

การเติบโต การผลิตสปอร์และเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนก  
สาหร่ายขนาดเล็ก *Botryococcus* sp.



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2558  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GROWTH, LIPID PRODUCTION AND MOLECULAR MARKERS FOR  
MICROALGAE *BOTRYOCOCCUS* SP. CLASSIFICATION

Miss Wichada Yentua



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Marine Science

Department of Marine Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเติบโต การผลิตสปอร์และเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับ การจำแนกสายพันธุ์ขนาดเล็ก <i>Botryococcus</i> sp.
โดย	นางสาววิชาดา เย็นทั่ว
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรณพ วิทยาอุจน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร. ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒน์นกร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร. บวรลักษณ์ คำน้ำทอง)

วิชาตา เย็นท้าว : การเติบโต การผลิตลิพิดและเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกสาหร่ายขนาดเล็ก  
*Botryococcus* sp. (GROWTH, LIPID PRODUCTION AND MOLECULAR MARKERS FOR  
MICROALGAE *BOTRYOCOCCUS* SP. CLASSIFICATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. ไทย  
ถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ, 70 หน้า.



ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล  
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล  
ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5572110023 : MAJOR MARINE SCIENCE

KEYWORDS:

WICHADA YENTUA: GROWTH, LIPID PRODUCTION AND MOLECULAR MARKERS FOR MICROALGAE *BOTRYOCOCCUS* SP. CLASSIFICATION. ADVISOR: ASSOC. PROF. THAITHAWORN LIRDWITAYAPRASIT, Ph.D., CO-ADVISOR: NARONGSAK PUANGLARP, Ph.D., 70 pp.

In this project, we studied on the growth of algae *Botryococcus* sp. labelled “CU-MPL-BT”. We collected nine categories of sample from seven different locations: (1) “CU-MPL-BT1” and “CU-MPL-BT2” from Maha Sarakham; (2) “CU-MPL-BT3” and “CU-MPL-BT4” from Nakhon Pathom; (3) “CU-MPL-BT5” from Lat Krabang, Bangkok; (4) “CU-MPL-BT6” from Sakon Nakhon; (5) “CU-MPL-BT7” from Huai Nam Man reservoir, Loei; (6) “CU-MPL-BT8” from Surat Thani; and (7) “CU-MPL-BT9” from Chiang Mai. Then these sample were preserved at The Plankton Laboratory, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University. In culturing process, each of the *Botryococcus* sample was kept in a 2 L durand with aerobic condition for 78 days by using BG11 (Blue-Green Medium) nutritional formula, with the following additional conditions: 0 psu of salinity; 27°C of temperature; 54  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  of light intensity; the ratio 12 : 12 hrs between dark and light conditions. We determined the growth rate by measuring the OD (Optical density) at 680 nm. This study found that CU-MPL-BT5 had the highest growth rate at  $0.418 \pm 0.002$  nm, and had the highest Specific Growth Rate (K) during the culture period of 0-20 Logarithmic Phase of experiments. The *Botryococcus* cells were “water-drop-like” oval in shape, green in colour, 10  $\mu\text{m}$  in diameter, and had the ability to deposit the hydrocarbon. The diameter of each species has no difference. Furthermore, the level of lipid deposition within the *Botryococcus* cells was distinct during Logarithmic Phase, and could be fluorescently indicated under the microscope by using Nile Red dye. Moreover, the sample CU-MPL-BT6 had the highest lipid deposition rate during Logarithmic Phase,  $28.05 \pm 4.76$  %, which was significantly different ( $p < 0.05$ ) from those of CU-MPL-BT1, CU-MPL-BT2, CU-MPL-BT3, CU-MPL-BT8, and CU-MPL-BT9. Additionally, after we extracted the lipid by using hexane solution, we found that CU-MPL-BT5 gave the highest amount of lipid which was  $62.26 \pm 8.05$  %, and this was significantly different ( $p < 0.05$ ) from CU-MPL-BT1, CU-MPL-BT2, CU-MPL-BT3, CU-MPL-BT4, CU-MPL-BT6, CU-MPL-BT7, CU-MPL-BT8, and CU-MPL-BT9. Moreover, the analysis of 18s rRNA by DGGE technique for determining the difference within nine *Botryococcus* species found that there were more than 90% of similarity of nucleotide patterns compared to those of *Botryococcus braunii*, *Chlamydomodium starrii*, and *Paraphysomonas vestita*.

Department: Marine Science

Field of Study: Marine Science

Academic Year: 2015

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร. ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำด้านวิชาการและแนวทางในการทำวิจัย ข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งติดต่อและประสานงานต่างๆที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยอีกทั้งให้ความกรุณาและกำลังใจในการทำงาน ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จจนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณพ วิทยาภรณ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิต ปิยพัฒน์กร และดร.บวรลักษณ์ คำน้ำทอง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ช่วยแก้ไขข้อผิดพลาดในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณนักวิจัย และบุคลากรในศูนย์เชี่ยวชาญเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้คำปรึกษาแนะนำด้านวิชาการในการทำวิจัย และให้ความช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณพี่ๆห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอน 730 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของงานวิจัยในครั้งนี้

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัว รวมถึงเพื่อนๆทุกคน ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดจนครู อาจารย์ทุกท่านที่เคยสั่งสอนงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป .....	1
สารบัญตาราง.....	1
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 สํารวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	3
2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของ <i>Botryococcus</i> sp. ....	4
2.2 วัฏจักรของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp.....	5
2.3 น้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgal oil) .....	6
2.4 ปัจจัยแวดล้อมและการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย .....	14
2.5 การศึกษาในระดับโมเลกุล.....	15
2.5.1 การสกัด DNA.....	16
2.5.2 หลักการของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอเลสหรือ PCR.....	17
2.5.3 การแยกสายคู่ของชิ้น DNA ด้วยเทคนิค DGGE .....	17
2.5.3.1 ขั้นตอนของ DGGE.....	17
2.5.3.2 การวิเคราะห์ทาง DGGE .....	17
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา.....	13





3.6. การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	21
บทที่ 4 .....	24
ผลการทดลอง .....	24
4.1 การเติบโต (Growth characteristic) ของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. ....	24
4.2 ลักษณะทางชีววิทยาของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. ....	26
4.3 การสะสมไขมันของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp.....	38
4.3.1 ตรวจสอบไขมันในสาหร่ายโดยการย้อมสี Nile red .....	38
4.3.2 ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. ....	38
4.4 การวิเคราะห์ 18s rRNA gene ของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp.....	39
4.4.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp.....	39
4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction : (PCR) .....	41
4.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction : (PCR) .....	42
4.4.4. การวิเคราะห์สาหร่ายโดยใช้เทคนิคดีจีจีอี (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis).....	45
4.4.5 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอทั้ง 9 แถบ .....	46
4.4.6 ข้อมูลทางพันธุกรรม .....	53
4.4.6.1 ผลจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 18s rRNA gene ขนาด 972 bp .....	53
4.4.6.2 ผลจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 18s rRNA gene ขนาด 411 bp .....	63
4.4.7 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอสาหร่ายโดยใช้เทคนิคดีจีจีอี (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis) .....	55

4.4.8 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	58
บทที่ 5 .....	59
อภิปรายผลการศึกษา สรุปลผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ .....	59
5.1 ลักษณะทางชีววิทยาของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. ....	59
5.2 ลักษณะการเติบโต (Growth characteristic) ของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp.....	59
5.3 การสะสมไขมันของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp.....	60
5.3.1 ตรวจสอบไขมันในสาหร่ายโดยการย้อมสี Nile red .....	60
5.3.2 ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. ....	61
5.4 การจำแนกสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp.....	62
ข้อเสนอแนะ .....	60
รายการอ้างอิง .....	61
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	70

## สารบัญรูป

รูปที่ 1 <i>Botryococcus</i> sp.....	3
รูปที่ 2 โคลนินของ <i>Botryococcus braunii</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Metzger and Largeau 2005) โดย A คือ ลักษณะภายนอกที่เห็น botryoid ของเซลล์รูปหยดน้ำแต่ละเซลล์ ซึ่งภายในมีลิวพิท และ B คือ โครงสร้างอย่างละเอียดของเซลล์ แสดงส่วนฐานที่เกิดจากการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่อง.....	4
รูปที่ 3 วัฏจักรของสาหร่าย (Kochert 1994).....	6
รูปที่ 4 ไฮโดรคาร์บอนประเภทต่างๆ ที่ถูกสร้างจาก <i>Botryococcus braunii</i> .....	13
รูปที่ 5 การเคลื่อนที่ของ DNA ในเจลโพลีอะคริลาไมด์ ในการทำ DGGE (Hovda 2007).....	18
รูปที่ 6 การเติบโตของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง (CU-MPL-BT) จากสถานที่ต่างๆวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. ที่ความยาวคลื่น 680 nm ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 78 วัน และเก็บเซลล์ทุกๆ 2 วัน .....	25
รูปที่ 7 เซลล์ของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. อยู่รวมกันเป็นโคลนนี้.....	26
รูปที่ 8 เซลล์ของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. มีเส้นใยไซโตพลาสซึมเชื่อมระหว่างโคลนินซึ่งมีเมือกในการยึดเกาะ.....	26
รูปที่ 9 สาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. 9 แหล่งตัวอย่าง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ส่องด้วยแสงปกติ ประกอบด้วย ช่วง lag phase (ก-ข), Logarithmic Phase (ฉ-ค) และ stationary phase (ต-ผ).....	39
รูปที่ 10 สาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. 9 แหล่งตัวอย่าง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ส่องด้วยแสงฟลูออเรสเซนซ์ ประกอบด้วย การสะสมไขมันตั้งแต่วันที่ 0 (lag phase) ของการทดลอง (ก-ข), การสะสมไขมันตั้งแต่วันที่ 20 (Logarithmic Phase) ของการทดลอง (ฉ-ค) และ การสะสมไขมันตั้งแต่วันที่ 54 (stationary phase) ของการทดลอง (ต-ผ).....	39
รูปที่ 11 รูปแบบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง หลังทำการอิเล็กโทรโฟรีซิสผ่านวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 %, เป็นเวลา 30 นาที และกระแสไฟฟ้า 100 V. ....	40
รูปที่ 12 รูปแบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 18S-F และ ไพรเมอร์ 18S-R จากสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง หลังทำการอิเล็กโทรโฟรีซิสผ่านวุ้นอะกาโรส.....	41

รูปที่ 13 รูปแบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ GC-Chlo-165F และ ไพรเมอร์ Chlo-595R ขนาด 411 bp จากสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง หลังทำการอิเล็กโตรโฟเรซิสผ่านวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 %, เป็นเวลา 30 นาที และกระแสไฟฟ้า 100 V. ....	42
รูปที่ 14 การเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนแผ่น DGGE gel ความเข้มข้นอะคริลาไมด์เจล 8% และความเข้มข้นของ Denaturant solution 40-50 %.....	45
รูปที่ 15 ผลการทำ multiple sequence alignment ของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. 9 แหล่งตัวอย่างของ 18s rRNA gene ขนาด 972 bp .....	50
รูปที่ 16 ผลการทำ multiple sequence alignment ของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. 9 แหล่งตัวอย่างของ 18s rRNA gene ขนาด 411 bp .....	52
รูปที่ 17 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT1 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	54
รูปที่ 18 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT2 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	55
รูปที่ 19 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT3 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	56
รูปที่ 20 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT4 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	57
รูปที่ 21 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT5 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	58
รูปที่ 22 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT6 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	59
รูปที่ 23 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT7 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	60
รูปที่ 24 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT8 มีความใกล้เคียงกับ <i>Chlamydomodium starri</i> .....	61
รูปที่ 25 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT9 มีความใกล้เคียงกับ <i>Paraphysomonas vestita</i> .....	62
รูปที่ 26 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT1 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	63
รูปที่ 27 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT2 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	64
รูปที่ 28 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT3 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	52
รูปที่ 29 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT4 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	53
รูปที่ 30 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT5 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	53
รูปที่ 31 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT6 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	54
รูปที่ 32 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT7 มีความใกล้เคียงกับ <i>Botryococcus braunii</i> .....	54

- รูปที่ 33 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT8 มีความใกล้เคียงกับ *Chlamydomodium starrii*..... 55
- รูปที่ 34 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT9 มีความใกล้เคียงกับ *Paraphysomonas vestita*..... 55
- รูปที่ 35 การเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนแผ่น DGGE gel ความเข้มข้นโพลีอะคริลาไมด์เจล 8% และความเข้มข้นของ Denaturant solution 40-50 %..... 57
- รูปที่ 36 Phylogenetic treeที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18s rRNA gene ..... 58



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ค่าผลิตน้ำมันของพืชน้ำมันชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับสาหร่าย (Demirbas and Demirbas 2011) .....	7
ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็ก (Chisti 2007).....	13
ตารางที่ 3 ไพร์เมอร์ 18s rRNA ที่ใช้ในการศึกษา.....	15
ตารางที่ 4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การเติบโต (K) ของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง .....	25
ตารางที่ 5 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์สาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง..	38
ตารางที่ 6 แสดงขนาดโคโลนีของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง.....	38
ตารางที่ 7 ปริมาณการสะสมไขมันของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp.....	38
ตารางที่ 8 ปริมาณไขมัน (% Lipid content) ของสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง.....	38
ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสง ปริมาณ และคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสาหร่าย <i>Botryococcus</i> sp. ด้วยเครื่อง Nano Drop 2000 UV-Vis Spectrophotometers (Thermo Scientific, U.S.A.).....	39
ตารางที่ 10 แสดง Percent Identity Matrix – created ของ 18s rRNA gene ขนาด 972 bp โดยโปรแกรม Clustal Omega 2.1 .....	52
ตารางที่ 11 แสดง Percent Identity Matrix – created ของ 18s rRNA gene ขนาด 411 bp โดยโปรแกรม Clustal Omega 2.1 .....	53
ตารางที่ 12 แสดงปริมาณไขมันของสาหร่าย <i>Botryococcus braunii</i> ที่มีการศึกษาในปัจจุบัน (Ruangsomboon 2012).....	62

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน

ปัจจุบันมีการนำพลังงาน fossil fuel ขึ้นมาใช้จำนวนมาก ส่งผลให้ปริมาณของพลังงาน fossil fuel ที่อยู่ใต้พิภพซึ่งมีอยู่อย่างจำกัด ลดจำนวนลงและอาจจะหมดไปในที่สุด ด้วยอัตราการใช้เชื้อเพลิงชนิดนี้ของมนุษย์เราในปัจจุบันจะทำให้ปริมาณสำรองที่มีอยู่ลดน้อยลงไปเรื่อยๆ ด้วยกระบวนการเกิดซึ่งต้องอาศัยระยะเวลาอย่างยาวนาน ทำให้ไม่สามารถเกิดการทดแทนขึ้นมาใหม่ได้ในช่วงสั้นๆ หรืออาจจะจัดว่าเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ไม่สามารถทดแทนได้ เมื่อมีการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงจาก fossil ในปริมาณที่มากขึ้นเรื่อยๆ ทำให้น้ำมันเชื้อเพลิงโดยเฉพาะดีเซล (diesel fuel) เป็นปัจจัยที่สำคัญที่อาจส่งผลกระทบต่อระบบอุตสาหกรรมของหลาย ๆ ประเทศได้ถ้าเกิดการขาดแคลนขึ้น ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยทั้งในประเทศและทั่วโลกจึงทำการค้นคว้าวิจัยในด้านการหาแหล่งพลังงานอื่นๆ เพื่อที่จะนำไปใช้แทนพลังงานทดแทน ซึ่งปัจจุบันนี้มีการพัฒนาการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพเพิ่มมากขึ้นในหลายประเทศ เพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนทางเลือกใหม่ในอนาคตและได้มีการคิดค้นพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานทางเลือกแทนการใช้พลังงานจาก fossil นอกจากนี้การใช้เชื้อเพลิง fossil fuel เป็นจำนวนมาก ทำให้มีกระบวนการต่างๆที่ทำให้เกิดก๊าซเสียต่างๆ ที่เป็นผลมาจากการเผาไหม้เชื้อเพลิง และส่งผลทำให้เกิดการสะสมตัวในบรรยากาศจำนวนมาก ทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก นำไปสู่ภาวะโลกร้อน ดังนั้นนักวิจัยทั่วโลกจึงได้มองหาแหล่งพลังงานใหม่ที่มีปริมาณและศักยภาพมากพอที่จะสามารถพัฒนาขึ้นมาทดแทน fossil fuel ในอนาคตอันใกล้ และแหล่งพลังงานทั้งหมดล้วนแต่มีต้นกำเนิดมาจากดวงอาทิตย์เป็นสำคัญ และได้มีการค้นคว้าวิจัยหาแหล่งพลังงานทดแทนจากพืชเพื่อนำมาใช้ในอนาคตได้แก่ ปาล์มน้ำมัน สับปะรด อ้อย และมันสำปะหลัง เป็นต้น พืชดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานทดแทนได้ แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกสูง ต้องใช้ผลผลิตจำนวนมากรวมถึงระยะเวลาการเติบโตของพืชบางชนิดใช้เวลานานมากกว่าที่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ ดังนั้นนักวิจัยจึงได้มีการคิดค้นหาแหล่งพลังงานอื่นที่สามารถทดแทนพืชขั้นสูงได้ ซึ่งพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กหลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรคาร์บอนสูง สามารถนำมาใช้ประโยชน์รวมถึงการพัฒนาในด้านอุตสาหกรรมพลังงานให้เกิดประโยชน์สูงสุด สามารถที่จะนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนชีวภาพได้ดี มีสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กบางชนิดที่มีความสามารถในการสะสมไฮโดรคาร์บอนภายในเซลล์ ได้แก่ *Botryococcus braunii*, *Chlorella* sp., *Cryptocodinium cohnii*, *Cylindrotheca* sp., *Nannochloropsis* sp., *Monallanthus salina*, *Nannochloropsis* sp., *Neochloris oleoabundans*, *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, และ *Dunaliella primolecta* เป็นต้น (Chisti 2007)

ในจำนวนสาหร่ายที่มีศักยภาพและมีความสำคัญในการใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนแหล่งใหม่ สาหร่ายขนาดเล็กใน genus *Botryococcus* ได้รับความสนใจในลำดับต้นๆ เพื่อพัฒนาระบบการผลิตเป็นพลังงานชีวภาพ เนื่องจากคุณสมบัติของสาหร่ายที่มีศักยภาพในการผลิตน้ำมัน

เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงกว่าสาหร่ายชนิดอื่น ๆ (Dayananda, Kumudha et al. 2010) สาหร่ายชนิดนี้มีความสามารถในการสังเคราะห์แสง และสะสมไขมันได้สูง ปริมาณสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในเซลล์ของ *Botryococcus braunii* มีอยู่ประมาณร้อยละ 15-75 ของน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งมีค่าที่สูงกว่าสาหร่ายชนิดอื่น เนื่องจากปริมาณไขมันที่สูงกับความสามารถในการเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้ บางครั้งสามารถอยู่รอดได้เป็นเวลาหลายปี (Zhang, Wang et al. 2011) แต่การผลิตน้ำมันของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น สายพันธุ์ รวมถึงสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายหรือปัจจัยสภาพแวดล้อมทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมี ดังนั้นข้อมูลในส่วนของการเติบโตและปริมาณการผลิตไขมันของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันหรือต่างสายพันธุ์กัน จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการคัดเลือกสาหร่าย *Botryococcus* sp. เพื่อนำมาพัฒนาในการผลิตสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพื่อเป็นพลังงานทางเลือกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการผลิตไขมันและการเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เก็บจากแหล่งน้ำต่างๆ ในประเทศไทยจำนวน 9 ตัวอย่าง จากนั้นทำการศึกษากการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเพื่อจำแนกสาหร่าย *Botryococcus* sp. จากแหล่งต่างๆ และดูความแตกต่างทางพันธุกรรมของสาหร่ายดังกล่าวโดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18s rRNA โดยใช้เทคนิคดีจีจีอี (DGGE) เพื่อทำการเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) หรือความสามารถในการผลิตไขมันและการเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ดังกล่าว ว่ามีความสัมพันธ์กับการเติบโต และปริมาณไขมัน ที่เหมือนหรือต่างกัน ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จะทำให้สามารถคัดเลือกสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่ต่างกันได้ในเบื้องต้น เพื่อให้ทราบถึงสายพันธุ์ของสาหร่ายในแต่ละสถานที่เพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกสาหร่าย ที่สามารถเติบโตได้เร็วและให้น้ำมันปริมาณมาก เพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานชีวภาพในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาการเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เก็บจากแหล่งน้ำต่างๆ
- 1.2.2 ศึกษาความสามารถในการผลิตไขมัน
- 1.2.3 เพื่อคัดเลือกสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่สามารถเติบโตได้เร็วและให้น้ำมันปริมาณ

มาก

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลเครื่องหมายทางพันธุกรรมของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่สามารถเติบโตได้เร็วและให้น้ำมันปริมาณมาก เพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานชีวภาพในอนาคต



## บทที่ 2

## สำรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สาหร่าย *Botryococcus* sp. (รูปที่ 1) เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กสามารถสังเคราะห์แสงและสะสมกรดไขมันในปริมาณมากหรือสามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนได้ในปริมาณ 15-75 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Banerjee, Sharma et al. 2002) พบได้ในแหล่งน้ำจืดและน้ำกร่อย (Dayananda, Kumudha et al. 2010) จัดอยู่ในอนุกรมวิธานลำดับต่อไปนี้

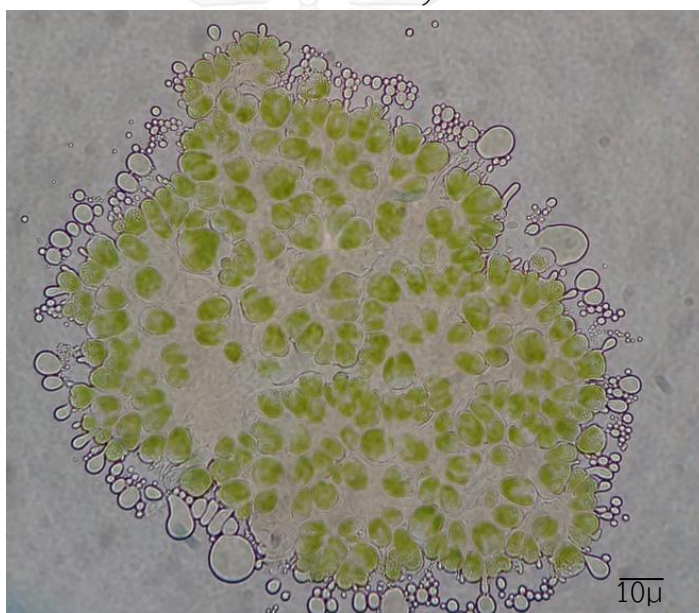
Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Chlorococcales

Family Botryococcaceae

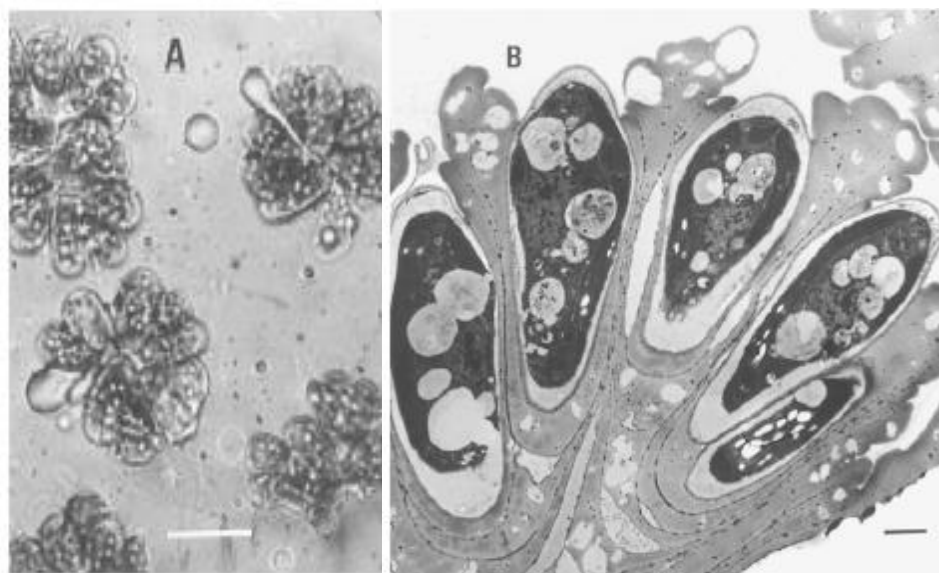
Genus *Botryococcus*



รูปที่ 1 *Botryococcus* sp.

