ศึกษาประสิทธิภาพในการปรับตัวของสาหร่าย *Dunaliella salina* ภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตในอาหาร Modified Ramaraj Medium โดยใช้การคัดเลือกโดยธรรมชาติ

STUDY ON THE ADAPTIVE POTENTIAL OF *DUNALIELLA SALINA* IN MODIFIED RAMARAJ MEDIUM USING NATURAL SELECTION

ยุวลักษณ์ บุญมานัส
แสงทิพย์ ทั่งทอง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ศึกษาประสิทธิภาพในการปรับตัวของสาหร่าย *Dunaliella salina* ภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตในอาหาร Modified Ramaraj Medium โดยใช้การคัดเลือกโดยธรรมชาติ

STUDY ON THE ADAPTIVE POTENTIAL OF *DUNALIELLA SALINA* IN MODIFIED RAMARAJ MEDIUM USING NATURAL SELECTION

T149052

ยุวลักษณ์ บุญมานัส
แสงทิพย์ ทั่งทอง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....149052
วัน,เดือน,ปี.....27 S.A. 2560

.b.12879996
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON THE ADAPTIVE POTENTIAL OF *DUNALIELLA SALINA* IN MODIFIED RAMARAJ MEDIUM USING NATURAL SELECTION

YUWALAK BOONMANAT
SANGTHIP THANGTONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY PROGRAM)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ศึกษาประสิทธิภาพในการปรับตัวของสาหร่าย *Dunaliella salina* ภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตในอาหาร Modified Ramaraj Medium โดยใช้การคัดเลือกโดยธรรมชาติ Study on The Adaptive Potential of *Dunaliella salina* in Modified Ramaraj Medium Using Natural Selection
ชื่อนักศึกษา	นางสาวยุวลักษณ์ บุญมานัส รหัสนักศึกษา 55051370 นางสาวแสงทิพย์ ทั่งทอง รหัสนักศึกษา 55051420
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.วีนา ชูโชติ ประธานกรรมการ	
ดร.ดวงกมล เรือนงาม กรรมการ	
ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ศึกษาประสิทธิภาพในการปรับตัวของสาหร่าย *Dunaliella salina* ภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตในอาหาร Modified Ramaraj Medium โดยใช้การคัดเลือกโดยธรรมชาติ
ชื่อนักศึกษา	นางสาวยุวลักษณ์ บุญมานัส รหัสนักศึกษา 55051370 นางสาวแสงทิพย์ ทั่งทอง รหัสนักศึกษา 55051420
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปการศึกษา	2558
อาจารยที่ปรึกษา	ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์

บทคัดย่อ

สาหร่าย *Dunaliella salina* เป็นสาหร่ายที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนได้ในปริมาณมาก งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาการปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D.salina* เพื่อตอบสนองกับการใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ ผู้วิจัยใช้วิธีการศึกษาที่เรียกว่า "การคัดเลือกโดยธรรมชาติ (Natural Selection)" ซึ่งได้ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงการเจริญเติบโตในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* การทดลองเริ่มจากการเลี้ยงสาหร่าย *D.salina* KU11 และทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 จนครบ 30 ครั้ง จากนั้นทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในทุกๆครั้งของการถ่ายเชื้อ และเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายรุ่นแรก (PD) และรุ่นสุดท้าย (ED) ผลการศึกษาพบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ PD และ ED ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อทำการวัดการเจริญเติบโตทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ED มีการเจริญเติบโตในระยะ log phase ยาวกว่า PD 1 วัน คือจาก 3 วันเป็น 4 วัน และมีการสะสมของเซลล์ในช่วง stationary phase เพิ่มขึ้นเป็น 1.2 เท่า เมื่อเทียบกับ PD งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการถ่ายเชื้อจำนวน 30 ครั้ง ยังไม่เพียงพอที่จะทำให้เห็นความแตกต่างของการเจริญเติบโตที่ชัดเจน แต่ทั้งนี้สาหร่ายที่ถูกถ่ายเชื้อเป็นเวลา 4 เดือน (30 ครั้ง) มีการปรับปรุงการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ซึ่งจำเป็นต้องทำการทดลองต่อไปอย่างน้อย 6 เดือนและทำการวัดการเปลี่ยนแปลงต่อไป

คำสำคัญ : การคัดเลือกโดยธรรมชาติ สาหร่าย *Dunaliella salina* Evolved *Dunaliella* Progenitor *Dunaliella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on The Adaptive Potential of *Dunaliella salina* in Modified Ramaraj Medium Using Natural Selection
Studen	Miss.Yuwalak Boonmanat Student ID 55051370
	Miss.Sangthip Thangtong Student ID 55051420
Degree	Bachelor of Science in Industrial Microbiology Program
Department	Applied Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2015
Advisor	Dr.Wipawee Dejtisakdi

Abstract

Dunaliella salina is a great potential microalgal for nutraceutical, pharmaceutical and biofuel product productions. In this study, we aimed to improve *D. salina* potential by increasing its growth rate via the technique called "Natural selection" that has been successful for improving *Chlamydomonas reinhardtii* growth previously. In this study, we started growing *D. salina* KU11 for the first generation called "Progenitor *Dunaliella*, PD" and then sub-cultured for 30 times and the last generation called "Evolved *Dunaliella*, ED". After that ED growth was compared with PD growth. From this study, we found that ED growth rate was not significantly different from PD growth rate. However, ED had a longer log phase and reached the stationary phase with higher number of cell accumulation than PD for one more day and 1.2 fold, respectively. This preliminary study suggested that using natural selection technique showed a promising result to improve growth of *D. salina* KU11 but still not enough to see an obvious growth improvement as *C. reinhardtii* study. Thus, we needed to observe for 6 more months.

Keywords : Natural Selection, *Dunaliella salina*, Evolved *Dunaliella*, Progenitor *Dunaliella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้คำปรึกษาข้อแนะนำต่างๆอย่างใกล้ชิด อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำโครงงานพิเศษ ผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างยิ่งและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.วีนา ชูโชติและ ดร.ดวงกมล เรือนงาม ท่านคณะกรรมการโครงงานพิเศษที่ให้คำแนะนำ และสามารถนำคำแนะนำไปปรับปรุงแก้ไขโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้ดียิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นิรันดร์ จันทวงศ์ ภาควิชาพฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 สำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณพี่ๆเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประจำตึกคณะวิทยาศาตร์หลังเก่าที่คอยให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการและคอยอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ อย่างดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณแม่บ้านและผู้ดูแลประจำตึกคณะวิทยาศาตร์หลังเก่า ชั้น 4 ที่คอยอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่างๆ จนกระทั่งโครงงานพิเศษลุล่วงไปด้วยดี

นอกจากนี้ขอขอบคุณเพื่อนๆร่วมโครงงานพิเศษและเพื่อนคนอื่นๆที่คอยให้ความช่วยเหลือให้คำปรึกษาในการทำโครงงานพิเศษเล่มนี้ ผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งใจในความช่วยเหลือความปรารถนาดีของทุกท่านเป็นอย่างยิ่งจึงขอขอบพระคุณไว้ในโอกาสนี้

หากโครงงานพิเศษเล่มนี้มีข้อผิดพลาดประการใดต้องขออภัยไว้ณ ที่นี้

ยุวลักษณ์ บุญมานัส
แสงทิพย์ ทั่งทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวของ	3
2.1 สาหร่าย *Dunaliella* sp.	3
2.1.1 อนุกรมวิธาน	3
2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย	3
2.1.3 การแพร่กระจาย	4
2.1.4 กระบวนการสืบพันธุ์	5
2.1.4.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ	5
2.1.4.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ	5
2.1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย	5
2.1.5.1 คาร์บอน (Carbon)	5
2.1.5.2 ไนโตรเจน (Nitrogen)	5
2.1.5.3 ฟอสฟอรัส (Phosphorus)	6
2.1.5.4 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)	6
2.1.5.5 อุณหภูมิ (Temperature)	6
2.1.5.6 แสง (Light)	6
2.1.5.7 ความเค็ม (Salinity)	7
2.1.6 ประโยชน์ของสาหร่าย*Dunaliella* sp.	7
2.1.6.1 ผลิตเบต้าแคโรทีน	7
2.1.6.2 อาหารสัตว์น้ำ	7
2.1.6.3 สกัดผลผลิตน้ำมันและเชื้อเพลิงชีวภาพ	7
2.2 ระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella* sp.	8
2.2.1 ระยะปรับตัว (Lag phase)	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.2.2 ระยะเอกโพเนนเชียล (Exponential phase)	9
2.2.3 ระยะคงที่ (Stationary phase)	9
2.2.4 ระยะการตาย (Death phase)	9
2.3 วิธีการปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสาหร่าย	9
2.3.1 การปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย	9
2.3.2 การปรับปรุงปัจจัยการเจริญเติบโต	10
2.3.3 การคัดเลือกโดยธรรมชาติ (Natural selection)	11
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	14
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	14
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	14
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ	14
3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน	15
3.4.1 สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย	15
3.4.2 การเก็บรักษาหัวเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารแข็ง	16
3.4.3 ขั้นตอนการทดลอง	16
3.4.3.1 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย	16
3.4.3.2 การคัดเลือกทางธรรมชาติโดยการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่อง	16
3.4.3.3 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย PD กับ ED	17
3.4.3.4 การเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของสาหร่าย PD กับ ED	18
3.4.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	18
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	19
4.1 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11	19
4.2 การวัดหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) ของสาหร่ายในแต่ละการถ่ายเชื้อ	20
4.3 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย PD (Progenitor *Dunaliella*) และสาหร่าย ED (Evolved *Dunaliella*)	23
4.4 การเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของสาหร่าย PD และ ED	24
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	25
5.1 สรุปผลการทดลอง	25
5.2 ข้อเสนอแนะ	25
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก ก	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ข	32
ภาคผนวก ค	37
ภาคผนวก ง	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่ได้ทำการถ่ายเชื้อทั้งหมด 30 ครั้ง	21
ค-1.1	แสดงจำนวนเซลล์ของสาหร่าย *D. salina* KU11	37
ค-2.1	แสดงจำนวนเซลล์ของ PD (Progenitor *Dunaliella*)	38
ค-2.2	แสดงจำนวนเซลล์ของ ED (Evolved *Dunaliella*)	38
ค-3.1	แสดงขนาดเซลล์ของ PD (Progenitor *Dunaliella*)	39
ค-3.2	แสดงขนาดเซลล์ของ ED (Evolved *Dunaliella*)	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะเซลล์ของสาหร่าย *Dunaliella salina*	3
2.2 แสดงโครงสร้างภายในเซลล์ของสาหร่าย	4
2.3 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella* sp.	8
2.4 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ *C. reinhardtii* (รูปซ้าย) การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์ *C. reinhardtii* กลุ่มต้นแบบ (PL, เส้นสีเขียว) และประชากรกลุ่มที่ผ่านวิวัฒนาการ (EL, เส้นสีแดง) (รูปขวา)	11
3.1 การวางแผนวิธีการทดลองการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* KU11	15
3.2 แสดงสภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย	16
3.3 แสดงจำนวนเซลล์สาหร่าย *D. salina* KU11 ในการวัดการเจริญเติบโตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า	18
4.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11 หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Modified Ramaraj Medium เป็นเวลา 9 วัน	19
4.2 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11 เป็นเวลา 7 วัน	20
4.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ *D. salina* KU11 หลังการถ่ายเชื้อ 30 ครั้ง ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกัน	22
4.4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์ *D. salina* KU11 ที่เก็บหลังจากการถ่ายเชื้อในครั้งแรกในอาหารเหลว Modified Ramaraj Medium (PD) และสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่ผ่านการถ่ายเชื้อ 30 ครั้ง (ED)	23
4.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดเซลล์ในเวลา 7 วัน ของสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่วัดขนาดหลังจากถ่ายเชื้อในครั้งแรก (PD) และสาหร่ายที่ผ่านการถ่ายเชื้อ 30 ครั้ง (ED)	24
ข-1.1 แสดงลักษณะของฮีมาไซโตมีเตอร์	32
ข-1.2 ภาพเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า	33
ข-1.3 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า	33
ข-3.1 ไมโครมิเตอร์สำหรับใช้วัดขนาดเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ประกอบด้วยสเตจไมโครมิเตอร์ (ด้านซ้าย) และออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์ (ด้านขวา)	34
ข-3.2 สเกลของออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์และสเตจไมโครมิเตอร์หลังจากใส่ไมโครมิเตอร์ทั้งสองชนิดไว้ในตำแหน่งที่ถูกต้องในกล้องจุลทรรศน์	35
ข-3.3 ภาพแสดง ocular scale มี 27 ช่อง ในขณะที่ stage scale มี 20 ช่อง	35
ข-3.4 ขนาดเซลล์สาหร่าย *D. salina* KU11 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	36
ค-1.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11 หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Modified Ramaraj Medium เป็นเวลา 9 วัน	37
ค-2.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์ *D.salina* KU11 ที่เก็บหลังจากการถ่ายเชื้อในครั้งแรกในอาหารเหลว Modified Ramaraj Medium (PD) และสาหร่าย *D.salina* KU11 ที่ผ่านการถ่ายเชื้อ 30 ครั้ง (ED)	39
ค-3.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของสาหร่าย PD และ ED ในเวลา 7 วัน	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

สาหร่ายเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติในแหล่งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม สาหร่ายจัดเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นที่สำคัญอย่างยิ่งต่อระบบนิเวศน์และมีการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์อีกมากมายในด้านอุตสาหกรรมต่างๆหรือแม้แต่การนำมาบริโภคโดยตรง ยกตัวอย่างเช่นชาวจีนและญี่ปุ่นใช้สาหร่ายสีน้ำตาล(*Laminaria*) และสาหร่ายสีแดง(*Porphyra*) หรือที่เรียกว่า จีฉ่าย มาประกอบอาหารพวกแกงจืด ปัจจุบันมีการใช้สาหร่ายและผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายในหลายรูปแบบไม่ว่าจะเป็นการใช้สาหร่ายเป็นอาหารเลี้ยงตัวอ่อนสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง ปลา ใช้สาหร่ายบำบัดน้ำเสียร่วมกับแบคทีเรียในโรงงานอุตสาหกรรมและนากุ้ง ผลิตวุ้นและเยลลี่ ผลิตเป็นเครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ

สาหร่าย *Dunaliella salina* นับว่าเป็นสาหร่ายขนาดเล็กสายพันธุ์หนึ่งที่มีประโยชน์หลากหลายด้านโดยที่เด่นชัด คือสามารถสะสมเบต้าแคโรทีน (β-carotene) ได้เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีความเข้มแสงสูง ความเค็มของน้ำสูง และปริมาณสารอาหารไนโตรเจนน้อย ในสภาวะดังกล่าวเซลล์ของสาหร่ายจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวไปเป็นสีส้ม (สรวิศ, 2543) โดยสาหร่าย *D.salina* สามารถสะสมเบต้าแคโรทีนได้ในปริมาณสูงมาก (5-15% น้ำหนักแห้ง) ซึ่งเบต้าแคโรทีนที่ได้มีราคาสูงและมีความต้องการของตลาดมาก นอกจากนี้สาหร่าย *D.salina* ยังสามารถผลิตกรดไขมัน (fatty acid) ซึ่งเป็นประโยชน์สามารถนำไปผลิตไบโอดีเซลได้ (Fakhry และ Maghraby, 2013) ทั้งนี้การที่สาหร่าย *D.salina* สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำที่มีความเค็มสูง เป็นการลดโอกาสการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ทำให้สามารถเลี้ยงในบ่อเปิดขนาดใหญ่ได้

