การศึกษาผลกระทบของแสงและความเค็มต่อการเจริญเติบโต และชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11

Effect of Photoperiod and salinity on *Dunaliella salina* KU11 growth and biomass

ช่อผกา บุญเลิศ
ฑิตฐิตา จันทร์พยัพ

โครงงานพิเศษศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การศึกษาผลกระทบของแสงและความเค็มต่อการเจริญเติบโตและชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11

Effect of Photoperiod and salinity on *Dunaliella salina* KU11 growth and biomass

ช่อผกา บุญเลิศ
ฑิตฐิตา จันทร์พยัพ

โครงงานพิเศษศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

EFFECT OF PHOTOPERIOD AND SALINITY ON *DUNALIELLA SALINA* KU11 GROWTH AND BIOMASS

Chorpaka Bunlert
Dhittita Chanphayap

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(BIOTECHNOLOGY PROGRAM)
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาผลกระทบของแสงและความเค็มต่อการเจริญเติบโตและชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 EFFECT OF PHOTOPERIOD AND SALINITY ON *DUNALIELLA SALINA* KU11 GROWTH AND BIOMASS
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ช่อผกา บุญเลิศ รหัสนักศึกษา 57050677 นางสาว ฑิตฐิตา จันทร์พยัพ รหัสนักศึกษา 57050681
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาผลกระทบของแสงและความเค็มต่อการเจริญเติบโตและชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11

ชื่อนักศึกษา นางสาว ช่อผกา บุญเลิศ รหัสนักศึกษา 57050677

นางสาว ฑิตฐิตา จันทร์พยัพ รหัสนักศึกษา 57050681

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การศึกษาผลของแสงและความเค็มต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* สายพันธุ์ KU11 ในการทดลองนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร Modified Ramaraj Medium ซึ่งใช้ความเข้มข้นเกลือและแสงที่แตกต่างกัน โดยทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่างสาหร่ายที่เลี้ยงด้วย Nacl 1.5 โมลาร์ ที่สภาวะแสงสว่าง:มืด เท่ากับ 12:12, 16:8 และ 24:0 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า *D. salina* KU11 พบว่า ประชากรสาหร่ายภายใต้ระยะเวลาแสง 16: มืด 8 ชั่วโมง มีการเข้าสู่ระยะ log ในวันที่ 1 ซึ่งเร็วกว่าที่ สภาวะแสง 12: มืด12 ชั่วโมง และ แสง 24: มืด 0 ชั่วโมง ที่มีการเข้าสู่ระยะ log ในวันที่ 2 และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนประชากรสาหร่ายพบว่า ระยะเวลาแสง 16: มืด 8 ชั่วโมง มีจำนวนประชากรสะสม เมื่อเข้าสู่ระยะ Stationary สูงกว่าที่แสง12: มืด12 ชั่วโมง 1.55 เท่า และสูงกว่าแสง 24: มืด 0 ชั่วโมง 1.42 เท่า ตามลำดับ จากความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ ทั้ง 3 ความเข้มข้นที่เลี้ยงในสภาวะแสงต่างกัน สรุปผลการทดลองได้ว่า ความเข้มข้นของเกลือ 1 โมลาร์เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของประชากรสาหร่าย *Dunaliella salina* สายพันธุ์ KU11 โดยมีการสะสมของประชากรสาหร่ายเมื่อเข้าระยะ stationary สูงสุดในแต่ละสภาวะแสง การเปรียบเทียบชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 เพาะเลี้ยงภายใต้ระยะเวลาแสง สว่าง:มืด เท่ากับ 12:12 16:8 และ 24:0 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 1 โมลาร์ พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสง12: มืด 12 ชั่วโมง มีค่าชีวมวลน้อยที่สุด และสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสง16 : มืด 8 ชั่วโมงค่าชีวมวลมากที่สุด

คำสำคัญ : สาหร่ายดูนาลิเอลล่า,ชีวมวล,ระยะเวลาการให้แสง,ความเค็ม

Title	EFFECT OF PHOTOPERIOD AND SALINITY ON *DUNALIELLA SALINA* KU11 GROWTH AND BIOMASS
Students	Miss Chorpaka Bunlert Student ID 57050677
	Miss Dhittita Chanphayap Student ID 57050681
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Dr.Wipawee Dejtisakdi

Abstract

The objective of this study was to investigate the effects of photoperiod and salinity on the growth and biomass of *Dunaliella salina* KU11. In this experiment, algae were cultured in Modified Ramaraj Medium under a varying of photoperiod (12L:12D, 16L:8D, 24L:0D) and salinity (1M – 2M NaCl). Under three different photoperiods, we found that *D. salina* KU11 cultured under 16L:8D showed the highest growth rate by entering the log phase on day 2 and higher cell accumulation in the stationary phase approximately 1.5 fold than 12L:12D and 24L:0D. Under three different NaCl concentration (1M, 1.5M and 2M), we found that 1M of NaCl showed the highest *D. salina* cell accumulation compared with 1.5M and 2M NaCl. We then measured the *D. salina* biomass under 12L:12D, 16L:8D, 24L:0D photoperiods cultured with 1M NaCl. The result showed that 16L: 8D with 1M NaCl was the most suitable medium in our experiments by showing the highest biomass accumulation. In this study, the finding suggested us to use this culture condition in the further study of *D. salina* KU11.

Keywords : *Dunaliella salina* KU11,biomass, photoperiod, salinity

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเรื่อง อิทธิพลของแสงและความเค็มต่อการเจริญเติบโตและชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 นั้นสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ของผู้มีพระคุณหลายท่าน จึงใคร่ขอขอบพระคุณทุกท่านมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ได้ให้คำแนะนำ ความรู้ด้านการเขียนงานวิจัย ข้อคิดเห็นต่างๆด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอน และประสบการณ์ต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำโครงงาน อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน

ขอขอบพระคุณ ผศ.วีนา ชูโชติ ประธานกรรมการ และผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม คณะกรรมการโครงงานพิเศษ ที่ให้คำแนะนำ และความรู้ เพื่อให้โครงงานพิเศษเล่มนี้ออกมาสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ประจำตึกวิทยาศาสตร์หลังเก่า ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเบิกใช้อุปกรณ์ และคอยให้ คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ต่างๆ

ทางคณะผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของผู้มีพระคุณทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ทำให้โครงงานพิเศษสำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ หากโครงงานพิเศษเล่มนี้มีข้อผิดพลาดประการใดทางคณะผู้จัดทำจึงขออภัยมา ณ ที่นี้

ช่อผกา บุญเลิศ
ฑิตฐิตา จันทร์พยัพ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 2
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 สาหร่ายสกุล *Dunaliella* 3
2.1.1 อนุกรมวิธาน 3
2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 3
2.1.3 การแพร่กระจาย 4
2.1.4 กระบวนการสืบพันธุ์ 5
2.1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* 5
2.1.6 ประโยชน์ของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* 8
2.1.7 ข้อได้เปรียบของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* 10
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 13
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 13
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 13
3.3 อุปกรณ์แล้วเครื่องมือ 13
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน 14

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 18
4.1 ศึกษาและเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย Dunaliella salina KU11 ที่เลี้ยงด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน 18
4.1.1 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตภายใต้ระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน 18
4.1.2 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่างระยะเวลาการให้แสงและการเลี้ยงด้วยอาหาร Modified Ramaraj (RM) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน 19
4.1.3 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 20
4.1.4 เปรียบเทียบรูปร่างของสาหร่ายระหว่างระยะเวลาการให้แสงและที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน 21
4.2 การวิเคราะห์ชีวมวลของสาหร่ายภายใต้ระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน 23
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 25
5.1 สรุปผลการวิจัย 25
5.2 ข้อเสนอแนะ 25
เอกสารอ้างอิง 26
ภาคผนวก 29
ภาคผนวก ก 30
ภาคผนวก ข 32
ภาคผนวก ค 35
ภาคผนวก ง 53

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ D.salina KU11 ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงและอาหาร Modified Ramaraj (RM) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน 20

ก-1 อาหาร Modified Ramaraj Medium 30

ก-2 อาหาร Modified Ramaraj Medium สูตรอาหารแข็ง 30

ค-1 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมลาร์ 35

ค-2 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์ 36

ค-3 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2 โมลาร์ 37

ค-4 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมลาร์ 38

ค-5 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์ 39

ค-6 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2 โมลาร์ 40

ค-7 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมลาร์ 41

ค-8 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์ 42

ค-9 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2 โมลาร์ 43

ง-1 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมลาร์ 44

ง-2 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์ 47

ง-3 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2 โมลาร์ 50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ง-4 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมลาร์ 53

ง-5 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์ 56

ง-6 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2 โมลาร์ 59

ง-7 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมลาร์ 62

ง-8 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์ 65

ง-9 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2 โมลาร์ 68

ง-10 แสดงปริมาณชีวมวลในวันที่ 4 ของการวัดการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1โมลาร์ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน 71

ง-11 แสดงปริมาณชีวมวลในวันที่ 6 ของการวัดการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1โมลาร์ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน 72

ง-12 แสดงปริมาณชีวมวลในวันที่ 4 ของการวัดการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1โมลาร์ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน 73

ง-13 แสดงค่าทางสถิติเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ D.salina KU11ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงและอาหาร Modified Ramaraj (RM) ที่ความเข้มข้น 74

ง-14 จำนวนเซลล์เฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ D. salina KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12 : มืด 12 ชั่วโมง 75

ง-15 จำนวนเซลล์เฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ D. salina KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16 : มืด 8 ชั่วโมง 75

ง-16 จำนวนเซลล์เฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ D. salina KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 : มืด 0 ชั่วโมง 76

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 เซลล์ของสาหร่าย *D. salina* เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม 4

2.2 แสดงการเปลี่ยนรูปร่างของ *D. salina* (จากซ้ายไปขวา) ในที่ที่มีความเค็มสูง ซึ่งชักนำให้เกิดการสะสมของเบต้าแคโรทีน 4

2.3 โครงสร้างของเบต้าแคโรทีน 8

3.1 สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย 14

3.2 การวางแผนการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะแสงที่แตกต่างกัน 15

3.3 การวางแผนการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน

3.4 การวางแผนการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะแสงที่แตกต่างกันเพื่อศึกษาปริมาณชีวมวล 16

3.5 แสดงภาพเครื่องกรองสุญญากาศและกระดาษกรองที่มีเซลล์สาหร่าย 17

4.1 แสดงกราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตสาหร่ายภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 16:8 และ 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์ 18

4.2 แสดงกราฟการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *D.salina* KU11 ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงและอาหาร Modified Ramaraj (RM) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน 20

4.3 แสดงรูปร่างของ *D.salina* KU11 อาหาร Modified Ramaraj (RM) 21

4.4 แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณชีวมวลสาหร่าย *D.salina* KU11 ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงแตกต่างกันในระยะ log (วันที่ 4) และระยะ stationary (วันที่ 6 และ 9) ในอาหาร RM ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ 24

ข-1.1 แสดงลักษณะฮีมาไซโตมิเตอร์ 32

ข-1.2 แสดงลักษณะตารางบนฮีมาไซโตมิเตอร์ 32

ข-3.1 เครื่องกรองสูญญากาศ 34

ค-1 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 12:12 ชั่วโมง NaCl 1 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3) 35

ค-2 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 12:12 ชั่วโมง NaCl 1.5 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3) 36

ค-3 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 12:12 ชั่วโมง NaCl 2 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3) 37

ค-4 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 16:8 ชั่วโมง NaCl 1 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3) 38

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ค-5 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 16:8 ชั่วโมง NaCl 1.5 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3) 39

ค-6 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 16:8 ชั่วโมง NaCl 2 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3) 40

ค-7 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 24 ชั่วโมง NaCl 1 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3) 41

ค-8 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 24 ชั่วโมง NaCl 1.5 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3) 42

ค-9 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 24 ชั่วโมง NaCl 2 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3) 43

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Dunaliella salina เป็นสาหร่ายทะเลสีเขียว เซลล์เดียวขนาดเล็กและไม่มีผนังเซลล์ ซึ่งแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติทั้งในแหล่งน้ำเค็มและดินเค็มจัดจึงเรียกว่าสาหร่ายทนเค็มเป็นที่รู้จักกันดีว่ามีบทบาทสำคัญสำหรับการผลิตหลักในสภาพแวดล้อมแบบ Hypersaline (มีเกลือเป็นส่วนประกอบในปริมาณมากหรือทะเลที่มีความเค็มมาก) เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้มีสารจากธรรมชาติอยู่มากและอุดมไปด้วยสาร เบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ Carotenoids ที่มีเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย *D. salina* จึงกลายเป็นแหล่งชีวมวลที่น่าสนใจมากขึ้น เมื่อเซลล์ของสาหร่าย *D. salina* อยู่ในสภาวะที่มีความเข้มแสงสูง ความเค็มสูง และมีสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน เซลล์ของสาหร่ายจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวไปเป็นสีส้มเนื่องจากสาหร่าย *D.salina* มีการผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) เช่น เบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) ปริมาณมากภายในเซลล์ (นิรันดร์, 2554) เบต้าแคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (Pro vitamin A) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งถูกนำมาใช้ในทางด้านอุตสาหกรรมทางการเกษตร และทางด้านการแพทย์ดังนั้นสาหร่ายชนิดนี้จึงมีราคาสูงและเป็นที่ต้องการมากในปัจจุบัน

สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีการสะสมเบต้าแคโรทีน เนื่องจากสาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถพบได้ตามแหล่งน้ำที่มีความเค็มสูงมาก เช่น ทะเลสาบเดดซี (Dead sea) ประเทศอิสราเอล ทะเลสาบและทะเลสาบสีชมพู (Pink lake) ในประเทศออสเตรเลีย ซึ่งสาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีความสามารถในการสะสมเบต้าแคโรทีนได้มากกว่าร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้ง โดยเซลล์สาหร่ายจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีส้ม เนื่องจากการสะสมเบต้าแคโรทีนเมื่ออยู่ในสภาวะจำกัด เช่น ความเค็มสูง ความเข้มแสงสูง และ ปริมาณไนโตรเจนจำกัด (Borowitzka *et al.*, 2007) เบต้าแคโรทีนเป็นสารสีแคโรทีนอยด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของแคโรทีน มีสีส้ม แดง ไม่ละลาย ทั้งในน้ำและแอลกอฮอล์ แต่ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม (Amotz *et al.*, 2009) โครงสร้างทางเคมี ประกอบด้วยโมเลกุลของไฮโดรคาร์บอนที่ต่อกันเป็นสายยาวด้วยโมเลกุลของไอโซพรีนหลายๆ หน่วย ต่อกัน ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่อิ่มตัว มีองค์ประกอบเป็นคาร์บอน 40 อะตอม และไฮโดรเจน56 อะตอม มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{40}H_{56}$ มีน้ำหนักโมเลกุล 536.9 มีจุดหลอมเหลว เท่ากับ 184 องศาเซลเซียส และมีพันธะคู่ 11 พันธะ

สาหร่ายขนาดเล็กเป็นแหล่งชีวมวลที่น่าสนใจสำหรับการใช้งานในภาคอุตสาหกรรมและหลายชนิดสามารถผลิตเชื้อเพลิงทดแทนได้ เช่น ก๊าซมีเทนที่ผลิตจากการย่อยสลายชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็กในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจนและไบโอดีเซลที่ได้จากการ transesterification ของ

ไขมันในสาหร่ายขนาดเล็ก ยกเว้นบางสายพันธุ์ที่สามารถเพิ่มชีวมวลได้เป็น 2 เท่าภายใน 24 ชั่วโมงโดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ นอกจากนี้สาหร่ายยังสามารถสะสมไขมันซึ่งเป็นแหล่งไบโอดีเซลที่มีแนวโน้มการเก็บสะสมสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งสาหร่าย นอกจากนี้สาหร่ายยังสามารถดูดซับ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) อีกทั้งยังเก็บสะสมผลผลิตที่มีคุณค่าโดยการสังเคราะห์แสงและใช้สาอาหารที่มีอยู่ในน้ำทิ้งหรือน้ำเสีย ส่งผลให้ไม่จำเป็นที่จะต้องใช้พื้นที่เพาะปลูกมากเหมือนพืชผลทางการเกษตรชนิดอื่น ข้อดีเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสาหร่ายขนาดเล็กนี้สามารถเป็นแหล่งทรัพยากรที่มีแนวโน้มในการผลิตเชื้อเพลิงทดแทนที่ยั่งยืนได้ กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ ที่ได้จากน้ำมันเป็นที่รู้กันดีว่า คือ ไบโอดีเซล ซึ่งสามารถหาได้ง่ายจากสาหร่าย ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ ของสาหร่ายขนาดเล็ก ที่มีอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณไขมันสูงเพื่อให้ได้ผลผลิตไบโอดีเซลที่มีคุณภาพสูง การปรับปรุงผลผลิตของสาหร่ายสามารถทำได้โดยการเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารที่เพาะเลี้ยงและปรับปรุงสภาวะในการเจริญเติบโต (Kichul *et al.*, 2014)

งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาระยะเวลาการให้แสงและความเค็มในอาหารที่เหมาะสมสำหรับกาเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตชีวมวลของสาหร่าย *D. salina KU11*

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) ศึกษาระยะเวลาการให้แสงที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina KU11*
2) ศึกษาความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11
3) ศึกษาระยะเวลาการให้แสงและความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มผลผลิตชีวมวลของ สาหร่าย *D. salina* KU11

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D.salina* KU11 เพื่อหากราฟอัตราการเจริญเติบโต โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นทำการวัดชีวมวล โดยวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยใช้การนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเครื่องฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และทำการชีวมวลโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum filtration)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบถึงอิทธิพลของแสงต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11
2) ทราบถึงอิทธิพลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11
3) ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* KU11 เพื่อเพิ่มผลผลิตชีวมวล

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายสกุล *Dunaliella*

2.1.1 อนุกรมวิธาน (Amotz, 2009)