## 2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของ *Botryococcus* sp.

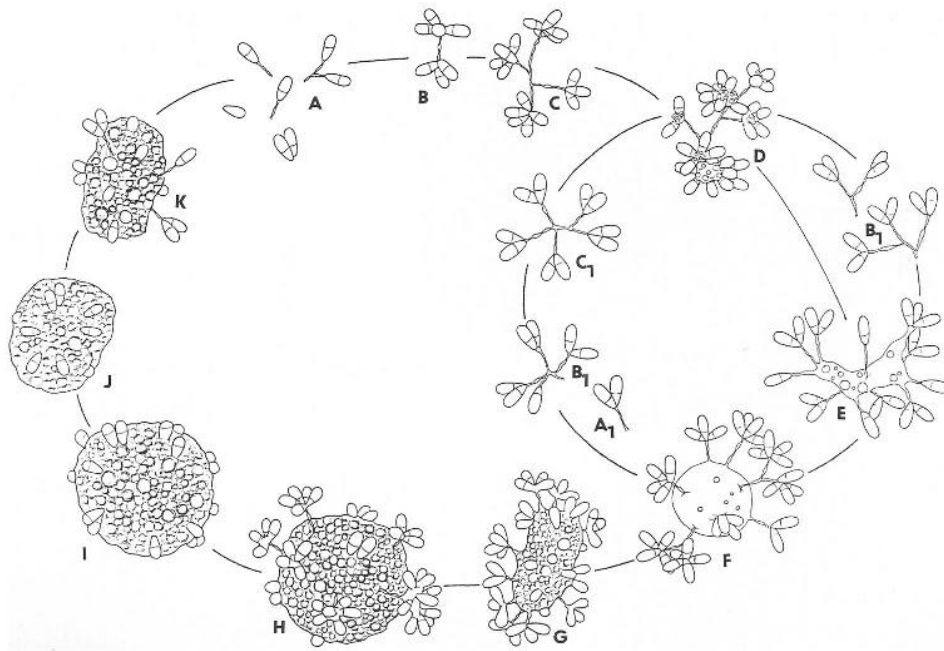
*Botryococcus* sp. มีลักษณะที่สำคัญ คือ อยู่รวมกันเป็นโคโลนี มีสีเขียว รอบนอกมีเมือกหุ้มจึงมีลักษณะไม่สม่ำเสมอและเมือกทำให้โคโลนีมีขนาดใหญ่ขึ้น ลอยน้ำได้ มีเส้นใยไซโทพลาสซึมเชื่อมระหว่างโคโลนี เซลล์มีรูปร่างกลมรี แต่ละเซลล์มีหนึ่งคลอโรพลาสต์ คลอโรพลาสต์มีลักษณะรูปถ้วยหรือ discoid มีการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการแบ่งเซลล์ตามยาวและเซลล์จะมารวมตัวกันหลังจากที่โคโลนีมีการแบ่งตัวตามยาวบริเวณเมือกหุ้มหรือเพิ่มจำนวนเซลล์โดยการแบ่งตัวของโคโลนีที่มีอายุมาก คุณสมบัติของสาหร่าย *Botryococcus* sp. มีความสำคัญในการผลิตน้ำมันหรือมีศักยภาพในการผลิตเชื้อเพลิงธรรมชาติ (Dayananda, Kumudha et al. 2010) แต่สาหร่ายชนิดนี้จะมีการเติบโตช้าและเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเค็มต่ำ



รูปที่ 2 โคโลนีของ *Botryococcus braunii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Metzger and Largeau 2005) โดย A คือ ลักษณะภายนอกที่เห็น botryoid ของเซลล์รูปหยดน้ำแต่ละเซลล์ ซึ่งภายในมีลิพิด และ B คือ โครงสร้างอย่างละเอียดของเซลล์ แสดงส่วนฐานที่เกิดจากการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่อง

## 2.2 วัฏจักรของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

วัฏจักรเซลล์ของประชากรสาหร่าย *Botryococcus* sp. เริ่มจากเซลล์เดี่ยวลอยอยู่ในมวลน้ำ ซึ่งถูกปล่อยมาจากโคโลนีแก่ที่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เซลล์เหล่านี้จะเข้าสู่ระยะพัก โดยมี cup หรือไม่มีก็ได้ เซลล์ที่ไม่มี cup จะสร้างเมือกหุ้ม เซลล์ทั้งหมดจะสร้างออโตสปอร์ (autospore) 2-4 ออโตสปอร์ในผนังเซลล์ของเซลล์แม่ จนเพิ่มจำนวนเป็น 8 ออโตสปอร์ในภายหลัง ซึ่งเมื่อออโตสปอร์ถูกปล่อยออกจะกลายเป็นวุ้น หลังจากนั้นเซลล์จะแตกกิ่งก้านมากขึ้นเรื่อยๆ โดยสามารถสร้างเป็นโคโลนีที่ใหญ่ได้ถึง 200 เซลล์ และอาจจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 400 ไมโครเมตร ถ้าอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เซลล์เหล่านี้ก็จะสร้างประชากรใหม่ต่อไป (รูปที่ 3) ซึ่งในการสืบพันธุ์ เซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (colony) เชื่อมเกาะกันด้วยเมือกช่วงชีวิตและการขยายโคโลนีของสาหร่ายจะดำเนินไปอย่างอิสระในวัฏจักรระยะพัก (resting stages cycle) (A1-C1) ก้านของโคโลนีขนาดเล็กจะมีการแตกออกและให้กำเนิดเซลล์ใหม่ เพื่อรักษาสมดุลการลอยของโคโลนีจึงมีการพัฒนาถุง (bladder) เล็กภายในตรงกลางของโคโลนี (E, F) เริ่มจากการขยายเล็ก ๆ ระหว่างผนังเซลล์ของก้านที่มีความหนา การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของทรงกลมจะสามารถขยายได้ถึง 40-80  $\mu\text{m}$  (เส้นผ่านศูนย์กลาง) บางครั้งมีอยู่เล็กน้อยในหนึ่งโคโลนี บางเซลล์หรือโคโลนีจะถูกล้อมรอบไปด้วยถุงทรงกลมที่ติดอยู่กับก้าน ซึ่งสามารถแตกออกและพัฒนาออกเป็นโคโลนีขนาดใหญ่ได้ (C หรือ D) เมื่อเซลล์โตขึ้น จะมีสารประกอบพวก oil และ wax สะสมอยู่ที่ผิวของถุง กิ่ง และก้าน โดยกิ่งจะยิ่งสั้นขึ้นเมื่อเซลล์ยิ่งมีอายุด้วยเหตุนี้เซลล์จึงติดกับเมือกและถุง เซลล์จะมีการเพิ่มจำนวนแต่จะไม่มีการผลิตก้านอีกแล้ว จะมีเพียงกลุ่มเซลล์ที่เพิ่มจำนวนซึ่งเชื่อมกับ cup เซลล์จะมีการผสานเข้าไปข้างในจนอยู่เกือบติดขอบของ cup มีหลายเซลล์ในโคโลนีที่ตาย แต่บางเซลล์ก็สามารถอยู่ได้และมองเห็นเป็นสีน้ำตาลดำซึ่งเป็นระยะพัก เซลล์เหล่านี้สามารถพัฒนาหรือเติบโตได้อีกครั้งและสามารถผลิตเซลล์ใหม่ได้ (Kochert 1994)



รูปที่ 3 วัฏจักรของสาหร่าย (Kochert 1994)

### 2.3 น้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgal oil)

ไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพแหล่งพลังงานทดแทน (renewable energy) หรือ เชื้อเพลิงทางเลือก (alternative energy) ที่มีคุณสมบัติในการเผาไหม้เหมือนกับดีเซลและไม่มี การปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่บรรยากาศจึงเป็นเชื้อเพลิงที่ดีในการช่วยบรรเทาภาวะโลกร้อน (Lang, Dalai et al. 2001, Andersen 2005) อย่างไรก็ตามราคาน้ำมันไบโอดีเซลในปัจจุบันยังคงสูง อันเนื่องมาจากราคาของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต รัฐบาลของประเทศต่างๆ จึงมีนโยบายส่งเสริมการ ปลูกพืชน้ำมันเพื่อลดต้นทุนของวัตถุดิบของการผลิตไบโอดีเซล แต่การปลูกพืชน้ำมันนั้นต้องการพื้นที่ ในการเพาะปลูกสูง ด้วยเหตุนี้นักวิจัยของหลายๆ ประเทศจึงได้พุ่งความสนใจไปที่การใช้ไขมันจาก สาหร่ายขนาดเล็กมากขึ้น ทั้งนี้เพราะข้อได้เปรียบของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กหลายๆ ประการ เช่น เติบโตเร็ว นอกจากนี้ยังสามารถเพาะเลี้ยงในอาหารแบบง่ายๆ ในระดับการผลิตขนาดใหญ่ได้ (Woft, Nonomura et al. 1985, Sawayama, D. et al. 1995)

ตารางที่ 1 ค่าผลิตน้ำมันของพืชน้ำมันชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับสาหร่าย (Demirbas and Demirbas 2011)

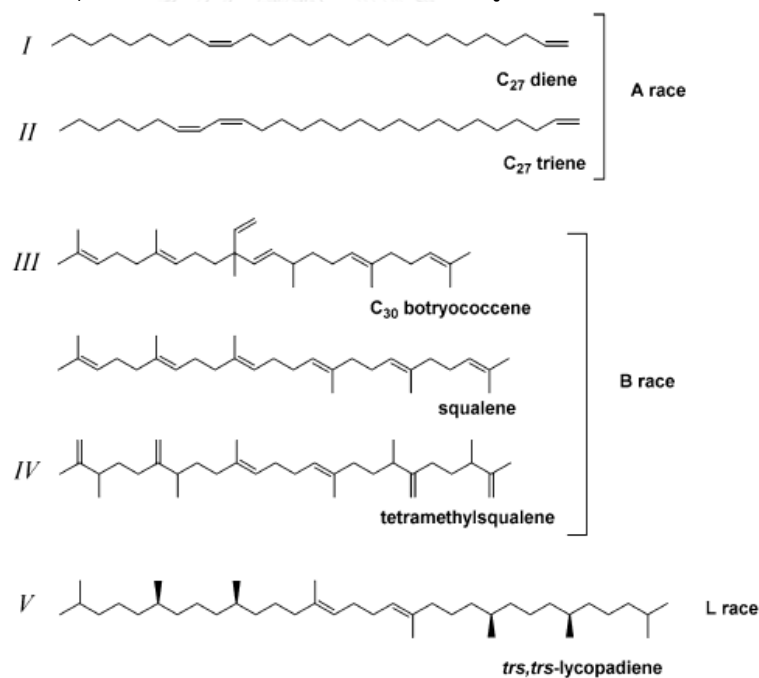
ชนิดของพืชน้ำมัน	น้ำมัน (ลิตร/เฮคแตร์)
สาหร่าย (Algae)	100,000
ละหุ่ง (Castor)	1,413
มะพร้าว (Coconut)	2,689
ปาล์ม (Palm)	5,950
ดอกคำฝอย (Safflower)	779
ถั่วเหลือง (Soy)	446
ดอกทานตะวัน (Sunflower)	952

การใช้สาหร่ายขนาดเล็กเป็นพลังงานทดแทนทำได้โดยการนำไขมันหรือน้ำมันในเซลล์มาผลิตเป็นเชื้อเพลิงไบโอดีเซลโดยผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) หรือการใช้เซลล์สาหร่ายขนาดเล็กผสมโดยตรงกับน้ำมันดีเซลหรือไบโอดีเซล (Sheehan, Dunahay et al. 1998, Scragg, Morrison et al. 2003) โดยค่าผลิตน้ำมันของพืชน้ำมันชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับสาหร่าย แสดงดังตารางที่ 2-1 ทั้งนี้ จากการศึกษ พบว่า สาหร่ายขนาดเล็กมีส่วนประกอบของน้ำมันอยู่ในปริมาณสูง (ตารางที่ 2-2) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการนำมาสกัดเพื่อให้ได้ผลผลิตน้ำมันในอนาคต ซึ่งนักวิจัยในประเทศไทย มีความตื่นตัวในการวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อการสกัดผลผลิตน้ำมันเช่นเดียวกัน โดยจากผลการวิจัย พบว่า มีสาหร่าย 4 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตน้ำมันชีวภาพ ได้แก่ *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis* sp., *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. และ *Carteria* sp (Chisti 2007)

ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำมันในสาหร่ายขนาดเล็ก (Chisti 2007)

สาหร่ายขนาดเล็ก	ปริมาณลิปิด (% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricomutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

สำหรับสาหร่าย *Botryococcus braunii* มี 3 สายพันธุ์ตามโครงสร้างไฮโดรคาร์บอน คือ A, B และ L ซึ่งแต่ละสายพันธุ์จะผลิตไฮโดรคาร์บอนที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ไฮโดรคาร์บอนประเภทต่างๆ ที่ถูกสร้างจาก *Botryococcus braunii* ทั้ง 3 สายพันธุ์ (Metzger and Largeau 2005)

## 2.4 ปัจจัยแวดล้อมและการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย

สาหร่ายขนาดเล็กสามารถใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานเหมือนสิ่งมีชีวิตพวก photoautotrophs (Wahidin, Idris et al. 2013.) นอกจากนี้แสงที่ทำให้เซลล์สาหร่ายเติบโตและผลิตน้ำมันแล้วยังได้รับผลจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆอีกด้วย เช่น ธาตุอาหาร ความเข้มแสง ช่วงมืด-ช่วงสว่าง และอุณหภูมิ (Parmar, Singh et al. 2011) ธาตุอาหาร เช่น ไนโตรเจนและเหล็กเป็นส่วนประกอบสำคัญของกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง โดยเฉพาะอย่างกลุ่มธาตุอาหารปริมาณน้อย (trace element) เช่น เหล็ก เป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการรับ-ส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการหายใจ การลดปริมาณไนโตรเจนกับไนเตรต และการกำจัดอนุมูลอิสระจำพวก superoxide (Liu, Xu et al. 2014) ฟอสฟอรัสและคาร์บอนไดออกไซด์สำคัญต่อการเติบโตและการผลิตไฮโดรคาร์บอน (Raven 1990, Chen and LIU 2013, Al-Hothaly, Mouradov et al. 2015) และอุณหภูมิถูกพบว่าเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อส่วนประกอบของไขมันในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก (Cheng, Ji et al. 2013)

*B. braunii* สามารถเติบโตได้ในสภาพที่มีความเค็มต่ำจึงมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ (Li and Qin 2005) ได้ศึกษาการเปรียบเทียบการเติบโตและไขมัน ใน *Botryococcus braunii* สามสายพันธุ์ เลี้ยงในระดับความเค็มที่ 0, 0.15, 0.25, และ 0.5 psu ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการปรับความเค็มจะพบว่าสาหร่าย *Botryococcus braunii* สามสายพันธุ์ มีการเติบโตได้ดีในความเค็มที่ต่ำ คือ 0 และจะมีการเติบโตช้าในระดับความเค็มที่สูง เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ (Furuhashi, Hasegawa et al. 2016) ทำการศึกษาผลของความเค็มต่อการสังเคราะห์ไฮโดรคาร์บอน การเติบโต และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของ *B. braunii* Showa strain ที่เลี้ยงในอาหาร Chu13 (modified) (25°C ช่วงสว่าง 12:12 ความเข้มแสง 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) พบว่าสามารถสังเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนได้ภายใน 7 วัน ซึ่งไม่มีความแตกต่างจากอาหารสูตรเดียวกันที่ระดับความเค็ม 0.3% 0.5% และ 0.7% ของความเค็มน้ำทะเล (3, 5 และ 7 g L<sup>-1</sup>) แต่เมื่อเลี้ยงในความเค็มที่ 0.3% จะสามารถพัฒนาการสังเคราะห์ไฮโดรคาร์บอนได้มากและใช้เวลาน้อยที่สุด อีกทั้งมีขนาดของโคโลนีใหญ่กว่าและมีการลอยน้ำมากกว่าที่ความเค็มอื่นๆ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อส่วนประกอบของไขมันในเซลล์สาหร่ายขนาดเล็ก *Botryococcus* ของ (Kalacheva, Zhila et al. 2002) รายงานว่า *B. braunii* (strain No LB 807/1 Droop 1950 H-25) ที่เลี้ยงใน Prat medium สามารถเติบโตที่อุณหภูมิ 32 °C ได้ดีกว่าที่ 18 และ 25 °C ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ (Yoshimura, Okada et al. 2013) รายงานว่า *B. braunii* Showa strain สามารถเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-30 °C โดยอุณหภูมิที่เติบโตได้ดีที่สุดคือ 30 °C ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในปี 2016 ของ (Al-Hothaly, Mouradov et al. 2015) ที่ทำการศึกษาผลของธาตุอาหารและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่ออัตราการเติบโตโดยวัดจากมวลรวมชีวภาพ และการผลิตน้ำมันของ *B. braunii* Race B strain จำนวน 2 สายพันธุ์ (Kossou-4 and Overjuyo-3) โดยใช้อาหาร BG11 (pH 7.4) รายงานว่า *B. braunii* สามารถเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิ 25 °C ซึ่งอาจเป็นเพราะ *B. braunii* ที่นำมาทำการศึกษาเป็นคนละสายพันธุ์ (Al-Hothaly, Mouradov et al. 2015)

นอกจากนี้ (Al-Hothaly, Mouradov et al. 2015) ยังทำการศึกษาปัจจัยอื่นๆ แบ่งเป็น 4 การทดลอง คือ การทดลองความเข้มข้นของไนโตรเจน 370, 750 และ 1500 mg l<sup>-1</sup> การทดลองความเข้มข้นของเหล็กที่ 3, 6 และ 9 mg l<sup>-1</sup> การทดลองอุณหภูมิที่ 20, 25 และ 30 °C และสุดท้าย การทดลองความเข้มแสงที่ 54, 81 และ 135 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> กับช่วงมืด: ช่วงสว่าง 12;12, 16:8 และ ให้แสงสว่างตลอด 24 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ 750 mg l<sup>-1</sup> ที่ความเข้มข้นของเหล็ก 6 mg l<sup>-1</sup> ที่อุณหภูมิ 25 °C ที่ความเข้มแสง 135 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> และที่ช่วงมืด:ช่วงสว่างเท่ากับ 16:8 ชั่วโมง เป็นช่วงที่มีความเหมาะสมต่อการเติบโตมากที่สุด

การเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus braunii* ของ (Khatri, Hendrix et al. 2014) เลี้ยงในอาหารสูตร WFAM ซึ่งพัฒนามาจากสูตร “Chu-13” และสูตร “HS” ให้แสง 400 W ช่วงสว่าง/มืด = 16/8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28 C ในเวลาสว่าง และ 25 C เวลามืด วัดค่าการเติบโตในช่วงความยาวคลื่น 550 nm พบว่ามีการเติบโตน้อยกว่า 0.5 เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่โคโลนีจะลอยขึ้นสู่ผิว

การทดลองของ (Yoshimura, Okada et al. 2013) ศึกษา *Botryococcus braunii* strain Showa race B เลี้ยงในอาหารสูตร Chu 13 ให้แสง 169 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ช่วงสว่าง:มืด 14:10 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 °C ในเวลาสว่าง วัดค่าการเติบโตโดยวิธี in vivo Chlorophyll-a (Chl-a) fluorescence ซึ่งมีค่าการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.693 ทำการทดลองกับอาหาร 4 สูตร ได้แก่ Chu 13, Chu 13 บวก vitamins, Chu 13 บวก selenium และ Chu 13 บวก vitamins บวก selenium ซึ่งพบว่า Chu 13 บวก vitamins เป็นสูตรอาหารที่ทำให้ *Botryococcus braunii* เติบโตได้ดีที่สุด โดยมีค่าการเติบโตเท่ากับ 0.27 ต่อวัน ซึ่ง vitamins กับ selenium มีรายงานว่า เป็นปัจจัยจำกัดต่อการเติบโตของสาหร่าย เพราะสาหร่ายไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินได้และยังได้ทำการทดลองเลี้ยงในความเค็มที่ 0.4, 0.7, 2.1, 4.0 และ 18.1 psu แสดงให้เห็นว่าความเค็มที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้การเติบโตลดลง ซึ่งที่ความเค็ม 0.4 psu มีการเติบโตดีที่สุด และที่ความเค็ม 18.1 psu ไม่มีการเติบโต และยังได้ทำการทดลองกับอุณหภูมิ ได้แก่ 5, 15, 20, 25, 27.5, 30, 35, 38, และ 45 °C ซึ่งอุณหภูมิที่ทำให้เติบโตได้ดีที่สุดคือ 30 °C โดยมีค่าการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.496

สำหรับการศึกษาในประเทศไทย (Boonma, Vacharapiyasophon et al. 2014) ได้ศึกษาการเลี้ยง *Botryococcus braunii* ที่เก็บมาจากแหล่งน้ำต่างๆ ในภาคเหนือของไทย โดยเลี้ยงในอาหาร 3 สูตร ได้แก่ CHU 13 (pH 6.7), Jaworski's medium (pH 7.0) และ CA (pH 7.2) ให้แสง 10.8 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> อุณหภูมิ 25 °C ซึ่งพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดคือสูตร CA ซึ่งน่าจะเป็นสูตรที่มีธาตุอาหารเหมาะสมต่อ *Botryococcus braunii* ในภาคเหนือของไทย

## 2.5 การศึกษาในระดับโมเลกุล

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทต่อการพัฒนาในด้านต่างๆ รอบตัวเรามากขึ้น และบ่อยครั้งขั้นตอนการศึกษาวิจัยเพื่อได้องค์ความรู้ใหม่ๆ ทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ จะต้องทำการศึกษาจากระดับหน่วยควบคุมทางพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต โดยการสกัดแยกเอาดีเอ็นเอออกมาใช้ประโยชน์ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและใช้ในการศึกษาระดับโมเลกุล จึงได้มีการพัฒนาและศึกษาข้อมูลในการวิเคราะห์สาหร่าย *Botryococcus* sp. มีลำดับ r-RNA เป็น 18S rRNA gene เป็นยีนที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดและมีบางช่วงของสายดีเอ็นเอของ 18S rRNA gene ที่เหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและส่วนที่เหมือนกันนี้



