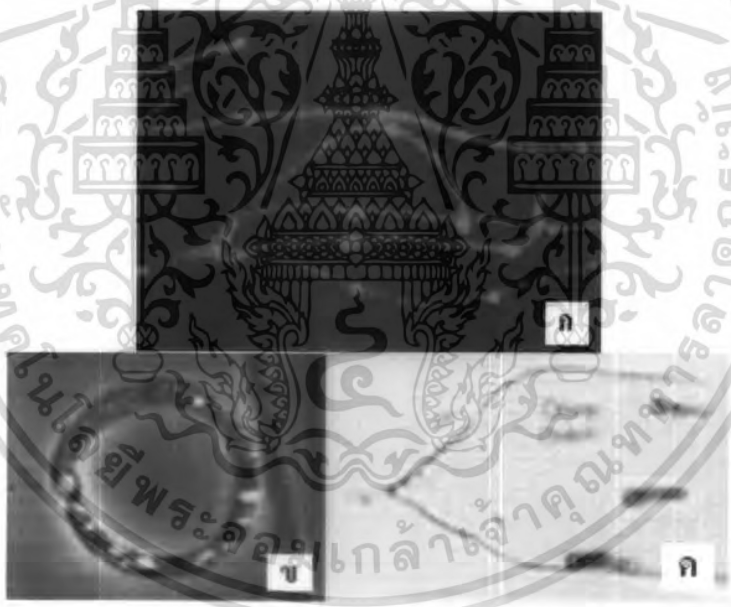
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควาย เป็ดไก่ ที่กินน้ำซึ่งมีแพลงก์ตอนเข้าไป ได้แก่ *Anabaena flosaquae, A. circinalis, A. spiroides* (ภาพ 3 ก)

2.2.2 Genus *Anabaenopsis* ลักษณะ trichome ขดเป็นวงหรือขดเป็นเป็นเกลียว มีชีทหุ้ม heterocyst ของสกุลนี้ถ้าอยู่กลางเส้นสาย มักอยู่เป็นคู่ สืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ ห่างจาก heterocyst จะไม่ติดกัน (ภาพ 3 ข)

2.2.3 Genus *Raphidiopsis* ลักษณะ trichome สั้นแต่อาจจะตรงหรือโค้งงอ ไม่มีชีทหุ้ม apical cell เรียวและแหลมมาก อาจมีหรือไม่มี heterocyst ก็ได้ ถ้ามีจะอยู่ตรงกลาง trichome

2.2.4 Genus *Richelia* ลักษณะ trichome สั้นๆ ประมาณ 3-20 เซลล์ ไม่มีชีทหุ้ม *R. intracellularis* จะเกาะอยู่รวมกับไดอะตอมทะเล Chaetoceros บางชนิด หรืออยู่ภายในเซลล์ของ *Rhizosolenia* หลายชนิด *R. intracellularis* trichome ยาว 105 ไมโครเมตร ประกอบด้วย เซลล์ประมาณ 3-20 เซลล์ มีสีเขียวแกมน้ำเงิน เซลล์รูปถังเบียร์ เส้นผ่าศูนย์กลาง 5.6-9.8 ไมโครเมตร มี heterocyst รูปกลมอยู่ตรงปลายข้างใดข้างหนึ่งของ trichome (ภาพ 3 ค)



ภาพ 3 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Order Nostocales Family Nostocaceae

(ก) *Anabaena* sp.

(ข) *Anabaenopsis* sp.

(ค) *Richelia* sp.

ที่มา: http://www.cyanobact-microalgae.sc.chula.ac.thprofile.phpid=TA-CY-48-0001.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 Family Scytonemataceae

2.3.1 Genus *Tolypothrix* ลักษณะเป็นเส้นสายที่แตกแขนงเทียมแบบเดี่ยว มักเกิดติดกับ heterocyst เป็นแพลก์ตอนชั่วคราว

2.3.2 Genus *Scytonema* ลักษณะเป็นเส้นสายที่แตกแขนงเทียมแบบคู่ และเกิดระหว่าง heterocyst ขนาดของเซลล์จะเท่ากันตลอดทั้งสาย มีชีทหนาและเหนียวหุ้มอยู่ เป็นแพลงก์ตอนชั่วคราว

2.4 Family Rivulariaceae

2.4.1 Genus *Calothrix* ลักษณะ trichome อยู่เดี่ยวๆ เป็นเส้นสายที่มีความกว้างของเซลล์ไม่เท่ากันทั้งสาย เซลล์ดรงโคนจะใหญ่ ส่วนเซลล์ตรงปลายจะเรียวแหลมเป็นเส้น ไม่แตกแขนงหรือแตกแขนงเทียม แขนงใหม่จะเป็นอิสระจากเส้นเดิม มีชีทหุ้ม (ใสหรืออาจมีสี) มี basal hetercyst และ akinete จะเกิดติดกับ heterocyst เป็น แพลงก์ตอนชั่วคราว

2.4.2 Genus *Rivularia* ลักษณะเป็นก้อนกลมหรือครึ่งวงกลม มี trichome เป็นเส้นสาย มีขนาดของเซลล์ไม่เท่ากันตลอดทั้งสายซึ่งฝังตัวอยู่ในชีทที่มีสารเมือกหนามาก ชีทแต่ละอันหนาเท่ากันตลอด สืบพันธุ์โดยการสร้าง hormogonia

2.4.3 Genus *Gloeotrichia* ลักษณะพบในลักษณะกลมหรือแบบ trichome เป็นเส้นสาย มีขนาดของเซลล์ไม่เท่ากันตลอดทั้งสายมี basal hetercyst และมี akinete ขนาดใหญ่ ลักษณะรูปทรงกระบอก ซึ่งเกิดติดกับ heterocyst

7. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เจริญที่อุณหภูมิสูง

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงเกินกว่า 45 °C ขึ้นไป ซึ่งโดยปกติที่อุณหภูมิดังกล่าวนี้สิ่งมีชีวิตที่เจริญได้มักจะเป็นพวกโพรคาริโอต (prokaryote) แต่ในบางครั้งก็อาจมีสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต (eucaryote) และสัตว์น้ำบางชนิดที่ทนอุณหภูมิสูงสามารถเจริญได้ เช่น ที่อุณหภูมิ 50-60 °C สิ่งมีชีวิตที่พบได้แก่ พวกฟังไจ (fungi) บางชนิด และสาหร่ายประเภทยูคาริโอต (eucaryote) ได้แก่ *Cyanidium caldarium* ลักษณะของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่พบในน้ำพุร้อนมักจะมี mat คล้ายวุ้น มีหลายสี โดยสีของ mat ที่มักจะพบได้บ่อยๆ คือ สีเขียว, น้ำตาล, แดง, ส้ม และเหลือง ส่วนที่อยู่ด้านบนสุดของ mat จะเป็นส่วนที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง (Catenholz, 1969)

สุมาลีและวิไล (2525) กล่าวว่า สิ่งมีชีวิตที่พบมากที่สุดในน้ำพุร้อน คือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำ-เงิน เนื่องจากอุณหภูมิในน้ำพุร้อนไม่เหมาะแก่การเจริญเติบโตของยูคาริโอต (eukaryote) อื่นๆ นอกจากนี้ยังมีปริมาณสารอินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในอัตราสูง เช่น กำมะถัน แมกนีเซียม ส่วนสารอินทรีย์อื่นที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต เช่น NO_3^-, NO_2^- มีปริมาณน้อย ดังนั้นการที่พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในน้ำพุร้อนมากกว่าสิ่งมีชีวิตอื่นๆนั้น มิใช่เพราะสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถปรับตัวให้เข้ากับอุณหภูมิสูงเท่านั้น แต่เพราะสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมด้านอื่นๆที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นอีกด้วย

จากการทดลองของอุดมลักษณ์ (2544) พบว่าสาหร่ายที่พบมากที่สุดในทุกแหล่งน้ำพุร้อนบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย คือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินใน Division Cyanophyta เนื่องจากสาหร่ายกลุ่มนี้มีโครงสร้างของเซลล์ที่ทนทานต่ออุณหภูมิสูง เยื่อหุ้มเซลล์หนาและยังมีเมือกหุ้มอยู่รวมทั้งมีไขมันจำนวนมาก และเอนไซม์ของสาหร่ายในกลุ่มนี้สามารถทำงานได้และไม่เสียสภาพในช่วงอุณหภูมิสูง ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าในช่วง 30-39 °C พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 20 genera 36 species ช่วง 40-49 °C พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 20 genera 38 species ช่วง 50-59 °C พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 13 genera 23 species ช่วง 60-69 °C พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 genera 5 species ช่วง 70-80 °C พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 1 genus 3 species ซึ่งจะเห็นได้ว่ายิ่งอุณหภูมิสูงขึ้นจำนวนชนิดของสาหร่ายจะยิ่งลดลง

การทดลองของวราภรณ์ (2545) ที่ได้ทำการแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อน 9 แหล่งบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย พบว่าสามารถแยกสาหร่ายเป็นสปีชีส์เดี่ยวๆได้ 8 สปีชีส์และทั้ง 8 สปีชีส์นี้จัดอยู่ใน Division Cyanophyta และจัดเป็นสาหร่ายประเภท thermotolerant และ thermophile blue-green algae ซึ่งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้นี้จะเป็นแนวทางให้นำไปใช้ในงานในอุตสาหกรรมที่ต้องใช้อุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิต ซึ่งนับว่าเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่าที่สมควรจะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สำรวจแหล่งน้ำพุร้อนที่ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย

ทำการสำรวจน้ำพุร้อนบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย (ภาพ 4) และกำหนดจุดเก็บตัวอย่างที่ช่วงอุณหภูมิ 30 – 80°C pH 7-10 โดยทำการเก็บตัวอย่างจากน้ำพุร้อนต่อไปนี้

3.1.1 โป่งน้ำร้อนดอยสะเก็ด อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

3.1.2 โป่งน้ำร้อนบ้านห้วยทรายขาว อำเภอพาน จังหวัดเชียงราย

3.2 อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างสาหร่าย

3.2.1 เทอร์โมมิเตอร์

3.2.2 กระดาษวัด pH

3.2.3 ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร

3.2.4 ลูกยาง

3.2.5 ปากคีบ

3.2.6 มีดปลายแหลม

3.2.7 ช้อน

3.2.8 ขวดเก็บตัวอย่าง

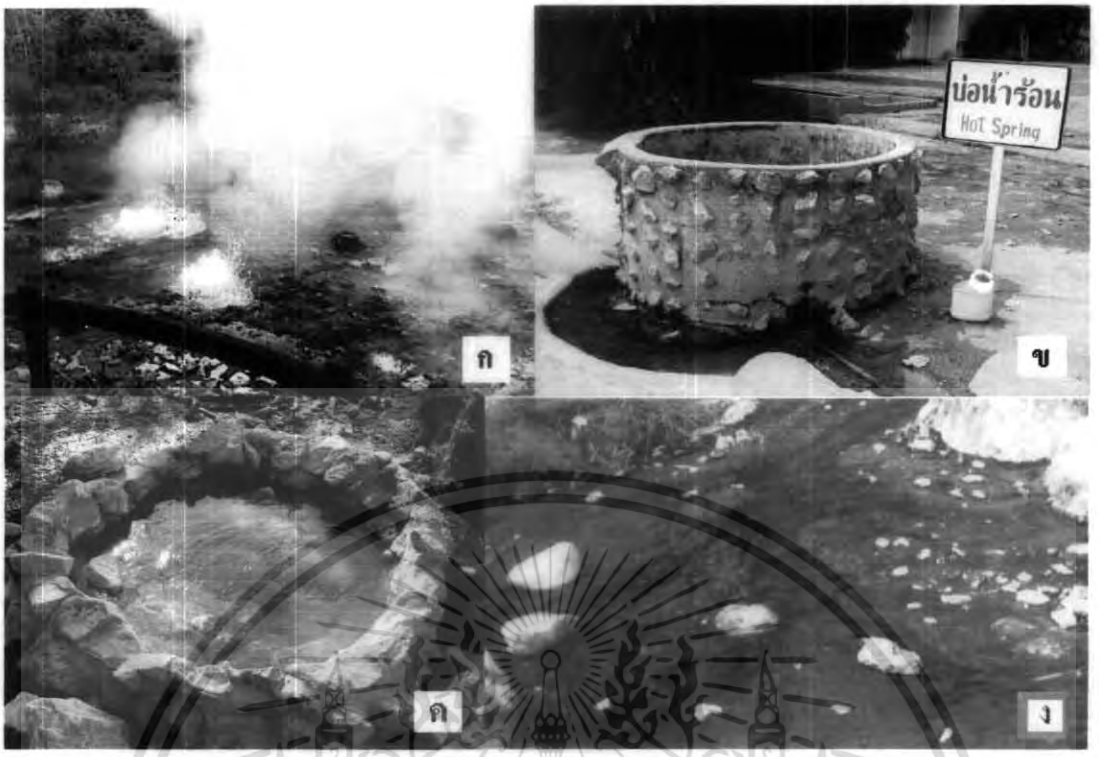
3.2.9 ปากกาเขียนแก้ว

3.2.10 ถุงพลาสติก

3.2.11 ยางรัด

3.2.12 กล่องโฟม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ 4 แหล่งน้ำพุร้อนที่ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

(ก) โป่งน้ำร้อนดอยสะเก็ด อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

(ข) โป่งน้ำร้อนบ้านห้วยทรายขาว อำเภอพาน จังหวัดเชียงราย

(ค) แอ่งน้ำร้อนขนาดเล็ก

(ง) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในลำธาร

3.3 อุปกรณ์ในการแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

3.3.1 หลอดทดลอง

3.3.2 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.3.3 จานเพาะเชื้อ

3.3.4 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.5 กระบอกตวง

3.3.6 บีกเกอร์ ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร

3.3.7 แท่งแก้ว

3.3.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.3.9 ปิเปต ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร

3.3.10 ลูปเขี่ยเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.11 เครื่องเขย่าที่สามารถปรับอุณหภูมิและเปิดแสงได้ ยี่ห้อ Gallankamp, รุ่น Firstek OSI-501

3.3.12 ตู้อบอุณหภูมิสูง ยี่ห้อ WTB binder, รุ่น FD53

3.3.13 หม้อนึ่งอัดไอ ยี่ห้อ Herayama

3.3.14 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ยี่ห้อ Hach, รุ่น DC / 400V

3.3.15 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ ยี่ห้อ Nikon, รุ่น ECLIPSE 80i

3.3.16 เครื่อง Freeze dry ยี่ห้อ Heto รุ่น LyoLab 3000

3.3.17 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LIBROR EB 4000H

3.3.18 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ sartorius analytic type A 200S

3.4 เก็บตัวอย่างสาหร่ายมาแยกในห้องปฏิบัติการ (ยุวดี และ ฉมาภรณ์, 2542)

3.4.1 สาหร่ายที่เป็นเส้นสาย เก็บโดยใช้ปากคีบคีบใส่ขวดเก็บตัวอย่าง (ภาพ 5ก)

3.4.2 สาหร่ายที่อยู่บริเวณพื้นท้องน้ำไม่สามารถใช้ปากคีบได้ จะเก็บโดยใช้ปิเปตดูดใส่ขวดเก็บตัวอย่าง (ภาพ 5ข)

3.4.3 สาหร่ายที่เกาะอยู่กับหิน เก็บโดยการใช้ปากคีบหรือมีดขูดใส่ขวดเก็บตัวอย่าง หรือถ้า substrate ที่สาหร่ายเกาะมีขนาดเล็กจะเก็บใส่ถุงพลาสติกทั้งหมด

3.4.4 นำสาหร่ายทั้งหมดจากข้อ 3.4.1 ถึง 3.4.3 เก็บใส่ในกล่องโฟมโดยไม่ต้องแช่เย็นระหว่างการขนส่งก่อนมาถึงห้องปฏิบัติการ

3.5 เตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ใช้อาหารสูตร BG-11 โดยมีรายละเอียดของสูตรอาหาร ดังภาคผนวก ก เตรียมทั้งอาหารเหลวและอาหารแข็ง อาหารเหลวจะเตรียมใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร ส่วนอาหารแข็งจะเตรียมใส่จานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพ 5 การเก็บตัวอย่างสาหร่ายจากน้ำพุร้อน โดยใช้ปากคีบและปิเปต

(ก) การเก็บตัวอย่างสาหร่ายที่เป็นเส้นสาย

(ข) การเก็บตัวอย่างสาหร่ายที่เป็นโคโลนี

3.6 แยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

3.6.1 นำตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บจากช่วงอุณหภูมิต่างๆ ใส่ลงในอาหารเหลว BG-11 ที่เตรียมใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตรไว้แล้ว

3.6.2 นำไปบ่มในเครื่องเขย่า (shaker) ปรับอุณหภูมิ 40°C และ 55°C เป็นเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์จนสังเกตเห็นว่ามีสาหร่ายเจริญ (ภาพ 6 ค)

3.6.3 นำสาหร่ายจากข้อ 2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดเดียวกันซึ่งเตรียมใส่ขวดรูปชมพู่ไว้บ่มที่สภาวะเดิม ทำซ้ำประมาณ 3 ครั้ง

3.6.4 ทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate, pour plate และ enrichment culture สังเกตการณ์เจริญเติบโตและเลือก โคโลนีที่อยู่เดี่ยวๆ เพื่อทำการคัดแยกด้วยวิธี streak plate หลายๆ ครั้ง (ภาพ 6 ข, 6 ค)

3.7 วินิจฉัยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้แยกได้เป็นจีนัสเดี่ยวๆ

3.7.1 วินิจฉัยชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการจำแนกเป็นหมวดหมู่ในระดับจีนัส (genus) จากหนังสือและเอกสารที่เกี่ยวข้อง เช่น สาหร่ายน้ำจืดในภาคเหนือของประเทศไทย (ยุวดี, 2548)

3.7.2 ถ่ายรูปสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพ 6 การแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อน

(ก) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในขวดรูปชมพู่

(ข) การแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็นเส้นสายโดยวิธี streak plate

(ค) การแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็นโคโลนีโดยวิธี streak plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การหาลักษณะเฉพาะของการทนอุณหภูมิสูงโดยการศึกษาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

3.8.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ

1. เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยอาหาร BG-11 โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในขั้นต้นจากจานอาหาร BG-11 agar ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่มีปริมาตรอาหาร 175 ml.

2. นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นระยะเวลา 15 วัน ทำเป็นเชื้อเริ่มต้น (starter)

3. นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density : OD) ที่ความยาวคลื่น 560 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer DR/400V แล้วนำเชื้อเริ่มต้นที่ได้เติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่มีปริมาตรอาหาร 175 ml. ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 โดยการคำนวณจากสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$

4. ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยนำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่สามารถปรับอุณหภูมิได้และมีแสงจากหลอดไฟ โดยทำการปรับอุณหภูมิที่ค่าต่างๆ ดังนี้คือ 27, 30, 40, 50, 60 °C โดยทำการทดลองอุณหภูมิละ 2 ซ้ำ

5. วัดการเจริญของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 5 ml.

