

การจัดจำแนกชนิดและความเป็นพิษของไซยาโนแบคทีเรียที่พบ
ในประเทศไทย

SYSTEMATICS AND TOXICITY OF CYANOBACTERIA IN THAILAND



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 31673
วัน, เดือน, ปี 21 S.A. 2541

พ.ศ. 2541

ISBN 974-622-329-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SYSTEMATICS AND TOXICITY OF CYANOBACTERIA IN THAILAND



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ ISBN 974-622-329-1 นั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 1998

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG ใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การจัดจำแนกชนิดและความเป็นพิษของไซยาโนแบคทีเรียที่พบในประเทศไทย
นักศึกษา	นางสาวพรรณรัตน์ รัตนโชติ
รหัสประจำตัว	38064204
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2541
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร. อาภารัตน์ มหาจันทร์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรไท สุขเจริญ

บทคัดย่อ

ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติ 4 แห่ง ที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียในระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2539 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2540 ได้แก่ เขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี อ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี เขื่อนแม่กวง จังหวัดเชียงใหม่ และเขื่อนลำนาดอง จังหวัดนครราชสีมา จากการสำรวจพบไซยาโนแบคทีเรียทั้งสิ้น 2 สายพันธุ์ คือ *Microcystis aeruginosa* และ *Oscillatoria* sp. โดยแต่ละแห่งจะพบ *M. aeruginosa* เป็นจำนวนมากที่สุด จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. aeruginosa* พบว่ากลุ่มเซลล์มีรูปร่างหลายแบบและเซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลม มีขนาด 3.7-5 ไมครอน ภายในมักมีแก๊สแวคิวโอล ในการแยกเซลล์ของ *M. aeruginosa* จากแหล่งน้ำทั้ง 4 แห่ง มาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารพิษพบว่า *M. aeruginosa* จะเจริญเติบโตดีที่สุดและส่วนใหญ่จะผลิตสารพิษได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหาร MA สูตรปกติที่มีไนเตรทและ β -glycerophosphate เป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งฟอสฟอรัส ที่ความเป็นกรด-ด่าง 8.6 บมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้อุณหภูมิแสง 60 ไมโครไฮสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที และจากการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษพบว่า *M. aeruginosa* จะผลิตสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ตับในกลุ่มของไมโครซิสติน 3 ชนิด คือ microcystin-RR microcystin-YR และ microcystin-LR โดยพบปริมาณสารพิษอยู่ในช่วง 2.0-119.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากตัวอย่างธรรมชาติพบปริมาณสารพิษมากที่สุดในตัวอย่างเป็นแม่กวงซึ่งมีปริมาณสารพิษเท่ากับ 770 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

การศึกษาค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียในหนูพุกขาวเพศผู้พันธุ์วิสตา พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเซลล์ตับ ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบการขยายตัวของเส้นเลือดในเซลล์ตับ การกั่งของเลือดและเนื้อเยื่อบางส่วนของเซลล์ตับตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการวิเคราะห์คุณภาพน้ำยังไม่สามารถสรุปถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่วิเคราะห์กับกับการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียได้ชัดเจนนัก แต่พบว่าฟอสเฟตมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในแหล่งน้ำธรรมชาติที่พบในประเทศไทย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Systematics and toxicity of cyanobacteria in Thailand
Student	Miss Pannarat Ratanachot
Student ID.	38064204
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	1998
Thesis Advisor	Dr. Aparat Mahakhant
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Oratai Sukcharoen

Abstract

Four samples from cyanobacterial blooms in natural aquatic ecosystems of Thailand were investigated and collected during May, 1996 to February, 1997, from Kang Krachan Dam, Phetchaburi province; Bang Pra reservoir, Chon Buri province; Mae Kwang Dam, Chiang Mai province and Lum Takhong Dam, Nakhon Ratchasima province. All of these samples were identified as *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria* sp.. *M. aeruginosa* was the dominant specie. Morphological study of *M. aeruginosa* showed polymorphic cells. Most cells are round and elongated with the length of 3.7-5 μm ; gas-vacuoles are often present in the cell. The suitable medium for growth and toxin production was original MA medium with nitrate and β -glycerophosphate as nitrogen and phosphorus sources, respectively. The optimal cultivation conditions were as follows: at pH 8.6, incubated at 30 $^{\circ}\text{C}$ and light intensities at 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. *M. aeruginosa* produced hepatotoxin, namely "microcystin" and components of this toxin was identified as microcystin-RR, microcystin-YR and microcystin-LR which was in the range of 2.0-119.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ dry weight. The sample from Mae Kwang Dam contained the highest toxin content of 770 $\mu\text{g}/\text{g}$ dry weight.

The acute oral toxicity of crude cyanobacterial extract in male Wistar rat was studied. The histopathological results showed liver degeneration, vessel congestion, and necrotic foci of hepatocytes.

The results of water quality analysis could not indicate the relationship between of the aquatic cyanobacterial bloom, however phosphate element was important to toxic cyanobacterial blooms in Thailand.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร. อภารัตน์ มหาจันทร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรไท สุขเจริญ กรรมการที่ปรึกษา ซึ่งกรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือต่องานนี้ด้วยดี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ เนาวรัตน์ ปานแย้ม กรรมการบัณฑิตศึกษา ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำแก้ไขเพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. คุณฉวี ธนะบริพัฒน์ ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย อีกทั้งอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและแนะนำในการศึกษาตลอดมา

ขอขอบคุณศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณประไพภัทร คลังทรัพย์ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ฝ่ายวิจัยวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และสัตว์ทดลอง ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ในการศึกษาเกี่ยวกับสัตว์ทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำเขื่อนแก่งกระจาน อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำนะทอง ที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบคุณ พี่ เพื่อน และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้ช่วยเหลือ สนับสนุน และเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าในการศึกษามาโดยตลอด

พรณรัตน์ รัตนโชติ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	IV
สารบัญ.....	V
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญรูป.....	VIII
บทที่ 1. บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	2
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา.....	3
1.4 แนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย.....	3
1.5 ขอบเขตการวิจัย.....	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย.....	7
2.2 สารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำ.....	12
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษของสาหร่าย.....	25
บทที่ 3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
3.1 การเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติ.....	31
3.2 การวิเคราะห์เซลล์และการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย.....	32
3.3 การศึกษาแหล่งธาตุอาหาร ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิต สารพิษของไซยาโนแบคทีเรีย.....	32
3.4 การวิเคราะห์สารพิษ.....	35
3.5 การวิเคราะห์สารพิษจากตัวอย่างธรรมชาติ.....	39
3.6 การตรวจความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง.....	39
3.7 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำบางประการที่มีผลต่อการเจริญเติบโต อย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย.....	41

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4. ผลการทดลอง.....	42
4.1 ชนิดและปริมาณเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติ.....	42
4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	44
4.3 แหล่งธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย.....	46
4.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษของไซยาโนแบคทีเรีย.....	48
4.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากตัวอย่างธรรมชาติ.....	72
4.6 การทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง.....	74
4.7 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.....	85
บทที่ 5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	87
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	87
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	88
บรรณานุกรม.....	90
ภาคผนวก.....	99
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	100
ภาคผนวก ข. การเตรียมน้ำยาเคมีและการวิเคราะห์.....	102
ภาคผนวก ค. การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียและโครมาโตแกรม ของสารพิษมาตรฐาน.....	108
ประวัติผู้เขียน.....	110

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สกูล-ชนิดของไซยาโนแบคทีเรียที่พบในช่วงที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในแหล่งน้ำ.....	9
2.2 บางส่วนของรายงานที่แสดงถึงผลของสารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำที่มีต่อมนุษย์และสัตว์.....	14
2.3 สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียที่พบตามแหล่งน้ำจืด.....	21
4.1 แสดงชนิดและปริมาณเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติ.....	42
4.2 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของ <i>M. aeruginosa</i> ในการศึกษาปริมาณในเตรทที่มีผลต่อการเจริญเติบโต.....	52
4.3 ผลการทดสอบปริมาณในเตรทที่มีต่อการผลิตสารพิษ.....	53
4.4 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของ <i>M. aeruginosa</i> ในการศึกษาปริมาณฟอสเฟตที่มีผลต่อการเจริญเติบโต.....	56
4.5 ผลการทดสอบปริมาณฟอสเฟตที่มีต่อการผลิตสารพิษ.....	58
4.6 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของ <i>M. aeruginosa</i> ในการศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการเจริญเติบโต.....	61
4.7 ผลการทดสอบความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการผลิตสารพิษ.....	62
4.8 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของ <i>M. aeruginosa</i> ในการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโต.....	65
4.9 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตสารพิษ.....	67
4.10 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของ <i>M. aeruginosa</i> ในการศึกษาความเข้มแสงที่มีผลต่อการเจริญเติบโต.....	70
4.11 ผลการทดสอบความเข้มแสงที่มีต่อการผลิตสารพิษ.....	71
4.12 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากตัวอย่างธรรมชาติ.....	73
4.13 แสดงน้ำหนักและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยของหนูพุกขาวที่ได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว.....	75
4.14 น้ำหนักตัวของหนูพุกขาวหลังจากได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว.....	76
4.15 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ	86

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 แสดงแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย.....	6
3.1 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติ.....	33
3.2 แสดงขั้นตอนการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษ.....	36
3.3 แสดงสภาวะการเพาะเลี้ยง <i>M. aeruginosa</i> บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไดน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที.....	37
3.4 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์สารพิษ.....	38
3.5 แสดงขั้นตอนการตรวจความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง.....	40
4.1 แสดงชนิดของไซยาโนแบคทีเรียที่พบจากแหล่งน้ำธรรมชาติ.....	43
4.2 แสดงลักษณะของกลุ่มเซลล์และเซลล์ของ <i>M. aeruginosa</i>	45
4.3 แสดงผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญเติบโตของ <i>M. aeruginosa</i>	47
4.4 แสดงผลการศึกษาแหล่งฟอสฟอรัสที่มีต่อการเจริญเติบโตของ <i>M. aeruginosa</i>	49
4.5 แสดงผลการศึกษาปริมาณไนเตรทที่มีต่อการเจริญเติบโตของ <i>M. aeruginosa</i>	51
4.6 แสดงผลการศึกษาปริมาณฟอสเฟตที่มีต่อการเจริญเติบโตของ <i>M. aeruginosa</i>	55
4.7 แสดงผลการศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการเจริญเติบโตของ <i>M. aeruginosa</i>	60
4.8 แสดงผลการศึกษาอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของ <i>M. aeruginosa</i>	64
4.9 แสดงผลการศึกษาความเข้มแสงที่มีต่อการเจริญเติบโตของ <i>M. aeruginosa</i>	69
4.10 แสดงลักษณะของเซลล์ดัดแปรที่ไม่ได้รับสารสกัด.....	77
4.11 แสดงลักษณะเซลล์ดัดแปรของหนูพุกขาวหลังจากได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากอ่างเก็บน้ำบางพระเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยแสดงการขยายตัวของหลอดเลือดซึ่งคิซีสีอีโอซิน และเกิดการตกตะกอนของเลือดใน portal triad และพบการคั่งของเลือดในเส้นเลือด	78
4.12 แสดงลักษณะเซลล์ดัดแปรของหนูพุกขาวหลังจากได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากอ่างเก็บน้ำบางพระเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยพบการคั่งของเลือดใน central vein และรอบเส้นเลือดเล็กๆ.....	79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่	หน้า
4.13 แสดงลักษณะเซลล์ตับของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจาก ไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากอ่างเก็บน้ำบางพระเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยพบอาการคั่ง และขยายตัวของหลอดเลือดใน portal triad เกิดการสะสมของเม็ดเลือดขาว บริเวณรอบๆท่อน้ำดี เซลล์ตับบางแห่งเกิดอาการบวมและถูกทำลาย.....	80
4.14 แสดงลักษณะเซลล์ตับของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจาก ไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากเขื่อนแม่กวงเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยจะแสดงการตายของ เนื้อเยื่อเซลล์ตับและเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บอย่างรุนแรง.....	81
4.15 แสดงลักษณะเซลล์ตับของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจาก ไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากเขื่อนแม่กวงเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งจะแสดงการสะสมของ เม็ดเลือดขาวในบริเวณเนื้อเยื่อที่ตายรอบท่อน้ำดี.....	82
4.16 แสดงลักษณะเซลล์ตับของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจาก ไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากเขื่อนแม่กวงเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยจะแสดงลักษณะของ เซลล์ตับที่ถูกทำลายในบริเวณส่วนกลางของพู (ทางขวา) เปรียบเทียบ กับบริเวณเซลล์ตับปกติ (มุมซ้ายด้านบน).....	83
4.17 แสดงลักษณะเซลล์ตับของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจาก ไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากเขื่อนแม่กวงเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยจะแสดงลักษณะการรวมตัว ของสารสีที่เกิดจากการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงบริเวณ portal tract และพบการขยายตัวของท่อน้ำดี.....	84

บทที่ 1

บทนำ

ความแตกต่างของลักษณะภูมิประเทศทำให้เกิดแหล่งน้ำต่างๆมากมาย และสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งขนาดและความลึกได้อยู่เสมอ โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องของการเปลี่ยนแปลงนี้คือ อุณหภูมิ ลักษณะทางธรณีวิทยาและกระบวนการทางชีววิทยา ส่วนหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้เกิดปรากฏการณ์ ยูโทรฟิเคชัน (eutrophication) ซึ่งเกิดเนื่องจากในแหล่งน้ำมีปริมาณธาตุอาหารเพิ่มขึ้น มีการดำเนินกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตสูงขึ้น และการตกตะกอนของอินทรีย์วัตถุจาก สันริมน้ำ อย่างไรก็ตามพบว่ากิจกรรมการใช้น้ำของมนุษย์ เช่น การเกษตร และอุตสาหกรรมเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดยูโทรฟิเคชัน (Moore and Thornton , 1988)

การเกิดยูโทรฟิเคชันทำให้พบสิ่งมีชีวิตจำพวกพืชน้ำและสาหร่าย (algae) หลายชนิด แต่จะพบสาหร่ายเป็นจำนวนมากที่สุด โดยในฤดูหนาวสาหร่ายที่พบเป็นจำนวนมากที่สุด คือ ไดอะตอม (diatom) และสาหร่ายสีเขียว (green algae) ในฤดูร้อนพบสาหร่ายสีเขียวมากที่สุด ส่วนปลายฤดูร้อนและฤดูฝนจะพบไซยาโนแบคทีเรีย (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน; cyanobacteria; blue-green algae) มากที่สุด แต่ส่วนใหญ่การเกิดยูโทรฟิเคชันจะพบไซยาโนแบคทีเรียมากที่สุด การเพิ่มขึ้นของไซยาโนแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำหรือวอเตอร์บลูม (water bloom) ไซยาโนแบคทีเรียที่พบเป็นปริมาณมากที่สุด คือ ไซยาโนแบคทีเรียในสกุล *Microcystis* และพบว่ามีความประมาณ 2-5 ชนิดที่สามารถผลิตสารพิษได้ ในจำนวนนั้น ได้แก่ *Microcystis aeruginosa*, *M. viridis*, *M. wesenbergii* และ *M. flos-aquae* แต่ชนิดที่พบมากที่สุดคือ *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend. Elenkin. ซึ่งเป็นชนิดแรกที่ถูกแยกนำมาเลี้ยงและศึกษาในห้องปฏิบัติการ (Bishop et al., 1959) สารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำแบ่งเป็นประเภทหลักๆได้ 2 ประเภท คือ สารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ตับ (hepatotoxin) และสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท (neurotoxin) ความรุนแรงของสารพิษขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ ปริมาณของสารพิษ และขนาดของสัตว์ที่ได้รับสารพิษ (อาภารัตน์ 2539)

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันแหล่งน้ำหลายแห่งทั่วโลกทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อนกำลังประสบกับปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษ ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าเป็นไซยาโนแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียเหล่านี้จะเจริญและก่อตัวเป็นแผ่น (scum) ในขนาดและความหนาต่างๆกัน นอกจากเป็นปัญหาสำคัญในการจัดการเกี่ยวกับแหล่งน้ำแล้ว ยังพบว่ามีสาหร่ายหลายสกุลที่สามารถผลิตสารพิษที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดการตายอย่างกว้างขวางของปลุสัตว์ สัตว์เลี้ยงตามบ้าน สัตว์ปีกที่อพยพย้ายถิ่น ที่บริโภคน้ำในแหล่งน้ำที่มีการเจริญเติบโตของสาหร่ายอย่างหนาแน่นมาเป็นเวลานาน มนุษย์ก็สามารถได้รับสารพิษจากสาหร่ายและก่อให้เกิดอาการต่างๆ เช่น อาการอัมพาตที่เกิดเนื่องจากการบริโภคหอยที่กรองสาหร่ายที่ผลิตสารพิษเป็นอาหาร (paralytic shellfish poisoning; PSP) (Gago-Martinez *et al.*, 1996) นอกจากนี้กิจกรรมบางอย่าง เช่น การเล่นกีฬาทางน้ำบางประเภทที่ทำให้มนุษย์ต้องหายใจเอาละอองน้ำ หรือการกลืนน้ำที่มีสาหร่ายปนเปื้อนเข้าไป โดยไม่ได้ตั้งใจ ในบางกรณีพบว่าทำให้เกิดอาการแพ้หรือเกิดอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท เช่น อาการชาบริเวณกล้ามเนื้อ (Falconer, 1996) แต่ยังไม่มียางานว่าเป็นสาเหตุให้ถึงแก่ความตาย

จากปัญหาดังกล่าวจึงมีนักวิจัยหลายท่านได้พยายามศึกษาเกี่ยวกับสารพิษที่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรีย ดังจะเห็นได้จากการศึกษาของ Carmichael (1992 และ 1994) และ Sivonen (1996) ที่ทำการศึกษเกี่ยวกับชนิดและโครงสร้างของสารพิษที่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรีย Kaya และ Watanabe (1994) ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและความเป็นพิษของสารพิษในกลุ่มไมโคซิสตินที่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรีย Falconer (1996) ศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียที่มีต่อมนุษย์ จะเห็นได้ว่าปัญหาที่เกิดขึ้นทำให้นักวิจัยในหลายๆประเทศให้ความสนใจและให้ความสำคัญเป็นอย่างมาก

โดยที่ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย จากการสำรวจพบว่าแหล่งน้ำหลายแห่งในประเทศกำลังประสบกับปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย และเมื่อทำการจัดจำแนกพบว่าส่วนใหญ่เป็นสาหร่ายที่ผลิตสารพิษที่เป็นอันตราย ถึงแม้ว่าจะยังไม่มีรายงานหรือการติดตามศึกษาเกี่ยวกับปัญหาที่เกิดขึ้น แต่ถ้าประชากรโดยเฉพาะประชากรที่อยู่ในชนบทใช้น้ำจากแหล่งน้ำที่มีสาหร่ายที่ผลิตสารพิษปนเปื้อนเป็นเวลานาน หรือแม้แต่ประชากรในเมืองที่อาจได้รับสารพิษจากสาหร่ายที่ปนเปื้อนมากับน้ำประปา อาจก่อให้เกิดปัญหาการเจ็บป่วยดังที่ได้เกิดกับหลายประเทศมาแล้ว อย่างไรก็ตามปัญหาที่เกิดขึ้นในประเทศไทยยังไม่ชัดเจนพอที่จะทำให้นักวิชาการหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องหันมาสนใจและให้ความสำคัญต่อผลร้ายที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในอนาคต

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 ดำรวจ จัดจำแนกชนิด และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ

1.2.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารพิษในไซยาโนแบคทีเรีย

1.2.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารพิษ และจัดจำแนกชนิดของสารพิษในไซยาโนแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่างธรรมชาติ

1.2.4 ศึกษาความเป็นพิษของไซยาโนแบคทีเรียที่มีต่อสัตว์ทดลอง

1.2.5 วิเคราะห์คุณภาพน้ำจากตัวอย่างที่เก็บในบริเวณที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย

1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

1.3.1 สูตรอาหาร MA สำหรับเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งมีส่วนประกอบของไนโตรเจนและฟอสเฟตที่สามารถทำให้ไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโต และผลิตสารพิษสูงกว่าสูตรอาหาร MA ที่ไม่มีส่วนประกอบของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

1.3.2 การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหาร MA มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษของไซยาโนแบคทีเรีย โดยในสถานะที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง จะทำให้ไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีและผลิตสารพิษได้สูง

1.3.3 ในสถานะการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการ การควบคุมอุณหภูมิให้ใกล้เคียงกับอุณหภูมิของแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย จะทำให้ไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และผลิตสารพิษได้สูง

1.3.4 ในสภาพธรรมชาติไซยาโนแบคทีเรียจะได้รับความเข้มแสงสูง ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการถ้าให้ความเข้มแสงสูงไซยาโนแบคทีเรียน่าจะเจริญเติบโตได้ดี และผลิตสารพิษได้สูงกว่าในสถานะที่ให้ความเข้มแสงต่ำ

1.4 แนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

การจำแนกชนิดและศึกษาความเป็นพิษของไซยาโนแบคทีเรีย ทดลองโดยนำตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ มาทำการจัดจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดปัญหา หลังจากนั้นทำการแยกเซลล์และนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร เพื่อจะทำการทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารพิษ แต่จะทำการทดลองจะทำการทดสอบบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ ทุกๆ 2 วันจะทำการเก็บตัวอย่าง นำไปนับจำนวนเซลล์เพื่อดูการเจริญเติบโต เมื่อการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วงแรกของการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ

สารพิษโดยวิธีของ Harada (1988) ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี (High performance liquid chromatography; HPLC) หาปริมาณสารพิษจากตัวอย่างในธรรมชาติ และทำการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง โดยนำเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติไปทำให้แห้งในสภาพแข็ง แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษ และอีกส่วนหนึ่งนำไปทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง สุดท้ายทำการประเมินผลการทดลองและสรุปผล (ดังแสดงในรูปที่ 1.1)

1.5 ขอบเขตการวิจัย

1.5.1 ทำการศึกษาชนิดและปริมาณของไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 แห่ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.5.2 แยกชนิดของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษโดยใช้พาสเจอร์บีเปิดที่ดิงปลาย จากนั้นนำเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซน

1.5.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารพิษของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งได้แก่ความต้องการไนโตรเจนและฟอสเฟต ความเป็นกรด-ด่างของอาหารสำหรับเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย อุณหภูมิ ความเข้มแสง

1.5.4 ศึกษาความเป็นพิษของไซยาโนแบคทีเรียในสัตว์ทดลอง โดยใช้หนูพุกขาวเป็นตัวแทนสำหรับการทดสอบ ทำการทดสอบโดยวิธี oral toxicity test และคัดแยกเซลล์ดิบเพื่อตรวจดูความผิดปกติภายใน

1.5.5 วิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากตัวอย่างธรรมชาติ โดยนำตัวอย่างที่เก็บได้ไปทำให้แห้งในสภาพแข็ง นำไปสกัด และวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษโดยวิธีของ Harada (1988) ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี

1.5.6 วิเคราะห์คุณภาพน้ำบางประการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ดีโอ (DO ; dissolved oxygen) บีโอดี (BOD ; biochemical oxygen demand) ไนเตรท (NO_3^-) ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) และจำนวนแบคทีเรีย

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

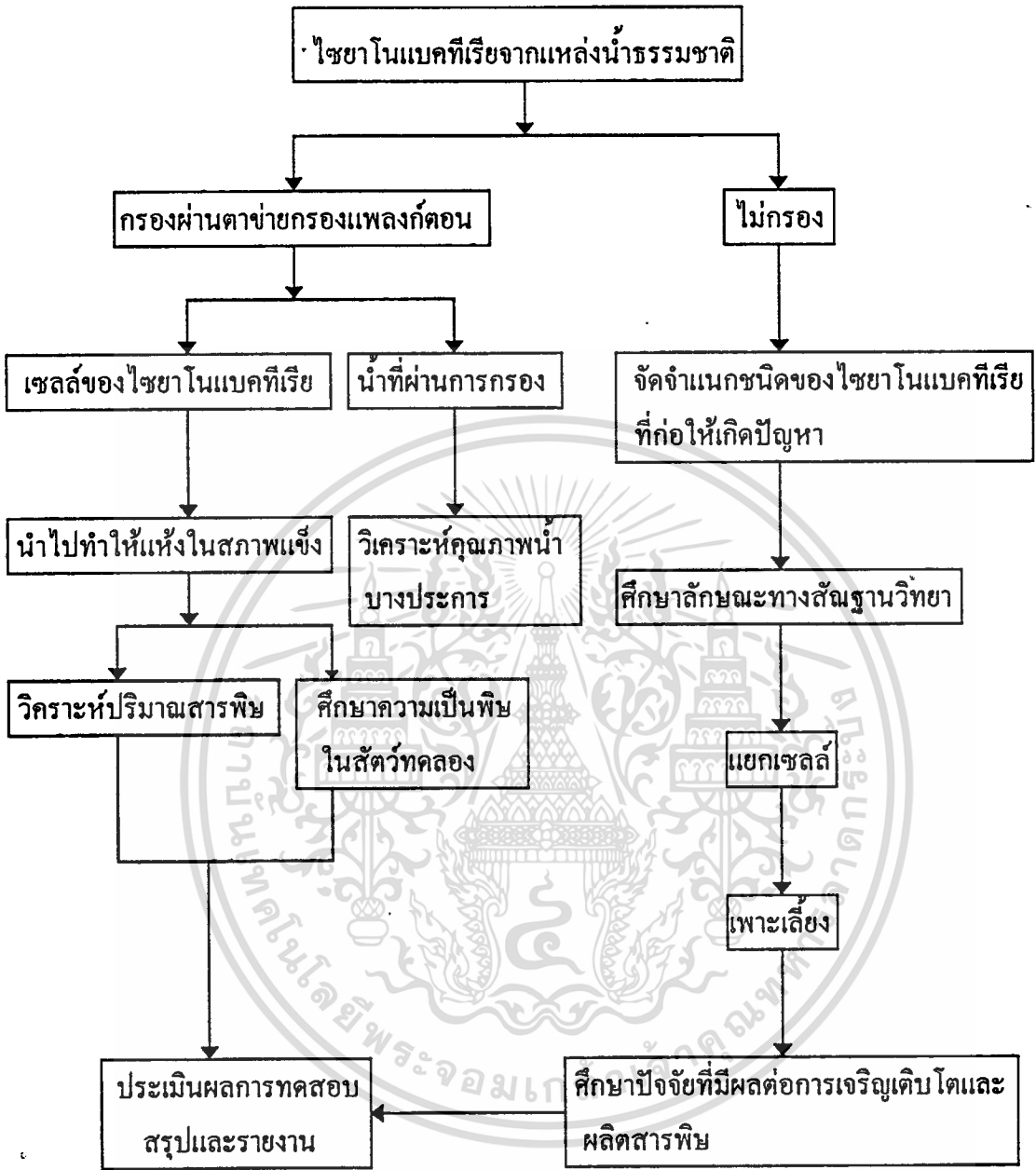
1.4.1 นำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาค้นคว้าต่อไป เช่น การศึกษาโครงสร้างของสารพิษ การศึกษาพันธุกรรมของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ การศึกษาความเป็นพิษในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ฯลฯ

1.4.2 เพื่อเป็นแนวทางในการหาวิธีป้องกันอันตราย ที่จะเกิดกับมนุษย์และสัตว์จากสารพิษบริเวณน้ำที่ปนเปื้อนไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ

1.4.3 เพื่อเป็นแนวทางในการหาวิธีที่จะกำจัดไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.1 แสดงแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทำให้สามารถแบ่งการศึกษาออกได้เป็นหัวข้อต่างๆดังนี้

- 2.1 การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย
- 2.2 สารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำ
- 2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารพิษของสาหร่าย

2.1 การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย

ผลจากการขยายตัวของเมืองต่างๆได้ก่อให้เกิดปัญหาที่สำคัญตามมาคือ การปล่อยน้ำเสียจากแหล่งชุมชน จากนิคมอุตสาหกรรม การถูกชะล้างของปุ๋ยเคมีจากการเกษตรลงสู่แหล่งน้ำ ซึ่งนอกจากจะก่อให้เกิดปัญหากับแหล่งน้ำในทางตรง คือ ทำให้แหล่งน้ำเน่าเสียแล้ว ยังก่อให้เกิดปัญหาทางอ้อม คือ การทะลักของน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำที่ใช้ในการผลิตน้ำประปา ยังผลให้เกิดปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายขึ้น

การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย (algal bloom หรือ water bloom) หมายถึง การมีสาหร่ายเกิดอยู่ในแหล่งน้ำจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็วจนทำให้น้ำเปลี่ยนสี บางครั้งเกิดกลิ่นเหม็น หรือรสเปลี่ยนไป เมื่อสาหร่ายเหล่านี้ตายจะก่อให้เกิดการเน่าเสียในน้ำและทำให้น้ำขาดออกซิเจนเป็นผลทำให้สิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำตาย

การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายพบได้โดยทั่วไปตามแหล่งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำทะเล ในน้ำทะเลการเกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย เรียกว่า ปรากฏการณ์ จี๊ปลาวาพ หรือ เรดไทด์ (red tide) ทำให้น้ำทะเลเป็นสีแดง ซึ่งสาหร่ายที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์นี้ส่วนใหญ่จะเป็น dinoflagellates ในขณะที่แหล่งน้ำจืดและน้ำกร่อยจะพบสาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ โดยพบว่าเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษร้อยละ 25-70 (Pearson, 1990; Vasconcelos, 1994)

ในจำนวนไซยาโนแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน Order Chroococcales, Order Oscillatoriaceae และ Order Nostocaceae จัดเป็นพวกแพลงก์ตอน (planktonic forms) ในขณะที่สาหร่ายในบาง Order อาจมีเพียงระยะเดียวที่เป็นแพลงก์ตอนในช่วงหนึ่งของชีวิต ซึ่งจะไม่จัดเป็นพวกแพลงก์ตอน Huber - Pestalozzi (1938) พบว่าในแหล่งน้ำจืดมีสาหร่ายที่เป็นแพลงก์ตอน 44 สกุล 251 ชนิด จากจำนวนไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมด 150 สกุล 1500 ชนิด

การที่มีไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตอยู่ในแหล่งน้ำเป็นจำนวนมากอาจเกิดจากไซยาโนแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว Smith (1950) และ Huber - Pestalozzi (1938) ได้แสดงชนิดของไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำที่เกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยรวบรวมได้ 40 ชนิด ดังตารางที่ 2.1

ในประเทศอินเดียชนิดของไซยาโนแบคทีเรียที่พบในบริเวณแหล่งน้ำที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วคือ *Microcystis aeruginosa* และ *Trichodesmium* spp. (Crow, 1922) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วก็คือ แสง อุณหภูมิ ปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่สูง

เป็นเวลายาวนานหลายศตวรรษที่ไซยาโนแบคทีเรีย *Trichodesmium erythraeum* และ *Trichodesmium thiebautii* ได้ก่อให้เกิดปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในบริเวณมหาสมุทรอินเดีย อ่าวเบงกอล และทะเลเอราเบีย นอกจากนี้ความเป็นพิษของสาหร่ายเหล่านี้ทำให้ปลาในบริเวณดังกล่าวตาย (Ballantine et al., 1957)

ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วมักจะมองเห็นสาหร่ายลอยเป็นแผ่นอยู่บนผิวน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 องค์ประกอบสำคัญที่มีหน้าที่ช่วยในการลอยตัวบนผิวน้ำก็คือ แก๊สแวกิวโอล (gas vacuoles) ซึ่งจะพบได้ในสกุล *Coelosphaerium*, *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* และสาหร่ายบางชนิดในสกุล *Gloeotrichia*, *Tolypothrix*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Calothrix* ในสาหร่ายบางชนิดแก๊สแวกิวโอลอาจเกาะหรืออยู่เป็นอิสระภายในเซลล์ และจะปรากฏให้เห็นชัดเจนเมื่อได้รับความเข้มแสงสูง (Bornet and Thuret, 1880 and van Goor, 1925) ในสาหร่ายบางชนิดแก๊สแวกิวโอลจะหายไปเมื่ออยู่ในที่มืด สาหร่ายที่เป็นแพลงก์ตอนทุกชนิดไม่จำเป็นจะต้องมีแก๊สแวกิวโอล