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Volvocales

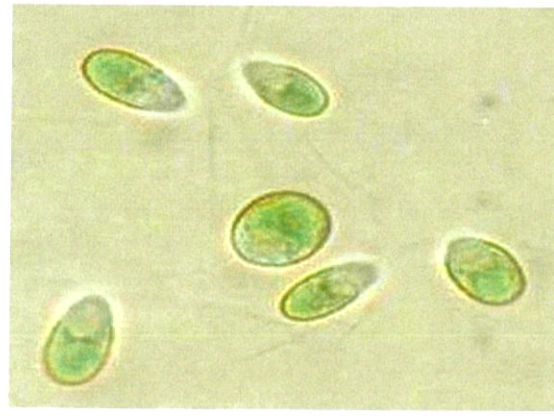
Family Polyblepharidacae

Genus Dunaliella

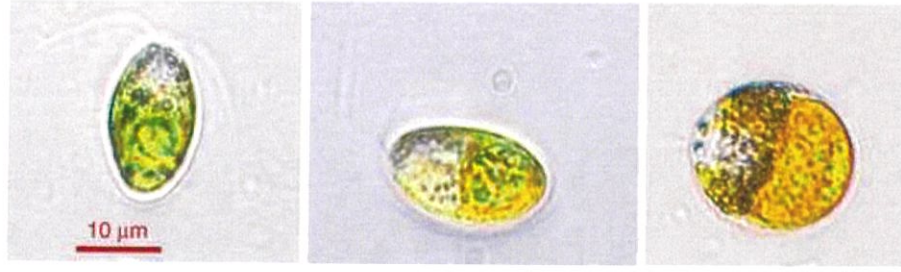
2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สาหร่ายสกุล *Dunaliella* เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวขนาดเล็กไม่มีผนังเซลล์แต่มีเพียงเยื่อเจลลาตินที่เหนียวและยืดหยุ่นห่อหุ้มเซลล์สาหร่ายเอาไว้ มีแฟลกเจลลา 2 เส้นที่มีความยาวเท่ากัน มีลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกันไป เช่น รูปไข่ รูปทรงกระบอก รูปกระสวย และ รูปทรงกลม (นิรันดร์, 2554) ซึ่งเซลล์ของสาหร่ายอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ โดยจะเปลี่ยนเป็นรูปร่างค่อนข้างกลมเมื่อเจริญอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม และขนาดเซลล์ของสาหร่ายนั้นจะขึ้นอยู่กับสภาวะในการเจริญเติบโตและสภาวะความเข้มแสง (Aharon, 2005) สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีนิวเคลียส 1 อันอยู่ที่ปลายด้านแหลมของตัวเซลล์และปกคลุมด้วยคลอโรพลาสต์รูปถ้วย จำนวน 1 อัน ขนาดใหญ่ประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตรเซลล์ (Duc *et al.*, 2013) มีไพรีนอยด์ที่ล้อมรอบด้วยเม็ดแป้งที่อยู่ด้านหน้าของคลอโรพลาสต์ สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีจุดตา (Eyespot) ที่อยู่ติดกับไทลาคอยด์ซึ่งประกอบด้วยเม็ดไขมัน (Lipid globules) 1-2 แถว และเมื่อเซลล์ของสาหร่ายมีอายุมากขึ้นจำนวนเม็ดไขมันจะเพิ่มขึ้นด้วย (Borowitzka and Siva, 2007) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และ 2.2

สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีการสะสมของคลอโรฟิลล์ เอ และ บี และมีการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ที่มีประโยชน์อย่างอื่นอีก เช่น แอลฟา และเบต้าแคโรทีน (Alpha and Bata-carotene), ไวโอแซนทีน (Violaxanthin), นีโอแซนทีน (Neoxanthin), ซีแซนทีน (Zeaxanthin) และลูทีน (Lutein)



รูปที่ 2.1 เซลล์ของสาหร่าย *D. salina* เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม (ที่มา : www.2.bp.blogspot.com)



รูปที่ 2.2 แสดงการเปลี่ยนรูปร่างของ *D. salina* (จากซ้ายไปขวา) ในที่ที่มีความเค็มสูง ซึ่งชักนำให้ เกิดการสะสมของเบต้าแคโรทีน (ที่มา : www.researchgate.net)

2.1.3 การแพร่กระจาย

สาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถดำรงชีวิตได้ในช่วงความเค็ม ที่กว้างตั้งแต่ 0.2-3.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl เมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะที่มีความเค็มสูง เช่น ทะเล ทะเลสาบน้ำเค็ม หรือแหล่งน้ำที่มีความเค็มสูงกวา 10 เปอร์เซ็นต์ NaCl จะสามารถสังเกตเห็นสาหร่ายได้ชัดเจนโดยสีของแหล่งน้ำจะกลายเป็นสีน้ำตาลแดง (นิรันดร์, 2554) สาหร่ายสกุล *Dunaliella* บางสายพันธุ์ เช่น *D. salina, D. parva* และ *D. pseudosalina* สามารถเจริญเติบโตในที่ที่มีความเค็มของเกลือสูงตั้งแต่ 5 ส่วนใน

ไทลาคอยด์ (Interthylakoid space) จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้สาหร่ายมีเซลล์สีแดง Amotz. et al. (2009) และ สาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถสะสมกลีเซอรอลได้สูงถึง 50 เปอรเซ็นต์ของน้ำหนักแห้งเพื่อปรับความดันออสโมติกทั้งภายนอกและภายในเซลล์เพื่อรักษาสมดุลของน้ำและแร่ธาตุ (Amotz, 2000)

2.1.4 กระบวนการสืบพันธุ์

สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีวงจรชีวิตที่ซับซ้อน โดยในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะเป็นการแบ่งตัวของเซลล์ปกติที่เคลื่อนที่ได้ (Motile vegetative cells) อีกทั้งยังมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสามารถอธิบายได้ดังนี้

2.1.4.1 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นมักเกิดในสภาวะที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* โดยเกิดจากการรวมตัวของเซลล์เคลื่อนที่ (Motile vegetative cells) 2 เซลล์ที่มีรูปร่างและขนาดเหมือนกันมารวมกนได้เป็นไซโกต (Zygote) ไซโกตที่ได้จะมีผนังเรียบและหนา และเมื่อเข้าสู่ระยะพักแล้ว ไซโกตจะแบ่งตัวแบบไมโอซิสได้ 32 เซลล์แล้วจะถูกปล่อยออกมาจากผนังเซลล์ของเซลล์แม่ (Aharon, 2005), (Martinez *et al.*, 1995) ได้สังเกตผลจากที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำที่ 2 เปอรเซ็นต์ และ 5 เปอรเซ็นต์ จะมีกิจกรรมการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นของเกลือที่สูงถึง 30 เปอรเซ็นต์ นั้นกลับพบว่าทำให้มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศลดลง

2.1.4.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นเกิดขึ้นได้ 2 กรณี เกิดจากการแบ่งตัวตามยาวในสภาวะที่เซลล์มีการเคลื่อนที่ (Motile state) โดยแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Mitosis) ในเซลล์ปกติ และอีกกรณี คือ สาหร่ายเกิดมีการสืบพันธุ์ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญมากๆ เช่น ในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร หรือสภาวะที่แห้งแล้ง สาหร่ายจะสร้างซีส (Cyst) ออกมาหุ้มเซลล์ ซึ่งเซลล์เหล่านั้นจะถูกเรียกว่า อะพลาโนสปอร์ (Aplanospores) โดยที่อะพลาโนสปอร์จะมีผนังเซลล์ที่หนาขรุขระและมีสีออกแดงของคีโตแคโรทีน (Ketocarotene) และแคนทาแซนทีน (Canthaxanthin) ซึ่งอาจพบอยู่เป็นกลุ่มหรืออยู่เป็นเซลล์เดี่ยว แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเซลล์จะถูกปล่อยออกเป็นอิสระ หรือแบ่งเซลล์ได้ 4-5 เซลล์ (นิรันดร์, 2554)

2.1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสกุล *Dunaliella*

2.1.5.1 คาร์บอน (Carbon) เนื่องจาก สาหร่ายสกุล *Dunaliella* เป็นสาหร่ายที่ต้องการพลังงาน จากแสงมาใช้ในการสังเคราะห์แสง ซึ่งสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และ ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) เป็นแหล่งคาร์บอนอนินทรีย์ จากการศึกษาอัตราการสังเคราะห์แสง

โดย (Borowitzka *et al.*, 2007) พบว่า การเพิ่มสารอนินทรีย์คาร์บอน เช่น การเพิ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยผสมลงในอากาศ หรือมีการเพิ่มโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) จะสามารถ กระตุ้นการเจริญเติบโตของ สาหร่ายสกุล *Dunaliella* เพิ่มมากขึ้น ซึ่งการเพิ่มก๊าซคาร์บอนได ออกไซด์จะทำให้พีเอชของน้ำลดลง และมีคาร์บอนไดออกไซด์ละลายในน้ำมากขึ้น (Amotz *et al.*, 2004) ได้ทาการทดลองโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ซึ่งใช้ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) ที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ จากการทดลอง พบว่า สาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถเจริญในอาหารที่มีโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตสูง ถึง 10 มิลลิโมลต่อลิตร (mmol L^{-1})

2.1.5.2 ไนโตรเจน (Nitrogen) แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดของสาหร่าย *D. salina* คือ ไนเตรท (NO_3^-) ซึ่งจัดเป็นรูปแบบของไนโตรเจนที่ดีที่สุดสาหรับการเพาะเลี้ยงในการนำมาใช้เป็นสารประกอบอนินทรีย์ เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* ในสภาวะที่มีการจำกัดปริมาณของไนเตรท พบว่า สาหร่าย *D. salina* จะมีปริมาณเบต้าแคโรทีนสูงมาก ในขณะที่สาหร่ายมีปริมาณโปรตีนและคลอโรฟิลล์ต่ำ เมื่อเทียบกับเซลล์สาหร่าย *D.salina* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไนโตรเจนเพียงพอ (Amotz *et al.*, 2004) นอกจากนี้สาหร่ายสกุล *Dunaliella* ยังสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของไน ไตรต์ (NO_2^-) และแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ได้ แต่ในการใช้แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) หรือ แอมโมเนียมคาร์บอเนต (NH_4CO_3) มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นและที่อุณหภมิสูงนั้นจะเกิดสารพิษที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* อย่างรวดเร็ว (Borowitzka et al., 2007)

2.1.5.3 ฟอสฟอรัส (Phosphorus) ฟอสฟอรัสในรูปของโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) หรือโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ซึ่งเป็นรูปที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* โดยปริมาณที่เหมาะสมของฟอสฟอรัสในการเจริญเติบโตประมาณ 0.2 ไมโครกรัมต่อลิตร (µg L^{-1}) ของโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Tafreshi and Shariati, 2009)

การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส จะส่งผลกระทบต่อการ เจริญของสาหร่ายเป็นอย่างมากโดยจะมีผลมากกว่าการเกิดการเปลี่ยนแปลง ความเข้มข้นของไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว ซึ่งในการปรับอัตรา ส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสจะปรับให้เป็นไนโตรเจน 1 ส่วนต่อฟอสฟอรัส 50 ส่วน (นิรันดร์, 2554)

2.1.5.4 ความเป็นกรดด่าง (pH) สาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถทนต่อพีเอชได้ในช่วงกวางตั้งแต่ 0 ถึง 11 แต่ค่าพีเอชที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 9 ถึง 11 (Tafreshi and Shariati, 2009) การสังเคราะห์แสงของสาหร่ายจะส่งผลให้ค่าพีเอชมีค่าสูงขึ้น ซึ่งสามารถทาให้ค่า

พีเอชมีค่าต่ำลงได้โดยการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ร่วมกับไนเตรท (NO_3^-) ทำให้เกิดการแตกตัวของไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) ส่งผลให้ค่าพีเอชของน้ำลดลง (Amotz *et al.*, 2004)

2.1.5.5 อุณหภูมิ (Temperature) สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีความสามารถในการเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างตั้งแต่ -35 ถึง 45 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* อยู่ในช่วง 25 ถึง 35 องศา เซลเซียส หรือประมาณ 32 องศาเซลเซียส (Tafreshi and Shariati, 2009)

(Tawfiq *et al.*, 2009) ได้ทำการวิเคราะห์ถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* โดยได้เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ความเข้มแสง 10×10^3 ลักซ์ ในอาหารเลี้ยงสาหร่าย สูตร Aquaculture Fisheries and Marine Sciences Department (AFMED) ซึ่งจากการศึกษาได้ ใช้อุณหภูมิในช่วงต่างกัน ได้แก่ 20, 23, 26, 29 และ 32 องศาเซลเซียส พบว่าสาหร่าย *D.salina* เจริญเติบโตได้ที่อุณหภมิ 20 องศาเซลเซียสได้ดีที่สุด โดยได้มีจำนวนเซลล์สาหร่ายมากที่สุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.90×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.1.5.6 แสง (Light) แสงเป็นแหล่งพลังงานสำคัญสำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึมในสาหร่าย *D.salina* การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นมากกวาหรือเท่ากับ 4.5 ถึง 10 เท่า (Borowitzka *et al.*,(2007) ส่วนปริมาณคลอโรฟลล์เอ และบีจะลดลงเมื่อความเข้มแสงมากจนถึงจุดอิ่มตัว (นิรันดร์, 2554), (Xu *et al.*, 2016) ศึกษาถึงผลของการแปรผันระยะเวลาในการให้แสงและความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D.salina* สายพันธุ์ CCAP 19/30 ที่มีผลต่อจำนวนเซลล์ การสังเคราะห์แสง และการหายใจ ซึ่งพบวาในระยะการให้แสงสาหร่ายมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น และจำนวนเซลล์สาหร่ายจะลดลงในช่วงเวลาที่ไม่ได้รับแสงและจะเกิดการผลิตกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่ม ความเข้มแสงมากกวา 1000 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (µmol photons $m^{-2}s^{-1}$) ส่งผลให้เซลล์ถูกทำลายด้วยแสง แต่เซลล์ยังคงรักษาระดับในการสังเคราะห์แสง การหายใจ และ อัตราการเจริญเติบโตได้ในระดับสูง อีกทั้งปริมาณกลีเซอรอลภายในเซลล์ยังสูงขึ้นกว่าสาหร่ายที่ เพาะเลี้ยงในที่ที่มีความเข้มแสง 500 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที (µmol photons m^{-2} s^{-1})

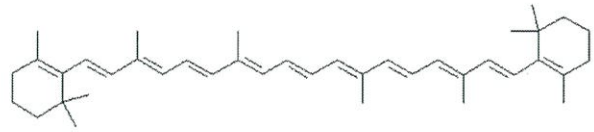
2.1.5.7 ความเค็ม (Salinity) สาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถเจริญได้ในแหล่งที่มีความเค็มช่วงกว้าง ซึ่งจัดได้ว่าเป็น Halotolerant Species โดยสาหร่ายที่ให้เบต้าแคโรทีนสามารถ เจริญได้ดีที่ความเค็ม 0.5 – 4.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ (29.25 – 234 พีพีที) และที่ความเค็มสูงถึง 4.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์สาหร่ายจะมีการสะสมเบต้าแคโรทีนสูงกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งเซลล์ปกติมีการสะสมเพียง 0.3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้งเท่านั้น (Aharon, 2005) ระดับความเค็มที่เหมาะต่อการสะสมเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย

D. salina อยู่ที่ความเค็ม 4.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ หรือ 24 เปอร์เซ็นต์ NaCl (Amotz *et al.*, 2009) แต่ในที่ที่ความเค็มสูงนั้นธาตุอาหารและก๊าซต่างๆ เช่น CO_2 และ O_2 จะละลายน้ำได้น้อยลง ทำให้ปริมาณของสาหร่าย *Dunaliella salina* มีปริมาณจำกัด เนื่องจากการขาดแคลน CO_2 และ O_2 (นิรันดร์, 2554)

(Nader, 2011) ได้ศึกษาถึงผลกระทบของปัจจัยสิ่งแวดล้อมในการเจริญของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* จากทะเลเดดซี (Dead sea) ซึ่งมีการศึกษาถึงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 1.25, 2.5, 5, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อปริมาณคลอโรฟิลล์และการผลิตเบต้าแคโรทีนของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีความเข้มข้นที่ 2.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl ซึ่งมีปริมาณคลอโรฟิลล์และการผลิตเบต้าแคโรทีนของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ได้ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 4.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากการทดลองสาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถทนต่อความเค็มสูงถึง 20 เปอร์เซ็นต์ NaCl

2.1.6 ประโยชน์ของสาหร่ายสกุล *Dunaliella*

2.1.6.1 การสะสมเบต้าแคโรทีน เนื่องจากสาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถพบได้ตามแหล่งน้ำที่มีความเค็มสูงมาก เช่น ทะเลสาบเดดซี (Dead sea) ประเทศอิสราเอล ทะเลสาบน้ำเค็มเกรท (Great salt lake) ประเทศสหรัฐอเมริกา และทะเลสาบสีชมพู (Pink lake) ในประเทศออสเตรเลีย ซึ่งสาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีความสามารถในการสะสมเบต้าแคโรทีนได้มากกว่าร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้ง โดยเซลล์สาหร่ายจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีส้ม เนื่องจากการสะสมเบต้าแคโรทีนเมื่ออยู่ในสภาวะจำกัด เช่น ความเค็มสูง ความเข้มแสงสูง และ ปริมาณไนโตรเจนจำกัด (Borowitzka *et al.*, 2007) เบต้าแคโรทีนเป็นสารสีแคโรทีนอยด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของแคโรทีน มีสีส้ม แดง ไม่ละลาย ทั้งในน้ำและแอลกอฮอล์ แต่ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม (Amotz *et al.*, 2009) โครงสร้างทางเคมี ประกอบด้วยโมเลกุลของไฮโดรคาร์บอนที่ต่อกันเป็นสายยาวด้วยโมเลกุลของไอโซพรีนหลายๆหน่วย ต่อกัน (รูปที่ 2.3) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่อิ่มตัว มีองค์ประกอบเป็นคาร์บอน 40 อะตอม และไฮโดรเจน 56 อะตอม มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{40}H_{56}$ มีน้ำหนักโมเลกุล 536.9 มีจุดหลอมเหลว เท่ากับ 184 องศาเซลเซียส และมีพันธะคู่ 11 พันธะ เบต้าแคโรทีนส่วนใหญ่ประกอบด้วยสเตอริโอไอโซเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ All-trans betacarotene และ 9-cis betacarotene (Nader *et al.*, 2011) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเบต้าแคโรทีน (ที่มา : www.cdn-3.sci-toys.com)

ปกติเมื่อเบต้าแคโรทีนอยู่ในรูปผลึกจะมีสีม่วงแดง แต่เมื่ออยู่ในสารละลายพวกน้ำมัน จะให้สีต่างๆ กันตั้งแต่สีเหลืองอ่อนถึงสีส้ม ขณะที่ละลายอยู่ในสารละลายพวกน้ำจะให้สีทั่วๆไป คือ สีส้ม สาหรับคุณสมบัติของ All-trans betacarotene คือละลายได้ยากในน้ำมันและมีแน้วโน้มจะตกเป็นผลึก ในขณะที่ 9-cis betacarotene จะละลายได้ดีในสารจำพวกน้ำ (Hydrohpilic solvents) และตกผลึกได้ยาก เบต้าแคโรทีนที่ใช้ในอุตสาหกรรม ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ มาจากการสังเคราะห์จากธรรมชาติโดยอยู่ในรูปแบบของ all-trans betacarotene ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์ได้พบเฉพาะในธรรมชาติเท่านั้น อัตราส่วนของสเตอริโอไอโซเมอร์ทั้งสองชนิดขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดกลืนแสงระหว่างที่เซลล์กำลังแบ่งเซลล์และสายพันธุ์ของสาหร่าย ถ้าความเข้มของแสงสูงสาหร่ายที่มีเบต้าแคโรทีนในเซลล์ต่ำจะมีอัตราส่วนของ 9-cis betacarotene ต่อ All-trans betacarotene ต่ำ เนื่องจาก 9-cis betacarotene ถูกเปลี่ยนไปเป็น All-trans betacarotene และสาหร่าย *D. salina* ที่มีเบต้าแคโรทีนในเซลล์สูง เมื่อได้รับแสงที่มีความเข้มแสงสูง จะส่งผลให้ปริมาณเบต้าแคโรทีนลดลงอย่างช้าๆ และสเตอริโอไอโซเมอร์ชนิด 9-cis betacarotene เท่านั้นที่จะถูกทำลายโดยแสง (Amotz *et al*., 2004)