6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในช่วง log phase โดยดูจากกราฟลอการิทึมการเจริญมาคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate : μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (doubling time : t_d) จากสูตร

$$\text{Specific growth rate } (\mu) = \frac{\ln (X_1 / X_2)}{T_1 - T_2}$$

$$\text{Doubling time} = 0.693/\mu$$

X_1 = ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยง

X_2 = ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น

T_1 = ช่วงวันที่ทำการเพาะเลี้ยง

T_0 = วันที่เริ่มต้น

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย

1. เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยอาหาร BG-11 โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในขั้นต้นจากจานอาหาร BG-11 agar ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่มีปริมาตรอาหาร 175 ml

2. นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นระยะเวลา 15 วัน ทำเป็นเชื้อเริ่มต้น (starter)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำเชื้อเริ่มต้น ได้แก่ *Phormidium* sp. ที่เป็นเชื้อเริ่มต้นจำนวน 2 กรัม และ *Oscillatoria* sp. ที่เป็นเชื้อเริ่มต้นจำนวน 3 กรัม นำสาหร่ายแต่ละชนิดเติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่มีปริมาตรอาหาร 175 ml และทำซ้ำเป็นจำนวน 10 ฟลาสก์ต่อสาหร่าย 1 ชนิด

4. ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยนำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่สามารถปรับอุณหภูมิได้และมีแสงจากหลอดไฟ โดยทำการปรับอุณหภูมิที่ค่าต่างๆ ดังนี้คือ 27, 30, 40, 50, 60 °C โดยทำการทดลองอุณหภูมิละ 2 ซ้ำ

5. วัดอัตราการเจริญของสาหร่ายโดยการหาน้ำหนักแห้ง โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 1 ฟลาสก์ จากตัวอย่างสาหร่ายที่ทำไว้เป็นจำนวน 10 ฟลาสก์ แล้วนำไปกรองในชุดเครื่องกรองผ่านกระดาษ GF/C ที่อบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 2- 3 ชั่วโมงแล้วชั่งน้ำหนักกระดาษกรองไว้ก่อน หลังจากกรองสาหร่ายเสร็จ จึงนำกระดาษ GF/C ไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C อีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่ในตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วชั่งน้ำหนักทั้งหมด หลังจากนั้นจึงนำมาคำนวณหาน้ำหนักแห้ง

6. ทำการกรองเซลล์ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน โดยในการกรองเซลล์แต่ละครั้งจะทำการกรองสาหร่ายจำนวน 1 ฟลาสก์

7. คำนวณหาน้ำหนักแห้งโดยใช้สูตร

$$\text{Algal dry weight (mg/l)} = \frac{[A]-[B] \times 1000}{\text{Vol.of culture}}$$

A = weight of filter paper + algae

B = weight of filter paper

3.8.2 ศึกษาความเป็นกรด- ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ

3.8.2.1 เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยอาหาร BG-11 โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในขั้นต้นจากจานอาหาร BG-11 agar ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่มีปริมาตรอาหาร 175 ml

3.8.2.2 นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 15 วัน เพื่อทำเป็นเชื้อเริ่มต้น (starter)

3.8.2.3 เตรียมอาหาร BG-11 ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างที่ค่าต่างๆ คือ 6, 7, 8, 9 และ 10 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้สารละลาย Citric acid เข้มข้น 2 M และสารละลาย NaOH เข้มข้น 2 M วิธีเตรียมสารละลายทั้ง 2 ชนิด ดังภาคผนวก ก ใส่อาหารปริมาตร 175 ml ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml การทดลองละ 2 ซ้ำ

3.8.2.4 เติมเชื้อเริ่มต้นของสาหร่ายแต่ละชนิดโดยแยกตามลักษณะที่เป็นเซลล์เดี่ยวและลักษณะที่เป็นเส้นสายตามวิธีดังข้อ 3.8.1.3 ที่ได้กล่าวมาแล้ว

3.8.2.5 นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายแต่ละชนิด จากผลการทดลองตามข้อ 3.8.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8.2.6 วัดการเจริญของสาหร่ายโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็นเส้นสาย นำไปหาน้ำหนักแห้ง ส่วนสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็นเซลล์เดี่ยวนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm วิธีการดังข้อ 3.8.1.5 และ 3.8.1.6 ที่ได้กล่าวมาแล้ว

3.9 การเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้ให้เป็นจีนัสเดี่ยวๆ

3.9.1 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization หรือ Freeze dry)

3.9.1.1 นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้เป็นจีนัสเดี่ยวๆ Streak ลงบนอาหาร BG-11 agar ลงใน Slant เป็นเวลา 30 วัน ภายใต้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 9 และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 9 และบ่มที่อุณหภูมิ 27°C และ สาหร่าย *Oscillatoria sp.* สายพันธุ์ DSK 52 เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 9 และบ่มที่อุณหภูมิ 27°C (ภาพ 7 ก)

3.9.1.2 เตรียม Skimmilk milk 15% ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก หลอดละ 1 ml จำนวน 30 หลอด (3 สายพันธุ์ ๆ ละ 10 หลอด) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 115 °C เป็นเวลา 15 นาที

3.9.1.3 เตรียมหลอด ampoule จำนวน 30 หลอด พิมพ์รหัสเชื้อ วันเดือนปี ลงบนกระดาษขนาดเล็ก บรรจุในหลอดและปิดด้วยจุกสำลี แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อ

3.9.1.4 เตรียมซัสเพนชัน (Suspension) ของสาหร่าย โดยใช้ Skim milk 15% เททับลงบน slant ของสาหร่าย ใช้ห่วงถ่ายเชื้อขูดสาหร่ายลงเป็นซัสเพนชัน

3.9.1.5 ใช้หลอดหยด (dropper) ที่อบแห้งแล้ว ดูดซัสเพนชันใส่ลงในหลอด ampoule 0.1 ml แล้วอุดปลายหลอดด้วยสำลี

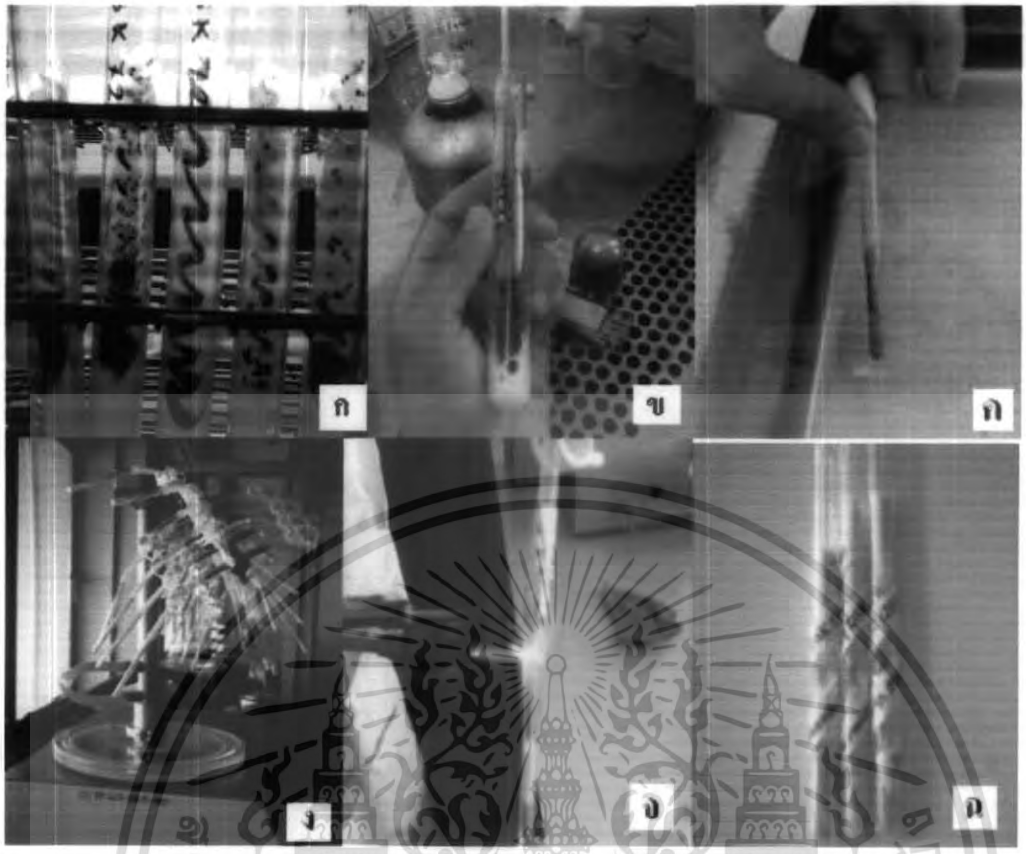
3.9.1.6 นำหลอด ampoule มาทำซัสเพนชันของสาหร่ายให้แข็งตัวก่อน โดยกลิ้งบนเอทานอล 95 % ที่เย็นจัด เป็นเวลาประมาณ 30 นาที โดยพยายามกลั้วซัสเพนชันให้บางที่สุด ระวังอย่าให้เอทานอลเข้าไปในหลอด (ภาพ 7 ข)

3.9.1.7 หลังจากการแช่แข็งเซลล์แล้ว นำสำลีที่อุดปากหลอด ampoule ออกก่อน นำมากำจัดความชื้นออกโดยอยู่ในรูปของไอภายใต้สุญญากาศ โดยเชื่อมต่อเข้ากับเครื่อง lyophilizer ประมาณ 1-2 ชั่วโมง (ภาพ 7 ค)

3.9.1.8 ทำการเชื่อมปิดปากหลอด ampoule ภายใต้สุญญากาศ ด้วยแก๊สไนโตรเจน(ภาพ 7 ง, 7 จ, 7ฉ)

3.9.1.9 การเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยวิธีนี้ สามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานหลายปี โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4°C หรือต่ำกว่าจะช่วยให้เก็บรักษาเชื้อไว้ได้นานขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ 7 การเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization)

(ก) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้เป็นจีนัสเดี่ยวๆ Streak ลงบนอาหาร BG-11 agar ลงใน Slant

(ข) การเตรียมซัสเพนชัน (Suspension) ของสาหร่ายการกลิ้งหลอด ampoule บนเอทานอล 95 % ที่เย็นจัด

(ค) การกลิ้งหลอด ampoule บนเอทานอล 95 % ที่เย็นจัด

(ง) การกำจัดความชื้นออก ภายใต้สุญญากาศ โดยเชื่อมต่อเข้ากับเครื่อง lyophilizer

(จ) การเชื่อมปิดปากหลอด ampoule ภายใต้สุญญากาศ ด้วยแก๊สไนโตรเจน

(ฉ) หลอด ampoule ที่ทำการเชื่อมปิดปากหลอดแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

ในการแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อนบางแหล่งบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ซึ่งมีช่วงอุณหภูมิ 30 - 80 °C pH 7-10 จากโป่งน้ำร้อนดอยสะเก็ดและโป่งน้ำร้อนบ้านห้วยทรายขาวเพื่อนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ทนอุณหภูมิสูง โดยการศึกษาอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ ได้ผลการศึกษาดังนี้

4.1 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถแยกเป็นจีนัสเดี่ยวๆ

จากการแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อนด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการจำแนกหมวดในระดับจีนัส (genus) ทั้ง 2 แหล่ง ด้วยอาหาร สูตร BG-11 โดยวิธี streak plate, pour plate และ enrichment culture สามารถแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้เป็นจีนัสต่างๆ ดังนี้

การเขียนรหัสเชื้อของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้

1. ชื่อวิทยาศาสตร์นำหน้า หมายถึง ชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินระดับจีนัส

- *Synechococcus* sp., *Phormidium* sp., *Oscillatoria sp.*

2. ตัวอักษรลำดับถัดมา หมายถึง สถานที่เก็บตัวอย่าง

-โป่งน้ำร้อนบ้านห้วยทรายขาว (HSK) และโป่งน้ำร้อนดอยสะเก็ด (DSK)

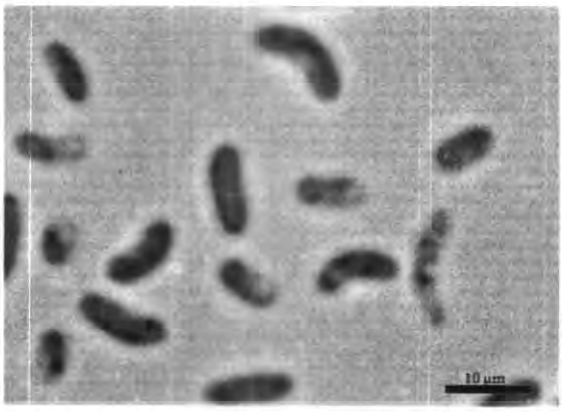
3. ตัวเลขตัวหลัง หมายถึง อุณหภูมิขณะที่เก็บตัวอย่าง

เช่น *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 หมายถึง สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจีนัส *Synechococcus* sp. เก็บจากโป่งน้ำร้อนดอยสะเก็ดที่อุณหภูมิ 72 °C

ในการคัดแยกสาหร่ายจากน้ำพุร้อน 2 แหล่ง โป่งน้ำร้อนบ้านห้วยทรายขาว เมื่อนำตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บได้ มาเพาะเลี้ยงและคัดแยกในห้องปฏิบัติการ พบว่าตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บจากโป่งน้ำร้อนบ้านห้วยทรายขาวไม่สามารถเจริญได้ ส่วนที่โป่งน้ำร้อนดอยสะเก็ดสามารถเพาะเลี้ยงและคัดแยกตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บได้ดังนี้

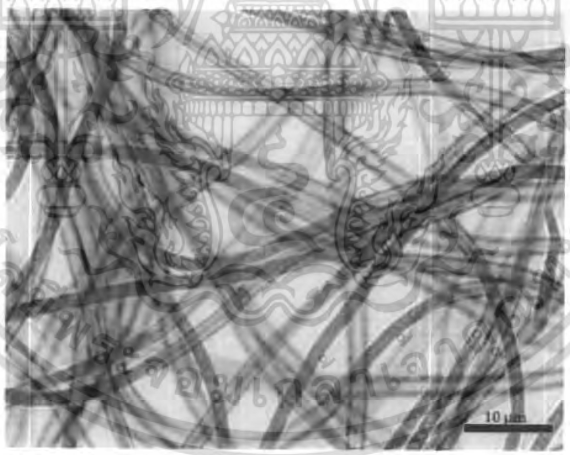
1. *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 (ภาพ 8) แยกได้จากน้ำพุร้อนดอยสะเก็ด อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ ตัวอย่างสาหร่ายเก็บจากอุณหภูมิ 72 °C ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ตรง ปลายมน คล้ายกับทรงกระบอกสั้นๆ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ไม่มีชีทหุ้มเมื่อแบ่งเซลล์แล้วเซลล์อาจไม่หลุด แต่จะติดเป็นคู่ เซลล์มักมีขนาดใหญ่สีเขียวน้ำเงินสด เซลล์มีการแบ่งตัวแบบ binary fission เห็นเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคอดเว้าบริเวณกลางเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ 8 *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72

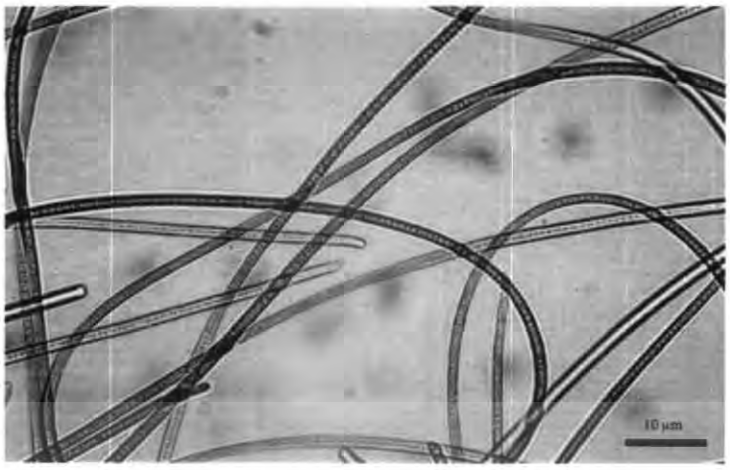
2. *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 (ภาพ 9) แยกได้จากน้ำพุร้อนดอยสะเก็ด อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ ตัวอย่างสาหร่ายเก็บจากอุณหภูมิ 48 °C ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะ trichome ประกอบด้วยเซลล์เรียงกันเป็นแถว มีชีทบางๆ ไม่มีสีหุ้ม มีสีเขียวแกมน้ำเงิน เซลล์รูปร่างทรงกระบอก มีรอยคอดระหว่างรอยต่อของแต่ละเซลล์ apical cell เส้นสายไม่ขดเป็นเกลียว มักอยู่รวมกันหลายๆ เส้น ปลายเซลล์จะโค้งมนหรือบางครั้งจะเรียวแหลม



ภาพ 9 *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48

3. *Oscillatoria sp.* สายพันธุ์ DSK 52 (ภาพ 10) แยกได้จากน้ำพุร้อนดอยสะเก็ด อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ ตัวอย่างสาหร่ายเก็บจากอุณหภูมิ 52 °C ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะเป็นเส้นสายเดี่ยวๆ หรืออาจอยู่รวมกันเป็นกลุ่มหนาแน่น ไม่มีชีทหุ้ม แต่ละสายไม่แตกแขนง trichome ประกอบด้วยเซลล์แถวเดียวเรียงต่อกันเป็นสาย และความกว้างของเซลล์สม่ำเสมอตลอดทั้งสาย แต่ละเซลล์มีความกว้างมากกว่าความยาว apical cell

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ 10 *Oscillatoria sp.* สายพันธุ์ DSK 52

จากภาพ 10 จะเห็นว่า *Oscillatoria sp.* สายพันธุ์ DSK 52 มีลักษณะเป็นสีน้ำตาล ซึ่งมีการเปลี่ยนสีไปจากเดิมที่เป็นสีเขียวในช่วงเริ่มทำการเพาะเลี้ยงนั้นเนื่องมาจาก ความเข้มของแสงในธรรมชาติซึ่งเป็นแหล่งน้ำพุร้อนที่สาหร่ายเจริญอยู่กับความเข้มของแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงนั้นมีความแตกต่างกัน ซึ่งความเข้มแสงในธรรมชาติจะสูงกว่าความเข้มแสงที่ใช้เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการทำให้สาหร่ายมีสีเปลี่ยนไปจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล ซึ่งตรงกับงานวิจัยของยุวดี (2546) ที่ได้กล่าวถึงการทดลองหนึ่งที่ให้ความเข้มของแสงแก่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่างกัน พบว่าถ้าให้ความเข้มของแสงสูง สาหร่ายจะมีสีน้ำเงิน ถ้าให้ความเข้มของแสงต่ำจะเป็นสีแดง

จากการแยกชนิดของสาหร่ายแกมน้ำเงินจากโป่งน้ำพุร้อนคอยสะเก็ดและโป่งน้ำพุร้อนบ้านห้วยทรายขาว พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เก็บจากช่วงอุณหภูมิต่างๆ โดยการทำไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 ที่อุณหภูมิ 40 C และ 55 C สามารถแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากโป่งน้ำพุร้อนคอยสะเก็ดเป็นจีนัสเดี่ยวๆได้ 3 จีนัส ซึ่งจัดอยู่ใน Divition Cyanophyta คือ *Synechococcus* sp. , *Phormidium* sp. , *Oscillatoria* sp. ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Krienitz และคณะ (2002) ได้สำรวจน้ำพุร้อนที่ Lake Bogoria ประเทศเคนยา พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินดังนี้ *Phormidium terebriformis, Oscillatoria willei, Spirulina subsalsa* และ *Synechococcus bigranulatus* เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในกลุ่มนี้มีโครงสร้างของเซลล์ที่ทนทานต่ออุณหภูมิสูง เยื่อหุ้มเซลล์หนาและยังมีเมือกหุ้มอยู่รวมทั้งมีไขมันจำนวนมาก และเอนไซม์ของสาหร่ายในกลุ่มนี้สามารถทำงานได้และไม่เสียสภาพในช่วงอุณหภูมิสูงๆ (อุดมลักษณ์ , 2544)

การแยกสาหร่ายในครั้งนี้ได้นำวิธีการ pour plate, streak plate และวิธีการ enrichment curture มาใช้ ซึ่งจะสามารถใช้ในการแยกสาหร่ายพวกที่เป็นเส้นสายและสาหร่ายเซลล์เดียวได้ ดังเช่น *Synechococcus* sp. , *Phormidium* sp. , *Oscillatoria sp.* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของชัชชฎาและปริณดา(2545) ที่ศึกษาไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากน้ำพุร้อนในภาคเหนือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของประเทศไทย สามารถคัดแยก *Synechococcus* sp., *Pseudanabeana* sp., *Limnothrix* sp., *Chroococidiopsis* sp., *Lyngbya* sp.และ Order Oscillatoriales ที่เก็บจากน้ำพุร้อนแล้วนำมาเพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิ 45 °C นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ วราภรณ์ (2545) ซึ่งสามารถแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 8 สปีชีส์คือ *Chroococidiopsis thermalis* Geitler, *Leptolyngbya* sp., *Mastigocladus laminosus* Cohn , *Phormidium* sp., *Pseudanabaena galeata sense* Anagnotidus, *Synechococcus bigranulatus* Skuja, *Synechococcus lividus* Copeland สายพันธุ์ SKP50 และ DSK74 ที่เก็บจากน้ำพุร้อนแล้วนำมาเพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิ 30°C, 50 °C และ 70 °C แสดงว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญในการคัดแยกสาหร่ายน้ำพุร้อนและน่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีแนวโน้มสามารถนำมาใช้การวินิจฉัยจีนัสของสาหร่ายจากน้ำพุร้อนได้เช่นเดียวกัน