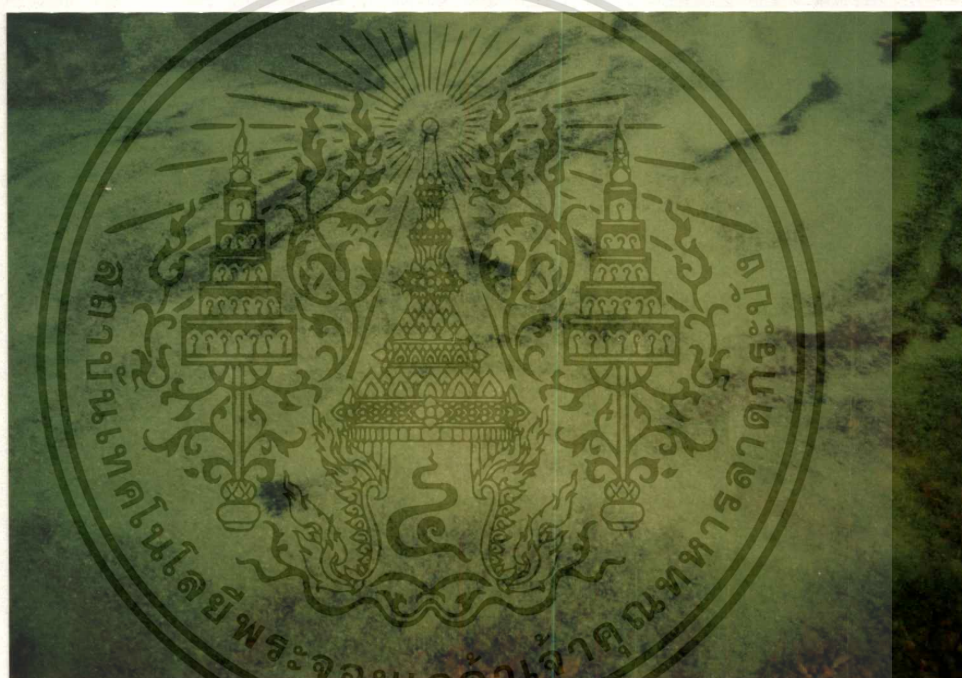
โดยปกติจะเห็นแก๊สแวกิวโอลมีสีเขียวปนเหลือง ที่ความเข้มแสงต่ำจะปรากฏเป็นสีดำ และเมื่อความเข้มแสงสูงจะปรากฏเป็นสีแดง (Brand, 1906 and van Goor, 1925) ในสาหร่ายแก๊สแวกิวโอลจะอยู่ภายในโครโมพลาสต์ซิม (chromoplasm) (Geitler, 1936) สำหรับไซยาโนแบคทีเรียในสกุล *Oscillatoria* แก๊สแวกิวโอลจะมีลักษณะเป็นถุงกลม แต่โดยทั่วไปจะมีรูปร่างไม่แน่นอนและมีลักษณะขรุขระ (van Goor, 1918) ส่วนแก๊สที่บรรจุภายในถุงนี้คาดว่าเป็นแก๊สไนโตรเจนหรือสารประกอบของไนโตรเจนจำพวกเอมีน (amine) ซึ่งมีส่วนช่วยในการลอยตัวของสาหร่าย (กาญจนภรณ์ 2527) การลอยตัวของสาหร่ายเริ่มจาก สาหร่ายจะจมอยู่ตามพื้น เมื่อสร้างแก๊สแวกิวโอลจะลอยขึ้นมาที่ผิวน้ำ เมื่อสาหร่ายได้รับแสงและเกิดการสังเคราะห์แสงทำให้ความดันภายในเซลล์เพิ่มขึ้นมีผลทำให้แก๊สแวกิวโอลลดลงและหายไปในที่สุด สาหร่ายก็จะจมตัวลงอีกครั้ง (van Goor, 1925 ; Bethge, 1935 and Feldmann, 1932)

ตารางที่ 2.1 สกุล-ชนิดของไซยาโนแบคทีเรียที่พบในช่วงที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในแหล่งน้ำ

สกุล-ชนิด	สกุล-ชนิด
<i>Anabaena catenula</i>	<i>Lyngbya hieronymusii</i>
<i>Anabaena catenula</i> var. <i>affinis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
<i>Anabaena cercinalis</i>	<i>Microcystis elabens</i>
<i>Anabaena cercinalis</i> var. <i>cyrtospora</i>	<i>Microcystis flos-aquae</i>
<i>Anabaena flos-aquae</i>	<i>Microcystis ichthyoblabe</i>
<i>Anabaena leranderi</i>	<i>Microcystis ochracea</i>
<i>Anabaena macrospora</i>	<i>Microcystis prasina</i>
<i>Anabaena macrospora</i> var. <i>robusta</i>	<i>Microcystis scripta</i>
<i>Anabaena spiroides</i>	<i>Microcystis viridis</i>
<i>Anabaena utermohli</i>	<i>Nodularia spumigena</i>
<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	<i>Nostoc carneum</i>
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	<i>Nostoc linckia</i>
<i>Aphanizomenon recurvum</i>	<i>Oscillatoria aerugescens</i>
<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Oscillatoria agardhii</i>
<i>Coelosphaerium dubium</i>	<i>Oscillatoria prolifica</i>
<i>Coelosphaerium kuetzingianum</i>	<i>Oscillatoria rubescens</i>
<i>Coelosphaerium naegelianum</i>	<i>Oscillatoria planctonica</i>
<i>Gloeotrichia echinulata</i>	<i>Oscillatoria redekei</i>
<i>Gloeotrichia natans</i>	<i>Spirulina gomontiana</i>
<i>Lyngbya limnetica</i>	<i>Spirulina thompsoniana</i>

โดยทั่วไปไซยาโนแบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในแหล่งน้ำและผลิตสารพิษ ได้แก่ *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia* และ *Gloeotrichia* ชนิดที่พบบ่อยคือ *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae* และ *Aphanizomenon flos-aquae* สารพิษจากสาหร่ายที่ถูกปลดปล่อยออกมาในน้ำทำให้ปลาและสัตว์น้ำตาย เนื่องจากสารพิษเหล่านี้ทำให้การหายใจติดขัดและอาจทำลายเนื้อเยื่อของตับ แต่ในบางครั้งปลาอาจตายด้วยสาเหตุที่มีสาหร่ายปริมาณมากไปอุดช่องเหงือกทำให้ขาดออกซิเจน สารพิษจากสาหร่ายยังก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยง เช่น โค กระบือ แพะ แกะ และสัตว์ปีกที่มากินน้ำ อากาศเป็นพิษส่วนใหญ่พบว่ามีผลต่อระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพมนุษย์เนื่องจากการเล่นน้ำและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ลักษณะของแหล่งนำธรรมชาติในขณะที่เกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค้ำน้ำที่ปนเปื้อนสาหร่ายที่ผลิตสารพิษ ทั้งนี้เนื่องมาจากสารพิษดังกล่าวนี้ไม่สามารถขจัดให้หมดได้โดยการกรอง การตกตะกอน การใส่คลอรีน หรือแม้แต่การค้ำ

2.1.1 สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย

สภาวะแวดล้อมของแหล่งน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย ได้แก่

2.1.1.1 บรรยากาศบริเวณแหล่งน้ำนั้นอยู่ในสภาพลมสงบ หรือลมพัดอ่อนๆ

2.1.1.2 อุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 15-30 องศาเซลเซียส

2.1.1.3 น้ำในแหล่งน้ำนั้นอยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง

2.1.1.4 มีปริมาณสารอินทรีย์ ได้แก่ ไนเตรทและฟอสเฟต ละลายอยู่ในปริมาณมาก 10-15 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในช่วงที่อากาศอบอุ่น ในบริเวณแหล่งน้ำจะมีอุณหภูมิและความเข้มแสงสูงขึ้นประกอบกับมีปริมาณธาตุอาหารเพิ่มขึ้น จึงทำให้สาหร่ายคงอยู่ในแหล่งน้ำได้เป็นเวลานาน

นอกจากสภาวะแวดล้อมดังที่ได้กล่าวมา บริเวณของแหล่งน้ำรวมถึงฤดูกาลยังมีผลต่อการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย เช่นในกรณีของไซยาโนแบคทีเรียในสกุล *Microcystis* เมื่อเกิดการเจริญเติบโตในบริเวณแหล่งน้ำที่อยู่ในระหว่างเขตหนาวกับเขตร้อนปริมาณ *Microcystis* จะเริ่มเพิ่มจำนวนขึ้นในช่วงฤดูใบไม้ผลิหรือช่วงก่อนฤดูร้อน และเมื่อน้ำมีอุณหภูมิมากกว่า 20 องศาเซลเซียส ไซยาโนแบคทีเรียจะเริ่มก่อตัวเป็นแผ่นลอยอยู่บนผิวน้ำจนถึงปลายฤดูร้อน ในบางกรณีจะพบโคโลนีของไซยาโนแบคทีเรียแขวนลอยอยู่ในน้ำตลอดช่วงฤดูหนาวจนถึงฤดูใบไม้ผลิ (Reynolds, 1984)

ในแหล่งน้ำบริเวณใกล้เขตร้อน เช่น ประเทศจีนตอนใต้จะพบ *Microcystis aeruginosa* ซึ่งเป็นชนิดหลักที่จะพบได้ตลอดฤดูร้อน ฤดูใบไม้ร่วง และฤดูหนาว โดยจะก่อตัวเป็นแผ่นมากที่สุดในช่วงฤดูหนาวเมื่อน้ำมีอุณหภูมิ 11-12 องศาเซลเซียส (Zohary and Robarts, 1989)

2.1.2 การควบคุมการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย

มีการศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายหลายทาง การควบคุมในทางชีวภาพมีการศึกษาโดยใช้ ฟาจ (phage) ซึ่งแยกได้โดยการคัดเลือกจากสภาพธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มี การทดลองปฏิบัติอย่างจริงจัง (Hu, 1981) นอกจากนี้มีการใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญหรือฆ่าจุลินทรีย์ตัวอื่นได้ (ดวงพร 2530) การควบคุมทางกายภาพ เช่น การใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet irradiation)

การควบคุมทางเคมี โดยการใช้สารส้มหรือสารที่ทำให้เกิดการตกตะกอน หรือใช้สารฆ่าสาหร่าย (algicide) เช่น จุนสีตะตุ (copper sulphate) ไอโซน คลอรีน propanyl, 2-3-

dichloronaphthoquinone, 3,4-dichloroaniline ซึ่งมีผลยับยั้งไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นแพลงก์ตอนได้อย่างจำเพาะเจาะจง และไม่มีความเป็นพิษต่อปลา โดยใช้ความเข้มข้น 20-25 พีพีบี นอกจากนี้ยังพบว่าสารปฏิชีวนะบางอย่าง เช่น สเตปโตมัยซิน ประมาณ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ นิโอมัยซิน 4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดได้ แต่จากการทดลองของ Fogg และคณะ (1973) พบว่าโดยทั่วไปไซยาโนแบคทีเรียมีความไวต่อสารปฏิชีวนะในช่วงกว้าง ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาถึงความแตกต่างของความไวต่อสารปฏิชีวนะ

อย่างไรก็ตามแม้จะกำจัดเซลล์สาหร่ายแล้ว ก็ยังพบว่าสารพิษที่ตกค้างอยู่ในแหล่งน้ำยังคงเป็นสาเหตุการตายของสัตว์ได้ และการทำลายสารพิษก็ไม่สามารถจัดให้หมดได้โดยการกรอง การตกตะกอน การใส่คลอรีน หรือแม้แต่การต้ม

2.2 สารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำ

สารพิษจากสาหร่าย คือ สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างและสลายของเซลล์ เป็นสารที่ไม่เกี่ยวข้องหรือจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต แม้ว่าในบางครั้งจะช่วยในการอยู่รอดในธรรมชาติก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่ทราบเหตุผลที่แท้จริงในการผลิตสารพิษของสาหร่าย แต่คาดว่าสารพิษที่สร้างขึ้นทำหน้าที่เป็นเสมือนสารป้องกันตัว (protective compound) จากศัตรูหรือคู่แข่งในธรรมชาติ (อาภารัตน์ 2539)

2.2.1 การเกิดสารพิษในแหล่งน้ำ

สารพิษจากสาหร่ายจะถูกปลดปล่อยสู่แหล่งน้ำเมื่อเซลล์ตายหรือเซลล์แก่ และเกิดการรั่วของผนังเซลล์ (อาภารัตน์ 2539) สารพิษจากสาหร่ายจะมีปริมาณการผลิตสูงสุดในช่วงแรกของการเจริญเติบโตคงที่ (late logarithmic growth phase หรือ early stationary phase) ปริมาณสารพิษจะเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยบางอย่างและกลไกการควบคุมการผลิตสารพิษ ความเข้มข้นของสารพิษที่พบโดยทั่วไปมีประมาณ 19 ไมโครกรัมของสารพิษต่อลิตร ในช่วงที่เกิดการเจริญเติบโตของสาหร่ายมากที่สุดพบว่ามีปริมาณสารพิษมากถึง 1,830 ไมโครกรัมต่อลิตร (Kirsten, 1996)

สัตว์จะได้รับสารพิษจากสาหร่ายเมื่อดื่มน้ำที่มีสาหร่ายที่สร้างสารพิษปนเปื้อนอยู่ ซึ่งปัจจัยที่มีผลก่อให้เกิดอาการบาดเจ็บตายของสัตว์เมื่อได้รับสารพิษ ได้แก่

- ก. ชนิดและปริมาณของสารพิษที่ผลิตโดยสาหร่าย
- ข. ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์สาหร่าย
- ค. ชนิด เพศ และขนาดของสัตว์

โดยทั่วไปแล้วปริมาณของน้ำที่สัตว์ดื่มเข้าไปแล้วทำให้เกิดอาการบาดเจ็บและทำให้ถึงแก่ความตายมีได้ตั้งแต่ 2-3 มิลลิลิตร จนถึงหลายลิตร มีรายงานบางส่วนที่แสดงถึงผลของสารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำที่มีต่อสัตว์ โดยแสดงดังตารางที่ 2.2

2.2.2 กลุ่มของสารพิษจากสาหร่าย

กลุ่มของสารพิษจากสาหร่ายสามารถแบ่งตามการตรวจวิเคราะห์ทางชีววิทยา (bioassay) เพื่อให้ทราบถึงลักษณะความเป็นพิษได้ 2 กลุ่มคือ

2.2.2.1 กลุ่มที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxin)

2.2.2.2 กลุ่มที่เป็นพิษต่อสัตว์ (biotoxin)

2.2.2.1 กลุ่มที่เป็นพิษต่อเซลล์ การค้นพบสารพิษในกลุ่มนี้เกิดจากการค้นหาเภสัชภัณฑ์ชนิดใหม่ๆ สารออกฤทธิ์ทางการเกษตร เอนไซม์ สารปฏิชีวนะ และสารต้านมะเร็ง เป็นต้น มหาวิทยาลัยแห่งฮาวาย (University of Hawaii) ได้รายงานว่าพบไซยาโนแบคทีเรียสร้างสารออกฤทธิ์ในกลุ่มนี้ได้ร้อยละ 7 ของตัวอย่างสาหร่ายที่สุ่มเก็บจากธรรมชาติ (Patterson et al., 1991)

สารพิษในกลุ่มนี้จะไม่ก่อให้เกิดพิษจนถึงแก่ความตายในสัตว์ แต่จะแสดงความสามารถอย่างกว้างขวางในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ สาหร่าย แบคทีเรีย รา และเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (culture mammalian cell line) จากรายงานของ Hawkins และคณะ (1985) พบว่าสารพิษจาก *Cylindrospermopsis raciborskii* ซึ่งเป็นสารพิษประเภทอัลคาลอยด์มีผลทำให้เกิดอาการบาดเจ็บในลำไส้ ตับ ไต และปอดของหนูถีบจักร ความเป็นพิษของสาหร่ายชนิดนี้นอกจากจะมีผลต่อสัตว์ ยังพบว่ามีผลต่อมนุษย์ด้วย โดยในปี 1975 ประชากรเมืองในอเมริกาจำนวน 5,000 คน มีอาการป่วยเกี่ยวกับกระเพาะและลำไส้ เนื่องมาจากการดื่มน้ำที่ปนเปื้อนสาหร่ายชนิดนี้ (Lippy, 1976) นอกจากนี้ความเป็นพิษของ *Cylindrospermopsis* ยังเป็นสาเหตุให้เกิดการเจ็บป่วยของประชากรที่อยู่ทางตอนเหนือและตอนกลางของประเทศออสเตรเลีย

สารออกฤทธิ์ต่อเซลล์ที่มีการศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเคมีแล้ว ได้แก่ acutiphycins, indolcarbazoles, mirabilene isonitriles, paracyclophanes, scytophycins, tentazoles, tolytoxin, toyocamycin และ tubercidin ซึ่งสารเหล่านี้ส่วนใหญ่จะถูกสร้างโดยไซยาโนแบคทีเรียใน Order Nostocales และ Stigonematales ซึ่งจะพบมากในน้ำจืดและบนบก

2.2.2.2 กลุ่มที่เป็นพิษต่อสัตว์ สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นแหล่งใหญ่ของสารพิษที่พบในธรรมชาติ ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรียที่ลอยอยู่ในบริเวณพื้นผิวน้ำในสกุล *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* และ *Oscillatoria* ซึ่งสารพิษจากสาหร่ายเหล่านี้ได้ถูกแยกและศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเคมีไปบ้างแล้ว ส่วนสาหร่ายในสกุล *Coelosphaerium*, *Cylindrospermopsis*, *Fischerella*, *Gloeotrichia*, *Gomphosphaeria*, *Hapalosiphon*, *Microcoleus*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Spirulina*, *Symploca*, *Tolypothrix* และ

ตารางที่ 2.2 บางส่วนของรายงานที่แสดงถึงผลของสารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำที่มีต่อมนุษย์ และสัตว์

อุบัติการณ์	แหล่งอ้างอิง
การตายของปลุสสัตว์ และสัตว์อื่นๆอย่างกว้างขวางภายหลังจากลงคิมน้ำในแม่น้ำเมอร์เรย์ ประเทศออสเตรเลีย	Carmichael, 1994
การตายของฝูงเป็ด และห่านที่โยกย้ายถิ่นภายหลังจากคิมน้ำที่มีไซยาโนแบคทีเรียปนเปื้อนในแถบมิคเวสต์ ประเทศสหรัฐอเมริกา	Carmichael, 1994
การตายของสุนัข และลูกวัวหลายตัวในมลรัฐเซ้าท์ คาโกตา ประเทศสหรัฐอเมริกา	Mahmood et al., 1998
การตายของสุกร และเป็ดจำนวนมากในมลรัฐอิลลินอยส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา	Cook et al., 1989
การระบาดของรุนแรงของโรคตับอักเสบในเกาะปาล์ม (Palm Island) รัฐควีนสแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย	Baurke et al., 1983
การตายของฝูงโคภายหลังจากการคิมน้ำในทะเลสาบที่มีสาหร่ายขึ้นปกคลุมบริเวณผิวน้ำในรัฐอัลเบอร์ตาร์ ประเทศแคนาดา	Smith and Lewis, 1987
การตายของฝูงแกะ และฝูงสุนัขภายหลังจากคิมในอ่างเก็บน้ำในประเทศอังกฤษ	Lawton and Codd, 1991

Trichodesmium ก็พบว่ามีความเป็นพิษแต่ยังไม่มีการศึกษาในรายละเอียด โดยการแยกสารพิษออกมาศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเคมีแต่อย่างไร (Scott, 1991 ; Skulberg et al., 1992b)

สารพิษในกลุ่มนี้ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากพบว่าเป็นสาเหตุการป่วย และกัการตายของสัตว์ในหลายพื้นที่ทั่วโลกตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 19 อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพิษนี้เป็นสาเหตุการตายของมนุษย์เหมือนที่พบในกรณีของ paralytic shellfish poison (PSP) ที่เกิดจากการบริโภคหอยซึ่งกรองเอาสาหร่ายที่ผลิตสารพิษเป็นอาหาร แต่จากการที่พบว่าสารกลุ่มนี้มีพิษร้ายแรงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงอาจเป็นไปได้ว่ามนุษย์เองก็มีความทนทานต่อพิษต่ำเช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีอาการของสารพิษจากสาหร่ายน้ำจืดในห่วงโซ่อาหารของมนุษย์ จากการที่น้ำในแหล่งน้ำต่างๆมีคุณภาพลดลงเรื่อยๆ ประกอบกับมีปัญหาการเจริญเติบโตของสาหร่ายอย่างรวดเร็วบ่อยครั้งขึ้น ประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศในกลุ่มสแกนดิเนเวีย และอีกหลายประเทศในยุโรป จึงได้ทำการศึกษาและพบว่าในการเจริญอย่างรวดเร็วของสาหร่ายในแหล่งน้ำ จะมีโอกาสเป็นสาหร่ายที่สร้างสารพิษถึงร้อยละ 40 (Repavich et al., 1990) และมีแนวโน้มว่าจะมีปัญหาเพิ่มขึ้นทั้งในแง่ของจำนวนครั้งที่เกิด ความกว้างขวางของพื้นที่ และระยะเวลาที่เกิด

สารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำที่เป็นอันตรายต่อสัตว์สามารถจำแนกเป็น 2 ประเภท คือ

ก. สารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท (neurotoxin)

ข. สารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อตับ (hepatotoxin)

ก. สารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท มีการพบสารพิษในกลุ่มนี้มากพอ

สมควร แต่ที่ทำการศึกษาดังลักษณะโครงสร้างทางเคมีแล้วมี 4 ชนิด คือ

- อนาทอกซิน-เอ (anatoxin-a, antx-a) สารพิษชนิดนี้ถูกผลิตโดยไซยาโน

แบคทีเรีย *Anabaena flos-aquae*, *A. spiroides*, *A. circinalis*, *Aphenizomenon* sp. และ *Oscillatoria*

rubescens เป็นสารประกอบประเภทอัลคาลอยด์ (alkaloid) มีชื่อทางเคมีว่า 2-acetyl-9-

azabicyclo[4-2-1]non-2-ene สัตว์ที่ได้รับสารพิษชนิดนี้จากธรรมชาติจะมีอาการเดินโซเซ กล้าม

เนื้อเกร็งเป็นมัด หายใจหอบ ชักกระตุก ในสัตว์ปีกจะมีอาการหดเกร็งของกล้ามเนื้อทำให้ท้องแน่น

ขึ้น ส่วนใหญ่แล้วสัตว์จะถึงแก่ความตายเนื่องจากการล้มเหลวของระบบหายใจ ซึ่งจะเกิดขึ้นใน

ระยะเวลาสั้นเป็นนาทีหรือ 2-3 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ ปริมาณสารพิษที่ได้รับ ชนิด

ของอาหารที่กินก่อนได้รับสารพิษ สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสารนี้ โดยนำ *Anabaena*

จากแหล่งน้ำธรรมชาติมาทดสอบกับสัตว์ทดลอง คือ หนูถีบจักร หนูพุกขาว และลูกวัว พบว่าจะ

แสดงอาการทางระบบประสาท (Gorham et al., 1964) เช่น กล้ามเนื้อเกร็งเป็นมัด การเคลื่อนไหว

ช้า หดความรู้สึก หายใจรุนแรง ตัวเขียวเนื่องจากขาดออกซิเจน ชักกระตุก ในประเทศออสเตรเลีย

สารพิษจาก *Anabaena* ทำให้ โค กระบือ และแกะที่ดื่มน้ำในแม่น้ำ Darling ในช่วงที่เกิดการเจริญ

เติบโตอย่างรวดเร็วของ *Anabaena* ในปี 1990-1991 เกิดอาการช็อกตาย (Falconer, 1996) นอกจากนี้

ยังมีรายงานว่าในประเทศสกอตแลนด์ อนาทอกซิน-เอ เป็นสาเหตุให้เกิดการตายในสุนัขเนื่องมา

จากการดื่มน้ำที่มี *Oscillatoria* ปนเปื้อนในทะเลสาบ สำหรับมนุษย์ก็สามารถได้รับสารพิษชนิดนี้

เช่น ในประเทศออสเตรเลียประชากรที่บริโภคหอยที่กินสาหร่าย *Anabaena circinalis* เป็นอาหาร

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้เป็นอัมพาต (paralytic shellfish poison ; PSP) การใช้น้ำ หรือกิจกรรมทางน้ำที่เกี่ยวข้องกับการพักผ่อนหย่อนใจ เช่นการว่ายน้ำ จะได้รับสารพิษโดยตรงถ้ากลืนน้ำที่มีสาหร่ายเข้าไป การเล่นสกีน้ำ จะได้รับสารพิษเมื่อผู้เล่นหายใจเอาละอองน้ำที่มีสาหร่ายเข้าไป

ค่าความเข้มข้นของอนาทอกซิน-เอบริสุทรี ที่ทำให้จำนวนสัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่งภายหลังจากฉีดสารพิษนี้เข้าสู่ช่องท้อง (LD_{50} intraperitoneal; i.p.) มีค่าประมาณ 200 ไมโครกรัมของสารพิษต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ส่วนความเข้มข้นของสารพิษที่ได้รับทางปากและทำให้สัตว์ตายจะมีค่าสูงกว่านี้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารนี้มีความเป็นพิษสูง การที่สัตว์ดื่มน้ำเพียง 2-3 มิลลิลิตร ถึง 2-3 ลิตรก็เพียงพอที่จะทำให้ถึงแก่ความตายได้

ความเป็นพิษของอนาทอกซิน-เอ เกิดจากการที่สารนี้สามารถเลียนแบบการทำงานของ acetylcholine ซึ่งเป็นสื่อพาหะของระบบประสาท (neurotransmitter) และทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อ โดยจะมีเอนไซม์ acetylcholinesterase เป็นตัวทำลาย acetylcholine เพื่อป้องกันการกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อที่มากเกินไป การที่อนาทอกซิน-เอเป็นสาเหตุของความตายก็เนื่องมาจาก acetylcholinesterase ไม่สามารถทำลายอนาทอกซิน-เอได้ จึงทำให้เกิดการเกร็งหดตัวของกล้ามเนื้อเป็นอัมพาต เมื่อเกิดขึ้นกับกล้ามเนื้อของระบบทางเดินหายใจจึงทำให้เกิดการชักกระตุกเนื่องจากการขาดออกซิเจนไปเลี้ยงสมอง และเกิดการตายเนื่องจากการหายใจล้มเหลวในที่สุด อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์การแพทย์พยายามนำเอาคุณสมบัติของอนาทอกซิน-เอมาใช้ประโยชน์ โดยการนำอนุพันธุ์ของอนาทอกซิน-เอมาใช้เป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ (alzheimer disease) ซึ่งเป็นสาเหตุของความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ และโรคไมแอสทีเนียกราวิส (myasthenia gravis disease) ซึ่งเป็นสาเหตุของความผิดปกติเนื่องจากกล้ามเนื้ออ่อนแรง

- อนาทอกซิน-เอ (เอส) (anatoxin-a (s), antx-a (s)) เป็นสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟต ที่แยกได้จากสาหร่าย *Anabaena flos-aquae* สายพันธุ์ NRC-525-17 โดย N-hydroxyguanidine methyl phosphate ester มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท สามารถมองเห็นอาการที่แสดงออกได้ เช่น มีอาการน้ำตาไหลและน้ำลายไหลมาก จากการเกิดน้ำลายฟูมปากในหนูทดลองจึงได้รับการตั้งชื่อเป็น anatoxin-a (s) (s = salivation ; การหลั่งน้ำลาย) อาการเป็นพิษที่เกิดขึ้น เนื่องจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase มีผลให้ acetylcholine ไม่ถูกทำลาย ก่อให้เกิดการกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อที่มากเกินไป สุกและเป็ดที่ได้รับสารนี้ในท้องทดลอง จะมีอาการน้ำลายฟูมปาก มีน้ำมูกไหลตลอดเวลา กล้ามเนื้อกระตุกและท้องร่วง

ค่าความเป็นพิษ LD_{50} ในหนูทดลองมีค่าประมาณ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หรือมีความเป็นพิษมากกว่าอนาทอกซิน-เอ 10 เท่า เนื่องจากอนาทอกซิน-เอ (เอส) มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับยาฆ่าแมลงออร์แกนออสฟอรัส (organophosphorus) ดังนั้นการแก้พิษของอนาทอกซิน-เอ (เอส) จึงสามารถใช้ atropine ได้เช่นเดียวกับการแก้พิษในยาฆ่าแมลงดังกล่าว โดย

นอกจากนี้เมื่อได้รับสารพิษแล้ว ควรรีบนำผู้ป่วยเข้าโรงพยาบาลโดยเร็วที่สุด การปฐมพยาบาลเบื้องต้นที่สำคัญคือการล้างปากและท้องด้วยน้ำสะอาด และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สูตรโครงสร้างทางเคมีของอนาทอกซิน-เอ (เอต) มีลักษณะเป็นสารประกอบ organophosphate ชนิดใหม่ จึงมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาฆ่าแมลงในยุคใหม่ ซึ่งสามารถย่อยสลายได้โดยทางชีวภาพ จึงไม่เกิดพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม

- แซกซิทอกซินและนีโอแซกซิทอกซิน (saxitoxin, STX and neosaxitoxin, NEOSTX) สารพิษในกลุ่มนี้โดยส่วนใหญ่จะพบในสาหร่ายจำพวก dinoflagellate หรือในหอยที่กรองสาหร่าย dinoflagellate เป็นอาหาร และก่อให้เกิดอาการอัมพาต (paralytic shellfish poison ; PSP) (Sasner et al., 1984) สาหร่ายน้ำจืดที่สร้างสารพิษในกลุ่มนี้ได้แก่ สาหร่ายในสกุล *Anabaena* และ *Aphanizomenon* สารพิษทั้งสองตัวนี้สามารถออกฤทธิ์อย่างรวดเร็วต่อระบบประสาท โดยจะมีผลต่อการยับยั้งการขนถ่ายโซเดียมและการเต้นของชีพจร

เซลล์ของสาหร่าย *Aphanizomenon flos-aquae* สายพันธุ์ NH-5 จะมีความเป็นพิษต่อหนูโดยมีค่า LD₅₀ ประมาณ 5 มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์สาหร่ายต่อ 1 กิโลกรัมของน้ำหนักหนู และใน 1 กรัมของเซลล์สาหร่ายแห้ง จะมีสารพิษนีโอแซกซิทอกซินอยู่ 1.3 มิลลิกรัม และมีสารแซกซิทอกซิน 0.1 มิลลิกรัม แต่สารพิษทั้งสองชนิดนี้มีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง และฆ่าแมลงได้

ข. สารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อตับ ในขณะที่สารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทจะพบอย่างกว้างขวางในทวีปอเมริกาเหนือ สหราชอาณาจักร กลุ่มสแกนดิเนเวีย และประเทศออสเตรเลีย แต่สารพิษต่อตับที่สร้างโดยสาหร่ายสามารถพบได้ในทุกพื้นที่ทั่วโลก โดยพบว่าก่อให้เกิดความเป็นพิษใน โค กระบือ และ ม้า สุกร เป็ด ตลอดจนสัตว์เลี้ยงปีกและสัตว์เลี้ยงในบ้าน ส่วนในหอยทดลองมีการศึกษาความเป็นพิษของสารกลุ่มนี้ในหนูพุกขาว หนูถีบจักร หนูตะเภา กระจง และสุกร อาการแสดงออกซึ่งความเป็นพิษได้แก่ อ่อนเพลีย หมดความอยากอาหาร เชื้อบูต่างๆมีสีซีด อาเจียน หนาวสั่นและท้องร่วง การตายจะเกิดขึ้นหลังจากได้รับสารพิษ 2-3 ชั่วโมง ถึง 2-3 วัน ส่วนใหญ่จะเกิดจากเลือดออกในตับ และการช็อกเนื่องจากขาดเลือดไปหล่อเลี้ยง ทั้งนี้เมื่อเซลล์ตับได้รับสารพิษจะเกิดการหดตัวทำให้เซลล์ที่เกาะกันแน่นแยกออก ทำให้เกิดเลือดคั่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ตับและนำมาซึ่งอาการช็อกในที่สุด (Theiss et al., 1988) ภาวะที่จำเพาะเจาะจงกับสารพิษขึ้นอยู่กับความสามารถของเซลล์ที่จะดูดซับสารพิษ เมื่อสารพิษเข้าไปภายในร่างกายจะยังไม่ซึมผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์แต่จะทำให้เซลล์ส่วนใดส่วนหนึ่งบาดเจ็บก่อน จากนั้นสารพิษจึงสามารถเข้าไปภายในเซลล์ได้ สารพิษจะถูกขนถ่ายโดยกลไกการทำงานของ bile acid transporter (Runnegar et al., 1991) โดยจะเข้าทำลายลำไส้เล็ก เชื้อบูผิว และเซลล์ตับ ส่วนใหญ่สารพิษในกระแสเลือดจะถูกดูดซึมเข้าไปในเซลล์ตับโดยตรง

สาหร่ายที่ผลิตสารพิษในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษาโครงสร้างทางเคมีแล้ว ได้แก่ สาหร่ายในสกุล *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria* และ *Nostoc* ส่วนที่มีการผลิตสารพิษ แต่ยังไม่มีการศึกษาโครงสร้างทางเคมีได้แก่ *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*,

Gloeotrichia และ *Coelosphaerium* สารพิษที่พบส่วนใหญ่จะมีสูตร โครงสร้างเป็นวงแหวน เปปไทด์ ที่พบแล้วมีอย่างน้อย 53 ชนิด

ชนิดของสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อดับ ซึ่งพบมากและมีความสำคัญได้แก่

- สารพิษในกลุ่มไมโครซิสติน (microcystin, MCYST) มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 7 ชนิด (Bishop *et al.*, 1959) สารพิษชนิดนี้ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกจากสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ NRC-1 สาหร่ายในสกุลนี้สามารถผลิตสารพิษได้มากกว่า 1 ชนิด สารพิษในกลุ่มไมโครซิสตินนอกจากจะเป็นพิษต่อดับแล้ว ยังพบว่าเป็นตัวเร่งให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองด้วย

ความเป็นพิษของสารพิษในกลุ่มนี้ที่เกิดขึ้นกับมนุษย์เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดมะเร็งตับ Yu และคณะ (1989) ได้รายงานผลการพบมะเร็งตับในประชากรของประเทศจีนที่เมืองไควดอง (Qidong city) โดยพบว่าเดิมแหล่งน้ำดื่มในเมืองนี้มาจาก สระน้ำ และร่องน้ำต่างๆ แต่เมื่อเปลี่ยนแหล่งน้ำดื่มไปเป็นบ่อน้ำ พบว่าจำนวนประชากรที่เป็นมะเร็งตับลดลง จากเหตุผลนี้จึงเชื่อว่าน้ำดื่มที่นำมาจากสระน้ำ และร่องน้ำ จะต้องปนเปื้อนสารพิษไมโครซิสตินซึ่งชักนำให้เกิดมะเร็งตับ นอกจากนี้ Yu ยังพบสารพิษไมโครซิสตินในแหล่งน้ำที่เมือง ไฮเมน (Haimen city) (Yu, 1994) ซึ่งทำให้ประชากรเป็นมะเร็งตับสูงพอกับเมืองไควดอง โดยทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำจำนวน 15 แห่ง ในเมืองไฮเมน แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ที่ประเทศญี่ปุ่น จากการตรวจวิเคราะห์พบว่ามีสารพิษปนเปื้อนในแหล่งน้ำ 2 แห่ง โดยพบสารพิษ microcystin-LR และ 3-desmethylmicrocystin-LR ในปริมาณที่สูง (Nagata *et al.*, 1994)

