

บทที่ 3

ผลการศึกษา

3.1 สภาพของบ่อน้ำร้อน

จากการสำรวจสภาพของบ่อน้ำร้อนใน อ.เหนือคลอง อ.คลองท่อม และ อ.คลองท่อมเหนือ จ.กระบี่ พบว่า บ่อน้ำร้อนในพื้นที่หมู่ที่ 2 ต.เหนือคลอง อ.เหนือคลองนั้นมีลักษณะเป็นบ่อกลมทำด้วยปูนซีเมนต์และปูกระเบื้อง ดังรูปที่ 3.1 มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 เมตร ลักษณะของน้ำภายในบ่อใสไม่มีกลิ่นของซัลเฟอร์ อุณหภูมิของน้ำในบ่อทุกตำแหน่งไม่มีความแตกต่างกันคือ 40.2°C มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 และค่าความเค็มเท่ากับ 12.5 g/l ส่วนสภาพของน้ำตกร้อนใน ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม เป็นน้ำตกร้อนที่เกิดจากธรรมชาติ ดังรูปที่ 3.2 ลักษณะของน้ำไม่มีสี ไม่มีกลิ่นของซัลเฟอร์ อุณหภูมิของน้ำประมาณ 38°C มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 และไม่มีค่าความเค็ม นอกจากนี้บริเวณพื้นที่ของน้ำตกร้อนยังมีบ่อจำนวนมากมายที่สร้างขึ้นเพื่อรองรับและเก็บน้ำที่ไหลจากน้ำตก โดยแบ่งได้เป็นสองบริเวณคือ บ่อน้ำร้อนหน้าศาลาขนาดของกลุ่มสร้างสุขภาพสถานีนอนามัยบ้านบางคราม โดยมีลักษณะเป็นบ่อกลม ขนาดเล็ก ภายในบ่อตกแต่งด้วยหิน ลักษณะของน้ำภายในบ่อไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 38.5°C มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.7 และไม่มีค่าความเค็ม (รูปที่ 3.3) สำหรับอีกบริเวณหนึ่งคือ สวนสปา มีลักษณะเป็นบ่อสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดใหญ่ที่ต่อกันสามบ่อ ทำด้วยปูนซีเมนต์ เนื่องจากน้ำที่ไหลเข้ามาในบ่อเป็นธารน้ำจากแหล่งเดียวกันจึงอุณหภูมิของน้ำไม่แตกต่างกันคือ 39.7°C มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.7 ไม่มีค่าความเค็ม ลักษณะของน้ำไม่มีสี ไม่มีกลิ่นซัลเฟอร์ ดังรูปที่ 3.4 อีกสถานที่ที่เก็บตัวอย่างคือ สระมรกต ตั้งอยู่ในหมู่ที่ 2 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม มีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 35°C มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 และไม่มีค่าความเค็ม ดังรูปที่ 3.5 ลักษณะของบ่อน้ำพุร้อนเค็มในพื้นที่หมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม เป็นบ่อที่สร้างขึ้นเพื่อเก็บน้ำจากธารน้ำพุร้อนเค็มแบ่งเป็นสี่บ่อด้วยกัน โดยบ่อที่ 1 (รูปที่ 3.6) มีลักษณะเป็นบ่อสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีความยาวประมาณ 5 เมตรและความกว้างประมาณ 2 เมตร ลักษณะของน้ำภายในบ่อจะมีกลิ่นของซัลเฟอร์ มีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 44.4°C มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6.8 และค่าความเค็มเท่ากับ 12 g/l บ่อที่ 2 (รูปที่ 3.7) เป็นลักษณะบ่อค่อนข้างกลมมีความลึกมากที่บริเวณก้นบ่อมีส่วนของซากหินและเกิดสฟุดตลอดเวลาและมีกลิ่นของซัลเฟอร์ มีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 46.1°C มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.6 และค่าความเค็มเท่ากับ 16.5 g/l บ่อที่ 3 (รูปที่ 3.8) ติดกับบ่อที่ 2 แต่จะมีลักษณะตื้นกว่าบ่อที่ 2 มีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 44.3°C มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.7 และค่าความเค็ม

เท่ากับ 19 g/l มีกลิ่นของซัลเฟอร์ บ่อที่ 4 (รูปที่ 3.9) เป็นบ่อที่อยู่ห่างจากบ่อที่ 1-3 และมีธารน้ำไหลออกไปเข้าสู่ป่าโกงกางบริเวณใกล้ๆ บ่อมีลักษณะกลม ก้นบ่อมีแก๊สผุดอยู่ตลอดเวลา อุณหภูมิของน้ำประมาณ 45.8 °C มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 6.6 และค่าความเค็มเท่ากับ 17.5 g/l มีกลิ่นของซัลเฟอร์ ดังตารางที่ 3.1



รูปที่ 3.1 บ่อน้ำร้อนในพื้นที่หมู่ที่ 2 ต.เหนือคลอง อ.เหนือคลอง จ.กระบี่



รูปที่ 3.2 น้ำตกร้อน หมู่ที่ 4 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม จ.กระบี่



รูปที่ 3.3 บ่อน้ำร้อนหน้าศาลาנדของกลุ่มสร้างสุขภาพสถานีนามัยบ้านบางครามในบริเวณ
น้ำตกร้อน หมู่ที่ 4 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม จ.กระบี่



รูปที่ 3.4 สวนสปาในบริเวณน้ำตกร้อน หมู่ที่ 4 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม จ.กระบี่



รูปที่ 3.5 สระมรกต หมู่ที่ 2 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม จ.กระบี่



รูปที่ 3.6 ปอที่ 1 น้ำพุร้อนเค็ม หมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม จ.กระบี่



รูปที่ 3.7 ปอที่ 2 น้ำพุร้อนเค็ม หมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม จ.กระบี่



รูปที่ 3.8 บ่อที่ 3 น้ำพุร้อนเค็ม หมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม จ.กระบี่



รูปที่ 3.9 บ่อที่ 4 น้ำพุร้อนเค็ม หมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม จ.กระบี่

ตารางที่ 3.1 ลักษณะของบ่อน้ำร้อน น้ำตกร้อน ที่อ.เหนือคลอง อ.คลองท่อม อ.คลองท่อมเหนือ จ.กระบี่

สถานที่	ลักษณะของน้ำในบ่อ						
	สี	กลิ่น	ค่าความเป็นกรด เป็นด่าง	อุณหภูมิ (°C)	ค่าความเค็ม (g/l)	ความเข้มข้นของ ไนเตรต (mM)	ความเข้มข้นของ ไนไตรต์ (mM)
1.บ่อน้ำร้อนหน้า ศาลาเวทดา ม.2 ต.เหนือคลอง อ.เหนือคลอง	ใส ไม่มีสี	ไม่มีกลิ่น	7.2	40.2	12.5	-	-
2.น้ำตกร้อน ม.4 ต.คลองท่อม- เหนือ อ.คลองท่อม							
2.1น้ำตกร้อน	ใส ไม่มีสี	ไม่มีกลิ่น	8.0	38	-	-	-
2.2บ่อน้ำร้อน หน้าศาลานวด	ใส ไม่มีสี	ไม่มีกลิ่น	7.7	38.5	-	-	-
2.3บ่อน้ำร้อน สวนสปา	ใส ไม่มีสี	ไม่มีกลิ่น	7.7	39.7	-	-	-

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

สถานที่	ลักษณะของน้ำในบ่อ						
	สี	กลิ่น	ค่าความเป็นกรด เป็นด่าง	อุณหภูมิ (°C)	ค่าความเค็ม (g/l)	ความเข้มข้นของ ไนเตรต (mM)	ความเข้มข้นของ ไนไตรต์ (mM)
3.สระมรกต ม.2 ต.คลองท่อม อ.คลองท่อม 4.น้ำพุร้อนเค็ม ม.7 ต.ห้วยน้ำ- ขาว อ.คลอง- ท่อม	ใส ไม่มีสี	ไม่มีกลิ่น	7.3	35	-		-
4.1 บ่อที่ 1	ใส ไม่มีสี	มีกลิ่นซัลเฟอร์	6.8	44.4	13.5	-	-
4.2 บ่อที่ 2	ใส ไม่มีสี	มีกลิ่นซัลเฟอร์	6.6	46.1	16.5	-	-
4.3 บ่อที่ 3	ใส ไม่มีสี	มีกลิ่นซัลเฟอร์	6.7	44.3	19.0	-	-
4.4 บ่อที่ 4	ใส ไม่มีสี	มีกลิ่นซัลเฟอร์	6.6	45.8	17.5	-	-

3.2 การแยกตัวอย่างให้เป็นสาหร่ายชนิดเดี่ยวๆ

เมื่อนำตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บได้ มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนอาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วทำการแยกด้วยวิธีจีดลากบนอาหารแข็งสูตร BG-11 ที่เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l เพาะเลี้ยงประมาณ 10 วัน จะมีโคโลนีเจริญเติบโตเต็มจานเพาะเลี้ยงดังรูปที่ 3.10 ในการแยกตัวอย่างนี้ให้เป็นชนิดเดียวนั้นจะทำซ้ำหลาย ๆ ครั้ง และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อได้สาหร่ายชนิด เดี่ยว ๆ จึงแยกโคโลนีลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l ในเครื่อง Illuminated shaker ที่มีความเร็ว 150 rpm ภายในห้องที่มีความเข้มแสง $120 \mu\text{photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 35°C

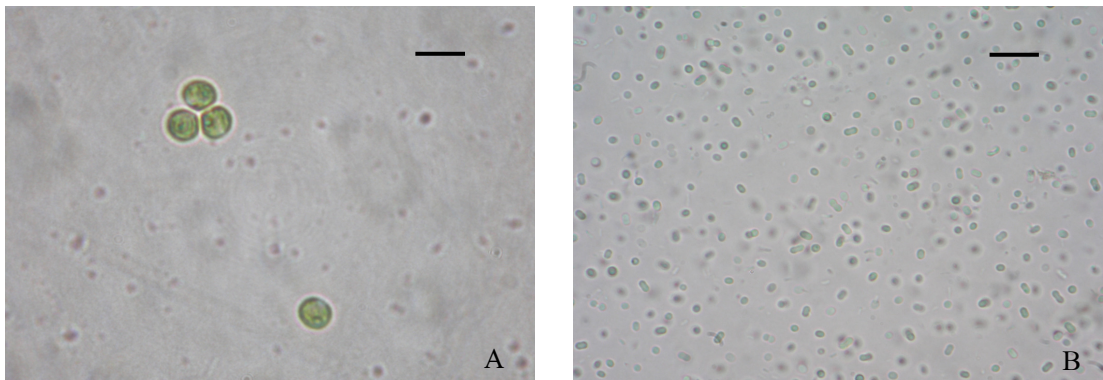


รูปที่ 3.10 โคโลนีของสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp. บนอาหารแข็งสูตร BG-11 ที่เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l

3.3 คัดเลือกตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการศึกษา

3.3.1 ผลการวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสแบบ *in vivo*

นำตัวอย่างที่แยกได้ชนิดเดียว ๆ แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีอายุครบ 14 วัน มาทดสอบแอกติวิตีของ NR วิธีการทดสอบแบบ *in vivo* พบว่า ตัวอย่างเกือบทุกตัวที่นำมาศึกษามีแอกติวิตีของ NR ยกเว้นตัวอย่าง ม3 ดังตารางที่ 3.2 และเมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดระบุชนิดของสาหร่ายโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ พบว่า ตัวอย่าง ม1, ม2, ม3, และ ม4 เป็นสาหร่ายชนิดเดียวกันคือ *Chlorella* sp. สำหรับตัวอย่าง น1.1, รค3.1ก, รค3.1ข, รค3.1ค, รค3.4ก และรค 3.4ข เป็นตัวอย่างชนิดเดียวกันคือ *Synechococcus* sp. คัดเลือกตัวอย่างจากผลการศึกษา ที่ได้คือ ตัวอย่าง ม2 เป็นตัวแทนของสาหร่าย *Chlorella* sp. (รูปที่ 3.11 A) และตัวอย่าง รค 3.4ข เป็นตัวแทนของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. (รูปที่ 3.11 B) เนื่องจากสาหร่ายทั้งสองชนิดดังกล่าวมีค่าแอกติวิตีที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างในกลุ่มเดียวกัน



รูปที่ 3.11 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวชนิด *Chlorella* sp. (A) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp.(B) ความยาวของขีดสีดำเท่ากับ 10 μ m

ตารางที่ 3.2 แอคติวิตีของสาหร่ายชนิดต่างๆจากการศึกษาแอคติวิตีแบบ *in vivo*

หมายเลขตัวอย่าง	รายละเอียดเกี่ยวกับตัวอย่าง	NR specific activity (nmole/min/mg protein)
ม1	สาหร่ายที่ลอยในธารน้ำสระมรกต	0.078±0.002
ม2	สาหร่ายจากขอบธารน้ำสระมรกต	0.232±0.003
ม3	สาหร่ายจากขอบภายในสระมรกต	ไม่มีแอคติวิตี
ม4	สาหร่ายบนพื้นดินขอบสระมรกต	0.205±0.001
น1.1	สาหร่ายติดกับขอบภายในบ่อน้ำร้อนหน้าศาลาทวด ต.เหนือคลอง อ.เหนือคลอง	0.071±0.000
รค3.1ก	สาหร่ายติดกับขอบบ่อภายในบ่อที่ 1 น้ำพุร้อนเค็ม ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม	0.062±0.000
รค3.1ข	สาหร่ายติดโขดหินใต้ผิวน้ำในบ่อที่ 1 น้ำพุร้อนเค็ม ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม	0.131±0.001
รค3.1ค	สาหร่ายส่วนที่ลอยในบ่อที่ 1 น้ำพุร้อนเค็ม ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม	0.017±0.000
รค3.4ก	สาหร่ายส่วนที่ลอยในบ่อที่ 4 น้ำพุร้อนเค็ม ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม	0.105±0.000
รค3.4ข*	สาหร่ายส่วนที่ติดกับบ่อที่ 4 น้ำพุร้อนเค็ม ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม	0.204±0.000

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 2 ซ้ำ

*ตัวอย่างสาหร่ายที่ถูกคัดเลือกใช้ในการศึกษาในงานวิจัยนี้

3.3.2 ผลการศึกษาความเสถียรที่อุณหภูมิห้องของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. และ *Chlorella* sp.

เมื่อทำการบ่มสารสกัดหยาบเอนไซม์ NR ของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. และสารสกัดหยาบและสารละลาย NR ของสาหร่ายชนิด *Chlorella* sp. ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในสารละลายของสาหร่ายชนิด *Chlorella* sp. ไม่มีเหลืออยู่ และแอกติวิตีของเอนไซม์ในสารสกัดหยาบเหลือเพียง 23% ขณะที่แอกติวิตีของเอนไซม์ในสารสกัดหยาบของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. เหลืออยู่ 91 % เมื่อเทียบกับแอกติวิตีก่อนทำการบ่มดังตารางที่ 3.3 แสดงว่าเอนไซม์ NR ของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้องมากกว่าสาหร่ายชนิด *Chlorella* sp. ดังนั้นสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. จึงมีคุณสมบัติเหมาะที่จะเป็นตัวอย่างสำหรับงานวิจัยนี้

ตารางที่ 3.3 แอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสของสาหร่ายเซลล์เดียวชนิด *Chlorella* sp. และ *Synechococcus* sp. ก่อนและหลังบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างสาหร่าย	NR specific activity (nmole/min/mg protein)	
	ก่อนบ่ม	หลังบ่มครบ 24 ชั่วโมง
สารละลาย NR ของสาหร่ายชนิด <i>Chlorella</i> sp.	1.476±0.023	ไม่มีแอกติวิตี
สารสกัดหยาบ NR ของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp.	0.782±0.02	0.182±0.004
สารสกัดหยาบ NR ของสาหร่าย <i>Synechococcus</i> sp.	1.466±0.04	1.335±0.03

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

3.4 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

3.4.1 ผลของก๊าซออกซิเจนต่ออัตราการเจริญเติบโต

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp. ในสูตรอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l ในสภาวะที่มีแสง $120 \mu\text{photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิ 35°C แต่เลี้ยงสาหร่าย 2 แบบที่ต่างกันคือ

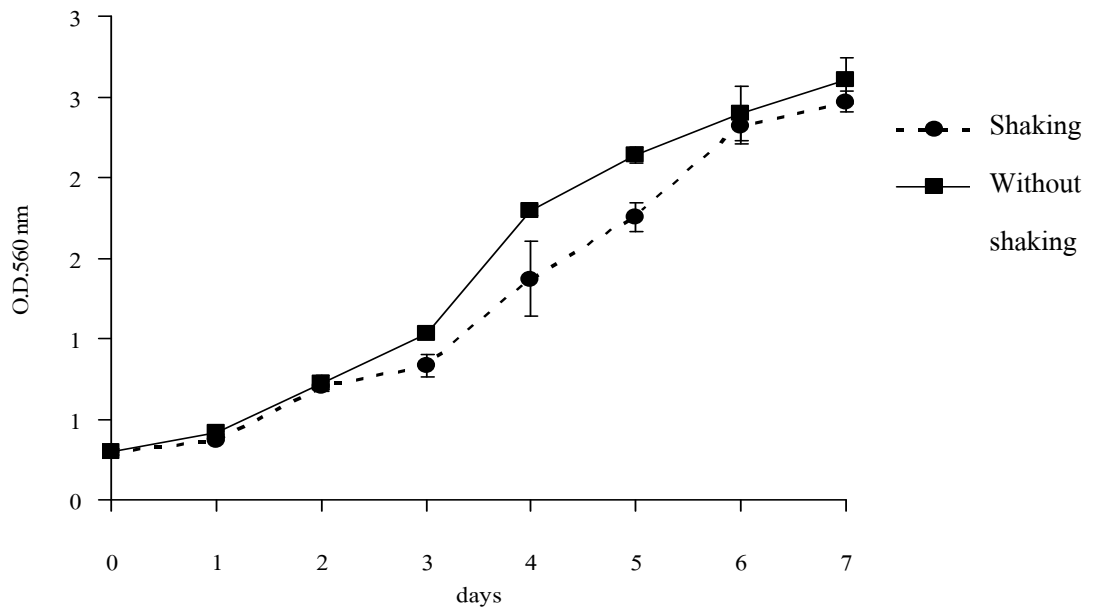
แบบที่ 1 เลี้ยงสาหร่ายในเครื่อง Illuminated shaker เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm

แบบที่ 2 วางพลาสติกตัวอย่างสาหร่ายไว้เฉยๆโดยไม่มีการเขย่า

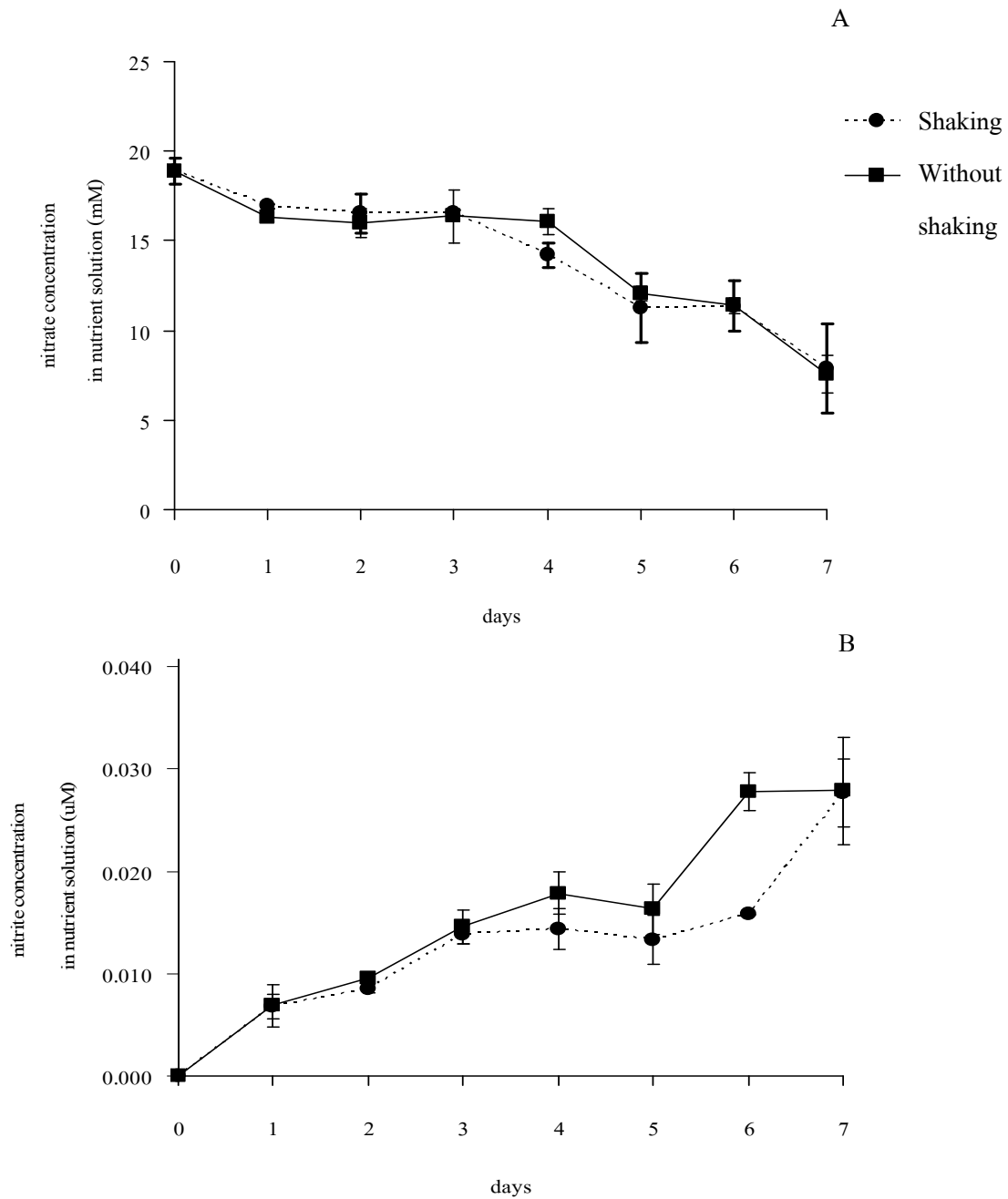
วัดอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน พบว่า สภาวะที่ไม่มีการเขย่ามีผลให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายสูงกว่าสภาวะที่การเขย่าดังรูปที่ 3.12 ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดดังกล่าวไม่จำเป็นต้องมีเขย่า พลาสติก สาหร่ายก็สามารถเจริญเติบโตได้ดี