สามารถนำมาใช้เพื่อออกแบบ primer ได้ ในขณะเดียวกัน 18S rRNA gene ก็มีช่วงของสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกันใน สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งช่วงที่เหมือนและช่วงที่แตกต่างกันของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอ นั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายได้โดยใช้หลักการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA gene ซึ่งจากการศึกษาของ (Dayananda, Kumudha et al. 2010) ได้มีการคัดแยกลักษณะและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Botryococcus* sp. โดยมีการใช้ 18S rRNA gene ในการวิเคราะห์ ลำดับ ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงของยีนที่ออกแบบมาจากลำดับในฐานข้อมูล (NCBI) พบว่าการวิเคราะห์ ได้แสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของสาหร่าย *Botryococcus* sp. มากกว่า 90 % ดังนั้นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic Markers) เข้ามามีบทบาทและมีความสำคัญมากขึ้น เพื่อให้เกิดความแม่นยำสูงในการใช้เครื่องหมาย (Markers) ซึ่งมีความสำคัญในการใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรม และสามารถถ่ายทอดลักษณะที่สิ่งมีชีวิตที่มีการแสดงออกในลักษณะต่างๆ และความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ได้จากการจำแนกโดยใช้เทคนิค ดีจีจีอี, อาร์เอพีดี, อาร์เอฟแอลพี และมาทำการเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological) หรือ ความสามารถในการผลิตน้ำมันหรือการเติบโต เพื่อเป็นเครื่องหมาย (Markers) สำหรับแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งอาร์เอพีดี (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) มีขั้นตอนการวิเคราะห์อย่างรวดเร็วและค่อนข้างเรียบง่ายเหมาะสำหรับการศึกษาในพืช เช่น การทำแผนที่พันธุกรรมพืชรวมถึงการศึกษาพันธุศาสตร์ ความหลากหลายด้านประชากร (Williams, Kubelik et al. 1990, Deragon and Landry 1992) จากการศึกษาของ (Chandrappa, Lakshmanan et al. 2010) ได้ศึกษาการประเมินผลของความแตกต่างทางพันธุกรรมในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Botryococcus* จากแหล่งที่แตกต่างกันโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี จากสาหร่าย *Botryococcus braunii* [Strain1], *Botryococcus braunii* [Strain 2], *Botryococcus braunii* [LB-572], *Botryococcus braunii* [SAG 30.81], *Botryococcus* sp. [DB-8], *Botryococcus* sp. [MCRC], *Botryococcus* sp. [CFTRI] พบว่ามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ระหว่างสายพันธุ์ *Botryococcus* sp. จากการวิเคราะห์กลุ่มของข้อมูล RAPD ส่วนเทคนิค อาร์เอฟแอลพี (RFLP Restriction Fragment Length Polymorphisms) ทำให้ตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์พืชได้เช่นกัน (Tanksley, Young et al. 1989, Kochert 1994) จากการศึกษาของ (Liu, Xu et al. 2014) ได้มีการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของสาหร่ายน้ำมันที่ราบสูงทางตอนเหนือของมณฑลชิงไห่ (ทิเบต) พบว่าสาหร่ายขนาดเล็กมีความแตกต่างกันของพันธุกรรม ซึ่งตัวแทนของสาหร่ายที่ได้มีความหลากหลายสูงอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน

### 2.5.1 การสกัด DNA

การเลือกวิธีที่เหมาะสมในการสกัด DNA มีความจำเป็นเนื่องจากให้คุณภาพและปริมาณ DNA ไม่เหมือนกัน โดยปัจจัยสำคัญที่ควรพิจารณา คือ ให้มีการปนเปื้อนสารน้อย, ทำให้เซลล์แตกได้มาก และ ได้ปริมาณ DNA มาก โดย DNA ฝึกลดน้อย การเก็บรักษา DNA สามารถเก็บได้ช่วงระยะเวลาหนึ่ง โดยจะต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำมากๆ เช่น -20 องศาเซลเซียส หรือ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพของ DNA ก่อนนำไปตรวจสอบต่อไป (สิงห์คะ 2554)

## 2.5.2 หลักการของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาอุณหภูมิโพริเมอเรสหรือ PCR

เทคนิค PCR ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ที่สนใจ อย่างจำเพาะเจาะจงได้ ในปริมาณที่มากกว่าเดิมหลายล้านเท่า และในเวลาที่รวดเร็ว โดยอาศัยหลักการเดียวกันกับการจำลองตัวเองของ DNA ที่พบในสิ่งมีชีวิต ขั้นตอนในการทำ PCR มี 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

ขั้นตอนที่ 1 การแยกสาย DNA สายคู่ออกจากกัน (Denaturing) แยกสาย DNA ต้นแบบสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูง 90-95 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 2 การจับของไพรเมอร์กับ DNA ต้นแบบ (Annealing) ไพรเมอร์สามารถเกาะกับ DNA สายเดี่ยวได้ตรงบริเวณที่เป็นเบสคู่สม โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 40-65 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 3 การสังเคราะห์ DNA สายใหม่ (Extension) เอนไซม์ DNA Polymerase จะสังเคราะห์ DNA สายใหม่ในทิศทางจาก 5'-3' โดยทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

## 2.5.3 การแยกสายคู่ของจีน DNA ด้วยเทคนิค DGGE

### 2.5.3.1 ขั้นตอนของ DGGE

ขั้นตอนของ DGGE มี 5 ขั้นตอนดังนี้คือ

ขั้นตอนที่ 1 การสกัด DNA ทั้งหมด และการทำให้ DNA บริสุทธิ์

ขั้นตอนที่ 2 การเพิ่มจำนวน DNA โดยเน้นเจาะจงไปที่สาย DNA ของ 18S rRNA gene โดยใช้ Universal primer ของ 18S rRNA gene

ขั้นตอนที่ 3 ทำการแยกสายของ DNA จากตัวอย่างโดยใช้ DGGE

ขั้นตอนที่ 4 สาย DNA ที่แยกได้มาจาก DGGE จะถูกแยกออกมาจาก DGGE gel และนำไปหาลำดับเบส (Sequencing)

ขั้นตอนที่ 5 หาความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 18S rRNA gene ที่ได้จากลำดับเบสและการแจกแจงชนิดของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ (Phylogenetic Relationship)

### 2.5.3.2 การวิเคราะห์ทาง DGGE

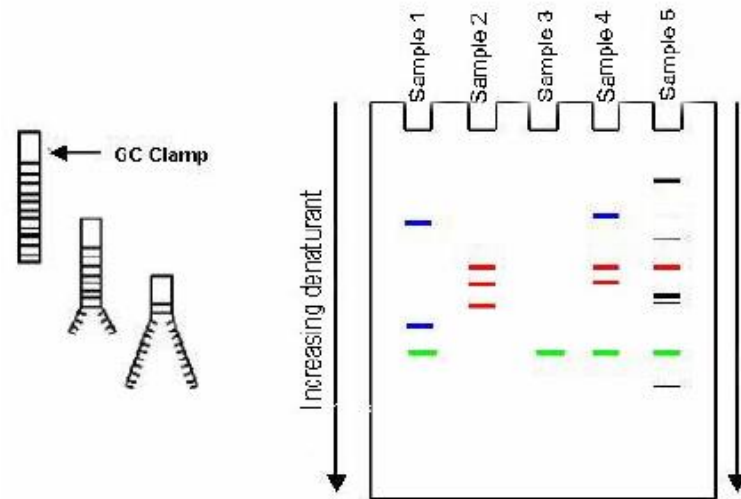
การวิเคราะห์ทาง DGGE เป็นการวิเคราะห์ทาง DNA อย่างหนึ่ง โดยมี 4 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 สายของ DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน (PCR products) ของ 18S rRNA gene โดยรวม จะถูกแยกบนเจล (DGGE gel) ซึ่งมีส่วนผสมของสารเคมีที่จะเป็นตัวแยกสาย DNA (Denaturant) อย่างเป็นสัดส่วน (Gradient) ตามความเข้มข้นของ Denaturant โดยความเข้มข้นน้อยจากข้างบนไปสู่ความเข้มข้นมากที่อยู่ส่วนล่างของเจล (รูปที่ 5)

ขั้นตอนที่ 2 ถึงแม้สาย DNA ของ 18S rRNA gene โดยรวมที่นำมาแยกจะมีลำดับเบสที่มีขนาดความยาวเท่ากัน แต่ลำดับเบสในส่วนที่ไม่เหมือนกันจะมีอุณหภูมิการหลอมหรือการแยก (Melting temperature) ที่ไม่เท่ากัน

ขั้นตอนที่ 3 สาย DNA ของ 18S rRNA gene ที่เพิ่มจำนวน DNA โดยรวมในขั้นตอนแรกๆ จะวิ่งไปบน DGGE gel ได้ไม่เท่ากัน

ขั้นตอนที่ 4 สาย DNA สองสายที่มีความยาวเท่ากันแต่มีเบสต่างกันถึงแม้จะมีเพียงแค่ตัวเดียวสาย DNA ทั้งสองสายจะถูกแยกไปอยู่ที่ตำแหน่งต่างกันบนเจล เราจึงสามารถเห็นสาย DNA ของแต่ละชนิดถูกแยกออกจากกันบน DGGE gel



รูปที่ 5 การเคลื่อนที่ของ DNA ในเจลโพลีอะคริลาไมด์ ในการทำ DGGE (Hovda 2007)

### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

### 3.1 ตัวอย่างสาหร่าย *Botryococcus* sp.

สาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ ชั้น 7 ห้อง 730 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง (CU-MPL-BT) จากแหล่งน้ำ ณ สถานที่ต่างๆ ได้แก่ จังหวัดมหาสารคาม (CU-MPL-BT1 และ CU-MPL-BT2), จังหวัดนครปฐม (CU-MPL-BT3 และ CU-MPL-BT4), ลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ (CU-MPL-BT5), จังหวัดสกลนคร (CU-MPL-BT6), จังหวัดเลย (CU-MPL-BT7), จังหวัดสุราษฎร์ธานี (CU-MPL-BT8) และ จังหวัดเชียงใหม่ (CU-MPL-BT9) ทำการแยกเซลล์ *Botryococcus* sp. ซึ่งถูกรวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ทั้ง 9 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Pasteur pipette single cell isolate และเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG11 (Blue-Green Medium) (Andersen 2005) โดยการนำเซลล์สาหร่ายเลี้ยงลงในขวดปริมาตร 2000 ml และเก็บรักษาต่อเชื้อโดยการเลี้ยงสาหร่ายในหลอดทดลองที่มี Medium หลังจากนั้นนำไปวางบนชั้นวางแผงก่ตอน บ่มที่ อุณหภูมิ 27 °C ความเข้มแสงประมาณ 54  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ช่วงมืด : สว่าง 12 : 12 ชั่วโมง

### 3.2 การเลี้ยงสาหร่าย *Botryococcus* sp.

ทำการทดลองเลี้ยงสาหร่ายในขวดปริมาตร 2,000 ml ในระดับความเค็ม 0 psu บ่มในห้องเพาะเลี้ยงแผงก่ตอน อุณหภูมิ 27 °C ความเข้มแสงประมาณ 54  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ช่วงมืด : สว่าง 12 : 12 ชั่วโมง โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาการเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่ง เลี้ยงเป็นเวลา 78 วัน และให้อากาศตลอดเวลา วัดการเติบโตด้วยวิธีวัดค่า OD (Optical density) 680 นาโนเมตร (Lee, Kim et al. 1998) เพื่อเปรียบเทียบการเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ในแต่ละแหล่งตัวอย่างโดยหาค่าสัมประสิทธิ์การเติบโตจำเพาะ (K) โดยใช้สูตร (Li and Qin 2005) ดังนี้

$$K = \frac{\log OD_t - \log OD_0}{T}$$

### 3.3 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

เก็บตัวอย่างสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในขวดปริมาตร 2,000 ml ลงในหลอดเก็บตัวอย่าง 1 ml หยดตัวอย่างสาหร่ายลงบนสไลด์ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ หลังจากนั้นนำ ตัวอย่างไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus bx 50) สังเกตลักษณะของสาหร่าย *Botryococcus* sp. รูปร่าง ขนาด สี ของสาหร่ายทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง พร้อมบันทึกภาพ

### 3.4 การตรวจวัดปริมาณไขมันรวมในสาหร่าย *Botryococcus* sp.

#### 3.4.1 ตรวจสอบไขมันในสาหร่ายโดยการย้อมสี Nile red

ตรวจสอบไขมันในสาหร่ายโดยการย้อมสี Nile red ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ (Huang, Chen et al. 2009) ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เลี้ยงในขวดปริมาตร 2,000 ml ในแต่ละช่วง คือ lag phase, log phase, และ stationary phase ใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่าง 1 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนออก เติมสีย้อม Nile red ความเข้มข้น 200 µg/ml ปริมาตร 10 µl เติม 25% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 100 µl (เขย่าให้เข้ากัน) ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำตัวอย่างไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบฟลูออเรสเซนซ์ โดยฉายแสง UV และตรวจวัดแสงสีเหลือง (พื้นที่ไขมัน) แสงสีแดง (พื้นที่เซลล์) สังเกตลักษณะการสะสมไขมันพร้อมบันทึก

#### 3.4.2 การตรวจสอบไขมันในสาหร่ายโดยการสกัดด้วย Hexane

ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับไขมันในสาหร่ายทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง ด้วยเทคนิคการสกัดไขมันในสารละลายโดยดัดแปลงจากวิธีของ (Zhang, Wang et al. 2011) นำสาหร่าย 2 g มาสกัดไขมันด้วยเฮกเซน 70 ml เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยคลื่นอัลตราซาวด์ความถี่ 19.5 -20.5 กิโลเฮิร์ตซ์ ในระหว่างการสกัดเพื่อทำให้การสกัดมีคุณภาพดีขึ้น นำไปกรองเอากากออก แล้วนำส่วนของเหลวไปทำการระเหยเฮกเซนออกด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ ที่อุณหภูมิ 60 °C ภายใต้สภาวะสูญญากาศ นำส่วนที่เหลือออกมาทำการหาปริมาณด้วยการชั่งน้ำหนัก

### 3.5 การจำแนกสาหร่าย *Botryococcus* sp. ด้วยการวิเคราะห์ยีน 18s rRNA

#### 3.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างสาหร่ายที่เลี้ยง BG11 ประมาณ 10 ml ความเข้มข้น 0.2 ที่ความถี่คลื่น 680 nm มากรอง เพื่อสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีของ (Winnepenninckx, Backeljau et al. 1993) โดยปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูด medium ออก แล้วเติม 2% CTAB buffer จำนวน 750 µl เขย่าที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm (รุ่น sigma 3-16k 12154) เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°C เก็บส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ใหม่โดยแบ่งใส่ปริมาตร 750 µl แล้วเติม Proteinase K (20 mg/ml) 75 µl (พลิกหลอดเบาๆ) บ่มที่อุณหภูมิ 55°C ประมาณ 1-3 ชั่วโมง หรือ ทิ้งไว้ข้ามคืน (พลิกหลอดเบาๆ ทุก 10 นาที) เติม RNase ปริมาตร 1 µl และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาณส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol ปริมาตร 2/3 ของปริมาณส่วนใสที่ได้ แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จะมีตะกอนสีขาวนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C เทส่วนใสออกเติม 70 % Ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม Absolute Ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C เทส่วนใสทิ้ง ทำให้ตะกอน DNAแห้ง เติม TE ที่ 4 °C เพื่อละลายตะกอนเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือ Overnight เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -



### 3.5.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

#### 3.5.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 18S-F และ ไพรเมอร์ 18S-R

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 18S-F และ ไพรเมอร์ 18S-R (ตารางที่3) เตรียมในปริมาตร 20  $\mu$ l ต่อ1ปฏิกิริยา ประกอบด้วย *Taq* DNA Polymerase 1 Units,  $MgCl_2$  1 mM, dNTP 0.1 mM, ไพรเมอร์ 18S-F และ ไพรเมอร์ 18S-R อย่างละ 0.3  $\mu$ M, จีโนมดีเอ็นเอ 10 ng จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบควบคุมอุณหภูมิ (C1000 Touch Thermal Cycler ยี่ห้อ Bio- Rad, U.S.A. NO. 185-1148) โดยใช้โปรแกรมอุณหภูมิดังนี้

ขั้นที่ 1 Initial denaturation 94 °C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่ 2 Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที, Annealing ที่ 55 °C 1 นาที Extension ที่ 72 °C 1 นาที จำนวน 25 รอบ

ขั้นที่ 3 Final Extension 72 °C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

#### 3.5.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ GC-Chlo-165F และ ไพรเมอร์ Chlo-595R

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ GC-Chlo-165F และ ไพรเมอร์ Chlo-595R (ตารางที่3) เตรียมในปริมาตร 50  $\mu$ l ต่อ 1 ปฏิกิริยา ประกอบด้วย *Taq* DNA Polymerase 1 Units,  $MgCl_2$  1 mM, dNTP 0.1 mM, ไพรเมอร์ GC-Chlo-165F และ ไพรเมอร์ Chlo-595R 0.5  $\mu$ M, Genomic DNA 5 ng จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบควบคุมอุณหภูมิโดยใช้โปรแกรมอุณหภูมิดังนี้

ขั้นที่ 1 Initial denaturation 94 °C เป็นเวลา5 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่ 2 Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที, Annealing ที่ 60 °C 45 วินาที Extension ที่ 72 °C 30 วินาที จำนวน 40 รอบ

ขั้นที่ 3 Final Extension 72 °C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

### 3.5.4 การวิเคราะห์สำหรับ *Botryococcus* sp. ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ดีจีจี (PCR-DGGE)

เตรียมพอลิอะคริลาไมด์เข้มข้น 8% ที่มี gradient ของสารละลายดีเนอเรนทนต์อยู่ 40% และ 50% ประกอบด้วยสารละลาย 0% (อะคริลาไมด์ต่อบิส 37.5:1 เข้มข้น 40% ปริมาตร 20 ml, บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า (50X) ประกอบด้วย Tris base 2 M, Acetic acid 1 M และ 0.5 M EDTA, pH 8.0 50 mM และปรับปริมาตรด้วยน้ำ (Deionized water: DI) 100 ml หลังจากนั้นเตรียมสารละลาย 100 % (อะคริลาไมด์:บิส 37.5:1 เข้มข้น 40% ปริมาตร 20 ml) บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า (50X) ปริมาตร 2 ml ฟอร์มาไมด์ปริมาตร 40 ml ยูเรีย 42 g แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ (Deionized water: DI) 100 ml ซึ่งละลาย 0% และ 100% เข้าด้วยกันเพื่อนำมาใช้เป็น gradient ของสารละลาย Denaturant 40 % และ 50% หลังจากนั้นใช้ชุดอุปกรณ์ของ DCode™ system, Bio-rad . ในการวิเคราะห์ และประกอบชุด gradient เพื่อทำแผ่นเจลสำหรับดีจีจี โดยนำสารละลาย Denaturant ที่เตรียมไว้ 40% และ 50% มาเติมเอพีเอส (10% Ammonium persulfate, APS) ปริมาตร 200  $\mu$ l จากนั้นเติม TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine) 20  $\mu$ l ซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้เจลแข็งตัวต่อจากนั้นนำ Syringe ปริมาตร 30 ml ดูด

สารละลาย Denaturant ทั้งสองชนิดมาบรรจุยังชุดเครื่องมือการทำ gradient ผสมสารละลาย Denaturant ทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันในสัดส่วนตั้งแต่ 0-100% จะทำให้เกิดอะครีลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้นของยูเรีย Denaturant ตั้งแต่ 40%-50% ระหว่างกระจกทั้งสองแผ่นระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศแล้วทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมงหรือข้ามคืนเพื่อให้เจลแข็งตัว นำชุด gel sandwich ที่ตั้ง comb ออกแล้วใส่ลงไปในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE และปรับปริมาตรด้วยน้ำ (Deionized water: DI) 1000 ml นำ Stock บัฟเฟอร์ TAE 50X ปริมาตร 140 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำ (Deionized water: DI) 6,860 ml ปริมาตร 7 ลิตร จะได้ความเข้มข้น 1 เท่า บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 60 °C แล้วนำตัวอย่าง PCR Product ปริมาณ 2000 ng มาผสมกับสีย้อม 2x Gel loading dry (ประกอบด้วย 2% Bromophenol blue, 2% Xylene cyanol, 100% Glycerol และ Deionized water: DI) โหลกลงในช่องเจล จากนั้น ให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านชุด gel sandwich โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 130 V เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลออกจากกระจกและย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 µg/ml) เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV)

### 3.5.5 การโคลน

#### 3.5.5.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ

ทำการตัดเจลอะกาโรส ตรงบริเวณที่มีส่วนของชิ้น DNA ที่สนใจใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit โดยทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอถ่ายชิ้นเจลลงไปในหลอดขนาด 1.5 ml เติม DF buffer ปริมาตร 500 µl ในที่มีตัวอย่างและผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 55 °C เป็นเวลา 10 นาที จนกระทั่งชิ้นเจลละลาย หลังจากนั้นวาง DF Column ใน Collection tube นำสารเจลที่ละลายแล้วใส่ใน DF Column ปริมาตร 800 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ที่มีส่วนใสและวาง DF Column ใน Collection tube และ เติม Wash Buffer ปริมาตร 600 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ที่มีส่วนใสและประกอบ DF Column ใน Collection tube และ นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ DF Column แห้ง ทำการย้าย DF Column ที่แห้งใส่ในหลอด 1.5 ml เติม Elution Buffer ปริมาตร 20 µl ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จะได้เป็นดีเอ็นเอ ที่บริสุทธิ์ และตรวจสอบ Eluted product โดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ที่ 1.2 % เจล ปริมาตร 40 ml. และทำการ run ที่กระแสไฟฟ้า 100 V. เป็นเวลา 30 นาที



### 3.5.5.2 PCR product ligation

ปฏิกิริยา ligation ในปริมาตร 10  $\mu$ l ประกอบด้วย 2X Rapid ligation buffer, 25 ng pGEM<sup>®</sup> - Easyvector, 3 ยูนิต T4 DNA ligase และ ดีเอ็นเอ 3.5  $\mu$ l บ่มที่ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบ ligation product โดยใช้เทคนิค พีซีอาร์ ปริมาตร 20  $\mu$ l ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM dNTPs, 0.1  $\mu$ M ไพร์เมอร์ (pUC1: 5'-TTCGGCTCGTATGTTGTGTGGA-3' และ pUC2: 5'-GTGGTGCAAGGCGATTAAGTTGG-3') ,ligation product 1  $\mu$ l และ 0.5U Tag DNA polymerase จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรมอุณหภูมิดังนี้ Initial denaturation 94 °C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย 35 รอบของ Denatuation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, Annealing ที่ 50 °C 1 นาที Extension ที่ 72 °C 1.30 นาที และจบด้วย Final Extension 72 °C เป็นเวลา 7 นาที และ ตรวจสอบ โดยวิธี Agarose gel electrophoresis ใช้ 1.2 °C เจล ปริมาตร 40 ml. และทำการ run ที่กระแสไฟฟ้า 100 V. เป็นเวลา 30 นาที

### 3.5.6 การเตรียม competent cell

นำแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM 109 มา streak บนอาหาร LB Agar เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 - 16 ชั่วโมงถ่ายเชื้อแบคทีเรียมา 1 โคโลนีไปเลี้ยงต่อในอาหาร LB Broth ปริมาตร 5 ml บ่มเชื้อใน shaking incubator ที่ 250 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 - 16 ชั่วโมง เติมแบคทีเรียที่บ่ม 1 ml ลงในอาหาร LB Broth ปริมาตร 100 ml นำมาบ่มใน shaking incubator ที่ 250 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 - 3 ชั่วโมง เมื่อเชื้ออยู่ในระยะ Log phase นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm มีค่าอยู่ในช่วง 0.4 - 0.6 โดยทำการวัดค่าดูดกลืนแสงทุกๆ 1 ชั่วโมง (โดยจะใช้เวลาประมาณ 2.3 ชั่วโมง) นำเซลล์ที่กำลังเติบโตใส่ลงในหลอดทดลองปริมาตร 50 ml บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C หลังจากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนแบคทีเรียด้วยสารละลาย MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub> (80 mM MgCl<sub>2</sub> และ 20 mM CaCl<sub>2</sub>) ที่เย็นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ และบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 45 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วทำให้ตะกอนแห้ง และเติม 0.1 M CaCl<sub>2</sub> (15% กลีเซอรอล) ที่แช่เย็นปริมาตร 2 ml ในหลอดทดลองขนาด 50 ml ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลงเบาๆ หลังจากนั้นแบ่ง competent cell ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดละ 100  $\mu$ l และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อใช้ในขั้นต่อไป