จากการทราบกลไกการทำงานของไมโครซิสติน ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนฟอสฟาเทส 1 (protein phosphatase 1 ; PP1) และโปรตีนฟอสฟาเทส 2A (protein phosphatase 2A ; PP2A) ซึ่งมีความสำคัญต่อการควบคุมเมแทบอลิซึมต่างๆ เช่น เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต การแบ่งเซลล์ และการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อ สารพิษในกลุ่มไมโครซิสตินทุกตัวจะมีค่าความเป็นพิษ LD₅₀ ในหนูระหว่าง 60-70 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้น microcystin-RR, demethylated toxin D-Asp และ Dha จะมีค่าความเป็นพิษในหนู LD₅₀ ระหว่าง 200-250 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Moore *et al.*, 1991)

ในการพัฒนาเพื่อหาสารที่จะมายับยั้งการเกิดพิษของไมโครซิสติน โดยการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological active compounds) นี้มาทดสอบกับหนูถีบจักร เช่น วิตามินอี silymarin glutathione และ monoethyl ester พบว่าสามารถป้องกันการเกิดพิษได้ (Hermansky *et al.*, 1991) โดยการให้วิตามินอีซึ่งเป็นสารแอนติออกซิแดน (antioxidants) ที่ละลายได้ในไขมันพบว่าสามารถป้องกันการตายของหนูทดลองได้ร้อยละ 50 จากจำนวนหนูทดลองทั้งหมดที่ถูกฉีดด้วยไมโครซิสตินในปริมาณที่ทำให้ถึงแก่ความตาย สำหรับ silymarin เป็นสารแอนติออกซิแดน ประเภทฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซึ่งจะแสดงผลในระดับเซลล์มมเบอร์น

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และจะให้ผลในการป้องกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยพบในหนูถีบจักรที่ถูกฉีดด้วย microcystin-LR ใน ปริมาณ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ยังพบว่า cyclosporin-A และ rifampin สามารถ ป้องกันสารพิษพวกไมโครซิสตินได้เช่นเดียวกัน (Hermansky et al., 1990 and 1991; Thompson and Pace, 1992) โดยจะป้องกันและต่อต้านการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับโดย microcystin-LR

- สารพิษในกลุ่มโนดูลาริน (nodularin, NODLN) สารพิษในกลุ่มนี้มีกรด อะมิโนเป็นองค์ประกอบ 5 ชนิด และมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันเป็นอย่างมากทั้งๆที่ สร้างจากไซยาโนแบคทีเรียชนิดเดียวกันคือ *Nodularia spumigena* โนดูลารินนอกจากจะมีพิษต่อ เซลล์ตับแล้ว จากผลการทดลองยังพบว่า เป็นสารส่งเสริมการเกิดมะเร็งด้วย

2.2.3 ผลของสารพิษจากสาหร่ายที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ

มีรายงานเกี่ยวกับสารพิษที่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำขนาดใหญ่หลายแห่ง พบความเข้มข้นของสารพิษอาจอยู่ในช่วง น้อยกว่า 1 จนถึง 8600 ไมโครกรัมต่อกรัมสาหร่ายแห้ง และมักจะพบสารพิษมากกว่า 1 ชนิด โดยความเข้มข้นของสารพิษมีผลต่อแพลงก์ตอนและ จุลินทรีย์ในธรรมชาติ หลายชนิดพบว่ามีความไวต่อสารพิษและทำให้เกิดการสะสมสารพิษในห่วง โซ่อาหาร

2.2.3.1 เซทเทอร์โรโทรฟิกแบคทีเรีย (heterotrophic bacteria)

จากการศึกษาของ Davidson (1959) พบว่า *Serratia marcescens* ถูกยับยั้งการ สร้างรงควัตถุ (pigment) ด้วยสารพิษที่ผลิตโดยสาหร่าย *Microcystis Oscillatoria* และ *Nostoc* และ แบคทีเรียบางสายพันธุ์มักจะถูกกระตุ้นเมื่อเกิดการย่อยสลายเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียในช่วงที่มี การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (Kiviranta et al., 1991 ; Jones and Orr, 1994 ; Lam et al., 1995)

2.2.3.2 แพลงก์ตอนพืช (phytoplankton)

สารพิษไมโครซิสตินหรือสารพิษชนิดอื่นที่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรียมีคุณสมบัติ เป็นสารฆ่าสาหร่าย (algicide) Keating (1978) ได้พบความสัมพันธ์ระหว่างประชากรของไซยาโน-แบคทีเรียที่เจริญในช่วงฤดูหนาว และปริมาณไดอะตอมที่เจริญในช่วงฤดูใบไม้ผลิ ซึ่งในการ ทดลองระดับห้องปฏิบัติการพบว่า สารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียไปยับยั้งการเจริญเติบโตของ ไดอะตอม การทดลองของ Bagchi และคณะ (1990) พบว่า *Oscillatoria* ไปยับยั้งการเจริญเติบโต ของ *Anacystis*, *Phormidium*, *Plectonema* และ *Chlorella* และการทดลองของ Gilbert (1994) พบ ว่านาทอกซิน-เอ ที่ความเข้มข้น 1-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถทำให้อัตราการเจริญเติบโต ของ *Cryptomonas erosa* ลดลง

2.2.3.3 แมคโครไฟต์ (macrophytes)

สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียมีผลต่อการเจริญเติบโตของแมคโครไฟต์ โดยสาร พิษที่แยกได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Elodea* และ *Lemna*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ลงเงินไว้สำหรับบริการเชิงวิชาการเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียมีผลต่อการเจริญเติบโตของแมคโครไฟต์ โดยสารพิษที่แยกได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Elodea* และ *Lemna* (Kirpenko, 1986) เมื่อให้สารพิษที่ความเข้มข้น 0.04-200 ไมโครกรัมต่อลิตร จะทำให้ไม่พบคลอโรฟิลล์ที่ใบ และเมื่อให้ความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้พืชตาย สารพิษที่แยกได้จาก *Microcystis aeruginosa* และ *Aphanizomenon flos-aquae* ในปริมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นสาเหตุที่ทำให้พืชตาย (Kirpenko, 1986) van Vierssen และ Prins (1985) ได้ทำการทดลองกับสารสกัดจาก *Anabaena* พบว่าจะไปลดการผลิตออกซิเจนและชีวมวลของ *Zannichellia peltata*

2.2.3.4 โปรโตซัว (protozoa)

ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของ *Microcystis* ในทะเลสาบเคนนิซ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของ heterotrophic nanoflagellates ลดลงเนื่องมาจากการพบสารพิษที่ผลิตโดยสาหร่ายชนิดนี้ (Christoffersen, 1996)

2.2.3.5 มีโซซัวโอแพลงก์ตอน (mesozooplankton)

มีรายงานหลายฉบับที่รายงานเกี่ยวกับผลของสารพิษจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีต่อการเจริญเติบโตและพฤติกรรมของ cladocerans และ copepods ส่วนใหญ่พบว่ามีความไวต่อสารพิษที่ความเข้มข้นสูง และทำให้ลักษณะทางสรีระผิดปกติ (Nizan et al., 1986 ; Fulton and Pearl, 1987 ; DeMott et al., 1991) DeMott และ Moxter (1991) กล่าวว่า *Eudiaptomus* จะหลีกเลี่ยงการกิน *Oscillatoria* ชนิดที่สร้างสารพิษโดยจะหันไปกินชนิดที่ไม่สร้างสารพิษ

2.2.3.6 ไมโครซัวโอแพลงก์ตอน (microzooplankton)

จากการทดลองของ Gilbert (1994) พบว่าสารพิษอนาทอกซิน-เอทีผลิตโดย *Anabaena flos-aquae* มีผลยับยั้งการสืบพันธุ์และการรอดชีวิตของ *Brachionus calyciflorus*

2.2.3.7 สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

Kiviranta (1992) พบว่าสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท และสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ตับ ซึ่งผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรียมีผลทำให้ตัวอ่อนของ *Aedes aegypti* ตาย โดยสารพิษจาก *Anabaena circinalis* ที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่ายต่อมิลลิลิตร จะไปมีผลทำให้ตัวอ่อนตายหลังจากได้รับสารพิษ 48 ชั่วโมง Turell และ Middlebrook (1988) พบว่า microcystin-LR จะมีผลต่อตัวเต็มวัยของ *Culex pipens* หลังจากที่ได้รับสารพิษ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับสารพิษจาก *Microcystis aeruginosa* ที่มีผลทำให้ตัวอ่อนของ *Chaobous* ในระยะที่ 4 ตาย โดยจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของดักแด้ (Lauren-Maatta et al ., 1995) จากการศึกษาของ Eriksson และคณะ (1986, 1989) พบว่าหอยน้ำจืด *Anodonta eygnea* จะบริโภคสาหร่ายเป็นอาหาร เช่น *Oscillatoria agardhii* เมื่อถูกบริโภคจะสะสมอยู่บริเวณตับอ่อนของหอย และพบสารพิษในปริมาณ 60-70 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของหอย

2.2.3.8 ปลา

สารพิษในกลุ่มไมโครซิสตินมีผลต่อปลา คือ ทำให้เกิดอาการบาดเจ็บที่ตับ เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม และทำให้ปลาตาย (Eriksson *et al.*, 1986 ; Tenculla *et al.*, 1994 ; Bury *et al.*, 1995) สารพิษเมื่อผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อจะผ่านไปตามกระแส เลือด และผ่านไปยังเหงือก สารพิษที่ละลายอยู่ในน้ำสามารถเข้าไปภายในตัวปลาได้หลายทาง และสารพิษสามารถไปยับยั้งการเจริญเติบโตได้ มีรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงการตายของปลาในระหว่างที่เกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษ แต่ในขณะเดียวกันการตายของปลาอาจเกิดจากสาเหตุทางอ้อม เช่น การขาดออกซิเจน

ความไวต่อสารพิษของจุลินทรีย์และสัตว์ในแหล่งน้ำอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงระยะของวงจรชีวิต นอกจากนี้ความแตกต่างบางประการยังมีผลต่อความไวของสารพิษ เช่น น้ำหนักตัว และความเข้มข้นของสารพิษ จุลินทรีย์และสัตว์ส่วนใหญ่จะหลีกเลี่ยงการได้รับสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรีย แต่ในบางครั้งก็อาจเผลอดูดกลืนสารพิษเข้าไปโดยไม่รู้ตัว ในบางชนิดมักจะไม่เลือกกิน เช่น หอยและปลา อาจเป็นเพราะมีกลไกเกี่ยวกับการดูดซึมและกำจัดสารพิษ การที่จุลินทรีย์สามารถทนความเข้มข้นของสารพิษได้ขึ้นอยู่กับ ความเป็นพิษของสาหร่าย ประสิทธิภาพในการย่อย และความไวต่อสารพิษ สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียที่ละลายลงสู่แหล่งน้ำอาจจะมีผลต่อจุลินทรีย์ทุกชนิดถึงแม้ว่าจุลินทรีย์เหล่านั้นจะไม่ได้กินสาหร่ายก็ตาม

มีรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษตามแหล่งน้ำหลายแห่งในหลายประเทศ บางฉบับได้นำเสนอถึงชนิดและกลุ่มของสารพิษรวมถึงค่าความเป็นพิษที่พบในสัตว์ทดลอง ดังรายงานที่รวบรวมโดย Kaya และ Watanabe (1994) แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียที่พบตามแหล่งน้ำจืด

ชนิด สายพันธุ์ และแหล่งน้ำ	สารพิษ	กลุ่มของสารพิษ	ค่าความเป็นพิษ ในหนูทดลอง (LD ₅₀ µg/kg ip.)
Neurotoxins			
<i>Anabaena flos-aquae</i>			
Strain NRC-44-1 (Canada, Saskatchewan)	Anatoxin-a	Secondary amine MW 165	200
Strain NRC-525-17 (Canada, Saskatchewan)	Anatoxin-a(s)	N-hydroxy guanidine methyl-phosphate ester	20

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

ชนิด สายพันธุ์ และแหล่งน้ำ	สารพิษ	กลุ่มของสารพิษ	ค่าความเป็นพิษ ในหนูทดลอง (LD ₅₀ µg/kg ip.)
<i>Aphanizoenon flos-aquae</i> Strain NH-1 and NH-5 (U.S., New Hampshire)	Neosaxitoxin	Purine alkaloid MW 315	10
Hepatotoxins			
<i>Anabaena flos-aquae</i> Strain S-23-g-1 (Canada, Saskatchewan)	Microcystins	Heptapeptides MW 994	50
<i>Microcystis aeruginosa</i> Strain WR-70 (South Africa, Transvaal)	Cyanoginosins	Heptapeptides MW 909-1044	50
(Waterbloom, Australia, New South Wales)	Cyanoginosins	Heptapeptides MW 1035	50
(Waterbloom, U.S., Wisconsin)	Microcystin	Heptapeptides MW 994	50
Strain NRC -1(SS-17) (Canada, Ontario)	Microcystin	Heptapeptides MW 994	50
Strain 7820 (Scotland, Loch Balgaves)	Microcystin	Heptapeptides MW 994	50
(Waterbloom, Norway, Lake Akersvatn)	Microcystin	Heptapeptides MW 994	50
Strain M-228	Microcystin	Heptapeptides	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เฉพาะในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

ชนิด สายพันธุ์ และแหล่งน้ำ	สารพิษ	กลุ่มของสารพิษ	ค่าความเป็นพิษ ในหนูทดลอง (LD ₅₀ µg/kg ip.)
(Japan, Tokyo)		MW 994	
<i>Microcystis viridis</i> Strain NIES-102 (Japan, Ibaraki)	Cyanoviridin	Heptapeptides MW 1039	100
<i>Nodularia spumigena</i>	Nodularin	Pentapeptides MW 824	30-50
<i>Oscillatoria agardhii</i> (Waterbloom, Norway, Lake Froylandsvatn)	Microcystins	Heptapeptides MW 1009	300-500
(Waterbloom, Norway, Lake Kolbotnvatn)	Microcystins	Heptapeptides MW 1023	500-1000
Cytotoxins			
<i>Scytonema pseudohofmanni</i> Strain BC-12 (U.S., Hawaii)	Scytophycin	Methylformamide A & B A=MW 821, B=MW 819	650 (Scytophycin B)
<i>Scytonema hofmanni</i> Strain UTEX-1581 (U.S., Texas)	Cyanobacterin	Chlorinated diaryllactone	ไม่ได้รายงาน
<i>Haplosiphon fontinalis</i> Strain V-3-1 (Marshall Island)	Hapalindole	Substituted indole alkaloid	ไม่ได้รายงาน

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

ชนิด สายพันธุ์ และแหล่งน้ำ	สารพิษ	กลุ่มของสารพิษ	ค่าความเป็นพิษ ในหนูทดลอง (LD ₅₀ µg/kg ip.)
<i>Tolypothrix byssoidea</i> Strain H-6-2 (U.S., Hawaii)	Tubercidin	Pyrolopyrimidine	ไม่ได้รายงาน
<i>Oscillatoria acutissima</i> Strain B-1 (U.S., Hawaii)	Acutiphycin	Macrolide	ไม่ได้รายงาน

2.2.4 การวิเคราะห์หาสารพิษจากสาหร่าย

การวิเคราะห์หาสารพิษจากสาหร่ายสามารถกระทำได้ 3 วิธี คือ

2.2.4.1 การวิเคราะห์ทางชีววิทยา (bioassay)

2.2.4.2 การวิเคราะห์ทางเคมี (chemical assay)

2.2.4.3 เทคนิคทางภูมิคุ้มกัน (immunoassay technique)

2.2.4.1 การวิเคราะห์ทางชีววิทยา การวิเคราะห์ทางชีววิทยาโดยใช้หนูทดลองจะเป็นขั้นตอนแรกในการตรวจสอบสารพิษจากสาหร่ายที่เจริญเติบโตในแหล่งน้ำ สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนสารสกัดจากเซลล์สาหร่าย เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ค่าใช้จ่ายน้อย ใช้เวลาน้อย และสามารถทราบผลทั้งในแง่คุณภาพและปริมาณ โดยสังเกตจากอาการที่สัตว์ทดลองแสดงออกหลังจากที่ได้รับสารพิษ ก็สามารถทำให้ทราบว่าสารพิษที่ได้รับนั้นเป็นชนิดที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทหรือเป็นพิษต่อตับ และหากเป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทยังสามารถจำแนกได้ว่าเป็นสารพิษชนิดใด แต่อย่างไรก็ตามข้อเสียเปรียบที่เกิดจากการใช้สัตว์ทดลองก็คือไม่สามารถตรวจสอบสารพิษที่ตกค้างอยู่ในปริมาณน้อยๆ ได้ โดยเฉพาะในน้ำดื่มซึ่งผ่านกระบวนการผลิตในขั้นตอนต่างๆมาแล้ว หรือแม้แต่ในแหล่งน้ำที่มีการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษร่วมกับสาหร่ายชนิดอื่นๆ ซึ่งทำให้มีความเป็นพิษไม่มากพอที่จะทำให้สัตว์ตายหรือแสดงอาการเจ็บป่วยที่รุนแรง แต่สามารถสะสมและส่งเสริมให้เกิดมะเร็งในผู้บริโภคได้

2.2.4.2 การวิเคราะห์ทางเคมี ได้มีความพยายามที่จะพัฒนาการตรวจสอบหาสารพิษปริมาณน้อยๆ ในทางเคมีควบคู่ไปกับการพัฒนาวิธีการแยกและการสกัดสารพิษให้บริสุทธิ์ ซึ่งวิธีการเหล่านี้ก็ได้แก่การใช้เทคนิคทาง high performance liquid chromatography (HPLC), high performance thin layer chromatography (HPTLC), thin layer chromatography (TLC), gas chromatography-electron capture detection (GC-ECD) และ fast-atom bombardment mass

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษายเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปตั้งประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spectroscopy (FAB-MS) แต่เทคนิคเหล่านี้ยังไม่สามารถพัฒนาให้เป็นเทคนิคมาตรฐานที่ง่ายต่อการตรวจสอบวิเคราะห์ตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติ และตัวอย่างในห้องปฏิบัติการได้

2.2.4.3 เทคนิคทางภูมิคุ้มกัน เป็นวิธีการที่มีแนวโน้มว่าจะมีความเป็นไปได้สูงในการตรวจสอบสารพิษที่มีปริมาณน้อยมากได้อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เพิ่งถูกพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจสอบปริมาณสารพิษในกลุ่มเปปไทด์บางตัวเท่านั้น

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษของสาหร่าย

มีรายงานในการศึกษาปัจจัยเกี่ยวกับสภาพแวดล้อมหลายประการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษของไซยาโนแบคทีเรียในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเบช (batch culture) และแบบต่อเนื่อง (continuous culture) มาแล้ว พบว่าอายุของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงและอุณหภูมิเป็นตัวแปรที่สำคัญที่สุดในการศึกษา ตามด้วย ความเข้มแสง ธาตุอาหาร ความเค็ม ความเป็นกรด-ด่าง และธาตุอาหารรอง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในสาหร่ายที่ผลิตสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ตับ คือ *Microcystis* (Watanabe and Oishi, 1985), *Oscillatoria* (Sivonen, 1990), *Anabaena* (Rapata et al., 1995), *Nodularia* (Lehtimaki et al., 1994) สารพิษอนาทอกซิน-เอ ที่ผลิตโดย *Anabaena* *Aphanizomenon* (Rapata et al., 1993) และสารพิษแซกซิทอกซินที่ผลิตโดย *Aphanizomenon* (Gentile and Maloney, 1969) สารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ตับและสารพิษอนาทอกซิน-เอ จะคงอยู่ภายในเซลล์ เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ ความเข้มข้นของสารพิษจะเพิ่มขึ้นในช่วงที่การเจริญเติบโตเข้าระยะ log phase และจะเพิ่มสูงที่สุดในช่วงแรกของการเจริญเติบโตคงที่ (early stationary phase) นอกเหนือจากปัจจัยเกี่ยวกับสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตสารพิษแล้ว ปัจจัยอื่นๆ เช่น การให้สาหร่ายเจริญในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำ หรือการถูกจำกัดปริมาณธาตุเหล็ก ต่างมีผลทำให้การผลิตสารพิษเพิ่มขึ้น (Westhuizen and Eloff, 1983) แต่การศึกษาโดยทั่วไปมักจะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตสารพิษของสาหร่าย

ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารพิษของไซยาโนแบคทีเรีย

2.3.1 ความเข้มแสง

ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการปริมาณแสงแตกต่างกัน เช่น *Oscillatoria* ชอบเจริญในสภาวะที่มีความเข้มแสงต่ำ *Anabaena* ชอบเจริญในสภาวะที่มีความเข้มแสงปานกลาง และ *Aphanizomenon* ชอบเจริญในสภาวะที่มีความเข้มแสงสูง ในสภาพธรรมชาติ แสงถูกพิจารณาว่ามีความสำคัญในการผลิตสารพิษ จากการทดลองของ Utkilen และ Gjølme (1992) พบว่าปริมาณสารพิษเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มแสงสูงถึง 40 ไมโครโวลต์ไครน์ต่อตารางเมตร ต่อวินาที และปริมาณสารพิษจะเริ่มคงที่และลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มแสง

จากการศึกษาของ Sivonen ในปี 1990 เกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารพิษของ *Oscillatoria agardhii* โดยศึกษาเกี่ยวกับความเข้มแสง พบว่าไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้จะผลิตสารพิษ desmethyl - 3 - MCYST-RR ในปริมาณมากเมื่อให้ความเข้มแสงต่ำ (12 และ 24 ไมโครไฮสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที) โดยอัตราการเจริญเติบโตเป็นไปอย่างปกติ แต่เมื่อให้ความเข้มแสงสูงอัตราการเจริญเติบโตจะชะงักและผลิตสารพิษในปริมาณต่ำ

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงต่ำ บางครั้งการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงที่สูงอาจทำให้เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียได้รับความเสียหาย รวมถึงการเกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายในแหล่งน้ำที่ได้รับปริมาณแสงที่สูงในช่วงกลางของฤดูร้อน (Zevenboom and Mur, 1984) ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะประเมินถึงปริมาณความเข้มแสงที่เซลล์ของสาหร่ายจะได้รับและนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง แต่อย่างไรก็ตามสาหร่ายทุกสายพันธุ์จะผลิตสารพิษได้มากที่สุดเมื่อเจริญเติบโตในสภาวะที่มีความเข้มแสงที่เหมาะสม

2.3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษ สาหร่ายแต่ละชนิดมีความต้องการอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกัน ส่วนใหญ่สาหร่ายจะผลิตสารพิษได้ในปริมาณสูงสุดเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิตั้งอยู่ในช่วง 18-25 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำหรือในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงสาหร่ายจะผลิตสารพิษได้น้อยลง

จากการทดลองของ Watanabe และ Oishi (1985) เกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษของ *M. aeruginosa* พบว่า *M. aeruginosa* M228 สามารถผลิตสารพิษได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับอุณหภูมิต่ำกว่าและมีอัตราการเจริญสูงกว่า และจากผลการทดลองของ Van der Westhuizen และ Eloff (1985) พบว่า *M. aeruginosa* ที่เจริญในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะผลิตสารพิษได้สูงกว่าเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 15 และ 28 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองทั้งสองจะเห็นได้ว่าสภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารพิษมากที่สุดคืออุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเล็กน้อย

2.3.3 ธาตุอาหาร

2.3.3.1 ในโตรเจน สารประกอบไนโตรเจนหลายชนิดทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์สามารถเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ตั้งแต่แก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศที่ไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ สาหร่ายส่วนใหญ่ใช้ในเตรท (NO_3^-) ไนไตรท์ (NO_2^-) แอมโมเนีย (NH_4^+) และยูเรียจนถึงกรดอะมิโน การใช้แอมโมเนียในการเลี้ยงสาหร่าย ความเป็นกรด-ด่างของน้ำจะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากการปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออนออกจากกระบวนการดูดซึมแอมโมเนียเข้าไปในเซลล์ เมื่อน้ำเป็นกรดจะยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นส่วนใหญ่ ในทางปฏิบัติจึงไม่ควรใช้แอมโมเนียเกินกว่า 1 มิลลิโมล สำหรับไนโตรเจนที่ไม่สามารถใช้ที่ความเข้มข้นเกินกว่า 1 มิลลิโมล ได้เช่นกัน เนื่องจากความเป็นพิษของสารประกอบนี้ ดังนั้นไนเตรตจึงเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ที่สุดในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทั่วไป ซึ่งก็อาจมีปัญหาค่าการเพิ่มขึ้นของกรด-ด่าง แต่โดยปกติแล้วสาหร่ายสามารถทนสภาพที่เป็นด่างได้ดีกว่าสภาพที่เป็นกรด และสาหร่ายบางชนิด เช่น ไชยาโนแบคทีเรียต้องการความเป็นกรด-ด่างสูงในการเจริญ

ในการผลิตสารพิษจากไชยาโนแบคทีเรียพบว่า *Microcystis* และ *Oscillatoria* จะผลิตสารพิษได้สูงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนสูง (Watanabe and Oishi, 1985) ภายใต้สภาวะที่ไนโตรเจนถูกจำกัดอาจไม่มีผลต่อไชยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิส (heterocyst) เนื่องจากสามารถตรึงแก๊สไนโตรเจนจากบรรยากาศได้ แต่จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Microcystis* ซึ่งไม่มีเฮเทอโรซิส แต่ *Microcystis* ก็จัดเป็นสาหร่ายที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะการเพิ่มขึ้นและลดลงของธาตุอาหารได้ดี ในไชยาโนแบคทีเรียชนิดที่ตรึงไนโตรเจนได้ การผลิตสารพิษจะไม่ขึ้นอยู่กับปริมาณไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหาร (Rapata et al., 1993)

2.3.3.2 ฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวกับการถ่ายทอดพลังงาน และการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยปกติในแหล่งน้ำทั่วไปมักจะมีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (total phosphorus) อยู่ในรูปของอินทรีย์ฟอสฟอรัสมากกว่าอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้ สาหร่ายมีความต้องการปริมาณฟอสฟอรัสแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาวะแวดล้อม ในกรณีที่มีการขาดปริมาณฟอสฟอรัสอย่างรุนแรงอาจทำให้รูปร่างและขนาดของเซลล์เปลี่ยนแปลงได้

ในการผลิตสารพิษของสาหร่าย ชนิดที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ตับมักจะผลิตสารพิษได้มากในสภาวะที่มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสสูง แต่ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสไม่มีผลต่อการผลิตอนาโทกซิน-เอ (Sivonen, 1990a)

Utkilen และ Gjølme (1995) พบว่าในสภาวะที่จำกัดปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส จะไม่มีผลต่อการผลิตสารพิษใน *M. aeruginosa* แต่ในสภาวะที่จำกัดปริมาณธาตุเหล็ก การผลิตสารพิษจะลดลงและพบว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นสูง *Microcystis* จะดูดซึมธาตุเหล็กได้มาก

จากการศึกษาของ Lukac และ Aegerter (1993) เกี่ยวกับผลของจุลธาตุที่มีต่อการเจริญและการผลิตสารพิษของ *M. aeruginosa* พบว่าในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบแบชมีเพียงธาตุสังกะสี ที่ไชยาโนแบคทีเรียมีความต้องการเพื่อที่จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตสารพิษ

2.3.4 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

สาหร่ายแต่ละชนิดสามารถเจริญได้ในระดับความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน ซึ่งส่วนมากจะมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อความสามารถในการใช้สารอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพที่เป็นอนินทรีย์คาร์บอนในน้ำ ไชยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่างในช่วง 7.5-11 เนื่องจากสาหร่ายเหล่านี้สามารถใช้อนินทรีย์คาร์บอนในการสังเคราะห์แสง (Coleman and Colman, 1981)

Eloff และ Van der Westhuizen ปี 1981 ได้ทำการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษของ *M. aeruginosa* ซึ่งพบว่าจะผลิตสารพิษได้ต่ำสุดเมื่อมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9 และที่ความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำกว่า 9 จะผลิตสารพิษได้สูงกว่า ซึ่งดูเหมือนว่าอัตราการผลิตสารพิษจะไม่ขึ้นอยู่กับอัตราการแบ่งเซลล์ซึ่งเหมือนกับในกรณีของอูณหภูมิตั้งแต่ 10°C ถึง 30°C



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมีสำหรับเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำ และวิเคราะห์สารพิษ เป็นชนิดเกรดวิเคราะห์ ของ Fluka , Merck และ Sigma

3.1.2 สารเคมีสำหรับทดสอบการย้อมติดสีเพื่อตรวจดูความผิดปกติระดับเซลล์ เป็นชนิดเกรดวิเคราะห์ ของ Merck และ Sigma

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพลตเคาท์อาการ์ (plate count agar) ของ Difco

3.1.4 งานเพาะเชื้อพลาสติก (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ของ Bibby Sterilin LTD.