เมื่อศึกษาอัตราการดูดซับและการใช้ในไตรต์ในอาหารที่เพาะเลี้ยงพบว่า เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นมีผลให้ความเข้มข้นของไนเตรตในอาหารลดลง ดังรูปที่ 3.13 (A) ในวันแรกก่อนเพาะเลี้ยงสาหร่ายสามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นไนเตรตในอาหารได้เท่ากับ 18.895 ± 0.711 mM เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 7 วัน พบว่า ในสภาวะที่มีการเขย่าส่งผลให้ความเข้มข้นของไนเตรตในอาหารลดลงเหลือ 7.897 ± 2.500 mM และสภาวะที่ไม่มีการเขย่าส่งผลให้ความเข้มข้นของไนเตรตในอาหารลดลงเหลือ 7.582 ± 1.050 mM แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายมีการดูดซับไนเตรตในอาหารไปใช้

เมื่อศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารที่เพิ่มขึ้นพบว่า สภาวะการเพาะเลี้ยง (เขย่า-ไม่เขย่า) มีผลให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3 ภาคผนวก) โดยสภาวะที่ไม่เขย่าในวันที่ 4 ถึง 6 ปริมาณไนโตรเจนในอาหารสูงกว่าสภาวะที่มีการเขย่า และเมื่อวันที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายเพิ่มขึ้น ปริมาณไนโตรเจนในอาหารก็เพิ่มขึ้นเช่นกันดังรูปที่ 3.13 (B)



รูปที่ 3.12 ผลของการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่าต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Synechococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l

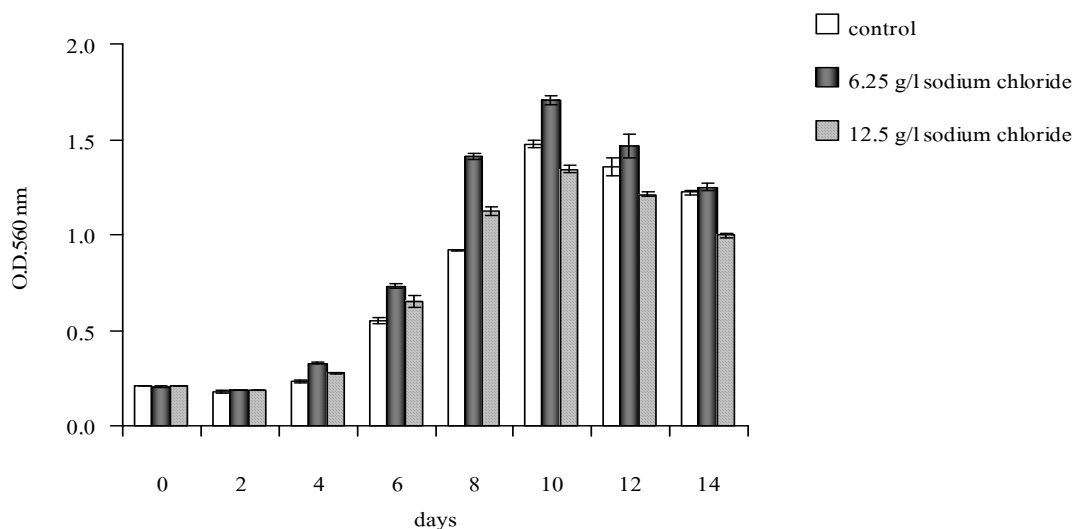


รูปที่ 3.13 เปรียบเทียบความเข้มข้นของไนเตรตในอาหารที่ลดลง (A) และไนไตรต์ในอาหารที่เพิ่มขึ้น (B) ของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. เมื่อในอาหารสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l ภายใต้สภาวะที่มีแสง $120 \mu\text{photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวันและอุณหภูมิ $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$

3.4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

3.4.2.1 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมคลอไรด์ต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

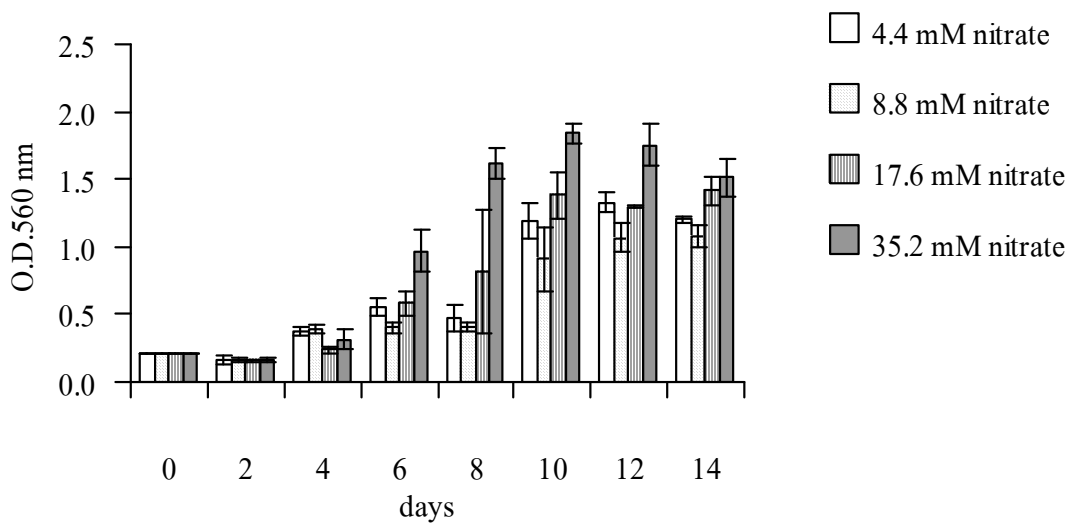
จากการทดลองโดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่โซเดียมคลอไรด์ 0, 6.25 และ 12.5 g/l พร้อมทั้งมีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l เก็บตัวอย่างสาหร่ายวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า ตั้งแต่วันที่ 4 ถึงวันที่ 14 สาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหารต่างกันมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4 ภาคผนวก) โดยสาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.25 g/l มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหารอื่นรองลงมาคือ สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 12.5 g/l และไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ตามลำดับ เห็นได้ว่าโซเดียมคลอไรด์ในอาหารส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายดีขึ้น ดังรูปที่ 3.14



รูปที่ 3.14 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

3.4.2.2 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมไนเตรตต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp.

จากการศึกษาให้มีไนเตรตในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีความเข้มข้น 4.4, 8.8, 17.6 และ 35.2 mM พร้อมทั้งมีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l เก็บตัวอย่างสาหร่ายวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตในอาหารมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5 ภาคผนวก) อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายในแต่ละวันเมื่อเทียบระหว่างสูตรอาหารเห็นได้ว่าสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของไนเตรตสูงสุดคือ 35.2 mM อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายสูงกว่าสูตรอาหารอื่น (รูปที่ 3.15) แสดงว่าเมื่อความเข้มข้นของไนเตรตในอาหารมีมากสาหร่ายสามารถดูดซับไนเตรตไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้มากเช่นกัน



รูปที่ 3.15 ผลของโซเดียมไนเตรตต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

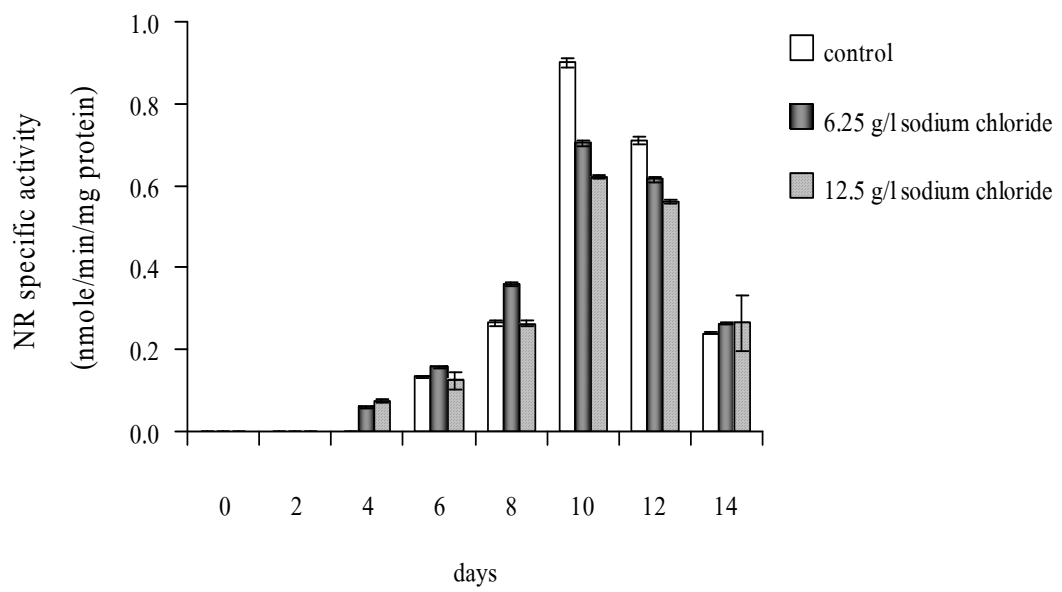
3.5 ผลการศึกษาสถานะต่าง ๆ ที่ส่งผลให้เอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสาหร่ายเซลล์เดียวชนิด *Synechococcus* sp. ทำงานได้สูงสุด

3.5.1 ผลการศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในเซลล์

เมื่อทำเซลล์สาหร่ายให้แตกโดยการบดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วบดกับบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH pH 7.5 ที่ประกอบด้วย 50 mM MOPS, 1 mM EDTA, 5 mM DTT และ 1 mM PMSF นำสารสกัดที่ได้ตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 20 นาที แยกสารละลายส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของไซโตพลาสซึมและส่วนตะกอนซึ่งเป็นส่วนของเมมเบรน นำส่วนของตะกอนมาละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด จากนั้นนำทั้ง 2 ส่วนมาวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ NR และปริมาณโปรตีนพบว่า ในส่วนของเมมเบรนมีค่า specific activity ของเอนไซม์ NR เท่ากับ 1.466 ± 0.04 nmole/min/mg protein แต่ในส่วนของไซโตพลาสซึมไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ NR แสดงว่าเอนไซม์ NR ในสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดนี้เกาะติดอยู่กับเมมเบรนของเซลล์

3.5.2 ผลของความเค็มในอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่มีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

จากการศึกษาให้ไซเดียมคลอไรด์ในอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 6.25 และ 12.5 g/l พร้อมทั้งมีไซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ NR ทุก 2 วันเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าไซเดียมคลอไรด์ที่มีในอาหารมีผลต่อค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6 ภาคผนวก) โดยตัวอย่างสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีไซเดียมคลอไรด์เริ่มมีแอกติวิตีของเอนไซม์ในวันที่ 4 ขณะที่ชุดควบคุมเริ่มมีแอกติวิตีในวันที่ 6 หลังจากนั้นค่าแอกติวิตีของสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 3 สูตรมีแนวโน้มค่อย ๆ สูงขึ้น (รูปที่ 3.16) ในวันที่ 6 และ 8 ตัวอย่างสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีไซเดียมคลอไรด์ 6.25 g/l มีแอกติวิตีสูงกว่าตัวอย่างสาหร่ายที่เลี้ยงในสูตรอาหารอื่น และในวันที่ 10 สาหร่ายที่เลี้ยงในทุกสูตรอาหารให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ NR สูงสุดเมื่อเทียบกับวันอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารพบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีไซเดียมคลอไรด์ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.900 ± 0.011 nmole/min/mg protein รองลงมาคือสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีไซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 6.25 และ 12.5 g/l มีค่าแอกติวิตีเท่ากับ 0.705 ± 0.008 และ 0.620 ± 0.004 nmole/min/mg protein ตามลำดับ หลังจากนั้นแอกติวิตีของเอนไซม์ NR ค่อย ๆ ลดลง จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไซเดียมคลอไรด์ที่เสริมลงไปในการเลี้ยงสาหร่ายไม่สามรถกระตุ้นให้เอนไซม์ NR มีแอกติวิตีสูงสุดแต่จะมีผลกระตุ้นให้เอนไซม์ทำงานได้เร็วขึ้น

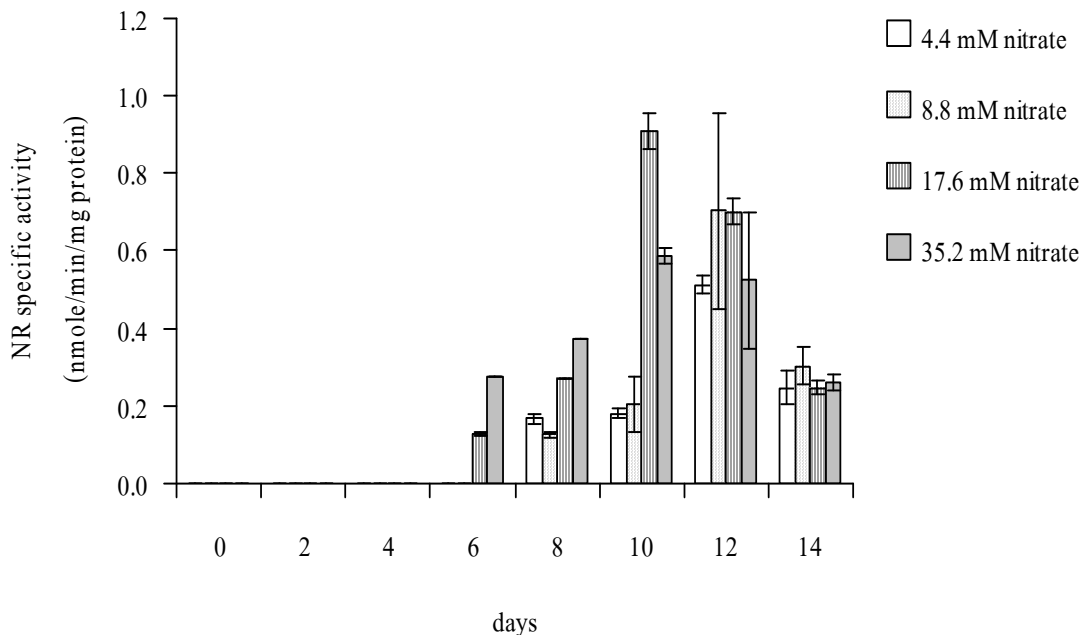


รูปที่ 3.16 ผลของความเค็มต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนโตรรีดักเทสในสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp.

3.5.3 ผลของไนเตรตในอาหารเลี้ยงสาหร่ายที่มีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรต

รีดักเทส

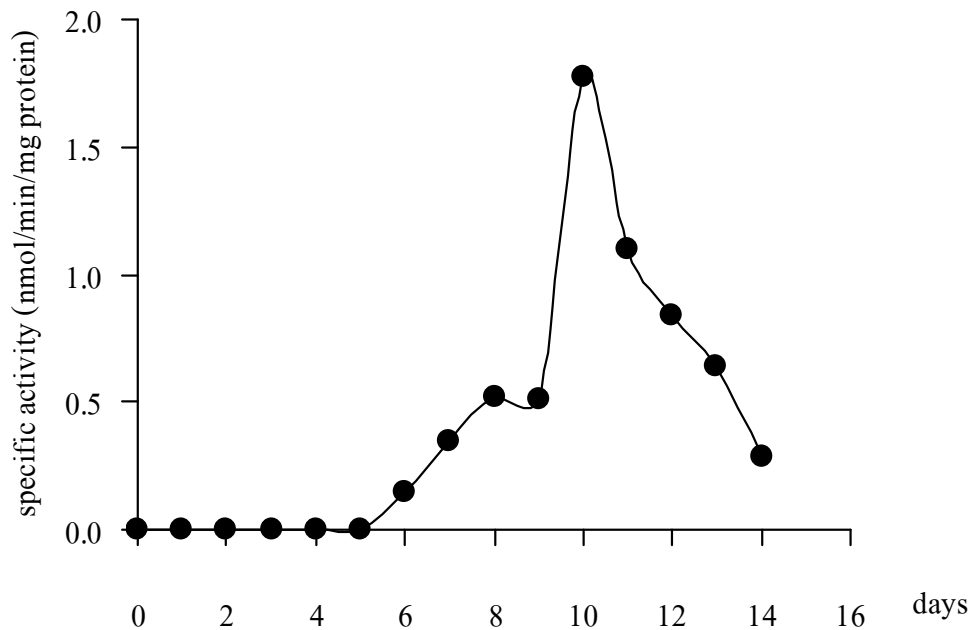
เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. ด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l และโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 4.4, 8.8, 17.6 และ 35.2 mM เก็บตัวอย่างวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ NR ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตที่มีในอาหารมีผลต่อค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ NR ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7 ภาคผนวก) โดยวันที่ 6 และ 8 ตัวอย่างที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่มีความเข้มข้นของไนเตรตสูงสุด (35.2 mM) จะมีแอกติวิตีสูงกว่าตัวอย่างที่เลี้ยงในสูตรอาหารอื่น ($p < 0.05$) แต่ในวันที่ 10 ตัวอย่างสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่มีความเข้มข้นของไนเตรตเท่ากับ 17.6 mM กลับสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและมีค่าแอกติวิตีสูงสุด ($p < 0.05$) เท่ากับ 0.911 ± 0.046 nmole/min/mg protein ขณะที่ตัวอย่างที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่มีความเข้มข้นของไนเตรตต่ำสุด (4.4 mM) เอนไซม์ NR มีค่าแอกติวิตีน้อยที่สุดในวันที่ 10 และ 12 ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 3.17 จากผลการศึกษาเห็นได้ว่าความเข้มข้นไนเตรตในอาหารมีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยไนเตรตความเข้มข้นสูงมีผลกระตุ้นให้เอนไซม์ทำงานได้ก่อนและดี แต่ไม่มีผลให้เอนไซม์ทำงานได้สูงสุด และเมื่ออาหารมีความเข้มข้นของไนเตรตต่ำส่งผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ต่ำด้วยเช่นกัน แต่อาหารที่มีความเข้มข้นของไนเตรตเท่ากับ 17.6 mM มีผลให้เอนไซม์ทำงานได้สูงที่สุด



รูปที่ 3.17 ผลของไนเตรตต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

3.5.4 ผลของอายุของสาหร่ายที่มีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีคัทเทส

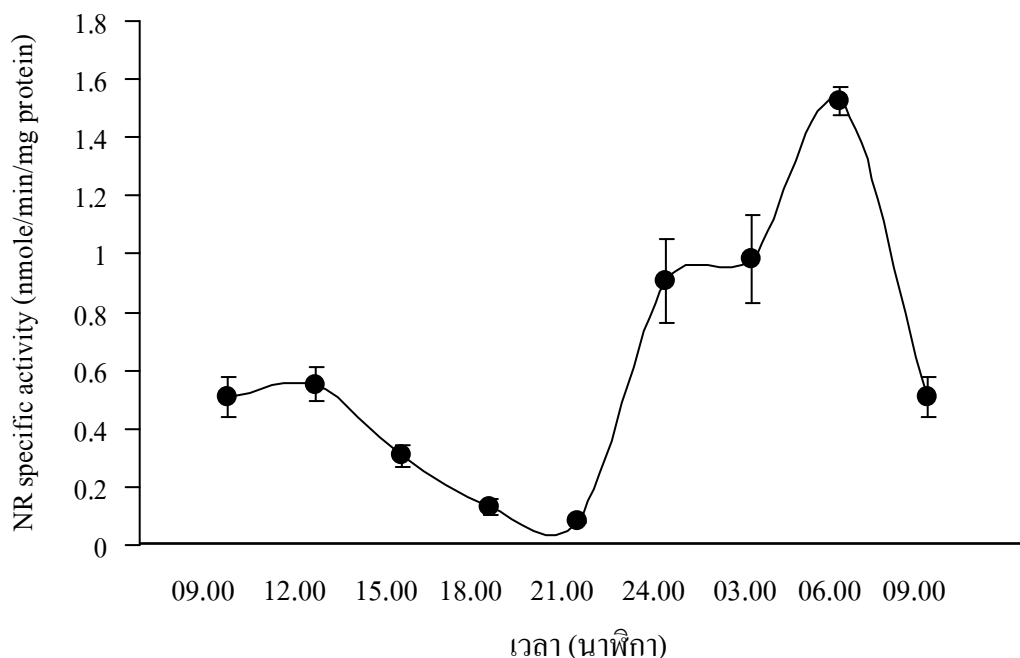
จากการศึกษาความสัมพันธ์ของอายุของสาหร่ายกับค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ NR พบว่า สาหร่ายเริ่มมีแอกติวิตีในวันที่ 6 แล้วมีแนวโน้มค่อย ๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งมีแอกติวิตีสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ 10 วัน ซึ่งมีค่าแอกติวิตีเท่ากับ 1.771 ± 0.069 nmole/min/mg protein (รูปที่ 3.18) แต่เมื่อสาหร่ายมีอายุมากขึ้นแอกติวิตีของเอนไซม์จะค่อย ๆ ลดลง ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเก็บตัวอย่างสาหร่ายวันที่ 10 มาทำการศึกษา



รูปที่ 3.18 การเปลี่ยนแปลงแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีคัทเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. ในช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยง เก็บเซลล์เพื่อหาแอกติวิตีที่เวลา 8.00 น.