บทบาทของเบต้าแคโรทีน คือ เป็นสารที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงโดยในกระบวนการสังเคราะห์แสงเบต้าแคโรทีนเป็นรงควัตถุที่ทำหน้าที่เป็นตัว ถ่ายทอดพลังงานรังสีที่ได้รับแล้วส่งต่อไปยังคลอโรฟิลล์ เอ และยังป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วย รังสีจากแสง (Photoprotection) โดยเป็นตัวป้องกันคลอโรฟลล์ไม่ให้ถูกทำลาย ทำให้แคโรทีนอยด์ไปสะสมที่รอบๆ คลอโรพลาสต์เป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดเสถียรภาพในการสังเคราะห์แสงของ คลอโรฟิลล์มากขึ้น (นิรันดร์, 2554) นอกจากนี้เบต้าแคโรทีนยังทาหน้าที่เป็นแหล่งสะสมคาร์บอนจาก ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่าย ซึ่งสาหร่ายจะน้ำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานหากสารอาหาร ที่ใช้ในการดำรงชีวิตไม่เพียงพอ (Amotz *et al*., 2009) และเบต้าแคโรทีนยังเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant) หรือสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถลดอนุมูลอิสระในร่างกายและจับออกซิเจนอะตอมเดี่ยวที่มักจะพบมากในสภาพที่มีมลภาวะทางอากาศ (นิรันดร์, 2554) จากคุณสมบัตินี้จึงทำให้เบต้าแคโรทีนถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมไปถึงนำไปใช้ทางด้านโภชนาการ เช่น นำมาผลิตอาหารเสริมสุขภาพป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่างๆได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคระบบภูมิคุ้มกันทำงานผิดปกติได้ (นิรันดร์, 2554) เนื่องจากเบต้าแคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (Provitamin A) โดยเบต้าแคโรทีน 1 โมเลกุล สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ถึง 2 โมเลกุล ผ่านการทางานของเอนไซม์ที่บริเวณของลำไส้เล็ก (อรชุน, 2539)

ในทางด้านการแพทย์ มีการใช้เบต้าแคโรทีนในการรักษาผู้ป่วยโรคอริโธรพอยอิติก โปรโตพอร์ฟัยเรีย (Erythopoietic protoporphyria, EPP) และโรคแพ้แสงอื่นๆ นอกจากนี้แล้วยังใช้เพื่อลดอาการจากการแพ้ยาที่เกิดขึ้นบริเวณผิวหนัง (Phototoxic drugs) โดยอาการการใช้ยาจะเริ่มเกิดหลังจากที่ใช้ยาและมีการสัมผัสกับแสง (Bayerl, 2008) และเนื่องจากเบต้าแคโรทีนมีคุณสมบัติใน

การเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระจึงช่วยลดอนุมูลอิสระที่เป็นตัวทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ ในทางการแพทย์นั้นพบว่า เบต้าแคโรทีนสามารถใช้ในการผลิตยาต้านมะเร็งได้จึงนำเอาเบต้าแคโรทีนมาใช้ในการป้องกันการเกิดมะเร็งบางชนิด (Amotz *et al.*, 2009)

ทางด้านอุตสาหกรรม สีที่ได้จากเบต้าแคโรทีนจะมีสีเหลืองถึงส้ม โดยนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้กับอาหารจำพวกไขมัน เช่น ใช้ทำมาร์การีน เป็นส่วนผสมในขนมอบ เนื่องจากมีคุณภาพและคงตัวดี ไม่เป็นพิษสะดวกต่อการละลายในไข มัน (Nader *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังได้นำเบต้าแคโรทีนผสมลงในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มสีของสัตว์น้ำ เช่น ปลาแซลมอน ใช้ผสมลงในอาหารไก่เพื่อเพิ่มสีในไข่แดง และอาหารวัวเพื่อปรับปรุงสุขภาพและระบบสืบพันธุ์ของวัว (Borowitzka *et al.*, 2007) รวมถึงการนำเบต้าแคโรทีนเป็นสีเคลือบแคปซูลหรือใช้เป็นสีผสมในเครื่องสำอางค์ โดยเป็นส่วนผสมในครีมกันแดด (อรชุน, 2539)

2.1.6.2 การสะสมไขมัน สำหรับสาหร่าย *D. salina* เป็นสาหร่ายที่สามารถสร้างกรดไขมัน (Fatty acid) ที่จัดเป็นองค์ประกอบทางด้านชีวเคมีภายในเซลล์ที่ความสามารถในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Amotz *et al.*, 2009) หลายๆ งานวิจัยได้มีการศึกษาถึงปริมาณน้ำมันและปริมาณกรดไขมันของสาหร่าย *D. salina* ซึ่ง (Lamers *et al.*, 2010) ได้ทำการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันในสาหร่าย *D. salina* พบวามีกรดไขมัน 5 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบหลักถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด ได้แก่ Palmitic acid (C16:0) Hexadecatetraenoic acid (C16:4) Oleic acid (C18:1) Linoleic acid (C18:2) และ alpha-linolenic acid (C18:3) (Herrero *et al.*, 2006) ได้ทำการวิเคราะห์สารสกัดจากสาหร่าย *D. salina* ที่ใช้เอทานอล และเฮกเซนในการสกัด โดยสารสกัดที่ได้นี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ *E .coli, S aureus* และ *C. albicans* ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันในสารสกัด พบว่ามีกรดไขมันชนิด Palmitic alpha-linolenic และ Oleic acids ที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดจากสาหร่าย

2.1.7 ข้อได้เปรียบของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* (Amotz *et al.*, 2009)

2.1.7.1 สาหร่ายสกุล *Dunaliella* บางสายพันธุ์ เช่น *D. salina* และ *D. bardawil* มีความสามารถในการสะสมเบต้าแคโรทีนได้ในปริมาณสูงถึง 5-15% ของน้ำหนักแห้ง

2.1.7.2 สาหร่ายสกุล *Dunaliella* เจริญได้ในน้ำที่มีความเค็มสูง ทำให้สามารถลดโอกาสการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้

2.1.7.3 นอกเหนือจากเบต้าแคโรทีนแล้ว สาหร่ายสกุล *Dunaliella* ยังสามารถผลิตกลีเซอรอล 20-40 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง และโปรตีน 30-40 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อได้

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 Yanan *et al.* (2016) ได้ศึกษาอิทธิพลของแสงและความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แสงของ *Dunaliella salina* CCAP 19/30 พบว่า ในการศึกษาครั้งนี้ *D. salina* CCAP 19/30 ถูกเพาะเลี้ยงในช่วงเวลาที่แสงและความเข้มแสงที่แตกต่างกันเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของแสงกับพารามิเตอร์การวัดการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันโดยมีการวัดปริมาณกลี เซอรอลแป้งและคาโรทีนอยด์ในเซลล์เพื่อตรวจกระบวนการสังเคราะห์แสงและการหายระดับเซลล์ของสาหร่าย ผลการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์ของ *D. salina* CCAP 19/30 เมื่อเติบโตในสภาวะที่มีแสง / มืด: ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นในที่มีแสงและลดลงในความมืดและการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกลีเซอรอลในเซลล์ การลดลงของปริมาณเซลล์ในที่มืดเป็นอิสระจากการแบ่งเซลล์

2.2.2 Hui chen *et al.* (2009) ได้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงความเค็มต่อการเจริญเติบโตของ *Dunaliella salina* และกิจกรรมของไอโซไซม์ Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase พบว่าสาหร่าย *Dunaliella salina* สามารถอยู่รอดได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.05 โมลาร์ จนถึงประมาณ 5.5 โมลาร์ ความเข้มข้นของ NaCl 2.0 โมลาร์ คือความเค็มที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *D. salina* ซึ่งพบว่ามีปริมาณกลีเซอรอลสูงสุดที่ 64.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.3 Sathasivam และJuntawong (2013) ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่สามารถเพิ่มปริมาณเบตาแคโรทีนในสาหร่าย *D. salina* สายพันธุ์ KU11 โดยเลี้ยงในอาหาร Johnson's medium และ Ramaraj medium ที่ความเข้มข้น NaCl ต่างๆ (0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0) พบว่า *D. salina* สายพันธุ์ KU11 สามารถเจริญได้ดีในอาหาร Ramaraj medium ที่ความเข้มข้น NaCl 1.5 โมลาร์ ซึ่งอาหาร Ramaraj มีจำเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในวันที่ 2 และมีอัตราการเติบโตสูงสุดในวันที่ 3 การผลิตมวลชีวภาพสูงสุด ในวันที่ 5 และ วันที่ 10 ถึง 11 การเจริญเติบโตได้หยุดลง ที่ความเข้มข้นของ NaCl 4 ระดับในอาหาร Ramaraj คือ 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลาร์ มีอัตราการเติบโตที่ดีขึ้นเมื่อเทียบกับ 2.0 โมลาร์ NaCl

2.2.4 Wu *et al.* (2016) ได้ศึกษาผลของแสง อุณหภูมิ และสารอาหารต่อการเจริญและการสะสมสารสีของสาหร่าย *D. salina* 3 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินเค็ม พบวาความเข้มแสงและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย คือ 135.3 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที และที่ 22 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่สภาวะมีความเข้มแสง 245.6 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส จะชักนำให้มีการผลิตเบต้าแคโรทีนสูงถึง 117.99 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ยูเรีย ($CO(NH_2)_2$) และโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) สำหรับการเจริญของ สาหร่ายมีค่าเท่ากับ 0.5, 0.36 และ 1.5กรัม

ต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ยูเรีย ($CO(NH_2)_2$) และโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 0, 0.12 และ 1.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะมีการสะสมปริมาณเบต้าแคโรทีนได้มากที่สุด

2.2.5 รวมทรัพย์ (1997) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงของ *Dunaliella salina* ที่มีช่วงแสงที่ต่างกันคือ 3:21, 6:18, 12:12, 16:8, 18:6 และ 24:0 น. (168 ชั่วโมง) พบว่าช่วงเวลาแสงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของมันคือ 18:6 ชั่วโมง ซึ่งสาหร่ายพบว่ามีอัตราการเพิ่มขึ้นสูงสุดในจำนวนเซลล์เท่ากับ 96.89 เปอร์เซ็นต์และมีขนาดเซลล์สม่ำเสมอ 80 เปอร์เซ็นต์ที่ 96 ชั่วโมง จากผลการทดลองข้างต้นได้ทำการเพาะเลี้ยง ในช่วงเวลา 18:6 ชม. และสังเกตได้ว่าทุกชั่วโมงที่ 72-90 ชั่วโมง (ระยะเวลาแสง) และ 91-96 ชั่วโมง (ระยะเวลามืด) พบอัตราการเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 90.10 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ ที่ 92 ชั่วโมง ขนาดเซลล์เฉลี่ยค่อย ๆเพิ่มขึ้นจนถึง 91 องศาเซลเซียสมีความยาว 12.58 ไมโครเมตรและความกว้าง 10.60 ไมโครเมตรและลดลงทันทีที่ 92 ชั่วโมง ความยาว 11.37 ไมครอนและความกว้าง 8.87 ไมครอน พบปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ค่อยๆเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 0.882 พิโครกรัมต่อเซลล์ ที่ 90 ชั่วโมง และลดลง 54.20 เปอร์เซ็นต์เฉพาะที่ 92 ชั่วโมง (0.464 พิโครกรัมต่อเซลล์) การศึกษายังพบว่าการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *D. salina* โดยการแบ่งตามยาวทำให้เซลล์ลูกมีขนาดเล็กกว่าเซลล์แม่

2.2.6 Mutsumi *et al.* (2006) ได้ศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่มีผลต่อการสะสมไขมันและไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ของ *Dunaliella* ซึ่งพบว่าในความเข้มข้นของ NaCl ที่สูงกว่า 1.5 โมลาร์ จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความเข้มข้นของ NaCl จาก 0.5 (เทียบเท่าน้ำทะเล) ถึง 1.0 โมลาร์ จะส่งผลให้ปริมาณไขมันในเซลล์สูงขึ้น คือ 60 ถึง 67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นที่ 0.5 หรือ 1.0 โมลาร์ ในระยะกลางหรือระยะสุดท้ายของช่วง log phase ในการเพาะเลี้ยง โดยความเข้มข้นของ NaCl เริ่มที่ 1.0 โมลาร์ มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไขมันเป็น 70 เปอร์เซ็นต์

2.2.7 Emily *et al.* (2010) ได้ศึกษาชีวมวลของสาหร่าย *D.salina* และปริมาณไขมันที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเค็มตั้งแต่ 0.4 ถึง 3.5 โมลาร์ NaCl ชีวมวลต่อปริมาตรสารละลายและปริมาณไขมันโดยรวมสูงสุดต่อมิลลิลิตรพบได้ในอาหารที่ 2 โมลาร์ NaCl พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ไขมันสูงที่สุดในชีวมวลอยู่ที่ 3.5 โมลาร์ NaCl ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า 2 โมลาร์ NaCl คือความเค็มที่ดีที่สุดในการสร้างมวลชีวภาพและการแบ่งเซลล์ เป็นความเค็มที่ *D. salina* เหมาะสำหรับผลิตเซลล์และชีวมวลและแสดงถึงสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติโดยเฉลี่ยที่พบในสภาพแวดล้อมแบบ Halophiles

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

สาหร่าย *Dunaliella salina* สายพันธุ์ KU11 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นิรันดร์ จันทวงศ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย *D. salina* สูตร Modified Ramaraj Medium

Micronutrient (Solution A)	1	mL/L
Concentrated mix (Solution B)	100	mL/L
Sodium Chloride (NaCl) 1.5 M	87.66	g/L
Sodium Bicarbonate ($NaHCO_3$)	50	mL/L

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Bright Field Microscope)
2. เครื่องชั่งน้ำหนักสี่ตำแหน่ง (Analytical Balance)
3. ตู้อบความร้อน (Hot Air Oven)
4. เครื่องเขย่า (Shaker)
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
6. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge)
8. ตู้เย็นเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย (Refrigerator)
9. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)
10. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 100 มิลลิลิตร
11. กระบอกตวง (Graduated Cylinder) ขนาด 100 มิลลิลิตร
12. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร
13. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 1000 มิลลิลิตร
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
15. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Eppendorf)
16. หลอดเซนตริฟิวก์ (Falcon Tube)

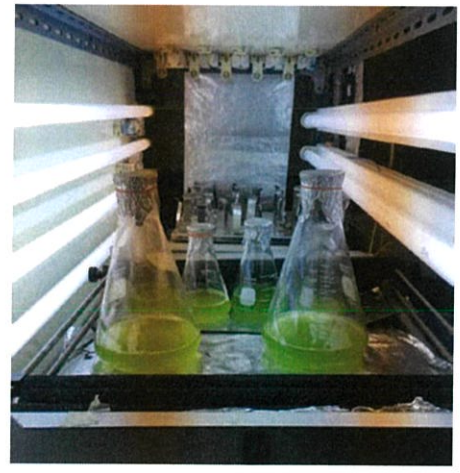
17. ออโตปิเปต (Autopipette)
18. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
19. จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)
20. กระบอกใส่จานเพาะเชื้อ (Petri Dish Box)
21. เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum Pump)
22. กระดาษกรอง (Filter Papers)

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

ศึกษาและเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ที่เลี้ยงด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน

1. สภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* KU11

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* KU11 ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 5.0×105 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน ในอาหารเหลวสูตร Modified Ramaraj Medium (ภาคผนวก ก-1) บนเครื่องเขย่า (Obital shaker) ที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที ภายใต้ความเข้มแสง 4210 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 3.1



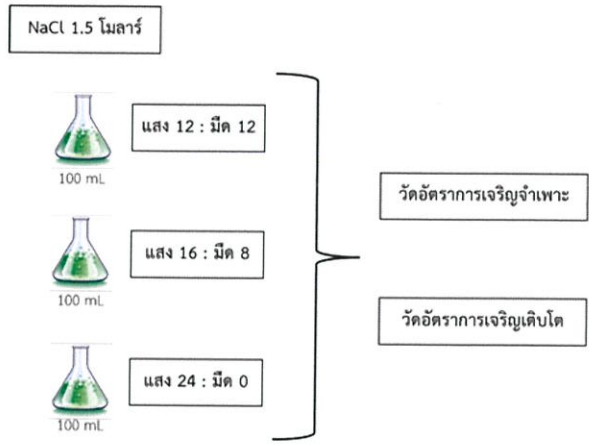
รูปที่ 3.1 สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

2. แผนการทดลองการศึกษาการเจริญเติบโตของ *D. salina* KU11

2.1 แผนการเลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน

ทำการนำสาหร่าย *D. salina* KU11 เพาะเลี้ยงลงในอาหาร Modified Ramaraj Medium ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์ ภายใต้สภาวะการให้แสงที่ สว่าง : มืด เท่ากับ 12:12, 16:8 และ 24:0 ชั่วโมง ซึ่งจากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย

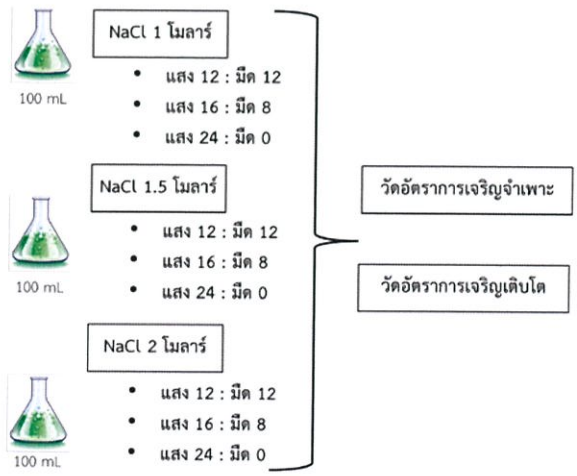
D. salina KU11 ได้ทำการวัดการเจริญเติบโตและการวัดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ



รูปที่ 3.2 การวางแผนการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะแสงที่แตกต่างกัน

2.2 แผนการเลี้ยงด้วยอาหาร Modified Ramaraj Medium ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน

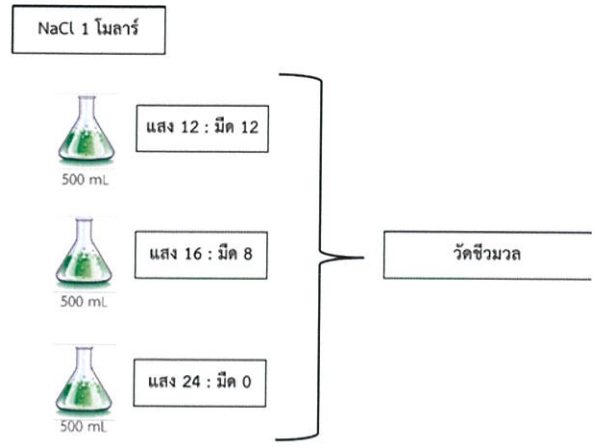
ทำการนำสาหร่าย *D. salina* KU11 เพาะเลี้ยงลงในอาหาร Modified Ramaraj Medium ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1,1.5 และ 2 โมลาร์ และนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการให้แสงที่ สว่าง : มืด เท่ากับ 12:12, 16:8 และ 24:0 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11 โดยการวัดการเจริญเติบโตและการวัดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ



รูปที่ 3.3 การวางแผนการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน

2.3 แผนการศึกษาปริมาณชีวมวลของสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่เลี้ยงด้วยสภาวะแสงที่แตกต่างกัน

ทำการนำสาหร่าย *D. salina* KU11 เพาะเลี้ยงลงในอาหาร Modified Ramaraj Medium ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ และนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการให้แสงที่ สว่าง : มืด เท่ากับ 12:12, 16:8 และ 24:0 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* KU11 โดยการวัดชีวมวล



