

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ

Microcystis aeruginosa

SCREENING OF LYTIC BACTERIA FOR THE CONTROL OF TOXIC
CYANOBACTERIUM *Microcystis aeruginosa*



ทักษวัน ทองอร่าม

TAKSAWAN THONGARAM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 32867

วัน, เดือน, ปี 14 ส.ย. 2542

พ.ศ.2542

ISBN 974-662-018-5

ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**SCREENING OF LYTIC BACTERIA FOR THE CONTROL OF
TOXIC CYANOBACTERIUM *Microcystis aeruginosa***



**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**

1999

ISBN 974-662-018-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 1999

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG หน่วยงานการค้ำ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ <i>Microcystis aeruginosa</i>
นักศึกษา	นางสาวทักษวัน ทองอร่าม
รหัสประจำตัว	38064206
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2542
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร. อภาภรณ์ มหาพันธ์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรไท สุขเจริญ

บทคัดย่อ

ได้ทำการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8325 โดยนำตัวอย่างดิน 13 ตัวอย่างและตัวอย่างน้ำ 12 ตัวอย่างมาทดสอบเบื้องต้นกับไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 พบแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. siamensis* TISTR 8012 ได้ดีที่สุดจากตัวอย่างน้ำรหัส B-3 และตัวอย่างดินรหัส C-12 เมื่อทดสอบแบคทีเรียคัดเลือกรหัส B-3 C-12 และ *Cytophaga* sp. TISTR 043 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ในอาหาร MA สูตรปกติ ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนความเข้มแสง 60 ไมโครโวนส์ไอน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่าแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ดีที่สุด โดยแบคทีเรียที่มีเซลล์เริ่มต้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่มีเซลล์เริ่มต้น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 3 วัน จากการศึกษาผลของส่วนที่กรองได้จากการบ่ม *M. aeruginosa* TISTR 8325 ร่วมกับแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 พบว่าการเติมส่วนที่กรองได้ในระดับความเข้มข้น 50 และ 90 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญพบว่า *M. aeruginosa* TISTR 8325 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MA สูตรปกติ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาพความเป็นต่างเริ่มต้นเท่ากับ 9 และแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้สูงสุด ที่สภาวะอุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส สภาพความเป็นต่างเริ่มต้น 8 และ 9

จากการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารพิษ พบว่าในระหว่างการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 พบสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อตับในกลุ่มไมโครซิสติน 3 ชนิด

คือ microcystin-RR microcystin-YR และ microcystin-LR เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ปริมาณสารพิษรวมในสภาพยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคิดเป็น 90.78 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ดีที่สุด จัดอยู่ในสกุล *Alcaligenes* sp. และจากการศึกษาผลของ *Alcaligenes* sp. ต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย จำนวน 20 สายพันธุ์ พบว่า *Alcaligenes* sp. มีผลยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย 7 สกุล 9 สายพันธุ์ โดยไม่มีผลต่อสาหร่ายสีเขียวทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Screening of Lytic Bacteria for the Control of Toxic Cyanobacterium <i>Microcystis aeruginosa</i>
Student	Miss Taksawan Thongararm
Student ID.	38064206
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	1999
Thesis Adviser	Dr. Aparat Mahakhant
Thesis Co-adviser	Assistant Professor Oratai Sukcharoen

ABSTRACT

Bacteria that were capable of controlling the growth of toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* TISTR 8325, was distinctively selected by analogous experiments from 13 soil samples and 12 water samples with *Anabaena siamensis* TISTR 8012. Among soil and water samples, bacteria showing the inhibition activity against *A. siamensis* TISTR 8012 were those from soil sample B-3 and water sample C-12. Screening of the most potent cyanobacteriolytic strains capable of lysing *M. aeruginosa* TISTR 8325 cells was studied by using bacterial strains B-3 and C-12 and *Cytophaga* sp. TISTR 043 was used as a reference, in MA medium, incubated at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ and light intensity of $60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ for 7 days. All of three bacterial strains could lyse *M. aeruginosa* TISTR 8325 cells and bacterial strain C-12 was found to be the most potent strain. The ability of bacterial strain C-12 at the initial concentration of 10^8 cells/ml showed an effective controlling on *M. aeruginosa* TISTR 8325 of initial concentration of 10^5 cells/ml completely within 3 days. The addition of 50% and 90% of the culture filtrate of bacterial strain C-12 and *M. aeruginosa* TISTR 8325 was shown to increase *M. aeruginosa* TISTR 8325 cells growth. The optimal cultivation conditons for *M. aeruginosa* TISTR 8325 were using MA medium were at 30°C under initial pH of 9 and optimal conditions for effective cell lysis were at 35°C and 40°C under initial pH of 8 and 9.

The classification and the quantity of the toxin production showed that *M. aeruginosa* TISTR 8325 produced hepatotoxin, namely "microcystin" and components of the toxin was identified as microcystin-RR microcystin-YR and

microcystin-LR. The quantities of total microcystin in the treatment condition after the completion of experiment reduced to 90.78%. The identification of bacterial strain C-12 was *Alcaligenes* sp. However, the study of *Alcaligenes* sp. to the growth of 20 strains of green algae and cyanobacteria showed a capability of controlling the growth of 7 genera and 9 strains of cyanobacteria but showed no effect on the studied green algae.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.อาภาภรณ์ มหาพันธ์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรไท สุขเจริญ อาจารย์ผู้ควบคุม วิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ตรวจสอบแก้ไข และช่วยเหลือต่องานวิจัยนี้ จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี รวมทั้งขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เนาวรัตน์ ปานแย้ม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ดุษณี ธนะบริพัทธ์ และ ดร. วัลลภา อรุณไพโรจน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และ แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้คำปรึกษา แนะนำแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ต่างๆในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ทุกท่านที่เกี่ยวข้องและให้ความช่วยเหลือต่องานวิจัยนี้ด้วย ดีตลอดมา

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่ ที่ให้การสนับสนุนและให้โอกาสทางการ ศึกษา รวมทั้งให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยในการศึกษามาโดยตลอด

ขอขอบคุณพี่ น้องและเพื่อนๆนักศึกษาทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และให้กำลังใจต่อผู้วิจัยตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุก ท่าน

ทักษวัน ทองอร่าม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญรูป.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
1.3 สมมติฐานของการศึกษา.....	3
1.4 แนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย.....	4
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 ไชยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ.....	7
2.2 สารพิษจากไชยาโนแบคทีเรีย.....	12
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไชยาโนแบคทีเรีย.....	18
2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างไชยาโนแบคทีเรียกับสิ่งมีชีวิตอื่น.....	21
2.5 การควบคุมและกำจัดไชยาโนแบคทีเรีย.....	25
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....	32
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	32
3.2 สายพันธุ์จุลินทรีย์.....	33
3.3 วิธีการวิจัย.....	36
3.3.1 ขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง ไชยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ.....	36
3.3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ ไชยาโนแบคทีเรีย <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 ที่ผลิตสารพิษ.....	37

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.3 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกในการยับยั้งการเจริญของ ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ	38
3.3.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ ไซยาโนแบคทีเรีย <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดย แบคทีเรียคัดเลือก.....	41
3.3.5 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารพิษในระหว่างการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR กับในสภาพการยับยั้งการเจริญโดย แบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12	45
3.3.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย.....	48
3.3.7 การทดสอบความปลอดภัยในการใช้แบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325.....	50
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	52
4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญ ของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ.....	52
4.2 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส B-3, C-12 และ แบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบในการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 ที่ผลิตสารพิษ.....	55
4.3 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในการยับยั้งการ เจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 ที่ผลิตสารพิษ.....	57
4.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12.....	61
4.5 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารพิษในสภาพการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 กับในสภาพการยับยั้งการเจริญ โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12.....	80
4.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย.....	84
4.7 การทดสอบความปลอดภัยในการใช้แบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325.....	94

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	97
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	97
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	99
บรรณานุกรม.....	100
ภาคผนวก.....	109
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม.....	110
ภาคผนวก ข. การเตรียมน้ำยาเคมีและวิธีการทดสอบ.....	114
ภาคผนวก ค. วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล.....	119
ประวัติผู้เขียน.....	125



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 รายงานแสดงผลกระทบของสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำที่มี ต่อมนุษย์และสัตว์.....	11
2.2 สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต.....	14
2.3 แสดงผลของแบคทีเรียต่อการเจริญของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย แต่ละชนิดจากการทดสอบบนอาหารแข็ง.....	23
2.4 สารเคมีที่มีคุณสมบัติในการควบคุมและกำจัดสาหร่าย.....	27
2.5 สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย.....	29
2.6 จุลินทรีย์สาเหตุโรคที่ใช้ในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย.....	30
4.1 แสดงผลของการทดสอบเบื้องต้นของตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำ ต่อการเจริญของ <i>A. siamensis</i> TISTR 8012	53
4.2 แสดงปริมาณไมโครซิสตินในเซลล์ของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และในอาหาร MA (ไมโครกรัมต่อลิตร).....	85
4.3 แสดงคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรีย <i>Cytophaga</i> sp. TISTR 043.....	88
4.4 แสดงคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12.....	90
4.5 แสดงคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส B-3.....	92
4.6 การทดสอบผลของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ต่อการเจริญของ สาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย.....	96

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 แสดงพื้นที่ของประเทศต่างๆทั่วโลกที่ประสบปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษ.....	2
1.2 แสดงแนวความคิดในการทำวิจัย.....	6
2.1 แสดงไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตและก่อตัวเป็นแผ่นหรือลอยเป็นฝ้าบริเวณพื้นผิวน้ำ.....	9
2.2 แสดงผลกระทบของการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในแหล่งน้ำ.....	10
2.3 แสดงลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารพิษที่ออกฤทธิ์ทำลายตับในกลุ่มไมโครซิสติน.....	17
3.1 แสดงลักษณะของไซยาโนแบคทีเรีย <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MA ในสภาวะนิ่ง.....	34
3.2 แสดงลักษณะเซลล์และกลุ่มเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325.....	35
3.3 แสดงขั้นตอนการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย.....	39
3.4 แสดงขั้นตอนการศึกษำปจัยที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325.....	42
3.5 แสดงสภาวะการทดสอบการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12.....	43
3.6 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ.....	47
3.7 แสดงขั้นตอนและรูปแบบของวิธีการศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการของ Sangkhobol และ Skerman (1981).....	49
4.1 แสดงผลของแบคทีเรียคัดเลือกต่อการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325.....	56
4.2 แสดงผลของปริมาณแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325.....	58
4.3 แสดงผลของส่วนที่กรองได้จากการบ่ม <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 ร่วมกับแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ต่อการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325.....	60
4.4 แสดงผลของสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการกรอง สารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ได้จากการบ่มที่ระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญของ <i>A. siamensis</i> TISTR 8012.....	62

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.5 แสดงผลของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325.....	63
4.6 กราฟแสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12.....	65
4.7 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12.....	66
4.8 (ก) กราฟแสดงการเจริญเติบโตของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MA ที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 6 7 8 9 10 11 และ 12 ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน.....	68
4.8 (ข) กราฟแสดงการเจริญเติบโตสูงสุดของเซลล์ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 เปรียบเทียบกับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเมื่อสิ้นสุดการทดลอง.....	68
4.9 กราฟแสดงผลของความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารต่อการเจริญและ การยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดยแบคทีเรีย คัดเลือกรหัส C-12.....	70
4.10 แสดงสภาวะการทดสอบผลของความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารต่อ การเจริญและการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12.....	71
4.11 กราฟแสดงผลของปริมาณไนเตรตต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12.....	73
4.12 แสดงสภาวะการทดสอบผลของปริมาณไนเตรตต่อการเจริญและการ ยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12.....	74
4.13 กราฟแสดงผลของปริมาณฟอสเฟตต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12.....	77
4.14 แสดงสภาวะการทดสอบผลของปริมาณฟอสเฟตต่อการเจริญและการ ยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12.....	78
4.15 กราฟแสดงผลของปริมาณไนเตรตและฟอสเฟตต่อการเจริญและการยับยั้งการ เจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12.....	81

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.16 แสดงสภาวะการทดสอบผลของปริมาณไนเตรดและฟอสเฟตต่อการเจริญ และการยับยั้งการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 โดยแบคทีเรีย คัดเลือกรหัส C-12.....	82
4.17 กราฟแสดงการเจริญของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 และการยับยั้งการเจริญ โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในอาหาร MA สูตรปกติ อาหาร MA ที่ ไม่เติมฟอสเฟต อาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรด และอาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรด และฟอสเฟต.....	83
4.18 กราฟแสดงปริมาณไมโครซิสตินในเซลล์ของ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8325 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และในอาหาร MA (ไมโครกรัมต่อลิตร).....	86
4.19 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Cytophaga</i> sp. TISTR 043.....	89
4.20 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Alcaligenes</i> sp.	91
4.21 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> sp.	93

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษในแหล่งน้ำจืดกำลังเป็นปัญหาที่สำคัญและพบได้ในหลายประเทศทั่วโลก (รูปที่ 1.1) โดยมีรายงานความเป็นพิษในอเมริกา แคนาดา อังกฤษ นอร์เวย์ แอฟริกาใต้ ออสเตรเลีย จีน และ ญี่ปุ่น (Carmichael, 1988) ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบอย่างกว้างขวางต่อนิเวศวิทยาของแหล่งน้ำ รวมทั้งก่อให้เกิดการตายของสัตว์และการเจ็บป่วยในมนุษย์เนื่องมาจากการบริโภคน้ำในแหล่งน้ำนั้น (Bourke *et al.*, 1983; Cook *et al.*, 1989; Carmichael, 1994; Lawton and Codd, 1991; Mahmood *et al.*, 1988; Smith and Lewis, 1987) โดยพบว่าสาหร่ายเหล่านี้ส่วนใหญ่จะเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) หรือ ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ซึ่งจะเจริญเติบโตและก่อตัวเป็นแผ่น (mat) หรือลอยเป็นฝ้า (scum) บริเวณพื้นผิวน้ำในขนาดและความหนาต่างๆกัน สารพิษที่ผลิตโดยสาหร่ายสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ตามอาการของการเกิดพิษ คือ ประเภทที่เป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxin) ได้แก่ anatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxin และ neosaxitoxin ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรียในสกุล *Anabaena* และ *Aphanizomenon* ประเภทที่เป็นพิษต่อตับ (hepatotoxin) ได้แก่ สารพิษในกลุ่ม microcystin ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรียในสกุล *Microcystis* และ nodularin ซึ่งผลิตโดย *Nodularia*

จากรายงานการค้นพบการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายของสัตว์ ในปี 1878 (Francis, 1878) เป็นต้นมา รวมทั้งจากปัญหาดังกล่าวข้างต้น จึงทำให้มีงานวิจัยต่างๆที่ศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้มากขึ้นรวมถึงวิธีการในการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งได้มีการศึกษาจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย โปรโตซัว รา และ ไวรัส ในการควบคุมการเจริญของสาหร่ายในน้ำจืด รวมทั้งการใช้สารปฏิชีวนะ (Fogg *et al.*, 1973) การใช้สิ่งมีชีวิตที่กินสาหร่ายเป็นอาหาร ได้แก่ หนอน (Atlavinyte and Pocience, 1973) ลูกอ๊อด (Taylor and Durring, 1983) และ การใช้ไซยาโนฟาจ (Barnet *et al.*, 1981; Hu *et al.*, 1981; Desjardins and Olson, 1982) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาวีธีการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด เช่น การศึกษาสารที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. ในการควบคุม *Microcystis aeruginosa* (Sugiura *et al.*, 1993) การศึกษาการควบคุม *M. aeruginosa* โดย *Ochromonas danica* (Cole and Wynne, 1974) การศึกษาปริมาณสารพิษในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.1 แสดงพื้นที่ของประเทศต่างๆทั่วโลกที่ประสบปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสายพันธุ์ผลิตสารพิษ (Carmichael, 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุม *Microcystis viridis* โดย *Poteroochromonas malhamensis* (Watanabe et al., 1996)

จากความสำคัญดังกล่าวข้างต้นและจากการที่จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายมากที่สุดชนิดหนึ่ง รวมทั้งมีบทบาทที่สำคัญต่อความหลากหลายทางชีวภาพและระบบนิเวศตามธรรมชาติ ดังนั้นเพื่อก่อให้เกิดการใช้ประโยชน์ขององค์ประกอบความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยั่งยืนรวมถึงความสามารถที่จะควบคุมปัญหาที่เกิดจากการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะทำการศึกษาศักยภาพของจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษเพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมโดยชีววิธีต่อไป

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ

1.2.2 ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ

1.2.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ

1.2.4 วิเคราะห์ปริมาณและชนิดของสารพิษในสภาวะการเจริญและยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษโดยแบคทีเรีย

1.2.5 จัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ

1.2.6 ศึกษาความปลอดภัยในการใช้แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

1.3.1 ชนิดและระดับความเข้มข้นของแบคทีเรีย มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ โดยเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียสูงขึ้นไปจะทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงขึ้นตามไปด้วย

1.3.2 เมื่อปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ระดับอุณหภูมิ และสภาพความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไปจากช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรีย จะมีผลทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตลดลง รวมทั้งประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญเติบโตลดลงด้วย

1.3.3 ปัจจัยทางเคมีมีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย โดยเมื่ออาหารสำหรับเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียมีองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส จะมีผลทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตดีกว่าอาหารที่ไม่มีองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

1.3.4 เมื่ออาหารสำหรับเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียไม่มีองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตลดลง มีผลทำให้ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียสูงขึ้น

1.4 แนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

การใช้แบคทีเรียเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษทดลองโดยการนำตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่างๆมาแยกและคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยนำมาทดสอบเบื้องต้นกับ *A. siamensis* TISTR 8012 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียชนิดที่มีผนังเซลล์บางและถูกทำลายได้ง่ายเป็นตัวแทนในการทดสอบเมื่อได้แบคทีเรียคัดเลือกนำมาทดสอบเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบหาชนิดและความเข้มข้นของแบคทีเรียที่เหมาะสมซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ จากนั้นศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษโดยแบคทีเรีย ศึกษาวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของสารพิษในสภาวะการเจริญและการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียศึกษาและจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ และทดสอบความปลอดภัยในการใช้แบคทีเรียในการควบคุมการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ สุดท้ายทำการประเมินผลการทดลองและสรุปผล แสดงดังรูปที่ 1.2

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1.5.1 ทำการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษจากตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำ

1.5.2 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกแล้วพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษได้ดีที่สุด ได้แก่ ระดับความเข้มข้นที่ใช้ ผลของส่วนที่ได้จากการกรองจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียร่วมกับแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบกับสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการกรอง และสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

1.5.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหาร ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

1.5.4 ศึกษาวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของสารพิษในสภาวะการเจริญและในสภาวะการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatograph, HPLC)

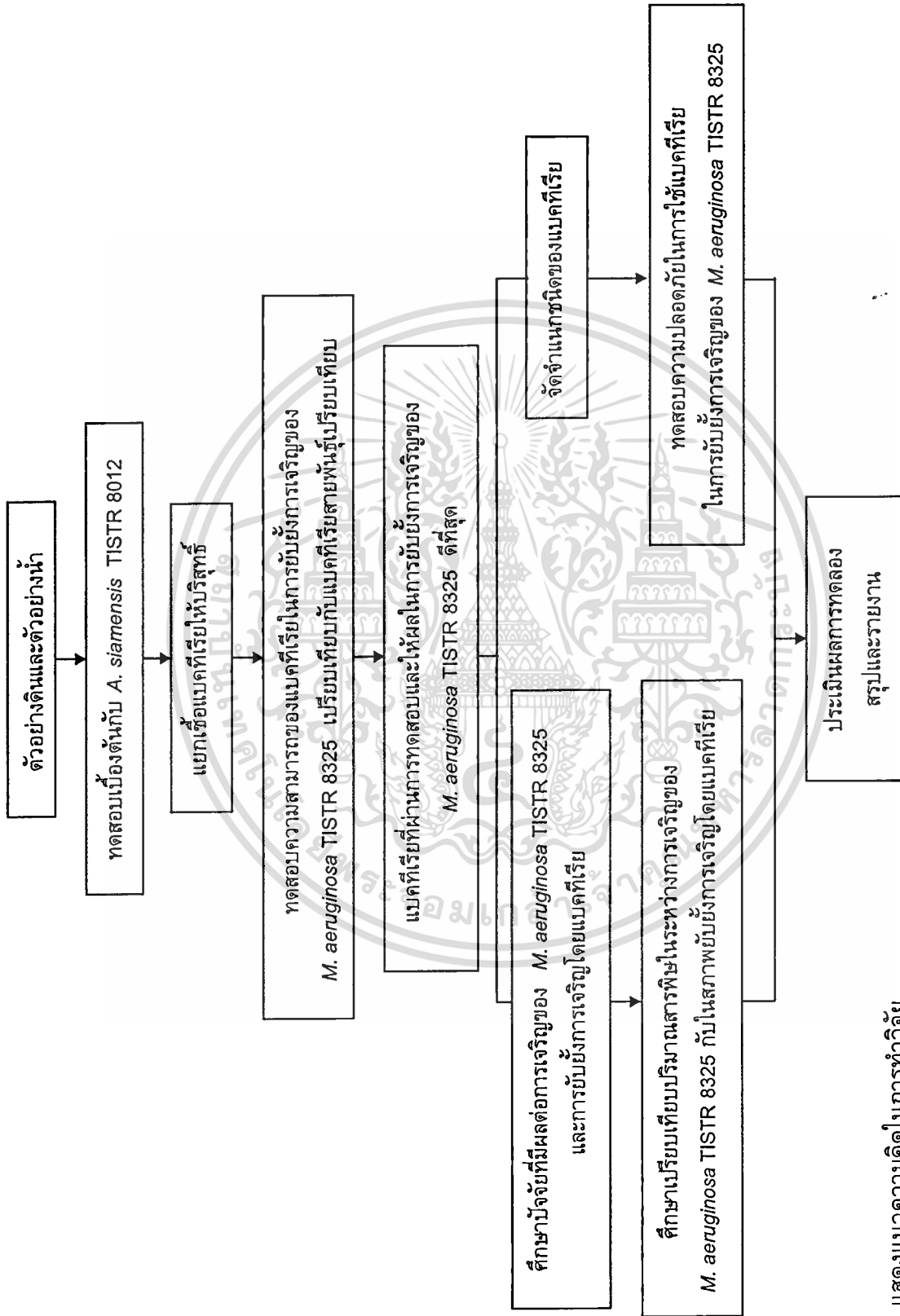
1.5.5 ศึกษาและจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือก โดยอาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของจุลินทรีย์ และจากการใช้ระบบจัดจำแนกจุลินทรีย์ เอพีไอ รวมทั้งอาศัยแนวทางในการจัดจำแนกของ Reichenbach และ Dworkin (1982) ; Sangkhobol และ Skerman (1981) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

1.5.6 ทดสอบความปลอดภัยในการใช้แบคทีเรียเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ โดยใช้สายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียจากศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) เป็นตัวแทนในการทดสอบ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ทางชีวภาพจากทรัพยากรจุลินทรีย์ในการแก้ไขปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในแหล่งน้ำ ตลอดจนปัญหาต่อสุขภาพของผู้บริโภคอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำ

1.6.2 เพื่อเป็นทางเลือกในการกำจัดไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ โดยการใช้การควบคุมทางชีววิธีแทนการใช้สารเคมีกำจัดไซยาโนแบคทีเรีย



รูปที่ 1.2 แสดงแนวความคิดในการทำวิจัย

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไซยาโนแบคทีเรีย หรือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria หรือ blue-green algae) จัดอยู่ใน Division Cyanophyta อาจมีชื่อเรียกอีกอย่างอื่นว่า Division Myxophyta หรือ Cyanophycophyta หรือ Cyanochloronta (Kumar, 1988) จัดเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำจำพวกโปรคาริโอตที่มีขนาดเล็ก

2.1 ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ

2.1.1 การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacterial bloom หรือ water bloom)

การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย เกิดขึ้นเมื่อมีไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตอยู่ในแหล่งน้ำเป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว จนทำให้น้ำเปลี่ยนสีและบางครั้งอาจก่อให้เกิดกลิ่นเหม็น เมื่อไซยาโนแบคทีเรียตายจะก่อให้เกิดการเน่าเสียในแหล่งน้ำ และทำให้น้ำขาดออกซิเจน ซึ่งมีผลต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ เช่น ปลา นอกจากนี้ยังอาจก่อให้เกิดการเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยง เช่น วัว ควาย แพะ แกะ และ สัตว์ปีกที่มากินน้ำ (Singh, 1961)

สภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย (Richard et al., 1990) ได้แก่

- 2.1.1.1 บรรยากาศบริเวณแหล่งน้ำนั้นอยู่ในสภาพลมสงบ หรือ ลมพัดอ่อนๆ
- 2.1.1.2 อุณหภูมิของแหล่งน้ำอยู่ระหว่าง 15-30 องศาเซลเซียส
- 2.1.1.3 น้ำในแหล่งน้ำนั้นอยู่ในสภาพที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ในช่วง 6-9
- 2.1.1.4 มีธาตุอาหารไนเตรดและฟอสเฟตละลายอยู่ในปริมาณมากโดยส่วนใหญ่มีแหล่งสำคัญมาจากปุ๋ยเคมีที่ถูกระบายลง และผงซักฟอกต่างๆ

โดยทั่วไปไซยาโนแบคทีเรียที่เกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในแหล่งน้ำและผลิตสารพิษ ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia* และ *Gloeotrichia* ชนิดที่พบว่าการผลิตสารพิษและพบได้บ่อยคือ *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae* และ *Aphanizomenon flos-aquae* อาการเป็นพิษส่วนใหญ่พบว่า มีผลต่อระบบทางเดินอาหาร การทำลายพิษไม่สามารถขจัดให้หมดได้โดยการกรอง การทำให้ตกตะกอน การใส่คลอรีน หรือแม้แต่การต้ม (Tanaka, 1993)

2.1.2 ลักษณะโดยทั่วไปของไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis aeruginosa*

ไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis aeruginosa* จัดเป็นแพลงก์ตอนสกุลที่สำคัญของแหล่งน้ำจืด และเป็นชนิดที่ก่อให้เกิดปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในแหล่งน้ำ (Watanabe *et al.*, 1989) จัดอยู่ใน

Division Cyanophyta

Order Chroococcales

Family Chroococcaceae

Genus *Microcystis*

ลักษณะโดยทั่วไป : ในระยะแรกกลุ่มเซลล์จะมีรูปร่างกลม ต่อมากลุ่มเซลล์จะมีรูปร่างไม่แน่นอน เซลล์กระจายอยู่ทั่วไป แต่ละเซลล์มีลักษณะกลม ภายในเซลล์มีแก๊สแวกิวโอลกระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งทำหน้าที่ช่วยในการลอยตัวบริเวณผิวน้ำ โครงสร้างของแก๊สแวกิวโอล ผังเซลล์ประกอบด้วยโปรตีน มีรูปร่างทรงกระบอกกลวง บริเวณกระเปาะ แก๊สสามารถซึมผ่านเข้าไปได้ (Walsby *et al.*, 1979) โดยความเข้มของแสงจะมีผลต่อการลอยตัวของเซลล์ พบว่าเมื่อความเข้มของแสงสูงทำให้ถุงแก๊สยุบตัวลงและมีผลทำให้เซลล์จมลง นอกจากนี้ยังพบว่าสารอนินทรีย์คาร์บอนมีผลในการลดการลอยตัวของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย (Paerl, 1983)

ส่วนประกอบของเซลล์ : โดยทั่วไปไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยผนังเซลล์ 2 ชั้น ผนังชั้นในบาง ประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลส ส่วนผนังชั้นนอกหนา ประกอบด้วยสารพวกเจลาติน ซึ่งประกอบกันเป็นชีท (sheath) หุ้มเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย (Desikachary, 1959)

การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำเป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว มีผลมาจากปัจจัยและสาเหตุต่างๆซึ่งแบ่งออกได้เป็น ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัส รวมทั้งปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ แสง อุณหภูมิ สภาพของแหล่งน้ำ การหยุดนิ่งของกระแสน้ำ จะทำให้เกิดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียก่อตัวเป็นแผ่นหรือลอยเป็นฝ้าบริเวณพื้นผิวน้ำ แสดงดังรูปที่ 2.1 ในขนาดและความหนาต่างๆกัน ซึ่งปัญหาที่เกิดขึ้นก่อให้เกิดความเสียหายและผลกระทบต่อในด้านต่างๆติดตามมา

2.1.3 ผลกระทบของการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในแหล่งน้ำ (อาการรัตน์ 2541) แสดงดังรูปที่ 2.2

เมื่อเกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในแหล่งน้ำก่อให้เกิดปัญหาและผลกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อม ดังนี้คือ

2.1.3.1 การผลิตสารพิษ สารพิษที่ไซยาโนแบคทีเรียผลิตขึ้นก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต ปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง และสัตว์ป่า ที่ดื่มจากแหล่งน้ำ รวมทั้งมีผลต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์ที่ใช้น้ำจากแหล่งน้ำในการอุปโภคบริโภค (ตารางที่ 2.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