เนื่องจากคุณประโยชน์ของสาหร่าย *D.salina* ดังที่กล่าวในข้างต้น งานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นในการปรับปรุงสาหร่ายชนิดนี้ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นโดยการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D.salina* โดยใช้วิธีที่เรียกว่า"การคัดเลือกโดยธรรมชาติ (Natural Selection)" เป็นวิธีทำให้สิ่งมีชีวิตเกิดวิวัฒนาการโดยปรับเปลี่ยน (adaptation) ให้มีลักษณะทางสรีระ พฤติกรรมและรูปแบบการดำรงชีวิตที่กลมกลืนกับสภาพแวดล้อมที่ประชากรนั้นอาศัยอยู่โดยประชากรที่มีลักษณะเหมาะสมกับสิ่งแวดล้อมจะสามารถดำรงชีวิตและแพร่พันธุ์ประชากรในรุ่นต่อไปได้ (นันทวันและศศิวิมล, 2552) ซึ่งวิธีนี้อาจจะนำไปสู่การสร้างฟีโนไทป์ใหม่ เช่น รุ่นลูกสามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่ารุ่นพ่อแม่ เพื่อให้ได้มาซึ่งสายพันธุ์ของสาหร่าย *D.salina* ที่จะสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วหรือทนต่อสภาพแวดล้อมหรือให้ผลผลิตเบต้าแคโรทีนที่สูงขึ้นเพื่อให้คุ้มต้นทุนการผลิต โดยวิธีนี้ถูกนำมาใช้และประสบความสำเร็จในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ในงานวิจัยของ Perrineau และคณะ (2014) ที่ทำการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C.reinhardtii* ในอาหารเหลวโดยทำการถ่ายเชื้ออย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อเนื่องเป็นจำนวน 283 ครั้ง เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ากลุ่มประชากรที่ผ่านวิวัฒนาการมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่ากลุ่มประชากรต้นแบบ ในการทดลองนี้จึงคาดว่าสาหร่าย *D. salina* จะมีการปรับตัวได้ดีขึ้นโดยสาหร่ายรุ่นสุดท้ายจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่าสาหร่ายรุ่นแรก

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่ทำการถ่ายเชื้อเป็นจำนวน 30 ครั้ง ในอาหารเหลวภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ถูกควบคุมอย่างต่อเนื่อง

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาประสิทธิภาพการปรับตัวของสาหร่าย *D. salina* KU11 ภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตในอาหาร Modified Ramaraj Medium ถูกถ่ายเชื้อ (sub-culture) ทุกๆ 4 วัน จนครบ 30 ครั้ง โดยทุกครั้งของการถ่ายเชื้อจะทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพื่อดูแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงของประชากรแต่ละรุ่น จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11 ทั้งสองกลุ่ม (PD และ ED) ซึ่งรายงานโดยใช้กราฟแสดงการเจริญเติบโต

1.4 ประโยชนที่คาดว่าจะได้รับ

1) ศึกษาและเรียนรู้การเพาะเลี้ยงและวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11

2) ทราบถึงประสิทธิภาพการปรับตัวของอัตราการเจริญเติบโตสาหร่าย *D. salina* KU11 โดยใช้การคัดเลือกโดยธรรมชาติ

3) เป็นความรู้ต่อการทำงานวิจัยของผู้อื่นหรือเพื่อพัฒนาสายพันธุ์สาหร่าย *D. salina* KU11 ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่าย *Dunaliella* sp.

2.1.1 อนุกรมวิธาน (Ben-Amotz และคณะ, 2009)

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Volvocales

Family Polyblepharidacae

Genus *Dunaliella* sp.

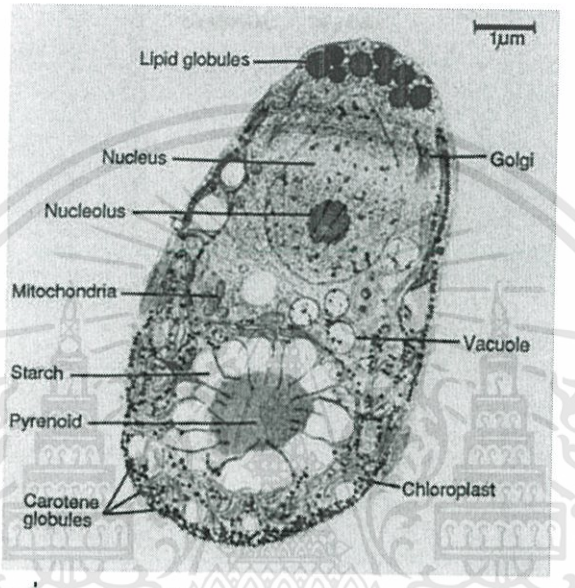
รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะเซลล์ของสาหร่าย *Dunaliella salina*
(ที่มา : www.d-factoryalgae.eu)

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสาหร่าย

สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวบางชนิดจะมีเซลล์ขนาดใหญ่และเมื่ออยู่ในสภาวะการเจริญเติบโตที่เหมาะสมเซลล์จะมีสีแดงที่มีคุณสมบัติในการสังเคราะห์เบต้าแคโรทีน (β-carotene) สูง เช่น *D.salina, D.parva* และ *D.pseudosalina* เป็นต้น บางชนิดเซลล์มีสีเขียว ไม่มีคุณสมบัติในการสะสมเบต้าแคโรทีน เช่น *D.assymetrica, D.peircei, D.turcomanica* และ *D.viridis* เป็นต้น (นิรันดร์, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไปแล้วเซลล์ปกติ (vegetative cell) ของสาหร่าย *Dunaliella* sp. จะมีแฟลกเจลลาสองเส้นที่มีความยาวเท่ากับหรือไม่น้อยกว่าช่วงความยาวของเซลล์ (Ben-Amotz และคณะ, 2009) เซลล์ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์บางๆหุ้มอยู่ (สรวิศ, 2543) ซึ่งจะมีขนาดความกว้าง 4-15 ไมโครเมตรและความยาว 6-25 ไมโครเมตร ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต รูปร่างของเซลล์จะมีลักษณะแตกต่างกัน มีทั้งรูปไข่รูปวงรีทรงกระบอก รูปกระสวยหรือทรงกลม (Tran และคณะ, 2013)



รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างภายในเซลล์ของสาหร่าย
(ที่มา : https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Dunaliella_acidophila)

ภายในเซลล์มีคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ลักษณะเป็นรูปถ้วย มีไพรีนอยด์ที่ถูกล้อมรอบด้วยแป้ง (starch) ภายในคลอโรพลาสต์มีนิวเคลียสอยู่ที่ด้านหน้าของเซลล์ (Tran และคณะ, 2013) มีจุดตา (eyespot) ติดกับไทลาคอยด์ (thylakoid) มีไมโตคอนเดรีย (mitrocondria) รูปร่างแห (reticulum) กระจายอยู่ระหว่างคลอโรพลาสต์กับพลาสมาเลมมา (plasmalemma) มีกอลจิบอดี (golgi body) ประมาณ 2-4 อัน อยู่ระหว่างปลายด้านบนของนิวเคลียสกับบริเวณกลางเซลล์ มีเอนโดพลาสมิคเรติคิวลัม (endoplasmic reticulum) ทำหน้าที่เป็นแหล่งสำรองสารเยื่อหุ้มสำหรับใช้ในสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม (นิรันดร์, 2554)

2.1.3 การแพร่กระจาย

สาหร่าย *Dunaliella* sp. สามารถดำรงชีวิตได้ในช่วงความเค็มที่กว้างตั้งแต่ 0.2-3.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ พบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย น้ำเค็ม และในดินเค็มทั่วโลก พบในน้ำจืด คือ *D.flagellate*, *D.chordate*, *D.tateralis* และ *D.pauper* ในน้ำกร่อย คือ *D.tertiolecta*, *D.bioculata* และที่พบในน้ำเค็ม คือ *D.terricola* และ *D.salina* เป็นต้น ซึ่ง *D.salina* จะสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตได้ในน้ำที่มีความเค็มตั้งแต่ 5 ส่วนในพันส่วน (ppt) จนถึงระดับความเข้มข้นที่อิ่มตัวของเกลือสูงกว่า 300 ส่วนในพันส่วน (น้ำทะเลปกติความเค็ม 30-35 ส่วนในพันส่วน) เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเค็มสูง เช่น ทะเล ทะเลสาบน้ำเค็ม หรือแหล่งน้ำที่มีความเค็มสูงกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถสังเกตเห็นสาหร่ายได้ชัดเจนทำให้สีน้ำกลายเป็นสีน้ำตาลแดง (นิรันดร์, 2554) นอกจากนั้นสาหร่าย *Dunaliella* sp. บางชนิดเช่น *D.acidophila* สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำที่มีค่าพีเอชต่ำถึงพีเอช 1 ได้ (สรวิศ, 2543)

2.1.4 กระบวนการสืบพันธุ์

2.1.4.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

เกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ สืบพันธุ์ในสภาวะเคลื่อนที่ (motile state) โดยการแบ่งเซลล์ตามยาวหรือแนวตั้งแบบไมโทซีส (mitosis) ในเซลล์ปกติ (vegetative cell) (นิรันดร์, 2554) ในสภาวะความเข้มข้นของเกลือที่ไม่เหมาะสม สาหร่ายจะสร้างซีสต์ (cyst) ที่มีลักษณะผิวขรุขระหุ้มเซลล์ที่เรียกว่าอะพลาโนสปอร์ (aplanospore) (Ben-Amotz และคณะ, 2009) ในสภาวะที่มีความเค็มจัด (มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์) สามารถกระตุ้นให้สาหร่าย *D. salina* สร้างอะพลาโนสปอร์ได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างอะพลาโนสปอร์ ได้แก่ สภาวะที่ขาดไนโตรเจน มีซัลเฟตสูง อุณหภูมิต่ำ และช่วงวันสั้น ส่วนความเข้มแสงและพีเอชไม่มีผลต่อการสร้างอะพลาโนสปอร์ การสร้างอะพลาโนสปอร์เกิดขึ้นในระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ซึ่งเซลล์มากกว่าร้อยละ 36 สามารถเป็นอะพลาโนสปอร์ได้ (นิรันดร์, 2554)

2.1.4.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

เกิดในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยการ lateral fusion ของเซลล์สืบพันธุ์ที่มีรูปร่างและขนาดเหมือนกัน (isogamy) ผสมกันจะได้ไซโกต (zygote) ซึ่งไซโกตที่ได้อาจเป็นสีเขียวหรือสีแดง มีผนังเซลล์หนาและเรียบ หลังจากเข้าสู่ระยะพักตัวแล้วนิวเคลียสของไซโกตจะแบ่งตัวแบบไมโทซีสจนได้เซลล์ 32 เซลล์ และจะถูกปล่อยออกมาผ่านผนังของเซลล์แม่ (นิรันดร์, 2554)

2.1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

2.1.5.1 คาร์บอน (Carbon) สาหร่าย *Dunaliella* sp. เป็นสาหร่ายที่ต้องการพลังงานแสงในการสังเคราะห์แสง (photoautotrophs) และมีความต้องการสารอินทรีย์คาร์บอน (organic carbon) ในการดำรงชีวิต โดยธรรมชาติแหล่งของคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำจืดจะมีเพียงพอแก่ความต้องการของสาหร่าย แต่ในน้ำทะเลหรือน้ำที่มีความเค็มสูงจะมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายอยู่ในน้ำจะต่ำมาก (นิรันดร์, 2554)

2.1.5.2 ไนโตรเจน (Nitrogen) ธาตุไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่าย รูปแบบของธาตุอาหารไนโตรเจนที่สาหร่ายทั่วๆไปนำมาใช้เป็นสารประกอบ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนินทรีย์ ได้แก่ ไนเตรท (NO^{3-}), ไนไตรต์ (NO^{2-}) และแอมโมเนียมไอออน (NH^{4+}) (นิรันดร์, 2554)

Giordano (2001) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* UTEX 200 ในสภาวะที่มี CO_2 สูง 5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไนเตรทหรือแอมโมเนียมไอออนปริมาตร 10 มิลลิโมล ต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เซลล์ที่เลี้ยงโดยใช้แอมโมเนียมไอออนมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงโดยใช้ไนเตรท ขนาดของเซลล์, ปริมาณโปรตีน, Rubiscoprotein, กิจกรรม phosphoenol pyruvate carboxylase (PEPC) และปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนอิสระ มีการเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตในอาหารที่มีแอมโมเนียมไอออน แต่ในตรงกันข้ามอัตราการสังเคราะห์แสงและความเข้มข้นกลีเซอรอลของเซลล์จะลดลงเมื่อใช้แอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งไนโตรเจน

2.1.5.3 ฟอสฟอรัส (Phosphorus) รูปแบบฟอสฟอรัสที่สาหร่ายต้องการจะอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ฟอสเฟต (organic phosphate) เช่น ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (H_2PO_4) หรือไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน (HPO_4^{2-}) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *D.salina* คือฟอสฟอรัสในรูปของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (นิรันดร์, 2554)

Abu-Rezq และคณะ (2010) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D.salina* โดยใช้ความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน ได้แก่ 7.5, 15 และ 30 g $m^{-3}d^{-3}$ พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเข้มข้นฟอสเฟตเท่ากับ 30 g $m^{-3}d^{-3}$

2.1.5.4 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) มีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราเมตาบอลิซึมของสาหร่าย การควบคุมพีเอชที่เพิ่มสูงขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงวิธีหนึ่งคือการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำปฏิกิริยากับน้ำทำให้สามารถเพิ่มไฮโดรเจนไอออน (H^+) ในน้ำได้ ทำให้พีเอชของน้ำลดลง (นิรันดร์, 2554)

สาหร่าย *D.salina, D.parva* และ *D.pseudosalina* ที่แยกได้จากบึงเกลือมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 7-8 โดย *D.salina* และ *D.parva* สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงพีเอช 6-9 ขณะที่ *D.pseudosalina* เจริญเติบโตได้ในช่วงพีเอช 5-10 (Ben-Amotz และคณะ , 2009)

2.1.5.5 อุณหภูมิ (Temperature) สาหร่าย *Dunaliella* sp. สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในอุณหภูมิตั้งแต่ -35 องศาเซลเซียสถึง 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *D. salina* อยู่ในช่วง 20-40 องศาเซลเซียส (Ben-Amotz และคณะ, 2009)

2.1.5.6 แสง (Light) สาหร่าย *Dunaliella* sp. มีการเจริญเติบโตได้ดีในช่วงความเข้มแสง 50-800 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยเจริญเติบโตได้สูงสุดที่ 800 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (Ben-Amotz และคณะ, 2009)

Hejazi และ Wijffels (2003) ศึกษาผลของความเข้มแสงต่อผลผลิตเบต้าแคโรทีนและสารสกัดจาก *D. salina* ในถังหมักสองเฟส ใช้ความเข้มแสงแตกต่างกัน 3 สภาวะ ได้แก่ 1.5×10^{-8}(ต่ำ), 2.7×10^{-8}(กลาง) และ 4.5×10^{-8}(สูง) ไมโครโมลโฟตอนต่อวินาทีต่อเซลล์ พบว่าปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบต้าแคโรทีนของเซลล์จะเพิ่มขึ้นถ้าใช้ความเข้มแสงสูงขึ้น อัตราการสกัดเบต้าแคโรทีนจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการรับแสงเพิ่มขึ้น

2.1.5.7 ความเค็ม(Salinity) สาหร่าย *Dunaliella* sp. บางชนิดสามารถสร้างรงควัตถุสีแดงที่เรียกว่าฮีมาโตโครม (haematochrome) พวกเบต้าแคโรทีน ซึ่งปกติจะเป็นสีเขียวแต่เมื่อความเค็มของน้ำทะเลเพิ่มสูงกว่า 250 ส่วนในพันส่วนเซลล์จะเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง (ยุวดี, 2549) ความเค็มที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *D.salina* คือ 120-180 ส่วนในพันส่วน (Brorowitzka และคณะ, 1984)

นิรันดร์ (2554) ศึกษาความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D.salina* KU11 พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็ม 1.0 - 1.5 โมลโซเดียมคลอไรด์

2.1.6 ประโยชน์ของสาหร่าย *Dunaliella* sp.

