



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดแดงในท้องถิ่น
และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าว

โดย

กมลวรรณ ศรีปลั่ง

สุรางค์รัตน์ พันแสง

พวงพกา แก้วกรม



มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

2554



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดแดงในท้องถิ่น
และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าว

โดย

กมลวรรณ ศรีปลั่ง

สุรางค์รัตน์ พันแสง

พวงผกา แก้วกรม

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2554



ชื่อโครงการวิจัย(ภาษาไทย) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแหนแดงในท้องถื่นและ
สำหรับเลี้ยงแหนแดงน้ำเงินเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าว

(ภาษาอังกฤษ) Study of Appropriate Conditions for Growth of
Azolla spp. and Blue-Green Algae to Increase
Rice Yield

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวกมลวรรณ ศรีปลั่ง

นางสาวสุรางค์รัตน์ พันแสง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พวงผกา แก้วกรม

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2554

จำนวนเงิน 110,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 11 เดือน

ตั้งแต่วันที่ 1 พฤศจิกายน พ.ศ.2553 ถึง วันที่ 30 กันยายน พ.ศ.2554

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแหนแดงและสำหรับเลี้ยงแหนแดงน้ำเงิน
มุ่งเน้นในการเพิ่มปริมาณ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ควบคู่กับการเกษตรอินทรีย์ ซึ่งจะนำไปสู่การวางแผนการ
จัดการดินและสิ่งแวดล้อมในท้องถื่นอย่างมีประสิทธิภาพ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ
การทดลองที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแหนแดง วางแผนการทดลองแบบ
Randomized Complete Block Design หรือ RCBD พบว่า แหนแดงที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2
 K_2HPO_4 อัตรา 4 กรัม/กระถาง มีอัตราการเจริญเติบโตมากที่สุด เท่ากับ 53.71 ± 7.25 กรัมต่อหน่วยทดลอง
น้ำหนักแห้ง 2.17 ± 0.53 กรัม สูตรอาหารที่ 5 K_2HPO_4 อัตรา 10 กรัม/กระถาง มีอัตราการเจริญน้อยที่สุด
เท่ากับ 9.57 ± 1.73 กรัมต่อหน่วยทดลอง น้ำหนักแห้ง 0.45 ± 0.10 กรัม การทดลองที่ 2 การศึกษาสภาวะที่
เหมาะสมต่อการเจริญของสำหรับเลี้ยงแหนแดงน้ำเงิน พบว่า *Nostoc* sp. มีอัตราการเจริญมากที่สุดเท่ากับ
 $0.431 \mu, day^{-1}$ รองลงมา คือ สายพันธุ์ *Anabaena* sp. และ *Calothrix* sp. ตามลำดับ การเพิ่มความ
เข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ทำให้อัตราการเจริญและผลผลิตน้ำหนักแห้งลดลง สายพันธุ์ที่มีอัตรา
การเจริญ น้ำหนักแห้งสูงสุด คือ *Nostoc* sp. และสำหรับเลี้ยงแหนแดงน้ำเงินที่สามารถเจริญและให้ผลผลิต
น้ำหนักแห้งสูงที่ pH 5.0-8.5 และเมื่อเปลี่ยนทุกระดับ pH แล้ว สายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญ น้ำหนักแห้ง
สูง คือ *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน สำหรับเลี้ยงแหนแดงน้ำเงินสามารถ
เจริญและให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งสูงที่สุด เมื่อได้รับความเข้มแสงที่ระดับ $80 \mu mole quanta cm^{-2} s^{-1}$

และเมื่อเฉลี่ยทุกระดับความเข้มแสงแล้วสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญ น้ำหนักแห้งสูง คือ *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

คำสำคัญ : การเจริญ , แหนแดง , สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

Abstract

This study investigated on appropriate condition for growth of *azolla* spp. and blue-green algae by focus on increase quantity. This approach was applied to using cooperated with organic farm. This technique will be an effectively for soil and environmental management. This research was divided into two parts. The first was investigated on an optimum conditions for the growth of *azolla* spp.. Experimental design was a Randomized Complete Block Design (RCBD). The results indicated that *azolla* spp. in the second treatment which used K_2HPO_4 4 g/pot had the highest growth rate. *Azolla* spp in this treatment have grew about 53.71 ± 7.25 g/unit and it have 2.17 ± 0.53 g of dry matter. Meanwhile, the fifth treatment, which used K_2HPO_4 10 g/pot, have the lowest growth rate of *azolla* spp.. The growth rate and dry weight were 9.57 ± 1.73 g/unit and 0.45 ± 0.10 g, respectively.

The second part monitored an optimum condition on the growth of blue-green algae. The results found that *Nostoc* sp. had the highest growth rate ($0.431 \mu, \text{day}^{-1}$) followed by *Anabaena* sp. and *Calothrix* sp., respectively. The result on concentration of NaCl had a negative effected to growth rate and dry weight of *azolla* spp. Comparing between three strains of cyanobacteria at pH 5.0-8.5 indicated that *Nostoc* sp. had the highest on growth and dry biomass. But on the average pH, *Anabaena* sp and *Nostoc* sp. showed the highest growth rate and biomass, and there were no significantly different. The optimum range of light intensity was a $80 \mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{s}^{-1}$. On the average light intensity the results indicated that *Anabaena* sp and *Nostoc* sp. showed the highest growth rate and biomass, and there were no significantly different.

Keywords : Growth, Azolla , blue-green algae

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ เนื่องจากความร่วมมือจากบุคคลและองค์กรจากหลายภาคส่วน คณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ นายกองค์การบริหารส่วนตำบลบ้านหวาย คุณบุญญาฤทธิ์ ต่ายขาว ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเผยแพร่องค์ความรู้ต่าง ๆ ของงานวิจัยให้แก่ประชาชนในเขตพื้นที่ดังกล่าว และขอขอบพระคุณสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่คอยช่วยให้คำปรึกษาและให้ตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมาใช้ในการทดลองครั้งนี้

ขอขอบคุณ อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือให้กำลังใจและประสานงานการวิจัยจนลุล่วงสำเร็จไปได้ด้วยดี

ท้ายสุดนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ทำหน้าที่ในการประสานงานจนทำให้การดำเนินโครงการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอคิดเห็นและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์จากผู้เข้ารับการอบรมเป็นสิ่งที่คณะผู้วิจัยระลึกถึงความกรุณา ซึ่งมีส่วนสำคัญที่ทำให้โครงการวิจัยนี้มีความสมบูรณ์ ถูกต้อง และเป็นประโยชน์ต่อชุมชนในท้องถิ่นของจังหวัดเพชรบูรณ์ ท้ายสุดนี้ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ สำนักงบประมาณ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

กมลวรรณ ศรีปลั่งและคณะ

11 มกราคม 2555

	หน้า
บทคัดย่อไทย	III
บทคัดย่ออังกฤษ	IV
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญเรื่อง	VI
สารบัญภาพ	VII
สารบัญตาราง	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	3
กรอบแนวความคิดของการวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
แห่นแดง (<i>Azolla pinnate</i> R.Br.)	5
ประโยชน์ของแห่นแดง	6
การขยายพันธุ์	7

สายพันธุ์ของเหานแดง	7
วิธีการเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์	7
สภาพแวดล้อมที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต	7
ชีพจักรของเหานแดง	8
ประโยชน์ที่มีต่อการเกษตร	8
การใช้เหานแดงเป็นปุ๋ยพืชสดในนาข้าว	9
สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae)	11
อนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรีย	12
ที่อยู่อาศัย	16
ขนาดของเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	17
การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย	17
การเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	22
ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	22
การวัดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย	26
สารบัญเรื่อง	
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	หน้า
วิธีดำเนินการวิจัย	28
การเก็บรวบรวมข้อมูล	28
การวิเคราะห์ข้อมูล	30
สถานที่ทำการทดลอง	30
ระยะเวลาทำการทดลอง	30
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	31
การทดลองที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเหานแดง	31
การทดลองที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	35

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	45
สรุปผลการวิจัย	45
ข้อเสนอแนะ	47
บรรณานุกรม	48
ภาคผนวก	49
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร BG11	50
ภาคผนวก ข การวัดความหนาแน่นของเซลล์	51
ภาคผนวก ค ภาพการทดลอง	52



ภาพที่		หน้า
1.1	กรอบแนวความคิดของการวิจัย	4
2.1	ลักษณะต้นของแหนแดง	6
2.2	เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (<i>Anabaena azollae</i>)	6
2.3	ลักษณะโครงสร้างของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย	12
2.4	การเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว	22
4.1	อัตราการเจริญของแหนแดง (<i>Azolla</i> spp.) ระหว่างสัปดาห์ที่ 5-8	33
4.2	ผลของโซเดียมคลอไรด์ 0 , 0.5 , 1.0 , 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	37
4.3	ผลของ pH 5 ระดับ (4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.4 และ 8.5) ต่อน้ำหนักแห้ง	

	ของสารยาสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	41
4.4	ผลของความเข้มแสง 40 , 60 และ 80 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ต่อน้ำหนักแห้งของสารยาสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	43



สารบัญตาราง

ตาราง ที่		หน้า
1.1	ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าปุ๋ยเคมีสูตรที่สำคัญ ปี 2546-2550	2
2.1	องค์ประกอบทางเคมีของแอมโมเนียม	8
2.2	การจำแนกไฮยาโนแบคทีเรียตามแบบนักพฤกษศาสตร์	14
2.3	สิ่งที่ใช้ในการพิจารณาในการจัดจำแนกไฮยาโนแบคทีเรีย	15

4.1	อัตราการเจริญ ของแหนแดง (<i>Azolla</i> spp.) ระหว่างสัปดาห์ที่ 1-4	32
4.2	อัตราการเจริญ ของแหนแดง (<i>Azolla</i> spp.) ระหว่างสัปดาห์ที่ 5-8	33
4.3	น้ำหนักแห้ง ของแหนแดง (<i>Azolla</i> spp.)	34
4.4	อัตราการเจริญ และน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	35
4.5	ผลของโซเดียมคลอไรด์ 0 , 0.5 , 1.0 , 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ต่ออัตราการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	36
4.6	ผลของโซเดียมคลอไรด์ 0 , 0.5 , 1.0 , 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	36
4.7	ผลของโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ ต่ออัตราการเจริญ และน้ำหนักแห้ง ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	38
4.8	ผลของ pH 5 ระดับ (4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.4 และ 8.5) ต่ออัตราการเจริญ ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	39
4.9	ผลของ pH 5 ระดับ (4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.4 และ 8.5) ต่อน้ำหนักแห้ง ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	39
4.10	ผลของ pH ระดับ 4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.4 และ 8.5 ต่ออัตราการเจริญ และน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	40
4.11	ผลของความเข้มแสง 40 , 60 และ 80 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ต่ออัตราการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	42
4.12	ผลของความเข้มแสง 40 , 60 และ 80 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	42
4.13	ผลของความเข้มแสง 40 , 60 และ 80 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ต่ออัตราการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์	43

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีพลเมืองประมาณ 60% มีอาชีพปลูกข้าวเป็นหลัก ในพื้นที่ทั้งหมดประมาณ 65 ล้านไร่ ให้ผลผลิตข้าวคิดเป็นมูลค่าประมาณ 70,000 ล้านบาท ทำให้ประเทศไทยได้ชื่อว่าเป็นประเทศหนึ่งที่มีการผลิตข้าวเป็นรายใหญ่ของโลก แต่ในขณะเดียวกันพบว่าเกษตรกรไทยที่มีอาชีพทำนายนากจนลงเรื่อย ๆ ทั้งนี้เป็นเพราะราคาข้าวตกต่ำ วัสดุที่ใช้เป็นปัจจัยการผลิตมีราคาสูงขึ้นเรื่อย ๆ ดินเสื่อมสภาพลง จำเป็นต้องเพิ่มปัจจัยการผลิตมากขึ้น จากการสำรวจสถิติทางการเกษตรของศูนย์สถิติการเกษตร สำนักเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2550) พบว่าประเทศไทยมีการนำเข้าปุ๋ยเคมีเพิ่มมากขึ้นทุกปี เมื่อปี พ.ศ.2545 มีปริมาณการใช้ 3,713,328 ตัน ปี พ.ศ.2546 ปริมาณการใช้ 3,952,356 ตัน และปี พ.ศ.2547 ปริมาณการใช้ 3,919,766 ตัน แสดงว่าดินนาในประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ลดลงและมีศักยภาพการผลิตข้าวต่ำ ทำให้ชาวนาต้องเพิ่มเงินซื้อปุ๋ยเคมีมากขึ้น ประกอบกับปุ๋ยเคมีมีราคาแพงทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น เกษตรกรไทยจึงยากจนลง การพัฒนาประเทศเพื่อให้มีความเจริญก้าวหน้าทัดเทียมอารยประเทศ สิ่งที่ต้องแก้ไขรีบด่วน คือ การจัดการความยากจนของชาวนาไทยซึ่งเป็นประชากรส่วนใหญ่ของประเทศให้มีการอยู่ดีกินดี การเพิ่มพื้นที่การเพาะปลูกย่อมเป็นไปได้ยาก เนื่องจากจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นทุกปี ในขณะที่พื้นที่ดินยังคงเท่าเดิม สิ่งที่เป็นไปได้คือ การเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ให้สูงขึ้น หรือลดต้นทุนการผลิตลง ซึ่งการเพิ่มผลผลิตในแต่ละพื้นที่มีปัจจัยหลายอย่างร่วมกัน แต่ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ คือ การใส่ปุ๋ยเพื่อเพิ่มธาตุอาหารที่จำเป็นลงไปบนดิน และขณะเดียวกันเกษตรกรขาดความมั่นใจว่าเมื่อใช้ปุ๋ยแล้วผลผลิตที่ได้คุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่ ปุ๋ยไนโตรเจนเป็นธาตุชนิดหนึ่งที่พืชต้องการในปริมาณสูงและดินมักจะขาดจำเป็นต้องใส่เพิ่มเติมลงไปบนดินอยู่เสมอ ซึ่งจากการสำรวจสถิติทางการเกษตรของศูนย์สถิติการเกษตร (2550) ฝ่ายปุ๋ยเคมี สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร รายงานว่าประเทศไทยได้มีการนำเข้าปุ๋ยเคมีสูตรที่สำคัญ ดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าปุ๋ยเคมีสูตรที่สำคัญ ปี 2546-2550

ปริมาณ : ตัน

มูลค่า : ล้านบาท

สูตรปุ๋ย	2546		2547		2549		2550	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
21-0-0	310,683	1,044	112,384	549	226,994	1,023	268,867	1,446
46-0-0	1,623,729	10,771	1,559,996	13,217	1,426,732	14,014	1,735,014	18,693
16-20-0	356,164	2,051	306,964	2,106	285,432	2,422	454,808	3,800
16-16-8	39,616	248	18,230	138	19,800	171	35,491	313
15-15-15	354,508	2,567	368,531	3,245	282,033	2,656	386,624	3,938
13-13-21	50,538	433	82,357	762	39,120	405	48,058	534
18-46-0	314,132	2,770	357,171	3,853	-	-	-	-
0-0-60	341,900	1,970	439,434	3,100	-	-	-	-
อื่นๆ	446,517	3,893	482,724	5,518	1,233,627	12,863	1,464,383	16,412
รวม	3,527,104	24,703	3,727,791	32,489	3,513,738	33,554	4,393,245	45,136

ที่มา : ฝ่ายปุ๋ยเคมี สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ปุ๋ยไนโตรเจนเป็นธาตุชนิดหนึ่งที่พืชต้องการในปริมาณสูงและดินมักจะขาด จำเป็นต้องใส่เพิ่มลงไปในดินอยู่เสมอซึ่งจากการสำรวจสถิติทางการเกษตรของสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร รายงานว่าในปี 2550 มีการสั่งปุ๋ยไนโตรเจนเข้ามาเป็นจำนวนมากประมาณ 2,928,862 ตัน และปุ๋ยเคมีที่สั่งเข้ามาทั้งหมดประมาณครึ่งหนึ่งนำมาใช้ในนาข้าว

ด้วยเหตุนี้ จึงจำเป็นต้องหาวิธีแก้ไขในการลดค่าใช้จ่ายเรื่องปุ๋ย และขณะเดียวกันก็ปรับปรุงคุณภาพดินให้ดีขึ้น คือ การใช้ແໜແດງແລະ ສາຮ່າຍສີເຢືວແກມນ້ຳເງິນ ຈຶ່ງສາມາດດຶງໂນໂຕຣເຈນຈາກອາກາດໄດ້ ຊ່ວຍເພີ່ມໂນໂຕຣເຈນໃຫ້ກັບດິນແລະພືດ ແລະຍັງປ່ອຍສານຈຳພວກອໍຣ໌ໂມນທີ່ສາມາດກະຕຸ້ນການເຈຣີຢູເຕີບໂຕຂອງພືດໃຫ້ຜລິດສູງຂຶ້ນ ປ່ອຍປ່ອຍອອກຊີເຈນໃນຂະໜາດສັງເກດເຫັນ ໃຫ້ຈຸລິນທຣີທີ່ມີປະໂຫຍດອື່ນ ໆ ເຈຣີຢູເຕີບໂຕໄດ້ດີດ້ວຍ ເມື່ອ ແໜແດງແລະສາຮ່າຍສີເຢືວແກມນ້ຳເງິນ ຂຶ້ນ ໝາຍແນ່ນຈະຊ່ວຍຍືດອຸນຫະພູມດິນໃຫ້ຈັບກັນເປັນໂຄງສ້າງທີ່ດົງຕ້ອງການຂອງນ້ຳຝົນໃຫ້ດິນອຸ່ມນ້ຳດີຂຶ້ນ ນອກຈາກນີ້ສາມາດແກ້ໄຂໂນ້ຍໄດ້ເໝາະສົມຕໍ່ການເຈຣີ ຢູເຕີບໂຕຂອງ ແໜແດງແລະສາຮ່າຍສີເຢືວແກມນ້ຳເງິນ (ຮຽນ, 2546)

ดังนั้น การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ แหนแดงและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการช่วยลดต้นทุนการใช้ปุ๋ยเคมีจำพวกไนโตรเจนให้แก่เกษตรกร หมายถึงการลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกร จึงเห็นสมควรที่จะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมและทดสอบผลของการเจริญเติบโตเพื่อจะนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเจริญของ แหนแดงและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแหนแดงและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

วิเคราะห์หาอัตราการเจริญ (specific growth rate , μ) ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน พร้อมทั้งการหาน้ำหนักแห้งของ แหนแดง, สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ [ผลของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl), ความเป็นกรด-ด่าง (pH), ความเข้มแสง]

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

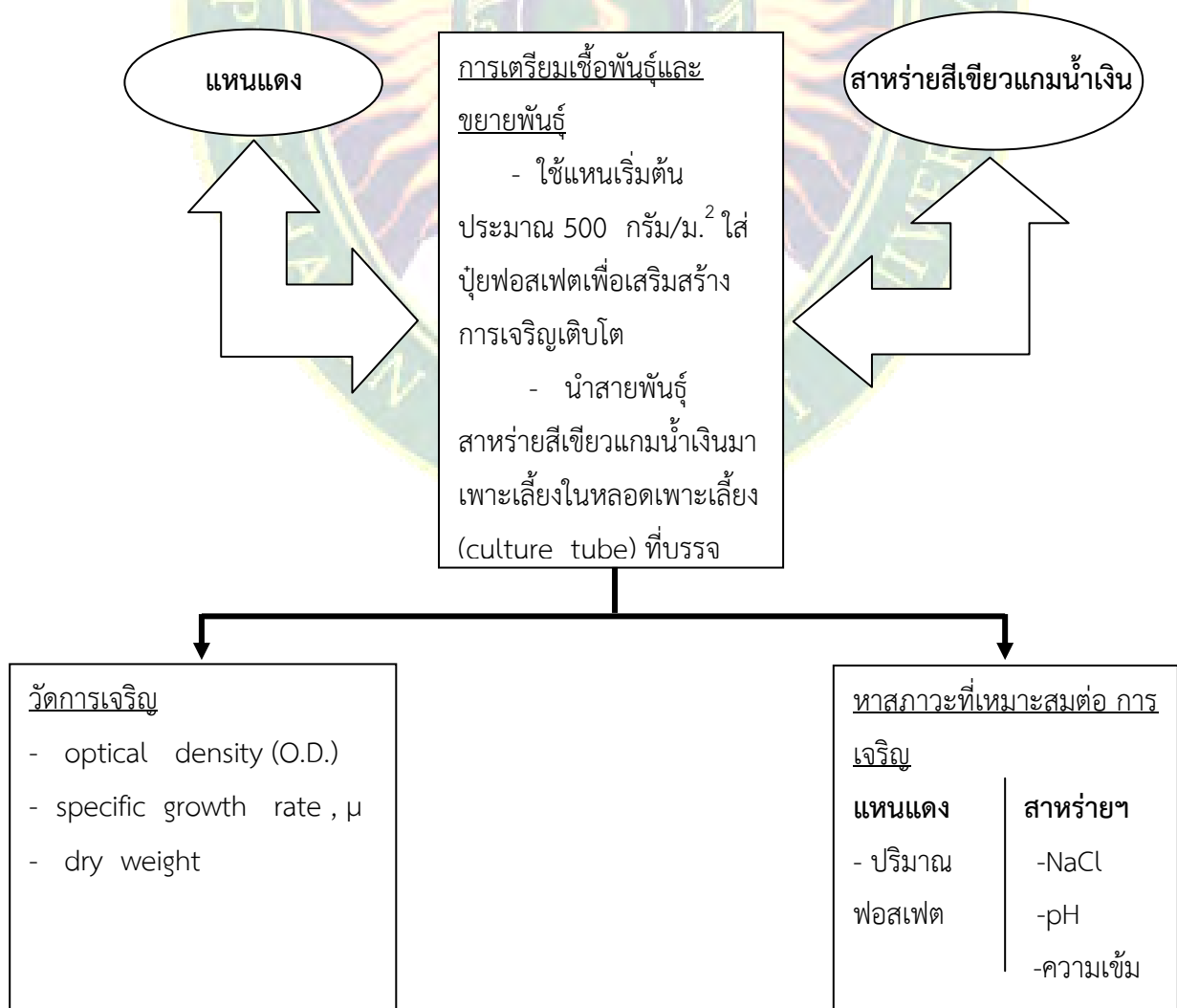
เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแหนแดงและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มุ่งเน้นในการเพิ่มปริมาณเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ควบคู่กับการเกษตรอินทรีย์ นำไปสู่การวางแผนการจัดการดิน และสิ่งแวดล้อมในท้องถิ่นอย่างมีประสิทธิภาพ

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

การเจริญ (Growth) หมายถึง การเพิ่มขนาด จำนวน หรือการเพิ่มของน้ำหนักแห้ง
แหนแดง (Mosquito fern, Water fern) หมายถึง พืชน้ำเล็ก ๆ พวกเฟิร์น พบเจริญเติบโตอยู่บนผิวน้ำในที่ที่มีน้ำขังในเขตร้อนและอบอุ่นทั่วไป

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae หรือ Cyanobacteria) เป็นชื่อที่ใช้เรียกแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถในการสังเคราะห์แสงได้เหมือนพืชทั่วไป แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ และเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์มากในทางอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม

1.6 กรอบแนวความคิดของการวิจัย





ภาพที่ 1.1 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แหนแดง (*Azolla pinnate* R.Br.)