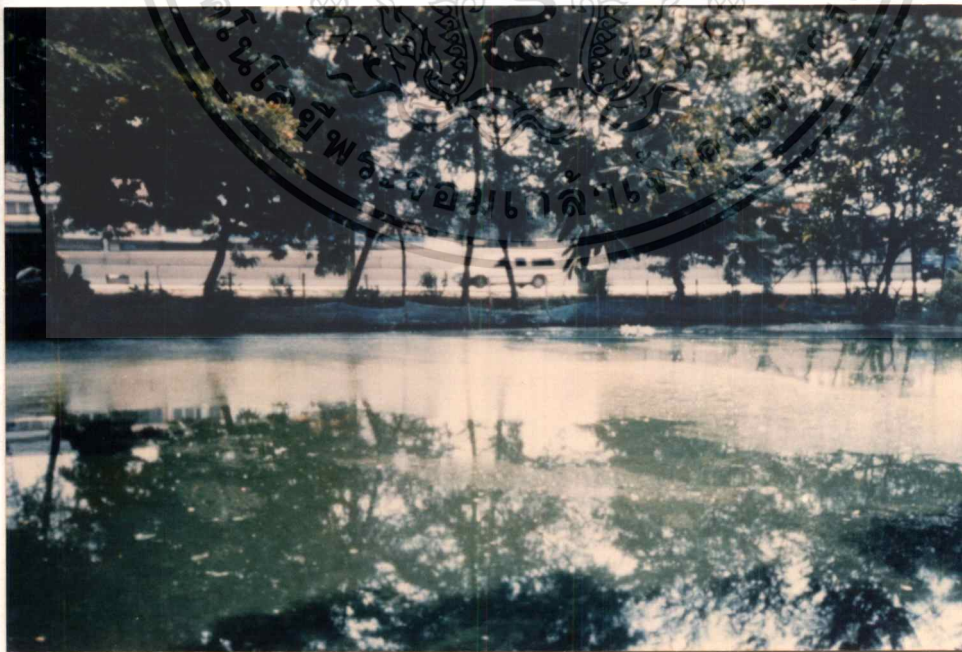
ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการผลิตน้ำประปา และความร้อนจากการต้มน้ำธรรมดาไม่สามารถทำลายสารพิษได้

2.1.3.2 การลดลงของออกซิเจนในน้ำ มีสาเหตุมาจากการใช้ออกซิเจนเพื่อการหายใจของไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในปริมาณสูง รวมทั้งการใช้ออกซิเจนโดยจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่ตายก่อให้เกิดการลดลงของปริมาณออกซิเจนในน้ำ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตรวมทั้งปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ

2.1.3.3 การพักผ่อนหย่อนใจ จากการใช้ไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตอยู่ในแหล่งน้ำเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดการก่อตัวเป็นแผ่นหรือลอยเป็นฝ้าบริเวณพื้นผิวน้ำ เป็นการทำลายทัศนียภาพของแหล่งน้ำที่ใช้เป็นสถานที่พักผ่อน นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาในด้านกลิ่นรบกวนบรรยากาศในการพักผ่อนอีกด้วย

2.1.3.4 การผลิตน้ำประปา เมื่อเกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียในบริเวณแหล่งน้ำที่กักเก็บน้ำไว้เพื่อผลิตเป็นน้ำประปาสำหรับใช้ในการอุปโภคบริโภค ก่อให้เกิดกลิ่นและรสไม่พึงประสงค์ และอาจก่อให้เกิดการอุดตันในระบบการกรองน้ำ ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของระบบการผลิตน้ำประปา

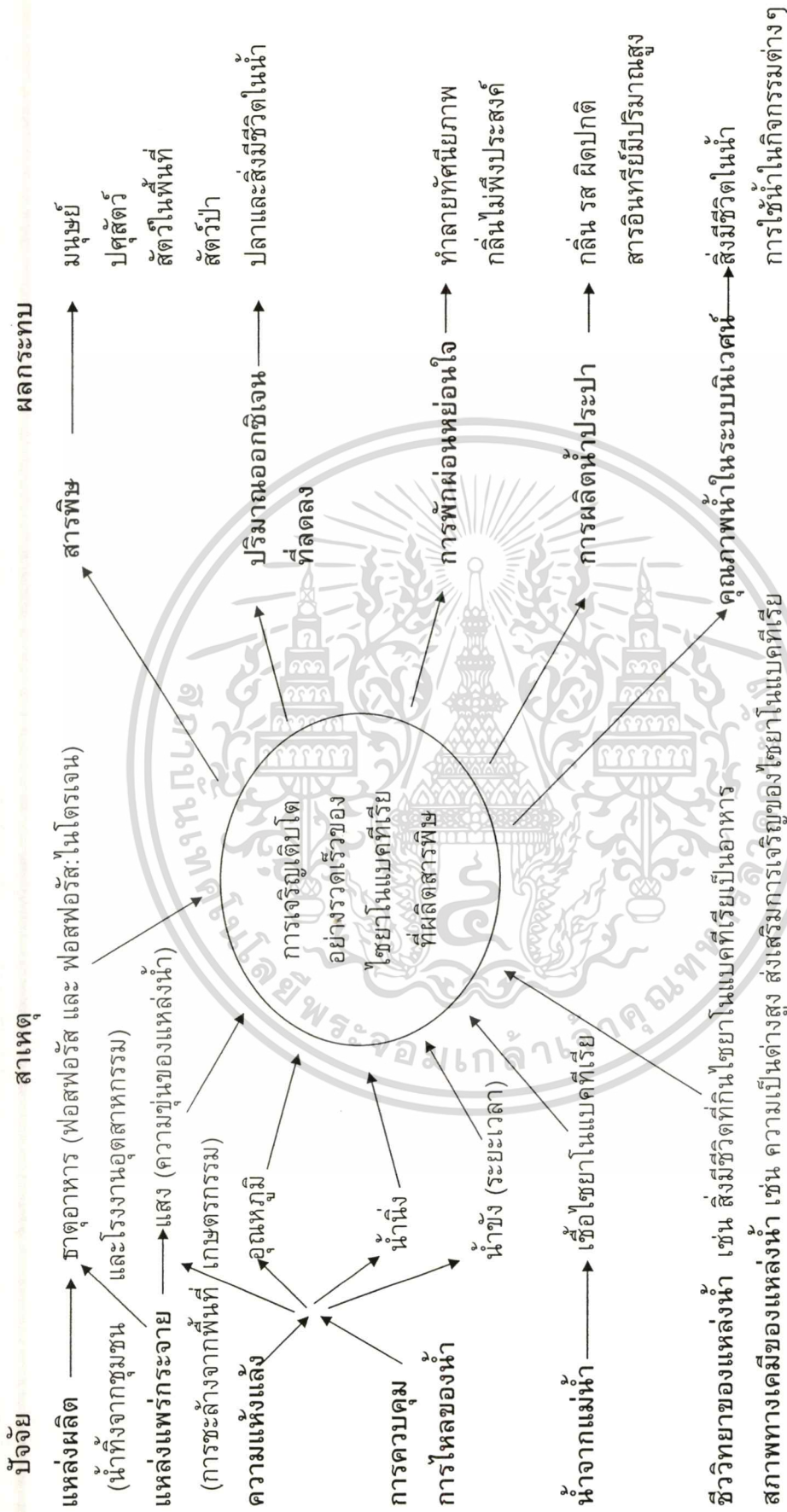
2.1.3.5 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ การเกิดและการย่อยสลายของมวลไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ ทั้งในด้านองค์ประกอบทางเคมีและชีวภาพของแหล่งน้ำ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ รวมทั้งการนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่น การเกษตร และอุตสาหกรรม



รูปที่ 2.1 ไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตและก่อตัวเป็นแผ่นหรือลอยเป็นฝ้าบริเวณ

พื้นผิวน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงผลกระทบของการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในแหล่งน้ำ

ที่มา: (Verhoeven, 1993) และ (อภารัตน์ 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 รายงานแสดงผลกระทบของสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำที่มีต่อมนุษย์และสัตว์

เหตุการณ์	แหล่งอ้างอิง
เกิดการระบาดของรุนแรงของโรคตับอักเสบซึ่งมีผลมาจากการปนเปื้อนของสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียในระบบการผลิตน้ำประปาในปาล์ม ไอส์แลนด์ รัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย	Bourke <i>et al.</i> , 1983
เกิดการเจ็บป่วยในหมู่ทหารที่ลงอาบน้ำในทะเลสาบในประเทศอังกฤษ	Lawton and Codd, 1991
เกิดการตายของฝูงโคภายหลังจากการดื่มน้ำในทะเลสาบที่มีไซยาโนแบคทีเรียขึ้นปกคลุมบริเวณพื้นผิวน้ำ ในรัฐ อัลเบอร์ตา ประเทศแคนาดา	Smith and Lewis, 1987
เกิดการตายของสุนัข และลูกวัวหลายตัว ในมลรัฐ เซาท์ ดาโกตา ประเทศสหรัฐอเมริกา	Mahmood <i>et al.</i> , 1988
เกิดการตายของสุกร และเป็ดจำนวนมาก ในมลรัฐ อิลลินอยส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา	Cook <i>et al.</i> , 1989
เกิดการตายของฝูงแกะและฝูงสุนัขภายหลังการดื่มน้ำในอ่างเก็บน้ำ ประเทศอังกฤษ	Lawton and Codd, 1991
เกิดการตายของปศุสัตว์และสัตว์อื่น ๆ อย่างกว้างขวาง ภายหลังจากดื่มน้ำในแม่น้ำเมอร์เรย์ ประเทศออสเตรเลีย	Carmichael, 1994
เกิดการตายของฝูงเป็ดและห่านที่อพยพย้ายถิ่นจำนวนนับพัน ภายหลังการดื่มน้ำที่มีไซยาโนแบคทีเรียปนเปื้อนในแถบมิดเวสต์ ประเทศสหรัฐอเมริกา	Carmichael, 1994

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรีย

สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรีย คือ สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างและสลายของเซลล์ ซึ่งเป็นสารที่ไม่เกี่ยวข้องหรือจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามคาดว่าสารพิษที่ไซยาโนแบคทีเรียสร้างขึ้นทำหน้าที่เป็นเสมือนสารป้องกันตัว (protective compound) จากศัตรูหรือคู่แข่งในธรรมชาติ (อาภารัตน์ 2539)

2.2.1 กลุ่มของสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรีย

สามารถแบ่งลักษณะความเป็นพิษของสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียตามการตรวจวิเคราะห์ทางชีววิธี (bioassay) ได้เป็น 2 กลุ่มคือ

2.2.1.1 กลุ่มที่เป็นพิษต่อเซลล์

สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้ จะไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสัตว์จนถึงแก่ความตาย แต่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย แบคทีเรีย รา และเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การค้นพบสารพิษกลุ่มที่เป็นพิษต่อเซลล์นี้เกิดจากการศึกษาค้นหาเภสัชภัณฑ์ชนิดใหม่ๆ สารออกฤทธิ์ทางการเกษตร เอนไซม์ สารปฏิชีวนะและสารต้านมะเร็ง เป็นต้น ซึ่งสามารถพบไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารออกฤทธิ์ในกลุ่มนี้ได้ร้อยละ 7 ของตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่สุ่มเก็บจากธรรมชาติ

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

2.2.1.2 กลุ่มที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต

สารพิษกลุ่มที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตนี้ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากพบว่าสารกลุ่มนี้มีพิษร้ายแรงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมทั้งเป็นสาเหตุการป่วยและการตายของสัตว์ในหลายพื้นที่ทั่วโลกตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 19 นอกจากนั้นการที่แหล่งน้ำต่างๆมีคุณภาพลดลงเรื่อยๆ ประกอบกับมีปัญหาคาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียอย่างรวดเร็วบ่อยครั้งขึ้น ทำให้นักวิทยาศาสตร์ในหลายประเทศ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา ประเทศในกลุ่มสแกนดิเนเวีย และอีกหลายประเทศในยุโรป ได้ศึกษาและพบว่าในการเกิดการเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำ จะมีโอกาสเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษถึง

ร้อยละ 40 และมีแนวโน้มว่าจะมีปัญหเพิ่มขึ้นทั้งในด้านของจำนวนครั้งที่เกิด ความกว้างขวางของพื้นที่ และระยะเวลาที่เกิด

โดยส่วนใหญ่สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียจะถูกปลดปล่อยลงสู่แหล่งน้ำเมื่อเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียแก่หรือตาย และเกิดการรั่วของผนังเซลล์ การตายของสัตว์จะเกิดจากการได้รับพิษเนื่องจากการย่อยเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียที่กินเข้าไป ซึ่งปัจจัยที่มีผลก่อให้เกิดการตายของสัตว์เมื่อได้รับสารพิษ ได้แก่

- ชนิดและปริมาณของสารพิษที่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรีย
- ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่สัตว์ได้รับ
- ชนิด เพศ และขนาดของสัตว์ที่ได้รับสารพิษ

สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นแหล่งใหญ่ของสารพิษที่พบได้ในธรรมชาติผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรียที่ลอยอยู่ในบริเวณพื้นผิวน้ำ (planktonic algae) ในสกุล *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* และ *Oscillatoria* ซึ่งได้มีการแยกและศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียเหล่านี้ไปบ้างแล้ว ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่พบว่ามีความเป็นพิษแต่ยังไม่มีการศึกษาในรายละเอียดและลักษณะโครงสร้างทางเคมี ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรียในสกุล *Coelosphaerium*, *Cylindrospermopsis*, *Fischerella*, *Gloeotrichia*, *Gomphosphaeria*, *Hapalosiphon*, *Microcoeleus*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Spirulina*, *Symploca*, *Tolypotrix* และ *Trichodesmium*

สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตสามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ

ก. สารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท (neurotoxin)

มีการพบสารพิษในกลุ่มนี้อย่างกว้างขวางในทวีปอเมริกาเหนือ สหราชอาณาจักร ประเทศในกลุ่มสแกนดิเนเวีย และประเทศออสเตรเลีย สำหรับสารพิษที่มีการศึกษา ลักษณะโครงสร้างทางเคมีแล้วมี 4 ชนิด แสดงดังตารางที่ 2.2

ข. สารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อดับ (hepatotoxin)

สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์ต่อดับสามารถพบได้ในทุกพื้นที่ทั่วโลก โดยพบว่าก่อให้เกิดความเป็นพิษในโค กระบือ แกะ ม้า สุกร เป็ด ตลอดจนสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงในบ้น จากการศึกษาความเป็นพิษในห้องทดลองโดยการทดสอบกับหนูขาว หนูถีบจักร หนูตะเภา กระต่าย และสุกร อาการแสดงออกซึ่งความเป็นพิษได้แก่ อ่อนเพลีย หดความอยากอาหาร เยื่อบุต่างๆมีสีซีด อาเจียน หนาวสั่นและท้องร่วง การตายจะเกิดขึ้นหลังจากได้รับสารพิษ 2-3 ชั่วโมง ถึง 2-3 วัน ส่วนใหญ่จะเกิดจากเลือดออกในตับ และการช็อกเนื่องจากขาดเลือดไปหล่อเลี้ยง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเซลล์ตับได้รับสารพิษจะเกิดการหดตัว ทำให้เซลล์ที่เกาะกันแน่นแยกออก หลังจากนั้นจะทำให้เกิดโลหิตคั่งมีผลเสียต่อเซลล์ตับและเกิดอาการช็อกในที่สุด (Falconer et al., 1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต

ประเภทของสารพิษ	ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ	อาการเมื่อได้รับสารพิษ	กลไกการทำงานของสารพิษ	ค่าความเป็นพิษ
<p>สารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท</p> <p>อนาโทอกซิน-เอ (anatoxin-a, antx-a)</p> <p>เป็นสารประกอบประเภทอัลคาลอยด์</p> <p>ชื่อทางเคมี : 2-acetyl-9-azabicyclo (4-2-1) non-2-ene</p>	<p>ผลิตสารพิษ</p> <p>Anabaena flos-aquae</p> <p>A. spiroides</p> <p>A. circinalis</p> <p>Aphanizomenon sp.</p> <p>Oscillatoria sp.</p>	<p>สัตว์ที่ได้รับสารพิษจะมีอาการเดินโซเซ กล้ามเนื้อเกร็งเป็นมัด หายใจหอบ ชักกระตุก ในสัตว์ปีกจะมีอาการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ ทำให้ท้องแข็งขึ้น และสัตว์จะถึงแก่ความตาย เนื่องจากการทำงานของระบบหายใจล้มเหลว</p>	<p>สามารถเลียนแบบการทำงานของ acetylcholine ซึ่งเป็นสื่อประสาทของระบบประสาท (neurotransmitter) และทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อ acetylcholinesterase เป็นตัวทำลาย acetylcholine เพื่อป้องกันการกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อที่มากเกินไป</p> <p>เมื่อ acetylcholinesterase ไม่สามารถทำลายอนาโทอกซิน-เอได้ ทำให้เกิดการเกร็งหดตัวของกล้ามเนื้อเป็นอัมพาต เมื่อเกิดกับกล้ามเนื้อของทางเดินหายใจทำให้เกิดการชักกระตุกเนื่องจากการขาดออกซิเจนไปเลี้ยงสมองและเกิดการตายเนื่องจากหายใจล้มเหลวในที่สุด</p>	<p>ค่าความเข้มข้นของอนาโทอกซิน-เอ บริสุทธิ์ ที่ทำให้จำนวนสัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่ง ภายหลังการฉีดสารพิษเข้าสู่ช่องท้อง (LD₅₀ intraperitoneal, i.p.) มีค่าประมาณ 200 ไมโครกรัมของสารพิษต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ส่วนความเข้มข้นของสารพิษที่ได้รับทางปากและทำให้สัตว์ตายจะมีค่าสูงกว่านี้</p>

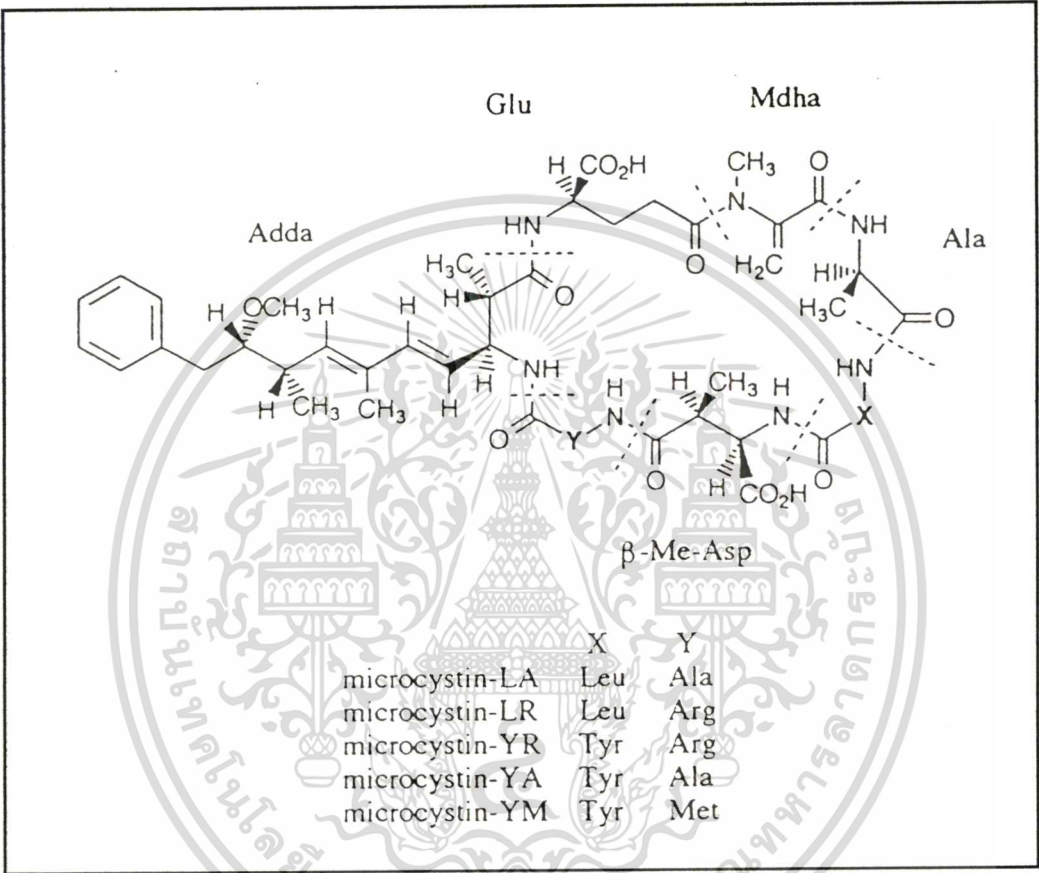
เป็นสื่อที่เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

ประเภทของสารพิษ	ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ	อาการเมื่อได้รับสารพิษ	กลไกการทำงานของสารพิษ	ค่าความเป็นพิษ
<p>- อนาโทกซิน-เอ(เอส) (anatoxin-a(s), antx-a(s)) เป็นสารประกอบ organic phosphate โดยเป็น N-hydroxyguanine methylphosphate ester</p> <p>- แซกซิโทกซิน และ นีโอแซกซิโทกซิน (saxitoxin, STX and neosaxitoxin, NEOSTX</p>	<p>Anabaena sp.</p> <p>dinoflagellate และไซยาโนแบคทีเรียในสกุล Anabaena sp. Aphanizomenon sp.</p>	<p>ทำให้เกิดน้ำลายฟูมปากในหนูทดลอง จึงได้รับการตั้งชื่อเป็น anatoxin-a(s) ซึ่ง s มาจากคำว่า salivation คือการหลั่งน้ำลาย</p> <p>ทำให้เกิดอาการเป็นอัมพาต เนื่องจากสารบริเวณรอยซึ่งกรองเอาไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษเป็นอาหาร (paralytic shellfish poison, PSP)</p>	<p>สามารถยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase ทำให้ acetylcholine ไม่ถูกทำลาย ก่อให้เกิดการกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อมากเกินไป</p> <p>สามารถออกฤทธิ์อย่างรวดเร็วต่อระบบประสาท โดยการปิดกั้น sodium channel</p>	<p>ค่าความเป็นพิษในหนูทดลอง LD₅₀ i.p. มีค่าประมาณ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หรือมีความเป็นพิษมากกว่าอนาโทกซิน-เอ 10 เท่า (Carmichael et al., 1990)</p> <p>Aphanizomenon flos-aquae สายพันธุ์ NH-5 มีความเป็นพิษต่อหนูโดยมีค่า LD₅₀ i.p. ประมาณ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 1 กรัมของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียแห้งมีสารพิษไนโอแซกซิโทกซิน 1.3 มิลลิกรัม และแซกซิโทกซิน 0.1 มิลลิกรัม (Mahmood and Carmichael, 1986)</p>

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

ประเภทของสารพิษ	โซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ	อาการเมื่อได้รับสารพิษ	กลไกการทำงานของสารพิษ	ค่าความเป็นพิษ
<p>ข. สารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อตับ (hepatotoxin)</p> <p>- สารพิษในกลุ่มไมโครซิสติน (microcystin, MCYST) โครงสร้างทางเคมี : มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 7 ชนิด (heptapeptide) แสดงในรูปที่ 2.3</p> <p>- สารพิษในกลุ่มโนดูลาริน (nodularin, NODLN) โครงสร้างทางเคมี : มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 5 ชนิด (pentapeptide)</p>	<p>สารพิษ</p> <p>ค้นพบเป็นครั้งแรกจาก <i>Microcystis aeruginosa</i> สายพันธุ์ NRC-1 (Bishop et al., 1959)</p> <p><i>Nodularia spumigena</i></p>	<p>เป็นพิษต่อเซลล์ตับ และเป็นตัวเร่งให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของอัตราการเกิดมะเร็งในตับสูง</p> <p>เป็นพิษต่อเซลล์ตับและเป็นตัวเร่งให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง</p>	<p>สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนฟอสฟาเทส PP1 และ PP2A (protein phosphatase PP1 และ PP2A) (Matsushima, 1990) ซึ่งมีความสำคัญต่อการควบคุมเมแทบอลิซึมต่างๆ เช่น เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต การแบ่งเซลล์ และการยึดตัวของกล้ามเนื้อ</p> <p>กลไกการทำงานคล้ายกับสารพิษในกลุ่มไมโครซิสติน สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนฟอสฟาเทส PP1 และ PP2A (protein phosphatase PP1 และ PP2A)</p>	<p>สารพิษในกลุ่มไมโครซิสตินทุกตัวจะมีค่าความเป็นพิษ LD₅₀ i.p. ในหนูทดลองระหว่าง 60-70 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้น MCYST-RR, demethylated toxin D-Asp และ Dha จะมีค่าความเป็นพิษ LD₅₀ i.p. ในหนูทดลองระหว่าง 200-250 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม</p> <p>มีค่าความเป็นพิษ LD₅₀ i.p. ในหนูทดลองระหว่าง 30-50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Kaya and Watanabe, 1994)</p>



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารพิษที่ออกฤทธิ์ทำลายตับในกลุ่มไมโครซิสติน (ที่มา : Botes et al., 1985)

ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเคมีแล้ว ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรียในสกุล *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria* และ *Nostoc* สำหรับไซยาโนแบคทีเรียที่มีการผลิตสารพิษแต่ยังไม่มีการศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารพิษ ได้แก่ *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* และ *Coelosphaerium* สารพิษที่พบส่วนใหญ่จะมีสูตรโครงสร้างเป็นวงแหวนเพปไทด์ (cyclic-peptide) ซึ่งสารพิษที่พบและมีการศึกษาแล้วมีอย่างน้อย 53 ชนิด ชนิดที่พบบ่อยและมีความสำคัญ แสดงดังตารางที่ 2.2

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.3.1 ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง โดยจะมีผลต่อการเจริญเติบโต และองค์ประกอบทางเคมีของไซยาโนแบคทีเรีย

2.3.1.1 อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญและกิจกรรมของไซยาโนแบคทีเรียมี 2 ประการ คือ ประการแรก ผลของอุณหภูมิต่อองค์ประกอบของโครงสร้างของเซลล์ โดยเฉพาะโปรตีนและไขมัน ประการที่สอง คือ ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเซลล์ในแง่ของการกระตุ้นพลังงานในปฏิกิริยาต่างๆ ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบที่ตามมา เช่น อิทธิพลของอุณหภูมิต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ และปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจง นอกจากนี้ยังมีผลต่อความสามารถในการให้สารผ่านเข้า-ออกของเซลล์และองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ (Pirt, 1975)

ก. อิทธิพลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

จากการศึกษาการตอบสนองต่ออุณหภูมิของไซยาโนแบคทีเรีย (Payer *et al.*, 1980) พบว่า เมื่ออุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงไปจากอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต อัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียจะลดลงในช่วงอุณหภูมิที่สูงขึ้นเกินกว่าที่กระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์จะรับได้ มีผลทำให้การเจริญลดลงและตายในที่สุด โดยอัตราการตายส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูง เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียมีพลังงานกระตุ้นภายในเซลล์สูง และพบว่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเป็นสาเหตุทำให้โครงสร้างของโปรตีนรวมทั้งสารอาหารและกลไกในการควบคุมพลังงานเสียหาย

ข. อิทธิพลของอุณหภูมิต่อองค์ประกอบทางเคมีของไซยาโนแบคทีเรีย

อุณหภูมิมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของไซยาโนแบคทีเรีย โดยพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อส่วนประกอบและการสังเคราะห์กรดไขมัน ซึ่งจะพบการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลของกรดไขมันในไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์ รวมทั้งกรดไขมันจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิลดลงและจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น นอกจากนี้อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมยังมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในเซลล์ลดลงกว่าปกติอีกด้วย

2.3.1.2 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

ความเป็นกรดเป็นด่างเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่ง ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญได้ในระดับความเป็นกรดเป็นด่างที่แตกต่างกัน และจะมีความสัมพันธ์ต่อความสามารถในการใช้สารอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปของอนินทรีย์คาร์บอนในน้ำ ซึ่งระบบของอนินทรีย์คาร์บอนในน้ำ ได้แก่ CO_2 , HCO_3^- และ CO_3^{2-} จะมีผลต่อความเป็นกรดเป็นด่าง โดยไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีที่ความเป็นกรดเป็นด่างในช่วง 7.5-11 เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียสามารถใช้อนินทรีย์คาร์บอนในการสังเคราะห์แสงได้ (Coleman and Colman, 1981)

2.3.2 ปัจจัยทางเคมี การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งอาหารหรือธาตุอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่

2.3.2.1 คาร์บอน (carbon)

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถใช้คาร์บอนในรูปของอนินทรีย์คาร์บอนและอินทรีย์คาร์บอน

- อนินทรีย์คาร์บอน (inorganic carbon) จากการที่ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถเจริญได้ที่ระดับความเป็นกรดเป็นด่างต่างกันซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับคาร์บอนในน้ำ เช่น เมื่อความเป็นกรดเป็นด่างมีค่าประมาณ 5 คาร์บอนจะอยู่ในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และเมื่ออยู่ในช่วง 7-9 คาร์บอนจะอยู่ในรูปของเกลือไบคาร์บอเนต และเมื่อความเป็นกรดเป็นด่างมีค่าสูงกว่า 9.5 ขึ้นไป คาร์บอนจะอยู่ในรูปของเกลือคาร์บอเนต

- อินทรีย์คาร์บอน (organic carbon) ไซยาโนแบคทีเรียจะใช้คาร์บอนประเภทอินทรีย์ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต เช่น ซูโครส กลูโคส และกาแล็กโทส เป็นต้น ไซยาโนแบคทีเรียมีความต้องการสารประกอบคาร์บอนแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย

2.3.2.2 ไนโตรเจน (nitrogen)

ไนโตรเจนมีความสำคัญรองจากคาร์บอนในเชิงปริมาณ ส่วนประกอบของเซลล์จะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 7-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Vaccaro, 1965)