### 3.5.7 การขนส่งยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยความร้อน (Transformation)

นำ Competent cell สายพันธุ์ *E. coli* JM 109 บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 4 นาที เติม ligation product ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เบบี้ บ่มต่อบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการกระตุ้นด้วยความร้อนโดยบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นบ่มในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2-5 นาที ดูดเซลล์ทั้งหมดลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ (Culture Tube) ที่มี SOC medium ปริมาตร 1 ml นำไปเขย่าเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้เทลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสด้านบนออกให้เหลือส่วนใสและตะกอนไว้ประมาณ 200 µl ดูดอาหารขึ้นลงเพื่อทำให้ตะกอนเซลล์กระจายตัว จากนั้น Spread ลงบนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลิน (50 µg/ml Ampicilin), 20 µg/ml IPTG (Isopropylthiogalactoside) และ 20 µg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ผสมอยู่ด้วย หลังจากนั้นพันขอบของจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม (Parafilm) และนำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 -16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วนำเชื้อมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

### 3.5.8 การตรวจสอบโคลนนิ่งของแบคทีเรียที่มีขึ้นยีนด้วยวิธี Colony PCR

ทำการคัดเลือกโคลนนิ่งสีขาวขีตลงบนจานเพาะเชื้อที่ติด Clone Label และมี LB agar, IPTG และ X-Gal อยู่ โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อขีตประมาณ 5 - 10 โคลนนิ่ง พันขอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 - 16 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบโคลนนิ่งของแบคทีเรียที่มีขึ้นยีน โดยการเขี่ยเชื้อที่สนใจลงไปหลอดพีซีอาร์ ปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM dNTPs, 0.1 µM ไพร์เมอร์ (pUC1: 5'TTCGGCTCGTATGTTGTGTGGA-3' และ pUC2: 5'(GTGGTGCAAGGCGATTAAGTTGG-3') และ 0.5U Tag DNA polymerase จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรมอุณหภูมิดังนี้ Initial denaturation 94 °C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย 35 รอบของ Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, Annealing ที่ 50 °C 1 นาที Extension ที่ 72 °C 1.30 นาที และจบด้วย Final Extension 72 °C เป็นเวลา 7 นาที และ ตรวจสอบ Colony PCR โดยวิธี Agarose gel electrophoresis ใช้ 1.2 % เจล ปริมาตร 40 ml. และทำการ run ที่กระแสไฟฟ้า 100 V. เป็นเวลา 30 นาที

### 3.5.9 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

นำ sterile tip ขนาด 200  $\mu$ l เชี่ยเชื้อที่มี insert product ที่ได้จากการทำ Colony PCR ใส่ลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ (Culture Tube) LB broth ปริมาตร 3 ml ผสมกับ 50  $\mu$ g/ml แอมพิซิลิน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ทำการเขย่าเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด HiYield™ Plasmid Mini Kit โดยนำเชื้อที่เลี้ยงมาใส่ในหลอดปริมาตร 1.5 ml หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสด้านบนทิ้ง ชັบบนกระดาษทิชชูให้แห้ง เติม PD1 ปริมาตร 200  $\mu$ l, เติม PD2 ปริมาตร 200  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน และเติม PD3 ปริมาตร 300  $\mu$ l นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่ หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที พร้อมทั้งประกอบ GD คอลัมน์ ดูดส่วนใสส่งไปนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ที่มีส่วนใสด้านล่างคอลัมน์ออก เติม W1 ปริมาตร 400  $\mu$ l หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที และนำส่วนใสด้านล่างทิ้ง เติม wash buffer ปริมาตร 600  $\mu$ l นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที นำส่วนใสด้านล่างทิ้ง และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง หลังจากนั้นย้ายคอลัมน์ใสในหลอดปริมาตร 1.5 ml เติม elution buffer ปริมาตร 40  $\mu$ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที พร้อมทั้งตรวจสอบปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Nano Drop 2000c UV-Vis Spectrophotometers และเก็บตัวอย่างไว้ที่ -20°C

### 3.5.10 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* โดยเตรียมในปริมาตร 12  $\mu$ l ประกอบด้วย 1X restriction buffer (90 mM-Tris-HCl; pH 7.5, 10 mM NaCl and 50 mM MgCl<sub>2</sub>) ปริมาตร 100 ng ของดีเอ็นเอลูกผสม และ 3 U จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง และตรวจผลโดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ที่ 1.2 % เจล ปริมาตร 40 ml. และทำการ run ที่กระแสไฟฟ้า 100 V. เป็นเวลา 30 นาที

### 3.5.11 DNA sequencing analysis

โดยใช้วิธีเอนไซม์ (Enzymatic sequencing) เป็นวิธีของ (Sanger, Nicklen et al. 1977) ส่งวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท มาโครเจน (Macrogen, South Korea)

## 3.6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

โดยใช้ ANOVA Test เพื่อดูความแตกต่างของชุดการทดลองและจัดกลุ่มโดย Duncan's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P \geq 0.05$ )

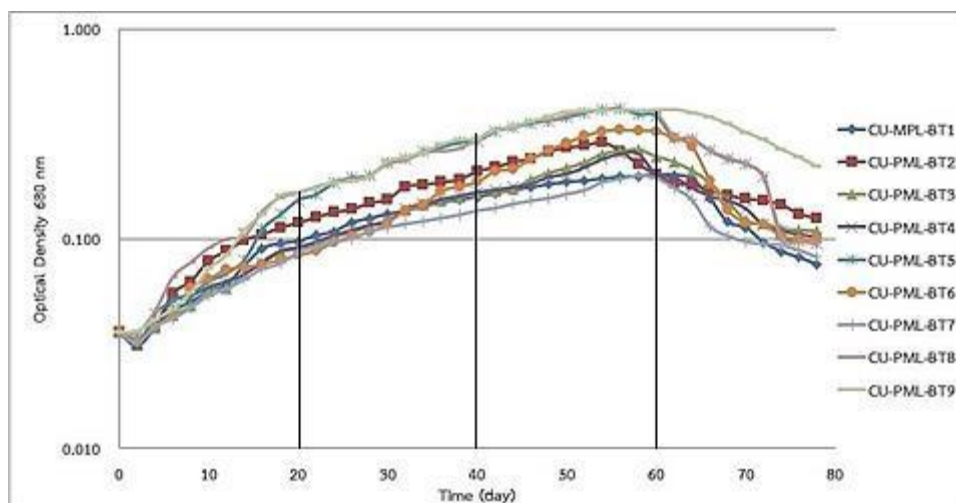
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การเติบโต (Growth characteristic) ของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

จากการศึกษาลักษณะการเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่ง ตัวอย่าง (CU-MPL-BT) จาก 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดมหาสารคาม (CU-MPL-BT1, CU-MPL-BT2), จังหวัดนครปฐม (CU-MPL-BT3, CU-MPL-BT4), ลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ (CU-MPL-BT5), จังหวัดสกลนคร (CU-MPL-BT6), อ่างเก็บน้ำห้วยน้ำหมาาน จังหวัดเลย (CU-MPL-BT7), จังหวัดสุราษฎร์ธานี (CU-MPL-BT8) และ จังหวัดเชียงใหม่ (CU-MPL-BT9) โดยแบ่งการเติบโตเป็น 4 ช่วงรูปที่ 6 ได้แก่ 0-20, 21-40, 41-60 และ 61-78 วันของการเลี้ยง พบว่าในภาพรวมการเติบโตของ *Botryococcus* sp. มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน คือในช่วง 1-20 วันแรกเซลล์มีจำนวนคงที่หรือลดจำนวนลงเล็กน้อย (Lag Phase) หลังจากนั้นเซลล์จะมีการเพิ่มจำนวนขึ้น อย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 20 และมีค่าสัมประสิทธิ์การเติบโต (K) สูงกว่าช่วงระยะเวลาอื่นอย่างเห็นได้ชัดยกเว้น CU-MPL-BT6 ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าในช่วงวันที่ 0-20 ของการเลี้ยงเป็นช่วง Logarithmic Phase (0-20) ส่วนในช่วงวันที่ 21-40 และ 41-60 สาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่างมีอัตราการเติบโตช้าลงอย่างเห็นได้ชัด โดยส่วนใหญ่มีค่าสัมประสิทธิ์การเติบโตในช่วงวันที่ 21-40 ใกล้เคียงกับในช่วงวันที่ 41-60 หรือสูงกว่าเล็กน้อย จึงอาจกล่าวได้ว่าช่วงวันที่ 21-60 ของการเลี้ยง เป็นช่วง Stationary phase เมื่อเลยวันที่ 60 สาหร่ายจากทุกแหล่งจึงลดลงอย่างรวดเร็วและเข้าสู่ Death Phase ดังตารางที่ 4

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การเติบโตในช่วง Logarithmic Phase พบว่าเราสามารถแบ่งกลุ่มสาหร่าย *Botryococcus* sp. จาก 9 แหล่งตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีอัตราการเติบโตเร็ว ( $K > 0.004$ ) ประกอบด้วย CU-MPL-BT9 ( $K > 0.042$ ) และ CU-MPL-BT5 ( $K = 0.040$ ) กลุ่มที่มีอัตราการเติบโตปานกลาง ( $K = 0.04 > 0.03$ ) ประกอบด้วย CU-MPL-BT2 ( $K = 0.036$ ) และ CU-MPL-BT1 ( $K = 0.036$ ) และกลุ่มที่มีอัตราการเติบโตต่ำ ( $K < 0.03$ ) ได้แก่ CU-MPL-BT6 ( $K = 0.023$ ), CU-MPL-BT7 ( $K = 0.023$ ), CU-MPL-BT3 ( $K = 0.025$ ), CU-MPL-BT4 ( $K = 0.026$ ) และ CU-MPL-BT8 ( $K = 0.026$ )



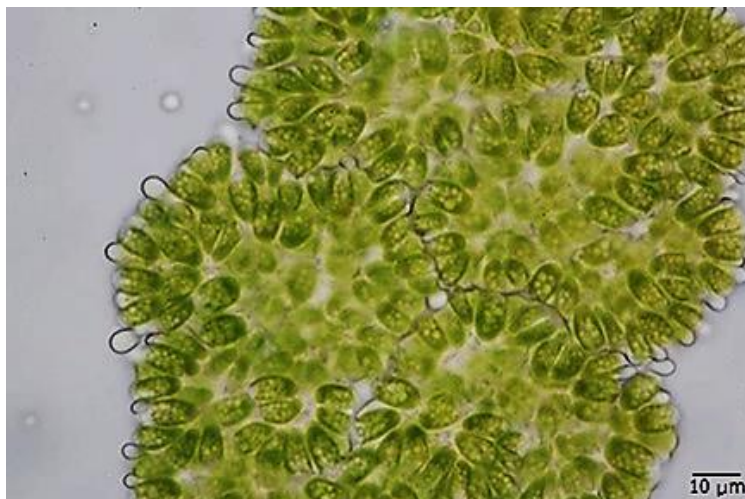
รูปที่ 6 การเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง (CU-MPL-BT) จากสถานที่ต่างๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่ความยาวคลื่น 680 nm ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 78 วัน และเก็บเซลล์ทุกๆ 2 วัน

ตารางที่ 4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การเติบโต (K) ของสาหร่าย *Botryococcus* sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง

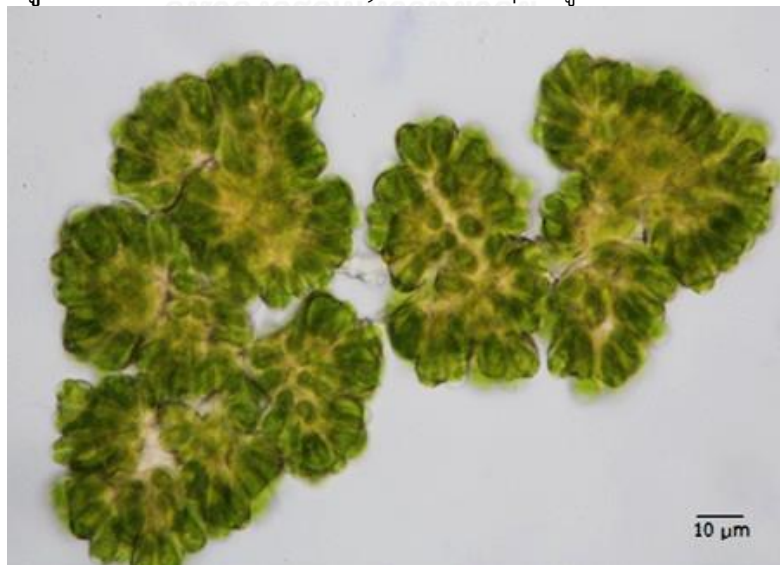
Sample source	สัมประสิทธิ์การเติบโต (K) ในแต่ละช่วง			
	0-20	21-40	41-60	61-78
CU-MPL-BT1	0.030	0.008	0.005	-0.031
CU-MPL-BT2	0.036	0.012	0.004	-0.011
CU-MPL-BT3	0.025	0.014	0.015	-0.023
CU-MPL-BT4	0.026	0.014	0.013	-0.019
CU-MPL-BT5	0.040	0.013	0.007	-0.041
CU-MPL-BT6	0.023	0.020	0.015	-0.037
CU-MPL-BT7	0.023	0.009	0.010	-0.020
CU-MPL-BT8	0.026	0.014	0.013	-0.019
CU-MPL-BT9	0.042	0.015	0.007	-0.018

#### 4.2 ลักษณะทางชีววิทยาของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

เซลล์ของสาหร่าย *Botryococcus* sp. อยู่รวมกันเป็นโคโลนี มีสีเขียว รอบนอกมีเมือกหุ้มมีลักษณะไม่สม่ำเสมอและเมือกทำให้โคโลนีมีขนาดใหญ่ขึ้น ลอยน้ำได้ มีเส้นใยไซโตพลาสซึมเชื่อมระหว่างโคโลนีและมีเมือกช่วยในการยึดเกาะ (รูปที่ 8) เซลล์มีรูปร่างกลมรีหรือคล้ายหยดน้ำ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10  $\mu\text{m}$  (รูปที่ 7-8) มีการสะสมไฮโดรคาร์บอนภายในเซลล์ และเซลล์ของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง ที่ทำการศึกษพบว่าเซลล์มีลักษณะสีเขียวและมีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ในแต่ละแหล่งตัวอย่างดังตารางที่ 4 ซึ่งทั้ง 9 แหล่งตัวอย่างไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) และขนาดโคโลนีของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง ดังตารางที่ 5 พบว่าขนาดโคโลนีของแหล่ง CU-MPL-BT3 มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) กับแหล่ง CU-MPL-BT9



รูปที่ 7 เซลล์ของสาหร่าย *Botryococcus* sp. อยู่รวมกันเป็นโคโลนี



รูปที่ 8 เซลล์ของสาหร่าย *Botryococcus* sp. มีเส้นใยไซโตพลาสซึมเชื่อมระหว่างโคโลนีซึ่งมีเมือกในการยึดเกาะ

ตารางที่ 5 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์สำหรับ *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง

Sample source	เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ ( $\mu\text{m}$ )
CU-MPL-BT1	10.056 $\pm$ 3.07 <sup>a</sup>
CU-MPL-BT2	10.95 $\pm$ 4.23 <sup>a</sup>
CU-MPL-BT3	11.33 $\pm$ 4.29 <sup>a</sup>
CU-MPL-BT4	11.43 $\pm$ 3.48 <sup>a</sup>
CU-MPL-BT5	10.81 $\pm$ 3.15 <sup>a</sup>
CU-MPL-BT6	11.30 $\pm$ 3.88 <sup>a</sup>
CU-MPL-BT7	11.13 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup>
CU-MPL-BT8	10.85 $\pm$ 4.18 <sup>a</sup>
CU-MPL-BT9	11.29 $\pm$ 4.11 <sup>a</sup>

ตารางที่ 6 แสดงขนาดโคโลนีของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง

Sample source	ขนาดความยาวของโคโลนี ( $\mu\text{m}$ )
CU-MPL-BT1	99 $\pm$ 26.7 <sup>ab</sup>
CU-MPL-BT2	96 $\pm$ 25.1 <sup>ab</sup>
CU-MPL-BT3	110 $\pm$ 24.0 <sup>a</sup>
CU-MPL-BT4	103 $\pm$ 27.8 <sup>ab</sup>
CU-MPL-BT5	97 $\pm$ 28.7 <sup>ab</sup>
CU-MPL-BT6	102 $\pm$ 24.4 <sup>ab</sup>
CU-MPL-BT7	101 $\pm$ 26.7 <sup>ab</sup>
CU-MPL-BT8	102 $\pm$ 21.1 <sup>ab</sup>
CU-MPL-BT9	80 $\pm$ 24.0 <sup>b</sup>

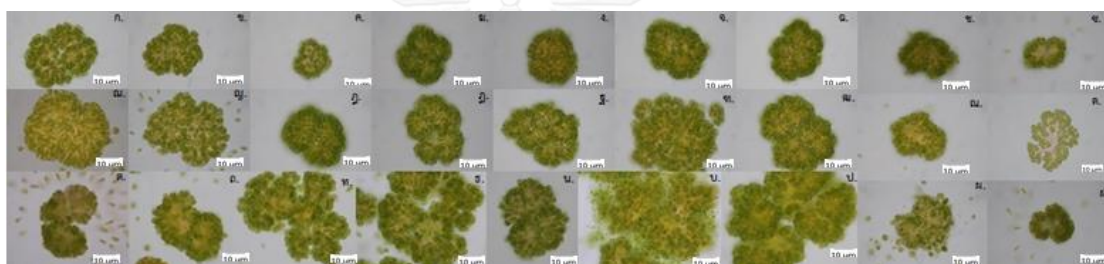
#### 4.3 การสะสมไขมันของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

##### 4.3.1 ตรวจสอบไขมันในสาหร่ายโดยการย้อมสี Nile red

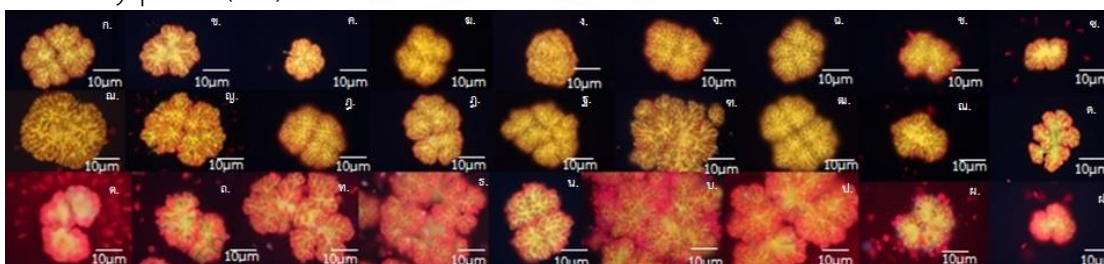
จากการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการสะสมไขมัน ด้วยการย้อมสีแล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าสาหร่าย *Botryococcus* sp. มีการสะสมไขมันเกิดขึ้น จะเห็นว่าเมื่อนำตัวอย่างมาใส่ในสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วกดเบาๆ สาหร่ายชนิดนี้มีการปล่อยไขมันออกมานอกเซลล์ สีเหลืองที่เห็นดังรูปที่ 10 คือสีของไขมันที่สะสมภายในเซลล์ พบว่าสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง มีการสะสมไขมันเกิดขึ้น และมีการสะสมไขมันตั้งแต่วันที่ 0 ของการทดลอง (lag phase) ดังรูปที่ 10 (ก-ข) เมื่อนำมาเปรียบเทียบทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง พบว่าสาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT6 มีปริมาณการสะสมไขมันสูงสุดเท่ากับ 21.42 $\pm$ 1.98 % มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) กับสาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT2, CU-MPL-BT3, CU-MPL-BT5 และ CU-MPL-BT9 ซึ่งมีการสะสมไขมันมากขึ้น



เรื่อยๆ จนเห็นได้ชัดในช่วง Logarithmic Phase ของการทดลอง สังเกตได้จากสีของเซลล์สำหรับราย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ที่มีสีเหลืองเข้มขึ้นอย่างชัดเจน แสดงถึงปริมาณไขมันที่เพิ่มมากขึ้น ดังรูปที่10 (ฉ-ด) และแหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT6 มีปริมาณการสะสมไขมันสูงสุดในช่วง Logarithmic Phase ของการทดลอง เท่ากับ  $28.05 \pm 4.76$  % ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) กับสำหรับราย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT1, CU-MPL-BT2, CU-MPL-BT3, CU-MPL-BT8 และ CU-MPL-BT9 หลังจากนั้นสีของไขมันที่เป็นสีเหลืองจะค่อยๆ จางลง แสดงถึงปริมาณไขมันที่ลดลงในช่วง stationary phase พบว่าแหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT2 มีปริมาณการสะสมไขมันสูงสุดเท่ากับ  $12.28 \pm 2.85$  % มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) กับ CU-MPL-BT1, CU-MPL-BT3 และ CU-MPL-BT5 และบางแหล่งตัวอย่างเซลล์มีการหลุดออกจากโคโลนีไม่มีการเพิ่มจำนวน ดังรูปที่10 (ต-ผ) จากการศึกษาพบว่าปริมาณของไขมันที่ตรวจสอบจากการย้อมสี แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าสำหรับราย *Botryococcus* sp. มีปริมาณการสะสมไขมันของแต่ละแหล่งตัวอย่างไม่เท่ากันดังตารางที่6



รูปที่ 9 สำหรับราย *Botryococcus* sp. 9 แหล่งตัวอย่าง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ส่องด้วยแสงปกติ ประกอบด้วย ช่วง lag phase (ก-ข), Logarithmic Phase (ฉ-ด) และ stationary phase (ต-ผ)



รูปที่ 10 สำหรับราย *Botryococcus* sp. 9 แหล่งตัวอย่าง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ส่องด้วยแสงฟลูออเรสเซนซ์ ประกอบด้วย การสะสมไขมันตั้งแต่วันที่ 0 (lag phase) ของการทดลอง (ก-ข), การสะสมไขมันตั้งแต่วันที่ 20 (Logarithmic Phase) ของการทดลอง (ฉ-ด) และ การสะสมไขมันตั้งแต่วันที่ 54 (stationary phase) ของการทดลอง (ต-ผ)



ตารางที่ 7 ปริมาณการสะสมไขมันของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

Sample source	lag phase(%)	Logarithmic Phase (%)	Stationary Phase (%)
CU-MPL-BT1	17.48±5.20 <sup>ab</sup>	21.61±4.16 <sup>bc</sup>	5.13±1.92 <sup>c</sup>
CU-MPL-BT2	16.68±1.61 <sup>b</sup>	20.23±2.87 <sup>bc</sup>	12.28±2.85 <sup>a</sup>
CU-MPL-BT3	16.61±1.10 <sup>b</sup>	19.66±1.44 <sup>bc</sup>	5.37±4.83 <sup>c</sup>
CU-MPL-BT4	19.93±1.99 <sup>ab</sup>	22.57±1.69 <sup>abc</sup>	8.85±2.64 <sup>abc</sup>
CU-MPL-BT5	16.83±1.31 <sup>b</sup>	25.31±5.68 <sup>ab</sup>	10.60±2.10 <sup>bc</sup>
CU-MPL-BT6	21.42±1.98 <sup>a</sup>	28.05±4.76 <sup>a</sup>	7.13±2.29 <sup>ab</sup>
CU-MPL-BT7	19.94±1.20 <sup>ab</sup>	24.85±1.76 <sup>ab</sup>	8.85±2.64 <sup>abc</sup>
CU-MPL-BT8	19.91±2.40 <sup>ab</sup>	18.51±4.10 <sup>c</sup>	9.11±3.02 <sup>abc</sup>
CU-MPL-BT9	17.26±2.15 <sup>b</sup>	18.18±3.88 <sup>c</sup>	8.85±2.64 <sup>abc</sup>