4.2 การหาลักษณะเฉพาะของการทนอุณหภูมิสูงโดยการศึกษาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

4.2.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ

จากการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 ° C หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วันผลการทดลองที่ได้แบ่งตามลักษณะของสาหร่ายได้ดังนี้

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ

***Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72**

เมื่อศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 วัดการเจริญของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่า สาหร่ายชนิดนี้มีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 1.664 ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.1572 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 4.4084 day ในช่วงวันที่ 0-15 โดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสง ที่มีค่าเท่ากับ 0.1 และ 1.057 ในช่วงวันที่ 0-15

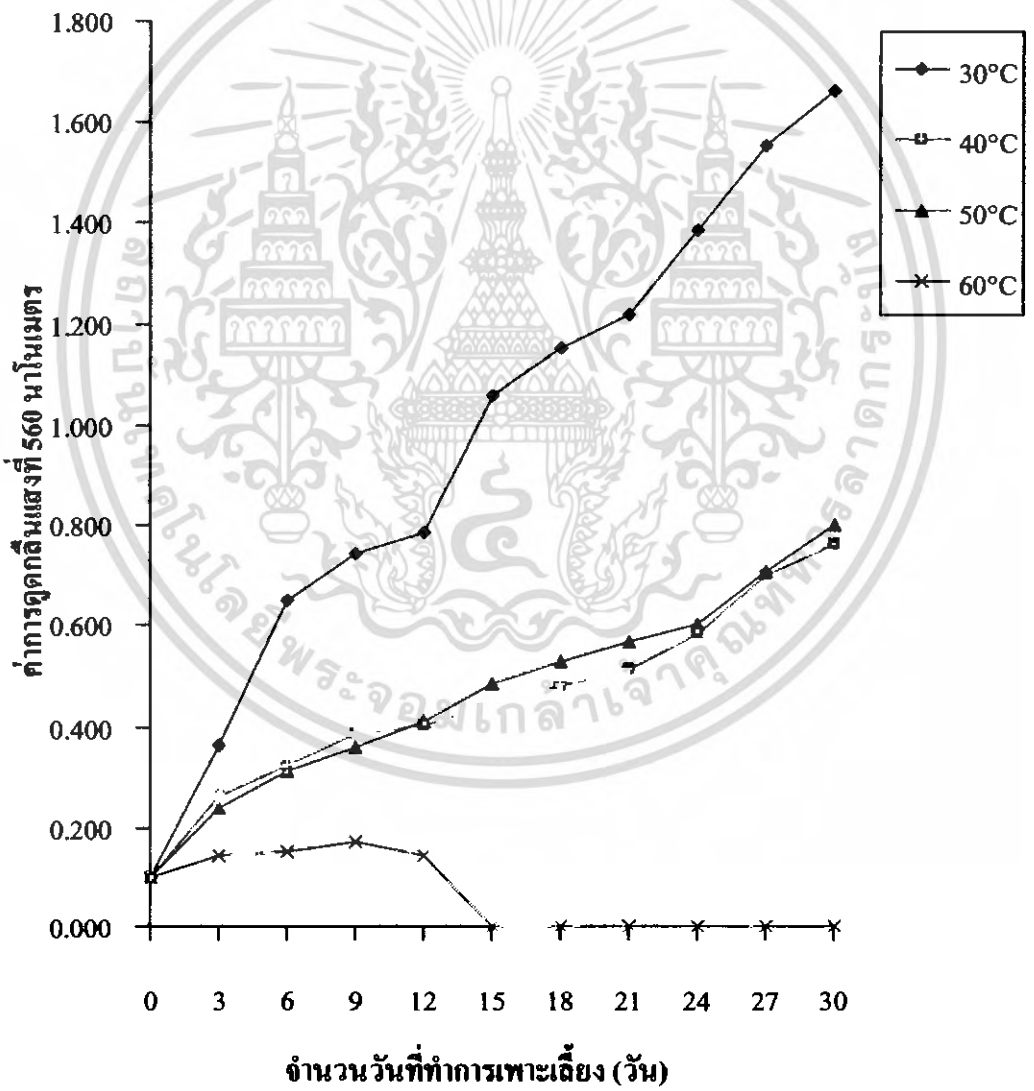
รองลงมาคือ ที่อุณหภูมิ 40 และ 50 ° C ซึ่งผลการทดลองของทั้ง 2 อุณหภูมินี้แทบจะไม่แตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิ 40 ° C มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.761 ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.1506 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 4.6001 day ในช่วงวันที่ 0-9 โดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าเท่ากับ 0.1 และ 0.3880 ในช่วงวันที่ 0-9 ส่วนที่อุณหภูมิ 50 ° C มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.801 ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.1176 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 5.8937 day ในช่วงวันที่ 0-12 โดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าเท่ากับ 0.1 และ 0.410 ในช่วงวันที่ 0-12

รองลงมาคือ อุณหภูมิ 60 ° C มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.172 ในวันที่ 9 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.1192 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 5.8125 day ในช่วงวันที่ 0-3 โดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าเท่ากับ 0.1 และ 0.143 ในช่วงวันที่ 0-3 โดยหลังจากวันที่ 9 สาหร่ายเริ่มตายและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

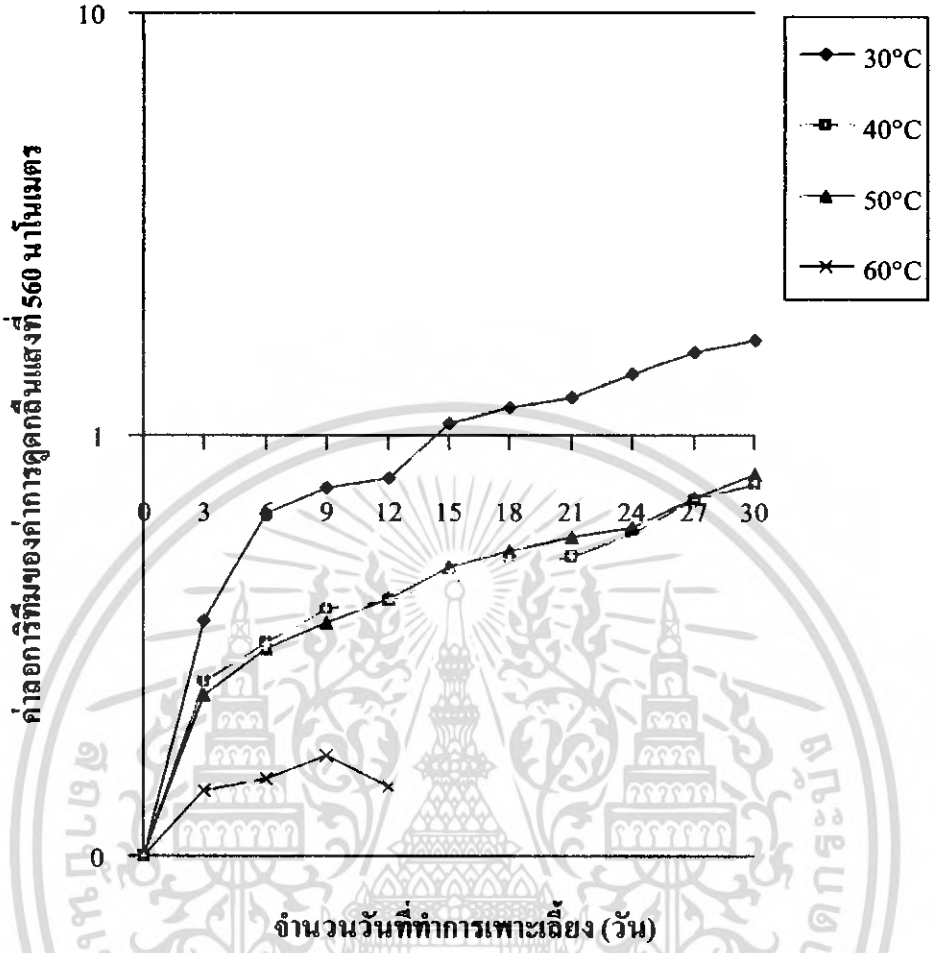
หลังจากวันที่ 12 สาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตต่อได้ ส่วนที่อุณหภูมิ 27° C นั้นสาหร่ายชนิดนี้ไม่สามารถเจริญได้ (ภาพ 11, 12, 13, 14 ตาราง 1, 2, 3)

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 นั้น พบว่าสาหร่ายชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C จากภาพ 13 และ 14 จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 30°C นั้นจะมีค่า specific growth rate สูงที่สุดและมีค่า doubling time ต่ำที่สุด ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากความชันของกราฟลอการิทึมการเจริญในช่วงระยะ log phase ที่นำมาคำนวณหาค่า specific growth rate และค่า doubling time นั้นที่อุณหภูมิ 30°C จะมีค่าความชันของกราฟที่สูงที่สุดทำให้ค่า specific growth rate ที่คำนวณออกมาได้มีค่าสูงที่สุดและส่งผลให้มีค่า doubling time ต่ำที่สุดเช่นเดียวกัน



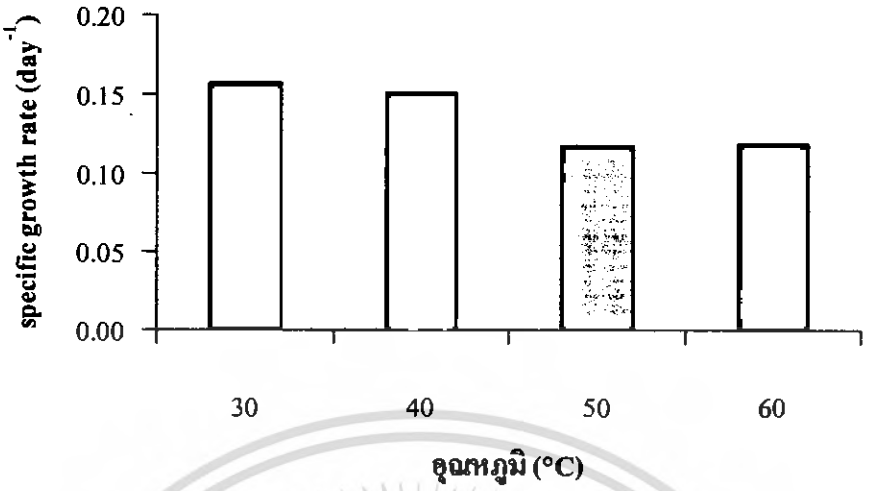
ภาพ 11 การเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

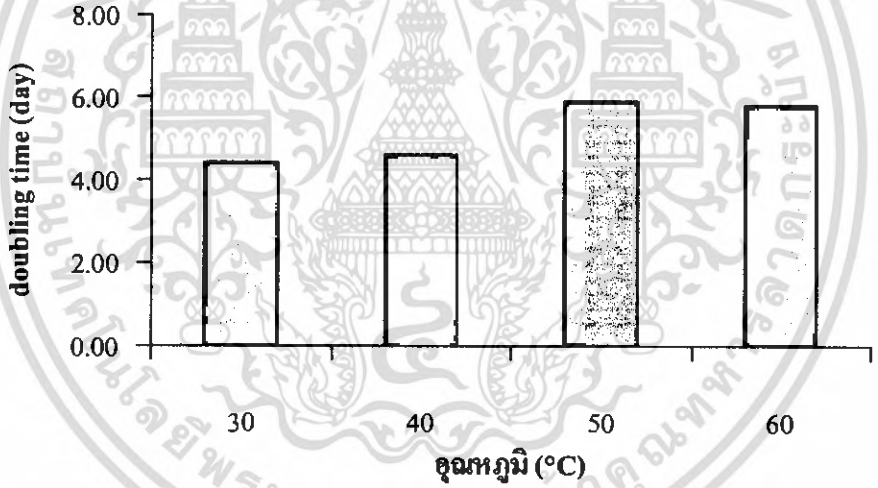


ภาพ 12 กราฟลอการิทึมการเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 จากที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ 13 ค่า specific growth rate (μ) ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 °C



ภาพ 14 ค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย

***Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48**

เมื่อศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 วัดอัตราการเจริญของสาหร่ายโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่า สาหร่ายชนิดนี้มีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่อุณหภูมิ 27 ° C มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.6971 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2591 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.6748 day ในช่วงวันที่ 0-18 โดยคำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0059 mg/l และ 0.6235 mg/l ในช่วงวันที่ 0-18

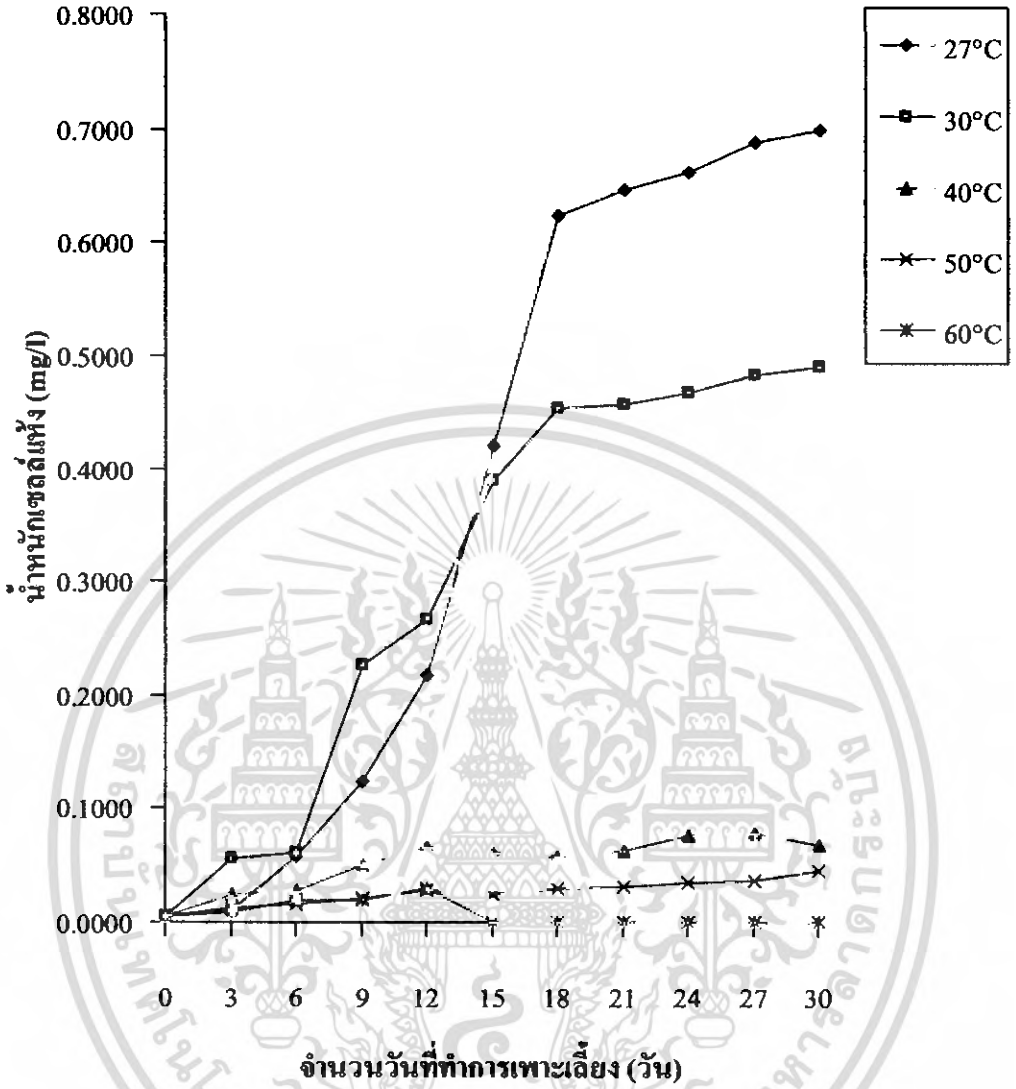
รองลงมาคืออุณหภูมิ 30°C มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.4894 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2414 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.8708 day ในช่วงวันที่ 0-18 โดยคำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0059 mg/l และ 0.4535 mg/l ในช่วงวันที่ 0-18

รองลงมาคืออุณหภูมิ 40 และ 50 ° C ตามลำดับ โดยผลการทดลองของทั้ง 2 อุณหภูมินี้ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยที่อุณหภูมิ 40 ° C มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.0676 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2013 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 3.4422 day ในช่วงวันที่ 0-12 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0059 mg/l และ 0.0659 mg/l ในช่วงวันที่ 0-12 ส่วนที่อุณหภูมิ 50 ° C มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.0453 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.1716 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 4.0384 day ในช่วงวันที่ 0-6 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0059 mg/l และ 0.0165 mg/l ในช่วงวันที่ 0-6

รองลงมาคืออุณหภูมิ 60 °C มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.288 mg/l ในวันที่ 12 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.1939 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 3.5748 day ในช่วงวันที่ 0-6 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0059 mg/l และ 0.0188 mg/l ในช่วงวันที่ 0-6 โดยหลังจากวันที่ 12 สาหร่ายเริ่มตายและไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (ภาพ 15, 16, 17, 18 ตาราง 4, 5, 6)

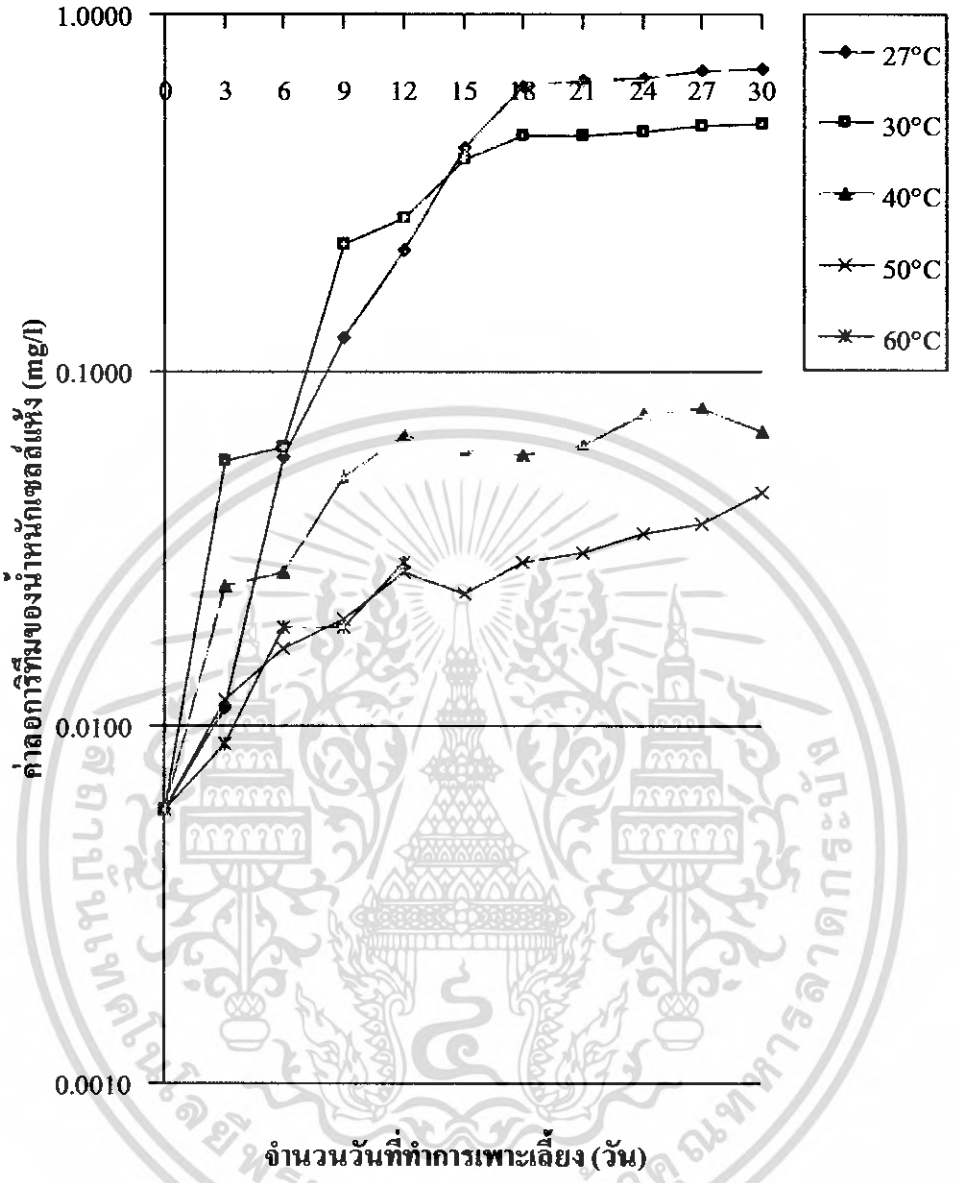
จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 พบว่าสาหร่ายชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 27°C จากภาพ 17 และ 18 จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 30°C นั้นจะมีค่า specific growth rate สูงที่สุดและมีค่า doubling time ต่ำที่สุด ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากความชันของกราฟลอการิทึมการเจริญในช่วงระยะ log phase ที่นำมาคำนวณหาค่า specific growth rate และค่า doubling time นั้นที่อุณหภูมิ 27°C จะมีค่าความชันของกราฟที่สูงที่สุดทำให้ค่า specific growth rate ที่คำนวณออกมาได้นั้นมีค่าสูงที่สุดและส่งผลให้มีค่า doubling time ต่ำที่สุดเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