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งในรูปของสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ นอกจากนี้เอกสารนี้เป็นเอกสารทสวงนวิสาห์การแข่งงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญูาตเหนาไปเซประเษนดานการค้ำ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นยังสามารถใช้ในโตรเจนในรูปของแก๊สจากการตรึงไนโตรเจนได้อีกด้วย ไชยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของเกลืออนินทรีย์ ได้แก่ ไนเตรต (NO_3^-), ไนไตรต์ (NO_2^-), แอมโมเนีย (NH_4^+) และยูเรียได้จนถึงกรดอะมิโน

เมื่อแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเลี้ยงไชยาโนแบคทีเรียอยู่ในรูปของแอมโมเนีย จะทำให้ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออนออกมาจากกระบวนการดูดซึมแอมโมเนียเข้าไปในเซลล์ ซึ่งจะมีผลยับยั้งการเจริญของไชยาโนแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงไม่ควรใช้แอมโมเนียเกินกว่า 1 มิลลิโมล ทั้งนี้รวมถึงปริมาณไนไตรต์ด้วยเช่นกัน (Morris, 1974) และจากความเป็นพิษของสารประกอบดังกล่าวจึงทำให้ไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมและนิยมใช้ที่สุดในการเพาะเลี้ยงไชยาโนแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามอาจมีปัญหากับค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เพิ่มขึ้น แต่โดยทั่วไปไชยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญและทนต่อสภาพที่เป็นด่างได้ดีกว่าสภาพที่เป็นกรด

ในกรณีที่ไชยาโนแบคทีเรียเกิดการขาดไนโตรเจนในระหว่างการเจริญไชยาโนแบคทีเรียสามารถนำสารประกอบไนโตรเจนที่สะสมไว้ภายในเซลล์มาใช้ ซึ่งอยู่ในรูปของไชยาโนไฟซินแกรนูล (cyanophycin granule) และไฟโคไซยานิน (phycocyanin) (Allen and Smith, 1969; Stewart and Lex, 1970) มีผลทำให้ปริมาณไนโตรเจนในเซลล์ลดลง ในขณะที่เดียวกันก็มีการสะสมของแป้งและไขมันเพิ่มมากขึ้น (Rodriguez et al., 1980) ภายใต้สภาวะที่ขาดธาตุไนโตรเจนเช่นนี้ทำให้เกิดผลกระทบที่ตามมาคือ ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงลดลงและเป็นผลทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลงด้วยเช่นกัน (Fogg, 1966)

2.3.2.3 ฟอสฟอรัส (phosphorus)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นอีกชนิดหนึ่งสำหรับการเจริญเติบโตของไชยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากฟอสฟอรัสมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดพลังงานและการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยทั่วไปในแหล่งน้ำตามธรรมชาติจะมีปริมาณฟอสฟอรัสอยู่ในรูปของอินทรีย์ฟอสฟอรัสมากกว่าอนินทรีย์ฟอสฟอรัส ซึ่งสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสจัดเป็นแหล่งเบื่องต้นของฟอสฟอรัสที่ไชยาโนแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ (Goldman et al., 1974) นอกจากนี้ปริมาณความต้องการฟอสเฟตของไชยาโนแบคทีเรียจะแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของไชยาโนแบคทีเรียและสภาพแวดล้อม ได้แก่ ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำ ความเป็นกรดเป็นด่าง แสง และปริมาณของธาตุอาหารชนิดอื่นๆ ได้แก่ โซเดียม โพแทสเซียม หรือ แมกนีเซียม

กรณีที่ไชยาโนแบคทีเรียขาดฟอสฟอรัส จะแสดงอาการคล้ายกับการขาดธาตุไนโตรเจน ซึ่งจะเป็นผลเสียต่อการเจริญเติบโตและทำให้องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง ได้แก่ ปริมาณโปรตีน คลอโรฟิลล์ เอ อาร์เอ็นเอ และดีเอ็นเอจะลดลง ในขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตจะเพิ่มขึ้น โดยรวมแล้วปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดภายใน

เซลล์จะค่อยๆ ลดลง และเมื่อมีการขาดฟอสฟอรัสอย่างรุนแรง อาจมีผลทำให้ขนาดและรูปร่างของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Healey, 1982)

- ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียที่ขาดธาตุอาหาร (ลัดดา, 2540)

1) ปริมาณรงควัตถุสำหรับใช้ในการสังเคราะห์แสงลดลง จากการศึกษารายงานของ Healey (1973) พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ จะลดลงและปรากฏว่าสีของเซลล์ซีดจางลง ซึ่งเป็นผลมาจากการขาดธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ ซิลิกา แมกนีเซียม เหล็ก โพแทสเซียม และโมลิบดีนัม

2) เซลล์มีการสะสมอาหารเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ เช่น มีการสะสมแป้ง ไขมัน และ โปรตีนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการสะสมแป้งหรือแป้งกับไขมันจะเกิดขึ้นเมื่อไซยาโนแบคทีเรียขาดธาตุอาหารบางชนิดหรือหลายชนิด โดยจะไปมีผลยับยั้งการสังเคราะห์องค์ประกอบและโครงสร้างของเซลล์

3) เซลล์มีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนลดลง ซึ่งเป็นผลต่อเนื่องมาจากการที่เซลล์มีการสะสมแป้งหรือไขมันลดลง

2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างไซยาโนแบคทีเรียกับสิ่งมีชีวิตอื่น

2.4.1 การอยู่ร่วมกันระหว่างไซยาโนแบคทีเรียกับสิ่งมีชีวิตอื่น

ไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย ฟีช หรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยสิ่งมีชีวิตทั้ง 2 ชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกันมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพา (symbiosis หรือ syncyanosis) เช่น *Richelia intracellularis* อาศัยอยู่ในเซลล์ของไดอะตอม *Rhizosolenia* sp. ส่วน *Nostoc symbioticum* อาศัยอยู่ร่วมกับสาหร่ายสีเขียว (siphonous green alga) *Geosiphon pyriformis* นอกจากนี้ยังพบไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Lyngbya*, *Calothrix*, *Phormidium* และ *Cyanodictyon*

จากการศึกษาของ Overbeck (1975) พบว่าสารอินทรีย์และอนุภาคของสารอินทรีย์ที่ละลายได้ มีผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างแพลงก์ตอนพืชกับแบคทีเรีย รวมทั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ ต่อมา Simidu และคณะ (1971) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบแบคทีเรียที่แยกได้จากแพลงก์ตอนพืชกับแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเล พบว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากแพลงก์ตอนจะเป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* หรือ *Aeromonas* ในขณะที่ตัวอย่างน้ำทะเลจะพบแบคทีเรียในกลุ่มนี้เพียง 45 เปอร์เซ็นต์ โดย *Vibrio* และ *Aeromonas* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำและแยกได้จากผิวหนังของปลา

Berland และคณะ (1972) มีรายงานการศึกษาจุลินทรีย์ที่แยกได้จากการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช พบว่าส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas*, *Flavobacterium* และ *Achromobacter* โดยจุลินทรีย์จะมีความสัมพันธ์กับแพลงก์ตอนพืชอย่างมีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเพาะเจาะจง ต่อมา Caldwell (1978) รายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกับไซยาโนแบคทีเรียที่มีการผลิตเมือก (mucus) โดยพบว่าในระหว่างที่เกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย จะพบแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถเจริญได้โดยอาศัยอยู่ในเมือกของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น *Anabaena* sp. กับ *Zooglea* sp. นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่เป็น microflora และมีความจำเพาะเจาะจงกับ *Anabaena* sp. โดยพบว่าแบคทีเรียจะเกาะอยู่กับเฮทเทอโรซิสต์ของ *Anabaena* sp. ซึ่งแบคทีเรียสามารถใช้สารที่ไซยาโนแบคทีเรียผลิตขึ้นและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular product) เป็นแหล่งคาร์บอน (Paerl, 1978)

2.4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างไซยาโนแบคทีเรียกับยูแบคทีเรีย (eubacteria)

เมื่อสภาพแวดล้อมมีอินทรีย์สารอย่างเพียงพอเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียอาจมีผลต่อสภาพแวดล้อมในการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น ปริมาณออกซิเจน และความเป็นกรดเป็นด่าง ซึ่งมีผลมาจากกระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้นในแหล่งน้ำ ได้แก่ กระบวนการสร้างกรดอินทรีย์และกระบวนการออกซิเดชันสารประกอบต่างๆ เช่น แอมโมเนีย, ไดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Cole, 1982)

- การยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียโดยแบคทีเรีย

Mankaeva (1966) มีรายงานเกี่ยวกับ aquatic bacteria ที่เป็นสาเหตุทำให้เซลล์สาหร่ายถูกทำลาย เช่น vibrio-shaped bacterium เป็นสาเหตุทำให้เซลล์ของ *Chlorella* sp. เกิดการแตก (lysis) แต่ไม่มีผลต่อ *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Scotiella* และ *Chlorococccum* ต่อมา Stewart และ Brown (1969) พบว่า nonfilterable agent จาก *Cytophaga* sp. และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นสามารถทำให้เซลล์ของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดเกิดการแตก

Shilo (1970) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทำให้ไซยาโนแบคทีเรียชนิดที่เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) และ เส้นสาย (filament) เกิดการแตกของเซลล์ โดยการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียซึ่งแยกได้จากบ่อปลาที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย โดยการบ่มร่วมกับ *Plectonema boryanum* แบคทีเรียที่แยกได้พบว่าเป็น myxobacteria จากการทดสอบบนอาหารแข็งพบว่า myxobacteria สามารถทำให้เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเกิดการแตกได้อย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับในอาหารเหลว แต่จะไม่เกิดการแตกของเซลล์เมื่อทดสอบในอาหารเหลวแบบเขย่า และจากการสังเกตการแตกของเซลล์อย่างต่อเนื่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟส (phase contrast) พบว่า myxobacteria จะมีผลต่อการแตกของเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย โดยไม่มีผลต่อเฮทเทอโรซิสต์

Granhall (1972) รายงานถึงปัจจัยที่มีผลต่อการทำให้เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียเกิดการแตก ได้แก่ ความสามารถในการละลาย การทนความร้อน เช่น *Bdellovibrio* สามารถผลิตสารที่ละลายได้และทนความร้อนในระหว่างการเจริญ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์

ของ *Phormidium* เกิดการแตก (Burnham, 1976) นอกจากนี้ *Bdellovibrio* ยังมีความสามารถในการเป็นปรสิตกับแบคทีเรียอื่น (Starr, 1975; Stolp and Starr, 1963) โดยอาศัยการแทงผ่าน (penetrate) เข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

Berland และคณะ (1972) มีการศึกษากลไกของการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียโดยแบคทีเรีย ที่ผ่านมามีรายงานถึงสารที่ละลายได้ (soluble substances) ที่ผลิตโดย *Pseudomonas*, *Flavobacterium* และ *Xanthomonas* ซึ่งมีผลยับยั้งหรือกระตุ้นการเจริญของสาหร่ายชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ผลของแบคทีเรียต่อการเจริญของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดจากการทดสอบบนอาหารแข็ง^a

สาหร่าย และไซยาโนแบคทีเรีย	แบคทีเรีย		
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Xanthomonas</i>
<i>Oscillatoria</i> sp.	+	+	+
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	-	0	+
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	+	+	-
<i>Anabaena flos-aquae</i>	+	0	0
<i>Euglena gracilis</i>	-	0	-
<i>Haematococcus lacustri</i>	0	+	+
<i>Botrydopsis arrhiza</i>	-	+	+

หมายเหตุ :
^a : แบคทีเรียแยกได้จากการเพาะเลี้ยง *Oscillatoria*
 + : ส่งเสริมการเจริญ
 - : ยับยั้งการเจริญ
 0 : ไม่มีผลต่อการเจริญ

ที่มา : Delucca and McCracken, 1978

Daft และคณะ (1973) ได้ศึกษากลไกในการทำละลายเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียในสภาพธรรมชาติ โดยพบว่าการที่แบคทีเรียเข้าเกาะกับเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียเป็นขั้นตอนหนึ่งของการทำให้เซลล์แตกโดย myxobacteria สายพันธุ์ CP-1 นอกจากนี้อาจมีสาเหตุมาจากไลโซไซม์ของแบคทีเรีย ซึ่ง myxobacteria สายพันธุ์ CP-1 สามารถทำให้เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเกิดการแตกได้ แต่จะไม่มีผลหรือมีผลเพียงส่วนน้อยต่อเฮทเทอโรซีสต์จากการทดสอบในอาหารเหลวในสภาวะนิ่งหรือบนอาหารแข็ง พบว่าความรวดเร็วของการ

แตกของเซลล์ขึ้นอยู่กับ การเข้าเกาะ (attachment) และ การตอบสนองต่อการกระตุ้นทางเคมี (chemotaxis) อย่างไรก็ตามพบว่า การกวนในระหว่างการเพาะเลี้ยงจะเป็นการป้องกันการแตกของเซลล์ (Daft et al, 1975)

Gunnison (1975) ได้แยกแบคทีเรียจากการทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อบน algal lawn ของไซยาโนแบคทีเรีย พบว่า lytic bacteria มีความสามารถในการทำลายเซลล์ของ *Anabaena*, *Anacystis*, *Ankistrodesmus*, *Chlamydomonas* แต่ไม่มีผลต่อ *Staurastrum*, *Calothrix*, *Chlorella*, *Fischerella* และ *Pediastrum* นอกจากนี้ยังพบว่า โดยทั่วไปสาหร่ายจะมีความต้านทานต่อการแตกของเซลล์ เนื่องจากมีผนังเซลล์ซึ่งทำให้ยากต่อการถูกทำลายโดยเอนไซม์ นอกจากนี้ Darveau และคณะ (1977) มีรายงานการศึกษาสาร prodigiosin ที่ผลิตโดย *Serratia marcescens* ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย

จากการศึกษาของ Fogg (1966; 1971); Watt และ Fogg (1966) พบว่า แพลงก์ตอนพืชจะมีการปล่อยสารประกอบที่ละลายได้ (soluble compounds) ออกมาในระหว่างการเจริญ เช่น *Chlamydomonas reinhardtii* จะปล่อยสารที่สามารถย่อยผนังเซลล์ โดยเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรต (soluble carbohydrates) (Solter and Gibor, 1977) ซึ่งกระบวนการต่างๆ เช่น การแตกของเซลล์ (lysis) การปลดปล่อยสารออกมาภายนอกเซลล์ (excretion) การกินสิ่งมีชีวิตอื่นเป็นอาหาร (grazing) และ กระบวนการออโตไลซิส (autolysis) อาจมีผลต่อการปล่อยสารอินทรีย์คาร์บอนที่ละลายได้ อย่างไรก็ตามแม้จะไม่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่ชัดเจนของสารที่ปล่อยออกมา ซึ่งอาจเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Wiebe and Smith, 1977) หรือสารประกอบบางอย่าง เช่น ไกลโคเลต (Shah and Wright, 1974) ซึ่งจะถูกเมแทบอลิซึมโดยแบคทีเรีย แต่จะไม่มีผลกระทบหรือก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในสภาพธรรมชาติ (Lee, 1978; Tanaka, 1974; Wright, 1975)

Nalewajko (1976) ได้ศึกษาสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนที่ *Oscillatoria redekei* ปล่อยออกมาและถูกเมแทบอลิซึมโดย *Flavobacterium* หรือ *Lactobacillus* ซึ่งความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้สารประกอบอินทรีย์คาร์บอนที่ปล่อยออกมาจะเป็นตัวควบคุมอัตราการปล่อยสารออกมาภายนอกเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่า สารที่ไซยาโนแบคทีเรียปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ในระหว่างการเจริญยังมีผลต่อเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียในสภาพธรรมชาติอีกด้วย

Iturriaga และ Hoppe (1977) ศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสาหร่ายพวกแพลงก์ตอนทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในสภาพธรรมชาติ พบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการเมแทบอลิซึมสารอินทรีย์บางชนิดจากเซลล์สาหร่ายที่ตายแล้ว ต่อมา Keating (1978) มีรายงานว่าแบคทีเรียมีผลกระทบต่อปริมาณแพลงก์ตอนพืชและสารอินทรีย์ที่แพลงก์ตอนพืชผลิตขึ้นอาจจะมีการเปลี่ยนรูปหรือถูกเมแทบอลิซึม โดยเมื่อเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียตายจะมีการปล่อยสารอินทรีย์ที่ละลายได้ ประมาณ 20-50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณสารอินทรีย์ภายในเซลล์ (Botan et al, 1960; Cole et al, 1982; Depinto, 1977; Motohashi, 1968; Waksman et al, 1937) ซึ่งการปล่อยสารออกจากเซลล์ อาจมีสาเหตุมาจากกระบวนการต่างๆ เช่น กระบวนการออโตไลซิส (autolysis) (Golterman, 1964) กระบวนการละลาย (dissolution) (Cole, 1982) และกลไกการทำลาย โดยสิ่งมีชีวิตที่กินไซยาโนแบคทีเรียเป็นอาหาร

Sugiura (1993) มีรายงานการศึกษาผลของ *Pseudomonas* sp. ต่อการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* พบว่าเซลล์ของ *M. aeruginosa* ถูกทำลายได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลาที่ทำการทดสอบ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแตกของเซลล์ของ *M. aeruginosa* อยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7 โดยกำจัดเซลล์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลง 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.5 การควบคุมและกำจัดไซยาโนแบคทีเรีย

วิธีการที่ใช้ในการควบคุมการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียโดยตรงมี 3 วิธี (Morris et al., 1992) คือ

2.5.1 การควบคุมโดยวิธีทางเคมี

2.5.1.1 การใช้สารประกอบของโลหะ เป็นวิธีการที่นิยมใช้มากที่สุดสำหรับการกำจัดไซยาโนแบคทีเรีย มีการศึกษาถึงการใช้สารประกอบทองแดง ซึ่งปกติจะอยู่ในรูปของคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) โดยมีอัตราการใช้สำหรับการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียอยู่ในช่วง 0.1-0.5 พีพีเอ็มในรูปของคอปเปอร์ซัลเฟต หรือ 0.03-0.05 พีพีเอ็มในรูปของคอปเปอร์ไอออน (Salvato, 1972) จากการเปรียบเทียบพบว่าต้องใช้ความเข้มข้นประมาณ 10 เท่า ในการควบคุมสาหร่ายพวงกุศริโอต (eukaryotic algae) ในปัจจุบัน สารฆ่าสาหร่ายส่วนมากจะเป็นพวกสารประกอบอินทรีย์ของคอปเปอร์ ซึ่งใช้สำหรับการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายพวงกุศริโอต แสดงดังตารางที่ 2.4 เช่น การใช้ ricetrine สำหรับการควบคุมการเจริญของสาหร่ายในนาข้าว ถึงแม้ว่าไซยาโนแบคทีเรียจะมีความไวต่อธาตุทรานสิชันและโลหะหนักแต่ไม่ควรนำมาใช้ในการควบคุมเนื่องจากมีผลในทางที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ในปี 1930 มีการใช้สารประกอบเงินในการกำจัดไซยาโนแบคทีเรียในสระว่ายน้ำและเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โลหะหนักชนิดอื่นกับไซยาโนแบคทีเรีย เช่น พรอท พบว่ามีความเป็นพิษสูงต่อแบคทีเรีย (Fogg et al., 1973; Salvato, 1972)

2.5.1.2 การใช้สารเคมีอื่นๆ มีการใช้สารออกซิไดซ์ เช่น โอโซน คลอรีน ในแหล่งน้ำ สระว่ายน้ำ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งที่กว้าง และการเติมคลอรีน (chlorination) อาจมีผลต่อการเกิดสารก่อมะเร็ง (carcinogenic organic compound) จากตัวเลขพบว่าการเติมคลอรีน 1 พีพีเอ็ม เป็นค่าที่ยอมรับได้ในการกำจัดแพลงก์ตอนและไซยาโนแบคทีเรีย โดยปกติคลอรีนที่มีในแหล่งน้ำจะอยู่ในรูป Cl_2 ClO_2 และ ClO^- เมื่อรวมตัวกับน้ำจะเกิดเป็น HClO และเมื่อ HClO แตกตัว แสดงได้ดังสมการ



การสลายตัวของ HClO ขึ้นอยู่กับความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ เช่น ความเป็นกรดเป็นด่างที่ 6 และ 9 จะมีการแตกตัวของ HClO เป็น 4 และ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งความเป็นพิษของ HClO จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอัตราการใช้สารเคมี ความเป็นกรดเป็นด่าง และปัจจัยอื่นๆ

สำหรับการใช้โอโซนในการกำจัดไซยาโนแบคทีเรียและแพลงก์ตอนอื่นๆ มีอัตราการใช้ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.0467 ลูกบาศก์เซนติเมตร STP โอโซนต่อลิตร ส่วนการใช้เปอร์แมงกาเนต ถึงแม้ว่าแมงกานีสและซิลิเนียมจะมีความเป็นพิษต่ำ แต่ปริมาณของเปอร์แมงกาเนตที่ใช้ควบคุมไซยาโนแบคทีเรียจะไปมีผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่อยู่ในแหล่งน้ำ เช่น ปลา

2.5.1.3 การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช (pesticides) ไซยาโนแบคทีเรียค่อนข้างมีความไวต่อสารกำจัดศัตรูพืชในช่วงกว้าง ถึงแม้ว่าไซยาโนแบคทีเรียจะมีความไวต่อสารกำจัดวัชพืช (herbicides) ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์แสง (photosynthesis inhibitor) แต่ยังไม่สามารถนำไปใช้ในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียได้อย่างเฉพาะเจาะจง เช่น endothall เป็นสารกำจัดวัชพืชชนิดที่มีการใช้ในทางการค้าสำหรับควบคุม cryptogam บนพื้นผิว แสดงดังตารางที่ 2.4 ส่วนการใช้ propanyl , 3,4-dichloroaniline และ 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งไซยาโนแบคทีเรียได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีอัตราการใช้ที่ระดับความเข้มข้น 1 พีพีเอ็ม นอกจากนี้ยังมีการใช้ ethionine ที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่า 10 พีพีเอ็ม แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารดังกล่าวเป็นสารก่อมะเร็งที่รุนแรง

ตารางที่ 2.4 สารเคมีที่มีคุณสมบัติในการควบคุมและกำจัดสาหร่าย

กลุ่มของสารเคมีและชื่อทางการค้า	ผู้ผลิต
1. Cu-ethanolamine complexes Aquatrine Cutrine-Plus Stocktrine II	Applied Biochemist, Inc. Applied Biochemist, Inc. Applied Biochemist, Inc.
2. Cu-triethanolamine complexes Algae-Rhap Cu-7 A&V -70 K-Tea Ricertrine (California registration for rice- field use)	CP Chemicals A&V, Inc. Kocide Chemical Co. Applied Biochemists, Inc.
3. Cu-ethylenediamine complexes Komeen	Kocide Chemical Co.
4. Salts of fatty acids (for control of cryptogams on solid surfaces) DeMoss Cryptocidal Soaps	Safer Agro-Chem, Inc.
5. Dyes, soluble (plankton inhibitors) Aquashade	Aquashade, Inc.
6. Organic herbicides, suitable for plankton control Endothall Weedtrine-Plus (mixture of Endothall and Cu-ethanol amine complex, California registration only)	Pennwalt Corp. Applied Biochemists, Inc.

ที่มา : Morris *et al.*, 1992

2.5.2 การควบคุมทางชีวภาพ

2.5.2.1 สารปฏิชีวนะ (antibiotics) หมายถึง สารประกอบอินทรีย์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ที่สามารถที่จะยับยั้งการเจริญหรือฆ่าจุลินทรีย์อื่นๆได้ โดยใช้ในปริมาณที่ต่ำและจะไม่รวมถึงสารสกัดจากพืชหรือแหล่งอื่นที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ ปัจจุบันยาปฏิชีวนะจะรวมถึงสารสังเคราะห์ที่ใช้อย่างกว้างขวางเป็นต้นแบบด้วย (ดวงพร 2530)

มีการนำสารปฏิชีวนะมาใช้ในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย เพื่อลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามได้มีการทดสอบความไวของไซยาโนแบคทีเรียต่อสารปฏิชีวนะ พบว่าไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆมีความไวต่อสารปฏิชีวนะในช่วงที่กว้าง ซึ่งสารปฏิชีวนะที่มีการนำมาใช้ เช่น penicillin, streptomycin, polymycin B, terramycin และ tetracycline เป็นต้น แสดงดังตารางที่ 2.5

2.5.2.2 สิ่งมีชีวิตที่กินสาหร่ายเป็นอาหาร (predators) มีการศึกษาเปรียบเทียบการพัฒนากลไกในการป้องกันตัวเองของไซยาโนแบคทีเรียจากการถูกกินเป็นอาหาร และศึกษาการกำจัดไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายพวกยูคาริโอต รวมทั้งความเป็นไปได้ในการนำไปใช้กำจัดในสภาพแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยสิ่งมีชีวิตที่กินสาหร่ายเป็นอาหารที่ได้มีการศึกษา ได้แก่ โปรโตซัว ไส้เดือนฝอย ไร หนอน และ ลูกอ๊อด (Taylor *et al.*, 1983; Morris *et al.*, 1992)

2.5.2.3 ฟาจ (phages) การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมอาจใช้ไซยาโนฟาจ (cyanophage) โดยการแยกและคัดเลือกจากสภาพธรรมชาติ ซึ่งจะมีความเฉพาะเจาะจงกับไซยาโนแบคทีเรีย (Barnet *et al.*, 1981; Hu *et al.*, 1981) อย่างไรก็ตามยังไม่มีให้นำไซยาโนฟาจไปใช้ในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียอย่างจริงจัง เนื่องจากเป็นการยากต่อการนำไปใช้ในการควบคุมโดยชีววิธี (biological control)

2.5.2.4 จุลินทรีย์สาเหตุโรค (pathogens) มีรายงานการศึกษาการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย โดยใช้จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคได้แก่ รา ไวรัส และ แบคทีเรีย (Fogg *et al.*, 1973) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งของการควบคุมการเจริญเติบโตและแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียโดยชีววิธี แสดงดังตารางที่ 2.6 นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการใช้จุลินทรีย์โดยเฉพาะการใช้แบคทีเรียในการควบคุมโดยชีววิธีอย่างต่อเนื่อง

2.5.3 การควบคุมโดยใช้วิธีทางกายภาพ

มีรายงานการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสำหรับใช้ในการควบคุมการเจริญของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย ที่เกิดขึ้นกับโบราณสถาน (Van der Mollen *et al.*, 1978) แต่อย่างไรก็ตามวิธีการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตยังมีข้อบกพร่องในส่วนของการนำไปใช้ เนื่องจากจะไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในรอยแยกของหินหรือกำแพง

ตารางที่ 2.5 สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย

สารปฏิชีวนะ	สาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย	ความเข้มข้นที่ใช้(พีพีเอ็ม)	อ้างอิง
Penicillin G	<i>Anabaena variabilis</i>	0.1	Galloway และ Krauss (1959)
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	1000.0	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	2.0	
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	1000.0	
Penicilin B	<i>Anabaena variabilis</i>	5.0	Foter et al., 1953
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	5.0	
	<i>Chlorella variegata</i>	2.0	
	<i>Cylindrospermum licheniforme</i>	2.0	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	2.0	
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	40.0	
	Streptomycin	<i>Anabaena variabilis</i>	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		10.0	
<i>Cylindrospermum licheniforme</i>		2.0	
<i>Microcystis aeruginosa</i>		2.0	
<i>Nitzschia</i>		2.0-4.0	
<i>Nostoc</i>		2.0	
<i>Phormidium</i>		2.0	
<i>Scenedesmus obliquus</i>		1.0	
Terramycin	<i>Anabaena variabilis</i>	10.0	Foter et al., 1953
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	1000.0	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	2.0	
	<i>Nitzschia</i>	233.0	
	<i>Nostoc</i>	233.0	
	<i>Phormidium</i>	58.0-117.0	
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	1000.0	
Tetracycline	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	1000.0	Galloway และ Krauss (1959)
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	1000.0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 จุลินทรีย์สาเหตุโรคที่ใช้ในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย

จุลินทรีย์สาเหตุโรค	ไซยาโนแบคทีเรีย
<p>เชื้อรา</p> <ul style="list-style-type: none"> -Chytrids (Chytridiaceae) จัดอยู่ใน Blastocladales -<i>Chytridium cornutum</i> -<i>Blastocладиella anabaenae</i> (Blastocladiales) -<i>Rhizosiphon crassum</i> -<i>Phylyctidium anabaenae</i> -<i>Rhizosiphon akinetum</i> 	<p><i>Anabaena</i>, <i>Aphanizomenon</i> <i>Gomphosphaeria</i>, <i>Lyngbya</i> <i>Microcystis</i>, <i>Oscillatoria</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Anabaena flos-aquae</i>, <i>A. circinalis</i>, <i>A. solitaria</i> <i>Anabaena</i>, <i>A. solitaria</i> <i>Anabaena shaerica</i>, <i>A. spiroides</i>, <i>A. macrospora</i> <i>Anabaena affinis</i>, <i>A. macrospora</i></p>
<p>ไวรัส</p> <ul style="list-style-type: none"> -ฟาจ -ฟาจ C-1 -ฟาจ AR-1 -ไวรัส LPP-1 -ไวรัส SM-1 <p>แยกจาก <i>Synechococcus elongatus</i></p>	<p><i>Spirochaeta rosea</i> และ non photosynthetic cyanobacteria <i>Cylindrospermum</i> <i>Anabaenopsis raciborskii</i> <i>Anabaena circinalis</i> <i>Lyngbya</i>, <i>Phormidium</i>, <i>Plectonema</i> <i>Microcystis pulverea</i></p>
<p>แบคทีเรีย</p> <ul style="list-style-type: none"> -gram negative bacteria แยกจากบ่อปลา 	<p>ทำลายเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย รวมทั้ง <i>Synechococcus</i> sp. <i>Coccochloris peniocyctis</i> <i>Plectonema boryanum</i> <i>Nostoc</i> sp.</p>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