3.5.5 ผลของช่วงเวลาที่ได้รับแสงต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

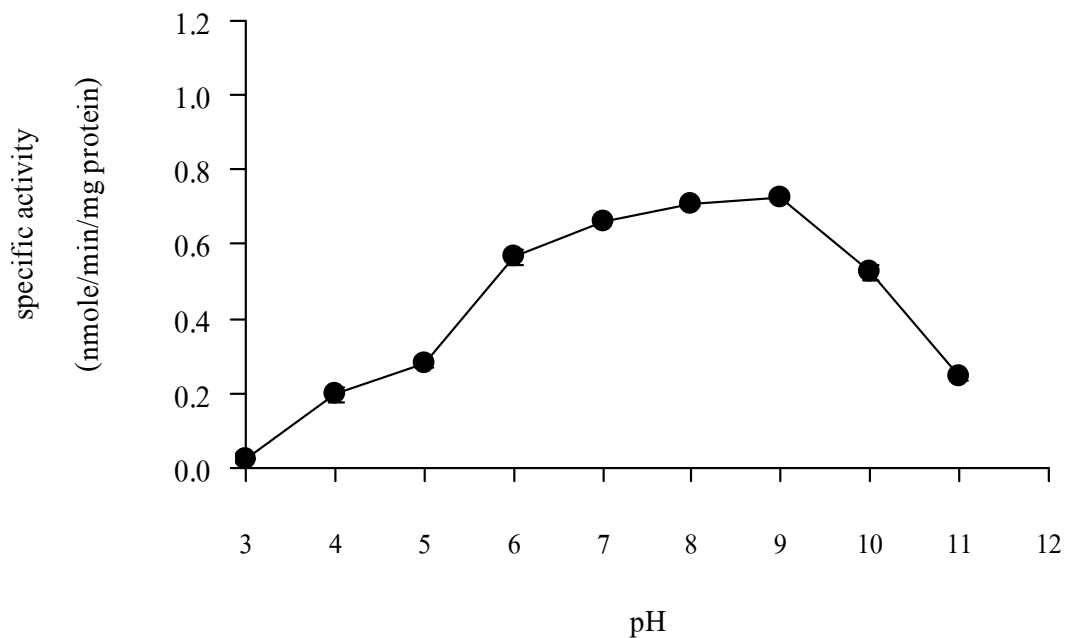
จากการศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l ภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิ 30 ± 1 °C และแสง $120 \mu\text{photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน เก็บตัวอย่างวิเคราะห์แอกติวิตีทุก 3 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาที่สาหร่ายได้รับแสงและไม่ได้รับแสงมีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 9 ภาคผนวก) โดยเมื่อระยะเวลาที่สาหร่ายได้รับแสงมากขึ้นแอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงดังรูปที่ 20 ขณะที่การไม่ได้รับแสงจะส่งผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้นและมีแอกติวิตีสูงสุดเมื่อไม่ได้รับแสงนาน 12 ชั่วโมง คือเวลา 06.00 น. มีค่าเท่ากับ 1.525 ± 0.047 nmole/min/mg protein หลังจากนั้นสาหร่ายจะได้รับแสงจึงส่งผลให้แอกติวิตีลดลงและต่ำสุดเมื่อได้รับแสง 12 ชั่วโมงคือเวลา 18.00 น. มีค่าเท่ากับ 0.132 ± 0.027 nmole/min/mg protein แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับค่าแอกติวิตีที่ตรวจวัดได้ที่เวลา 21.00 น. ซึ่งเป็นเวลาที่สาหร่ายไม่ได้รับแสงเพียง 3 ชั่วโมงซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.079 ± 0.004 nmole/min/mg protein แสดงให้เห็นว่า ความมืดชักนำให้เอนไซม์ NR ทำงานได้ดีกว่าสภาวะที่มีแสง



รูปที่ 3.19 การเปลี่ยนแปลงแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. ในช่วงวัน เมื่อได้รับแสง $120 \mu\text{photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน (06.00 – 18.00 น.)

**3.5.6 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสา-
ห่ายชนิด *Synechococcus* sp.**

จากการศึกษาผลของค่า pH ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ NR โดยเปรียบเทียบแอกติวิตีของเอนไซม์ NR ที่ pH 3.0 – 11.0 พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ NR มีค่าสูงสุดที่ pH 8.0 และ 9.0 ดังรูปที่ 3.20

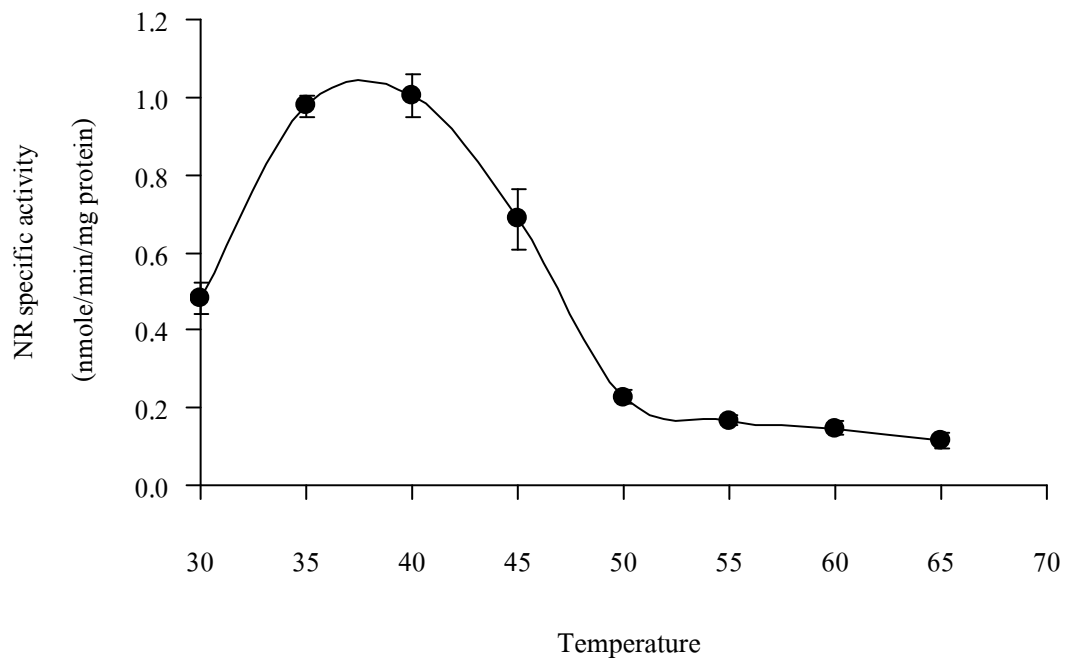


รูปที่ 3.20 ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสาห่ายชนิด *Synechococcus* sp. ที่ pH ต่าง ๆ

3.5.7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตสใน

สาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ NR โดยเปรียบเทียบแอกติวิตีของเอนไซม์ NR ที่อุณหภูมิระหว่าง 30 – 65 °C พบว่าเอนไซม์ NR มีแอกติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 และ 40 °C โดยค่าแอกติวิตีที่อุณหภูมิทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 11 ภาคผนวก) ดังรูปที่ 3.21



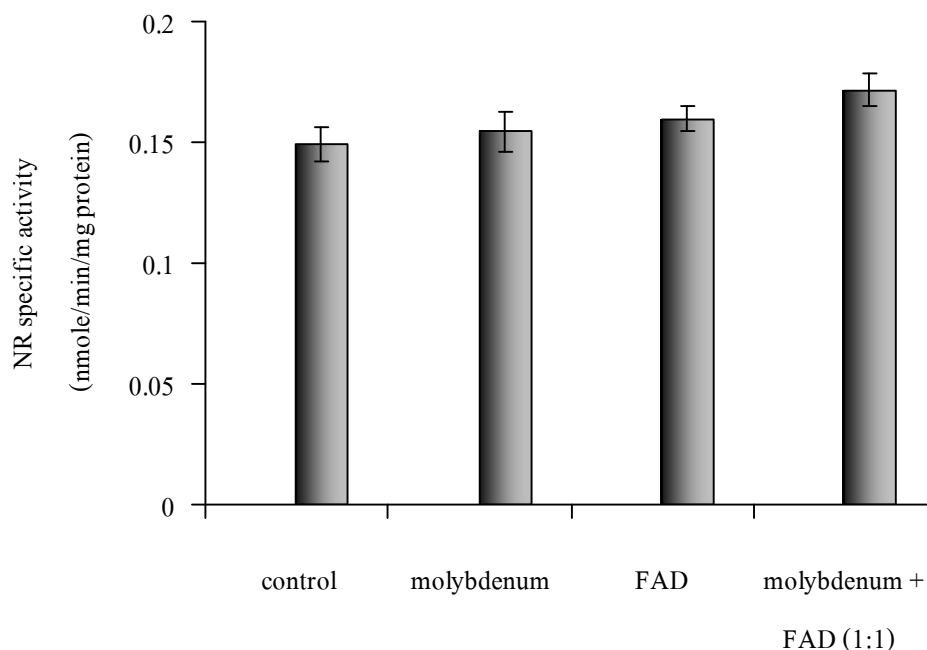
รูปที่ 3.21 ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

3.6 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus*

sp.

3.6.1 ผลของ FAD และ molybdenum ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส

จากการศึกษาพบว่า การเติม FAD หรือ molybdenum ในรูป Na_2MoO_4 ในสารผสมสำหรับวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารดังกล่าว ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าประมาณ 0.149 ถึง 0.160 nmole/min/mg protein แต่มีความแตกต่างกันกับชุดที่มีการเติม 20 μM FAD ร่วมกับ 20 μM molybdenum อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.172 nmole/min/mg protein ($p < 0.05$) (ตารางที่ 12 ภาคผนวก) แสดงให้เห็นได้ว่าการเติม 20 μM FAD หรือ 20 μM molybdenum ไม่มีผลต่อการเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส แต่การเติม 20 μM FAD ร่วมกับ 20 μM molybdenum ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสเพิ่มขึ้น 15 % ดังรูปที่ 3.22

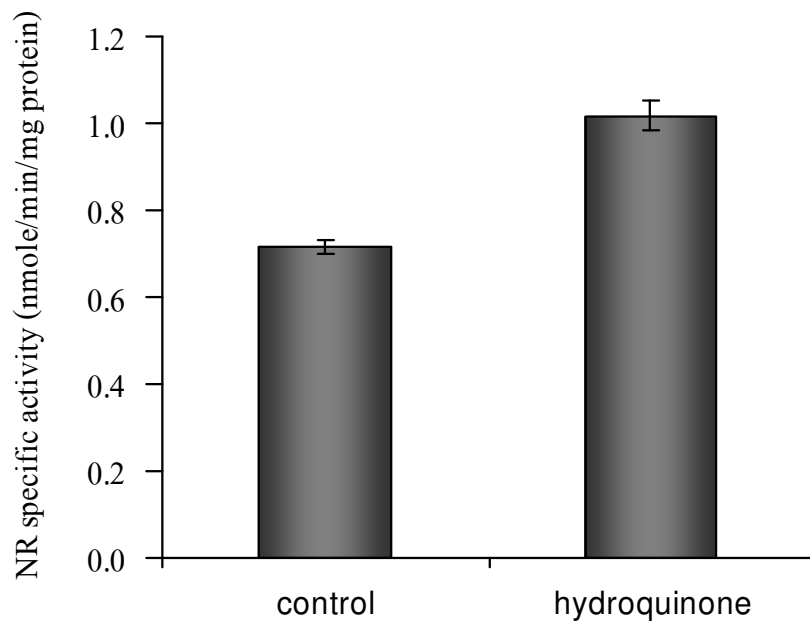


รูปที่ 3.22 ผลของ FAD และ molybdenum ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสวิเคราะห์แอกติวิตีโดยการเติม FAD หรือ molybdenum และ FAD ร่วมกับ molybdenum อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ในสารผสมสำหรับวิเคราะห์แอกติวิตี

3.6.2 ผลของ Hydroquinone ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีคักเทสใน

สำหรับ *Synechococcus* sp.

เมื่อเติมสารให้อิเล็กตรอน hydroquinone ลงในสารผสมสำหรับวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ พบว่า hydroquinone มีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์แตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุมที่ไม่มีสารดังกล่าว ($p < 0.05$) (ตารางที่ 13 ภาคผนวก) คือ แอกติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อมี hydroquinone แสดงว่าเอนไซม์ NR สามารถใช้อิเล็กตรอนจากสารดังกล่าวได้ (รูปที่ 3.23)

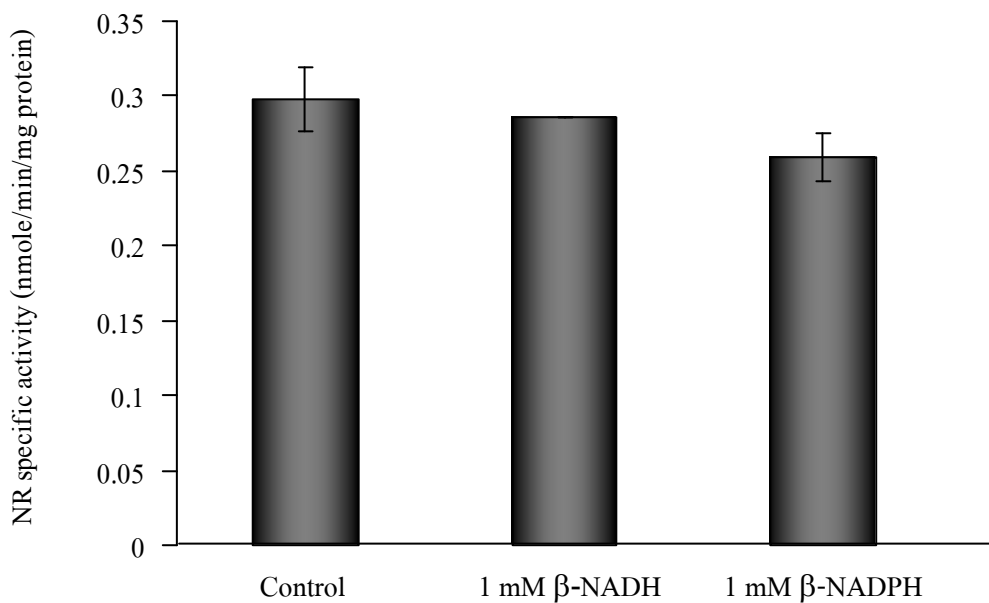


รูปที่ 3.23 ผลของ Hydroquinone ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีคักเทส วิเคราะห์แอกติวิตีโดยการเติม 20 μ M Hydroquinone ในสารผสมสำหรับวิเคราะห์แอกติวิตี

3.6.3 ผลของ β -NADH และ β -NADPH ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในไตรตรีดักเทส

ในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

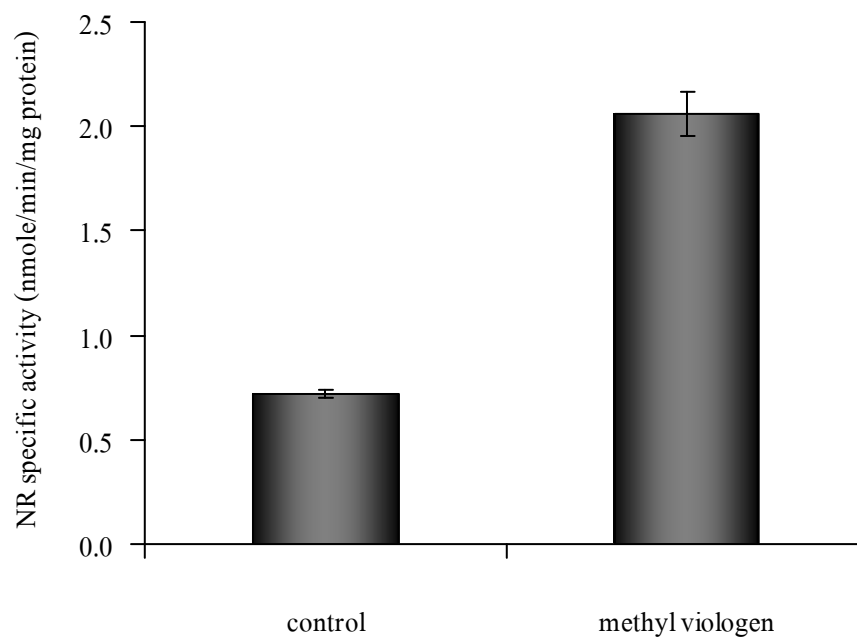
จากการศึกษาการเติม β -NADH และ β -NADPH ในสารผสมสำหรับวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์ NR ในสารสกัดสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. ไม่จำเป็นต้องรับอิเล็กตรอนจาก β -NADH หรือ β -NADPH เพราะแม้ว่าในสารผสมสำหรับวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ไม่มี NADH และ NADPH แอกติวิตีของเอนไซม์ยังคงมีอยู่ ดังรูปที่ 3.24 โดย NADH ที่อยู่ในสารผสมสำหรับวิเคราะห์แอกติวิตีไม่มีผลให้แอกติวิตีแตกต่างจากชุดควบคุม แต่ NADPH มีผลแอกติวิตีของเอนไซม์แตกต่างจากชุดควบคุม ($p < 0.05$) (ตารางที่ 14) โดย NADPH มีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลง



รูปที่ 3.24 ผลของ NADH และ NADPH ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในไตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. วิเคราะห์แอกติวิตีโดยการเติม NADH และ NADPH ในสารผสมสำหรับวิเคราะห์แอกติวิตี

3.6.4 ผลของ Methyl viologen ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

จากการศึกษาเปรียบเทียบแอกติวิตีของเอนไซม์ระหว่างสภาวะที่เติม methyl viologen ที่ถูกรีดิวซ์ด้วย sodium dithionite กับสภาวะที่ไม่เติม methyl viologen พบว่า methyl viologen มีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าสภาวะที่ไม่เติมอย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 15 ภาคผนวก) แสดงว่า methyl viologen สามารถให้อิเล็กตรอนแก่เอนไซม์ NR ได้จึงส่งผลให้การเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์โดยเอนไซม์เกิดได้ดีขึ้น (รูปที่ 3.25)

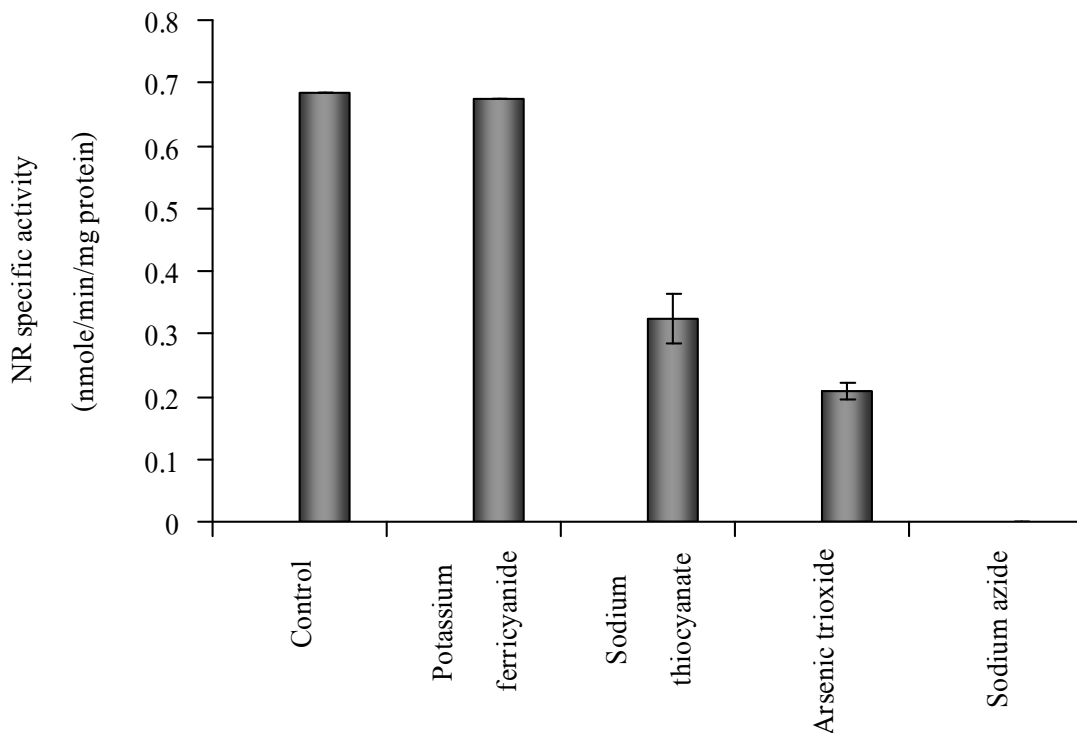


รูปที่ 3.25 ผลของ Methyl viologen ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

3.6.5 ผลของ Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), Sodium thiocyanate (NaSCN), Arsenic trioxide (As_2O_3) และ Sodium azide (NaN_3) ต่อค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ ไนเตรตรีดักเทส