รูปที่ 3.4 การวางแผนการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะแสงที่แตกต่างกันเพื่อศึกษาปริมาณชีวมวล

3. การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย

3.1 การนับจำนวนเซลล์

นำสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่ทำการเพาะเลี้ยงสำหรับการวัดการเจริญเติบโตมาทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) (ภาคผนวก ข-2) บันทึกผลการทดลองและสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจานวนเซลล์สะสมกับวันที่ทำการเพาะเลี้ยง

3.2 การศึกษาความเขียวของสาหร่าย

ถ่ายรูปฟลาสก์ของสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันเพื่อเปรียเทียบความเขียวในแต่ละฟลาสก์ทุก ๆ 24 ชั่วโมง

3.3 การวัดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

ทำการวัดการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 ทุกๆ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการนับเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) แต่ละการทดลองนับ 3 ซ้ำทำการหาค่าเฉลี่ยและนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดังสูตร

$$\mu = \frac{\ln (N - N_0)}{\Delta t}$$

โดย μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

N = ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายวันสุดท้าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

N_0 = ความหนาแน่นของเซลล์สาหร่ายวันแรก (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

Δt = ความต่างของระยะเวลา ($t-t_0$) (วัน)

3.4 การวัดปริมาณชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11

เลี้ยงสาหร่าย *D.salina* KU11 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างสาหร่ายในวันที่ 4 (ระยะ log) วันที่ 6 และ 9 (ระยะ stationary) มาปริมาณ 10 มิลลิลิตร และนำไปกรองด้วย เครื่องกรองสูญญากาศ (Vacuum Pump) (ภาคผนวก ข-3) จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีเซลล์สาหร่ายไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงใน **รูปที่ 3.5** ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองหลังอบ บันทึกผล คำนวณหาปริมาณชีวมวลโดย

ปริมาณชีวมวล (กรัม) = กระดาษกรองหลังอบที่มีเซลล์สาหร่าย – กระดาษกรองก่อนอบ

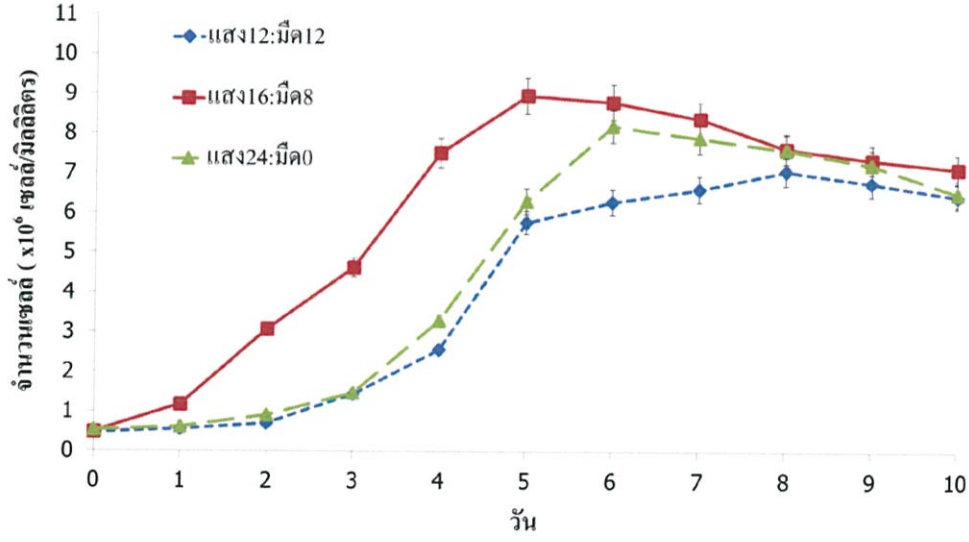
รูปที่ 3.5 แสดงภาพเครื่องกรองสุญญากาศ (ซ้าย)
และกระดาษกรองที่มีเซลล์สาหร่าย (ขวา)

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ศึกษาและเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ที่เลี้ยงด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน

4.1.1 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตภายใต้ระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* สายพันธุ์ KU11 เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้ระยะเวลาแสง สว่าง:มืด เท่ากับ 12:12 16:8 และ 24:0 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เท่ากับ 1.5 โมลาร์ พบว่า ประชากรสาหร่ายภายใต้ระยะเวลาแสง 16: มืด 8 ชั่วโมง มีการเข้าสู่ระยะ log ในวันที่ 1 ซึ่งเร็วกว่าที่ สภาวะแสง 12: มืด12 ชั่วโมง และแสง 24: มืด 0 ชั่วโมง ที่มีการเข้าสู่ระยะ log ในวันที่ 2 และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนประชากรสาหร่ายพบว่า ระยะเวลาแสง 16: มืด 8 ชั่วโมง มีจำนวนประชากรสะสม เมื่อเข้าสู่ระยะ Stationaryสูงกว่าที่แสง12: มืด12 ชั่วโมง 1.55 เท่า และสูงกว่า แสง 24: มืด 0 ชั่วโมง 1.42 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 4.1)



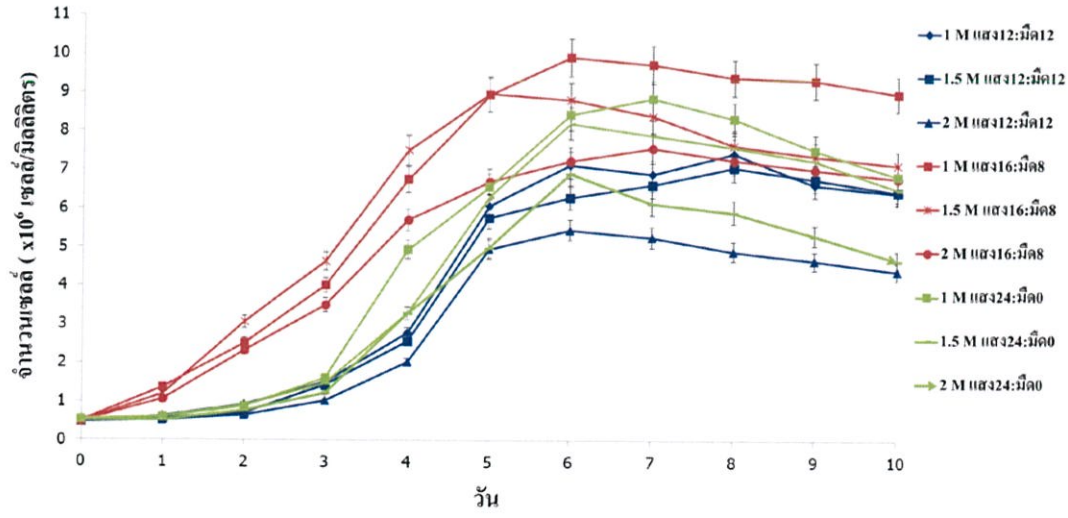
รูปที่ 4.1 แสดงกราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตสาหร่ายภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 16:8 และ 24:0 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์

4.1.2 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่างระยะเวลาการให้แสงและการเลี้ยงด้วยอาหาร Modified Ramaraj (RM) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน

จากการทดลองที่ 4.1.1 พบว่าสาหร่ายที่ได้รับแสง 16 : มืด 8 ชั่วโมง จะมีการเติบโตสูงกว่าที่ระยะแสง 12 : มืด 12 ชั่วโมง และ ที่แสง 24 :0 ชั่วโมง ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากจำนวนเซลล์ที่นับได้ ในการทดลองที่ 4.1.2 จึงได้ทำการศึกษาผลของแสงและความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายร่วมด้วย โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 9 สภาวะ ผลการเปรียบเทียบ พบว่ามีการสะสมของประชากรสาหร่ายสูงสุดในแต่ละสภาวะแสง อธิบายได้ว่าที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ทั้ง 3 ความเข้มข้น เข้าสู่ระยะ log ในวันเดียวกัน คือวันที่ 2 มีอัตราการเจริญเติบโตเหมือนกัน แต่มีประชากรสะสมเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary ที่แตกต่างกัน คือ แสง 12 : มืด 12 ชั่วโมง มีการเข้าสู่ระยะ stationary ในวันที่ 5 ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1,1.5 และ 2 โมลาร์ ประชากรสะสมเท่ากับ 7.43 $\times 10^6$, 7.06 $\times 10^6$ และ 5.44 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สำหรับแสง 16 : มืด 8 ชั่วโมง มีการเข้าสู่ระยะ stationary ในวันที่ 5 ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1,1.5 และ 2 โมลาร์ ประชากรสะสมเท่ากับ 9.91 $\times 10^6$, 8.97 $\times 10^6$ และ 7.56 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแสง 24 : มืด 0 ชั่วโมง มีการเข้าสู่ระยะ stationary ในวันที่ 6 ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1,1.5 และ 2 โมลาร์ ประชากรสะสมเท่ากับ 8.85 $\times 10^6$, 8.20 $\times 10^6$ และ 6.91 $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ ทั้ง 3 ความเข้มข้นที่เลี้ยงในสภาวะแสงต่างกัน สรุปผลการทดลองได้ว่า ความเข้มข้นของเกลือ 1 โมลาร์เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของประชากรสาหร่าย *Dunaliella salina* สายพันธุ์ KU11 โดยมีการสะสมของประชากรสาหร่ายเมื่อเข้าระยะ stationary สูงสุดในแต่ละสภาวะแสง (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 แสดงกราฟการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *D.salina* KU11 ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสง และอาหาร Modified Ramaraj (RM) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน

4.1.3 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11

เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สภาวะแตกต่างกันดังแสดงใน ตารางที่ 4.1 พบว่าที่ความเข้มข้นโซเดียวคลอไรด์ต่ำจะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่าที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูง โดยที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ของแสง 16 : มืด 8 ชั่วโมง มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสภาวะแสงอื่นๆ โดยมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 0.2138 ต่อวัน

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ *D.salina* KU11 ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงและอาหาร Modified Ramaraj (RM) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน

ระเวลาการให้แสง (สว่าง:มืด)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(day^{-1})		
	ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์		
	1 โมลาร์	1.5 โมลาร์	2 โมลาร์
12:12	0.1780	0.1786	0.1363
16:8	0.2138	0.1894	0.1842
24:0	0.1841	0.1788	0.1422

4.1.4 เปรียบเทียบรูปร่างของสาหร่ายระหว่างสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน

จากการทดลองที่ 4.1.2 เมื่อพิจารณาลักษณะสัณฐานของสาหร่ายเบื้องต้น ในช่วงระยะ Stationary phase เพื่อดูว่าระยะการให้แสง:มืด มีผลต่อลักษณะสัณฐานหรือไม่ ซึ่งพบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงด้วย แสง 12 : มืด 12 ชั่วโมง เซลล์จะมีลักษณะเรียว ดังแสดงใน รูป 4.3 ก, สาหร่ายที่เลี้ยงด้วย แสง 16 : มืด 8 ชั่วโมง เซลล์จะมีลักษณะกลมและใหญ่กว่าเซลล์ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาแสงอื่น ดังแสดงใน รูป 4.3 ข และ สาหร่ายที่เลี้ยงด้วย แสง 24 : มืด 0 ชั่วโมง เซลล์จะมีลักษณะเรียวคล้ายรูปกระสวยและเล็ก ดังแสดงใน รูป 4.3 ค

เนื่องจากการ Synchronize ของเซลล์สาหร่าย เมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะมืดไม่ได้รับแสงจะมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น เซลล์จะมีขนาดเล็กลง และเมื่อได้รับแสงจะเกิดการสังเคราะห์แสง ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ในระยะเวลาแสง 24 : มืด 0 ชั่วโมง สาหร่ายจะมีการสังเคราะห์แสงและแบ่งเซลล์ตลอดเวลาทำให้เซลล์มีขนาดเล็ก ไม่เท่ากันและการแบ่งเซลล์ของสาหร่ายเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน (Eppley และ Coastsworth,1966)

(ก.) (ข.) (ค.)

รูปที่ 4.3 แสดงรูปร่างของ *D.salina* KU11 อาหาร Modified Ramaraj (RM) ภายใต้สภาวะแสง (ก.) แสง 12: มืด 12 ชั่วโมง, (ข.) แสง 16: มืด 8 ชั่วโมง, (ค.) แสง 24: มืด 0 ชั่วโมง ที่ระยะ stationary phase กำลังขยาย 100X

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ที่ระยะเวลาการให้แสงและการเลี้ยงด้วยอาหาร Modified Ramaraj (RM) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน โดยการเปรียบเทียบการเจริญเติบโต อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และลักษณะทางสันฐาน พบว่าสาหร่าย *Dunaliella salina* ที่เลี้ยงในระยะเวลาให้แสงสว่าง : มืด เท่ากับ 12: 12, 16:8, 24:0 ชั่วโมง ระยะ log phase จะอยู่ในระหว่างวันที่ 2-6 ซึ่งสอดกับงานวิจัยของ รวมทรัพย์ (2540) พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในระยะเวลาแสง สว่าง : มืด เท่ากับ 12:12, 16:8, 24:0 ชั่วโมง ระยะ log phase จะอยู่ในระหว่างวันที่ 2-7, 2-5, 2-4 ตามลำดับ และยังสอดคล้องกับรายงายของ Sorokin (1973) กล่าวว่าการเจริญของสาหร่ายเซลล์เดียวแบ่งออกเป็น 5 ระยะ คือ lag phase ,log phase,early stationary phase, stationary phase และ dead phase กล่าวคือ วันที่ 1 จำนวนเซลล์ของ *Dunaliella salina* ที่ระยะเวลาให้แสงสว่าง : มืด 3 ระยะจะมีการเจริญช้า จัดอยู่ในระยะ lag phase ซึ่งในระยะนี้สาหร่ายต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ เมื่อสาหร่ายสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้แล้วจะเข้าสู่ระยะ log phase ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญและแบ่งเซลล์เป็นไปอย่างรวดเร็ว

จากการวัดจำนวนเซลล์สะสมและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะพบว่าที่ ระยะเวลาแสง 16 : มืด 8 ชั่วโมง มีค่ามากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะแสงอื่น ๆ ซึ่งผลการทดลองไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yanan Xu (2016) ได้ศึกษาผลกระทบของช่วงแสงที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของ *D. salina* สายพันธุ์ CCAP 19/30 การเพาะเลี้ยงจะใช้ แสง : มืด (LD) 24 ชั่วโมงที่มีช่วงแสงที่แตกต่างกัน (LD) และ แสงต่อเนื่อง (LL) คือ ระยะเวลาแสง 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมงในทุก ๆ 24 ชั่วโมง (4/20 LD, 8 /16 LD, 12/12 LD, 16/8 LD, 20/4 LD และ LL ตามลำดับ) ความเข้มของแสง 200 มิลลิเมตรโฟรตอน m^{-2} s^{-1} พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสงแตกต่างกันโดยรวมในช่วง 6 วัน ระยะเวลาในการให้แสงมากสาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้เร็วขึ้นและความหนาแน่นของเซลล์ที่

สูงขึ้น โดยแสง LL คือการเพาะเลี้ยงที่มีการให้แสงอยู่ตลอดเวลา สาหร่ายมีการเจริญเติบโตมากที่สุด สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากแสงเป็นปัจจัยจำกัดตัวหนึ่งที่มีผลต่อการสังเคราะห์แสง เมื่อช่วงระยะเวลาในการรับแสงลดลงทำให้สาหร่ายมีการสังเคราะห์แสงได้น้อย ดังนั้นสาหร่ายจึงมีการเจริญเติบโตช้า Ikuo (1992) แต่ในงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้การเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยแสง 16 : มืด 8 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด อาจเนื่องมาจากปัจจัยในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีผลต่อการเจริญเติบโตมีอยู่ด้วยกันหลายประการ นอกจากระยะเวลาการให้แสงแล้วความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสงยังมีผลต่อการเจริญของสาหร่ายเช่นกัน รวมไปถึงสายพันธุ์ของสาหร่ายและสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ถ้ามีความแตกต่างกันการเจริญเติบโตก็จะแตกต่างกันด้วย Wallen และ Geen (1971), Fogg และ Thake (1987), Naus และ Melis (1991)

การวิเคราะห์หาการเจริญเติบโตของ *Dunaliella salina* ผลปรากฏว่า ในวันที่ 1-5 ของการทดลองที่เลี้ยงในช่วงแสง สว่าง:มืด เท่ากับ 16:8 ชั่วโมงจะมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดรองลงมาคือ 24 และ 12:12 ชั่วโมงตามลำดับ พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในช่วงแสง 24 ชั่วโมงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการเพิ่มผลผลิตเพื่อเป็นการค้า เช่น อาหารสัตว์น้ำเพราะ *D. salina* ที่เลี้ยงในช่วงนี้จะมีการเพิ่มปริมาณเซลล์ตลอดเวลา ส่วน *D. salina* ที่เลี้ยงที่ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง เหมาะสำหรับที่จะนำไปใช้ในการขยายพันธุ์ต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาให้แสง 24 ชั่วโมงสาหร่ายมีการสังเคราะห์แสงและแบ่งเซลล์ตลอดเวลาทำให้เซลล์ที่ได้มีขนาดเล็กเมื่อนำมาขยายพันธุ์จะทำให้สาหร่ายต้องใช้เวลาในการปรับตัวเพื่อเข้าสู่ระยะ log phase นาน Fogg และ Thake (1987)