แหนแดง (*Azolla*, Water fern, Water velvet) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Azolla* spp. เป็นพืชลอยบนผิวน้ำ ลักษณะโดยทั่วไปของแหนแดง ประกอบด้วยส่วนต่างๆ คือ ลำต้น (rhizome) ราก (root) และใบ (lobe) มีกิ่งแยกจากลำต้น ใบเกิดตามกิ่งเรียงสลับกันไป แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ใบบน (dorsal lobe) และใบล่าง (ventral lobe) มีขนาดใกล้เคียงกัน รากของแหนแดงจะห้อยลงไปในน้ำตามแนวดิ่งและอาจฝังลงไปในดินโคลนได้ ใบบนมีโพรงใบและมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอาศัยอยู่ในลักษณะพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนี้สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศแล้วเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบในรูปของแอมโมเนียมให้แหนแดงใช้ประโยชน์ได้ ทำให้แหนแดงเจริญเติบโตได้เร็วและมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสูง การที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสูงทำให้แหนแดงสลายตัวได้ง่ายและปลดปล่อยไนโตรเจนและธาตุอาหารพืชอื่น ๆ ออกมาอย่างรวดเร็ว เพื่อให้พืชอื่นหรือจุลินทรีย์นำไปใช้ต่อไป จากการศึกษาพบว่าประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนในต้นแหนแดงจะถูกปลดปล่อยออกมาภายใน 8 สัปดาห์หลังจากการไถกลบ

แหนแดงมีหลายชนิด (species) เช่น *Azolla caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. microphylla*, *A. mexicana*, *A. nilotica*, *A. pinnata* และ *A. rubra* ส่วนใหญ่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปอเมริกา แอฟริกา และเอเชีย แหนแดงชนิดที่พบแพร่หลายในประเทศไทยคือ *A. pinnata* โดยทั่วไป แหนแดงจะอาศัยอยู่ในน้ำนิ่งและนาข้าวทั่วไป เจริญได้ดีในน้ำที่มีความเป็นกรดเป็นด่างระหว่าง 4.0-5.5 อุณหภูมิ 18-25 °C ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศอยู่ระหว่าง 85-90 เปอร์เซ็นต์ แสง 50-75 เปอร์เซ็นต์ของแสงแดดปกติ ($1700 \text{ uE / M}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$) และในสภาพน้ำที่ความเค็มต่ำกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ของเกลือ

แหนแดงมีอัตราการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างรวดเร็วและแตกต่างกันไปตามชนิด เช่น แหนแดงพันธุ์ *Azolla pinnata* สามารถเจริญเติบโตให้น้ำหนักเป็น 2 เท่า ได้ภายใน 2-6 วัน ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ในฤดูแล้งแหนแดงจะเจริญได้ช้ากว่าในฤดูหนาว มีอัตราการเพิ่มน้ำหนักแห้งประมาณ 0.308 กรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง/วัน ตรึงไนโตรเจนได้ประมาณ 9.86 มิลลิกรัมไนโตรเจน/กรัมน้ำหนักแห้ง/วัน *A. mexicana* ให้น้ำหนักเป็น 2 เท่า ในเวลาสั้นที่สุดประมาณ 2.8 วัน ซึ่งสั้นเป็นสองเท่าของ *A. filiculoides* ทั้งนี้เพราะ *A. mexicana* สามารถใช้แสงได้ดีกว่า และสามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่า *A. filiculoides* สำหรับ *A. caroliniana* เป็นแหนแดงที่สามารถเจริญเติบโตได้ตลอดปีโดยไม่ตาย ซึ่งแหนแดงส่วนใหญ่เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะโทรมและตายไปพักหนึ่ง แล้วจึงเกิดใหม่เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม

ธาตุฟอสฟอรัสมีผลต่อการเจริญเติบโตของแหนแดงมากที่สุด ถ้ามีระดับฟอสฟอรัสต่ำกว่า 0.23 เปอร์เซ็นต์ในเนื้อเยื่อ การเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนของแหนแดงจะหยุดชะงัก อาการซึ่งอาจ

สังเกตได้ คือ ใบมีสีแดงเข้ม การเจริญเติบโตลดลง และปลายรากคดงอ การเลี้ยงเหนแดงให้ได้ผลดีจึงควรใส่ปุ๋ยฟอสเฟตในนาบ้าง

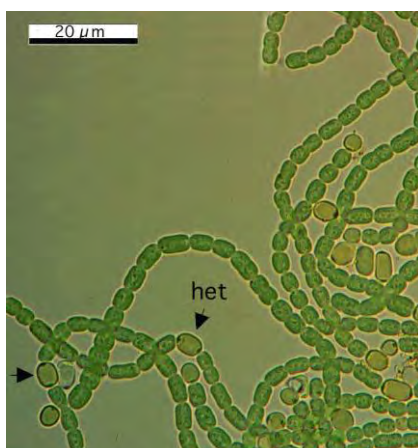


ภาพที่ 2.1 ลักษณะต้นของเหนแดง
ที่มา : วราภรณ์ (2551)

2.2 ประโยชน์ของเหนแดง

เหนแดงมีคุณสมบัติเป็นทั้งปุ๋ยพืชสด และปุ๋ยชีวภาพเนื่องจากในใบของเหนแดงมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) ชื่อ *Anabaena azollae* อาศัยอยู่โดยดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันกับเหนแดงแบบพึ่งพาอาศัยกัน สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ความสัมพันธ์นี้ ทำให้เหนแดงกลายเป็นปุ๋ยพืชสดที่สำคัญ และมีศักยภาพสูงที่สามารถนำมาใช้ในระบบเกษตรพอเพียง ร่วมกับการปลูกข้าวทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี นอกจากนี้ยังสามารถลดการเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าวได้เป็นอย่างดี

กลไกการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายน้ำเงินแกมสีเขียวในเหนแดง



ภาพที่ 2.2 เซลล์สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (*Anabaena azollae*) ในช่องใบของแห่นาง
ที่มา : วราภรณ์ (2551)

แห่นางไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ด้วยตัวของมันเอง แต่อาศัยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อาศัยอยู่ในโพรงใบในการตรึงไนโตรเจน สาหร่ายจำพวกนี้มีอยู่หลายสกุล แต่สกุลที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีมี 9 สกุล ที่สำคัญ คือ สกุล *Anabaena*, *Nostoc*, และ *Oscillatoria* สาหร่ายพวกนี้มีโครงสร้างเป็นเส้นสายยาว (filament) แต่จะมีบางส่วนเท่านั้นที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ส่วนหรือเซลล์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้นี้ เรียกว่า heterocyst ซึ่งจะมีลักษณะแตกต่างไปจากเซลล์อื่น ๆ จนสามารถสังเกตเห็นได้ชัด โดยที่เซลล์ของ heterocyst จะมีขนาดใหญ่กว่าและไม่มีสี โดยทั่วไปแล้วสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมักมีชีวิตอยู่อย่างอิสระ แต่ในบางกรณีก็สามารถที่จะอยู่ร่วมกับเชื้อราได้ เกิดเป็นสิ่งมีชีวิตใหม่ที่แตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและเชื้อรา เรียกว่า Lichen นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดยังสามารถที่จะอยู่ร่วมกับเฟิร์นได้ อย่างเช่นในกรณี *Anabaena* อยู่ร่วมกับแห่นางเป็นต้น

ในแห่นาง ขบวนการตรึงไนโตรเจนจากอากาศของ *Anabaena* จะเกิดที่เซลล์ heterocyst โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเหล่านี้จะทำหน้าที่ตรึง N_2 จากบรรยากาศ โดยใช้ Enzyme Nitrogenase เปลี่ยน N_2 ให้เป็น NH_3 ภายใต้สภาพ reduction จากนั้น NH_3 จะถูกแปรรูปต่อไป โดยรวมตัวกับสารประกอบอินทรีย์จากแห่นางกลายเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนต่าง ๆ เช่น Glutamic acid เป็นต้น

2.3 การขยายพันธุ์ ทำได้ 2 วิธี คือ

1. การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ เมื่อต้นมีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว
2. การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างสปอร์สืบพันธุ์เพศผู้ และเพศเมีย

2.4 สายพันธุ์ของแห่นาง : ที่ใช้ในนาข้าว

1. *Azolla filiculoides*
2. *Azolla pinnata*
3. *Azolla critata*

4. *Azolla rubra*

5. *Azolla nilotica*

2.5 วิธีการเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์

1. เลี้ยงในบ่อดินโคลน กระจก และซีเมนต์ (คล้ายกับการเลี้ยงบัว)
2. เลี้ยงในบ่อธรรมชาติ โดยเลี้ยงในกระชัง
3. เลี้ยงในแปลงโดยตรง

2.6 สภาพแวดล้อมที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต

1. น้ำ
2. แสง
3. อุณหภูมิ
4. อากาศ
5. แร่ธาตุต่าง ๆ
6. ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ

2.7 ชีพจักรของแหนแดง

แหนแดงที่เห็นในธรรมชาติเป็นระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น แม้เมื่อมีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมแหนแดงจะเปลี่ยนระบบการขยายพันธุ์จากการเจริญเติบโตทางลำต้น เป็นการสร้างสปอร์ทั้งเพศผู้และเพศเมียในต้นเดียวกัน สปอร์เพศผู้ (microsporocarp) มีขนาดใหญ่แต่มีสปอร์เล็ก ๆ ภายในมากมาย ส่วนสปอร์เพศเมีย (macrosporocarp) มีขนาดเล็ก แต่ภายในมีไข่อยู่ใบเดียว เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม microsporocarp และ macrosporocarp จะผสมพันธุ์เกิดเป็นตัวอ่อนที่เรียกว่า zygote ซึ่ง zygote นี้จะเจริญเติบโต เป็นต้นแหนแดงต่อไป

2.8 ประโยชน์ที่มีต่อการเกษตร

เนื่องจากแหนแดงสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ (โดยอาศัยกิจกรรมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) ดังนั้น แหนแดงจึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้ในสภาพที่มีปริมาณของปุ๋ยไนโตรเจนต่ำ เมื่อแหนแดงเน่าเปื่อยสลายตัวลงธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ก็จะถูกปลดปล่อยออกมาอย่างรวดเร็ว เพื่อให้พืชอื่นหรือจุลินทรีย์นำไปใช้ต่อไป ด้วยเหตุนี้แหนแดงจึงจัดเป็นพืชที่สามารถนำมาใช้เพื่อเป็นปุ๋ยพืชสดและเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดิน นอกจากนี้แล้วเกษตรกรบางแห่งยังได้นำเอาแหนแดงไปใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงสัตว์ เช่น ปลา สุนัข เป็ด เป็นต้น ในแหนแดงนอกจากจะมีธาตุอาหารพืชสูงแล้วยังมีปริมาณโปรตีนซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของสัตว์อยู่ในปริมาณที่สูงด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 2.1) ทำให้สัตว์เจริญเติบโตได้ดี

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของແໜແດງ

องค์ประกอบทางเคมี	% ธาตุอาหารต่อน้ำหนักแห้งของແໜແດງ
Ash	10.5
Crude fat	3 - 3.36
Crude protein	3 - 5
Nitrogen	23 - 30
Phosphorus	0.5 - 0.9
Calcium	0.1 - 1.0
Potassium	2 - 4.5
Manganese	0.5 - 0.65
Magnesium	0.11 - 0.16
Iron	0.06 - 0.26
Soluble sugars	3.4 - 3.5
Starch	6.50 - 6.54
Chlorophyll	0.34-0.55

2.9 การใช้ແໜແດງเป็นปุ๋ยพืชสดในนาข้าว

(1) คุณลักษณะเด่นของແໜແດງในการใช้เป็นปุ๋ยพืชสด

การที่ແໜແດງสามารถตรึงไนโตรเจนได้ทำให้มีความเหมาะสมมากในการนำมาใช้เป็นปุ๋ยพืชสดในนาข้าว นอกจากการตรึงไนโตรเจนได้แล้วยังมีคุณสมบัติที่เหมาะสมอีกหลายประการ กล่าวคือ

- เจริญเติบโตขยายปริมาณได้รวดเร็ว ———— แໜແດງขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การขยายพันธุ์ແໜແດງแบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีแตกกิ่งก้าน สามารถเพิ่มปริมาณແໜແດງจากเดิมเป็นสองเท่าในเวลาเพียง 3-7 วัน ในทางปฏิบัติถ้าเริ่มเลี้ยงແໜແດງโดยใช้อัตรา 50-100 กก.ต่อไร่ แໜແດງจะขยายเต็มพื้นที่ได้น้ำหนักແໜແດງสด 2-3 ตันต่อไร่ภายใน 2-3 สัปดาห์

- สามารถเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ แໜແດງสามารถเลี้ยงให้เติบโตขยายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในดินนาภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทั้งนี้เพราะคุณสมบัติในการดูดซับฟอสเฟตของดินดังกล่าวต่ำ ทำให้ปุ๋ยฟอสเฟตที่ไม่ถูกดูดซับไว้ในดินเหมือนดินเหนียว หรือพวกดินกรดจัดต่างๆ ทำให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสซึ่งเป็นธาตุอาหารสำคัญต่อการเจริญเติบโตจากปุ๋ยฟอสเฟตได้ดียิ่งขึ้น

- มีไนโตรเจนและธาตุอาหารอื่นเป็นองค์ประกอบสูง ขบวนการฟึงพาอาศัยระหว่าง แหนแดงกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในโพรงใบแหนแดง ทำให้แหนแดงสามารถดึงเอาไนโตรเจนจาก อากาศมาใช้ในการเจริญเติบโตและขยายปริมาณได้อย่างเพียงพอ ทำให้แหนแดงมีไนโตรเจนอยู่ใน ส่วนประกอบสูง เมื่อแหนแดงขยายเต็มพื้นที่หนึ่งไร่จะให้ไนโตรเจนได้ถึงไร่ละ 4-6 กิโลกรัม นอกจากนี้ ไนโตรเจนแล้วยังมีธาตุอาหารพืชอื่นๆ เป็นองค์ประกอบในปริมาณที่ค่อนข้างสูง เช่น ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม เป็นต้น (ตารางที่ 2.1)

- สลายตัวได้รวดเร็ว เนื่องจากแหนแดงมีอัตราส่วนของ C : N ต่ำ (ประมาณ 8-13) ทำให้ ภายใน 1 สัปดาห์หลังจากถูกกลบ แหนแดงจะเริ่มย่อยสลายและปลดปล่อยธาตุอาหารพืชที่เป็นประกอบ ออกมา และประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของธาตุอาหารพืชที่เป็นองค์ประกอบจะถูกปลดปล่อยออกมาภายใน 8 สัปดาห์หลังจากถูกกลบ

- ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงขยายสั้น การเลี้ยงขยายแหนแดงเป็นปุ๋ยพืชสดในนาข้าว ใช้ ระยะเวลา 2-3 สัปดาห์ ก็สามารถขยายปริมาณแหนแดงให้เต็มพื้นที่นา ได้น้ำหนักสด 2-3 ตันต่อไร่ แหนแดงในปริมาณดังกล่าวมีปริมาณไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 4-6 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่

- เพิ่มประสิทธิภาพของปุ๋ยเคมีไนโตรเจนในนาข้าว แหนแดงสามารถลดอุณหภูมิของน้ำ ลดการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้น้ำและวัชพืชอื่นๆ ลดค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ ปัจจัยดังกล่าว สามารถลดการสูญเสียปุ๋ยไนโตรเจนที่ใส่ในนาข้าวในรูปของก๊าซแอมโมเนียได้ ทำให้การใช้ปุ๋ยเคมี ไนโตรเจนของข้าวมียุทธศาสตร์เพิ่มขึ้น

(2) การเตรียมเชื้อพันธุ์และการขยายพันธุ์

การที่จะใช้แหนแดงในนาข้าวจะต้องรู้จักหลักและวิธีการเลี้ยงขยายเชื้อพันธุ์แหนแดงก่อน การเพาะขยายแหนแดงเพื่อให้ได้ปริมาณตามต้องการภายในระยะเวลาที่กำหนดนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของ เชื้อพันธุ์ที่เริ่มต้น ขนาดพื้นที่เลี้ยงขยาย และระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อพันธุ์ โดยทั่วไปการเพาะ ขยายพันธุ์แหนแดงทำได้โดยใช้เชื้อพันธุ์เริ่มต้นประมาณ 500 กรัม/ ตารางเมตร ใส่ปุ๋ยฟอสเฟตเพื่อ เสริมสร้างการเจริญเติบโตประมาณ 2 กรัม ฟอสเฟต/ตารางเมตร จะได้แหนแดงกระจายคลุมพื้นที่ผิวน้ำ บางๆ และสามารถเจริญเต็มพื้นที่ได้ภายใน 3-6 วัน และสามารถลดปริมาณแสงลงได้ผิวน้ำได้เกือบทั้งหมด ทำให้ลดการเจริญเติบโตของสาหร่ายและวัชพืชน้ำได้เป็นอย่างดี การเลี้ยงขยายแหนแดงวิธีนี้เป็นวิธีการที่ ได้ผลแน่นอน แต่ต้องมีการใส่ปุ๋ยฟอสเฟตทุกครั้งที่มีการขยายพื้นที่ แหนแดงที่ขยายเต็มที่จะให้น้ำหนักแหน แดงสดประมาณ 1.5-2 กิโลกรัม/ตารางเมตร

(3) วิธีการใช้ประโยชน์ในนาข้าว

สามารถทำได้ 3 วิธีหลักๆ ดังนี้ คือ

- เลี้ยงแหนแดงก่อนปักดำข้าว หลังจากการเตรียมดินเรียบร้อยแล้ว รักษาระดับ น้ำในนาให้ลึก 5-10 เซนติเมตร ให้หวานแหนแดงที่เลี้ยงไว้ก่อนแล้ว 50 -100 กิโลกรัมต่อไร่ แล้วใส่ปุ๋ย ฟอสเฟต อัตรา 3 - 6 กิโลกรัมฟอสเฟตต่อไร่ ในดินทรายที่ขาดโพแทสเซียมใส่ปุ๋ยโพแทสเซียม อัตรา 3.5-4

กิโกรัมโพแทสเซียมต่อไร่ในวันที่ใส่เชื้อพันธุ์เห่นแดง และใส่ปุ๋ยฟอสเฟตปริมาณเท่าเดิมหลังจากเห่นแดง อายุ 7-10 วัน ซึ่งในสภาพที่ไม่มีปัญหาโรคแมลงรบกวน สิ่งแวดล้อมเหมาะสม เห่นแดงจะเจริญเติบโตเต็ม พื้นที่ให้น้ำหนักสด 2-3 ตันต่อไร่ภายใน 2-3 สัปดาห์ จากนั้นระบายน้ำออก ไกลบเห่นแดงลงดิน เพื่อให้เน่าเปื่อยจึงปักดำกล้าข้าวต่อไป

- เลี้ยงเห่นแดงภายหลังปักดำข้าว ภายหลังปักดำข้าวแล้ว นำเห่นแดงมาเลี้ยง ในนาข้าว อัตรา 50-100 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเช่นเดียวกับวิธีที่ 1 เมื่อเห่นแดงขยายตัวเต็มเนื้อที่ จึงระบาย น้ำออกแล้วจึงย่ำเห่นแดงลงดิน และระบายน้ำกลับมามากครั้งหนึ่ง หรืออาจใช้วิธีกดเห่นแดงลงดินโดยไม่ ต้องระบายน้ำออกก็ได้ หรืออาจปล่อยให้ตายไปเองตามธรรมชาติ ทั้งนี้การใช้ทั้งสองวิธีดังกล่าวร่วมกัน ก็จะสามารถเพิ่มปริมาณของเห่นแดงให้แก่ข้าวได้มากยิ่งขึ้น การที่จะเลือกเลี้ยงขยายเห่นแดงก่อนหรือ พร้อมปักดำข้าวขึ้นขึ้นอยู่กับปัจจัยเรื่องน้ำเป็นสำคัญ ในแหล่งที่สามารถควบคุมน้ำได้เช่นในเขต ชลประทาน การเลี้ยงเห่นแดงก่อนปักดำข้าวทำได้โดยง่าย ในกรณีพื้นที่น่าน้ำฝนที่ไม่สามารถควบคุมเรื่อง น้ำได้ ปัญหาเรื่องน้ำเป็นปัญหาใหญ่เนื่องจากชาวนาไม่สามารถหาน้ำมาใช้ในระยะก่อนปักดำข้าวได้อย่าง เพียงพอ แต่ระยะหลังปักดำข้าวแล้วพื้นที่นาส่วนใหญ่จะมีน้ำขังอยู่ตลอด ดังนั้น ในพื้นที่น่าน้ำฝน การเพาะเลี้ยงเห่นแดงพร้อมหรือหลังปักดำข้าวจึงมีความเป็นไปได้สูง สะดวกในการปฏิบัติมากกว่า