จากการศึกษาผลของสารยับยั้งแอกติวิตี (inhibitor) ต่อเอนไซม์ NR พบว่า Sodium thiocyanate, Arsenic trioxide และ Sodium azide มีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16 ภาคผนวก) โดย Sodium thiocyanate, Arsenic trioxide และ Sodium azide ยับยั้งแอกติวิตีได้ 52.4, 69.6 และ 100 % ตามลำดับ แต่ Potassium ferricyanide ไม่มีผลยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ดังรูปที่

3.26

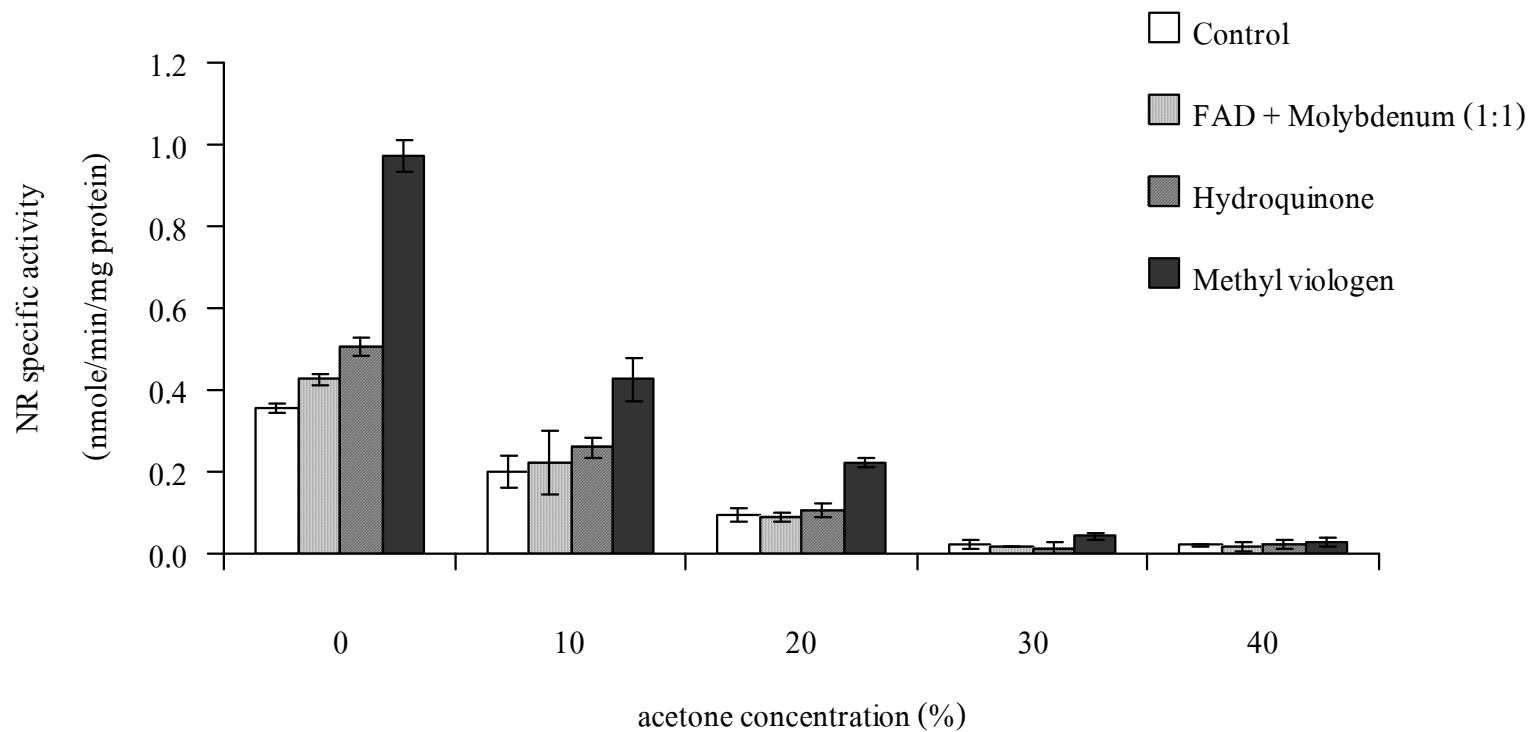


รูปที่ 3.26 ผลของสารยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

3.6.6 ผลของอะซีโตนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรต

รีดักเทส

จากการศึกษาผลของอะซีโตนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในบัฟเฟอร์ (50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT) พบว่า อะซีโตนไม่สามารถสกัดเอนไซม์ที่ติดกับเมมเบรนออกได้ เนื่องตรวจพบแอกติวิตีของเอนไซม์เฉพาะในส่วนของเมมเบรนเท่านั้น และเมื่อสกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของอะซีโตนเพิ่มขึ้นส่งผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 3.27 และตารางภาคผนวกที่ 17) คือที่ระดับความเข้มข้นของอะซีโตนเท่ากับ 10, 20, 30 และ 40 % แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลง 32, 75, 92 และ 95 % ตามลำดับ เมื่อเติมสารให้อิเล็กตรอนคือ สารผสมของ FAD และ molybdenum อัตราส่วน 1:1, Hydroquinone และ Methyl viologen แก่สารสกัดเอนไซม์พบว่า สารให้อิเล็กตรอนดังกล่าวมีผลให้แอกติวิตีของสารสกัดเอนไซม์ที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่ไม่มีอะซีโตน และบัฟเฟอร์ที่มีอะซีโตนความเข้มข้น 10 % เพิ่มขึ้นอย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ 26, 49 และ 200 % สำหรับสารสกัดเอนไซม์ที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของอะซีโตน 10 % แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลง 28, 48 และ 70 % ขณะที่สารสกัดที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของ อะซีโตน 20 และ 30 % พบว่าเฉพาะสารให้อิเล็กตรอน Methyl viologen เท่านั้นที่ส่งผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของอะซีโตน 40 % ไม่สามารถรับอิเล็กตรอนจากสารให้อิเล็กตรอนตัวใดได้ เนื่องจากเมื่อเติมสารให้อิเล็กตรอนต่าง ๆ แอกติวิตีของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุม

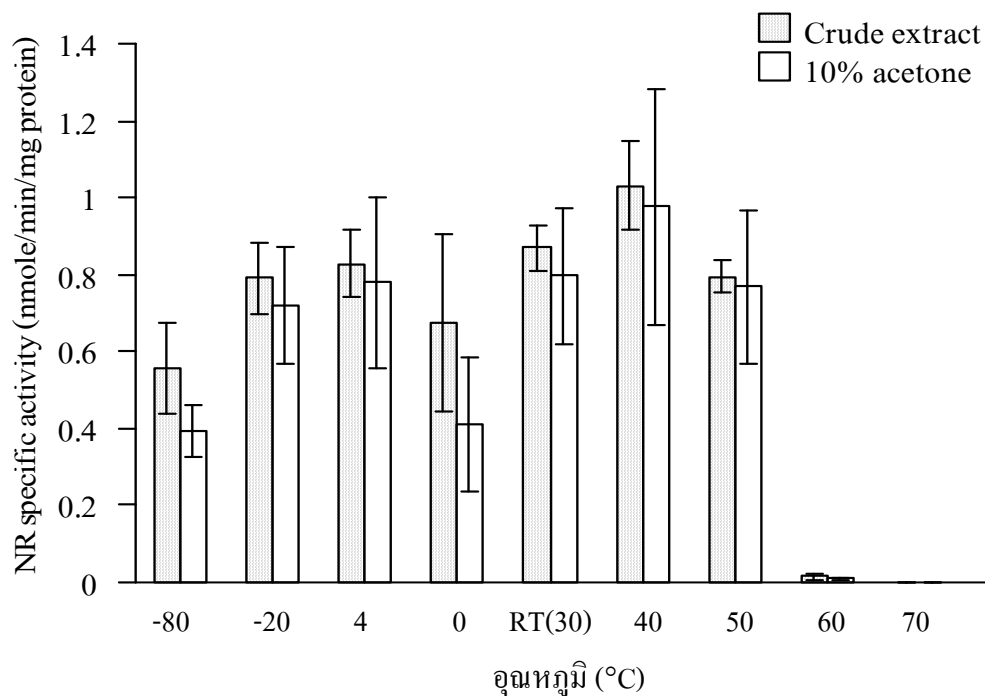


รูปที่ 3.27 แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเตสของสาหร่ายเมื่อทำการสกัดด้วย acetone ที่ความเข้มข้นต่างๆ และใส่สารให้อิเล็กตรอนต่าง ๆ (สารผสมของ FAD+Mo (1:1), Hydroquinone และ Methylviologen) ในสารผสมสำหรับวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์

3.6.7 ผลการศึกษาความเสถียรของสารสกัดเอนไซม์ในเตรตรีคกเทศเมื่อถูกบ่มที่

อุณหภูมิต่าง ๆ

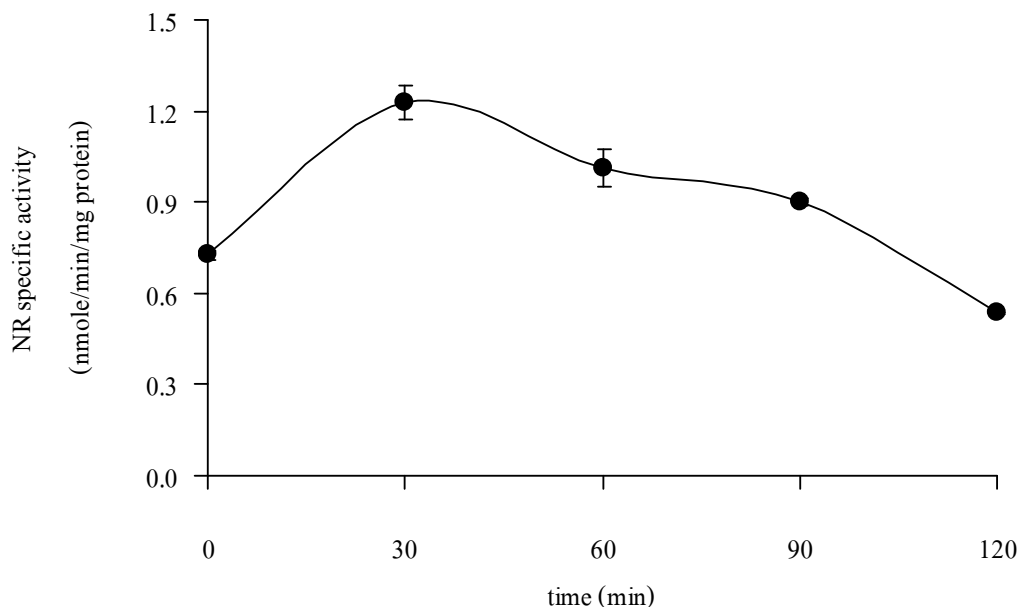
เมื่อนำสารสกัดเอนไซม์ที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH pH 7.5 และบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH pH 7.5 ที่มี 10% acetone ใส่หลอดขนาด 1.5 ml ปริมาตร 300 μ l บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ -80, -20, 0, 4, RT(30), 40, 50, 60 และ 70 $^{\circ}$ C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดวิเคราะห์แอกติวิตีพบว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 18 ภาคผนวก) โดยที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}$ C สารสกัดเอนไซม์ NR สามารถทำงานได้ดีที่สุดและสูงกว่าชุดควบคุม(อุณหภูมิห้อง,RT) ทั้งในสารสกัดที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH pH 7.5 และบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH pH 7.5 ที่มี 10% acetone ดังรูปที่ 3.28 แต่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่านี้มีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงและที่อุณหภูมิ 70 $^{\circ}$ C เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้เลย ขณะอุณหภูมิต่ำกว่า RT มีผลให้แอกติวิตีลดลงเช่นกัน โดย -80 $^{\circ}$ C มีผลให้แอกติวิตีต่ำสุด รองลงมาคือ 0, -20 และ 4 $^{\circ}$ C ตามลำดับ



รูปที่ 3.28 ผลการศึกษาความเสถียรของสารสกัดหยาบเอนไซม์ในเตรตรีคกเทศที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH pH 7.5 และ MOPS-NaOH pH 7.5 ที่มี 10% acetone เมื่อถูกบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

3.6.8 ผลการศึกษาความเสถียรของสารสกัดเอนไซม์เมื่อถูกบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

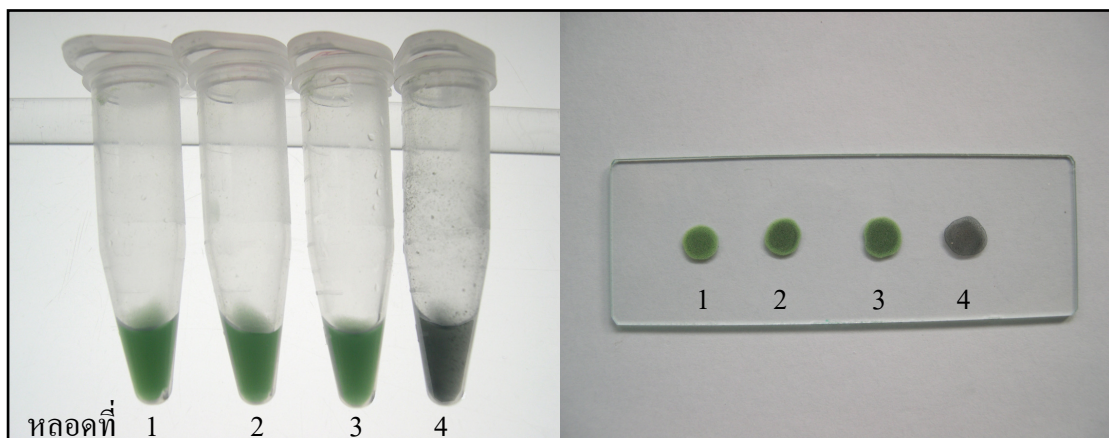
เมื่อได้ผลการศึกษาความเสถียรของสารสกัดเอนไซม์ NR ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังข้อที่ 3.6.9 จึงได้ทำการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มต่างกันต่อแอกติวิตีของเอนไซม์พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มต่างกันมีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 19 ภาคผนวก) โดยเมื่อบ่มเป็นเวลา 30, 60 และ 90 นาที มีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.230 ± 0.056 , 1.010 ± 0.063 , 0.901 ± 0.010 nmole/min/mg protein ตามลำดับ และโดยชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.726 ± 0.017 nmole/min/mg protein แต่ที่เวลา 120 นาที มีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ NR ลดลงเหลือ 0.534 ± 0.003 nmole/min/mg protein แสดงให้เห็นว่า การบ่มสารสกัดก่อนวิเคราะห์แอกติวิตีที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) ทำให้เอนไซม์ NR ในสาหร่าย *Synechococcus* sp. ทำงานได้ดีขึ้นและดีที่สุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที แต่ถ้าบ่มนานถึง 2 ชั่วโมงจะมีผลให้เอนไซม์เสถียรภาพจึงทำงานได้น้อยลง (รูปที่ 3.29)



รูปที่ 3.29 แอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสเมื่อบ่มสารสกัดที่อุณหภูมิ 40 °C ที่เวลาต่าง ๆ กัน

3.6.9 ผลการศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบด้วยวิธี ELISA แบบดัดแปลงตามวิธีของ Towbin และคณะ (1979)

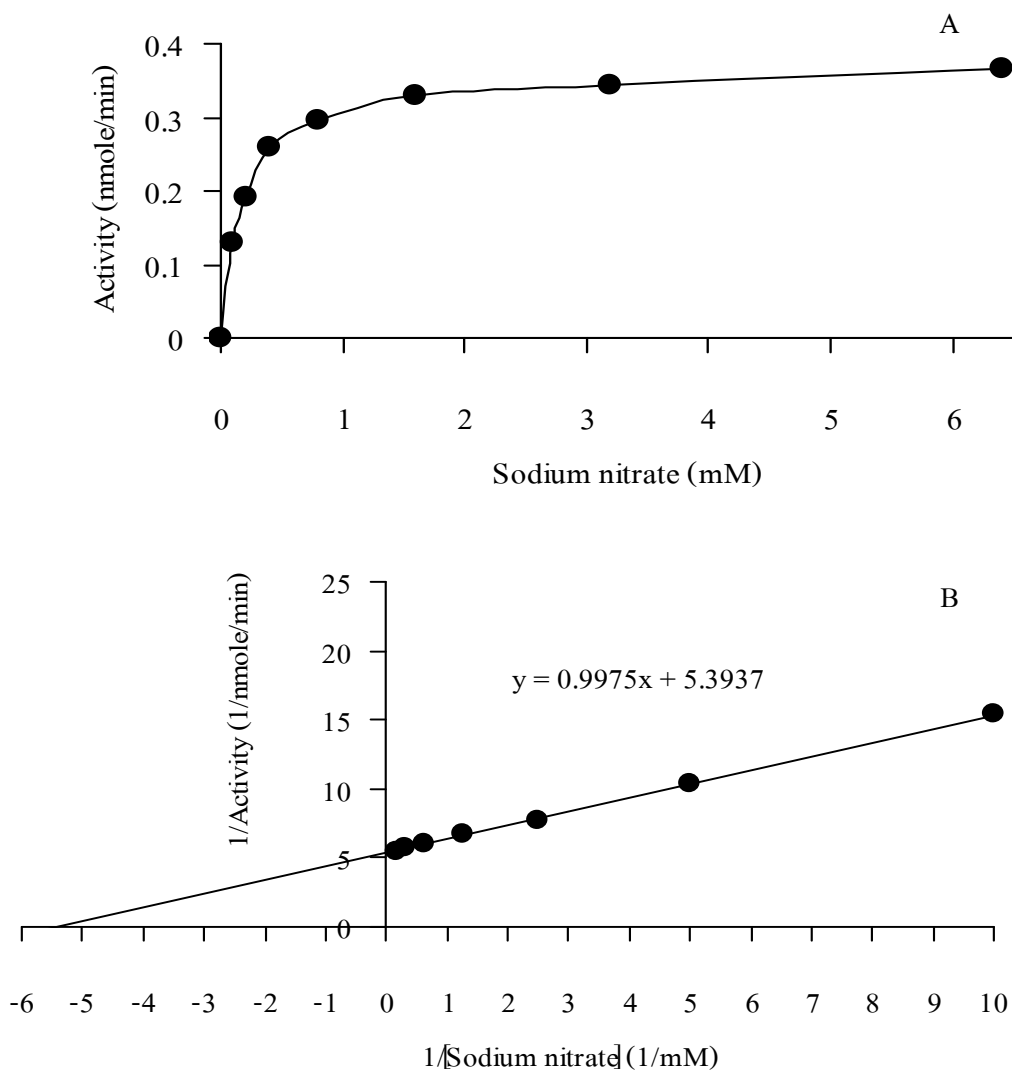
เมื่อนำเมมเบรนของเซลล์สาหร่ายซึ่งมีเอนไซม์ NR เกาะติดอยู่มาทำปฏิกิริยา cross reaction กับแอนติบอดีต่อ เอนไซม์ NR ของข้าวโพด ในการศึกษาที่แบ่งชุดทดสอบออกเป็นสี่หลอด ๆ ละ 3 ซ้ำ โดยหลอดที่ 1 ไม่มีการบ่มด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์ NR จากข้าวโพด (1° antibody) และแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับสับสเตรตของเอนไซม์ alkaline phosphatase (2° antibody) หลอดที่ 2 บ่มด้วย 1° antibody เพียงอย่างเดียว หลอดที่ 3 บ่มด้วย 2° antibody เพียงอย่างเดียว และหลอดที่ 4 บ่มทั้ง 1° antibody และ 2° antibody และทุกหลอดย้อมด้วยสับสเตรตของเอนไซม์ alkaline phosphatase ตามวิธีการในข้อที่ 2.4.12.11 พบว่า หลอดที่ 1, 2 และ 3 ไม่เกิดสีม่วง ส่วนหลอดที่ 4 เกิดสีม่วงชัดเจน (รูปที่ 3.30) ซึ่งแสดงถึงการเกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับเมมเบรนของเซลล์สาหร่ายซึ่งมีเอนไซม์ NR เกาะติดอยู่ ดังนั้นการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวจะต้องมีเอนไซม์ NR, 1° antibody, 2° antibody และสับสเตรตของเอนไซม์ alkaline phosphatase นอกจากนี้จากผลการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าในส่วนของเมมเบรนของสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp. ที่ทำการศึกษามีเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสเกาะติดอยู่ และโครงสร้างของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสดังกล่าวมีส่วนที่เหมือนกับเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในข้าวโพด



รูปที่ 3.30 การเกิด cross reaction ระหว่างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสจากข้าวโพดกับเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย

3.7 จลนศาสตร์

จากการศึกษาผลของสับสเตรต NaNO_3 ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส โดยทำปฏิกิริยากับ NaNO_3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 mM พบว่า เอนไซม์ไนเตรรีดักเทส มีจลนศาสตร์แบบ hyperbola (รูปที่ 3.31 A) และจากการหาค่า V_{\max} และ K_m โดยการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk ระหว่างค่า $1/V$ และ $1/[S]$ (รูปที่ 3.31 B) พบว่า NR มีค่า K_m สำหรับ NaNO_3 เท่ากับ $185 \mu\text{M}$ และค่า V_{\max} เท่ากับ $200 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein

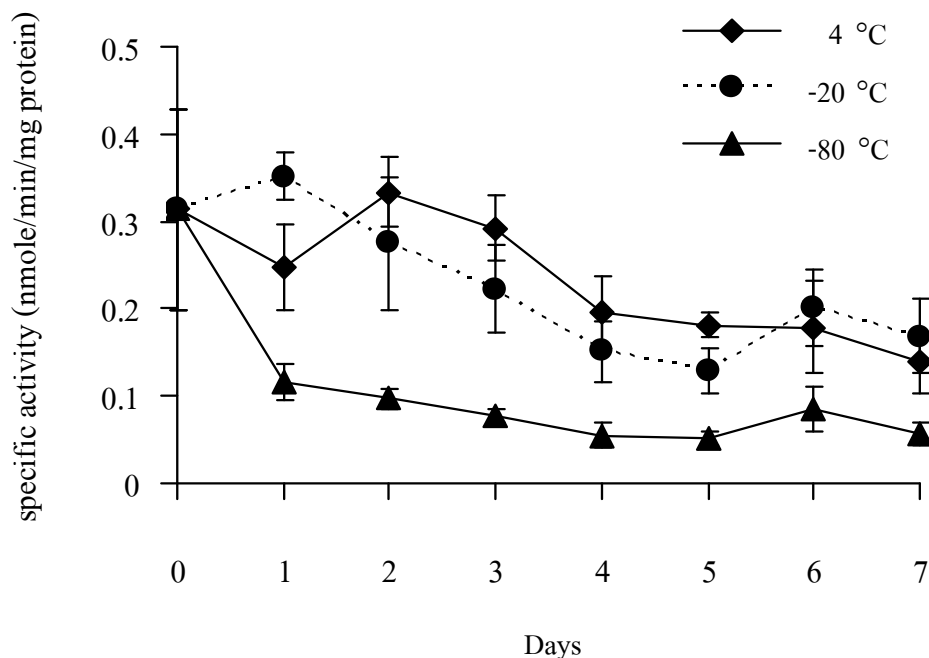


รูปที่ 3.31 จลนศาสตร์ของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส แบบ Hyperbola (A) และแบบ Lineweaver-Burk (B)

3.8 ผลการศึกษาวิธีการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ในตรตรีดักเทศ

3.8.1 ผลของการเก็บรักษาสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิต่างๆ

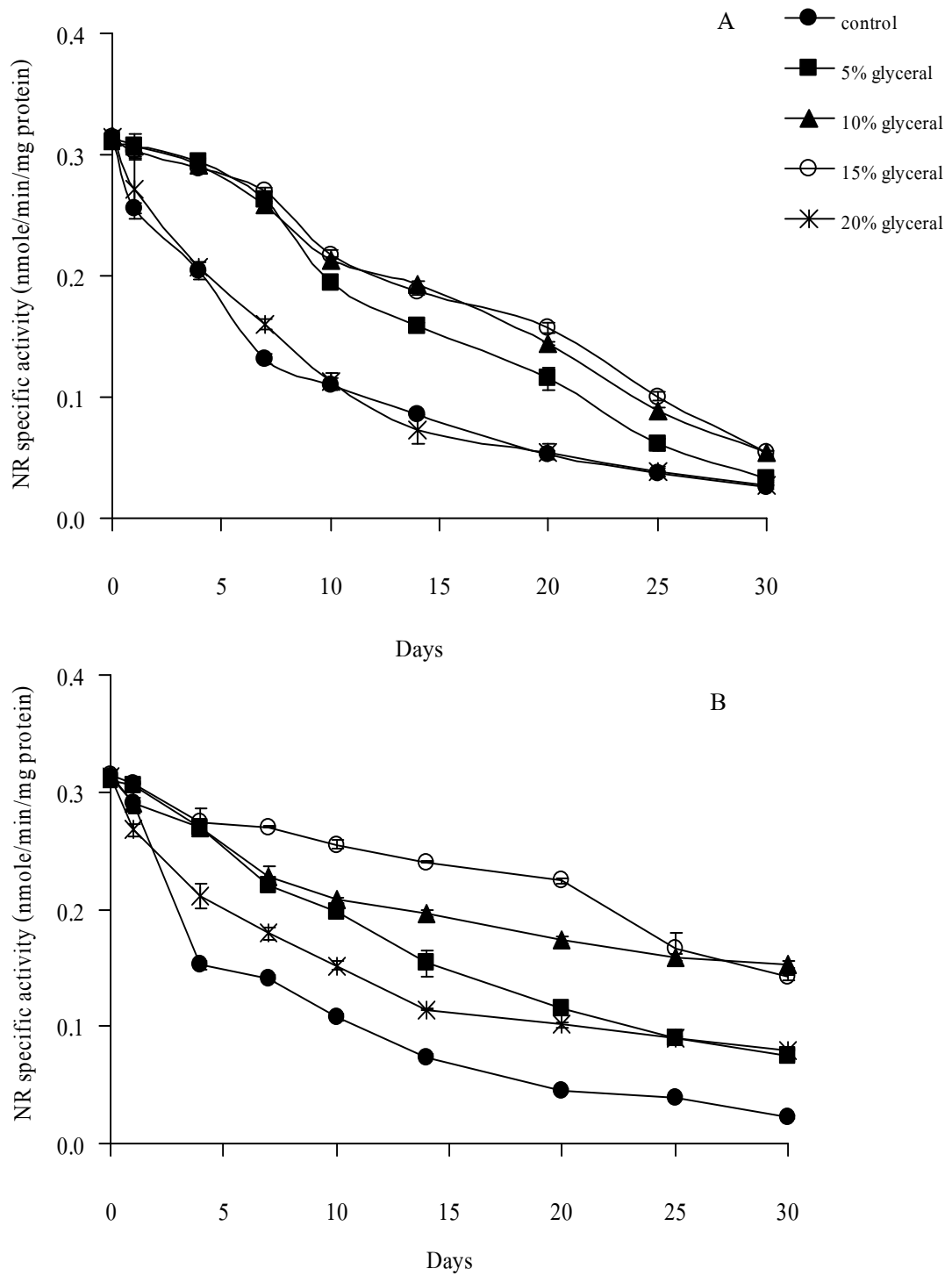
เมื่อเก็บสารสกัดหยาบเอนไซม์ NR ที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH pH 7.5 ซึ่งมีค่าแอกติวิตีเท่ากับ 0.314 ± 0.115 nmole/min/mg protein เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างกันคือ อุณหภูมิห้อง, 4, -20 และ -80 °C เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์แอกติวิตีทุกวันเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแอกติวิตีของเอนไซม์ (รูปที่ 3.32) พบว่าไม่สามารถเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ เนื่องจากเมื่อทำการตรวจสอบโดยนำสารสกัดที่เก็บไว้มาฉีดลากบนอาหารแข็งสำหรับแบคทีเรีย (nutrient agar) แล้วบ่มไว้ 1 คืน พบว่าหลังจาก 2 วันเริ่มทำการศึกษาในงานเพาะเชื้อมีโคโลนีของแบคทีเรียเจริญ แสดงถึงการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจึงทำให้ค่าแอกติวิตีที่ได้ไม่ใช่แอกติวิตีของสารสกัดเอนไซม์ NR ในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. เพียงอย่างเดียว ขณะที่อุณหภูมิต่ำอื่นไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิมิผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 20 ภาคผนวก) และเมื่อเวลาผ่านไปแอกติวิตีของเอนไซม์ลดลง โดยที่ในวันที่ 7 แอกติวิตีของเอนไซม์ที่เก็บไว้ที่ 4 °C ลดลง 56%, -20 °C ลดลง 46% และที่ -80 °C ลดลงถึง 82 % แสดงว่าที่อุณหภูมิต่ำ -80 °C มีผลให้แอกติวิตีลดลงมากที่สุดดังนั้นที่อุณหภูมิดังกล่าวจึงไม่เหมาะสมที่จะเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ได้



รูปที่ 3.32 แอกติวิตีของสารสกัดหยาบเอนไซม์ในตรตรีดักเทศในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างกัน 4, -20 และ -80 °C เป็นระยะเวลา 7 วัน

3.8.2 ผลของการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ในตรตรีดักเทสในกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

การทดลองนี้เป็นการเปรียบเทียบการเก็บรักษาเอนไซม์ในบัฟเฟอร์สกัด (50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT) กับการเก็บรักษาเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % ที่อุณหภูมิ 4 และ -20 °C เป็นเวลา 1 เดือน โดยวิเคราะห์แอกติวิตีในวันที่ 1, 4, 7, 10, 14, 20, 25 และ 30 ของเดือน พบว่า เมื่อเก็บสารสกัดไว้ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลและอุณหภูมิต่างกัน ส่งผลให้แอกติวิตีมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 21 ภาคผนวก) โดยสารสกัดที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ไม่มีกลีเซอรอลผสมอยู่มีแอกติวิตีต่ำและลดลงอย่างรวดเร็วกว่าสารสกัดที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอลทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ -20 °C และเมื่อเทียบเทียบในแต่ละวันพบว่า ที่อุณหภูมิ 4 และ -20 °C ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่สามารถเก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์ได้ดีเท่ากับ 10% และ 15% (รูปที่ 3.33 (A) และ (B)) แต่บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอล 15 % ที่อุณหภูมิ -20 °C ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 25 สามารถรักษาแอกติวิตีได้ดีที่สุด แต่ในวันที่ 30 พบว่า บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอล 10 % ที่อุณหภูมิ -20 °C แอกติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุด ขณะที่บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงสุดคือ 20 % มีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว

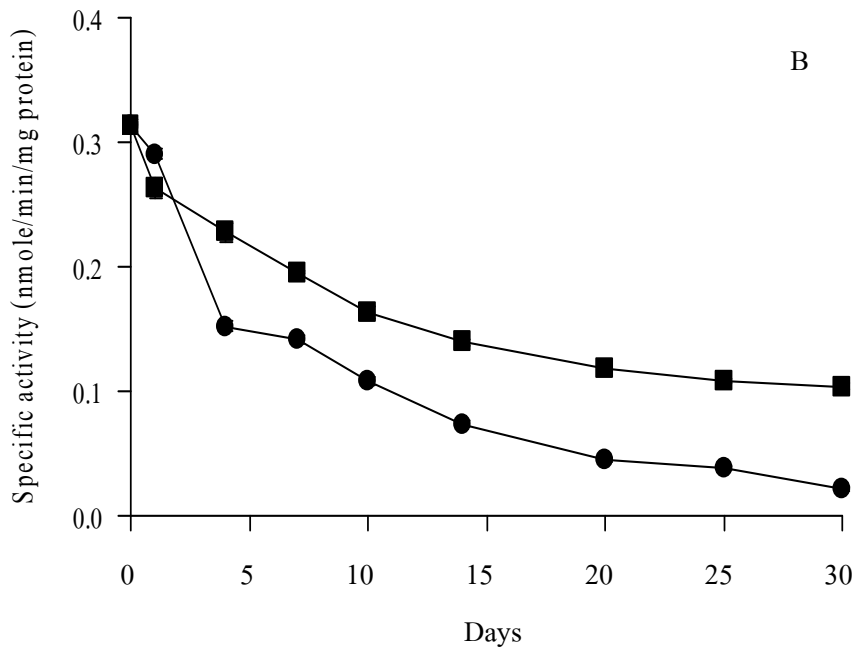
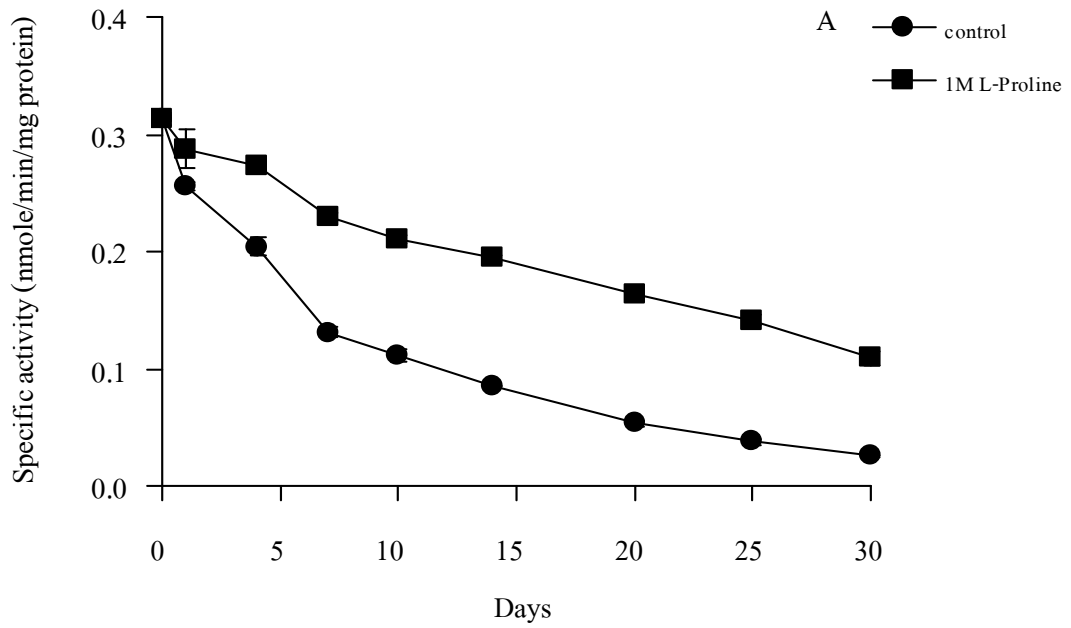


รูปที่ 3.33 ผลของอุณหภูมิและการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอ็นไซม์ในเตรตรีดักเทสในกลีเซอรอล

(A) อุณหภูมิ 4 °C และ (B) อุณหภูมิ -20 °C

3.8.3 ผลของการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสใน L-Proline ที่ระดับความเข้มข้น 1 โมลาร์

จากการทดลองนี้เป็นการเปรียบเทียบการเก็บรักษาเอนไซม์ในบัฟเฟอร์สกัด (50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT) กับการเก็บรักษาเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี L-Proline ความเข้มข้น 1 M ที่อุณหภูมิ 4 และ -20 °C เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า เมื่อเก็บสารสกัดไว้ในบัฟเฟอร์ที่มีและไม่มี L-Proline และอุณหภูมิต่างกัน ส่งผลให้แอกติวิตีมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 22 ภาคผนวก) ในสารสกัดเอนไซม์ที่เก็บในบัฟเฟอร์ที่ไม่มี L-Proline แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วและต่ำกว่าสารสกัดเอนไซม์ที่เก็บในบัฟเฟอร์ที่มี L-Proline ทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ -20 °C แสดงว่า L-Proline ที่ผสมในบัฟเฟอร์สามารถเก็บรักษาแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ดีกว่าบัฟเฟอร์ที่ไม่มี L-Proline (รูปที่ 3.34 (A) และ (B))



รูปที่ 3.34 ผลของอุณหภูมิและการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอ็นไซม์ในเตรตรีดักเทสใน L-Proline

(A) อุณหภูมิ 4 °C และ (B) อุณหภูมิ -20 °C

3.8.4 เก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์แบบแห้งจากวิธีการ freeze dry

เมื่อนำสารสกัดเอนไซม์ NR ที่ใช้บัฟเฟอร์สกัดต่างกันคือ ชุดที่ 1 สกัดด้วย MOPS-NaOH pH 7.5 และชุดที่ 2 สกัดด้วย MOPS-NaOH pH 7.5 ที่มี 10% acetone และมีแอกติวิตีของเอนไซม์ NR เท่ากับ 0.198 ± 0.003 และ 0.129 ± 0.019 nmole/min/mg protein ตามลำดับ มาทำ freeze-dry ด้วยเครื่อง freeze-dryer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้สารสกัดแห้งนำไปละลายกลับ โดยแบ่งสารสกัดแต่ละชุดออกเป็น 2 ส่วน ซึ่งส่วนที่ 1 ละลายด้วย MOPS-NaOH pH 7.5 และส่วนที่ 2 ละลายด้วย MOPS-NaOH pH 7.5 ที่มี 5% กลีเซอรอลพบว่า ส่วนที่ละลายด้วย MOPS-NaOH pH 7.5 ชุดที่ 1 มีค่าแอกติวิตีเท่ากับ 0.006 ± 0.000 nmole/min/mg protein และชุดที่ 2 มีค่าแอกติวิตีเท่ากับ 0.013 ± 0.002 nmole/min/mg protein และส่วนที่ 2 ซึ่งละลายด้วย MOPS-NaOH pH 7.5 ที่มี 5% กลีเซอรอล ชุดที่ 1 มีค่าแอกติวิตีเท่ากับ 0.008 ± 0.010 nmole/min/mg protein และชุดที่ 2 มีค่าแอกติวิตีเท่ากับ 0.032 ± 0.002 nmole/min/mg protein (ตารางที่ 3.4) แสดงว่า ไม่สามารถเก็บสารสกัดเอนไซม์ NR โดยการทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze-dry ได้

ตารางที่ 3.4 เปรียบเทียบแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีศกเทศก่อนและหลังการทำ freeze-dry ระหว่างสารสกัดที่สกัดและละลายสารสกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน

ข้อเปรียบเทียบ	ก่อนทำ freeze dry		หลังทำ freeze dry			
	สกัดเอนไซม์ด้วย MOPS-NaOH buffer	สกัดเอนไซม์ด้วย MOPS-NaOH buffer ที่มี 10% acetone	สกัดเอนไซม์ด้วย MOPS-NaOH buffer		สกัดเอนไซม์ด้วย MOPS-NaOH buffer ที่มี 10% acetone	
			ละลายด้วย MOPS-NaOH buffer	ละลายด้วย MOPS-NaOH buffer ที่มี 5% glycerol	ละลายด้วย MOPS-NaOH buffer	ละลายด้วย MOPS-NaOH buffer ที่มี 5% glycerol
NR specific activity (nmole/min/mg protein)	0.198±0.003	0.129±0.019	0.006±0.000	0.008±0.001	0.013±0.002	0.032±0.002

ค่า NR specific activity ที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

3.9 ผลการศึกษาการโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน nar สำหรับเอนไซม์ NR ในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

3.9.1 ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนส่วนของยีน nar ในสาหร่ายเซลล์เดียวชนิด *Synechococcus* sp.

จากการออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนส่วนของยีน nar ซึ่งแปรเป็นรหัสของเอนไซม์ NR เริ่มจากการรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nar ของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม Cyanobacteria อื่นที่มีการศึกษามาแล้วจากธนาคารยีน (GenBank) โดยผ่านฐานข้อมูล NCBI (National Center For Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) แล้วนำข้อมูลที่ได้มาจัดเรียงและเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม ClustalX (version 1.81) ดังรูปที่ 3.35 จากข้อมูลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nar สำหรับเอนไซม์ NR มีบริเวณอนุรักษ์ (Conserve region) หลายตำแหน่ง จากนั้นเลือกตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ (แถบสีดำ) ดังกล่าว ซึ่งในยีน nar นี้ ได้เลือกบริเวณ CT(C/T)TGTCC(C/T)TA(C/T)TGTGGTGT สำหรับเป็น Forward primer I, บริเวณ TGATGCCAACTCCCGC(C/T)T สำหรับเป็น Forward primer II, บริเวณ GA(A/C)GAGAAC(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)GGA สำหรับเป็น Forward primer III, บริเวณ GTGACATTCGGCGGT(A/G)TT สำหรับเป็น Reverse primer I, บริเวณ GGCATACT(C/T)AC(A/C)GC(A/C/T)GGATT สำหรับเป็น Reverse primer II และบริเวณ TCGGTGGTTCTGCCAGTC สำหรับเป็น Reverse primer III ตามลำดับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ตรงกับลำดับกรดอะมิโนดังนี้ LCPYCG (Forward primer I), DANSRI (Forward primer II), REAGG (Forward primer III), TAECH (Reverse primer I), NPAVSM (Reverse primer II), LAEPP (Reverse primer III) ตามลำดับ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 3.36

Forward domain I

Nostoc : -ATGAGTCAATTTA--CRAAAACCTTTGTCCTTACTGTGGTGTGGCTGGGCTGGAAGTTCACCCCAAGCCCACTTGGCRAAGCA : 87
Trichodesmium : ----ATGAAACTA--CRAAAACGCTTCCCTTATTTGTGGCTAGGGCTGGGATTAAGATATCACCCCAACCAACCCAGGAAAGTA : 84
Oscillatoria : -ATGACTGACTCA--CRAAAACCTTTGTCCTTACTGTGGTGTGGCTGGGCTGGAAGTTCACCCCAAGCCCACTTGGCRAAGCA : 87
Cyanotheca : -ATGACTTACTCTG--CRAAAACCTTCTCCCTTATTTGTGGTGTGGCTGGGCTGGAAGTTCACCCCAAGCCCAACCCAGGTAACCC : 87
Crocosphaera : -ATCACAACTCTA--CRAAAACCTTCTCCCTTATTTGTGGTGTGGCTGGGCTGGAAGTTCACCCCAAGCCCAACCCAGGTAAGCA : 87
Synechococcus : ATGATCAAGCAAAACRAAAACCTTTGTCCTTACTGTGGTGTGGCTGGGCTGGAAGTTC-----TGAAGTTC : 72

Nostoc : ACTAATCGAGATGCTAAGGAAATCCGACTTGGCGGCTGCGGGCGATAAAGCCATCCCTCTACTCAAGGAATGTTTCTCTCAAAAGC : 177
Trichodesmium : ACAATCGGACTACTAAGGTAATCCAACTTGGCAAGTACGGGGCGATCGCTCATCCCTCAGTCAAGGCARAAAGTTCTCTCAAAAGT : 174
Oscillatoria : GTAATCGAGACTCAAGGTTATCCCGTCTGAAAGTTCAGGGCGATCGGAAACATCCCTCAGTCAAGGAATGTTTCTCTCAAAAGT : 177
Cyanotheca : ACCAACCGAGACTCAAGGAAACCCCTTCTGGCAAGTGAAGGGCGATCGGAGTATCCCTCAGTCAAGGAATGTTTCTCTCAAAAGT : 177
Crocosphaera : GTCACCGAGACTCAAGGAAACCCCTTCTGGCAAGTGAAGGGCGATCGGAGTATCCCTCAGTCAAGGAATGTTTCTCTCAAAAGT : 177
Synechococcus : ATCAA--AAATGAACA-----CCACCCCTCAAAAGTTCAGGGCGATCGGCAACATCCCTCAGCTCGGTAAGGTTCTCTCAAAAGC : 153

