

การศึกษาสภาวะเหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสาหร่าย *Chlorella sp.*

นางสาวป้าจารย์ อินทรทองคำ

นางสาวนิตา พนายิ่งไพศาล

นายพงศ์อนันต์ คงคารา



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.พ.

๒๕๔๓

พ.ศ. ๒๕๓๙

๕๓๑

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 28146

วัน, เดือน, ปี 17 ก.ค. 2540

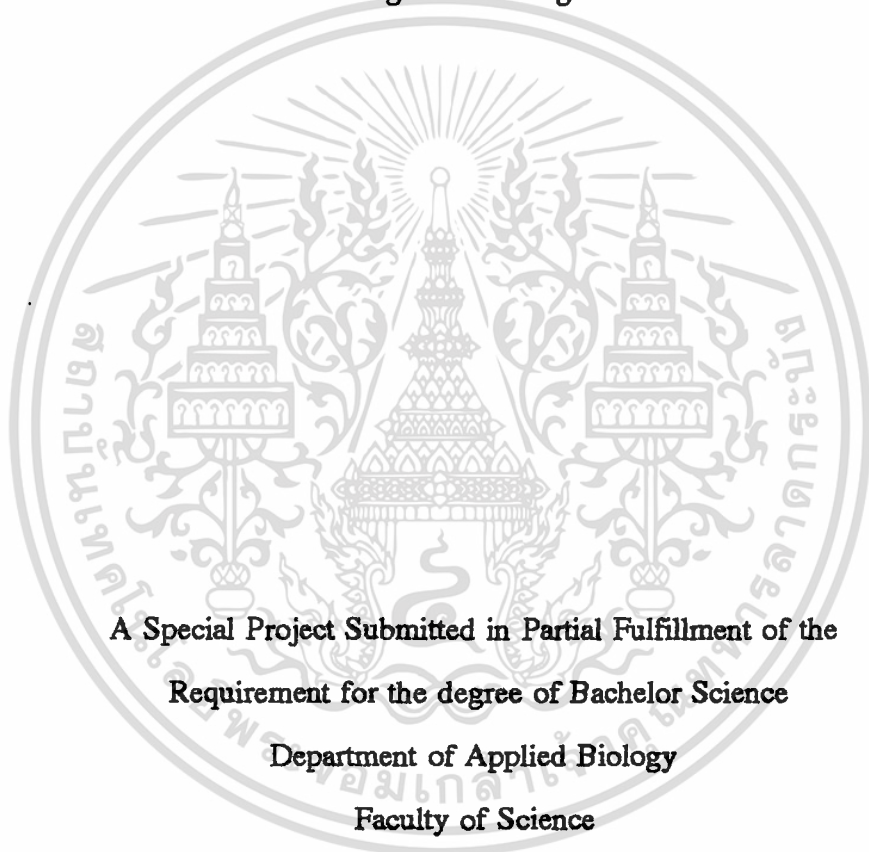
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Optimization of growth and mass cultivation in microalgae, *Chlorella* sp.**

**Miss Pajaree Intarathongkhom**

**Miss Wanida Phanayingphaisal**

**Mr. Ponganun Khongdara**



**A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the  
Requirement for the degree of Bachelor Science  
Department of Applied Biology  
Faculty of Science**

**King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang**

**1996**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp.
นักศึกษา	นางสาวปจารีย์ อินทรทองคำ นางสาววนิดา พนายิ่งไพศาล นายพงศ์อนันต์ คงคารา
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์วีณา ชูโชติ อาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2539

## บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. โดยการคัดเลือกจากธรรมชาติ 3 สายพันธุ์ นำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร N-8 ใช้แหล่งไนโตรเจน 3 แหล่ง คือ โปแตสเซียมไนเตรต ไกลซีน และยูเรีย ให้ความเข้มแสง 3 ระดับ คือ 400 ลักซ์ 1400 ลักซ์ และ 2400 ลักซ์ วัตถุประสงค์การเจริญเติบโตทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 15 วัน ด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นับจำนวนเซลล์ และการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. สายพันธุ์ที่ 1 เาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์ การเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 15 วัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 1.596 นับจำนวนเซลล์ได้เท่ากับ  $13.85 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งวัดได้เท่ากับ 1.69 กรัมต่อลิตร

Project Title Optimization of growth and mass cultivation in microalgae ,  
*Chlorella sp.*

Name Miss Pajaree Intaratongkhom  
 Miss Wanida Phanayingphaisal  
 Mr. Ponganun Kongdara

Special Project Advisor Mrs. Weena Choochote  
 Mr. Mongkol Phensajjai

Department Applied Biology

Academic Year 1996

### Abstract

Three strains of *Chlorella* were selected and N-8 medium was used to medium optimization. Potassiumnitrate glycine and urea were used as nitrogen source and the culture were cultivated with the light intensity of 400 , 1400 , 2400 lux. Cell growth of all the cultures was determined every 24 h. by cell dry weight , total cell count and absorbence at 550 nm. for 15 days . The maximum growth was obtained from *Chlorella* strain No. 1 with 1.69 g/l cell dry weight ,  $13.85 \times 10^6$  cells/l and 1.596 absorbence density .

### กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ยวีณา ชูโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ และอาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รวมทั้งอาจารย์ทุกท่านที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา คำแนะนำ และชี้แนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ และเพื่อนนักศึกษา ที่ได้ช่วยเหลือเป็นกำลังใจ กำลังความคิด ตลอดจนให้ความร่วมมือในเรื่องต่าง ๆ อย่างดียิ่ง

คณะผู้จัดทำ  
มีนาคม 3540



## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
-วัตถุประสงค์	2
-ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
-ลักษณะทั่วไปของสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i>	4
-องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i>	5
-ประโยชน์ของสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i>	8
-การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> ในประเทศไทย	11
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย	13
3.1 อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i>	13
3.2 วิธีการทดลอง	13
-การเก็บตัวอย่างสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> จากแหล่งน้ำธรรมชาติ	13
-การแยกสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> ให้บริสุทธิ์	13
-การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> ในอาหารเหลว	14
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	15
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและขอเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 องค์ประกอบหลักของสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i>	5
2-2 วิตามินและเกลือแร่ในสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i>	5
2-3 กรดไขมันในสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i>	6
2-4 กรดอะมิโนในสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i>	7
4-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> หลังการเพาะเลี้ยง 15 วัน	40
4-2 แสดงจำนวนเซลล์( $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)ของสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> หลังการเพาะเลี้ยง 15 วัน	41
4-3 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)ของสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> หลังการเพาะเลี้ยง 15 วัน	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2-1 แสดงการสืบพันธุ์โดยการสร้างอโอสปอร์	4
4-1 กระจกน้ำตึกพระเทพ	18
4-2 กระจกน้ำตึกแดง	19
4-3 กระจกน้ำสวนลาดกระบัง	20
4-4 สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค spread plate และเทคนิค streak plate	21
4-5 หลอดอาหารเลี้ยงเก็บสายพันธุ์สาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. บริสุทธิ์	22
4-6 หัวเชื้อสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ในอาหารเหลว	23
4-7 ชั้นเลี้ยงสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp.	24
4-8 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์	25
4-9 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ที่ระดับความเข้มแสง 1400 ลักซ์	26
4-10 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์	27
4-11 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ที่ระดับความเข้ม 2400 ลักซ์	28
4-12 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ที่ระดับความเข้ม 1400 ลักซ์	29
4-13 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ที่ระดับความเข้ม 400 ลักซ์	30
4-14 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์	31
4-15 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์	32
4-16 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ในอาหารสูตรที่ 3 ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์	33
4-17 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ ( $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)ของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์	34

รูปที่	หน้า
4-18 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ ( $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)ของสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> ที่ระดับความเข้มแสง 1400 ลักซ์	35
4-19 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ ( $\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)ของสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์	36
4-20 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร) ของสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์	37
4-21 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร) ของสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> ที่ระดับความเข้มแสง 1400 ลักซ์	38
4-22 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร) ของสาหร่าย <i>Chlorella sp.</i> ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์	39



## บทที่ 1

### บทนำ

ในปัจจุบันนี้กำลังประสบปัญหาการขาดแคลนอาหารของประชากรโลก และปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ ซึ่งเป็นปัญหาที่นักวิทยาศาสตร์ และนักวิจัยทั่วโลกต่างให้ความสนใจในการศึกษาค้นคว้า เพื่อหาวิธีแก้ไข และสาหร่ายสีเขียวก็เป็นแหล่งหนึ่งที่ได้ถูกศึกษาอย่างต่อเนื่องมาเป็นระยะเวลาช้านาน จนกระทั่งเกิดเป็นเทคโนโลยีของสาหร่าย(algotechnology)ขึ้นมา ทั้งนี้เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวมีศักยภาพสูงในการนำมาใช้ประโยชน์ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ และในขณะเดียวกันก็ช่วยลดชั้นสารพิษในน้ำ จึงเป็นการช่วยรักษาสภาพแวดล้อมได้ทางหนึ่ง นอกจากนี้ในสาหร่ายจะมีสารบางชนิดที่สามารถสกัดออกมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และเภสัชได้ด้วย

มนุษย์ได้รู้จักสาหร่ายมาเป็นเวลาช้านานแล้ว แต่ได้มีการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์น้อยมาก ซึ่งส่วนใหญ่จะนำมาใช้เป็นอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยเฉพาะในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอยู่อย่างมากมาย การเพาะเลี้ยง โดยการให้อาหาร จะทำให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตสูงกว่าการปล่อยให้สัตว์น้ำหากินตามธรรมชาติ อาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำนั้นจะมีอยู่ 2 ประเภท ได้แก่ อาหารสำเร็จรูป และอาหารที่มีชีวิต การใช้อาหารสำเร็จรูปนั้นจะก่อให้เกิดมลภาวะแก่ น้ำ เนื่องจากการที่มีอาหารเหลือตกค้างจะก่อให้เกิดการเน่าเสียในบ่อเลี้ยง ทำให้สัตว์น้ำเป็นโรค และตายได้ สำหรับการใช้อาหารที่มีชีวิต ซึ่งได้แก่พวกสาหร่ายสีเขียว จะไม่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของน้ำในบ่อเลี้ยง ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเพียงพอแก่ความต้องการ จึงมีการพัฒนาและควบคุมการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะเพิ่มปริมาณสาหร่ายได้สูงสุด เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการ

### วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella sp.* จากธรรมชาติ ที่มีอัตราการเจริญเติบโตได้สูง
2. เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารและระดับความเข้มข้นที่ทำให้สาหร่าย *Chlorella sp.* มีอัตราการเจริญสูง

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella sp.* จากแหล่งน้ำตามธรรมชาติให้บริสุทธิ์ และนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการได้
2. สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ จะสามารถนำไปเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่าย *Chlorella sp.* ในระดับนอกห้องปฏิบัติการได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### การตรวจเอกสาร

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรก ๆ ที่เกิดขึ้นมาบนโลกนี้ มีอายุนับพันล้านปีมาแล้ว มีบทบาทสำคัญทางด้านนิเวศวิทยา และห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิตซึ่ง สาหร่ายจะเป็นผู้ผลิตเบื้องต้น (สิริรัตน์, 2525) สาหร่ายสีเขียว (grass-green algae) ซึ่งจัดอยู่ในดิวิชันคลอโรไฟตา สาหร่ายในดิวิชันนี้จะมีสีเขียวเหมือนหญ้า และมีส่วนประกอบของรงควัตถุเหมือนกับพืชชั้นสูง ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ (กาญจนเกษม, 2527) สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย ในทะเล และบนพื้นดิน จะมีขนาดตั้งแต่เล็กมากซึ่งประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว (unicellular) ไปจนถึงขนาดใหญ่ที่มีลักษณะเป็นต้นหรือทาลัส พวกที่มีขนาดใหญ่มักจะมีส่วนคล้ายรากส่วนพวกที่มีขนาดเล็กมักจะมีลักษณะเป็นแพลงก์ตอน ซึ่งจะเป็อาหารของสัตว์น้ำ

จากคุณสมบัติในการเจริญเติบโตที่รวดเร็วของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว จึงได้มีการนำมาศึกษาเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้สูงสุด ซึ่งสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่มีการศึกษากันได้แก่ สาหร่าย *Chlorella sp.* เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้ง่าย และให้ผลผลิตสูงภายในระยะเวลาอันสั้นและทนต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ดี และมีคุณค่าทางอาหารสูง ในช่วงระยะเวลาแรกๆ นั้นนักวิทยาศาสตร์จะให้ความสนใจในเรื่องการผลิตเซลล์สาหร่าย เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหาร ได้เริ่มมีการเพาะเลี้ยง *Chlorella sp.* ขนาดใหญ่อย่างจริงจังในประเทศเยอรมัน ซึ่งอยู่ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 แต่ความไม่แน่นอนของสภาพภูมิอากาศทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่คงที่ (Becker, 1994) นับเป็นจุดเริ่มต้นที่ ทำให้เกิดการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ได้ผลผลิตปริมาณเซลล์ต่อหน่วยพื้นที่ ในการผลิตมีค่าสูงสุด และได้มีการศึกษามาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีเพียงประเทศที่พัฒนาแล้วบางประเทศที่ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยง *Chlorella sp.* ขนาดใหญ่ ส่วนประเทศที่กำลังพัฒนาอีกหลาย ๆ ประเทศยังประสบกับปัญหาในการนำเทคโนโลยีที่เหมาะสมไปใช้ในการเพาะเลี้ยงภายนอกห้องปฏิบัติการ

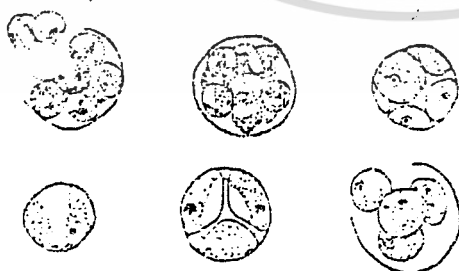
### ลักษณะทั่วไปของสาหร่าย *Chlorella sp.*

สาหร่าย *Chlorella sp.* เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวมีขนาดประมาณ 2.5-3.5 ไมครอน (อิทธิพร,2532) มีโปรตีนสูงประมาณ 64.15 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีลักษณะกลม มีผนัง 2 ชั้น และภายในมีเม็ดคลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วยสามารถสังเคราะห์แสงได้ ซึ่งภายในคลอโรพลาสต์จะพบเม็ดแป้ง (Pyrenoids) จำนวนเม็ดแป้งนี้จะเป็นตัวกำหนดชนิด (Species) ของสาหร่าย *Chlorella sp.* (สิริรัตน์,2525) เมื่อมีปริมาณสาหร่าย *Chlorella sp.* เป็นจำนวนมากในแหล่งน้ำ จะทำให้น้ำมีสีเขียว จึงมีการเรียกกันโดยทั่ว ๆ ไปว่า น้ำเขียว