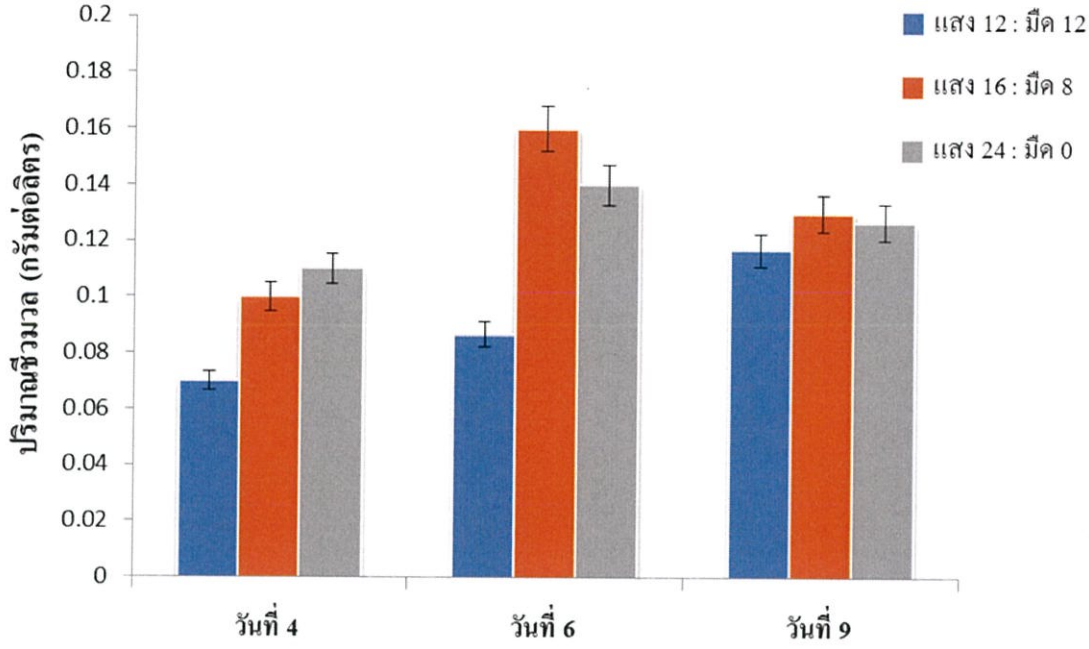
จากผลการศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญของสาหร่าย *D. salina* KU11 พบว่าอัตราการเจริญ (Specific growth rate) ของ *D. salina* KU11 ที่เพาะเลี้ยงในระดับความเค็มต่ำจะมีค่าสูงกว่าที่ระดับความเค็มสูง โดยจะมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดประมาณ 0.2138 ต่อวัน ที่ระดับความเค็ม 1.0 ถึง 1.5 M NaCl และจะมีค่าต่ำลงเมื่อเลี้ยงที่ระดับความเค็มสูงขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Ben-Amotz and Avron (1981) ซึ่งพบว่าการเลี้ยง *D. salina* ที่ความเค็ม 1 mM NaCl เซลล์สาหร่ายจะสามารถเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าได้ในเวลาเพียง 5 ชั่วโมงเท่านั้น แต่เมื่อเพิ่มความเค็มจะทำให้อัตราการเจริญของสาหร่ายลดลงโดยจะต้องใช้ระยะเวลา 3 วันในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า เนื่องจากความเค็มจะส่งผลให้สาหร่ายชะงักการสังเคราะห์ DNA หรือลดอัตราการสังเคราะห์ DNA ลง จึงทำเซลล์แบ่งตัวได้ช้าลง Richmond (1986) และ Bhumibhamon (1997) พบว่าระดับความเค็มสูงเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย เนื่องจากมีผลทำให้สาหร่ายหยุดการแบ่งเซลล์หรือทำให้เซลล์ถูกปล่อยออกจากเซลล์แม่ได้ช้าลง ทำให้เซลล์ที่ได้มีปริมาณน้อย และที่ความเค็มสูงมีการชักนำการสร้างเบต้าแคโรทีนทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวช้าและเจริญเติบโตได้ไม่ดีเนื่องจากนำพลังงานจากการเมตตาบอลิซึมภายในเซลล์ไปช่วยในการสร้างเบต้าแคโรทีนด้วย นิรันดร์ (2554)

Sandra Orset and Andrew J., 1999. ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยง *Dunaliella salina* CCAP 19/30 (Teorodesco) ในอาหาร De Walne medium ที่ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ โดยความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นที่ 20 - 30×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 4 อุณหภูมิ คือ 17, 24, 29 และ 34 องศาเซลเซียส ทั้งหมด 15 วัน ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตคือที่ 24 องศาเซลเซียส โดยความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 94±63.78 ×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 24 -29 องศาเซลเซียส(ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 76±67.26 ×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ส่วนแคโรทีนอยด์ต่อเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิดังกล่าว (ที่อุณหภูมิ 24 เท่ากับ 18.65±62.72 และที่อุณภูมิ 29 เท่ากับ 17.66±64.40มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เมื่อนำผลการทดลองของงานวิจัยนี้มาทำการเปรียบเทียบความหนาแน่นเซลล์กับการทดลองตอนที่ 4.1 ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายพบว่าความหนาแน่นเซลล์ที่ความเข้มข้นเกลือ 1 โมลาร์ มีค่ามากกว่าของงานวิจัยที่ได้นำมาอ้างอิงซึ่งใช้เกลือที่ความเข้มข้นสูงกว่าและอุณหภูมิที่แตกต่างกันเป็นผลทำให้เซลล์ที่ได้ในการทดลองที่ 4.1 มีค่ามากกว่า

ดังนั้นหากต้องเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตหัวเชื้อซึ่งต้องการใช้สาหร่ายในปริมาณมากและมีอัตราการเจริญดีจึงควรเลี้ยงสาหร่ายที่ความเค็มต่ำอย่างไรก็ตามหากเลี้ยงที่ระดับความเค็มต่ำจะทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย ดังนั้นจึงเลือกความเค็มที่ระดับ 1.5 M NaCl เพื่อนำไปใช้ในการเตรียมหัวเชื้อซึ่งจะช่วยทำให้การปนเปื้อนในหัวเชื้อน้อยลงได้ นิรันดร์ (2554)

4.2 การวิเคราะห์ชีวมวลของสาหร่ายภายใต้ระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน

การทดลองนี้ได้ทำการเปรียบเทียบชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้ระยะเวลาแสง สว่าง:มืด เท่ากับ 12:12 16:8 และ 24:0 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เท่ากับ 1 โมลาร์ ในการทดลองนี้เพื่อดูว่าสาหร่ายมีการสะสมชีวมวลแตกต่างกันหรือไม่ เนื่องจากมีปริมาณเซลล์สะสมที่แตกต่างกันข้างต้น การทดลองได้ทำการสุ่มตัวอย่างสาหร่ายปริมาตร 10 มิลลิลิตร มากรองและคำนวณหาน้ำหนักแห้ง ผลการทดลองพบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสง 12 : มืด 12 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด และสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสง16 : มืด 8 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งมากที่สุด ส่วนแสง 24 : 0 ชั่วโมงค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งน้อยกว่า แสง16 : มืด 8 ชั่วโม แต่มีค่าใกล้เคียงกัน ในระยะ log และเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary ช่วงแรกค่าชีวมวลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่เมื่อเข้าสู่ช่วงระยะ stationary ไปแล้วค่าชีวมวลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณชีวมวลสาหร่าย *D.salina* KU11 ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงแตกต่างกันในระยะ log (วันที่ 4) และระยะ stationary (วันที่ 6 และ 9) ในอาหาร RM ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์

จากการทดลองที่ 4.2 สาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะแสง 3 ช่วงเวลา ที่สภาวะแสง16 : มืด 8 ชั่วโมง มีชีวมวลมากที่สุดประมาณ 0.16 กรัมต่อลิตร รองลงมา แสง 24 : 0 ชั่วโมง เท่ากับ 0.14 กรัมต่อลิตร และแสง12 : มืด 12 ชั่วโมง เท่ากับ 0.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากเซลล์สาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ระยะเวลาแสง แสง16 : มืด 8 ชั่วโมง มีลักษณะกลมและมีขนาดใหญ่กว่าที่แสง 24 ชั่วโมงซึ่งแสง 24 ชั่วโมงมีปริมาณชีวมวลใกล้เคียงกันแต่เซลล์มีขนาดเล็กกว่า ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาให้แสง 24 ชั่วโมงสาหร่ายมีการสังเคราะห์แสงและแบ่งเซลล์ตลอดเวลาทำให้เซลล์ที่ได้มีขนาดเล็ก Fogg and Thake (1987) ปริมาณชีวมวลจึงมีค่าน้อยกว่าที่แสง 16 : มืด 8 ชั่วโมง จากงานวิจัย Mercedes *et al.*, (2005) ได้ทำการทดลอง 3 ระบบอุณหภูมิ คือ เลี้ยงที่อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียสตลอดทั้งวัน, เขย่าที่อุณหภูมิ 17 ถึง 30 องศาเซลเซียส และ ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ โดยจะอยู่ระหว่าง 17 ถึง 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่ดีที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงจะอยู่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสตลอดทั้งวัน ทั้งในแง่ของผลผลิตชีวมวลและผลผลิตแคโรทีนอยด์ (2.2±0.6 กรัมต่อลิตร และ 102.5±33.1 มิลลิกรัม carotenoid ตามลำดับ) ซึ่งมีชีวมวลมากกว่าการทดลองที่ 4.2 อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิที่ใช้ในงานวิจัยเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเพาะอุณหภูมิเป็นจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายเช่นกัน

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผลกระทบของแสงและความเค็มต่อการเจริญเติบโตและชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 โดยได้ทำการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะทั้งสิ้น 9 ที่สภาวะแสงและความเข้มข้นโซเดียวคลอไรด์แตกต่างกัน ทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโต อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ลักษณะสันฐาน และปริมาณชีวมวลของสาหร่าย สรุปได้ว่าสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้ระยะเวลาการให้แสง 12 :มืด 12 ,แสง 16: มืด 8 ชั่วโมง และ แสง 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์ สาหร่ายที่เลี้ยงด้วยแสง 16: มืด 8 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์สะสมมากที่สุด จากนั้นเมื่อทำการเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะแสง 12 :มืด 12 ,แสง 16: มืด 8 ชั่วโมง และ แสง 24 ชั่วโมง และความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1,1.5 และ 2 โมลาร์ สรุปได้ว่าที่สภาวะแสง 16: มืด 8 ชั่วโมง ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ มีจำนวนเซลล์สะสมและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบกับระยะเวลาแสงและความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ

สุดท้ายได้ทำการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเปรียบเทียบปริมาณชีวมวล ที่สภาวะแสง 12 :มืด 12 ,แสง 16: มืด 8 ชั่วโมง และ แสง 24:มืด 0 ชั่วโมง ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ พบว่าสาหร่ายที่แสง16: มืด 8 ชั่วโมง มีปริมาณชีวมวลมากที่สุด เท่ากับ 0.16 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงที่ระยะเวลาแสง12 :มืด 12 และ แสง 24:มืด 0 ชั่วโมง ปริมาณชีวมวลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

5.2 ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาผลกระทบของแสงและความเค็มต่อการเจริญเติบโตและชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ควรศึกษาปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของสาหร่ายเพิ่มเติม เนื่องจากการหาข้อมูลเบื้องต้น ทำให้ทราบว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการเจริญของสาหร่าย *Dunaliella salina* มีอยู่หลายประการ ตัวอย่างเช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ซึ่งอาจช่วยให้สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและปริมาณชีวมวลได้เช่นเดียวกัน และอีกหนึ่งสิ่งที่ควรศึกษา เนื่องจากสาหร่าย *Dunaliella salina* มีการสะสมไขมันและเบต้าแคโรทีนปริมาณมากในเซลล์เมื่อเปลี่ยนสภาวะในการเลี้ยงจึงควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มเบต้าแคโรทีนและไขมันเพื่อนำผลผลิตที่ได้ไปใช้งานต่อยอดได้ในภาคอุตสาหกรรมและทางการแพทย์

เอกสารอ้างอิง

นิรันดร์ จันทวงศ์. 2554. การพัฒนาสาหร่ายดูนาลิเอลล่าในการผลิตเบต้าแคโรทีนและส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากพื้นที่ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. การวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ

อรชุน เลียววัฒนะผล. 2539. ต้านโรคมะเร็งด้วยเบต้าแคโรทีน. สำนักพิมพ์รวมทรรศน์, กรุงเทพ

Amotz Ami Ben, Adriana Katz and Mordgay Avron. 2004. Accumulation of betacarotene in halotolerant algae: purification and characterization of betacarotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (chlorophyceae). J. phycology. 18: 529-573.

Amotz, P., and Rao. 2009. The Alga *Dunaliella*. NewHampshire : Science Publishers.

Aharon Oren. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. BioMed Central Ltd.

Ben-Amotz, A. and M. Avron. 1981. Glycerol and betacarotene metabolism in the halotolerant alga *Dunaliella*: a model system for biosolar energy conversion trends Biochem. Sci. 6: 297-299.

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

Bhumibhamon, O., Boontaveeyawat, N., Phoopat, S. and U. Sittiphuprasert. 1997. Beta - carotene production and HMG coA Reductase. Abstract. Biotecnology : An Essential Tool for Future Development. 19-22

Chumnantan, R. 1997. Culture of *Dunaliella salina* with various photoperiods.

D. G. Wallen and G. H. Geen. 1971. Light quality in relation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae. Marine Biology, 10(1) : 34–43

Emily, H. 2010. Optimum salinity conditions for producing lipids from *Dunaliella salina* for biofuels production. Energy Futures DTC

Fogg, G.E. and Thake, B. 1987 Algae Cultures and Phytoplankton Ecology. 3rd Edition, The University of Winsconsins Press Ltd., London.

Hui Chen, Jian-Guo Jiang, Guang-Hong Wu. 2009. Effects of Salinity Changes on the Growth of *Dunaliella salina* and Its Isozyme Activities of Glycerol-3-phosphate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(14) : 6178-82

Kichul, C. Kil-Nam, K. and Na Lae, L. 2015. Enhanced biomass and lipid production by supplement of myo-inositol with oceanic microalga *Dunaliella salina* Biomass and Bioenergy 72: 1-7 ·

Martinez, G. Cifuentes, A. Gonzalez, M. Parra, O. 1995. Effect of salinity on sexual activity of *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, strain CONC-006. Revista Chilena de Historia Natural.

Mercedes Garc´ıa-Gonz´ alez, Jos´ e Moreno, J. Carlos Manzano, F. Javier Florencio, Miguel G. Guerrero., 2005. and lutein in a closed tubular photobioreactor. J. of Biotechnology 115; 81–90

Melis, A. 1991, Dynamics of photosynthetic membrane composition and function, Biochim. Biophys. Acta (Reviews on Bioenergetics), 1058:87–106.

Mutsumi, T. Karseno, K. and Toshiomi, Y. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. J. of Bioscience and Bioengineering, 101(3): 223-6

Nader, F. AbuSaraa, S. and Abdul-Karim, J. 2011. The Effect of Certain Environmental Factors on Growth and betaaroteneProduction by *Dunaliella* sp. Isolated from the Dead Sea. Jordan J.of Biological Sciences Pages 29- 36.

Niran, J. and Ramaraj, S. 2015. Identification and comparison of culture medium for high betacarotene production by *Dunaliella salina* KU11 isolated from salt soil samples collected from Northeastern parts of Thailand. 203 readsRamaraj Sathasivam and Niran Juntawong. 2013. Modified medium for enhanced growth of Dunaliella strains.5: 67-73.

Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Inc. Boca Raton Florida. 528 pp.

Tawfiq S. Abu-Rezq, Suad Al-Hooti and Dangly A. Jacob3. 2010. Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. Journal of algal biomass utilization 2:12-19.

Yanan Xu, Iskander M. Ibrahim, Patricia J. Harvey. 2016. The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina*

Zhe Wu, Promchup Duangmanee, Pu Zhao, Niran Juntawong, and Chunhong Ma. 2016. The Effects of Light, Temperature, and Nutrition on Growth and Pigment Accumulation of Three *Dunaliella salina* Strains Isolated from Saline Soil. Jundishapur J Microbiol, 9(1): e26732

Yanan Xu, Iskander M. Ibrahim, Patricia J. Harvey. 2016. The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (chlorophyta) CCAP 19/30. Plant Physiology and Biochemistry, Volume 106 : 305-315

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย *Dunaliella salina*

ตาราง ก-1 อาหาร Modified Ramaraj Medium (Sathasivam และ Juntawong, 2003)

อาหาร Modified Ramaraj Medium	
สารเคมี	**ปริมาณสาร (mL/L)**
Solution A (Micronutrient)	1
- Boric acid (H_3BO_3)	9.27507
- Manganese(II) Chloride Tetrahydrate ($MnCl_24H_2O$)	1.9790
- Zinc Choloride ($ZnCl_2$)	0.109024
- Copper(II) Chloride Dihydrate ($CuCl_2.2H_2O$)	0.051144
- Sodium Molybdate (Na_2MoO_4)	0.48
- Sodium Metavanadate ($NaVO_3$)	0.24386
- Cobalt(II) Chloride Hexahydrate ($CoCl_2.6H_2O$)	0.047586
Solution B (Concentrated mix)	100
- Potassium chloride (KCl)	2.0
- Calcium Chloride Dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)	0.441
- Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4)	0.14
- Potassium Nitrate (KNO_3)	5.06
- Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)	12.323
- Iron(III) Chloride Hexahydrate ($FeCl_3.6H_2O$)	0.0054
Sodium Chloride (NaCl)	87.66
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	50

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

ตาราง ก-2 อาหาร Modified Ramaraj Medium (สูตรอาหารแข็ง)

อาหาร Modified Ramaraj Medium (สูตรอาหารแข็ง)	
สารเคมี	**ปริมาณสาร**
อาหารเหลว Modified Ramaraj Medium	1 L
ผงวุ้น (Agar)	15 g/L

ขั้นตอนในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในสาหร่าย

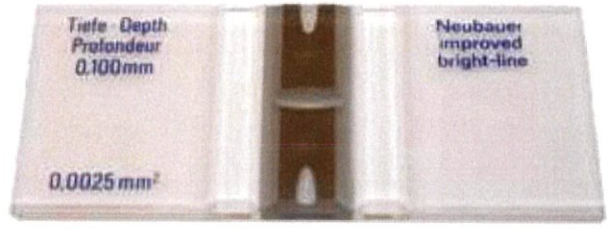
ชั่งยาปฏิชีวนะสองชนิด คือ Streptomycin ความเข้มข้น 25 mg /L และ Ampicillin ความเข้มข้น 50 mg/L ใส่ในหลอด eppendorf ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นทำการละลายตัวยาด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 1 mL และ ใช้ syringe ดูดสารละลายยาทั้งสองชนิดมาผสมกันและกรองผ่าน syringe filter ขนาดรูกรอง 0.2 µm ลงในอาหารเหลวที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ทำการผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นเทแบ่งใส่ฟลาสก์ฟลาสก์ละ 100 mL

ภาคผนวก ข

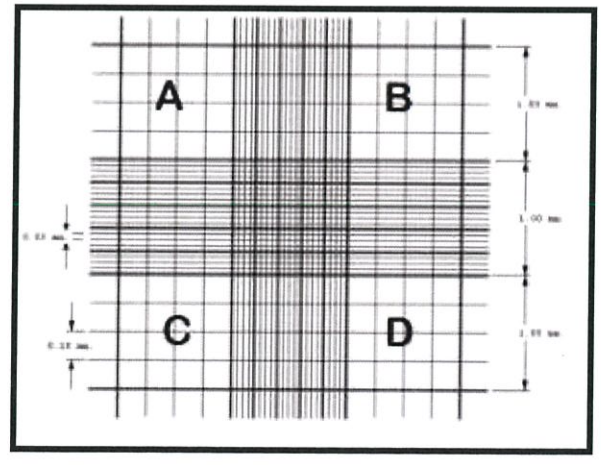
ขั้นตอนการทดลอง

ข-1 การนับจำนวนเซลล์

นับจำนวนเซลล์สาหร่าย *D. salina* ด้วยเครื่องมือฮีมาไซโตมิเตอร์ (Heamacyto meter) ฮีมาไซโตมิเตอร์มีลักษณะเป็นแก้วทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า บนฮีมาไซโตมิเตอร์ประกอบด้วยตารางสี่เหลี่ยมจำนวน 9 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 1 มิลลิเมตร และมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร พื้นที่ที่จะนับเซลล์จะนับที่มุมทั้ง 4 มุม มีจำนวนมุมละ 16 ช่อง และกระจกปิดสไลด์เพื่อช่วยในการนับจำนวนเซลล์



รูปที่ ข-1.1 แสดงลักษณะฮีมาไซโตมิเตอร์
(ที่มารูป : http://www.graymed.com.au/haemacytometer-haemacytometers)



รูปที่ ข-1.2 แสดงลักษณะตารางบนฮีมาไซโตมิเตอร์
(ที่มารูป : http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber

วิธีการนับจำนวนเซลล์

1. วางกระจกปิดสไลด์ลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์
2. ทำการเจือจางตัวอย่างสาหร่ายในอัตราส่วน 1:9 (สาหร่าย:น้ำ) ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจางมาปริมาณ 10 ไมโครลิตรและโหลดลงไปบนช่องระหว่างแชมเบอร์กับกระจกปิดสไลด์ น้ำตัวอย่างจะไหล ลงไปในช่องจนเต็มพื้นที่ตาราง
3. วางฮีมาไซโตมิเตอร์บนสเตทของกล้องจุลทรรศน์ ปรับเลนส์ใกล้วัตถุเป็นกำลังขยาย 40x จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ และทำการคำนวณได้จาก พื้นที่ตาราง × ความลึก

วิธีการคำนวณจำนวนเซลล์

ช่อง A B C D (รูปข-2.2) มีความกว้างและยาวเท่ากับ 1 มิลลิเมตร

ปริมาตรน้ำของช่อง A B C D เท่ากับ ความกว้าง × ความยาว × ความลึก

= 1 มิลลิเมตร × 1 มิลลิเมตร × 0.1 มิลลิเมตร

= 0.1 เซนติเมตร × 0.1 เซนติเมตร × 0.01 เซนติเมตร

= 0.0001 ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ 0.0001 มิลลิลิตร

= 10^{-4} มิลลิลิตร

ดังนั้น จำนวนเซลล์ที่นับได้ = (A + B + C + D) ÷ 4 = E

= E × 10^{-4} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ข-2 การวัดปริมาณชีวมวล

วัดปริมาณชีวมวลสาหร่ายโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ เป็นการกรองโดยใช้เครื่องดูดอากาศช่วยดูดอากาศ ทำให้ความดันในขวดบุชเนอร์ต่ำกว่าความดันเหนือกรวยบุชเนอร์ ทำให้ของเหลวจากการกรองไหลผ่านกรวยกรองด้วยดี

รูปที่ ข-3.1 เครื่องกรองสุญญากาศ

วิธีการใช้เครื่องกรองสุญญากาศ

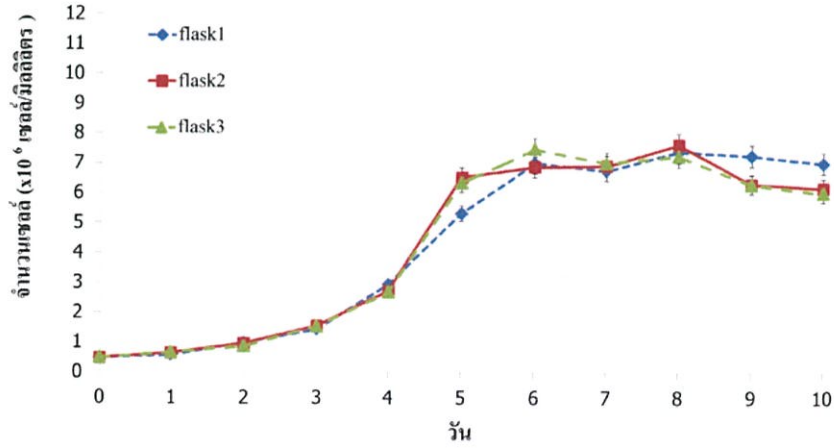
1. ต่อขวดกรองบุชเนอร์กับสายต่อท่อเครื่องปั๊มสุญญากาศ
2. ต่อข้อต่อสุญญากาศกับขวดกรองบุชเนอร์ นำกระดาษกรองไปจุ่มลงในอาหารให้ชุ่มแล้วนำไปวางตรงข้อต่อสุญญากาศ
3. นำกรวยบุชเนอร์มาวางทับแล้วหนีบเข้าด้วยคีมล็อคอลูมิเนียม
4. เปิดเครื่องปั๊มสุญญากาศ แล้วเทตัวอย่างสาหร่ายลงในชุดกรอง เครื่องจะทำการกรองให้เหลือแต่เซลล์สาหร่ายติดอยู่บนกระดาษกรอง เมื่อกรองเสร็จนำกระดาษกรองที่ได้ไปอบในตู้อบรมร้อน

ภาคผนวก ค

จำนวนเซลล์

ตารางที่ ค-1 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมลาร์

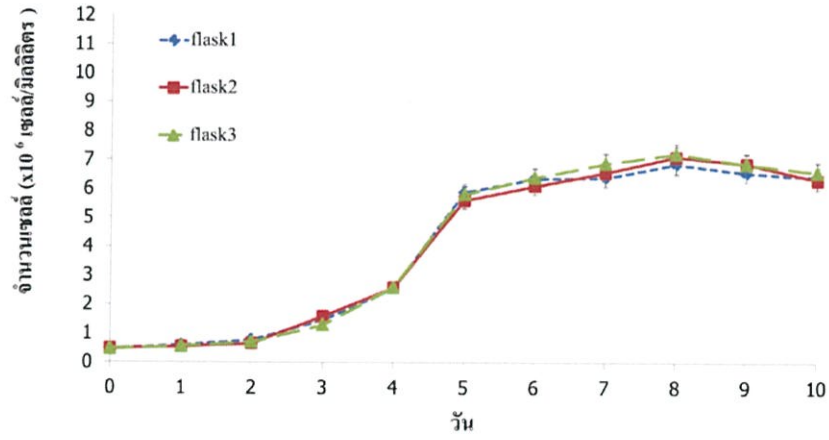
วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	12:12 (Flask 1)	12:12 (Flask 2)	12:12 (Flask 3)
0	0.47×10^6	0.47×10^6	0.48×10^6
1	0.58×10^6	0.64×10^6	0.66×10^6
2	0.98×10^6	0.96×10^6	0.86×10^6
3	1.45×10^6	1.56×10^6	1.54×10^6
4	2.95×10^6	2.73×10^6	2.69×10^6
5	5.33×10^6	6.53×10^6	6.35×10^6
6	7.02×10^6	6.88×10^6	7.48×10^6
7	6.77×10^6	6.92×10^6	7.02×10^6
8	7.40×10^6	7.63×10^6	7.25×10^6
9	7.27×10^6	6.32×10^6	6.30×10^6
10	7.02×10^6	6.18×10^6	6.02×10^6



รูปที่ ค-1 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 12:12 ชั่วโมง NaCl 1 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3)

ตารางที่ ค-2 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์

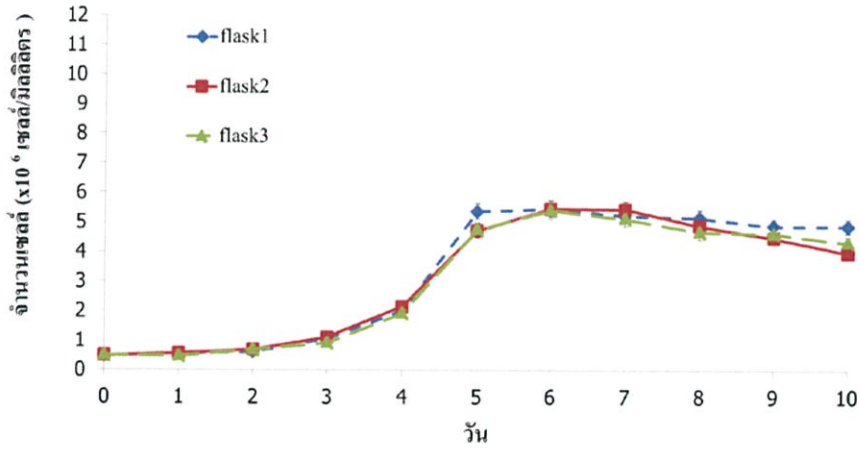
วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	12:12 (Flask 1)	12:12 (Flask 2)	12:12 (Flask 3)
0	0.48×10^6	0.48×10^6	0.47×10^6
1	0.59×10^6	0.54×10^6	0.56×10^6
2	0.77×10^6	0.65×10^6	0.70×10^6
3	1.45×10^6	1.58×10^6	1.29×10^6
4	2.56×10^6	2.58×10^6	2.58×10^6
5	5.88×10^6	5.60×10^6	5.82×10^6
6	6.37×10^6	6.10×10^6	6.40×10^6
7	6.40×10^6	6.57×10^6	6.88×10^6
8	6.87×10^6	7.12×10^6	7.22×10^6
9	6.57×10^6	6.88×10^6	6.87×10^6
10	6.42×10^6	6.32×10^6	6.58×10^6



รูปที่ ค-2 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 12:12 ชั่วโมง NaCl 1.5 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3)

ตารางที่ ค-3 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2 โมลาร์

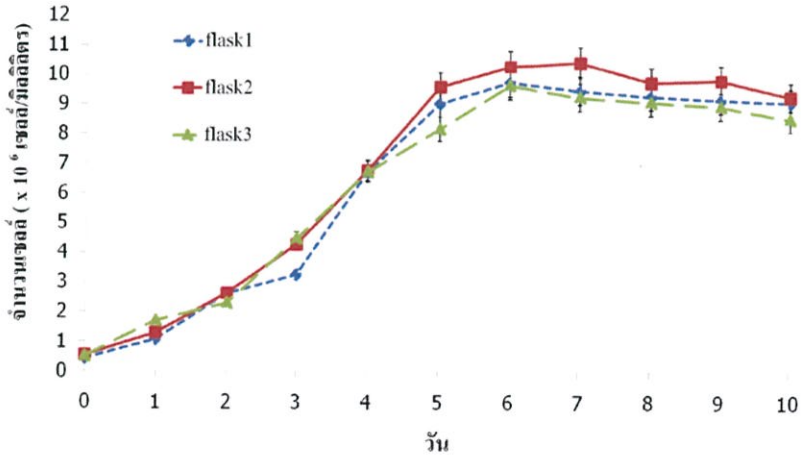
วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	12:12 (Flask 1)	12:12 (Flask 2)	12:12 (Flask 3)
0	0.47×10^6	0.48×10^6	0.47×10^6
1	0.54×10^6	0.56×10^6	0.46×10^6
2	0.60×10^6	0.69×10^6	0.68×10^6
3	1.06×10^6	1.11×10^6	0.91×10^6
4	2.02×10^6	2.16×10^6	1.92×10^6
5	5.37×10^6	4.72×10^6	4.75×10^6
6	5.47×10^6	5.47×10^6	5.40×10^6
7	5.22×10^6	5.43×10^6	5.12×10^6
8	5.15×10^6	4.88×10^6	4.67×10^6
9	4.88×10^6	4.48×10^6	4.62×10^6
10	4.87×10^6	3.97×10^6	4.31×10^6



รูปที่ ค-3 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 12:12 ชั่วโมง NaCl 2 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3)

ตารางที่ ค-4 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมลาร์

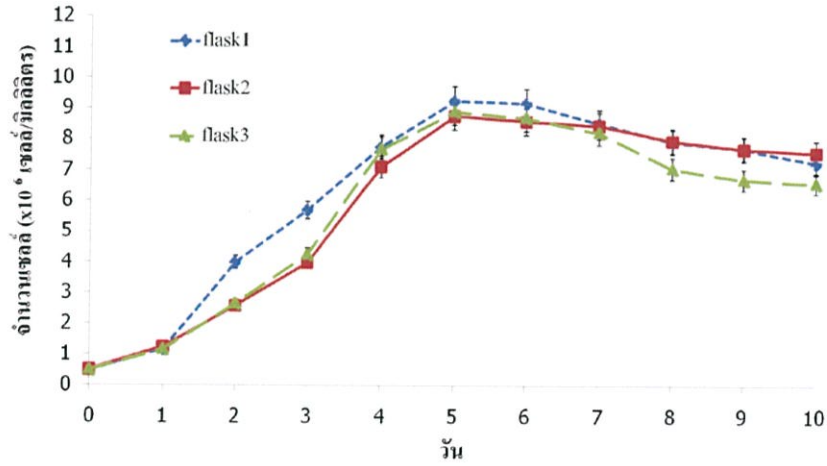
วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	16:8 (Flask1)	16:8 (Flask2)	16:8 (Flask3)
0	0.44×10^6	0.54×10^6	0.50×10^6
1	1.08×10^6	1.30×10^6	1.71×10^6
2	2.63×10^6	2.63×10^6	2.29×10^6
3	3.26×10^6	4.28×10^6	4.48×10^6
4	6.73×10^6	6.78×10^6	6.73×10^6
5	9.05×10^6	9.60×10^6	8.18×10^6
6	9.77×10^6	10.30×10^6	9.67×10^6
7	9.48×10^6	10.43×10^6	9.27×10^6
8	9.30×10^6	9.77×10^6	9.10×10^6
9	9.18×10^6	9.83×10^6	8.96×10^6
10	9.10×10^6	9.28×10^6	8.54×10^6



รูปที่ ค-4 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 16:8 ชั่วโมง NaCl 1 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3)

ตารางที่ ค-5 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์

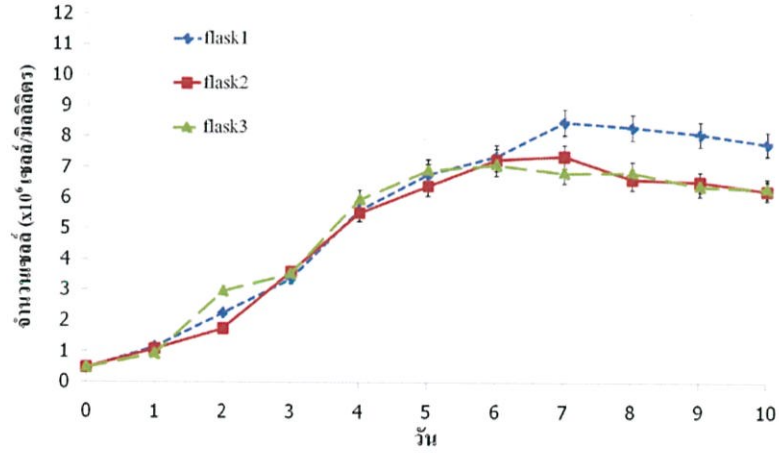
วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	16:8 (Flask1)	16:8 (Flask2)	16:8 (Flask3)
0	0.48×10^6	0.49×10^6	0.48×10^6
1	1.17×10^6	1.23×10^6	1.15×10^6
2	3.98×10^6	2.57×10^6	2.65×10^6
3	5.69×10^6	3.97×10^6	4.23×10^6
4	7.75×10^6	7.10×10^6	7.68×10^6
5	9.25×10^6	8.75×10^6	8.90×10^6
6	9.17×10^6	8.57×10^6	8.69×10^6
7	8.52×10^6	8.43×10^6	8.22×10^6
8	7.92×10^6	7.95×10^6	7.05×10^6
9	7.69×10^6	7.68×10^6	6.69×10^6
10	7.24×10^6	7.57×10^6	6.57×10^6



รูปที่ ค-5 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 16:8 ชั่วโมง NaCl 1.5 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3)

ตารางที่ ค-6 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2 โมลาร์

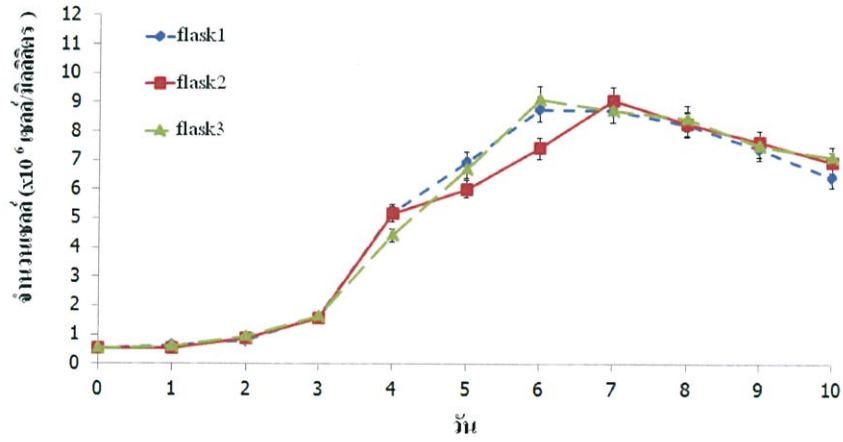
วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	16:8 (Flask1)	16:8 (Flask2)	16:8 (Flask1)
0	0.46×10^6	0.49×10^6	0.48×10^6
1	1.15×10^6	1.09×10^6	0.92×10^6
2	2.25×10^6	1.75×10^6	2.97×10^6
3	3.37×10^6	3.59×10^6	3.53×10^6
4	5.62×10^6	5.52×10^6	5.97×10^6
5	6.78×10^6	6.40×10^6	6.92×10^6
6	7.37×10^6	7.25×10^6	7.09×10^6
7	8.48×10^6	7.37×10^6	6.83×10^6
8	8.32×10^6	6.62×10^6	6.85×10^6
9	8.09×10^6	6.53×10^6	6.40×10^6
10	7.78×10^6	6.25×10^6	6.32×10^6



รูปที่ ค-5 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 16:8 ชั่วโมง NaCl 2 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3)

ตารางที่ ค-7 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมลาร์

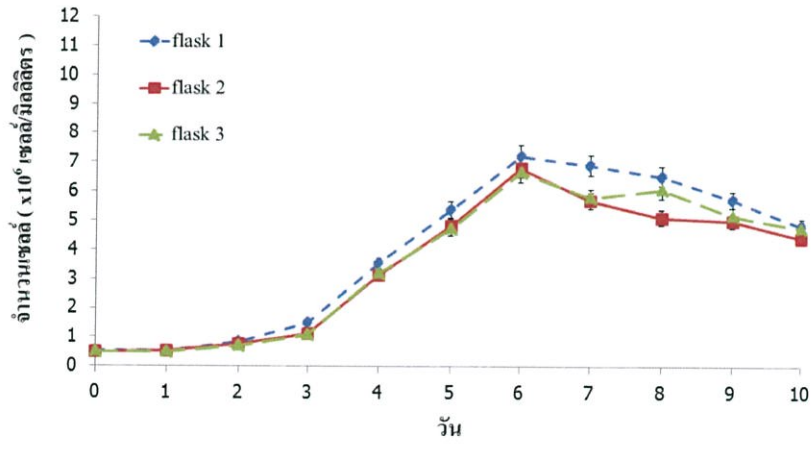
วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	24 (Flask 1)	24 (Flask 2)	24 (Flask 3)
0	0.54	0.52	0.55
1	0.64	0.54	0.60
2	0.82	0.89	0.96
3	1.60	1.57	1.64
4	5.22	5.17	4.43
5	6.95	6.02	6.72
6	8.78	7.43	9.10
7	8.73	9.08	8.73
8	8.23	8.28	8.47
9	7.40	7.67	7.50
10	6.42	6.97	7.13



รูปที่ ค-7 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 24 ชั่วโมง NaCl 1 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3)