2.1.6.1 ผลิตเบต้าแคโรทีนสาหร่าย *Dunaliella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวสะสมเบต้าคาโรทีนได้เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีความเข้มแสงสูง ความเค็มของน้ำสูง ในปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella* sp. เพื่อผลผลิตเบต้าคาโรทีนในระดับอุตสาหกรรมอยู่ในหลายประเทศ เช่น อิสราเอล สหรัฐอเมริกา และสเปน เป็นต้น ผลผลิตหลักของสาหร่าย *Dunaliella* sp. จะอยู่ในสองรูปแบบ ได้แก่ สาหร่ายแห้งสำหรับใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพและเป็นส่วนผสมในอาหาร และในรูปสารสกัดเบตาคาโรทีนสำหรับใช้ในอุตสาหกรรม (คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 2559 : ออนไลน์)

2.1.6.2 อาหารสัตว์น้ำการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจำเป็นต้องใช้สาหร่ายเพื่อเป็นอาหารสัตว์น้ำทั้งในทางตรงคือการบริโภคของลูกสัตว์น้ำเช่นลูกกุ้งหรือเป็นอาหารของหอยสองฝาโดยตรงและทางอ้อมคือใช้สาหร่ายเป็นอาหารของแพลงก์ตอนสัตว์แล้วจึงนำแพลงก์ตอนสัตว์ไปใช้เป็นอาหารลูกปลาอีกครั้งหนึ่งสามารถใช้สาหร่ายเซลล์เดียวที่มีโปรตีนสูงหลายชนิดสำหรับการเลี้ยงแพลงก์ตอนสัตว์โดย *Artemia salina* (ไรทะเล) จะขยายพันธุ์ได้มากเมื่อเลี้ยงด้วยสาหร่าย *Dunaliella* sp. (กัญญาและสัณห์ชัย, 2527)

2.1.6.3 สกัดผลผลิตน้ำมันและเชื้อเพลิงชีวภาพ

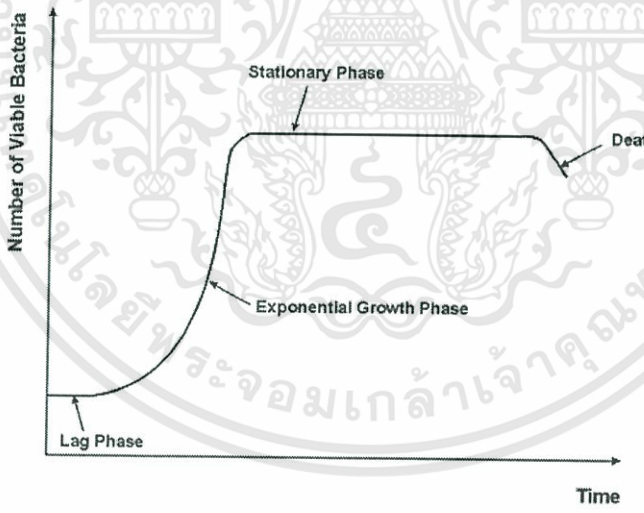
Sohi และ Eghdami (2014) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่าย *D.salina* โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะการควบคุมในห้องปฏิบัติการ พบว่าความเข้มข้นชีวมวลของสาหร่ายจะเท่ากับ 1.9 มิลลิกรัมต่อลิตรของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ได้ปริมาณน้ำมันเท่ากับ 24.8 เปอร์เซ็นต์ของมวลชีวภาพ เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมตรี (GC/MS) พบ 8 fatty acid methyl esters (FAME) ที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว C16 และ C18 เท่ากับ 38.57 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำมันที่ได้จากสาหร่าย *D. salina* เหมาะสำหรับใช้ผลิตไบโอดีเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fakhry และ Maghraby (2013) ทำการเพาะเลี้ยง *D.salina* เพื่อการผลิตไบโอดีเซล โดยทำการเพาะเลี้ยงภายใต้การควบคุมในห้องปฏิบัติการ ในระยะการเจริญเติบโตคงที่ของสาหร่าย ความเข้มข้นมวลชีวภาพจะเท่ากับ 2.6 มิลลิกรัมต่อลิตรของน้ำหนักแห้ง ได้น้ำมันจากสาหร่ายเท่ากับ 26.1 เปอร์เซ็นต์ของมวลชีวภาพ ทำการวิเคราะห์น้ำมันโดยเทคนิคแก๊สลิควิดโครมาโทกราฟี (GLC) พบ 14 fatty acid methyl esters (FAME) ปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวเป็น 35 เปอร์เซ็นต์และ 65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งคุณสมบัติทางเคมีของกรดไขมันนี้สามารถนำไปผลิตไบโอดีเซลได้

Santhanam และคณะ (2013) ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่าย *D.salina* ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบ in-door และ out-door และเก็บมวลชีวภาพที่ได้มาใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซล ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของสาหร่ายเท่ากับ 66.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวิเคราะห์ได้ว่าเป็น fatty acid methyl esters (FAME) ได้แก่ กรดปาล์มิติก (C16:0), กรดโอเลอิก (C18:1) และกรดไลโนเลนิค (C18:3) ที่ใช้สำหรับผลิตไบโอดีเซล

2.2 ระยะการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella* sp.



รูปที่ 2.3 การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella* sp.
(ที่มา : http://www.corrosion-club.com/waterbactgrowth.htm)

การเจริญเติบโตของสาหร่าย (Growth pattern) สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ

2.2.1 ระยะปรับตัว (Lag phase) เป็นระยะที่สาหร่ายเริ่มมีการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อม ระยะนี้สาหร่ายจะยังคงไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์

2.2.2 ระยะเอกโพเนนเชียล (Exponential phase) เป็นระยะที่สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงเช่น ความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร ความเข้มแสง อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น

2.2.3 ระยะคงที่ (Stationary phase) เป็นระยะที่สาหร่ายมีการเจริญเติบโตคงที่ซึ่งหมายถึงมีการเจริญเติบโตเท่ากับอัตราการตาย เนื่องจากปริมาณธาตุลดลงอย่างรวดเร็ว และเกิดสารพิษจากขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) หรือการสลายตัวของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

2.2.4 ระยะการตาย (Death phase) เป็นระยะที่สาหร่ายมีการหยุดการเจริญเติบโต และมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากธาตุอาหารหมด และสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและมีของเสียเกิดขึ้นปริมาณมากเซลล์สาหร่ายจะเริ่มตายและจะตายเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (กมลวรรณและคณะ, 2554)

2.3 วิธีการปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสาหร่าย

2.3.1 การปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

Sathasivam และ Juntawong (2013) ทำการปรับปรุงอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Modified Johnsons medium มาปรับปรุงโดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต, โซเดียมไบคาร์บอเนต, เพิ่มโซเดียมเมทาวานาเดตและนำเอาแมกนีเซียมคลอไรด์ออก โดยเรียกอาหารสูตรนี้ว่า Ramaraj medium ได้ทดลองนำ *D.salina* ที่แยกได้จากดินเกลือ ได้แก่ สายพันธุ์ KU07, KU08, KU11, KU13 และ KU16 มาทำการเพาะเลี้ยง โดยทุกสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในอาหาร Ramaraj medium นำสายพันธุ์ KU11 มาเพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิดเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต พบว่าสายพันธุ์ KU11 มีการเจริญเติบโตในอาหาร Ramaraj medium ได้เร็วขึ้นและดีกว่าในอาหาร Modified Johnsons medium ในทุกระดับของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 โมล)

นิศาชล (2540) ทดลองปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรทตามสูตรอาหาร J/1 เป็น 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรในโหล 10 ลิตร เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเบต้าแคโรทีน พบว่าความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) 0.5 กรัมต่อลิตร สาหร่ายจะมีปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้น

2.3.2 การปรับปรุงปัจจัยการเจริญเติบโต

Boontaveeyuwat (1999) ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* 1197 เมื่อทำการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและในถาดเขย่ากลางแจ้ง พบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายในห้องปฏิบัติการ ความเค็ม 9 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้ความเข้มแสง 8 กิโลลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พีเอช 6.3-6.8 และอุณหภูมิ 24-25 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสภาวะที่เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.65 + 0.34 ต่อวัน และการลดปริมาณไนเตรทจะทำให้เซลล์มีอัตราการเจริญลดลง และเมื่อเลี้ยงสาหร่ายในถาดเขย่ากลางแจ้ง สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายคือ ความเค็ม 9 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มแสง 50.5 กิโลลักซ์ พีเอช 6.3-6.8 และอุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส ในเวลากลางวัน และ 28-30 องศาเซลเซียส ในเวลากลางคืน โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.72 + 0.04 ต่อวัน

Imamoglu และคณะ (2014) เพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* EgeMacc-024 โดยปรับปรุงปัจจัยการเจริญเติบโตทางกายภาพ เช่น ความเข้มแสงอุณหภูมิและความเร็วรอบของเครื่องเขย่า โดยใช้แผนการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนอง คือ แผนแบบเซ็นทรัลคอมโพสิต (Central composite design) พบว่าปัจจัยการเจริญเติบโตทางกายภาพที่เหมาะสมที่สุด คือ การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสง 55.75 ไมโครโมล อุณหภูมิ 22.09 องศาเซลเซียสและเขย่าที่ความเร็ว 148.73 รอบต่อนาที ได้ความเข้มข้นของคลอโรฟิลด์เอเท่ากับ 6.47 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสง 57.5 ไมโครโมล อุณหภูมิ 27.97 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 166.08 รอบต่อนาที จะได้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 14.87 ไมโครกรัม ต่อ100 ไมโครลิตร และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.22 ในวันที่ 1 สอดคล้องกับค่า doubling time 3.15 วัน

โฆษิต (2540) ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* 1197 โดยทำการเปรียบเทียบระดับโปแตสเซียมไนเตรท 5, 10, 15 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร Johnson's medium พบว่าที่ระดับโปแตสเซียมไนเตรท 5 เปอร์เซ็นต์ ความเค็มของน้ำ 150 ส่วนในพันส่วน เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในบ่อกลางแจ้งขนาด 500 ลิตร ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้นที่สุด 9 วัน ได้จำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ $0.668 \pm 0.018 \times 10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.1405 ต่อวัน เวลาสั้นที่สุดในการเพิ่มเซลล์เป็นสองเท่า 4.993 วัน ใช้เวลา 13 วัน

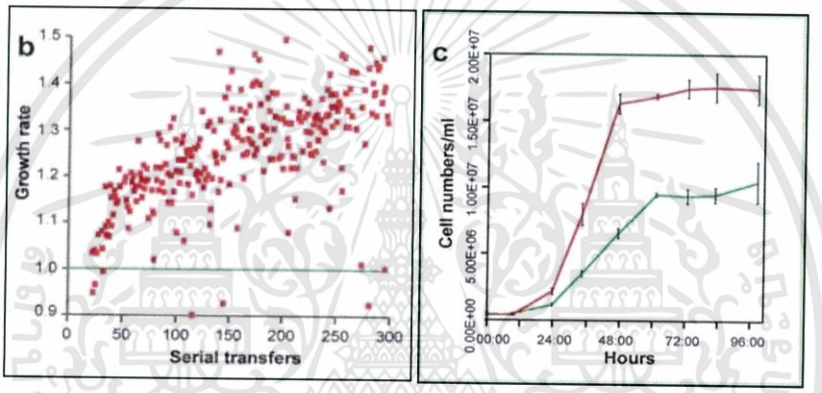
Pisal และ Lele (2004) ทำการเพิ่มปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์จากสาหร่าย *D. salina* โดยใช้ปัจจัยต่างๆเพื่อกระตุ้นให้สาหร่ายเกิดความเครียด เช่น การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์, การจำกัดปริมาณไนโตรเจน, ความเค็มสูง, ความเข้มแสงสูงและอุณหภูมิสูง พบว่าการเพิ่มความเค็ม 3 โมล มีผลทำให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงจนตายในที่สุด แต่จะทำให้เซลล์มีปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น ในการจำกัดปริมาณไนโตรเจนทำให้ได้ปริมาณเบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้นจาก 1.65 พิโกกรัมต่อเซลล์ เป็น 7.05 พิโกกรัมต่อเซลล์ และจะได้ปริมาณเบต้าแคโรทีนสูงสุด (8.28 พิโกกรัมต่อเซลล์) เมื่อใช้ความเข้มแสงสูงควบคู่กับการเพิ่มอุณหภูมิสูง

2.3.3 การคัดเลือกโดยธรรมชาติ (Natural selection) ถือเป็นกลไกพื้นฐานของการเกิดวิวัฒนาการร่วมกับกลไกอื่นๆ การคัดเลือกโดยธรรมชาติทำให้ประชากรที่มีลักษณะเหมาะสมกับสิ่งแวดล้อมสามารถดำรงชีวิตและแพร่พันธุ์ประชากรในรุ่นต่อไปได้ แต่สำหรับประชากรที่ไม่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับสิ่งแวดล้อมนั้นก็จะถูกคัดทิ้งและลดจำนวนลงไป ทำให้สิ่งมีชีวิตที่ถูกคัดเลือกให้เหลืออยู่เกิดวิวัฒนาการโดยปรับเปลี่ยน (adaptation) ให้มีลักษณะทางสรีระ พฤติกรรมและรูปแบบการดำรงชีวิตที่กลมกลืนกับสภาพแวดล้อมที่ประชากรนั้นอาศัยอยู่ (นันทวันและศศิวิมล, 2552)

จากงานวิจัยของ Perrineau และคณะ (2014) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ในห้องทดลอง ด้วยวิธีการเจือจางเชื้อเริ่มต้นเพื่อทำการศึกษาศักยภาพในการวิวัฒนาการโดยผ่านขบวนการคัดเลือกโดยธรรมชาติ ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้งหมด 1,880 รุ่นในอาหารเหลว และเลี้ยงภายใต้แสงอย่างต่อเนื่อง (เรียกสาหร่ายกลุ่มนี้ว่า EL population) เมื่อทำการทดลองครั้งสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์ EL สูงกว่ากลุ่มเซลล์ PL (PL population) ถึง 35 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 2.4 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ *C. reinhardtii* (รูปซ้าย) การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์ *C. reinhardtii* กลุ่มต้นแบบ (PL, เส้นสีเขียว) และประชากรกลุ่มที่ผ่านวิวัฒนาการ (EL, เส้นสีแดง) (รูปขวา)