สำหรับการจัดเรียงตามหลักอนุกรมวิธานของ สาหร่าย *Chlorella sp.* คือ (อิทธิพร,2525)

Phylum	Chlorophyta
Subphylum	Chlorophyceae
Order	Chlorococcales
Family	Oocystaceae
Genus	<i>Chlorella</i>

การสืบพันธุ์ของสาหร่าย *Chlorella sp.* ยังไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศพบเพียงแต่ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างออโตสปอร์ (autospore) (Marold,1978) โดยเซลล์ เดิมจะแบ่งนิวเคลียสในเซลล์เดิม (multinucleate cell) โดยอาจจะเพิ่มเป็น 4 เซลล์ 8 เซลล์ หรือ 16 เซลล์เป็นต้น จากนั้นนิวเคลียสแต่ละอันจะเจริญเติบโตเป็นเซลล์ใหม่ปล่อยออกสู่ภายนอก ออโตสปอร์จะมีขนาดรูปร่างเหมือนเซลล์เดิมทุกประการแต่มีขนาดเล็กกว่า (ภาพที่ 2 -1 )



ภาพที่ 2-1 แสดงการสืบพันธุ์โดยการสร้างออโตสปอร์

องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย *Chlorella sp.*ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบหลักของสาหร่าย *Chlorella sp.* (Steenblock.R,1981)

องค์ประกอบ	สัดส่วนองค์ประกอบโดยเปอร์เซ็นต์
ความชื้น	3.6 %
โปรตีน	60.5 %
ไขมัน	11.0 %
คาร์โบไฮเดรต	20.1 %
เส้นใย	0.2 %
เถ้า	4.6 %
แคลลอรี่	461/100 กรัม

ตารางที่ 2-2 วิตามินและเกลือแร่ในสาหร่าย *Chlorella sp.* (Steenblock.R,1981)

วิตามินและเกลือแร่	ปริมาณที่พบ
วิตามินเอ	55500 หน่วย/100 กรัม
บีต้า-แคโรทีน	180.8 มิลลิกรัม/100 กรัม
คลอโรฟิลล์เอ	1469.0 มิลลิกรัม/100 กรัม
คลอโรฟิลล์บี	613.0 มิลลิกรัม/100 กรัม
โทอะมีน(วิตามินบี 1)	4.8 มิลลิกรัม/100 กรัม
ไรโบฟลาวิน(วิตามินบี ๒)	1.7 มิลลิกรัม/100 กรัม
วิตามินบี 12	125.9 ไมโครกรัม/100 กรัม
วิตามินซี	15.6 มิลลิกรัม/100 กรัม
วิตามินอี	< 1.0 IU/100 กรัม
ไนอะซิน	23.8 มิลลิกรัม/100 กรัม
กรดแพนโทเทมิก	1.3 มิลลิกรัม/100 กรัม
กรดโฟลิก	26.9 มิลลิกรัม/100 กรัม
ไบโอติน	191.6 ไมโครกรัม/100 กรัม
อินโนสitol	165.0 ไมโครกรัม/100 กรัม
แคลเซียม	203.0 ไมโครกรัม/100 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

วิตามินและเกลือแร่	ปริมาณที่พบ
ฟอสฟอรัส	989.0 ไมโครกรัม/100 กรัม
ไอโอดีน	600.0 ไมโครกรัม/100 กรัม
แมกนีเซียม	315.0 ไมโครกรัม/100 กรัม
เหล็ก	167.0 ไมโครกรัม/100 กรัม
สังกะสี	71.0 ไมโครกรัม/100 กรัม
ทองแดง	0.08 ไมโครกรัม/100 กรัม

ตารางที่ 2-3 กรดไขมัน ในสาหร่าย *Chlorella sp.* (Steenblock,R,1981)

กรดไขมัน	สัดส่วนที่พบโดยเปอร์เซ็นต์
กรดไขมันไม่อิ่มตัว	81.8 %
กรดไขมันอิ่มตัว	12.2 %
C 14:0	0.6 %
C 14:1	0.9 %
C 14:2	0.9 %
C 16:0	15.6 %
C 16:1	9.1 %
C 16:2	5.5 %
C 16:3	7.1 %
C 18:0	2.0 %
C 18:1	10.0 %
C 18:2	22.8 %
C 18:3	15.5 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2-4 กรดอะมิโนในสาหร่าย *Chlorella sp.* (Steenblock,R,1981)

กรดอะมิโน	ปริมาณในหน่วยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนัก
ไลซีน	3.46
ฮิสติดีน	1.29
อาร์จินีน	3.64
กรดแอสพาทิก	5.20
ทรีโอนีน	2.70
เซอรีน	2.78
กรดกลูตามิก	6.29
โปรลีน	6.93
ไกลซีน	3.40
อะลานีน	4.80
ซีสเทอีน	0.38
วาเลีน	3.64
เมไทโอนีน	1.45
ไอโซลิวซีน	2.63
ลิวซีน	5.26
ไทโรซีน	2.09
ออไนรีน	0.06
ทริโปรฟาน	5.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประโยชน์ของสาหร่าย *Chlorella sp.*

### 1. ใช้เป็นอาหารชั้นต้นในการอนุบาลสัตว์น้ำ

ในปัจจุบันนี้ได้มีอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยจะมีการให้อาหารแทนการปล่อยให้สัตว์น้ำเจริญเติบโต และขยายพันธุ์เองตามธรรมชาติ ดังนั้นอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำจึงได้เข้ามามีบทบาทสำคัญ และอาหารที่ได้รับความนิยมและมีการใช้กันมากได้แก่ สาหร่าย *Chlorella sp.* เนื่องจากเป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่มีการเจริญเติบโตได้ง่าย และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สามารถทำการผลิตเองได้ และการใช้สาหร่าย *Chlorella sp.* เป็นอาหารสัตว์น้ำจะไม่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของน้ำในบ่อเลี้ยง

### 2. ใช้เป็นอาหารเสริมมนุษย์ในรูปสาหร่าย *Chlorella sp.* อัดเม็ด

เนื่องจากสาหร่าย *Chlorella sp.* มีโปรตีนอยู่ในปริมาณที่สูง ซึ่งจะประกอบด้วย กรดอะมิโนหลายชนิดทั้งกรดอะมิโนที่จำเป็นและไม่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์นอกจากนี้ยังมีปริมาณวิตามิน และเกลือแร่อยู่ในปริมาณที่เหมาะสมในการใช้เป็นอาหาร นอกจากนี้สาหร่าย *Chlorella sp.* แล้วยังมีสาหร่ายชนิดอื่นที่สามารถใช้เป็นอาหารมนุษย์ได้เช่นกัน เช่น *Scenedesmus sp.* *Spirulina sp.* และ *Dunaliella sp.* เป็นต้น

ประเทศเยอรมันตะวันตกใช้ สาหร่าย *Chlorella sp.* เป็นอาหารคนและสัตว์และพบว่า มีโปรตีนมากกว่า 50 % ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งน้อยกว่าโปรตีนในไข่และนม แต่มากกว่าโปรตีนในข้าวโพดและข้าวสาลีญี่ปุ่นใช้ *Scenedesmus sp.* และสาหร่าย *Chlorella sp.* ผสมลงในน้ำนมเป็นเครื่องดื่มทำให้รสชาติดีขึ้น และใช้สาหร่าย *Chlorella sp.* เติมน้ำผลไม้เพื่อเพิ่มรสชาติ ในประเทศไทยสถาบันค้นคว้าและพัฒนาอาหารได้ทดลองนำสาหร่ายน้ำจืดหลายชนิดมาทดลองสกัดโปรตีนพบว่า *Scenedesmus sp.* มีโปรตีนประมาณ 50% โดยน้ำหนักแห้ง จึงนำสาหร่ายชนิดนี้ ผสมลงในเส้นบะหมี่ และขนมพวกคุกกี้ ออกจำหน่าย เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร

### 3. ใช้เป็นอาหารสัตว์อื่น ๆ เช่นหมู วัว ควาย

ชาวไต้หวันได้มีการนำสาหร่าย *Chlorella sp.* ตากแห้งมาผสมลงในอาหารสัตว์จะทำให้ สัตว์เจริญเติบโตได้เร็ว ซึ่งจะเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตลงได้ด้วย

#### 4. ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

ในการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายจะมีการใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงาน และได้รับแหล่งคาร์บอนและแร่ธาตุต่าง ๆ จากสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำ ดังนั้นการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์ของสาหร่าย จะเป็นการช่วยให้สาหร่ายมีความสะอาดไม่เน่าเสีย จากคุณสมบัติ ดังกล่าวจึงได้มีการนำสาหร่ายไปใช้ในระบบบำบัดน้ำเสีย สาหร่ายที่มีบทบาทมากได้แก่สาหร่าย *Chlorella sp.* และ *Scenedesmus sp.* และมีผู้ทดลองนำสาหร่ายบางชนิดเช่นสาหร่าย *Chlorella sp.* , *Dunaliella sp.* และ *Chlamydomonas sp.* มารักษาสภาวะของน้ำในบ่อเลี้ยงปลาและสัตว์ ทะเลอื่น ๆ เพื่อใช้ในการดูดซับสารประกอบไนโตรเจนที่เป็นของเสียจากปลาและสัตว์น้ำ (พิสมัย, 2539)

#### 5. ใช้ประโยชน์ในทางกสิกรรม

สาหร่ายจะช่วยปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของดินให้เหมาะสมแก่การเจริญของพืช ซึ่งขึ้นอยู่กับพื้นดินจะช่วยให้อุณหภูมิดินยึดเกาะกันเป็นก้อนทำให้ดินสามารถอุ้มน้ำได้ดีขึ้น

#### 6. ใช้ในการผลิตเชื้อเพลิง

เนื่องจากปัจจุบันประสบกับภาวะขาดแคลนแหล่งเชื้อเพลิง จึงได้มีการศึกษาพัฒนาไป ไบโอมันที่มีอยู่ในสาหร่ายมาใช้ในรูปแบบน้ำมันเชื้อเพลิง (fuel oil) เพื่อทดแทนการใช้ น้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งนับวันจะหมดไป (Beker, 1994)

#### 7. ใช้ในการศึกษาวิจัย

ได้มีการใช้สาหร่ายน้ำจืดหลายชนิดในการศึกษาวิจัย เช่นใช้ สาหร่าย *Chlorella sp.* ใน การศึกษากระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีภายในเซลล์ (metabolism)

#### 8. ประโยชน์ทางการแพทย์

พบว่าไขมันจากสาหร่ายสามารถทำให้แตกตัว (fractionated) เป็นพอสโพลีปิด ซึ่งจะใช้ในการผลิตไลโปโซม ซึ่งเป็นพาหะนำยารักษาโรคที่ไม่สามารถละลายน้ำได้เข้าสู่อวัยวะเป้าหมาย ที่ต้องการรักษาได้และที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ในกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับมนุษย์ (essential fatty acid, EPA) เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสร้างกรดไขมันเหล่านี้ได้แก่ กรดลิโนลิอิก (linoleic acid, 18:2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดแกมมาลิโนลิติก(g-linolenic, GLA, 18:3-6,9,12) กรดไดโฮโมแกมมาลิโนลิติก (dihomo-g-linoleic acid, DGLA, 20:3,11,14) กรดอาราชิโดนิก (arachidonic acid, AA,20:4-5,8,11,14,17) และกรดไอโคซาเพนทาเอโนิก (eicosapentaenoic acid,EPA20:5-5,8,11,14,17)

นอกจากกรดลิโนลิติกแล้วกรดไขมันตัวอื่น ๆ จะพบได้ในปริมาณน้อยมากในพืชและสัตว์ กรดไขมันชนิด GLA,DGLA,AA,และ EPA เป็นสารตั้งต้นของฮอว์โมนที่สำคัญ คือ โพรสตาแกลนดิน(postaglandin,PGE 1) ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมความดันโลหิต การสังเคราะห์ คลอเรสเตอรอล และอาการ บวมของเซลล์ นอกจากนี้ PGE 1 ยังใช้ในการบำบัดทางคลินิกได้ หลายประการ เช่นลดความเจ็บปวดขณะคลอด ลดอาการแพ้ ป้องกันการปฏิสนธิ รักษาโรค หอบหืด รักษาอาการหลอดลมอักเสบ รักษาบาดแผล รักษาความดันโลหิตสูง และลดการแข็งตัวของโลหิตในเส้นเลือดและอวัยวะต่าง ๆ กรดไขมันเหล่านี้นอกจากจะเป็นสารตั้งต้นของ PGE 1 แล้ว ยังพบว่ากรดบริโกล GLA ช่วยในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น ข้ออักเสบ โรคหัวใจ โรคอ้วน โรคที่เกิดจากการขาดสังกะสี โรคพิษสุราเรื้อรัง อาการซึมเศร้าในผู้สูงอายุ (manic-depression agin symptom) และโรคจิตเภทถล่มตัว(schizophrenia) ตลอดจนอาการ ก่อนมีประจำเดือน (premenstrual syndrome) และได้มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ในรูปวิตามิน F (นัฐพร,2538)

Lee และคณะ (1987) ได้รายงานว่ามีการศึกษาการใช้สาหร่าย *Chlorella sp.* เพื่อป้องกันโรคไข้หวัดในประเทศญี่ปุ่น ในปี 1971 โดยการทดลองกับกะลาสีเรือญี่ปุ่นจำนวน 1000 คนซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกจะรับประทานสาหร่าย *Chlorella sp.* อัดเม็ด วันละ 2 กรัมต่อวัน (10 เม็ด ) ส่วนกลุ่มที่สองไม่ได้รับประทานสาหร่าย *Chlorella sp.* อัดเม็ด เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน พบว่ากลุ่มกะลาสีเรือที่ไม่ได้รับประทานสาหร่าย *Chlorella sp.* อัดเม็ดจะเป็นไข้หวัดมากกว่ากะลาสีกลุ่มที่ได้รับสาหร่าย *Chlorella sp.* อัดเม็ดถึง 41 % และในปี 1973 ในประเทศญี่ปุ่น ได้ศึกษาพบว่าเส้นใยจากผนังเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella sp.* มีประสิทธิภาพในการดูดซับโลหะหนัก เช่นตะกั่ว แคดเมียม เมื่อรับประทานสาหร่าย *Chlorella sp.* โลหะหนักที่มีอยู่ในร่างกายจะถูกกำจัดออกมาทางปัสสาวะและอุจจาระ นอกจากนี้คลอโรฟิลล์ของสาหร่าย *Chlorella sp.* จะช่วยเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างวิตามินบีในลำไส้ซึ่งจะช่วยให้การเคลื่อนตัวของลำไส้ดีขึ้นจึงมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคท้องผูก