จุลินทรีย์สาเหตุโรค	ไซยาโนแบคทีเรีย
<p>-Myxobacterales</p> <p>-Cytophaga</p> <p>-FP-1</p>	<p>ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว</p> <p>ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว</p> <p><i>Nostoc</i> sp. 6305</p> <p><i>Plectonema boryanum</i></p> <p><i>Oscillatoria prolifera</i></p> <p><i>Spirulina platensis</i></p> <p><i>S. tenuis</i></p>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมีสำหรับเลี้ยงเชื้อยาโนแบคทีเรีย (analytical grade) ของ Fluka Merck และ Sigma

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ของ Difco

3.1.3 อุปกรณ์จำแนกชนิดแบคทีเรียระบบเอพีไอ (API) ของ bioMérieux

3.1.4 จานเพาะเชื้อพลาสติก (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ของ Bibby Sterilin

3.1.5 แผ่นกรองเมมเบรน (membrane filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ของ Whatman

3.1.6 ชุดกรอง (Swinex W/O Filter) ของ Millipore

3.1.7 ชุด Sep-Pak C₁₈ Cartridge ของ Millipore

3.1.8 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ของ Olympus รุ่น BX50

3.1.9 กล้องถ่ายภาพติดกล้องจุลทรรศน์ ของ Olympus รุ่น C-35AD-4 และ ชุดควบคุมการถ่ายภาพ (exposure control unit) ของ Olympus รุ่น PM-C35DX

3.1.10 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของ Mettler Toledo รุ่น MP 225

3.1.11 เครื่องวัดความเข้มแสง (illuminance meter) ของ Minolta รุ่น T-1

3.1.12 เครื่องเขย่า (shaker) ของ New Brunswick Scientific รุ่น Innova 4080

3.1.13 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ของ Sorvall รุ่น SS-3

3.1.14 ตู้อบความร้อน (hot air oven) ของ Memmert รุ่น 600

3.1.15 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ของ Tomy Seiko รุ่น SS-245

3.1.16 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectronic 3000 array spectrophotometer) ของ Milton Roy

3.1.17 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatograph, HPLC) ของ Shimadzu รุ่น LC-10AT

3.1.18 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตริกดีเทคเตอร์ (UV-VIS Spectrophotometric Detector) ของ Shimadzu รุ่น SPD-10A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.19 เครื่องแสดงผลข้อมูล (Data Processor Chromatopac) ของ Shimadzu รุ่น C-R6A
- 3.1.20 เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (vortex mixer) ของ Scientific Industries รุ่น G-560E
- 3.1.21 เครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยระบบอัลตราโซนิก (ultra sonicator) ของ Sonicor รุ่น SC-52 TH
- 3.1.22 เครื่องชั่งละเอียด ของ Sartorius รุ่น A-200 S
- 3.1.23 เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ หลอดทดลอง ขวดเตรียมอาหาร กระบอกตวง กรวยกรอง แท่งแก้วคนสาร ปิเปตต์ พาสเจอร์ปิเปตต์ ฯลฯ
- 3.1.24 ตู้เขี่ยเชื้อ
- 3.1.25 ลวดเขี่ยเชื้อ และเข็มเขี่ยเชื้อ
- 3.1.26 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.27 สไลด์ และ กระจกปิดสไลด์
- 3.1.28 สไลด์นับเซลล์ (cell counting chamber) ชนิด Petroff - Hausser Haemocytometer ของ Boeco และ ชนิด Sedgewick Rafter Cell ของ Graticules

3.2 สายพันธุ์จุลินทรีย์

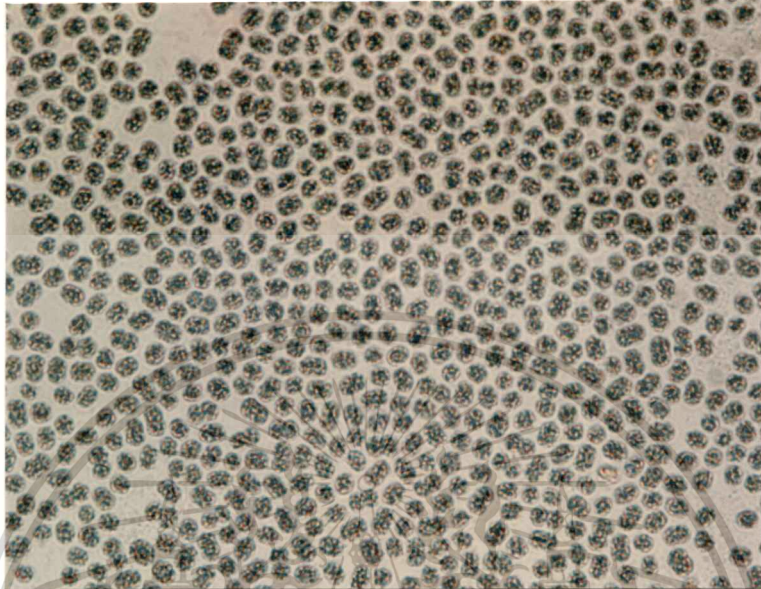
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาได้มาจาก ศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) - สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) มีดังนี้ คือ

- 3.2.1 สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8325
- 3.2.2 สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* TISTR 8012
- 3.2.3 สายพันธุ์แบคทีเรีย *Cytophaga* sp. TISTR 043
- 3.2.4 สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 13 สกุล 15 สายพันธุ์ และสาหร่ายสีเขียวจำนวน 3 สกุล 5 สายพันธุ์



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะของไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8325 เมื่อเลี้ยง
ในอาหาร MA ในสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.2 แสดงลักษณะเซลล์และกลุ่มเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8325

(ก) ลักษณะเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 (ภาพขยาย 400 เท่า)

(ข) ลักษณะกลุ่มเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 (ภาพขยาย 100 เท่า)

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 ขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ

3.3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่างๆ ตัวอย่างดินจะเก็บจากบริเวณผิวดินตามไต้ต้นไม้ซึ่งมีซากพืชที่เน่าเปื่อยปะปนอยู่ ตัวอย่างน้ำเก็บจากแหล่งน้ำต่างๆ เช่น สระน้ำ บ่อน้ำ ท่อระบายน้ำ และอาหารเหลวจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพียงชนิดเดียว (unialgal culture)

3.3.1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเบื้องต้น

นำตัวอย่างดินจำนวน 13 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 กรัม และตัวอย่างน้ำจำนวน 12 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ แต่ละตัวอย่างจะนำมาบ่มร่วมกับไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 ซึ่งอยู่ในระยะที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เต็มที่ ในอาหารเหลว BG-11 (Stanier, 1971) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 วัน เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย หลังจากนั้นตรวจผลโดยสังเกตจากลักษณะภายนอกและสีของเซลล์ *A. siamensis* TISTR 8012 ที่ซัดจางลงหรือเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม รวมทั้งตรวจดูลักษณะของเซลล์ *A. siamensis* TISTR 8012 ที่ถูกทำลายโดยแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.1.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (nutrient agar) (ภาคผนวก ก) ในจานเพาะเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จานละ 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 3.3.1.2 มาเกลี่ย (spread plate) ลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อสร้างโคโลนีใหม่ ทำการย้ายเชื้อลงอาหารเดิมซ้ำอีกจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์

3.3.1.4 การเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการคัดเลือกเบื้องต้น เก็บไว้บนอาหาร NA เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป โดยเก็บเชื้อไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อ (subculture) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุกเดือน

3.3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่ผลิตสารพิษ

3.3.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ขั้นตอนในการเตรียมเชื้อแบคทีเรียนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Reim, 1974 โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกเบื้องต้นจากข้อ 3.3.1.2 ที่อยู่บนอาหารแข็ง NA มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ตามภาคผนวก ก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจากอาหารเหลว NB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว NB 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง วัดการเจริญโดยการนับเซลล์ (cell count number) และวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ตามภาคผนวก ค และเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2.2 การเตรียมไซยาโนแบคทีเรีย

ในการทดลองนี้ใช้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ แยกได้จากสระน้ำเลี้ยงเปิด หน้าเรือนจำกลางคลองเปรม เป็นตัวทดสอบถ่ายเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่ผ่านการกระตุ้นการเจริญเติบโตมาเลี้ยงในอาหารเหลว MA (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจาก 2 สัปดาห์ เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ 7,000 g เป็นเวลา 30 นาที (Watanabe *et al.*, 1996) ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2.3 การทดสอบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8325

นำเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 เจือจางในอาหารเหลว MA หลังจากนั้นบรรจุเซลล์แขวนลอยของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร ประมาณ 0.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน

ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.2.1 ซึ่งเจือจางในอาหารเหลว MA เติมลงในสารแขวนลอยของเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยมีเซลล์ของแบคทีเรียเริ่มต้น $4.0-8.0 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ให้บ่มในสภาวะเดียวกัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำทั้งในชุดควบคุมและชุดทดสอบ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน บันทึกผลโดยการนับจำนวนเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

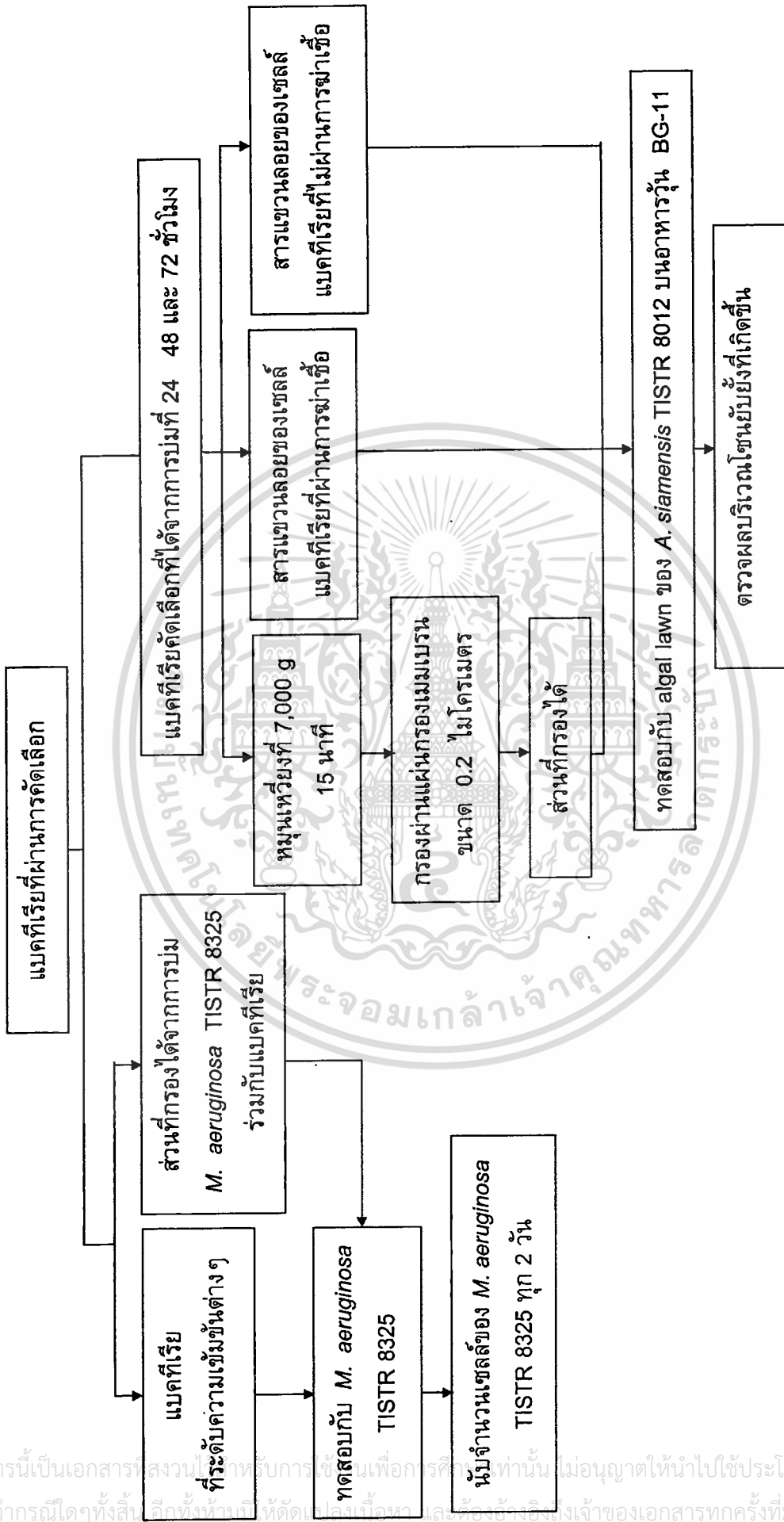
3.3.3 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ (แสดงในรูปที่ 3.3)

3.3.3.1 ศึกษาผลของปริมาณแบคทีเรียคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Imai, 1993 เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกแล้วพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ดีที่สุด (จากข้อ 3.3.2.3) มาทดสอบ โดยนำเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 เจือจางในอาหารเหลว MA หลังจากนั้นบรรจุสารแขวนลอยของเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร ประมาณ 0.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 ซึ่งเจือจางในอาหารเหลว MA เติมลงในสารแขวนลอยของเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยมีเซลล์ของแบคทีเรียเริ่มต้น 2.14×10^2 2.14×10^4 2.14×10^6 และ 2.14×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย ให้บ่มในสภาวะเดียวกัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำทั้งในชุดควบคุมและชุดทดสอบ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน บันทึกผลโดยการนับจำนวนเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

3.3.3.2 ศึกษาผลของส่วนที่กรองได้ (culture filtrate) ซึ่งได้จากการบ่ม *M. aeruginosa* TISTR 8325 ร่วมกับแบคทีเรียคัดเลือกต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Imai, 1993 เตรียมเชื้อแบคทีเรียคัดเลือกและ *M. aeruginosa* TISTR 8325 วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 และ 3.3.2.2 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

นำเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 เจือจางในอาหารเหลว MA โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นบรรจุสารแขวนลอยของเซลล์ *M. aeruginosa* ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 ซึ่งเจือจางในอาหารเหลว MA เติมนลงในสารแขวนลอยของเซลล์ *M. aeruginosa* โดยมีเซลล์ของแบคทีเรียเริ่มต้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยของเซลล์มากรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

นำส่วนที่กรองได้ (culture filtrate) เติมนลงในหลอดทดลองที่มีสารแขวนลอยของเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8325 1.63×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นของส่วนที่กรองได้ในหลอดทดลองเป็น 50 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมส่วนที่กรองได้บ่มในสภาวะเดียวกัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ทั้งในชุดควบคุมและชุดทดสอบ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน บันทึกผลโดยการนับจำนวนเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

3.3.3.3 ศึกษาผลของสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการกรองและสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อต่อการเจริญของ *A. siamensis* TISTR 8012

เตรียม algal lawn หรือ อาหารแข็งที่มีเซลล์แขวนลอยของ *A. siamensis* TISTR 8012 โดยเตรียมอาหารวัน BG-11 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมน้ำสารแขวนลอยของเซลล์ *A. siamensis* TISTR 8012 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร ประมาณ 0.5 ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ *A. siamensis* TISTR 8012 เป็น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารวันแข็งตัว

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจากวิธี well-diffusion technique (Reim, 1974) ซึ่งการทดสอบผลของสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการกรอง และสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อต่อการเจริญของ *A. siamensis* TISTR 8012 สามารถทดสอบได้โดยนำจานเลี้ยงเชื้อที่มี *A. siamensis* TISTR 8012 เจริญอยู่มาเจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในหลุมกลางจานเลี้ยงเชื้อเป็นตัว

ควบคุม ส่วนในหลุมอื่นเติมอาหารเหลว NB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ สารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการกรองและสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ได้จากการบ่มเชื้อแบคทีเรียคัดเลือกที่ระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณโซนยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้น

3.3.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ

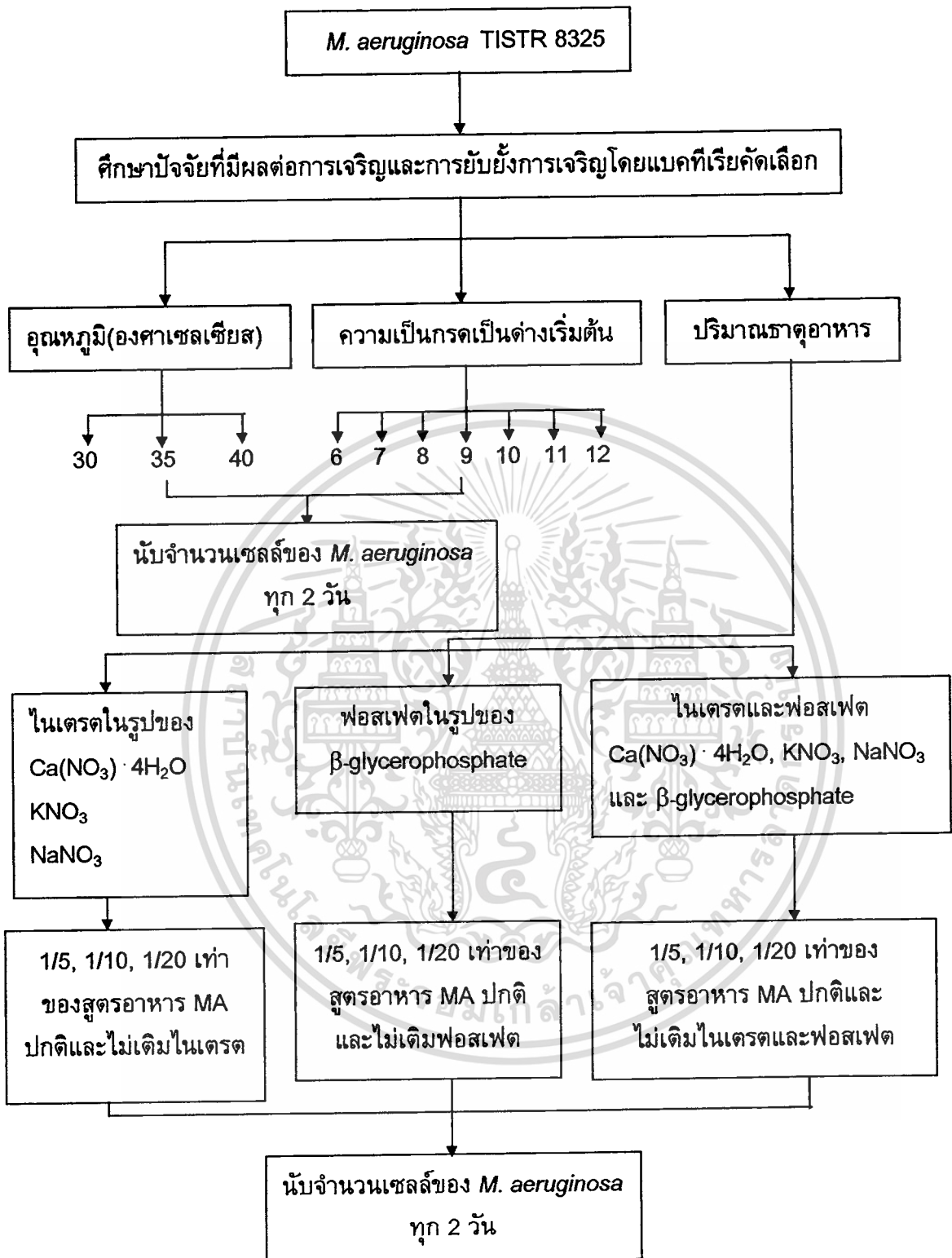
ไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือก (แสดงดังรูปที่ 3.4 และ 3.5)

นำไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8325 และแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ที่ผ่านการทดสอบแล้วว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ดีที่สุด มาศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณไนเตรต และปริมาณฟอสเฟต

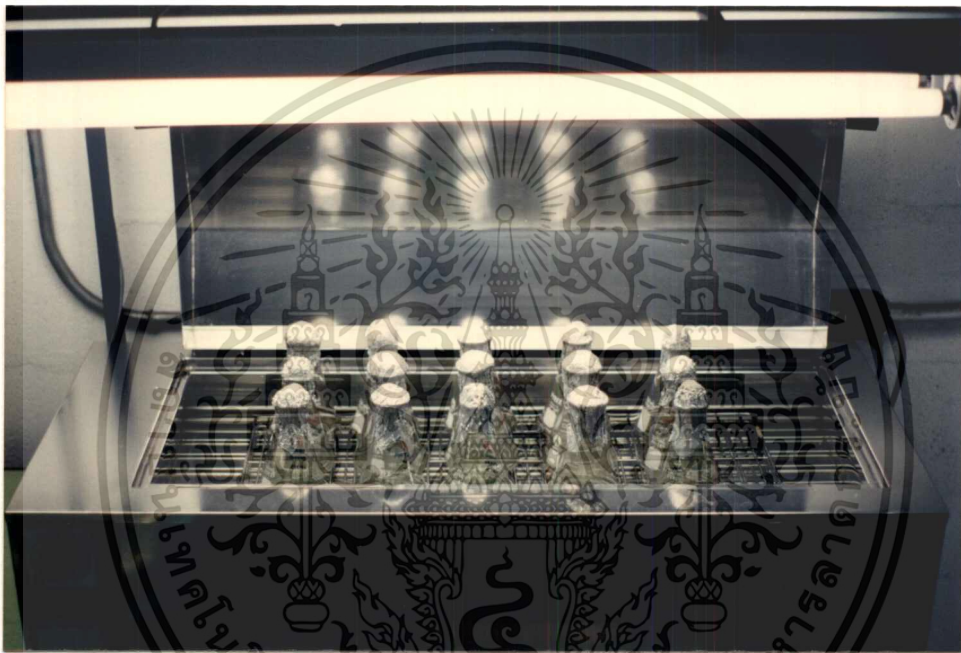
3.3.4.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือก

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 โดยนำเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2.2 เจือจางในอาหารเหลว MA หลังจากนั้นบรรจุสารแขวนลอยของเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร ประมาณ 0.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 ซึ่งเจือจางในอาหารเหลว MA เติมลงในสารแขวนลอยของเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยมีเซลล์ของแบคทีเรียเริ่มต้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย บ่มในสภาวะเดียวกัน และทำการทดลอง 2 ซ้ำทั้งในชุดควบคุมและชุดทดสอบ เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน บันทึกผลโดยการนับจำนวนเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และคำนวณหาความสามารถของแบคทีเรียในการกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยใช้สูตรของ Kaya และ Sano (1996) ดังนี้คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.4 แสดงขั้นตอนการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12



รูปที่ 3.5 แสดงสภาวะการทดสอบการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12

หมายเหตุ : ทำการทดสอบในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร MA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

$$\text{ความสามารถในการกำจัดเซลล์} = \frac{[C - E]}{C}$$

C คือ จำนวนเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ในชุดควบคุม

E คือ จำนวนเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ในชุดทดสอบ

3.3.4.2 การศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือก

ศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในอาหารเหลว MA ที่ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารด้วย 1 นอร์มอลของกรดไฮโดรคลอริก หรือ 1 นอร์มอลของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 7 8 9 10 11 และ 12 ตามลำดับ วิธีการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.1 ทดสอบที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย บ่มในสภาวะเดียวกัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน บันทึกผลโดยการนับจำนวนเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และคำนวณหาความสามารถของแบคทีเรียในการกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.1

3.3.4.3 การศึกษาผลของปริมาณไนเตรตต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือก

ศึกษาผลของปริมาณไนเตรตต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในอาหารเหลว MA ที่มีองค์ประกอบของไนเตรต ได้แก่ แคลเซียมไนเตรด ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) , โพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) และ โซเดียมไนเตรด (NaNO_3) ซึ่งดัดแปลงโดยการเติมไนเตรดที่ความเข้มข้น 1/5 1/10 และ 1/20 เท่าของสูตรอาหาร MA ปกติ วิธีการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2

3.3.4.4 การศึกษาผลของปริมาณฟอสเฟตต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือก

ศึกษาผลของปริมาณฟอสเฟตต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ซึ่งในการทดลองนี้ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบตากลีเซอโรฟอสเฟต (β -glycerophosphate) เป็นตัวแทนในการทดสอบ และทดสอบในอาหารเหลว MA ซึ่งดัดแปลงโดยการเติมเบตากลีเซอโรฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 1/5 1/10 และ 1/20 เท่าของสูตรอาหาร MA ปกติ วิธีการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2

3.3.4.5 การศึกษาผลของปริมาณไนเตรตและฟอสเฟตต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือก

ศึกษาผลของปริมาณไนเตรตและฟอสเฟตต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในอาหารเหลว MA ซึ่งดัดแปลงโดยการเติมองค์ประกอบของไนเตรตและเบตากลีเซอโรฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 1/5 1/10 และ 1/20 เท่าของสูตรอาหาร MA ปกติ วิธีการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.2

3.3.5 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารพิษในระหว่างการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 กับในสภาพการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 (แสดงในรูปที่ 3.6)

3.3.5.1 การทดลองนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Watanabe, 1996 ซึ่งเป็นการศึกษาปริมาณสารพิษในระหว่างการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และในสภาพการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 โดยนำเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่เตรียมได้จากวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.2 เจือจางในอาหารเหลว MA หลังจากนั้นบรรจุสารแขวนลอยของเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร ประมาณ 0.2 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นำเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมได้จากวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 ซึ่งเจือจางในอาหารเหลว MA เติมนลงในสารแขวนลอยของเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยมีเซลล์ของแบคทีเรียเริ่มต้นเป็น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย บ่มในสภาวะเดียวกัน

3.3.5.2 เก็บตัวอย่างจากชุดควบคุมและชุดทดสอบเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ (toxin analysis) (แสดงดังรูปที่ 3.6) ทุก 3 วัน โดยการหมუნเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์ด้วยอาหาร MA นำสารละลายส่วนใส (supernatant) มากรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อแยกเซลล์ของ

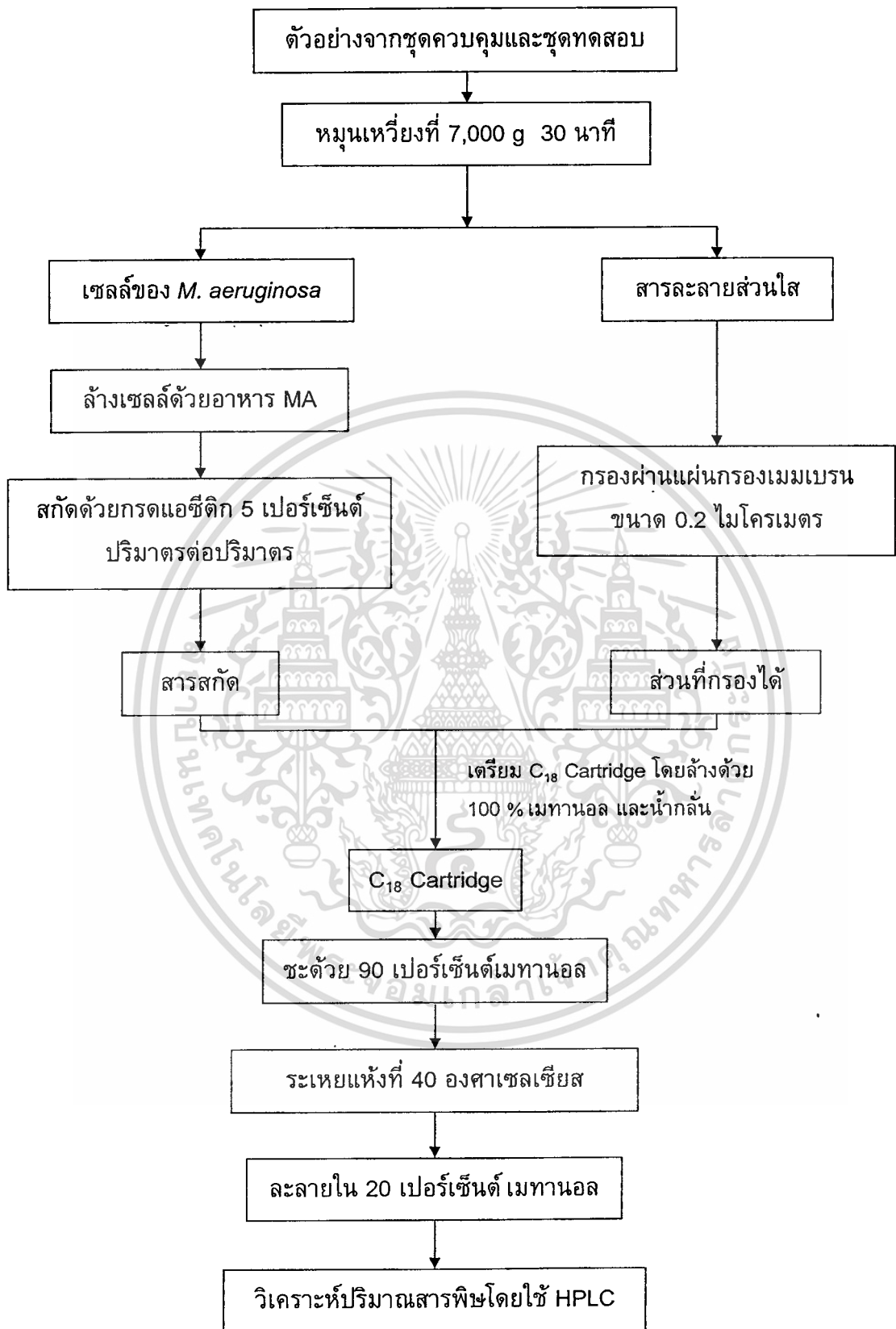
แบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5.3 นำเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มาสกัดด้วยกรดแอสซิดิก 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร เตรียม C₁₈ Cartridge โดยผ่านการทำความสะอาดด้วย 100 เปอร์เซ็นต์เมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำสารสกัดมาผ่านชุด Sep-Pak C₁₈ Cartridge จากนั้นล้าง C₁₈ Cartridge ด้วย 20 เปอร์เซ็นต์เมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ชะด้วย 90 เปอร์เซ็นต์เมทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาละลายใหม่ใน 20 เปอร์เซ็นต์เมทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3.3.5.4 นำส่วนที่กรองได้จากข้อ 3.3.5.2 มาผ่านชุด Sep-Pak C₁₈ cartridge ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.5.3 หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารพิษโดยฉีดสารละลาย 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มซัลลิวิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatograph, HPLC) คอลัมน์ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ความยาวคอลัมน์ 150 มิลลิเมตร ระบบของสารละลายเป็นเมทานอลต่อ 0.5 โมลฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 และมีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 3 ตรวจสอบชนิดและปริมาณของสารพิษที่ความยาวคลื่น 239 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารละลายของสารพิษมาตรฐาน (standard microcystins)