วิธีการนี้เป็นวิธีที่น่าสนใจเนื่องจากไม่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรมหรือเกี่ยวข้องกับการตัดต่อพันธุกรรม ซึ่งยังไม่เป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายในบางประเทศ ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้ผู้วิจัยจึงนำเสนอวิธีการคัดเลือกโดยธรรมชาติมาใช้เป็นวิธีในการศึกษาการปรับตัวของสาหร่าย *D. salina* เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงโดยธรรมชาติและนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Bell (2012) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวในห้องปฏิบัติการโดยเพาะเลี้ยงในที่มืด ในการเพาะเลี้ยงแบบเฮทเทอโรโทรป จะเกิดวิวัฒนาการและมีประสิทธิภาพด้านการเจริญเติบโตได้เร็วขึ้นมีความแข็งแรงมากขึ้นและการตอบสนองต่อความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้นซึ่งฟีโนไทป์เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกมากกว่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรม เมื่ออยู่ในที่มีแสงวิวัฒนาการด้านความคงทนจะต่ำลงซึ่งอาจจะมีการสะสมยีนที่เป็นอันตรายต่อการสังเคราะห์แสง ในบางสายพันธุ์เกิดวิวัฒนาการที่ทำให้ไม่สามารถจะเจริญเติบโตในที่มีแสงได้โดยเฉพาะการเจริญเติบโตแบบออโตโทรปและเฮทเทอโรโทรป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มักจะเกิดวิวัฒนาการขึ้นในสาหร่ายที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงในระยะยาว โดยจะส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโต

Mishra และคณะ (2015) ศึกษาเกี่ยวกับการใช้ความเค็มเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่าย *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 ซึ่งสาหร่ายจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมี โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบขั้นตอนเดียวในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 400 มิลลิโมล พบว่าสาหร่ายมีปริมาณไขมัน 33.13 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณคาร์โบไฮเดรต 35.91 เปอร์เซ็นต์ และทำการเพาะเลี้ยงแบบสองขั้นตอนในโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 400 มิลลิโมล เป็นเวลา 3 วัน ส่งผลให้ได้ปริมาณไขมัน 24.77 เปอร์เซ็นต์ (ที่มี 74.87 เปอร์เซ็นต์ของไขมันที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง) และมีชีวมวลที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับแบบขั้นตอนเดียว ทำให้ได้วิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับพัฒนาศักยภาพของ *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 เพื่อเพิ่มผลผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ

Yu และคณะ (2013) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไขมันในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์กลายที่มีแป้งต่ำโดยการใช้ Adaptive laboratory evolution (ALE) ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่าย โดยฟีโนไทป์สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* สามสายพันธุ์ (cc4324, cc4326 และ cc4334) จะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นโดย ALE ส่งผลให้สายพันธุ์สุดท้ายมีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น วิธีการ ALE ทำให้ความเข้มข้นชีวมวลของสายพันธุ์สุดท้าย cc4324, cc4326 และ cc4334 เพิ่มเป็น 1.17, 1.33 และ 1.48 เท่าของสายพันธุ์เริ่มต้น ปริมาณไขมันทั้งหมดของสายพันธุ์ดั้งเดิมจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จาก 32 เปอร์เซ็นต์ เป็น 36.67 เปอร์เซ็นต์ ในสายพันธุ์ cc4326 สุดท้ายและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 24.27 เปอร์เซ็นต์เป็น 44.67 เปอร์เซ็นต์ในสายพันธุ์ cc4334 สุดท้ายที่เจริญในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน การเจริญเติบโตมีความบกพร่องเล็กน้อยเนื่องจากพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีแป้งต่ำเกิดความเครียดจากการไม่ได้รับสารอาหารจากไนโตรเจนแต่ก็ได้ทำการแก้ไขด้วยการเติมไนโตรเจน ดังนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้วิธี ALE สามารถเพิ่มความเข้มข้นชีวมวลและการผลิตไขมันในสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีแป้งต่ำได้

Takouridis และคณะ (2015) ได้เพิ่มศักยภาพสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* เพื่อนำไปใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ โดยทำการพัฒนาสาหร่ายให้เจริญเติบโตในสภาพที่มีความเค็มสูงขึ้นด้วยวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ genome shuffling การทดลองเริ่มจากการผลิตประชากรสาหร่ายโดยทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutagenesis) แบบสุ่มและเหนี่ยวนำให้เกิดการผสมพันธุ์หลายๆรอบภายใต้การเพิ่มปริมาณความเค็มให้สูงขึ้น ผลการทดลองพบว่าประชากรสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตในระดับความเค็มที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) สูงถึง 700 มิลลิโมล ต่างจากสายพันธุ์ต้นกำเนิด (progenitor) ที่สามารถเจริญในความเค็มที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพียงแค่ 300 มิลลิโมล นอกจากนี้การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual line) ทำให้สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ในระดับความเข้มข้นของเกลือที่ 500 มิลลิโมล อีกทั้งการรวมตัวของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์สาหร่าย (Palmelloid aggregations) มีปริมาณเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณมวลชีวภาพกลับมีค่าลดลง ซึ่งจำเป็นจะต้องมีการปรับปรุงสำหรับการพัฒนาสายพันธุ์สาหร่ายในอนาคต และการควบคุมการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual line) จะทำให้ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

สาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นิรันดร์ จันทวงศ์ ภาควิชาพฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่ายสูตร Modified Ramaraj Medium ได้แก่

3.2.1 บอริกแอซิด (Boric acid)

3.2.2 แมงกานีส คลอไรด์ (Manganese chloride)

3.2.4 ซิงค์คลอไรด์ (Zinc chloride)

3.2.5 คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ (Copper (II) chloride)

3.2.6 โซเดียมโมลิบเดต (Sodium molybdate)

3.2.7 โซเดียมเมทาวานาเดต(Sodium metavanadate)

3.2.8 โคบอลต์ (II) คลอไรด์ (Cobalt (II) chloride)

3.2.8 โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)

3.2.9 โพแทสเซียมไนเตรต (Potassium nitrate)

3.2.10 แมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต (Magnesium sulphate hydrate)

3.2.11 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (Calcium chloride dehydrate)

3.2.12 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออโทฟอสเฟต (Potassium dihydrogen orthophosphate)

3.2.13 ไอรอน (III) คลอไรด์เฮกซาไฮเดรต (Iron (III) chloride hexahydrate)

3.2.14 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)

3.2.15 โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate)

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Bright field microscope)

3.3.2 เครื่องชั่งน้ำหนักสี่ตำแหน่ง (Analytical Balance)

3.3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.4 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow clean bench)

3.3.5 เครื่องเขย่า (Orbital Shaker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

3.3.7 ตู้อบความร้อน (Hot air oven)

3.3.8 ตู้เย็นเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย(Refrigerator)

3.3.9 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)

3.3.10 เครื่องผสมสาร (Vortex)

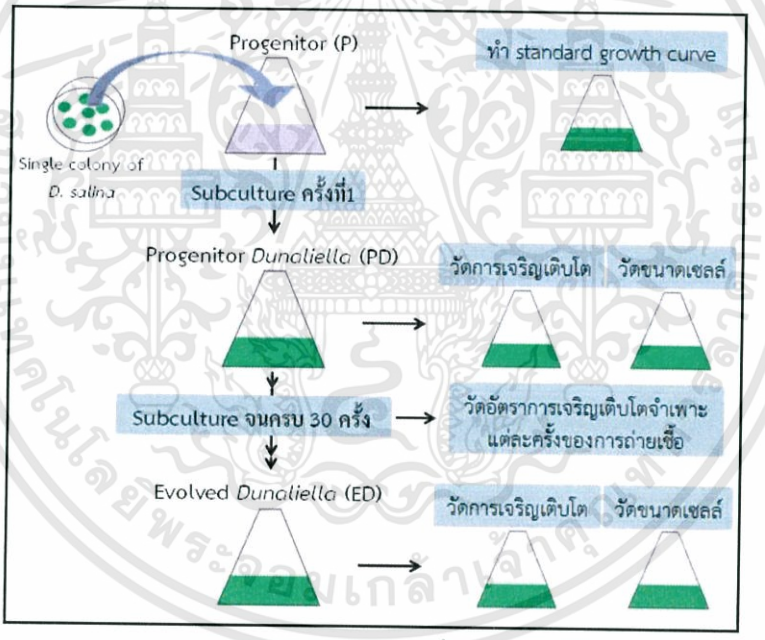
3.3.11 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.12 สเตจไมโครมิเตอร์ (Stage micrometer) และออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์ (Ocular micrometer)

3.3.13 สไลด์แก้ว (Microscope slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์ (Cover glass)

3.3.14 เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ฟลาสก์บีกเกอร์ กระบอกตวงปิเปต

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน



รูปที่ 3.1 การวางแผนวิธีการทดลองการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* KU11

3.4.1 สภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ในทุกการทดลองจะใช้สภาวะเดียวกันในการเพาะเลี้ยง คือ สาหร่ายจะถูกถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Modified Ramaraj Medium (ภาคผนวก ก-1) ที่ความเข้มแสง 39.86 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (μmol photons m^{-2} s^{-1}) ภายใต้อุณหภูมิ 27±3 องศาเซลเซียสและถูกเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.2 แสดงสภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

3.4.2 การเก็บรักษาหัวเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารแข็ง

นำสาหร่าย *D. salina* KU11 มาทำการเขี่ยเชื้อ (streak plate) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง Modified Ramaraj Medium (ภาคผนวก ก-2) ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงดังข้อที่ 3.4.1 สังเกตดูโคโลนีที่เกิดขึ้นและทำการ streak plate ซ้ำ 2-3 ครั้ง จนได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำสาหร่ายที่คัดแยกได้ถ่ายลงอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อแล้วเก็บไว้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.3 ขั้นตอนการทดลอง (รูปที่ 3.1)

3.4.3.1 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน

ตอนที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย

นำเชื้อสาหร่ายที่ผ่านการคัดแยกให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.4.2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Modified Ramaraj Medium (ภาคผนวก ก-1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะดังข้อ 3.4.1 เป็นเวลา 3-4 วัน เพื่อให้ได้หัวเชื้อขนาดปริมาตร 100 มิลลิลิตรเรียกสาหร่ายหัวเชื้อนี้ว่า Progenitor (P)

ตอนที่ 2 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย Progenitor (P)

นำสาหร่ายหัวเชื้อ Progenitor มาเพาะเลี้ยงโดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 50×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงตามข้อ 3.4.1 ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดอัตราการเจริญเติบโตโดยการตรวจนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Counting chamber slide แบบ Hemocytometer (ภาคผนวก ข-1) เป็นเวลาทั้งหมด 9 วัน จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานการเจริญเติบโต (standard growth curve) เพื่อนำช่วงระยะการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) ของสาหร่ายไปใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.4.3.2 การคัดเลือกทางธรรมชาติโดยการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่อง (serial sub-culture)

ตามวิธีของ Perrineau และคณะ (2014) สาหร่าย Progenitor (P) ที่เจริญเติบโตในช่วงระยะ log phase (วันที่ 4) ถูกนำมาทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 โดยใช้วิธีการเจือจางโดยการผสมเชื้อ 4 มิลลิลิตรในอาหารเหลว Modified Ramaraj Medium โดยมีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 50×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เรียกเชื้อที่ได้ว่า Progenitor *Dunaliella* (PD) จากนั้นจึงทำการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่อง (sub culturing) ทุกๆวันที่ 4 จนครบ 30 ครั้ง ซึ่งในแต่ละครั้งของการถ่ายเชื้อสาหร่าย *D.salina* KU11 จะถูกนับจำนวนเซลล์เพื่อหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดังสูตร

$$\mu = \frac{ln\ (N/N0)}{t}$$ (ยศวดี, 2547)

โดยที่ μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)

N = ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายวันสุดท้าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

N_0 = ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายวันแรก (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

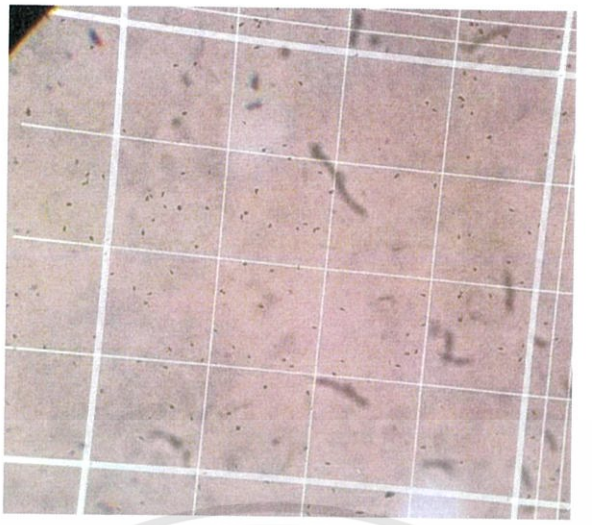
t = เวลา (วัน)

เชื้อครั้งสุดท้ายที่ถูกถ่ายเชื้อจะเรียกว่า Evolved *Dunaliella* (ED) ซึ่งจะถูกนำมาวัดหาค่าการเจริญเติบโตเพื่อเปรียบเทียบกับสาหร่าย PD

3.4.3.3 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย PD กับ ED

กลุ่มเซลล์ PD (Progenitor *Dunaliella* : PD) คือ เซลล์สาหร่าย *D. salina* KU11 ที่เก็บหลังจากการถ่ายเชื้อครั้งแรกในอาหารเหลว Modified Ramaraj Mediumกลุ่มเซลล์ ED (Evolved *Dunaliella* : ED) คือเซลล์สาหร่าย *D. salina* KU11 ที่ผ่านการถ่ายเชื้อ 30 ครั้ง สาหร่ายทั้ง 2 กลุ่มจะถูกนำมาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายโดยใช้เซลล์เริ่มต้นที่มีความเข้มข้นประมาณ 50×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในอาหารเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นตรวจนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Counting chamber slide แบบ Hemocytometer (ภาคผนวก ข-1) ทุก 24 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลองและสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างวันที่ทำการเพาะเลี้ยงกับค่าจำนวนเซลล์ที่สะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
149052



รูปที่ 3.3 แสดงจำนวนเซลล์สาหร่าย *D. salina* KU11 ในการวัดการเจริญเติบโตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า

3.4.3.4 การเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของสาหร่าย PD กับ ED

นำสาหร่าย PD และ ED มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเริ่มใช้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นประมาณ 50×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การวัดขนาดของเซลล์จะทำทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยการสุ่มเซลล์จำนวน 20 เซลล์ มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย100 เท่า และวัดขนาดเซลล์โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่าไมโครมิเตอร์ (micrometer) (ภาคผนวก ข-3) เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลองและสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างวันที่ทำการเพาะเลี้ยงกับขนาดเซลล์เพื่อเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของสาหร่าย

3.4.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองทำทั้งหมด 2 ซ้ำ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ในบล็อก (Randomized Complete Block Design: RCBD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ค) การวัดการเจริญเติบโตในหัวข้อ 3.4.3, 3.4.3.3 และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในหัวข้อ 3.4.3.2 จะทำการนับเซลล์ทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ยเพื่อนำไปสร้างกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