ในการรักษาโรคมะเร็งด้วยสารเคมีและการเอ็กซเรย์ในผู้ป่วย จะทำให้ภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยลดน้อยลงและเกิดผลข้างเคียงต่าง ๆ ในสาหร่าย *Chlorella sp.*จะมีสารอาหารที่ช่วยฟื้นฟูระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย Merchant (1990) ได้ทดลองศึกษากับผู้ป่วยโรคมะเร็งในระยะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อันตรายจำนวน 25 คน โดยการให้รับประทานสาหร่าย *Chlorella sp.* ในรูปอาหารเสริมปรากฏผลว่า ผู้ป่วย 7 คนจากผู้ป่วย 25 คน มีอาการดีขึ้นและมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น

### การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* ในประเทศไทย

ในประเทศไทยเป็นประเทศที่มีสภาพอากาศอบอุ่น ถึงร้อน มีแสงแดดสม่ำเสมอ เหมาะแก่การเพาะขยายพันธุ์แพลงค์ตอนพืชหลายชนิด แพลงค์ตอนพืชที่นิยมเพาะขยายพันธุ์ ได้แก่ สาหร่าย *Chlorella sp.*, *Tetrahymena sp.*, *Chaetoceros sp.*, *Sketelonema sp.*, *Isochrysis sp.* ซึ่งการเพาะเลี้ยงแพลงค์ตอนพืชส่วนใหญ่ มีจุดประสงค์เพื่อใช้เป็นอาหารของลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน เช่น ปลาเกะพงขาว กุ้งทะเล ปะการัง ฯลฯ หรือใช้เป็นอาหารของไรแดง เพื่อใช้ไรแดงเป็นอาหารของสัตว์น้ำที่มีขนาดที่โตขึ้น การเพาะเลี้ยงแพลงค์ตอนพืชจะมีขั้นตอนที่สำคัญต่าง ๆ เริ่มจากการรวบรวมพันธุ์จากธรรมชาติ นำมาคัดแยกสายพันธุ์ และขยายพันธุ์ให้ได้มาก ๆ ในบ่อเพาะเลี้ยงกลางแจ้ง แพลงค์ตอนที่มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นอาหารกันมากคือสาหร่าย *Chlorella sp.* แต่ในการเพาะเลี้ยงยังประสบปัญหาหลายประการ เช่นการปนเปื้อนของโปรโตซัว การใช้สูตรอาหารที่ไม่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง ฯลฯ ทำให้ปริมาณของสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่เพาะเลี้ยงได้มีปริมาณที่ต่ำ

ธิดา เพชรธณี(2532) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* นอกห้องปฏิบัติการ โดยใช้สารประกอบ *Chlorella sp.* ควบคุมการปนเปื้อนโปรโตซัว ทำการเพาะเลี้ยงในบ่อขนาดใหญ่กลางแจ้ง ขนาด 26 ตัน โดยใช้คลอรีนผง 1 ส่วนในล้านส่วนลงไปเมื่อเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง และใส่คลอรีนผง 3 ส่วนในล้านส่วนลงในพันธุ์นาน 1 ชั่วโมงก่อนการเพาะเลี้ยง ปรากฏว่าตรวจไม่พบโปรโตซัวและสาหร่าย *Chlorella sp.* เจริญเติบโตได้ดี และไม่ปรากฏว่ามีการเจริญเติบโตของแพลงค์ตอนชนิดอื่น เช่น ไดอะตอม หรือโรติเฟอร์ ทั้งนี้ต้องควบคุมปริมาณผงคลอรีนและช่วงเวลาที่ใช้ให้เหมาะสม เพราะการใส่ผงคลอรีนที่มีปริมาณมากเกินไป หรือใส่ในช่วงที่สาหร่าย *Chlorella sp.* กำลังอยู่ในช่วง Log phase จะทำให้สาหร่าย *Chlorella sp.* ตายได้เช่นกัน

ธิดา เพชรธณี (2528) รายงานว่าสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* น้ำจืด เพื่อเพาะเลี้ยงไรแดงตามวิธีของภาณุและคณะ (2532) มีกากผงชูรส หรือ อามิ-อามิ เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย สูตรอาหารดังกล่าวไม่เหมาะกับการใช้พื้นที่ที่อยู่ห่างไกลจากบริษัทผงชูรส จึงทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สูตรอาหารของ Yamagushi เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* น้ำจืด ซึ่งจะประกอบด้วยสารอาหารเพียง 3 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สูตรอาหาร

NS III ซึ่งมีสารประกอบจำนวนมากถึง 20 ชนิด พบว่าสาหร่าย *Chlorella sp.* มีอัตราการเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกัน จึงสรุปได้ว่าสูตรอาหารของ Yamagushi น่าจะเป็นอาหารสูตรหนึ่งที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* น้ำจืด

ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล และคณะ(2530) ได้รายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* โดยใช้ปุ๋ยสูตรต่าง ๆ ที่สถานีพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลา จังหวัดปทุมธานี ว่าการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ จะให้ผลดีกว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์ หรือปุ๋ยอินทรีย์เพียงอย่างเดียวและการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ควรทำการย่อยสลายปุ๋ยและฆ่าเชื้อเสียก่อนเพื่อให้สาหร่าย *Chlorella sp.* ใช้อาหารได้ดียิ่งขึ้น และเป็นการกำจัดสิ่งที่จะทำลายหรือกินสาหร่าย *Chlorella sp.* โดยตรง นอกจากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* เพื่อใช้เลี้ยงสัตว์น้ำแล้ว ในประเทศไทยยังได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดอื่นในเชิงการค้า เช่น สาหร่าย *Spirulina sp.* และสาหร่าย *Dunaliella sp.* สาหร่าย *Dunaliella salina* เป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยในนาเกลือแถบชายทะเลที่มีความเค็มสูง การควบคุมธาตุอาหารบางชนิดให้น้อยลงในการเพาะเลี้ยง เช่น ไนเตรท ฟอสเฟต จะทำให้สาหร่ายชนิดนี้สะสมบีตา-แคโรทีน ซึ่งสารประกอบนี้เป็นสารที่ปลอดภัย สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างไม่เป็นอันตราย ใช้เป็นสีผสมอาหารในเครื่องดื่ม ใช้ผสมในอาหารสัตว์ปีกเพื่อเพิ่มสีในไข่แดง ผสมในอาหารสัตว์น้ำทำให้เกิดสีสรรตามตัวได้ชัดเจนขึ้น ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการติดลูกของแม่ตัว ใช้เป็นสีผสมของเครื่องสำอางค์ ใช้เป็นสีเคลือบเม็ดยา หรือสีผสมในยาน้ำ ในด้านการแพทย์ใช้ป้องกันการเกิดมะเร็งและโรคหัวใจ

อุดม สิทธิภูประเสริฐ และคณะ (2538) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Dunaliella salina* สายพันธุ์ 1197 สามารถเพาะเลี้ยงให้เกิดการสะสมบีตา-แคโรทีน ซึ่งสามารถเป็นแนวทางในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้าต่อไปได้ ในประเทศอิสราเอลมีการเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ในระดับโรงงานต้นแบบเพื่อผลิตกลีเซอรอล ซึ่งจะใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงโดยใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป (อาภารัตน์,2538)

สาหร่าย *Spirulina sp.* เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีขนาดใหญ่กว่าสาหร่าย *Chlorella sp.* มาก มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง เก็บเกี่ยวง่าย และมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สูงในประเทศไทยมีการศึกษานำน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตวุ้นเส้น โรงงานผลิตยางพารา มาทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Spirulina sp.* ซึ่งเป็นการช่วยลดปริมาณน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมพร้อมทั้งได้ผลิตผลิตภัณฑ์สาหร่าย *Spirulina sp.*

### บทที่ 3

#### วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

##### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp.

1. งานเพาะเชื้อ
2. หลอดทดลองขนาดกลาง
3. ปีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร
4. ฟาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรและ 500 มิลลิลิตร
5. เครื่องลามินาร์
6. ตู้บลมร้อน
7. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
8. ลักซ์มิเตอร์ (รุ่น DM-28, TAKEMURA ELECTRIC WORKS LTD.)
9. สเตปโตโฟโตมิเตอร์ (รุ่น UNICAM 8620)
10. กล้องจุลทรรศน์ และฮีมาไซโตมิเตอร์

##### 3.2 วิธีการทดลอง

###### 3.2.1 การเก็บตัวอย่างสาหร่าย *Chlorella* sp. จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติใน คลองห้วยตะเข็บบริเวณสถานีรถไฟห้วยตะเข็บ สระน้ำคณะเกษตร สระน้ำคณะสถาปัตยกรรม สระน้ำตึกพระเทพ สระน้ำตึกแดง สระน้ำสวนลาดกระบัง โดยทำการเก็บในวันที่ท้องฟ้าโปร่ง มีแสงแดด ไม่มีเมฆฝน ในการเก็บจะใช้ขวดแก้วที่มีน้ำหนักมากพอเพื่อให้ขวดจมอยู่ใต้ผิวน้ำ เก็บตัวอย่างน้ำที่ได้ใส่ถุงพลาสติกสะอาด วัดพีเอชของน้ำขณะนั้นด้วยกระดาษวัดพีเอช รัศฉนวนยางถุงพลาสติกนำไปตรวจหาสาหร่าย *Chlorella* sp. ในห้องปฏิบัติการ

###### 3.2.2 วิธีการแยกสาหร่าย *Chlorella* sp. ให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างน้ำที่เก็บมาทำการแยกให้ได้สาหร่าย *Chlorella* sp. บริสุทธิ์ โดยใช้ปิเปตที่อบฆ่าเชื้อแล้วปิเปตตัวอย่างน้ำมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารแข็งสูตร N-8 ใช้แท่งแก้วเกลี่ยตัวอย่างน้ำให้ทั่วด้วยเทคนิค spread plate นำจานอาหาร ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6-7 วัน สังเกตการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้ออย่างสม่ำเสมอ เลือกโคโลนีที่มีสีเขียวมาตรวจดูด้วยกล้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลทรรศน์ เพื่อคัดเลือกเอาโคโลนีของสาหร่าย *Chlorella sp.* แล้วนำไปแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้น ด้วยเทคนิค streak plate ซ้ำ 2-3 ครั้ง โคโลนีบริสุทธิ์ในขั้นสุดท้าย จะทำการเก็บรักษาสายพันธุ์ ไว้ในหลอดอาหารเลี้ยง

### 3.2.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* ในอาหารเหลว

#### 3.2.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2 สามารถแยกสาหร่าย *Chlorella sp.* ได้ 3 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์จากสระน้ำตึกพระเทพ สายพันธุ์จากสระน้ำตึกแดง และสายพันธุ์จากสระน้ำสวนลาดกระบัง เริ่มต้นเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารเหลวสูตร N-8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ลูปถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยง 3 ลูปใส่ในแต่ ละฟาสก์ ทำการเขย่าฟาสก์ทุกวัน เพื่อให้อากาศแก่สาหร่าย *Chlorella sp.* และป้องกันไม่ให้เกิด การตกตะกอนของสาหร่าย *Chlorella sp.* ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7-10 วัน เชื้อที่ได้จะมีการ เจริญเติบโตเห็นเป็นสีเขียวเข้ม ทำการขยายพันธุ์ต่อเพื่อให้ได้หัวเชื้อที่มีปริมาณมากเพียงพอ โดย ใช้เชื้อที่ได้จากการขยายครั้งแรก 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N-8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในขั้นนี้จะใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* ในสภาวะต่าง ๆ

#### 3.2.3.2 การเพาะเลี้ยงและการวัดผลการเจริญของสาหร่าย *Chlorella sp.*

นำเชื้อที่เตรียมไว้ในอาหารเหลวข้อ 3.2.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.025 ความคุมสูตรอาหาร 3 สูตร โดยมีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 3 แหล่ง (ภาคผนวก) และควบคุมความเข้มแสง 3 ระดับที่ 2400 ลักซ์ 1400 ลักซ์ และ 140 ลักซ์ โดยใช้หลอดไฟติดตั้งบนเลี้ยง แยกชั้นเลี้ยงแต่ละระดับความเข้มแสง เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* 3 ซ้ำในแต่ละปัจจัย เขย่าฟาสก์ที่เพาะเลี้ยงวันละ 1-2 ครั้งทุกวันและเก็บสาหร่าย *Chlorella sp.* จากฟาสก์เลี้ยงทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 15 วัน เพื่อวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella sp.* โดยทำการวัดอัตราการเจริญเติบโต 3 วิธีคือ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นับจำนวนเซลล์ และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสาหร่าย *Chlorella sp.* โดยทำการแยกสายพันธุ์จากแหล่งน้ำธรรมชาติ 3 แหล่ง ได้แก่ สระน้ำตึกพระเทพ สระน้ำตึกแดง และสระน้ำสวนลาดกระบัง สภาวะของแหล่งน้ำ ณ เวลาที่เก็บตัวอย่างน้ำเป็นดังนี้ สระน้ำตึกพระเทพ วัดอุณหภูมิน้ำได้ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 8.1 สระน้ำตึกแดงวัดอุณหภูมิน้ำได้ 29 องศาเซลเซียส พีเอช 7.7 สระน้ำสวนลาดกระบังวัดอุณหภูมิน้ำได้ 27 องศาเซลเซียส พีเอช 7.6 แหล่งน้ำทั้ง 3 แหล่งมีพืชน้ำและสัตว์น้ำอาศัยอยู่ จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยควบคุมสูตรอาหารและระดับความเข้มแสง ทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella sp.* เป็นเวลา 15 วัน ที่ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นในวันแรกคือ 0.025 ให้ผลการทดลองเป็นดังนี้

ผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์ สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 1 ในอาหารสูตรที่ 2 (a1b2c1) จะมีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด วัดค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ 15 ได้เท่ากับ 1.596 (รูปที่ 4-11 และ ตารางที่ 4-1) ปัจจัยที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงรองลงมาได้แก่ สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 3 ในอาหารสูตรที่ 2 (a3b2c1) ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ 15 ได้เท่ากับ 1.29 ส่วนที่ปัจจัยอื่น ๆ ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 0.6

ที่ระดับความเข้มแสง 1400 ลักซ์ สาหร่าย *Chlorella sp.* ในทุก ๆ ปัจจัยจะมีการเจริญเติบโตต่ำกว่าที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์ โดยที่สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 1 ในอาหารสูตรที่ 2 (a1b2c2) จะมีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด วัดค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ 15 ได้เท่ากับ 1.037 (รูปที่ 4-12 และ ตารางที่ 4-1) ปัจจัยที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงรองลงมาได้แก่ สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 3 ในอาหารสูตรที่ 2 (a3b2c2) วัดค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ 15 ได้เท่ากับ 0.909 ปัจจัยอื่น ๆ จะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 0.3

ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์ สาหร่าย *Chlorella sp.* ในทุก ๆ ปัจจัยจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์และ 1400 ลักซ์ ตามลำดับ โดยที่สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 1 ในอาหารสูตรที่ 2 (a1b2c3) ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่าปัจจัยอื่น ๆ มาโดยตลอดในระยะเวลา 14 วันของการเพาะเลี้ยง แต่ในวันที่ 15 วัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.968 ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ต่ำกว่าค่าการดูดกลืนแสงของ สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 3 ในอาหารสูตรที่ 2 (a3b2c3) ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.72 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 1 เริ่มมีอัตราการเจริญเติบโตที่ลดลงในวันที่ 15 ในขณะที่สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 3 ยังคงมีอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น ส่วนปัจจัยอื่น ๆ จะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 0.4 (รูปที่ 4-13 และ ตารางที่ 4-1)

พิจารณาความเหมาะสมของสูตรอาหารในแต่ละสายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์ ในอาหารสูตรที่ 1 โดยสาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 2 สายพันธุ์ที่ 1 และสายพันธุ์ที่ 3 มีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีตามลำดับจากมากไปน้อย โดยในช่วงแรกของการเจริญเติบโต สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 2 จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่า สายพันธุ์ที่ 1 และ สายพันธุ์ที่ 3 ตามลำดับและในช่วงวันที่ 10-15 สายพันธุ์ที่ 1 และสายพันธุ์ที่ 3 ยังคงมีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันแต่สายพันธุ์ที่ 2 จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ 15 ได้เท่ากับ 0.289 ในขณะที่วัดอัตราการดูดกลืนแสงในสายพันธุ์ที่ 1 ได้เท่ากับ 0.259 และในสายพันธุ์ที่ 1 วัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.256 (รูปที่ 4-14 และตารางที่ 4-1)

ในอาหารสูตรที่ 2 สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 3 และสายพันธุ์ที่ 2 มีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีตามลำดับจากมากไปน้อย โดยสายพันธุ์ที่ 1 และสายพันธุ์ที่ 3 มีอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นโดยตลอดในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 15 วัน สายพันธุ์ที่ 1 วัดค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ 15 ได้เท่ากับ 1.596 และสายพันธุ์ที่ 3 วัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 1.29 ส่วนสายพันธุ์ที่ 2 จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำ โดยอัตราการเจริญเติบโตจะเริ่มคงที่ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง วัดค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ 15 ได้เท่ากับ 0.377 (รูปที่ 4-45 และตารางที่ 4-1)

ในอาหารสูตรที่ 3 สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 1 สายพันธุ์ที่ 3 และสายพันธุ์ที่ 2 มีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีตามลำดับจากมากไปน้อย โดยสาหร่าย *Chlorella sp.* ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นตลอดช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 15 วัน สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 1 วัดค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ 15 ได้เท่ากับ 0.546 สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 3 วัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.465 และสาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 2 วัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.263 นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบแฟคทอเรียล ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 % (ภาคผนวก) ทั้งสายพันธุ์ สูตรอาหาร และระดับความเข้มแสง ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และปัจจัยร่วมระหว่างสายพันธุ์กับสูตรอาหาร สูตรอาหารกับระดับความเข้มแสง ให้ค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญด้วย ส่วนระดับความเข้มแสง และสายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งเป็นการยืนยันผลการทดลองที่ได้ว่า สาหร่าย *Chlorella sp.* แต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน สูตรอาหารแต่ละสูตรมีความเหมาะสมและมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella sp.* ต่างกัน และสาหร่ายทุก

สายพันธุ์จะเจริญเติบโตได้ดีในระดับความเข้มแสงที่สูง และจะเจริญเติบโตได้น้อยที่ระดับความเข้มแสงที่ต่ำ

การวิเคราะห์ผลโดยวิธีนับจำนวนเซลล์ โดยความเข้มข้นของจำนวนเซลล์ในวันแรกเท่ากับ  $0.15 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะให้ผลการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง คือมีการเจริญเติบโตได้ดีทุกสายพันธุ์ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์ 1400 ลักซ์ และ 400 ลักซ์ ตามลำดับ โดยในวันที่ 15 ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์ สายพันธุ์ที่ 1 ในสูตรอาหารที่ 2 ให้ค่าที่จำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $13.85 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4-17 และตารางที่ 4-2) ที่ระดับความเข้มแสง 1400 ลักซ์สายพันธุ์ที่ 1 ในสูตรอาหารที่ 2 ให้ค่าจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $11.25 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4-18 และ ตารางที่ 4-2) และที่ความเข้มแสง 400 ลักซ์ สายพันธุ์ที่ 3 ในสูตรอาหารที่ 2 ให้ค่าจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $6.20 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4-19 และตารางที่ 4-2) ธิดา เพชรรมณี และคณะ (2530) ได้ทดลองเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* ในห้องปฏิบัติการโดยใช้สูตรอาหารของ Yamaguchi และสูตรอาหาร NS III โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $6 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในถังขนาด 30 ลิตร ปรากฏว่าสาหร่าย *Chlorella sp.* ใช้เวลาเพียง 2 วันในการเจริญเติบโตสูงสุดโดยในสูตรอาหาร Yamaguchi ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $10 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนในอาหารสูตร NS III ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $13 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจำนวนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสูตรอาหาร NS III จะใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์สูงสุดที่ได้ในการทดลองนี้คือเท่ากับ  $13.85 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ในการทดลองนี้จะใช้เวลานานกว่า ทั้งนี้เนื่องจากใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ต่ำกว่า

การวิเคราะห์ผลโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงและการนับจำนวนเซลล์ ในวันแรกของการเพาะเลี้ยงจะให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.07 กรัมต่อลิตรและในวันที่ 15 ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์ สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 1 ในสูตรอาหารที่ 2 จะให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.69 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4-20 ตารางที่ 4-3) ที่ระดับความเข้มแสง 1400 ลักซ์ สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 2 ในอาหารสูตรที่ 2 จะให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดวันที่ 15 เท่ากับ 1.54 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4-21 และตารางที่ 4-3) ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์ สาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 3 ในอาหารสูตรที่ 2 จะให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.10 กรัมต่อลิตร

จากการวิเคราะห์ผลทั้ง 3 วิธีจะให้ผลเหมือนกันคือสาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ 1 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์ จะให้ผลการเจริญเติบโตสูงสุด



รูปที่ 4-1 สระน้ำตึกพระเทพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



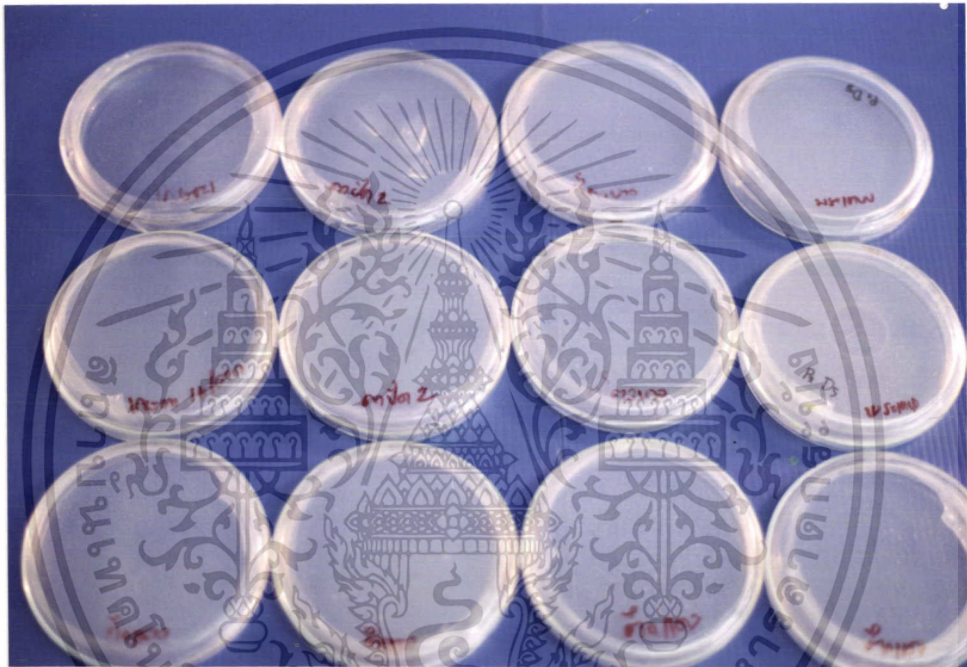
รูปที่ 4-2 สระน้ำตึกแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



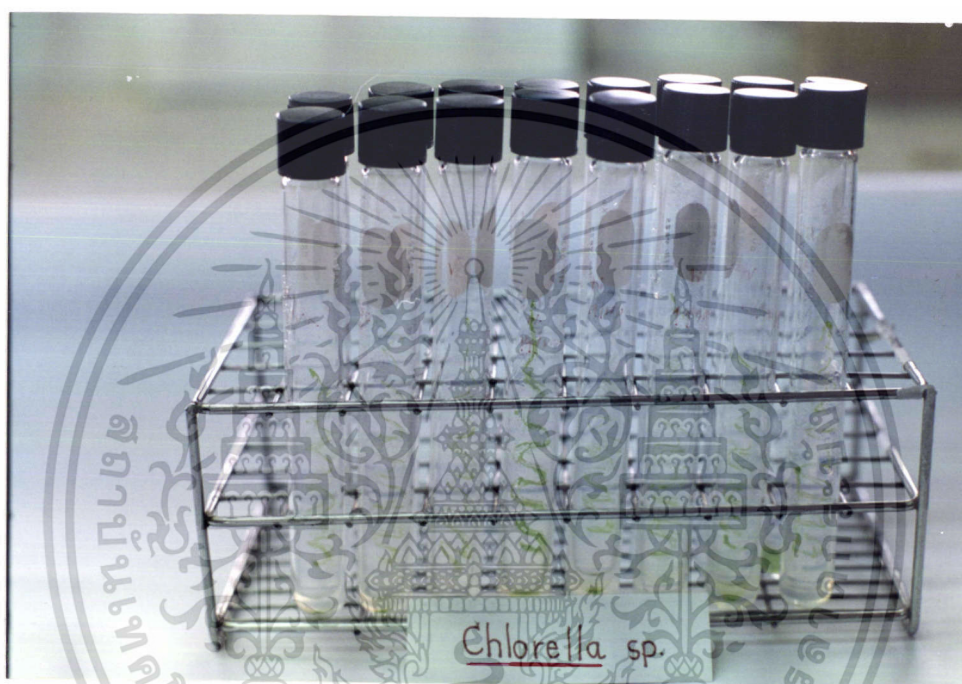
รูปที่ 4-3 สระน้ำสวนลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



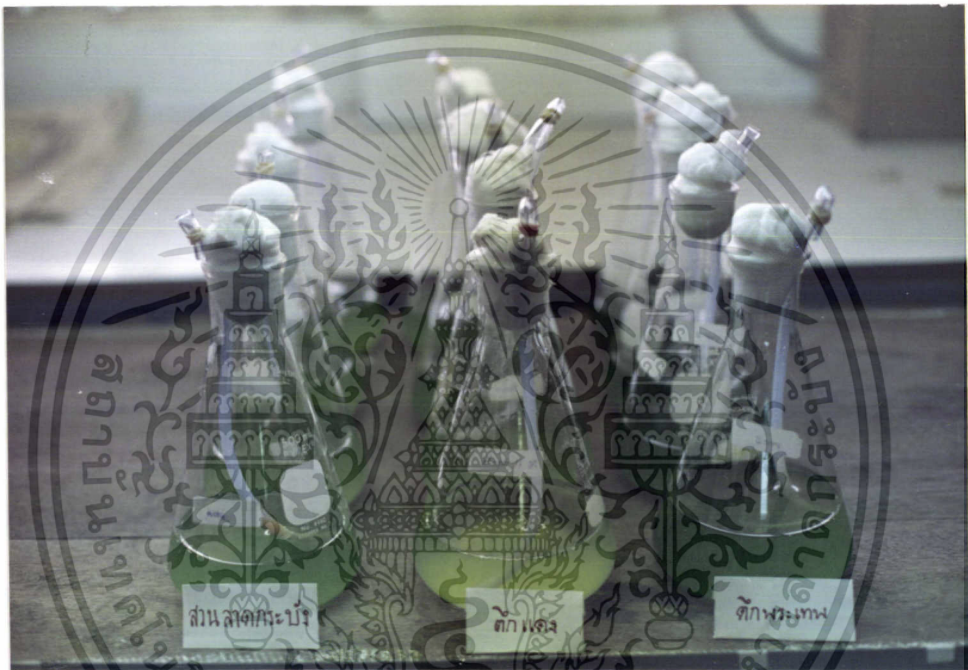
รูปที่ 4-4 สาหร่าย *Chlorella sp.* ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค spread plate และเทคนิค streak plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



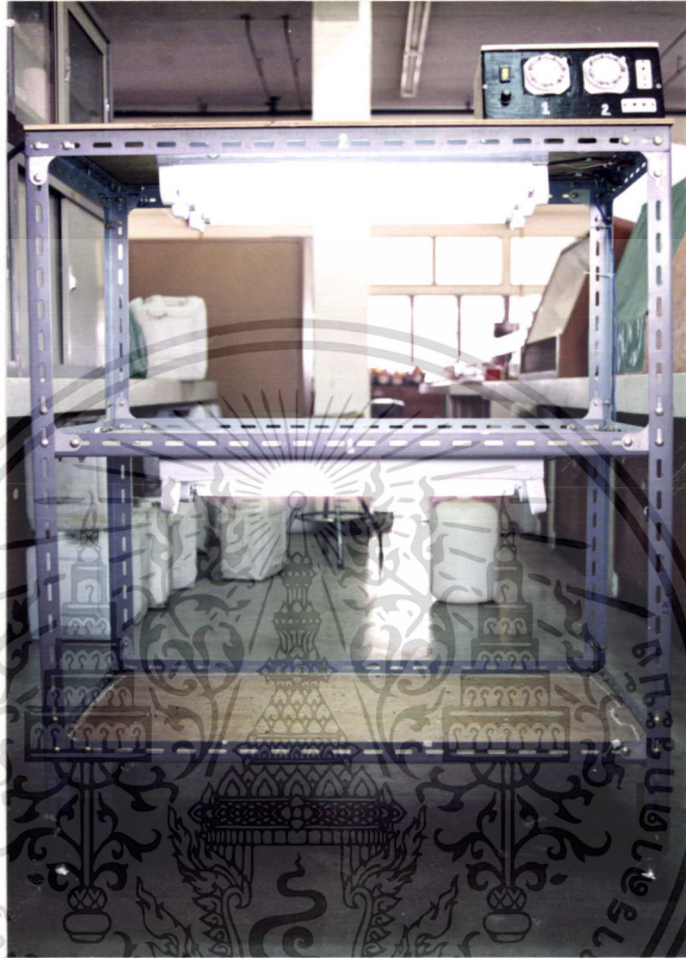
รูปที่ 4-5 หลอดอาหารเลี้ยงเก็บสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella sp.* ที่บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