Nostoc : GGBACGATCGCAAAATCTTTAATAAAAATAGATTACATTCACCBATGTCGAGCTCTTTAGATCAAGAGTTTCGCGCTTATGTTGG : 267
Trichodesmium : GGTACCGTTGGGAAAGCAATGGATAAAGTGGCTTAAGTATCCCAATGATCCCAATACCCCTAGATCAAGCTTTCCTCTTTAATTGG : 264
Oscillatoria : GGBACTATGCGAAATCTTTGCAAAAGTGGATTGCTTTATCCGATGATCCGCAATCTTATAGTAAGCCCTTTCGCGCTTATGTTGG : 267
Cyanotheca : GGBACGTTAGGAAATCTTTGCAAAACCGTCTAATAATACCAATGATCCGCAATCTTCTGATCAATCTTTCCTCTTTAAGTTGG : 267
Crocosphaera : GGBACGTTAGGAAATCTTTGCAAAAGTGGCTTAAGTATCCCAATGATCCCAATACCCCTAGATCAAGCTTTCCTCTTTAAGTTGG : 267
Synechococcus : GGBACCTTGGCAATCCCTCTCAAGACCGCTTACTCTACCCATGATCCGCAATCTCTCAAGATCAATTCAGCGCTTCAAGTTGG : 243

Nostoc : GATGAAGCTTTTATCTCTACCGAGCTTATAAAGAGTCCGGTTCCCGAGGGCCAGAGCGGTTATGATGTATGTTTCGGTCAAG : 357
Trichodesmium : GATGAAGCTTTTATCTCTACCGAGCTTATAAAGAGTCCGGTTTCCTCAAGGGCCAGAGCGGTTATGATGTATGTTTCGGTCAAG : 354
Oscillatoria : GATGAAGCTTTTATCTCTACCGAGCTTATAAAGAGTCCGGTTTCCTCAAGGGCCAGAGCGGTTATGATGTATGTTTCGGTCAAG : 357
Cyanotheca : GATGAAGCTTTTATGAGCCATTGCTCAATCTATTAAACCTTCTCCAGACCAAGGTTCAGAGGTTGTTTATGATGTATGTTTCGGTCAAG : 357
Crocosphaera : GATGAAGCAATGGAGCCATCTCAACCTATGAAAGAGTCCGGTTTCCTCAAGGGCCAGAGCGGTTATGATGTATGTTTCGGTCAAG : 357
Synechococcus : GATGAAGCTTTTATGAGCCATTGCTCAAGAGATCAAAAGGTTAAAGGCAACCTCCGCAAGAGGTTATGATGTATGTTTCGGTCAAG : 333

Forward domain II

Nostoc : TTTCAAACGAAGACTATACATAGCCCAAGGTTATGAAGGCTTCTGGTACTAAATAATTTGATGCCAATCCCGTTATGATG : 447
Trichodesmium : TTTCAAACGAAGACTATAGGTTGGCTCAAAAGTTCGTTTAAAGGATCTCTGGAACTAAATAATTTGATGCCAATCCCGTTATGATG : 444
Oscillatoria : TTTCAAACGAAGACTATATAGCTCAAAATTAATGAAGGCTTCTGGCAAGAAATAATTTGATGCCAATCCCGTTATGATG : 447
Cyanotheca : TTTCAAACGAAGACTATATAGCTCAAAACTCTTAAAGGTTCTTGGAACTAAATAATTTGATGCCAATCCCGTTATGATG : 447
Crocosphaera : TTTCAAACGAAGACTATATACATAGCCCAAAACTCTTAAAGGTTCTCTGGAACTAAATAATTTGATGCCAATCCCGTTATGATG : 447
Synechococcus : TTTCAAACGAAGACTATATACAGCCCAAAACTCTTAAAGGTTCTCTGGAACTAAATAATTTGATGCCAATCCCGTTATGATG : 423

Nostoc : TCTAGTGGTGGTGGGTTTCAATCAAGGTTTGGCTGAGAGGTTCCGCTCTGTTAGAGAGTTGAGTTTACCGTGTGCAATTT : 537
Trichodesmium : TCTTAGCGTGGTGGGTTTCAATCAAGGTTTGGCTGAGAGGTTCCGCTCTGTTAGAGAGTTTGAAGAGCAAGTGTGCAATTT : 534
Oscillatoria : TCTTAGCGTGGTGGGTTTCAATCAAGGTTTGGCTGAGAGGTTCCGCTCTGTTAGAGAGTTTGAAGAGCAAGTGTGCAATTT : 537
Cyanotheca : TCTTAGCGTGGGTTTCAATCAAGGTTTGGCTGAGAGGTTCCGCTCTGTTAGAGAGTTTGAAGAGCAAGTGTGCAATTT : 537
Crocosphaera : TCTTAGCGTGGTGGGTTTCAATCAAGGTTTGGCTGAGAGGTTCCGCTCTGTTAGAGAGTTTGAAGAGCAAGTGTGCAATTT : 537
Synechococcus : TCTTAGCGTGGTGGGTTTCAATCAAGGTTTGGGTCAGAGGTTCCGCTCTGTTAGAGAGCTTGAATTTAACGATTTGCGCTTT : 513

Reverse domain I

Nostoc : TTTATAGGAACTAAACAGCCGAATGTCATCCCATCTTTTAAACGACTAGAGAAATTTCAAAAAAGAACCGC---AAAGTCAAAAT : 624
Trichodesmium : TTTATAGGAACTAAACAGCCGAATGTCATCCCATCTTTTAAACGCTCTCGGGCTCTAAAAAAAGAAATAA---AAAGTCAAAAT : 621
Oscillatoria : TTTATAGGAACTAAACAGCTGAATGTCATCCCATCTTTTAAACGCTCTCGGAAACCAAAAAAATAAACGGCAAGCGAAATG : 627
Cyanotheca : TTTATAGGAACTAAACAGCCGAATGTCATCCCATCTTTTAAACGCTTTCCGGCAACCAAAAAAGAACCGC---AAAGTCAAAAT : 624
Crocosphaera : TTTATAGGAACTAAACAGCCGAATGTCATCCCATCTTTTAAACGCTCTCCCGCTTTTCAAAAAAGAACCGT---AAAGTCAAAAT : 624
Synechococcus : TTTATAGGAACTAAACAGCCGAATGTCATCCCATCTTTTAAACGCTCTCCCGCTTTTCAAAAAAGAACCGTCT---AAAGTCAAAAT : 597

Nostoc : ATTGTGTTGATCCCGAGCGACGCAAGCGGCAATGCGAAGAGTGGCAATTTGCGGATTCGTTCCGGTACAGAAATGATTTGTTTAA : 714
Trichodesmium : ATTGTGTTGATCCCGAGCGACGCAAGAGTGGCAATTTGCGGATTCGTTCCGGTACAGAAATGATTTACTTAAAT : 711
Oscillatoria : GATGATGATGATCCCGAGCGACTACCGCGAAGCTTGGCGATTTCAATTTGCGGATTTAAACCGGTAACGAAATGATTTTAA : 717
Cyanotheca : GATGATGATGATCCCGAGCGACTACCGCGAAGTGGCAATTTGCGGATTTAAACCGGTAACGAAATGATTTTAA : 714
Crocosphaera : GATGATGATGATCCCGAGCGACTACCGCGAAGTGGCAATTTGCGGATTTAAACCGGTAACGAAATGATTTTAA : 714
Synechococcus : ATTGTGTTGATCCCGAGCGACGCAAGAGTGGCGATTTCACTTGGGATCAAAACCGGCTACTGAAATGATTTACTTAA : 687

Nostoc : GGTATGCTTACTTATGATGGCTGGAAGTACTTGCATACCAATGTTATGAGGAGTGCACCGCAACTTTCCGCTTATGCTGACTG : 804
Trichodesmium : GGTATGCTTAAATGCTTACTGATGGGTTTACTGGATGCAAGTTTATGATGAGTGCACCGGAGGCTTCCGCTTAAATGCTTAAAT : 801
Oscillatoria : GGTATGCTTAAATGCTTACTGATGGCTGGGAAATGATGACTTATTTATGATGAGTGCACCAATTTCCGCTTAAATGCTTAAAT : 807
Cyanotheca : GGTATGCTTAAATGCTTACTGATGGCTGGGAAATGATGACTTATTTATGATGAGTGCACCAAACTTCCGCTTAAATGCTTAAAT : 804
Crocosphaera : GGTATGCTTAAATGCTTACTGATGGCTGGGAAATGATGACTTATTTATGATGAGTGCACCAAACTTCCGCTTAAATGCTTAAAT : 804
Synechococcus : GGTATGCTTAAATGCTTACTGATGGGCAAAATGATGACTTATTTATGATGAGTGCACCAAGGCTTTTCAAAATGCTTAAATGCT : 777

820 * 840 * 860 * 880 * 900
Nostoc : ATTCCGCACTATTCCCGGAGCTGTAGCCGHCATCCGGAAATCAGTATTGAAAGATTAGAAACAGGAGCCGTTATTTGGGGTGAATCT : 894
Trichodesmium : ATTCCGCACTATTCCCGGAGCTGTAGCCGHCATCCGGAAATCAGTATTGAAAGATTAGAAACAGGAGCCGTTATTTGGGGAAATCC : 891
Oscillatoria : ATTCCGCACTATTCCCGGAGCTGTAGCCGHCATCCGGAAATCAGTATTGAAAGATTAGAAACAGGAGCCGTTATTTGGGGGAAATCA : 897
Cyanotheca : ATTAGTCACTATTCCCGGAGCTGTAGCCGHCATCCGGAAATCAGTATTGAAAGATTAGAAACAGGAGCCGTTATTTGGGGTAAATCT : 894
Crocosphaera : ATTCCGCACTATTCCCGGAGCTGTAGCCGHCATCCGGAAATCAGTATTGAAAGATTAGAAACAGGAGCCGTTATTTGGGGTGAATCT : 894
Synechococcus : ATTCCGAGAGCTATTCCCGAAGCTGTAGCCGHCATCCGGAAATCAGTATTGAAAGATTAGAAACAGGAGCCGTTATTTGGGGCAATCT : 867

* 920 * 940 * 960 * 980 *
Nostoc : AGGCGGCTACTTTCCTTGTGGTCGATGGGCTGAATCAATCAACAGAGGGACAGGCAAGCTAAGCAACTGATCAATCTGCACCTGATG : 984
Trichodesmium : CAGCAGCTTTTTCCTTGTGGTCGATGGGCTGAATCAATCAACAGAGGGACAGGCAAGCTAAGCAACTGATCAATCTGCACCTGATG : 981
Oscillatoria : CAGCAGCTTCTTTCCTTGTGGTCGATGGGCTGAATCAATCAACAGAGGGACAGGCAAGCTAAGCAACTGATCAATCTGCACCTGATG : 987
Cyanotheca : CAGCAGCTTCTTTCCTTGTGGTCGATGGGCTGAATCAATCAACAGAGGGACAGGCAAGCTAAGCAACTGATCAATCTGCACCTGATG : 984
Crocosphaera : CAGCAGCTTCTTTCCTTGTGGTCGATGGGCTGAATCAATCAACAGAGGGACAGGCAAGCTAAGCAACTGATCAATCTGCACCTGATG : 984
Synechococcus : CAGCAATCTTTTTCCTTGTGGTCGATGGGCTGAATCAATCAACAGAGGGACAGGCAAGCTAAGCAACTGATCAATCTGCACCTGATG : 957

Forward domain III

1000 * 1020 * 1040 * 1060 * 1080
Nostoc : ACTGGACAAATGGGAAACCTGGGCGCGCCCTTTTTCCTTGCACGCGCAAGCAATGCATGGGAGGACCGGAAGCCGGAGGTTGGGA : 1074
Trichodesmium : ACAGGCTGATATAGGAAACCGGGCACAGGCGCCCTTTTTCCTTGCACGCGCAAGCAATGCATGGGAGGACCGGAAGCCGGAGGCTAGCT : 1071
Oscillatoria : ACCGCTGATATAGGAAACCGGGCACAGGCGCCCTTTTTCCTTGCACGCGCAAGCAATGCATGGGAGGACCGGAAGCCGGAGGCTTTCT : 1077
Cyanotheca : ACCGCTGATATAGGAAACCGGGCACAGGCGCCCTTTTTCCTTGCACGCGCAAGCAATGCATGGGAGGACCGGAAGCCGGAGGCTTAGC : 1074
Crocosphaera : ACAGGAGATATAGGAAACCGGGCACAGGCGCCCTTTTTCCTTGCACGCGCAAGCAATGCATGGGAGGACCGGAAGCCGGAGGCTTGT : 1074
Synechococcus : ACCGGGAAATGGGAAACCGGGCGCGCCCTTTTTCCTTGCACGCGCAAGCAATGCATGGGAGGACCGGAAGCCGGAGGCTGGC : 1047

* 1100 * 1120 * 1140 * 1160 *
Nostoc : GATTTATACCTGGCTATCCGCTTTCGAAATCTCCAGCATGGCCAGAGTGTAGGAGTTTGGGGCTTAAACCGACAGATTTCT : 1164
Trichodesmium : GATTTATACCTGGCTATCCGCTTTCGAAATCTCCAGCATGGCCAGAGTGTAGGAGTTTGGGGCTTAAACCGACAGATTTCT : 1161
Oscillatoria : GATTTATACCTGGCTATCCGCTTTCGAAATCTCCAGCATGGCCAGAGTGTAGGAGTTTGGGGCTTAAACCGACAGATTTCT : 1167
Cyanotheca : GATTTATACCTGGCTATCCGCTTTCGAAATCTCCAGCATGGCCAGAGTGTAGGAGTTTGGGGCTTAAACCGACAGATTTCT : 1164
Crocosphaera : GATTTATACCTGGCTATCCGCTTTCGAAATCTCCAGCATGGCCAGAGTGTAGGAGTTTGGGGCTTAAACCGACAGATTTCT : 1164
Synechococcus : GATTTATACCTGGCTATCCGCTTTCGAAATCTCCAGCATGGCCAGAGTGTAGGAGTTTGGGGCTTAAACCGACAGATTTCT : 1137

Reverse domain II

1180 * 1200 * 1220 * 1240 * 1260
Nostoc : CGCAATCCGGTTGACTGTTGGGATGATGACTGCTTGGAAAGTATGCTGTCCGGTTAATTTGGATTTGGACGCTACAAACCGGCT : 1254
Trichodesmium : GATGATCTGGTCCGAGTGTGGGAAATGATGATGCTTTGGAAACCGAAAGAAATGGTTGTTTGGGATTTGGCCGACAAACCGGCT : 1251
Oscillatoria : CCGGAAAGGGTTTGGAGCTATGGGAAATGATGCTTCCGTTTGGAAATCGGAAAGTTGGCTTGGTTGGATCCGGCGACAAACCGGCG : 1257
Cyanotheca : CCGCAAGAGGTTTAAAGGGGATGATGATGCTGGGCGTTAGAAACCGGCGATTTGGCTTTTATGGATTTGGTGGGACAAACCGGCG : 1254
Crocosphaera : CCGCAAGAGGCTGAT : 1254
Synechococcus : CGCAATCCGGTTGACTGTTGGGATGATGACTGCTTGGAAAGTATGCTGTCCGGTTAATTTGGATTTGGACGCTACAAACCGGCT : 1227

Reverse domain I

* 1280 * 1300 * 1320 * 1340 *
Nostoc : GTAAGTATGCCGATTTGAAAGGACTTAAAGGGGTTGTTGGGATGCTCCCTTTACCTTTTACAGAGGCTTATTTACCCACGAAACG : 1344
Trichodesmium : GTAAGTATGCCGATTTGAAAGGACTTAAAGGGGTTGTTGGGATGCTCCCTTTACCTTTTACAGAGGCTTATTTACCCACGAAACG : 1341
Oscillatoria : GTAAGTATGCCGATTTGAAAGGACTTAAAGGGGTTGTTGGGATGCTCCCTTTACCTTTTACAGAGGCTTATTTACCCACGAAACG : 1347
Cyanotheca : GTAAGTATGCCGATTTGAAAGGACTTAAAGGGGTTGTTGGGATGCTCCCTTTACCTTTTACAGAGGCTTATTTACCCACGAAACG : 1344
Crocosphaera : GTAAGTATGCCGATTTGAAAGGACTTAAAGGGGTTGTTGGGATGCTCCCTTTACCTTTTACAGAGGCTTATTTACCCACGAAACG : 1344
Synechococcus : GTAAGTATGCCGATTTGAAAGGACTTAAAGGGGTTGTTGGGATGCTCCCTTTACCTTTTACAGAGGCTTATTTACCCACGAAACG : 1317

1360 * 1380 * 1400 * 1420 * 1440
Nostoc : TCTGCTATAGCCACGTTTGTGCTCCGAGCCCAAGTGGGGTGAAGAAACGTTGCTGATGACAACTCCGAAACGGGTTGTAACCTCTCT : 1434
Trichodesmium : GCTGATATAGCCACGTTTGTGCTCCGAGCCCAAGTGGGGTGAAGAAACGTTGCTGATGACAACTCCGAAACGGGTTGTAACCTCTCT : 1431
Oscillatoria : GCTGATATAGCCACGTTTGTGCTCCGAGCCCAAGTGGGGTGAAGAAACGTTGCTGATGACAACTCCGAAACGGGTTGTAACCTCTCT : 1437
Cyanotheca : TCCGATATAGCCACGTTTGTGCTCCGAGCCCAAGTGGGGTGAAGAAACGTTGCTGATGACAACTCCGAAACGGGTTGTAACCTCTCT : 1434
Crocosphaera : GCAACTATAGCCACGTTTGTGCTCCGAGCCCAAGTGGGGTGAAGAAACGTTGCTGATGACAACTCCGAAACGGGTTGTAACCTCTCT : 1434
Synechococcus : TCTGATATAGCCACGTTTGTGCTCCGAGCCCAAGTGGGGTGAAGAAACGTTGCTGATGACAACTCCGAAACGGGTTGTAACCTCTCT : 1407

* 1460 * 1480 * 1500 * 1520 *
Nostoc : CAAAGCTTTCCGCAACCAAGGAAAGCTTAAAGCAGATTTGGGAAATTTTGGCTGAGCTTGGCCGAGATTAGGTTTGAAGAAAGCTTC : 1524
Trichodesmium : CAGGCTTTCCGCAACCAAGGAAAGCTTAAAGCAGATTTGGGAAATTTTGGCTGAGCTTGGCCGAGATTAGGTTTGAAGAAAGCTTC : 1521
Oscillatoria : CAGGCTTTCCGCAACCAAGGAAAGCTTAAAGCAGATTTGGGAAATTTTGGCTGAGCTTGGCCGAGATTAGGTTTGAAGAAAGCTTC : 1527
Cyanotheca : CAGGCTTTCCGCAACCAAGGAAAGCTTAAAGCAGATTTGGGAAATTTTGGCTGAGCTTGGCCGAGATTAGGTTTGAAGAAAGCTTC : 1524
Crocosphaera : CAGGCTTTCCGCAACCAAGGAAAGCTTAAAGCAGATTTGGGAAATTTTGGCTGAGCTTGGCCGAGATTAGGTTTGAAGAAAGCTTC : 1524
Synechococcus : CAGGCTTTCCGCAACCAAGGAAAGCTTAAAGCAGATTTGGGAAATTTTGGCTGAGCTTGGCCGAGATTAGGTTTGAAGAAAGCTTC : 1497