รูปที่ 3.6 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

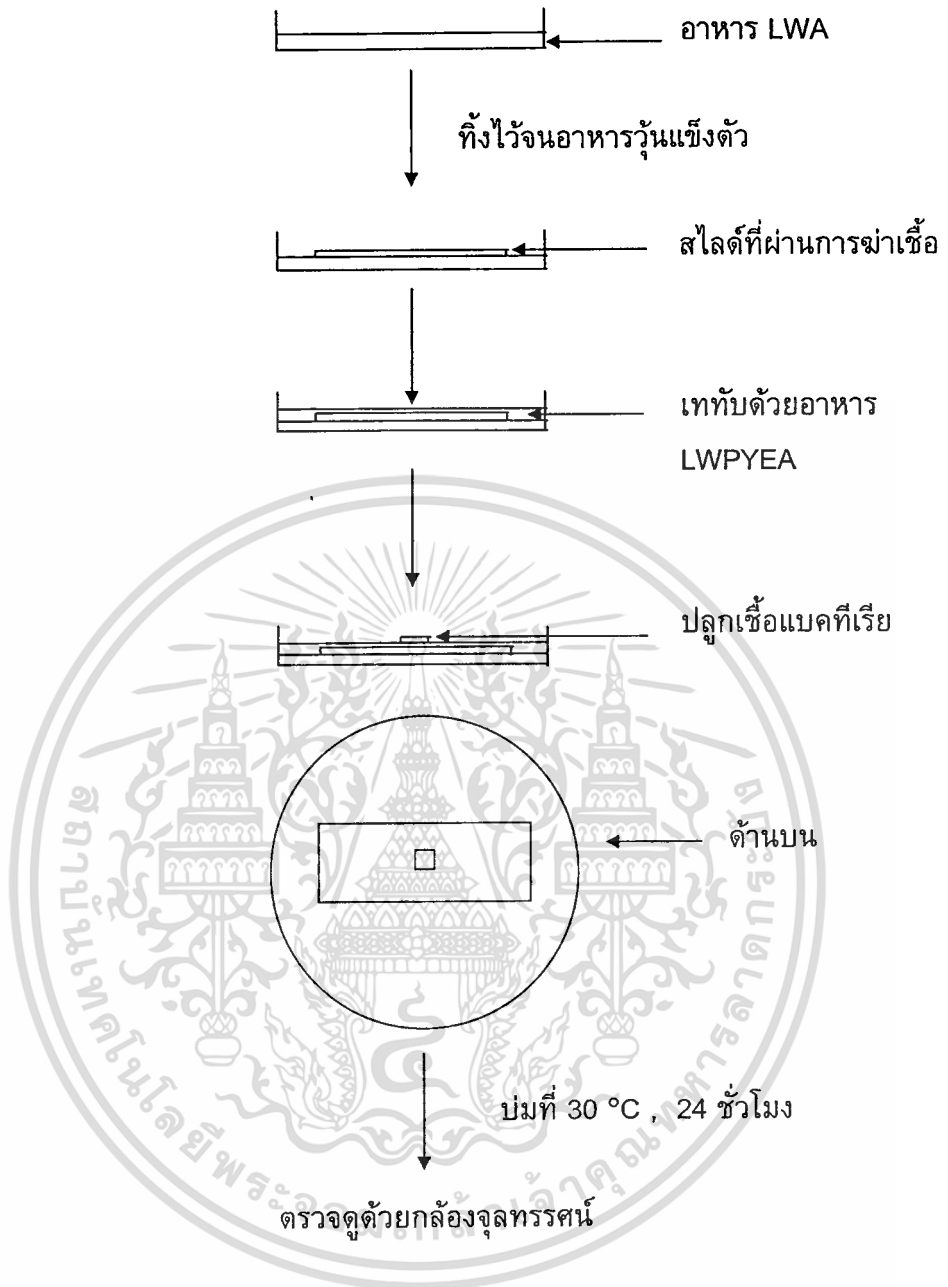
นำเชื้อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากการคัดเลือกและทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *M. aeruginosa* TISTR 8325 มาจำแนกชนิด โดยอาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ และจากการใช้อุปกรณ์จำแนกชนิดแบคทีเรียระบบเอพีไอ (API) รวมทั้งอาศัยแนวทางในการจัดจำแนกของ Reichenbach และ Dworkin (1982) ; Sangkhobol และ Skerman (1981) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984)

3.3.6.1 การศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อตามลักษณะต่างๆ คือ รูปร่างของเซลล์ ขนาดของเซลล์ และตรวจสอบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่

ศึกษารูปร่าง ขนาด และการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนสไลด์ในจานเลี้ยงเชื้อตามวิธีการของ Sangkhobol และ Skerman (1981) ดังนี้ แสดงในรูปที่ 3.7 เทอาหาร LWA ตามภาคผนวก ก ลงในจานเลี้ยงเชื้อ รอจนอาหารวันแข็งตัว หลังจากนั้นนำแผ่นสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววางไว้บนอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ เททับด้วยอาหาร LWPYEA ตามภาคผนวก ก ปริมาตร 8-10 มิลลิลิตร จนอาหารท่วมทั้งแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง นำเชื้อแบคทีเรียมาปลูกเชื้อไว้บนอาหารที่อยู่ตรงกลางสไลด์ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสไลด์ที่มีเชื้อเจริญอยู่มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.3.6.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีโดยใช้อุปกรณ์จำแนกชนิดแบคทีเรียระบบเอพีไอ (API) ตามภาคผนวก ข



รูปที่ 3.7 แสดงขั้นตอนและรูปแบบของวิธีการศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการของ Sangkhobol และ Skerman (1981)

3.3.7 การทดสอบความปลอดภัยในการใช้แบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

นำแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ที่ผ่านการทดสอบแล้วว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ดีที่สุด มาศึกษาผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์อื่น โดยในการทดลองนี้ได้นำสาหร่ายจากศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียว จำนวน 3 สกุล 5 สายพันธุ์ และไซยาโนแบคทีเรีย จำนวน 13 สกุล 15 สายพันธุ์ เป็นตัวแทนในการทดสอบ แสดงดังตารางที่ 3.1

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Reim, 1974 เตรียมเชื้อแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 ส่วนสาหร่ายสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย เตรียมโดยถ่ายเชื้อสาหร่ายสีเขียวที่ผ่านการกระตุ้นการเจริญเติบโต มาเลี้ยงในอาหารเหลว N-8 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจาก 2 สัปดาห์ เก็บเกี่ยวเซลล์ที่อยู่ในระยะที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เต็มที่ โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 g เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ส่วนไซยาโนแบคทีเรียเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 โดยวิธีการเช่นเดียวกัน

นำเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียที่ได้ เจือจางในอาหารเหลว N-8 และ BG-11 ตามลำดับ จากนั้นบรรจุสารแขวนลอยของเซลล์สาหร่ายแต่ละชนิดที่มีค่าความหนาแน่นของเซลล์ที่ 900 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 0.3-0.5 ลงในหลอดทดลอง ส่วนชุดทดสอบเติมเซลล์แบคทีเรียที่เจือจางในอาหารเลี้ยงสาหร่ายแต่ละชนิดลงไป โดยมีปริมาณของเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลโดยสังเกตจากลักษณะภายนอกและสีของสาหร่ายเปรียบเทียบกับชุดควบคุม รวมทั้งตรวจดูลักษณะเซลล์ของสาหร่ายและแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลโดยใส่ค่าเป็น + หรือ -

ตารางที่ 3.1 แสดงสายพันธุ์สาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบกับแบคทีเรีย
คัดเลือกรหัส C-12

สายพันธุ์สาหร่ายที่ใช้ในการทดสอบ	
สาหร่ายสีเขียว	ไซยาโนแบคทีเรีย
<i>Chlorella ellipsoidea</i> TISTR 8260	<i>Anabaena siamensis</i> TISTR 8012
<i>Chlorella</i> sp. TISTR 8264	<i>Calothrix marchica</i> TISTR 8109
<i>Chroococcum</i> sp. TISTR 8268	<i>Cylindrospermum</i> sp. TISTR 8158
<i>Scenedesmus</i> sp. S12 NO.94	<i>Fischerella</i> sp. TISTR 8220
<i>Scenedesmus</i> sp. S22 NO.97	<i>Gloeocapsa</i> sp. TISTR 8223
	<i>Hapalosiphon fontinalis</i> TISTR 8225
	<i>Hapalosiphon</i> sp. TISTR 8229
	<i>Nostoc</i> sp. TISTR 8177
	<i>Oscillatoria</i> sp. TISTR 8245
	<i>Phormidium</i> sp. TISTR 8246
	<i>Phormidium</i> sp. TISTR 8247
	<i>Rivularia</i> sp. TISTR 8248
	<i>Scytonema</i> sp. TISTR 8208
	<i>Stigonema</i> sp. TISTR 8253
	<i>Tolypothrix</i> sp. TISTR 8257
รวม 3 สกุล 5 สายพันธุ์	รวม 13 สกุล 15 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ

จากการนำตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่างๆ มาคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่ผลิตสารพิษ ทั้งนี้จากการศึกษาของ Safferman และ Morris (1963) ; Daft และคณะ (1975) และ Yamamoto (1978) ที่ศึกษาถึงวิธีการในการทดสอบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสาหร่าย พบว่าโดยทั่วไปจะใช้วิธีทดสอบบนอาหารร่วน ซึ่งใช้สาหร่ายเป็น lawn สำหรับการทดสอบ แต่จากการศึกษาในครั้งนี้เนื่องจาก *M. aeruginosa* TISTR 8325 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารร่วน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ *A. siamensis* TISTR 8012 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียชนิดที่เป็นเส้นสาย มีผนังเซลล์บางและถูกทำลายได้ง่าย สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารร่วน เป็นตัวแทนในการทดสอบคัดเลือกเบื้องต้น โดยบ่มตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำแต่ละตัวอย่างร่วมกับ *A. siamensis* TISTR 8012 เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย เป็นระยะเวลา 14 วัน สังเกตลักษณะการเจริญโดยรวมและสีของ *A. siamensis* TISTR 8012 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม รวมทั้งตรวจจุลลักษณะเซลล์ของ *A. siamensis* TISTR 8012 ที่ถูกทำลายโดยแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.1

จากตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำ จำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างน้ำ 1 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างน้ำที่ใช้ทดสอบ 13 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างน้ำรหัส B-3 และตัวอย่างดิน 1 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างดินที่ใช้ทดสอบ 12 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดินรหัส C-12 ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *A. siamensis* TISTR 8012 ได้ดีที่สุด ในขณะที่ตัวอย่างน้ำรหัส A-1 A-4 และ A-6 และตัวอย่างอาหารเหลวจากการเลี้ยงสาหร่ายเพียงชนิดเดียว รหัส B-1 B-2 B-4 B-5 B-6 และ B-7 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. siamensis* TISTR 8012 ได้ดีใกล้เคียงกัน รองลงมาได้แก่ ตัวอย่างดิน รหัส C-1 C-6 และ C-7 สำหรับตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำซึ่งทำการทดสอบในครั้งนี้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. siamensis* TISTR 8012 ได้ ได้แก่ตัวอย่างน้ำรหัส A-2 A-3 A-5 และ ตัวอย่างดินรหัส C-2 C-3 C-4 C-5 C-8 C-9 C-10 และ C-11 จากขั้นตอนการทดสอบและคัดเลือกในเบื้องต้นนี้ จึงเลือกตัวอย่างดินรหัส C-12 และ ตัวอย่างน้ำรหัส B-3 ไปศึกษา

เอกสารที่และทดสอบประสิทธิภาพในขั้นตอนต่อไป การศึกษาเท่านั้น ไม่นอญูตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำต่อการเจริญของ
ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* TISTR 8012

ตัวอย่าง *	ผลการทดสอบ
ชุดควบคุม	++++ **
ตัวอย่างน้ำ	
ตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำ	
สระน้ำ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) กรุงเทพฯ	
- รหัส A-1	++
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย	
- รหัส A-2	++++
บ่อน้ำ กรมประมง กรุงเทพฯ	
- รหัส A-3	++++
สระน้ำ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ. เมือง จ. นครปฐม	
- รหัส A-4	++
- รหัส A-5	++++
ท่อระบายน้ำ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ. เมือง จ. นครปฐม	
- รหัส A-6	++
ตัวอย่างอาหารเหลวจากการเลี้ยงสาหร่ายเพียงชนิดเดียว (unialgal culture)	
- ศูนย์จุลินทรีย์	
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย	
- รหัส B-1	++
- รหัส B-2	++
- รหัส B-3	+
- รหัส B-4	++
- รหัส B-5	++
- รหัส B-6	++
- รหัส B-7	++

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ตัวอย่าง *	ผลการทดสอบ
ตัวอย่างดิน	
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย	
- รหัส C-1	+++ **
- รหัส C-2	++++
กรมประมง กรุงเทพฯ	
- รหัส C-3	++++
- รหัส C-4	++++
กรมป่าไม้ กรุงเทพฯ	
- รหัส C-5	++++
มหาวิทยาลัยศิลปากร อ. เมือง จ. นครปฐม	
- รหัส C-6	+++
- รหัส C-7	+++
- รหัส C-8	++++
- รหัส C-9	++++
- รหัส C-10	++++
- รหัส C-11	++++
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) กรุงเทพฯ	
- รหัส C-12	+

หมายเหตุ * ทดสอบที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 วัน

** การเจริญเติบโตของ *A. siamensis* TISTR 8012

++++ = เจริญได้ดีเท่าชุดควบคุม ++ = เจริญค่อนข้างน้อย

+++ = เจริญปานกลาง + = เจริญเล็กน้อย ชืดจาง

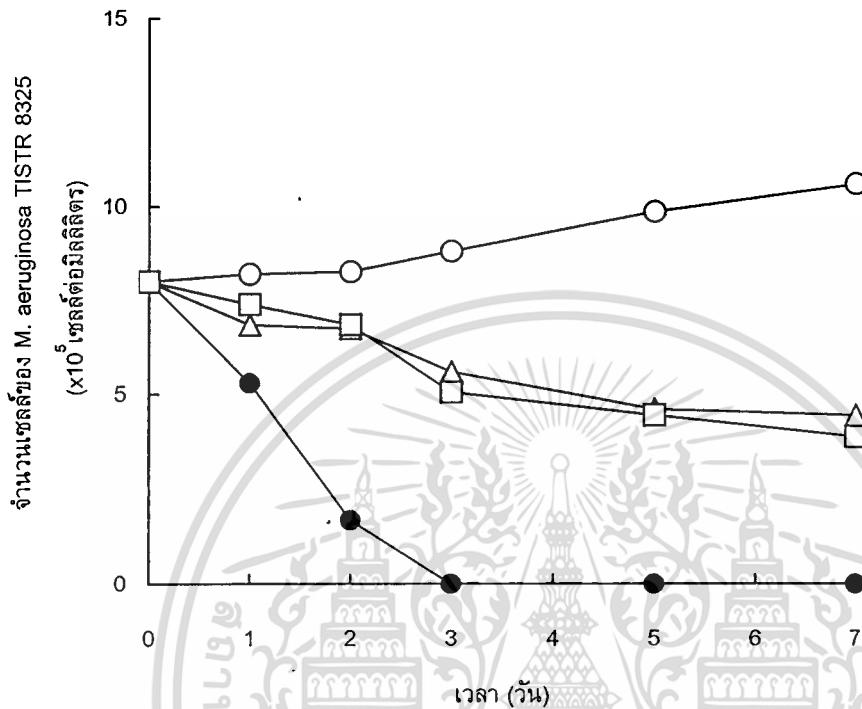
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส B-3, C-12 และแบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่ผลิตสารพิษ

จากขั้นตอนการทดสอบคัดเลือกเบื้องต้น จึงนำแบคทีเรียรหัส B-3 และแบคทีเรียรหัส C-12 ที่ได้จากการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ มาศึกษาความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกต่อการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ และจากการศึกษารายงานการวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับไกลดิงแบคทีเรีย (gliding bacteria) ซึ่งมีความสามารถในการทำลายเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิด (Stewart and Brown, 1969; Daft, 1975; Imai, 1993) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงนำไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *Cytophaga* sp. TISTR 043 จากศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) มาทำการทดสอบเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ

จากการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกและแบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบต่อการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ โดยเลี้ยง *M. aeruginosa* TISTR 8325 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8325 เพื่อนำมาทดสอบกับแบคทีเรียรหัส B-3 แบคทีเรียรหัส C-12 และ *Cytophaga* sp. TISTR 043 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.1 พบว่าแบคทีเรียคัดเลือกและแบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ดีที่สุดในโดยสามารถกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้หมดภายในเวลา 3 วัน ในขณะที่ *Cytophaga* sp. TISTR 043 และแบคทีเรียคัดเลือกรหัส B-3 มีผลทำให้เซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 8.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลดลงเหลือ 3.89×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 4.45×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ภายในเวลา 7 วัน

จากขั้นตอนการคัดเลือกและการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 พบว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพ



รูปที่ 4.1 แสดงผลของแบคทีเรียคัดเลือกต่อการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

หมายเหตุ : ทดสอบที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน

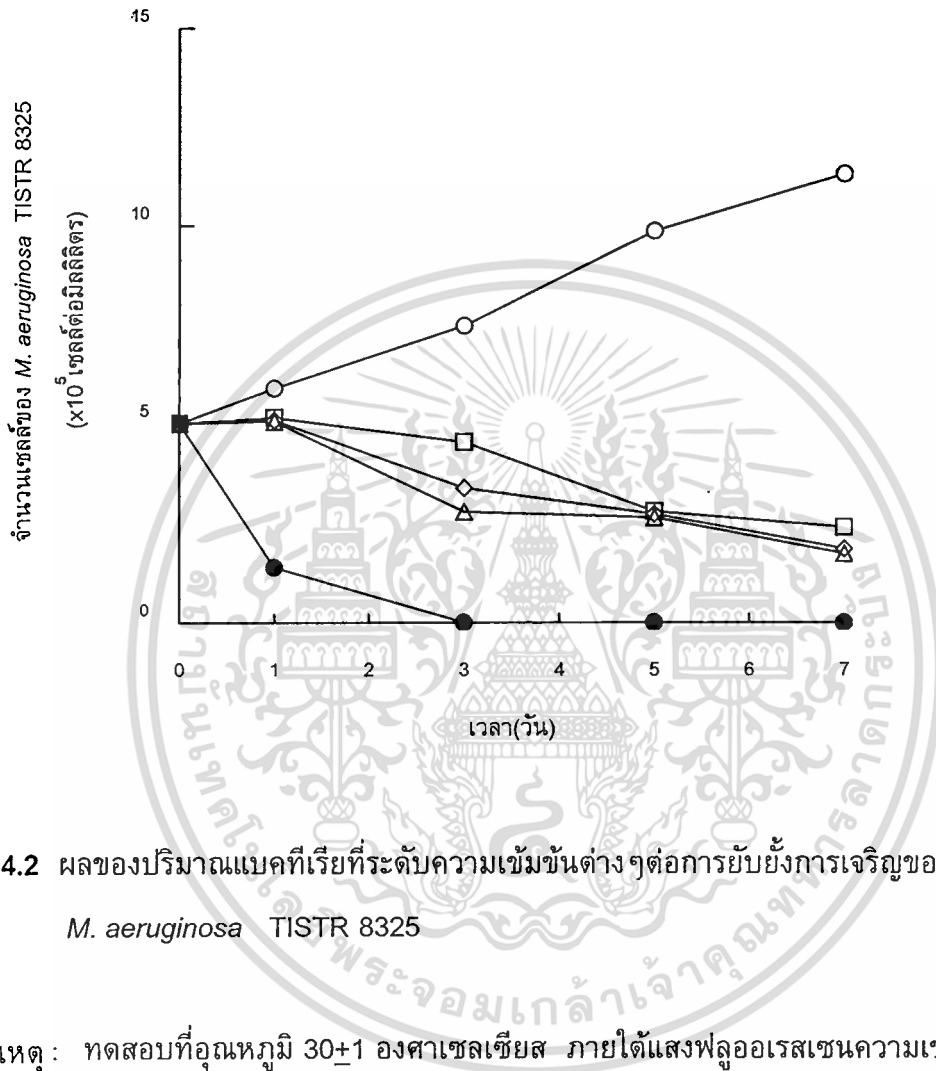
- ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย
- △ ชุดทดสอบที่มีการเติมแบคทีเรียคัดเลือกรหัส B-3
- ชุดทดสอบที่มีการเติมแบคทีเรีย *Cytophaga* sp. TISTR 043
- ชุดทดสอบที่มีการเติมแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12

ภาพในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของความเข้มข้นและชนิดของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่มีต่อ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ต่างกัน รวมทั้งความไวของไซยาโนแบคทีเรียต่อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 แสดงผลในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ในขั้นตอนต่อไป

4.3 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ

4.3.1 การศึกษาผลของปริมาณแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

ในการศึกษาผลของปริมาณแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยมีเซลล์ของแบคทีเรียเริ่มต้น 2.14×10^2 2.14×10^4 2.14×10^6 และ 2.14×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และทดสอบกับ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.2 จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการใช้แบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 2.14×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ดีที่สุด โดยเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ในชุดทดสอบที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย 2.14×10^2 2.14×10^4 2.14×10^6 และ 2.14×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร กับชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 การใช้แบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 2.14×10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 จากเริ่มต้น 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลดลงเหลือ 2.4×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับที่ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรีย 2.14×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ลดลงเหลือ 1.86×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และที่ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรีย 2.14×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ลดลงเหลือ 1.74×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับที่ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรีย 2.14×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้หมดภายในเวลา 3 วัน



รูปที่ 4.2 ผลของปริมาณแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

หมายเหตุ : ทดสอบที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครโวนส์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน

- : ○— ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย
- ชุดทดสอบที่มีการเติมแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
- ◇— ชุดทดสอบที่มีการเติมแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
- △— ชุดทดสอบที่มีการเติมแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
- ชุดทดสอบที่มีการเติมแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

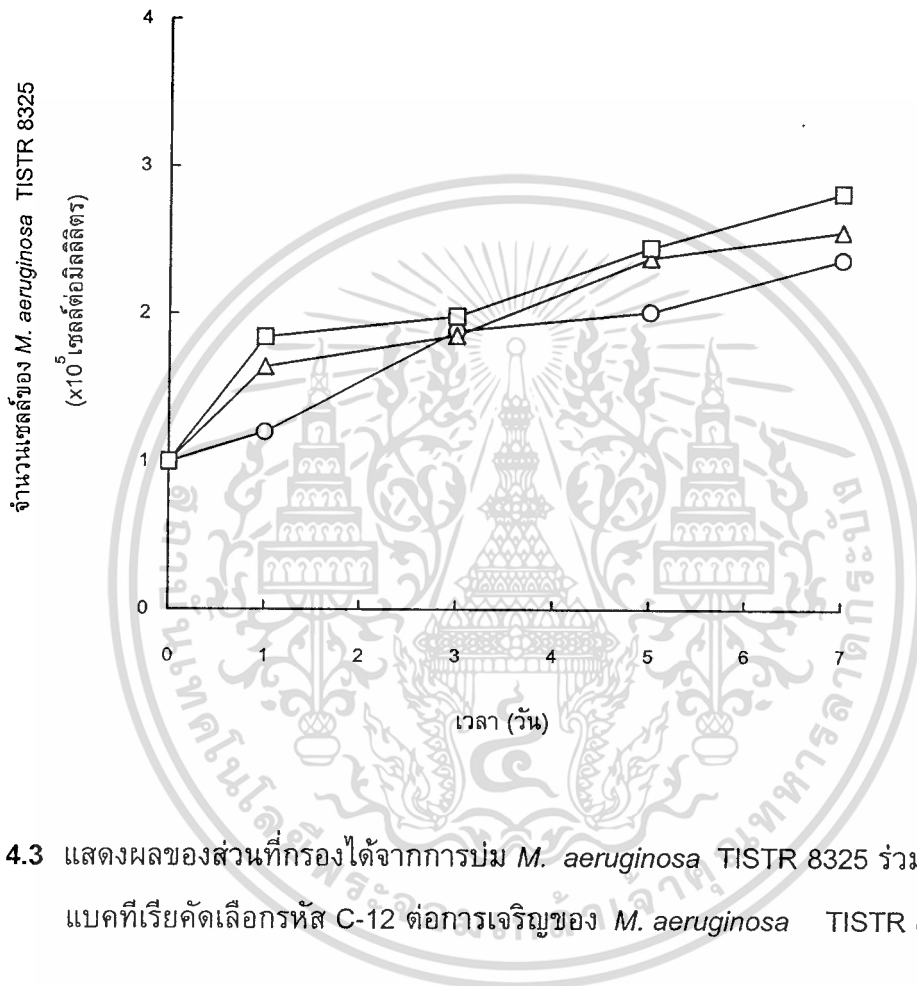
จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ใช้แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์เริ่มต้นของแบคทีเรียที่ใช้อีกด้วย โดยเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นของแบคทีเรียสูงขึ้นไปทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียสูงขึ้นไปตามไปด้วย และจากผลการศึกษาของ Imai และคณะ (1993) ที่ศึกษาผลของ *Cytophaga* sp. สายพันธุ์ J18 / M01 ต่อการกำจัดแพลงก์ตอนพืช *Chattonella antiqua* โดยทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 2.20×10^2 , 2.20×10^4 และ 2.20×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ต่อการกำจัดแพลงก์ตอนพืช *C. antiqua* ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.0×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคทีเรียสามารถกำจัดแพลงก์ตอนพืชได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อมีปริมาณของแบคทีเรียเริ่มต้นตั้งแต่ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรขึ้นไป

4.3.2 การศึกษาผลของส่วนที่กรองได้จากการเพาะเลี้ยง *M. aeruginosa* TISTR 8325 ร่วมกับแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

จากการศึกษาผลของส่วนที่กรองได้จากการเพาะเลี้ยง *M. aeruginosa* TISTR 8325 ร่วมกับแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ในอาหาร MA โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวันต่อเนื่องกันเป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าการเติมส่วนที่กรองได้ในอาหาร MA ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 90 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยเมื่อเปรียบเทียบการเจริญในอาหารที่มีการเติมส่วนที่กรองได้ ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 90 เปอร์เซ็นต์ กับอาหารที่ไม่มีการเติมส่วนที่กรองได้ พบว่าอาหารที่มีการเติมส่วนที่กรองได้ที่ระดับความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญดีกว่าอาหารที่มีการเติมส่วนที่กรองได้ที่ระดับความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และอาหาร MA ที่ไม่มีการเติมส่วนที่กรองได้ คิดเป็น 1.10 และ 1.19 เท่าตามลำดับ จากผลการศึกษาที่ได้พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ Imai และคณะ (1993) ที่ได้ศึกษาผลของส่วนที่กรองได้ จากการเพาะเลี้ยง *Cytophaga* sp. สายพันธุ์ J18 / M01 ร่วมกับ *C. antiqua* ต่อการเจริญของ *C. antiqua* พบว่าส่วนที่กรองได้ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *C. antiqua* แต่เป็นผลเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียสามารถเข้าทำลาย *C. antiqua* ได้โดยตรง เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Shilo (1970) ที่ศึกษาความสามารถของ myxobacter FP-1 ในการทำให้เซลล์ของ *Nostoc* เกิดการแตก ซึ่งเป็นผลมาจากการที่แบคทีเรียเข้าเกาะและสามารถทำลายเซลล์ของ *Nostoc* ได้โดยตรงเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงผลของส่วนที่กรองได้จากการป้อน *M. aeruginosa* TISTR 8325 ร่วมกับแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