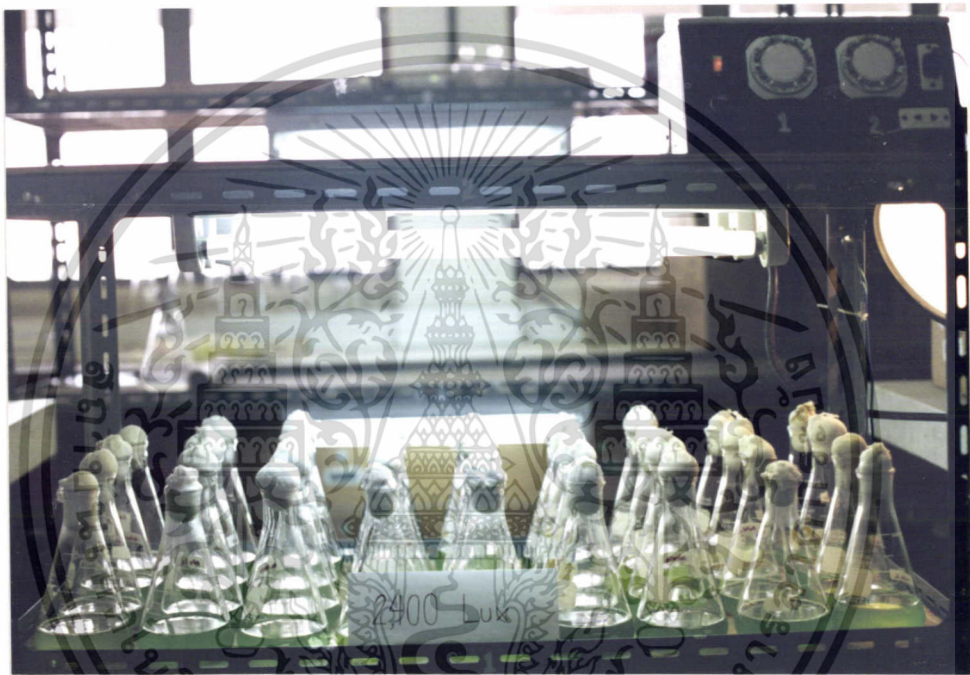
รูปที่ 4-6 หัวเชื้อสาหร่าย *Chlorella sp.* ในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-7 ชั้นเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-8 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



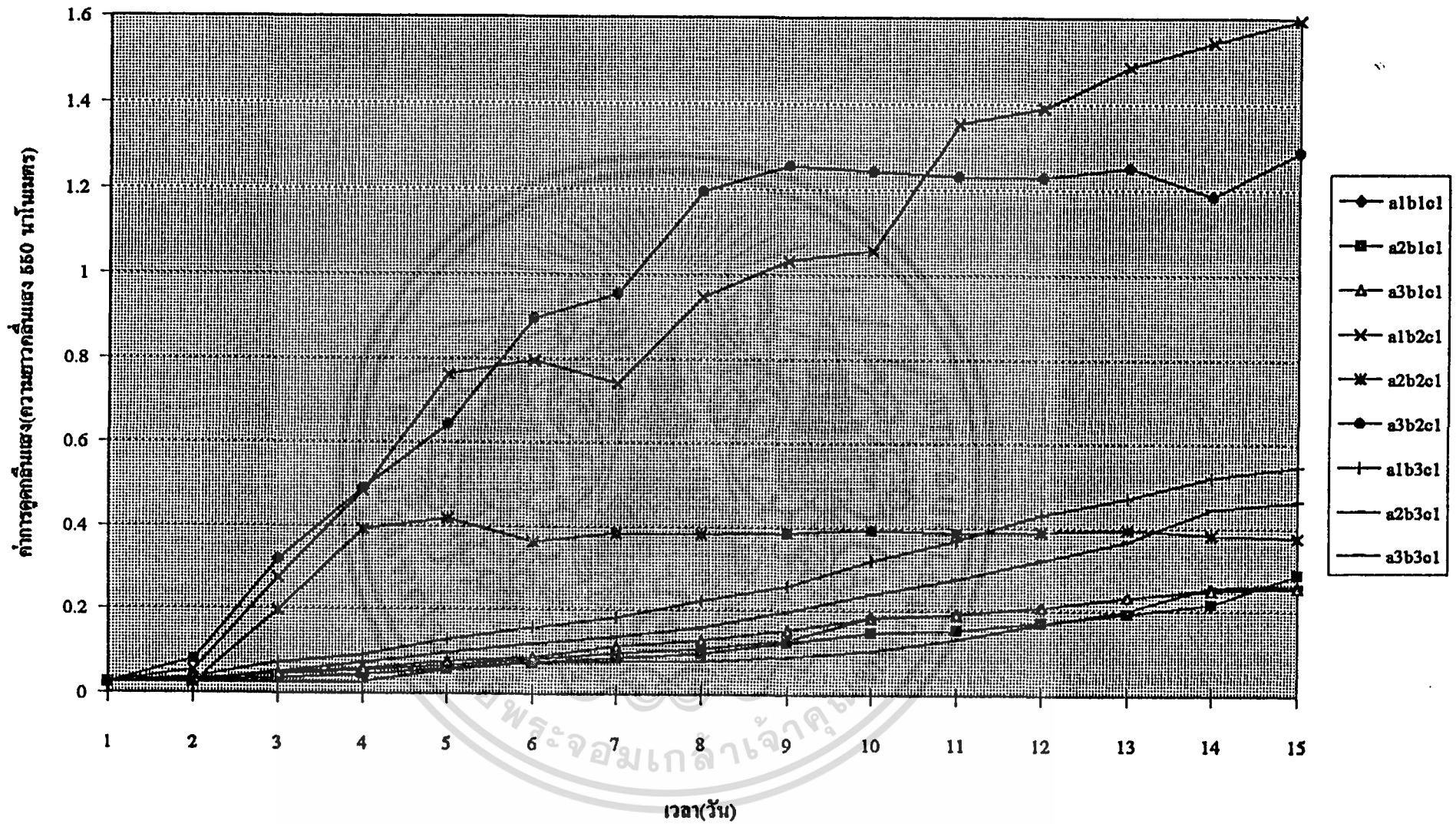
รูปที่ 4-9 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ระดับความเข้มแสง 1400 ลักซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

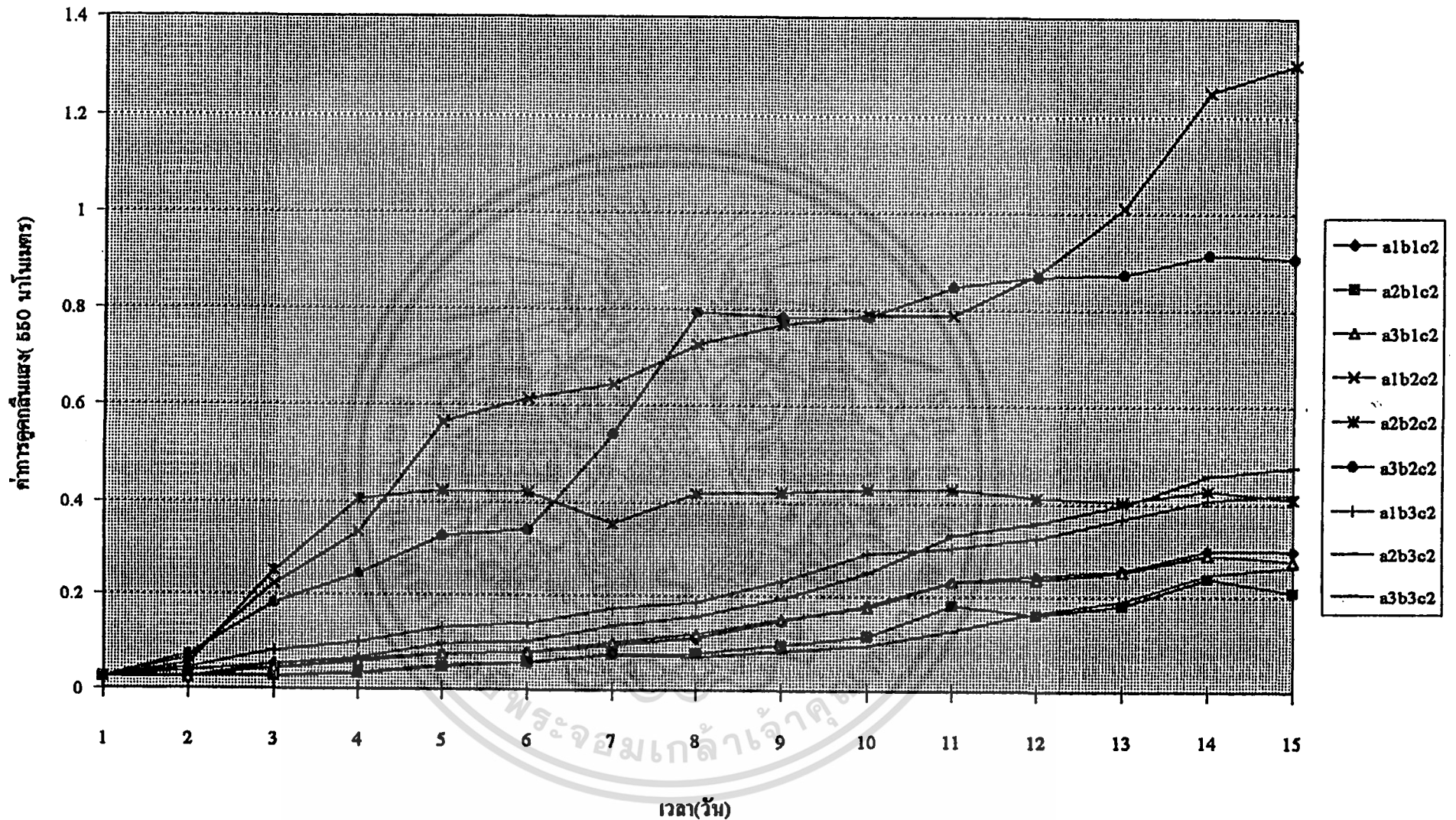


รูปที่ 4-10 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์

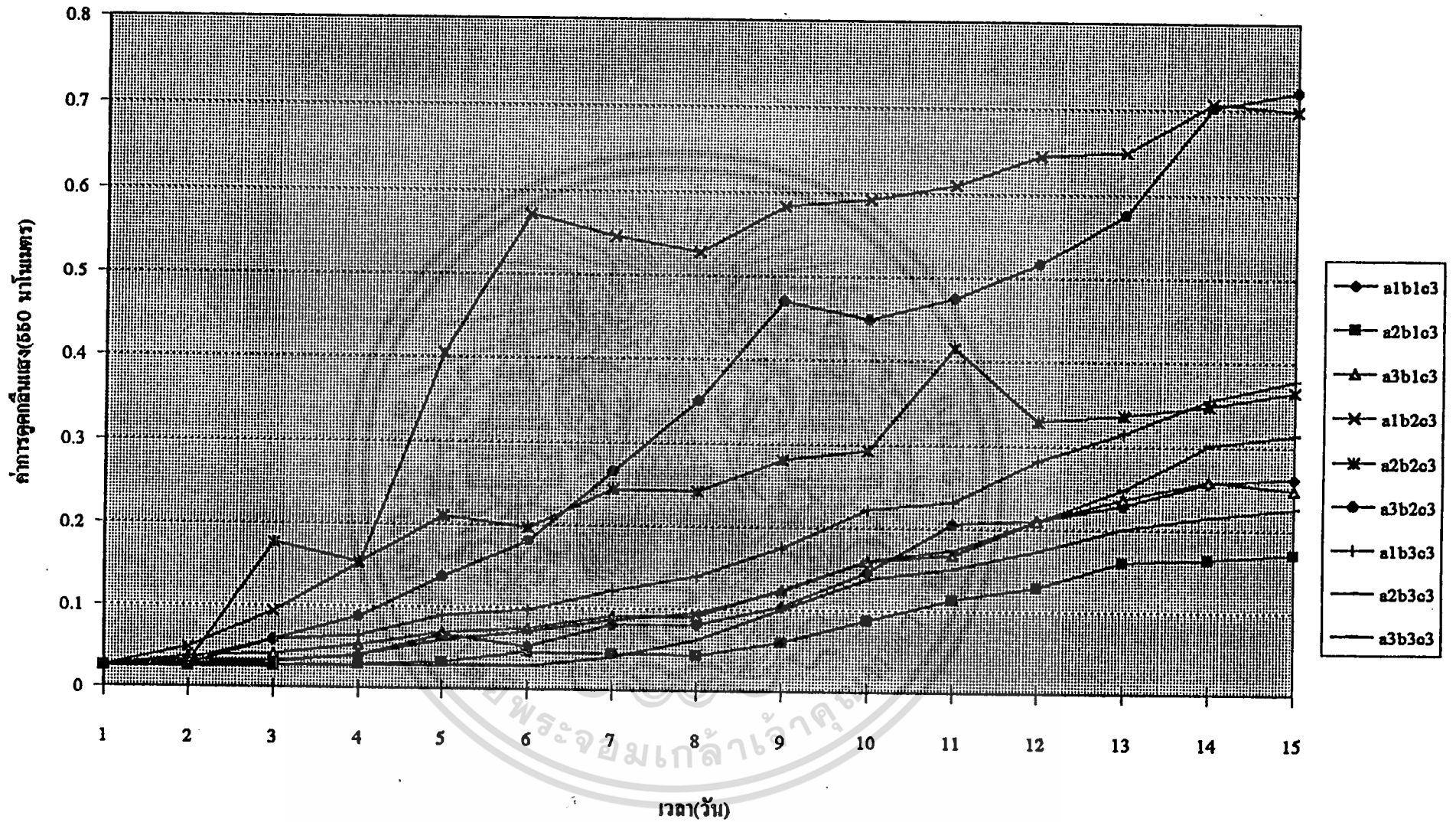
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