- การเลี้ยงปลาในนาข้าว กรมวิชาการเกษตรแนะนำให้เลี้ยงปลาในนาข้าวโดย ปล่อยู่ออกปลา 400-600 ตัวต่อไร่ สามารถเพิ่มผลผลิตอาหารจากการทำนาปกติเป็นเนื้อปลาได้ 20-30 กก. ต่อไร่ ซึ่งยังต่ำมาก ทำให้เกษตรกรไม่สนใจนัก เนื่องจากอาหารปลาตามธรรมชาติที่มีอยู่ในนาข้าวมี จำกัด การที่เห่นแดงสามารถเลี้ยงขยายในนาข้าวได้ตลอดเวลา ทำให้สามารถใช้เป็นอาหารปลาที่เลี้ยงใน นาข้าวได้ ดังนั้นถ้าเลี้ยงปลาในนาข้าวโดยเลี้ยงเห่นแดงควบคู่ไปด้วย ข้อจำกัดเรื่องอาหารปลาก็จะหมดไป วิธีการดังกล่าวน่าจะเป็นวิธีการเพิ่มผลผลิตในระบบการเลี้ยงปลาในนาข้าวที่มีประสิทธิภาพ

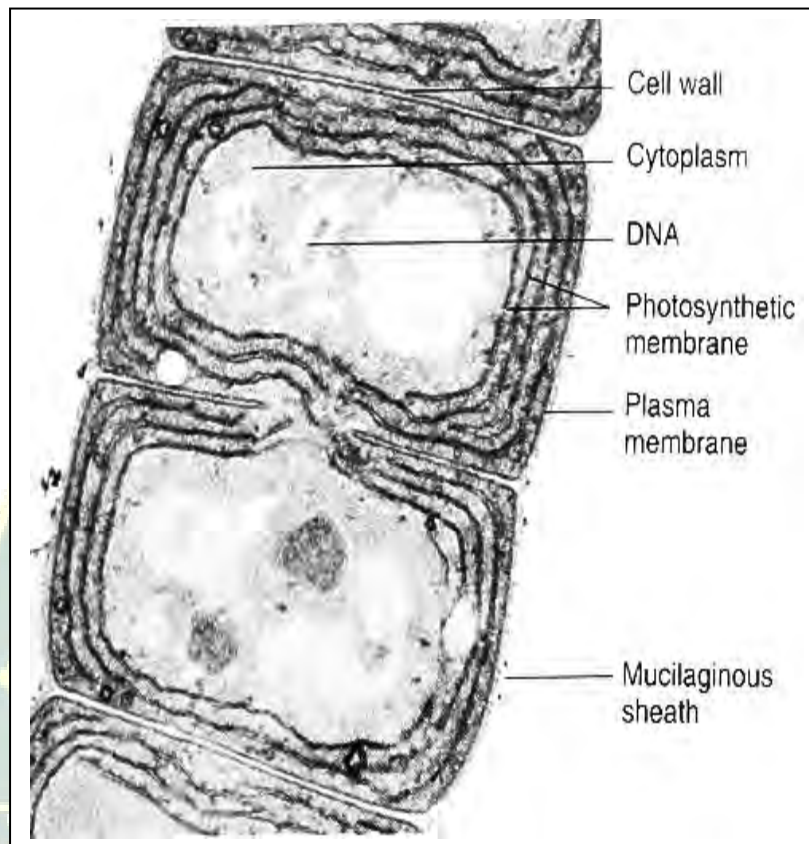
ปลาที่นิยมเลี้ยงในนาข้าวได้แก่ ปลานิล ปลาไน และปลาดุกเทศ เนื่องจาก เป็นปลากินพืชที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตดี สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ ปลาทั้งสามชนิดเหมาะที่ จะปล่อยรวมกัน โดยปกติใช้อัตราส่วนเท่าๆ กัน ใช้ปลา 600 ตัวต่อไร่ หรืออย่างละ 200 ตัว ขนาดปลาที่ ปล่อย 3-5 ซม. ถ้าเลี้ยงเห่นแดงเป็นอาหารปลาด้วยก็สามารถเพิ่มจำนวนลูกปลาได้อีก 3 เท่า การปล่อย ลูกปลาหลังจากปักดำเสร็จหรือหลังจากใส่เห่นแดง ใช้ระยะเวลาเลี้ยงประมาณ 4 เดือน ซึ่งพอข้าวเก็บเกี่ยว ได้ ปลาที่มีขนาดโตสามารถจับไปบริโภคหรือจำหน่ายได้

2.10 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย จัดเป็นโพรคาริโอต (prokaryote) มีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยวและเป็นเส้นสาย ซึ่งประกอบด้วยเซลล์แถวเดียวหรือหลายแถว

มีทั้งที่ไม่สร้างกิ่งแขนงและสร้างกิ่งแขนง ในสภาพธรรมชาติอาศัยอยู่อย่างอิสระเป็นเซลล์เดี่ยว หรืออยู่รวมกันเป็นโคโลนี หรืออยู่รวมกันกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Singleton และ Sainsbury, 1987) และต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ คือ สามารถสังเคราะห์แสงได้เพราะภายในมีคลอโรฟิลล์ เอ และสามารถปลดปล่อยก๊าซออกซิเจนได้ (Lewin, 1977) แต่อย่างไรก็ตาม คลอโรพลาสต์และรงควัตถุก็ยังไม่มีการพัฒนาเหมือนกับสิ่งที่มีสีเขียวโดยทั่วไปคงมีแต่ไทลาคอยด์ที่ขดไปมาภายในที่ผิวภายนอกมีไฟโคบิลิโซม (phycobilisomes) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ค่อนข้างซับซ้อนเกาะติดอยู่ Sze (1986) รายงานว่าไฟโคบิลิโปรตีนในไซยาโนแบคทีเรีย มีอยู่ 4 ชนิด คือ ไฟโคอิทริน (phycoerythrin) ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) อัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) และไฟโคอิทรไซยานิน (phycoerythrocyanin) โดยไฟโคไซยานินและอัลโลไฟโคไซยานิน พบในไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิด และไฟโคไซยานินทำให้เซลล์มีสีน้ำเงินแกมเขียว หน้าที่ของไฟโคบิลิโซม คือ รับแสงที่ความเข้มแตกต่างกัน และส่งผ่านไปเพื่อใช้ในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (Grazer, 1987) จัดเป็นข้อแตกต่างระหว่างพืชชั้นสูงและไซยาโนแบคทีเรียรวมถึงไทลาคอยด์ซึ่งขดไปมาภายในเซลล์ ทำหน้าที่คล้ายกับคลอโรพลาสต์ในพืชที่มีสีเขียว ซึ่งทำหน้าที่เป็นคลื่นลูกโซ่อิเล็กตรอนเพื่อสร้างพลังงาน (Singleton และ Sainsbury, 1987)

ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ชั้นนอก (outer membrane) ค่อนข้างหนาและฉีกขาดได้ง่าย ประกอบด้วยสารพวกเจลลาตินหรือเมือก ถัดเข้ามาเป็นชั้นที่ประกอบด้วยสารพวก peptidoglycan ซึ่งเป็นชั้นที่อัดแน่น มีองค์ประกอบเหมือนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ชั้นในสุดเป็นชั้นที่เรียกว่า cytoplasmic membrane หรือเซลล์เมมเบรน ซึ่งเป็นชนิดที่ติดกับไซโตพลาสซึมภายในไซโตพลาสซึมประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีสีเป็นที่อยู่ของรงควัตถุที่เรียกว่าโปรโทพลาสซึม (protoplast) ภายในโปรโทพลาสซึมมีกรานูลหลายชนิดสะสมอยู่ ได้แก่ ไซยาโนไฟซินกรานูล (cyanophycin granules) , ไกลโคเจนกรานูล (glycogen granules), โพลีฟอสเฟตกรานูล (polyphosphate granules) หน้าที่ของกรานูล คือ เป็นแหล่งสำรองไนโตรเจน คาร์บอนและพลังงาน รวมทั้งฟอสเฟตให้แก่เซลล์ นอกจากนี้ กรานูลมีช่องว่างเก็บแก๊ส (gas vacuole) พบได้ในบางสกุล ทำหน้าที่ในการจมตัวหรือลอยตัวของไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นแพลงก์ตอนในน้ำ ภายในบรรจุแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ (Walsby, 1987) โดยการควบคุมของเอนไซม์ ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase ซึ่งอยู่เป็นกลุ่มภายในโครงสร้างที่เรียกว่าคาร์บอกซิโซม (carboxysomes) ดังภาพที่ 2.3 และในส่วนของเซนโทรพลาสซึมเป็นที่อยู่ของดีเอ็นเอ ribosome 70S ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ ทางด้านพันธุกรรม โดยดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียมีขนาดตั้งแต่ 2,400 ถึง 13,000 กิโลเบส นอกจากนี้ยังพบ extrachromosome ได้แก่ พลาสมิด (plasmid) ซึ่ง Ciferri และคณะ (1989) รายงานว่า พลาสมิดเหล่านี้ส่วนใหญ่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง แต่ถ้าเกิดการสูญหายไปก็ไม่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงแต่อย่างไร



ภาพที่ 2.3 ลักษณะโครงสร้างของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ทั่วไป ตั้งแต่เขตร้อนถึงขั้วโลก Liengen และ Olsen (1997) รายงานว่า พบ *Nostoc commune* เจริญได้ทั่วไปโดยเฉพาะแถบขั้วโลก และเมื่อนำมาศึกษาการตรึงไนโตรเจน พบว่า สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีบนผิวดินเมื่อหิมะละลายแล้ว ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 19 องศาเซลเซียส และไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่เป็นตัวการเพิ่มไนโตรเจนให้กับพื้นผิวโลกและในทะเล โดย Kart และคณะ (1997) ได้ศึกษาในเขตร้อนกึ่งแห้งแล้งในมหาสมุทรแปซิฟิกทางตอนเหนือ พบว่า คาร์บอนและไนโตรเจนที่พบในแหล่งน้ำประมาณ 50% ได้มาจากการสังเคราะห์ของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของวงจรลูกโซ่ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในทะเล

2.11 อนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรีย

การจัดหมวดหมู่

นักพฤกษศาสตร์ได้จัดไซยาโนแบคทีเรียอยู่ใน Division Cyanophyta, Class Myxophyceae ตามการจัดจำแนกของ International Code of Botanical Nomenclature แต่หลังจากจัดว่าเป็นโพรคาริโอตแล้วก็ได้มีการจัดจำแนกโดยใช้หลักของ International Code of Nomenclature of Bacteria ซึ่งนักแบคทีเรียวิทยาได้จัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย ดังนี้

Kingdom	:	Prokaryote
Division	:	Gracilicutes (Gram-negative bacteria)
Class	:	Photobacteria
Subclass	:	Oxyphotobacteria
Order	:	Cyanobacteriales

Singleton และ Sainsbury (1987) ได้แบ่งไซยาโนแบคทีเรียเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) มักอยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม ขยายพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กันที่เรียกว่า binary fission เช่น *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, *Gloeotheca*, *Synechococcus*, *Synechocystis* หรือโดยการแตกหน่อ เช่น *Chamaesiphon*

กลุ่มที่ 2 เป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์ปกคลุมด้วย fibrous layer บางสกุลขยายพันธุ์โดยวิธี multiple fission เพียงอย่างเดียว เช่น *Dermocarpa*, *Xenococcus* บางสายพันธุ์ขยายพันธุ์โดยวิธี multiple fission และ binary fission เช่น *Chroococcidiopsis*, *Dermocarpella*, *Myxosarcina*, *Pleurocapsa* ซึ่ง Multiple fission เป็นการขยายพันธุ์โดยวิธี binary fission ที่เกิดขึ้นติดต่อกันหลาย ๆ ครั้งอย่างรวดเร็ว และมีการสร้าง fibrous layer บางครั้งก็เรียกว่า baeocytes ซึ่งมีการปลดปล่อยออกมาภายนอกเมื่อมีรอยแยกของ fibrous layer หลายสายพันธุ์มีการแบ่งเซลล์และรวมกันเป็นกลุ่มภายใน fibrous layer บางสายพันธุ์ทำ multiple fission และสร้าง bacocyte ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยมีการเปลี่ยนสภาพของ fibrous layer กลุ่มนี้รวม Chamaesiphonales และ Pleurocapsales ไว้ด้วย

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่เป็นเส้นสาย เจริญเติบโตโดยการแบ่งเซลล์ตรงกลางสายเซลล์ โดยเจริญไปในแนวระนาบ สายเซลล์หลักหรือที่เรียกว่า ทริชโอม (trichomes) มีเพียงแถวเดียว ไม่มีการแตกแขนง บางสกุลมี เฉพาะเซลล์ธรรมดา ไม่มีการสร้างเฮเทอโรซิสต์และอะคินีต บางครั้งทริชโอมมีการขดกันเป็นเกลียว เช่น สกุล *Spirulina* หรือทริชโอมอาจมีสายตรง เช่น สกุล *Oscillatoria*, *Pseudoanabaena*

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่เป็นเส้นสาย เจริญเติบโตโดยการแบ่งเซลล์ตรงกลางสายเซลล์ โดยเจริญไปในแนวระนาบ สายเซลล์มีเพียงแถวเดียว ไม่สร้างกิ่งแขนง สร้างเฮเทอโรซิสทีในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน และบางสกุลสร้างอะคีนิต ขยายพันธุ์โดยการขาดท่อนของทริโคม หรือโดยการงอกของอะคีนิตเป็นไฮโมโกน โดยสกุล *Calothrix* , *Nostoc* และ *Scytonema* แต่จะไม่สร้างในสกุล *Anabaena* , *Cylindrospermum* หรือ *Nodularia*

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มที่เป็นเส้นสาย เจริญเติบโตโดยการแบ่งเซลล์ตรงกลางสายเซลล์ ซึ่งเจริญเติบโตได้หลายระบบ บางเซลล์มีการแบ่งตัวในแนวระนาบ ในทริโคมที่โตเต็มที่มีเซลล์หลายแถว มีการแตกกิ่งแขนงแบบแขนงแท้ (true branching) และแขนงประกอบด้วยเซลล์แถวเดียว มีการสร้างอะคีนิต ขยายพันธุ์โดยการขาดท่อน สร้างฮอริโมโกนในบางสกุล มีการงอกของอะคีนิต เช่น *Fischerella*

จากการจำแนกของนักแบคทีเรียวิทยา ซึ่งเป็นการจำแนกที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับวิธีการจำแนกแบบนักพฤกษศาสตร์ซึ่งเป็นแบบเก่า ได้จัดจำแนกและเปรียบเทียบลักษณะของแต่ละอันดับ (order) ตามตารางที่ 2.2 ซึ่งในแต่ละอันดับมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2.2 การจำแนกไซยาโนแบคทีเรียตามแบบนักพฤกษศาสตร์

Phylum	Class	Order	Family
Cyanophyta	Cyanophyceae	Chroococcales	<i>Chroococcaceae</i> <i>Entophysalidaceae</i>
		Chamaesiphonales	<i>Cyanidiaceae</i> <i>Chamaesiphonaceae</i> <i>Dermocarpaceae</i>
		Pleurocapsales	<i>Pleurocapsaceae</i> <i>Hyclaceae</i>
		Nostocales	<i>Oscillatoriaceae</i> <i>Gomontiellaceae</i> <i>Nostocaceae</i> <i>Scytonemataceae</i> <i>Microchaetaceae</i> <i>Rivulariaceae</i>
		Stigonematales	<i>Capsosiraceae</i> <i>Pulvinulariaceae</i> <i>Nostochopsidaceae</i>

			<i>Diplonemataceae</i> <i>Mastigocladaceae</i> <i>Mastigocladopsidaceae</i> <i>Stigonemataceae</i>
--	--	--	---

ที่มา : Desikachary (1959)

Rippka (1988 b) ได้รายงานไว้ว่า ไม่ว่าจะการจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียแบบนักพฤกษศาสตร์หรือแบคทีเรียวิทยา จะเป็นแบบใดก็ตามได้มีหลักการต่าง ๆ ที่นิยมใช้ในการจำแนก ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สิ่งที่ใช้ในการพิจารณาในการจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย

Cell Morphology	Physiology / biochemistry
● Cell shape, polarity ● Cell dimensions (diameter , length) ● Number and regularity of planes of fission or of budding ● Color of cells and cell suspension If present : ● Sheath or glycocalyx description ● Location of “chromatoplasm” ● Gas vacuoles (location) ● Baeocyte (“endospore”) description ● Heterocyst and akinete description (dimension, shape, etc.) Ultrastructure	● Absorption spectrum (“in vivo”) ● Types of phycobilin pigments present ● Capacity for chromatic adaptation ● Temperature optimum and upper limit ● Capacity for dark chemoheterotrophy (aerobic vs. anaerobic) and photoheterotrophy (with DCU) ; substrates used ● Motility (speed, rotation, smoothness) ● Growth and/or acetylene reduction in aerobic or anaerobic condition free of combined nitrogen and in light ● Salinity tolerance

● Thylakoid arrangement ● Cell wall structural appearance ● Sheat structure ● Cell inclusion types (identification of storage granules)	● Vitamin requirements ● Morphological responses to deficiencies of phosphate and combined nitrogen ● Sensitivity to soluble sulfide ; sulfide-dependent anoxygenic photosynthetic capacity ● Calcium carbonate deposition
--	---

ตารางที่ 2.3 สิ่งที่ใช้ในการพิจารณาในการจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย (ต่อ)

Cell Morphology	Physiology / biochemistry
Colony or Trichome Morphology ● Colony or thallus shape, arrangement and symmetry ● Trichome type : tapered, straight or helical ; constricted at septa ; false or true branching ; shape of terminal cell ; terminal hair formation ; dimension and characteristics of hormogonia ● Location and pattern of heterocysts and akinetes Genetic Chracteristics	Culture Conditions ● Specifics of medium, temperature , light intensity, isolation method , stain history And conservation of cultures including the type strain Habitat / Ecology ● General description of habitat (e.g.marine , brackish water , Freshwater , Terrestrial ; eutrophic, oligotrophic ; flowing or static waters ; temperature ; depth ; aerobic or anaerobic ; high or low

● DNA base composition (mol% G+C) ● DNA/DNA or DNA/RNA hybridization data with other species ● Partial or complete sequence data for 16S rRNA ● Complete sequences for 5S rRNA	light intensity ; associated organisms ; Possible symbiotic situations) ● Growth habit (planktonic ; fascicles , clusters, nonaggregated ; attached ; streamers, tufted , crustose , nodular, etc.
---	---

ที่มา : Rippka (1988 b)

2.12 ที่อยู่อาศัย

สาหร่ายสีเขียวในแกมน้ำเงินสามารถขึ้นได้มีแหล่งต่าง ๆ เช่น ในน้ำจืด ได้แก่ ทางน้ำหรือแม่น้ำ (upper water zone) ในน้ำเค็มพบ *Oscillatoria erythraea* และในดิน สุวรรณ (2542) ได้ศึกษาการแพร่กระจายของ สาหร่ายสีเขียวในแกมน้ำเงินในดินนา ของประเทศไทย พบว่า ภาคเหนือ มีการแพร่กระจายของ สาหร่ายสีเขียวในแกมน้ำเงินมากที่สุด ดินนาที่เป็นกรดเล็กน้อย (pH5.5-6.5) เป็นดินเหนียวมีการแพร่กระจายมากที่สุดโดยพบว่าสกุลที่มีการแพร่กระจายมากได้แก่ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Calothrix* sp. ในดินที่มี pH สูงนั้นจะมีแนวโน้มที่ *Anabaena* เจริญได้ดี และในสภาพที่มี pH ต่ำ *Nostoc* sp. มีแนวโน้มเจริญดี เมื่อจำแนก สาหร่ายสีเขียวในแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้ 18 สกุล 116 ชนิด watanabe (1951) รายงานพบว่า สาหร่ายสีเขียวในแกมน้ำเงินกระจายอยู่ทั่วไปในดินนาของสุมาตรา บอร์เนียว ฟิลิปปินส์ มลายู อินโดจีน พม่า พอร์โมซา ญี่ปุ่น จีน และประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบสีเขียวในแกมน้ำเงินที่ผืนกำแพง น้ำพุร้อน ทั้งนี้เพราะสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี บางชนิดอาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น *Gloeocapsa* , *Nostoc* sp. บางชนิดอาศัยอยู่กับราเรียกว่า lichens สำหรับ *Nostoc* sp. บางชนิดอาศัยอยู่ใน thallus ของ liverworts (ธงชัย , 2546) และ *Anabaena azollae* อาศัยอยู่ในโพรงใบของแหวนแดง (Janet , 1979 ; Ruschel and Vose , 1984)

2.13 ขนาดของเซลล์ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ขนาดเซลล์แตกต่างกันตามรูปร่างของแต่ละสายพันธุ์เช่น *Synechococcus* และ *Gloeocapsa* เซลล์มีรูปร่างกลม (coccus) หรือรีมีขนาดกว้าง 2-5 μm *Oscillatoria* เซลล์เป็นแบบเส้นสายกว้าง 8-12 μm *Cylindrospermum majus* มีเซลล์กว้าง 3-5 μm (บรรหาญ , 2545)

2.14 การเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรีย

ไฮยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบกันได้ง่ายทั่วไปในธรรมชาติ โดยเฉพาะในฤดูร้อน มีการอาศัยรวมกันเป็นกลุ่มก้อน โดยอาศัยอยู่รวมกันกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ หรืออาจอยู่รวมกันเป็นโคโลนีใหญ่ ๆ ตามที่ชื้นและ ผิวดิน ใบไม้ผุ ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงต้องการผ่านกระบวนการ ดังต่อไปนี้