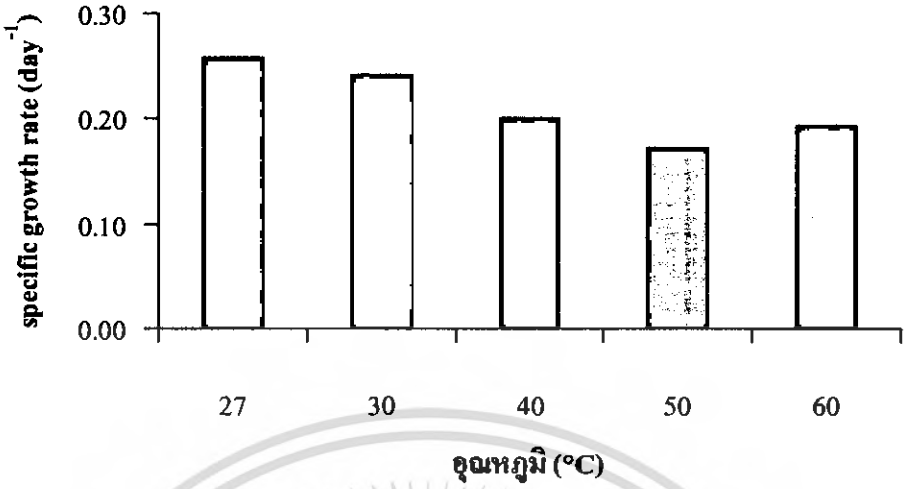
ภาพ 15 การเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

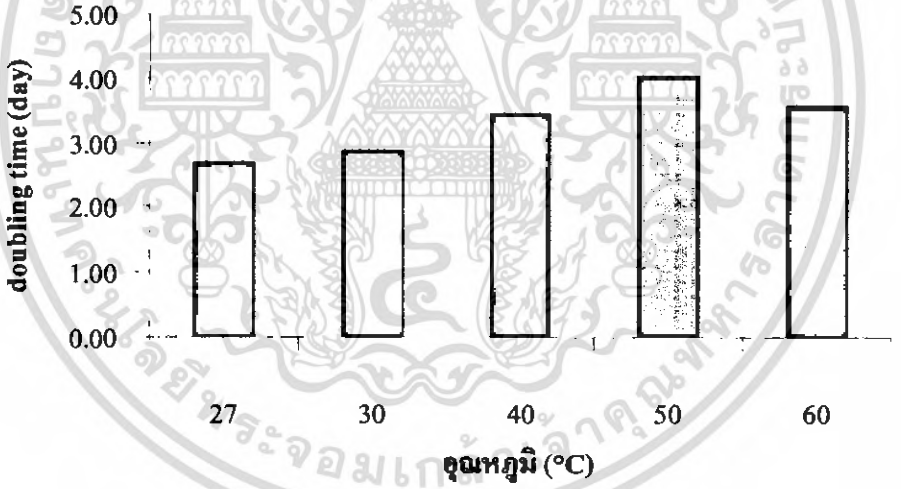


ภาพ 16 กราฟลอการิทึมการเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ 17 ค่า specific growth rate (μ) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C



ภาพ 18 ค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

***Oscillatoria sp.* สายพันธุ์ DSK 52**

เมื่อศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 วัดอัตราการเจริญของสาหร่ายโดยการหาน้ำหนักแห้งทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่า สาหร่ายชนิดนี้มีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่อุณหภูมิ 27°C ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.9571 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2778 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.4948 day ในช่วงวันที่ 0-15 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0071 mg/l และ 0.4553 mg/l ในช่วงวันที่ 0-15

รองลงมาคือ อุณหภูมิ 30°C มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.4400 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2551 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.7163 day ในช่วงวันที่ 0-15 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0071 mg/l และ 0.3241 mg/l ในช่วงวันที่ 0-15

รองลงมาคือ อุณหภูมิ 40 และ 50 °C ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 อุณหภูมินี้ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยที่อุณหภูมิ 40 °C มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.1500 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2939 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.3577 day ในช่วงวันที่ 0-6 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0071 mg/l และ 0.0412 mg/l ในช่วงวันที่ 0-6 ส่วนที่อุณหภูมิ 50 °C มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.1024 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.5474 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 1.2660 day ในช่วงวันที่ 0-3 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0071 mg/l และ 0.0365 mg/l ในช่วงวันที่ 0-3

รองลงมาคือ อุณหภูมิ 60°C มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.0159 mg/l ในวันที่ 21 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2824 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.4537 day ในช่วงวันที่ 0-3 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0071 mg/l และ 0.0165 mg/l ในช่วงวันที่ 0-3 โดยหลังจากวันที่ 21 สาหร่ายเริ่มตายและไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (ภาพ 19, 20, 21, 22 ตาราง 7, 8, 9)

จากภาพ 21 และ 22 จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 27 ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK52 นั้นจะมีค่า specific growth rate ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 40°C และ 50°C และค่า doubling time ที่อุณหภูมิ 30°C นั้นยังมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 40°C และ 50°C ทั้งที่ในความเป็นจริงแล้วที่อุณหภูมิ 30°C ควรจะมีค่า specific growth rate สูงที่สุดและมีค่า doubling time ต่ำที่สุด แต่ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากความชันของกราฟลอการิทึมการเจริญในช่วงระยะ log phase ซึ่งเป็นช่วงที่นำมาคำนวณหาค่า specific growth rate และค่า doubling time ที่อุณหภูมิ 40°C และ 50°C นั้นมีค่าความชันสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30°C ทำให้ค่า specific growth rate ที่อุณหภูมิ 40°C และ 50°C มีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30°C และทำให้ค่า doubling time ที่อุณหภูมิ 40°C และ 50°C มีค่าต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30°C ตามไปด้วย

จากผลการทดลองศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK72 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเท่ากับ 30°C ส่วน *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK52 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเท่ากับ 27 ° C ซึ่งจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นอุณหภูมิที่ไม่สูงมากที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก สาหร่ายที่เราแยกได้แม้จะมีคุณสมบัติเป็น thermotolerant คือ สามารถเจริญเติบโตและทนต่อสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงได้ ซึ่งไม่ได้หมายความว่าจะต้องเจริญเติบโตดีที่สุดที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญจึงอาจอยู่ที่อุณหภูมิต่ำกว่าที่เจริญได้ในธรรมชาติก็เป็นได้

ส่วนการที่ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK72 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 ° C สามารถเจริญไปได้ระยะหนึ่งแล้วจึงเริ่มตายทั้งที่ในธรรมชาติสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 72° C เนื่องมาจากในธรรมชาติจะเป็นการเพาะเลี้ยงแบบสภาวะเปิดดังนั้นอุณหภูมิ ณ บริเวณที่สาหร่ายเจริญเติบโตอยู่นั้นจะไม่เท่ากันตลอดทั้งวัน คือ อุณหภูมิจะมีการเพิ่มขึ้นและลดลงซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ลม, แสงอาทิตย์, อัตราการไหลของน้ำในบริเวณนั้น เป็นต้น ซึ่งปัจจัยต่างๆเหล่านี้จะส่งผลให้อุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาทำให้สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ แต่สำหรับการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนั้นจะเป็นการเพาะเลี้ยงในระบบปิดคือ มีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่อยู่ที่อุณหภูมิเดียวตลอดทั้งวันซึ่งทำให้สาหร่ายไม่มีช่วงเวลาปรับตัวในการเจริญ จึงทำให้สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการไม่สามารถเจริญได้และเริ่มตายในที่สุด (ยุวดี, 2546)

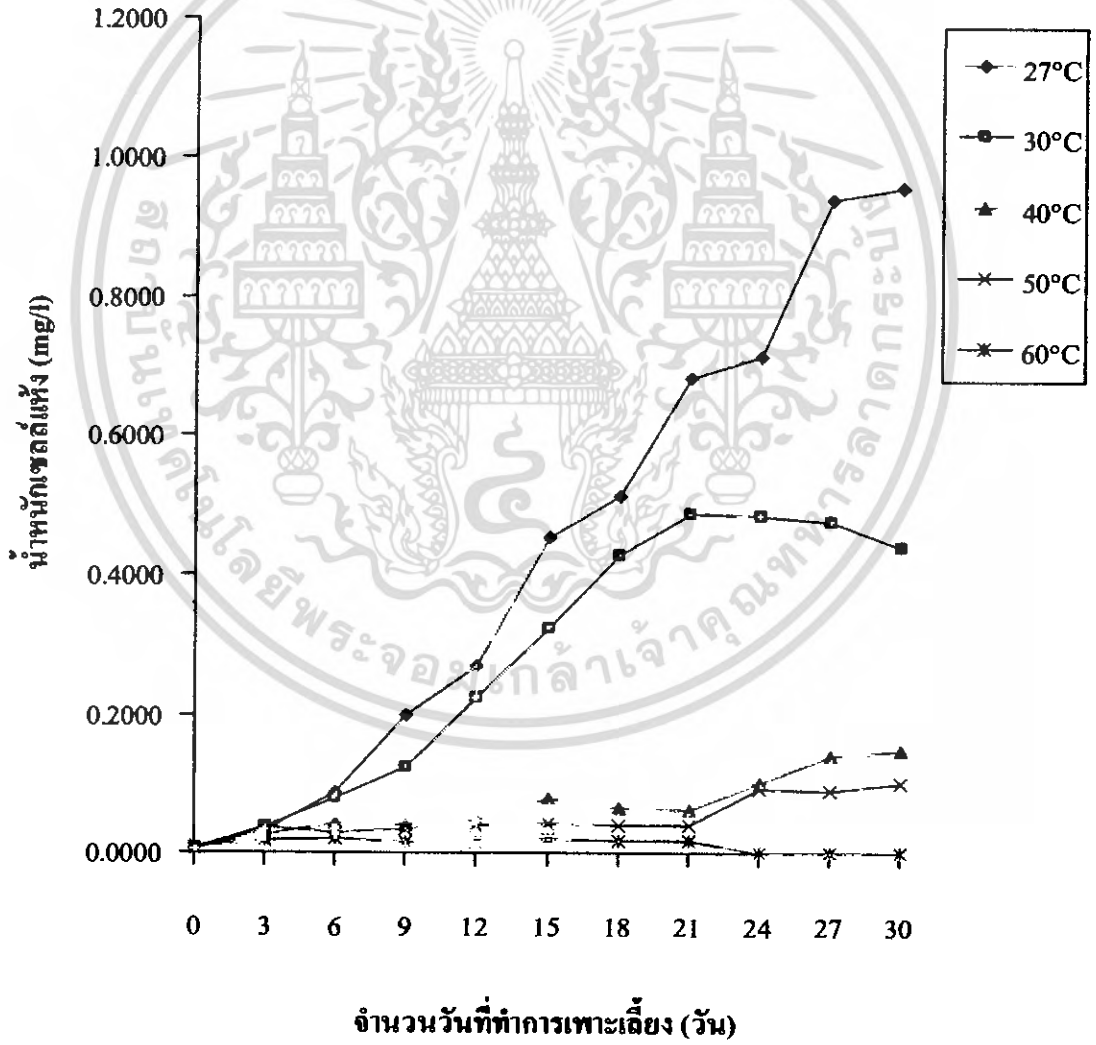
จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27°C , 30°C , 40° C , 50° C และ 60°C จะเห็นว่าสาหร่ายพวกที่เป็นเส้นสาย คือ *Phormidium* sp. , *Oscillatoria* sp. มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 27°C ส่วนสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว คือ *Synechococcus* sp. มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 30 °C ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วราภรณ์ (2545) พบว่า, *Leptolyngbya* sp., *Mastigocladus laminosus* Cohn, *Phormidium* sp., *Pseudanabaena galeata sense* Anagnotidus สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C และงานวิจัยของนุชนรี , 2543 ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทดลองเลี้ยง *Oscillatoria* sp. ซึ่งอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-35 °C พบว่า *Oscillatoria* sp. สามารถเจริญได้ดีที่สุด ดังนั้นอุณหภูมิดังกล่าว จึงใกล้เคียงกับโครงงานพิเศษครั้งนี้ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Synechococcus* sp. จะสอดคล้องกับรายงานของ Krienitz และคณะ (2002) ที่ว่า *Synechococcus* spp. สามารถพบได้ในน้ำพุร้อนทั่วโลก ซึ่งพบว่า *S. bigranulatus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-75 °C

นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายเหล่านี้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญต่ำกว่าอุณหภูมิที่เจริญในธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ วราภรณ์ (2545) อ้างถึง Brock (1978) และ Peary and Castenholz (1964) ว่ามีการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechococcus lividus* ที่เก็บมาจากอุณหภูมิต่างๆในน้ำพุร้อน Hunter รัฐโอริกอน พบว่าสามารถแบ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 สายพันธุ์ที่เก็บมาจากอุณหภูมิ 45 °C , 48 °C และ 53 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 45 °C กลุ่มที่ 2 สายพันธุ์ที่เก็บมาจากอุณหภูมิ 55 °C และ 60 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 50 °C กลุ่มที่ 3 สายพันธุ์ที่เก็บมาจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

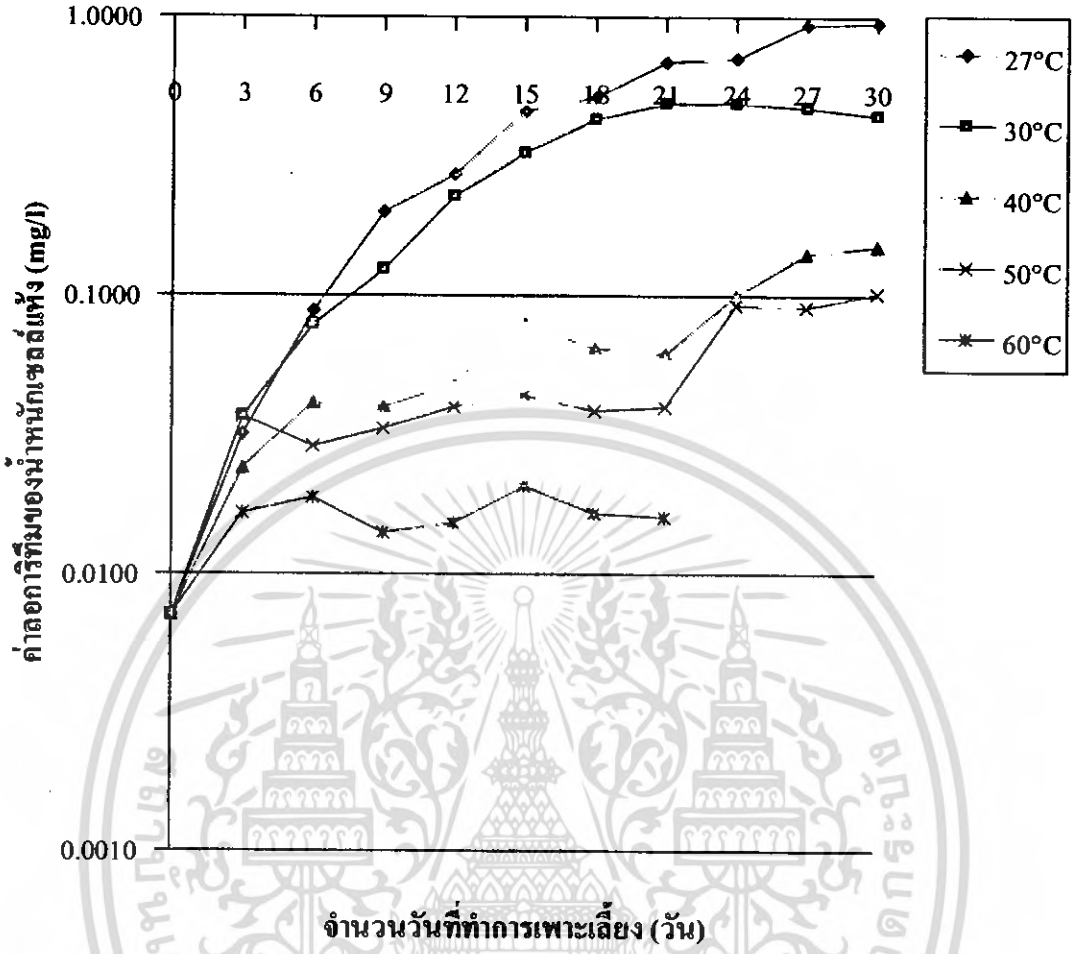
อุณหภูมิ 66 °C และ 71 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 55 °C กลุ่มที่ 4 สายพันธุ์ที่เก็บมาจากอุณหภูมิ 75 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 65 °C

เนื่องจากสาหร่ายที่แยกทั้ง 3 สายพันธุ์นี้มีคุณสมบัติเป็น thermotolerant ซึ่งสาหร่ายบางจีนัสสามารถเจริญได้ถึงอุณหภูมิ 50 °C นับว่ามีประโยชน์อย่างยิ่ง ในการวิจัยและทางอุตสาหกรรมที่ต้องใช้อุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิตเนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงและสกัดผลผลิตต่างๆได้ที่อุณหภูมิสูงโดยไม่เสียสภาพและไม่สูญเสียความสามารถในการทำงานของผลผลิต นอกจากนี้ยังเป็นการประหยัดต้นทุนและอุณหภูมิสูงยังป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นอีกด้วย (คนึงกานต์, 2547)



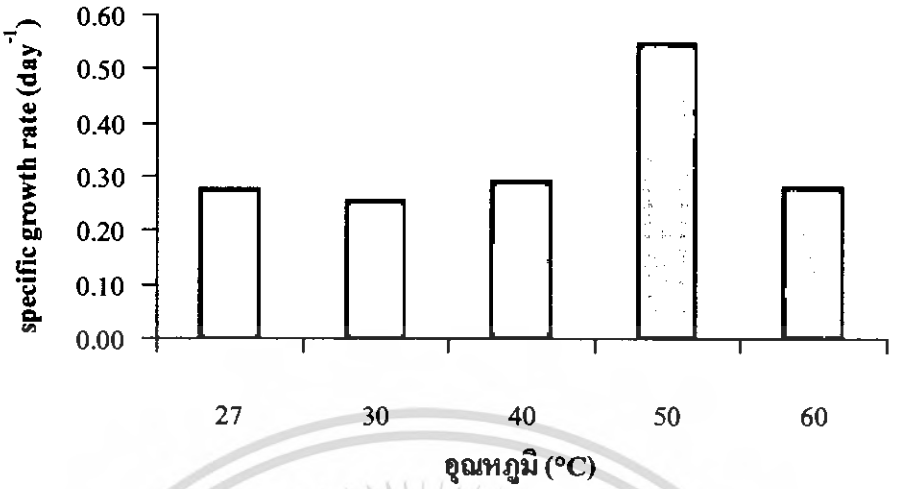
ภาพ 19 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