3.1.5 เครื่องแก้ว เช่น ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดวัดปริมาตร บิวเรต แท่งแก้ว-คน ปิเปตต์ พาสเจอร์ปิเปตต์

3.1.6 สไลด์นับเซลล์สำหรับย้อม (cell counting chamber) ชนิด sedgewick-rafter cell S50 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

3.1.7 ตู้เขี่ยเชื้อ

3.1.8 ตู้เลี้ยงสาหร่าย

3.1.9 ตู้ควัน (hood)

3.1.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ของ Tomy Seiko Japan รุ่น SS-245

3.1.11 ตู้อบเครื่องแก้ว (oven) ของ Memmert รุ่น Modell 600

3.1.12 เครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ของ Sorvall รุ่น SS-3

3.1.13 เครื่องเขย่า (shaker)

3.1.14 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ของ New Brunswick Scientific รุ่น Innova 4080

3.1.15 เครื่องปั่นละเอียดให้เซลล์เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenizer) ของ Polytron PT 205

3.1.16 เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (rotary evaporator) ของ Buchi รุ่น 461

3.1.17 เครื่องทำให้เซลล์แห้งในสภาพแข็ง (lyophilizer) ของ Edward Britain รุ่น 501

3.1.18 เครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยระบบอัลตราโซนิก (ultra sonicator) ของ Sonicor รุ่น SC-52TH

3.1.19 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ของ Olympus รุ่น BH-2

3.1.20 สไลด์ (slide)

- 3.1.21 สไลด์หลุม
- 3.1.22 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.23 ตาข่ายกรองแพลงก์ตอน (plankton net)
- 3.1.24 ชุดเยื่อกรอง (membrane filter)
- 3.1.25 กระดาษกรองเบอร์ 3 (Whatman filter paper No. 3)
- 3.1.26 แกลลอนพลาสติกความจุ 4 ลิตร
- 3.1.27 ขวดพลาสติกความจุ 100 มิลลิลิตร
- 3.1.28 ถังพลาสติกขนาด 8x12 นิ้ว
- 3.1.29 สายยางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2 ฟุต
- 3.1.30 เครื่องชั่ง ของ Sartorius รุ่น A 200 S
- 3.1.31 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ของ Milton Roy รุ่น Spectronic 3000
- 3.1.32 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography) ของ Shimadzu รุ่น LC-10AT
- 3.1.33 เครื่องยูวี-วิส สเปกโตรโฟโตเมตริกดีเทคเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometric Detector) ของ Shimadzu รุ่น SPD-10A
- 3.1.34 เครื่องแสดงข้อมูล (Data Processor Chromatopac ของ Shimadzu รุ่น C-R6A
- 3.1.35 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของ Mettler Toledo รุ่น MP 225
- 3.1.36 เครื่องดึงน้ำออกจากเซลล์ ของ Reichertilung รุ่น Histokinette 2000
- 3.1.37 เครื่องฝัดชิ้นเนื้อ ของ Reichertilung รุ่น No. 1
- 3.1.38 เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome)
- 3.1.39 ชุด Sep-Pak C₁₈ cartridge ของ Millipore
- 3.1.40 หนูพุกขาวเพศผู้พันธุ์วิสตาจำนวน 20 ตัว

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

ทำการเก็บตัวอย่างในบริเวณที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำ 4 แห่ง ในประเทศ คือ

3.1.1 อ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี เป็นแหล่งน้ำดิบสำหรับใช้ในการผลิตน้ำประปาให้กับจังหวัดชลบุรี และโรงงานไฟฟ้าบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยทำการเก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 16 มกราคม 2540

3.1.2 เขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี เป็นแหล่งน้ำดิบสำหรับใช้ในการผลิตน้ำประปาให้กับจังหวัดเพชรบุรีและจังหวัดใกล้เคียง ทำการเก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 28 พฤษภาคม 2539

3.1.3 เขื่อนลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมา เป็นแหล่งน้ำขนาดใหญ่แหล่งหนึ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อาศัยน้ำจากเขื่อนช่วยในการเพาะปลูกบนพื้นที่ 2 ฝั่งลำตะคอง และยังเป็นแหล่งน้ำดิบสำหรับใช้ในการผลิตน้ำประปาให้กับจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียง โดยทำการเก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 30 มกราคม 2540

3.1.4 เขื่อนแม่กวง จังหวัดเชียงใหม่ เป็นเขื่อนใหม่ที่ทำภารกิจกักเก็บน้ำเพื่อใช้ผลิตน้ำประปาให้กับจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดใกล้เคียงในอนาคต ตัวเขื่อนได้สร้างเสร็จและทำการกักเก็บน้ำแล้ว ส่วนท่อส่งน้ำเพื่อนำไปใช้ทำน้ำประปากำลังอยู่ระหว่างการก่อสร้าง ทำการเก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2540

ในการเก็บตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติจะแบ่งการเก็บออกเป็น 2 แบบ คือ แบบแรกจะทำการเก็บเฉพาะเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย โดยใช้ตาข่ายกรองแพลงก์ตอนขนาด 108 ไมครอน ลากไปตามแนวนอนระดับผิวน้ำ เนื่องจากเมื่ออยู่ในสภาพลมสงบและได้รับปริมาณแสงแดดที่เหมาะสมจะทำให้เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียลอยขึ้นมาอยู่บริเวณผิวน้ำ นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่ได้เก็บลงในขวดหรือถุงพลาสติกและนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างไปทำให้แห้งในสภาพแข็งเพื่อเตรียมไว้สำหรับขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษ การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของสารพิษ แบบที่ 2 จะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำที่มีเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียโดยไม่กรองผ่านตาข่ายกรองแพลงก์ตอน เก็บลงในเกลลอนพลาสติกขนาด 4 ลิตร เพื่อนำไปนับปริมาณเซลล์ทำการแยกเซลล์ จัดจำแนกชนิด และวิเคราะห์คุณภาพของน้ำโดยวิธีทางเคมี

3.2.2 การวิเคราะห์เซลล์และการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย (แสดงดังรูปที่ 3.1)

3.2.2.1 การนับจำนวนเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย

นำไซยาโนแบคทีเรียที่แขวนลอยมาทำการเจือจาง จากนั้นดูดตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร โดยใช้พาสเจอร์ปีเปตต์หยดลงในสไลด์สำหรับนับเซลล์สาหร่าย ซึ่งประกอบด้วยช่องเล็กๆทั้งหมด 1,000 ช่องทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที จากนั้นทำการตรวจนับปริมาณเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียทั้งหมดด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก ข ข้อ 2)

3.2.2.2 ทำการจัดจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดปัญหาทั้ง 4 ตัวอย่างตามระบบของ Desikachary (1959)

3.2.2.3 การแยกและการเพาะเลี้ยง

แยกเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดปัญหาโดยใส่ตัวอย่างลงในสไลด์หลุม นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำการดึงเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้พาสเจอร์ปีเปตต์ที่ฆ่าเชื้อ และดึงปลายให้แหลมและมีขนาดเล็กพอเหมาะกับความหนาเซลล์ โดยต่อเข้ากับปลายข้างหนึ่งของสายยาง ส่วนปลายของสายยางอีกข้างหนึ่งจะใช้สำหรับดูดและเป่าตัวอย่างด้วยปาก ในการดึงเซลล์เลื่อนปลายพาสเจอร์ปีเปตต์มาอยู่ใกล้เซลล์ที่ต้องการ เมื่อดึงเซลล์ได้แล้วให้ถ่ายลงในหลุมใหม่ซึ่งมีน้ำกลั่นสำหรับล้างเซลล์ ทำการล้างเซลล์ประมาณ 2-3 ครั้ง จนแน่ใจว่ามีไซยาโนแบคทีเรียที่ต้องการเพียงชนิดเดียวจากนั้นถ่ายลงในหลอดทดลองขนาด 12 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหาร MA (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสโตนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เมื่อไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตทำการเพิ่มปริมาณโดยการย้ายเซลล์ลงไปเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารใหม่ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษของไซยาโนแบคทีเรียต่อไป

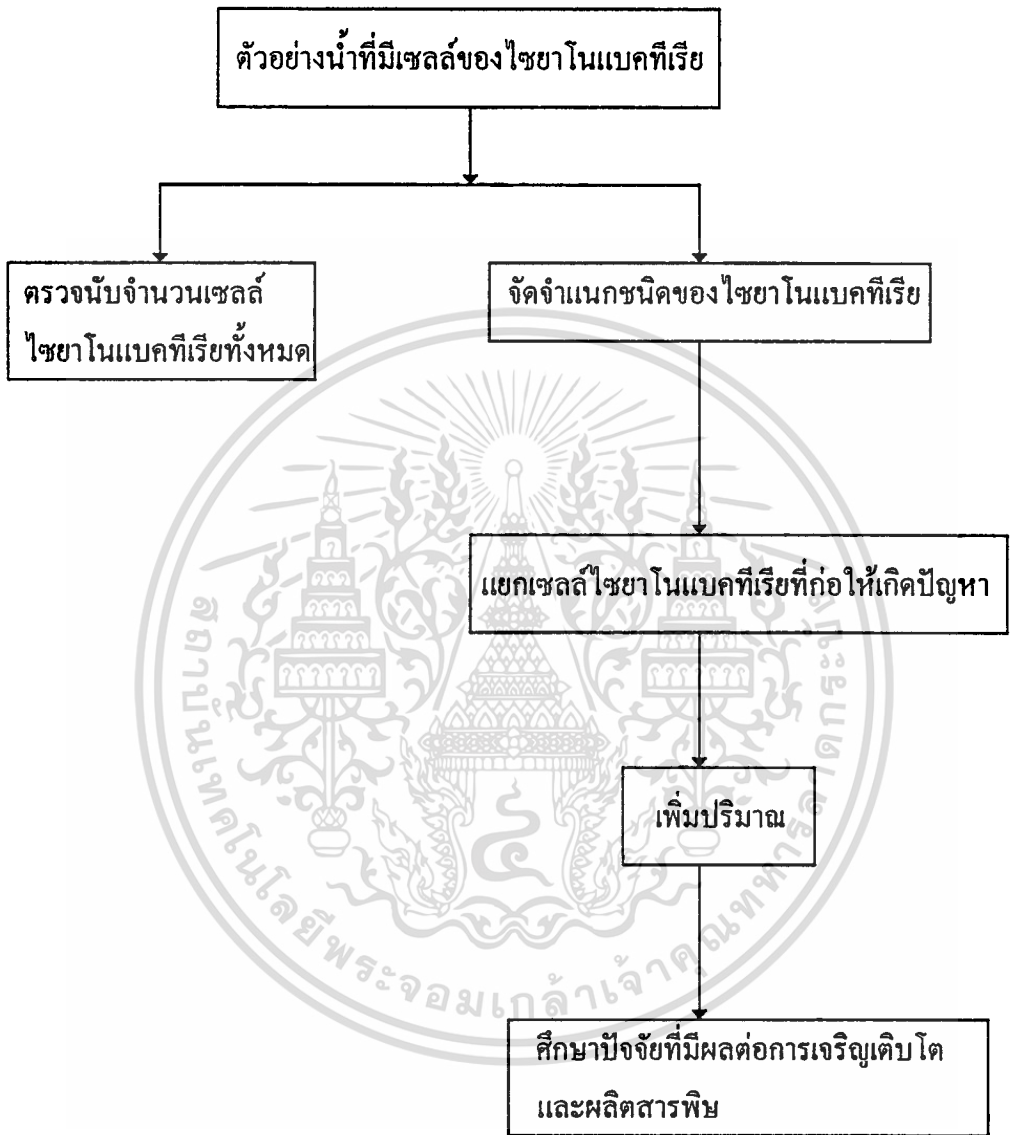
3.2.3 การศึกษาแหล่งธาตุอาหาร ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารพิษของไซยาโนแบคทีเรีย (แสดงดังรูปที่ 3.2)

นำไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งน้ำทั้ง 4 แห่ง มาทำการศึกษาดังนี้

3.2.3.1 ศึกษาแหล่งธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.1.1 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตในอาหาร MA โดยใช้ไนเตรท (NO_3^-) ซึ่งประกอบด้วย $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 และ NaNO_3 , ยูเรีย และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน นำอาหารดังกล่าวไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที บรรจุอาหารแต่ละความเข้มข้นลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ถ่ายโซยาโนแบคทีเรียลงในอาหารแต่ละความเข้มข้นให้มีปริมาณโซยาโนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากัน โดยใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์ (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที (แสดงผังรูปที่ 3.3) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอส์ไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน นำไปวัดการเจริญเติบโตของโซยาโนแบคทีเรียโดยวิธีการนับเซลล์

3.2.3.1.2 ศึกษาแหล่งฟอสฟอรัสที่มีผลต่อการเจริญเติบโตในอาหาร MA โดยใช้ β -glycerophosphate, K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสฟอรัส วิธีการศึกษาเหมือนข้อ 3.2.3.1.1

3.2.3.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตสารพิษของโซยาโนแบคทีเรีย

ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตสารพิษ จะทำการศึกษาในอาหาร MA สูตรปกติ ซึ่งเป็นสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงโซยาโนแบคทีเรียที่ผลผลิตสารพิษ ดังนั้นในการศึกษาจึงใช้ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , NaNO_3 และ β -glycerophosphate ที่มีอยู่ในอาหาร MA เป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสสำหรับการศึกษา

3.2.3.2.1 ศึกษาความต้องการธาตุอาหาร

- ศึกษาความต้องการปริมาณไนเตรทในอาหาร MA โดยใช้ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้ความเข้มข้นเป็น 1/5 , 1/10 และ 1/20 ของสูตรอาหารปกติ โดยนำอาหารดังกล่าวไปนึ่งฆ่าเชื้อ และทำการศึกษาเหมือนวิธีการในข้อ 3.2.3.1.1 ในอาหารแต่ละความเข้มข้นจะทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน นำไปวัดการเจริญเติบโตของโซยาโนแบคทีเรียโดยวิธีการนับเซลล์ จนกระทั่งการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วงแรกของการเจริญเติบโตครั้งที่ จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 20 นาที เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษ (ภาคผนวก ข ข้อ 3)

- ศึกษาความต้องการปริมาณฟอสเฟตที่มีผลต่อการเจริญเติบโตในอาหาร MA โดยใช้ β -glycerophosphate เป็นแหล่งฟอสฟอรัส และใช้ความเข้มข้นเป็น 1/5 , 1/10 และ 1/20 ของสูตรอาหารปกติ วิธีการศึกษาเหมือนการศึกษาปริมาณไนเตรท

3.2.3.2.2 ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของโซยาโนแบคทีเรีย

โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร MA ด้วย 1 นอร์มอล ของกรดซัลฟิวริก หรือ 1 นอร์มอล ของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ให้ได้เท่ากับ 6.2, 6.8, 7.4, 8.0, 8.6 และ 9.2 ตามลำดับ วิธีการศึกษาเหมือนข้อ 3.2.3.2.1

3.2.3.2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

หลังจากถ่ายไซยาโนแบคทีเรียลงในอาหาร MA นำไปเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิ ดังนี้ คือ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส วิธีการศึกษาเหมือนข้อ 3.2.3.2.1

3.2.3.2.4 ศึกษาความเข้มแสงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

หลังจากถ่ายไซยาโนแบคทีเรียลงในอาหาร MA นำไปเลี้ยงโดยควบคุมความเข้มแสงดังนี้ คือ 15 , 30 , 45 และ 60 ไมโครไอสโตลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที วิธีการศึกษาเหมือนข้อ 3.2.3.2.1

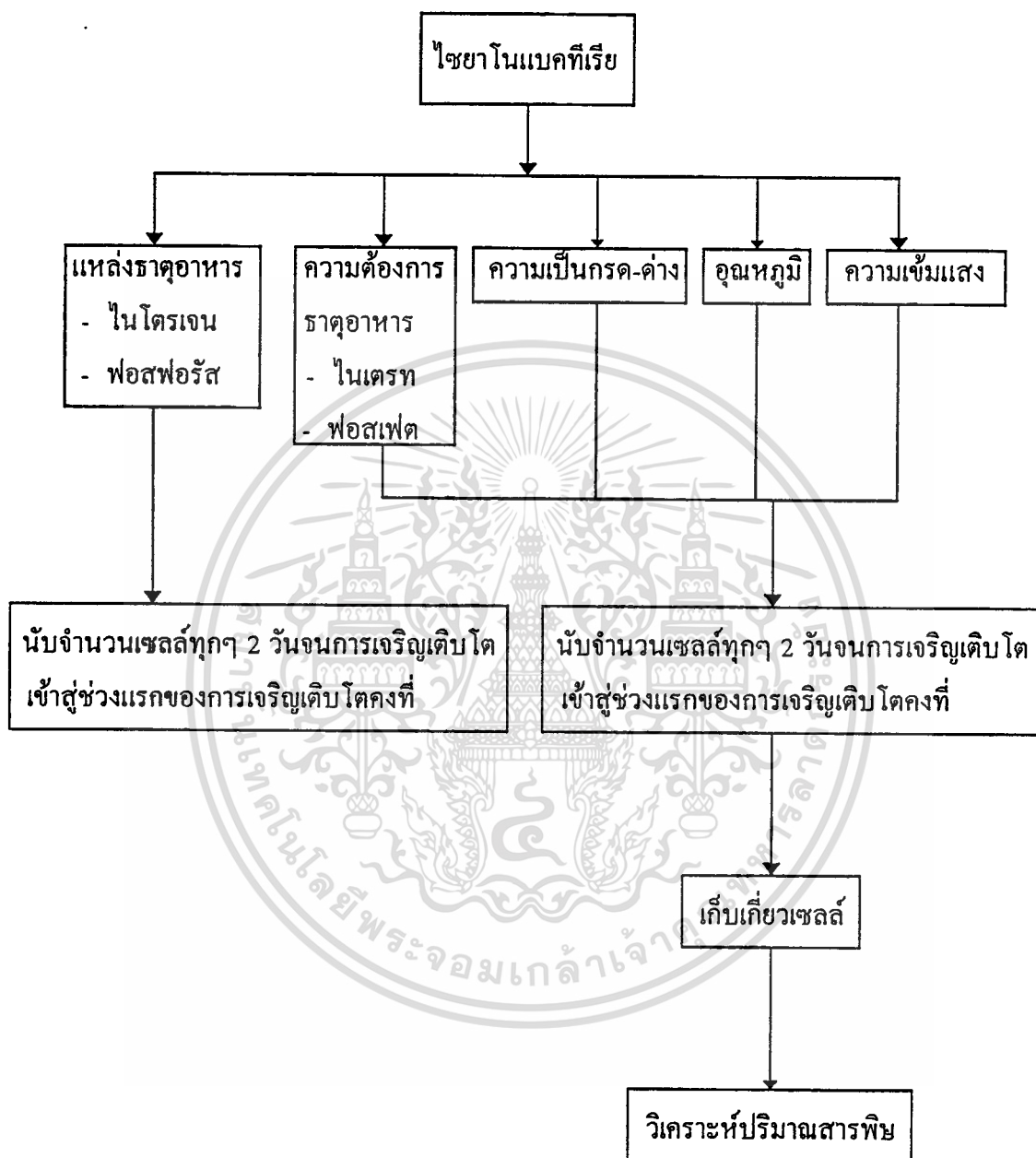
3.2.4 การวิเคราะห์สารพิษ (Harada, 1988)

(แสดงผังรูปที่ 3.4)

ชั่งตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียปริมาณ 0.2 กรัมน้ำหนักแห้ง ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาดความจุ 125 มิลลิลิตร เติม 100 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องเสียงความถี่สูง (ultra sonicator) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง นำสารสกัดทั้งหมดที่ได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาละลายด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ของ กรดแอสซิดิก นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 20 นาที

เตรียม C₁₈ cartridge โดยการล้างด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำตัวอย่างผ่านเข้าไปยัง C₁₈ cartridge ล้าง C₁₈ cartridge ด้วย 20 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ก่อนชะตัวอย่างด้วย 90 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นละลายตัวอย่างด้วย 20 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์โดยฉีดสารสกัด 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์ ODS ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ความยาวคอลัมน์ 150 มิลลิเมตร มีระบบของสารละลายเป็นเมทานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมล (ภาคผนวก ข ข้อ 1) ในอัตราส่วน 60:ต่อ 40 และมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 ตรวจวัดชนิดและปริมาณสารพิษที่ความยาวคลื่น 239 นาโนเมตร และจัดจำแนกชนิดของสารพิษ โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



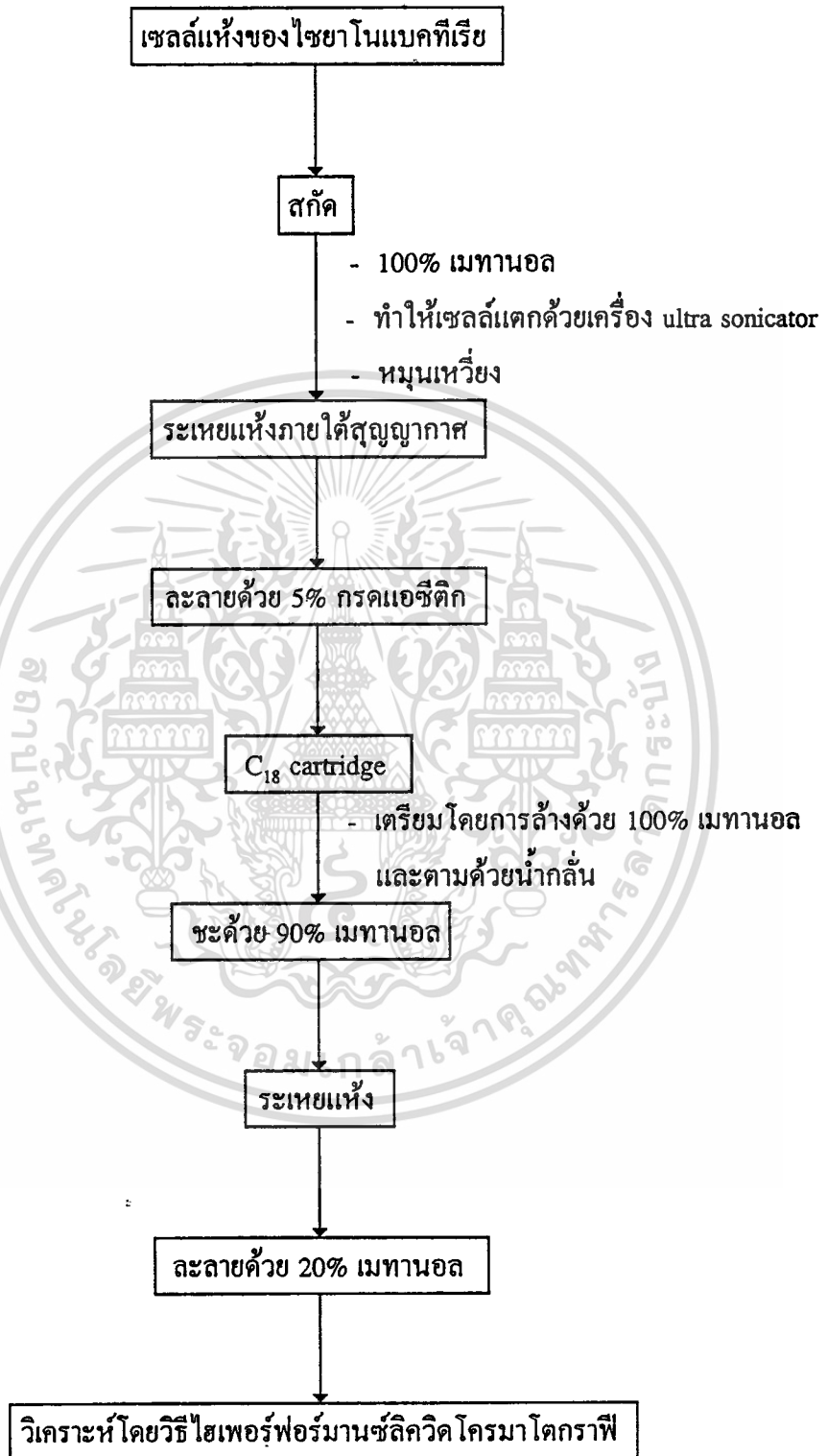
รูปที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.3 แสดงสถานะการเพาะเลี้ยง *M. aeruginosa* บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 60 ไมโครวัตต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.4 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์สารพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารทส่งงานวิชาสำหรับการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การวิเคราะห์สารพิษจากตัวอย่างธรรมชาติ

นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติทั้ง 4 แห่ง และผ่านการทำให้แห้งในสภาพแข็งแล้วมาทำการศึกษาเหมือนวิธีการในข้อ 3.2.4

3.2.6 การตรวจความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง (OECD, 1987)

(แสดงดังรูปที่ 3.5)

3.2.6.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติและผ่านการทำให้แห้งในสภาพแข็งแล้วทั้ง 4 ตัวอย่างมา 10 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์เป็นเวลา 30 นาที บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลาย จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 20 นาที สารสกัดที่ได้จะถูกนำไปประเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ชุดตัวอย่างสารสกัดแต่ละตัวอย่างลงในถ้วยกระเบื้อง ค่อยๆละลายด้วยน้ำกลั่นจนสารสกัดละลายเป็นเนื้อเดียวกันหมด

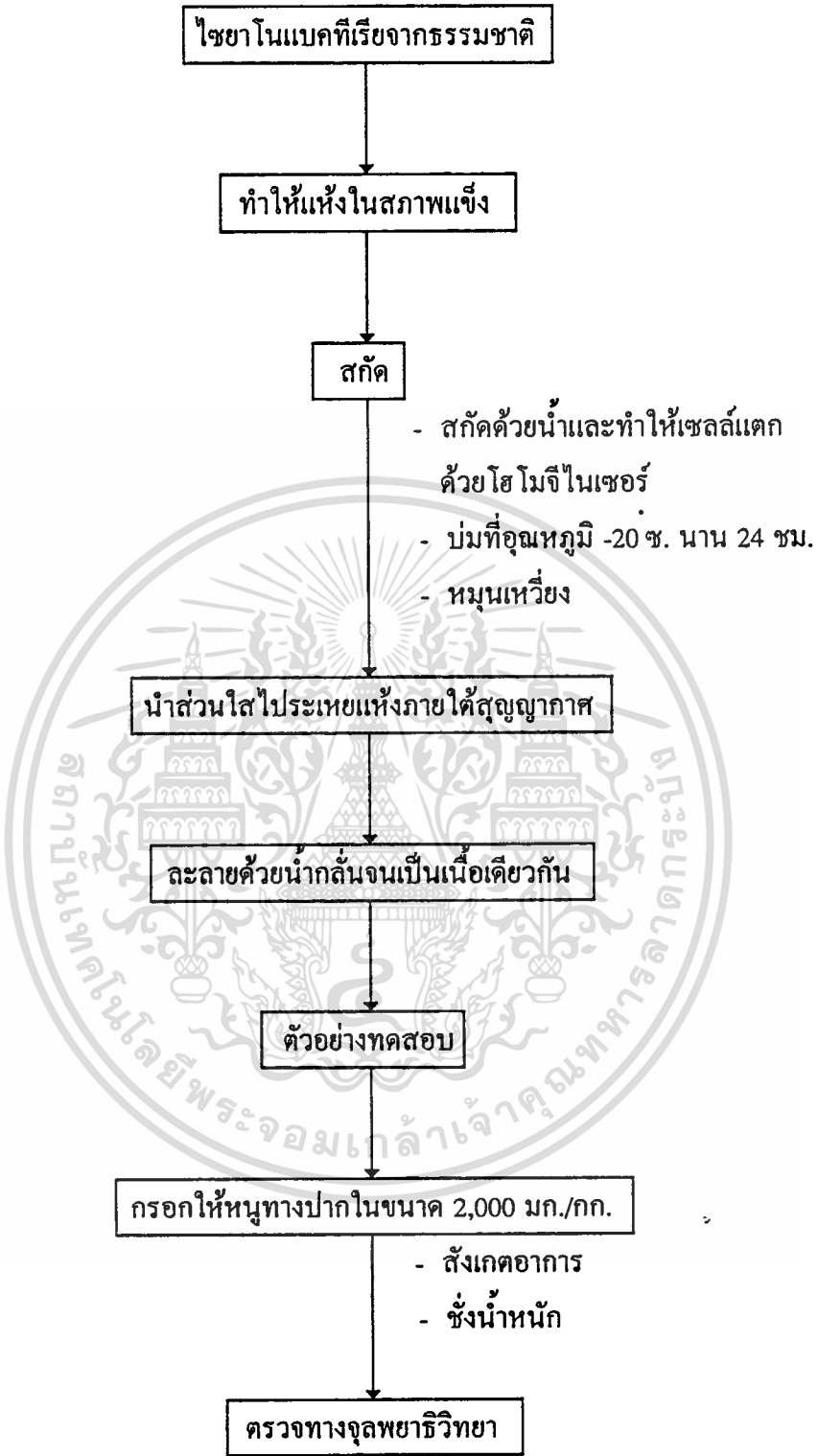
3.2.6.2 ขั้นตอนการทดสอบ

นำหนูเพศผู้พันธุ์วีสตาอายุ 14 วัน น้ำหนัก 200 กรัม โดยเฉลี่ย จำนวน 20 ตัว มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนทำการทดสอบนาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 24 ± 1 องศาเซลเซียส อดอาหารหนูอย่างน้อย 18 ชั่วโมง ก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ แต่ละตัวได้รับน้ำดื่มตามปกติ ในวันทดสอบแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่มๆละ 5 ตัว ชั่งน้ำหนักหนูทุกตัวและทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มสีที่หาง (tail tattooing) กรอกตัวอย่างทดสอบโดยใช้สารทดสอบ 1 ตัวอย่างต่อ 1 กลุ่ม ให้หนูทางปากในขนาด 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ให้อดอาหารหนูตามปกติภายหลังกรอกตัวอย่างทดสอบแล้ว 4 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูภายหลังกรอกตัวอย่างทดสอบต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน ทำการชั่งน้ำหนักตัวหนูแต่ละตัวในวันที่ 1, 8 และ 15 (ก่อนทำการผ่าตัดเปิดหน้าท้อง) หนูที่แสดงอาการเป็นพิษรุนแรง หรือหนูที่มีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง จะถูกวางยาสลบ โดยใช้สารละลายนิมบูทอล (nembutal solution) ในอัตรา 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ก่อนทำการผ่าตัดเปิดหน้าท้อง

3.2.6.3 การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology)

ภายหลังการสังเกตดูความผิดปกติที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า ตับจะถูกตัดแยกออกมา ชั่งน้ำหนักและแช่ในน้ำยาฟอร์มาลินทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน หลังจากนั้นทำการตัดตับเป็นชิ้นที่มีความหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร ตามแนวยาว นำไปผ่านกระบวนการเตรียมทางเนื้อเยื่อเพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาตามขั้นตอนต่างๆคือ การดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์ การฝัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาระดับสูง ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.5 แสดงขั้นตอนการตรวจความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดได้นี้บนแผ่นสไลด์แก้ว นำไปอบให้แห้งในตู้อบเพื่อให้เนื้อเยื่อเกาะติดบนแผ่นสไลด์ นำสไลด์ไปย้อมสีฮีมาทอกไซลิน (hematoxylin) และ อีโอซิน (eosin) (H&E) เพื่อตรวจดูความผิดปกติระดับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยนิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินของฮีมาทอกไซลิน และ ไซโตพลาสซึมจะติดสีแดงของอีโอซิน

3.2.7 การวิเคราะห์คุณภาพของน้ำบางประการที่มีผลต่อการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย (ภาคผนวก ข)

กรองตัวอย่างน้ำผ่านชุดเยื่อกรองและนำไปวิเคราะห์ค่าต่างๆดังนี้

3.2.7.1 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพ

3.2.7.1.1 วิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง (ภาคผนวก ข ข้อ 4)

3.2.7.2 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี

3.2.7.2.1 ออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen , DO) โดยวิธี azide modification of iodometric (APHA, AWWA and WPCF, 1975) (ภาคผนวก ข ข้อ 5)

3.2.7.2.2 บีโอดี (biochemical oxygen demand ; BOD) โดยวิธี direct method (APHA, AWWA and WPCF, 1975) (ภาคผนวก ข ข้อ 6)

3.2.7.2.3 ปริมาณไนเตรท (nitrate-nitrogen) โดยวิธีบรูซีน (brucine) (APHA, AWWA and WPCF, 1975) (ภาคผนวก ข ข้อ 7)

3.2.7.2.4 ปริมาณฟอสเฟต (phosphate) โดยวิธี aminonaphthosulfonic acid (APHA, AWWA and WPCF, 1975) (ภาคผนวก ข ข้อ 8)

3.2.7.3 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยา

3.2.7.3.1 วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย โดยวิธี total plate count (ภาคผนวก ข ข้อ 9)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ชนิดและปริมาณเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

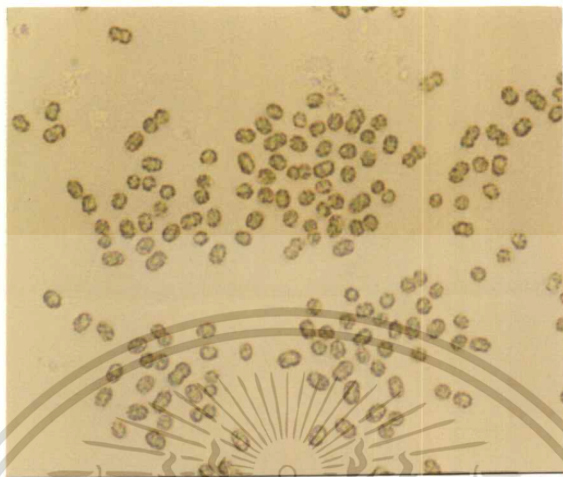
ได้นำตัวอย่างที่ทำการสุ่มเก็บในบริเวณแหล่งน้ำที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 4 แห่ง ภายในประเทศ คือ เขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี อ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี เขื่อนแม่กวง จังหวัดเชียงใหม่ และเขื่อนลำนะคอง จังหวัดนครราชสีมา โดยนำตัวอย่างที่ไม่กรองผ่านตาข่ายกรองแพลงก์ตอนมาตรวจชนิดและปริมาณของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

จากการจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายตามระบบการจัดจำแนกของ Desikachary (1959) พบไซยาโนแบคทีเรียทั้งสิ้น 2 สกุล 2 สายพันธุ์ (ภาคผนวก ค ข้อ 1) คือ *Microcystis aeruginosa*, และ *Oscillatoria* sp. (แสดงดังรูปที่ 4.1) โดยเขื่อนแก่งกระจาน อ่างเก็บน้ำบางพระ และเขื่อนแม่กวงจะพบ *M. aeruginosa* เพียงชนิดเดียว และมีจำนวนเท่ากับ 4.21×10^6 , 4.17×10^5 และ 3.37×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเขื่อนลำนะคองพบ *M. aeruginosa* จำนวน 6.10×10^5 เซลล์

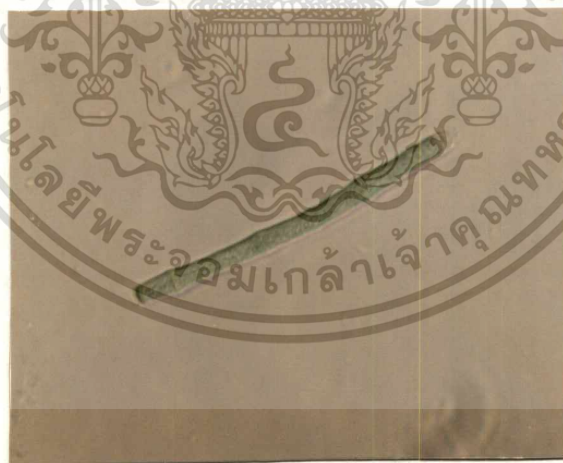
ตารางที่ 4.1 แสดงชนิดและปริมาณเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

สถานที่	วัน/เดือน/ปี	ไซยาโนแบคทีเรีย	จำนวนเซลล์ (เซลล์/มล.)
เขื่อนแก่งกระจาน	28/05/39	<i>M. aeruginosa</i>	4.21×10^6
อ่างเก็บน้ำบางพระ	16/01/40	<i>M. aeruginosa</i>	4.17×10^5
เขื่อนแม่กวง	13/02/40	<i>M. aeruginosa</i>	3.37×10^6
เขื่อนลำนะคอง	30/01/40	<i>M. aeruginosa</i>	6.10×10^5
		<i>Oscillatoria</i> sp.	2.2×10^4

ก.



ข.