(1) การแยกไฮยาโนแบคทีเรียจากธรรมชาติ

ไฮยาโนแบคทีเรียที่พบในธรรมชาติมักจะอยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่มก้อน เป็นอิสระหรืออยู่รวมกันกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ พบได้ตามพื้นดิน ก้อนหิน ใบไม้ผุ ในน้ำ เป็นต้น ถ้าเป็นไฮยาโนแบคทีเรียที่อยู่บนผิวดินหรือก้อนหิน เก็บตัวอย่างจากดินหรือก้อนหินนั้นมาเก็บไว้ในที่มืด แต่ถ้าอาศัยในแหล่งน้ำ ทะเลสาบหรือน้ำบ่อ ก็ให้เก็บตัวอย่างน้ำมา 200-500 มิลลิลิตร ใส่ในขวดนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบประมาณ 3,000-5,000 รอบต่อนาที ไฮยาโนแบคทีเรียก็จะตกตะกอน แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส ถ้าเป็นไฮยาโนแบคทีเรียในเขตร้อนเก็บไว้ในห้องอุณหภูมิประมาณ 15 องศาเซลเซียส ถ้าตัวอย่างที่เก็บมาจากที่เย็น อาจทำให้แข็งก็ได้แต่ต้องไม่ทำให้เซลล์แตก ถ้าการเก็บรักษาดีหรือถ้าเก็บมาจากน้ำพุร้อนก็ให้เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีผลทำให้เชื้อมีชีวิตรอดได้หลายสัปดาห์หรือหลายเดือน หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงลงในจานที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับไฮยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิด ภายใต้สภาพของแสงและอุณหภูมิที่พอเหมาะ

Rippka และคณะ (1981) ได้รายงานว่ามีปัจจัยเกี่ยวข้องหลายอย่างที่ทำให้การเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียไม่สำเร็จ สิ่งที่สำคัญคือ คุณภาพของน้ำที่นำมาใช้จะต้องเป็นน้ำธรรมชาติที่ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเครื่องกรองที่สามารถกรองจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มากมาย , สามารถดักจับไอออนโดยใช้ ion-exchange resins , ฟอกสีของน้ำ และสามารถลดการปนเปื้อนของสารที่มีอยู่ในน้ำ โดยเฉพาะฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นสูงที่มาจากผงซักฟอกได้

Rippka (1988 a) ยังพบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงหรือใช้ไฮยาโนแบคทีเรียในดินและในน้ำจืดมีอยู่หลายสูตร ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ NO.11 , ASM-1 , Z 8 และ BG 11 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ ASM มีข้อเสียบางอย่างคือ ไม่มีซิเตรท ซึ่งเมื่อนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นพิษต่อไฮยาโนแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Anacystis nidulans* อาหารเลี้ยงเชื้อ Z8 มีข้อดี คือ มีธาตุอาหารเสริมบางธาตุที่ไม่มีใน ASM และ BG11 เหมาะสำหรับไฮยาโนแบคทีเรียบางชนิด และในขณะเดียวกัน ASM ไม่มีโบลิบดินน์มอยู่เลย ในขณะที่ Z8 ที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ nitrate reductase และไนโตรจีเนส

ความเข้มของแสงได้มาจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (เช่น Cool white , Warm White , Day light) ซึ่งทำให้การเพาะเลี้ยงสำเร็จมากขึ้น ในการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ ต้องการความเข้มของแสงต่ำ (น้อยกว่า 500 ลักซ์) ก็พอเพียงแล้ว การเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรีย ถ้ามีการให้แสงสว่างช่วงเวลาหนึ่งและหยุดการให้แสงช่วงเวลาหลัง จะทำให้การเลี้ยงได้ผลดีกว่าการให้แสงติดกันตลอดเวลา ช่วงแสงสว่างที่นิยมใช้ คือ 12 ชั่วโมงให้แสง 12 ชั่วโมงหยุดการให้แสง แต่บางแห่งนิยมใช้วงจรแสงสว่าง 16 ชั่วโมง 8 ชั่วโมงมืด

อุณหภูมิมีผลต่อการแยกสกุลของไซยาโนแบคทีเรีย โดยมีความต้องการอยู่ในช่วงที่ต่ำมาก อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มตั้งแต่ช่วงแรกของการแยกเชื้อ จนกระทั่งถึงการเลี้ยงตามปกติต้องใช้ อุณหภูมิอย่างน้อย 2 ช่วง ซึ่งห่างกันประมาณ 10° C เช่น 20° C และ 30° C , 35° C และ 45° C ไซยาโนแบคทีเรีย บางชนิดไม่สามารถทนอุณหภูมิที่สูงกว่า 30° C หรือต่ำกว่า 20° C

Song และคณะ (1998) รายงานว่า อุณหภูมิและ pH มีผลต่อการแพร่กระจายของ ไซยาโนแบคทีเรีย สกุล *Microcystin viridis* ซึ่งพบว่า ที่อุณหภูมิ 25° C ที่ pH 7 และ 9.2 ที่ความเข้มของแสง 15 μ E/วินาที/ตารางเมตร ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสกุลดังกล่าวเจริญเติบโตได้สูงสุด

(2) เทคนิคของการทำเชื้อให้บริสุทธิ์

เป็นวิธีการเพื่อให้ได้ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นชนิดเดียวกันทั้งหมด หรือเป็นการเลี้ยง ไซยาโนแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว (unialgal) ควรตั้งต้นจากไซยาโนแบคทีเรีย 1 สายเซลล์ , 1 เซลล์หรือ 2-3 เซลล์ ที่เรียกว่า โคลน (clone) ดังนั้น จึงอาจเรียกไซยาโนแบคทีเรียที่ได้จากการเลี้ยงแบบนี้ว่า clone culture

Stein (1973) กล่าวว่า วิธีการแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียที่มีขนาดเล็กให้บริสุทธิ์ในระดับ unialgal ทำได้หลายวิธี คือ

- (1) แคมป์ลารีปีเปต (capillary pipette)
- (2) แคมป์ลารีปีเปตอย่างง่าย
- (3) การเย็บเชื้อลงจานเพาะเชื้อ
- (4) การพ่นเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อ
- (5) การแยกเชื้อจากอาหารวุ้น
- (6) แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการกรองอากาศ

วิธีในระดับปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ทำได้ 4 วิธี คือ

- (1) โดยการล้าง
- (2) โดยการสั่นสะเทือน
- (3) โดยการใช้ยาปฏิชีวนะ
- (4) โดยการใช้โปตัสเซียม เทลลูไรท์ (potassium tellurite)

ปัญหาที่พบในการแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ คือการปะปนไซยาโนแบคทีเรีย ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ เช่น ไดอะตอม ก็สามารถใช้ 1-10 มิลลิลิตร/กรัมของเจอมีเนียมไดออกไซด์ (germanium dioxide) ใส่ลงไปในการเลี้ยงเชื้อ แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงเรื่องของระยะเวลาที่ใช้ด้วย หลังจากได้ไซยาโนแบคทีเรียที่ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ แล้วก็สามารถทดสอบว่ามีการปนเปื้อนของ สิ่งมีชีวิตอื่น ๆ หรือไม่ โดยการทดสอบด้วย nutrient broth , peptone glucose ในบางครั้งมีสิ่ง ปนเปื้อนมากก็ต้องนำเอาไปปั่นแยกโดยใช้ขนาดของความแตกต่างเป็นหลัก เช่น ถ้าสิ่งปนเปื้อนมี ขนาดใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย ก็ให้กรองผ่าน filter ที่ฆ่าเชื้อแล้วที่มีขนาด 8 μ m ของ

Millipore filter และล้างอีกครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อลดปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน

เมื่อแยกได้ดีแล้วก็นำไป cấyไปบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และควรเก็บไว้ในตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิและแสง ควรมีการตรวจสอบจานอาหารที่มีการเชื้อเชื้อลงไปทุกขั้นตอนด้วยกล้องจุลทรรศน์ และควรแยกเซลล์เดี่ยว ๆ หรือโคโลนีบริสุทธิ์ก่อนที่จะมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่มองเห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ อาจสังเกตได้จากการเกิดครวครว ควรจะเก็บและแยกโดยใช้ Pasteur pipette ที่มีขนาด 0.1-0.2 nm. ซึ่งทำให้เย็นและฆ่าเชื้อแล้ว ถ่ายโคโลนีลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใบใหม่หยดอาหารเหลวลงทับ และเขี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่อีกครั้งทำงานกระทั่งได้โคโลนีบริสุทธิ์ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเก็บโคโลนีเฉพาะโคโลนีเดี่ยวที่แยกบริสุทธิ์ได้ให้ปลอดภัย

ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด เกาะติดเป็นแผ่นแน่น ต้องทำให้แยกออกจากกันก่อนที่จะนำไปเขี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ โดยใช้ Pasteur pipette เก็บเชื้อและใช้เขี่ยเชื้อใหม่อีกครั้ง ถ้าจำเป็นต้องแยกในอาหารเหลวให้ใช้ไฮโมจีนเซอร์ และนำไปเขี่ยใหม่อีกครั้ง

ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นลักษณะเส้นสายมีขนาดใหญ่ อยู่เดี่ยว ๆ และเคลื่อนที่ได้ เมื่อเจริญอยู่บนอาหารแข็งให้ใช้ platinum spade ตัดผิวรอบ ๆ นำเอา เฉพาะตรงกลางไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องสักระยะหนึ่ง หลังจากนั้นจะมีสายเซลล์เล็ก ๆ บาง ๆ เจริญออกมารอบ ๆ ซึ่งสายเซลล์เหล่านี้ปราศจากการปนเปื้อนนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ จะได้ไซยาโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์

ในกรณีที่ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายขนาดใหญ่แต่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) ก็ยากที่จะทำให้บริสุทธิ์ต้องใช้วิธีพิเศษ ทั้งที่เคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ โดยทั่วไปมีเส้นผ่าศูนย์กลางอย่างน้อย 3 μm

ปัญหาที่พบในการทำให้เซลล์บริสุทธิ์ ในบางกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียที่จำเป็นต้องใช้วิธีพิเศษ ได้แก่ พวกที่มีช่องว่างเก็บก๊าซในปริมาณสูง ซึ่งเป็นแพลงตอนพืชมีประมาณ 5 สายพันธุ์ คือ 2 สายพันธุ์ของ *Microcystis aeruginosa* และ 3 สายพันธุ์ของ *Oscillatoria agardhii*

Howshaw และ Rosowski (1973) ได้ศึกษาการเลี้ยงแบบปลอดเชื้อของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ โดยการเก็บตัวอย่างมาเขี่ยเชื้อบนอาหารแข็งแล้วนำไปบ่มที่ 26 °C ความเข้มข้นของแสง 4,000-6,000 ลักซ์ของหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาว เมื่อเชื้อเจริญเติบโตก็ให้เก็บเป็นสต็อกเพื่อจะทำให้บริสุทธิ์ การทำให้บริสุทธิ์แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกทำให้เชื้ออยู่ในสภาพที่เป็น uni-strain คือ มี เฉพาะไซยาโนแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว หลังจากนั้นจึงทำให้เชื้อนั้นปราศจากแบคทีเรีย หลักการที่ทำให้มีไซยาโนแบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียว โดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะไปที่กลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย แล้วนำมาวางบนแผ่นสไลด์และกดจนกระทั่งแยกออกจากกันเป็นชิ้นเล็ก ๆ หลังจากนั้นนำไปล้างในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วเจือจางเซลล์ไปเรื่อย ๆ ในอัตราส่วน 1:10 แล้วนำไป spread plate บนอาหารแข็ง นำไปบ่มไว้ หลังจากที่เกิดเป็นโคโลนีนำไปส่องดูด้วย

กล้องจุลทรรศน์เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรียและมีการปนเปื้อนน้อยที่สุด หลังจากคัดเลือกได้แล้วก็ทำซ้ำเดิมอีกครั้งหนึ่ง จะได้ไตรโคมที่มีขนาดเล็กมากเพียง 1 ไทรโคม (single trichome isolate)

ส่วนขั้นตอนการเพาะเลี้ยงให้ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นนั้น ทำได้โดยใช้ความร้อน ยาปฏิชีวนะเข้าร่วม คือ หลังจากได้เชื้อเพียง 1 สายพันธุ์ นำไปบ่มที่ 50-60 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพนนิซิลินผสมอยู่ (1,000-5,000 หน่วย/มิลลิลิตร) บ่มที่ 30 °C ในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำเช่นนี้อีกจนกระทั่งได้โคโลนีของไซยาโนแบคทีเรียที่ปราศจากการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดทนความเข้มข้นของเพนนิซิลินอัตราสูงไม่ได้ก็ให้ลดลงอยู่ในช่วง 100-500 หน่วย/มิลลิลิตร

ลักษณะการเจริญเติบโตโดยทั่วไป ไซยาโนแบคทีเรียจัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตช้ามาก ช่วงเวลาที่เพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า มีค่าประมาณ 12-24 ชั่วโมง *Gloeobacter violaceus* และ *Gloeotheca* spp. มี generation time ประมาณ 50 ชั่วโมงหรือมากกว่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับว่าเชื้อที่ใส่ลงไปในฟลาสต์นั้นเป็นสายเซลล์เพียง 1 หรืออยู่ในกลุ่มใหญ่แบบโคโลนี ซึ่งอาจใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 2-3 เดือน จึงจะมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

การทดสอบความบริสุทธิ์ ทำได้โดยเอาไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวหยดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 0.5% (w/v) glucose และ 0.02-0.05% (w/v) casamino acid บ่มในที่มืด 3-5 วัน ถ้ามีจุลินทรีย์ที่ปะปนก็จะเจริญเติบโตคลุมพื้นที่ทั้งหมด แต่ถ้าไม่มีไซยาโนแบคทีเรียก็เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ

(3) การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

ทำได้โดยนำเอาหัวเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย (stock culture) ที่บ่มไว้ภายใต้ความเข้มข้นแสงไม่เกิน 500 ลักซ์และในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม และเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ก็ควรเก็บไว้ในตู้เย็น ในปัจจุบันนิยมเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารแข็งเป็นส่วนใหญ่ สายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีช่องว่างเก็บก๊าซขนาดใหญ่ พวกที่เป็นแพลงตอนในน้ำหรือพวกที่เป็นเส้นสายก็สามารถสืบคลานได้อย่างรวดเร็ว มักจะเลี้ยงในอาหารเหลว การเลี้ยงแบบปลอดเชื้อไว้ในจานอาหาร มักจะหลีกเลี่ยงไม่กระทำกันเพราะเสี่ยงต่อการปนเปื้อน

Rippka (1988a) ได้ทำการทดลองเพื่อหาจุดวิกฤติในการเก็บรักษาในสภาพที่มีอากาศ และเป็นพวกที่ตรึงไนโตรเจนได้ ได้แก่ *Gloeotheca* spp. และพวกที่มีการสร้างเฮเทอโรซิสท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากธาตุไนโตรเจน พบว่าสายพันธุ์ที่มีการสร้างเฮเทอโรซิสท์เกิดการสูญเสียความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้เพราะเฮเทอโรซิสท์ไม่ทำงานหรือเกิดการสลายของเฮเทอโรซิสท์ไปเลย ถ้าทดลองโดยบ่มนาน 4-6 เดือนในอาหารเหลวที่ไม่มีไนโตรเจน เมื่อนำมาเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากธาตุไนโตรเจน

Marsac (1995) ได้แนะนำวิธีการเก็บเชื้อไว้ในระยะเวลานานกว่าอาจเก็บไว้ในทรายที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยนำทรายที่ได้จากการตกตะกอนใสในหลอดทดลอง นึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.001% ให้สูงจากทรายประมาณ 0.1-0.2 เซนติเมตร เชียเชื้อใส่ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องภายใต้ความเข้มของแสงประมาณ 100 ลักซ์ เมื่อนำไปใช้ก็นำไปเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง แต่ถ้าเก็บไว้บนอาหารแข็งจะต้องเชียเชื้อใหม่ทุก ๆ เดือน

ถ้าต้องการเก็บรักษาในเวลานาน ทำได้โดยการเก็บรักษาในรูปการทำแห้งแบบแช่แข็ง (lyophilize) แต่พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จ ทั้งนี้เพราะไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกันและมีการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นอย่างดีเป็นเวลาหลายปีในอาหารเหลวที่เข้มข้น ซึ่งมี DMSO 5% (v/v) ผสมอยู่ด้วย และบรรจุลงไปในหลอดแอมพุที่มีขนาดเล็ก (ประมาณ 5 มล.) เก็บทันทีในไนโตรเจนเหลว ที่ -25 °C ไซยาโนแบคทีเรียที่มีช่องว่างเก็บก๊าซขนาดใหญ่ก็เก็บโดยวิธีนี้ เมื่อนำมาใช้ก็นำไปทำให้ละลายที่ 37 °C

Mori และคณะ (1998) รายงานว่า ไซยาโนแบคทีเรียถ้ามีการต่อเชื้อในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (sub culture) ไปเรื่อย ๆ ทำให้เชื้ออ่อนแอลงไปเรื่อย ๆ และในที่สุดอาจจะตายหรือเกิดการผ่าเหล่าได้ วิธีที่แนะนำคือ การเก็บรักษาโดยวิธี cryopreservative โดยการใช้ 3% DMSO เป็นสารที่เข้ามาป้องกันไม่ให้เซลล์แตก จะทำให้เก็บไซยาโนแบคทีเรียได้เป็นเวลานาน ๆ ซึ่งจากการทดลองพบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย 48 ชนิด 144 สายพันธุ์ เมื่อเก็บด้วยวิธีนี้ทำให้ 39 ชนิด 139 สายพันธุ์ มีชีวิตรอดหลังจากการทำ freezing และ thawing

(4) การเพาะเลี้ยงในระดับปฏิบัติการ

ลัดดา (2539) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวทั้งชนิดที่เป็น กลุ่มหรือเป็นเส้นสายมีการเลี้ยง 2 ประเภท คือ การเลี้ยงระยะยาวและการเลี้ยงระยะสั้น การเลี้ยงระยะยาวทำเพื่อเก็บหัวเชื้อ (stock culture) ไซยาโนแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงต่อไป อาหารที่ใช้เลี้ยงมักจะเป็นอาหารร่วน และการเลี้ยงต้องเลี้ยงแบบปลอดเชื้อ ซึ่งมีสูตรต่าง ๆ กัน เช่น อาหารที่นิยมใช้เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ สูตร BG11, Allen Blue-Green Medium, Chu No.10 medium เป็นต้น สารอาหารที่นิยมใช้ก็มีสารละลายจากดิน (Soil-water medium) ซึ่งเตรียมมาจากดินล้วน ๆ หรือเติมสารอื่น ๆ เข้าไป สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเลี้ยงระยะยาว คือ อุณหภูมิ ควรจะลดต่ำกว่าปกติ 5-8°C และลดความเข้มของแสงลงครึ่งหนึ่ง ทั้งนี้เพื่อลดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยง ส่วนวัตถุประสงค์อีกอย่างหนึ่งของการเลี้ยงระยะยาว คือ การเลี้ยงเพื่อผลิตเป็นอุตสาหกรรม ซึ่งมีการเลี้ยงแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว และการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

การเลี้ยงระยะสั้น (short term culture) เป็นการเลี้ยงเพื่อการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมักทำเป็นครั้งคราว เช่น การศึกษารูปร่างลักษณะ (morphology) เป็นต้น เกี่ยวข้องกับกรณีที่

ต้องการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากขึ้นในระดับปลอดเชื้อก็ให้ใช้ fernbach flasks ที่มีขนาดบรรจุ 1-5 ลิตร หรือขวด carboys ขนาดบรรจุ 10 ลิตร โดยมีวิธีการทำ คือ

ขั้นแรกเตรียมหัวเชื้อจำนวน 400 มิลลิลิตร ในฟลาสก์บรรจุอาหารเหลว โดยหัวเชื้อได้จาก agar slant ถ้าจะให้ปลอดภัยและเหมาะสม อัตราที่ใช้ของหัวเชื้อ : ปริมาตรที่ต้องการเท่ากับ 1 : 10-40 โดยปริมาตรหัวเชื้อ 40 มิลลิลิตร ใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 4-6 สัปดาห์ หลังจากนั้นใส่หัวเชื้อที่เลี้ยงไว้ลงใน fernbach flasks ขนาดบรรจุ 1.5 ลิตร เลี้ยงอีก 4-6 สัปดาห์แล้วถ่ายลงในขวด carboys

ความลึกของอาหารเลี้ยงเชื้อต้องจำกัดเพราะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วต้องให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปด้วย โดยให้มีส่วนผสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1% (v/v) ในอากาศที่ผ่านเข้าไปใน Pasteur pipette ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุกสำลีที่ใช้ไม่ควรขึ้นเพราะหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน การเพิ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปมีผลทำให้ pH ลดลงจาก 7.0 จึงต้องใส่ Na_2CO_3 เพิ่มขึ้นประมาณ 20 เท่า ซึ่งควรทำหลังจากฆ่าเชื้ออาหารแล้วคนด้วยแท่งกวนแม่เหล็ก ทำให้เกิดการหมุนเวียนของก๊าซภายในขวดดีขึ้น และทำให้สารละลายเป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน และให้แสงเต็มที่

2.15 การเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ระยะการเจริญเติบโต

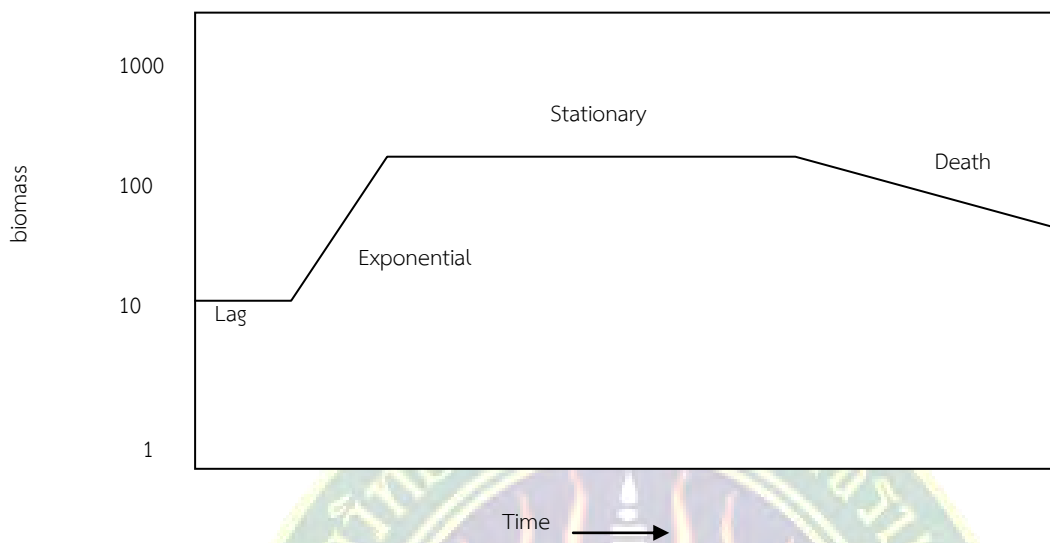
การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในห้องปฏิบัติการแบบปิด สาหร่ายสีเขียวในแกมน้ำเงินจะเจริญเติบโตดังภาพที่ 2.4 โดยแบ่งเป็น 4 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 Lag phase เป็นระยะที่เริ่มทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ในระยะนี้ไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เป็นระยะที่เซลล์กำลังปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม

ระยะที่ 2 Exponential phase (log phase) เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัว และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ภายในถังเพาะเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านเคมี ชีวภาพ และกายภาพ

ระยะที่ 3 Stationary phase เป็นระยะที่เซลล์ไม่มีการเพิ่มจำนวนแต่เซลล์ยังคงมีความต้องการพลังงานเพื่อการอยู่รอด ซึ่งระยะนี้พลังงานมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นอย่างมาก

ระยะที่ 4 Death phase เป็นระยะที่เซลล์ที่มีชีวิตรอดเริ่มมีปริมาณลดลง เนื่องจากการขาดแคลนของพลังงาน หรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีพ



ภาพที่ 2.4 การเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว
ที่มา : Richmond (1986)

2.16 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

Venkataraman , 1981 แบ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ดังนี้

(1) ปัจจัยทางกายภาพ (physical factor)

1.1 แสง สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการแสงสว่างในการเจริญเติบโตปกติจะเจริญอยู่ในดินความลึกไม่เกิน 0.5 เซนติเมตร หรือในพื้นที่ที่มีน้ำขัง ความเข้มของแสงจะเปลี่ยนแปลงไปขึ้นกับฤดูกาล พืชที่เจริญปกคลุมอยู่ตลอดจนความขุ่นของน้ำ ในนาข้าวจะพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินลอยอยู่บนผิวน้ำ หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มในเวลากลางวัน เนื่องมาจากการเกิดก๊าซออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเอง จุลินทรีย์ชนิดนี้มีความทนทานต่อแสงได้แตกต่างกันแล้วแต่ชนิดและสายพันธุ์ (ธงชัย , 2546) นอกจากนี้แสงจะเป็นตัวคัดเลือกชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย (Venkataraman , 1981) Ruschel and Vose (1984) กล่าวว่าความเข้มแสง (light intensity) เป็นปัจจัยภูมิอากาศ (climatic factor) ที่สำคัญ เนื่องจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะไวต่อความเข้มแสงสูง

1.2 ความชื้น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความทนทานต่อความแห้งแล้งได้สูง Materasi and Bolloni (1965) รายงานว่าพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพียง 30% ในดินนาของประเทศอิตาลีที่ตรึงไนโตรเจนได้ ส่วนในประเทศเซเนกัลซึ่งมีช่วงแห้งแล้งนานถึง 8 เดือนยังสามารถพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 95 เปอร์เซ็นต์ก่อนสิ้นฤดูแล้ง พื้นที่ลุ่มในอินเดียที่มีความชื้นสูง

จะมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอยู่มาก แต่เมื่อความชื้นที่เหมาะสมจะมีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมาก ตามมาและทนทานได้นานต่อสภาพความแห้งแล้งในนาข้าวโดยจะพบ *Cylindrospermum* sp. มาก ซึ่งสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ดีเมื่อสิ้นสุดฤดูปลูกข้าว ในญี่ปุ่นก็มีรายงานว่าพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในปริมาณสูงในดินที่มีสภาพน้ำขังตลอดไป

1.3 อุณหภูมิ (temperature) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส (ธงชัย , 2535 ; Roger and Kulasooraya , 1980) Roger and Kulasooraya (1980) กล่าวว่าอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อชีวมวล (biomass) และความสามารถในการให้ผลผลิต (productivity)

1.4 ความชุ่มชื้นของน้ำ ถ้าน้ำชุ่มมากมีผลให้แสงผ่านน้ำได้น้อยลง จึงอาจพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนบางครั้ง ในบางครั้งฝนอาจทำให้เกิดการคลุกเคล้ากันระหว่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและดิน ทำให้กิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินลดลงเกือบทั้งหมดได้ (ธงชัย , 2546)

1.5 ลม กรณีที่ไม่มีสิ่งกีดขวางหรือต้นข้าว วังกระแสนลมเอาไว้ ลมก็อาจจะพัดเอาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไปรวมกัน (ธงชัย , 2546)

(2) ปัจจัยทางเคมี (chemical factor)

2.1 คาร์บอน เป็นธาตุอาหารที่ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดต้องการ ส่วนใหญ่ได้มาจากอากาศซึ่งมีอยู่ประมาณ 0.03% แต่ปรากฏว่าไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงจำเป็นต้องให้เพิ่มในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไบคาร์บอเนต คาร์บอเนต ซึ่งปกติในน้ำจืดจะมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปอิสระ ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ ถ้ารูปอิสระหมดจึงจะมีการใช้ ในรูปก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อื่น ๆ เช่น ไบคาร์บอเนต คาร์บอเนต ซึ่งถ้าไซยาโนแบคทีเรียนำเอาไบคาร์บอเนตมาใช้ทำให้เกิดการตกตะกอนของคาร์บอเนต ส่งผลให้มีหินปูนเกิดขึ้น ดังสมการ



และในขณะเดียวกัน pH ก็จะเป็นตัวกำหนดสภาพของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำด้วยว่าจะอยู่ในรูปใด ฉะนั้นการปรับ pH ช่วยให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถนำเอาก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เพราะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จำเป็นต่อการสังเคราะห์แสง ซึ่งเมื่อนำเอาไซยาโนแบคทีเรียไปทำให้แห้ง พบว่ามีองค์ประกอบของคาร์บอนประมาณ 50% แต่ถ้ามีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากเกินไปเกินกว่า 10% จะชะงักการเจริญเติบโต

2.2 ไนโตรเจน เป็นอีกธาตุหนึ่งที่มีความสำคัญ ไซยาโนแบคทีเรียสามารถใช้ได้ทั้งในรูปของ NO_3^- , NH_4^+ และอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น ยูเรีย ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้แต่ต้องระวังในเรื่องของความเป็นพิษถ้าใช้ในอัตราที่มีความเข้มข้นสูง ไซยาโนแบคทีเรียสามารถใช้ไนโตรเจนได้จาก

บรรยากาศแล้วนำมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียมและยูเรีย แต่อย่างไรก็ตาม ในอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ไนโตรเจนในรูปของไนเตรทหรือเกลือแอมโมเนียม แต่ไซยาโนแบคทีเรียจะใช้น้ำในรูปของแอมโมเนียมหมดก่อนจึงจะใช้น้ำในรูปของไนเตรท แอมโมเนียมถูกเปลี่ยนไปเป็นสารอินทรีย์ ไนโตรเจนในเซลล์ในรูปของกรดกลูตามิก แต่ในไซยาโนแบคทีเรียผลผลิตตัวแรกของแอมโมเนียม คือ กลูตามีน (glutamine) ซึ่งได้มาจากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และในขณะเดียวกันการให้แอมโมเนียมลงไปในการเลี้ยงเชื้อเป็นการขัดขวางการตรึงไนโตรเจนด้วย

2.3 ฟอสฟอรัส เป็นธาตุอาหารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียโดยทั่วไป เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก การเคลื่อนย้ายพลังงานต่าง ๆ เป็นต้น ในสภาพธรรมชาติปริมาณฟอสฟอรัสเป็นตัวจำกัดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย แต่ถ้าในน้ำธรรมชาติมีฟอสฟอรัสปริมาณสูง จะทำให้เกิดวอเตอร์บลูมของไซยาโนแบคทีเรียได้

2.4 กำมะถัน ไซยาโนแบคทีเรียสะสมกำมะถันไว้ในช่องว่างเก็บก๊าซและพบทั่วไปในเซลล์ รูปซัลเฟอร์ที่นำไปใช้ได้ คือ ซัลเฟต (SO_4^-) ในแหล่งน้ำขาดออกซิเจน กำมะถันก็จะอยู่ในรูปของซัลไฟด์ (H_2S) และจะหลุดเป็นฟองขึ้นมาบนผิวน้ำ เช่น ในแหล่งน้ำที่มีการทับถมของใบไม้ ในน้ำพุร้อน ไซยาโนแบคทีเรียสามารถแยกกำมะถันออกมาใช้ประโยชน์ได้ จึงทำให้เห็นเป็นคราบสีเหลืองในน้ำพุร้อน ไซยาโนแบคทีเรียต้องการกำมะถันเพราะกำมะถันเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น methionine , cysteine , cystine เป็นต้น วิตามิน และ sulfolipid

2.5 แคลเซียม ไซยาโนแบคทีเรียต้องการแคลเซียมเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเพื่อใช้เสริมสร้างความแข็งแรงของผนังเซลล์ แต่บางชนิดก็มีการสะสมเพื่อทำให้โครงสร้างของเซลล์แข็งแรงขึ้น ไซยาโนแบคทีเรียใช้น้ำในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนตในผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียพบแคลเซียมในรูปของแคลไซต์ (calcite) หรืออะราโกไนท์ (aragonite) และในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถใช้สตรอนเทียม(strontium)ทดแทนแคลเซียมได้ ในไซยาโนแบคทีเรียรูปแคลเซียมที่นำไปใช้ คือ แคลเซียมไอออน (Ca^{2++}) เพื่อเป็นองค์ประกอบในพลาสมาเมมเบรน (plasmamembrane) องค์ประกอบของเกลือในสารประกอบพวกคอลลอยด์ และผนังเซลล์ และตกตะกอนในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนต

2.6 แมกนีเซียม เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง ไซยาโนแบคทีเรียต้องการในอัตราที่มากกว่าแคลเซียม เพราะแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของคลอโรฟิลล์ บางครั้งพบว่าอยู่รวมกันเป็นกลุ่มในไรโบโซมเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา catalase ปริมาณที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 0.1 mg/l ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* พบว่า ที่ความเข้มข้น 480 mg/l จะไปยับยั้งการเจริญเติบโต แต่ถ้าได้รับน้อยเกินไปก็จะมีผลในการแบ่งเซลล์ และใน *Chlorella pyrenoidosa* แมกนีเซียมสามารถทดแทนด้วยโซเดียม และโพแทสเซียมได้

2.7 โซเดียม เป็นธาตุอาหารที่ไซยาโนแบคทีเรียต้องการใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการเคลื่อนย้ายคาร์บอน เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลง pH

ภายในเซลล์การเปลี่ยนแปลงความเป็นต่างและเกี่ยวข้องกับกระบวนการไนเตรฟิเคชันด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าไซโตเคียมเกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงไนโตรเจนด้วย

ไซยาโนแบคทีเรียมีความต้องการไซโตเคียมมากกว่าสารประกอบพวกซิลิโคน ซึ่งใช้ในปริมาณเล็กน้อยในการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต และจากการทดลองกับ *Anacystis nidulans* พบว่า การเพิ่มซิลิโคนไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์แต่อย่างใด ถ้าในเซลล์นั้นมีไซโตเคียมและโปตัสเซียมอย่างเพียงพอ

2.8 โปตัสเซียม ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดต้องการโปตัสเซียมเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต กระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหายใจ ถ้าได้รับไม่เพียงพอมีผลทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง การหายใจมากขึ้น นอกจากนี้โปตัสเซียมก็เป็น co-factor ของเอนไซม์หลายชนิด และควบคุมเกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีนต่าง ๆ และเกี่ยวข้องกับกระบวนการ osmotic pressure ของเซลล์ด้วย ในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดไซโตเคียมสามารถทำงานทดแทนโปตัสเซียมได้

2.9 เหล็ก เป็นธาตุที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมโดยเป็นองค์ประกอบอยู่ใน cytochromes เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ และไฟโคไซยานิน ถ้าไซยาโนแบคทีเรียได้รับไม่เพียงพอจะมีสีเหลือง ในอาหารเลี้ยงเชื้อมักจะให้ในรูปของเกล็ดอินทรีย์ซึ่งง่ายแก่การตกตะกอน จึงทำให้ไซยาโนแบคทีเรียไม่สามารถนำเอาธาตุเหล็กไปใช้ได้ ดังนั้นจึงมักจะให้ธาตุเหล็กลงไปในรูปแบบของ FeEDTA ซึ่งสามารถละลายออกมาเป็นประโยชน์ได้

ธาตุอาหารเสริม (trace element) เป็นธาตุอาหารที่ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดต้องการไม่เท่ากันและต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ แมงกานีส นิเกิล โบรอน วานาเดียม โคบอลต์ และโมลิบดีนัม

(3) ปัจจัยทางชีวภาพ (biological factor)

แบคทีเรียไวรัสและเชื้อราบางชนิดที่เป็นเชื้อโรคของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Venkataraman,1981)ซึ่งจะมีความเฉพาะเจาะจงต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Venkataraman(1961) รายงานว่าเมื่อมีการพัฒนาประชากร Zooplankton โดยเฉพาะ Cladocerans , Copepods , Ostracods และตัวอ่อนขนาดเล็กจะขัดขวางการเจริญเติบโตของสาหร่ายในช่วง 1-2 สัปดาห์

(4) ปัจจัยดิน (soil factor)

Ruschel and Vose (1984) กล่าวว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเจริญเติบโตได้ดีในดินที่เป็นด่าง Venkataraman (1981) กล่าวว่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5-8.5 เมื่อทดลองในดินนาข้าวที่มีไนโตรเจนในดินต่ำจะพบความสัมพันธ์ทางบวกระหว่าง pH ของน้ำ และปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ถ้ามี pH สูง เช่น การเติมปูนจะเพิ่มการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Roger and Kulasoorya , 1980) แต่การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะดีที่สุดถ้า pH เป็นกลางหรือใกล้กลาง (6.5-7.5) (Okuda and Yamaguchi , 1952)

2.17 การวัดการเจริญเติบโตของ ไซยาโนแบคทีเรีย

โดยทั่วไปมักจะใช้วิธีการวัดการเพิ่มปริมาณของเซลล์ ปริมาณโปรตีน รงควัตถุ เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีมีรายละเอียดดังนี้

(1) การนับเซลล์

1.1 การนับเซลล์โดยตรง (Direct Microscopic Counting) เป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปในการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย วิธีนี้เหมาะกับการนับไซยาโนแบคทีเรียจากธรรมชาติ ต้องคัดเลือกภาชนะบรรจุที่เหมาะสม สารละลายที่เจือจางที่เหมาะสมที่จะนับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ก่อนที่จะนำภาชนะบรรจุใช้ต้องทำความสะอาดและทำให้แห้งก่อนทุกครั้ง ใส่ตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่จะนับก่อนประมาณ 4-6 นาติ โดยเฉพาะถ้าไซยาโนแบคทีเรียที่มีขนาดเล็กที่บรรจุในภาชนะเล็ก

1.2 การนับโคโลนี (total plate counts) วิธีนี้โดยทั่วไปใช้กับแบคทีเรีย ถ้านำมาใช้กับไซยาโนแบคทีเรียเหมาะกับการศึกษาในระยะ stationary ที่ปฏิบัติกันทั่วไปโดยวิธีเลี้ยงเชื้อ ไซยาโนแบคทีเรียให้ทั่วทั้งจานเลี้ยงเชื้อ (spread plate) โดยใช้ปริมาตร 0.1 ml หลังจากทำการเจือจางแล้ว และ layered plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เจือจาง 2-3 ml ใส่ลงในหลอดที่บรรจุวุ้นเข้มข้น 0.6-0.8% ผสมกันและเทลงในจานเพาะเชื้อ เก็บไว้ 3-4 วัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมก่อนจะนำมานับโคโลนี

1.3 Electronic counting เหมาะกับไซยาโนแบคทีเรียทรงกลมที่ไม่ใช้พวกที่เป็นเส้นสาย โดยการเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสม หลังจากนั้นบังคับให้ผ่านช่องที่เล็กมาก electrode ก็จะเป็นตัววัด ซึ่ง orifice ยิ่งเล็กมากแต่ก็ทนกระแสไฟฟ้าได้สูง เมื่ออนุภาคไซยาโนแบคทีเรียผ่าน orifice ค่าความต้านทานเหนี่ยวนำให้มีความต้านทานน้อยกว่าอาหาร เราสามารถคำนวณกลับได้ ปัญหาที่พบ คือยากที่จะควบคุมปริมาณของเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้น และสารละลายที่ใช้ความบริสุทธิ์มากและยากที่จะทำความสะอาด

(2) การวัดความขุ่น

เป็นวิธีวัดความเข้มข้นโดยใช้การเทียบสี (colorimeter) หรือสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) เป็นวิธีการวัดความเข้มข้นของมวลไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้ optical density ที่แตกต่างกัน วิธีนี้ง่ายและนิยมใช้กันโดยทั่วไป แต่มักมีความคลาดเคลื่อนจากการซ้อนทับกันของเซลล์ขนาดของเซลล์ที่ไม่เท่ากัน รูปร่างและปริมาณสารต่าง ๆ ในไซยาโนแบคทีเรีย และยัง

ขึ้นกับการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียในสารละลายด้วย วิธีนี้อาจหลีกเลี่ยงการดูดกลืนแสงของรงควัตถุในไซยาโนแบคทีเรีย (photosynthetic pigments) ที่ใช้อยู่ที่ 550 nm แล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนของแสงกับน้ำหนักแห้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ก็สามารถคำนวณค่าประมาณของมวลไซยาโนแบคทีเรียได้โดยประมาณ

(3) การหาค่าน้ำหนักแห้ง

เป็นวิธีการหาค่ามวลไซยาโนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นโดยตรง บางครั้งก็อาจผิดพลาดเพราะของแข็งที่เกิดขึ้นอาจไม่ใช่เชื้อไซยาโนแบคทีเรีย แต่อาจเป็นแร่ธาตุที่แขวนลอยอยู่ในน้ำและรวมเข้ากับน้ำหนักของสารด้วย จึงต้องใช้แผ่นกรองแยกไซยาโนแบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน หรือใช้วิธีการตกตะกอนตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย หรืออาจใช้วิธีการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดแตกต่างกัน

วิธีที่ให้เกิดความผิดพลาดน้อยที่สุด คือ ล้างเซลล์ในบัฟเฟอร์หรือน้ำกลั่นเพื่อเอาเกลือออก ควรระวังในเรื่องของเซลล์แตกและสารที่ปนเปื้อน อาจจะทำให้ 2 ชั่วโมงและต้องไม่มีเซลล์สูญหายระหว่างที่แยกส่วน

(4) ปริมาตรของเซลล์ที่อัด

วิธีนี้รวดเร็วแต่หยาบ โดยการประมาณส่วนของของแข็งที่มีอยู่ ในตัวอย่างการวัดเซลล์ที่ถูกอัด ให้หลอดหมุนเหวี่ยงชนิดพิเศษซึ่งมีปริมาตร 5-10 ml ที่ข้างหลอดมีสเกลบอกความสูง หลังจากตกตะกอนตัวอย่าง (10 นาที ที่ $1,000 \times g$) มวลของไซยาโนแบคทีเรียบางส่วนอยู่ที่ก้นหลอด ประมาณได้ว่าเซลล์อยู่สูงเท่าใด คิดเป็นกิโลเปอร์เซ็นต์ของปริมาตรตัวอย่างทั้งหมด

(5) ปริมาณของคลอโรฟิลล์

วิธีนี้จะใช้เมื่อการหาน้ำหนักแห้งไม่ได้ผล เพราะมีเซลล์ของแบคทีเรียหรือแพลงตอนเข้าไปปะปนในมวลของสาร ปริมาณของคลอโรฟิลล์ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย โดยทั่วไปใช้อะซิโตน (acetone) เมทานอล (methanol) เอทานอล (ethanol) หรือไดเอทิลอีเทอร์ (diethylether) ในการสกัดรงควัตถุจากเซลล์ บางครั้งอาจต้องใช้ความร้อนบ้าง เพื่อให้การสกัดที่สมบูรณ์

(6) ปริมาณของรงควัตถุที่ละลายได้ในน้ำ

รงควัตถุที่ละลายในน้ำมีไฟโคไซยานิน และไฟโคอีรีทริน ซึ่งอาจจะพบในบางสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรีย ส่วนใหญ่พบในไซยาโนแบคทีเรียเท่านั้น หาได้ทั้งวัดปริมาณและคุณภาพ รงควัตถุที่พบมีไฟโคอีริโทรไซยานิน (PE) อัลโลไฟโคไซยานิน (APC) ซีไฟโคไซยานิน (PC) โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยโซเดียมคลอไรด์ และหมุนเหวี่ยงเซลล์ให้ตกตะกอน นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 565 , 620 และ 650 nm ตามลำดับ

(7) วิธีวิเคราะห์โปรตีน

มีหลายวิธีที่แตกต่างกันแต่ที่ใช้อย่างกว้างขวางในการหาโปรตีนของไซยาโนแบคทีเรียมี 3 วิธีด้วยกัน คือ Biuret reaction , วิธีของ Lowry และคณะ , วิธีของ Bradford ซึ่งทุกวิธีต้องมีกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของโปรตีน โดยใช้ซีรัมอัลบูมิน (serum albumin)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เพื่อให้การศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของແພງແຕງในท้องถิ่นและสาหร่ายสีเขียว
แกมน้ำเงินเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าว บรรลุวัตถุประสงค์ ได้แบ่งขั้นตอนการวิจัย ดังนี้

3.1 วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของແພງແຕງ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง วางแผนการทดลองแบบ (Randomized Complete Block Design หรือ RCBD โดยกำหนดมี 2 ปัจจัย ประกอบด้วย 5 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ ๆ รวมจำนวนหน่วยทดลองทั้งหมด 30 หน่วยทดลอง