หมายเหตุ : ทดสอบที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน

- ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมส่วนที่กรองได้
- △ ชุดทดสอบที่มีการเติมส่วนที่กรองได้ที่ระดับความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์
- ชุดทดสอบที่มีการเติมส่วนที่กรองได้ที่ระดับความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนั้นผลการทดลองเปรียบเทียบความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกกรหัส C-12 จากการทดสอบการใช้สารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการกรอง สารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียไม่ผ่านการฆ่าเชื้อต่อการเจริญของ *A. siamensis* TISTR 8012 โดยวิธี well-diffusion technique ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 พบว่าสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการกรอง และสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ได้จากการบ่มที่ระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการเจริญของ *A. siamensis* TISTR 8012 ในขณะที่สารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ได้จากการบ่มที่ระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *A. siamensis* TISTR 8012 ได้ ไม่แตกต่างกัน โดยมีขนาดของบริเวณโซนยับยั้งเฉลี่ย 16 มิลลิเมตร จากผลการทดลองที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือก และจากการตรวจสอบติดตามผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงดังรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 อาจเป็นผลเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียสามารถเข้าทำลายเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้โดยตรง ซึ่งจากการศึกษาเปรียบเทียบการกำจัดแพลงก์ตอนพืช โดยวิธีการใช้สิ่งมีชีวิตที่กินแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหารและวิธีการผลิตสารออกมายับยั้ง (Shilo, 1970 ; Reim et al., 1974 ; Imai et al., 1993) พบว่าวิธีการใช้สิ่งมีชีวิตที่มีคุณสมบัติในการกำจัดแพลงก์ตอนพืชได้โดยตรงเป็นวิธีที่ดีและเหมาะสมกว่าการผลิตสารออกมายับยั้ง เนื่องจากสารที่ผลิตขึ้นมีโอกาสแพร่กระจายในแหล่งน้ำได้ง่าย ทำให้การกำจัดไม่ค่อยได้ผล ดังนั้นจากผลการทดสอบต่างๆ ในขั้นตอนที่ผ่านมาจึงแสดงให้เห็นว่าการที่แบคทีเรียคัดเลือกกรหัส C-12 สามารถกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้นั้น ไม่ได้เป็นผลมาจากวิธีการผลิตสารออกมายับยั้ง แต่เป็นผลเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียสามารถเข้าทำลายเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้โดยตรง

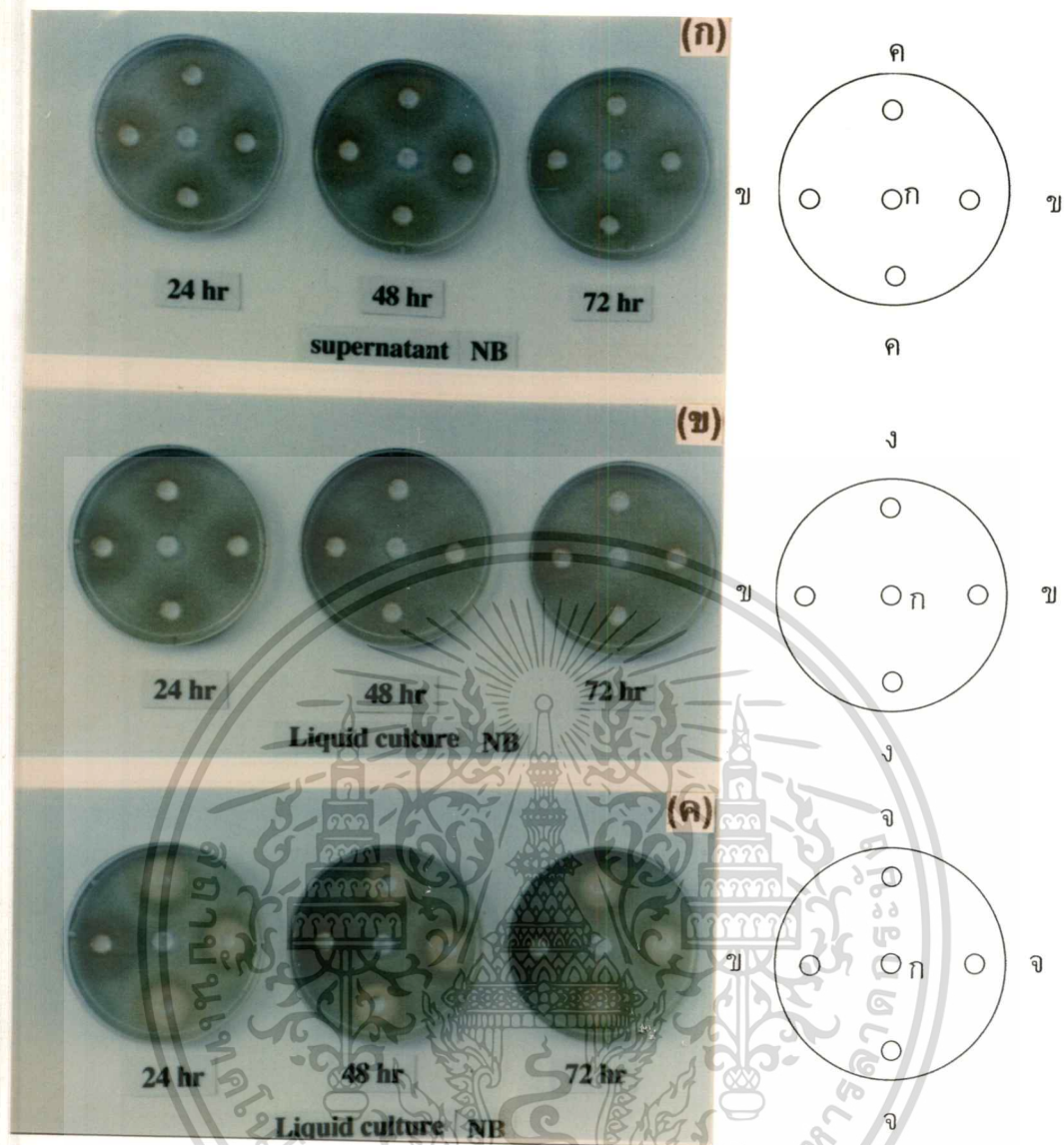
4.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกกรหัส C-12

ปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีบางประการที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกกรหัส C-12 ที่ทำการศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิ ระดับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเริ่มต้น ปริมาณธาตุอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจนและฟอสเฟต

4.4.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ

M. aeruginosa TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกกรหัส C-12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และห้ามมิให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงผลของสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการกรอง สารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่ได้จากการบ่มที่ระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญของ *A. siamensis* TISTR 8012

หมายเหตุ : ทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซน ความเข้มแสง 60 ไมโครโวนส์ไต้ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 5 วัน

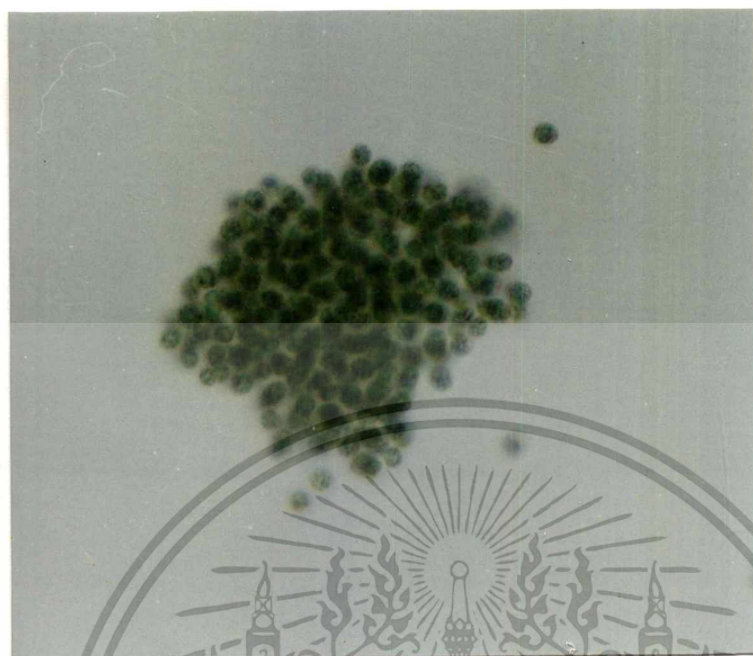
: ก : น้ำกลั่น

ข : อาหารเหลว NB

ค : สารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการกรอง

ง : สารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

จ : สารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.5 แสดงผลของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในการยับยั้งการเจริญของ

M. aeruginosa TISTR 8325

(ก) ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย

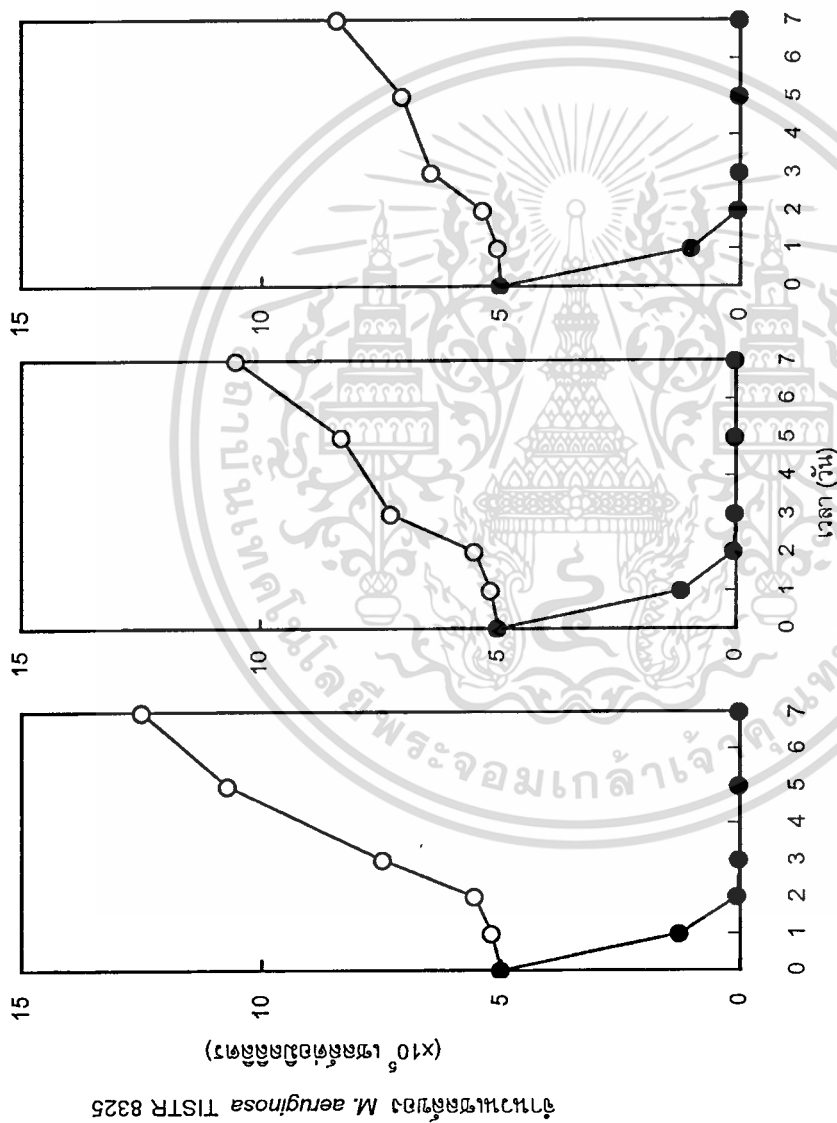
(ข) ชุดทดสอบที่มีการเติมแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาผลของระดับอุณหภูมิต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ในอาหาร MA โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.6 และ 4.7 พบว่าในสภาพอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีความเหมาะสมต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยการเจริญเติบโตสูงสุดของเซลล์เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 มีจำนวนเซลล์ 1.25×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ ที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส มีจำนวนเซลล์ 1.05×10^6 และ 8.42×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทดสอบให้สูงขึ้นเป็น 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญดีกว่าที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส คิดเป็น 1.19 และ 1.48 เท่า ตามลำดับ จากผลการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า *M. aeruginosa* TISTR 8325 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากสภาวะอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาดังกล่าวมีสภาพใกล้เคียงกับสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียเอง และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมิมีผลต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย รวมทั้งจากการศึกษาของ Kruger และคณะ (1978) ซึ่งรายงานว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ลดลงในช่วงอุณหภูมิที่สูงขึ้นเกินกว่าที่การควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์จะรับได้ จะทำให้สาหร่ายมีการเจริญลดลงหรือตายในที่สุด นอกจากนั้นอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นยังเป็นสาเหตุทำให้โครงสร้างของโปรตีน รวมถึงกลไกควบคุมพลังงานเสียสภาพ (Pirt, 1975) ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเพิ่มสูงขึ้นเป็น 35 และ 40 องศาเซลเซียส จึงมีผลทำให้การเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ลดลงตามลำดับ

สำหรับการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ซึ่งทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.6 และ 4.7 พบว่าในวันที่ 2 ของการทดสอบ แบคทีเรียมีความสามารถในการกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่ระดับอุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส คิดเป็น 99.45 และ 99.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน สำหรับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรียมีความสามารถในการกำจัดเซลล์คิดเป็น 99.28 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 แต่ไม่มีผลอย่างชัดเจนต่อกิจกรรมของแบคทีเรียในการกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 เนื่องจากที่ทุกระดับอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ คือ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสามารถกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้หมดภายในเวลา 3 วัน ใช้ และจากผลการ

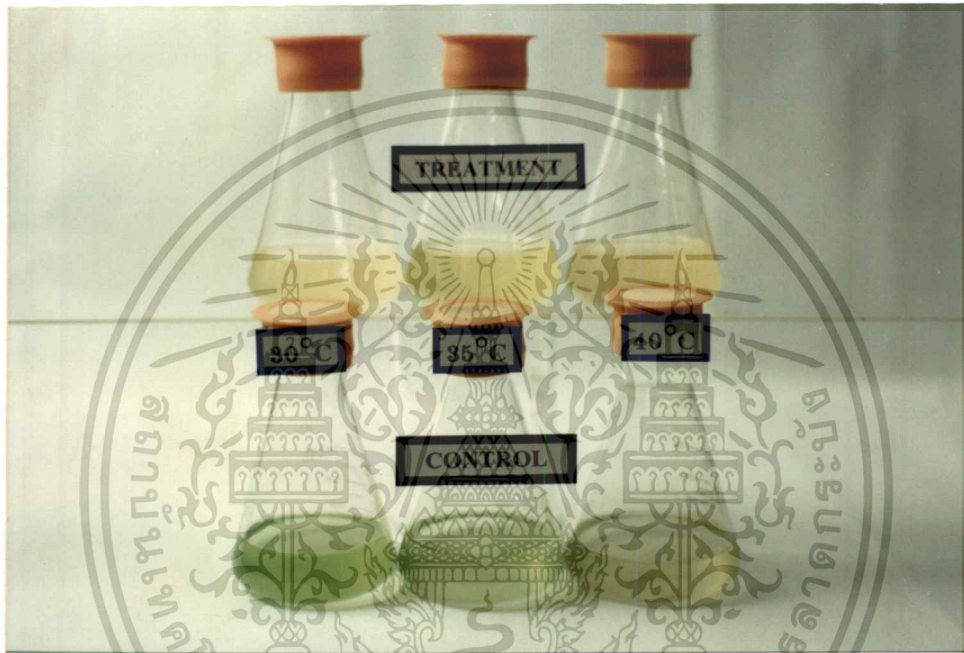
เอกสารนี้... ไม่ว่าจะกรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบบที่เรียดัดเล็กรหัส C-12

หมายเหตุ ○—○ ชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย
●—● ชุดทดสอบที่เติมแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12

หมายเหตุ : ทำการทดสอบในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร MA 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครโอินส์ไตน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

ศึกษาของ Sugiura (1993) ที่ได้ศึกษาผลของ *Pseudomonas* sp. ในการกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* รายงานว่าแบคทีเรียมีผลทำให้เซลล์ของ *M. aeruginosa* เกิดการแตกได้ ภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงประมาณ 30 องศาเซลเซียส และมีสภาพความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ในช่วง 8-9 และจากผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำ ให้เซลล์ของ *M. aeruginosa* แตก ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และสภาพความเป็นกรดเป็นด่างมีค่า 7

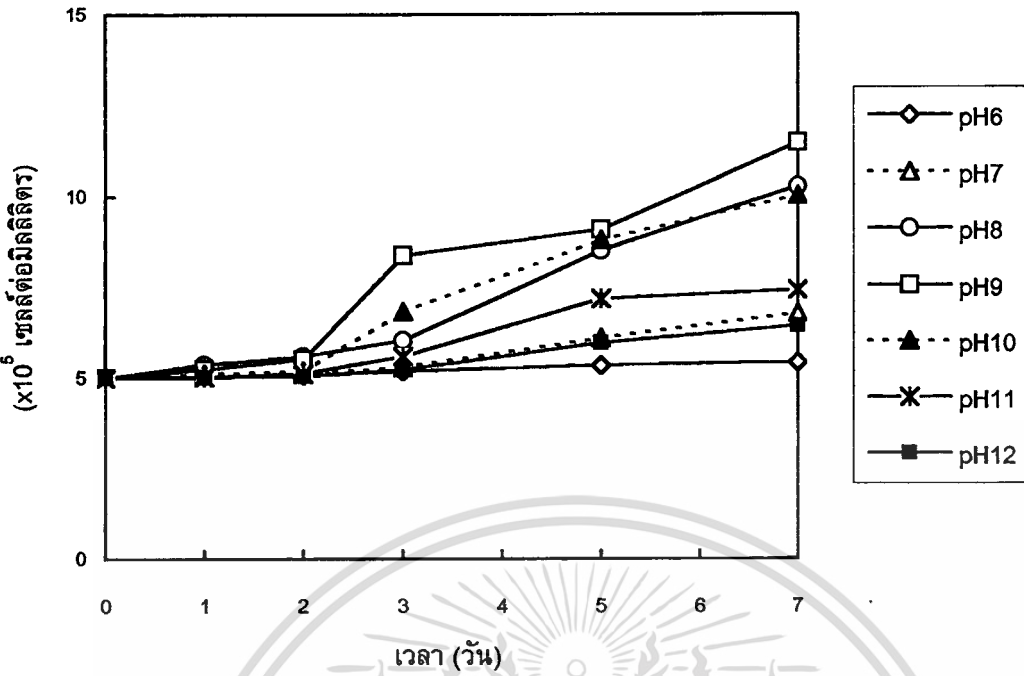
4.4.2 การศึกษาผลของระดับความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12

การศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ในอาหาร MA โดยการปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6 7 8 9 10 11 และ 12 ทดสอบที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครโวลต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8 (ก) และ 4.9 พบว่าสภาพของอาหารเมื่อความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9 มีความเหมาะสมต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยพบว่าการเจริญเติบโตสูงสุดของเซลล์เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.15×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 8 10 11 7 12 และ 6 ตามลำดับ โดยเมื่อความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นมีค่าลดลงตั้งแต่ 8 7 และ 6 แสดงดังรูปที่ 4.8 (ข) พบว่าทำให้การเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ลดลงตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.03×10^6 6.81×10^5 5.45×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 10 11 และ 12 พบว่า *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญลดลง โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.01×10^6 7.45×10^5 และ 6.45×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

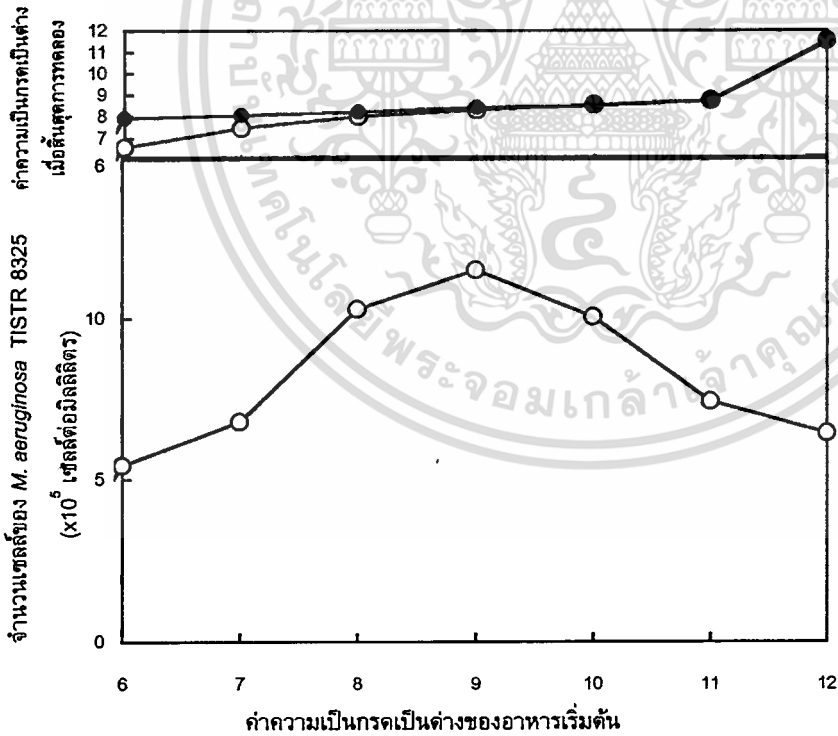
จากผลการทดลองพบว่า *M. aeruginosa* TISTR 8325 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ระดับความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 9 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับของความเป็นกรดเป็นด่างเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญและมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Van der Westhuizen และ Eloff (1983) พบว่าระดับความเป็นกรดเป็นด่างมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* โดย *M. aeruginosa* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อระดับความเป็นกรดเป็นด่างมีค่าเท่ากับ 9

เอกสารนี้และเมื่อความเป็นกรดเป็นด่างมีการเปลี่ยนแปลงไปจากค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสม ไม่ว่าจะกรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325



รูปที่ 4.8 (ก) แสดงการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MA ที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 6 7 8 9 10 11 และ 12 ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.8 (ข) แสดงการเจริญเติบโตสูงสุดของเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8325 เปรียบเทียบกับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

หมายเหตุ : ○ ชุดควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรีย

● ชุดทดสอบที่เติมแบคทีเรีย

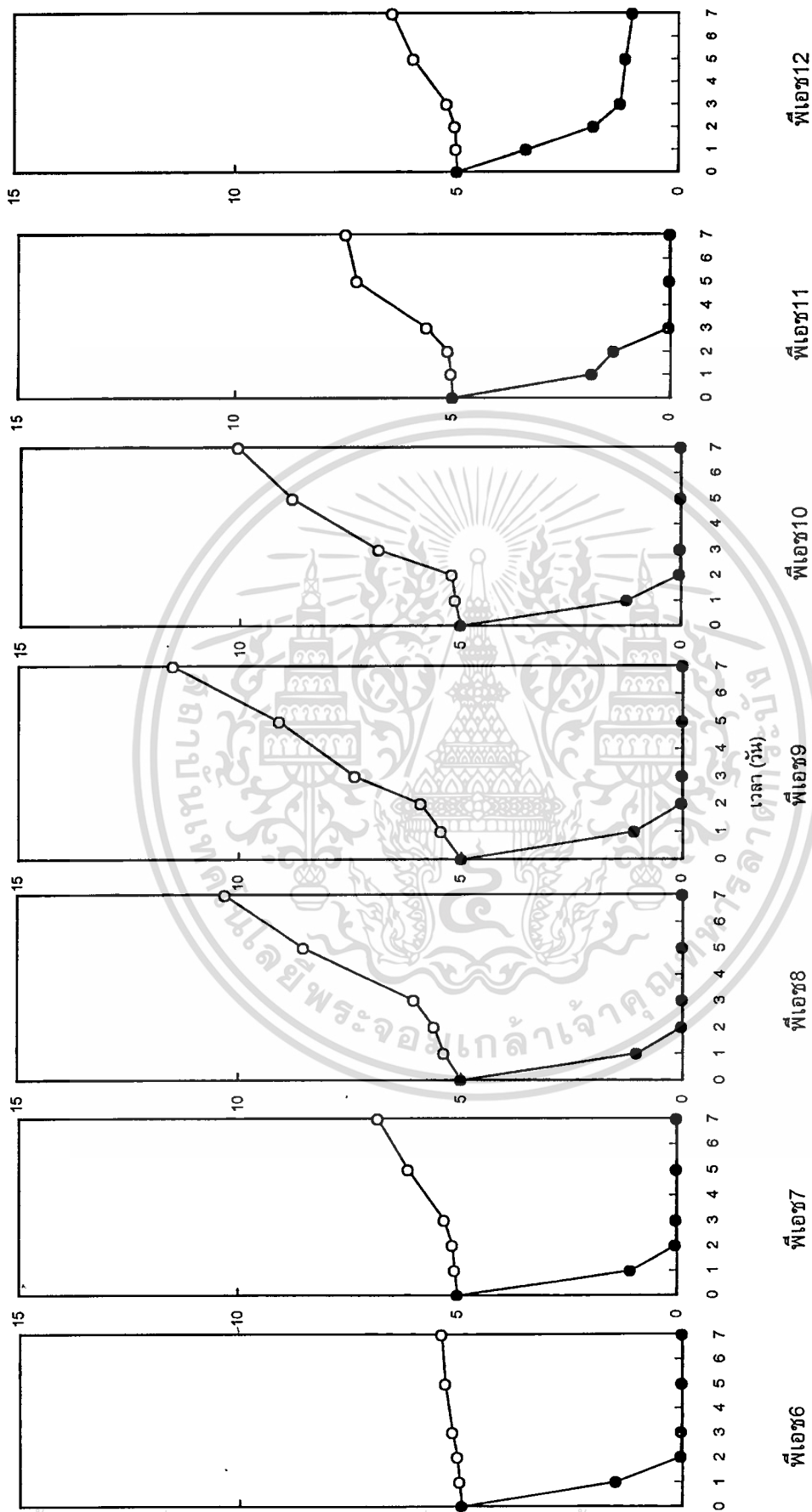
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการเจริญเติบโต จะมีผลทำให้ *M. aeruginosa* มีการเจริญเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ลดลง

สำหรับผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 แสดงดังรูปที่ 4.9 และ 4.10 พบว่าเมื่อความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 8 และ 9 แบคทีเรียสามารถกำจัดเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 3 วัน และเมื่อความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6 7 และ 10 แบคทีเรียสามารถกำจัดเซลล์ได้คิดเป็น 99.80 99.81 และ 99.85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับในวันที่ 3 และสามารถกำจัดเซลล์ได้หมดในวันที่ 5 เมื่อความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นมีค่า 11 แบคทีเรียสามารถกำจัดเซลล์ได้คิดเป็น 99.86 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5 และสามารถกำจัดเซลล์ได้หมดในวันที่ 7 และเมื่อความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 12 แบคทีเรียสามารถกำจัดเซลล์ได้คิดเป็น 83.88 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 จากสภาพของอาหารที่มีการแปรผันระดับความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นแตกต่างกัน ทำให้มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และความสามารถของแบคทีเรียในการกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 แล้ว นอกจากนั้นเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 สังเกตพบว่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเริ่มต้น โดยอาหารที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นในช่วง 6-8 เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะมีสภาพความเป็นกรดเป็นด่างเพิ่มขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.8 (ข) ทั้งในชุดควบคุมและชุดทดสอบ ทั้งนี้จากผลการศึกษาของ Goldman และคณะ (1974) ที่ได้ศึกษาอิทธิพลของอินทรีย์คาร์บอนต่อการเจริญของสาหร่าย พบว่าเมื่อสาหร่ายใช้ CO_3^{2-} ไป จะมีผลทำให้ความเป็นกรดเป็นด่างมีค่าสูงขึ้นเนื่องจากไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) ที่เหลือจากปฏิกิริยา ส่วนอาหารที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นในช่วง 9-12 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่ามีความเป็นกรดเป็นด่างลดลงทั้งในชุดควบคุมและชุดทดสอบ ทั้งนี้เนื่องมาจากไฮโดรเจนไอออน (H^+) ที่เหลือจากปฏิกิริยา รวมทั้งเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียอาจมีผลทำให้ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารลดลงเนื่องจากการสร้างกรดอินทรีย์และการออกซิเดชันสารประกอบต่างๆ (Cole และคณะ, 1982)

4.4.3 การศึกษาผลของปริมาณไนเตรตต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12

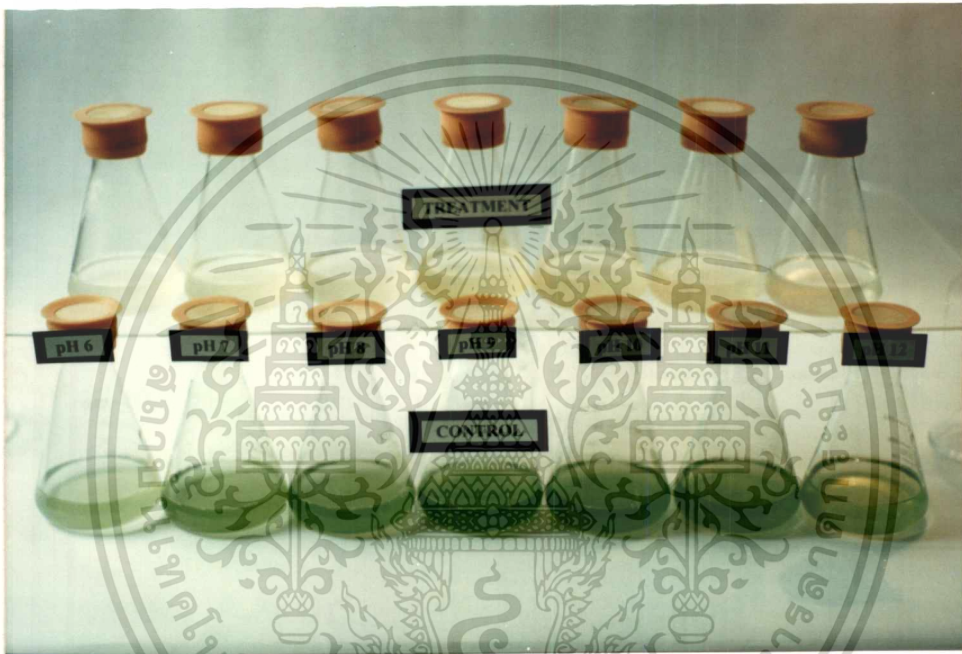
จากการนำอาหาร MA ที่มีองค์ประกอบของไนเตรต ได้แก่ แคลเซียมไนเตรต ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) และ โซเดียมไนเตรต (NaNO_3) มาดัดแปลงโดยการเติมองค์ประกอบของไนเตรตให้มีความเข้มข้นเป็น 1/5 1/10 และ 1/20 เท่าของสูตรอาหาร MA ปกติ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.11 และ 4.12 พบว่าสูตรอาหาร MA ที่มีองค์ประกอบของ แคลเซียมไนเตรต โพแทสเซียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต



รูปที่ 4.9 แสดงผลของความเข้มข้นต่างต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียตัดดีเอการหัส C-12

หมายเหตุ -○- ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย
 -●- ชุดทดสอบที่มีการเติมแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



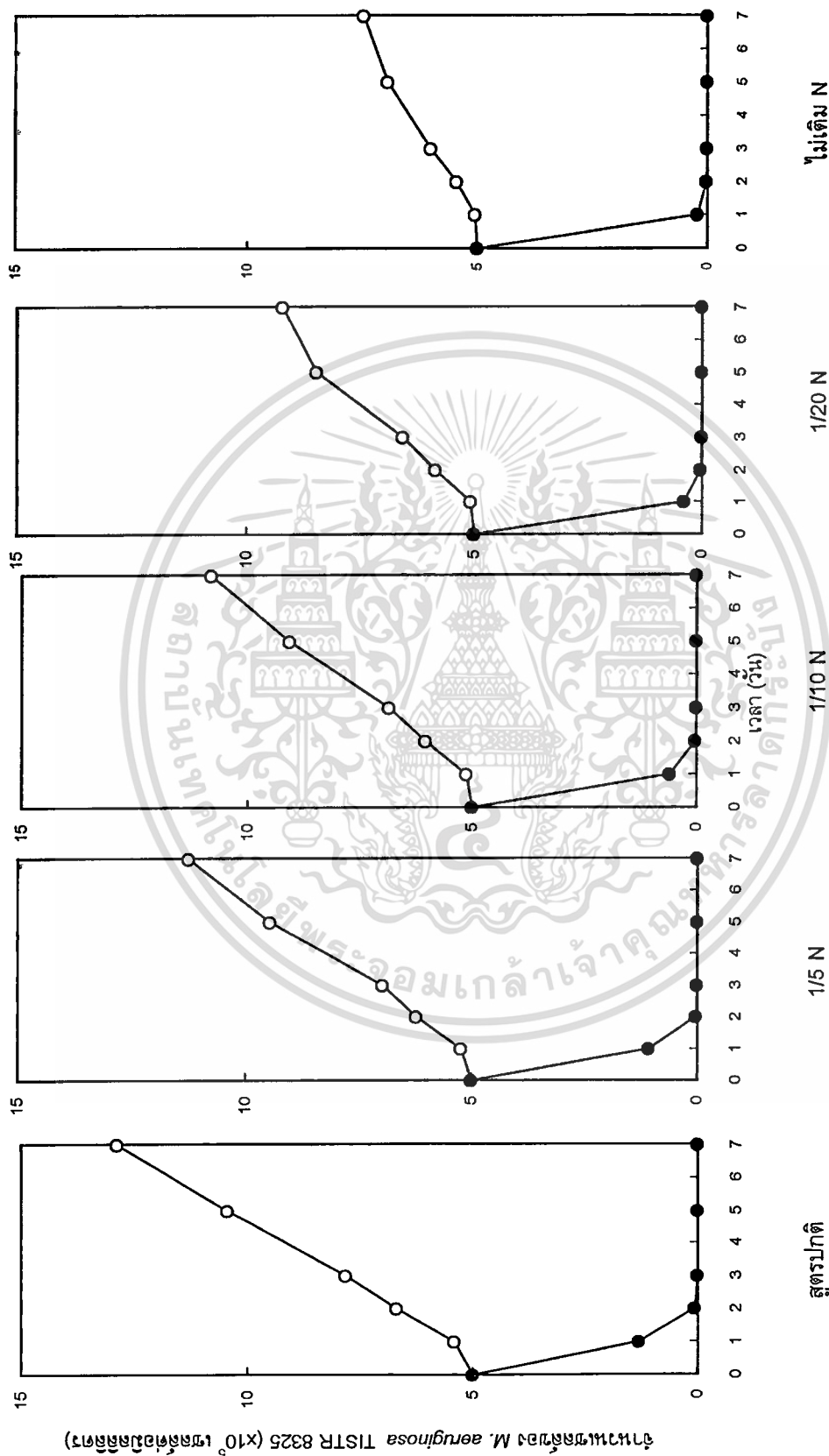
รูปที่ 4.10 แสดงผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12

หมายเหตุ : ทำการทดสอบในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร MA 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

ที่ระดับความเข้มข้นของสูตรอาหาร MA ปกติ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยพบว่าการเจริญเติบโตสูงสุดของเซลล์เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.29×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ในการทดลองเปรียบเทียบการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MA ดัดแปลงที่มีการเติมองค์ประกอบของไนเตรดที่ระดับความเข้มข้น 1/5 1/10 1/20 เท่าของสูตรอาหาร MA ปกติ และสูตรอาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรดกับสูตรอาหาร MA ปกติ พบว่าในระยะแรกการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไนเตรดเท่ากับ 1/5 1/10 และ 1/20 เท่าของสูตรอาหารปกติ ยังไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ในวันที่ 3 ของการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตเริ่มมีความแตกต่างกัน และมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในช่วงวันที่ 5-7 ซึ่งเป็นช่วงที่การเจริญเติบโตเริ่มลดลง โดยอาหาร MA สูตรดัดแปลงและอาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรด มีผลทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญเติบโตสูงสุดของเซลล์เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 เท่ากับ 1.13×10^6 1.08×10^6 9.21×10^5 และ 7.48×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยอาหาร MA สูตรปกติทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญดีกว่าอาหาร MA สูตรดัดแปลง คิดเป็น 1.14 1.19 และ 1.40 เท่า และมีการเจริญดีกว่าสูตรอาหารที่ไม่เติมไนเตรด 1.72 เท่าตามลำดับ

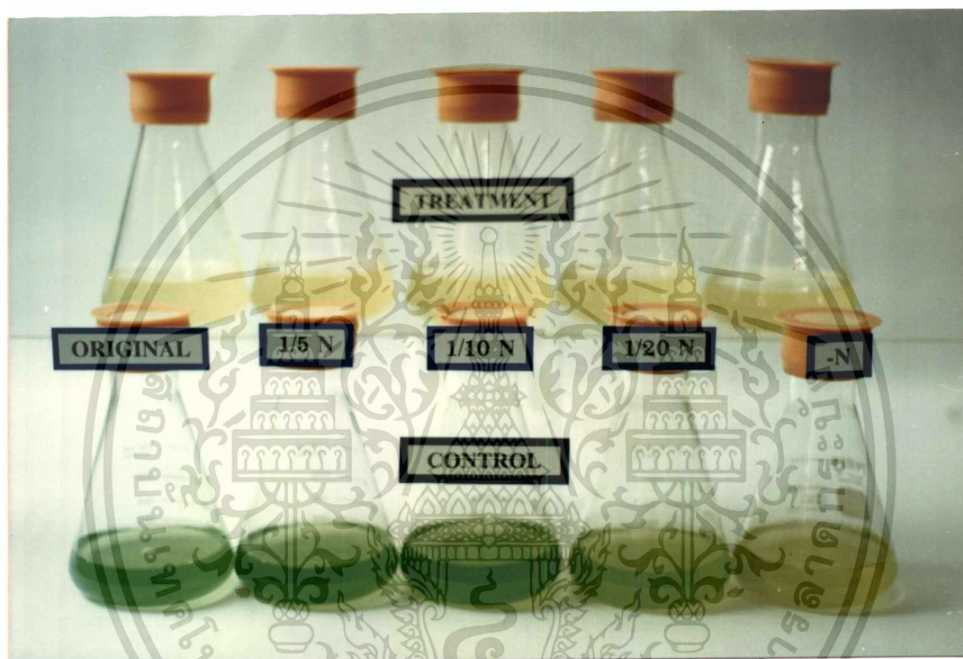
จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณไนเตรดที่ระดับต่างๆ มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาปัจจัยทางสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* ในอาหาร MA ที่ดัดแปลงโดยการเติมองค์ประกอบของไนเตรด ได้แก่ แคลเซียมไนเตรด โพแทสเซียมไนเตรด และโซเดียมไนเตรด ในระดับความเข้มข้น 1/10 และ 1/20 เท่าของสูตรอาหารปกติ (Watanabe and Oishi, 1985) ทั้งนี้เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียต้องการสารอาหารจากแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นเมื่อแหล่งไนโตรเจนในอาหารมีปริมาณลดลง จึงมีผลทำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตลดลงอย่างชัดเจน ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า สูตรอาหาร MA ที่มีองค์ประกอบของไนเตรดที่ระดับความเข้มข้นของสูตรอาหารปกติ มีผลทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด รองลงมาได้แก่ สูตรอาหาร MA ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของไนเตรดเท่ากับ 1/5 1/10 1/20 เท่าของสูตรอาหาร MA ปกติ และสูตรอาหาร MA ดัดแปลงที่ไม่มีการเติมไนเตรด



รูปที่ 4.11 แสดงผลของปริมาณไนเตรตต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแมคทีเรียตัดดีเอการหัส C-12

หมายเหตุ : -○- ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแมคทีเรีย
 -●- ชุดทดสอบที่มีการเติมแมคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงผลของปริมาณไนเตรตต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12

หมายเหตุ : ทำการทดสอบในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร MA 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 60 ไมโครโวนส์ไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรร่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในอาหารที่มีการเติมองค์ประกอบของไนเตรตที่ระดับความเข้มข้น 1/5 1/10 1/20 เท่าของสูตรอาหาร MA ปกติ สูตรอาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรต และสูตรอาหาร MA ปกติ จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.11 และ 4.12 พบว่าในวันที่ 2 ของการทดสอบแบคทีเรียสามารถกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ คิดเป็น 99.51 99.50 99.66 99.82 และ 99.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมของสูตรอาหารที่มีการเติมไนเตรตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณองค์ประกอบของไนเตรตไม่มีผลอย่างชัดเจนต่อกิจกรรมของแบคทีเรียในการกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 เนื่องจากแบคทีเรียสามารถกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ในแต่ละชุดทดสอบได้หมดภายในเวลา 3 วัน ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียสามารถใช้สารประกอบต่างๆที่ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ผลิตขึ้นและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์หลังจากที่เซลล์ถูกทำลายโดยแบคทีเรีย ทั้งนี้ Iturriaga และ Hoppe (1977) รายงานว่าแบคทีเรียสามารถเมแทบอลิซึมสารอินทรีย์บางชนิดจากเซลล์สาหร่ายที่ตายแล้วได้ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Keating (1978) รายงานว่า แบคทีเรียมีผลกระทบต่อปริมาณแพลงก์ตอนพืชและสารอินทรีย์ที่แพลงก์ตอนพืชผลิตขึ้นอาจจะมีการเปลี่ยนรูปหรือถูกเมแทบอลิซึมได้โดยแบคทีเรีย โดยเมื่อเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียตายจะมีการปล่อยสารอินทรีย์ที่ละลายได้ออกมาภายนอกเซลล์ ดังนั้นเมื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในอาหารที่ไม่มีการเติมองค์ประกอบของไนเตรต แบคทีเรียจึงสามารถเจริญเติบโตและยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้

4.4.4 การศึกษาผลของปริมาณฟอสเฟตต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12

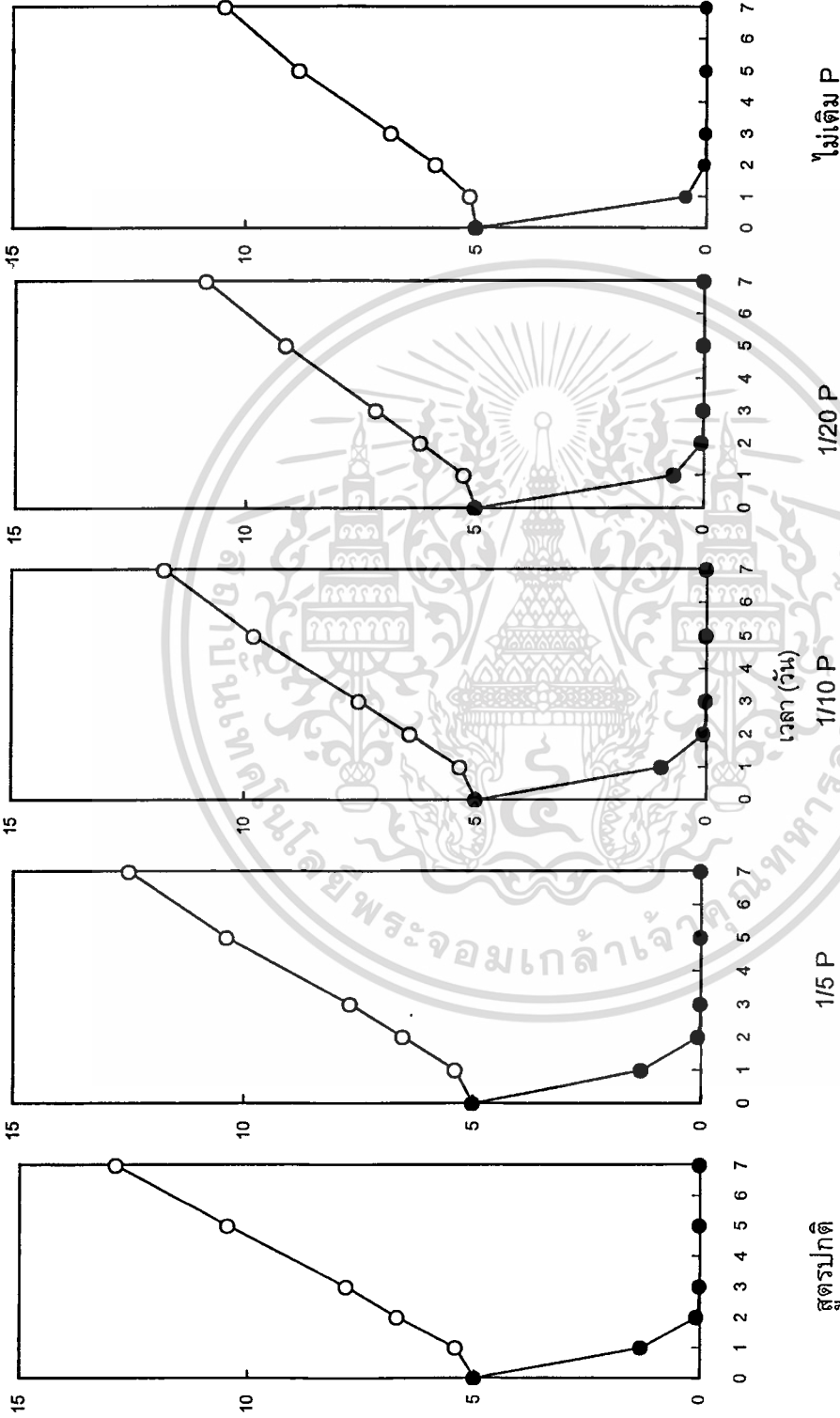
จากการนำอาหาร MA มาดัดแปลงโดยการเติมฟอสเฟต ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เบตากลีเซอโรฟอสเฟตเป็นตัวแทนในการทดสอบ โดยให้มีความเข้มข้นของเบตากลีเซอโรฟอสเฟตเท่ากับ 1/5 1/10 และ 1/20 เท่าของสูตรอาหาร MA ปกติ และสูตรอาหารที่ไม่เติมเบตากลีเซอโรฟอสเฟต ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13 และ 4.14 พบว่าสูตรอาหาร MA ที่มีองค์ประกอบของเบตากลีเซอโรฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้นของสูตรอาหาร MA ปกติ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

สำหรับการเปรียบเทียบการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MA ดัดแปลงที่มีการเติมเบตากลีเซอโรฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 1/5 1/10 1/20 เท่าของสูตรอาหาร MA ปกติ และสูตรอาหาร MA ที่ไม่เติมเบตากลีเซอโรฟอสเฟตกับสูตรอาหาร MA ปกติ พบว่าในระยะแรกการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเบตากลีเซอโรฟอสเฟตเท่ากับ 1/5 1/10 และ 1/20 เท่าของสูตรอาหารปกติ ยังไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน หลังจากวันที่ 3 การเจริญเติบโตเริ่มลดลงจนถึงช่วงวันที่ 5-7 พบว่าอาหาร MA สูตรดัดแปลงทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญเติบโตสูงสุดของเซลล์เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 เท่ากับ 1.25×10^6 1.17×10^6 1.09×10^6 1.05×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยอาหาร MA สูตรปกติทำให้มีการเจริญดีกว่าอาหาร MA สูตรดัดแปลง คิดเป็น 1.03 1.10 และ 1.19 เท่าตามลำดับ และมีการเจริญดีกว่าสูตรอาหารที่ไม่เติมเบตากลีเซอโรฟอสเฟต 1.23 เท่า

จากผลการทดลองที่ได้ในขั้นตอนนี้พบว่าปริมาณฟอสเฟตมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 เช่นเดียวกันกับในกรณีของไนเตรต ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* ในอาหาร MA ที่ดัดแปลงโดยการเติมเบตากลีเซอโรฟอสเฟต ในระดับความเข้มข้น 1/10 และ 1/20 เท่าของสูตรอาหารปกติ (Watanabe and Oishi, 1985) และจากการศึกษาของ Healey (1982) พบว่าเมื่อไซยาโนแบคทีเรียขาดฟอสเฟต ทำให้มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโต โดยทำให้องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง ได้แก่ ปริมาณโปรตีน คลอโรฟิลล์ เอ อาร์เอ็นเอ และดีเอ็นเอลดลง นอกจากนั้นเมแทบอลิซึมของฟอสเฟตและไนเตรตยังมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนระหว่างไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (N/P) ดังนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเบตากลีเซอโรฟอสเฟตเป็น 1/5 1/10 1/20 และไม่เติมเบตากลีเซอโรฟอสเฟต จึงมีผลทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญลดลงตามลำดับ และจากผลการทดลองพบว่า สูตรอาหาร MA ที่ไม่มีการเติมเบตากลีเซอโรฟอสเฟต มีผลทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญเติบโตได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร MA ที่มีการเติมเบตากลีเซอโรฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆที่ทำการทดสอบ

สำหรับผลการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 เมื่อเปรียบเทียบในสูตรอาหาร MA ที่มีการเติมเบตากลีเซอโรฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้น 1/5 1/10 1/20 เท่าของสูตรอาหาร MA ปกติ และสูตรอาหารที่ไม่เติมเบตากลีเซอโรฟอสเฟตกับสูตรอาหาร MA ปกติ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13 และ 4.14 พบว่าในวันที่ 2 ของการทดสอบแบคทีเรียสามารถ

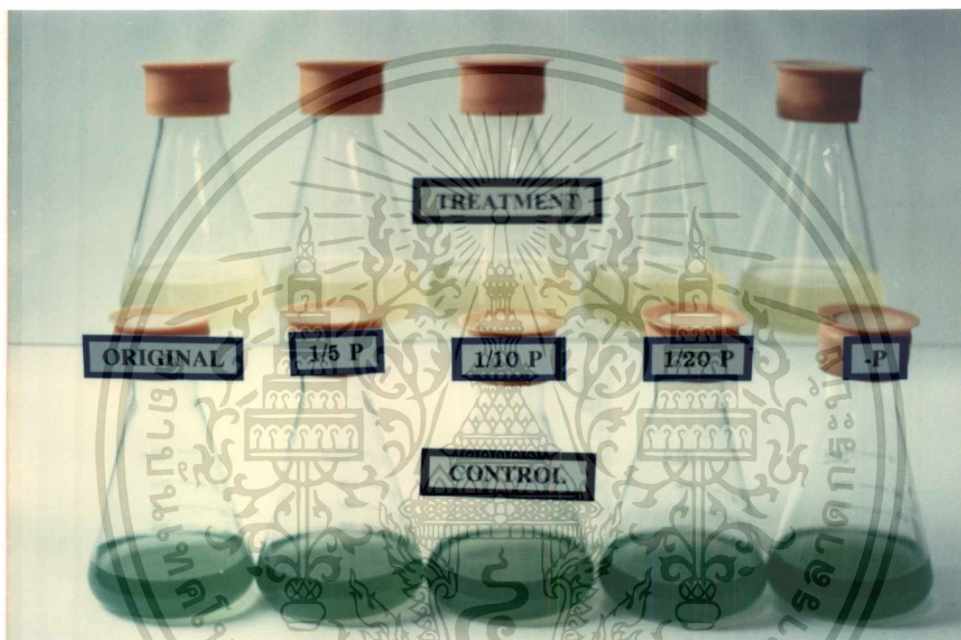
เอกสารนี้จัดทำขึ้นในนามของกรมวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ในอาหารที่มีการแปรผันปริมาณของเบตาไมว่กว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดงผลของปริมาณฟอสเฟตต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบบที่เรียดัดเลือกที่ C-12

หมายเหตุ : -○- ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบบที่เรียดัดเลือก
 -●- ชุดทดสอบที่มีการเติมแบบที่เรียดัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 แสดงผลของปริมาณฟอสเฟตต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12

หมายเหตุ : ทำการทดสอบในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร MA 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตร์ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรรังสีให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

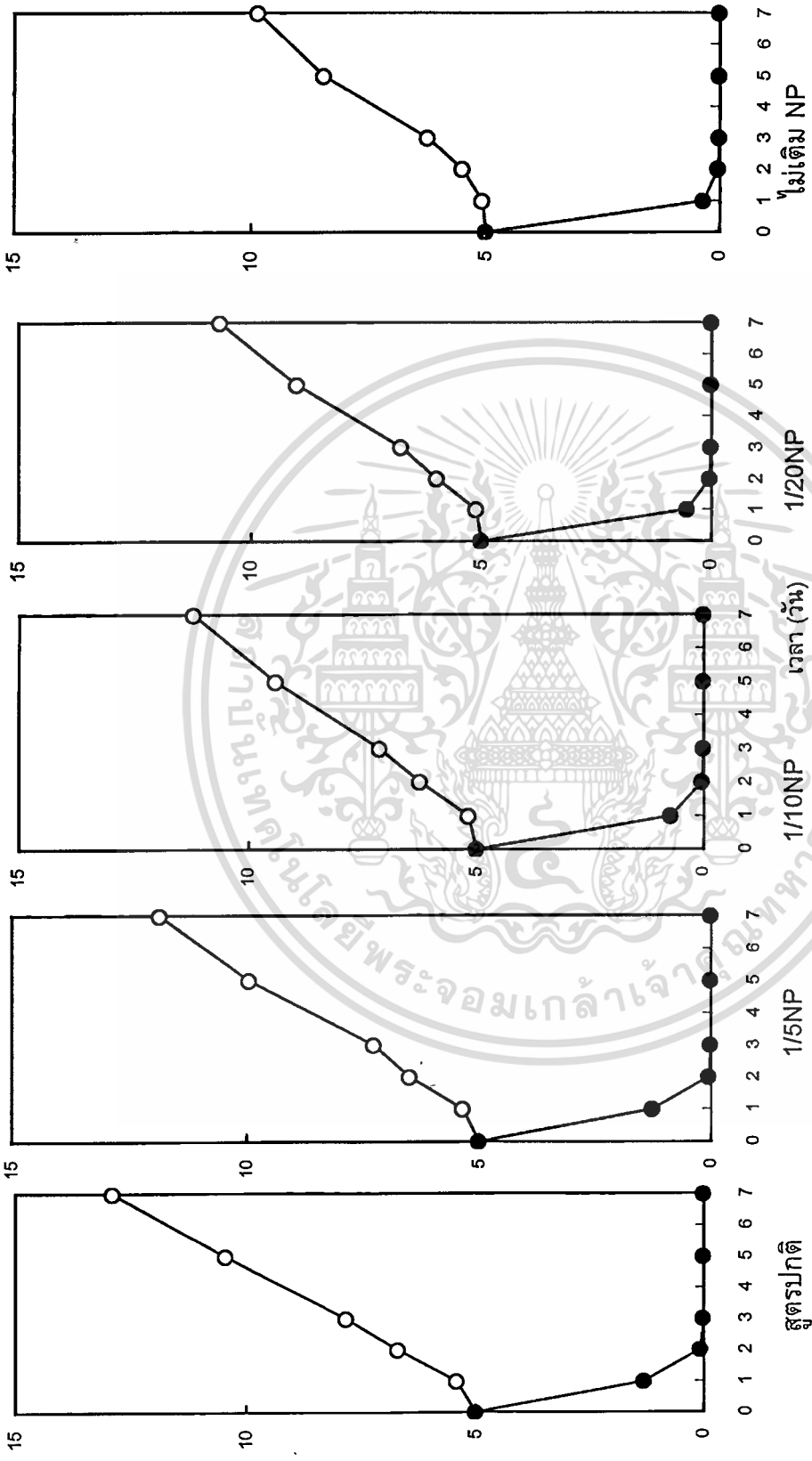
8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในสูตรอาหาร MA ที่ดัดแปลงโดยการแปรผันปริมาณไนเตรตและฟอสเฟต ที่ระดับความเข้มข้น 1/5 1/10 1/20 เท่าของสูตรอาหาร MA ปกติ สูตรอาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรตและฟอสเฟต กับสูตรอาหาร MA ปกติ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.15 และ 4.16 พบว่าในวันที่ 2 ของการทดสอบแบคทีเรียสามารถกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ คิดเป็น 99.45 99.58 99.57 99.70 และ 99.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมของสูตรอาหารที่มีการเติมไนเตรตและฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณไนเตรตและฟอสเฟตไม่มีผลอย่างชัดเจนต่อกิจกรรมของแบคทีเรียในการกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 เนื่องจากแบคทีเรียสามารถกำจัดเซลล์ของ *aeruginosa* TISTR 8325 ได้หมดภายในเวลา 3 วัน เช่นเดียวกันกับการศึกษาผลของไนเตรต และการศึกษาผลของฟอสเฟตต่อการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 จากผลการศึกษาที่ได้ในข้อ 4.4.3 4.4.4 และ 4.4.5 เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MA ที่ไม่เติมฟอสเฟต สูตรอาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรตและฟอสเฟต และสูตรอาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรต กับสูตรอาหาร MA ปกติ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังรูปที่ 4.17 พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 สูตรอาหาร MA ปกติมีผลทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญเติบโตดีกว่าสูตรอาหาร MA ดัดแปลง ดังกล่าวคิดเป็น 1.19 1.27 และ 1.67 เท่าตามลำดับ และจากผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 เมื่อทดสอบในอาหาร MA ดัดแปลงที่ไม่เติมไนเตรตและฟอสเฟตดังกล่าว แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตและกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้หมดภายในเวลา 3 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณไนเตรตและฟอสเฟตไม่มีผลอย่างชัดเจนต่อกิจกรรมของแบคทีเรีย

4.5 การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารพิษในสภาพการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 กับในสภาพการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของสารพิษจากการเปรียบเทียบกับสารพิษมาตรฐาน (standard microcystin) แสดงดังรูปที่ 4.18 จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบสารพิษในกลุ่มไมโครซิสติน (microcystin) 3 ชนิด คือ microcystin-RR (MCYST-RR) microcystin-YR (MCYST-YR) และ microcystin-LR (MCYST-LR) และจากผลการทดลองเปรียบเทียบปริมาณสารพิษในระหว่างการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

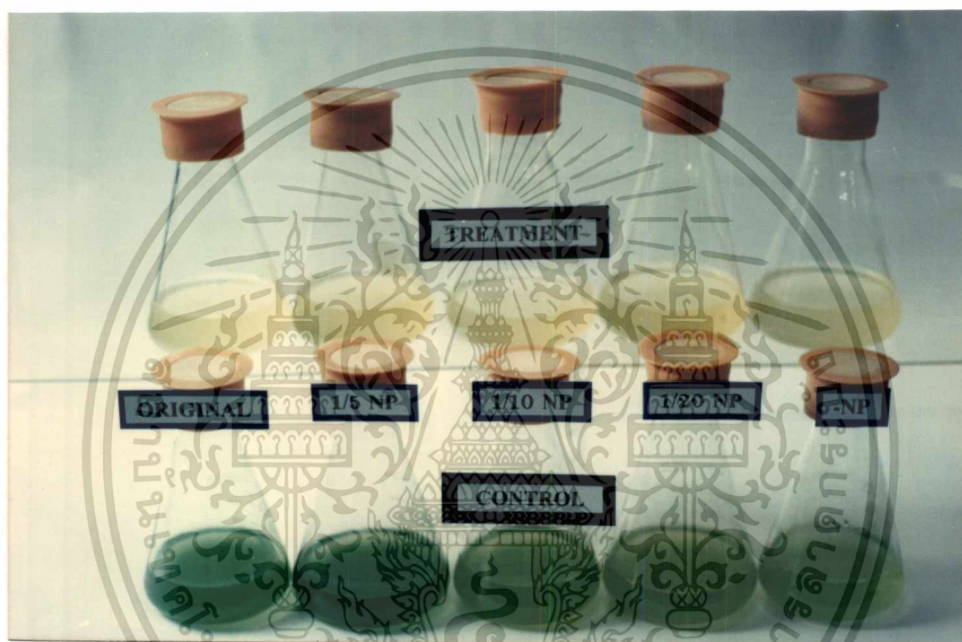
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