รูปที่ 4.1 แสดงชนิดของไซยาโนแบคทีเรียที่พบจากแหล่งน้ำธรรมชาติ (400 เท่า)

ก. *Microcystis aeruginosa*

ข. *Oscillatoria* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมิลลิลิตร และ *Oscillatoria* sp. จำนวน 2.2×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากข้อมูลนี้จะเห็นว่า *M. aeruginosa* เป็นไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์หลักที่พบในแหล่งน้ำที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 4 แห่ง และพบเป็นจำนวนมาก แต่ละแห่งพบจำนวน *M. aeruginosa* แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิ ความเข้มแสง ปริมาณธาตุอาหารในแหล่งน้ำ ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ ฤดูกาลที่แตกต่างกัน และลักษณะภูมิประเทศ

จากการศึกษาของ Bishop และคณะ (1959) พบว่าในบริเวณแหล่งน้ำที่เกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย จะพบไซยาโนแบคทีเรียเป็นปริมาณมากที่สุด และส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Microcystis* นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียจะเกิดขึ้นในช่วงปลายฤดูร้อนมากที่สุด แต่สำหรับประเทศไทยจากการสอบถามเจ้าหน้าที่ประจำเขื่อนก่อนการสำรวจเพื่อทำการเก็บตัวอย่าง พบว่าช่วงเวลาที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มียุทธอากาศเย็น แต่ในบางแห่ง เช่น เขื่อนแก่งกระจาน จะมีการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียมากที่สุดในเดือนพฤษภาคมซึ่งอยู่ในช่วงปลายฤดูร้อน ตอนต้นของฤดูฝนก็ยังคงพบเห็นไซยาโนแบคทีเรียอยู่บ้างแต่ไม่มากนัก สำหรับเขื่อนแม่กวงจะพบการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียได้เกือบทั้งปี (7 เดือนใน 12 เดือน) จากผลการทดลองข้างต้นอาจกล่าวได้ว่าในช่วงปลายฤดูร้อนไซยาโนแบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงฤดูหนาวและฤดูร้อน ซึ่งดูจากปริมาณเซลล์ที่นับได้และช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างของแหล่งน้ำแต่ละแห่ง

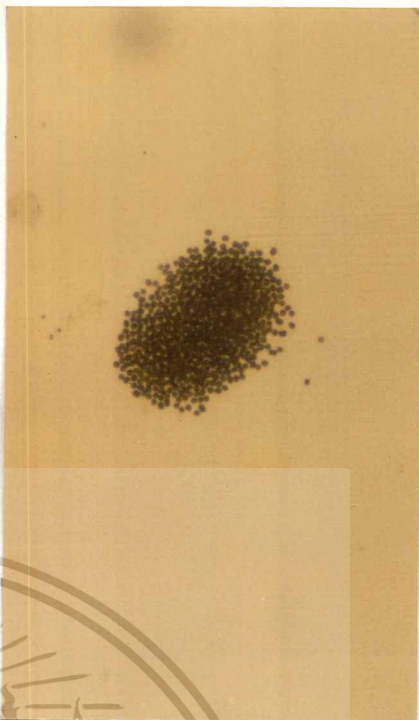
4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการตรวจนับและศึกษาชนิดของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำทั้ง 4 แห่ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และพบว่ามียุทธเซลล์ของ *M. aeruginosa* มากที่สุด โดยส่วนหนึ่งของการจัดจำแนกได้ทำการศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. aeruginosa* ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ากลุ่มเซลล์ (colony) มีหลายขนาด และมีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม เป็นร่างแห หรือ เรียวยาว โดยในตอนแรกกลุ่มเซลล์จะมีลักษณะกลมต่อมาเริ่มบิดเบี้ยวและเกิดช่องว่างภายในทำให้มีลักษณะเป็นร่างแห กลุ่มเซลล์จะถูกห่อหุ้มด้วยชีท (sheath) ซึ่งจะสังเกตเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์แต่ละเซลล์จะเกาะกันอย่างหนาแน่น เซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลมมีขนาดประมาณ 3.7-5.0 ไมครอน ภายในเซลล์มีแก๊สเวคิวโอล (gas vacuole) เห็นเป็นจุดสีดำกระจายอยู่ทั่วไป ลักษณะของกลุ่มเซลล์และเซลล์ของ *M. aeruginosa* แสดงดังรูปที่ 4.2

ก.



ข.



ค.



ง.



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของกลุ่มเชลล์และเชลล์ของ *M. aeruginosa*

ก. ข. และ ค. แสดงลักษณะของกลุ่มเชลล์แบบต่างๆ

โดย ก. (40 เท่า) ข. (200 เท่า)

ค. (200 เท่า)

ง. แสดงลักษณะของเชลล์ (400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 แหล่งธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

ได้ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนและแหล่งฟอสฟอรัสที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ในอาหาร MA ดัดแปลงที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ ยูเรีย และแหล่งฟอสฟอรัส คือ K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 เปรียบเทียบกับอาหาร MA สูตรปกติ ซึ่งมี $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 และ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี β -glycerophosphate เป็นแหล่งฟอสฟอรัส

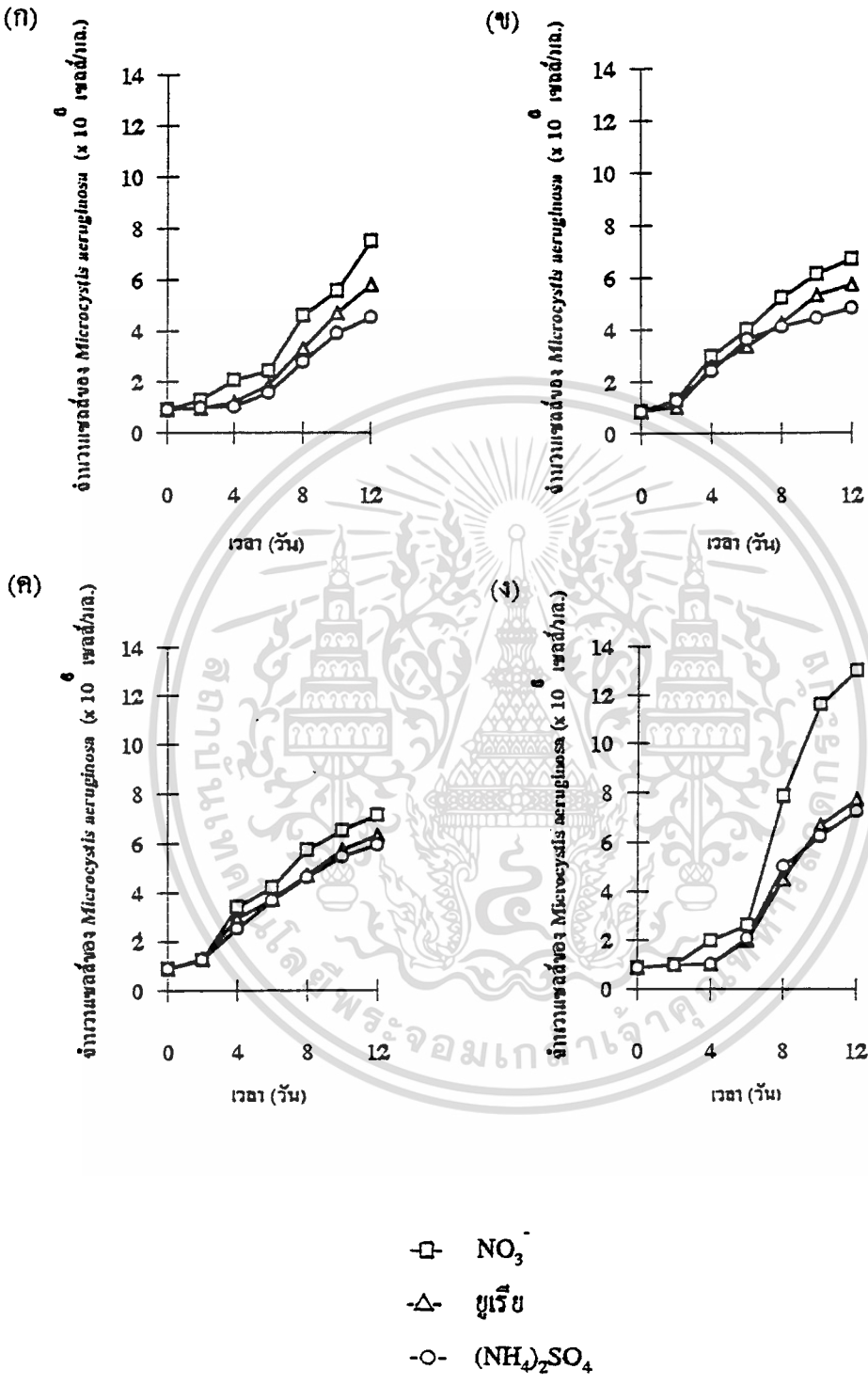
4.3.1 แหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาพบว่า *M. aeruginosa* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำทั้ง 4 แห่ง เจริญเติบโตในอาหาร MA สูตรปกติซึ่งมี $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 และ NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุด โดยเขื่อนแก่งกระจาน อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำนางรอง พบปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 7.5×10^6 , 6.69×10^6 , 7.1×10^6 และ 1.3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือ อาหาร MA ดัดแปลงที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน และเจริญเติบโตต่ำที่สุดในอาหาร MA ดัดแปลงที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3

สารประกอบไนโตรเจนหลายชนิดสามารถเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ สำหรับส่วนใหญ่ใช้ในเตรท (NO_3^-) ไนไตรท์ (NO_2^-) แอมโมเนีย (NH_4^+) และยูเรียได้จนถึงกรดอะมิโน (Thomas, 1968 ; Wheeler and North, 1974 ; Neilson and Larson, 1980) การใช้แอมโมเนียในการเลี้ยงสาหร่าย พืเอชของน้ำจะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากการปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออนออกจากกระบวนการดูดซึมแอมโมเนียเข้าไปในเซลล์ พืเอชที่เป็นกรดจะยับยั้งการเจริญของสาหร่ายเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นในการเลี้ยงสาหร่ายจึงนิยมใช้ไนเตรทเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนซึ่งอาจจะมีปัญหาเกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของพืเอช แต่โดยปกติแล้วสาหร่ายจะทนสภาพที่เป็นด่างได้ดีกว่าสภาพที่เป็นกรด และสาหร่ายบางชนิด เช่น ไซยาโนแบคทีเรียต้องการพืเอชสูงในการเจริญ จากผลการศึกษาจะเห็นว่าในอาหาร MA ดัดแปลงที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนสาหร่ายก็สามารถเจริญเติบโตได้ดี ดังนั้นนอกเหนือจากไนเตรทก็สามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงสาหร่ายได้

4.3.2 แหล่งฟอสฟอรัส

จากการศึกษา *M. aeruginosa* ที่แยกได้จาก เขื่อนแก่งกระจาน เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำนางรอง เจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร MA สูตรปกติที่มี β -glycerophosphate เป็นแหล่งฟอสฟอรัส โดยพบปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 7.6×10^6 , 7.31×10^6 และ 7.75×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือ K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 สำหรับอ่างเก็บน้ำบางพระ *M. aeruginosa* จะเจริญเติบโตดีที่สุดในการอาหาร MA ดัดแปลงที่มี KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสฟอรัส โดยพบปริมาณเซลล์สูง



รูปที่ 4.3 แสดงผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* จาก (ก) เชื้อนแก่่งกระจาน (ข) อ่างเก็บน้ำบางพระ (ค) เชื้อนแม่กวง และ (ง) เชื้อนลำตะคอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุดเท่ากับ 7.77×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ β -glycerophosphate และ K_2HPO_4 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4

โดยปกติในแหล่งน้ำทั่วไปมักจะมีปริมาณฟอสฟอรัสอยู่ในรูปของอินทรีย์ฟอสฟอรัสมากกว่าอนินทรีย์ฟอสฟอรัสที่สาหร่ายสามารถนำไปใช้ได้ (Goldman and Jenkins, 1974) แต่จากการศึกษาแหล่งฟอสฟอรัสพบว่า β -glycerophosphate ซึ่งเป็นแหล่งฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในอาหาร MA สูตรปกติทำให้ *M. aeruginosa* เจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ KH_2PO_4 และ K_2HPO_4 ถึงแม้ว่า *M. aeruginosa* จากอ่างเก็บน้ำบางพระจะเจริญเติบโตดีที่สุด ในอาหาร MA ดัดแปลงที่มี KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสฟอรัสก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากความต้องการฟอสฟอรัสของสาหร่ายจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาวะแวดล้อม เช่น ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในอาหาร แสง และ พีเอช

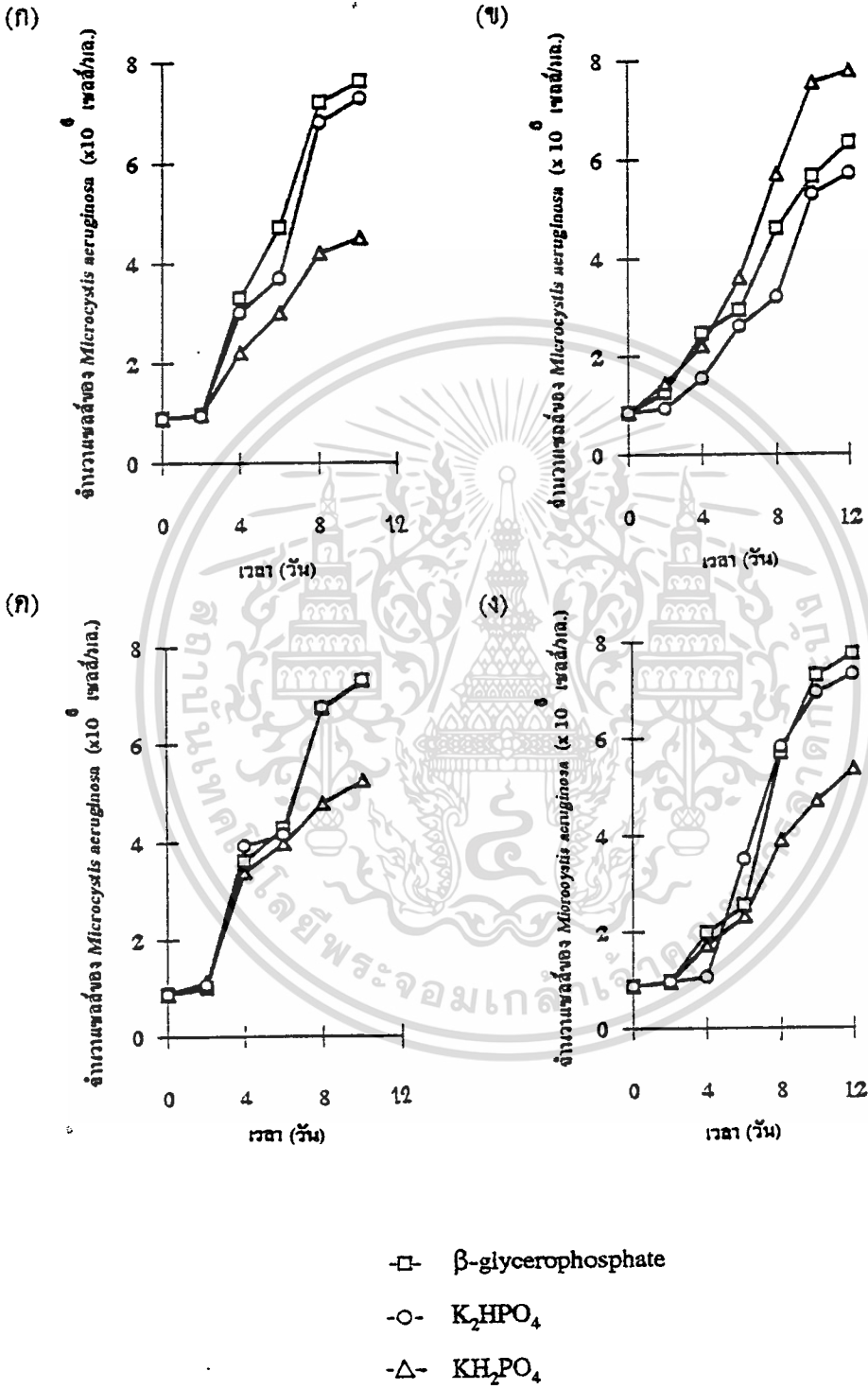
4.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารพิษของไซยาโนแบคทีเรีย

จากผลการศึกษาแหล่งธาตุอาหารและพบว่าไนเตรทและฟอสเฟตมีผลต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียมากที่สุด ดังนั้นในการศึกษาปริมาณธาตุอาหารจึงทำการศึกษาเฉพาะไนเตรทและฟอสเฟต นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาปัจจัยอื่นๆ คือ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และความเข้มแสง ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* จากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 แห่ง เมื่อการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วงแรกของการเจริญเติบโตครั้งที่ จะทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และนำไปผ่านขั้นตอนการสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษ

4.4.1 ไนเตรท

จากการศึกษาความต้องการปริมาณไนเตรทที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 แห่ง ในอาหาร MA ดัดแปลง ซึ่งมี $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, KNO_3 และ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้ความเข้มข้นเป็น 1/5, 1/10 และ 1/20 ของสูตรอาหารปกติ โดยทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เมื่อการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วงแรกของการเจริญเติบโต ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5

จากผลการศึกษาพบว่าในสูตรอาหาร MA ที่มีความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในระดับปกติ นั้น จะทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร MA ที่ดัดแปลงให้มีความเข้มข้นของไนเตรทเท่ากับ 1/5, 1/10 และ 1/20 ของสูตรอาหารปกติ และสูตรอาหาร MA ดัดแปลงที่ไม่เติมไนเตรทและฟอสเฟต โดยดูได้จากปริมาณเซลล์สูงสุดที่ได้จากการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เพาะเลี้ยงซึ่งแยกจากตัวอย่างของเขื่อนแก่งกระจาน อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำตะคอง คือ 2.32×10^7 , 1.15×10^7 , 1.06×10^7 และ 7.64×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในระยะ 3 วันแรกการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ไม่แตกต่างกันมากนัก โดย



รูปที่ 4.4 แสดงผลการศึกษาแหล่งฟอสฟอรัสที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* จาก (ก)

เขื่อนแก่งกระจาน (ข) อ่างเก็บน้ำบางพระ (ค) เขื่อนแม่กวง และ (ง) เขื่อนลำตะคอง

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

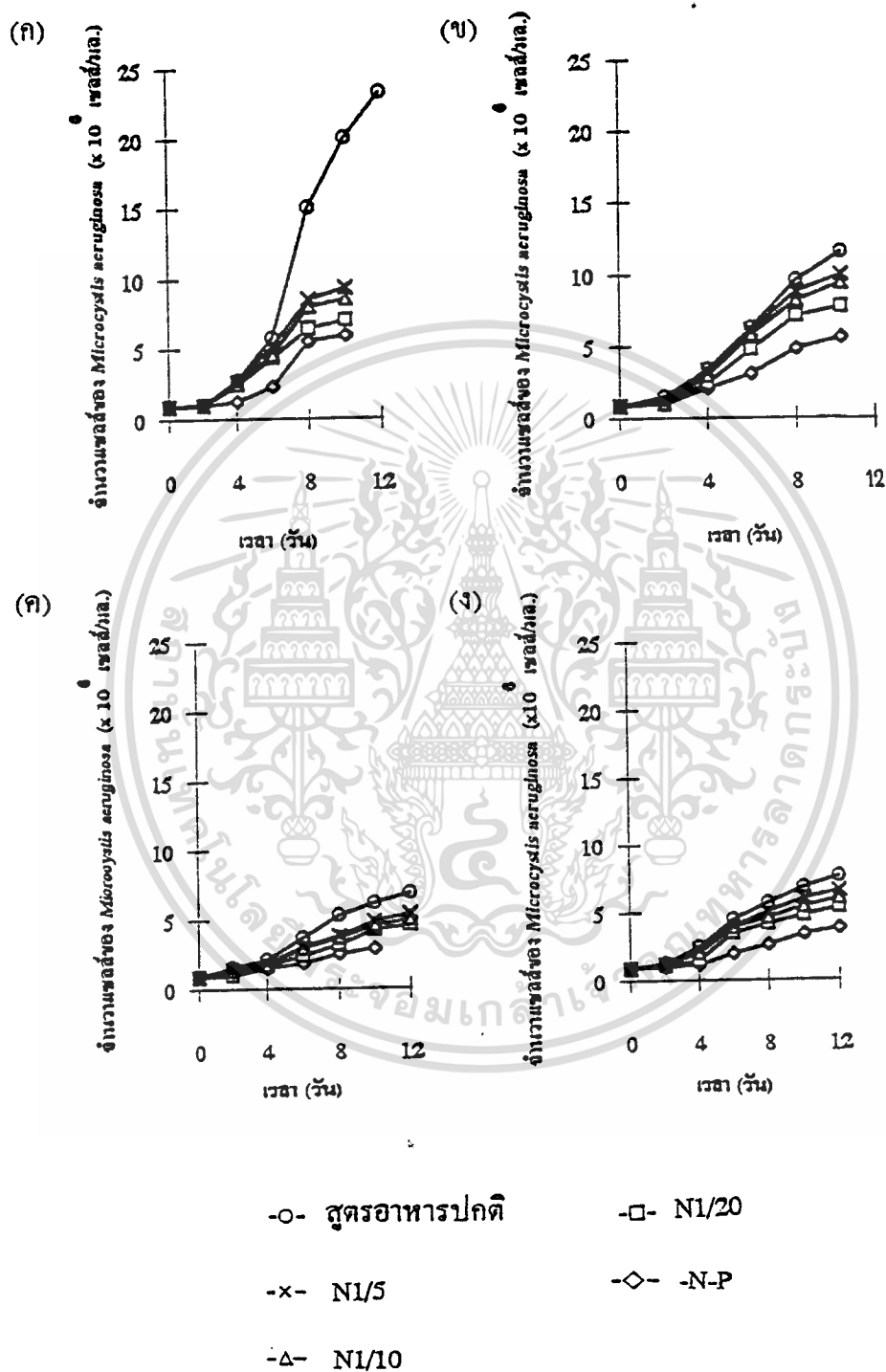
ไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MA ที่มีความเข้มข้นของไนเตรทเท่ากับ 1/5 ของสูตรอาหารปกติ จะเจริญเติบโตใกล้เคียงกับที่เลี้ยงในอาหาร MA สูตรปกติ แต่หลังจากวันที่ 3 ของการเจริญเติบโตจะเริ่มมีความแตกต่างกัน และมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดในช่วงวันที่ 6 ถึงวันที่ 8 โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ย (แสดงดังตารางที่ 4.2) ของ *M. aeruginosa* ที่เลี้ยงในอาหาร MA สูตรปกติของเขื่อนแก่งกระจาน อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำนะตะกอง เป็น 0.42, 0.35, 0.22 และ 0.30 ตามลำดับ และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยของ *M. aeruginosa* ที่เลี้ยงในอาหาร MA ดัดแปลงที่ให้ความเข้มข้นของไนเตรทเท่ากับ 1/5 ของเขื่อนแก่งกระจาน อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำนะตะกอง เป็น 0.39, 0.33, 0.18 และ 0.3 ตามลำดับ หลังจากวันที่ 8 การเจริญเติบโตเริ่มลดลง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำทั้ง 4 แห่ง ที่นำมาเลี้ยงในอาหาร MA สูตรปกติมีการเจริญเติบโตดีที่สุด รองลงมาคือสูตรอาหาร MA ดัดแปลงที่ให้ความเข้มข้นของไนเตรทเท่ากับ 1/5, 1/10, 1/20 ตามลำดับ และสูตรอาหาร MA ดัดแปลงที่ไม่เติมไนเตรท และฟอสเฟตจะมีการเจริญเติบโตต่ำที่สุด

จากผลการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่าปริมาณไนเตรทมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำทั้ง 4 แห่ง โดยเฉพาะจากเขื่อนแก่งกระจาน เพราะเมื่อลดปริมาณไนเตรทในอาหาร MA ทำให้การเจริญเติบโตลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับ อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำนะตะกอง ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตจะค่อยๆ ลดลงตามปริมาณของไนเตรทที่มีในอาหาร

ผลการศึกษาระดับปริมาณสารพิษหลังจากทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ เมื่อการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วงแรกของการเจริญเติบโตคงที่และนำไปผ่านขั้นตอนการสกัดโดยแสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 จากการเปรียบเทียบกับสารพิษมาตรฐาน (ภาคผนวก ก ข้อ 2) พบสารพิษในกลุ่มของไมโครซิสติน (microcystin) 3 ชนิด คือ microcystin-RR (MCYST-RR), microcystin-YR (MCYST-YR) และ microcystin-LR (MCYST-LR) ตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากเขื่อนแก่งกระจานพบสารพิษมากที่สุด ในสูตรอาหาร MA ปกติมีปริมาณ 85.05 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 8.19 ไมโครกรัม และ MCYST-LR 76.86 ไมโครกรัม ตัวอย่างจากอ่างเก็บน้ำบางพระพบสารพิษปริมาณ 2.36 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.47 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 1.89 ไมโครกรัม ตัวอย่างจากเขื่อนแม่กวงพบปริมาณสารพิษ 12.72 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.38 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 12.34 ไมโครกรัม ในสูตรอาหาร MA ดัดแปลงที่ให้ความเข้มข้นของไนเตรท 1/5, 1/10 และ 1/20 ของสูตรอาหารปกติพบสารพิษเพียงชนิดเดียว คือ MCYST-YR และไม่พบสารพิษชนิดใดในสูตรอาหาร MA ดัดแปลงที่ไม่เติมไนเตรทและฟอสเฟต ตัวอย่างจากเขื่อนลำนะตะกองพบปริมาณสารพิษ 3.09 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.68 ไมโครกรัม และ

MCYST-YR 2.41 ไมโครกรัม ตัวอย่างจากเขื่อนแก่งกระจาน อ่างเก็บน้ำบางพระ และเขื่อน

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงผลการศึกษาปริมาณไนเตรทที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* จาก (ก)

เขื่อนแก่งกระจาน (ข) อ่างเก็บน้ำบางพระ (ค) เขื่อนแม่กวง และ (ง) เขื่อนลำตะคอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของ *M. aeruginosa* ในการศึกษาปริมาณ ไนเตรทที่มีผลต่อการเจริญเติบโต

ปริมาณไนเตรท	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)			
	เขื่อนแก่งกระจาน	อ่างเก็บน้ำบางพระ	เขื่อนแม่กวง	เขื่อนลำนางรอง
สูตรปกติ	0.42 ¹ (10.0) ²	0.35 (7.8)	0.22 (5.4)	0.30 (5.0)
N 1/5	0.39 (8.3)	0.33 (5.8)	0.18 (3.8)	0.30 (4.8)
N 1/10	0.37 (8.1)	0.33 (5.8)	0.17 (3.7)	0.29 (4.7)
N 1/20	0.36 (7.6)	0.31 (4.3)	0.16 (3.5)	0.28 (4.1)
-N-P	0.30 (5.1)	0.26 (3.3)	0.16 (2.6)	0.20 (3.8)

หมายเหตุ ¹ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะคิดจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยในช่วงที่ เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด

² น้ำหนักแห้งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบปริมาณไนเตรทที่มีต่อการผลิตสารพิษ

ปริมาณไนโตรเจน	ปริมาณสารพิษ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ¹															
	เฟืองแก่่งกระงาน			อ่างเก็บน้ำบางพระ			เขื่อนแม่กวาง			เขื่อนลำตะคอง						
	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR
สูตรปกติ	85.05	8.19 9.6% ¹	- ²	76.86 90.4%	2.36	0.47 19.9%	1.89 80.1%	-	12.72	0.38 3.0%	12.34 97.0%	-	3.09	0.68 22.0%	2.41 78.0%	-
N 1/5	58.84	0.078 0.1%	-	58.76 99.9%	1.21	0.29 24.0%	0.92 76.0%	-	6.49	-	6.49 100%	-	1.91	0.39 20.4%	1.52 79.6%	-
N 1/10	36.29	-	-	36.29 100%	0.81	0.23 28.4%	0.58 71.6%	-	4.6	-	4.6 100%	-	0.58	0.28 48.3%	0.3 51.7%	-
N 1/20	12.2	-	-	12.2 100%	0.17	0.17 100%	-	-	1.77	-	1.77 100%	-	0.22	0.22 100%	-	-
-N-P	6.28	-	-	6.28 100%	0.09	0.09 100%	-	-	-	-	-	-	0.13	0.13 100%	-	-

หมายเหตุ ¹ ปริมาณสารพิษคำนวณจากพื้นที่ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับพื้นที่ของสารพิษมาตรฐาน

² ไม่พบปริมาณสารพิษ

³ ปริมาณสารพิษคิดเป็นร้อยละของปริมาณทั้งหมดที่พบ

ลำตะคองจะพบปริมาณสารพิษน้อยที่สุดในสูตรอาหาร MA ดัดแปลงที่ไม่เติมไนเตรทและฟอสเฟต

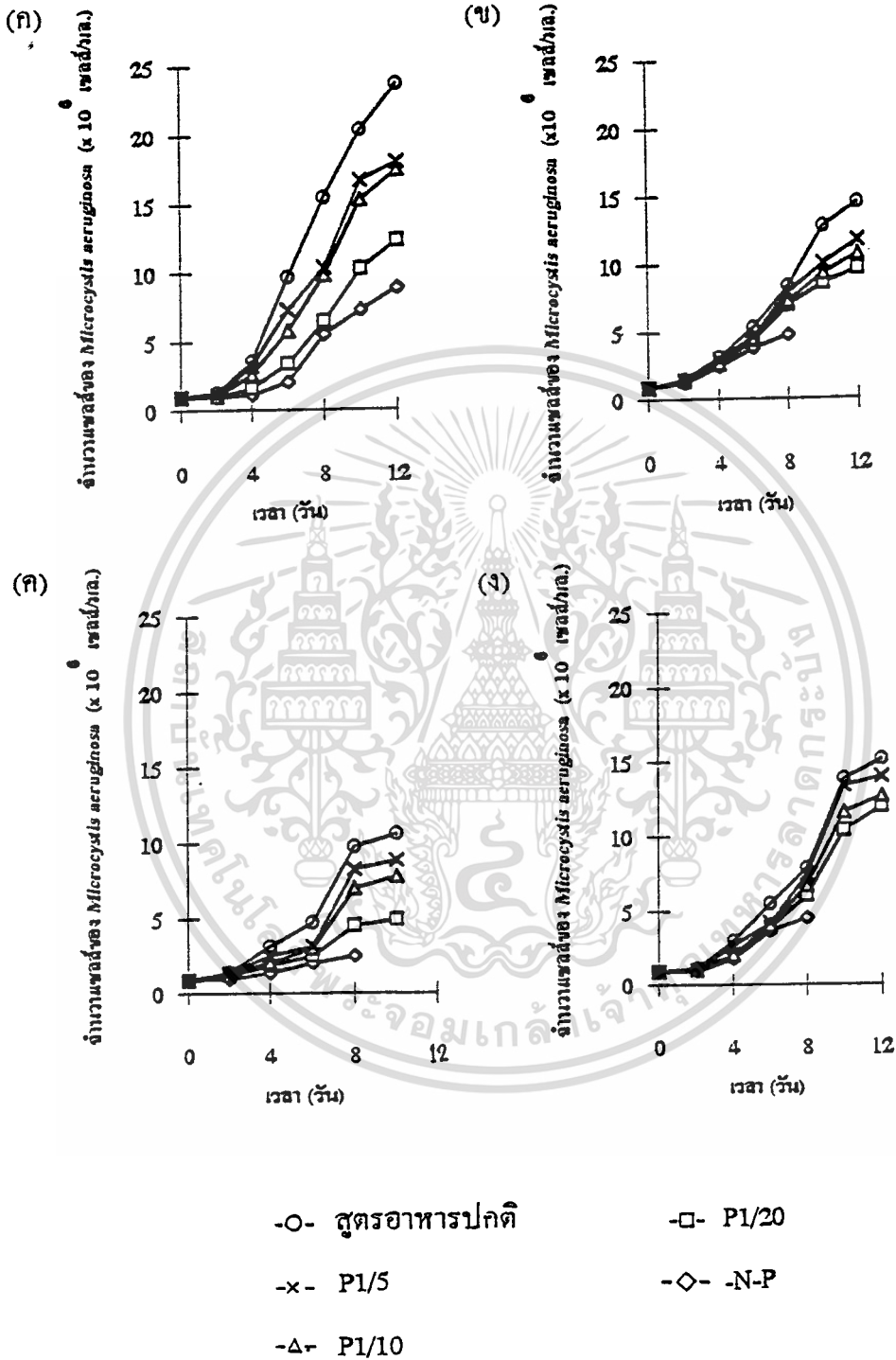
จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่าการลดปริมาณไนเตรทในอาหาร MA มีผลต่อปริมาณของสารพิษ นั่นคือเมื่อปริมาณไนเตรทลดลงปริมาณสารพิษก็จะลดลง ดังจะเห็นได้จากเขื่อนแก่งกระเจาน ที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรท 1/5 MCYST-RR จะลดลงมากและไม่พบอีกเลย ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 1/10 และเขื่อนแม่กวางที่จะพบ MCYST-RR เฉพาะในสูตรอาหารปกติเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Watanabe และ Oishi (1985) โดยพบว่าเมื่อลดความเข้มข้นของไนเตรทในอาหาร MA เป็น 1/10 และ 1/20 จะทำให้ความเป็นพิษลดลง สำหรับความเป็นพิษที่พบในไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรทและฟอสเฟตน่าจะเป็นผลมาจากจุลราตุบางชนิดที่มีผลต่อการผลิตสารพิษ เช่น สังกะสี (Zn) และ เหล็ก (Fe) (Lukac and Angerter, 1993)

4.4.2 ฟอสเฟต

โดยการศึกษาความต้องการปริมาณฟอสเฟตที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* จากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 แห่ง ในอาหาร MA ซึ่งมี β -glycerophosphate เป็นแหล่งฟอสฟอรัส และใช้ความเข้มข้น 1/5, 1/10 และ 1/20 ของสูตรอาหารปกติ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7