แผนผังการจัดหน่วยทดลอง

1. เตรียมสถานที่โดยใช้โรงเรือนชั่วคราว คลุมด้วยซาแรนกรองแสงให้มีความเข้มแสง ร้อยละ 40
2. กำหนดตำแหน่งที่จะวางหน่วยทดลอง กำหนดหน่วยทดลองเป็น 2 แถว แถวละ 10 อ่าง กำหนดหน่วยทดลองตั้งแต่หน่วยที่ 1 ถึง 15 จำนวน 2 ชุด
3. จัดทำฉลากตำแหน่งตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 15 พร้อมทั้งติดฉลากกำกับแต่ละอ่าง
4. จับฉลากเพื่อกำหนดตำแหน่งหน่วยทดลองทั้ง 30 หน่วย จากนั้นจับฉลากตำแหน่งและ หน่วยทดลองพร้อมกัน แล้วนำหน่วยทดลองไปวางตามตำแหน่งที่จัดได้ดังแผนผังการจัดหน่วยทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1

- T1 = ชุดควบคุม (Control)
- T2 = K_2HPO_4 อัตรา 4 กรัม/กระถาง
- T3 = K_2HPO_4 อัตรา 6 กรัม/กระถาง
- T4 = K_2HPO_4 อัตรา 8 กรัม/กระถาง
- T5 = K_2HPO_4 อัตรา 10 กรัม/กระถาง

ชุดการทดลองที่ 2

- T6 = ชุดควบคุม (Control)
- T7 = มูลไก่ อัตรา 4 กรัม/กระถาง
- T8 = มูลไก่ อัตรา 6 กรัม/กระถาง
- T9 = มูลไก่ อัตรา 8 กรัม/กระถาง
- T10 = มูลไก่ อัตรา 10 กรัม/กระถาง

ปริมาณธาตุอาหารของมูลไก่ที่ใช้การทดลอง

Total N	1.68%
Total P ₂ O ₅	0.64%
Total K ₂ O	0.92%

ขั้นตอนการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อพันธุ์และการขยายพันธุ์เห็ดนางฟ้า

การที่จะใช้เห็ดนางฟ้าในนาข้าว ในเบื้องต้นจะต้องรู้จักหลักและวิธีการเลี้ยงขยายเชื้อพันธุ์เห็ดนางฟ้าก่อน การเพาะขยายเห็ดนางฟ้าเพื่อให้ได้ปริมาณตามต้องการภายในระยะเวลาที่กำหนดนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อพันธุ์ที่เริ่มต้น ขนาดพื้นที่เลี้ยงขยาย และระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปการเพาะขยายพันธุ์เห็ดนางฟ้าทำได้โดยใช้เชื้อพันธุ์เริ่มต้นประมาณ 500 กรัม/ตารางเมตร ใส่ปุ๋ยฟอสเฟตเพื่อเสริมสร้างการเจริญเติบโต

2. การเตรียมดินและการดูแลรักษา

นำดินที่จะใช้ในการทดลองมาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ทบแล้วผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน ใช้ดินกระถางละ 1 กิโลกรัม เติม K₂HPO₄, มูลไก่ ตามตำรับการทดลองข้างต้น หลังจากนั้นจึงนำเห็ดนางฟ้าที่เตรียมไว้พักประมาณ 15 นาที ชั่งน้ำหนักสด 3 กรัม ใส่ลงในอ่างที่มีอาหารเพาะเลี้ยง คนให้เห็ดนางฟ้ากระจายภายในอ่างอย่างสม่ำเสมอ ในระยะที่ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดนางฟ้าได้รับการรดน้ำให้อยู่เหนือผิวดินประมาณ 5 เซนติเมตร

3. การวัดการเจริญเติบโตทุก 7 วัน ในช่วงเวลา 10.00-12.00 น. ใช้กระชอนตักเห็ดนางฟ้าในแต่ละหน่วยทดลองขึ้นจากอ่างเพาะเลี้ยง พักไว้เป็นเวลา 15 นาที นำเห็ดนางฟ้าไปชั่งน้ำหนักสด บันทึกข้อมูล จากนั้นนำเห็ดนางฟ้าไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บันทึกข้อมูลน้ำหนักแห้ง

การทดลองที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ทำการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์ด้วย

1) ผลของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ 5x3 factorial experimental in completely randomized design มี 2 ซ้ำ โดยโซเดียมคลอไรด์ 5 ระดับและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สายพันธุ์ โดยเพาะเลี้ยงในฟลาस्कที่บรรจุอาหารสูตร BG-11 จำนวน 150 มิลลิลิตร เติม NaCl ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ให้แสงสว่างต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่ความเข้มแสง 60 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ เก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญ โดยทำการวัดค่า Optical density (O.D.) เป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาอัตราการเจริญ จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปหาน้ำหนักแห้ง

2) ผลของ pH เริ่มต้น

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ 5x3 factorial experimental in completely randomized design มี 2 ซ้ำ โดยมี pH 5 ระดับและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สายพันธุ์ โดยเฉพาะเลี้ยงในพลาสติกที่บรรจุอาหารสูตร BG-11 จำนวน 150 มิลลิลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.4 และ 8.0 ให้แสงสว่างต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่ความเข้มแสง $60 \mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ เก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญ โดยทำการวัดค่า Optical density (O.D.) เป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาอัตราการเจริญ จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปหาค่าความเข้มข้น

3) ผลของความเข้มแสง

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ 3x3 factorial experimental in completely randomized design มี 2 ซ้ำ โดยมีความเข้มแสง 2 ระดับ และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สายพันธุ์ โดยเฉพาะเลี้ยงในพลาสติกที่บรรจุอาหารสูตร BG-11 จำนวน 150 มิลลิลิตร โดยระดับความเข้มแสง คือ 40 , 60 และ $80 \mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ เก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญ โดยทำการวัดค่า Optical density (O.D.) เป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาอัตราการเจริญ จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปหาค่าความเข้มข้น

3.2 การเก็บรวบรวมข้อมูล

1) การวัดความหนาแน่นของเซลล์ (Optical density, O.D.)

นำตัวอย่างที่เก็บมาวัด O.D. ที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาอัตราการเจริญ (specific growth rate, μ) ดังนี้

$$\ln X_t/X_0 = \mu t$$

เมื่อ X_0, X_t = ปริมาณของมวลชีวภาพวัดที่เวลา 0 และ t

T = เวลาที่อยู่ระหว่าง 0 กับ t

2) การวิเคราะห์น้ำหนักรวม

นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เพาะเลี้ยงมาจำนวน 20 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman ก่อนการกรองนำกระดาษกรองไปอบในตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ น้ำหนักแห้งหาได้จากผลต่างระหว่างน้ำหนักกระดาษก่อนและหลังการกรอง

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูล โดยวิธีเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple new rang test (DMRT)

3.4 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการชั้น 4 อาคารสิรินธร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

3.5 ระยะเวลาทำการทดลอง

เมษายน – ตุลาคม 2554



บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การทดลองที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของແໜແຈງ

เมื่อเพาะเลี้ยงແໜແຈງในสภาพกลางแจ้ง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า แໜແຈງที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 10 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (4.75 ± 0.53 กรัมต่อหน่วยทดลอง) รองลงมา คือ สูตรอาหารที่ 8 (4.54 ± 0.41 กรัมต่อหน่วยทดลอง) ส่วนແໜແຈງที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 5 มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (3.31 ± 0.76 กรัมต่อหน่วยทดลอง) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่า แໜແຈງที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร 1, 2, 4 และสูตรอาหาร 6 - 10 มีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ พบว่า แໜແຈງที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (8.71 ± 2.32 กรัมต่อหน่วยทดลอง) รองลงมา คือ สูตรอาหารที่ 1 (7.80 ± 1.92 กรัมต่อหน่วยทดลอง) ส่วนແໜແຈງที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 5 มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (3.95 ± 0.91 กรัมต่อหน่วยทดลอง) ในสัปดาห์ที่ 3 - 4 พบว่า แໜແຈງที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (16.00 ± 3.00 และ 23.06 ± 6.42 กรัมต่อหน่วยทดลองตามลำดับ) และในสูตรอาหารที่ 5 แໜແຈງยังคงมีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (5.45 ± 1.53 และ 6.59 ± 2.08 กรัมต่อหน่วยทดลองตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งแตกต่างจากซึ่งจากการทดลองของ Arora และ Singh (2003) พบว่า *A. microphylla* มีมวลน้ำหนักสดสูงสุด 5.86 กรัม โดยใช้เวลาในการเพิ่มมวลชีวภาพเป็นสองเท่าในช่วงเวลาสั้นที่สุด คือ 5.4 วัน อีกทั้งยังสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีฟอสฟอรัส ตั้งแต่ 1-20 mg kg⁻¹ (Arora and Saxena, 2005) และจากการทดลองของ Boonkerd et al. (n.d.) ที่ศูนย์วิจัยข้าวขอนแก่น พบว่า *A. microphylla* มีค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ช่วงเวลาที่ใช้ในการเพิ่มมวลชีวภาพเป็น 2 เท่า สูงสุด คือ 1,866, 112.6 g m⁻² และ 3.5 วัน ตามลำดับ และจากการทดลองของ Adhikary et al. (1977) พบการเพิ่มมวลชีวภาพสดและแห้งต่อวันมีค่าเฉลี่ย 97.6 และ 7.31 kg rai⁻¹ ตามลำดับ ในขณะที่ประพิศ และ พิษิต (2536) ได้ทำการทดลองนำແໜແຈງมาใช้ในการปรับปรุงดินเพื่อศึกษาระยะเวลาและอัตราการปลดปล่อยไนโตรเจน โดยทำการคลุกແໜແຈງ(*A. microphylla*) อัตรา 3,000 kg rai⁻¹ ในดินนา พบว่า ดินชุดรังสิต มีการปลดปล่อยไนโตรเจน สูงสุด 7.4 kg rai⁻¹ หลังจากคลุกในดิน 6 สัปดาห์ ส่วนดินชุดร้อยเอ็ด ปลดปล่อยไนโตรเจนสูงสุด 2.2 kg rai⁻¹ ในสัปดาห์ที่ 3 หลังการคลุกลงในดิน ซึ่งอัตราดังกล่าวเป็นการใช้ແໜແຈງในอัตราสูง เกษตรกรจำเป็นจะต้องมีพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงແໜແຈງก่อนการนำมาใช้ประโยชน์

ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญ ของแหนแดง (*Azolla* sp.) ระหว่างสัปดาห์ที่ 1-4

ตำรับ	อัตราการเจริญ (กรัม) ^{1/}			
การทดลอง	1	2	3	4
1	4.04±0.86 ^{ab}	7.80±1.92 ^{ab}	13.95±3.55 ^a	16.90±3.20 ^b
2	3.81±0.60 ^{ab}	8.71±2.32 ^a	16.00±3.00 ^a	23.06±6.42 ^a
3	3.49±0.19 ^b	6.39±1.32 ^{ab}	10.24±2.49 ^b	14.96±4.80 ^{bc}
4	4.00±0.72 ^{ab}	5.49±1.25 ^{bc}	8.51±0.70 ^{bc}	11.40±1.04 ^{cd}
5	3.31±0.76 ^b	3.95±0.91 ^c	5.45±1.53 ^c	6.59±2.08 ^d
6	4.44±0.20 ^a	5.74±0.72 ^{bc}	6.74±1.61 ^{bc}	8.29±0.91 ^d
7	4.48±0.54 ^a	6.52±0.25 ^{ab}	7.97±0.38 ^{bc}	10.60±1.44 ^{cd}
8	4.54±0.41 ^a	6.43±0.34 ^{ab}	8.06±1.25 ^{bc}	11.04±1.95 ^{cd}
9	4.14±0.25 ^{ab}	6.63±0.89 ^{ab}	8.41±0.92 ^{bc}	10.44±1.17 ^{cd}
10	4.75±0.53 ^a	6.79±0.68 ^{ab}	7.84±0.85 ^{bc}	9.25±0.87 ^d
Mean	4.10±0.60	6.44±1.60	9.32±3.52	12.25±2.28
F-test	*	*	*	*
หมายเหตุ	* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%			

เมื่อเพาะเลี้ยงแหนแดงในสภาพกลางแจ้ง เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า แหนแดงที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (28.94±5.14 กรัมต่อหน่วยทดลอง) รองลงมา คือ สูตรอาหารที่ 3 (20.27±7.02 กรัมต่อหน่วยทดลอง) ส่วนแหนแดงที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 5 มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (8.34±3.89 กรัมต่อหน่วยทดลอง) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่า แหนแดงที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างกัน มีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์ พบว่า แหนแดงที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (38.01±8.15 กรัมต่อหน่วยทดลอง) รองลงมา คือ สูตรอาหารที่ 3 (32.35±12.20 กรัมต่อหน่วยทดลอง) ส่วนแหนแดงที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 5 มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (9.00±1.44 กรัมต่อหน่วยทดลอง)

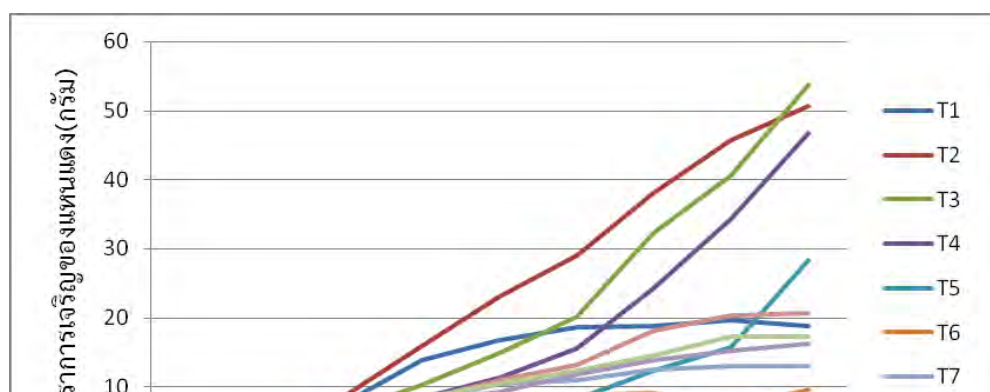
ทดลอง) ในสัปดาห์ที่ 7 – 8 พบว่า แหนแดงที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (45.66 ± 6.92 และ 53.71 ± 7.25 กรัมต่อหน่วยทดลอง ตามลำดับ) และในสูตรอาหารที่ 5 แหนแดงยังคงมีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (6.68 ± 5.75 และ 9.57 ± 1.73 กรัมต่อหน่วยทดลอง ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่า แหนแดงที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างกัน มีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4.2 อัตราการเจริญ ของแหนแดง (*Azolla* sp.) ระหว่างสัปดาห์ที่ 5-8

ลำดับ การทดลอง	อัตราการเจริญ (กรัม) ^{1/}			
	5	6	7	8
1	18.65 ± 3.52^{bc}	18.90 ± 4.06^{cd}	19.75 ± 4.33^{bc}	18.85 ± 4.78^{bc}
2	28.94 ± 5.14^a	38.01 ± 8.15^a	45.66 ± 6.92^a	53.71 ± 7.25^a
3	20.27 ± 7.02^b	32.35 ± 12.20^{ab}	40.59 ± 12.32^a	50.60 ± 7.71^a
4	15.60 ± 2.20^{bcd}	24.23 ± 4.28^{bc}	34.33 ± 6.34^a	46.79 ± 3.21^a
5	8.34 ± 3.89^e	9.00 ± 1.44^d	6.68 ± 5.75^c	9.57 ± 1.73^c
6	8.80 ± 1.10^e	12.46 ± 7.56^{cd}	15.72 ± 9.03^{bc}	28.41 ± 15.34^b
7	11.12 ± 1.14^{de}	12.61 ± 0.69^{cd}	13.10 ± 0.75^{bc}	13.09 ± 1.30^c
8	13.15 ± 3.03^{cde}	18.18 ± 7.54^{cd}	20.32 ± 9.64^b	20.69 ± 9.57^{bc}
9	12.35 ± 1.76^{cde}	14.56 ± 3.27^{cd}	17.20 ± 5.52^{bc}	17.20 ± 5.37^{bc}
10	11.76 ± 1.56^{de}	13.81 ± 1.70^{cd}	15.12 ± 1.56^{bc}	16.19 ± 1.62^{bc}
Mean	14.90 ± 6.73	19.41 ± 10.42	22.85 ± 13.70	27.51 ± 17.06
F-test	*	*	*	*

หมายเหตุ * แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 4.1 อัตราการเจริญของแหนแดง (*Azolla* sp.) ระหว่างสัปดาห์ที่ 5-8

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักแห้ง ของแหนแดง (*Azolla* sp.)

ดำรับการทดลอง	น้ำหนักแห้ง (กรัม) ^{1/}
1	1.13±0.29 ^{cd}
2	2.17±0.53 ^a
3	2.15±0.55 ^a
4	1.79±0.13 ^{ab}
5	0.45±0.10 ^e
6	1.47±0.29 ^{bc}
7	0.48±0.15 ^e
8	0.73±0.41 ^{de}
9	0.66±0.31 ^{de}
10	0.63±0.11 ^{de}
Mean	1.16±0.71
F-test	*

หมายเหตุ * แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ นำແທງແຕງໄປອບທີ່ອຸໂມງມີ 60 ອງສາເສລເສຍສ ຈນນ້ຳພັກກັງທີ່ ພວ່າ ແທງແຕງທີ່ເພາະເລີ່ຍໃນສູຕຣາອາຫາທີ່ 2 ມີກັງເຈຣິຍເຕີບໂຕມາກທີ່ສຸດ (2.17 ± 0.53 ກັງມ) ຮອດລມາ ຄື ສູຕຣາອາຫາທີ່ 3 (2.15 ± 0.55 ກັງມ) ສ່ວນແທງແຕງທີ່ເພາະເລີ່ຍໃນສູຕຣາອາຫາທີ່ 5 ມີກັງເຈຣິຍເຕີບໂຕນ້ອຍທີ່ສຸດ (0.45 ± 0.10 ກັງມ) ເມື່ອເປຣິຍເຕີບຄວາມແຕກຕ່າງທາງສັຕຕິ ພວ່າ ແທງແຕງທີ່ເພາະເລີ່ຍໃນສູຕຣາອາຫາ ຕ່າງກັນ ມີກັງເຈຣິຍເຕີບໂຕແຕກຕ່າງກັນອ່າຍນ້ຳສຳຄັງທາງສັຕຕິທີ່ຣັດບຄວາມເສື່ອມ້ັນ 95% ໃນອາຫາ ເພາະເລີ່ຍສູຕຣາທີ່ 5 ແທງແຕງມີອັຕຣາກັງເຈຣິຍເຕີບໂຕນ້ອຍທີ່ສຸດ ດັງແສດງໃນຕາຣາງທີ່ 4.3 ເນື່ອມາຈາກໃນ ອາຫາເພາະເລີ່ຍສູຕຣາທີ່ 5 ນັ້ນມີປຣິມາດອາຫາມາກເກີນໄປ ດ້ວຍພິພິ $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ ຢູ່ທີ່ເຍື່ອຫຸ້ມເສລ ແລະເຍື່ອ Tonoplast (Taiz and Zeiger, 1991) ທຳພຳທີ່ສູບ Na^+ ອອກຈາກ Cytosol ໄປສະສມໄວ້ນອກເສລ ແລະສູບຈາກ Cytosol ໄປເກັບໄວ້ໃນແວກົວໂອລແລະໃນເຂດເຍື່ອກັນກັງສູບ K^+ ເຂົ້າສູ່ Cytosol (Wolfe, 1995) ທຳ ໃຫ້ມີປຣິມາດ K^+ ເພີ່ຍພອຢູ່ຕອດເວລາ ຈິງຣັງກະບວນກັງເມແທບອລິສິມທີ່ສຳຄັງໃນເສລໄດ້ ເຊັ່ນ K^+ ຮວມຕົວ ກັບ Calmodulin ຣັງກັງທຳງານຂອເອນໄຊມໄຫລຍເຂດທີ່ຄວບຄຸມກະບວນກັງສັງເສຣາະທຳດ້ວຍແສງແລະ ກະບວນກັງຫາຍໃຈ ກັງສັງເສຣາະທຳໂປຣຕິນແລະແປັງ (Hopkins, 1995) ຄວບຄຸມຣັງດັງອອສໂມສິດຂອເສລ (Moore, Clark and Stern, 1995) ໃນເຂດເຍື່ອກັນກັງປຣິມາດ Mg^{2+} ທີ່ສະສມກັງມີທບທາໃນກັງສັງ ຄລອຣິຟິລ ທຳໃຫ້ໂປໄຊມມີໂຄຣງສັງເສຍຣາພ ທຳພຳທີ່ກັງດັງທຳງານຂອເອນໄຊມພວກ Ribulose biphosphate carboxylase ແລະ Phosphoenolpyruvate Carboxylase (Hopkins, 1995) ທຳໃຫ້ພິພິເຈຣິຍເຕີບໂຕໄດ້ດີ ແຕ່ຖ້າມີປຣິມາດມາກເກີນໄປຈະຖືກສະສມໃນຮູບຂອເຄືອນິນທຣີໄວ້ໃນ ແວກົວໂອລ ຈິງໄດ້ມີຜຸດຕໍ່ກັງເຈຣິຍເຕີບໂຕຂອພິພິ