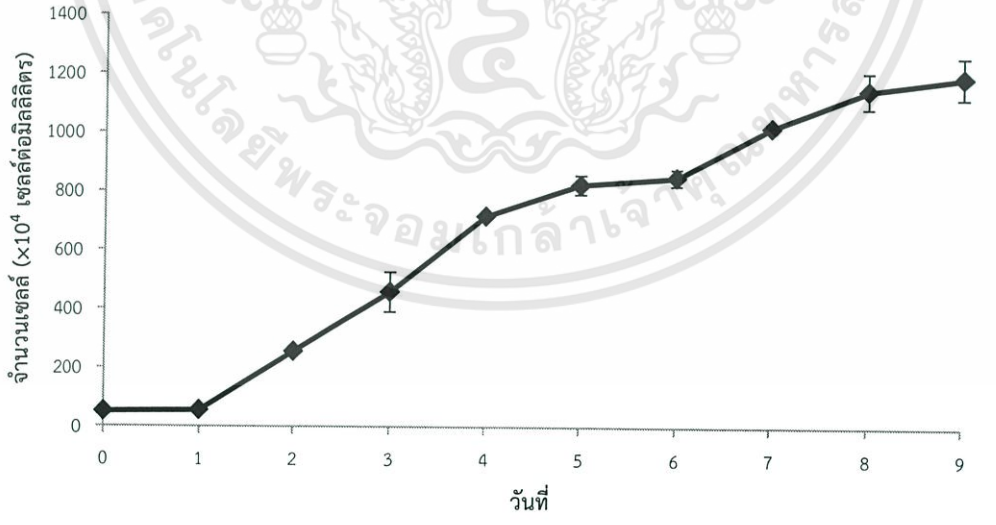
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยทำกราฟมาตรฐานการเจริญเติบโต (standard growth curve) เพื่อหาช่วงระยะการเจริญเติบโต log phase ของสาหร่าย *D. salina* KU11 พบว่าในวันที่ 1 สาหร่ายจะมีการปรับตัวในช่วง lag phase จนถึงวันที่ 2 หลังจากวันที่ 2 พบว่าสาหร่ายเข้าสู่การเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (log phase) ซึ่งมีจำนวนเซลล์อยู่ระหว่าง 300–700 $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากวันที่ 5 ของการเจริญเติบโตสังเกตได้ว่าสาหร่ายมีการสะสมของจำนวนเซลล์คงที่หรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ดังรูปที่ 4.1 อีกทั้งจำนวนเซลล์ที่นับได้ทุกๆ 24 ชั่วโมงยังสอดคล้องกับความเขียวของ culture ดังรูปที่ 4.2 ดังนั้น วันที่ 3 หรือ 4 คือช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการถ่ายเชื้อในการทดลองต่อไป

ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sathasivam และ Juntawong (2013) ซึ่งได้รายงานผลอัตราการเจริญเติบโตของ *D. salina* KU11 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Modified Ramaraj medium ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 52.84 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสและเขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที สาหร่ายมีการเจริญเติบโตแบบ log phase เมื่อเข้าสู่วันที่ 2 ถึงวันที่ 3 และมีจำนวนเซลล์อยู่ระหว่าง 400–500 $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11 หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Modified Ramaraj Medium เป็นเวลา 9 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีผลสำคัญอย่างยิ่งต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย อันได้แก่ ธาตุอาหาร, แสง, อุณหภูมิ, ความเป็นกรดด่างและความเค็ม ดังนั้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกันจึงส่งผลให้การเจริญเติบโตต่างกันไปด้วย (Ben-Amotz และคณะ, 2009)

รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11 เป็นเวลา 7 วัน

4.2 การวัดหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) ของสาหร่ายในแต่ละการถ่ายเชื้อ

จากผลการทดลอง 4.1 สาหร่าย *D. salina* KU11 ซึ่งเรียกสาหร่ายกลุ่มนี้ว่า Progenitor (P) มีระยะการเจริญเติบโตที่ mid-log phase ในช่วงวันที่ 4 จึงทำการถ่ายเชื้อในทุกๆ วันที่ 4 ของการถ่ายเชื้อตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 30

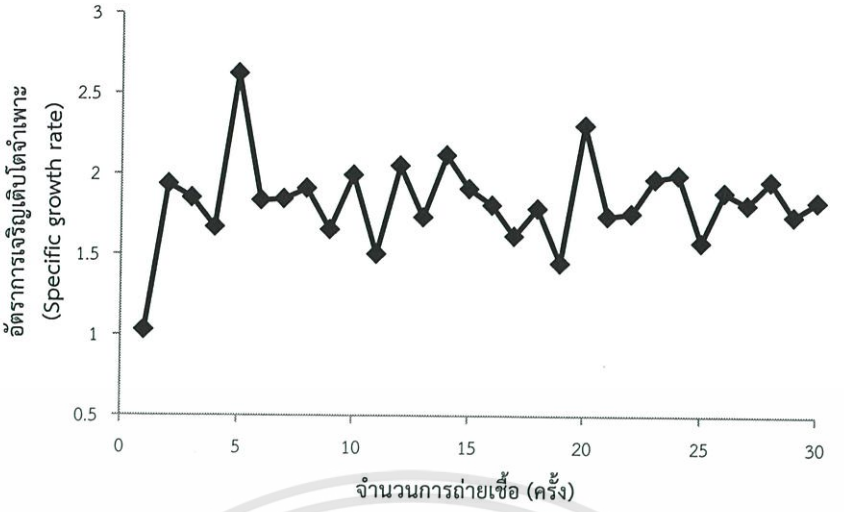
จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.1) (รูปที่ 4.3) พบว่าสาหร่าย PD ที่ได้จากการถ่ายเชื้อในครั้งแรกมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.0297 ต่อวัน สาหร่าย ED ที่ได้หลังจากการถ่ายเชื้อในครั้งสุดท้ายคือครั้งที่ 30 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.8353 ต่อวัน โดยค่าที่ได้นั้นถือว่าไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งจากงานวิจัยของ Perrineau และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการปรับตัวของสาหร่าย *C. reinhardtii* โดยวิธีการคัดเลือกโดยธรรมชาติ ซึ่งผู้ทำวิจัยพบว่าสาหร่าย *C. Reinhardtii* กลุ่มที่ผ่านวิวัฒนาการมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มขึ้น 35 เปอร์เซ็นต์ หลังจากได้มีการถ่ายเชื้อเป็นจำนวน 283 ครั้ง ซึ่งสุดท้ายได้ประชากรสาหร่ายจำนวน 1,880 รุ่นในอาหารเหลว TAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่ได้ทำการถ่ายเชื้อทั้งหมด 30ครั้ง

ครั้งที่ถ่ายเชื้อ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)
1	1.0297
2	1.9375
3	1.8514
4	1.6691
5	2.6235
6	1.8364
7	1.8440
8	1.9106
9	1.6559
10	1.9952
11	1.5028
12	2.0520
13	1.7324
14	2.1178
15	1.9100
16	1.8097
17	1.6164
18	1.7898
19	1.4501
20	2.3063
21	1.7420
22	1.7580
23	1.9732
24	1.9973
25	1.5804
26	1.8902
27	1.8157
28	1.9605
29	1.7443
30	1.8353

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



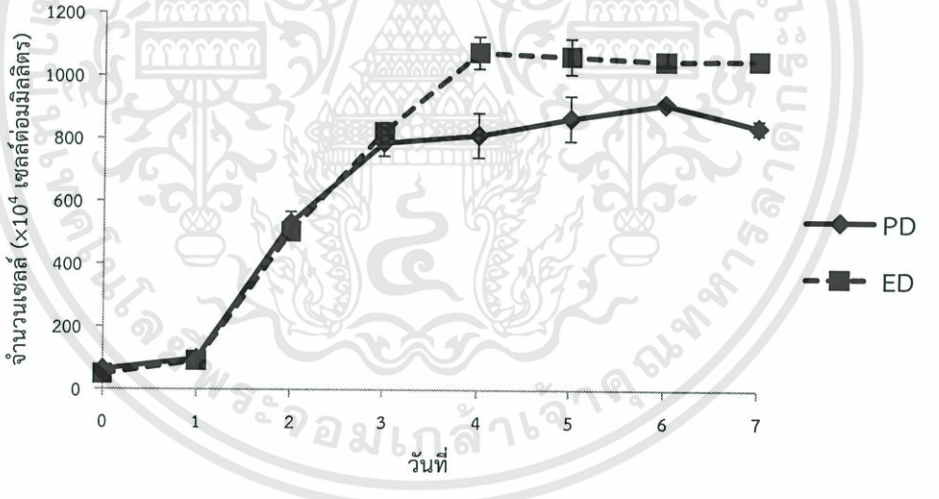
รูปที่ 4.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ *D. salina* KU11 หลังการถ่ายเชื้อ 30 ครั้งภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอย่างต่อเนื่อง

จากรูปที่ 4.3 เนื่องด้วยปัจจัยการเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย จึงเห็นได้ว่าในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1, 2, 3 และ 4 ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่ายต่ำ เพราะในช่วงนั้นได้มีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยเขย่าที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ซึ่งอาจไม่ใช่ความเร็วรอบที่เหมาะสมสำหรับสาหร่าย *D. salina* KU11 จึงได้ปรับเป็นความเร็ว 110 รอบต่อนาที พบว่าหลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 5 สาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่เปลี่ยนแปลงมากนักจนถึงครั้งที่ 30 ดังนั้นงานวิจัยนี้อาจมีความจำเป็นที่จะต้องทำการถ่ายเชื้อต่ออีกระยะหนึ่ง (6 เดือน) ของการเจริญเติบโตต่อไป อีกทั้งในการทดลองนี้ยังมีข้อจำกัดเรื่องสภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายซึ่งอาจมีความจำเป็นต้องปรับสภาวะให้เหมาะสม เพื่อให้สอดคล้องกับงานวิจัยเบื้องต้น เช่น งานวิจัยของ Sathasivam และ Juntawong (2013) ได้รายงานว่าสาหร่าย *D. salina* KU11 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร Modified Ramaraj medium ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 52.84 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสและเขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย PD (Progenitor *Dunaliella*) และสาหร่าย ED (Evolved *Dunaliella*)

การทดลองนี้ทำเพื่อเปรียบเทียบดูว่ามีการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ได้หลังจากการถ่ายเชื้อในครั้งแรก (PD) และสาหร่ายที่ได้หลังจากการถ่ายเชื้อ 30 ครั้ง (ED) จากผลการทดลองที่ 4.2 หรือไม่ หลังจากทำการวัดการเจริญเติบโต (growth curve) พบว่าสาหร่าย PD และ ED มีการเจริญเติบโตในระยะ lag phase ในวันที่ 1 หลังจากวันที่ 1 สาหร่าย PD จึงเข้าสู่ระยะ log phase จนถึงวันที่ 3 และเริ่มเข้าสู่การเจริญเติบโตแบบ stationary phase โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 786×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากวันที่ 3 จนถึงวันที่ 7 ในขณะที่สาหร่ายกลุ่ม ED เขาสู่ระยะ log phase วันที่ 2 และจำนวนเซลล์มีการเพิ่มแบบทวีคูณด้วยอัตราการแบ่งเซลล์ที่ใกล้เคียงกับ PD ดังรูปที่ 4.4 แต่สาหร่าย ED มีระยะ log phase ที่เพิ่มขึ้น 1 วันคือ จากวันที่ 3 เพิ่มมาเป็นวันที่ 4 และหลังจากวันที่ 4 สาหร่าย ED เริ่มเข้าสู่การเจริญเติบโตแบบ stationary phase โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ $1,074 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าสาหร่าย ED มีการปรับปรุงลักษณะการเจริญเติบโตไปในทางที่ดี เนื่องจากมีระยะ log phase ที่ยาวกว่าสาหร่าย PD 1 วัน และมีการสะสมของจำนวนเซลล์ในระยะ log phase ที่เพิ่มขึ้นเป็น 1.2 เท่า เมื่อเทียบกับสาหร่าย PD



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์ *D. salina* KU11 ที่เก็บหลังจากการถ่ายเชื้อในครั้งแรกในอาหารเหลว Modified Ramaraj Medium (PD) และสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่ผ่านการถ่ายเชื้อ 30 ครั้ง (ED)

ผลการทดลองนี้เป็นไปในทางที่ดี แต่เนื่องมาจากข้อจำกัดของระยะเวลาการทดลองทำให้ถ่ายเชื้อสาหร่าย *D. salina* KU11 ได้เพียง 30 ครั้ง เมื่อเทียบกับข้อมูลในงานวิจัยของ Perrineau และคณะ (2014) ถือว่าเป็นจำนวนครั้งของการถ่ายเชื้อที่น้อยเกินไป ซึ่งอาจจะยังไม่ทำให้เห็นผลการเปลี่ยนแปลงระหว่างสาหร่ายกลุ่มที่ผ่านวิวัฒนาการเมื่อเทียบกับสาหร่ายต้นแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งในงานวิจัยของ Perrineau และคณะ (2014) ซึ่งทราบว่าหลังจากการถ่ายเชื้อสาหร่าย *C. reinhardtii* ทั้งสิ้น 283 ครั้ง สาหร่าย EL มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น 35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับสาหร่าย PL

4.4 การเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของสาหร่าย PD และ ED

การทดลองนี้ทำเพื่อสังเกตว่าขนาดเซลล์ของสาหร่าย PD และ ED มีการเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ สาหร่าย PD และ ED ที่ได้จากการถ่ายเชื้อในผลการทดลองที่ 4.2 นำมาเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของสาหร่ายทั้งสองกลุ่มโดยทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกัน ผู้วิจัยจึงทำการวัดขนาดเซลล์ของสาหร่าย 2 กลุ่มทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าขนาดเซลล์ของสาหร่ายกลุ่ม ED และ PD ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในสาหร่าย ED ทั้งเรื่องการยืดออกของระยะ log phase และการสะสมเซลล์ที่มากขึ้นในช่วงระยะ stationary phase มาจากการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงหรือการปรับตัวของสาหร่ายจากการถ่ายเชื้อในระยะหนึ่งซึ่งไม่ได้สัมพันธ์กับขนาดของเซลล์

รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดเซลล์ในเวลา 7 วันของสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่นำมาวัดขนาดหลังจากการถ่ายเชื้อในครั้งแรก (PD) และสาหร่ายที่ผ่านการถ่ายเชื้อ 30 ครั้ง (ED)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพในการปรับตัวของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ด้วยวิธีการคัดเลือกโดยธรรมชาติตามวิธีของ Perrineau และคณะ (2014) พบว่าสาหร่าย *D. salina* KU11 หลังจากถ่ายเชื้อ 30 ครั้ง (ED) มีระยะการเจริญเติบโตช่วง log phase ยาวขึ้น 1 วันจาก 3 วันเป็น 4 วัน และมีจำนวนเซลล์สะสมในช่วง stationary phase คงที่เท่ากับ $1,074 \times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นจากสาหร่าย *D. salina* KU11 (PD) เป็นจำนวน 1.2 เท่า แต่เมื่อทำการวัดขนาดเซลล์ของสาหร่าย *D. salina* KU11 (ED) พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับสาหร่าย *D. salina* KU11 (PD)

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) การถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่องของสาหร่าย *D. salina* KU11 ต้องคำนึงถึงปัจจัยการเจริญเติบโตเป็นอย่างมากไม่ว่าจะเป็น แสง อุณหภูมิ ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าและอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยควบคุมให้ปัจจัยเหล่านี้คงที่อยู่เสมอ เนื่องจากส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์

2) อาหารเหลว Modified Ramaraj Medium ที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* KU11 ควรเตรียมอาหารให้สดใหม่อยู่เสมอ ไม่ควรใช้อาหารที่เตรียมไว้นานแล้ว เพื่อให้สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3) เมื่อเตรียมอาหารเหลว Modified Ramaraj Medium ครั้งใหม่ควรทดสอบประสิทธิภาพของอาหารโดยนำไปใช้ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* KU11 ก่อนที่จะนำไปใช้งานครั้งต่อไป

4) สามารถนำไปต่อยอดโดยอาจจะทำการถ่ายเชื้อในจำนวนครั้งที่มากขึ้น เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กมลวรรณ ศรีปลั่ง, สุรางค์รัตน์ พันแสง และพวงผกา แก้วกรม. 2554. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแหนแดงในท้องถิ่นและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าว**. เพชรบูรณ์ : มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.

ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม. ม.ป.ป. **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย**. [Online]. Available : http://www.fishtech.mju.ac.th/fishnew1/OSS/files/TmBcVkLThu30003.pdf.

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.2559. **แนวทางการใช้ประโยชน์จากสาหร่าย**. [Online].Available :http://www.fishtech.mju.ac.th/e- learning/FA422/PDF/chapter5.pdf.

โฆษิต ศรีภูธร. 2540. **ศึกษาการเจริญเติบโต และการสะสมเบตาคาโรทีนของ *Dunaliella salina* 1197 โดยเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอนในบ่อกลางแจ้ง**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิรารัชกิตนะ. ม.ป.ป. **คู่มือการสอนวิชาชีววิทยา**. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐานและคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นันทวัน นันทวนิชและศศิวิมล แสวงผล. 2552. **150 ปี ชาร์ลส์ดาร์วิน วิวัฒนาการของสัตว์และพืช**. [Online]. Available :http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/150charles-darwin/intro.html.

นุชนาถ แช่มช้อย. 2557. “สาหร่ายขนาดเล็ก : การเพาะเลี้ยงและการนำมาใช้ประโยชน์.” *วารสารมฉก.วิชาการ*. 17(34) : 169-190.

นิรันดร์ จันทวงศ์. 2554. **การพัฒนาสาหร่ายดูนาลิเอลล่าในการผลิตเบต้าแคโรทีนและส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากพื้นที่ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ**. กรุงเทพฯ: การวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

นิศาชล แสนละมุน. 2540. “การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* ในน้ำเกลือสินเธาว์เพื่อผลิตเบต้าแคโรทีน.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย.

ยุวดี จอมพิทักษ์. ม.ป.ป. **เบต้าแคโรทีน**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์น้ำฝน.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. **สาหร่ายวิทยา**. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.ยศวดี

สวัสดิรักษา. 2547. “การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Botrycoccus braunii* ที่มีไฮโดรคาร์บอนสูงในน้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล.”วิทยานิพนธ์ วท.ม.เทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี. 2548. **การนับแพลงก์ตอนด้วย Hemacytometer**. [Online]. Available :http://www.fisheries.go.th/cf-chan/plankton/hema/hema.htm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรวิศ เผ่าทองศุข. 2543. **ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักผู้ประสานงานชุดโครงการ"อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ"สกว.

อัจฉรา นิยมเดชาและมงคล คงเสน. 2556. "เมทาบอลิซึมและคุณประโยชน์ของแคโรทีนอยด์ในการเพิ่มความเข้มสีไข่แดง." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์.

Abu-Rezq, S.T., Al-Hooti, S. & Jacob, A.D. 2010. "Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*."*Journal of Algal Biomass Utilization*. 1(2) : 12-19.

Amotz, A.B., Polle, J.E.W. & Rao, D.V.S.2009. **The Alga *Dunaliella***. NewHampshire : Science Publishers.

Bell, G. 2012. "Experimental evolution of heterotrophy in a green alga."*Evolution*. 67: 468–476.

Boontaveeyuwat, N. 1999. "Production, Storage Stability and Safety Test of Beta-carotene Products from *Dunaliella salina*Teodoresco DS 1197." Thesis of Doctoral Degree, Kasetsart University.

Borowitzka, M.A. & Siva, C.J. 2007."The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species."*JApplPhycol*.19 : 567-590.

Dittami, S.M., Gravot, A., Goulitquer, S., Rousvoal, S., Peters, A.F., Bouchereau, A., Boyen, C. &Tonon, T. 2012. "Towards deciphering dynamic changes and evolutionary mechanisms involved in the adaptation to low salinities in Ectocarpus (brown algae)."*Plant J*. 71 : 366–377.

Elena, S.F. &Lenski, R.E. 2003. "Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation." *Nat Rev Genet*. 4 (11):457–469

Giordano, M. 2001. "Interactions between C and N metabolism in *Dunaliella salina* cells cultured at elevated $CO_2$and high N concentrations." *Journal ofPlant Physiology*.158 : 577–581.

Hejazi, A.M. & Wijffels, H.R. 2003."Effect of light intensity on B-carotene production and extraction by *Dunaliella salina* in two-phasebioreactors. "*Biomolecular Engineering*.20 : 171-175.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Imamoglu, E. Demirel, Z. & Dalay, C.M. 2014. "Evaluation of culture conditions of locally isolated *Dunaliella salina* strain EgeMacc-024." *Biochemical Engineering Journal*.92 : 22–27.

Microbe Wiki. 2014. ***Dunaliella acidophila***. [Online].Available : https://microbewiki.kenyon.edu.

Mishra, S., Patidar, S.K., Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K. & Ghosh, A. 2015. "Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus sp*. CCNM 1077." *Bioresource Technology*.189 : 341–348.

Perrineau, M. M., Gross, J., Zelzion, E., Price, D.C., Levitan, O., Boyd, J. & Bhattacharya, D. 2014. "Using natural selection to explore the adaptive potential of *Chlamydomonas reinhardtii."OPEN ACCESS Freely available online*. 9(3) : 1-9.

Pisal, S.D. and Lele, S.S. 2005."Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina."Indian Journal of Biotechnology*.4 : 476-483.

Sathasivam, R. & Juntawong, N. 2013."Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains."*INT J CURR SCI*. 5 : 67-73.

Sohi, H.M.S. &Eghdami, A. 2014."Biodiesel production using marine microalgae *Dunalialla salina."Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 4(2) : 177-182.

Takouridis, S.J., Tribe, D.E., Gras,S.L. &Martin.G.J. 2015. "The selective breeding of the freshwater microalga *Chlamydomonas reinhardtii* for growth in salinity." *BioresourceTechnology*.184 : 18–22.

Tran, D., Vo, T., Portilla, S., Louime, C., Doan, N., Mai, T., Tran, D. & Ho, T. 2013. "Phylogenetic study of some strains of *Dunaliella*." *American Journal of Environmental Science*. 9(4) :317-321.

Yu, S., Zhao, Q., Shi, J. & Miao, X. 2013. "Enhancement of lipid production in low-starch Mutants *Chlamydomonas reinhardtii* by adaptive laboratory evolution." *Bioresource Technology*. 147 :499–507.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

ก-1. อาหารสูตร Modified Ramaraj Medium – สูตรอาหารเหลว (SathasivamและJuntawong, 2013)

A. Micronutrient

บอริกแอซิด (H_3BO_3)	9.27507	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_24H_2O$)	1.9790	กรัมต่อลิตร
ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	0.109024	กรัมต่อลิตร
คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ ($CuCl_2.2H_2O$)	0.051144	กรัมต่อลิตร
โซเดียมโมลิบเดต (Na_2MoO_4)	0.48	กรัมต่อลิตร
โซเดียมเมทาวานาเดต($NaVO_3$)	0.24386	กรัมต่อลิตร
โคบอลต์ (II) คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	0.047586	กรัมต่อลิตร

B. Concentrated Mix

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	2.0	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)	5.06	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	12.323	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	0.441	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออโทฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.14	กรัมต่อลิตร
ไอรอน (III) คลอไรด์เฮกซาไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$)	0.0054	กรัมต่อลิตร

*ไอรอน (III) คลอไรด์เฮกซาไฮเดรตละลายอยู่ใน 0.5โมล EDTA (พีเอช 7.5) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

C. Modified Ramaraj Medium

(โพแทสเซียมคลอไรด์~2.5 มิลลิโมล, โพแทสเซียมไนเตรต 5 มิลลิโมล, แมกนีเซียมซัลเฟต 5 มิลลิโมล, แคลเซียมคลอไรด์ 0.3 มิลลิโมล, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออโทฟอสเฟต 0.1 มิลลิโมล, ไอรอน (III) คลอไรด์ 2 ไมโครมิลลิโมล ต่อสารละลาย 1 ลิตร)

Micronutrient(A)	1	มิลลิลิตรต่อลิตร
Concentrated mix (B)	100	มิลลิลิตรต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	ตามความจำเป็นเพื่อให้ได้ความเค็มที่ต้องการ	
โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	50	มิลลิลิตรต่อลิตร

* หลังจาก autoclave ทำให้อาหารเย็นลงหลังจากนั้นจึงเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก-2. อาหารสูตร Modified Ramaraj Medium – สูตรอาหารแข็ง

อาหารเหลว Modified Ramaraj Medium	100 มิลลิลิตร
วุ้น (Agar)	1.5 กรัม

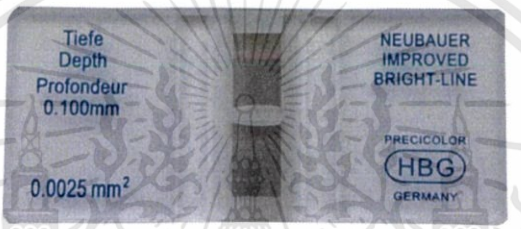
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการทดลอง

ข-1. การนับจำนวนเซลล์ (cell counting: Hemocytometer) (ดัดแปลงจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี,2548)

สไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์ 1 อัน จะมีตารางสี่เหลี่ยมเล็กๆ 2 ตารางอยู่พื้นที่ตรงกลางสไลด์โดยแต่ละตารางมีพื้นที่เท่ากับ 1 ตารางมิลลิเมตร จะมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร บริเวณรอบตารางสี่เหลี่ยมจะล้อมรอบด้วยร่องลึกขนาดใหญ่ให้น้ำขังนิยมใช้สำหรับนับสาหร่ายขนาดเล็ก (0.5 – 10 ไมครอน) สไลด์นับเซลล์แบบนี้จุน้ำได้ปริมาตรที่แน่นอน สามารถใช้นับสาหร่ายที่ยังมีชีวิตและตายแล้ว



รูปที่ ข-1.1 แสดงลักษณะของฮีมาไซโตมิเตอร์
(ที่มา : https://www.gizmosupplyco.com/products/gizmo-supply-professional-neubauer-hemacytometer-blood-count-with-double-counting-chamber)

วิธีการนับจำนวนเซลล์

1. วางกระจกปิดสไลด์บนฮีมาไซโตมิเตอร์ จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างสาหร่ายมา 9-10 ไมโครลิตร ค่อยๆหยดน้ำตัวอย่างลงไปซึ่งน้ำจะไหลเข้าใต้กระจกปิดสไลด์เองจนเต็มพื้นที่ตาราง (หยดทั้งสองตาราง)

2. นับจำนวนสาหร่ายในตารางภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (รูปที่ ข-1.2) จะทำการนับ 4 ช่อง (รูปที่ ข-1.3) ซึ่งช่อง A B C D มีความกว้างและยาวเท่ากับ 1 มิลลิเมตร ดังนั้น ปริมาตรน้ำของช่อง A B C D ช่องใดช่องหนึ่ง = ความกว้าง × ความยาว × ความลึก

= 1 มิลลิเมตร × 1 มิลลิเมตร × 0.1 มิลลิเมตร

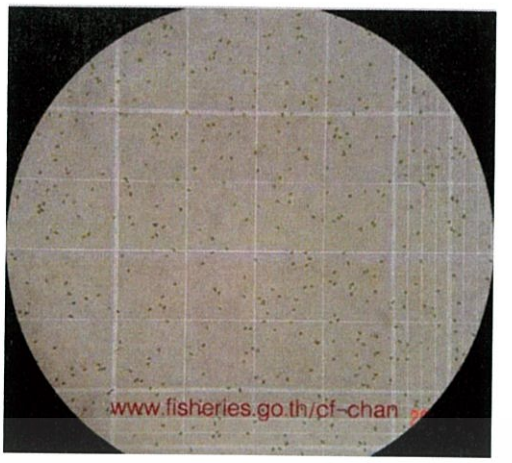
= 0.0001 ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ 0.0001 มิลลิลิตร

= 10^{-4} มิลลิลิตร

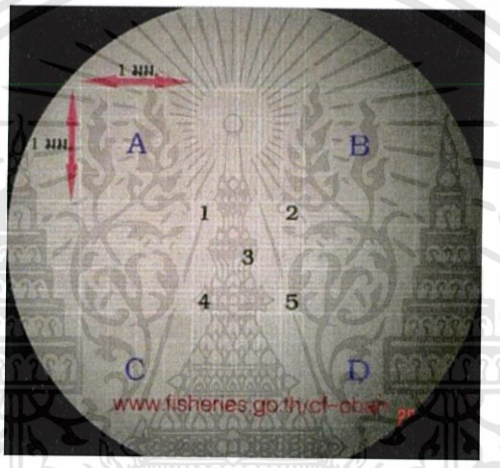
ดังนั้น จะได้ความหนาแน่นของเซลล์ = $\frac{A+B+C+D}{4} \times 10^{4}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3. บันทึกผลการทดลอง และนำค่าจำนวนเซลล์ที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างวันที่ทำการเพาะเลี้ยงกับค่าจำนวนเซลล์ เพื่อวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-1.2 ภาพเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ ข-1.3 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า
(ที่มา : http://www.fisheries.go.th/cf-chan/plankton/hema/hema.htm)

ข-2. การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย (Specific growth rate, μ) (ยศวดี, 2547)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเป็นอัตราที่เซลล์แบ่งตัวมีค่าเท่ากับจำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้นหารด้วยเวลา ดังสมการ

$$\mu = \frac{\ln(N/N0)}{t}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยที่ μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)

N = ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายวันสุดท้าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

N_o = ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายวันแรก (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

T = เวลา (วัน)

ข-3. การวัดขนาดเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ดัดแปลงจากจิรารัช, ม.ป.ป.)

การวัดขนาดเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์จะใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่าไมโครมิเตอร์ (micrometer) โดยไมโครมิเตอร์สำหรับใช้วัดขนาดเซลล์ มี 2 ชนิด ได้แก่ สเตจไมโครมิเตอร์ (stage micrometer) และออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์ (ocular micrometer)

ออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์มีลักษณะเป็นแผ่นแก้วรูปวงกลมด้านบนจะมีสเกล (scale) ที่ไม่ระบุขนาดอยู่ 100 ช่องส่วนสเตจไมโครมิเตอร์มีลักษณะเป็นสไลด์แก้วด้านบนจะมีสเกลที่ระบุขนาดไว้ 100 ช่อง (รูปที่ ข-3.1)

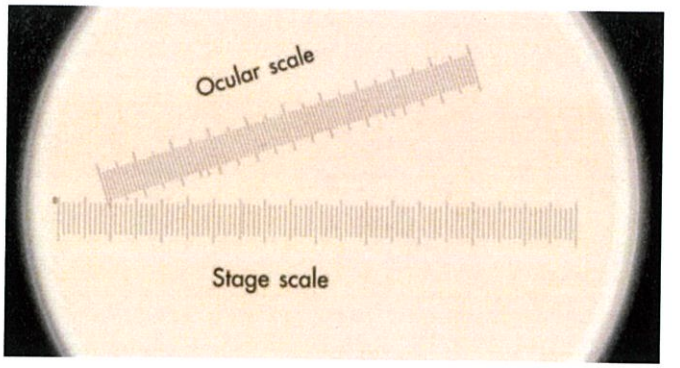
รูปที่ ข-3.1 ไมโครมิเตอร์สำหรับใช้วัดขนาดเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ประกอบด้วยสเตจไมโครมิเตอร์ (ด้านซ้าย) และออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์(ด้านขวา)
(ที่มา : จิรารัช, ม.ป.ป.)

เริ่มต้นใช้งานโดยการหาขนาดของออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์

1. ใส่ออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์ลงในกระบอกของออกคิวลาร์ เลนส์ (ocular lens) และวางสเตจไมโครมิเตอร์ไว้บนแท่นวางสไลด์ โดยเลื่อนให้สเกลของสเตจไมโครมิเตอร์อยู่ตรงกับช่องว่างที่แสงส่องผ่าน

2. ที่กำลังขยาย 100เท่าของเลนส์ใกล้วัตถุ(objective lens)หมุนปุ่มปรับภาพเพื่อปรับโฟกัสภาพจนชัด จะเห็นภาพใต้กล้องเป็นสเกลของไมโครมิเตอร์ทั้งสองชนิด (รูปที่ ข-3.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-3.2 สเกลของออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์และสเตจไมโครมิเตอร์หลังจากใส่ไมโครมิเตอร์ทั้งสองชนิดไว้ในตำแหน่งที่ถูกต้องในกล้องจุลทรรศน์
(ที่มา : จิรารัช, ม.ป.ป.)

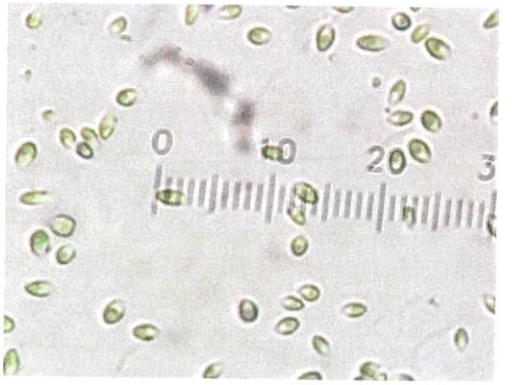
3. หมุนกระบอกของออกคิวลาร์ เลนส์จนกระทั่งสเกลทั้งสองวางตัวขนานกันในแนวนอน แล้วเลื่อนแท่นวางสไลด์ให้ตำแหน่งเริ่มต้นที่ศูนย์ตรงกันค่อยๆเลื่อนแท่นวางสไลด์ให้เส้นสเกลทั้งสองซ้อนตรงกันพอดี เพื่อนับจุดที่ซ้อนกันของ ocular scale และ stage scale

รูปที่ ข-3.3ภาพแสดง ocular scale มี 27 ช่อง ในขณะที่ stage scale มี 20 ช่อง
(ที่มา : จิรารัช, ม.ป.ป.)

4. จากรูปที่ ข-3.3 พบว่าตำแหน่งที่ตรงกัน ocular scale มี 27 ช่อง ในขณะที่ stage scale มี 20 ช่องนำตัวเลขที่ได้มาคำนวณโดยวิธีเทียบบัญญัติไตรยางศ์

โดย 27 ช่องของ ocular scale เท่ากับ 20 ช่องของ stage scale
ซึ่ง stage scale มีขนาดช่องละ 0.01 มิลลิเมตร
เพราะฉะนั้น 27 ช่องของ ocular scale $= 20 \times 0.01 = 0.2$ มิลลิเมตร
ดังนั้น 1 ช่องของ ocular scale $= \frac{0.2 \times 1}{27} = 0.0074$ มิลลิเมตร
แปลงเป็นหน่วยไมโครเมตร โดยนำไปคูณด้วย 1,000 $= 7.4$ ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-3.4 ขนาดเซลล์สาหร่าย *D.salina* KU11 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. จากนั้นทำการวัดขนาดเซลล์สาหร่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์รูปที่ ข-3.4 ขนาดเซลล์ของสาหร่าย *D. salina* KU11 เท่ากับ 3 ช่อง ocular scale

คำนวณได้เท่ากับ 3 x 7.4 = 22.2 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

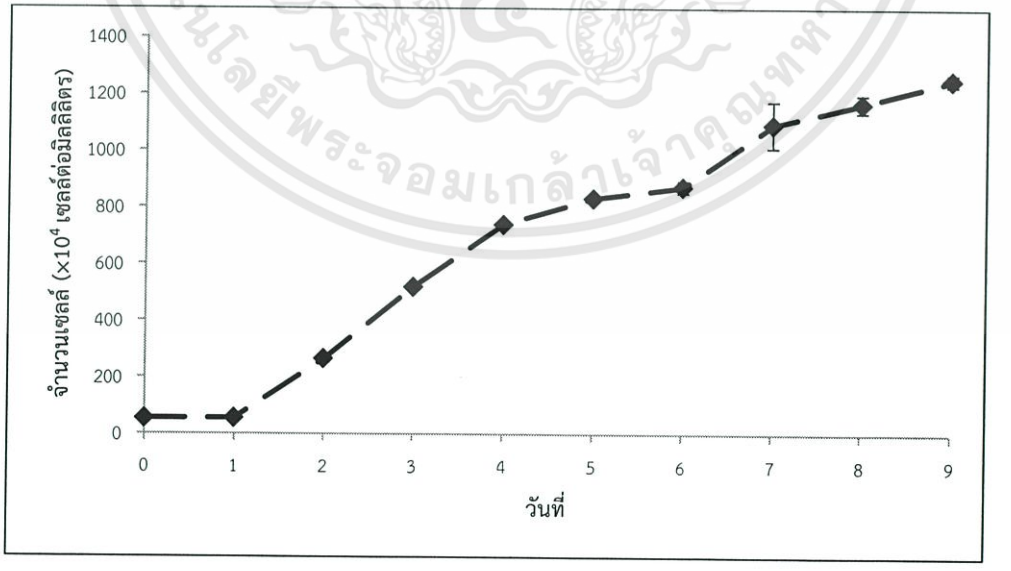
ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผลการทดลอง

ค-1. การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11

ตาราง ค-1.1 แสดงจำนวนเซลล์ของสาหร่าย *D. salina* KU11

วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
0	50.5000	53.7500
1	55.1650	54.7100
2	255.3750	264.6250
3	457.8750	518.6250
4	716.2520	739.2500
5	823.5000	831.4990
6	848.6240	871.6250
7	1,018.4990	1,091.7490
8	1,146.0020	1,166.5020
9	1,189.4990	1,250.4750



รูปที่ ค-1.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11 หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Modified Ramaraj Medium เป็นเวลา 9 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค-2. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย PD (Progenitor *Dunaliella*)และสาหร่าย ED (Evolved *Dunaliella*)

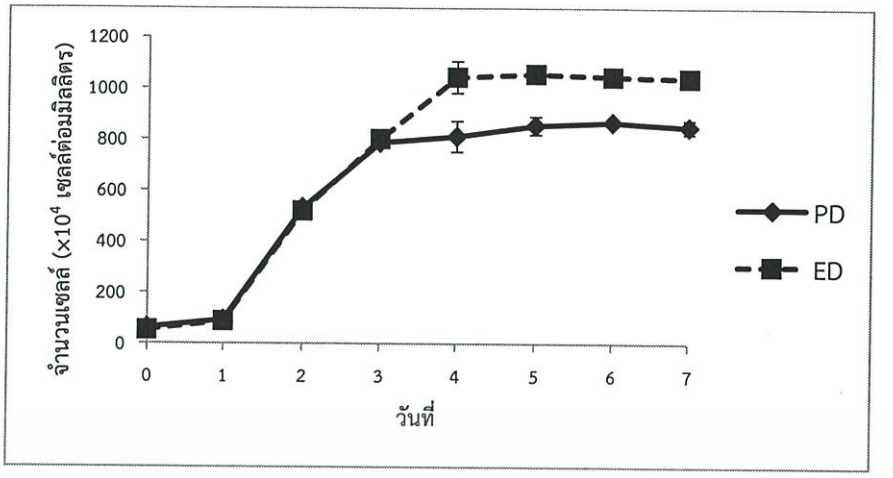
ตาราง ค-2.1 แสดงจำนวนเซลล์ของ PD (Progenitor *Dunaliella*)

วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
0	63.6667	62.5000
1	98.2500	93.3333
2	530.8333	531.0000
3	786.6667	785.5833
4	810.8333	811.1667
5	865.0000	853.9167
6	911.2167	866.2500
7	837.9167	848.3333

ตาราง ค-2.2 แสดงจำนวนเซลล์ของ ED (Evolved *Dunaliella*)

วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
0	48.6667	52.75
1	91.3333	87.8333
2	502.5000	519.5833
3	821.6667	799.9167
4	1,074.1670	1,042.5830
5	1,062.3330	1,055.1670
6	1,047.2500	1,044.5000
7	1,050.4170	1,039.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-2.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์ *D. salina* KU11 ที่เก็บหลังจากการถ่ายเชื้อในครั้งแรกในอาหารเหลว Modified Ramaraj Medium (PD) และสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่ผ่านการถ่ายเชื้อ 30 ครั้ง (ED)

ค-3. การเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของสาหร่าย PD และ ED

ตาราง ค-3.1 แสดงขนาดเซลล์ของ PD (Progenitor *Dunaliella*)

วันที่	ขนาดเซลล์ (ไมโครเมตร)	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
1	9.7100	9.9600
2	10.2515	9.7465
3	9.7920	9.6900
4	9.4673	9.6129
5	9.6000	9.6500
6	10.0584	9.6520
7	9.8430	10.0470

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-3.2 แสดงขนาดเซลล์ของ ED (Evolved *Dunaliella*)

วันที่	ขนาดเซลล์ (ไมโครเมตร)	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
1	10.0000	10.3000
2	9.8475	9.8475
3	9.6390	9.5880
4	9.7586	9.7100
5	9.7000	9.7500
6	10.0076	9.9060
7	10.1490	10.0980

รูปที่ ค-3.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของสาหร่าย PD และ ED ในเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การคำนวณค่าสถิติ

การคำนวณทางสถิติแบบแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ในบล็อก (Randomized Complete Block Design: RCBD)

ง-1. การเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella salina*

วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
0	50.5000	53.7500
1	55.1650	54.7100
2	255.3750	264.6250
3	457.8750	518.6250
4	716.2520	739.2500
5	823.5000	831.4990
6	848.6240	871.6250
7	1,018.4990	1,091.7490
8	1,146.0020	1,166.5020
9	1,189.4990	1,250.4750
10	1,510.8750	1,515.3750

วิธีทำ เพื่อสะดวกในการคำนวณ จะนำค่าสังเกตทุกค่าหารด้วย 200

วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.2525	0.2688	0.5213
1	0.2758	0.2736	0.5494
2	1.2769	1.3231	2.6000
3	2.2894	2.5931	4.8825
4	3.5813	3.6963	7.2776
5	4.1175	4.1575	8.2750
6	4.2431	4.3581	8.6012
7	5.0925	5.4587	10.5512

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8	5.7300	5.8325	11.5625
9	5.9475	6.2524	12.1999
10	7.5544	7.5769	15.1313
รวม	**40.3605**	**41.7910**	**82.1515**
เฉลี่ย	**3.6691**	**3.7992**	

จากข้อมูลมีจำนวนการทดลอง (treatment) a=2, จำนวนวัน (block) b=11, N=ab=22

$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y^2_{ij} - Y^2_{..}/ab$

$= [(0.2525)^2 + (0.2758)^2 + ... + (7.5769)^2] - (82.1515)^2/22 = 424.8829 - 306.7668$

$= 118.1161$

$SS_{Tr} = \frac{1}{b}\sum_{i=1}^{a} Y^2_{i} - Y^2_{..}/ab$

$= \frac{1}{11}[(40.3605)^2 + (41.7910)^2] - (82.1515)^2/22 = 306.8598 - 306.7668$

$= 0.0930$

$SS_{Bl} = \frac{1}{a}\sum_{j=1}^{b} Y^2_{j} - Y^2_{..}/ab$

$= \frac{1}{2}[(0.5213)^2 + (0.5494)^2 + ... + (15.1313)^2] - (82.1515)^2/22$

$= 424.2898 - 306.7668 = 117.5230$

$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{Bl} = 118.1161 - 0.0930 - 117.5230$

$= 0.5001$

คำนวณค่าองศาอิสระ

$df_T = ab - 1 = 2\times11-1 = 21$

$df_{Tr} = a - 1 = 2-1 = 1$

$SS_{Bl} = b - 1 = 11 - 1 = 10$

ตาราง ANOVA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Source	df	SS	MS	F_{cal}	$F_{0.05}$
Treatment	1	0.0930	0.0930	1.8600	4.9600
Block	10	117.5230	11.7523	235.0460	
Error	10	0.5001	0.0500		
Total	**21**	**118.1161**			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของจำนวนเซลล์สาหร่ายในแต่ละการทดลอง

H_0 = $\mu_1 = \mu_2$

H_a = $\mu_i \neq \mu_j$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;1,10}$ = 4.9600

จากตาราง ANOVA ได้ค่า F_{cal} = 1.8600

เพราะว่าค่า $F_{cal} < F_{0.05;1,10}$ ดังนั้น ไม่สามารถปฏิเสธ H_0 แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ง-2. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate) ของสาหร่ายในแต่ละการถ่ายเชื้อ

ครั้งที่ถ่ายเชื้อ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
1	1.1026	1.0297
2	1.7986	1.9375
3	1.9035	1.8514
4	1.6343	1.6691
5	2.6614	2.6235
6	1.8380	1.8364
7	1.8985	1.8440
8	1.8605	1.9106
9	1.6658	1.6559
10	1.9480	1.9952

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11	1.5330	1.5028
12	2.0575	2.0520
13	1.7579	1.7324
14	2.1248	2.1178
15	1.8791	1.9100
16	1.8375	1.8097
17	1.6204	1.6164
18	1.7376	1.7898
19	1.5416	1.4501
20	2.2593	2.3063
21	1.7657	1.7420
22	1.7453	1.7580
23	1.9655	1.9732
24	1.9641	1.9973
25	1.5891	1.5804
26	1.9225	1.8902
27	1.7623	1.8157
28	1.9956	1.9605
29	1.7334	1.7443
30	1.8387	1.8353

วิธีทำ

ครั้งที่ถ่ายเชื้อ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม ($Y_{.j}$)
1	1.1026	1.0297	2.1323
2	1.7986	1.9375	3.7361
3	1.9035	1.8514	3.7548
4	1.6343	1.6691	3.3035
5	2.6614	2.6235	5.2849
6	1.8380	1.8364	3.6744
7	1.8985	1.8440	3.7425