จากการศึกษาพบว่า สูตรอาหาร MA ที่มีความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟตในระดับปกติ ทำให้ *M. aeruginosa* เจริญเติบโตดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร MA ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟต 1/5, 1/10 และ 1/20 ของสูตรอาหารปกติ และสูตรอาหารดัดแปลงที่ไม่เติมไนเตรทและฟอสเฟต ในสูตรอาหารปกติตัวอย่างจากเขื่อนแก่งกระเจานพบว่า *M. aeruginosa* มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยในช่วงวันที่ 4 ถึงวันที่ 10 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ย (แสดงดังตารางที่ 4.4) ของ *M. aeruginosa* ของเขื่อนแก่งกระเจาน ใกล้เคียงน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวาง และเขื่อนลำตะคอง เป็น 0.35, 0.31, 0.31 และ 0.34 ตามลำดับ แต่หลังจากวันที่ 10 การเจริญเติบโตเริ่มลดลง หลังจากทำการเก็บเกี่ยวเซลล์พบว่า มีจำนวนเซลล์ของ *M. aeruginosa* ของเขื่อนแก่งกระเจาน เท่ากับ 2.37×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ เขื่อนลำตะคอง ใกล้เคียงน้ำบางพระ และเขื่อนแม่กวาง มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.52×10^7 , 1.45×10^7 และ 6.87×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากการทดลองพบว่า การเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* จะลดลงเมื่อลดปริมาณฟอสเฟตในอาหาร MA และในอาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรทและฟอสเฟตพบว่า *M. aeruginosa* จะมีการเจริญเติบโตต่ำที่สุด แต่จากกราฟจะสังเกตเห็นว่าในบางตัวอย่าง เช่น เขื่อนลำตะคอง แม้จะมีการลดปริมาณฟอสเฟตในอาหาร MA ลงก็ตามแต่การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงผลการศึกษาปริมาณฟอสเฟตที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* จาก (ก) เขื่อนแก่งกระจาน (ข) อ่างเก็บน้ำบางพระ (ค) เขื่อนแม่กวง และ (ง) เขื่อนลำตะคอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของ *M. aeruginosa* ในการศึกษาปริมาณฟอสเฟตที่มีผลต่อการเจริญเติบโต

ปริมาณฟอสเฟต	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)			
	เขื่อนแก่งกระจาน	อ่างเก็บน้ำบางพระ	เขื่อนแม่กวง	เขื่อนลำนางรอง
สูตรปกติ	0.35 ¹ (4.0) ²	0.31 (6.9)	0.31 (4.6)	0.34 (2.7)
P 1/5	0.31 (3.5)	0.29 (6.8)	0.29 (3.8)	0.32 (1.9)
P 1/10	0.29 (2.0)	0.25 (5.8)	0.28 (3.5)	0.28 (1.5)
P 1/20	0.27 (1.6)	0.23 (5.6)	0.22 (2.3)	0.27 (0.4)
-N-P	0.22 (1.3)	0.23 (0.8)	0.18 (0.9)	0.28 (0.3)

หมายเหตุ ¹ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะคิดจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด

² น้ำหนักแห้งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร

เจริญเติบโตไม่แตกต่างกันมากนัก จึงอาจเป็นไปได้ว่าการได้รับปริมาณฟอสเฟตเพียงเล็กน้อยก็ยังเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* สายพันธุ์ล่าตะคอง

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าปริมาณฟอสเฟตมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 แห่ง เช่นเดียวกับไนเตรท แต่การลดปริมาณไนเตรทในอาหาร MA มีผลทำให้การเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ต่ำกว่าการลดปริมาณฟอสเฟตในอาหาร MA ระดับความเข้มข้น 1/5, 1/10 และ 1/20 ของสูตรอาหารปกติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาปัจจัยเกี่ยวกับสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารพิษของไซยาโนแบคทีเรีย (*M. aeruginosa*) (Watanabe et.al., 1985) ซึ่งทำการทดสอบในอาหาร MA ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของไนเตรทและฟอสเฟต 1/10 และ 1/20

ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษพบสารพิษทั้งหมด 3 ชนิด คือ MCYST-RR, MCYST-YR และ MCYST-LR แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.5 ทั้ง 4 ตัวอย่างจะพบปริมาณสารพิษมากที่สุดในสูตรอาหาร MA ปกติ ซึ่งพบว่าไซยาโนแบคทีเรียจากเขื่อนแก่งกระจานมีปริมาณสารพิษทั้งหมด 32.75 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 2.41 ไมโครกรัม และ MCYST-LR 30.34 ไมโครกรัม แต่ที่ระดับความเข้มข้น 1/20 และสูตรอาหารที่ไม่เติมไนเตรทและฟอสเฟตจะพบเฉพาะ MCYST-LR เท่านั้น ส่วนไซยาโนแบคทีเรียจากอ่างเก็บน้ำบางพระพบปริมาณสารพิษ 5.13 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-YR 0.45 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 4.68 ไมโครกรัม ในสูตรอาหารที่ไม่เติมไนเตรทและฟอสเฟตจะพบเฉพาะ MCYST-RR เท่านั้น ไซยาโนแบคทีเรียจากเขื่อนแม่กวงพบปริมาณสารพิษ 7.13 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.21 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 6.92 ไมโครกรัม ในอาหารที่ไม่เติมไนเตรทและฟอสเฟตไม่พบสารพิษชนิดใดเลย และเขื่อนลำนะคงพบปริมาณสารพิษทั้งหมด 5.96 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.59 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 5.37 ไมโครกรัม สำหรับอาหารที่ไม่เติมไนเตรทและฟอสเฟตจะพบเฉพาะ MCYST-RR เท่านั้น

จากผลการทดลองนี้แสดงว่าปริมาณฟอสเฟตมีผลต่อปริมาณสารพิษที่ผลิตโดย *M. aeruginosa* เช่นเดียวกับไนเตรท แต่มีผลน้อยกว่าเนื่องจากปริมาณสารพิษค่อยๆ ลดลงเมื่อลดปริมาณฟอสเฟต สำหรับในแหล่งน้ำธรรมชาติฟอสเฟตเป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) ดังนั้นเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฟอสเฟตเพียงเล็กน้อยก็อาจมีผลต่อการผลิตสารพิษของไซยาโนแบคทีเรียได้ (Sivonen, 1990)

4.4.3 ความเป็นกรด-ด่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบปริมาณฟอสเฟตที่มีผลต่อการผลิตสารพิษ

ปริมาณฟอสเฟต	ปริมาณสารพิษ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ¹															
	เงื่อนไข่งกระงาน			อ่างเก็บน้ำบางพระ			เขื่อนแม่กวาง			เขื่อนลำตะคอง						
	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR
สูตรปกติ	32.75	2.41	- ²	30.34	5.31	0.45	4.86	-	7.13	0.21	6.92	-	5.96	0.59	5.37	-
		7.4%		92.6%	8.5%		91.5%			3.0%	97.0%			9.9%	90.1%	
P 1/5	19.8	1.4	-	18.4	3.99	0.32	3.67	-	3.05	0.19	2.86	-	3.79	0.38	3.41	-
		7.1%		92.9%	8.0%		92.0%			6.2%	93.8%			10.0%	90.0%	
P 1/10	11.53	0.06	-	11.47	2.26	0.28	1.98	-	0.99	0.13	0.86	-	2.83	0.26	2.57	-
		0.5%		99.5%	12.4%		87.6%			13%	87%			9.2%	90.8%	
P 1/20	10.59	-	-	10.59	1.28	0.11	1.17	-	0.51	0.09	0.42	-	1.63	0.24	1.39	-
				100%	8.6%		91.4%			18%	82%			14.7%	85.3%	
-N-P	2.54	-	-	2.54	0.04	0.04	-	-	-	-	-	-	0.06	0.06	-	-
				100%	100%		100%							100%		

หมายเหตุ ¹ ปริมาณสารพิษคำนวณจากพื้นที่ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับพื้นที่ของสารพิษมาตรฐาน

² ไม่พบปริมาณสารพิษ

³ ปริมาณสารพิษคิดเป็นร้อยละของปริมาณทั้งหมดที่พบ

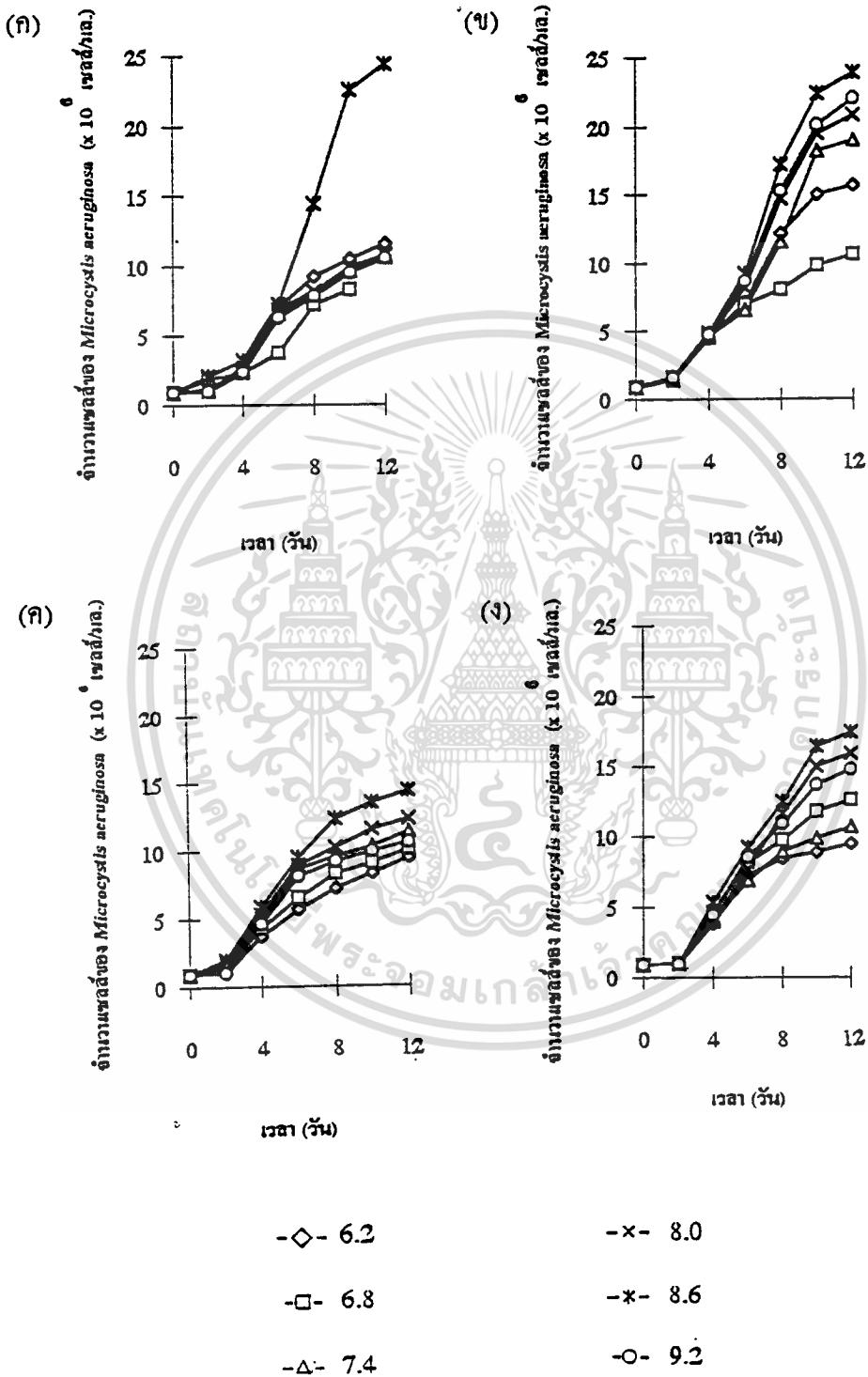
โดยการศึกษาคือความเป็นกรด-ด่างในอาหาร MA ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร MA สูตรปกติที่ปรับพีเอชเท่ากับ 6.2, 6.8, 7.4, 8.0, 8.6 และ 9.0 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8

จากผลการทดลองพบว่า ในอาหาร MA ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 8.6 (ค่าปกติของอาหาร) ไชยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตดีที่สุด โดยเฉพาะ ไชยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากเขื่อนแก่งกระจาน จะมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด รองลงมา คือ อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนลำตะคอง และเขื่อนแม่กวง มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.44×10^7 , 2.39×10^7 , 1.74×10^7 และ 1.43×10^7 ตามลำดับ โดยในช่วงวันที่ 4 ถึง วันที่ 8 *M. aeruginosa* จากเขื่อนแก่งกระจาน อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำตะคอง มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ย (แสดงดังตารางที่ 4.6) เป็น 0.29, 0.36, 0.29 และ 0.31 ตามลำดับ ตัวอย่างจากเขื่อนแม่กวงและเขื่อนลำตะคองการเจริญเติบโตที่พีเอชต่างๆ ไม่แตกต่างกันมากนัก นั่นคือพีเอชอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อยสำหรับตัวอย่างจากอ่างเก็บน้ำบางพระการเจริญเติบโตมีความแตกต่างกันมากขึ้นในแต่ละการทดลอง โดยเฉพาะที่พีเอช 6.8 อัตราการเจริญเติบโตจะต่ำสุดอย่างเห็นได้ชัด และตัวอย่างจากเขื่อนแก่งกระจาน ในอาหาร MA ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 8.6 การเจริญเติบโตของไชยาโนแบคทีเรียจะแตกต่างจากการเลี้ยงในอาหาร MA ที่ปรับค่าพีเอชเป็น 6.2, 6.8, 7.4, 8.0 และ 9.2 มาก

ในการทดลองนี้จะเห็นว่าที่พีเอชต่ำ *M. aeruginosa* จะเจริญเติบโตได้ไม่ดี แต่จะเจริญเติบโตได้ดีที่พีเอชเป็นกลางหรือเป็นด่าง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Eloff และ Van der Westhuizen (1981) ซึ่งทำการศึกษเกี่ยวกับความเป็นพิษของ *Microcystis* ในแหล่งน้ำธรรมชาติ รวมถึงการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต โดยพบว่า *Microcystis* มีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อพีเอชเท่ากับ 9

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษที่พบใน *M. aeruginosa* ทั้ง 4 ตัวอย่าง หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร MA ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 6.2, 6.8, 7.4, 8.0, 8.6 และ 9.2 พบว่าที่พีเอชเท่ากับ 8.6 ไชยาโนแบคทีเรียทั้ง 4 ตัวอย่างจะผลิตสารพิษได้สูงที่สุด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7 โดยเขื่อนแก่งกระจานจะพบปริมาณสารพิษทั้งหมด 74.63 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 4.61 ไมโครกรัม และ MCYST-LR 70.02 ไมโครกรัม อ่างเก็บน้ำบางพระพบปริมาณสารพิษ 6.1 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.83 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 5.27 ไมโครกรัม เขื่อนแม่กวงพบปริมาณสารพิษ 8.66 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.57 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 8.09 ไมโครกรัม และเขื่อนลำตะคองพบปริมาณสารพิษ 7.54 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.9 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 6.64 ไมโครกรัม และพบว่าทั้ง 4 ตัวอย่างจะผลิตสารพิษได้ต่ำสุดที่พีเอชเท่ากับ 9.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงผลการศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* จาก (ก) เอกสารนี้เป็นเชื้อเขื่อนแก่งกระจาน (ข) อย่างเก็บน้ำบางพระ (ค) เขื่อนแม่กวง และ (ง) เขื่อนลำตะคอง กำนการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของ *M. aeruginosa* ในการศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการเจริญเติบโต

พีเอช	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)			
	เขื่อนแก่งกระจาน	อ่างเก็บน้ำบางพระ	เขื่อนแม่กวง	เขื่อนลำนะทอง
6.2	0.28 ¹ (15.1) ²	0.33 (13.7)	0.24 (7.7)	0.25 (6.3)
6.8	0.22 (9.8)	0.27 (6.3)	0.28 (11.8)	0.28 (15.1)
7.4	0.27 (14.1)	0.23 (9.3)	0.26 (8.1)	0.27 (9.2)
8.0	0.26 (11.5)	0.35 (17.1)	0.29 (16.1)	0.26 (4.6)
8.6	0.29 (16.4)	0.36 (18.7)	0.29 (17.0)	0.31 (17.5)
9.2	0.27 (13.8)	0.36 (18.4)	0.28 (15.2)	0.30 (15.2)

หมายเหตุ ¹ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะคิดจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด

² น้ำหนักแห้งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อปริมาณอาหาร 100 มิลลิกรัม

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการผลิตสารพิษ

พีเอช	ปริมาณสารพิษ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ¹																					
	เงื่อนไข่งกระงาน				อ่างเก็บน้ำบางพระ				เงื่อนไข่งแก้ว				เงื่อนไข่งตะกอง									
	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR						
6.2	55.65	0.27	- ²	55.38	0.46	-	-	0.46	100%	0.35	-	-	0.35	0.35	-	-	1.55	0.79	0.76	51.0%	49%	-
6.8	32.42	0.18	-	32.24	0.67	-	-	0.67	100%	0.67	0.2	-	0.67	0.47	0.2	-	1.78	0.82	0.96	46.1%	53.9%	-
7.4	27.44	0.11	-	27.33	0.48	0.2	27.33	0.28	58.3%	0.91	0.75	-	0.91	0.16	0.75	-	1.66	0.27	1.39	16.3%	83.7%	-
8.0	27.84	0.17	-	27.67	4.33	3.57	27.67	0.76	17.5%	1.15	0.89	-	1.15	0.26	0.89	-	0.43	0.26	0.17	60.5%	39.5%	-
8.6	74.63	4.61	-	70.02	6.1	0.83	70.02	5.27	86.4%	8.66	8.09	-	8.66	0.57	8.09	-	7.54	0.9	6.64	11.9%	88.1%	-
9.2	20.92	0.51	-	20.41	0.39	0.27	20.41	0.12	30.8%	0.2	0.14	-	0.2	0.062	0.14	-	0.42	0.17	0.25	40.5%	59.5%	-

หมายเหตุ ¹ ปริมาณสารพิษคำนวณจากพื้นที่ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับพื้นที่ของสารพิษมาตรฐาน

² ไม่พบปริมาณสารพิษ

³ ปริมาณสารพิษคิดเป็นร้อยละของปริมาณทั้งหมดที่พบ

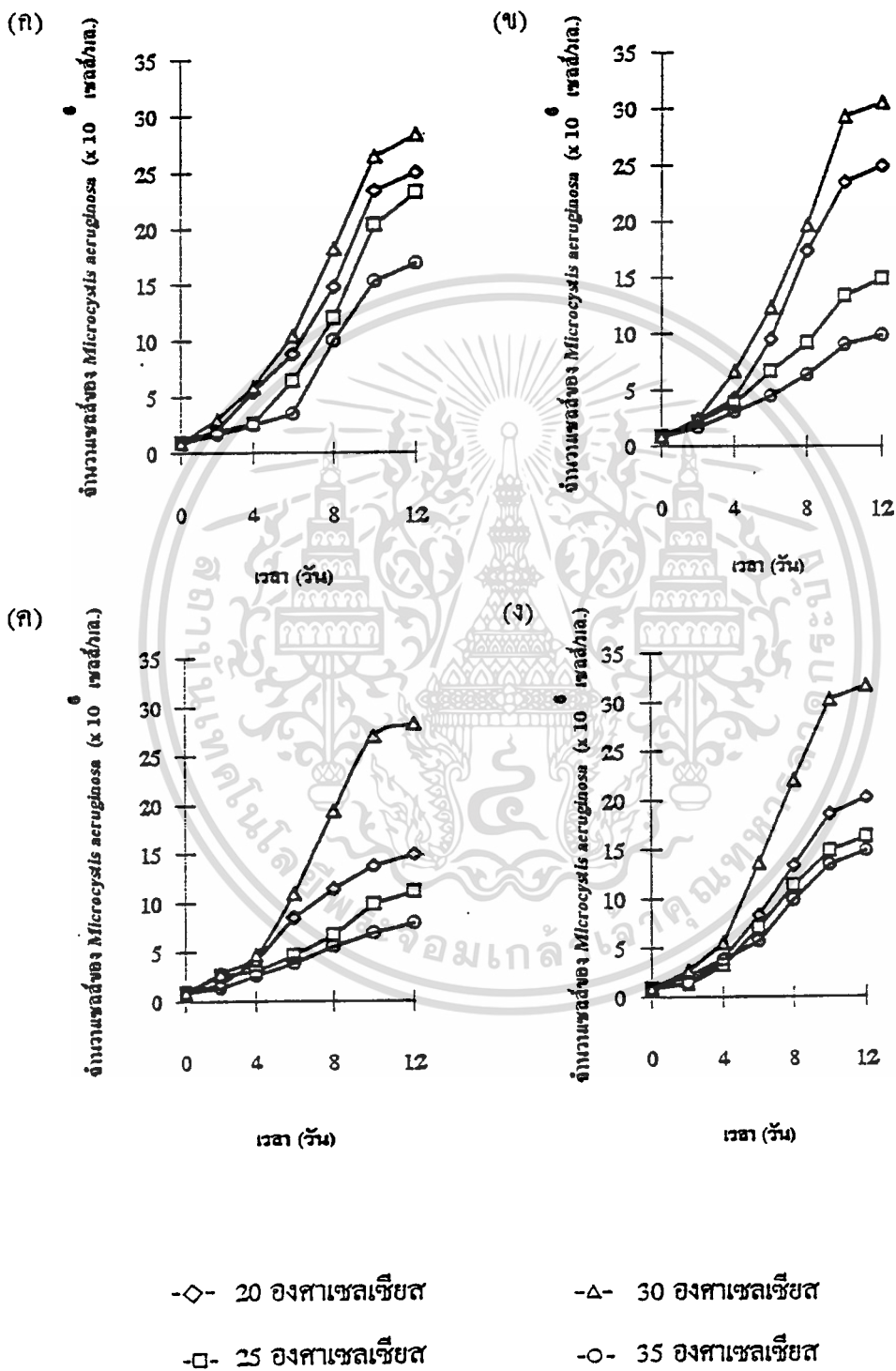
จากผลการทดลองนี้ถึงแม้ว่าไซยาโนแบคทีเรียจะผลิตสารพิษได้น้อยที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 9.2 แต่ก็พบว่าไซยาโนแบคทีเรียมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองของ Van der Westhuizen และ Eloff (1981) ซึ่งพบว่า *M. aeruginosa* จะผลิตสารพิษได้ต่ำสุดที่พีเอชเท่ากับ 9.0 แต่จะมีอัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียสูงที่สุด จากเหตุผลนี้ดูเหมือนว่าการผลิตสารพิษจะไม่แปรผันตามอัตราการแบ่งเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย

4.4.4 อุณหภูมิ

ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* จากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 แห่ง ในอาหาร MA โดยการเลี้ยงสาหร่ายบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.9

จากผลการทดลองพบว่า *M. aeruginosa* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำทั้ง 4 แห่ง จะเจริญเติบโตดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยพบว่าไซยาโนแบคทีเรียจากเขื่อนลำตะคองมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด รองลงมา คือ อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแก่งกระจาน และเขื่อนแม่กวง ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 3.16×10^7 , 3.05×10^7 , 2.83×10^7 และ 2.82×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยในช่วงวันที่ 4 ถึง วันที่ 8 *M. aeruginosa* จากเขื่อนแก่งกระจาน อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำตะคอง มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ย (แสดงดังตารางที่ 4.8) เป็น 0.29, 0.23, 0.26 และ 0.27 ตามลำดับ ตัวอย่างจากเขื่อนแม่กวงและเขื่อนลำตะคองซึ่งทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันในแต่ละตัวอย่าง แต่การเจริญเติบโตต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับตัวอย่างจากเขื่อนแก่งกระจานหลังจากได้ศึกษาการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกันมากนัก และตัวอย่างจากอ่างเก็บน้ำบางพระที่อุณหภูมิ 20 กับ 30 องศาเซลเซียส และ 25 กับ 35 องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า *M. aeruginosa* จากแหล่งน้ำทั้ง 4 แห่ง เจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะเขื่อนแม่กวงและเขื่อนลำตะคองซึ่ง *M. aeruginosa* มีการเจริญเติบโตอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิที่ใช้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่วัดได้จริงจากแหล่งน้ำธรรมชาติในขณะที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้อาจจะมีผลทำให้การการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียลดลง



รูปที่ 4.8 แสดงผลการศึกษาอณูภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* จาก (ก) เขื่อนเอกลีรินเป็นเอกสารที่ส่งงานไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติเห็นว่าเป็นประโยชน์ด้านการค้าแก่กระงาน (ข) อ่างเก็บน้ำบางพระ (ค) เขื่อนแม่กวง และ (ง) เขื่อนลำตะคอง
 “ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ยกเว้นห้ามมิให้ตีแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงเลขที่ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้”

ตารางที่ 4.8 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของ *M. aeruginosa* ในการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโต

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)			
	เขื่อนแก่งกระจาน	อ่างเก็บน้ำบางพระ	เขื่อนแม่กวง	เขื่อนลำนางรอง
20	0.29 ¹ (15.0) ²	0.22 (14.0)	0.25 (15.0)	0.25 (8.9)
25	0.29 (14.5)	0.21 (8.1)	0.20 (5.8)	0.25 (9.0)
30	0.29 (19.3)	0.23 (16.2)	0.26 (17.0)	0.27 (17.1)
35	0.28 (10.1)	0.11 (8.0)	0.19 (9.0)	0.21 (9.2)

หมายเหตุ ¹ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะคิดจากอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด
² น้ำหนักแห้งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อปริมาณอาหาร 100 มิลลิลิตร

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ (แสดงดังตารางที่ 4.9) พบว่าตัวอย่าง ไชยาโนแบคทีเรียจากเขื่อนแก่งกระจานจะผลิตสารพิษได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และพบปริมาณสารพิษ MCYST-LR เท่ากับ 118.15 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พบปริมาณ สารพิษน้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารพิษเท่ากับ 6.67 ไมโครกรัม ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าจะผลิตสารพิษ 2 ชนิด คือ MCYST - RR 3.1 ไมโครกรัม และ MCYST-LR 59.24 ไมโครกรัม ไชยาโนแบคทีเรียจากอ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำนะทอง พบปริมาณสารพิษสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อ่างเก็บน้ำบางพระพบปริมาณสารพิษ 6.85 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.75 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 6.1 ไมโครกรัม เขื่อนแม่กวงพบปริมาณสารพิษ 8.14 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.36 ไมโครกรัม และ MCYST- YR 7.78 ไมโครกรัม และเขื่อนลำนะทองพบปริมาณสารพิษ 7.01 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.82 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 6.19 ไมโครกรัม และไม่พบสาร พิษชนิดใดเลยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่ามีตัวอย่างจาก เขื่อนแก่งกระจานเท่านั้นที่ผลิตสารพิษและผลิตเฉพาะ MCYST-LR 24.14 ไมโครกรัม

จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่าการผลิตสารพิษของ *M. aeruginosa* สามารถเกิดขึ้นได้ที่ อุณหภูมิต่ำ (20 องศาเซลเซียส) แต่ถ้าอุณหภูมิมากกว่า 30 องศาเซลเซียส การผลิตสารพิษจะ ลดลงหรือไม่ผลิตสารพิษเลย Watanabe และ Oishi (1985) ได้ศึกษาความเป็นพิษและอัตราการ เจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* M208 ภายใต้อุณหภูมิที่ต่างกัน พบว่า ไชยาโนแบคทีเรียจะผลิตสารพิษได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิที่ทำให้ อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาของ Van der Westhuizen และ Eloff (1985) และ Codd และ Poon (1988) พบว่า *M. aeruginosa* จะผลิตสารพิษได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าที่อุณหภูมิ 15, 28 และ 38 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารพิษของไชยาโนแบคทีเรียม่าจะต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย (Watanabe, 1995)

4.4.5 ความเข้มแสง

ได้ทำการศึกษาความเข้มแสงที่มีผลต่อการเจริญ เติบโตของ *M. aeruginosa* โดยทำ การเพาะเลี้ยงบนแท่นเขย่าซึ่งควบคุมอุณหภูมิ และควบคุมความเข้มแสงที่ระดับต่างๆดังนี้ 15, 30, 45 และ 60 ไมโครโอสไคน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.10

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตสารพิษ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณสารพิษ (ไม่โคกรักริมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ¹															
	เชื่อมแก่งกระงาน				อ่างเก็บน้ำบางพระ				เขื่อนแม่กวง				เขื่อนลำตะคอง			
	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR
20	118.15	- ²	-	118.15 100% ³	0.24	-	0.24 100%	-	2.21	-	2.21 100%	-	6.79	-	6.79 100%	-
25	24.14	-	-	24.14 100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	62.34	3.1 5.0%	-	59.24 95.0%	6.85	0.75 11.0%	6.1 89.0%	-	8.14	0.36 4.4%	7.78 95.6%	-	7.01	0.82 11.7%	6.19 88.3%	-
35	6.67	-	-	6.67 100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ ปริมาณสารพิษคำนวณจากพื้นที่ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับพื้นที่ของสารพิษมาตรฐาน

² ไม่พบปริมาณสารพิษ

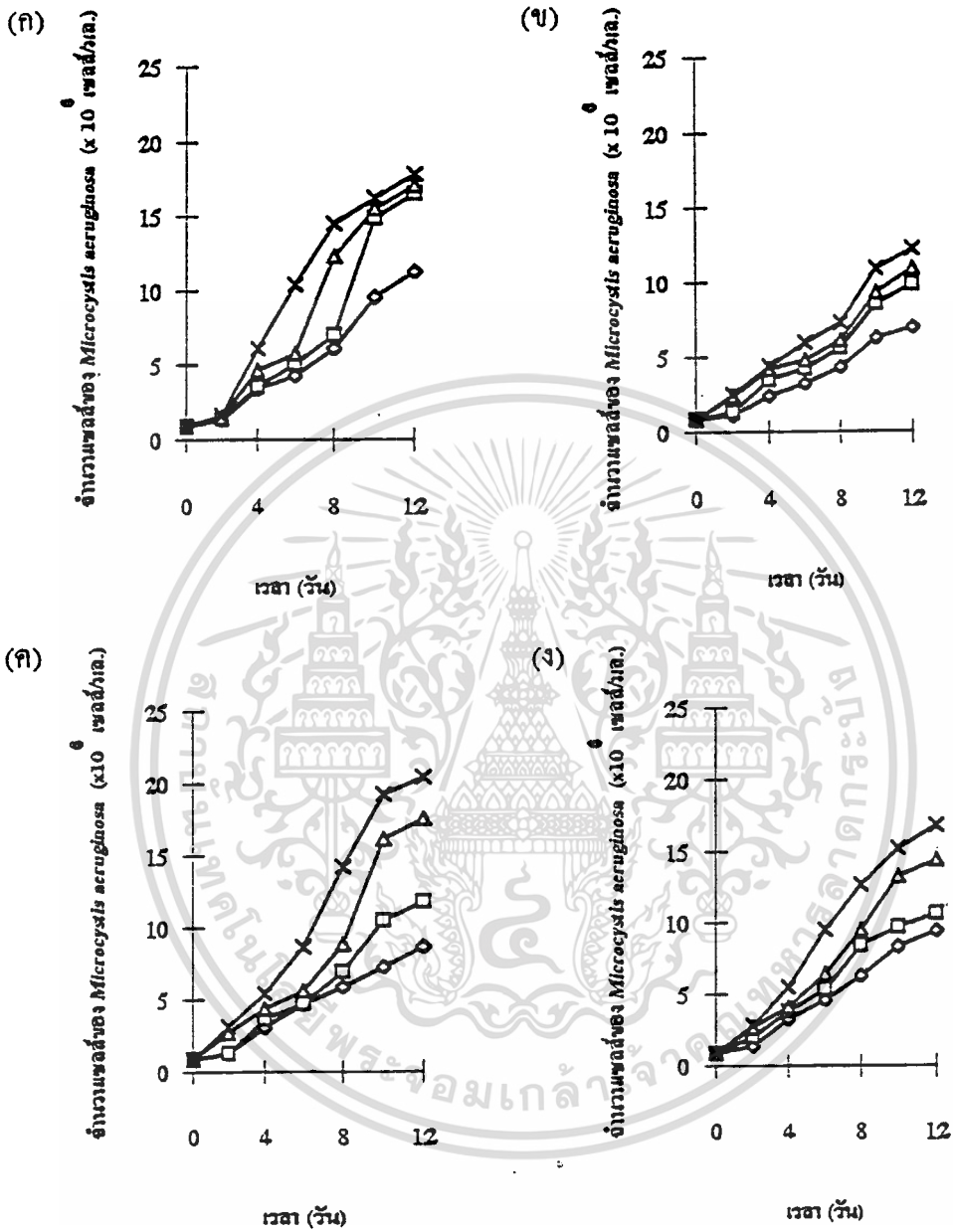
³ ปริมาณสารพิษคิดเป็นร้อยละของปริมาณทั้งหมดที่พบ

หมายเหตุ

จากผลการทดลอง *M. aeruginosa* จากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 แห่ง เจริญเติบโตดีที่สุดที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยตัวอย่างจากเขื่อนแม่กวงมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด รองลงมา คือ เขื่อนแก่งกระจาน เขื่อนลำตะคอง และอ่างเก็บน้ำบางพระ มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.04×10^7 , 1.78×10^7 , 1.68×10^7 และ 1.22×10^7 ตามลำดับ โดยในช่วงวันที่ 4 ถึง วันที่ 8 *M. aeruginosa* จากเขื่อนแก่งกระจาน อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำตะคอง มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ย (แสดงดังตารางที่ 4.10) เป็น 0.40, 0.21, 0.24 และ 0.21 ตามลำดับ และจากผลการทดลองนี้จะเห็นว่าความเข้มแสงมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* จากอ่างเก็บน้ำบางพระและเขื่อนลำตะคองเพียงเล็กน้อย เนื่องจากมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันในแต่ละการทดลอง

ปริมาณแสงมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* แต่เนื่องจากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นปริมาณแสงที่ใช้ในการทดสอบจึงน้อยกว่าปริมาณแสงในธรรมชาติมาก แต่จากผลการทดลองนี้สามารถแสดงให้เห็นว่าไซยาโนแบคทีเรียต้องการปริมาณแสงที่มากเพียงพอในการเจริญเติบโต ถึงแม้ว่าแต่ละตัวอย่างจะมีการเจริญเติบโตแตกต่างกันก็ตาม ทั้งนี้ต้องพิจารณาถึงสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำแต่ละแห่งในช่วงที่ทำการเก็บตัวอย่างด้วย และถึงแม้ว่าไซยาโนแบคทีเรียแต่ละแห่งจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกันก็ตาม แต่ในสภาพแวดล้อมจริงไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะมีการตอบสนองต่อความเข้มแสงต่างกัน เนื่องจากภายในเซลล์จะมีแก๊สแควอโกลเพื่อปรับระดับความลึกของเซลล์ ซึ่งมีผลต่อการได้รับแสงและสังเคราะห์แสงเพื่อผลิตคลอโรฟิลล์เอ

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ (แสดงดังตารางที่ 4.11) พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 แห่ง จะผลิตสารพิษได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยตัวอย่างจากเขื่อนแก่งกระจาน พบปริมาณสารพิษทั้งหมด 60 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 2.31 ไมโครกรัม และ MCYST-LR 57.69 ไมโครกรัม อ่างเก็บน้ำบางพระพบปริมาณสารพิษทั้งหมด 5.93 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.54 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 5.39 ไมโครกรัม เขื่อนแม่กวงพบปริมาณสารพิษทั้งหมด 5.82 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.24 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 5.58 ไมโครกรัม เขื่อนลำตะคองพบปริมาณสารพิษทั้งหมด 4.57 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 0.57 ไมโครกรัม และ MCYST-YR 4.0 ไมโครกรัม เมื่อลดความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียปริมาณสารพิษที่วิเคราะห์ได้ก็จะลดลงด้วย โดยทุกตัวอย่างจะพบปริมาณสารพิษน้อยที่สุดที่ความเข้มแสง 15 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที



\diamond - 15 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ \triangle - 45 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$
 \square - 30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ \times - 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$

รูปที่ 4.9 แสดงผลการศึกษาความเข้มแสงที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* จาก (ก)

เขื่อนแก่งกระจาน (ข) อ่างเก็บน้ำบางพระ (ค) เขื่อนแม่กวง และ (ง) เขื่อนลำตะคอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของ *M. aeruginosa* ในการศึกษาความเข้มแสงที่มีผลต่อการเจริญเติบโต

ความเข้มแสง ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อวัน)			
	เขื่อนแก่งกระจาน	อ่างเก็บน้ำบางพระ	เขื่อนแม่กวง	เขื่อนลำนางรอง
15	0.20 ¹ (10.2) ²	0.17 (12.8)	0.11 (6.8)	0.15 (10.4)
30	0.23 (13.6)	0.18 (13.9)	0.20 (9.6)	0.20 (12.0)
45	0.24 (15.6)	0.18 (15.1)	0.24 (10.4)	0.20 (12.2)
60	0.40 (17.6)	0.21 (17.2)	0.24 (11.4)	0.21 (14.5)

หมายเหตุ ¹ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะคิดจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด
² น้ำหนักแห้งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบความเข้มแสงที่มีผลต่อการผลิตสารพิษ

ความเข้มแสง ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)	ปริมาณสารพิษ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ¹															
	เขื่อนแก่งกระจาน			อ่างเก็บน้ำบางพระ			เขื่อนแม่กวาง			เขื่อนลำตะคอง						
	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR
15	19.6	- ²	-	19.6	0.42	0.42	-	-	0.53	0.53	-	-	0.9	0.9	-	-
			100% ³		100%				100%	100%			100%	100%		
30	29.41	-	-	29.41	0.79	0.79	-	-	0.66	0.66	-	-	-	-	-	-
			100%		100%				100%	100%						
45	41.74	1.05	-	40.69	9.93	9.93	-	-	1.15	1.15	-	-	1.56	0.73	0.83	-
		2.5%			100%				100%	100%			46.8%	53.2%		
60	60.0	2.31	-	57.69	5.93	5.93	-	-	5.82	0.24	5.58	-	4.57	0.57	4.0	-
		3.9%			9.1%	90.9%			4.1%	95.9%			12.5%	87.5%		

¹ ปริมาณสารพิษคำนวณจากพื้นที่ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับพื้นที่ของสารพิษมาตรฐาน

² ไม่พบปริมาณสารพิษ

³ ปริมาณสารพิษคิดเป็นร้อยละของปริมาณทั้งหมดที่พบ

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ความเข้มแสงสูง ไซยาโนแบคทีเรียจะผลิตสารพิษได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสงต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Watanabe และ Oishi (1985) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มแสงความเป็นพิษจะเพิ่มขึ้น ซึ่งคล้ายกับรายงานของ Van der Westhuizen และ Eloff (1985) โดยกล่าวว่าที่ความเข้มแสงต่ำหรือสูงมากเกินไปจะทำให้การผลิตสารพิษลดลง และจากการศึกษาของ Utikilen และ Gjolme (1992) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสง และการผลิตสารพิษโดยทำการเพาะเลี้ยง *M. aeruginosa* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 40 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ปริมาณสารพิษจะเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มแสงให้สูงขึ้นการผลิตสารพิษจะลดลง และยังได้อธิบายว่าการผลิตสารพิษในขั้นแรกจะถูกควบคุมโดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง เช่น ความเข้มแสง เมื่อได้รับความเข้มแสงเพียงพอก็จะทำให้ผลิตสารพิษได้สูง

4.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากตัวอย่างธรรมชาติ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากตัวอย่างเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ทั้ง 4 แห่ง โดยนำไปผ่านการทำให้แห้งในสภาพแข็ง และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซัลลิวคิตโครมาโตกราฟี (แสดงดังตารางที่ 4.12) จากการจัดจำแนกเมื่อเปรียบเทียบกับสารพิษมาตรฐาน พบว่าตัวอย่างจากเขื่อนแก่งกระจานมีปริมาณสารพิษทั้งหมด 560 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วยสารพิษ 2 ชนิด คือ MCYST-RR 340 ไมโครกรัม และ MCYST-LR 220 ไมโครกรัม ตัวอย่างจากอ่างเก็บน้ำบางพระพบสารพิษทั้งหมด 520 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 80 ไมโครกรัม MCYST-YR 20 ไมโครกรัม และ MCYST-LR 420 ไมโครกรัม เช่นเดียวกับเขื่อนแม่กวาง ซึ่งพบปริมาณสารพิษทั้งหมด 770 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 410 ไมโครกรัม MCYST-YR 100 ไมโครกรัม และ MCYST-LR 260 ไมโครกรัม และเขื่อนลำตะคองพบปริมาณสารพิษทั้งหมด 620 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วย MCYST-RR 330 ไมโครกรัม MCYST-YR 40 ไมโครกรัม และ MCYST-LR 250 ไมโครกรัม

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษที่พบในไซยาโนแบคทีเรียจะอยู่ในช่วง 500 ถึง 800 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งต่ำกว่าที่พบในแหล่งน้ำของประเทศออสเตรเลีย (2,300 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) (Falconer *et al.*, 1994) แต่สูงกว่าที่พบในแหล่งน้ำของประเทศญี่ปุ่น (200 ถึง 400 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) (Kaya and Watanabe, 1990) ปริมาณสารพิษที่แตกต่างกันนี้อาจเป็นผลมาจากปริมาณธาตุอาหารในแหล่งน้ำ อุณหภูมิ และความเข้มแสงที่ไซยาโนแบคทีเรียได้รับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากตัวอย่างธรรมชาติ

สถานที่	ปริมาณสารพิษ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ¹			
	ปริมาณ	RR	YR	LR
เขื่อนแก่งกระจาน	560	340	- ²	220
อ่างเก็บน้ำบางพระ	520	80 60.7% ³	20 4.6%	420 80.0%
เขื่อนแม่กวง	770	410 53.0%	100 13.7%	260 33.3%
เขื่อนล้นตะคอง	620	330 53.2%	40 6.5%	250 40.3%

¹ ปริมาณสารพิษคำนวณจากพื้นที่ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับพื้นที่ของสารพิษมาตรฐาน

² ไม่พบปริมาณสารพิษ

³ ปริมาณสารพิษคิดเป็นร้อยละของปริมาณทั้งหมดที่พบ

หมายเหตุ

ไม่พบปริมาณสารพิษ

ปริมาณสารพิษคิดเป็นร้อยละของปริมาณทั้งหมดที่พบ

4.6 การทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง

ในการทดสอบความเป็นพิษของไซยาโนแบคทีเรียที่มีต่อสัตว์ทดลอง โดยในการทดลองได้ใช้หนูทุกตัวเป็นตัวแทนสำหรับการทดสอบนั้นได้ทำการทดสอบเพียง 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างจากอ่างเก็บน้ำบางพระ และเขื่อนแม่กวง เพราะตัวอย่างจากเขื่อนแก่งกระจานและเขื่อนลำตะคองเมื่อนำมาสกัดพบว่ามีค่าความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการทดสอบโดยวิธีการกรอกทางปาก (oral route)

จากผลการทดสอบพบว่าสัตว์ทดลองทุกตัวที่ได้รับการกรอกตัวอย่างทดสอบและไม่ได้รับการกรอกตัวอย่างทดสอบ (ตัวควบคุม) มีอาการปกติและไม่มีอาการตายเกิดขึ้นตลอดระยะเวลาที่สังเกตผลติดต่อกัน 14 วัน มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 67.6 ± 5.9 และ 68.8 ± 10.5 กรัม ซึ่งพบในสัตว์ทดลองที่ได้รับการกรอกตัวอย่างทดสอบจากอ่างเก็บน้ำบางพระและเขื่อนแม่กวงตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.13 ในวันที่ 15 ได้ทำการผ่าตัดเปิดหน้าท้องและแยกตับไปชั่งน้ำหนักพบว่าน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 4.15 ± 0.13 และ 4.41 ± 0.12 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักตัว ซึ่งพบในสัตว์ทดลองที่ได้รับการกรอกตัวอย่างทดสอบจากอ่างเก็บน้ำบางพระและเขื่อนแม่กวงตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.14

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัด พบว่าเซลล์ตับเป็นอวัยวะที่ได้รับผลกระทบจากการได้รับสารพิษมากที่สุด นั่นคือ เกิดการสะสมของเม็ดเลือดขาว และการสะสมของเม็ดเลือดแดง การคั่งของเลือด และการขยายตัวของเส้นเลือดในบริเวณ portal tract ในสัตว์ทดลองทั้งสองกลุ่ม ในกลุ่มของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดจากตัวอย่างของอ่างเก็บน้ำบางพระ พบในเซลล์ตับเกิดการคั่งของเลือดใน central vein และใน sinusoids ในกลุ่มของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดจากตัวอย่างของเขื่อนแม่กวงพบ necrotic foci ขนาดใหญ่และอาการบวมภายในเซลล์ตับ ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในเซลล์ตับแสดงในรูปที่ 4.11 ถึง 4.18

ตารางที่ 4.13 แสดงน้ำหนักและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยของหนูพุกขาวที่ได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

ตัวอย่างทดสอบ	หนูพุกขาว	น้ำหนัก (กรัม)			น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย (กรัม)
		วันที่ 1	วันที่ 8	วันที่ 15	
อ่างเก็บน้ำบางพระ	1	164	204	236	67.6 ± 5.9
	2	168	198	238	
	3	168	206	340	
	4	164	198	232	
	5	176	208	232	
เขื่อนแม่กวง	1	176	206	246	64.4 ± 4.8
	2	174	214	246	
	3	168	212	254	
	4	166	198	222	
	5	160	196	220	
	ตัวควบคุม ¹	169	205	238	

หมายเหตุ ¹ ไม่ได้กรอกตัวอย่างทดสอบ

ตารางที่ 4.14 น้ำหนักตัวของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

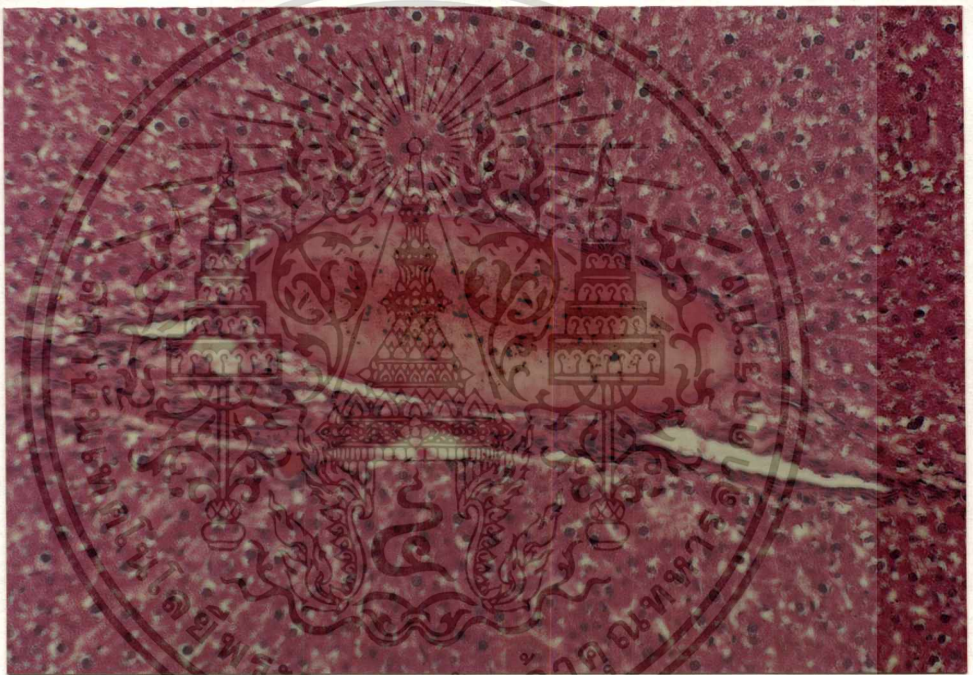
ตัวอย่างทดสอบ	หนูเพศผู้	น้ำหนักตัว (กรัม)	น้ำหนักตัว (กรัม/100กรัม นน.ตัว)	น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม/100กรัม นน.ตัว)
อ่างเก็บน้ำบางพระ	1	9.49	4.02	4.15 ± 0.13
	2	9.89	4.16	
	3	10.10	4.21	
	4	10.10	4.35	
	5	9.31	4.01	
เขื่อนแม่กวง	1	10.56	4.29	4.41 ± 0.12
	2	9.87	4.01	
	3	10.63	4.19	
	4	9.34	4.21	
	5	8.78	3.99	
	ตัวควบคุม ¹	10.6	4.17	

หมายเหตุ ¹ ไม่ได้กรอกตัวอย่างทดสอบ



รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของเซลล์ตับปกติที่ไม่ได้รับสารสกัด (H&E x 20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

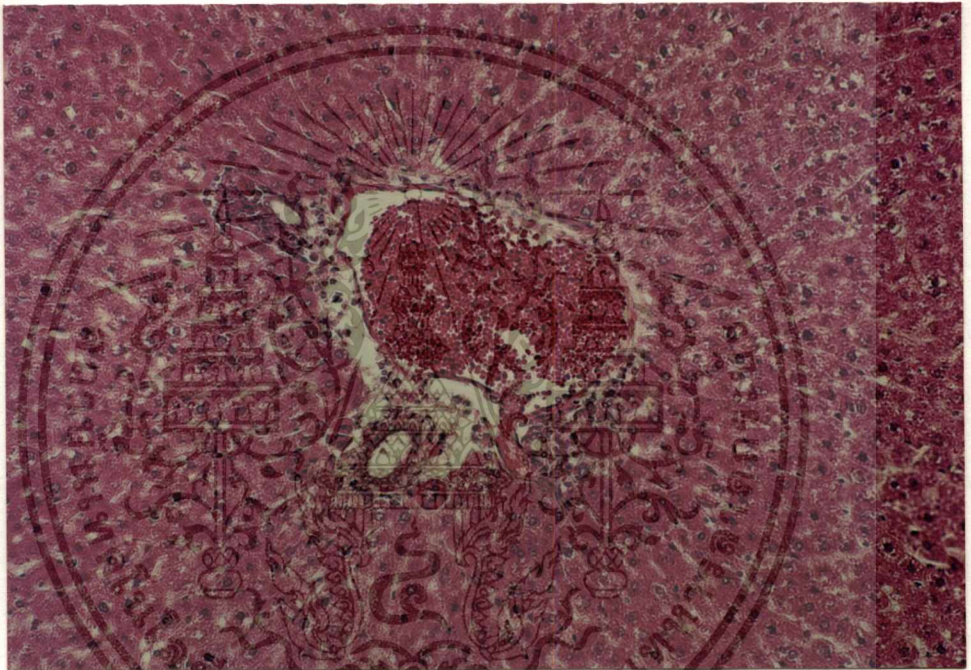


รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะเซลล์ตับของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากอ่างเก็บน้ำบางพระเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว โดยแสดงการขยายตัวของหลอดเลือดซึ่งติดสีอีโอซิน และเกิดการตกตะกอนของเลือดใน portal triad และพบการคั่งของเลือดในเส้นเลือด (H&E x 20)



รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะเซลล์ตับของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากอ่างเก็บน้ำบางพระเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว โดยพบการคั่งของเลือดใน central vein และรอบเส้นเลือดเล็กๆ (H&E x 20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะเซลล์ตับของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากอ่างเก็บน้ำบางพระเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว โดยพบอาการคั่งและขยายตัวของหลอดเลือดใน portal triad เกิดการสะสมของเม็ดเลือดขาวบริเวณรอบๆท่อน้ำดี เซลล์ตับบางแห่งเกิดอาการบวมและถูกทำลาย (H&E x 20)



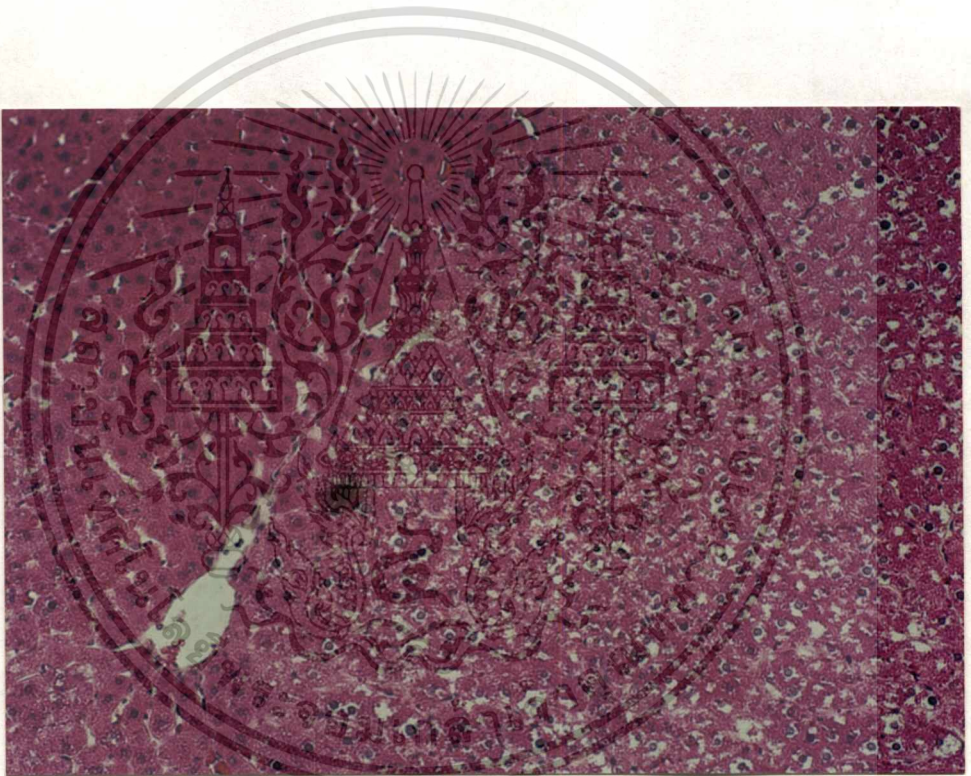
รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะเซลล์ตับของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากเขื่อนแม่กวงเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว โดยจะแสดงการตายของเนื้อเยื่อเซลล์ตับและเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บอย่างรุนแรง (H&E x 20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

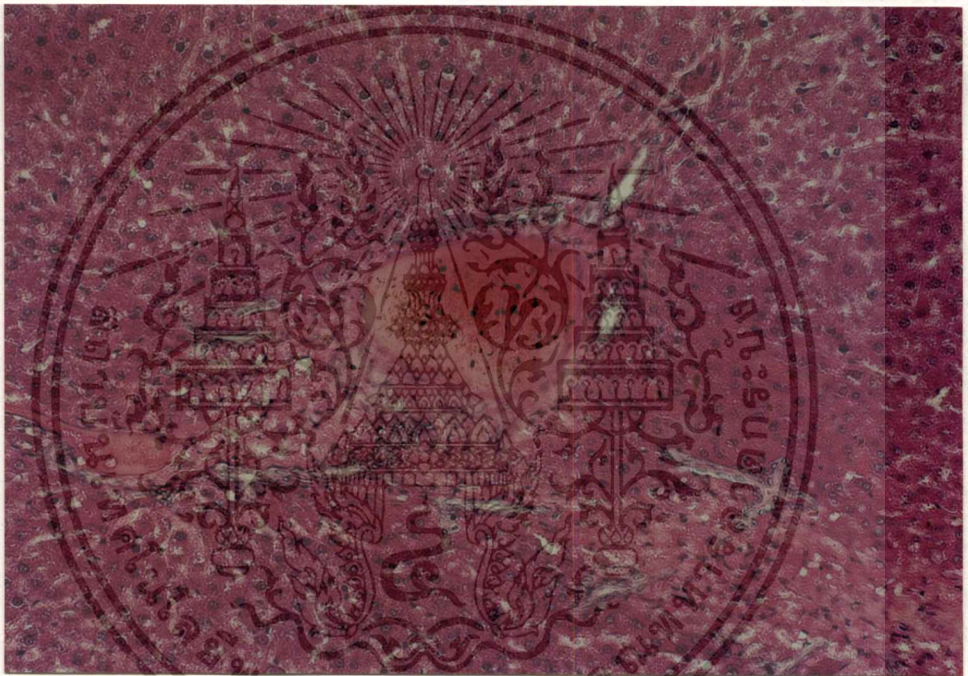


รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะเซลล์ตับของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากเขื่อนแม่กวงเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว ซึ่งจะแสดงการสะสมของเม็ดเลือดขาวในบริเวณเนื้อเยื่อที่ตายรอบท่อน้ำดี (H&E x 20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะเซลล์ตับของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากเขื่อนแม่กวงเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว โดยจะแสดงลักษณะของเซลล์ตับที่ถูกทำลายในบริเวณส่วนกลางของพู (ทางขวา) เปรียบเทียบกับบริเวณเซลล์ตับปกติ (มุมซ้ายด้านบน) (H&E x 20)



- รูปที่ 4.17** แสดงลักษณะเซลล์ตับของหนูเพศผู้หลังจากได้รับสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่เก็บจากเขื่อนแม่กวงเป็นเวลา 14 วัน ในปริมาณ 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว โดยจะแสดงลักษณะการรวมตัวของสารสีที่เกิดจากการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงบริเวณ portal tract และพบการขยายตัวของท่อน้ำดี (H&E x 20)

4.7 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำในบริเวณที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย ทั้ง 4 แห่ง นำไปกรองเพื่อวิเคราะห์ จำนวนแบคทีเรีย ความเป็นกรด-ด่าง ดีไอ (DO) บีโอดี (BOD) ไนเตรท (NO_3^-) และฟอสเฟต (PO_4^{3-}) ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.15

จากผลการวิเคราะห์พบจำนวนแบคทีเรียอยู่ในช่วง 1.30×10^3 ถึง 7.80×10^5 CFU ต่อ มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6.9 ถึง 8.1 ค่าดีไออยู่ในช่วง 5.8 ถึง 9.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีโอดีอยู่ในช่วง 1.6 ถึง 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณไนเตรทอยู่ในช่วง 0.04 ถึง 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณฟอสเฟตอยู่ในช่วง 0.05 ถึง 154.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการวิเคราะห์นี้ไม่สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของน้ำกับการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียได้ชัดเจนนัก เพราะบางค่า เช่น บีโอดีและปริมาณฟอสเฟตอยู่ในช่วงที่กว้าง แต่อย่างไรก็ตามค่าความเป็นกรด-ด่างจากผลการวิเคราะห์นี้จะพบได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในแหล่งน้ำธรรมชาติจะอยู่ในช่วง 5 ถึง 9 ซึ่งเป็นช่วงที่พืชน้ำหรือแพลงก์ตอนพืชเจริญเติบโตได้ดี ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่ำกว่า 4.5 พืชน้ำหรือแพลงก์ตอนพืชจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (ไมตรี และคณะ 2529) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟอสเฟตกับจำนวนเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย โดยพบว่าในตัวอย่างน้ำที่มีปริมาณฟอสเฟตมากจะพบจำนวนเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมาก

ตารางที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

สถานที่	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มล.)	จำนวนไนโตรเจนที่รีด (เซลล์/มล.) ¹	pH	DO (มก./ล.)	BOD (มก./ล.)	NO ₃ -N (มก./ล.)	PO ₄ -P (มก./ล.)
เขื่อนแก่งกระจาน	7.90x10 ⁴	4.21x10 ⁶	6.9	6.5	3.2	0.1	40.0
อ่างเก็บน้ำบางพระ	4.17x10 ⁵	4.17x10 ⁵	7.13	5.8	13.0	0.11	0.09
เขื่อนแม่งวาง	7.80x10 ⁵	3.37x10 ⁶	7.5	8.7	1.6	0.04	154.2
เขื่อนลำตะคอง	1.30x10 ³	6.6x10 ⁵	8.1	9.3	600	0.08	0.05

หมายเหตุ¹ จำนวนไนโตรเจนที่รีดทั้งหมด



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาชนิดและปริมาณเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 แห่ง คือ เขื่อนแก่งกระจาน อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำนครหลวง และจากการจัดจำแนกชนิดของไซยาโนแบคทีเรียตามระบบของ Desikachary (1959) พบไซยาโนแบคทีเรียทั้งสิ้น 2 สายพันธุ์ คือ *M. aeruginosa* และ *Oscillatoria* sp. โดยพบว่า *M. aeruginosa* เป็นสายพันธุ์หลักที่พบเป็นจำนวนมากที่สุดในแหล่งน้ำทั้ง 4 แห่ง และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. aeruginosa* พบว่ากลุ่มเซลล์มีหลายขนาดและมีรูปร่างหลายแบบ กลุ่มเซลล์ถูกห่อหุ้มด้วยซีท เซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลม มีขนาด 3.7-5 ไมครอน ภายในมีแก๊สแวกคิวโอลสำหรับช่วยในการลอยตัวบนผิวน้ำ

ในการศึกษาแหล่งธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ในอาหาร MA ดัดแปลงที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ และ ยูเรีย และแหล่งฟอสฟอรัส คือ K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 โดยเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร MA ปกติที่มีไนเตรท (NO_3^-) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี β -glycerophosphate เป็นแหล่งฟอสฟอรัส ในการศึกษาแหล่งไนโตรเจนพบว่า *M. aeruginosa* ทั้ง 4 แห่ง จะเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร MA สูตรปกติที่มีไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน และในการศึกษาแหล่งฟอสฟอรัสพบว่า *M. aeruginosa* จากเขื่อนแก่งกระจาน เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำนครหลวง เจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร MA สูตรปกติซึ่งมี β -glycerophosphate เป็นแหล่งฟอสฟอรัส สำหรับอ่างเก็บน้ำบางพระ *M. aeruginosa* เจริญเติบโตที่สุดในอาหาร MA ดัดแปลงที่มี KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสฟอรัส

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตสารพิษของ *M. aeruginosa* คือ ความต้องการธาตุอาหาร (ไนเตรทและฟอสเฟต) ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และความเข้มแสง พบว่า *M. aeruginosa* จะเจริญเติบโตดีที่สุด และส่วนใหญ่จะผลิตสารพิษได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหาร MA สูตรปกติซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.6 ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ในการผลิตสารพิษพบว่า *M. aeruginosa* จากแหล่งน้ำทั้ง 4 แห่ง จะผลิตสารพิษในกลุ่มของไมโครซิสติน 3 ชนิด คือ microcystin-RR microcystin-YR และ microcystin-LR โดยพบปริมาณสารพิษรวมมากที่สุดในตัวอย่างจากเขื่อนแก่งกระจาน แต่การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากตัวอย่างธรรมชาติพบปริมาณสารพิษรวมมากที่สุดในตัวอย่างจากเขื่อนแม่กวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติในบริเวณที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย ยังไม่สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของน้ำกับการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายได้ชัดเจนนัก เนื่องจากค่าวิเคราะห์บางค่า เช่น บีโอดี และฟอสเฟตอยู่ในช่วงที่กว้าง แต่ก็พบว่าฟอสเฟตมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษในแหล่งน้ำ และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่วิเคราะห์ได้ก็อยู่ในช่วงที่พีชน้ำหรือแพลงก์ตอนพืชเจริญเติบโตได้

ในการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองโดยใช้หนูฟูกขาวเป็นตัวแทนสำหรับการทดสอบ หลังจากกรอกตัวอย่างทดสอบที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียจากอ่างเก็บน้ำบางพระและเขื่อนแม่กวง ในปริมาณ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และสังเกตผลติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน พบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดและหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารสกัด (ตัวควบคุม) มีอาการปกติและไม่มี การตายเกิดขึ้น หลังจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าเซลล์ตับเป็นอวัยวะที่ได้รับผลกระทบจากการได้รับสารพิษมากที่สุด โดยทำให้เนื้อเยื่อบางส่วนของเซลล์ตับตาย เกิดการสะสมของเม็ดเลือดขาว การคั่งของเลือดใน central vein และเส้นเลือดเล็กๆ และเกิดการขยายตัวของเส้นเลือดในบริเวณ portal tract

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสำรวจแหล่งน้ำธรรมชาติที่สำคัญเพียง 4 แห่ง คือ เขื่อนแก่งกระจาน อ่างเก็บน้ำบางพระ เขื่อนแม่กวง และเขื่อนลำนาดะคอง ซึ่งยังมีแหล่งน้ำธรรมชาติที่สำคัญอีกหลายแห่งที่คาดว่าจะเกิดปัญหาเช่นเดียวกัน จึงควรมีการสำรวจเพิ่มขึ้นเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการพบแหล่งน้ำที่มีสาหร่ายที่ผลิตสารพิษในประเทศไทย

5.2.2 ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 แห่ง ควรทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตรวจวิเคราะห์ทุกเดือน ในช่วงที่เกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย เพราะการเก็บตัวอย่างน้ำเพียงครั้งเดียวจะไม่สามารถสรุปสาเหตุของการเกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายในแหล่งน้ำได้ชัดเจนนัก

5.2.3 ในการเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายควรปรับปรุงอุปกรณ์ และวิธีการเก็บตัวอย่างให้มีความสะดวก รวดเร็ว และเหมาะสมต่อสภาพพื้นที่ เช่น การเก็บตัวอย่างในบริเวณพื้นที่ลาดชันซึ่งไม่สามารถลงไปเก็บใกล้ๆ ได้ จึงควรมีเชือกหรือไม้ยาวสำหรับเก็บตัวอย่าง

5.2.4 การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น จึงควรมีการศึกษาต่อในด้านการแยกสารพิษให้อยู่ในสภาพที่บริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อนำไปศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้างโมเลกุลของสารพิษ

5.2.5 การทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองควรใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูง เพราะการใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้พบอาการที่เกิดขึ้นกับเซลล์ตับได้มากและชัดเจนกว่าการใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นต่ำ นั่นคือจะต้องเพิ่มปริมาณเซลล์สาหร่ายในการสกัด ตลอดจนพัฒนาวิธีการสกัดและเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อที่จะสกัดสารพิษออกมาให้ได้มากที่สุด



บรรณานุกรม

- กาญจนพานิช ลีวมนมนต์. 2527. สาหร่าย. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ควงพร คันทโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ไอ. เอส.
- ไมตรี ดวงสวัสดิ์ และ จารุวรรณ สมศิริ. 2529. คุณสมบัติของน้ำและวิธีวิเคราะห์สำหรับการวิจัยทางประมง. กรุงเทพฯ : ฝ่ายวิจัยสิ่งแวดล้อมสัตว์น้ำ สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติกรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- อภารรัตน์ มหาจันทร์. 2539 “สารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำ.” วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 11 ฉบับที่ 1 (มกราคม-เมษายน 2539) : 39-53.
- APHA, AWWA and WPCF. 1975. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 14th ed., APHA, Inc., New York, 1200 pp.
- Ballantine, D. and Abbott, B.C. 1957. “Toxic Marine Flagellates Their Occurrence and Physiological Effects on Animals.” Journal of Microbiology. 17 : 274-281.
- Baurke, A.T.C., Hawes, R.B., Neilson, A. and Stallman, N.D. 1983. “An Outbreak of Hepatoenteritis (The Palm Island Mystrey Disease) Possible Caused by Algal Intoxication.” Toxicon. Suppl. 3 : 45-48.
- Bethge, H. 1935. “Chroococcus Planctonicus, Eine Neue Planktonische Cyanophyceae.” Ber. Dtsch. Bot. Ges. 53 : 265-269.
- Bishop, C.T., Anet, E.F.L.J. and Gorham, P.R. 1959. “Isolation and Identification of the Fast Death Factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1.” Canadian Journal Biochemistry Physiology. 37 : 453-471.
- Bornet, E. and Thuret, G. 1880. Notes Algologiques II. Paris.
- Brand, F. 1906. “Ueber Die Sogenannten Gasvakuolen und Die Differenten Spitzenzellen der Cyanophyceen Sowie uber Schnellfarbung.” Hedwigia 45 : 1-15.
- Bury, N.R., Eddy, E.B. and Codd, G.A. 1995. “ The Effects of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin-LR, and Ammonia on Growth Rate and Ionic Regulation of Brown Trout.” Journal of Fish Biology. 46 : 1042-1054.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Carmichael, W.W., Mahmood, N.A. and Hyde, E.G. 1990. Natural Toxins from Cyanobacteria (Blue-Green Algae) in : Hall, S. and Strichartz, Eds., Marine Toxins. American Chemical Society, Washington D.C., 87-106 p.
- Carmichael, W.W. 1992. "Cyanobacteria Secondary Metabolites - the Cyanotoxin." Journal of Applied Bacteriology. 72 : 445-459.
- Carmichael, W.W. 1994. The Toxins of Cyanobacteria. Scientific American January, 64-72 p.
- Christoffersen, K. 1996. "The Effect of Microcystin on Growth of Single Species and on Mixed Natural Population of Heterotrophic Nanoflagellates." Journal of Natural Toxin. (in press).
- Codd, G.A. and Poon, G.K. 1988. Cyanobacterial Toxin. Vol. 28 Rogers, L.J. and Gallon, J.R., Eds. Proceedings of the Phytochemistry Society of Europe, Oxford University Press. Oxford. 283-296 pp.
- Coleman, J.R. and Colman, B. 1981. The Effect of pH on Photosynthesis and Inorganic Carbon Accumulation in a Blue-green Alga in Photosynthesis IV Regulation of Carbon Metabolism . Akoyunoglou, G. Ed., Balaban International Science Services. Philadelphia. Pa.
- Cook, W.O., Beasley, V.R., Lovell, R.A., Dahlem, A.M., Hooser, S.B., Mahmood, N.S. and Carmichael, W.W. 1989. "Consistent Inhibition of Peripheral Cholinesterase by Neurotoxins from the Freshwater Cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* : Studies of Ducks Swine Mice and a Steer." Journal of Environmental Toxicology and Chemistry. 8 : 915-922.
- Crow, W.B. 1922. "A Critical Study of Certain Unicellular Cyanophyceae from the Point of View of their Evolution." New Phytol. 21 : 81-102.
- Davidson, F.F. 1959. "Effect of Extracts of Blue-Green Algae on Pigment Production by *Serratia-marsescens*." Journal of General Microbiology. 20 : 605-611.
- Demott, W.R. and Moxter, F. 1991. "Foraging on Cyanobacteria by Copepods : Responses to Chemical Defenses and Resource Abundance." Journal of Ecology. 72 : 1820-1844.