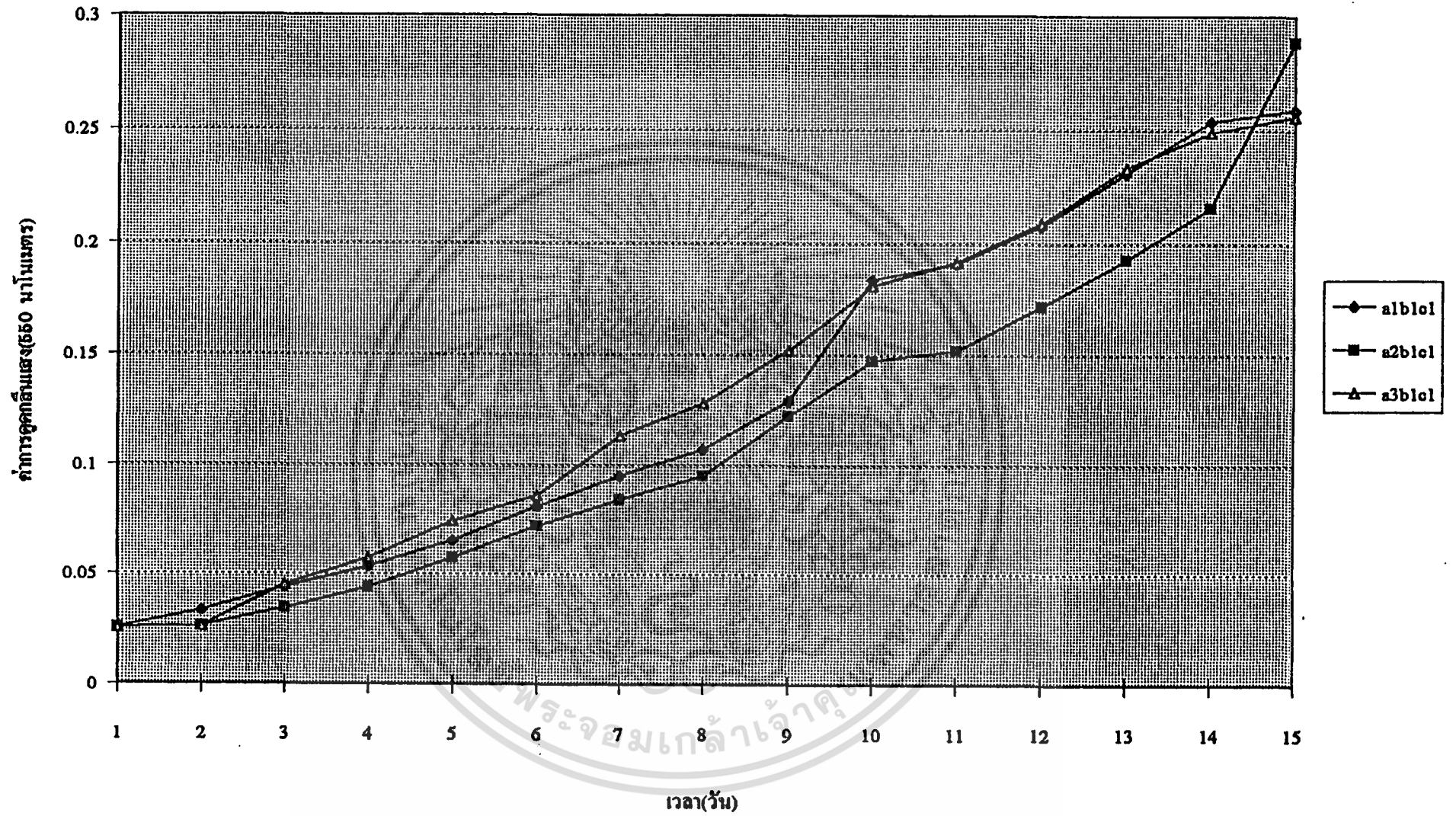
รูปที่ 4-11 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์



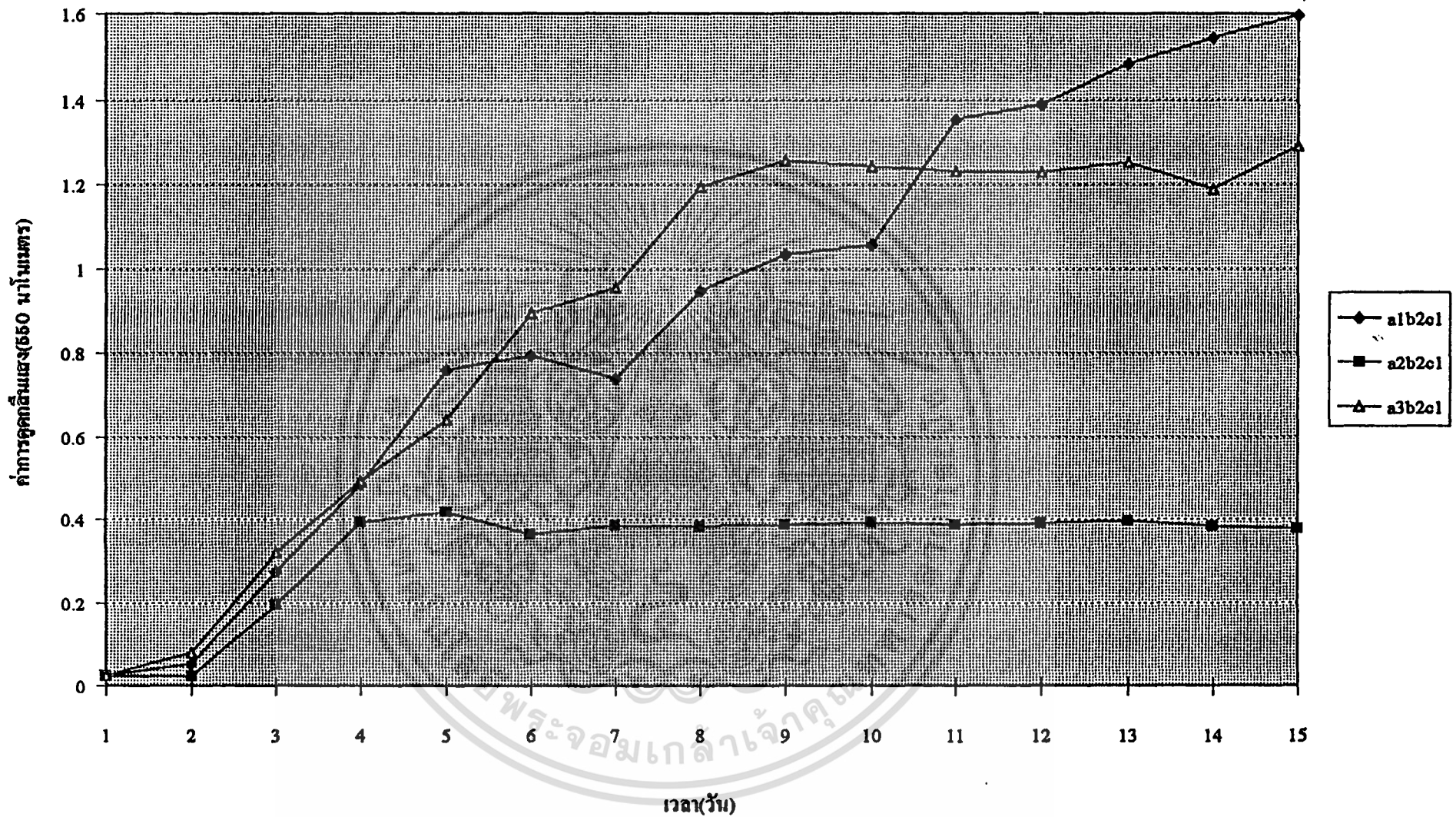
รูปที่ 4-12 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่ระดับความเข้มแสง 1400 ลักซ์



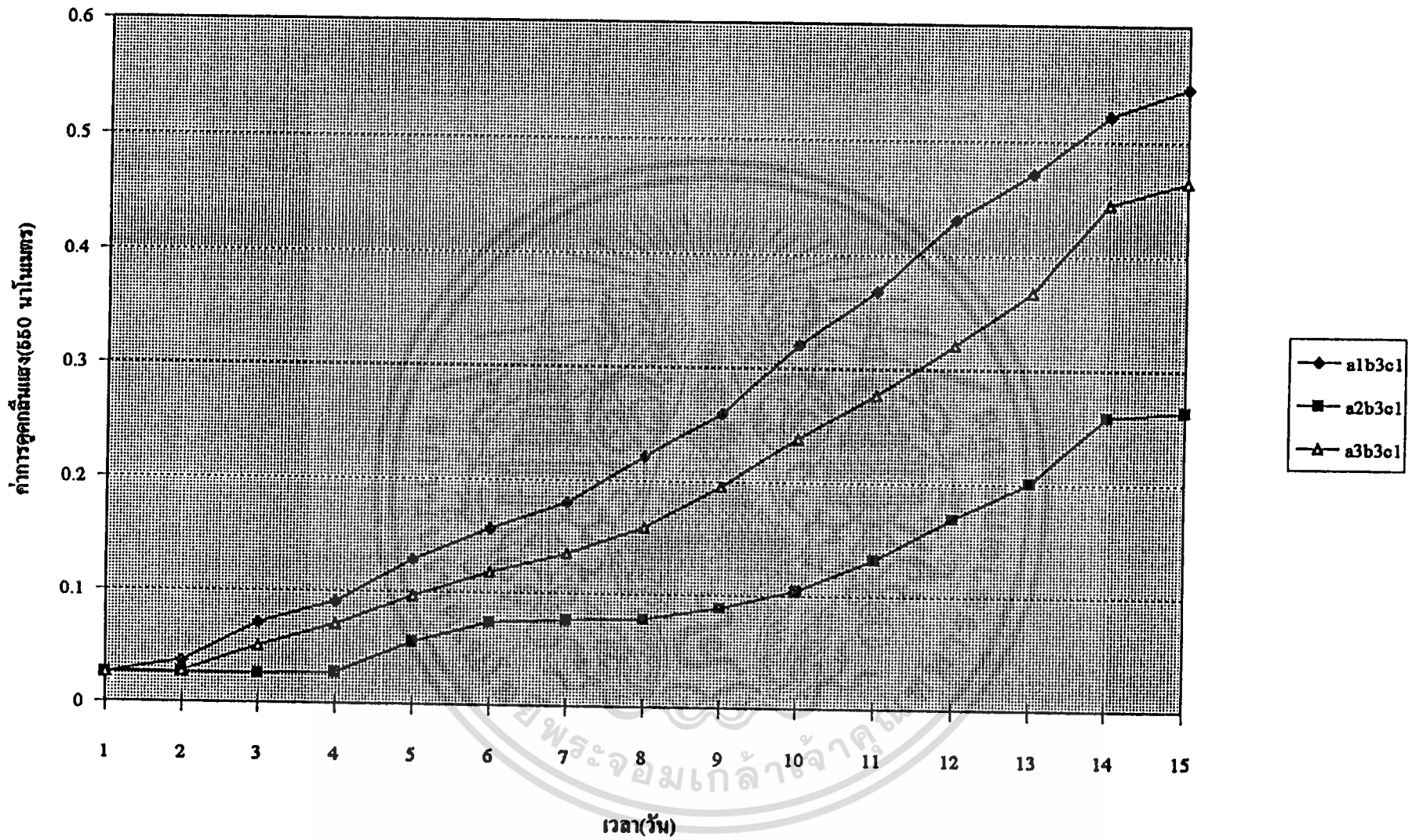
รูปที่ 4-13 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่ระดับความเข้มข้น 400 ตักร์



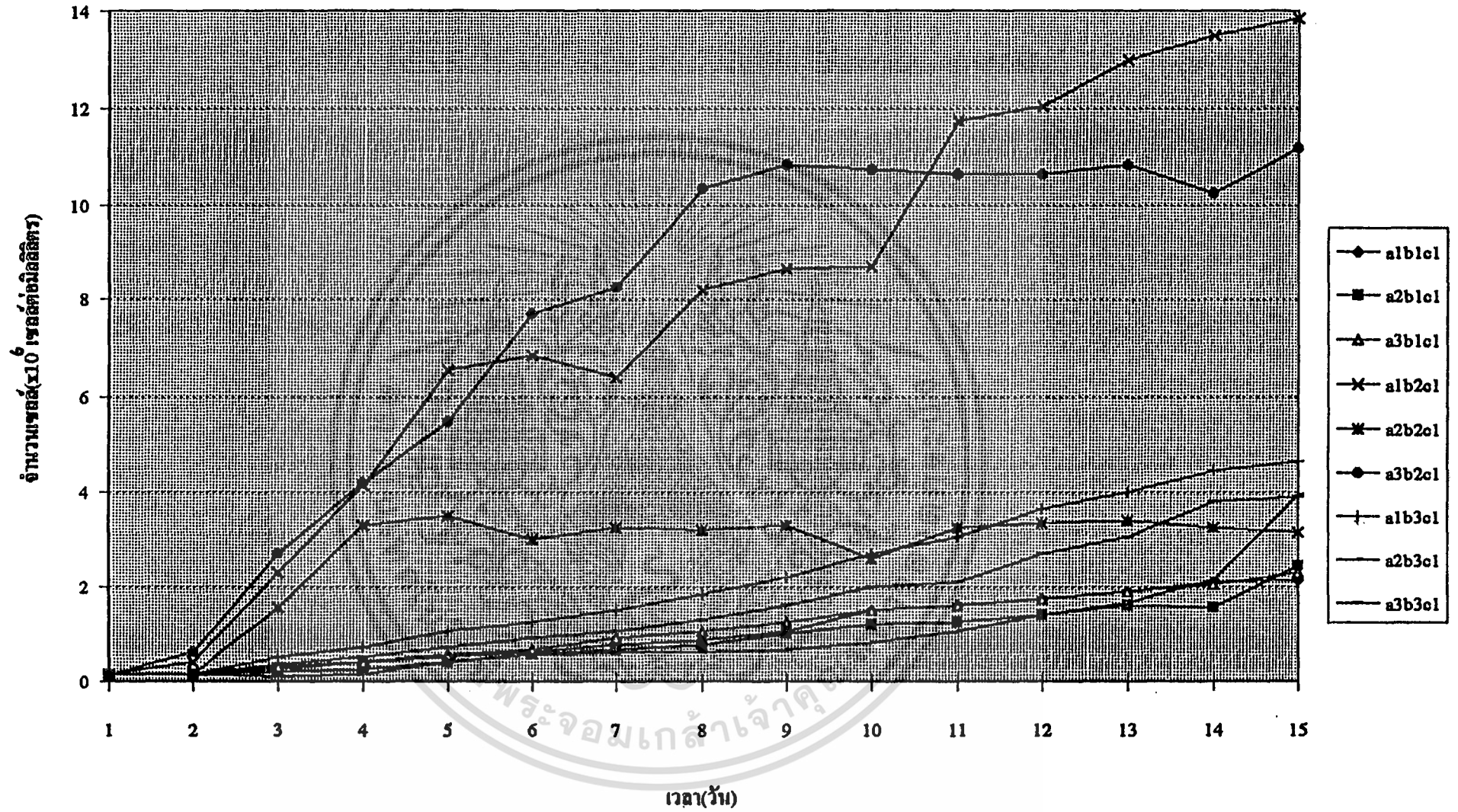
รูปที่ 4-14 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Chlorella sp.* ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์