ກັງທດລອງທີ່ 2 ກັງສັກສາສາວະທີ່ເພາະສມຕໍ່ກັງເຈຣິຍຂອສາຮ່າຍສີເສຍແກມນ້ຳເຈີນ

ຈາກກັງສັກສາກັງເຈຣິຍຂອສາຮ່າຍສີເສຍແກມນ້ຳເຈີນ ຈຳນວນ 3 ສາຍພັນຸ ຕາຣາງທີ່ 4.4 ດ້ວຍ ພິຈາຣາອັຕຣາກັງເຈຣິຍ (specific growth rate, μ , day^{-1}) ແລະນ້ຳພັກແທງ ພວ່າ ມີຄວາມແຕກຕ່າງທາງ ສັຕຕິຣະຫວ່າງສາຍພັນຸອ່າຍນ້ຳສຳຄັງທາງສັຕຕິ ທີ່ຣັດບຄວາມເສື່ອມ້ັນ 95% ດ້ວຍສາຍພັນຸ *Nostoc* sp. ມີອັຕຣາກັງເຈຣິຍມາກທີ່ສຸດເທ່າກັບ 0.431μ , day^{-1} ຮອດລມາ ຄື ສາຍພັນຸ *Anabaena* sp. ແລະ *Calothrix* sp. ຕາມລຳດັບ ດ້ວຍມີອັຕຣາກັງເຈຣິຍເທ່າກັບ 0.387 ແລະ 0.293μ , day^{-1} ຕາມລຳດັບ ຈິງຜລກັງທດລອງທີ່ໄດ້ ຂັດແຍັງກັບຣາຍງານຂອ Antarikanonda and Lorenzen (1983) ຈິງສັກສາກັງເຈຣິຍເຕີບໂຕຂອໄຊຍາໂນ ແບກຕີເຣີຈາກນາຂ້າວໃນຫ້ອງປຸກປັດິກ ພວ່າ *Anabaena* sp. ມີ doubling time (5-8 ຂ້າວໂມງ) ນ້ອຍກ່ວາ *Nostoc* sp. ແລະ *Fischerella* (12-14 ຂ້າວໂມງ) Boussiba (1995) ພວ່າ *Anabaena azollae* ເປັນ ໄຊຍາໂນແບກຕີເຣີສາຍພັນຸທີ່ສາມາດເຈຣິຍໄດ້ເຣີວ ($\mu=0.0675 \text{ hr}^{-1}$, doubling time = 10.2 hr) Antarikanonda and Sassanarakkit (1995) ໄດ້ທຳກັງຄັດເສັກໄຊຍາໂນແບກຕີເຣີ 254 ສາຍພັນຸໃນ 14 ສຸກ ພວໄຊຍາໂນແບກຕີເຣີສຸກ *Calothrix*, *Anabaena*, *Hapalosiphon* ແລະ *Nostoc* ຈິງມີຄ່າກັງ

การเจริญ (specific growth constant) เท่ากับ 0.28 , 0.20 , 0.39 และ 0.30 μ , day⁻¹ ตามลำดับ doubling time เท่ากับ 28 , 38 , 19 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ O.D.(optical density) อยู่ในช่วง 0.13 , 0.05 , 0.20 และ 0.09 μ , day⁻¹ ตามลำดับ มาริชา (2547) ได้คัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญและให้อัตราการตรึงไนโตรเจนสูงจากจำนวน 67 สายพันธุ์สามารถคัดเลือกได้ 9 สายพันธุ์ คือ N23 , H1 , ANCG1064 , ANCG1346 , ANCG1835 , ANCG718 , ANCG564 , ANCG707 และ ANCG750 ซึ่งมีอัตราการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 97.596-401.142 μ mole N ml⁻¹ culture h⁻¹ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 อัตราการเจริญ และน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์

สายพันธุ์	อัตราการเจริญ ^{1/} (μ , day ⁻¹)	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)
<i>Anabaena</i> sp.	0.387±0.001 ^b	1.713±0.001 ^a
<i>Nostoc</i> sp.	0.431±0.000 ^a	1.538±0.001 ^b
<i>Calothrix</i> sp.	0.293±0.001 ^c	0.951±0.001 ^c
Mean	0.370±0.061	1.401±0.345
F-test	*	*

หมายเหตุ * แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการทดลองเพื่อหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 3 สายพันธุ์ ตารางที่ 4.4 พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสายพันธุ์ *Anabaena* sp. มีค่าน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเท่ากับ 1.713 กรัม/ลิตร รองลงมา คือ สายพันธุ์ *Nostoc* sp. และ *Calothrix* sp. ตามลำดับ โดยมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.538 และ 0.951 กรัม/ลิตร จากลักษณะของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เหมาะสมจะนำมาทำเป็นปุ๋ยชีวภาพนั้นต้องมีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว และสามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณมาก มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน สามารถปลดปล่อยสารกระตุ้นการเจริญเติบโต และสารประกอบไนโตรเจนซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ทนต่อความแห้งแล้ง และสามารถตรึงไนโตรเจนได้ที่ความชื้นหลายระดับ และมีความคงทนต่อสารเคมีทางการเกษตร (ธงชัย, 2546) ซึ่งสอดคล้องกับมาริชา (2547) ศึกษาการเจริญโดยพิจารณาอัตราการเจริญ น้ำหนักแห้ง และอัตราการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 14 สายพันธุ์ ได้แก่ H1 , N23 , ANCG564 , ANCG265 , ANCG39 , ANCG707 , ANCG718 , ANCG750 , ANCG1064 , ANCG1346 , ANCG1711 , ANCG1835 , ANCG3113 และ ANCG3183 พบว่ามีไซยาโนแบคทีเรีย 9 สายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญและอัตราการตรึงไนโตรเจนที่สูง ได้แก่ H1 , N23 , ANCG564 , ANCG707 , ANCG718 , ANCG750 , ANCG1064 ,

ANCG1346 และ ANCG1835 มีอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการตรึงไนโตรเจนสูง (ช่วง 97.596-401.142 $\mu\text{mole N ml}^{-1} \text{ culture h}^{-1}$) Boussiba (1995) พบว่า *Anabaena azollae* เป็นไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสม และสามารถนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพได้

ตารางที่ 4.5 ผลของโซเดียมคลอไรด์ 0 , 0.5 , 1.0 , 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ต่ออัตราการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์

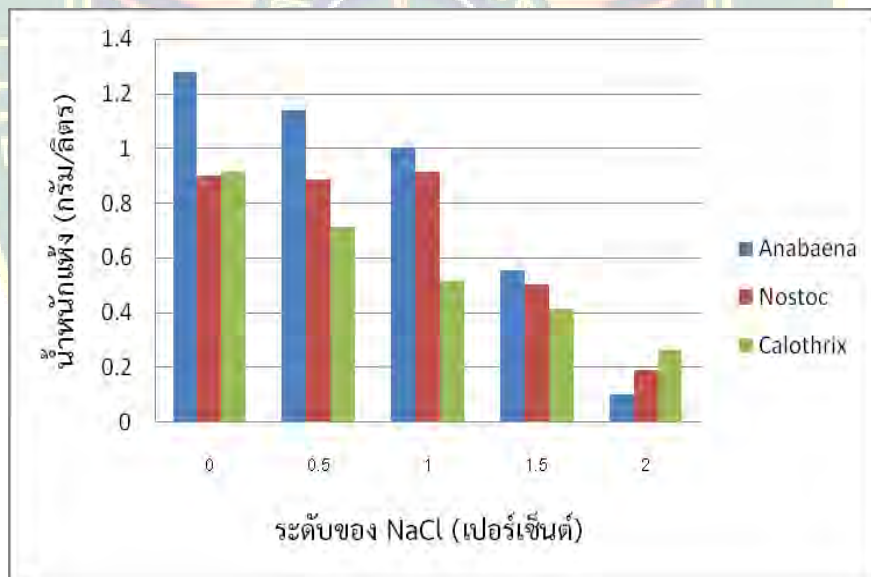
สายพันธุ์	อัตราการเจริญ (μ, day^{-1})					เฉลี่ย
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	
<i>Anabaena</i> sp.	0.39±0.00	0.26±0.00	0.25±0.00	0.24±0.00	0.13±0.00	0.25±0.08
<i>Nostoc</i> sp.	0.39±0.00	0.37±0.00	0.32±0.00	0.24±0.00	0.00±0.00	0.26±0.15
<i>Calothrix</i> sp.	0.34±0.00	0.29±0.00	0.21±0.00	0.09±0.00	0.07±0.00	0.20±0.11
เฉลี่ย	0.37±0.02	0.30±0.05	0.26±0.04	0.19±0.07	0.06±0.05	0.24±0.11

ตารางที่ 4.6 ผลของโซเดียมคลอไรด์ 0 , 0.5 , 1.0 , 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์

สายพันธุ์	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)					เฉลี่ย
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	
<i>Anabaena</i> sp.	1.27±0.00	1.13±0.00	1.00±0.00	0.55±0.00	0.10±0.00	0.81±0.45
<i>Nostoc</i> sp.	0.90±0.00	0.88±0.00	0.91±0.00	0.50±0.00	0.18±0.00	0.67±0.30
<i>Calothrix</i> sp.	0.91±0.00	0.71±0.00	0.51±0.00	0.41±0.00	0.26±0.00	0.56±0.24
เฉลี่ย	1.02±0.19	0.91±0.19	0.80±0.23	0.48±0.06	0.18±0.07	0.68±0.34

ผลของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 3 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบอิทธิพลของระดับโซเดียมคลอไรด์ ตารางที่ 4.5 และ 4.7 พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีอัตราการเจริญแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คือ เมื่อใส่โซเดียมคลอไรด์ (0% NaCl) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการเจริญได้ดี โดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ $0.37 \mu, \text{day}^{-1}$ รองลงมาที่ระดับโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.5 , 1.0 , 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.30 , 0.26 , 0.19 และ $0.06 \mu, \text{day}^{-1}$ ตามลำดับ Boussiba (1995) พบว่า การเติมโซเดียมคลอไรด์จาก 0 เป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์มีผลทำให้อัตราการเจริญของ *Anabaena azollae* ลดลง ส่วน Boussiba (1995) พบว่า การเติมโซเดียมคลอไรด์จาก 0 เป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้อัตราการเจริญของ *Anabaena azollae* ลดลง

เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ กัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สาหร่ายที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด ได้แก่ *Nostoc* sp. มีอัตราการเจริญเท่ากับ $0.26 \mu, \text{day}^{-1}$ รองลงมาคือ *Anabaena* sp. และ *Calothrix* sp. มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.25 และ $0.20 \mu, \text{day}^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับรายงานของมาริชา (2547) ศึกษาอัตราการเจริญของสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรียในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง สาหร่าย ANCG564 มีอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ $0.381 \mu, \text{day}^{-1}$ และเจริญได้ดีกว่าสาหร่ายอื่น ๆ ที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีอัตราการเจริญได้ดีทุกระดับโซเดียมคลอไรด์ รองลงมา คือ ANCG1346 ที่เจริญได้ดีที่ 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ Moreno *et al.*, (1995) รายงานว่า *Anabaena* sp. ATCC33047 สามารถทนเค็มได้มากที่สุดที่ 0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการทนเค็มขึ้นกับชนิดและสาหร่าย เนื่องจากสภาพความทนทานของโครงสร้างของเซลล์ ความหนาบาง และสารเมือกที่ห่อหุ้มเซลล์ Padhi *et al.*, (1998) ศึกษาไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 11 สาหร่าย ใน 6 สกุล ได้แก่ *Cylindrospermum* , *Anabaena* , *Nostoc* , *Calothrix* , *scytonema* และ *Westiellopsis* ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.05-0.35 โมลาร์ ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสกุลเดียวกันมีความผันแปร สกุลที่ทนทานน้อยที่สุด คือ *Cylindrospermum* สกุลที่ทนทานมากที่สุด คือ *Westiellopsis*



ภาพที่ 4.2 ผลของโซเดียมคลอไรด์ 0 , 0.5 , 1.0 , 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์
ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สาหร่าย

ตารางที่ 4.7 ผลของโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ ต่ออัตราการเจริญ และน้ำหนักแห้ง
ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์

ตำรับการทดลอง	อัตราการเจริญ ^{1/} (μ , day ⁻¹)	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)
%NaCl		
0	0.37±0.02 ^a	1.02±0.19 ^a
0.5	0.30±0.05 ^b	0.91±0.19 ^{ab}
1.0	0.26±0.04 ^b	0.80±0.23 ^b
1.5	0.19±0.07 ^c	0.48±0.06 ^c
2.0	0.06±0.05 ^d	0.18±0.07 ^d
สายพันธุ์		
<i>Anabaena</i> sp.	0.25±0.08	0.81±0.45
<i>Nostoc</i> sp.	0.26±0.15	0.67±0.30
<i>Calothrix</i> sp.	0.20±0.11	0.56±0.24
Mean	0.24±0.11	0.68±0.34
F-test (NaCl)	*	*
F-test (สายพันธุ์)	ns	ns
หมายเหตุ	* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 3 สายพันธุ์ที่ระดับโซเดียมคลอไรด์เพื่อศึกษา
น้ำหนักแห้ง ตารางที่ 4.6 และ 4.7 พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น
95% ในสถานะที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซ็นต์ทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีน้ำหนักแห้งมากที่สุด
(1.02 กรัม/ลิตร) รองลงมาคือ โซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับสถานะที่มีโซเดียม
คลอไรด์ 0 เปอร์เซ็นต์ (0.91 กรัม/ลิตร) Ashwani and Rai (2003) ซึ่งพบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ 20
มิลลิโมลาร์ลงในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้น้ำหนักแห้งของ *Azolla pinnata* และ *Anabaena azollae*
ลดลง

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกับความเค็ม พบว่า ไม่มีความแตกต่าง
ในทางสถิติ โดยสายพันธุ์ที่มีน้ำหนักแห้งมากที่สุดได้แก่ *Anabaena* sp. เท่ากับ 0.81 กรัม/ลิตร
รองลงมาคือ *Nostoc* sp. และ *Calothrix* sp. เท่ากับ 0.67 และ 0.56 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.8 ผลของ pH 5 ระดับ (4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.4 และ 8.5) ต่ออัตราการเจริญ
ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์

สายพันธุ์	อัตราการเจริญ (μ , day ⁻¹)					เฉลี่ย
	4.0	5.0	6.0	7.4	8.5	
<i>Anabaena</i> sp.	0.42±0.00	0.49±0.00	0.48±0.00	0.46±0.00	0.43±0.00	0.46±0.02
<i>Nostoc</i> sp.	0.32±0.00	0.39±0.00	0.44±0.00	0.47±0.00	0.46±0.00	0.42±0.05
<i>Calothrix</i> sp.	0.14±0.00	0.25±0.00	0.32±0.00	0.37±0.00	0.33±0.00	0.28±0.08
เฉลี่ย	0.30±0.12	0.38±0.10	0.41±0.07	0.43±0.04	0.41±0.06	0.38±0.09

ตารางที่ 4.9 ผลของ pH 5 ระดับ (4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.4 และ 8.5) ต่อน้ำหนักแห้ง
ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์

สายพันธุ์	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)					เฉลี่ย
	4.0	5.0	6.0	7.4	8.5	
<i>Anabaena</i> sp.	0.66±0.00	0.93±0.00	1.17±0.00	1.08±0.00	1.01±0.00	0.97±0.18
<i>Nostoc</i> sp.	0.30±0.00	0.52±0.00	1.14±0.00	1.10±0.10	1.19±0.23	0.85±0.39
<i>Calothrix</i> sp.	0.12±0.00	0.41±0.00	0.70±0.00	0.70±0.00	0.56±0.00	0.49±0.22
เฉลี่ย	0.36±0.24	0.62±0.24	1.00±0.23	0.96±0.20	0.92±0.30	0.77±0.34

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 3 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบอิทธิพลของพีเอช
ตารางที่ 4.8 และ 4.10 พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีอัตราการเจริญที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินส่วนใหญ่มีอัตราการเจริญดีที่สุดที่
ระดับ pH เท่ากับ 7.4 โดยมีอัตราการเจริญ 0.43 μ , day⁻¹ ใกล้เคียงกับ pH 6.0 และ 8.5 มีอัตราการ

เจริญเท่ากับ $0.41 \mu, \text{day}^{-1}$ รองลงมาคือ pH 5.0 และ 4.0 ตามลำดับ มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.38 และ $0.30 \mu, \text{day}^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Boussiba (1995) ซึ่งพบว่า *Anabaena azollae* สามารถเจริญใน pH ช่วง 6-9 ผลการศึกษาของมาริชา (2547) ศึกษาอัตราการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียพบว่า มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ระดับ pH 6.0 โดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ $0.433 \mu, \text{day}^{-1}$ ผลการศึกษาของสมถวิล (2531) ได้ศึกษาการแพร่กระจายของ ไซยาโนแบคทีเรียในนาข้าว พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียมีการแพร่กระจายในดินที่เป็นกรดอ่อนจนถึงดินที่เป็นด่างอ่อน (pH 5-8) ที่ pH 7.0-7.9 มีการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียในปริมาณสูงถึง 59 เปอร์เซ็นต์ ที่ช่วง pH ต่ำกว่าและสูงกว่า 7.0-7.9 มีปริมาณการแพร่กระจายลดลงตามลำดับ ในภาคเหนือและภาคกลางมีการแพร่กระจายสูงที่ pH 6.0-6.9 และ 8.0 ขึ้นไป และที่ระดับ 4.0-5.9 จะมีการแพร่กระจายต่ำที่สุด ภาคอีสานก็เช่นเดียวกันกับ ภาคเหนือและภาคกลาง Ruschel and Vose (1984) กล่าวว่า ไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีในดินที่เป็นกลางจนถึงด่าง

ด้านสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีอัตราการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสายพันธุ์ *Anabaena* sp. มีอัตราการเจริญสูงที่สุด เท่ากับ $0.46 \mu, \text{day}^{-1}$ เจริญได้ดีทุกช่วง (pH 4.0-8.5) รองลงมาคือ *Nostoc* sp. และ *Calothrix* sp. มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.42 และ $0.28 \mu, \text{day}^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของมาริชา (2547) พบว่า สายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญสูงที่สุด คือ ANCG1064 มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.462 เจริญได้ดีทุกช่วง (pH 4-8.5) รองลงมาคือ H1, ANCG1346, ANCG564, ANCG718, ANCG707, N23, ANCG1835 และ ANCG750 ซึ่งมีอัตราการเจริญเท่ากับ $0.452, 0.424, 0.423, 0.422, 0.392, 0.385, 0.383$ และ $0.288 \mu, \text{day}^{-1}$ ตามลำดับ การศึกษาของสมถวิล (2531) รายงานการแพร่กระจายของแต่ละสกุลในนาที่มีระดับ pH ต่าง ๆ กัน ช่วง pH 6.0-6.9 จะพบ *Anabaena* sp. ช่วง pH 7.0-7.9 พบ *Calothrix* sp. และ *Nostoc* sp. ในปริมาณมาก ดินกรดจัดในประเทศไทยพบว่ามีไซยาโนแบคทีเรียในปริมาณน้อย แต่จะพบปริมาณมากในดินตะกอนภาคพื้นสมุทร (marine alluvium) ดินตะกอนน้ำพาสีเทา (fresh water alluvial humic grey) และดิน grumusol มาก (ธงชัย, 2546) สุวรรณ (2542) ได้ศึกษาการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียในดินนาในประเทศไทย พบว่า ภาคเหนือมีการแพร่กระจายมากที่สุด สกุลที่แพร่กระจายมาก ได้แก่ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Calothrix* sp. ในดินที่มี pH สูงนั้น จะมีแนวโน้มที่ *Anabaena* ap. เจริญได้ดี และสภาพที่ pH ต่ำ *Nostoc* sp. มีแนวโน้มที่จะเจริญได้ดี

ตารางที่ 4.10 ผลของ pH ระดับ 4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.4 และ 8.5 ต่ออัตราการเจริญ และน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์

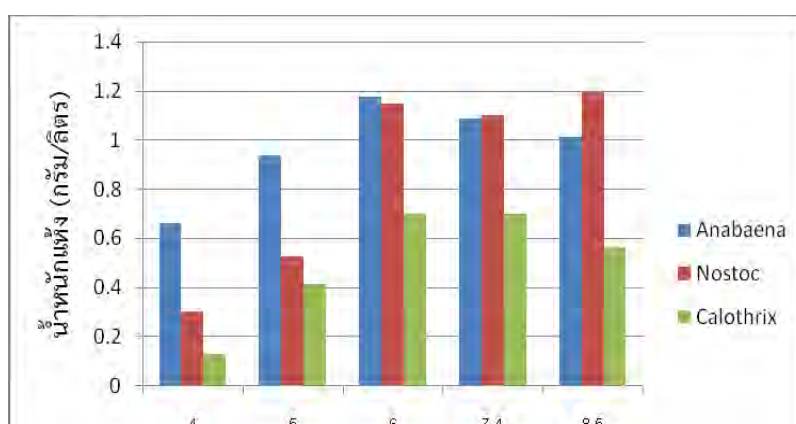
ตำรับการทดลอง	อัตราการเจริญ ^{1/} (μ, day^{-1})	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)
---------------	---	----------------------------

pH		
4.0	0.30 ± 0.12^b	0.36 ± 0.24^c
5.0	0.38 ± 0.10^{ab}	0.62 ± 0.24^{bc}
6.0	0.41 ± 0.07^a	1.00 ± 0.23^a
7.4	0.43 ± 0.04^a	0.96 ± 0.20^a
8.5	0.41 ± 0.06^a	0.92 ± 0.30^{ab}
สายพันธุ์		
<i>Anabaena</i> sp.	0.46 ± 0.02^a	0.97 ± 0.18^a
<i>Nostoc</i> sp.	0.42 ± 0.05^a	0.85 ± 0.39^a
<i>Calothrix</i> sp.	0.28 ± 0.08^b	0.49 ± 0.22^b
Mean	0.38 ± 0.09	0.77 ± 0.34
F-test (pH)	ns	*
F-test (สายพันธุ์)	*	*

หมายเหตุ * แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

น้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเมื่อทำการทดลองตามลำดับข้างต้น พบว่า เมื่อ pH ต่างกันส่งผลให้น้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตารางที่ 4.9 และ 4.10 เมื่อพิจารณาที่ระดับของ pH ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 3 สายพันธุ์ส่วนใหญ่มีน้ำหนักแห้งสูงที่สุดที่ pH 6.0 เท่ากับ 1.00 กรัม/ลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับ pH 7.4 และ 8.5 ซึ่งมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.96 และ 0.92 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สายพันธุ์ที่ระดับ pH ต่าง ๆ กันตารางที่ 4.10 พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสายพันธุ์ *Anabaena* sp. มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด เท่ากับ 0.97 กรัม/ลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Nostoc* sp. มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.85 และสายพันธุ์ *Calothrix* sp. มีน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด เท่ากับ 0.49 กรัม/ลิตร



ภาพที่ 4.3 ผลของ pH 5 ระดับ (4.0 , 5.0 , 6.0 , 7.4 และ 8.5) ต่อน้ำหนักแห้ง
ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์



ตารางที่ 4.11 ผลของความเข้มแสง 40 , 60 และ 80 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ต่ออัตราการเจริญ
ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์