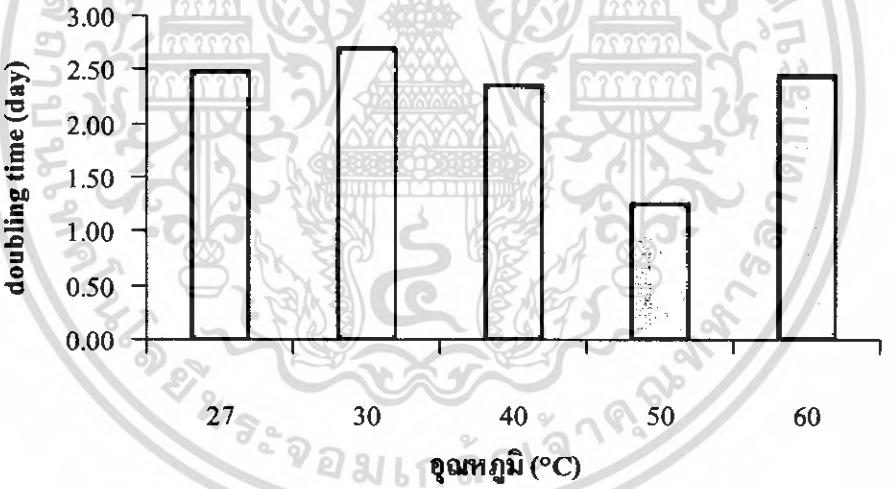


ภาพ 20 กราฟลอการิทึมการเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ 21 ค่า specific growth rate (μ) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C



ภาพ 22 ค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50 และ 60 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ

จากการศึกษาหาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร BG-11 ที่ pH 6, 7, 8, 9 และ 10 และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 4.2.1 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ผลการทดลองที่ได้แบ่งตามลักษณะของสาหร่ายได้ดังนี้

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ

***Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72**

เมื่อศึกษาหาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 วัดการเจริญของสาหร่ายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 nm ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C พบว่าสาหร่ายชนิดนี้จะมีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ pH 9 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.8180 ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.0860 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 8.0618 day ในช่วงวันที่ 0-24 โดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่า 0.1 และ 0.787 ในช่วงวันที่ 0-24

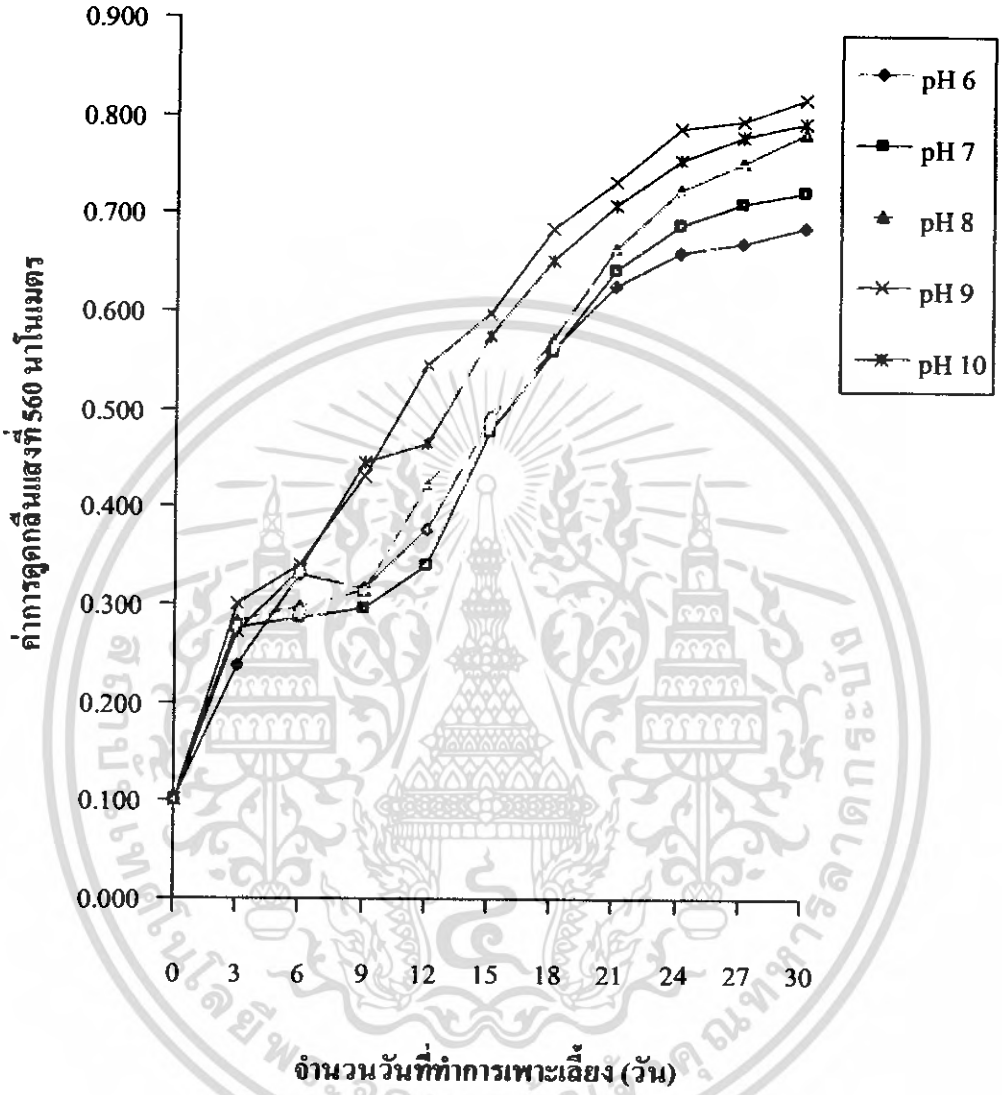
รองลงมาคือ pH 10 และ pH 8 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกันมากจนแทบจะไม่แตกต่างกัน โดยผลการทดลองที่ pH 10 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.7940 ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.0843 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 8.2220 day ในช่วงวันที่ 0-24 โดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่า 0.1 และ 0.7560 ในช่วงวันที่ 0-24 ส่วนผลการทดลองที่ pH 8 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.7830 ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.0902 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 7.6812 day ในช่วงวันที่ 0-21 โดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่า 0.1 และ 0.665 ในช่วงวันที่ 0-21

รองลงมาคือ pH 7 และ 6 ตามลำดับ โดยให้ผลการทดลองที่มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยที่ pH 7 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.7230 ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.0885 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 7.8266 day ในช่วงวันที่ 0-21 โดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่า 0.1 และ 0.642 ในช่วงวันที่ 0-21 ส่วนผลการทดลองที่ pH 6 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.6864 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.0873 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 7.9343 day ในช่วงวันที่ 0-21 โดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่า 0.1.และ 0.626 ในช่วงวันที่ 0-21 (ภาพ 23, 24, 25, 26 ตาราง 10, 11, 12)

จากผลการทดลองในภาพ 25 และ 26 จะเห็นได้ว่าค่า specific growth ที่ pH 6, 7 และ 8 มีค่าสูงกว่าที่ pH 9 และค่า doubling time ที่ pH 6, 7 และ 8 มีค่าต่ำกว่าที่ pH 9 ทั้งที่ในความเป็นจริงแล้วที่ pH 9 ควรจะมีค่า specific growth rate สูงสุด และมีค่า doubling time ต่ำที่สุด แต่ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากความชันของกราฟลอการิทึมการเจริญในช่วงระยะ log phase ซึ่งเป็นช่วงที่เรานำมาคำนวณหาค่า specific growth และค่า doubling time นั้น ที่ pH 6, 7 และ 8 มีค่าความชันสูงกว่าที่

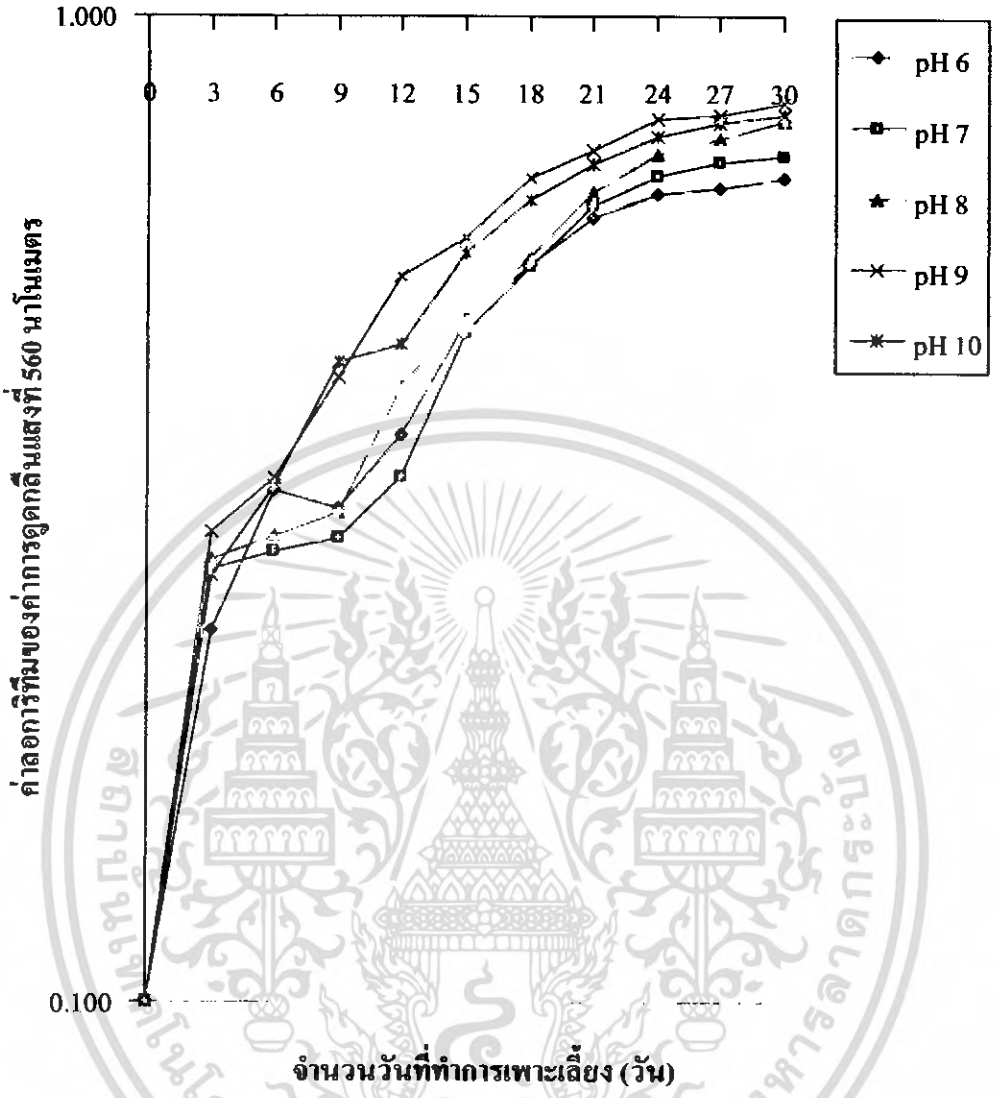
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 9 ทำให้ค่า specific growth rate ที่คำนวณออกมานั้นมีค่าสูงตามไปด้วย และทำให้ค่า doubling time มีค่าต่ำกว่าที่ pH 9



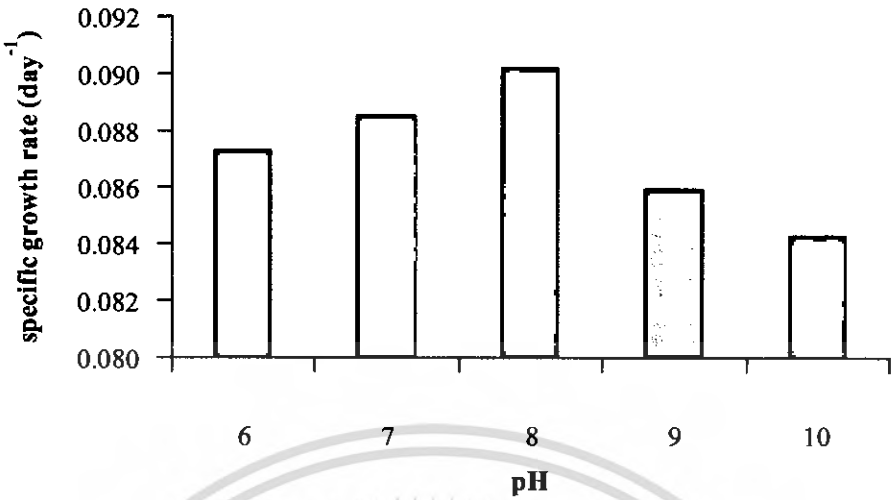
ภาพ 23 การเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

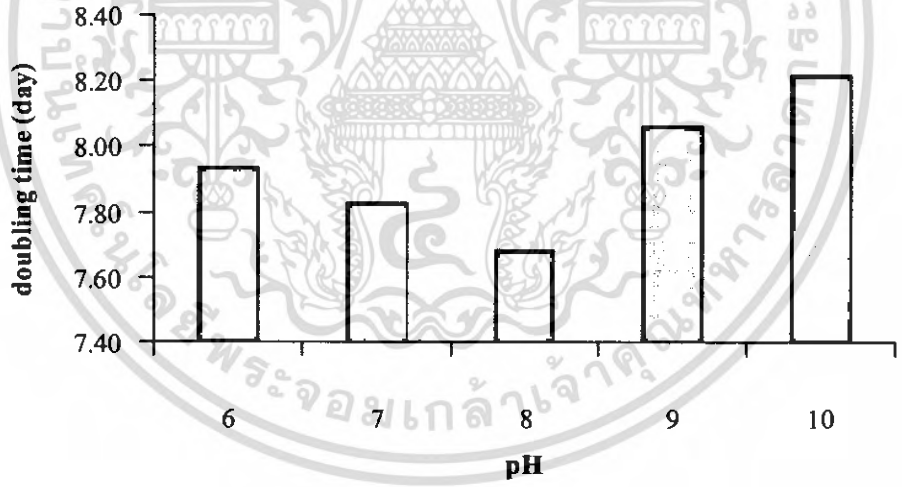


ภาพ 24 กราฟลอการิทึมการเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9 และ 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ 25 ค่า specific growth rate (μ) ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C



ภาพ 26 ค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย

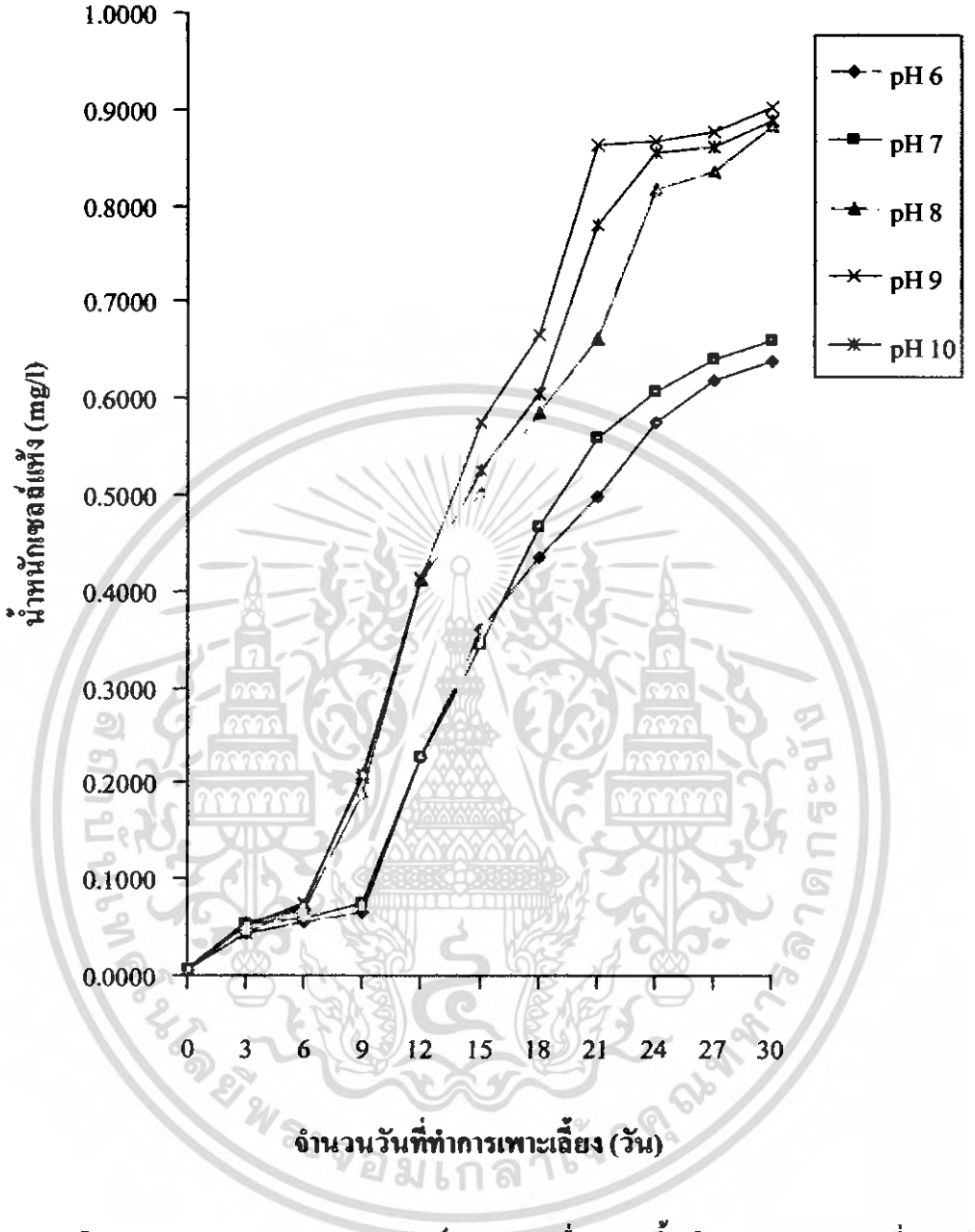
***Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48**

เมื่อศึกษาหาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 วัดอัตราการเจริญของสาหร่ายโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 27 °C พบว่าสาหร่ายชนิดนี้จะมีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ pH 9 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.9024 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2375 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.9174 day ในช่วงวันที่ 0-21 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0059 mg/l และ 0.8629 mg/l ในช่วงวันที่ 0-21

รองลงมาคือ pH 10 และ 8 ตามลำดับซึ่งให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกันมากจนแทบจะไม่แตกต่างกัน โดยที่ค่า pH 10 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.8882 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2327 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.9782 day ในช่วงวันที่ 0-21 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0059 mg/l และ 7794 mg/l ในช่วงวันที่ 0-21 ส่วนที่ค่า pH 8 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.8818 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.1980 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 3.4999 day ในช่วงวันที่ 0-24 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0059 mg/l และ 0.8176 mg/l ในช่วงวันที่ 0-24