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8	1.8605	1.9106	3.7710
9	1.6658	1.6559	3.3216
10	1.9480	1.9952	3.9432
11	1.5330	1.5028	3.0357
12	2.0575	2.0520	4.1095
13	1.7579	1.7324	3.4903
14	2.1248	2.1178	4.2421
15	1.8791	1.9100	3.7891
16	1.8375	1.8097	3.6472
17	1.6204	1.6164	3.2368
18	1.7376	1.7898	3.5274
19	1.5416	1.4501	2.9917
20	2.2593	2.3063	4.5656
21	1.7657	1.7420	3.5077
22	1.7453	1.7580	3.5033
23	1.9655	1.9732	3.9387
24	1.9641	1.9973	3.9614
25	1.5891	1.5804	3.1694
26	1.9225	1.8902	3.8128
27	1.7623	1.8157	3.5781
28	1.9956	1.9605	3.9562
29	1.7334	1.7443	3.4777
30	1.8387	1.8353	3.6740
รวม	**54.9419**	**54.9376**	**109.8795**
เฉลี่ย	**1.8314**	**1.8313**	

จากข้อมูลมีจำนวนการทดลอง (treatment) a=2, จำนวนครั้งที่ถ่ายเชื้อ (block) b=30, N=ab=60

$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y^2_{ij} - Y^2_{..}/ab$

$= [(1.1026)^2 + (1.7986)^2 + ... + (1.8353)^2] - (109.8795)^2/60 = 205.4451 - 201.2251$

$= 4.2200$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$SS_{Tr} = \frac{1}{b}\sum_{i=1}^{a} Y^2_i - Y^2../ab$

$= \frac{1}{30}[(54.9419)^2 + (54.9376)^2] - (109.8795)^2/60 = 201.2251 - 201.2251$

$= 0$

$SS_{Bl} = \frac{1}{a}\sum_{j=1}^{b} Y^2_j - Y^2../ab$

$= \frac{1}{2}[(2.1323)^2 + (3.7361)^2 + ... + (3.6740)^2] - (109.8795)^2/60$

$= 201.4143 - 201.2251 = 0.1892$

$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{Bl} = 4.2200 - 0 - 0.1892$

$= 4.0308$

คำนวณค่าองศาอิสระ

$df_T = ab - 1 = 2 \times 30 - 1 = 59$

$df_{Tr} = a - 1 = 2 - 1 = 1$

$SS_{Bl} = b - 1 = 30 - 1 = 29$

ตาราง ANOVA

Source	df	SS	MS	F_{cal}	$F_{0.05}$
Treatment	1	0	0	0	4.1800
Block	29	0.1892	0.0065	0.0468	
Error	29	4.0308	0.1390		
Total	59	4.2200			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของจำนวนเซลล์สาหร่ายในแต่ละการทดลอง

$H_0 = \mu_1 = \mu_2$

$H_a = \mu_i \neq \mu_j$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;1,29} = 4.1800$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตาราง ANOVA ได้ค่า $F_{cal} = 0$

เพราะว่าค่า $F_{cal} < F_{0.05;1,29}$ ดังนั้น ไม่สามารถปฏิเสธH_0 แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ง-3. การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสาหร่ายPD (Progenitor *Dunaliella*) และสาหร่าย ED (Evolved *Dunaliella*)

ง-3.1 การเจริญเติบโตของเซลล์ PD (Progenitor *Dunaliella*)

วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
0	63.6667	62.5000
1	98.2500	93.3333
2	530.8333	531.0000
3	786.6667	785.5833
4	810.8333	811.1667
5	865.0000	853.9167
6	911.2167	866.2500
7	837.9167	848.3333

วิธีทำ เพื่อสะดวกในการคำนวณ จะนำค่าสังเกตทุกค่าหารด้วย 200

วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.3183	0.3125	0.6308
1	0.4913	0.4667	0.9579
2	2.6542	2.6550	5.3092
3	3.9333	3.9279	7.8613
4	4.0542	4.0558	8.1100
5	4.3250	4.2696	8.5946
6	4.5561	4.3312	8.8873
7	4.1896	4.2417	8.4313

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวม	24.5219	24.2604	48.7823
เฉลี่ย	3.0652	3.0326	

จากข้อมูลมีจำนวนการทดลอง (treatment) a=2, จำนวนวัน (block) b=8, N=ab=16

$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y^2_{ij} - Y^2../ab$

$= [(0.3183)^2 + (0.4913)^2 + ... + (4.2417)^2] - (48.7823)^2/16 = 190.5344 - 148.7322$

$= 41.8022$

$SS_{Tr} = \frac{1}{b}\sum_{i=1}^{a} Y^2_{i} - Y^2../ab$

$= \frac{1}{8}[(24.5219)^2 + (24.2604)^2] - (48.7823)^2/16 = 148.7363 - 148.7322$

$= 0.0041$

$SS_{Bl} = \frac{1}{a}\sum_{j=1}^{b} Y^2_{j} - Y^2../ab$

$= \frac{1}{2}[(0.6308)^2 + (0.5979)^2 + ... + (8.4313)^2] - (48.7823)^2/16$

$= 190.5059 - 148.7322 = 41.7737$

$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{Bl} = 41.8022 - 0.0041 - 41.7737$

$= 0.0244$

คำนวณค่าองศาอิสระ

$df_T = ab - 1 = 2\times8-1 = 15$

$df_{Tr} = a - 1 = 2 - 1 = 1$

$SS_{Bl} = b - 1 = 8 - 1 = 7$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ANOVA

Source	df	SS	MS	F_{cal}	$F_{0.05}$
Treatment	1	0.0041	0.0041	1.1714	5.5900
Block	7	41.7737	5.9677	1705.0571	
Error	7	0.0244	0.0035		
Total	15	41.8022			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของจำนวนเซลล์สาหร่ายในแต่ละการทดลอง

H_0 = $\mu_1 = \mu_2$

H_a = $\mu_i \neq \mu_j$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;1,7}$ = 5.5900

จากตาราง ANOVA ได้ค่า F_{cal} = 1.1714

เพราะว่าค่า $F_{cal} < F_{0.05;1,8}$ ดังนั้น ไม่สามารถปฏิเสธH_0 แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ง-3.2 การเจริญเติบโตของเซลล์ ED (Evolved *Dunaliella*)

วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
0	48.6667	52.75
1	91.3333	87.8333
2	502.5000	519.5833
3	821.6667	799.9167
4	1,074.1670	1,042.5830
5	1,062.3330	1,055.1670
6	1,047.2500	1,044.5000
7	1,050.4170	1,039.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีทำ เพื่อสะดวกในการคำนวณ จะนำค่าสังเกตทุกค่าหารด้วย 200

วันที่	จำนวนเซลล์ ($\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.2433	0.2638	0.5071
1	0.4567	0.4392	0.8958
2	2.5125	2.5979	5.1104
3	4.1083	3.9996	8.1079
4	5.3708	5.2129	10.5838
5	5.3117	5.2758	10.5875
6	5.2363	5.2225	10.4588
7	5.2521	5.1950	10.4471
รวม	**28.4917**	**28.2067**	**56.6983**
เฉลี่ย	**3.5615**	**3.5258**	

จากข้อมูลมีจำนวนการทดลอง (treatment) a=2, จำนวนวัน (block) b=8, N=ab=16

$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y^2_{ij} - Y^2_{..}/ab$

$= [(0.2433)^2 + (0.4567)^2 + \ldots + (5.1950)^2] - (56.6983)^2/16$

$= 267.8009 - 200.9186$

$= 66.8823$

$SS_{Tr} = \frac{1}{b}\sum_{i=1}^{a} Y^2_{i} - Y^2_{..}/ab$

$= \frac{1}{8}[(28.4917)^2 + (28.2067)^2] - (56.6983)^2/16$

$= 200.9244 - 200.9186$

$= 0.0058$

$SS_{Bl} = \frac{1}{a}\sum_{j=1}^{b} Y^2_{j} - Y^2_{..}/ab$

$= \frac{1}{2}[(0.5071)^2 + (0.8958)^2 + \ldots + (10.4471)^2] - (56.6983)^2/16$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$= 267.7761 - 200.9186$

$= 66.8575$

$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{Bl}$

$= 66.8823 - 0.0058 - 66.8575$

$= 0.0190$

คำนวณค่าองศาอิสระ

$df_T = ab - 1 = 2 \times 8 - 1 = 15$

$df_{Tr} = a - 1 = 2 - 1 = 1$

$SS_{Bl} = b - 1 = 8 - 1 = 7$

ตาราง ANOVA

Source	df	SS	MS	F_{cal}	$F_{0.05}$
Treatment	1	0.0058	0.0058	2.1481	5.5900
Block	7	66.8575	9.5511	3,537.4444	
Error	7	0.0190	0.0027		
Total	15	66.8823			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของจำนวนเซลล์สาหร่ายในแต่ละการทดลอง

$H_0 = \mu_1 = \mu_2$

$H_a = \mu_i \neq \mu_j$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;1,7} = 5.5900$

จากตาราง ANOVA ได้ค่า $F_{cal} = 2.1481$

เพราะว่าค่า $F_{cal} < F_{0.05;1,8}$ ดังนั้น ไม่สามารถปฏิเสธH_0 แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง-4. การเปรียบเทียบขนาดเซลล์ของสาหร่าย PDและ ED

ง-4.1 ขนาดเซลล์ของ PD (Progenitor *Dunaliella*)

วันที่	ขนาดเซลล์ (ไมโครเมตร)	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
1	9.7100	9.9600
2	10.2515	9.7465
3	9.7920	9.6900
4	9.4673	9.6129
5	9.6000	9.6500
6	10.0584	9.6520
7	9.8430	10.0470

วิธีทำ เพื่อสะดวกในการคำนวณ จะนำค่าสังเกตทุกค่าหารด้วย 10

วันที่	ขนาดเซลล์ (ไมโครเมตร)		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม ($Y_{.j}$)
1	0.9710	0.9960	1.9670
2	1.0252	0.9747	1.9998
3	0.9792	0.9690	1.9482
4	0.9467	0.9613	1.9080
5	0.9600	0.9650	1.9250
6	1.0058	0.9652	1.9710
7	0.9843	1.0047	1.9890
รวม	**6.8722**	**6.8358**	**13.7081**
เฉลี่ย	**0.9817**	**0.9764**	

จากข้อมูลมีจำนวนการทดลอง (treatment) a=2, จำนวนวัน (block) b=7, N=ab=14

$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y^2_{ij} - Y^2_{..}/ab$

$= [(0.9710)^2 + (1.0252)^2 + ... + (1.0047)^2] - (13.7081)^2/14 = 13.4283 - 13.4223$

$= 0.0060$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$SS_{Tr} = \frac{1}{b}\sum_{i=1}^{a} Y^2_{i} - Y^2../ab$

$= \frac{1}{7}[(6.8722)^2 + (6.8358)^2] - (13.7081)^2/14$

$= 13.4222 - 13.4223$

$= 0$

$SS_{Bl} = \frac{1}{a}\sum_{j=1}^{b} Y^2_{j} - Y^2../ab$

$= \frac{1}{2}[(1.9670)^2 + (1.9998)^2 + ... + (1.9890)^2] - (13.7081)^2/14$

$= 13.4256 - 13.4223 = 0.0033$

$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{Bl} = 0.0060 - 0 - 0.0033$

$= 0.0027$

คำนวณค่าองศาอิสระ

$df_T = ab - 1 = 2\times7\text{-}1 = 13$

$df_{Tr} = a - 1 = 2 - 1 = 1$

$SS_{Bl} = b - 1 = 7 - 1 = 6$

ตาราง ANOVA

Source	df	SS	MS	F_{cal}	$F_{0.05}$
Treatment	1	0	0	0	5.9900
Block	6	0.0033	0.0005	1.2500	
Error	6	0.0027	0.0004		
Total	13	0.0060			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของขนาดเซลล์สาหร่ายในแต่ละการทดลอง

$H_0 = \mu_1 = \mu_2$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

H_a = $\mu_i \neq \mu_j$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;1,7}$ = 5.9900

จากตาราง ANOVA ได้ค่า F_{cal} = 0

เพราะว่าค่า $F_{cal}<F_{0.05;1,8}$ ดังนั้น ไม่สามารถปฏิเสธH_0 แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ง-4.2 ขนาดเซลล์ของ ED (Evolved *Dunaliella*)

วันที่	ขนาดเซลล์ (ไมโครเมตร)	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
1	10.0000	10.3000
2	9.8475	9.8475
3	9.6390	9.5880
4	9.7586	9.7100
5	9.7000	9.7500
6	10.0076	9.9060
7	10.1490	10.0980

วิธีทำ เพื่อสะดวกในการคำนวณ จะนำค่าสังเกตทุกค่าหารด้วย 10

วันที่	ขนาดเซลล์ (ไมโครเมตร)		
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	รวม ($Y_{.j}$)
1	1.0000	1.0300	2.0300
2	0.9848	0.9848	1.9695
3	0.9639	0.9588	1.9227
4	0.9759	0.9710	1.9469
5	0.9700	0.9750	1.9450
6	1.0008	0.9906	1.9914
7	1.0149	1.0098	2.0247
รวม	**6.9102**	**6.9199**	**13.8301**
เฉลี่ย	**0.9872**	**0.9886**	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อมูลมีจำนวนการทดลอง (treatment) a=2, จำนวนวัน (block) b=7, N=ab=14

$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y^2_{ij} - Y^2_{..}/ab$

$= [(1.0000)^2 + (0.9848)^2 + ... + (1.0098)^2] - (13.8301)^2/14 = 13.6680 - 13.6623$

$= 0.0057$

$SS_{Tr} = \frac{1}{b}\sum_{i=1}^{a} Y^2_{i} - Y^2_{..}/ab$

$= \frac{1}{7}[(6.9102)^2 + (6.9199)^2] - (13.8301)^2/14 = 13.6623 - 13.6623$

$= 0$

$SS_{Bl} = \frac{1}{a}\sum_{j=1}^{b} Y^2_{j} - Y^2_{..}/ab$

$= \frac{1}{2}[(2.0300)^2 + (1.9695)^2 + ... + (2.0247)^2] - (13.8301)^2/14$

$= 13.6674 - 13.6623 = 0.0051$

$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{Bl} = 0.0057 - 0 - 0.0051$

$= 0.0006$

คำนวณค่าองศาอิสระ

$df_T = ab - 1 = 2\times7-1 = 13$

$df_{Tr} = a - 1 = 2 - 1 = 1$

$SS_{Bl} = b - 1 = 7 - 1 = 6$

ตาราง ANOVA

Source	df	SS	MS	F_{cal}	$F_{0.05}$
Treatment	1	0	0	0	5.9900
Block	6	0.0051	0.0001	1	
Error	6	0.0006	0.0001		
Total	13	0.0057			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของขนาดเซลล์สาหร่ายในแต่ละการทดลอง

H_0 = $\mu_1 = \mu_2$

H_a = $\mu_i \neq \mu_j$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;1,7}$ = 5.9900

จากตาราง ANOVA ได้ค่า F_{cal} = 0

เพราะว่าค่า $F_{cal} < F_{0.05;1,8}$ ดังนั้น ไม่สามารถปฏิเสธH_0 แสดงว่าการทดลองทั้ง 2 ครั้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้