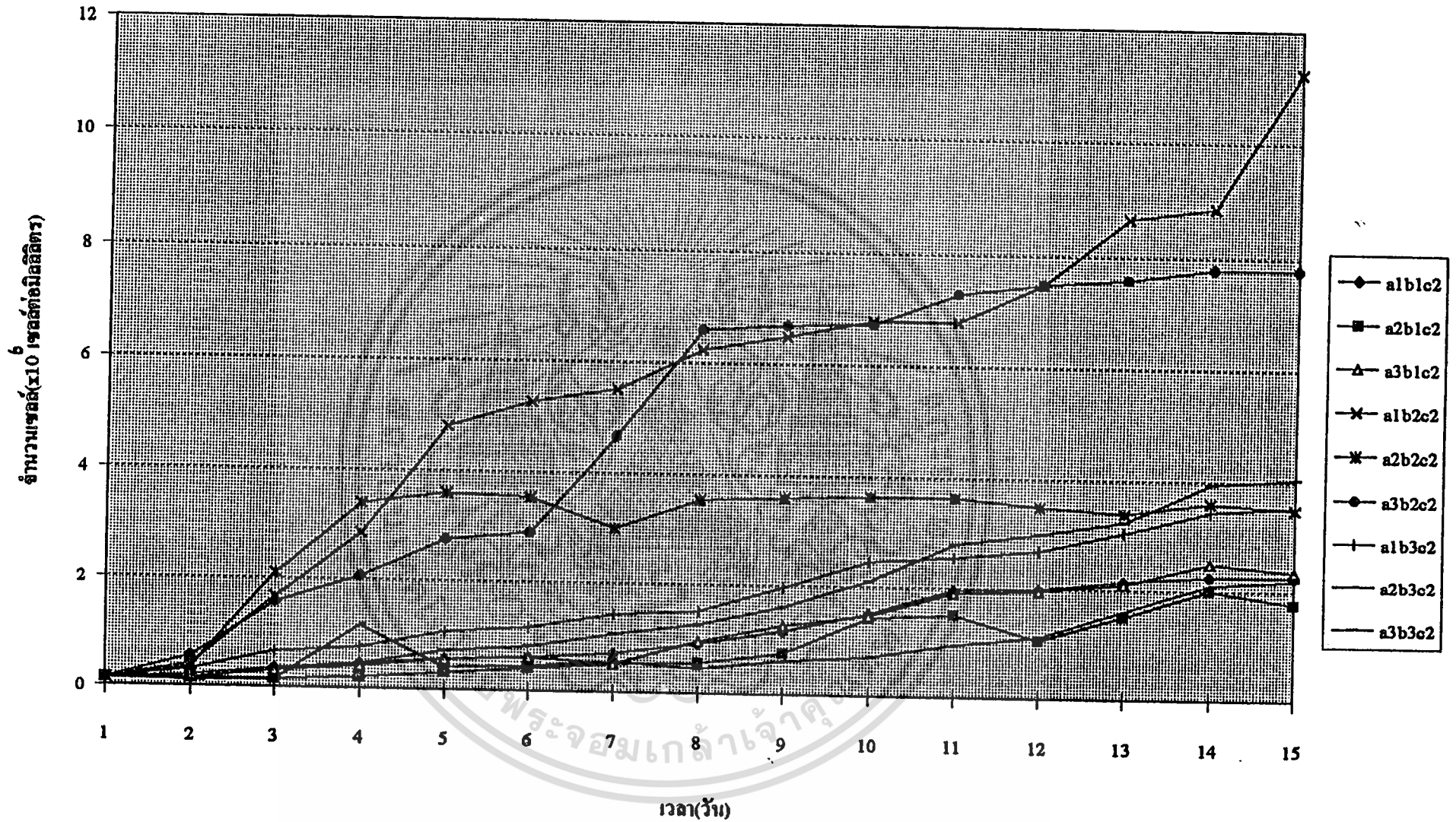
รูปที่ 4-15 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Chlorella sp.* ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์



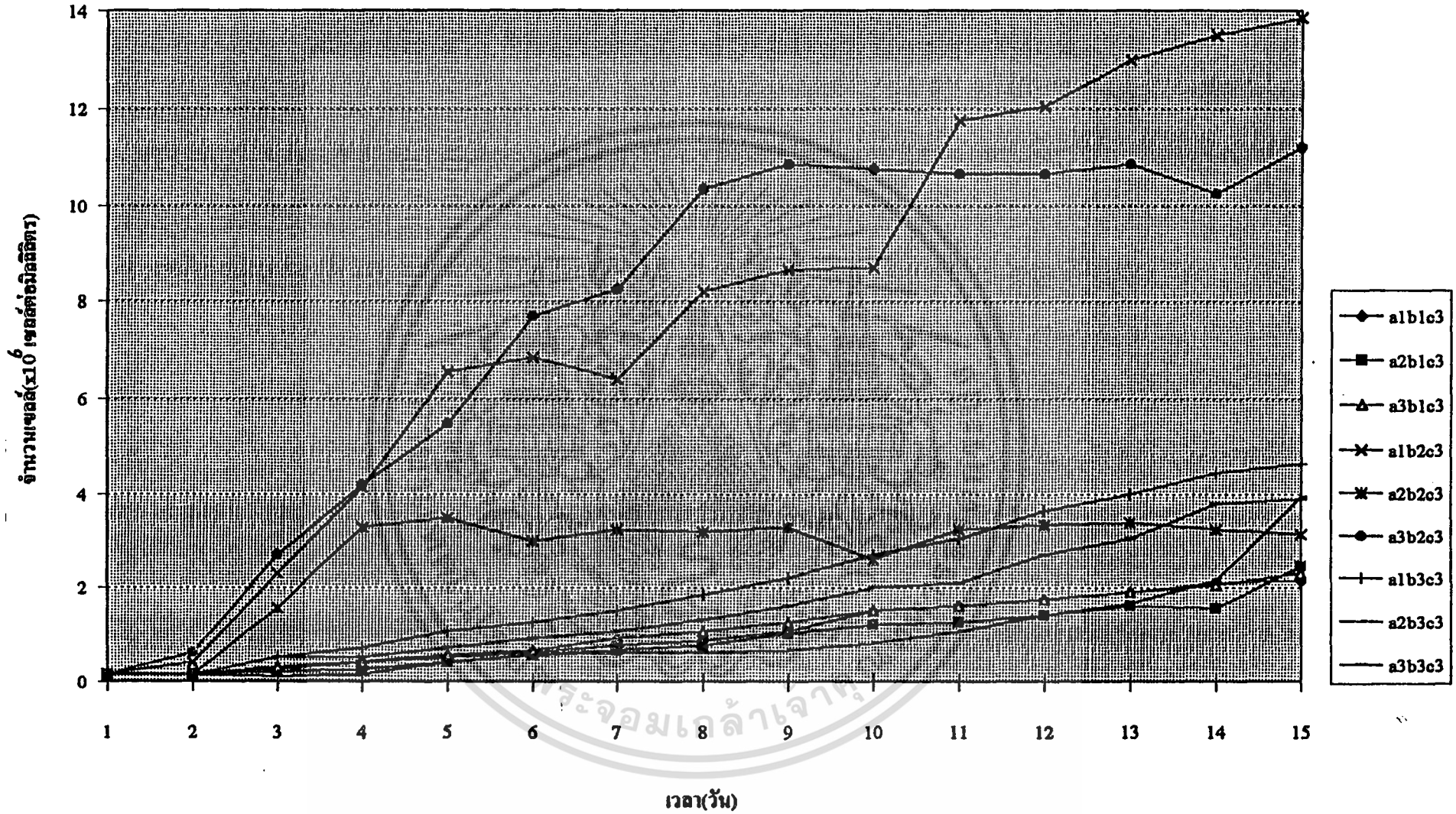
รูปที่ 4-16 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Chlorella sp.* ในอาหารสูตรที่ 3 ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์



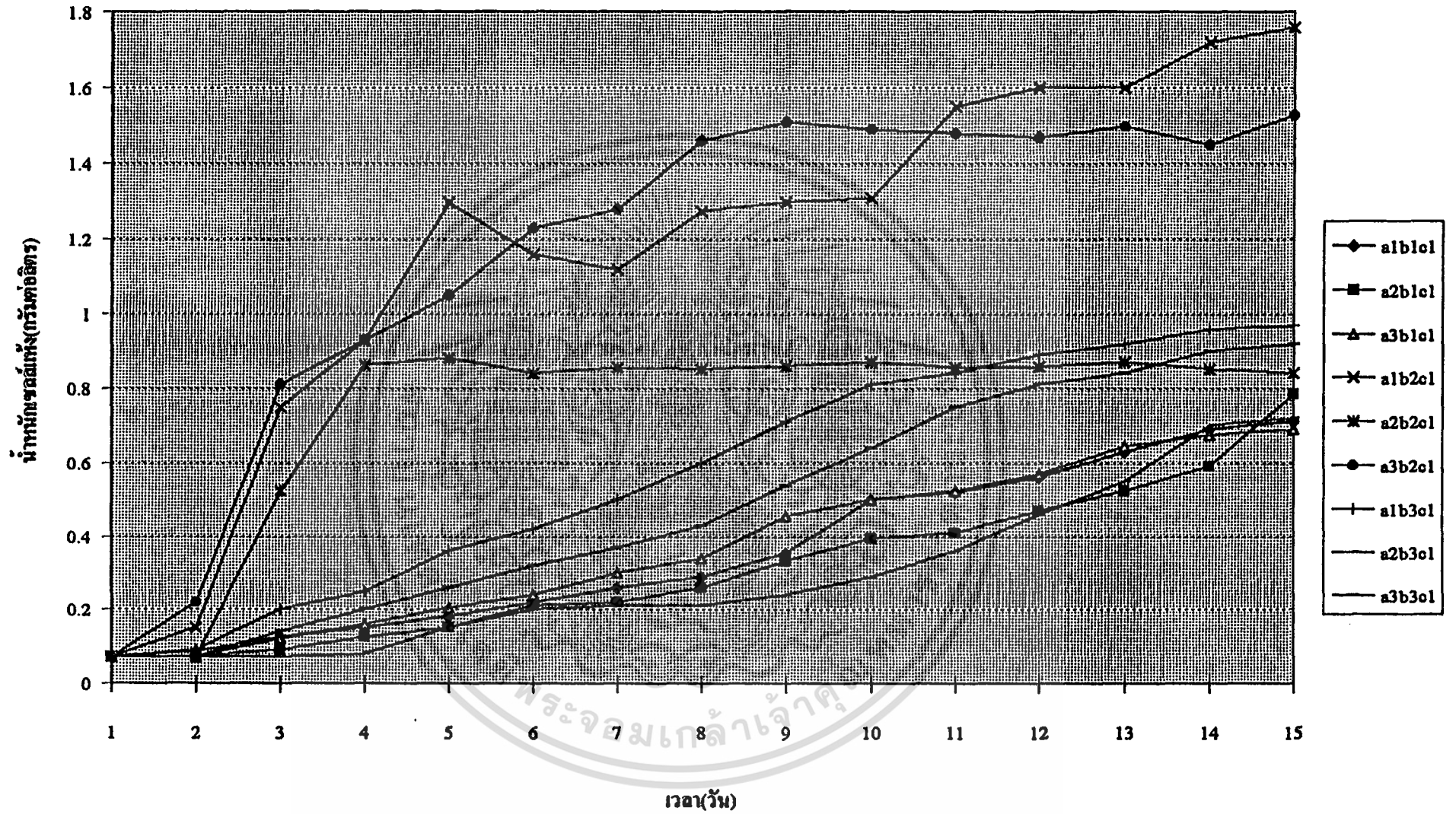
รูปที่ 4-17 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella sp.* ( $\times 10^6$  เซลล์/มล) ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์



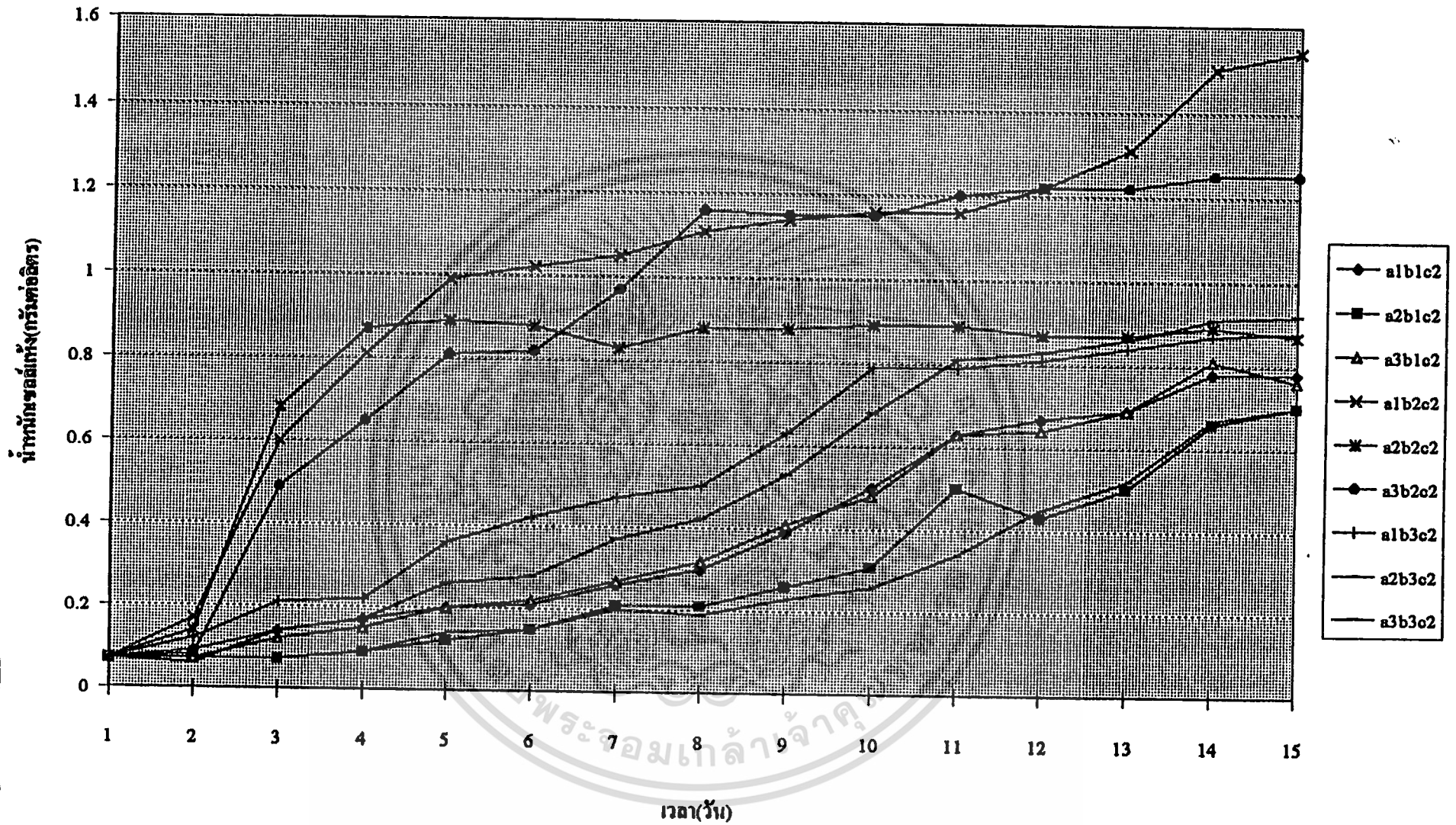
รูปที่ 4-18 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella sp.* ( $\times 10^6$  เซลล์/มล) ที่ระดับความเข้มแสง 1400 ลักซ์