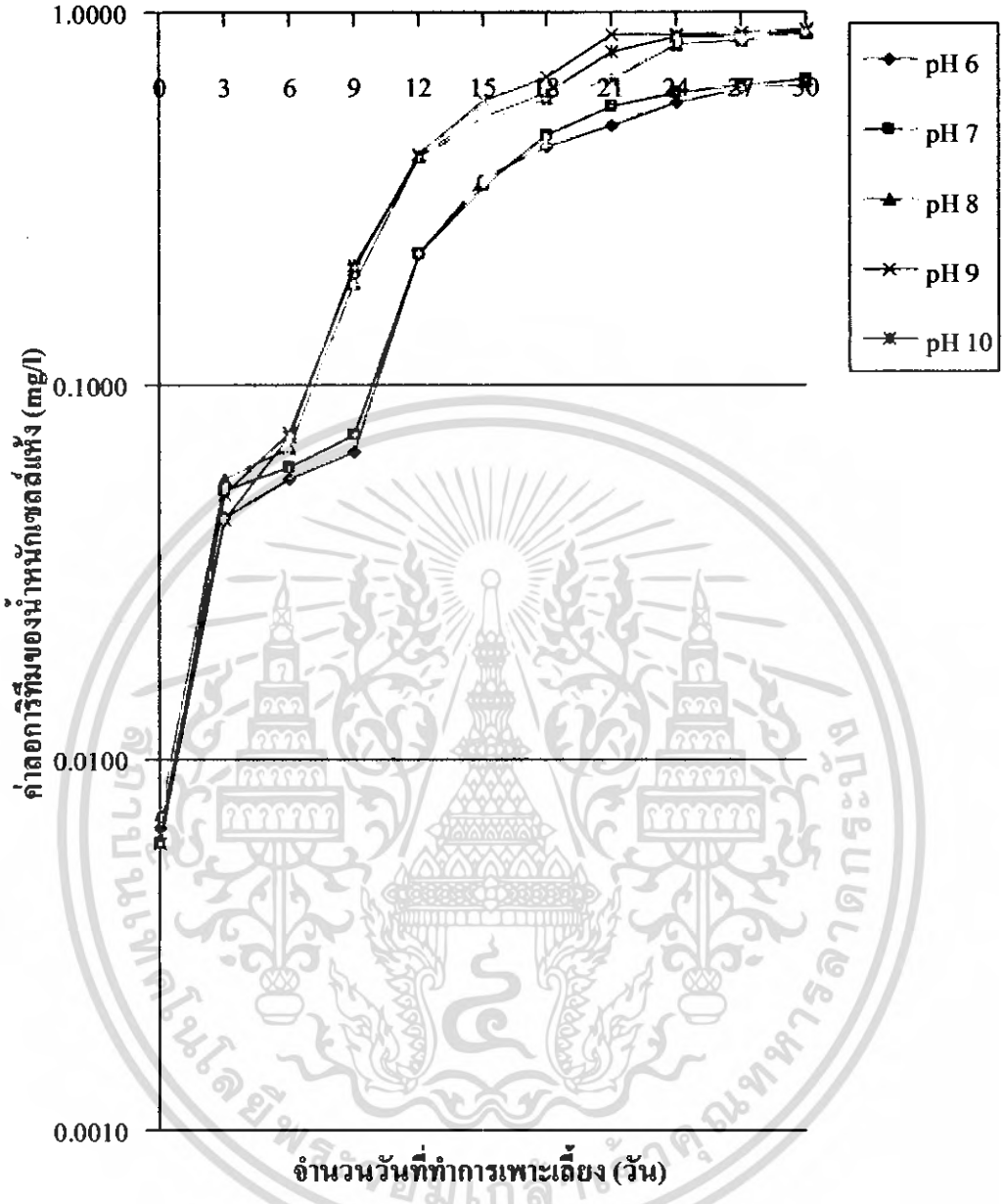
รองลงมาคือ pH 7 และ pH 6 ตามลำดับซึ่งให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยที่ pH 7 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.6588 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2170 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 3.1943 day ในช่วงวันที่ 0-21 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0059 mg/l และ 0.5600 mg/l ในช่วงวันที่ 0-21 ส่วนที่ค่า pH 6 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.6376 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2067 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 3.3521 day ในช่วงวันที่ 0-21 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0065 mg/l และ 0.4971 mg/l ในช่วงวันที่ 0-21 (ภาพ 27, 28, 29, 30 ตาราง 13, 14, 15)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



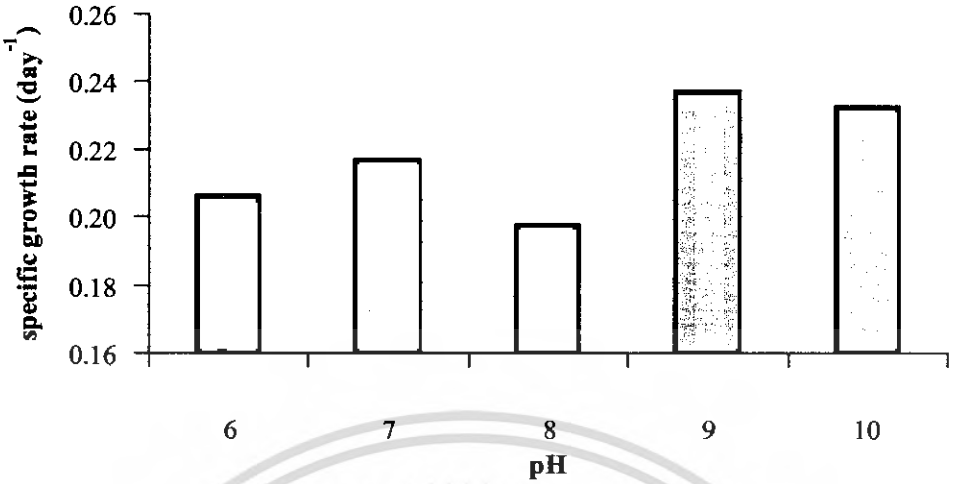
ภาพ 27 การเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

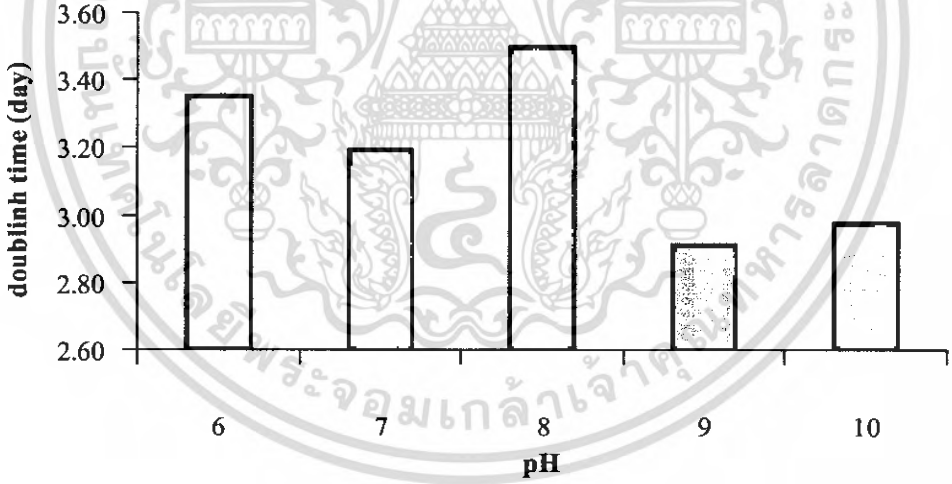


ภาพ 28 กราฟลอการิทึมการเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ 29 ค่า specific growth rate (μ) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK48 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C



ภาพ 30 ค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

***Oscillatoria sp.* สายพันธุ์ DSK 52**

เมื่อศึกษาหาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่าย *Oscillatoria* sp. วัดอัตราการเจริญของสาหร่ายโดยการหาน้ำหนักแห้งทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 30 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 27 °C พบว่าสาหร่ายชนิดนี้จะมีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ pH 9 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.9635mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2171 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 3.1914 day ในช่วงวันที่ 0-18 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0071 mg/l และ 0.5600 mg/l ในช่วงวันที่ 0-18

รองลงมาคือ pH 10 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.7765 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2423 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.8601 day ในช่วงวันที่ 0-18 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0065 mg/l และ 0.5071 mg/l ในช่วงวันที่ 0-18

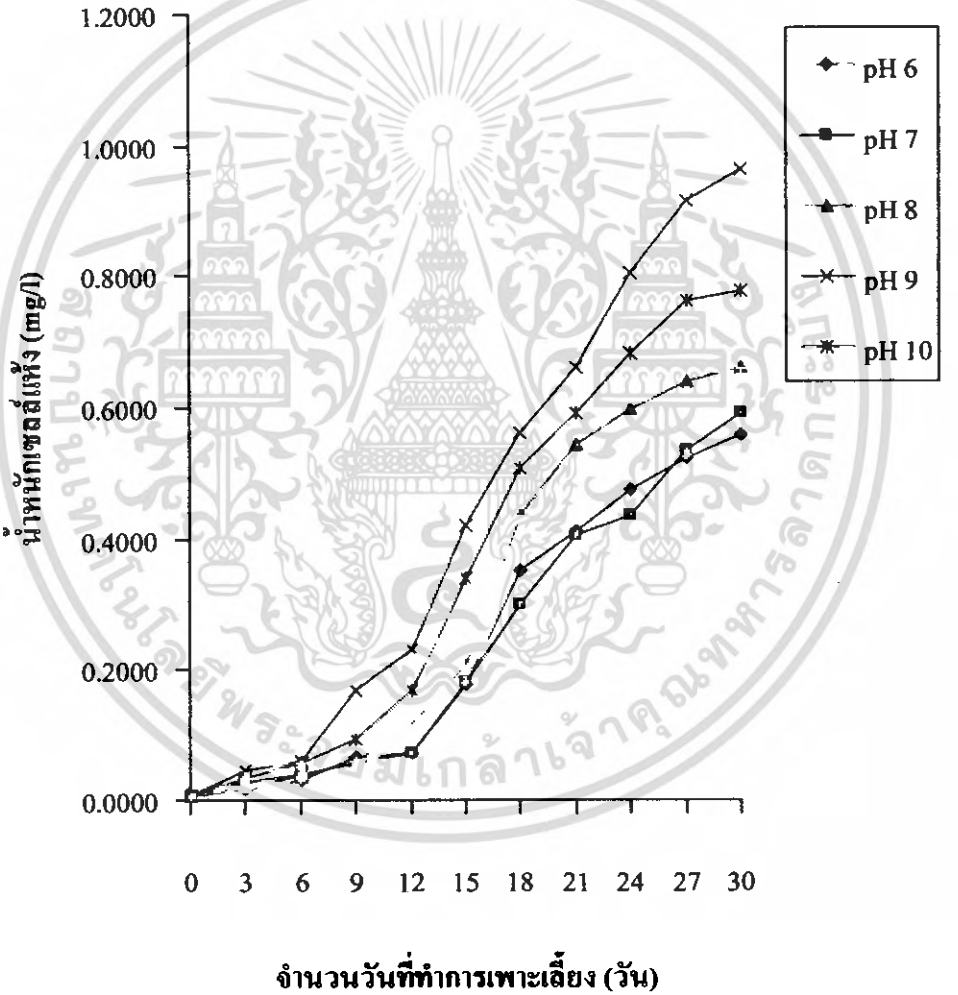
รองลงมาคือค่า pH 8 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.6588 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2340 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.9619 day ในช่วงวันที่ 0-18 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0065 mg/l และ 0.4365 mg/l ในช่วงวันที่ 0-18

รองลงมาคือ pH 7 และ pH 6 ตามลำดับซึ่งให้ผลการทดลองที่มีใกล้เคียงกันมากจนแทบจะไม่แตกต่างกัน โดยที่ค่าpH 7 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.5912 mg/l ในวันที่30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2189 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 3.1694 day ในช่วงวันที่ 0-18 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0059 mg/l และ 0.3012 mg/l ในช่วงวันที่ 0-18 ส่วนที่ค่า pH6 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.5571mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2171 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 3.1914 day ในช่วงวันที่ 0-18 โดยคำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าเท่ากับ 0.0071 mg/l และ 0.3518 mg/lในช่วงวันที่ 0-18 (ภาพ 31, 32, 33, 34 ตาราง 16, 17, 18)

จากการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยการเพาะเลี้ยงที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6, 7, 8, 9 และ 10 นำสาหร่ายพวกที่เป็นเส้นสายนำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิจากการทดลองข้างต้น 27°C พบว่า *Phormidium* sp. , *Oscillatoria* sp. สามารถเจริญได้ดีที่ค่า pH 9 ส่วนสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว นำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C จากการทดลองข้างต้น *Synechococcus* sp. สามารถเจริญได้ดีที่ค่า pH 9 เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสมหมาย (2507) ได้ทดลองหาการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ pH ต่างๆ พบว่า *Oscillatoria* sp. สามารถเจริญได้ดีที่ pH 8-9 และงานวิจัยของวราภรณ์ (2545) ได้ทำการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) พบว่า *Mastigocladus laminosus* Cohn, *Phormidium* sp. สามารถเจริญได้ดีที่ pH 7 ส่วน *Chroococidiopsis thermalis* Geitler, *Leptolyngbya* sp. , *Pseudanabaena galeata sense* Anagnotidus , *Synechococcus bigranulatus* Skuja , *Synechococcus lividus* Copeland สายพันธุ์ SKP50 และ DSK74 สามารถเจริญได้ดีที่ pH 9 ซึ่งใกล้เคียงกับโครงงานพิเศษนี้

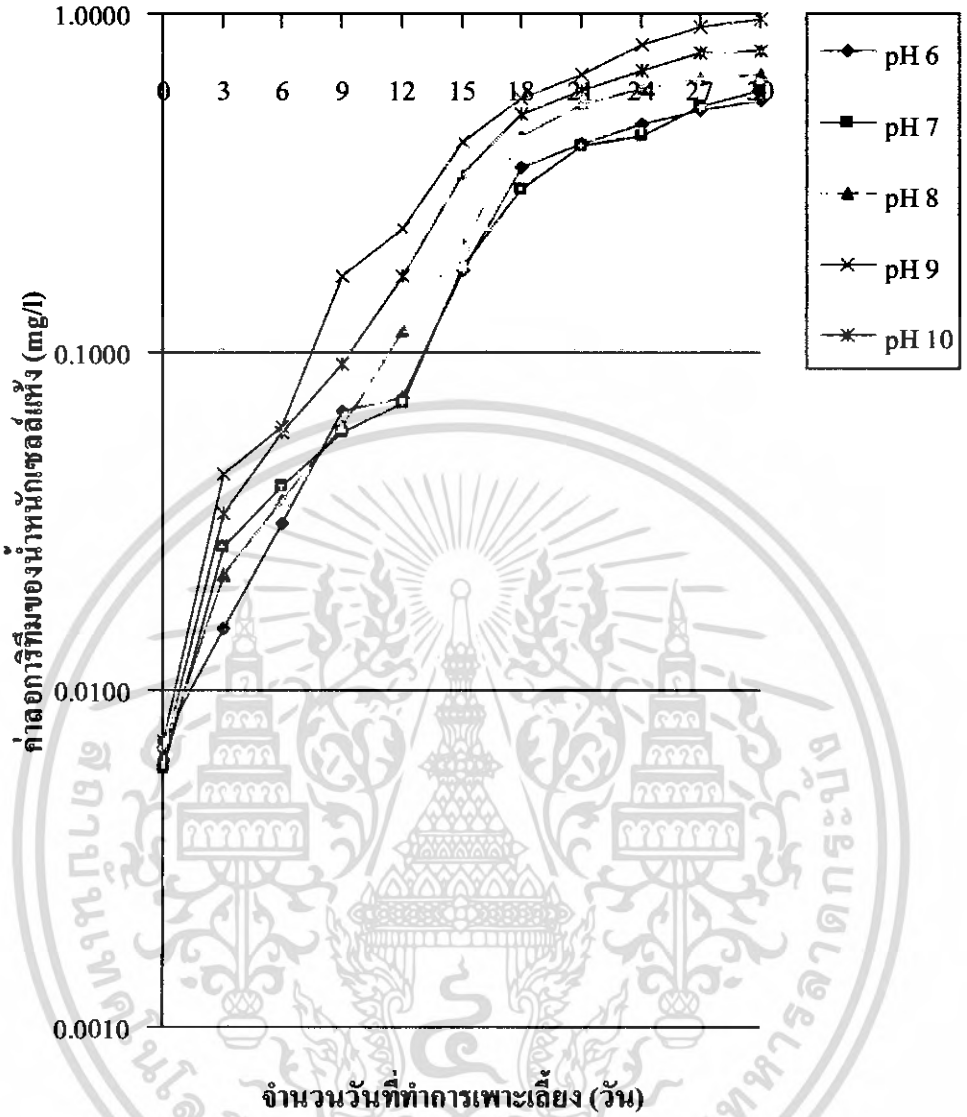
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่ pH 9 ซึ่งเป็นค่า pH ค่อนข้างสูง เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากแหล่งน้ำพุร้อนที่ทำการเก็บตัวอย่างและคัดแยกสาหร่ายได้นั้นคือ น้ำพุร้อนดอยสะเก็ด ซึ่งมีลักษณะเป็นแบบ alkaline springs จากงานวิจัยของอุดมลักษณ์ (2544) ได้กล่าวว่า น้ำพุร้อนประเภทนี้จะมีค่า pH ของน้ำพุร้อนประมาณ 9 ดังนั้นเมื่อทดลองหาสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด คือ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72, *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK48 และ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK52 ซึ่งแยกได้จากน้ำพุร้อนดอยสะเก็ด จึงทำให้สาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ pH 9 เช่นเดียวกัน



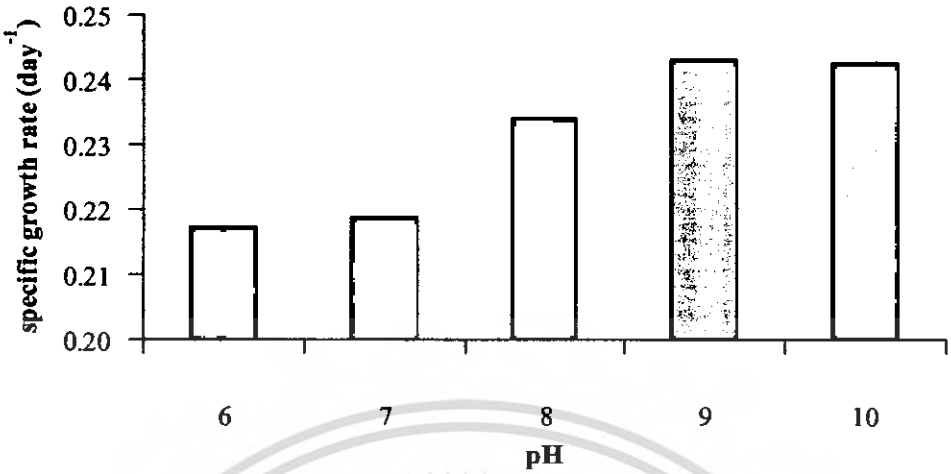
ภาพ 31 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

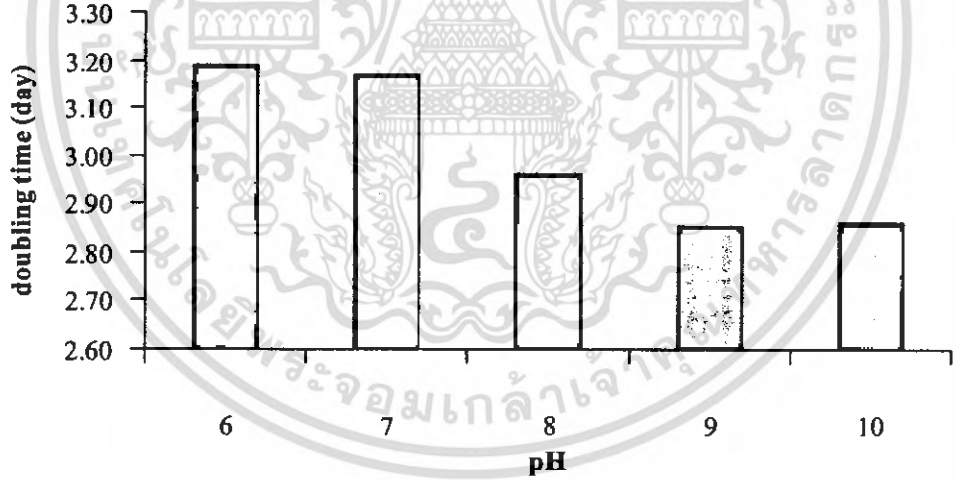


ภาพ 32 กราฟลอการิทึมการเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ 33 ค่า specific growth rate (μ) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C