1540 * 1560 * 1580 * 1600 * 1620
Nostoc : GCGTTGCTAAGCTGGGTTGAGCTTATAGCCGATTTCCGCAATTAACCAAAATCCGCTTCCGATATGACAGGCTATCAGTCAAGAGGAA : 1614
Trichodesmium : AATTTGCTGACTCGGAACTGTCCAGAGGCTTTTGGAAATTAACACCGGATCCGCTTCCGATATGACAGGCTATCAGTCAAGAGGAA : 1611
Oscillatoria : AACTTTGCCAATTCGCGAGCTTATAGCCGATTTACCCAAATTAACCAAAAGCTCCCTTCCGACAAACTGGGATCCGCTCAAGAGGAA : 1617
Cyanotheca : GCGTTAAGTTCGGCCAGGCTTATAGCCGATTTCCGCAATTAACCAAAATCCGCTTCCGATATGACAGGCTATCAGTCAAGAGGAA : 1614
Crocosphaera : AGTTCGCAACTCCGCAACCAAGGAAAGCTTATAGCCGATTTCCGCAATTAACCAAAATTAACCAAAAGCTCCCTTCCGACAAACTGGG : 1614
Synechococcus : CAGGCTTTGCTAAGCTGGGTTGAGCTTATAGCCGATTTCCGCAATTAACCAAAATCCGCTTCCGATATGACAGGCTATCAGTCAAGAGGAA : 1587

```

*      1640      *      1660      *      1680      *      1700      *
Nostoc      : TT---GACACAGGGCCCACTCAATGGCCCTACCCAGCCAAAGAAATAGACTCAGTATTTATCGATACTGAAAAGGACTCTTAAGTTTT : 1701
Trichodesmium : CTTCAAGAAAAGGTCGACTCAATGGCCCTGTCCCTG----ATAGTAGTGG-GTATCT-----GAGG----- : 1670
Oscillatoria : TTGGGAGCAGAGGGCCCACTACATGGCCCTGTCCCTGAAGAGCAGAGAGAA--ATATG-----GGGT----- : 1680
Cyanotheca  : CTTGCTCAGCAGGGCCCTTGCATGGCCCTAATCCCTAT-CAATGCCATCTCCAGAGGGGAGAGAAAAGAAACA : 1691
Crocosphaera : TTACGCAGATAGGGACCTTTGCATGGCCCTAATCCCTAT-ACTTGGCCCTCTCCAGAGGAGAGAGTTAGACGACA----- : 1691
Synechococcus : TTGGCCACCGAGGGCCCACTCAATGGCCCTGTCCCTCAATGAGACCAACT--GCGATCCAGAAAACAACAGCGAACCCGGGTTTAT : 1675

*      1720      *      1740      *      1760      *      1780      *      1800
Nostoc      : CAGCCAGAAGAAGAACTTTCTCTGACAAGAAGCCGAGAGAAGCGTAAGTACCATACCTCAGATGGGAAAACGGCTTTACACAGAA : 1791
Trichodesmium : TTTTGGATTAATAACCCCGAAGCCAGGGCCGAGTTTGGAGCATATTAATCTCAGGACTGGCAGAACCCCTAAACCTGATTAACAGAC : 1686
Oscillatoria : -----GGCTCTGATTAACAGAC-----AGGCTTTACACAGAA : 1695
Cyanotheca  : -----AAATCGCCTAATAAAGCATTTACACAGAA : 1722
Crocosphaera : -----AAACCCCACTAATAAAGCATTTACACAGAA : 1722
Synechococcus : TGC-----AAAATTTATCCACCAGGACGACCCCTTAGGGCAACGGCTTTACACAGAC : 1731

*      1820      *      1840      *      1860      *      1880      *
Nostoc      : TTTAGCCTTTCATACCCCGAAGCCAGGGCTCAATTTGGGGCATAATCTCAAAGGCATGGCAGAACCCAGACCCGAGATTAACCTTT : 1881
Trichodesmium : TTTTGGATTAATAACCCCGAAGCCAGGGCCGAGTTTGGAGCATATTAATCTCAGGACTGGCAGAACCCCTAAACCTGATTAACAGAC : 1776
Oscillatoria : TTTAGCCTTTCATACCCCGAAGCCAGGGCCGAGTTTGGGGCATAATCTCAAAGGCATGGCAGAACCCAGACCCGAGATTAACCTTT : 1785
Cyanotheca  : TTTAGCCTTTCATACCCCGAAGCCAGGGCCGAGTTTGGGGCATAATCTCAAAGGCATGGCAGAACCCAGACCCGAGATTAACCTTT : 1812
Crocosphaera : TTTAGCCTTTCATACCCCGAAGCCAGGGCCGAGTTTGGGGCATAATCTCAAAGGCATGGCAGAACCCAGACCCGAGATTAACCTTT : 1812
Synechococcus : CCAAGCTTCCATACCCCGAAGCCAGGGCCGAGTTTGGGGCATAATCTCAAAGGCATGGCAGAACCCAGACCCGAGATTAACCTTT : 1821

*      1900      *      1920      *      1940      *      1960      *      1980
Nostoc      : GTTCTTACATTAAGGGCCGACTTAAAGGACATGGGCATACCCAAACACCGACGGCCGCATTTGAAAAAATTTGCAAAATGACCCCGAAGC : 1971
Trichodesmium : TTTTATGAAATTCACCCCGCAGGATGCTCAGGATTTGGAGATTTCAGATAATGATTTGGGTAGAAATGACCTCCCGAAGGCTTATAGCAGA : 1866
Oscillatoria : GTTCTTACATTAAGGGCCGACTTAAAGGACATGGGCATACCCAAACACCGACGGCCGCATTTGAAAAAATTTGCAAAATGACCCCGAAGC : 1875
Cyanotheca  : ATCTTAAACACCGGGAGGCTTAAAGGACATGGGCATACCCAAACACCGACGGCCGCATTTGAAAAAATTTGCAAAATGACCCCGAAGC : 1902
Crocosphaera : GTTCTTACATTAAGGGCCGACTTAAAGGACATGGGCATACCCAAACACCGACGGCCGCATTTGAAAAAATTTGCAAAATGACCCCGAAGC : 1902
Synechococcus : GTTCTTACATTAAGGGCCGACTTAAAGGACATGGGCATACCCAAACACCGACGGCCGCATTTGAAAAAATTTGCAAAATGACCCCGAAGC : 1911

*      2000      *      2020      *      2040      *      2060      *
Nostoc      : TTTATCGAAATTCACCCCGCAGGATGCTCAGGATTTGGAGATTTCAGATAATGATTTGGGTAGAAATGACCTCCCGAAGGCTAAAGCTCAA : 2061
Trichodesmium : TTTTATGAAATTCACCCCGCAGGATGCTCAGGATTTGGAGATTTCAGATAATGATTTGGGTAGAAATGACCTCCCGAAGGCTTATAGCAGA : 1956
Oscillatoria : TTTATCGAAATTCACCCCGCAGGATGCTCAGGATTTGGAGATTTCAGATAATGATTTGGGTAGAAATGACCTCCCGAAGGCTTATAGCAGA : 1965
Cyanotheca  : TTTATCGAAATTCACCCCGCAGGATGCTCAGGATTTGGAGATTTCAGATAATGATTTGGGTAGAAATGACCTCCCGAAGGCTTATAGCAGA : 1992
Crocosphaera : TTTATGAAATTCACCCCGCAGGATGCTCAGGATTTGGAGATTTCAGATAATGATTTGGGTAGAAATGACCTCCCGAAGGCTTATAGCAGA : 1992
Synechococcus : TTTATCGAAATTCACCCCGCAGGATGCTCAGGATTTGGAGATTTCAGATAATGATTTGGGTAGAAATGACCTCCCGAAGGCTTATAGCAGA : 2001

*      2080      *      2100      *      2120      *      2140      *      2160
Nostoc      : TTTCTGCTTAAAGTACAAAAAGCGATCCACCCGGACAGTTTTCGCCCCATGCCTGGGGTTCAATATGGGCAGATATCCCGAAGCT : 2151
Trichodesmium : TTTCCGCCCATAAATGACAAAAAGCTATTACTCCAGGACTCTATTTCGCCCCATGCCTGGGGTTCAATATGGGCAGATATCCCGAAGGCA : 2046
Oscillatoria : TTTCCGCCCATAAATGACAAAAAGCGATCCACCCGGACAGTTTTCGCCCCATGCCTGGGGTTCAATATGGGCAGATATCCCGAAGGCA : 2055
Cyanotheca  : TTTCCGCCCATAAATGACAAAAAGCGATCCACCCGGACAGTTTTCGCCCCATGCCTGGGGTTCAATATGGGCAGATATCCCGAAGGCT : 2082
Crocosphaera : TTTCCGCCCATAAATGACAAAAAGCGATCCACCCGGACAGTTTTCGCCCCATGCCTGGGGTTCAATATGGGCAGATATCCCGAAGGCT : 2082
Synechococcus : TTTCCGCCCATAAATGACAAAAAGCGATCCACCCGGACAGTTTTCGCCCCATGCCTGGGGTTCAATATGGGCAGATATCCCGAAGGCT : 2091

*      2180      *      2200      *      2220      *      2240      *
Nostoc      : AACCCCTTACCCATCCAGAAATTCGCCCGGATTCGCCCAACCCAGAAATTAAGCCTGTGCTGTGAGCTGATTCCTAATTTCTGTAGAA : 2241
Trichodesmium : AATAGCTGTGACTCATCCCAAGCCTGTCTGACTCGGGACAAACAGATTAAGCCTGTGCTGTGAGCTGATTCCTAATTTCTGTAGAA : 2136
Oscillatoria : AATAGCTGTGACTCATCCAGAAATTCGCCCGGATTCGCCCAACCCAGAAATTAAGCCTGTGCTGTGAGCTGATTCCTAATTTCTGTAGAA : 2145
Cyanotheca  : AATAGCTGTGACTCATCCATTCCTTTCCTGCTCCGAGTCTTACAAACCCGAAATTAAGCCTGTGCTGTGAGCTGATTCCTAATTTCTGTAGAA : 2172
Crocosphaera : AATAGCTGTGACTCATCCAGAAATTCGCCCGGATTCGCCCAACCCAGAAATTAAGCCTGTGCTGTGAGCTGATTCCTAATTTCTGTAGAA : 2170
Synechococcus : AATAGCTGTGACTCATCCAGAAATTCGCCCGGATTCGCCCAACCCAGAAATTAAGCCTGTGCTGTGAGCTGATTCCTAATTTCTGTAGAA : 2181

*      2260      *      2280      *      2300      *      2320
Nostoc      : GTT---GACGTCAG---ATTATCAATTC---AGTCATCACAATGCTA----- : 2283
Trichodesmium : GCA---GCTCCTATAGCGCTATGGGCAAGTAAAAAGTCAACCCCTTGGGAGAGTAAAAAGCTCAAAGTAA : 2205
Oscillatoria : ATAAAGCCAACTATAGTTTTCCTGAAACCGCAAAATCTAGTATGCTCTCAGCAACGCCCTTCTGTTGA--- : 2214
Cyanotheca  : ACAGGGTCGCTTCATGGGAAACCGTGGAACTTGCCTTGAGAGAAATCAAGCATTCAGCCCGTAAATAA--- : 2241
Crocosphaera : ACGAAGTCAGAAATCAGAG---GTCAAGAGTTGTTTGTAGA---CGGGATTAA----- : 2220
Synechococcus : GTT---CCCGAGGAAAAGCCACAGCCGAGCCTGT---TGCAGCGCTTTAG----- : 2229

```

Reverse domain III

1860

1880

รูปที่ 3.35 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nar ของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria โดยใช้โปรแกรม ClustalX (version 1.81) สิ่งมีชีวิตที่ใช้เปรียบเทียบได้แก่ *Nostoc* sp., *Trichodesmium erythraeum*, *Oscillatoria sancta*, *Cyanotheca* sp. PCC 8801, *Crocosphaera wastonii* และ *Synechococcus elongatus* แถบสีดำคือบริเวณอนุรักษ์ (Conserve region) และลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรอบสีแดงคือ บริเวณที่เลือกมา ออกแบบไฟรเมอร์

Forward domain I

```

Nostoc       : -MGEFTKTLCPCYCGVGCGLVSPPAQGLGHATNRGQGNFNWVVRVGGDKAHFSSCGMVCVKGATTAESELDKNRILHYPMMVRES : 79
Oscillatoria : -MTDSSTKTLPCYCGVGCGLVSPPARSGKPVNRRDQSYFVWRKVGDRHPSSCGMVCVKGATTAESELDKRLIYPMVRES : 79
Cyanothece   : -MTNSAKTLPCYCGVGCGLVLPAPGPRPTNRDQGTFTWQVVRGDRSHFSSCGMVCVKGATTVSESELDKNRILKYPMMVRES : 79
Crocospaera  : -MTNSTKTLPCYCGVGCGLVLPAPQPKAVNRRDSEGNFTWQVVRGDRSHFSSCKRNICIKGCTVSESELDKRLIYPMVRES : 79
Trichodesmium : --MKTSTKTLPCYCGVGCGLVSPPAFPKVTNRDSENFTWQVVRGDRSHFSSCGMVCVKGATTAESELDKRLIYPMVRES : 78
Synechococcus : MDQRKTLPCYCGVGCGLVSP-----EVIKNKCF--PFLKVMGDRHPSSCGMVCVKGATTAESELDKRLIYPMVRES : 71

```

Forward domain II

```

Nostoc       : LDQEFRVRSWDEAFNLITQRIQIVRHTGCEALMAYGSGGQTEDDYIYAQKLMKGCGLGTNNFDANSRLCMSSAVAGYIQS : 159
Oscillatoria : LDKFFRVSWDDEALNAINVNRIOIVRHTGCEALMAYGSGGQTEDDYIYAQKLMKGCGLGTNNFDANSRLCMSSAVAGYIQS : 159
Cyanothece   : LDESFRVSWDDEALEAIHVRIQIVLQTCGDDGLMAYGSGGQTEDDYIYAQKLEKGLGTNNFDANSRLCMSSAVAGYIQS : 159
Crocospaera  : LTDFRVSWDDEAMEAIVNRMRVRHTGCEALMAYGSGGQTEDDYIYAQKLEKGLGTNNFDANSRLCMSSAVAGYIQS : 159
Trichodesmium : LEAIFRVSWDEAFNRIVNCTIKRVRSGCEALMAYGSGGQTEDDYIYAQKLEKGLGTNNFDANSRLCMSSAVAGYIQS : 158
Synechococcus : LDQCFRISWDEAFELIMEGFKRVRHTGCEGIMAYGSGGQTEDDYIYAQKLEKGLGTNNFDANSRLCMSSAVAGYIQS : 151

```

Reverse domain I

```

Nostoc       : FCGDGPFCYDLEITDCAFLICTNTAECHPIVFNRLRHHKKNR-KVKMIVVDRRRTTAEADHLHLAIPKPTDIDLIN : 238
Oscillatoria : FCGDGPFCYDLEITDCAFLVCTNTAECHPIVFNRLRHHKKNR-KVKMIVVDRRRTTAEADHLHLAIPKPTDIDLIN : 239
Cyanothece   : FCGDGPFCYDLEITDCAFLICTNTAECHPIVFNRLRHHKKNR-KVKMIVVDRRRTTAEADHLHLAIPKPTDIDLIN : 238
Crocospaera  : FCGDGPFCYDLEITDCAFLICTNTAECHPIVFNRLRHHKKNR-KVKMIVVDRRRTTAEADHLHLAIPKPTDIDLIN : 238
Trichodesmium : FCGDGPFCYDLEITDCAFLICTNTAECHPIVFNRLRHHKKNR-KVKMIVVDRRRTTAEADHLHLAIPKPTDIDLIN : 237
Synechococcus : FCGDGPFCYDLEITDCAFLICTNTAECHPIVFNRLRHHKKNR--AKLIVVDRRRTTAEADHLHLAIPKPTDIDLIN : 229

```

Forward domain III

```

Nostoc       : GIATLLMWRWYIDTMFMDDCTSNIFFAYAEVIRHYSPEVVARCGCISIEDLEAARYWGESRRLVLSWSMGMNOSSEGTAK : 318
Oscillatoria : GMAYLLMWRWKIDTIFIDECTSNFFAYAEVIRHYPVVARCKCITVEELEAARYWAESRRLVLSWSMGMNOSSEGTAK : 319
Cyanothece   : GIATLLMWRWKIDYFIDECTONFFAYAEVISHYEPVVARCKCIRLDLLEAARYWAKESRRLVLSWSMGMNOSSEGTAK : 318
Crocospaera  : GIAYLLMWRGRIDSLFIDECTONFFAYAEVIRHYSPEVVARCKCIRIQDLEAARYWGESRRLVLSWSMGMNOSSEGTAK : 318
Trichodesmium : GIATLLMWRGIDDMFIDECTKGFHYVNIINQVPEVVARCKCIRLDLEAARYWAKESRRLVLSWSMGMNOSSEGTAK : 317
Synechococcus : GIATLLMWRKIDTIFIDECTKGFESRYAMLIQSTPPTVARRCGCIRIDHLEAARYWANADNVLVLSWSMGMNOSSEGTAK : 309

```

Reverse domain II

```

Nostoc       : ITLESDAVGLWIAAANPAVSMDDERTKKAALRSPFTTQDAYYPTETSIAHVVLLPAAQWQEKGTGMNTSERVVILC : 478
Oscillatoria : ILLGLEMRYVGLWIAAANPAVSMDDERTKKAALRSPFTTQDAYYPTETANAHVVLLPAAQWQSEKGTGMNTSERVVILC : 479
Cyanothece   : IQALETGRVGLWIAAANPAVSMDDERTKKAALRSPFTTQDAYYPTETSIAHILLPAAQWQSEKGTGMNTSERVVILC : 478
Crocospaera  : IQALETGRVGLWIAAANPAVSMDDERTKKAALRSPFTTQDAYYPTETSIAHILLPAAQWQSEKGTGMNTSERVVILC : 478
Trichodesmium : IMALETRKIGLWIAAANPAVSMDDERTKKAALRSPFTTQDAYYPTETSIAHVVLLPAAQWQEKGTGMNTSERVVILC : 477
Synechococcus : IELDMGTVGLWIVVAINPAVSMDDERTKKAALRSPFTTQDAYYPTETSIAHVVLLPAAQWQEKGTGMNTSERVVILC : 469

```

Forward domain III

```

Nostoc       : QAFFRDEPRBAKADWBIIEAVGRRRLGHEKGFANSAVAEVYAEFVOLTQNRPCIMTGLSHQRL-TQQGLTOWPFIYAKKVESVF : 557
Oscillatoria : QAFFRDRPEAKADWBIIEAVGRRRLGVEGFFNANSAAVVYAEFFVOLTQKGRPCCTGIGHORIGADGPHOWPCEEAGE--- : 556
Cyanothece   : PFRDPEGEARADWBIIEAVGRRRLGHEKGFANSAVAEVYAEFVOLTQGRPCYSGLSHDLRQQGPHOWPYIYQWFS--- : 555
Crocospaera  : PFRDPEGEARADWBIIEAVGRRRLGHEKGFANSAVAEVYAEFVOLTQGRPCSSGLSLEYKLRRYGPHOWPYADTWPC--- : 555
Trichodesmium : PFRFELRBAKADWBIIEAVGRRRLGHTNHFNAESEAVAEVAEFLITRRRPCIMTGLIYORLQEKGPHOWPCDSSGV--- : 554
Synechococcus : PFRDRPEEAMADWBIIEAVGRRRLGHOQEFRAVSSAAVVYAEFVOLTQGRPCIMTGLSHORLATEGPHOWPCANETKCDP : 549

```

Reverse domain III

```

Nostoc       : IDTETGLLSFQPEEETFSDKEAEKKRKYHTLRMGKRLRYTLRHHTPDGRARAEAYNSGLAEPEDFDPYFVLTNGRLYGH : 637
Oscillatoria : -----NNAARLYTLRHHTPDGRAKEAAYNSGLAEPEDFDPYFVLTNGRLYGH : 605
Cyanothece   : -----PGEEEKQNRNTKRLYTLRHHTPDGRAREAAYNSGLAEPEDFDPYFVLTNGRLYGH : 614
Crocospaera  : -----LEGEELDRQNRNTKRLYTLRHHTPDGRAREAAYNSGLAEPEDFDPYFVLTNGRLYGH : 614
Trichodesmium : -----SQRLYTLRHHTPDGRAREAAYNSGLAEPEDFDPYFVLTNGRLYGH : 602
Synechococcus : ETTAD-----NRGLLQKLFHQDEPLKGRKRYTLRHHTPDGRAREAAYNSGLAEPEDFDPYFVLTNGRLYGH : 617

```

Forward domain III

```

Nostoc       : WHHTRTGRIKIKKMHHPFFIEIHPRDAAKGILLDQCVOVRSRRGKCFPAVTKAIPGTVFVPMHWGSLWADNAAEA : 717
Oscillatoria : WHHTRTGRIKIKKMHHPFFIEIHPRDAAGKLGLEDWVEVRSRRGMARFPVTKAIPGTVFVPMHWGSLWADNAAEA : 685
Cyanothece   : WHHTRTGRIKIKKMHHPFFIEIHPRDAAREKIEENSLEEVRSRRGVARFPVTKAIPGTVFVPMHWGSLWADNAAEA : 694
Crocospaera  : WHHTRTGRIKIKKMHHPFFIEIHPRDAAKKINKENSLEEVRSRRGVARFPVTKAIPGTVFVPMHWGSLWADNAAEA : 694
Trichodesmium : WHHTRTGRIKIKKMHHPFFIEIHPCDAQRHEISDDWVEVRSRRGYSEFPVTKAIPGTVFVPMHWGSLWADNAAEA : 682
Synechococcus : WHHTRTGRIKIKKMHHPFFIEIHPRDADRISITLDGEMVEVRSRRGMARFPVTKAIPGTVFVPMHWGSLWADNAAEA : 697