#### 4.3.2 ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง ด้วยเทคนิคการสกัดไขมันในสารละลายเฮกเซน (Hexane) โดยดัดแปลงจากวิธีของ (Zhang, Wang et al. 2011) พบว่าสาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT5 ให้ปริมาณไขมันสูงที่สุดเท่ากับ 62.26±8.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) กับสาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT1, CU-MPL-BT2, CU-MPL-BT3, CU-MPL-BT4, CU-MPL-BT6, CU-MPL-BT7, CU-MPL-BT8 และ CU-MPL-BT9 โดยใช้ ANOVA Test เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของชุดการทดลองและจัดกลุ่มโดย Duncan's test ในการวิเคราะห์ มีค่าปริมาณไขมันรวม (Lipid content %) ของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณไขมัน (% Lipid content) ของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง

Sample source	Lipid content (%)
CU-MPL-BT1	15.52±3.48 <sup>d</sup>
CU-MPL-BT2	13.86±1.79 <sup>d</sup>
CU-MPL-BT3	34.16±0.08 <sup>c</sup>
CU-MPL-BT4	33.64±0.78 <sup>c</sup>
CU-MPL-BT5	62.26±8.05 <sup>a</sup>
CU-MPL-BT6	51.04±7.22 <sup>b</sup>
CU-MPL-BT7	17.01±4.84 <sup>d</sup>
CU-MPL-BT8	14.05±5.19 <sup>d</sup>
CU-MPL-BT9	2.32±0.77 <sup>e</sup>

#### 4.4 การวิเคราะห์ 18s rRNA gene ของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

งานวิจัยนี้ศึกษาสาหร่าย *Botryococcus* sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง ได้แก่ จังหวัดมหาสารคาม (CU-MPL-BT1, CU-MPL-BT2), จังหวัดนครปฐม (CU-MPL-BT3, CU-MPL-BT4), ลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ (CU-MPL-BT5), จังหวัดสกลนคร (CU-MPL-BT6), อ่างเก็บน้ำห้วยน้ำหมาน จังหวัดเลย (CU-MPL-BT7), จังหวัดสุราษฎร์ธานี (CU-MPL-BT8) และ จังหวัดเชียงใหม่ (CU-MPL-BT9) และทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในแต่ละแหล่ง ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในช่วงสายของ 18S rRNA และจำแนกความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ดีจีจีเอ็ม 3 ขั้นตอนดังนี้

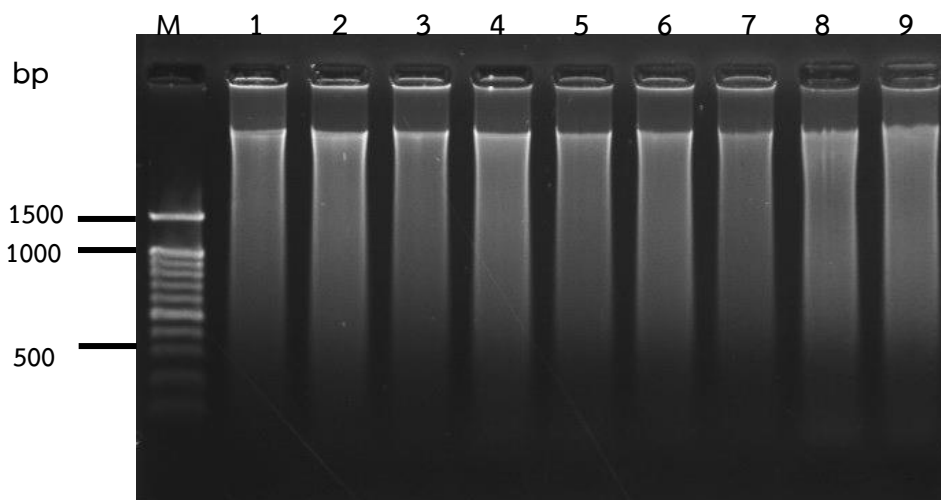
##### 4.4.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของสาหร่าย *Botryococcus* sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง ด้วยเทคนิค CTAB:Chloroform:Isoamyl โดยตรวจสอบผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Nano Drop 2000 UV-Vis Spectrophotometers (Thermo Scientific, U.S.A.) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm มีค่า 1.61-1.80 พบว่าปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก สาหร่าย *Botryococcus* sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง ดังตาราง 8 และภาพที่ 11

**ตารางที่ 9** ค่าการดูดกลืนแสง ปริมาณ และคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสาหร่าย *Botryococcus* sp. ด้วยเครื่อง Nano Drop 2000 UV-Vis Spectrophotometers (Thermo Scientific, U.S.A.)

ลำดับที่	Sample ID	ปริมาณ DNA (ng/ $\mu$ l)	ค่าการดูดกลืนแสง		คุณภาพ DNA (OD <sub>260/280</sub> nm)
			260 nm	280 nm	
1	CU-MPL-BT1	375.1	7.501	4.416	1.70
2	CU-MPL-BT2	398.9	7.978	4.779	1.67
3	CU-MPL-BT3	436.1	8.722	5.425	1.61
4	CU-MPL-BT4	357.2	7.144	3.966	1.80
5	CU-MPL-BT5	342.3	6.846	4.079	1.68
6	CU-MPL-BT6	429.5	8.589	5.176	1.66
7	CU-MPL-BT7	368.2	7.364	4.381	1.68
8	CU-MPL-BT8	326.2	6.523	3.680	1.77
9	CU-MPL-BT9	464.7	9.295	5.236	1.78

คุณภาพและปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากสาหร่าย *Botryococcus* sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง ที่ตรวจด้วยเครื่อง Spectrophotometers แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm. ต่อความยาวคลื่น 280 nm ดังตาราง



รูปที่ 11 รูปแบบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากสาหร่าย *Botryococcus* sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่ง ตัวอย่าง หลังทำการอิเล็กโทรโฟรีซิสผ่านวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 % เป็นเวลา 30 นาที และ กระแสไฟฟ้า 100 V.

Lane M = 100 bp DNA ladder

Lane 1 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT1

Lane 2 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT2

Lane 3 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT3

Lane 4 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT4

Lane 5 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT5

Lane 6 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT6

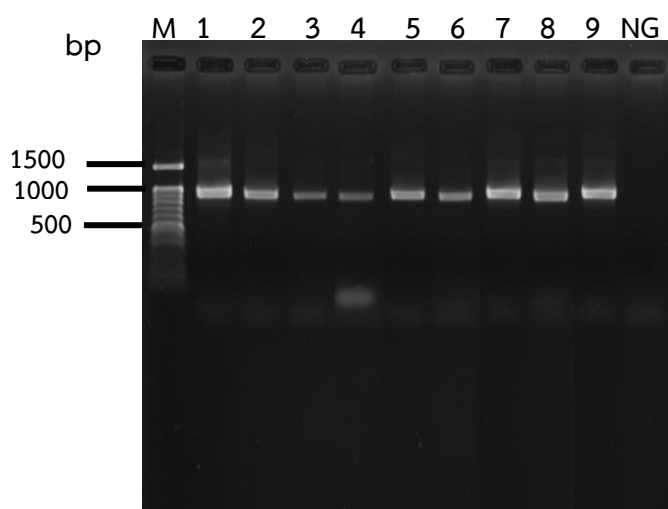
Lane 7 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT7

Lane 8 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT8

Lane 9 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT9

#### 4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction : (PCR)

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 18S-F และ ไพรเมอร์ 18S-R ขนาด 972 bp (ตารางที่3) (รูปที่ 12)



**รูปที่ 12** รูปแบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 18S-F และ ไพรเมอร์ 18S-R จากสาหร่าย *Botryococcus* sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง หลังทำการอิเล็กโทรโฟรีซิสผ่านวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 1.2 %, เป็นเวลา30 นาที และกระแสไฟฟ้า 100 V.

Lane M = 100 bp DNA ladder

Lane 1 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT1

Lane 2 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT2

Lane 3 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT3

Lane 4 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT4

Lane 5 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT5

Lane 6 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT6

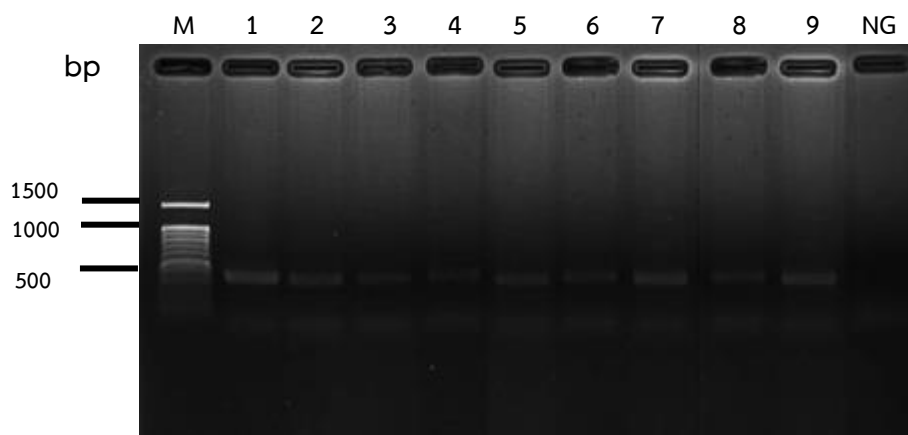
Lane 7 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT7

Lane 8 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT8

Lane 9 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT9

#### 4.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction : (PCR)

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ GC-Chlo-165F และไพรเมอร์ Chlo-595R ขนาด 411 bp (ตารางที่3) (ภาพที่ 13)



**รูปที่ 13** รูปแบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ GC-Chlo-165F และไพรเมอร์ Chlo-595R ขนาด 411 bp จากสาหร่าย *Botryococcus* sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง หลังทำการอิเล็กโตรโฟรีซิสผ่านวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 %, เป็นเวลา 30 นาที และกระแสไฟฟ้า 100 V.

Lane M = 100 bp DNA ladder

Lane 1 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT1

Lane 2 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT2

Lane 3 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT3

Lane 4 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT4

Lane 5 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT5

Lane 6 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT6

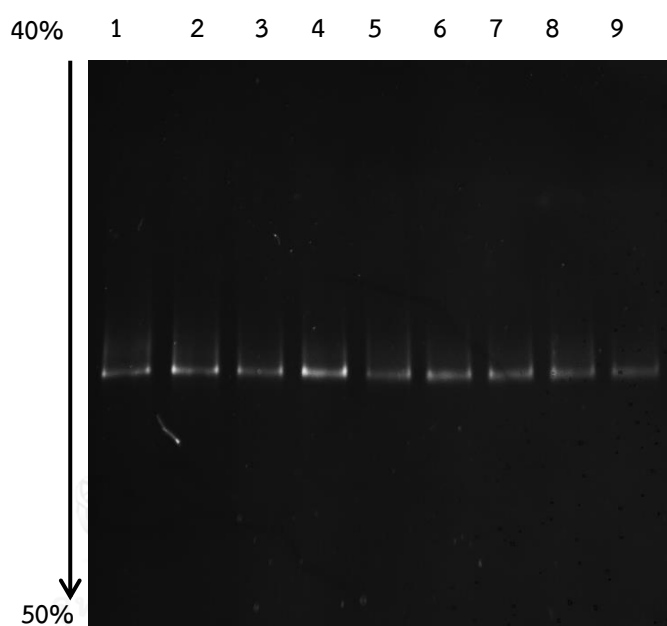
Lane 7 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT7

Lane 8 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT8

Lane 9 = สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT9

#### 4.4.4. การวิเคราะห์สายห่ายโดยใช้เทคนิคดีจีจีอี (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis)

ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสายห่ายโดยใช้เทคนิคดีจีจีอี (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis) นำมาใช้ในการศึกษาประชากรของสายห่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดีจีจีอีในโพลีอะครีลาไมด์เจล 8% ที่มีสารละลาย Denaturant 40-50 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 1 แถบ ในแต่ละแหล่งตัวอย่างของสายห่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่ง (ภาพที่ 14)



**รูปที่ 14** การเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนแผ่น DGGE gel ความเข้มข้นอะครีลาไมด์เจล 8% และความเข้มข้นของ Denaturant solution 40-50 %

- Lane 1 PCR product ของ สายห่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT1
- Lane 2 PCR product ของ สายห่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT2
- Lane 3 PCR product ของ สายห่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT3
- Lane 4 PCR product ของ สายห่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT4
- Lane 5 PCR product ของ สายห่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT5
- Lane 6 PCR product ของ สายห่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT6
- Lane 7 PCR product ของ สายห่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT7
- Lane 8 PCR product ของ สายห่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT8
- Lane 9 PCR product ของ สายห่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT9

#### 4.4.5 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอทั้ง 9 แถบ

จากการนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 18s rRNA gene ขนาด 972 bp ดังรูปที่ 15 และ 411 bp ดังรูปที่ 16 ของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง มาเปรียบเทียบความเหมือน (Multiple sequence alignment) ได้แก่ สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT1, CU-MPL-BT2, CU-MPL-BT3, CU-MPL-BT4, CU-MPL-BT5, CU-MPL-BT6, CU-MPL-BT7, CU-MPL-BT8 และ CU-MPL-BT9 ผลที่ได้พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งต่างกัน และจากค่า Identity ตารางที่ 9 (972bp) และตารางที่ 10 (411bp) มีค่าความเหมือนกันมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 7 แหล่งตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย สาหร่ายแหล่ง CU-MPL-BT1- CU-MPL-BT7 แต่สาหร่ายแหล่ง CU-MPL-BT8 และ CU-MPL-BT9 มีความเหมือนกันน้อยกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 9 (972bp) และตารางที่ 10 (411bp)



CU-MPL-BT1 CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC  
 CU-MPL-BT2 CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC  
 CU-MPL-BT3 CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC  
 CU-MPL-BT4 CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC  
 CU-MPL-BT5 CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC  
 CU-MPL-BT6 CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC  
 CU-MPL-BT7 CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC  
 CU-MPL-BT8 CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACC-TCTTAC  
 CU-MPL-BT9 CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTTTT-TGCTAC  
 \*\*\*\*\* \* \*\*

CU-MPL-BT1 TCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA  
 CU-MPL-BT2 TCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA  
 CU-MPL-BT3 TCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA  
 CU-MPL-BT4 TCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA  
 CU-MPL-BT5 TCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA  
 CU-MPL-BT6 TCAGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA  
 CU-MPL-BT7 TCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA  
 CU-MPL-BT8 TCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGCAAATCCCGACTTATGGAAGGGA  
 CU-MPL-BT9 TTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCATAAAACTTTTTTATTATATGTA  
 \* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \* \* \*

CU-MPL-BT1 CGTATTTA-----TTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC----CTAGCCCG  
 CU-MPL-BT2 CGTATTTA-----TTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC----CTAGCCCG  
 CU-MPL-BT3 CGTATTTA-----TTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC----TCTGCCCG  
 CU-MPL-BT4 CGTATTTA-----TTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC----TCTGCCCG  
 CU-MPL-BT5 CGTATTTA-----TTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC----TCTGCCCG  
 CU-MPL-BT6 CGTATTTA-----TTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC----TCTGCCCG  
 CU-MPL-BT7 CGTATTTA-----TTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC----CTAGCCCG  
 CU-MPL-BT8 CGTATTTA-----TTAGATAAAAAGGCCAGCCGGGC----T-TGCCCG  
 CU-MPL-BT9 AAAGTATGATAGAAGAGGTGATTTATTAGATGGAAACCAATGGCAGGGCAACCTGTTAC  
 \* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \*

CU-MPL-BT1 ACTCTTGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCAT  
 CU-MPL-BT2 ACTCTTGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCAT  
 CU-MPL-BT3 ACTCTTGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCAT  
 CU-MPL-BT4 ACTCTTGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCAT  
 CU-MPL-BT5 GCTCTTGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCAT  
 CU-MPL-BT6 ACTCTTGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCAT  
 CU-MPL-BT7 ACTCTTGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCAT  
 CU-MPL-BT8 ACCCTAGCGAATCATGATAACTTCACGGATCGCATGCCCTCGTGGCGGCGATGTTTCAT  
 CU-MPL-BT9 ACTAATGGTGATTATAATAA-----CTTTCGGATCGATTTGTATAAATCGATGCATCAT  
 \* \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*



CU-MPL-BT1 TCAAATTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGG  
CU-MPL-BT2 TCAAATTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGG  
CU-MPL-BT3 TCAAATTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGG  
CU-MPL-BT4 TCAAATTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGG  
CU-MPL-BT5 TCAAATTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGG  
CU-MPL-BT6 TCAAATTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGG  
CU-MPL-BT7 TCAAATTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGG  
CU-MPL-BT8 TCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGG  
CU-MPL-BT9 TCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGATTGGCCTACCATGGCTTTAACGG  
\*\*\* \*\*

CU-MPL-BT1 GTGACGGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCA  
CU-MPL-BT2 GTGACGGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCA  
CU-MPL-BT3 GTGACGGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCA  
CU-MPL-BT4 GTGACGGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCA  
CU-MPL-BT5 GTGACGGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCA  
CU-MPL-BT6 GTGACGGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCA  
CU-MPL-BT7 GTGACGGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCA  
CU-MPL-BT8 GT-ACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCA  
CU-MPL-BT9 GTAACGGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCA  
\*\* \*\*

CU-MPL-BT1 AGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAAT  
CU-MPL-BT2 AGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAAT  
CU-MPL-BT3 AGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAAT  
CU-MPL-BT4 AGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAAT  
CU-MPL-BT5 AGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAAT  
CU-MPL-BT6 AGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAAT  
CU-MPL-BT7 AGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAAT  
CU-MPL-BT8 AGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAAT  
CU-MPL-BT9 AGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAAT  
\*\*\*\*\* \*\*

CU-MPL-BT1 AACAAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAAC  
CU-MPL-BT2 AACAAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAAC  
CU-MPL-BT3 AACAAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAAC  
CU-MPL-BT4 AACAAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAAC  
CU-MPL-BT5 AACAAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAAC  
CU-MPL-BT6 AACAAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAAC  
CU-MPL-BT7 AACAAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAAC  
CU-MPL-BT8 AACAAATCTGGGCA--TTTATGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATGTAATATCTTAAC  
CU-MPL-BT9 AACAAATGCTGGGCTTTTGAAGTCTGGCAATTGGAATGAGAACAATTTAAATCCCTTATC  
\*\*\*\*\* \*\*

CU-MPL-BT1 GAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGC  
CU-MPL-BT2 GAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGC  
CU-MPL-BT3 GAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGC  
CU-MPL-BT4 GAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGC  
CU-MPL-BT5 GAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGC  
CU-MPL-BT6 GAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGC  
CU-MPL-BT7 GAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGC  
CU-MPL-BT8 GAGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGC  
CU-MPL-BT9 GAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGC  
\*\*\* \*\*



CU-MPL - BT1 GTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGGGGCCGGCGG  
 CU-MPL - BT2 GTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGGGGCCGGCGG  
 CU-MPL - BT3 GTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGGGGCCGGCGG  
 CU-MPL - BT4 GTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGGGGCCGGCGG  
 CU-MPL - BT5 GTATATTTAAGCTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGGGGCCGGCGG  
 CU-MPL - BT6 GTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGGGGCCGGCGG  
 CU-MPL - BT7 GTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGGGGCCGGCGG  
 CU-MPL - BT8 GTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGGTGGGGGCCGGCGG  
 CU-MPL - BT9 GTATACTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGATAATGTCATTA  
 \*\*\*\*\*

CU-MPL - BT1 TCCGCCGACTGGTGTGCACTGCCGGGCCCGCCTTGC-----TGCC-GGAGA  
 CU-MPL - BT2 TCCGCCGACTGGTGTGCACTGCCGGGCCCGCCTTGC-----TGCC-GGAGA  
 CU-MPL - BT3 TCCGCCGACTGGTGTGCACTGCCGGGCCCGCCTTGC-----TGCC-GGAGA  
 CU-MPL - BT4 TCCGCCGACTGGTGTGCACTGCCGGGCCCGCCTTGC-----TGCC-GGAGA  
 CU-MPL - BT5 TCCGCCGACTGGTGTGCACTGCCGGGCCCGCCTTGC-----TGCC-GGAGA  
 CU-MPL - BT6 TCCGCCGACTGGTGTGCACTGCCGGGCCCGCCTTGC-----TGCC-GGAGA  
 CU-MPL - BT7 TCCGCCGACTGGTGTGCACTGCCGGGCCCGCCTTGC-----TGCC-GGAGA  
 CU-MPL - BT8 TCTGCCATTGGTATGTAAGTGCCTCGATGCATCTTTC-----TGCT-GGGGA  
 CU-MPL - BT9 TTTTATATGAATAGTTCTTAATTGAATTATTTTCATATAAAACATTATCATCATCGAAAA  
 \* \* \* \* \*

CU-MPL - BT1 TGGGCG-CCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCGGACTCGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATT  
 CU-MPL - BT2 TGGGCG-CCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCGGACTCGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATT  
 CU-MPL - BT3 TGGGAG-CCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCGGACTCGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATT  
 CU-MPL - BT4 TGGGAG-CCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCGGACTCGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATT  
 CU-MPL - BT5 TGGGAG-CCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCGGACTCGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATT  
 CU-MPL - BT6 TGGGAG-CCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCGGACTCGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATT  
 CU-MPL - BT7 TGGGCG-CCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCGGACTCGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATT  
 CU-MPL - BT8 CGAGCT-TCTGGGCTTAGTTGTCTGGGACTCGGAATCAGCGAAGTGACCTTGAGCAAACA  
 CU-MPL - BT9 TATTATATTGGTCATTAATTTGTCTAGTATAAGATTTTGTCAATTTACTGTGAGCAAAAT  
 \* \* \* \* \*

CU-MPL - BT1 AGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTG-AATATGTTAGCATGGAATAACGCGATAGGAC  
 CU-MPL - BT2 AGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTG-AATATGTTAGCATGGAATAACGCGATAGGAC  
 CU-MPL - BT3 AGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTG-AATATGTTAGCATGGAATAACGCGATAGGAC  
 CU-MPL - BT4 AGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTG-AATTTTTTAGCATGGAATCACATGATAGGAC  
 CU-MPL - BT5 AGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTG-AATATGTTAGCATGGAATAACGCGATAGGAC  
 CU-MPL - BT6 AGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTG-AATATGTTAGCATGGAATAACGCGATAGGAC  
 CU-MPL - BT7 AGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTG-AATATGTTAGCATGGAATAACGCGATAGGAC  
 CU-MPL - BT8 AGAGTGTTCAAAGCAAGCCTACGCTCTG-AATTTTTTAGCATGGAATCACATGATAGGAC  
 CU-MPL - BT9 AGAGTGTTCAAAGCAGGCCTAGGCCGTTGAATACATTAGCATGGAATAATAATATAAGAT  
 \*\*\*\*\*