ภาพ 34 ค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

4.3.1 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization หรือ Freeze dry)

หลังจากที่ทำการแยกสาหร่ายเป็นจีนัสเดี่ยวๆที่ Streak ลงบนอาหาร BG-11 agar ลงใน Slant เป็นเวลา 30 วัน ภายใต้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 9 และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 9 และบ่มที่อุณหภูมิ 27°C และ สาหร่าย *Oscillatoria sp.* สายพันธุ์ DSK 52 เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 9 และบ่มที่อุณหภูมิ 27°C แล้ว สามารถเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเหล่านี้ไว้ โดยการทำ culture collection ด้วยวิธี lyophilization ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของวราภรณ์ (2545) อ้างถึง Castenholz (1981) วิธีนี้สามารถเก็บรักษาสาหร่ายไว้ในลักษณะที่ยังมีชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานานหลายปี ภายใต้อุณหภูมิต่ำ (-20 ถึง -70 °C) แต่การเก็บรักษาแบบ lyophilization หรือ Freezing ด้วยไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -20 °C นั้นอาจไม่เหมาะกับการเก็บรักษาสาหร่ายพวกเซลล์เดี่ยวๆ เนื่องจากสาหร่ายอาจจะสูญเสียความสามารถในการมีชีวิตได้ (วราภรณ์, 2545 อ้างถึง Castenholz, 1970)

ภาพ 35 ลักษณะของสาหร่ายที่ทำการเก็บรักษาโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization) ในหลอด ampoule

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองการแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน การวินิจฉัยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้เป็นจีนัสเดี่ยวๆและการหาลักษณะเฉพาะของการทนอุณหภูมิสูงโดยการศึกษาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้ สามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

1. จากการแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในน้ำพุร้อนจากน้ำพุร้อน 2 แหล่งในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย คือ โป่งน้ำร้อนดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ และโป่งน้ำร้อนบ้านห้วยทรายขาว จังหวัดเชียงราย โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ช่วงอุณหภูมิ 30-80°C pH 7-10 จากนั้นนำตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่อุณหภูมิ 40 และ 55°C และแยกให้เป็นจีนัสเดี่ยวๆ ด้วยวิธี pour plate และ streak plate พบว่าสามารถแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้ทั้งหมด 3 จีนัส ดังนี้ คือ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72, *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 และ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52

2. จากการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 พบว่า สาหร่ายชนิดนี้เจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 1.664 ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.1572 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 4.4084 day ในช่วงวันที่ 0-15

3. จากการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 พบว่า สาหร่ายชนิดนี้เจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 27°C มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.6971 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2591 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.6748 day ในช่วงวันที่ 0-18

4. จากการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 พบว่า สาหร่ายชนิดนี้เจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 27°C มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.9571 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2778 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.4948 ในช่วงวันที่ 0-15

5. จากการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 พบว่า สาหร่ายชนิดนี้จะมีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ pH 9 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.8180 ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.0860 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 8.0618 day ในช่วงวันที่ 0-21

6. จากการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 พบว่า สาหร่ายชนิดนี้จะมีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ pH 9 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.9024 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2375 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.9174 day ในช่วงวันที่ 0-21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. จากการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 พบว่า สาหร่ายชนิดนี้จะมีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่ pH 9 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.9635 mg/l ในวันที่ 30 และมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.2430 day^{-1} และค่า t_d เท่ากับ 2.8521 day ในช่วงวันที่ 0-18

8. เมื่อทำการเก็บรักษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้ด้วยวิธี lyophilization สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิต่ำโดยสาหร่ายจะยังคงอยู่ในรูปเซลล์ที่มีชีวิต

ข้อเสนอแนะ

1. สาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ที่แยกได้นั้นจัดเป็นพวก thermotolerant คือสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง จึงสามารถเพาะเลี้ยงและสกัดผลผลิตต่างๆที่ต้องการได้ที่อุณหภูมิสูงโดยไม่เสียสภาพและไม่สูญเสียความสามารถในการทำงานของผลผลิต นอกจากนี้ยังเป็นการประหยัดต้นทุนและที่อุณหภูมิสูงยังช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อีกด้วย

2. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดเป็นพวก autotroph ซึ่งสามารถสังเคราะห์อาหารเองได้โดยอาศัยพลังงานแสง จึงจำเป็นต้องให้แสงตลอดเวลาซึ่งจะเป็นการสิ้นเปลืองพลังงานและต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเป็นอย่างมาก ดังนั้นแนวทางในการลดต้นทุนดังกล่าวนี้อาจทำได้โดยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสภาพที่ทำให้กลายเป็น heterotroph โดยให้แสงจากธรรมชาติในเวลากลางวันและไม่ให้แสงสว่างในเวลากลางคืน การกระทำเช่นนี้จะช่วยลดต้นทุนในการใช้พลังงานไฟฟ้าเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานแสงได้เป็นอย่างมาก แต่จำเป็นต้องมีการเติมแหล่งคาร์บอนบางชนิดลงไปในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเพื่อให้สาหร่ายนำไปใช้ในการเจริญได้ในสภาพที่ไม่มีแสงสว่าง

3. จากงานวิจัยครั้งนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK72 จะพบแบคทีเรียปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงได้น้อยมากหรือแทบจะไม่มีเลย ซึ่งแตกต่างจากสาหร่าย *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK48 และ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK52 เป็นอย่างมากเพราะสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดนี้จะพบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียได้บ่อยครั้ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK72 อาจมีคุณสมบัติที่สามารถสร้างสาร antibiotic บางอย่างที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียไม่ให้เจริญได้ และจากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่าสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์นี้มีสีที่ชัดเจน ซึ่งการแสดงออกของสีที่เด่นชัดนี้แสดงว่ามีองค์ประกอบของ pigment อยู่มากมายจึงอาจนำสาหร่ายดังกล่าวมาทำการทดลองสกัด pigment เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการแต่งสีในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอางและอาหาร ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

4. จากการทดลองหาสภาพความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญที่เหมือนกันคือที่ pH 9 ซึ่งที่ pH ดังกล่าวนี้จะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ยีสต์ รา จึงเป็นการช่วยลดการปนเปื้อนในขณะเพาะเลี้ยงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา ชาญสง่าเวช, สุทธิรักษ์ นิยมฤทธิ์ และศิริเพ็ญ เวชชการัณย์. 2532. การวินิจฉัยของแบคทีเรียสีน้ำ เงินแกมเขียวประเภทที่เจริญ ณ อุณหภูมิสูงในบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 13. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

กาญจนา ชาญสง่าเวช และสุทธิรักษ์ นิยมฤทธิ์. 2535. แบคทีเรียสีเขียวแกมน้ำเงินที่เจริญ ณ อุณหภูมิสูง. วารสารวิทยาศาสตร์. 2: 71-75.

คนึงกานต์ กลั่นบุศย์. 2547. เอนไซม์ไฟเดสจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัย เชียงใหม่.

จริญ ทองบริสุทธิ์. 2547. ผลของความเค็มไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุลออสซิลาทอเรีย (*Oscillatoria* sp.). กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชัชชฎา เวชกิจวาณิชย์ และปริณดา พัฒนวงศ์งาม. 2545. การศึกษาไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากบ่อน้ำพุร้อนในภาคเหนือของประเทศไทย.โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

นิติมา ศาลากิจ. 2547. คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่าย *Phormidium angustissima*, *Nostoc commune*, *Calothrix marchica* และ *Gloeocapsa* sp.. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นุชนรี จันทร์มณี. 2543 ผลของเบนซัลโคเนียมคลอไรด์ คอปเปอร์คีเลท และฟอร์มาลินต่อ *Oscillatoria* ที่ พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เบญจวรรณ ชิวปรีชา. 2543.การศึกษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีเขียวในป่าดิบแล้งสถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2548. สาหร่ายน้ำจืดในภาคเหนือของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: โครงการพัฒนาองค์กร ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย.

วราภรณ์ ปานอยู่. 2545. การแยกและการหาลักษณะของการทนอุณหภูมิสูงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำพุร้อนบางแหล่งบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย.วิทยานิพนธ์วิทยศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วิลิศ เหมือนสร้อย. ผลของปูนแคลเซียมไฮดรอกไซค์และแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุลออสซิลาทอเรีย. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมหมาย อมรศิลป์. 2507. การศึกษาการเจริญเติบโตของ *Oscillatoria rubescena* เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีความเป็นกรด-ต่างต่างๆกัน.วิทยานิพนธ์ปริญญากสิกรรมและสัตวบาลบัณฑิต คณะ กสิกรรมและสัตวบาล, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สระบุรี ชัยมงคล. 2523. จุลินทรีย์ในน้ำพุร้อนโป่งฮ่อม ตำบลออนหลวย อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่.การค้นคว้าอิสระเชิงวิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(การสอนชีววิทยา). มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุมาลี พิตรากูล และวิไล บุญญะประภา. 2525. การศึกษานิเวศวิทยา บริเวณน้ำพุร้อน บ้านโป่งกุ่ม ตำบลป่าเมี่ยง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่. กรุงเทพฯ: สภาวิจัยแห่งชาติ.

อักษร ศรีเปล่ง. 2529. สาหร่าย. กรุงเทพฯ: ฝ่ายสื่อการศึกษา สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม ม.ก. บางเขน.

อุดมลักษณ์ สมพงษ์. 2544. ความหลากหลายทางชีวภาพของสาหร่ายน้ำพุร้อนบางแหล่งในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Brock, T. D. 1978. Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. New York: Springer-Verlage.

Castenholz, R. W. 1969. Thermophilic blue-green algae and the thermal environment Bacteriological reviews. 33(4): 476-504.

Castenholz R. W. 1973. Ecology of blue-green algae in hot spring. In Carr N. G., Whitton B. A (eds.) . The biology of blue-green algae. London: Blackwell Scientific Publication.

Desikachara T.U. 1959. Cyaanophyta. New Delhi: Indian Council of Agriculture Research.

Krienitz, L. , Ballot, A. , Kotut, K. ,Wiegand, C. , Putz, S. , Metcalf, J. S. , Codd, G. A. and Pflugmacher, S. 2002. Contribution of spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria , Kenya. FEMS Microbiology Ecology. 1437: 1-8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://www.cyanobact-microalgae.sc.chula.ac.thprofile.phpid=TA-CY-48-0001.htm

http://www.glerl.noaa.gov/seagrant/GLWL/Algae/Cyanophyta/Images/MTUSynechococcus_taco.jpg

http://www.med.cmu.ac.th/dept/biochem/webdept/Files_Staff/Faculty%20websites/~rawiwan/microcys tin.htm

http://www.rbgsyd.nsw.gov.au/information_about_plants/botanical_info/australian_freshwater_algae2/algpic/simple_unbranched_algae

http://vdo.kku.ac.th/mediacenter/mediacenteruploads/libs/html/1194/D%20Cyanophyta.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

อาหาร BG-11 medium (วราภรณ์, 2545 อ้างถึง Stanier et al., 1971 และ Rippka et al., 1979)

การเตรียมอาหารสูตร BG-11 นี้จะเตรียมเป็น stock solution ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

Stock	**Stock solution**	**ml/Litre**
1. $NaNO_3$	150 g/L	10 ml
2. $K_2HPO_4.3H_2O$ หรือ *K_2HPO_4	40 g/L หรือ *30 g/L	1 ml
3. $MgSO_4.7H_2O$	75 g/L	1 ml
4. $CaCl_2.2H_2O$	36 g/L	1 ml
5. Citric acid	6 g/L	1 ml
6. Ferric ammonium citrate	6 g/L	1 ml
7. Na_2-EDTA.$2H_2O$	1 g/L	1 ml
8. Na_2CO_3	20 g/L	1 ml
9. *Trace-metal mix A5	ส่วนประกอบด้านล่าง	1 ml

ปรับ pH ให้ได้ค่าประมาณ 7.5 (เมื่อเตรียมเสร็จ pH จะมีค่าประมาณ 8.5) ด้วย 0.1 NaOH

***Trace-metal mix A5**

ส่วนประกอบ	**g/Litre**
1. H_3BO_3	2.86 g
2. $MnCl_2.4H_2O$	1.81 g
3. $ZnSO_4.7H_2O$	0.222 g
4. $Na_2MoO_4.2H_2O$ หรือ $Na_2MoO_4.5H_2O$	0.39 g
5. $CuSO_4.5H_2O$	0.079 g
6. $Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.0494 g

การเตรียม Trace-metal ควรละลายส่วนประกอบแต่ละตัวก่อน จากนั้นจึงนำมาผสมกัน

การเตรียมอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงสาหร่าย

สามารเตรียมได้โดยการเติมวุ้น (agar) ลงไป 1.5 % ของปริมาตรอาหารซึ่งการเติมวุ้นสามารถเติมได้โดยตรงลงในอาหารแล้วนำไปฆ่าเชื้อโรค (clave) พร้อมกัน หรือจะแยกนึ่งฆ่าเชื้อโรค แล้วจึงนำมาผสมกันทีหลังก็ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลาย Citric acid เข้มข้น 2 M จำนวน 500 มิลลิลิตร

การคำนวณ

มวลโมเลกุล $C_6H_8O_7$ = 192

จากสูตร

$$\text{โมล/ลิตร} = \frac{\text{น้ำหนักของสาร(กรัม)}}{\text{มวลโมเลกุล}}$$

$$2 \text{ โมล/ลิตร} = \frac{\text{น้ำหนักของสาร(กรัม)}}{192}$$

น้ำหนักของสาร = 384 กรัม/ลิตร

เตรียมสารละลายจำนวน 500 มิลลิลิตร ต้องชั่งสารทั้งหมด = 384/2 = 192 กรัม

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Citric acid จำนวน 192 กรัม โดยใช้เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
2. เทสารที่ชั่งได้ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 ml แล้วเทน้ำกลั่นใส่ลงไปประมาณ 100 ml ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย
3. ถ้าสารยังละลายไม่หมดให้เติมน้ำกลั่นไปลงแต่ไม่ควรเกิน 250 ml แล้วใช้แท่งแก้วคนต่อไปจนสารละลายหมด
4. ปรับปริมาตรของสารละลายในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 ml ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน
5. เทสารละลายที่ได้ใส่ในขวดแก้วสีชา เขียนระบุรายละเอียดของสารละลายที่เตรียมได้ไว้ข้างขวด

การเตรียมสารละลาย NaOH เข้มข้น 2 M จำนวน 500 มิลลิลิตร

การคำนวณ

มวลโมเลกุล NaOH = 40

จากสูตร

$$\text{โมล/ลิตร} = \frac{\text{น้ำหนักของสาร(กรัม)}}{\text{มวลโมเลกุล}}$$

$$2 \text{ โมล/ลิตร} = \frac{\text{น้ำหนักของสาร(กรัม)}}{40}$$

น้ำหนักของสาร = 80 กรัม/ลิตร

เตรียมสารละลายจำนวน 500 มิลลิลิตร ต้องชั่งสารทั้งหมด = 80/2 = 40 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง NaOH จำนวน 40 กรัม โดยใช้เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

2. เทสารที่ชั่งได้ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 ml แล้วเทน้ำกลั่นใส่ลงไปประมาณ 100 ml ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย

3. ถ้าสารยังละลายไม่หมดให้เติมน้ำกลั่นไปลงแต่ไม่ควรเกิน 400 ml แล้วใช้แท่งแก้วคนต่อไปจนสารละลายหมด

4. รอให้สารละลายเย็นลงแล้วจึงปรับปริมาตรของสารละลายในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 ml ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน

5. เทสารละลายที่ได้ใส่ในขวดพลาสติก ปิดฝา เขียนระบุรายละเอียดของสารละลายที่เตรียมได้ไว้ข้างขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 1 การเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C

Days	A_{560}				
	27 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
3	0	0.362	0.260	0.240	0.143
6	0	0.647	0.323	0.311	0.152
9	0	0.742	0.388	0.358	0.172
12	0	0.786	0.404	0.410	0.145
15	0	1.057	0.445	0.484	0
18	0	1.152	0.482	0.529	0
21	0	1.220	0.513	0.567	0
24	0	1.388	0.580	0.600	0
27	0	1.553	0.698	0.706	0
30	0	1.664	0.761	0.801	0

ตาราง 2 ค่าลอการิทึมการเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C

Days	$\log A_{560}$				
	27 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000
3	-	-0.441	-0.585	-0.620	-0.845
6	-	-0.189	-0.491	-0.507	-0.818
9	-	-0.130	-0.411	-0.446	-0.764
12	-	-0.105	-0.394	-0.387	-0.839
15	-	0.024	-0.352	-0.315	-
18	-	0.061	-0.317	-0.277	-
21	-	0.086	-0.290	-0.246	-
24	-	0.142	-0.237	-0.222	-
27	-	0.191	-0.156	-0.151	-
30	-	0.221	-0.119	-0.096	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 3 ค่า specific growth rate (μ_{max}) และค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C

อุณหภูมิ (°C)	Range of date	μ_{max} (day^{-1})	t_d (day)
30	0-15	0.1572	4.4084
40	0-9	0.1506	4.6001
50	0-12	0.1176	5.8937
60	0-3	0.1192	5.8125

ตาราง 4 การเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C

Days	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)				
	27 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.0059	0.0059	0.0059	0.0059	0.0059
3	0.0112	0.0559	0.0247	0.0118	0.0089
6	0.0571	0.0612	0.0271	0.0165	0.0188
9	0.1235	0.2259	0.0506	0.0200	0.0190
12	0.2171	0.2659	0.0659	0.0271	0.0288
15	0.4194	0.3882	0.0600	0.0235	0
18	0.6235	0.4535	0.0576	0.0288	0
21	0.6453	0.4559	0.0618	0.0306	0
24	0.6612	0.4665	0.0759	0.0347	0
27	0.6876	0.4824	0.0782	0.0371	0
30	0.6971	0.4894	0.0676	0.0453	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 5 ค่าลอการิทึมการเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C

Days	log น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)				
	27 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	-2.2304	-2.2304	-2.2304	-2.2304	-2.2304
3	-1.9517	-1.2527	-1.6072	-1.9294	-2.0506
6	-1.2437	-1.2134	-1.5677	-1.7833	-1.7253
9	-0.9082	-0.6461	-1.2960	-1.6990	-1.7212
12	-0.6634	-0.5753	-1.1812	-1.5677	-1.5403
15	-0.3774	-0.4109	-1.2218	-1.6284	-
18	-0.2051	-0.3434	-1.2392	-1.5403	-
21	-0.1902	-0.3411	-1.2093	-1.5144	-
24	-0.1797	-0.3312	-1.1199	-1.4596	-
27	-0.1626	-0.3166	-1.1066	-1.4311	-
30	-0.1567	-0.3103	-1.1698	-1.3440	-

ตาราง 6 ค่า specific growth rate (μ_{max}) และค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C

อุณหภูมิ (°C)	Range of date	μ_{max} (day^{-1})	t_d (day)
27	0-18	0.2591	2.6748
30	0-18	0.2414	2.8708
40	0-12	0.2013	3.4422
50	0-6	0.1716	4.0384
60	0-6	0.1939	3.5748

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 7 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C

Days	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)				
	27 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.0071	0.0071	0.0071	0.0071	0.0071
3	0.0318	0.0365	0.0241	0.0365	0.0165
6	0.0888	0.0788	0.0412	0.0288	0.0188
9	0.2000	0.1247	0.0394	0.0329	0.0141
12	0.2706	0.2271	0.0482	0.0394	0.0153
15	0.4553	0.3241	0.0794	0.0435	0.0206
18	0.5129	0.4282	0.0647	0.0382	0.0165
21	0.6847	0.4882	0.0612	0.0400	0.0159
24	0.7129	0.4859	0.1006	0.0929	0
27	0.9412	0.4765	0.1412	0.0906	0
30	0.9571	0.4400	0.1500	0.1024	0