```

Reverse domain III

```

Nostoc       : NALTHEACPSISQPELKCAVGLIPISVEVAVKDYQFQSSQC----- : 760
Oscillatoria : NAMTHEACPSISQPELKCAVGLVPTIADIKATNSLLETAKSSMLSATPSV : 737
Cyanothece   : NALTHEIACPSISQPELKCAVGLKVTIPTGSLHGEFSELDLKRNQUALTRK : 746
Crocospaera  : NALTHEIACPSISQPELKCAVGLSIAARVN--EVRNQRSEVVFETRI-- : 739
Trichodesmium : NALTHEIACPSISQPELKCAVGLQVVKFQAAPALWASKKSTPLGEVSKSK : 734
Synechococcus : NALSHAEACPSISQPELKCAVGLVQRITGVPVQEKATAEVEVLQQL----- : 742

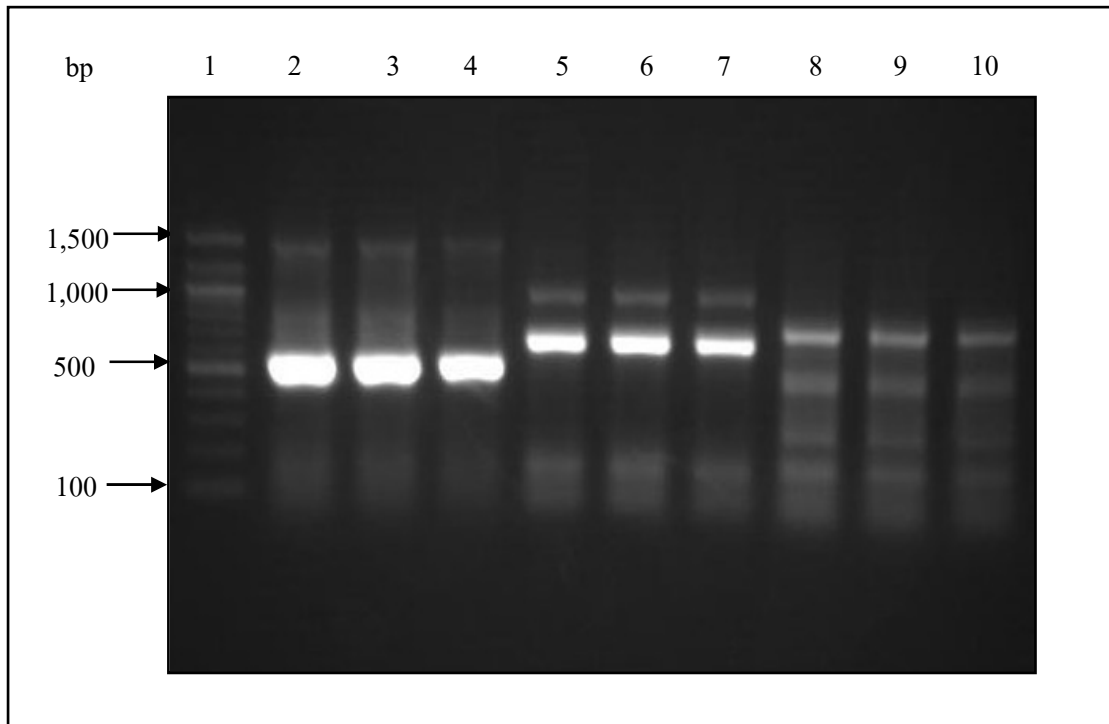
```

รูปที่ 3.36 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ NR ของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria โดยใช้โปรแกรม ClustalX (version 1.81) สิ่งมีชีวิตที่ใช้เปรียบเทียบได้แก่ *Nostoc* sp., *Trichodesmium erythraeum*, *Oscillatoria sancta*, *Cyanothece* sp. PCC 8801, *Crocospaera wastonii* และ *Synechococcus elongatus* แถบสีดำคือบริเวณอนุรักษ์ (Conserve region) และลำดับกรดอะมิโนในกรอบสีแดงคือ บริเวณที่เลือกมาออกแบบไพรเมอร์

3.9.2 ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากส่วนของยีน nar ในสาหร่าย *Synechococcus* sp. โดยใช้ วิธี RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว

การเพิ่มบริเวณดีเอ็นเอจากส่วนของยีน nar ของสาหร่าย *Synechococcus* sp. โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบตามข้อ 3.9.2 โดยใช้วิธี RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว ดังวิธีในข้อ 2.4.16.3 พบว่าเมื่อนำ PCR product มาตรวจสอบผลด้วยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% ใน 1 x TAE buffer พบแถบ PCR product สามแถบ คือ แถบ PCR product ที่ได้ประมาณ 500, 700 และ 800 คู่เบส (base pair, bp) ดังรูปที่ 3.37 นำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำให้บริสุทธิ์ QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) และเชื่อม PCR product ที่ได้กับดีเอ็นเอพาหะ pDrive (QIAGEN) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลูกผสมในเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* สายพันธุ์ DH₅ α และนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง Biosystem 377 sequencer (Perkin – Elmer, USA) ตรวจสอบผลการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500, 700 และ 800 bp ว่าเป็นยีน nar หรือไม่โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลของธนาคารยีน

จากการตรวจสอบผลการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอพบว่า ดีเอ็นเอที่มีขนาด 500 คู่เบสเป็นยีน nar ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 534 bp (รูปที่ 3.38) สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 178 residues (รูปที่ 41) เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับยีน nar จากสิ่งมีชีวิตกลุ่ม Cyanobacteria เท่ากับ 65-68 % (รูปที่ 3.39) และเหมือนกับสิ่งมีชีวิตกลุ่ม Bacteria น้อยกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตกลุ่ม Cyanobacteria เท่ากับ 67-75 % (รูปที่ 3.40) และเหมือนกับสิ่งมีชีวิตกลุ่ม Bacteria น้อยกว่า 65% ส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 และ 800 bp เป็นยีนที่มีขนาดเท่ากับ 675 และ 748 bp ตามลำดับและเมื่อทำการตรวจสอบแล้วพบว่าไม่มีความเหมือนกับยีน nar แต่มีความเหมือนกับยีนอื่น ๆ ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ (ตารางที่ 3.5)



รูปที่ 3.37 แบบแผนของ PCR product จากการทำ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียวสำหรับยีน nar ในสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp. แยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5%

ช่องที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair ladder (QIAGEN)

ช่องที่ 2-4 แถบ PCR product ของยีน nar ซึ่งใช้ forward และ reverse primer I

ช่องที่ 5-7 แถบ PCR product ของยีน nar ซึ่งใช้ forward และ reverse primer II

ช่องที่ 8-10 แถบ PCR product ของยีน nar ซึ่งใช้ forward และ reverse primer III

```
ctctgtccctactgtggtgtgggttgtgggtctcgaagtgatcccaacctgtggccagggga
L C P Y C G V G C G L E V I P T C G Q G
tctcaggggagaagccatttccctgtggaaagtgcggggcgatcgcgccatccctccagc
S Q G E A I S L W K V R G D R A H P S S
cagggcatgggtgtgtgtcaagggggccaccgtgctcgaactccattaccaaggatcgacta
Q G M V C V K G A T V L D S I T K D R L
ctgtaccgatgctacgcccctccctagatcatccctttgagcgggtgagttgggataca
L Y P M L R P S L D H P F E R V S W D T
gcccctagatgtgatcgtgagaaaattcagcaggtgcgcgaagactttggccccgatgcc
A L D L I A E K I Q Q V R Q D F G P D A
ctctgcatgtaaggctccgggtcagtttgtgaccgaggactactacaccgccccaaagtgtg
L C M Y G S G Q F V T E D Y Y T A Q K L
tgggaaggggtgcttaggcaccaacaacttcgacgccaactccccggctgtgcatgtcttcg
W K G C L G T N N F D A N S R L C M S S
gcggtatctggctacatccagagccctgggtgcccgatggccccccctgtacctacgaggat
A V S G Y I Q S L G A D G P P C T Y E D
ctagagctgactgattgtgcttttttgattggcaccaacaccgcccgaatgtcac
L E L T D C A F L I G T N T A E C H
```

รูปที่ 3.38 ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของยีน nar ที่มีขนาดเท่ากับ 534 bp (แถวบน)
ลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ในตระกูลรีดักเทส (แถวล่าง)

```

*           20           *           40           *           60           *           80           *           100          *           120
This study : -----ctcgtcccttactgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgagaagtgatcccaacctgtt-gggccagggaatctcagg---gaga-agcca---ttttccctgt : 85
Nostoc     : ATG-AGTGAATTTA--C(AAAAACTCTT)GTCCTTACTGTGGTGTGGTGTGGACTTGAAGT-TCACCCCGAGCCAACTTGGCAAAGCAACTAATGGAGATGTC(AAGG)AATCC-GA : 115
Trichodesmium : ATG-A---AAACTA--CA(AAACTGCTT)GTCCTTATGTGTGGTGTGGTGTGGACTTGAAGT-TCACCCCGAGCCAACTTGGCAAAGCAACTAATGGAGATGTC(AAGG)AATCC-AA : 112
Oscillatoria : ATG-ACTGACTCAA--CA(AAACTGCTT)GTCCTTATGTGTGGTGTGGTGTGGACTTGAAGT-TCACCCCGAGCCAACTTGGCAAAGCAACTAATGGAGATGTC(AAGG)AATCC-CG : 116
Cyanothece : ATG-CTA(AC)TCTG--CC(AAACTGCTT)GTCCTTATGTGTGGTGTGGTGTGGACTTGAAGT-TCACCTCCAGCCGAAACCAGGTAAACCCCAACCCGAGATAC(TCAGG)AACC(C)CAT : 116
Crocospaera : ATG-ACA(AC)TCTA--CT(AAACTGCTT)GTCCTTATGTGTGGTGTGGTGTGGACTTGAAGT-TCACCCCGAGCCAAACCAGGTAAAGCAACTAATGGAGATGTC(AAGG)AATCC-CAT : 116
Synechococcus : ATG(GATCAACG)CAAAAGG(AAAACCTT)GTCCTTATGTGTGGTGTGGTGTGGACTTGAAGT-TTC-----TGAGGTGATCAA---AAATGAACAA-----CCAC : 92

*           140          *           160          *           180          *           200          *           220          *           240
This study : ---ggaagtgctggggcgatcgcccatccctceadccagggcatgtgtgtgtgtaaggggggcaacctgtctgactccattaccaagggatgactactgtaccggatgctacg-cccc : 201
Nostoc     : CTTGGCGGGTGC(GGGCGAT)AAAGCCATCCATCTAGTCAAGGAATGGTTTGCCTCAAAGGCCAACGATCGCAGAACTCTTATAGATAAAAATAGATACATTAACCAATGGTCCG-AGAC : 234
Trichodesmium : CTTGGCAGTACGGGGCGATGGCTCTCATCCATCAAGTCAAGG(AAACTT)TGCCTCAAAGGTGTACCGTTGGGGAAGCATGGATAAAAGTGGCTTAAAGTATCCAATGATCGG-CAT : 231
Oscillatoria : CT-GGAAAGTTCAGGGCGATGGCAACATCCCTCCAGGATGCTGCTCGTTAAAGGTGCAACTATTCGCAAAAGATCGATTGCTTATCCGATGATCGG-CGAA : 234
Cyanothece : CT-GGCAAGTCAGAGGGCGATGGCACTCCCTTAGTCAGGG(AAGCT)CTGCTCAAAGGGGGAACCCGTGCGAATCTTGGCAAAAACGGTCTAAAATACCCAATGATCGG-CGAT : 234
Crocospaera : CT-GGCAAGTACGGGGCGATGGCACTCCCTTAGTAAAGG(AAACT)CTGATTAAGGGGGAACCCGTAGCGACTCTCTGGTGAAGATGGCTTAAATATCCCATGATCGG-AGAC : 234
Synechococcus : CCTCA-AAGTCATGGGGCGATGGCAACATCCATCCAGCTGGG(AAACT)CTGCTCAAAGGGGGCAACTATGGCGAATCCCTCGATCAAGACGGCTACTTACC(C)ATGATGGCGCA- : 210

*           260          *           280          *           300          *           320          *           340          *           360
This study : tccctagatcatccccttggagcgggtgaggttgggacacagcccagatttgatccctgagaaaatbcagcaggttgcccaagatttggcccgatgcccctctgcatgtacggctccgggt : 321
Nostoc     : TCTTAGATCAAGACTTTCCGGCCCTTAGTTGGGATGAAGCTTTTAACTCTCATACCGCAGCGGTATCAAAACAGTCCGGCTTCCACCAGGGCCAGAGGGTATGTATGTATGGTCCGGT : 354
Trichodesmium : ACCCTAGATGAAGCTTTTCGTGCTTACTTTGGGAAGAACTTTCCGGCCGATGTAAACGAATTC(AAAAAGT)ACTTTTTCTCAGGGACAGATGGAATTTGTATGTATGGTCCGGT : 351
Oscillatoria : TCTTAGATAAACCTTTCCGGCCGCTTTCTTTGGGATGAAGCTTTAAATGCGATCGTCAATGGCATCAAAACCCTTCGCTTCACGCAAGGTGCGGAAAGCAATTTGTATGTATGGTCCGGT : 354
Cyanothece : TCCCTTATGAATCTTTCCGTGCTCAGTTGGGATGAAGCTTTAGAAGCCATTTGTCATGGTATCAAAACCTTACC(TCCAGACC)CAAGGTCCAGATGCTCTGTCTATGTACGGTCTCGGG : 354
Crocospaera : AGTCTAACCCATGAGTTTCCGTGCTGAGTTGGGATGAAGCAATGGAGCCGATCTCCACCGTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCT : 354
Synechococcus : TCGCTACAGGATCAATTCAGCGCATCAGTTGGGATGACGCTTTGAGCTAATTGTGGAGGAGATCAAAACGTTAAGGGCAACCCTGGCAGCGAAGGATTTGCCATGTATGGCTCCGGA : 330

*           380          *           400          *           420          *           440          *           460          *           480
This study : cagtttgtgacggaggactactacacccggcccaaaagttgtggaaggggttggttaggcacaaacaacttgagagcgaactccgggtgtgtgcatgtcttcgggggtatctgtgtacatccag : 441
Nostoc     : CAGTTTCAAACGGAAGACTACTACATAGCCAGAACTTAAAGAAAGGTTGTCTGGGACTTAAATAATTTGATGCCAATCCCGTTTATGTATGTCTACTGGTGTGCTGGTGTGATTCAA : 474
Trichodesmium : CAGTTTCAAACGGAAGACTATAGGTTGCTCAAAGTGTCTAAAGGATGTCTGGGACTTAAACAATTTGATGCCAATCCCGCTCTGTATGTCTTCAGGAGTATCTGGATAGATTCAA : 471
Oscillatoria : CAATTTCAAACGGAAGATTATATGTAGCTCAAATAATAAGAAAGGTTGTCTCGGACGAAATAATTTGATGCCAATCCCGCTTGTGTATGTCTTCTGCTGTCCCGCATAGATTCAA : 474
Cyanothece : CAATTTCAAACGGAAGATTACTATATGCGCAAAACTCTTAAAGGTTTCCCTGGAACCAATAATTTGACGCTAATCCCGCTTGTGTATGTCTTCAGGAGTGGCGGGTTATACCCAA : 474
Crocospaera : CAGTTTCAAACGGAAGATTATACATGCGCAAAACTCTTAAAGGTTTCCCTGGAAGCAATAATTTGATGCCAATCCCGCTCTGTATGTCTTCTGCTGTAGCAGGTTATATCCAA : 474
Synechococcus : CAGCTTCAAACGGAAGACTATTACCCGCC(AAA)ACTTCC(AAAGGG)TCCCTCGGACCAACAATTTGATGCCAATCCCGCTCTGTATGTCTTCTGGCGTGGCGGCTATATCCAG : 450

*           500          *           520          *           540          *           560          *           580          % Identity
This study : agccttggtgcggatggcccccctgtacctaggagatctagagctgactgatttgcttttggatgggacccaacacggcgggaatgtcac----- : 100
Nostoc     : AGTTTGGCTCAGATGGTCCGCCCTGTCTTATGAAGACTTGGAGTTAACCAGACTGTGCCATTTTAAATAGGCCTAATACAGCCGAATGTCATCCAATCCGT : 67
Trichodesmium : AGTTTGGTCTGATGGTCCCTCTGTGTTGCTAGGATGACTTAGAAAAGACAGACTGTGCCATTTTAAATAGGTAATAACAGCCGAATGTCATCCTATTAAC : 65
Oscillatoria : AGTTTGGTCTCGATGGCCGCCCTGTGTGCTATGAGCATTTAGATTTAAGTCAATGCGCTTTTATGATGGTACTAATAAGGCTGAATGCCACCCAATTAAT : 68
Cyanothece : AGTTTGGCAGCGAAGGCCCCCAAGTTGTCTATGAAGATTAGAAATTACCGATTGGGCTTTTCTCATGGAAACCAACACCGCCGAATGTCACCCCATGTCT : 68
Crocospaera : AGTTTGGCAGTACGGCCCTCTGTGTATGGAAGACTAGAGTTAACCAGACTGTGCCATTTTAAATAGGTAATAACAGCCGAATGTCACCCCATGTCT : 66
Synechococcus : AGCTTTGGGGCGATGGCCGCCCTTGTCTAGGAGACTTAGAATTACCGATTGCGCTTTTATCATGGGAGCAATACAGCCGAATGTCACCCGATGTTG : 67

```

รูปที่ 3.39 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nar* ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria โดยใช้ โปรแกรม ClustalX (version 1.81) สิ่งมีชีวิตที่ใช้เปรียบเทียบ ได้แก่ *Nostoc* sp., *Trichodesmium erythraeum*, *Oscillatoria sancta*, *Cyanothece* sp. PCC 8801, *Crocospaera wastonii* และ *Synechococcus elongatus* แถบสีดำคือบริเวณอนุรักษ์ (Conserve region)

		*	20	*	40	*	60	*	80	*	100														
This study	:	-----	ICPYCGVGCGL	VIPTCGQGS	----	QGEAISLW	KVGRDRAH	PS	SGMVCVKGAT	VLD	SITKDRLL	YPLRPS	LDHPFERV	SWDTALDL	IAEK	:	88								
Nostoc	:	M-SEFTKTI	CPYCGVGCGL	EVSPPAQL	GKATNRD	GQGNPTW	RVGRDKA	HPS	SGMVCVKGAT	IAESL	DKNRLH	YPMVRD	LDQEF	FRVSWDE	AFNLI	TQR	:	99							
Trichodesmium	:	--MKTTKTA	CPYCGVGCGL	EVSPPAT	PGKVTNR	DSKGNPT	WQVRGDR	SHPS	SGKVCVKGAT	VGEAL	DKSRLKY	PMMRNT	LDEAF	FRVTV	WEEAF	FRRI	VNQ	:	98						
Oscillatoria	:	M-TDSTKTI	CPYCGVGCGL	EVSPPAR	SGKPVNR	DSQGY	PVWVQ	GDREH	PS	SGMVCVKGAT	IAESL	HKDRLL	YPMVR	LDKPF	FRVSW	DEAL	NAIVNR	:	99						
Cyanothece	:	M-TNSAKTI	CPYCGVGCGL	EVLP	PPAQPG	KPTNR	DSQGT	PIWQV	RGDR	SHPS	SGKVCVKGAT	VSESL	DKNRL	KYPM	VRD	LD	ESF	FRVSW	DEALEA	IVHR	:	99			
Crocospaera	:	M-TNSTKTI	CPYCGVGCGL	EVLP	PPAQPG	KAVNR	DS	SEGN	PIWQV	RGDR	SHPS	SGKVIC	IKGGT	VSESL	VKDR	LKY	PMMR	DS	LD	EF	FRVSW	DEAMEA	IVNR	:	99
Synechococcus	:	MDQRKTKTI	CPYCGVGCGL	EVSE	-----	VIKNEQ	--	PTLKVM	GDRQH	PS	SLGKVCVKGAT	IAESL	DQDRLL	YPMYRR	SLQDQ	FORI	SWDDA	FELI	VEQ	:	91				

		*	120	*	140	*	160	*	180	*	% Identity				
This study	:	IQQVRQDF	GPDALCMY	GSGQFV	TEDYYTAQ	KLKGLG	TNNFDAN	SRLCMS	SAVSGYIQ	SLGADGPP	CTYEDLE	ITDCAFL	IGTNTA	ECH-----	100
Nostoc	:	IQTVRFTQ	GPEALCMY	GSGQFQ	TEDYYTAQ	KLKGLG	TNNFDAN	SRLCMS	SAVAGYIQ	SFGSDGPP	CCYEDLE	ITDCAFL	IGTNTA	ECHPIVF	NRL75
Trichodesmium	:	IQKVRFSQ	GPDAICMY	GSGQFQ	TEDYYVAQ	KLKGLG	TNNFDAN	SRLCMS	SAVSGYIQ	SFGSDGPP	CCYEDLE	KTDCAFL	IGTNTA	ECHPII	NRL70
Oscillatoria	:	IQTVRFTQ	GAEAICMY	GSGQFQ	TEDYYVAQ	KLKGLG	TNNFDAN	SRLCMS	SAVAAYIQ	SFGSDGPP	CCYEDL	DLTDCAFL	IGTNTA	ECHPII	NRL73
Cyanothece	:	IQTVLQIQ	GPDLMSY	GSGQFQ	TEDYYTAQ	KLKGLG	TNNFDAN	SRLCMS	SAVAGYIQ	SFGSDGPP	CCYEDLE	ITDCAFL	IGTNTA	ECHPIV	NRL73
Crocospaera	:	MQKVRLTQ	GPDALCMY	GSGQFQ	TEDYYTAQ	KLKGLG	SNNFDAN	SRLCMS	SAVAGYIQ	SFGSDGPP	CCYEDLE	ITDCAFL	IGTNTA	ECHPIV	NRL70
Synechococcus	:	IKTVKATL	CSEGIAMY	GSGQLQ	TEDYYTAQ	KLKGLG	TNNFDAN	SRLCMS	SAVAGYIQ	SFGADGPP	PCYEDLE	ITDCAFL	IGSNTA	ECHPIV	NRL67

รูปที่ 3.40 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ในตระกูลโปรตีนในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria โดยใช้ โปรแกรม ClustalX (version 1.81) สิ่งมีชีวิตที่ใช้เปรียบเทียบได้แก่ *Nostoc* sp., *Trichodesmium erythraeum*, *Oscillatoria sancta*, *Cyanothece* sp. PCC 8801, *Crocospaera wastonii* และ *Synechococcus elongatus* แถบสีดำคือบริเวณอนุรักษ์ (Conserve region)

ตารางที่ 3.5 ค่า % Identity ของลำดับกรดอะมิโนของดีเอ็นเอที่มีขนาด 675 และ 748 bp เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

ขนาดดีเอ็นเอ	% Identity	Accession number	ชนิดของสิ่งมีชีวิต
675 bp	62	NP 681829	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>
	61	YP 478950	<i>Synechococcus</i> sp.
	54	YP 464368	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>
748 bp	74	NP 487765	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120
	74	ZP 00112288	<i>Nostoc punctiforme</i>
	74	YP 324056	<i>Anabaena variabilis</i>