CU-MPL - BT1 TCTGGCCTAT-----CTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTC  
 CU-MPL - BT2 TCTGGCCTAT-----CTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTC  
 CU-MPL - BT3 TCTGGCCTAT-----CTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTC  
 CU-MPL - BT4 TCCGGCCTAT-----CTTGTGGTCTGTAGGACTGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTC  
 CU-MPL - BT5 TCTGGCCTAT-----CTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTC  
 CU-MPL - BT6 TCTGGCCTAT-----CTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTC  
 CU-MPL - BT7 TCTGGCCTAT-----CTTGTGGTCTGTGGGACCGAGTAATGATTAAGAAGGACAGTC  
 CU-MPL - BT8 TCCGGCCTAT-----CTTGTGGTCTGTAGGACTGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTC  
 CU-MPL - BT9 TTTGATATAAATTTTATTTTGGTGTATATATCAAATAATGATTAATAGGGATAGTT  
 \* \* \* \* \*







```

CU-MPL-BT1   ACAATATCGGGGTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACG
CU-MPL-BT2   ACAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACG
CU-MPL-BT3   ACAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACG
CU-MPL-BT4   ACAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACG
CU-MPL-BT5   ACAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACG
CU-MPL-BT6   ACAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACG
CU-MPL-BT7   ACAATATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACG
CU-MPL-BT8   ACAATACTGGGCAT--TTATGCTGGTAATTGGAATGAGTACAATGTAATATCTTAACG
CU-MPL-BT9   ACAATGCTGGGCTTTTGAAAGCTGGCAATTGGAATGAGAACAAATTTAAATCCCTTATCG
**** * * * * *

```

```

CU-MPL-BT1   AGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT
CU-MPL-BT2   AGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT
CU-MPL-BT3   AGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT
CU-MPL-BT4   AGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT
CU-MPL-BT5   AGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT
CU-MPL-BT6   AGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT
CU-MPL-BT7   AGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT
CU-MPL-BT8   AGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT
CU-MPL-BT9   AGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT
** * * * * *

```

รูปที่ 16 ผลการทำ multiple sequence alignment ของสาหร่าย *Botryococcus* sp. 9 แห่ง ตัวอย่างของ 18s rRNA gene ขนาด 411 bp

ตารางที่ 10 แสดง Percent Identity Matrix – created ของ 18s rRNA gene ขนาด 972 bp โดยโปรแกรม Clustal Omega 2.1

แหล่งตัวอย่าง (CU-MPL-BT)	BT1	BT2	BT3	BT4	BT5	BT6	BT7	BT8	BT9
BT1	100.00	99.79	98.28	97.94	98.66	98.87	99.59	88.30	75.44
BT2	99.79	100.00	99.49	98.15	98.87	99.07	99.79	88.41	75.54
BT3	99.28	99.49	100.00	98.46	99.38	99.59	99.28	88.41	75.65
BT4	97.94	98.15	98.46	100.00	97.84	98.04	97.94	89.65	75.34
BT5	98.66	99.87	99.38	97.84	100.00	98.97	98.66	87.89	75.34
BT6	98.87	99.07	99.59	98.04	98.97	100.00	98.87	87.99	75.23
BT7	99.59	99.79	99.28	97.94	98.66	98.87	100.00	88.20	75.54
BT8	88.30	88.41	88.41	89.65	87.89	87.99	88.20	100.00	75.55
BT9	75.44	75.54	75.65	75.34	75.34	75.23	75.54	75.55	100.00



ตารางที่ 11 แสดง Percent Identity Matrix – created ของ 18s rRNA gene ขนาด 411 bp โดยโปรแกรม Clustal Omega 2.1

แหล่งตัวอย่าง (CU-MPL-BT)	BT1	BT2	BT3	BT4	BT5	BT6	BT7	BT8	BT9
BT1	100.00	99.51	98.78	98.54	98.54	98.54	99.51	88.94	79.80
BT2	99.51	100.00	99.27	99.03	99.03	99.03	100.00	89.19	80.05
BT3	98.78	99.27	100.00	99.76	99.76	99.76	99.27	88.94	80.30
BT4	98.54	99.03	99.76	100.00	99.51	99.51	99.03	88.70	80.05
BT5	98.54	99.03	99.76	99.51	100.00	99.51	99.03	88.70	80.05
BT6	98.54	99.03	99.76	99.51	99.51	100.00	99.03	88.70	80.05
BT7	99.51	100.00	99.27	99.03	99.03	99.03	100.00	89.19	80.05
BT8	88.94	89.19	88.94	88.70	88.70	88.70	89.19	100.00	79.85
BT9	79.80	80.05	80.30	80.05	80.05	80.05	80.05	79.85	100.00

#### 4.4.6 ข้อมูลทางพันธุกรรม

##### 4.4.6.1 ผลจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 18s rRNA gene ขนาด 972 bp

พบว่าแถบดีเอ็นเอทั้ง 9 แถบ ที่ศึกษานั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับสาหร่ายสายพันธุ์ *Botryococcus braunii* โดยมีค่า E value เท่ากับ 0.0 และค่า Identities มากกว่า 90% ดังแสดงในรูปที่ 17-23 และอีก 2 แถบดีเอ็นเอที่ศึกษามีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับสาหร่ายสายพันธุ์อื่น คือ *Chlamydomodium starri* และ *Paraphysomonas vestita* ดังแสดงในรูปที่ 24-25

*Botryococcus braunii* strain 3013 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KC438299.1| Length: 2434 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1783 bits(965)	0.0	969/971(99%)	0/971(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC	60		
Sbjct 41	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC	100		
Query 61	TCCGATAACCCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA	120		
Sbjct 101	TCCGATAACCCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA	160		
Query 121	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCCTAGCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAAC	180		
Sbjct 161	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCCTAGCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAAC	220		
Query 181	TGCACGGATCGTACGGGCTTCCCCGGCGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACT	240		
Sbjct 221	TGCACGGATCGTACGGGCTTCCCCGGCGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACT	280		
Query 241	GTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCGA	300		
Sbjct 281	GTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCGA	340		
Query 301	TTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAGGCAAGCAGGCGCGAAA	360		
Sbjct 341	TTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAGGCAAGCAGGCGCGAAA	400		
Query 361	TTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATCGGGTTCTCTAAC	420		
Sbjct 401	TTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATCGGGTTCTCTAAC	460		
Query 421	TCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGT	480		
Sbjct 461	TCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGT	520		
Query 481	CTGGTGCCAGCAGCCCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTT	540		
Sbjct 521	CTGGTGCCAGCAGCCCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTT	580		
Query 541	AAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGCCGGCGGTCCGCCGACTGGTGTGCACTGC	600		
Sbjct 581	AAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGCCGGCGGTCCGCCGACTGGTGTGCACTGC	640		
Query 601	CGGGCCCCGCTTGTGCTGCCGGAGATGGCGCCTGGGCTTCTGCTGTCCGGGCCCCGGACTC	660		
Sbjct 641	CGGGCCCCGCTTGTGCTGCCGGAGATGGCGCCTGGGCTTCTGCTGTCCGGGCCCCGGACTC	700		
Query 661	GGCGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTACGCTCTGAATATGTTA	720		
Sbjct 701	GGCGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTACGCTCTGAATATGTTA	760		
Query 721	GCATGGAATAACGCGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAATG	780		
Sbjct 761	GCATGGAATAACGCGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAATG	820		
Query 781	ATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCTGATTTTATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTT	840		
Sbjct 821	ATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCTGATTTTATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTT	880		
Query 841	ATGAAAGACGGACTACTGCGAAAGCATTGGCCAAGGATGTTTTTATTAAATCAAGAACGAA	900		
Sbjct 881	ATGAAAGACGGACTACTGCGAAAGCATTGGCCAAGGATGTTTTTATTAAATCAAGAACGAA	940		
Query 901	AGTTGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACT	960		
Sbjct 941	AGTTGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACT	1000		
Query 961	AGGGATTGGAG	971		
Sbjct 1001	AGGGATTGGAG	1011		

รูปที่ 17 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT1 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*

*Botryococcus braunii* strain 3013 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KC438299.1|Length: 2434Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1794 bits(971)	0.0	971/971(100%)	0/971(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGTGAAACTGCCAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC	60		
Sbjct 41	CTGTGAAACTGCCAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC	100		
Query 61	TCCGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA	120		
Sbjct 101	TCCGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA	160		
Query 121	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCTAGCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAAC	180		
Sbjct 161	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCTAGCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAAC	220		
Query 181	TGCACGGATCGCACGGGCTTGCCCGGGCGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACT	240		
Sbjct 221	TGCACGGATCGCACGGGCTTGCCCGGGCGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACT	280		
Query 241	GTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCGA	300		
Sbjct 281	GTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCGA	340		
Query 301	TTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCCGCGCAA	360		
Sbjct 341	TTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCCGCGCAA	400		
Query 361	TTACCCAACTCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATCGGGGTTTCTAAAC	420		
Sbjct 401	TTACCCAACTCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATCGGGGTTTCTAAAC	460		
Query 421	TCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGT	480		
Sbjct 461	TCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGT	520		
Query 481	CTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTT	540		
Sbjct 521	CTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTT	580		
Query 541	AAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGCCGGCGGTCCGCCACTGGTGTGCACTGC	600		
Sbjct 581	AAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGCCGGCGGTCCGCCACTGGTGTGCACTGC	640		
Query 601	CGGGCCCCGCCTTGCTGCCGGAGATGGCGCCTGGGCTTCGCTGTCCGGCCCCGGACTC	660		
Sbjct 641	CGGGCCCCGCCTTGCTGCCGGAGATGGCGCCTGGGCTTCGCTGTCCGGCCCCGGACTC	700		
Query 661	GGCGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCCTACGCTCTGAATATGTTA	720		
Sbjct 701	GGCGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCCTACGCTCTGAATATGTTA	760		
Query 721	GCATGGAATAACCGGATAGGACTCTGGCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAATG	780		
Sbjct 761	GCATGGAATAACCGGATAGGACTCTGGCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAATG	820		
Query 781	ATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCTGATTTTCATTGTGAGAGGTGAAATTTCTGGATTT	840		
Sbjct 821	ATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCTGATTTTCATTGTGAGAGGTGAAATTTCTGGATTT	880		
Query 841	ATGAAAGACGGACTACTGCGAAAGCATTGCCAAAGGATGTTTTTCATTAAATCAAGAACGAA	900		
Sbjct 881	ATGAAAGACGGACTACTGCGAAAGCATTGCCAAAGGATGTTTTTCATTAAATCAAGAACGAA	940		
Query 901	AGTTGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACT	960		
Sbjct 941	AGTTGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACT	1000		
Query 961	AGGGATTGGAG	971		
Sbjct 1001	AGGGATTGGAG	1011		

รูปที่ 18 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT2 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*



*Botryococcus braunii* gene for 18S rRNA, partial sequence, isolate: Ba10  
 Sequence ID: dbj|AB901105.1|Length: 1710Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1777 bits(962)	0.0	969/972(99%)	2/972(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC	60		
Sbjct 33	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC	92		
Query 61	TCCGATAAACCGTAGTAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAAGGGA	120		
Sbjct 93	TCCGATAAACCGTAGTAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAAGGGA	152		
Query 121	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCTCT-GCCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAA	179		
Sbjct 153	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC-CTAGCCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAA	211		
Query 180	CTCGACGGATCGCACGGGCTTCCCCGGCGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAAC	239		
Sbjct 212	CTCGACGGATCGCACGGGCTTCCCCGGCGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAAC	271		
Query 240	TGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTTCG	299		
Sbjct 272	TGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTTCG	331		
Query 300	ATTCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA	359		
Sbjct 332	ATTCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA	391		
Query 360	ATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATCGGGGTTTCTAAA	419		
Sbjct 392	ATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATCGGGGTTTCTAAA	451		
Query 420	CTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAG	479		
Sbjct 452	CTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAG	511		
Query 480	TCTGGTGCCAGCAGCCCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGT	539		
Sbjct 512	TCTGGTGCCAGCAGCCCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGT	571		
Query 540	TAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGGCCGGCGGTCGGCCGACTGGTGTGCACTG	599		
Sbjct 572	TAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGGCCGGCGGTCGGCCGACTGGTGTGCACTG	631		
Query 600	CCGGGCCCCGCTTGTGCTGCCGAGATGGGAGCCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCCGGACT	659		
Sbjct 632	CCGGGCCCCGCTTGTGCTGCCGAGATGGGAGCCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCCGGACT	691		
Query 660	CGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATATGTT	719		
Sbjct 692	CGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATATGTT	751		
Query 720	AGCATGGAATAACGCGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAAT	779		
Sbjct 752	AGCATGGAATAACGCGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAAT	811		
Query 780	GATTAAGAGGGACAGTCGGGGCATTCTGATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATT	839		
Sbjct 812	GATTAAGAGGGACAGTCGGGGCATTCTGATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATT	871		
Query 840	TATGAAAGACGGACTACTGCGAAAGCATTGGCCAAGGATGTTTTCGTTAATCAAGAACGA	899		
Sbjct 872	TATGAAAGACGGACTACTGCGAAAGCATTGGCCAAGGATGTTTTCGTTAATCAAGAACGA	931		
Query 900	AAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGAC	959		
Sbjct 932	AAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGAC	991		
Query 960	TAGGGATTGGAG	971		
Sbjct 992	TAGGGATTGGAG	1003		

รูปที่ 19 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT3 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*

*Botryococcus braunii* gene for 18S rRNA, partial sequence, isolate: Ba10

Sequence ID: dbj|AB901105.1|Length: 1710Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1705 bits(923)	0.0	956/972(98%)	2/972(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC	60		
Sbjct 33	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC	92		
Query 61	TCGGATAACCGTAGTAATTCAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA	120		
Sbjct 93	TCGGATAACCGTAGTAATTCAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA	152		
Query 121	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCTCT-GCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAA	179		
Sbjct 153	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC-CTAGCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAA	211		
Query 180	CTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCGGGCGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAAC	239		
Sbjct 212	CTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCGGGCGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAAC	271		
Query 240	TGTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTG	299		
Sbjct 272	TGTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTG	331		
Query 300	ATTCGGAGAGGGCGCTGAGAGACGGCGACCAATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA	359		
Sbjct 332	ATTCGGAGAGGGCGCTGAGAGACGGCGACCAATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA	391		
Query 360	ATTACCCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGGCAATAAATAACAATATCGGGGTTTCTAAA	419		
Sbjct 392	ATTACCCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACATAAATAACAATATCGGGGTTTCTAAA	451		
Query 420	CTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAG	479		
Sbjct 452	CTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAG	511		
Query 480	TCTGGTGCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGT	539		
Sbjct 512	TCTGGTGCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGT	571		
Query 540	TAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGACCGCGGTCCGCGACTGGTGTGCACTG	599		
Sbjct 572	TAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGACCGCGGTCCGCGACTGGTGTGCACTG	631		
Query 600	CCGGGCCCGCCTTGCTGCCGGAGATGGGAGCCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCGGACT	659		
Sbjct 632	CCGGGCCCGCCTTGCTGCCGGAGATGGGAGCCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCGGACT	691		
Query 660	CGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATTTTT	719		
Sbjct 692	CGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATATGTT	751		
Query 720	AGCATGGAATCACATGATAGGACTCCGGCCTATCTTGTGGTCTGTAGGACTGGAGTAAT	779		
Sbjct 752	AGCATGGAATAACCGGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAAT	811		
Query 780	GATTAAGAGGGACAGTCGGGGCATTCTGATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATT	839		
Sbjct 812	GATTAAGAGGGACAGTCGGGGCATTCTGATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATT	871		
Query 840	TATGAAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTATTGATCAAGAACGA	899		
Sbjct 872	TATGAAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTATTGATCAAGAACGA	931		
Query 900	AAGTTGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGAC	959		
Sbjct 932	AAGTTGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGAC	991		
Query 960	TAGGGATTGGAG	971		
Sbjct 992	TAGGGATTGGAG	1003		

รูปที่ 20 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT4 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*



*Botryococcus braunii* gene for 18S rRNA, partial sequence, isolate: Ba10

Sequence ID: dbj|AB901105.1|Length: 1710Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1749 bits(947)	0.0	965/973(99%)	4/973(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC			60
Sbjct 33	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC			92
Query 61	TCGGATAACCGTAGTAATTC TAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCC GACTTCTGGAAAGGA			120
Sbjct 93	TCGGATAACCGTAGTAATTC TAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCC GACTTCTGGAAAGGA			152
Query 121	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCTCT -GCCCGGCTCTTGCTGACTCATGATAA			179
Sbjct 153	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC -CTAGCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAA			211
Query 180	CTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAAC			239
Sbjct 212	CTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAAC			271
Query 240	TGTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCG			299
Sbjct 272	TGTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCG			331
Query 300	ATTCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA			359
Sbjct 332	ATTCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA			391
Query 360	ATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATCGGGGTTTCTAAA			419
Sbjct 392	ATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATCGGGGTTTCTAAA			451
Query 420	CTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAG			479
Sbjct 452	CTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAG			511
Query 480	TCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGCTGTTGCAGT			539
Sbjct 512	TCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGCTGTTGCAGT			571
Query 540	TAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTGCGGTGGGGGCCGGCGGTCCGCCGACTGGTGTGCACCG			599
Sbjct 572	TAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTGCGGTGGGGGCCGGCGGTCCGCCGACTGGTGTGCACCG			631
Query 600	CCGGGCCCGCCTTGGCT -CCGGAGATGGGAGCCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCGGAC			658
Sbjct 632	CCGGGCCCGCCTTGGCT -CTGCCGAGATGGGAGCCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCGGAC			690
Query 659	TCGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCCTACGCTCTGAATATGT			718
Sbjct 691	TCGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCCTACGCTCTGAATATGT			750
Query 719	TAGCATGGAATAACGCGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAA			778
Sbjct 751	TAGCATGGAATAACGCGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAA			810
Query 779	TGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTTCGTATTTCAATTGTGAGAGGTGAAATTTCTGGAT			838
Sbjct 811	TGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTTCGTATTTCAATTGTGAGAGGTGAAATTTCTGGAT			870
Query 839	TTATGAAAACGCGACTACTGCGAAAACATTTGCCAAGGATGTTTTCTGTTAATCAAGAACG			898
Sbjct 871	TTATGAAAACGCGACTACTGCGAAAACATTTGCCAAGGATGTTTTCTGTTAATCAAGAACG			930
Query 899	AAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGA			958
Sbjct 931	AAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGA			990
Query 959	CTAGGGATTGGAG			971
Sbjct 991	CTAGGGATTGGAG			1003

รูปที่ 21 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT5 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*

*Botryococcus braunii* gene for 18S rRNA, partial sequence, isolate: Ba10

Sequence ID: dbj|AB901105.1|Length: 1710Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1755 bits(950)	0.0	965/972(99%)	2/972(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTGTGGATGGTACCTTGCTAC	60		
Sbjct 33	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTGGATGGTACCTTGCTAC	92		
Query 61	TCAGATAACCCGTAGTAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAAGGGA	120		
Sbjct 93	TCGGATAACCCGTAGTAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAAGGGA	152		
Query 121	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCTCT-GCCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAA	179		
Sbjct 153	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC-CTAGCCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAA	211		
Query 180	CTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCTCCGGCGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAAC	239		
Sbjct 212	CTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCTCCGGCGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAAC	271		
Query 240	TGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCG	299		
Sbjct 272	TGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCG	331		
Query 300	ATTCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA	359		
Sbjct 332	ATTCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA	391		
Query 360	ATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATCGGGTTTTCTAAA	419		
Sbjct 392	ATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATCGGGTTTTCTAAA	451		
Query 420	CTCTGATAAATTGGAATGAGTACACTCTAAAATCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAG	479		
Sbjct 452	CTCTGATAAATTGGAATGAGTACAACTCTAAAATCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAG	511		
Query 480	TCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGT	539		
Sbjct 512	TCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGT	571		
Query 540	TAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGCCGGCGGTCGCCGACTGGTGTGCACTG	599		
Sbjct 572	TAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCCGGTGGGGCCGGCGGTCGCCGACTGGTGTGCACTG	631		
Query 600	CCGGGCCCCGCTTGTGCTGCCGAGATGGGAGCCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCCGGACT	659		
Sbjct 632	CCGGGCCCCGCTTGTGCTGCCGAGATGGGAGCCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCCGGACT	691		
Query 660	CGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATATGTT	719		
Sbjct 692	CGGCGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATATGTT	751		
Query 720	AGCATGGAATAACGCGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAAT	779		
Sbjct 752	AGCATGGAATAACGCGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCGGAGTAAT	811		
Query 780	GATTAAGAGGGACAGTCGGGGCATTTCGTATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATT	839		
Sbjct 812	GATTAAGAGGGACAGTCGGGGCATTTCGTATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATT	871		
Query 840	TATGAAAGACGGACTACTGCGAAAGCATTGGCCAAAGGATGTTTTCGTTAATCAAGAACGA	899		
Sbjct 872	TATGAAAGACGGACTACTGCGAAAGCATTGGCCAAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGA	931		
Query 900	AAGTTGGGGGCGCAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGAC	959		
Sbjct 932	AAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGAC	991		
Query 960	TAGGGATTGGAG	971		
Sbjct 992	TAGGGATTGGAG	1003		

รูปที่ 22 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT6 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*



*Botryococcus braunii* strain 3013 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KC438299.1|Length: 2434Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1783 bits(965)	0.0	969/971(99%)	0/971(0%)	Plus/Plus
Query 6	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC	65		
Sbjct 41	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTTGCTAC	100		
Query 66	TCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA	125		
Sbjct 101	TCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA	160		
Query 126	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCCGGGCTAGCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAAC	185		
Sbjct 161	CGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCCGGGCTAGCCCGACTCTTGCTGACTCATGATAAC	220		
Query 186	TCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCGGGGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACT	245		
Sbjct 221	TCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCGGGGACGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACT	280		
Query 246	GTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCGA	305		
Sbjct 281	GTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCGA	340		
Query 306	TTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA	365		
Sbjct 341	TTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA	400		
Query 366	TTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATCGGGGTTTCTAAAC	425		
Sbjct 401	TTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATATCGGGGTTTCTAAAC	460		
Query 426	TCTGATAATTGGAAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGT	485		
Sbjct 461	TCTGATAATTGGAAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGT	520		
Query 486	CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTT	545		
Sbjct 521	CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTT	580		
Query 546	AAAAAGCTCGTAGTTGGATTTGCGGTGGGGGCGGCGGTCCGCCGACTGGTGTGCACTGC	605		
Sbjct 581	AAAAAGCTCGTAGTTGGATTTGCGGTGGGGGCGGCGGTCCGCCGACTGGTGTGCACTGC	640		
Query 606	CGGGCCCCGCCTTGCTGCCGAGATGGGCGCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCCGGACTC	665		
Sbjct 641	CGGGCCCCGCCTTGCTGCCGAGATGGGCGCTGGGCTTCGCTGTCCGGGCCCCGGACTC	700		
Query 666	GGCGTGGTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATATGTTA	725		
Sbjct 701	GGCGTGGTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATATGTTA	760		
Query 726	GCATGGAATAACGCGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCAGAGTAATG	785		
Sbjct 761	GCATGGAATAACGCGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTGGGACCAGAGTAATG	820		
Query 786	ATTAAGAAAGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTT	845		
Sbjct 821	ATTAAGAAAGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTT	880		
Query 846	ATGAAAGACGGACTACTGCGAAAGCATTGGCCAAGGATGTTTTATTAAATCAAGAACGAA	905		
Sbjct 881	ATGAAAGACGGACTACTGCGAAAGCATTGGCCAAGGATGTTTTATTAAATCAAGAACGAA	940		
Query 906	AGTTGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACT	965		
Sbjct 941	AGTTGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACT	1000		
Query 966	AGGGATTGGAG	976		
Sbjct 1001	AGGGATTGGAG	1011		