ตาราง 8 ค่าลอการิทึมการเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C

Days	log น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)				
	27 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	-2.1513	-2.1513	-2.1513	-2.1513	-2.1513
3	-1.4981	-1.4381	-1.6177	-1.4381	-1.7833
6	-1.0515	-1.1033	-1.3854	-1.5403	-1.7253
9	-0.6990	-0.9041	-1.4044	-1.4823	-1.8502
12	-0.5677	-0.6439	-1.3166	-1.4044	-1.8155
15	-0.3417	-0.4893	-1.1001	-1.3612	-1.6864
18	-0.2899	-0.3683	-1.1891	-1.4175	-1.7833
21	-0.1645	-0.3114	-1.2134	-1.3979	-1.7991
24	-0.1469	-0.3135	-0.9975	-1.0318	-
27	-0.0263	-0.3220	-0.8502	-1.0429	-
30	-0.0191	-0.3565	-0.8239	-0.9899	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 9 ค่า specific growth rate (μ_{max}) และค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 ที่อุณหภูมิ 27, 30, 40, 50, 60 °C

อุณหภูมิ (°C)	Range of date	μ_{max} (day^{-1})	t_d (day)
27	0-15	0.2778	2.4948
30	0-15	0.2551	2.7163
40	0-6	0.2939	2.3577
50	0-3	0.5474	1.2660
60	0-3	0.2824	2.4537

ตาราง 10 การเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C

Days	A_{560}				
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
3	0.238	0.275	0.281	0.300	0.271
6	0.330	0.286	0.297	0.340	0.334
9	0.317	0.296	0.314	0.430	0.445
12	0.376	0.341	0.422	0.545	0.465
15	0.491	0.478	0.496	0.599	0.576
18	0.561	0.559	0.571	0.685	0.652
21	0.626	0.642	0.665	0.732	0.709
24	0.660	0.689	0.724	0.787	0.756
27	0.671	0.711	0.753	0.795	0.780
30	0.686	0.723	0.783	0.818	0.794

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 11 ค่าลอการิทึมการเจริญของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C

Days	A_{560}				
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
0	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000
3	-0.623	-0.561	-0.551	-0.524	-0.567
6	-0.481	-0.544	-0.527	-0.469	-0.476
9	-0.499	-0.529	-0.503	-0.367	-0.352
12	-0.425	-0.467	-0.375	-0.264	-0.333
15	-0.309	-0.321	-0.305	-0.223	-0.240
18	-0.251	-0.253	-0.243	-0.165	-0.186
21	-0.203	-0.192	-0.177	-0.135	-0.149
24	-0.180	-0.162	-0.140	-0.104	-0.121
27	-0.173	-0.148	-0.123	-0.100	-0.108
30	-0.163	-0.141	-0.106	-0.087	-0.100

ตาราง 12 ค่า specific growth rate (μ) และค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของ *Synechococcus* sp. สายพันธุ์ DSK 72 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C

pH	Range of date	μ_{max} (day^{-1})	t_d (day)
6	0-21	0.0873	7.9343
7	0-21	0.0885	7.8266
8	0-21	0.0902	7.6812
9	0-24	0.0860	8.0618
10	0-24	0.0843	8.2220

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 13 การเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C

Days	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)				
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
0	0.0065	0.0059	0.0071	0.0059	0.0059
3	0.0441	0.0524	0.0559	0.0512	0.0435
6	0.0559	0.0600	0.0676	0.0741	0.0729
9	0.0659	0.0739	0.1888	0.2047	0.2094
12	0.2265	0.2259	0.4106	0.4135	0.4112
15	0.3600	0.3435	0.5024	0.5753	0.5265
18	0.4359	0.4659	0.5841	0.6647	0.6053
21	0.4971	0.5600	0.6606	0.8629	0.7794
24	0.5747	0.6071	0.8176	0.8659	0.8541
27	0.6188	0.6394	0.8347	0.8759	0.8606
30	0.6376	0.6588	0.8818	0.9024	0.8882

ตาราง 14 ค่าลอการิทึมการเจริญของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27°C

Days	log น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)				
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
0	-2.1891	-2.2304	-2.1513	-2.2304	-2.2304
3	-1.3554	-1.2811	-1.2527	-1.2909	-1.3612
6	-1.2527	-1.2218	-1.1698	-1.1301	-1.1370
9	-1.1812	-1.1315	-0.7239	-0.6889	-0.6790
12	-0.6450	-0.6461	-0.3866	-0.3835	-0.3860
15	-0.4437	-0.4640	-0.2990	-0.2401	-0.2786
18	-0.3606	-0.3317	-0.2335	-0.1774	-0.2180
21	-0.3036	-0.2518	-0.1801	-0.0640	-0.1082
24	-0.2406	-0.2168	-0.0874	-0.0625	-0.0685
27	-0.2084	-0.1942	-0.0785	-0.0576	-0.0652
30	-0.1954	-0.1812	-0.0546	-0.0446	-0.0515

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 15 ค่า specific growth rate (μ_{max}) และค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Phormidium* sp. สายพันธุ์ DSK 48 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C

pH	Range of date	μ_{max} (day^{-1})	t_d (day)
6	0-21	0.2067	3.3521
7	0-21	0.2170	3.1943
8	0-24	0.1980	3.4999
9	0-21	0.2375	2.9174
10	0-21	0.2327	2.9782

ตาราง 16 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C

Days	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)				
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
0	0.0071	0.0059	0.0065	0.0071	0.0065
3	0.0153	0.0265	0.0218	0.0435	0.0329
6	0.0312	0.0400	0.0365	0.0594	0.0576
9	0.0665	0.0571	0.0594	0.1671	0.0918
12	0.0729	0.0706	0.1147	0.2324	0.1688
15	0.1759	0.1800	0.2082	0.4188	0.3376
18	0.3518	0.3012	0.4365	0.5600	0.5071
21	0.4112	0.4053	0.5424	0.6606	0.5900
24	0.4747	0.4365	0.5971	0.8029	0.6800
27	0.5206	0.5353	0.6394	0.9141	0.7618
30	0.5571	0.5912	0.6588	0.9635	0.7765

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 17 ค่าลอการิทึมการเจริญของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 °C

Days	log น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/l)				
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
0	-2.1513	-2.2304	-2.1891	-2.1513	-2.1891
3	-1.8155	-1.5772	-1.6622	-1.3612	-1.4823
6	-1.5062	-1.3979	-1.4381	-1.2261	-1.2392
9	-1.1774	-1.2437	-1.2261	-0.7771	-1.0373
12	-1.1370	-1.1513	-0.9404	-0.6339	-0.7726
15	-0.7548	-0.7447	-0.6814	-0.3780	-0.4715
18	-0.4537	-0.5212	-0.3600	-0.2518	-0.2949
21	-0.3860	-0.3922	-0.2657	-0.1801	-0.2291
24	-0.3236	-0.3600	-0.2240	-0.0953	-0.1675
27	-0.2835	-0.2714	-0.1942	-0.0390	-0.1182
30	-0.2541	-0.2283	-0.1812	-0.0161	-0.1099

ตาราง 18 ค่า specific growth rate (μ_{max}) และค่า doubling time (t_d) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Oscillatoria* sp. สายพันธุ์ DSK 52 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่ปรับค่า pH เป็น 6, 7, 8, 9, 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 27°C

pH	Range of date	μ_{max} (day^{-1})	t_d (day)
6	0-18	0.2171	3.1914
7	0-18	0.2187	3.1694
8	0-18	0.2340	2.9619
9	0-18	0.2430	2.8521
10	0-18	0.2423	2.8601

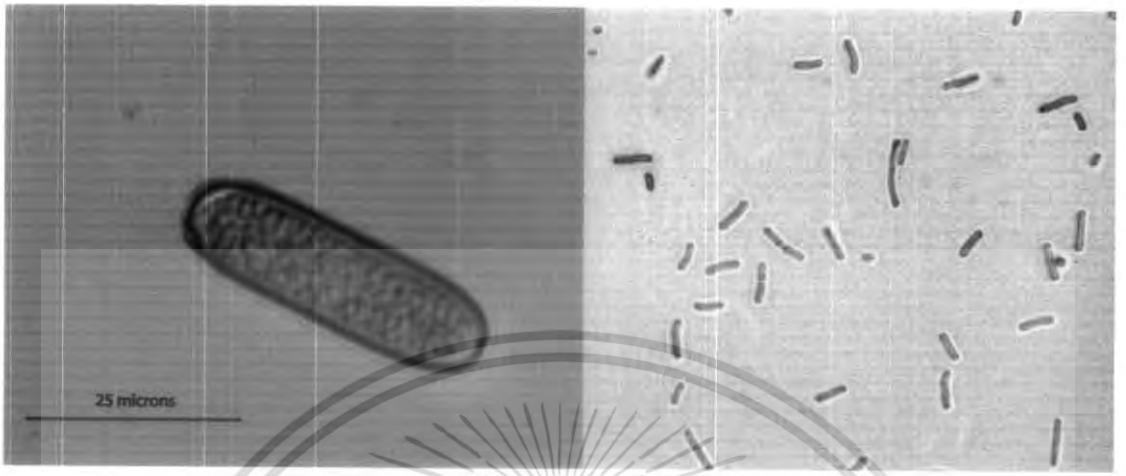
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 3 สายพันธุ์

1. *Synechococcus* sp.



ภาพ 36 ลักษณะของ *Synechococcus* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ที่มา: http://www.ibvf.csic.es/Cultivos/Seccion_1.htm

http://www.glerl.noaa.gov/seagrant/GLWL/Algae/Cyanophyta/Images/MTUSynechococcus_taco.jpg

Synechococcus sp. เซลล์มีรูปร่างแบบรูปไข่ เป็นแท่งสั้นๆตรง หรือโค้งเล็กน้อย อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ไม่มีชีทหุ้มเมื่อแบ่งเซลล์แล้วเซลล์อาจไม่หลุด แต่จะติดเป็นคู่ ปลายเซลล์มน แบ่งตัวแบบ binary fission เซลล์มักมีขนาดใหญ่สีเขียวน้ำเงินสด

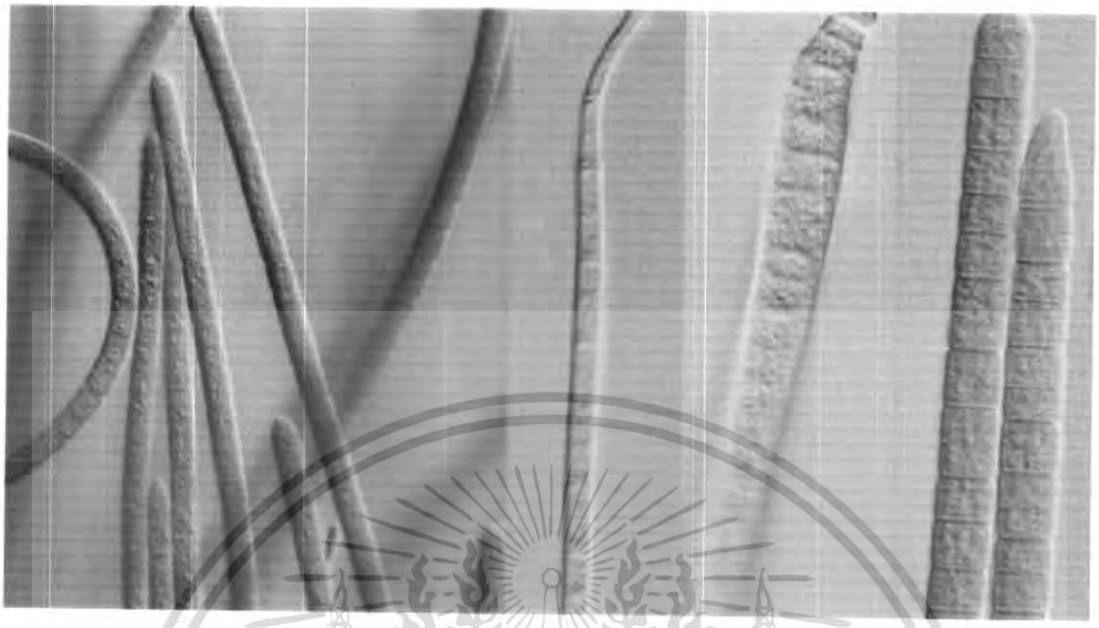
พบมากในน้ำพุร้อนและสามารถแยกมาให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ในเซลล์ของสาหร่ายชนิดนี้มีสารมีประโยชน์หลายชนิด เช่น เอนไซม์ และสารเพิ่มภูมิคุ้มกันบางชนิด (วราภรณ์,2545)

<u>ลักษณะภายนอก</u>

- เซลล์เดี่ยว
- ไม่มีเกราะหุ้มเซลล์
- โครงสร้างอย่างละเอียดภายในเซลล์ เป็นแบบโปรคาริโอต ไม่มีนิวเคลียส ไม่มีไมโตรคอนเดรีย ไม่มีคลอโรพลาส ไม่มีโกลจิบอดีฯลฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ***Phormidium* sp.**



ภาพ 37 ลักษณะของ *Phormidium* sp.ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่มา: http://www.rbgsyd.nsw.gov.au/information_about_plants/botanical_info/australian_freshwater_algae2/algpic/simple_unbranched_algae

Phormidium sp. เป็นเส้นสายที่มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มสายยาว เซลล์มีลักษณะเป็นเส้นตรงหรือโค้งเล็กน้อย หรือทรงกระบอกเรียงต่อกัน มีความยาวของเซลล์สม่ำเสมอตลอดสาย ยกเว้นตรงปลายกลมมนหรือเรียวแหลม เซลล์มีความกว้างน้อยกว่าความยาวมีรอยคอดบริเวณรอยต่อของเซลล์แต่ละเซลล์ บางชนิดอาจมีคาลิปตรา มีชีทหุ้มเส้นสายบางๆชีทไม่มีสี บางชนิดชีทโผล่ออกมานอกไตรโคม (อักษร, 2529)

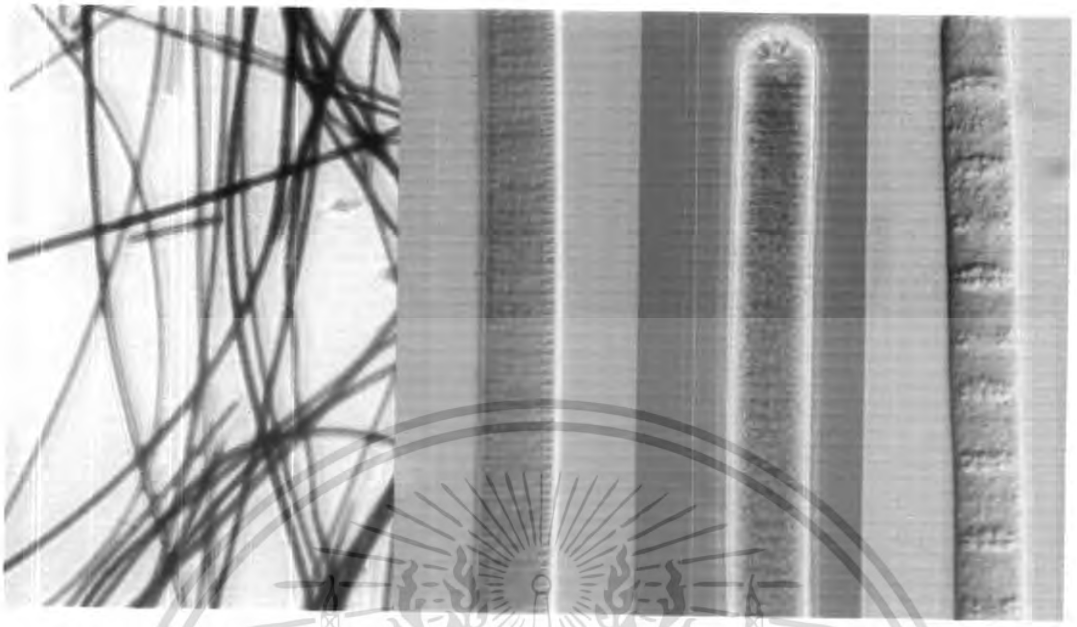
ส่วนมากจะพบ *Phormidium* sp. อยู่รวมกันหลายๆเส้น เกาะอยู่กับวัตถุในน้ำ ตามดิน หรือในน้ำนิ่งๆ ถ้าพบลอยตัวอยู่เป็นอิสระจะมีปลายด้านหนึ่งฉีกขาดเสมอ ถ้าพบในบ่อน้ำพุร้อนอุณหภูมิ 40-54 °C (นิติมา, 2547)

<u>ลักษณะภายนอก</u>

- มีหลายเซลล์เป็นเส้นสายยาว ตรง
- เซลล์มีความกว้างน้อยกว่าความยาว
- โครงสร้างอย่างละเอียดภายในเซลล์ เป็นแบบโปรคาริโอต ไม่มีนิวเคลียส ไม่มีไมโตรคอนเดรีย ไม่มีคลอโรพลาส ไม่มีโกลจิบอดี ฯลฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

***3. Oscillatoria* sp.**



ภาพ 38 ลักษณะของ *Phormidium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ที่มา: http://www.rbgsyd.nsw.gov.au/information_about_plants/botanical_info/australian_freshwater_algae2/algpic/simple_unbranched_algae

Oscillatoria sp. อยู่ใน Order Oslcillatoriales มีลักษณะเป็นเส้นสายที่ไม่แตกแขนง รูปทรงกระบอก ไม่มีชีทหุ้มแต่อาจมีเยื่อบางๆหรือน้ำใสๆหุ้มอยู่ ในแต่ละ เซลล์มีความกว้างมากกว่าความยาว เส้นสายเรียงรวมกันเป็นกลุ่ม ในเส้นสายประกอบด้วยเซลล์ที่เรียงตัวต่อกันเป็นแถว เรียกว่า ทรัยโคม (trichome) แต่บางชนิดเซลล์ส่วนปลายๆ อาจจะเรียวลงหรือแคบลง ส่วนปลายสุด (apical cell) อาจมี คาลิปตรา (calypta) ซึ่งมีลักษณะคล้ายหมวกปีกหรือมีผนังเซลล์พองออก (นุชนรี และจันทร์มณี, 2543 และ เบญวรรณ, 2543)

ส่วนมากจะพบทั่วไปทุกแห่งทั้งในน้ำและในดิน บ่อน้ำ บึง ลำธาร ตามบริเวณเหล่านี้ *Oscillatoria* sp. จะมีสีเขียวคล้ำ บางรายงานพบในบ่อน้ำร้อน โดยจะเป็นแบบ thermal algae ซึ่งจะพบหลากหลายสี ในอเมริกา พบ *Oscillatoria prolifica* ในทะเลสาป มีสีแดง และมีบางชนิด *Oscillatoria formosa* มีสีน้ำเงิน (อักษร, 2529)

<u>ลักษณะภายนอก</u>

- มีลักษณะเป็นเส้นสายยาว ตรง ไม่แตกแขนง
- เซลล์มีความกว้างมากกว่าความยาว
- โครงสร้างอย่างละเอียดภายในเซลล์ เป็นแบบโปรคาริโอต ไม่มีนิวเคลียส ไม่มีไมโตรคอนเดรีย ไม่มีคลอโรพลาส ไม่มีโกลจิบอดี ฯลฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ น.ส.กนกวรรณ การเจริญดี

วัน เดือน ปีเกิด 1 กุมภาพันธ์ 2528

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา อุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2549

สถานที่ติดต่อได้ 110/224 ซ.69/1 ถ.พหลโยธิน แขวงอนุสาวรีย์ เขตบางเขน กทม. 10220

e-mail : poriko_ok@hotmail.com โทร. 089-0454092 , 02-552-0808

ชื่อ น.ส.กุลพัฒน์ คมกฤส

วัน เดือน ปีเกิด 22 พฤศจิกายน 2527

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา อุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2549

สถานที่ติดต่อได้ 15/99 หมู่ 24 ถ.สันโค้งหลวง ต.รอบเวียง อ.เมือง จ.เชียงราย 57000

e-mail : zyber_k@hotmail.com โทร. 084-611-7033 , 053-712037

ชื่อ น.ส.สุมาลี ปานทอง

วัน เดือน ปีเกิด 10 มีนาคม 2528

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา อุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2549

สถานที่ติดต่อได้ 92 ม.3 ต.หอมศีล อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา 24180

e-mail : su_na_ja555@hotmail.com โทร. 086-602-0178 , 02-708-6558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้