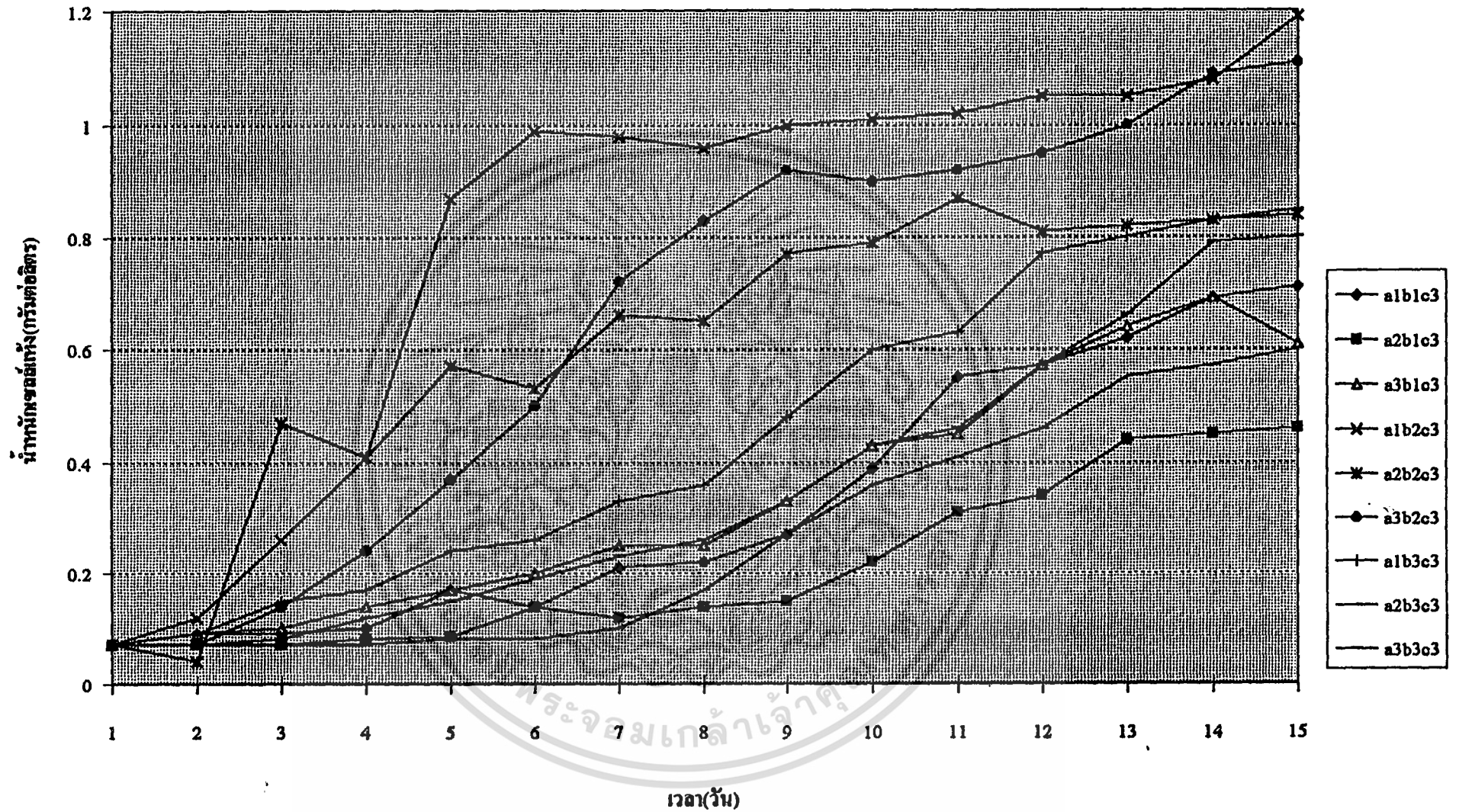
รูปที่ 4-19 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella sp.* ( $\times 10^6$  เซลล์/มล) ที่ระดับความเข้มแสง 400 ลักซ์



รูปที่ 4-20 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัม/ลิตร) ของสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์



รูปที่ 4-21 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัม/ลิตร) ของสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่ระดับความเข้มแสง 1400 ลักซ์



รูปที่ 4-22 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัม/ลิตร) ของสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่ระดับความเข้มแสง 400 ดักซ์

ตารางที่ 4 -1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Chlorella sp.* หลังการเพาะเลี้ยง 15 วัน

สายพันธุ์ \ อาหาร	ความเข้มแสง 2400 ลักซ์			ความเข้มแสง 1400 ลักซ์			ความเข้มแสง 400 ลักซ์		
	b1	b2	b3	b1	b2	b3	b1	b2	b3
a1	0.259	1.596	0.546	0.301	1.307	0.421	0.262	0.698	0.378
a2	0.289	0.377	0.263	0.211	0.411	0.266	0.17	3.65	0.226
a3	0.256	1.29	0.465	0.279	0.909	0.476	0.248	0.72	0.313

ตารางที่ 4 -2 แสดงจำนวนเซลล์( $\times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร)ของสาหร่าย *Chlorella sp.* หลังการเพาะเลี้ยง 15 วัน

อาหาร สายพันธุ์	ความเข้มแสง 2400 ลักซ์			ความเข้มแสง 1400 ลักซ์			ความเข้มแสง 400 ลักซ์		
	b1	b2	b3	b1	b2	b3	b1	b2	b3
a1	2.15	13.85	4.65	2.25	11.25	3.55	2.15	3.05	3.2
a2	2.45	3.15	3.95	1.75	3.5	2.2	1.4	3.05	1.85
a3	2.3	11.2	3.9	2.35	7.8	4.05	5.95	6.2	2.65

ตารางที่ 4 -3 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัม/ลิตร)ของ *Chlorella sp.* หลังการเพาะเลี้ยง 15 วัน

สายพันธุ์ \ อาหาร	ความเข้มแสง 2400 ลักซ์			ความเข้มแสง 1400 ลักซ์			ความเข้มแสง 400 ลักซ์		
	b1	b2	b3	b1	b2	b3	b1	b2	b3
a1	0.71	1.69	0.97	0.78	1.54	0.88	0.71	0.85	0.85
a2	0.785	0.838	0.72	0.7	0.87	0.7	0.71	0.84	0.6
a3	0.69	1.34	0.92	0.76	0.92	0.92	0.61	1.1	0.8

## บทที่ 5

## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองพบว่าสาหร่าย *Chlorella sp.* แต่ละสายพันธุ์ที่ได้มาจากแหล่งน้ำแต่ละแหล่งนั้นมีการเจริญเติบโตที่ต่างกัน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าสาหร่าย *Chlorella sp.* สายพันธุ์ที่ได้จากสระน้ำตึกพระเทพเจริญเติบโตได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 ที่ระดับความเข้มแสง 2400 ลักซ์ โดยในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 1.596 นับจำนวนเซลล์ได้  $13.85 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 1.69 กรัมต่อลิตร

ผลการทดลองที่ได้นำไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธีแบบแฟคทอเรียลเพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดลองที่ได้ ได้ข้อสรุปว่า ในแต่ละสายพันธุ์ของสาหร่าย *Chlorella sp.* มีอัตราการเจริญที่ต่างกัน และสาหร่าย *Chlorella sp.* ในแต่ละสูตรอาหาร ในแต่ละระดับความเข้มแสง จะให้ค่าการเจริญเติบโตที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแต่ละสายพันธุ์ทำให้ทราบถึงแหล่งที่มาของแต่ละสายพันธุ์ในธรรมชาติที่สามารถนำมาเพิ่มปริมาณให้ได้มากที่สุด เพื่อนำไปขยายการเพาะเลี้ยงในระดับนอกห้องปฏิบัติการ หรือเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยที่เป็นประโยชน์ต่อไป เช่น ใช้ในการศึกษาการดูดซับโลหะหนัก การบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น

## ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการทดลองที่ได้ปรากฏว่าสาหร่าย *Chlorella sp.* จะเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับความเข้มแสงสูงและมีแนวโน้มที่ปริมาณสาหร่าย *Chlorella sp.* จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ระดับความเข้มแสงที่มากขึ้น ดังนั้นหากต้องการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* ให้ได้ปริมาณสูงจึงควรมีการเพิ่มความเข้มแสงให้มากกว่าในการทดลองนี้
2. อากาศเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella sp.* การทดลองนี้ใช้วิธีการเขย่าฟาสก์ให้อากาศ ปริมาณสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่ได้จึงมีปริมาณน้อย การให้อากาศโดยใช้เครื่องให้อากาศที่มีระบบกรองอากาศแก่สาหร่าย *Chlorella sp.* ตลอด 24 ชั่วโมง น่าจะทำให้ปริมาณสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีปริมาณสูงกว่านี้

### เอกสารอ้างอิง

- กาญจนกาณ์ ลีวโนมนต์ สาทร่ายสีเขียว สาทร่าย คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,  
2527. หน้า 82-102
- ณัฐพร พันธุ์นาวิน พงศ์เทพ อัสวารีย์ และอาภารัตน์ มหาจันทร์ “สาทร่ายกับศักยภาพที่รอ  
การพัฒนา” วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 10(3),2532. หน้า 42-50
- ทัศนีย์ สุขสวัสดิ์ ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล และวีระ วัชรกรโยธิน “การเพาะเลี้ยงไรแดงเพื่อการ  
ค้า” รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 25 คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตร  
ศาสตร์ ,2530. หน้า 297-306
- ธิดา เพชรมณี และมาวิทย์ อัสวารีย์ “การใช้สารประกอบคลอรินควบคุมโปรโตซัวในการ  
เพาะเลี้ยง *Chlorilla sp.*” รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2532 สถาบัน  
ประมงน้ำจืด กรมประมง,2530. หน้า 255-261
- ธิดา เพชรมณี มาวิทย์ อัสวารีย์ และสุจินต์ บุญช่วย “ความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงไรแดง  
ด้วย *Chlorilla sp.*” รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2536 คณะประมง  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,2530 หน้า 297-300
- บรรจง เทียนสงรัสมิ์ การเพาะเลี้ยงอาหารที่มีชีวิต การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล สำนักพิมพ์อักษร  
เจริญทัศน์,2529 หน้า 28-33
- พิสมัย ชัยรัตน์อุทัย การบำบัดเชิงชีววิทยา มลพิษทางน้ำ ภาควิชาเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระ  
จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง,2539 หน้า 82-110
- อิทธิพร จันทรเพ็ญ อาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน อาหารและการให้อาหาร ปลา กุ้ง สำนักพิมพ์ขอนแก่น,  
2532 หน้า 41-62
- สิริรักษ์ วงศ์ไพโรจน์พานิช “การเพาะเลี้ยงสาทร่ายคลอเรลลาน้ำจืด” ซีเนียร์โปรเจก  
แผนกวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,2525.
- Becker,E.W Microalgae:Biotechnology and microbiology. Cambridge University Press,  
1994.
- Lee, W.H. and M.Rosenbaum. *Chlorella*.:The Sun-powered Supernutrient and Its Beneficial  
Properties,1987 pp 4-16.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Merchant, R.E. ,C.D. Rice and H.F. Young. Dietary *Chlorella pyrenoidosa*. for patients with malignant glioma : Effects on immunocompetence, quality of life and survival. *Phytotherapy*. 4(6),1990 pp. 220-231
- Steenblock, D. *Chlorella* : Nutural Medicinal Algae, 1987. pp.3-8
- Thailand Institute of Scientific and Technological research : List of culture collection,1995.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก

1. สูตรอาหารเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.*

## 1.1 N-8 Medium (Thailand, 1995)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	260.0 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	740.0 mg
$\text{CaCl}_2$	10.0 mg
FeEDTA	10.0 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.0 mg
$\text{KNO}_3$	1000 mg
Tract element mixture	1 ml
Distilled water to	1000 ml

## Tract element mixture for N-8 Medium

$\text{Al}_2(\text{SO}_4) \cdot 18\text{H}_2\text{O}$	3.58 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	12.98 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.83 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.20 g
Disstilled water to	1000 ml

1.2 N-8 Medium (ใช้ Glycine แทน  $\text{KNO}_3$  )1.3 N-8 Medium (ใช้ Urea แทน  $\text{KNO}_3$  )

## 2. วิธีการวัดอัตราการเจริญ

## 2.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Becker, 1994)

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Chlorella sp.* ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 การนับจำนวนเซลล์ (สิริรัตน์, 2525)

ใช้กล้องจุลทรรศน์และฮีมาไซโตมิเตอร์ (Improved Neubauer) นับจำนวนเซลล์ จำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella sp.* = จำนวนเซลล์ที่นับได้  $\times 5 \times 10^4$  (เซลล์ต่อลูกบาศก์ เซนติเมตร)

## 2.3 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Becker, 1994)

ใช้ชุดกรอง Millipore และกระดาษกรอง GF/C ที่อบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน แล้ว กรองสาหร่าย *Chlorella sp.* 10 มิลลิลิตร อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่ได้ในหน่วยกรัมต่อลิตร

## 8. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลแบบแฟคทอเรียลเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้ว่า ปัจจัยต่าง ๆ มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella sp.* อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 1 Analysis of variance ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella sp.* ที่สภาวะต่าง ๆ

SOV	df	SS	MS	F	F <sub>table</sub>
r	14	8.921	1.569	8.814*	2.15
a	2	2.192	1.096	61.570*	19.50
b	2	13.317	6.658	374.050*	19.50
c	2	1.416	0.708	39.764*	19.50
ab	4	1.512	0.378	21.230*	5.63
bc	4	1.583	0.396	22.220*	5.63
ac	4	0.319	0.080	4.470	5.63
error	372	6.624	0.0178		

\* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ 0.05 %

r = วันที่ใช้ในการทดลอง

a = สายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella sp.*

b = สูตรอาหาร

c = ระดับความเข้มแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้