รูปที่ 23 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT7 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*

*Chlamydomodium starrii* gene for 18S rRNA, partial sequence, strain: SAG 16.87  
 Sequence ID: dbj|AB983625.1|Length: 1744Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1738 bits(941)	0.0	955/962(99%)	0/962(0%)	Plus/Plus
Query 3	GTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTCTTACTCG			62
Sbjct 60	GTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTCTTACTCG			119
Query 63	GATAACCGTAGTAATCTAGAGCTAATACGTGCGCAATCCCAGCTTATGGAAGGGACGT			122
Sbjct 120	GATAACCGTAGTAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCAGCTTATGGAAGGGACGT			179
Query 123	ATTTATTAGATAAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACCCCTAGGCGAATCATGATAAATTCA			182
Sbjct 180	ATTTATTAGATAAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACCCCTAGGCGAATCATGATAAATTCA			239
Query 183	CGGATCGCATGCCCTCGTGGCGGGCATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCG			242
Sbjct 240	CGGATCGCATGCCCTCGTGGCGGGCATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCG			299
Query 243	ATGGTAGGATAGAGGCCCTACCATGGTGGTAACGGGTACGGAGGATTAGGGTTCGATCCG			302
Sbjct 300	ATGGTAGGATAGAGGCCCTACCATGGTGGTAACGGGTACGGAGGATTAGGGTTCGATCCG			359
Query 303	GAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCAGCGCAAAATTACC			362
Sbjct 360	GAGAGGGCGCCTGAGAAACGGCGACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCAGCGCAAAATTACC			419
Query 363	CAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAAATAACAATACTGGGCATTTATGTCTGGTA			422
Sbjct 420	CAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAAATAACAATACTGGGCATTTATGTCTGGTA			479
Query 423	ATTGGAATGAGTACAATGTAATATCTTAACGAGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC			482
Sbjct 480	ATTGGAATGAGTACAATGTAATATCTTAACGAGTATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC			539
Query 483	CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGC			542
Sbjct 540	CAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGC			599
Query 543	TCGTAGTTGGATTTCCGATGTGTTGACGCGGTCTGCCATTGGTATGACTGCGCTCGATG			602
Sbjct 600	TCGTAGTTGGATTTCCGATGTGTTGACGCGGTCTGCCATTGGTATGACTGCGCTCGATG			659
Query 603	CATCTTTCTGCTGGGGACGAGCTTCTGGGCTTAGTTGTCTGGGACTCGGAATCAGCGAAG			662
Sbjct 660	CATCTTTCTGCTGGGGACGAGCTTCTGGGCTTAGTTGTCTGGGACTCGGAATCAGCGAAG			719
Query 663	TGACCTTGAGCAAAACAAGAGTGTTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGAATTTTTAGCATGGA			722
Sbjct 720	TGACCTTGAGCAAAACAAGAGTGTTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGAATTTTTAGCATGGA			779
Query 723	ATCACATGATAGGACTCCGGCCTATCTTGTGGTCTGTAGGACTGGAGTAATGATTAAAGA			782
Sbjct 780	ATCACATGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTAGGACCAGGTAATGATTAAAGA			839
Query 783	GGGACAGTCGGGGGCATTGATTTTCAATGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTTATGAAAG			842
Sbjct 840	GGGACAGTCGGGGGCATTGATTTTCAATGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTTATGAAAG			899
Query 843	ACGAACTTCTGCGAAAGCATTGGCCAAGGATGTTTTCAATTGATCAAGAACGAAAGTTGGG			902
Sbjct 900	ACGAACTTCTGCGAAAGCATTGGCCAAGGATGTTTTCAATTGATCAAGAACGAAAGTTGGG			959
Query 903	GGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATT			962
Sbjct 960	GGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATT			1019
Query 963	GG 964			
Sbjct 1020	GG 1021			

รูปที่ 24 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT8 มีความใกล้เคียงกับ *Chlamydomodium starrii*



*Paraphysomonas vestita* 18S small subunit ribosomal RNA gene, complete sequence

Sequence ID: gb|AF109325.1|Length: 1823Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1849 bits(1001)	0.0	1005/1007(99%)	0/1007(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGTGAAACTGCCAATGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTTTTTGCTACT			60
Sbjct 73	CTGTGAAACTGCCAATGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTTTTTGCTACT			132
Query 61	TGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCATAAAACTTTTTTTATTATATGTAA			120
Sbjct 133	TGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCATAAAACTTTTTTTATTATATGTAA			192
Query 121	AAGTATGATAGAAAGAGGTGTATTTATTAGATGGAAACCAATGGCAGGGCAACCTGTTACA			180
Sbjct 193	AAGTATGATAGAAAGAGGTGTATTTATTAGATGGAAACCAATGGCAGGGCAACCTGTTACA			252
Query 181	CTAATGGTGATTCAATAAATTTTCGGATCGATTTGTATAAATCGATGCATCATTCAAGT			240
Sbjct 253	CTAATGGTGATTCAATAAATTTTCGGATCGATTTGTATAAATCGATGCATCATTCAAGT			312
Query 241	TTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGTATTGGCTACCATGGCTTTAACGGGTAACG			300
Sbjct 313	TTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGTATTGGCTACCATGGCTTTAACGGGTAACG			372
Query 301	GAGAAATTAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAGGAAG			360
Sbjct 373	GAGAAATTAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAGGAAG			432
Query 361	GCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAAT			420
Sbjct 433	GCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAAT			492
Query 421	GCTGGGCTTTTGAAAGTCTGGCAATTGGAAATGAGAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGAT			480
Sbjct 493	GCTGGGCTTTTGAAAGTCTGGCAATTGGAAATGAGAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGAT			552
Query 481	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATAC			540
Sbjct 553	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATAC			612
Query 541	TAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGATAATGTCATTAAATTTTAT			600
Sbjct 613	TAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGATAATGTCATTAAATTTTAT			672
Query 601	ATGAATAGTTCCTAATTGAATTATTTTCATATAAAACATTATCATCATCGAAAATATTAT			660
Sbjct 673	ATGAATAGTTCCTAATTGAATTATTTTCATATAAAACATTATCATCATCGAAAATATTAT			732
Query 661	ATTGGTCATTAATTTGCTAGTATAAGATTTTGTCAATTTACTGTGAGCAAAATAGAGTG			720
Sbjct 733	ATTGGTCATTAATTTGCTAGTATAAGATTTTGTCAATTTACTGTGAGCAAAATAGAGTG			792
Query 721	TTCAAAGCAGGCTTAGGCCGTTGAATACATTAGCATGGAATAATAATAAGATTTTGAT			780
Sbjct 793	TTCAAAGCAGGCTTAGGCCGTTGAATACATTAGCATGGAATAATAATAAGATTTTGAT			852
Query 781	ATAAATTTTATTTTGTGGTTTATATATCAAAATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGT			840
Sbjct 853	ATAAATTTTATTTTGTGGTTTATATATCAAAATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGT			912
Query 841	ATTTGTATTCAATTGTGAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATTGAAAGACAAACTACTGCGAA			900
Sbjct 913	ATTTGTATTCAATTGTGAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATTGAAAGACAAACTACTGCGAA			972
Query 901	AGCATTACCAAGGATGTTTTCTAATAACAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATT			960
Sbjct 973	AGCATTACCAAGGATGTTTTCTAATAACAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATT			1032
Query 961	AGATACCATCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGG 1007			
Sbjct 1033	AGATACCATCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGG 1079			

รูปที่ 25 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT9 มีความใกล้เคียงกับ *Paraphysomonas vestita*

#### 4.4.6.2 ผลจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 18s rRNA gene ขนาด 411 bp

พบว่าแถบดีเอ็นเอทั้ง 9 แถบ ที่ศึกษานั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับสาหร่ายสายพันธุ์ *Botryococcus braunii* โดยมีค่า Evalue เท่ากับ 0.0 และค่า Identities มากกว่า 90% ดังแสดงในรูปที่ 26-32 และอีก 2 แถบดีเอ็นเอที่ศึกษามีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับสาหร่ายสายพันธุ์อื่น คือ *Chlamydomodium starri* และ *Paraphysomonas vestita* ดังแสดงในรูปที่ 33-34

*Botryococcus braunii* culture-collection ANACC:CS-95202 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KP071395.1|Length: 1630Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
749 bits(405)	0.0	409/411(99%)	0/411(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCCTAGCCCCGACTCTT			60
Sbjct 74	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCCTAGCCCCGACTCTT			133
Query 61	GCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGTACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAAAT			120
Sbjct 134	GCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGTACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAAAT			193
Query 121	TTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGACG			180
Sbjct 194	TTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGACG			253
Query 181	GAGAATTAGGGTTCGATTCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAG			240
Sbjct 254	GAGAATTAGGGTTCGATTCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAG			313
Query 241	GCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAAT			300
Sbjct 314	GCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAAT			373
Query 301	ATCGGGTTCCTAAACTCTGATAAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGAT			360
Sbjct 374	ATCGGGTTCCTAAACTCTGATAAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGAT			433
Query 361	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT			411
Sbjct 434	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT			484

รูปที่ 26 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT1 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*



*Botryococcus braunii* culture-collection ANACC:CS-95202 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KP071395.1|Length: 1630Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
760 bits(411)	0.0	411/411(100%)	0/411(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCCTAGCCCGACTCTT	60		
Sbjct 74	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCCTAGCCCGACTCTT	133		
Query 61	GCTGACTCATGATAAAGTACGACGGATCGCACGGGCTTGCCCGGGCGACGTTTCATTCAAAT	120		
Sbjct 134	GCTGACTCATGATAAAGTACGACGGATCGCACGGGCTTGCCCGGGCGACGTTTCATTCAAAT	193		
Query 121	TTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGGGTGACG	180		
Sbjct 194	TTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGGGTGACG	253		
Query 181	GAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAG	240		
Sbjct 254	GAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAG	313		
Query 241	GCAGCAGGGCGCGCAAATTACCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAAT	300		
Sbjct 314	GCAGCAGGGCGCGCAAATTACCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAAT	373		
Query 301	ATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGAT	360		
Sbjct 374	ATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGAT	433		
Query 361	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT	411		
Sbjct 434	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAAT	484		

รูปที่ 27 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT2 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*



*Botryococcus braunii* culture-collection ANACC:CS-95202 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KP071395.1|Length: 1630Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
749 bits(405)	0.0	410/412(99%)	2/412(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCTCT-GCCCCGACTCT			59
Sbjct 74	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC-CTAGCCCCGACTCT			132
Query 60	TGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAAA			119
Sbjct 133	TGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAAA			192
Query 120	TTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGGGTGAC			179
Sbjct 193	TTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGGGTGAC			252
Query 180	GGAGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAA			239
Sbjct 253	GGAGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAA			312
Query 240	GGCAGCAGGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAA			299
Sbjct 313	GGCAGCAGGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAA			372
Query 300	TATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGA			359
Sbjct 373	TATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGA			432
Query 360	TCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCCGGTAATTCAGCTCCAAT			411
Sbjct 433	TCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCCGGTAATTCAGCTCCAAT			484

รูปที่ 28 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT3 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*



*Botryococcus braunii* culture-collection ANACC:CS-95202 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KP071395.1|Length: 1630Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
743 bits(402)	0.0	409/412(99%)	2/412(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCTCT-GCCCCGACTCT			59
Sbjct 74	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC-CTAGCCCCGACTCT			132
Query 60	TGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAA			119
Sbjct 133	TGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAA			192
Query 120	TTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGGGTGAC			179
Sbjct 193	TTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGGGTGAC			252
Query 180	GGAGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAA			239
Sbjct 253	GGAGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAA			312
Query 240	GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGGCAATAAATAACAA			299
Sbjct 313	GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGGCAATAAATAACAA			372
Query 300	TATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGA			359
Sbjct 373	TATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGA			432
Query 360	TCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAAT			411
Sbjct 433	TCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAAT			484

รูปที่ 29 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT4 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*



*Botryococcus braunii* culture-collection ANACC:CS-95202 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KP071395.1|Length: 1630Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
743 bits(402)	0.0	409/412(99%)	2/412(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCCGGCTCT-GCCCCGCTCT	59		
Sbjct 74	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCCGGC-CTAGCCCGACTCT	132		
Query 60	TGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAAA	119		
Sbjct 133	TGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAAA	192		
Query 120	TTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGAC	179		
Sbjct 193	TTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGAC	252		
Query 180	GGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAA	239		
Sbjct 253	GGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAA	312		
Query 240	GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAA	299		
Sbjct 313	GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAA	372		
Query 300	TATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGA	359		
Sbjct 373	TATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGA	432		
Query 360	TCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAAT	411		
Sbjct 433	TCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAAT	484		

รูปที่ 30 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT5 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*





*Botryococcus braunii* culture-collection ANACC:CS-95202 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KP071395.1|Length: 1630Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
743 bits(402)	0.0	409/412(99%)	2/412(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCTCT-GCCCGACTCT			59
Sbjct 74	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGC-CTAGCCCGACTCT			132
Query 60	TGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAA			119
Sbjct 133	TGCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAA			192
Query 120	TTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGAC			179
Sbjct 193	TTTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCTACCATGGTGTTCACGGGTGAC			252
Query 180	GGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAA			239
Sbjct 253	GGAGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAA			312
Query 240	GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAA			299
Sbjct 313	GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAA			372
Query 300	TATCGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACACTCTAAAATCCTTAACGAGGA			359
Sbjct 373	TATCGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGA			432
Query 360	TCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAAT			411
Sbjct 433	TCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAAT			484

รูปที่ 31 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT6 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*

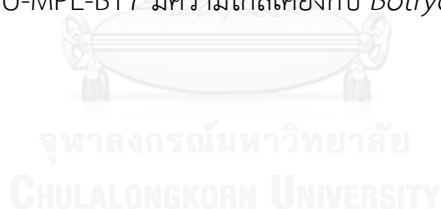


*Botryococcus braunii* culture-collection ANACC:CS-95202 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KP071395.1|Length: 1630Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
760 bits(411)	0.0	411/411(100%)	0/411(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCCTAGCCCGACTCTT			60
Sbjct 74	CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCTGACCGGGCCTAGCCCGACTCTT			133
Query 61	GCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAAAT			120
Sbjct 134	GCTGACTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGGCTTGCCCCGGCGACGTTTCATTCAAAT			193
Query 121	TTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGGGTGACG			180
Sbjct 194	TTCTGCCCTATCAACTGTCGATGGTACGGTAGTGGCCTACCATGGTGTTCACGGGTGACG			253
Query 181	GAGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAG			240
Sbjct 254	GAGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAG			313
Query 241	GCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAATAAATAACAAT			300
Sbjct 314	GCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAATAAATAACAAT			373
Query 301	ATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGAT			360
Sbjct 374	ATCGGGGTTTCTAAACTCTGATAATTGGAATGAGTACAATCTAAAATCCTTAACGAGGAT			433
Query 361	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAAT			411
Sbjct 434	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAAT			484

รูปที่ 32 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT7 มีความใกล้เคียงกับ *Botryococcus braunii*



*Chlamydomodium starrii* gene for 18S rRNA, partial sequence, strain: SAG 16.87  
 Sequence ID: dbj|AB983625.1|Length: 1744Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
747 bits(404)	0.0	406/407(99%)	0/407(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGACTTATGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACCCCTAG	60		
Sbjct 161	CGACTTATGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAAGGCCAGCCGGGCTTGCCCGACCCCTAG	220		
Query 61	GCGAATCATGATAACTTCACGGATCGCATGCCCTCGTGGCGGCGATGTTTCATTCAAATT	120		
Sbjct 221	GCGAATCATGATAACTTCACGGATCGCATGCCCTCGTGGCGGCGATGTTTCATTCAAATT	280		
Query 121	TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCACCATGGTGGTAACGGGTACGGGA	180		
Sbjct 281	TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCACCATGGTGGTAACGGGTACGGGA	340		
Query 181	GGATTAGGGTTCGATTCGGAGAGGGCGCCTGAGAGACGGCGACCACATCCAAGGAAGGC	240		
Sbjct 341	GGATTAGGGTTCGATTCGGAGAGGGCGCCTGAGAAACGGCGACCACATCCAAGGAAGGC	400		
Query 241	AGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATAC	300		
Sbjct 401	AGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATAC	460		
Query 301	TGGGCATTTATGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATGTAAATATCTTAACGAGTATCCAT	360		
Sbjct 461	TGGGCATTTATGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATGTAAATATCTTAACGAGTATCCAT	520		
Query 361	TGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCCGGTAATTCAGCTCCAAT	407		
Sbjct 521	TGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCCGGTAATTCAGCTCCAAT	567		

รูปที่ 33 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT8 มีความใกล้เคียงกับ *Chlamydomodium starrii*



*Paraphysomonas vestita* isolate J1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|GU220392.1|Length: 1879Number of Matches: 1

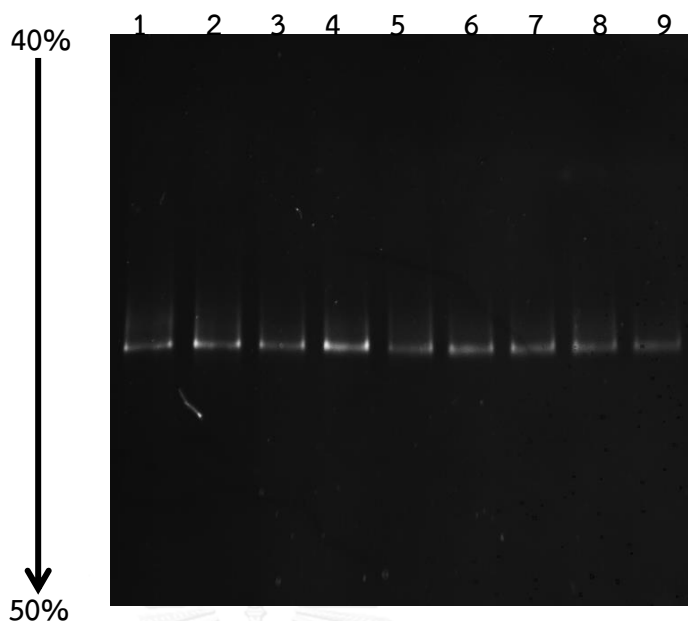
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
976 bits(528)	0.0	530/531(99%)	0/531(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTTTTTGTACT	60		
Sbjct 18	CTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTTTTTGTACT	77		
Query 61	TGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCATAAAACtttttttTATTATATGTAA	120		
Sbjct 78	TGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCATAAAACTTTTTTTATTATATGTAA	137		
Query 121	AAGTATGATAGAAGAGGTGTATTTATTAGATGGAAACCAATGGCAGGGCAACCTGTTACA	180		
Sbjct 138	AAGTATGATAGAAGAGGTGTATTTATTAGATGGAAACCAATGGCAGGGCAACCTGTTACA	197		
Query 181	CTAATGGTGATTCATAAATACTTTCCGGATCGATTTGTATAAATCGATGCATCATTCAAGT	240		
Sbjct 198	CTAATGGTGATTCATAAATACTTTCCGGATCGATTTGTATAAATCGATGCATCATTCAAGT	257		
Query 241	TTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGTATTGGCCTACCATGGCTTTAACGGGTAACG	300		
Sbjct 258	TTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGTATTGGCCTACCATGGCTTTAACGGGTAACG	317		
Query 301	GAGAATTAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAG	360		
Sbjct 318	GAGAATTAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAG	377		
Query 361	GCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAAT	420		
Sbjct 378	GCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAAT	437		
Query 421	GCTGGGCTTTTGAAAGTCTGGCAATTGGAATGAGAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGAT	480		
Sbjct 438	GCTGGGCTTTTGAAAGTCTGGCAATTGGAATGAGAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGAT	497		
Query 481	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAAT	531		
Sbjct 498	CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAAT	548		

รูปที่ 34 แหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT9 มีความใกล้เคียงกับ *Paraphysomonas vestita*

4.4.7 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสาหร่ายโดยใช้เทคนิคดีจีจีอี (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis)

วิเคราะห์ดีเอ็นเอของสาหร่ายโดยใช้เทคนิคดีจีจีอี (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis) สาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดีจีจีอีในโพลีอะครีลาไมด์เจล 8% ที่มีสารละลาย Denaturant 40-50 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 1 แถบ ในแต่ละแหล่งตัวอย่างของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง (ภาพที่ 35)



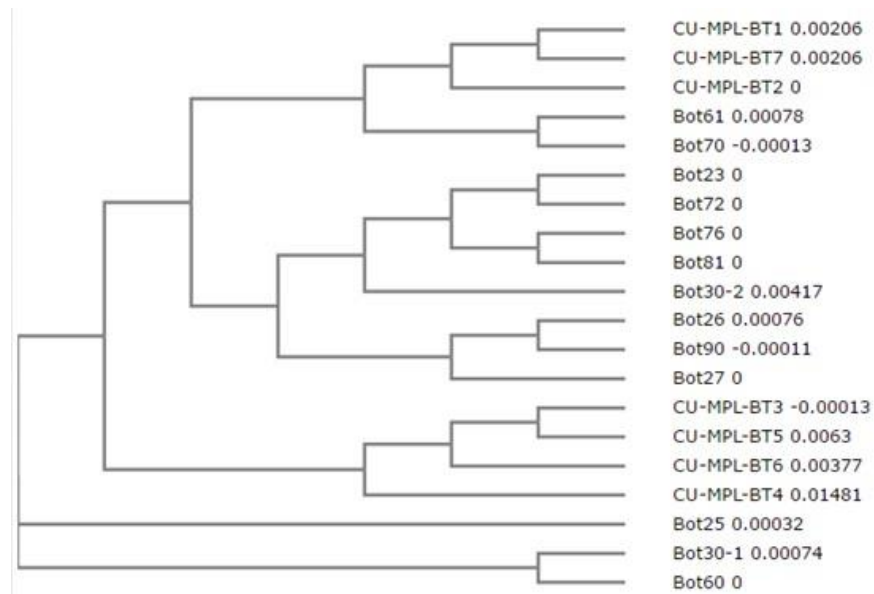


รูปที่ 35 การเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนแผ่น DGGG gel ความเข้มข้นโพลีอะคริลาไมด์เจล 8% และความเข้มข้นของ Denaturant solution 40-50 %

- Lane 1 PCR product ของ สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT1
- Lane 2 PCR product ของ สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT2
- Lane 3 PCR product ของ สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT3
- Lane 4 PCR product ของ สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT4
- Lane 5 PCR product ของ สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT5
- Lane 6 PCR product ของ สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT6
- Lane 7 PCR product ของ สาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT7
- Lane 8 PCR product ของ *Chlamydomodium starrii* แหล่ง CU-MPL-BT8
- Lane 9 PCR product ของ *Paraphysomonas vestita* แหล่ง CU-MPL-BT9

#### 4.4.8 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสาหร่าย *Botryococcus braunii* โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI และ (Kawachi, Tanoi et al. 2012) ด้วยเทคนิค Neighbor-joining tree พบว่าสามารถจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ดังรูปที่ 36



รูปที่ 36 Phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18s rRNA gene

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการศึกษา สรุปลผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 ลักษณะทางชีววิทยาของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

เซลล์ของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง มีลักษณะกลมรีหรือคล้ายหยดน้ำ มีสีเขียวและมีการสะสมไฮโดรคาร์บอนภายในเซลล์ มีเส้นใยไซโตพลาสซึมเชื่อมระหว่างโคโลนี และมีเมือกช่วยในการยึดเกาะ มีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ประมาณ 10  $\mu\text{m}$  ของแต่ละแหล่งตัวอย่างซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P>0.05$ ) และขนาดโคโลนีของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง พบว่าขนาดโคโลนีของแหล่ง CU-MPL-BT3 มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ ) กับแหล่ง CU-MPL-BT9 ที่มีขนาดของโคโลนีเล็กที่สุดเท่ากับ  $80\pm 24.0 \mu\text{m}$