ตารางที่ ค-8 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5โมลาร์

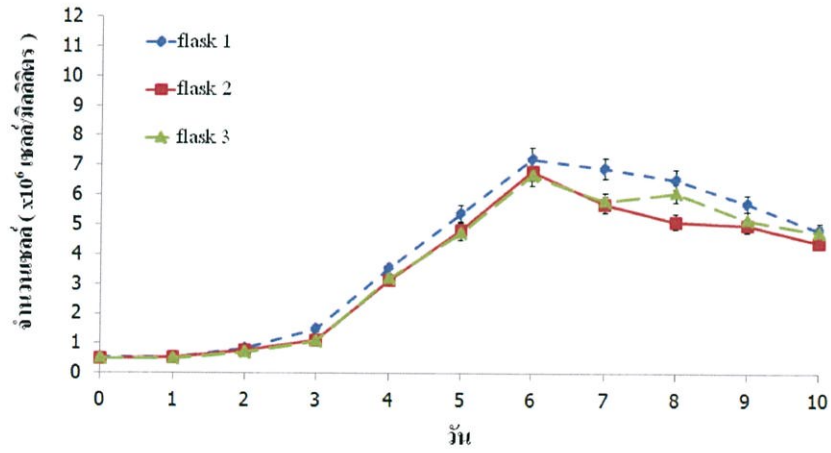
วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	24 (Flask1)	24 (Flask2)	24 (Flask3)
0	0.54×10^{6}	0.51×10^{6}	0.54
1	0.67×10^{6}	0.62×10^{6}	0.53×10^{6}
2	0.89×10^{6}	0.96×10^{6}	0.88×10^{6}
3	1.52×10^{6}	1.32×10^{6}	1.59×10^{6}
4	3.55×10^{6}	3.12×10^{6}	3.20×10^{6}
5	6.13×10^{6}	6.26×10^{6}	6.50×10^{6}
6	8.85×10^{6}	8.10×10^{6}	7.65×10^{6}
7	7.92×10^{6}	8.02×10^{6}	7.78×10^{6}
8	7.90×10^{6}	7.13×10^{6}	7.76×10^{6}
9	7.23×10^{6}	7.56×10^{6}	6.92×10^{6}
10	7.02×10^{6}	6.35×10^{6}	6.15×10^{6}



รูปที่ ค-8 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 24 ชั่วโมง NaCl 1.5 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3)

ตารางที่ ค-9 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2 โมลาร์

วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	24 (Flask 1)	24 (Flask 2)	24 (Flask 3)
0	0.53×10^6	0.51×10^6	0.51×10^6
1	0.54×10^6	0.54×10^6	0.49×10^6
2	0.85×10^6	0.78×10^6	0.70×10^6
3	1.48×10^6	1.11×10^6	1.09×10^6
4	3.55×10^6	3.12×10^6	3.20×10^6
5	5.38×10^6	4.83×10^6	4.73×10^6
6	7.23×10^6	6.82×10^6	6.67×10^6
7	6.92×10^6	5.70×10^6	5.78×10^6
8	6.53×10^6	5.11×10^6	6.08×10^6
9	5.73×10^6	5.00×10^6	5.18×10^6
10	4.82×10^6	4.42×10^6	4.75×10^6



รูปที่ ค-9 กราฟมาตราฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย แสง 24 ชั่วโมง NaCl 2 M (Flask 1) (Flask 2) และ (Flask 3)

ภาคผนวก ง

การคำนวณค่าทางสถิติ

การทดสอบความแตกต่างของจานวนเซลล์ในแต่ละการทดลอง โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

ตารางที่ ง-1 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมลาร์

วันที่	จำนวนเซลล์ (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	12:12 (Flask 1)	12:12 (Flask 2)	12:12 (Flask 3)	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.4717	0.4733	0.4817	1.4267
1	0.5800	0.6367	0.6566	1.8733
2	0.9800	0.9600	0.8600	2.8000
3	1.4467	1.5567	1.5400	4.5434
4	2.9500	2.7300	2.6900	8.3700
5	5.3333	6.5333	6.3500	18.2166
6	7.0167	6.8833	7.4833	21.3833
7	6.7667	6.9167	7.0167	20.7001
8	7.4000	7.6333	7.2500	22.2833
9	7.2667	6.3167	6.3000	19.8834
10	7.0167	6.1833	6.0167	19.2167
รวม ($Y_{.i}$)	47.2285	46.8233	46.6450	140.6968
เฉลี่ย($\overline{Y}_{.i}$)	4.2935	4.2567	4.2405	

หา ANOVA โดยคำนวณทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

Treatment เป็น ครั้งของกำรทดลอง (a) = 3

Block เป็น จำนวนวันของกำรทดลอง (b) = 11

N = ab = 33

1. ความผันแปรทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการทดลอง

$$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y_{ij}^2 - \frac{Y^2}{ab}$$

$$SS_T = \{(0.4717)^2 + (0.5800)^2 + \ldots + (6.0167)^2 - \frac{140.6968^2}{33}$$

$SS_T = 263.4667$

ค่าองศาอิสระ (df_T) = ab-1 = 32

2. ความผันแปรที่เกิดจากทรีทเมนต์

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

$$SS_{Tr} = \frac{1}{11}\{(47.2285)^2 + (46.8233)^2 + (46.6450)^2\} - \frac{140.6968^2}{33}$$

$SS_T = 0.0163$

3. ความผันแปรที่เกิดจากบลอค

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

$$SS_{Bl} = \frac{1}{3}\{(1.4267)^2 + (1.8733)^2 + \ldots + (19.2167)^2\} - \frac{140.6968^2}{33}$$

$SS_{Bl} = 261.0819$

ค่าองศาอิสระ (df_{Bl}) = b-1 = 10

4. ความผันแปรที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

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

$SS_E = 263.4667 - 0.0163 - 261.0819$

$SS_E = 2.3685$

ค่าองศาอิสระ (df_E) = (a-1)(b-1) = 20

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source	df	S	M	F_{ca}	$F_{0.05}$
Treatment	2	0.0163	0.0082	0.0693	4.10
Block	10	261.0819	26.1082	220.5084	
Error	20	2.3685	0.1184		
Total	32	263.4667			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ $H_o = \mu_1 = \mu_2$

$H_1 = \mu 1 \neq \mu_2$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10} = 4.10$

จากตาราง ANOVA ได้ค่า $F_{cal} = 0.0693$

เนื่องจากค่า F_{cal} 0.0693 มีค่าน้อยกว่าค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10}$ 4.10 ดังนั้นจึงไม่สามารถปฏิเสธ H_o แสดงว่าในแต่ละครั้งของการทดลองไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ตารางที่ ง-2 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์

วันที่	จำนวนเซลล์ (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	12:12 (Flask 1)	12:12 (Flask 2)	12:12 (Flask 3)	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.4750	0.4767	0.4683	1.4200
1	0.5900	0.5400	0.5567	1.6867
2	0.7733	0.6467	0.7000	2.1200
3	1.4533	1.5833	1.2867	4.3233
4	2.5600	2.5767	2.5833	7.7200
5	5.8833	5.6000	5.8167	17.3000
6	6.3667	6.1000	6.4000	18.8667
7	6.4000	6.5667	6.8833	19.8500
8	6.8667	7.1167	7.2167	21.2001
9	6.5667	6.8833	6.8667	20.3167
10	6.4167	6.3167	6.5833	19.3167
รวม ($Y_{.j}$)	44.3517	44.4068	45.3617	134.1202
เฉลี่ย($\bar{Y}_{.j}$)	4.0320	4.0370	4.1238	

หา ANOVA โดยคำนวณทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

Treatment เป็น ครั้งของกำรทดลอง (a) = 33

Block เป็น จำนวนวันของกำรทดลอง (b) = 11

N = ab = 33

1. ความผันแปรทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการทดลอง

$$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_T = \{(0.4750)^2 + (0.5900)^2 + \ldots + (6.5833)^2 - \frac{134.1202^2}{33}$$

SS_T = 246.0918

ค่าองศาอิสระ (df_T) = ab-1 = 32

2. ความผันแปรที่เกิดจากทรีทเมนต์

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

$$SS_{Tr} = \frac{1}{11}\{(44.3517)^2 + (44.4068)^2 + (45.3617)^2\} - \frac{134.1202^2}{33}$$

$SS_T = 0.0586$

3. ความผันแปรที่เกิดจากบลอค

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

$$SS_{Bl} = \frac{1}{3}\{(1.4200)^2 + (1.6867)^2 + \ldots + (19.3167)^2\} - \frac{134.1202^2}{33}$$

$SS_{Bl} = 245.6546$

ค่าองศาอิสระ (df_{Bl}) = b-1 = 10

4. ความผันแปรที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

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

$SS_E = 246.0918 - 0.0586 - 245.6546$

$SS_E = 0.3786$

ค่าองศาอิสระ (df_E) = (a-1)(b-1) = 20

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source	df	S	M	F_{ca}	$F_{0.05}$
Treatment	2	0.0586	0.0293	1.5500	4.10
Block	10	245.6546	24.5655	1297.7021	
Error	20	0.3786	0.0189		
Total	32	246.0918			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ $H_o = \mu_1 = \mu_2$

$H_1 = \mu 1 \neq \mu_2$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10} = 4.10$

จากตาราง ANOVA ได้ค่า $F_{cal} = 1.5500$

เนื่องจากค่า F_{cal} 1.5500 มีค่าน้อยกว่าค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10}$ 4.10 ดังนั้นจึงไม่สามารถปฏิเสธ H_o แสดงว่าในแต่ละครั้งของการทดลองไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ตารางที่ ง-3 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12:12 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2 โมลาร์

วันที่	จำนวนเซลล์ (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	12:12 (Flask 1)	12:12 (Flask 2)	12:12 (Flask 3)	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.4683	0.4817	0.4717	1.4217
1	0.5433	0.5567	0.4600	1.5600
2	0.6000	0.6867	0.6767	1.9634
3	1.0567	1.1133	0.9100	3.0800
4	2.0167	2.1567	1.9167	6.0901
5	5.3667	4.7167	4.7500	14.8334
6	5.4667	5.4667	5.4000	16.3334
7	5.2167	5.4333	5.1167	15.7667
8	5.1500	4.8833	4.6667	14.7000
9	4.8800	4.4817	4.6167	13.9784
10	4.8667	3.9667	4.3133	13.1467
รวม ($Y_{i.}$)	35.6318	33.9435	33.2985	102.8738
เฉลี่ย($\bar{Y}_{i.}$)	3.2393	3.0858	3.0249	

หา ANOVA โดยคำนวณทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

Treatment เป็น ครั้งของกำรทดลอง (a) = 33

Block เป็น จำนวนวันของกำรทดลอง (b) = 11

N = ab = 33

1.ความผันแปรทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการทดลอง

$$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_T = \{(0.4683)^2 + (0.5433)^2 + \ldots + (4.3133)^2 - \frac{102.8738^2}{33}$$

SS_T = 138.5002

ค่าองศาอิสระ (df_T) = ab-1 = 32

2. ความผันแปรที่เกิดจากทรีทเมนต์

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

$$SS_{Tr} = \frac{1}{11}\{(35.6318)^2 + (33.9435)^2 + (33.2985)^2\} - \frac{102.8738^2}{33}$$

$$SS_T = 0.2640$$

3. ความผันแปรที่เกิดจากบลอค

$$SS_{Bl} = \frac{1}{a}\sum_{j=1}^{b} Y_j^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_{Bl} = \frac{1}{3}\{(1.4217)^2 + (1.5600)^2 + \ldots + (13.1467)^2\} - \frac{102.8738^2}{33}$$

$$SS_{Bl} = 137.5043$$

ค่าองศาอิสระ (df_{Bl}) = b-1 = 10

4. ความผันแปรที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

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

$$SS_E = 138.5002 - 0.2640 - 137.5043$$

$$SS_E = 0.7319$$

ค่าองศาอิสระ (df_E) = (a-1)(b-1) = 20

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source	df	S	M	F_{ca}	$F_{0.05}$
Treatment	2	0.2640	0.1320	3.6066	4.10
Block	10	137.5043	13.7504	375.6940	
Error	20	0.7319	0.0366		
Total	32	138.5002			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ $H_o = \mu_1 = \mu_2$

$H_1 = \mu 1 \neq \mu_2$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10} = 4.10$

จากตาราง ANOVA ได้ค่า $F_{cal} = 3.6066$

เนื่องจากค่า F_{cal} 3.6066 มีค่าน้อยกว่าค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10}$ 4.10 ดังนั้นจึงไม่สามารถปฏิเสธ H_o แสดงว่าในแต่ละครั้งของการทดลองไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ตารางที่ ง-4 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมลาร์

วันที่	จำนวนเซลล์ (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	16:8 (Flask 1)	16:8 (Flask 2)	16:8 (Flask 3)	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.4367	0.54	0.5000	1.4767
1	1.0833	1.300	1.7067	4.0900
2	2.6300	2.6267	2.2967	7.5534
3	3.2633	4.2767	4.4833	12.0233
4	6.7333	6.7833	6.7333	20.2499
5	9.0500	9.6000	8.1833	26.8333
6	9.7667	10.3000	9.6667	29.7334
7	9.4833	10.4333	9.2667	29.1833
8	9.300	9.7667	9.1000	28.1667
9	9.1833	9.8300	8.9600	27.9733
10	9.100	9.2833	8.5433	26.9266
รวม ($Y_{.i}$)	70.0299	74.7400	69.4400	214.2099
เฉลี่ย($\bar{Y}_{.i}$)	6.3664	6.7946	6.31273	

หา ANOVA โดยคำนวณทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

Treatment เป็น ครั้งของกำรทดลอง (a) = 3

Block เป็น จำนวนวันของกำรทดลอง (b) = 11

N = ab = 33

1.ควมผันแปรทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการทดลอง

$$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y_{ij}^2 - \frac{Y^2}{ab}$$

$$SS_T = \{(0.4367)^2 + (1.0833)^2 + \ldots + (8.5433)^2\} - \frac{214.2099^2}{33}$$

SS_T = 409.3662

ค่าองศาอิสระ (df_T) = ab-1 = 32

2. ความผันแปรที่เกิดจากทรีทเมนต์

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

$$SS_{Tr} = \frac{1}{11}\{(70.0299)^2 + (74.7400)^2 + (69.4400)^2\} - \frac{214.2099^2}{33}$$

$$SS_T = 1.5340$$

3. ความผันแปรที่เกิดจากบลอค

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

$$SS_{Bl} = \frac{1}{3}\{(1.4767)^2 + (4.0900)^2 + \ldots + (26.9266)^2\} - \frac{214.2099^2}{33}$$

$$SS_{Bl} = 405.2711$$

ค่าองศาอิสระ (df_{Bl}) = b-1 = 10

4. ความผันแปรที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

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

$$SS_E = 409.3662 - 1.5340 - 405.2711$$

$$SS_E = 2.5611$$

ค่าองศาอิสระ (df_E) = (a-1)(b-1) = 20

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source	df	S	M	F_{ca}	$F_{0.05}$
Treatment	2	1.5340	0.7670	5.9875	4.10
Block	10	405.2711	40.5271	316.3708	
Error	20	2.5611	0.1281		
Total	32	409.3661			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ $H_o = \mu_1 = \mu_2$

$H_1 = \mu 1 \neq \mu_2$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10} = 4.10$

จากตาราง ANOVA ได้ค่า $F_{cal} = 5.9875$

เนื่องจากค่า F_{cal} 5.9875 มีค่ามากกว่าค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10}$ 4.10 ดังนั้นจึงสามารถ ปฏิเสธ H_O และยอมรับ H_1 แสดงว่าในแต่ละครั้งของการทดลองแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ตารางที่ ง-5 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์

วันที่	จำนวนเซลล์ (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	16:8 (Flask 1)	16:8 (Flask 2)	16:8 (Flask 3)	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.4800	0.4967	0.4767	1.4534
1	1.1667	1.2367	1.1500	3.5534
2	3.9833	2.5733	2.6500	9.2066
3	5.6933	3.9700	4.2333	13.8966
4	7.7500	7.1000	7.6800	22.5300
5	9.2500	8.7500	8.9000	26.9000
6	9.1667	8.5733	8.6933	26.4333
7	8.5167	8.4333	8.2167	25.1667
8	7.9167	7.9500	7.0500	22.9167
9	7.6933	7.6800	6.6933	22.0666
10	7.2367	7.5733	6.5733	21.3833
รวม ($Y_{.j}$)	68.8534	64.3366	62.3166	195.5066
เฉลี่ย($\bar{Y}_{.j}$)	6.2594	5.8488	5.6651	

หา ANOVA โดยคำนวณทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

Treatment เป็น ครั้งของกำรทดลอง (a) = 3

Block เป็น จำนวนวันของกำรทดลอง (b) = 11

N = ab = 33

1.ควมผันแปรทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการทดลอง

$$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_T = \{(0.4800)^2 + (1.1667)^2 + \ldots + (6.5733)^2\} - \frac{195.5066^2}{33}$$

SS_T = 288.8001

ค่าองศาอิสระ (df_T) = ab-1 = 32

2. ความผันแปรที่เกิดจากทรีทเมนต์

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

$$SS_{Tr} = \frac{1}{11}\{(68.8534)^2 + (64.3366)^2 + (62.3166)^2\} - \frac{195.5066^2}{33}$$

$$SS_{Tr} = 2.0367$$

3. ความผันแปรที่เกิดจากบลอค

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

$$SS_{Bl} = \frac{1}{3}\{(1.4534)^2 + (3.5534)^2 + \ldots + (21.3833)^2\} - \frac{195.5066^2}{33}$$

$$SS_{Bl} = 283.4872$$

ค่าองศาอิสระ (df_{Bl}) = b-1 = 10

4. ความผันแปรที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

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

$$SS_E = 288.8001\text{-}2.0367\text{-}283.4872$$

$$SS_E = 3.2761$$

ค่าองศาอิสระ (df_E) = (a-1)(b-1) = 20

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source	df	S	M	F_{ca}	$F_{0.05}$
Treatment	2	2.0367	1.0184	6.2173	4.10
Block	10	283.4872	28.3487	173.0690	
Error	20	3.2761	0.1638		
Total	32	288.8000			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ $H_o = \mu_1 = \mu_2$

$H_1 = \mu 1 \neq \mu_2$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10} = 4.10$

จากตาราง ANOVA ได้ค่า $F_{cal} = 6.2173$

เนื่องจากค่า F_{cal} 6.2173 มีค่ามากกว่าค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10}$ 4.10 ดังนั้นจึงสามารถ ปฏิเสธ H_o และยอมรับ H_1 แสดงว่าในแต่ละครั้งของการทดลองแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ตารางที่ ง-6 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16:8 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2 โมลาร์

วันที่	จำนวนเซลล์ (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	16:8 (Flask 1)	16:8 (Flask 2)	16:8 (Flask 3)	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.4600	0.4850	0.4783	1.4233
1	1.1467	1.0933	0.9200	3.1600
2	2.2500	1.7467	2.9667	6.9634
3	3.3700	3.5933	3.5333	10.4966
4	5.6167	5.5167	5.9667	17.1001
5	6.7833	6.4000	6.9167	20.1000
6	7.3667	7.2500	7.0900	21.7067
7	8.4833	7.3667	6.8333	22.6833
8	8.3167	6.6167	6.8500	21.7834
9	8.0933	6.5333	6.4000	21.0266
10	7.7833	6.2500	6.3167	20.3500
รวม ($Y_{.i}$)	59.6700	52.8517	54.2717	166.7934
เฉลี่ย($\bar{Y}_{.i}$)	5.4246	4.8047	4.9338	

หา ANOVA โดยคำนวณทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

Treatment เป็น ครั้งของกำรทดลอง (a) =3

Block เป็น จำนวนวันของกำรทดลอง (b) = 11

N = ab =33

1.ควมผันแปรทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการทดลอง

$$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_T = \{(0.4600)^2 + (1.1467)^2 + \ldots + (6.3167)^2\} - \frac{166.7934^2}{33}$$