สายพันธุ์	อัตราการเจริญ (μ, day^{-1})			เฉลี่ย
	40	60	80	
<i>Anabaena</i> sp.	0.39±0.00	0.42±0.00	0.44±0.00	0.41±0.02
<i>Nostoc</i> sp.	0.40±0.00	0.37±0.00	0.43±0.00	0.40±0.02
<i>Calothrix</i> sp.	0.29±0.00	0.32±0.00	0.34±0.00	0.32±0.02

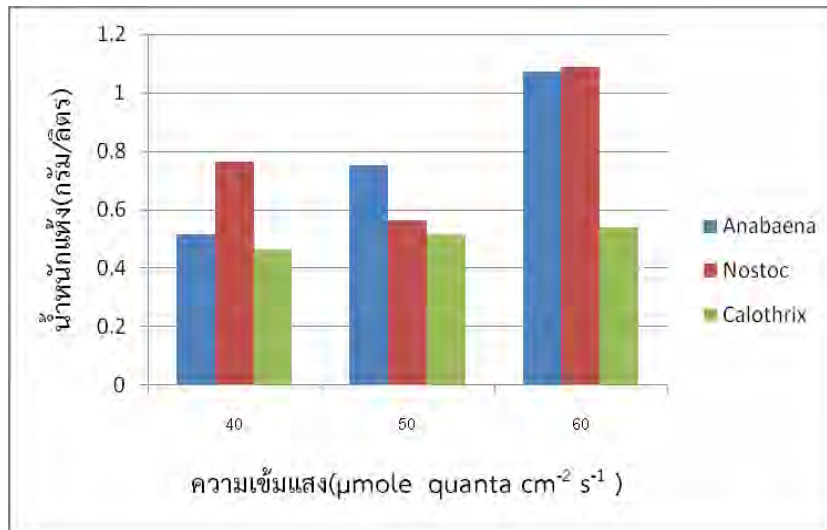
เฉลี่ย	0.36±0.05	0.37±0.04	0.41±0.04	0.38±0.04
--------	-----------	-----------	-----------	-----------

ตารางที่ 4.12 ผลของความเข้มแสง 40 , 60 และ 80 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์

สายพันธุ์	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)			เฉลี่ย
	40	60	80	
<i>Anabaena</i> sp.	0.51±0.00	0.75±0.00	1.07±0.00	0.77±0.25
<i>Nostoc</i> sp.	0.76±0.00	0.56±0.00	1.08±0.00	0.80±0.23
<i>Calothrix</i> sp.	0.46±0.00	0.51±0.00	0.53±0.00	0.50±0.03
เฉลี่ย	0.57±0.14	0.60±0.11	0.90±0.27	0.69±0.23

ผลของความเข้มแสงต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ตารางที่ 4.11 และ 4.13 ที่ความเข้มแสง 80 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ 0.41 รองลงมาที่ความเข้มแสง 60 และ 40 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.37 และ 0.36 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของมาริชา (2547) พบว่า ไชยาโนแบคทีเรียมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดที่ความเข้มแสง 80 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ รองลงมาคือความเข้มแสง 60 และ 40 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ โดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.420 , 0.399 และ 0.385 ตามลำดับ และรายงานของกนกอรและคณะ (2542) ซึ่งพบว่าความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้น (80 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ทำให้อัตราการเจริญของ *Calothrix* sp. ANCG1542, *Calothrix* sp. ANCG18, *Nostoc* sp. ANCG1660 เพิ่มขึ้น แต่ *Calothrix* sp. ANCG1542 และ *Anabaena siamensis* ANCG1709 มีอัตราการเจริญลดลงเล็กน้อย

เมื่อพิจารณาสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่ออัตราการเจริญ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตารางที่ 4.11 และ 4.13 สายพันธุ์ *Anabaena* sp. มีอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ 0.41 ซึ่งมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกับ *Nostoc* sp. ซึ่งมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.40 และเมื่อพิจารณาแต่ละสายพันธุ์พบว่า สายพันธุ์ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Calothrix* sp. สามารถเจริญเติบโตสูงสุดที่ความเข้มแสง 80 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ความทนทานต่อความเข้มแสงแตกต่างกันตามสายพันธุ์ โดยปกติไซยาโนแบคทีเรียจะต้องการแสงเพื่อการเจริญเติบโต โดยจะเจริญอยู่ผิวดินระดับดิน 0.5 เซนติเมตร ในนาข้าวจะพบไซยาโนแบคทีเรียลอยอยู่บนผิวน้ำ หรือรวมกันในเวลากลางวัน เนื่องมาจากเกิดก๊าซออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของไซยาโนแบคทีเรีย (ธงชัย ,2546) นอกจากนี้แสงยังเป็นตัวเลือกไซยาโนแบคทีเรีย (Ventakaraman,1981) เนื่องจากความเข้มแสงจะผันแปรตามระดับความลึกของน้ำ



ภาพที่ 4.4 ผลของความเข้มแสง 40 , 60 และ 80 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์

ตารางที่ 4.13 ผลของความเข้มแสง 40 , 60 และ 80 $\mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ต่ออัตราการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์

ตัวแปรที่ทดสอบ	อัตราการเจริญ ^{1/} (μ, day^{-1})	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)
ความเข้มแสง		
40	0.36±0.05	0.57±0.14 ^b
60	0.37±0.04	0.60±0.11 ^b
80	0.41±0.04	0.90±0.27 ^a
สายพันธุ์		
<i>Anabaena</i> sp.	0.41±0.02 ^a	0.77±0.25 ^a
<i>Nostoc</i> sp.	0.40±0.02 ^a	0.80±0.23 ^a
<i>Calothrix</i> sp.	0.32±0.02 ^b	0.50±0.03 ^b
Mean	0.38±0.04	0.69±0.23
F-test (ความเข้มแสง)	ns	*
F-test (สายพันธุ์)	*	*

หมายเหตุ * แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ
ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

น้ำหนักแห้งเมื่อพิจารณาระดับของความเข้มแสงต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3
สายพันธุ์ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตารางที่ 4.12
และ 4.13 ที่ความเข้มแสง $80 \mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ส่งผลให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีน้ำหนักแห้ง
สูงที่สุดเท่ากับ 0.90 กรัม/ลิตร และลดลงเมื่อความเข้มแสงเท่ากับ 60 และ $40 \mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$
ซึ่งมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.60 และ 0.57 กรัม/ลิตร ตามลำดับ
เมื่อพิจารณาผลของความเข้มแสงต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สายพันธุ์ พบว่า มีความ
แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตารางที่ 4.12 และ 4.13 สายพันธุ์
Nostoc sp. มีน้ำหนักแห้งสูงที่สุด เท่ากับ 0.80 กรัม/ลิตร ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Anabaena sp.* โดยมี
น้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.77 กรัม/ลิตร



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดนางฟ้า

เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดนางฟ้าในสภาพกลางแจ้ง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า เห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 10 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (4.75 ± 0.53 กรัมต่อหน่วยทดลอง) รองลงมา คือ สูตรอาหารที่ 8 (4.54 ± 0.41 กรัมต่อหน่วยทดลอง) ส่วนเห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 5 มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (3.31 ± 0.76 กรัมต่อหน่วยทดลอง) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่า เห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร 1, 2, 4, 6, 10 มีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ พบว่า เห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (8.71 ± 2.32 กรัมต่อหน่วยทดลอง) รองลงมา คือ สูตรอาหารที่ 1 (7.80 ± 1.92 กรัมต่อหน่วยทดลอง) ส่วนเห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 5 มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (3.95 ± 0.91 กรัมต่อหน่วยทดลอง) ในสัปดาห์ที่ 3 - 4 พบว่า เห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (16.00 ± 3.00 และ 23.06 ± 6.42 กรัมต่อหน่วยทดลองตามลำดับ) และในสูตรอาหารที่ 5 เห็ดนางฟ้ายังคงมีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (5.45 ± 1.53 และ 6.59 ± 2.08 กรัมต่อหน่วยทดลองตามลำดับ) ในสัปดาห์ที่ 5 พบว่า เห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (28.94 ± 5.14 กรัมต่อหน่วยทดลอง) รองลงมา คือ สูตรอาหารที่ 3 (20.27 ± 7.02 กรัมต่อหน่วยทดลอง) ส่วนเห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 5 มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (8.34 ± 3.89 กรัมต่อหน่วยทดลอง) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่า เห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างกัน มีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์ พบว่า เห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (38.01 ± 8.15 กรัมต่อหน่วยทดลอง) รองลงมา คือ สูตรอาหารที่ 3 (32.35 ± 12.20 กรัมต่อหน่วยทดลอง) ส่วนเห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 5 มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (9.00 ± 1.44 กรัมต่อหน่วยทดลอง) ในสัปดาห์ที่ 7 - 8 พบว่า เห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (45.66 ± 6.92 และ 53.71 ± 7.25 กรัมต่อหน่วยทดลองตามลำดับ) และในสูตรอาหารที่ 5 เห็ดนางฟ้ายังคงมีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (6.68 ± 5.75 และ 9.57 ± 1.73 กรัมต่อหน่วยทดลอง ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่า เห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างกัน มีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ นำเห็ดนางฟ้าไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ พบว่า เห็ดนางฟ้าที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด (2.17 ± 0.53 กรัม) รองลงมา คือ

สูตรอาหารที่ 3 (2.15 ± 0.55 กรัม) ส่วนแห้งที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 5 มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด (0.45 ± 0.10 กรัม) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่า แห้งที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างกัน มีการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่ 5 แห้งมีอัตราการเจริญเติบโตน้อยที่สุด

การทดลองที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

จากการศึกษาการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 3 สายพันธุ์ โดยพิจารณาอัตราการเจริญ (specific growth rate, μ , day^{-1}) น้ำหนักแห้ง พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสายพันธุ์ *Nostoc* sp. มีอัตราการเจริญมากที่สุดเท่ากับ 0.431μ , day^{-1} รองลงมา คือ สายพันธุ์ *Anabaena* sp. และ *Calothrix* sp. ตามลำดับ โดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.387 และ 0.293μ , day^{-1} ตามลำดับ จากการทดลองเพื่อหาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 3 สายพันธุ์ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสายพันธุ์ *Anabaena* sp. มีน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเท่ากับ 1.713 กรัม/ลิตร รองลงมา คือ สายพันธุ์ *Nostoc* sp. และ *Calothrix* sp. ตามลำดับ โดยมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.538 และ 0.951 กรัม/ลิตร

ผลของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 3 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบอิทธิพลของระดับโซเดียมคลอไรด์ พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีอัตราการเจริญแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คือ เมื่อใส่โซเดียมคลอไรด์ (0% NaCl) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการเจริญได้ดี โดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.37μ , day^{-1} รองลงมาที่ระดับโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.5 , 1.0 , 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.30 , 0.26 , 0.19 และ 0.06μ , day^{-1} ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญของสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ระดับต่าง ๆ กัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด ได้แก่ *Nostoc* sp. มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.26μ , day^{-1} รองลงมาคือ *Anabaena* sp. และ *Calothrix* sp. มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.25 และ 0.20μ , day^{-1} ตามลำดับ

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 3 สายพันธุ์ที่ระดับโซเดียมคลอไรด์เพื่อศึกษาน้ำหนักแห้ง พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซ็นต์ทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีน้ำหนักแห้งมากที่สุด (1.02 กรัม/ลิตร) รองลงมาคือ โซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซ็นต์ (0.91 กรัม/ลิตร) เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกับความเค็มพบว่า ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ โดยสายพันธุ์ที่มีน้ำหนักแห้งมากที่สุดได้แก่ *Anabaena* sp. เท่ากับ 0.81 กรัม/ลิตร รองลงมาคือ *Nostoc* sp. และ *Calothrix* sp. เท่ากับ 0.67 และ 0.56 กรัม/ลิตรตามลำดับ

จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 3 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบอิทธิพลของพีเอช พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีอัตราการเจริญที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินส่วนใหญ่มีอัตราการเจริญดีที่สุดที่ระดับ pH เท่ากับ 7.4 โดยมีอัตราการเจริญ $0.43 \mu, \text{day}^{-1}$ ใกล้เคียงกับ pH 6.0 และ 8.5 มีอัตราการเจริญเท่ากับ $0.41 \mu, \text{day}^{-1}$ รองลงมาคือ pH 5.0 และ 4.0 ตามลำดับ มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.38 และ $0.30 \mu, \text{day}^{-1}$ ตามลำดับ ด้านสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีอัตราการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสายพันธุ์ *Anabaena* sp. มีอัตราการเจริญสูงสุด เท่ากับ $0.46 \mu, \text{day}^{-1}$ เจริญได้ดีทุกช่วง (pH 4.0-8.5) รองลงมาคือ *Nostoc* sp. และ *Calothrix* sp. มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.42 และ $0.28 \mu, \text{day}^{-1}$ ตามลำดับ

น้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเมื่อทำการทดลองตามลำดับข้างต้น พบว่า เมื่อ pH ต่างกันส่งผลให้น้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อพิจารณาที่ระดับของ pH ต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 3 สายพันธุ์ส่วนใหญ่มีน้ำหนักแห้งสูงที่สุดที่ pH 6.0 เท่ากับ 1.00 กรัม/ลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับ pH 7.4 และ 8.5 ซึ่งมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.96 และ 0.92 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สายพันธุ์ที่ระดับ pH ต่าง ๆ กัน พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสายพันธุ์ *Anabaena* sp. มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด เท่ากับ 0.97 กรัม/ลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Nostoc* sp. มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.85 และสายพันธุ์ *Calothrix* sp. มีน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด เท่ากับ 0.49 กรัม/ลิตร

ผลของความเข้มแสงต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ความเข้มแสง $80 \mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ $0.41 \mu, \text{day}^{-1}$ รองลงมาที่ความเข้มแสง 60 และ $40 \mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.37 และ $0.36 \mu, \text{day}^{-1}$ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่ออัตราการเจริญ พบว่า มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สายพันธุ์ *Anabaena* sp. มีอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ $0.41 \mu, \text{day}^{-1}$ ซึ่งมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกับ *Nostoc* sp. ซึ่งมีอัตราการเจริญเท่ากับ $0.40 \mu, \text{day}^{-1}$ และเมื่อพิจารณาแต่ละสายพันธุ์พบว่าสายพันธุ์ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Calothrix* sp.สามารถเจริญเติบโตสูงสุดที่ความเข้มแสง $80 \mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{s}^{-1}$

น้ำหนักแห้งเมื่อพิจารณาระดับของความเข้มแสงต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สายพันธุ์ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตารางที่ 4.12 และ 4.13 ที่ความเข้มแสง $80 \mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ส่งผลให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเท่ากับ 0.90 กรัม/ลิตร และลดลงเมื่อความเข้มแสงเท่ากับ 60 และ $40 \mu\text{mole quanta cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ซึ่งมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.60 และ 0.57 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของความเข้มแสงต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สายพันธุ์ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตารางที่ 4.12 และ 4.13 สายพันธุ์ *Nostoc* sp. มีน้ำหนักแห้งสูงสุด เท่ากับ 0.80 กรัม/ลิตร ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Anabaena* sp. โดยมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.77 กรัม/ลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตของแหนแดงและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน นั้น ควรคำนึงถึงปัจจัยอื่น ๆ นอกจากทำการทดลองไปแล้ว เช่น ปริมาณที่เหมาะสมของฟอสเฟต , ประเภทของเนื้อดิน หรือค่าความเป็นกรดด่างที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแหนแดง และผลของอุณหภูมิ , ความชื้น และปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน
2. การใช้ประโยชน์จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในฤดูกาลปลูกนั้น ๆ ควรทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สด และปล่อยเข้าไปในนา แต่การใช้ประโยชน์ปุ๋ยชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนั้นความเป็นประโยชน์ จะเพิ่มมากขึ้นหากนำมาใช้ติดต่อกันมากกว่า 1 ฤดูกาล



บรรณานุกรม

- กนกอร จารุจารีต, สุริยา สาสนรักกิจ, นวลพรรณ ณ ระนองและวีณา ชูโชติ. 2542. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของไซยาโนแบคทีเรีย. *งานวิจัยห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย* , กรุงเทพฯ.
- ธงชัย มาลา. 2546. *ปุ๋ยอินทรีย์และชีวภาพ* . สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- นันทกร บุญเกิด, ประยูร สวัสดิ์ และอ้อมทรัพย์ นพอมรบดี. 2533. *การใช้จุลินทรีย์ดินเพื่อเพิ่มผลผลิตพืช*. คู่มือการปรับปรุงดินและการใช้ปุ๋ย. หน้า 288-309.
- บรรหาญ แต่งฉำ. 2545. สหรัยสี่เขียวแถมน้ำเงิน. ใน *เอกสารวิชาการปุ๋ยชีวภาพ* กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ
- ประยูร สวัสดิ์. 2539. การใช้ประโยชน์จากแหนแดง ใน *เอกสารวิชาการเรื่อง ปุ๋ยชีวภาพ* กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพี กรมวิชาการเกษตร. หน้า 148-166.
- ประเสริฐ สองเมือง, วิทยา ศรีทานันท์ และประยูร สวัสดิ์. 2536. เลี้ยงแหนแดงร่วมกับปลาในนาข้าว. *กสิกร*. 66(1) : 66-68.
- มาริษา ภิรมย์แทน. 2547. *การคัดเลือกสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ*. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ยงยุทธ โอสดสภา. 2528. *หลักการผลิตและการใช้ปุ๋ย*. กรุงเทพฯ.
- โยธิน คนบุญ. 2542. ดินนาภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : ปัญหาและแนวทางแก้ไข. *การสัมมนาวิชาการข้าวภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และ ศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร*. หน้า 96-111.
- วรารณ วงศ์บุญ. 2551. *แหนแดงและการใช้ประโยชน์ในนาข้าว*. เกษตรกรรมธรรมชาติปีที่ 11 ฉบับที่ 3 (2551) หน้า 44-50.
- สุวรรณ สาสนรักกิจ. 2542. *การศึกษาทางลัทธิฐานวิทยาและสรีรวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียของไทยที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศ เพื่อนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ* . วิทยานิพนธ์ ปริญญาเอก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. *กระทรวงเกษตรและสหกรณ์*. (สืบค้นจาก www.oae.go.th เมื่อวันที่ 5 ตุลาคม 2553)
- Abdullah, A.R., C.M. Bajet, M.A. Matin, D.D.Nham and A.H.Sulaiman. 1997. Ecotoxicology of pesticides in the tropical paddy field ecosystem. *Env. Toxi. Chem.*
- Antarikanonda , P. and H, Lorenzen. 1983. *N₂-fixing blue green algae (Cyanobacteria) of high efficiency from paddy soils of Bangkok, Thailand : Characterisation of*

- species and N₂-fixing capacity in laboratory*. Pflanzensphysiologische Institute der Universität Göttingen, Göttingen, FR Germany.
- Ashwani, K.R. and V. Rai. 2003. Effect of NaCl on growth, nitrate uptake and reduction and nitrogenase activity of *Azolla pinnata*-*Anabaena azollae*. *Plant Science*.
- Boussiba, S. 1995. *Anabaena azollae* as a Nitrogen Biofertilizer. Microalgal biotechnology laboratory, Jacob Blaustein Institute for Desert Research Ben Gurion University, Sede Boker, Israel.
- Desikachary, T.V. 1959. *Cyanobacteria*. Indian Council of Agriculture Research, New Delhi.
- Janet, I.S. 1979. *The biological of nitrogen-fixing organism*. Plenum Press.
- Lewin, R.A. 1977. *Rechlorom*, Type genus of the prochlorophyta. *Phycologia*.
- Lumpkin, T. A., and D. I. Plucknett. 1982. *Azolla as a Green Manure : Use and Management in Crop Production*. Westview press, Inc, USA.
- Materasi, R. and W. Bolloni. 1965. The observation present of microorganisms autothrophes fixator vary areas. *Ann.Inst. Pasteur, Parris, 3. Suppl.*
- Moreno, J., H. Hodriguez, M.A.Vargas, J. Rivas and M.G. Guerero. 1995. Nitrogen-fixing cyanobacteria as source of phycobiliprotein pigment, composition and growth performance of ten filamentous heterocyst strains. *J. of App. Phycology*.
- Mori, F., Y. Sakurai, M. Erata and M.M. Watanabe. 1998. Cryopreservation of Cyanobacteria and green algae in the NIE collection. Cited in *Asian Network on Microbial Researches Gadjah Mada University (GMU)*. The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) Science and Technology Agency, Japan.
- Padhi, H, B. Rath and S.P. Adhikary. 1998. Tolerance of N₂-fixing cyanobacteria to NaCl. *Biologia-Plantarum*. Czech Republic.
- Richmond, A. 1986. *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC press Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- Roger, P.A. and Kulasoorya, S.A. 1980. *Blue-green Algae and Rice*. The International Rice Research Institute, Los Banos, philippins.
- Ruschel, A.P. and P.B, Vose. 1984. *Current Developments in Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley and Sons.





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร BG11 มีรายละเอียดดังนี้

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.040 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.075 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.036 g
Citric acid	0.006 g
Ferric ammonium citrate	0.006 g
Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA) (disodium magnesium salt)	0.001 g
Na_2O_3	0.020 g
*Trace metal mix	1.0 ml
Deionized water	1000 ml

After autoclaving and cooling, the pH of the medium should be 7.4

*Trace metal mix	Stock 1 litre
H_3BO_3	2.860 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.810 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.222 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.390 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.079 g
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.0494 g

Omitting the nitrogen sources makes the medium suitable for cultivating N_2 -fixing cyanobacteria

ภาคผนวก ข

การวัดความหนาแน่นของเซลล์ (optical density, O.D.)

นำตัวอย่างที่เก็บมาวัด O.D. ที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาอัตราการเจริญ (specific growth rate, μ) ดังนี้

$$\ln X_t/X_0 = \mu t$$

เมื่อ X_0, X_t = ปริมาณของมวลชีวภาพวัดที่เวลา 0 และ t

T = เวลาที่อยู่ระหว่าง 0 กับ t

การวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง

นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เพาะเลี้ยงมาจำนวน 20 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman ก่อนการกรองนำกระดาษกรองไปอบในตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ น้ำหนักแห้งหาได้จากผลต่างระหว่างน้ำหนักกระดาษก่อนและหลังการกรอง

ภาพการทดลอง