จากการรายงานของ (ลัดดา 2544) ได้รายงานว่า *Botryococcus braunii* จะอยู่รวมกันเป็นโคโลนีประกอบด้วยเซลล์รูปรีอยู่เรียงกันแน่นในแนวรัศมี มีสารเมือกเหนียวสีเข้มจนเกือบดำหุ้มรอบเซลล์ทุกเซลล์ในโคโลนี เมือกจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มมากขึ้นในโคโลนีที่มีอายุมาก คลอโรพลาสต์คล้ายร่างแห มีขนาดค่อนข้างเล็กและมีโพรงยวดยาว 1 เม็ด สืบพันธุ์โดยการขาดเป็นท่อนของโคโลนี หรือการสร้างออดีสปอร์ *Botryococcus braunii* มีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ 3-6 ไมโครเมตร และส่วนใหญ่พบในแหล่งน้ำจืด

จากการศึกษาของ (Weiss, Roth et al. 2012) เกี่ยวกับโคโลนีของสาหร่าย *Botryococcus braunii* (Race B) พบว่าลักษณะโคโลนีของสาหร่าย จะมีขนาดใหญ่ ทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะด้วยเส้นใย ในแนวรัศมี และเซลล์สามารถผลิตไฮโดรคาร์บอนออกมา รวมทั้งมีเมือกรอบๆโคโลนี ทำให้อายุของโคโลนีมีการขยายมากขึ้น และเซลล์สามารถไปอยู่บนโคโลนีใหม่ได้ เมื่อมีการสร้างโคโลนีอันใหม่ขึ้น

จากการศึกษาของ (Tanoi, Kawachi et al. 2011) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของ *Botryococcus braunii* พบว่าขนาดโคโลนีของสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร Chu13 มีขนาด  $\geq 80 \mu\text{m}$  ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้เลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหาร BG 11 ที่มีขนาดโคโลนี  $\geq 80 \mu\text{m}$  เช่นกัน

#### 5.2 ลักษณะการเติบโต (Growth characteristic) ของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

การศึกษากการเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. จำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง (CU-MPL-BT) โดยแบ่งการเติบโตเป็น 4 ช่วง ได้แก่ 0-20, 21-40, 41-60 และ 61-78 วันของการเลี้ยง พบว่าการเติบโตของ *Botryococcus* sp. มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน คือในช่วง 1-20 วันแรกเซลล์มีจำนวนคงที่หรือลดจำนวนลงเล็กน้อย (Lag Phase) แต่หลังจากนั้นเซลล์จะมีการเพิ่มจำนวนขึ้น อย่าง

รวดเร็วจนถึงวันที่ 20 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การเติบโต (K) สูงกว่าช่วงระยะเวลาอื่นอย่างเห็นได้ชัดเจน ยกเว้น CU-MPL-BT6 ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าในช่วงวันที่ 0-20 ของการเลี้ยงเป็นช่วง Logarithmic Phase (0-20) ส่วนในช่วงวันที่ 21-40 และ 41-60 สำหรับ *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง มีอัตราการเติบโตช้าลงอย่างเห็นได้ชัด โดยส่วนใหญ่มีค่าสัมประสิทธิ์การเติบโตในช่วงวันที่ 21-40 ใกล้เคียงกับในช่วงวันที่ 41-60 หรือสูงกว่าเล็กน้อย จึงอาจกล่าวได้ว่าช่วงวันที่ 21-60 ของการเลี้ยงเป็นช่วง Stationary phase เมื่อเลยวันที่ 60 สำหรับจากทุกแหล่งจึงลดลงอย่างรวดเร็วและเข้าสู่ Death Phase

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การเติบโตในช่วง Logarithmic Phase พบว่าเราสามารถแบ่งกลุ่มสำหรับ *Botryococcus* sp. จาก 9 แหล่งตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีอัตราการเติบโตเร็ว ( $K > 0.004$ ) ประกอบด้วย CU-MPL-BT9 ( $K > 0.042$ ) และ CU-MPL-BT5 ( $K = 0.040$ ) กลุ่มที่มีอัตราการเติบโตปานกลาง ( $K = 0.04 > 0.03$ ) ประกอบด้วย CU-MPL-BT2 ( $K = 0.036$ ) และ CU-MPL-BT1 ( $K = 0.036$ ) และกลุ่มที่มีอัตราการเติบโตต่ำ ( $K < 0.03$ ) ได้แก่ CU-MPL-BT6 ( $K = 0.023$ ), CU-MPL-BT7 ( $K = 0.023$ ), CU-MPL-BT3 ( $K = 0.025$ ), CU-MPL-BT4 ( $K = 0.026$ ) และ CU-MPL-BT8 ( $K = 0.026$ ) ซึ่งสำหรับ *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT5 ที่จัดอยู่ในกลุ่มตัวอย่างที่มีอัตราการเติบโตเร็ว เมื่อวัดด้วยวิธีวัดค่า OD (Optical density) 680 นาโนเมตร มีค่าการเติบโตสูงสุดที่ 0.418 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับแหล่งตัวอย่างอื่น

จากการศึกษาของ (Lee, Kim et al. 1998) ทำการศึกษาผลของการเก็บเกี่ยวและระยะการเติบโตของ *Botryococcus braunii* พบว่าสาหร่ายมีการเติบโต ในช่วง 2 วันแรกเซลล์มีการลดจำนวนลงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย หลังจากนั้นมีการเติบโตเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 14 ของการทดลอง และทำการวัดค่าการเติบโตและวัดค่า OD (Optical density) 680 นาโนเมตร เพื่อวัดการเติบโตของสาหร่าย

### 5.3 การสะสมไขมันของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

#### 5.3.1 ตรวจสอบไขมันในสาหร่ายโดยการย้อมสี Nile red

จากการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการสะสมไขมัน ด้วยการย้อมสี Nile red พบว่าสาหร่าย *Botryococcus* sp. มีการสะสมไขมันเกิดขึ้นทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง และมีการสะสมไขมันตั้งแต่วันที่ 0 ของการทดลอง (lag phase) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ 9 แหล่งตัวอย่าง สำหรับ *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT6 มีปริมาณการสะสมไขมันสูงสุดเท่ากับ  $21.42 \pm 1.98$  % มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) กับสาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT2, CU-MPL-BT3, CU-MPL-BT5 และ CU-MPL-BT9 ซึ่งมีการสะสมไขมันมากขึ้นเรื่อยๆ จนเห็นได้ชัดในช่วง Logarithmic Phase ของการทดลอง สังเกตได้จากสีของเซลล์สาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ที่มีสีเหลืองเข้มขึ้นอย่างชัดเจน แสดงถึงปริมาณไขมันที่เพิ่มมากขึ้น และแหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT6 มีปริมาณการสะสมไขมันสูงสุดในช่วง Logarithmic Phase ของการทดลอง เท่ากับ

28.05±4.76 % ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ ) กับสาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT1, CU-MPL-BT2, CU-MPL-BT3, CU-MPL-BT8 และ CU-MPL-BT9 โดยรวมจะพบว่า สาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่างในช่วง Logarithmic Phase ที่มีปริมาณการสะสมไขมันสูงสุดและมีความสอดคล้องกับอัตราการเติบโตได้เร็วของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่ง ในช่วง Logarithmic Phase เช่นกัน แต่ในช่วง stationary phase พบว่าสีของไขมันที่เป็นสีเหลืองจะค่อยๆจางลง แสดงถึงปริมาณของไขมันที่ลดลงในช่วงนั้น พบว่าแหล่งตัวอย่าง CU-MPL-BT2 มีปริมาณการสะสมไขมันสูงสุดเท่ากับ 12.28±2.85 % มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ ) กับ CU-MPL-BT1, CU-MPL-BT3 และ CU-MPL-BT5 และบางแหล่งตัวอย่างเซลล์มีการหลุดออกจากโคโลนีซึ่งสอดคล้องกับอัตราการเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่ง ในช่วง stationary phase โดยมีอัตราการเติบโตช้าลงอย่างเห็นได้ชัดหรือบางแหล่งไม่มีการเพิ่มจำนวนจากการศึกษาพบว่าปริมาณของไขมันที่ตรวจสอบจากการย้อมสีแล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าสาหร่าย *Botryococcus* sp. มีปริมาณการสะสมไขมันมากที่สุดของแต่ละแหล่งตัวอย่าง Logarithmic Phase ของการทดลอง

### 5.3.2 ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันของสาหร่าย *Botryococcus* sp.

จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณน้ำมันของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 9 แหล่งตัวอย่าง ด้วยเทคนิคการสกัดไขมันในสารละลายเฮกเซน (Hexane) พบว่าสาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT5 ให้ปริมาณไขมันสูงสุดเท่ากับ 62.26±8.05 % ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ ) กับสาหร่าย *Botryococcus* sp. แหล่ง CU-MPL-BT1, CU-MPL-BT2, CU-MPL-BT3, CU-MPL-BT4, CU-MPL-BT6, CU-MPL-BT7, CU-MPL-BT8 และ CU-MPL-BT9 และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณไขมันของสาหร่าย *Botryococcus braunii* จากการรายงานของ (Ruangsomboon 2012) พบว่าปริมาณไขมันที่ได้มีความสอดคล้องกับปริมาณไขมันของ (Chisti 2007) อยู่ในช่วง 25-75 % ดังตาราง ซึ่งการสกัดไขมันด้วยสารละลายเฮกเซนจะให้ปริมาณไขมันรวมเยอะกว่าการสกัดด้วยสารละลายชนิดอื่น จากการศึกษาของ (Al-Hothaly, Mouradov et al. 2015) และเมื่อนำปริมาณไขมันมาเปรียบเทียบกับตรวจสอบไขมันในสาหร่ายโดยการย้อมสี Nile red จะพบว่าปริมาณไขมันที่ได้จะต่างกันเนื่องจากการย้อมสี Nile red เป็นการตรวจสอบเฉพาะพื้นที่ที่ย้อมติดสีของไขมัน ไม่ได้ใช้วิธีการสกัดไขมันด้วยสารละลายที่ทำการสกัดไขมันทั้งภายในและภายนอกเซลล์ออกมา อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการย้อมสี Nile red เป็นการตรวจสอบเฉพาะพื้นที่ไขมัน แต่สามารถทำให้ทราบเบื้องต้นว่าสาหร่ายมีการผลิตไขมันสูงสุดในช่วง Logarithmic Phase ของการทดลอง ซึ่งเป็นช่วงที่สาหร่ายมีอัตราการเติบโตเร็ว มีพื้นที่ไขมันสูงทำให้มีปริมาณไขมันรวมที่สกัดได้มีปริมาณมาก

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณไขมันของสาหร่าย *Botryococcus braunii* ที่มีการศึกษาในปัจจุบัน (Ruangsomboon 2012)

Lipid content (% dry wt.)	Reference
12–55	In present study
10–33	Okada et al. (1995)
50	Kojima and Zhang (1999)
6–17	Kalacheva et al. (2001)
13–18	Dayananda et al. (2007)
25–75	Chisti (2007)
11–18	Orpez et al. (2009)
9–20	Zhila et al. (2011)
6–36	Yeesang and Cheirsilp (2011)
10–13	Ge et al. (2011)

#### 5.4 การจำแนกสาหร่าย *Botryococcus* sp.

การศึกษาดีเอ็นเอของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ดีจีจีอีจำนวนทั้งสิ้น 9 แหล่งตัวอย่าง พบว่าแถบที่ปรากฏบนเจลมีจำนวน 1 แถบ อยู่ในระดับเดียวกันในแต่ละแหล่งตัวอย่าง เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอทั้ง 9 แถบ พบว่า สาหร่าย *Botryococcus* sp. ทั้ง 7 แหล่งตัวอย่าง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์สาหร่าย *Botryococcus braunii* มีความเหมือนกันมากกว่า 90 % และอีก 2 แหล่งตัวอย่าง คือ แหล่ง CU-MPL-BT8 และ CU-MPL-BT9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับสาหร่ายชนิดอื่นคือ *Chlamydomodium starrii* และ *Paraphysomonas vestita*. ตามลำดับ ซึ่งมีความเหมือนกันมากกว่า 90 % อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเพื่อจำแนกสาหร่าย *Botryococcus* sp. จากแหล่งต่างๆ และดูความแตกต่างทางพันธุกรรมของสาหร่ายดังกล่าวโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18s rRNA โดยใช้เทคนิคดีจีจีอี (DGGE) ทำให้สามารถคัดเลือกสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่ต่างกันดีเพื่อให้ทราบถึงสายพันธุ์ของสาหร่ายในแต่ละสถานที่เพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกสาหร่าย

### ข้อเสนอแนะ

อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานและแนวทางการศึกษาทดสอบความสามารถในการผลิตไขมันและการเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่เก็บจากแหล่งน้ำต่างๆ ในประเทศไทยจำนวน 9 แหล่งตัวอย่าง จากนั้นทำการศึกษา ความแตกต่างทางพันธุกรรมของสาหร่ายดังกล่าว โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA โดยใช้เทคนิคดีจีจีอี (DGGE) เพื่อทำการเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) หรือความสามารถในการผลิตน้ำมันและการเติบโตของสาหร่าย *Botryococcus* sp. ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จะทำให้สามารถคัดเลือกสาหร่าย *Botryococcus* sp. ที่ต่างกันได้ในเบื้องต้น เพื่อให้ทราบถึงแหล่งตัวอย่างของสาหร่ายในแต่ละสถานที่ เพื่อนำไปใช้ในการเลือกสาหร่าย ที่สามารถเติบโตได้เร็วและให้น้ำมันปริมาณมาก นำไปใช้เป็นพลังงานชีวภาพในอนาคต เนื่องจากในปัจจุบันนี้พลังงานด้านชีวภาพสามารถเป็นทางเลือกใหม่ของหลายประเทศที่จะนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนในอนาคต



รายการอ้างอิง





- Al-Hothaly, K. A., et al. (2015). "The Effect of Media on Biomass and Oil Production in *Botryococcus braunii* Strains Kossou-4 and Overjuyo-3." *Clean Coal and Energy* 4: 11-22.
- Andersen, R. A. (2005). "Algal culturing techniques, Massachusetts." Elsevier Academic Press.
- Banerjee, A., et al. (2002). "*Botryococcus braunii*: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals." *Critical Reviews in Biotechnology* 22(3): 245-279.
- Boonma, S., et al. (2014). "Isolation and Cultivation of *Botryococcus braunii* Kutzing from Northern Thailand." *Chiang Mai Journal of Science* 41(2): 298-306.
- Chandrappa, D., et al. (2010). "Assessment of Genetic Polymorphism among Green Microalgae *Botryococcus* of Distinct Origin by RAPD." *Genes Genomes and Genomics* 4: 65-69.
- Chen, B. and H. LIU (2013). "Relationships between phytoplankton growth and cell size in surface oceans: Interactive effects of temperature, nutrients, and grazing." *Limnol. Oceanogr.* 55: 965-972.
- Cheng, P., et al. (2013). "The growth, lipid and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* with attached cultivation." *Bioresource Technology* 138: 95-100.
- Chisti, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae." *Biotechnology advances* 25(3): 294-306.
- Dayananda, C., et al. (2010). "Isolation, characterization and outdoor cultivation of green microalgae *Botryococcus* sp. ." *Scientific Research and Essays* 5(17): 2497-2505.
- Demirbas, A. and M. F. Demirbas (2011). "Importance of algae oil as a source of biodiesel." *Energy Conversion and Management* 52: 163-170.
- Deragon, J. and B. Landry (1992). "RAPD and other PCR-based analyses of plant genomes using DNA extracted from small leaf disks." *Genome Research* 1(3): 175-180.

- Furuhashi, K., et al. (2016). "Effects of culture medium salinity on the hydrocarbon extractability, growth and morphology of *Botryococcus braunii*." *Biomass and Bioenergy* 91: 83-90.
- Hovda, M. B. (2007). "Application of PCR and DGGE to characterise the microflora of farmed fish." Ph.D. thesis, University of Bergen.
- Huang, G.-H., et al. (2009). "Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence." *Biomass and Bioenergy* 33(10): 1386-1392.
- Kalacheva, G., et al. (2002). "The effect of temperature on the lipid composition of the green alga *Botryococcus*." *Microbiology* 71(3): 286-293.
- Kawachi, M., et al. (2012). "Relationship between hydrocarbons and molecular phylogeny of *Botryococcus braunii*." *Algal Research* 1(2): 114-119.
- Khatri, W., et al. (2014). "Hydrocarbon production in high density *Botryococcus braunii* race B continuous culture." *Biotechnology and bioengineering* 111(3): 493-503.
- Kim, B.-H., et al. (2012). "Simple, rapid and cost-effective method for high quality nucleic acids extraction from different strains of *Botryococcus braunii*." *PLoS One* 7(5): e37770.
- Kochert, G. (1994). "RFLP technology. In DNA-based markers in plants. Phillips, R.L. and Vasil, I.K. (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht." The Netherlands: 8-38.
- Lang, X., et al. (2001). "Preparation and characterization of bio-diesel from various bio-oils." *Bioresour.Technol* 80: 53-62.
- Lee, S., et al. (1998). "Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*." *Letters in Applied Microbiology* 27(1): 14-18.
- Li, Y. and J. G. Qin (2005). "Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains." *Journal of Applied Phycology* 17(6): 551-556.
- Liu, Y., et al. (2014). "The biodiversity of oleaginous microalgae in Northern Qinghai-Tibet Plateau." *African Journal of Microbiology Research* 99: 4717-4722.

- Metzger, P. and C. Largeau (2005). "*Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids." Applied microbiology and biotechnology 66(5): 486-496.
- Parmar, A., et al. (2011). "Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels." Bioresour Technol 102(10163-10172): 1-18.
- Raven, A. J. (1990). "Predictions of Mn and Fe use efficiencies of phototrophic growth as a function of light availability for growth and of C assimilation pathway." New Phytol. 116: 1-18.
- Ruangsomboon, S. (2012). "Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2." Bioresource technology 109: 261-265.
- Sanger, F., et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proceedings of the National Academy of Sciences 74(12): 5463-5467.
- Sawayama, S., et al. (1995). "CO<sub>2</sub> fixation and oil production through microalga." Energy Convers Manage 36: 729-731.
- Scragg, A. H., et al. (2003). "The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. ." Enzyme Microb. 33: 884-889.
- Sheehan, J., et al. (1998). A look back at the U.S.Department of Energy's Aquatic Species Program — biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. Report NREL/TP: 580-24190.
- Tankslay, S. D., et al. (1989). "RFLP mapping in plant breeding. ." New tools for an old science. Biotechnology 7: 257-264.
- Tanoi, T., et al. (2011). "Effects of carbon source on growth and morphology of *Botryococcus braunii*." Journal of Applied Phycology 23(1): 25-33.
- Wahidin, S., et al. (2013. ). "The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp." Bioresource Technology 129: 7-11.

Weiss, T. L., et al. (2012). "Colony organization in the green alga *Botryococcus braunii* (Race B) is specified by a complex extracellular matrix." *Eukaryotic cell* 11(12): 1424-1440.

Williams, J. G., et al. (1990). "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucleic acids research* 18(22): 6531-6535.

Winnepenninckx, B., et al. (1993). "DE (1993) Extraction of high molecular weight DNA from molluscs." *Trends in Genetics* 9: 407.

Woft, F. R., et al. (1985). "Growth and branched hydrocarbons production in a strain of *Botryococcus braunii* (Chlorophyta)." *J. Phycol.* 21: 388-396.

Yoshimura, T., et al. (2013). "Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: Optimal CO<sub>2</sub>, salinity, temperature, and irradiance conditions." *Bioresource technology* 133: 232-239.

Zhang, H., et al. (2011). "Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*." *Biomass and Bioenergy* 35(5): 1710-1715.

ดวงหทัย สิงห์คะ และ วสุ ปฐมอารีย์ (2554). "เทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis: หลักการ และการประยุกต์ใช้ทางจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม." *ว.วิทยาศาสตร์ มข.* 39: 321-333.

ลัดดา วงศ์รัตน์ (2544). แพลงก์ตอนพืช. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต บางเขน. กรุงเทพมหานคร.



**1. LB Broth (ปริมาตร 1 ลิตร)**

NaCl	จำนวน	10	กรัม
Tryptone	จำนวน	10	กรัม
Yeast extract	จำนวน	10	กรัม

ละลายให้เข้ากันปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย 5 N NaOH ปรับปริมาตรสารเป็น 1 ลิตร ด้วย deionized H<sub>2</sub>O และนำสารไปนึ่งฆ่าเชื้อ

**2. LB Agar (ปริมาตร 1 ลิตร)**

NaCl	จำนวน	10	กรัม
Tryptone	จำนวน	10	กรัม
Yeast extract	จำนวน	5	กรัม
Agar	จำนวน	20	กรัม

ละลายให้เข้ากันปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย 5 N NaOH ปรับปริมาตรสารเป็น 1 ลิตร ด้วย deionized H<sub>2</sub>O และนำสารไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นเทลงจานเลี้ยงเชื้อ (~25 ml/100-mm plate)

**3. LB-Ampicillin Agar (ปริมาตร 1 ลิตร)**

เตรียม LB Agar ปริมาตร 1 ลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และมีอุณหภูมิอยู่ที่ 55 °C เติมสาร filter-sterilized ampicillin ปริมาตร 50 ml จากนั้นเทลงจานเลี้ยงเชื้อ (~25 ml/100-mm plate)

**4. 1X TAE Buffre**

40 mM Tris-acetate
1 mM EDTA

**5. SOB Medium (ปริมาตร 1 ลิตร)**

Bacto-tryptone	จำนวน	10	กรัม
Yeast extract	จำนวน	5	กรัม
NaCl	จำนวน	0.5	กรัม

**6. TE pH 8.0**

10 mM Tris-Cl (pH 8.0)
1 mM EDTA (pH 8.0)

**7. Tris-Borate (TBE)**

Working solution

0.089 M Tris-borate

0.089 M boric acid

0.002 M EDTA

Concentrated stock solution (5x, ปริมาตร 1 ลิตร)

Tris base                      จำนวน 54      กรัม

Boric acid                      จำนวน 27.5      กรัม

0.5 M EDTA (pH 8.0)      จำนวน 20      ml

**8. Gel-Loading Buffer Type II**

10x buffers

0.25% bromophenol blue

0.25% xylene cyanol

25% Ficoll (type 400) in H<sub>2</sub>O

Store at room temperature

**9. 10x TEN buffers**

0.1 M Tris-Cl (pH 8.0)

0.01 M EDTA (pH 8.0)

0.1 M NaCl

**10. 30.8% (w/v) Acrylamide-bisacrylamide (ปริมาตร 1 ลิตร)**

Acrylamide      จำนวน 30.0      กรัม

Bis-acrylamide      จำนวน 0.8      กรัม

**11. TEMED (N, N, N'-tetramethyl ethlenediamine)**

This reagent is commercial available

10% Ammonium persulfate      จำนวน 75      µl

TEMED                              จำนวน 5      µl

**12. 10x Running buffers: 0.25 M Tris-HCL, 1.92 M glycin, 1% (w/v) SDS pH 8.3**

Tris	จำนวน	30.3	กรัม
Glycin	จำนวน	144.0	กรัม
SDS	จำนวน	10	กรัม

ละลายและปรับปริมาตรสารเป็น 1 ลิตร ด้วย deionized H<sub>2</sub>O





## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิชาดา เย็นทั่ว เกิดเมื่อวันที่ 27 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2532 ที่จังหวัดพัทลุง สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางน้ำ จากคณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี เมื่อปีการศึกษา 2554 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555