SS_T = 225.6518

ค่าองศาอิสระ (df_T) = ab-1 = 32

2. ความผันแปรที่เกิดจากทรีทเมนต์

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

$$SS_{Tr} = \frac{1}{11}\{(59.6700)^2 + (52.8517)^2 + (54.2717)^2\} - \frac{166.7934^2}{33}$$

$$SS_{Tr} = 2.3529$$

3. ความผันแปรที่เกิดจากบลอค

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

$$SS_{Bl} = \frac{1}{3}\{(1.4233)^2 + (3.1600)^2 + \ldots + (20.3500)^2\} - \frac{166.7934^2}{33}$$

$$SS_{Bl} = 218.1593$$

ค่าองศาอิสระ (df_{Bl}) = b-1 = 10

4. ความผันแปรที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

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

$$SS_E = 225.6518\text{-}2.3529\text{-}218.1593$$

$$SS_E = 5.1396$$

ค่าองศาอิสระ (df_E) = (a-1)(b-1) = 20

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source	df	S	M	F_{ca}	$F_{0.05}$
Treatment	2	2.3529	1.1765	4.5778	4.10
Block	10	218.1593	21.8159	84.8868	
Error	20	5.1396	0.2570		
Total	32	288.8000			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ $H_o = \mu_1 = \mu_2$

$H_1 = \mu 1 \neq \mu_2$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10} = 4.10$

จากตาราง ANOVA ได้ค่า $F_{cal} = 4.5778$

เนื่องจากค่า F_{cal} 4.5778 มีค่ามากกว่าค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10}$ 4.10 ดังนั้นจึงสามารถ ปฏิเสธ H_o และยอมรับ H_1 แสดงว่าในแต่ละครั้งของการทดลองแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ตารางที่ ง-7 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 โมลาร์

วันที่	จำนวนเซลล์ (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	24 (Flask 1)	24 (Flask 2)	24 (Flask 3)	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.5367	0.5167	0.5467	1.6001
1	0.6367	0.5400	0.6000	1.7767
2	0.8167	0.8867	0.9600	2.6634
3	1.6000	1.5733	1.6400	4.8133
4	5.2167	5.1667	4.4333	14.8167
5	6.9500	6.0167	6.7167	19.6834
6	8.7833	7.4333	9.1000	25.3166
7	8.7333	9.0833	8.7333	26.5499
8	8.2333	8.2833	8.4667	24.9833
9	7.4000	7.6667	7.5000	22.5667
10	6.4167	6.9667	7.1333	20.5167
รวม ($Y_{i.}$)	56.3234	56.1334	58.8300	171.2868
เฉลี่ย($\bar{Y}_{i.}$)	5.0294	4.9212	5.0755	

หา ANOVA โดยคำนวณทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

Treatment เป็น ครั้งของกำรทดลอง (a) = 33

Block เป็น จำนวนวันของกำรทดลอง (b) = 11

N = ab = 33

1.ความผันแปรทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการทดลอง

$$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_T = \{(0.5367)^2 + (0.6367)^2 + \ldots + (7.1333)^2 - \frac{171.2868^2}{33}$$

SS_T = 294.8493

ค่าองศาอิสระ (df_T) = ab-1 = 32

2. ความผันแปรที่เกิดจากทรีทเมนต์

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

$$SS_{Tr} = \frac{1}{11}\{(56.3234)^2 + (56.1334)^2 + (58.8300)^2\} - \frac{171.2868^2}{33}$$

$$SS_T = 0.4118$$

3. ความผันแปรที่เกิดจากบลอค

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

$$SS_{Bl} = \frac{1}{3}\{(1.6001)^2 + (1.7767)^2 + \ldots + (20.5167)^2\} - \frac{171.2868^2}{33}$$

$$SS_{Bl} = 291.9786$$

ค่าองศาอิสระ (df_{Bl}) = b-1 = 10

4. ความผันแปรที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

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

$$SS_E = 294.8493 - 0.4118 - 291.9786$$

$$SS_E = 2.4588$$

ค่าองศาอิสระ (df_E) = (a-1)(b-1) = 20

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source	df	S	M	F_{ca}	$F_{0.05}$
Treatment	2	0.4118	0.2059	1.6753	4.10
Block	10	291.9786	29.1979	237.5745	
Error	20	2.4588	0.1229		
Total	32	294.8493			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ $H_o = \mu_1 = \mu_2$

$H_1 = \mu 1 \neq \mu_2$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10} = 4.10$

จากตาราง ANOVA ได้ค่า $F_{cal} = 1.6753$

เนื่องจากค่า F_{cal} 1.6753 มีค่าน้อยกว่าค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10}$ 4.10 ดังนั้นจึงไม่สามารถปฏิเสธ H_o แสดงว่าในแต่ละครั้งของการทดลองไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ตารางที่ ง-8 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.5 โมลาร์

วันที่	จำนวนเซลล์ (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	24 (Flask 1)	24 (Flask 2)	24 (Flask 3)	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.5433	0.5100	0.5367	1.5900
1	0.6767	0.6233	0.5333	1.8333
2	0.8867	0.9633	0.8833	2.7333
3	1.5233	1.3233	1.5853	4.4319
4	3.5500	3.1167	3.2000	9.8667
5	6.1333	6.2667	6.5000	18.9000
6	8.8500	8.1000	7.6500	24.6000
7	7.9167	8.0167	7.7833	23.7167
8	7.9000	7.1333	7.7667	22.8000
9	7.2333	7.5667	6.9167	21.7167
10	7.0167	6.3500	6.1500	19.5167
รวม ($Y_{.j}$)	52.2300	49.9700	49.5053	151.7053
เฉลี่ย($\bar{Y}_{.j}$)	4.7482	4.5427	4.5005	

หา ANOVA โดยคำนวณทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

Treatment เป็น ครั้งของกำรทดลอง (a) = 33

Block เป็น จำนวนวันของกำรทดลอง (b) = 11

N = ab = 33

1.ความผันแปรทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการทดลอง

$$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_T = \{(0.5433)^2 + (0.6767)^2 + \ldots + (6.1500)^2 - \frac{151.7053^2}{33}$$

SS_T = 313.7269

ค่าองศาอิสระ (df_T) = ab-1 = 32

2. ความผันแปรที่เกิดจากทรีทเมนต์

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

$$SS_{Tr} = \frac{1}{11}\{(52.2300)^2 + (49.9700)^2 + (49.5053)^2\} - \frac{151.7053^2}{33}$$

$$SS_{Tr} = 0.3863$$

3. ความผันแปรที่เกิดจากบลอค

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

$$SS_{Bl} = \frac{1}{3}\{(1.5900)^2 + (1.8333)^2 + \ldots + (19.5167)^2\} - \frac{151.7053^2}{33}$$

$$SS_{Bl} = 311.7783$$

ค่าองศาอิสระ (df_{Bl}) = b-1 = 10

4. ความผันแปรที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

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

$$SS_E = 313.7269 - 0.3863 - 311.7783$$

$$SS_E = 1.5623$$

ค่าองศาอิสระ (df_E) = (a-1)(b-1) = 20

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source	df	S	M	F_{ca}	$F_{0.05}$
Treatment	2	0.3863	0.1932	2.4738	4.10
Block	10	311.7783	31.1778	399.2036	
Error	20	1.5623	0.0781		
Total	32	313.7269			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ $H_o = \mu_1 = \mu_2$

$H_1 = \mu 1 \neq \mu_2$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10} = 4.10$

จากตาราง ANOVA ได้ค่า $F_{cal} = 2.4738$

เนื่องจากค่า F_{cal} 2.4738 มีค่าน้อยกว่าค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10}$ 4.10 ดังนั้นจึงไม่สามารถปฏิเสธ H_o แสดงว่าในแต่ละครั้งของการทดลองไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ตารางที่ ง-9 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 24 ชั่วโมง ในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2 โมลาร์

วันที่	จำนวนเซลล์ (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			
	24 (Flask 1)	24 (Flask 2)	24 (Flask 3)	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.5300	0.5100	0.5067	1.5467
1	0.5400	0.5367	0.4867	1.5634
2	0.8533	0.7767	0.7033	2.3333
3	1.4833	1.1133	1.0867	3.6833
4	3.5500	3.1167	3.2000	9.8667
5	5.3833	4.8333	4.7333	14.9499
6	7.2333	6.8167	6.6667	20.7167
7	6.9167	5.7000	5.7833	18.4000
8	6.5333	5.1100	6.0833	17.7266
9	5.7333	5.0000	5.1833	15.9166
10	4.8167	4.4167	4.7500	13.9834
รวม ($Y_{.j}$)	43.5732	37.9301	39.1833	120.6866
เฉลี่ย($\bar{Y}_{.j}$)	3.9612	3.4482	3.5621	

หา ANOVA โดยคำนวณทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

Treatment เป็น ครั้งของกำรทดลอง (a) = 33

Block เป็น จำนวนวันของกำรทดลอง (b) = 11

N = ab = 33

1.ความผันแปรทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการทดลอง

$$SS_T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_T = \{(0.5300)^2 + (0.5400)^2 + \ldots + (4.7500)^2 - \frac{120.6866^2}{33}$$

SS_T = 186.8111

ค่าองศาอิสระ (df_T) = ab-1 = 32

2. ความผันแปรที่เกิดจากทรีทเมนต์

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

$$SS_{Tr} = \frac{1}{11}\{(43.5732)^2 + (37.9301)^2 + (39.1833)^2\} - \frac{120.6866^2}{33}$$

$$SS_{Tr} = 1.5970$$

3. ความผันแปรที่เกิดจากบลอค

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

$$SS_{Bl} = \frac{1}{3}\{(1.5467)^2 + (1.5634)^2 + \ldots + (13.9834)^2\} - \frac{120.6866^2}{33}$$

$$SS_{Bl} = 183.8108$$

ค่าองศาอิสระ (df_{Bl}) = b-1 = 10

4. ความผันแปรที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

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

$$SS_E = 186.8111 - 1.597 - 183.8108$$

$$SS_E = 1.4038$$

ค่าองศาอิสระ (df_E) = (a-1)(b-1) = 20

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source	df	S	M	F_{ca}	$F_{0.05}$
Treatment	2	1.5970	0.7985	11.3746	4.10
Block	10	183.8108	18.3811	261.8390	
Error	20	1.4038	0.0702		
Total	32	186.8111			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ $H_o = \mu_1 = \mu_2$

$H_1 = \mu 1 \neq \mu_2$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10} = 4.10$

จากตาราง ANOVA ได้ค่า $F_{cal} = 11.3746$

เนื่องจากค่า F_{cal} 11.3746 มีค่ามากกว่าค่าวิกฤต $F_{0.05;2,10}$ 4.10 ดังนั้นจึงสามารถ ปฏิเสธ H_o และยอมรับ H_1 แสดงว่าในแต่ละครั้งของการทดลองแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ตารางที่ ง-10 แสดงปริมาณชีวมวลในวันที่ 4 ของการวัดการเจริญของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน

ปริมาณชีวมวลแสง12 : มืด 12 ชั่วโมง (g/l)	ปริมาณชีวมวลแสง16 : มืด 8 ชั่วโมง (g/l)	ปริมาณชีวมวลแสง24 : มืด 0 ชั่วโมง (g/l)
0.0800	0.1000	0.1100
0.0600	0.1100	0.1000
0.0700	0.0900	0.1200

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ One way anova โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.003	2	0.001	13.000	0.007
Within Groups	0.001	6	0.000		
Total	0.003	8			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ Ho = $\mu 1 = \mu 2 = \mu 3$

H1 = $\mu 1 \neq \mu 2 \neq \mu 3$

จากผลการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า F_{cal} 13.000 มีค่ามากกว่า α 0.05 = 5.14 แสดงว่าปฏิเสธ Ho นั้นคือ H1 = $\mu 1 \neq \mu 2 \neq \mu 3$ (ในวันที่ 4 ของการวัดปริมาณชีวมวล พบว่าปริมาณชีวมวลของสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาแสงที่ต่างๆ แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ ง-11 แสดงปริมาณชีวมวลในวันที่ 6 ของการวัดการเจริญของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน

ปริมาณชีวมวลแสง12 : มืด 12 ชั่วโมง (g/l)	ปริมาณชีวมวลแสง16 : มืด 8 ชั่วโมง (g/l)	ปริมาณชีวมวลแสง24 : มืด 0 ชั่วโมง (g/l)
0.1	0.14	0.12
0.08	0.16	0.15
0.08	0.18	0.15

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ One way anova โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.009	2	0.004	15.520	0.004
Within Groups	0.002	6	0.000		
Total	0.010	8			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ Ho = $\mu 1 = \mu 2 = \mu 3$

$H1 = \mu 1 \neq \mu 2 \neq \mu 3$

จากผลการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า F_{cal} 15.520 มีค่ามากกว่า α 0.05 = 5.14 แสดงว่าปฏิเสธ Ho นั้นคือ $H1 = \mu 1 \neq \mu 2 \neq \mu 3$ (ในวันที่ 6 ของการวัดปริมาณชีวมวล พบว่าปริมาณชีวมวลของสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาแสงที่ต่างๆ แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ ง-12 แสดงปริมาณชีวมวลในวันที่ 9 ของการวัดการเจริญของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงที่แตกต่างกัน

ปริมาณชีวมวลแสง12 : มืด 12 ชั่วโมง (g/l)	ปริมาณชีวมวลแสง16 : มืด 8 ชั่วโมง (g/l)	ปริมาณชีวมวลแสง24 : มืด 0 ชั่วโมง (g/l)
0.09	0.09	0.13
0.13	0.15	0.14
0.13	0.15	0.11

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ One way anova โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.000	2	0.000	0.220	0.808
Within Groups	0.004	6	0.001		
Total	0.004	8			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ Ho = $\mu 1 = \mu 2 = \mu 3$

H1 = $\mu 1 \neq \mu 2 \neq \mu 3$

จากผลการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า F_{cal} 0.220 มีค่าน้อยกว่า α 0.05 = 5.14 แสดงว่ายอมรับ Ho นั้นคือ Ho = $\mu 1 = \mu 2 = \mu 3$ (ในวันที่ 9 ของการวัดปริมาณชีวมวล พบว่าปริมาณชีวมวลของสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาแสงที่ต่างๆ ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ ง-13 แสดงค่าทางสถิติเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ *D.salina* KU11 ที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาการให้แสงและอาหาร Modified Ramaraj (RM) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: อัตราจำเพาะ

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	0.136[a]	8	.017	.771	0.633
Intercept	179.622	1	179.622	8131.347	0.000
ระยะเวลาแสง	0.046	2	0.023	1.030	0.377
ความเข้มข้นNaCl	0.023	2	0.011	0.520	0.603
ระยะเวลาแสง * ความเข้มข้นNaCl	0.068	4	0.017	0.766	0.561
Error	0.398	18	0.022		
Total	180.155	27			
Corrected Total	0.534	26			

a. R Squared = .255 (Adjusted R Squared = -.076)

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

กำหนดให้ Ho = $\mu 1 = \mu 2 = \mu 3$

H1 = $\mu 1 \neq \mu 2 \neq \mu 3$

จากตารางผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า F_{cal} 0.766 และมีค่า Sig = 0.561 น้อยกว่า α 0.05 = 6.94 แสดงว่าปฏิเสธ Ho นั้นคือ H1 = $\mu 1 \neq \mu 2 \neq \mu 3$ การวัดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยระยะเวลาแสงและอาหาร RM ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน มีอย่างน้อย 1 คู่สภาวะที่การเจริญเติบโตแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ ง-14 จำนวนเซลล์เฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 12 : มืด 12 ชั่วโมง

วันที่	จำนวนเซลล์เฉลี่ย (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			SD (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	NaCl 1M	NaCl 1.5M	NaCl 2M	NaCl 1M	NaCl 1.5M	NaCl 2M
0	0.4755	0.4733	0.4739	0.0054	0.0044	0.0070
1	0.6244	0.5622	0.5200	0.0397	0.0255	0.0524
2	0.9333	0.7067	0.6545	0.0643	0.0636	0.0474
3	1.5145	1.4411	1.0267	0.0593	0.1487	0.1049
4	2.7900	2.5733	2.0300	0.1400	0.0120	0.1206
5	6.0722	5.7667	4.9445	0.6464	0.1481	0.3660
6	7.1278	6.2889	5.4445	0.3150	0.1644	0.0385
7	6.9000	6.6167	5.2556	0.1258	0.2455	0.1618
8	7.4278	7.0667	4.9000	0.1932	0.1803	0.2421
9	6.6278	6.7722	4.6595	0.5534	0.1782	0.2026
10	6.4056	6.4389	4.3822	0.5358	0.1347	0.4539

ตารางที่ ง-15 จำนวนเซลล์เฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ *D. salina* KU11 ภายใต้ระยะเวลาแสง 16 : มืด 8 ชั่วโมง

วันที่	จำนวนเซลล์เฉลี่ย (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			SD (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	NaCl 1M	NaCl 1.5M	NaCl 2M	NaCl 1M	NaCl 1.5M	NaCl 2M
0	0.4922	0.4845	0.4744	0.2703	0.2429	0.1323
1	1.3633	1.1845	1.0533	0.2781	0.7009	0.4535
2	2.5178	3.0689	2.3211	0.3459	1.3484	1.3772
3	4.0078	4.6322	3.4989	0.5199	2.1436	2.0712
4	6.7500	7.5100	5.7000	1.1351	3.5708	3.2169
5	8.9444	8.9667	6.7000	2.7085	4.4340	3.2323
6	9.9111	8.8111	7.2356	3.0854	5.0554	2.9089
7	9.7278	8.3889	7.5611	2.9170	4.9242	2.7681
8	9.3889	7.6389	7.2611	2.7073	4.7326	2.4789
9	9.3244	7.3555	7.0089	2.5803	4.7319	2.3915
10	8.9755	7.1278	6.7833	2.3656	4.4715	2.3864

ตารางที่ ง-16 จำนวนเซลล์เฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ *D. salina* KU11 ภายใต้

ระยะเวลาแสง 24 : มืด 0 ชั่วโมง

วันที่	จำนวนเซลล์เฉลี่ย (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)			SD (*10^6เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	NaCl 1M	NaCl 1.5M	NaCl 2M	NaCl 1M	NaCl 1.5M	NaCl 2M
0	0.5334	0.5300	0.5156	0.0153	0.0176	0.0126
1	0.5922	0.6111	0.5211	0.0488	0.0725	0.0299
2	0.8878	0.9111	0.7778	0.0717	0.0452	0.0750
3	1.6044	1.4773	1.2278	0.0336	0.1369	0.2217
4	4.9389	3.2889	3.2889	0.4386	0.2299	0.2299
5	6.5611	6.3000	4.9833	0.4857	0.1856	0.3500
6	8.4389	8.2000	6.9056	0.8851	0.6062	0.2936
7	8.8500	7.9056	6.1333	0.2021	0.1171	0.6797
8	8.3278	7.6000	5.9089	0.1229	0.4096	0.7275
9	7.5222	7.2389	5.3055	0.1347	0.3250	0.3816
10	6.8389	6.5056	4.6611	0.3750	0.4538	0.2143

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 27 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว ช่อผกา บุญเลิศ รหัสประจำตัว 57050677

นาย/นาง/นางสาว ฑิตฐิตา จันทร์พยัพ รหัสประจำตัว 57050681

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย ศึกษาผลกระทบของแสงและความเค็มต่อการเจริญเติบโตและชีวมวลของ Dunaliella salina KU11

ชื่อภาษาอังกฤษ Effect of Photoperiod and salinity on growth and biomass of Dunaliella salina KU11

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.00 % หรือโปรแกรม Turnitin 0.00 %

ลงชื่อ ช่อผกา บุญเลิศ ลงชื่อ ฑิตฐิตา จันทร์พยัพ

(น.ส.ช่อผกา บุญเลิศ) (น.ส.ฑิตฐิตา จันทร์พยัพ)

นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า ศ. / รศ. / ผศ. / ดร. / อ. วิภารี เดชศิลัคิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....

อาจารย์ที่ปรึกษา