- Demott, W.R., Zhang, Q.X. and Carmichael, W.W. 1991. "Effect of Toxic Cyanobacteria and Purified Toxins on the Survival and Feeding of a Copepod and Three Species of Daphnia." Journal of Limnology and Oceanography. 36 : 1346-1357.
- Desikachary, T.V. 1959. Cyanophyta. Botany Department University of Madras., Published by Indian Council of Agricultural Research New Delhi, 686 pp.
- Eriksson, J.E., Meriluoto, J.A.O. and Lindholm, T. 1986. Can Cyanobacterial Peptide Toxins Accumulate in Aquatic Food Chains? Proceedings from the IV International Symposium of Microbial Ecology, Ljubljana, Jugoslavia, 655-658 pp.
- Eriksson, J.E., Meriluoto, J.A.O. and Lindholm, T. 1989. "Accumulation of a Peptide Toxin from the Cyanobacterium *Oacillatoria agardhii* in the Freshwater Mussel *Anodonta cygnea*." Journal of Hydrobiologia. 183 : 211-216.
- Falconer, Ian R. 1996. "Potential Impact on Human Health of Toxic Cyanobacteria." Journal of Phycologia. 35 : 6-11.
- Feldmann, J. 1932. "Sur la Biologie des *Trichodesmium* Ehrbg." Rev. Algol. Paris 6 : 357-358.
- Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, R. and Walsby, A.E. 1973. Pathogens of Blue-Green Algae in the Blue-Green Algae. London-New York : Academic Press.
- Fulton, R.S. and Pearl, H.W. 1987. "Toxic and Inhibitory Effects of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on Herbivorous Zooplankton." Journal of Plankton Research. 9 : 837-855.
- Gago-Martinez, A., Rodriguez-Vazquez, Jose A. , Pierre, T. and Quilliam, Michael A. 1996. "Simultaneous Occurrence of Diarrhetic and Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Spanish Mussels in 1993." Journal Natural Toxins. 4 : 72-79.
- Geitler, L. and Ruttner, F. 1936. "Die Cyanophyceen der Deutschen Limnologischen Sunda-Expedition ihre Morphologie, Systematik, und Okologie." Journal of Archive fur Hydrobiologie. 6 : 308-483.
- Gentile, J.H. and Maloney, T.E. 1969. "Toxicity and Environmental Requirements of a Strain of *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Raifs." Canadian Journal of Microbiology. 15 : 165-173.

- Gilbert, J.J. 1994. "Susceptibility of Planktonic Rotifers to a Toxic Strain of *Anabaena flos-aquae*." Journal of Limnology and Oceanography. 39 : 1286-1297.
- Goldman, J.C. and Jenkins, D. 1974. "The Kinetics of Inorganic Carbon Limited Algal Growth" Journal of Water Pollution Contaminated Food. 46 : 553.
- Gorham, P.R. 1964. Toxic Algae, in *Algae and Man*. Jackson, D.F., E.d. Plenum Press. New York. 307-336 pp.
- Harada, K.-I., Matsuura, K., Suzuki, M., Oka, H., Watanabe, M.F., Oishi, S., Dahlem, A.M., Beasley, V.R. and Carmichael, W.W. 1988. "Chemical Analysis of Toxic Peptides Produced by Cyanobacteria." Journal of Chromatogr. 448 : 275-289.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T.C., Jackson, A.R.B. and Falconer I.R. 1985. "Severe Hepatotoxicity Caused by the Tropical Cyanobacterium (Blue-Green Algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Isolated from a Domestic Water Supply Reservoir." Journal of Applied Environmental Microbiology. 50 : 1292-1295.
- Hermansky, S.J., Casey, P.J. and Stohs, S.J. 1990. "Cyclosporin A, a Chemoprotectant Against Microcystin-LR Toxicity." Journal of Toxicol. Lett. 54 : 279-285.
- Hermansky, S.J., Stohs, S.J., Eldeen, Z.M., Roche, V.F. and Mereish, K.A. 1991. "Evaluation of Potential Chemoprotectants Against Microcystin-LR Hepatotoxicity in Mice." Journal of Applied Toxicology. 11 : 65-73.
- Hu, N.T., Thiel, T.H., Gidding, Jr. and Volk, C.P. 1981. "New *Anabaena* and *Nostoc* Cyanophages from Sewage Setting Ponds." Journal of Virology. 114 : 236-246.
- Huber - Pestalozzi, G. 1938. "Das Phytoplankton des Susswassers, in Thienemann." Binnengewasser. 16 : 324 pp.
- Jones, G.J. and Orr, P.T. 1994. "Release and Degradation of Microcystin Following Algicide Treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a Recreational Lake, as Determined by HPLC and Protein Phosphatase Inhibition Assay." Journal Water Research. 28 : 871-876.
- Kaarina, S. 1996. "Cyanobacterial Toxins and Toxin Production." Journal Phycologia. 35 : 12-24.

- Keating, K.I. 1978. "Blue-Green Algal Inhibition of Diatom Growth : Transition from Mesotrophic to Eutrophic Community Structure." Journal of Science. 199 : 971-973.
- Kirpenko, N.I. 1986. "Phytopathic Properties of Blue-Green Algae Toxin." Journal of Hydrobiology. 22 : 44-47.
- Kirsten , C. 1996. "Ecological Implications of Cyanobacterial Toxin in Aquatic Food Webs." Journal Phycologia. 35 : 42-50.
- Kiviranta, J., Sivonen, K., Luukkainen, R. and Niemela, S.I. 1991. "Production and Biodegradation of Cyanobacterial Toxins-a Laboratory Study." Journal of Archiv fur Hydrobiologie. 121 : 281-294.
- Kiviranta, J. 1992. "Larvicidal Effects of Toxic Cyanobacteria on Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*." Acta Pharmaceutica Fennica. 101 : 83-87.
- Kunimitsu , K. and Watanabe , Makoto M. 1994. " Chemistry and Toxicology of the Cyclic Heptapeptide Toxins , the Microcystins , from Cyanobacteria" . A Review Microbiology Cultivation Collection. 10 : 5-33.
- Lam, A.K.-Y., Fedorak, P.M. and Prepas, E.E. 1995. "Biotransformation on the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin-LR, as Determined by HPLC and Protein Phosphatase Bioassay." Journal Environmental Science and Technology. 28 : 242-246.
- Lauren-Maatta, C., Hietala, J., Reinikainen, M. and Walls, M. 1995. "Do *Microcystis aeruginosa* Toxins Accumulate in Food Web : a Laboratory Study." Journal of Hydrobiologia. 304: 23-27.
- Lawton, L.A. and Codd, G.A. 1991. "Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins and their Significance in UK and European Waters." Journal of Inst. Water Environ. Manage. 54 : 460-465.
- Lehtimaki , J. , Sivonen , K. , Luukkainen , R. and Niemela , S.I. 1994. "The Effects of Incubation Time , Temperature , Light , Salinity and Phosphorus on Growth and Hepatotoxin Production by *Nodularia* Strains." Journal Archiv Hydrobiologie. 130 : 269-283.
- Lippy , E.C. and Erb J. 1976. "Gastrointestinal Illness at Sewickley." Journal of the American Water Works Association. 68 : 606-610.

- Lukac , M. and Aegerter , R. 1993. "Influence of Trace Metals on Growth and Toxin Production of *Microcystis aeruginosa*." Journal Toxicon. 31 : 293-305.
- Mahmood, N.A., Carmichael, W.W. and Pfahier, D. 1988. "Anticholinesterase Poisoning in Dogs from a Cyanobacterial (Blue-Green Algae) Bloom Dominated by *Anabaena flos-aquae*." American Journal of Vet. Res. 49 : 500-503.
- Mariyo, F.W. and Shinshi, O. 1985. "Effects of Environmental Factors on Toxicity of a Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under Culture Conditions." Journal Applied and Environmental Microbiology. 49 : 1342-1344.
- Moor , L. and Thornton , K. 1988. Lake and Reservoir Restriction Guidance Manual , Environmental Protection. Washington , D.C.
- Neilson, A.H. and Larson, T. 1980. "The Utilization of Organic Nitrogen for Growth of Algae : Physiological Aspects." Journal of Physiology Plant. 48 : 542.
- Nizan, S., Dimentman, C. and Shilo, M. 1986. "Acute Toxic Effects of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna* ." Journal of Limnology and Oceanography. 31 : 497-502.
- OECD. 1987. Guideline for Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity, Volume 2, 1-7p.
- Patterson , G.M.L. , Baldwin , C.L. , Bolis , C.M. , Caplin , F.R. , Karuso , H. , Larsen , L.K. , Levine , I.A. , More , R.E. , Nelson , C.S. , Tschappat , K.D. and Tuang , G.D. 1991. "Antieoplastic Activity of Cultured Blue-Green Algae (Cyanophyta)." Journal of Phycology. 27 : 530-536.
- Pearson , M.J. 1990. Toxic Blue-Green Algae. Report of the National Rivers Authority , Water Quality Series , No 2 . United Kingdom , Rushden , northout , Stanley L. Hunt .
- Rapata , J. , Sivonen , K. , Luukkainen , R. and Niemela , S.I. 1993. "Anatoxin-a Concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* at Different Environmental Conditions and Comparison of Growth by Toxic and Non-Toxic *Anabaena* Strains" Journal of Applied Phycology. 5 : 581-591.
- Rapata , J. , Sivonen , K. and Niemela , S.I. 1995. Comparison of Toxic Production by Hepatotoxic and Neurotoxic *Anabaena* spp. 1st International Congress on Toxic Cyanobacteria (Blue-Green Algae) , 20-24 August 1995. p. 54.

- Repavich, W.M., Sonzogni, W.C., Standridge, J.H., Wedepohl, R.E. and Meisner, L.F. 1990. "Cyanobacteria (Blue-Green Algae) in Wisconsin Water : Acute and Chronic Toxicity." Journal of Water Research. 24 : 225-231.
- Reynolds, C.S. 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*, Cambridge University Press, 384 pp.
- Scott, W.E. 1991. "Occurrence and Significance of Toxic Cyanobacteria in Southern Africa." Journal of Water Science Technology. 23 : 175-180.
- Sivonen, K. 1990. "Effect of Light , Temperature , Nitrate , Orthophosphate and Bacteria on Growth of and Hepatotoxin Production by *Oscillatoria agardhii* Strains." Journal of Applied and Environmental Microbiology. 56 : 2658-2666.
- Sivonen, K., Carmichael, W.W., Namikoshi, M., Rinehart, K.L., Dahlem, A.M. and Niemela, S.I. 1990. "Isolation and Characterization of Hepatotoxic Microcystin Homologs from the Filamentous Freshwater Cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain 152" Journal of Applied Environmental Microbiology. 56 : 2650.
- Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Anderson, R.A., Matsunaga, S., Moore, R.E. and Skulberg, R. 1992. "Investigations of a Neurotoxic Oscillatorialean Strain (Cyanophyceae) and Its Toxin, Isolation and Characterization of Homoanatoxin" Journal of Environmental Toxicology and Chemistry. 11 : 321-329.
- Smith, G.M. 1950. *Freshwater Algae of the United States of America.* McGraw-Hill, New York, 2nd Ed. . 719 pp.
- Smith, R.A. and Lewis, D. 1987. "A Rapid Analysis of Anatoxin-a, the Unstable Toxic Alkaloid from *Anabaena flos-aque*, the Stable Non-Toxic Alkaloids Left After Bioreduction and a Related Amine Which may be Nature's Precursor to Anatoxin-a." Journal of Vet. Them. Toxicol. 29 : 153-154.
- Tencella, F.G., Dietrich, D.R. and Schlatter, C. 1994. "Toxicity of *Microcystis aeruginosa* Peptide Toxin to Yearling Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Journal of Aquatic Toxicology. 30 : 215-224.
- Theiss , W.C. , Carmichael , W.W. , Wyman , J. and Bruner , R. 1988. "Blood Pressure and Hepatocellular Effects of the Cyclic Heptapeptide Toxin Produced by *Microcystis aeruginosa* Strain PCC-7820." Journal Toxicol. 26 : 603-613.

- Thomas, W.H. 1968. Nutrient Requirement and Utilization Algae in Metabolism, Biological Handbooks. Altman, P.T. and Dittmer. Eds. Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda. Md.
- Turell, M.J. and Middlebrook, J.L. 1988. "Mosquito Inoculation, an Alternative Bioassay for Toxins." Journal of Toxicon. 26 : 1089-1094.
- Utkilen, H. and Gjolme, N. 1995. "Iron-Stimulated Toxin Production in *Microcystis aeruginosa*." Journal of Applied and Environmental Microbiology. 61 : 797-800.
- Van der Westhuizen, A.J. and Eloff, J.N. 1981. Toxicological Studies on *Microcystis*, in the Water Environmental, Algal Toxins and Health. Carmichael, W.W. Ed., Plenum Press, New York. 343 pp.
- Van der Westhuizen, A.J. and Eloff, J.N. 1983. "Effect of Culture Age and pH of Culture Medium on the Growth and Toxicity of the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa*." Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie. 110 : 157-163.
- Van der Westhuizen, A.J. and Eloff, J.N. 1985. "Effect of Temperature and Light on the Toxicity and Growth of the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa* (UV-600)." Journal of Planta. 163.
- van Goor, A.C.J. 1918. "Zur Kenntnis der Oscillatoriaceen." Rec. Trav. Bot. Neerland. 15 : 255-262.
- van Goor, A.C.J. 1925. "Contribution a la Physiologie des Cyanophycees sur les Pseudovacuoles Rouges et leur Signification." Rev. Algol. Paris 2 : 19-38.
- van Vierssen, W. and Prins, T.C. 1985. "On the Relationship Between Growth of Algae and Aquatic Macrophytes in Brackish Water." Journal of Aquatic Botany. 21 : 165-179.
- Watanabe, M.F. and Oishi, S. 1985. "Effects of Environmental Factors on Toxicity of a Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under Culture Conditions." Journal of Applied and Environmental Microbiology. 49 : 1342-1344.
- Wheeler, P.A. and North, B.B. 1974. "Amino Acid Uptake by Marine Physiology." Journal of Limmol. Oceanogr. 19 : 249.
- Yu, S.-Z. 1989. Drinking Water and Primary Liver Cancer, in Primary Liver Cancer, Tang, Z.Y., Wu, M.C. and Xia, S.S. Eds., China Academic Publishers, Beijing, Springer-Verlag, Berlin, 30 pp.

Yu, S.-Z. 1994. "Primary Prevention of Hepatocellular Carcinoma." Journal of Natural Toxins, in press.

Zevenboom, W. and Mur, L.R. 1984. "Growth and Photosynthetic Response of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in Relation to Photoperiodicity and Irradiance." Journal of Arch. Microbiology. 139 : 232.

Zohary, T. and Roberts R.D. 1989. "Diurnal Mixed Layers and the Long-Term Dominance of *Microcystis aeruginosa*." Journal of Plankton Res. 11 : 25.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร MA Medium สำหรับเลี้ยง *M. aeruginosa*

Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.05	กรัม
KNO ₃	0.1	กรัม
NaNO ₃	0.05	กรัม
Na ₂ SO ₄	0.04	กรัม
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.05	กรัม
β-glycerophosphate	0.1	กรัม
Na ₂ EDTA	0.005	กรัม
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0005	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.005	กรัม
ZnCl ₂	0.0005	กรัม
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.005	กรัม
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0008	กรัม
H ₃ BO ₃	0.02	กรัม
Bicine	0.5	กรัม
Deionized water	1000	มิลลิลิตร

pH 8.6

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหาร PCA Medium สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Deionized water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข

การเตรียมน้ำยาเคมีและการวิเคราะห์

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมกรดฟอสฟอริก 0.5 โมล โดยชั่งกรดฟอสฟอริก 57.64 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เจือจางกรดฟอสฟอริก 0.5 โมล 10 เท่า จะได้กรดฟอสฟอริก 0.05 โมล ปรับ pH ให้เท่ากับ 3 โดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 โมล (ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 24 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ทีละหยด เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

2. การนับจำนวนเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียโดยตรง

นับจำนวนเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียโดยการสุ่มประมาณ 50-100 ช่อง จนกระทั่งได้จำนวนนับรวม นำมาหารด้วยจำนวนช่องที่นับ จะได้จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อ 1 ช่อง

การคำนวณ

$$\text{จำนวนเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง} = \frac{\text{จำนวนเฉลี่ยที่นับได้ต่อ 1 ช่อง} \times 1,000}{\text{x ความเจือจางเริ่มต้น}}$$

3. การหาปริมาณสารพิษ

หาพื้นที่ของสารพิษมาตรฐานและพื้นที่ของสารตัวอย่าง นำไปคำนวณหาปริมาณสารพิษโดยคิดต่อตัวอย่างแห้ง 1 กรัม

การคำนวณ

$$\text{พื้นที่} = 1/2 \times \text{ฐาน} \times \text{สูง}$$

$$\text{ปริมาณสารพิษ (ไมโครกรัม)} = \frac{\text{พื้นที่ของสารตัวอย่าง} \times 0.07}{\text{พื้นที่ของสารพิษมาตรฐาน}}$$

เมื่อ 0.07 คือ ความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐานแต่ละชนิดมีหน่วยเป็นไมโครกรัม

4. วิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง

กรองตัวอย่างน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาดความจุ 1000 มิลลิลิตร ด้วยชุดเยื่อกรอง (membrane filter) โดยใช้แผ่นกรองที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรู 0.45 ไมโครเมตร วัดความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างน้ำที่ผ่านการกรองด้วย pH meter

5. วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen ,DO)

โดยวิธี azide modification of iodometric

5.1 น้ำยาเคมี

5.1.1 สารละลายแมงกานีสซัลเฟต

ละลายแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 364 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

5.1.2 อัสคาไล-ไอโอไดด์-เฮไซค์ รีเอเจนต์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 กรัม และ โซเดียมไอโอไดด์ 135 กรัม แล้วทำให้เจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโซเดียมเฮไซค์ 10 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตรเสียก่อน ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้น

5.1.3 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

5.1.4 น้ำแข็ง

ละลายน้ำแข็ง 5-6 กรัม ในน้ำเย็นเล็กน้อย แล้วเทลงในน้ำซึ่งกำลังเดือด 800 มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดต่อไปอีก 2-3 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นแล้วรินส่วนที่ใสมาใช้ เติมกรดซัลฟิวริก 1.25 กรัม เพื่อให้เก็บได้นาน

5.1.5 สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.05 โมลต่อลิตร

5.1.6 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.0125 โมลต่อลิตร

5.1.7 สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 0.0042 โมลต่อลิตร

5.2 วิธีวิเคราะห์

การหาค่าออกซิเจนละลายจากน้ำตัวอย่างซึ่งเก็บไว้ในขวดอินคิวเบทขนาด 250 มิลลิลิตร ทำได้ดังต่อไปนี้

เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 2 มิลลิลิตร และ อัสคาไล-ไอโอไดด์-เฮไซค์ รีเอเจนต์ 2 มิลลิลิตร ลงในขวดบิโอซีที่ใส่น้ำตัวอย่างปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำขวดขึ้นลง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนจนได้ปริมาณน้ำใส 1/3 ของขวด เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิดจุกผสมให้เข้ากันโดยคว่ำขวดขึ้นลงจนตะกอนละลายหมด นำน้ำตัวอย่างไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไทโอซัลเฟตจนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแข็ง 1-2 มิลลิลิตร จะได้สีน้ำเงินเข้มไตเตรทต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป อ่านปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้

5.3 การคำนวณ

สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.0125 โมลต่อลิตร มีค่าสมมูลย์พอกีกับ 0.2 มิลลิกรัมของออกซิเจนละลาย

ดังนั้น ถ้าใช้ตัวอย่างน้ำในการไตเตรท 200 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาพอกีกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 1.00 มิลลิลิตร ตัวอย่างน้ำจะมีค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

6. วิเคราะห์บีโอดี (biochemical oxygen demand ; BOD)

โดยวิธี direct method

6.1 น้ำยาเคมี

น้ำยาเคมีเหมือนวิธีการทดลองในข้อ 1.2.1

6.2 วิธีวิเคราะห์

ในกรณีที่น้ำตัวอย่างไม่เป็นกลางจะต้องทำให้เป็นกลางโดยใช้กรดซัลฟิวริก 0.5 โมลต่อลิตร จากนั้นนำน้ำตัวอย่างมาปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 20 องศาเซลเซียสในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เติมหอากาศให้มีออกซิเจนละลายอิ่มตัว โดยใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที รินน้ำตัวอย่างลงในขวดอินคิวเบชันเต็ม 3 ขวด ปิดจุกให้สนิท นำขวดหนึ่งมาหาค่าออกซิเจนละลายก่อน อีกสองขวดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หลังจาก 5 วัน นำตัวอย่างมาหาค่าออกซิเจนละลายที่เหลืออยู่ นำค่าออกซิเจนละลายที่ได้ทั้ง 2 วันไปคำนวณหาค่าบีโอดี

6.3 การคำนวณ

$$\text{ค่าบีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = D_1 - D_2$$

เมื่อ D_1 = ค่าออกซิเจนละลายที่ไตเตรทได้ในวันแรก

D_2 = ค่าออกซิเจนละลายที่ไตเตรทได้ในวันที่ 5

7. วิเคราะห์ปริมาณไนเตรท-ไนโตรเจน (nitrate-nitrogen)

โดยวิธีบรูซีน (brucine)

7.1 นำยาเคมี

7.1.1 สารละลายไนเตรทมาตรฐาน

ละลายโพแทสเซียมไนเตรท 0.7218 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เจือจางให้มีปริมาตร 1 ลิตร สารละลายนี้มีไนโตรเจน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

7.1.2 สารละลายบรูซีน-ซัลฟานิลิก

ละลายบรูซีนซัลเฟต 1 กรัม และกรดซัลฟานิลิก 0.1 กรัม ในน้ำร้อนประมาณ 70 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ต้มจนเดือด ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

7.1.3 สารละลายกรดซัลฟูริก

ค่อยๆเทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 500 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง

7.2 วิธีวิเคราะห์

ใช้ปิเปตต์ดูดน้ำตัวอย่าง 2 มิลลิลิตรใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำยา กรดบรูซีนซัลฟานิลิก 1 มิลลิลิตร ตวงกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ใบที่สอง ค่อยๆเทตัวอย่างน้ำที่ผสมกับน้ำยากรดบรูซีนซัลฟานิลิกลงในบีกเกอร์ที่บรรจุกรดซัลฟูริกเข้มข้น เทกลับไปกลับมาจนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำตัวอย่างที่ได้ไปตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที เทน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในตัวอย่างเทกลับไปกลับมาจนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ปล่อยให้เย็นโดยตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 20 - 30 นาที นำไปวัดความเข้มของสีโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายไนเตรทมาตรฐานในช่วง 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

7.3 การคำนวณ

$$\begin{array}{l} \text{ไนเตรท-ไนโตรเจน} \\ \text{(มิลลิกรัมต่อลิตร)} \end{array} = \frac{\text{มิลลิกรัมไนเตรท-ไนโตรเจน} \times 1,000}{\text{มิลลิลิตรน้ำตัวอย่าง}}$$

8. วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต (phosphate)

โดยวิธี aminonaphthosulfonic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.1 น้ำยาเคมี

8.1.1 ฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์

8.1.2 สารละลายกรดเข้มข้น

ค่อยๆรินกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 300 มิลลิลิตร ลงในน้ำประมาณ 600 มิลลิลิตร ทำให้เย็น เติมกรดไนตริกเข้มข้น 4 มิลลิลิตร แล้วจึงเจือจางให้เป็น 1 ลิตร

8.1.3 สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต 31.4 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ค่อยๆรินกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 400 มิลลิลิตร ทำให้เย็น เติมกรดไนตริกเข้มข้น 3.4 มิลลิลิตร เติมสารละลายโมลิบเดตลงไป เจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

8.1.4 สารละลายอมิโนแนฟโธซัลโฟนิค

ชั่งอมิโนแนฟโธซัลโฟนิค แอซิด 0.75 กรัม และโซเดียมไทโอซัลเฟต 70 กรัม นำไปบดรวมกันให้ละเอียด ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร แล้วจึงเจือจางให้เป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วปิดจุกสนิท

8.1.5 สารละลายฟอสเฟตมาตรฐาน

ละลายไดไฮโดรเจนโพแทสเซียมฟอสเฟต 219.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น เจือจางให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

8.2 วิธีวิเคราะห์

ดูดน้ำตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตรหยดฟีนอล์ฟทาลีน 1 หยด ถ้ามีสีชมพูเกิดขึ้นเติมสารละลายกรดเข้มข้นที่ละลายจนสีชมพูหายไป ต้มให้เดือดเป็นเวลาอย่าง 90 นาที คอยเติมน้ำกลั่นเพื่อให้ปริมาตรอยู่ระหว่าง 10 - 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้เย็นทำให้เป็นกลางด้วยจนสารละลายเป็นสีชมพูอ่อนๆ เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 2 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายฟอสเฟตมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

8.3 การคำนวณ

$$\text{ฟอสเฟต (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{มิลลิกรัมฟอสเฟต} \times 1,000}{\text{มิลลิลิตรน้ำตัวอย่าง}}$$

9. วิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย

โดยวิธี total Plate Count

เจือจางน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 เพื่อเอาเซลล์สาหร่ายออก $1:10^3$, $1:10^4$ และ $1:10^5$ ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างน้ำแต่ละความเจือจาง 1 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเชื้อพลาสติกแต่ละใบ เทอาหาร PCA (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตามลงไป หมุนงานเพาะเชื้อตามเข็มนาฬิกา 5 รอบ ทวนเข็มนาฬิกา 5 เคลื่อนงานขึ้น ลง 5 ครั้ง และเคลื่อนงานไปทางซ้าย ขวา อีก 5 ครั้ง ให้น้ำตัวอย่างผสมและกระจายทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-32 ชั่วโมง

9.1 การตรวจผล

การนับจำนวนโคโลนี ให้เลือกงานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีเจริญอยู่ประมาณ 30-300 โคโลนี จากความเจือจางเดียว ถ้าทำ 2 งาน ในแต่ละความเจือจางให้รวมจำนวนโคโลนีของทั้ง 2 งาน แล้วหารด้วย 2 จะเท่ากับจำนวนเฉลี่ยของโคโลนีที่นับได้ต่อ 1 ความเจือจางต่องาน

9.2 การคำนวณ

คำนวณจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่างวัสดุ 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร ได้ดังนี้
สมมติให้จำนวนเฉลี่ยของโคโลนีแบคทีเรียเท่ากับ 99.9 โคโลนี นับได้ที่ความเจือจาง $1:10^5$ ดังนั้นจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่างวัสดุ 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร คำนวณได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ตัวอย่างวัสดุ } 1/10^5 \text{ กรัม นับแบคทีเรียได้} &= 99.9 \text{ โคโลนี} \\ \text{วัสดุ 1 กรัม นับแบคทีเรียได้} &= 99.9 \times 10^5 \text{ โคโลนี} \\ &= 9.99 \times 10^6 \text{ โคโลนี} \end{aligned}$$

ภาคผนวก ค

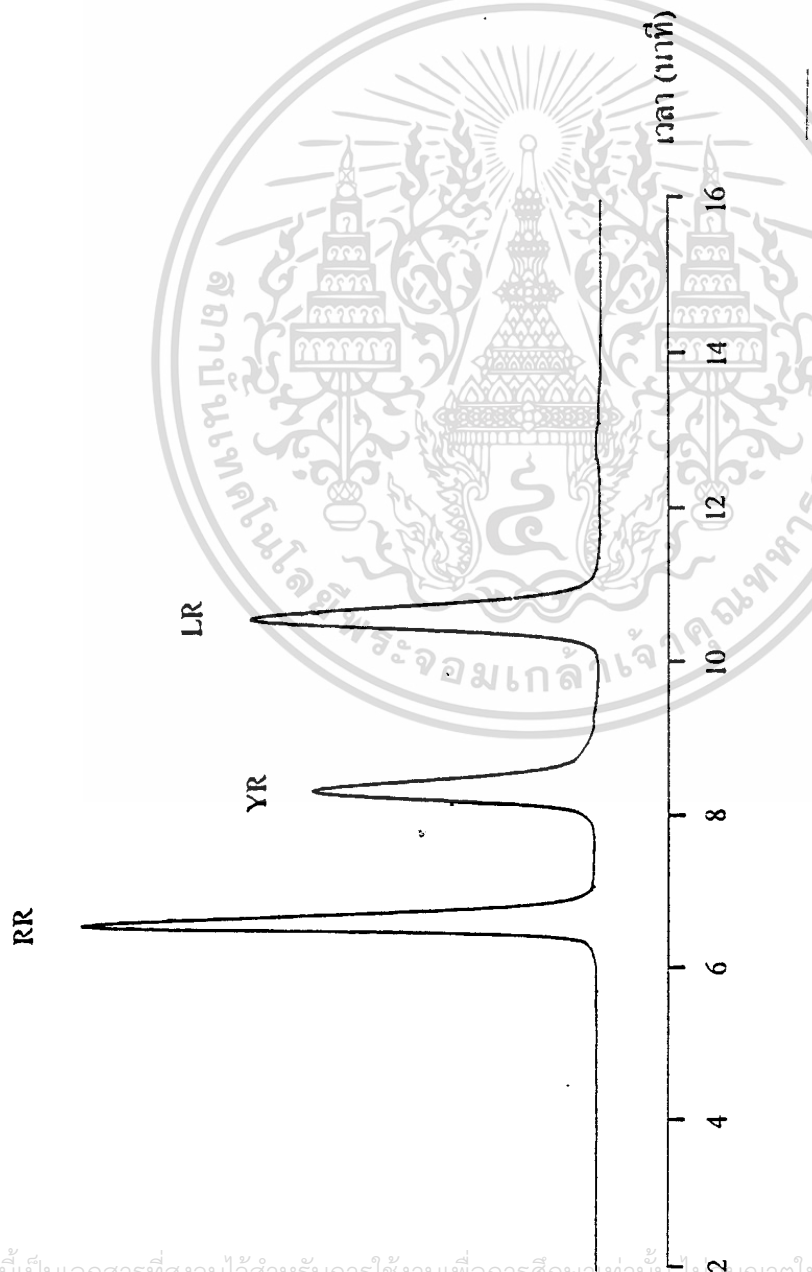
การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย และโครมาโตแกรมของสารพิษมาตรฐาน

1. จากการจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายตามระบบของ Desikachary (1959) สามารถจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 แห่ง ได้ดังนี้

คิวิชั่น	ลำดับ	วงศ์	สกุล	ชนิด
Cyanophyta	Chroococcales	Chroococcaceae	<i>Microcystis</i>	<i>aeruginosa</i>
	Oscillatoriales	Oscillatoriaceae	<i>Oscillatoria</i>	sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- คอลัมน์ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 x 150 มิลลิเมตร
- ระบบของสารละลายเป็นเมทานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เท่ากับ 64:40 pH 3
- อัตราการไหลของสารละลายเท่ากับ 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที
- วิเคราะห์ผลด้วยเครื่องยูวี-วิสสเปกโทรโฟโตเมทริกตีเทคเตอร์



2. โครมาโตแกรมของสารพืมาตรฐาน microcystin-RR, microcystin-YR และ microcystin-LR

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพรรณรัตน์ รัตนโชติ เกิดวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2516 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาวិทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2537



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้