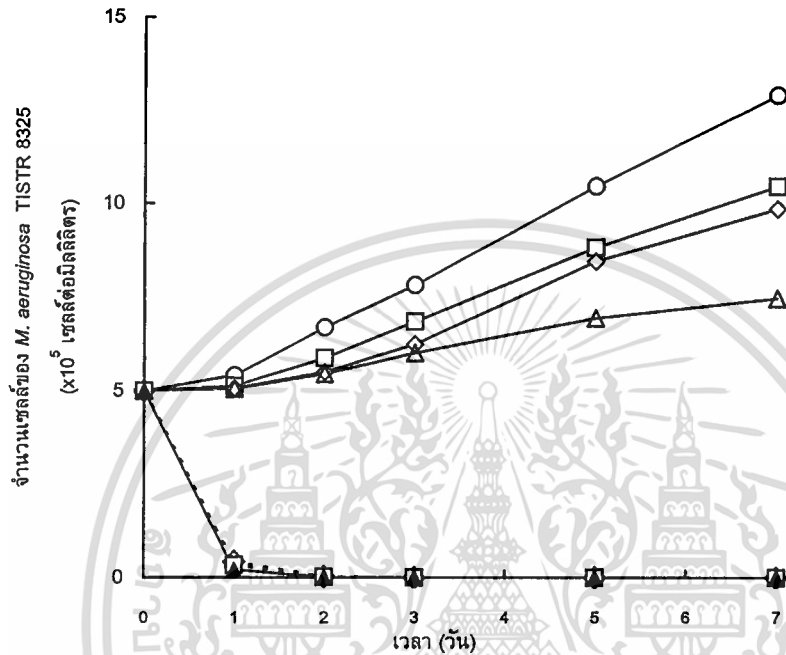
รูปที่ 4.15 แสดงผลของปริมาณไนเตรตและฟอสเฟตต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียคัดเลือกที่รหัส C-12

หมายเหตุ :-○- ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย
 -●- ชุดทดสอบที่มีการเติมแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 แสดงผลของปริมาณไนเตรตและฟอสเฟตต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยแบคทีเรียตัดเล็กรหัส C-12
 หมายเหตุ : ทำการทดสอบในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร MA 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 60 ไมโครโวนส์ไต้ต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยมีวงจรช่วงให้แสงต่อช่วงมืดเท่ากับ 12 ต่อ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.17 แสดงการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ในอาหาร MA สูตรปกติ อาหาร MA ที่ไม่เติมฟอสเฟต อาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรด และอาหาร MA ที่ไม่เติมฟอสเฟตและไนเตรด จากชุดควบคุมและชุดทดสอบ

- หมายเหตุ : ○— อาหาร MA มาตรฐาน
- ชุดควบคุม : □— อาหาร MA ที่ไม่เติมฟอสเฟต
 △— อาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรด
 ◇— อาหาร MA ที่ไม่เติมฟอสเฟตและไนเตรด
- ชุดทดสอบ : □— อาหาร MA ที่ไม่เติมฟอสเฟต
 ▲— อาหาร MA ที่ไม่เติมไนเตรด
 ◇— อาหาร MA ที่ไม่เติมฟอสเฟตและไนเตรด

ในเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 จากเริ่มต้น 6.87 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง มีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 และวันที่ 7 มีค่า 7.01 และ 9.54 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ และจากการศึกษาปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในชุดทดสอบที่มีการเติมแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 แสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.18 (ข) พบปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในอาหารในวันที่ 3 และวันที่ 7 โดยปริมาณสารพิษไมโครซิสตินรวมในวันที่ 3 มีค่า 0.75 ไมโครกรัมต่อลิตร และในวันที่ 7 มีค่า 0.88 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณสารพิษไมโครซิสตินรวมในอาหารในวันที่ 7 มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารพิษไมโครซิสตินรวมในชุดควบคุม คิดเป็น 90.78 เปอร์เซ็นต์

จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าปริมาณสารพิษไมโครซิสติน มีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ภายในระยะเวลา 7 วันที่ทำการทดสอบ และการปลดปล่อยไมโครซิสตินออกสู่ภายนอกเซลล์จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของ *M. aeruginosa* ถูกทำลาย ถึงแม้จะมีรายงานว่าไมโครซิสตินเป็น intracellular toxins (Carmichael, 1981) แต่อย่างไรก็ตามไมโครซิสตินจะถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำเมื่อเซลล์ของ *Microcystis* ถูกย่อย (Berg et al, 1987) ซึ่งจากการศึกษาที่ได้พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาการปลดปล่อยสารพิษไมโครซิสตินในระหว่างกระบวนการย่อยสลายของ *M. aeruginosa* โดยพบที่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารพิษทั้งในเซลล์ของ *M. aeruginosa* และในอาหารที่ทำการทดสอบ ทั้งจากการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ (Watanabe et al., 1992) และในสภาพธรรมชาติ (Jones and Orr, 1994) และจากการศึกษาของ Watanabe และ Oishi (1995) และ Sivonen (1990) รายงานว่าระดับความเป็นพิษของสารพิษและการผลิตสารพิษของ *M. aeruginosa* และ *Oscillatoria aghardhii* เป็นผลเนื่องมาจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ และความเข้มของแสง นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยอื่นๆที่มีผลกระทบต่อการผลิตสารพิษ เช่น ปริมาณธาตุอาหาร (ไนเตรตและฟอสเฟต) และความเป็นกรดเป็นด่าง การเปลี่ยนแปลงปริมาณของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย สายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียและองค์ประกอบของสารพิษ

4.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

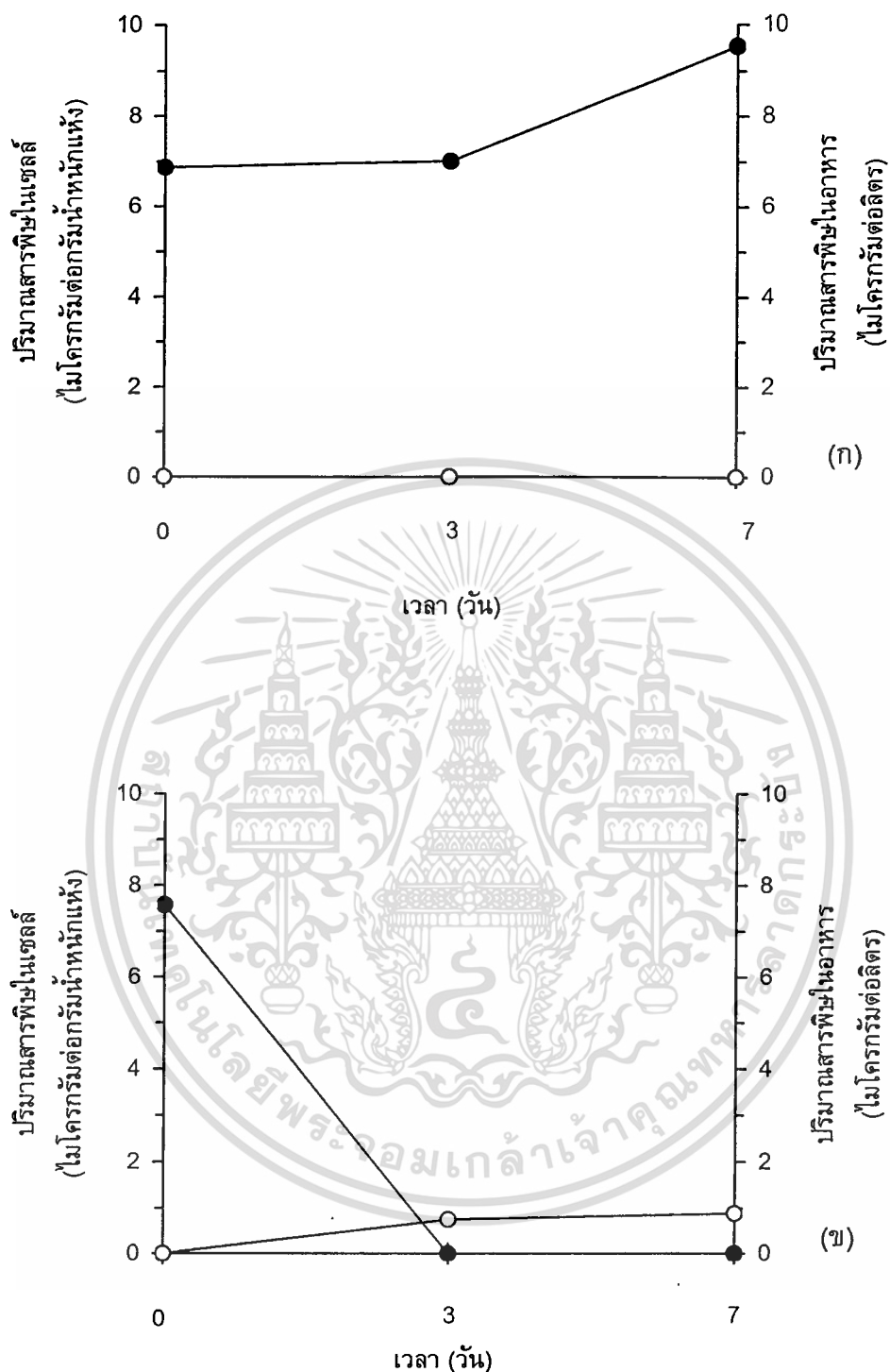
จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกเบื้องต้นและจากศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 จากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกแล้วพบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ดีที่สุด มาจำแนกชนิดและศึกษาคุณสมบัติบางประการ โดยอาศัยลักษณะของรูปร่าง ขนาด และการเคลื่อนที่ของเซลล์ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการ โดยอาศัยแบบ

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในเซลล์ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และในอาหาร MA (ไมโครกรัมต่อลิตร) จากชุดควบคุมและชุดทดสอบ

เวลา (วัน)	ปริมาณสารพิษในเซลล์ (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) * หรือ ปริมาณสารพิษในอาหาร (ไมโครกรัมต่อลิตร)				ชุดควบคุม				ชุดทดสอบ				
	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR	ปริมาณ	RR	YR	LR	
วันที่ 0													
ในเซลล์	6.87	2.29	2.08	2.50	7.57	2.95	2.25	2.37					
ในอาหาร	**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
วันที่ 3													
ในเซลล์	7.01	1.19	3.41	2.41	0.75	0.10	0.50	0.15					
ในอาหาร	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
วันที่ 7													
ในเซลล์	9.54	3.72	1.55	4.27	0.88	0.19	0.68	0.01					
ในอาหาร	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ * ปริมาณสารพิษจากการคำนวณเปรียบเทียบกับสารพิษมาตรฐาน

** ไม่พบปริมาณสารพิษ



รูปที่ 4.18 แสดงปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และในอาหาร MA (ไมโครกรัมต่อลิตร) จากชุดควบคุม (ก) และชุดทดสอบ (ข)

หมายเหตุ ● ปริมาณสารพิษไมโครซิสติน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

○ ปริมาณสารพิษไมโครซิสติน (ไมโครกรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนการจัดจำแนกของ Reichenbach และ Dworkin (1982) Sangkhobol และ Skerman (1981) Stanier (1946) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ร่วมกับการวิเคราะห์และจัดจำแนกแบคทีเรียตามระบบเอพีไอ (API)

รายละเอียดของการจัดจำแนกแบคทีเรียทั้ง 3 ตัวอย่าง มีดังนี้คือ

Cytophaga sp. TISTR 043

มีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.19 เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่งยาวปลายกลม เซลล์บิดงอได้ (flexible rods, rounded ends) ไม่มี flagella มีการเคลื่อนที่โดยการลื่นไถลไปบนพื้นผิวของอาหาร (gliding movement) เซลล์มีขนาด $0.6 \times 1.3-3$ ไมโครเมตร ขนาดของเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์รูปร่างเป็นแท่งยาวมาเป็นแท่งสั้นเมื่อเซลล์แก่ โคโลนีบนอาหารที่มีความเข้มข้นของสารอาหารต่ำจะเป็นแบบ swarm โคโลนี เนื่องจากความเข้มข้นของสารอาหารที่ต่ำจะเป็นการกระตุ้นการเคลื่อนที่และการกระจาย (spreading) ของโคโลนี (Reichenbach and Dworkin, 1982) นอกจากนี้ลักษณะการเจริญของเชื้อจากการ streak บนอาหารที่มีความเข้มข้นของสารอาหารต่ำจะเป็นแบบ slime trail (รูปที่ 4.19 ข.) และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย *Cytophaga* sp. TISTR 043 มาทำการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี โดยใช้การวิเคราะห์และจัดจำแนกแบคทีเรียตามระบบเอพีไอ (API) พบว่ามีคุณสมบัติดังนี้คือ ไม่รีดิทซ์ไนเตรต ไม่สร้างอินโดล ไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส ย่อยเจลาติน สามารถใช้ esculin ได้ สร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เป็นต้น

Alcaligenes sp. (แบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12)

มีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี แสดงดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.20 แบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ปลายกลม เซลล์มีขนาด $0.3-0.6 \times 1.3-1.6$ ไมโครเมตร แกรมลบ เซลล์มีการเคลื่อนที่ ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร NA และ CYEA มีลักษณะขอบของโคโลนีเรียบ โคโลนีมีสีเหลืองอ่อน และจากรายงานของ Kersters และ De Ley (1984) รายงานว่าแบคทีเรียในสกุลนี้บางสายพันธุ์ยังมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter*, *Agrobacter* และ *Pseudomonas* และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียรหัส C-12 มาทำการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี โดยใช้การวิเคราะห์และจัดจำแนกแบคทีเรียตามระบบเอพีไอ (API) พบว่ามีคุณสมบัติดังนี้คือ รีดิทซ์ไนเตรต ไม่สร้างอินโดล ไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส ไม่สามารถใช้ esculin ได้ ไม่ย่อยเจลาติน สร้างเอนไซม์คาตาเลส สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เป็นต้น จากการพิจารณาตามแนวทางการจัดจำแนกของ Reichenbach และ Dworkin (1982) , Sangkhobol และ Skerman (1981)

ตารางที่ 4.3 คุณสมบัติบางประการของแบคทีเรีย *Cytophaga* sp. TISTR 043

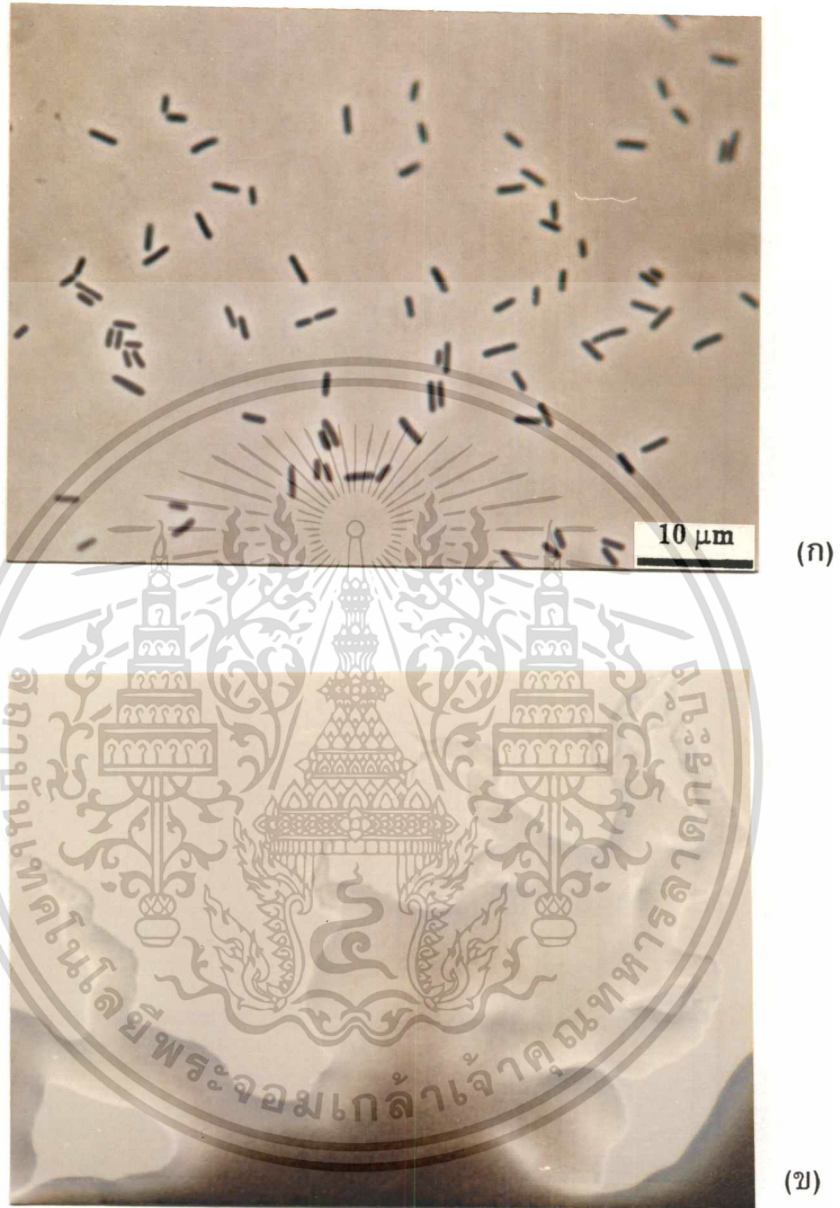
Characteristics	Reaction
Gram reaction	-ve
Mode of motility	
: Gliding	+
: Flagella	-
Reduction of nitrate	-
Indole production of tryptophane	-
Fermentation production of acid from glucose	-
Arginine dihydrolase	-
Urease production	-
Hydrolysis of esculin	+
Hydrolysis of gelatin	+
β -galactosidase production	+
Assimilation of :	
-Glucose	+
-Arabinose	+
-Mannose	+
-Mannitol	+
-N-acetyl-glucosamine	+
-Maltose	+
-Gluconate	-
-Caprato	-
-Adipate	-
-Malate	+
-Citrate	+
-Phenyl-acetate	-
Cytochrome oxidase	-
Catalase	+

หมายเหตุ : -ve = Gram negative bacteria

 + = Positive

 - = Negative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

Cytophaga sp. TISTR 043

(ก) รูปร่างเซลล์ปกติของเชื้อ *Cytophaga* sp. TISTR 043

บนอาหาร LWPYEA อายุ 24 ชั่วโมง (ภาพขยาย 1,000 เท่า)

(ข) ลักษณะการเจริญของเชื้อจากการ streak บนอาหารที่มี

ความเข้มข้นของสารอาหารต่ำ (1/10 NA) (ภาพขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 คุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12

Characteristics	Reaction
Gram reaction	-ve
Mode of motility	
: Gliding	-
: Flagella	+
Reduction of nitrate	+
Indole production of tryptophane	-
Fermentation production of acid from glucose	-
Arginine dihydrolase	-
Urease production	-
Hydrolysis of esculin	-
Hydrolysis of gelatin	-
β -galactosidase production	-
Assimilation of :	
-Glucose	+
-Arabinose	-
-Mannose	-
-Mannitol	-
-N-acetyl-glucosamine	-
-Maltose	-
-Gluconate	+
-Caprato	+
-Adipate	+
-Malate	+
-Citrate	+
-Phenyl-acetate	+
Cytochrome oxidase	+
Catalase	+

หมายเหตุ : -ve = Gram negative bacteria

+ = Positive

- = Negative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.20 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

Alcaligenes sp. (รหัส C-12)

(ก) รูปร่างเซลล์ปกติของเชื้อ *Alcaligenes* sp. (รหัส C-12)

บนอาหาร LWPYEA อายุ 24 ชั่วโมง (ภาพขยาย 1,000 เท่า)

(ข) ลักษณะการเจริญของเชื้อจากการ streak บนอาหารที่มี

ความเข้มข้นของสารอาหารต่ำ (1/10 NA) (ภาพขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 คุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียที่เรียดัดเลือกรหัส B-3

Characteristics	Reaction
Gram reaction	-ve
Mode of motility	
: Gliding	-
: Flagella	+
Reduction of nitrate	+
Indole production of tryptophane	-
Fermentation production of acid from glucose	-
Arginine dihydrolase	-
Urease production	-
Hydrolysis of esculin	-
Hydrolysis of gelatin	-
β -galactosidase production	-
Assimilation of :	
-Glucose	+
-Arabinose	-
-Mannose	+
-Mannitol	-
-N-acetyl-glucosamine	-
-Maltose	-
-Gluconate	+
-Caprata	+
-Adipate	+
-Malate	+
-Citrate	+
-Phenyl-acetate	+
Cytochrome oxidase	+
Catalase	+

หมายเหตุ : -ve = Gram negative bacteria

+ = Positive

- = Negative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.21 รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Pseudomonas* sp. (รหัส B-3)

(ก) รูปร่างเซลล์ปกติของเชื้อ *Pseudomonas* sp. (รหัส B-3)

บนอาหาร LWPYEA อายุ 24 ชั่วโมง (ภาพขยาย 1,000 เท่า)

(ข) ลักษณะการเจริญของเชื้อจากการ streak บนอาหารที่มีความ

เข้มข้นของสารอาหารต่ำ (1/10 NA) (ภาพขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ Stanier (1946) ร่วมกับการวิเคราะห์และจัดจำแนกแบคทีเรียตามระบบเอพีไอ (API) จึงจัดให้เชื่อ้อยู่ในสกุล *Alcaligenes* sp.

Pseudomonas sp. (แบคทีเรียคัดเลือกรหัส B-3)

มีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี แสดงดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.21 เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเซลล์เป็นแท่งตรงหรือโค้ง เซลล์มีขนาด 0.3-0.6 x 0.6-1.6 ไมโครเมตร โคลีนีบนอาหาร NA มีลักษณะขอบของโคโลนีเรียบ และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียรหัส B-3 มาทำการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี โดยใช้การวิเคราะห์และจัดจำแนกแบคทีเรียตามระบบเอพีไอ (API) พบว่า มีคุณสมบัติดังนี้คือ ไรติวซ์ในเตรด ไม่สร้างอินโดล ไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส ไม่สามารถใช้ esculin ไม่ย่อยเจลาติน สร้างเอนไซม์คาตาเลส สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เป็นต้น จากการพิจารณาตามแนวทางการจัดจำแนกของ Reichenbach และ Dworkin (1982) Sangkhobol และ Skerman (1981) Stanier (1946) ร่วมกับการวิเคราะห์และจัดจำแนกแบคทีเรียตามระบบเอพีไอ (API) จึงจัดให้เชื่อ้อยู่ในสกุล *Pseudomonas* sp.

4.7 การทดสอบความปลอดภัยในการใช้แบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

หลังจากการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียและทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่ผลิตสารพิษจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาและพิจารณาทั้งทางด้านประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่จะนำไปใช้ต่อไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายและผลสืบเนื่องจากการนำไปใช้ จึงนำแบคทีเรียคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลในการยับยั้งที่ดีที่สุด มาศึกษาผลของแบคทีเรียที่มีต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีอยู่ในระบบนิเวศตามธรรมชาติ ซึ่งในการทดลองนี้ได้นำสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย จากศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวจำนวน 3 สกุล 5 สายพันธุ์ และไซยาโนแบคทีเรีย จำนวน 13 สกุล 15 สายพันธุ์ มาเป็นตัวแทนในการทดสอบกับแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325

จากผลการทดลองและการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่าแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรียในสกุล *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Hapalosiphon*, *Calothrix*, *Nostoc*, *Oscillatoria* ไม่ว่าจะกรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ *Phormidium* ส่วนสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรียสกุลอื่นๆซึ่งทำการทดลองใน ครั้งนี้แต่ไม่พบว่าถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ได้แก่ *Chlorella*, *Chroococcum*, *Scenedesmus*, *Scytonema*, *Fischerella*, *Gloeocapsa*, *Rivularia*, *Stigonema* และ *Tolypothrix*

ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ได้ แสดงดังตารางที่ 4.11 พบว่าแบคทีเรียคัดเลือกสามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena siamensis* TISTR 8012 ได้ดี ในขณะที่ *Cylindrospermum* sp. TISTR 8158, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 และ *Hapalosiphon* sp. TISTR 8229 ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ได้ดีใกล้เคียงกัน รองลงมาได้แก่ *Calothrix marchica* TISTR 8109, *Nostoc* sp. TISTR 8177, *Oscillatoria* sp. TISTR 8245, *Phormidium* sp. TISTR 8246 และ *Phormidium* sp. TISTR 8247



ตารางที่ 4.6 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ต่อการเจริญ
ของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย

สาหร่ายที่ทดสอบ *	ผลการทดสอบ
สาหร่ายสีเขียว	
<i>Chlorella ellipsoidea</i> TISTR 8260	++++**
<i>Chlorella</i> sp. TISTR 8264	++++
<i>Chroococcum</i> sp. TISTR 8268	++++
<i>Scenedesmus</i> sp. S12 NO.94	++++
<i>Scenedesmus</i> sp. S22 NO.97	++++
ไซยาโนแบคทีเรีย	
<i>Anabaena siamensis</i> TISTR 8012	+
<i>Calothrix marchica</i> TISTR 8109	+++
<i>Cylindrospermum</i> sp. TISTR 8158	++
<i>Fischerella</i> sp. TISTR 8220	++++
<i>Gloeocapsa</i> sp. TISTR 8223	++++
<i>Hapalosiphon fontinalis</i> TISTR 8225	++
<i>Hapalosiphon</i> sp. TISTR 8229	++
<i>Nostoc</i> sp. TISTR 8177	+++
<i>Oscillatoria</i> sp. TISTR 8245	+++
<i>Phormidium</i> sp. TISTR 8246	+++
<i>Phormidium</i> sp. TISTR 8247	+++
<i>Rivularia</i> sp. TISTR 8248	++++
<i>Scytonema</i> sp. TISTR 8208	++++
<i>Stigonema</i> sp. TISTR 8253	++++
<i>Tolypothrix</i> sp. TISTR 8257	++++

- หมายเหตุ * ทดสอบที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไตร์ตต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 14 วัน
- ** ++++ เจริญได้ดีเท่าชุดควบคุม ++ เจริญค่อนข้างน้อย
+++ เจริญปานกลาง + เจริญเล็กน้อย ชัดจาง

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการนำตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำจำนวน 25 ตัวอย่าง จากแหล่งต่างๆมาแยก และคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8325 โดยนำมาทดสอบเบื้องต้นกับ *A. siamensis* TISTR 8012 พบแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. siamensis* TISTR 8012 ได้ดีที่สุด จากตัวอย่างรหัส B-3 และตัวอย่างรหัส C-12 และจากการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 กับแบคทีเรียสายพันธุ์เปรียบเทียบ คือ *Cytophaga* sp. TISTR 043 พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ โดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ดีที่สุด โดยสามารถกำจัดเซลล์ได้หมดภายในเวลา 3 วัน จากการทดสอบในอาหาร MA สูตรปกติ ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไคน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ใช้ โดยที่ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียตั้งแต่ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรได้ดีที่สุด และสามารถกำจัดเซลล์ได้หมดในวันที่ 3 เมื่อทดสอบในอาหาร MA สูตรปกติ ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 60 ไมโครไอน์สไคน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน และจากการศึกษาผลของส่วนที่กรองได้จากการบ่ม *M. aeruginosa* TISTR 8325 ร่วมกับแบคทีเรียคัดเลือกต่อการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 พบว่าการเติมส่วนที่กรองได้ในระดับความเข้มข้น 50 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น 1.10 และ 1.19 เท่าตามลำดับ

ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณไนเตรตและฟอสเฟต พบว่า *M. aeruginosa* TISTR 8325 เจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหาร MA สูตรปกติ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเท่ากับ 9 ที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรตและฟอสเฟตในอาหาร MA สูตรปกติ จากการเปรียบเทียบการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ในสภาพที่ไม่มีการเติมฟอสเฟต ไนเตรตและฟอสเฟต และไนเตรต กับสภาพอาหาร MA สูตรปกติ ในสภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกัน พบว่าในสภาพอาหาร MA สูตรปกติทำให้ *M. aeruginosa* TISTR 8325 มีการเจริญเติบโตดีกว่า คิดเป็น 1.25 1.41 และ 2.03 เท่าตามลำดับ และแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้สูงสุด ที่สภาวะอุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 8 และ 9

จากการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารพิษในสภาพการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 กับในสภาพการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 พบว่าในระหว่างการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 พบสารพิษในกลุ่มไมโครซิสติน 3 ชนิด คือ microcystin-RR microcystin-YR และ microcystin-LR สำหรับปริมาณสารพิษในระหว่างการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 ปริมาณสารพิษรวมมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม คิดเป็น 90.78 เปอร์เซ็นต์

จากการนำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ดีที่สุด มาจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยแบบแผนการจัดจำแนกของ Reichenbach และ Dworkin (1982) ; Sangkhobol และ Skerman (1981) ร่วมกับการวิเคราะห์และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียตามระบบเอพีไอ (API) ผลการจัดจำแนกพบว่าแบคทีเรียคัดเลือกรหัส C-12 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 ได้ดีที่สุด จัดอยู่ในสกุล *Alcaligenes* sp.

จากการทดสอบผลของแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. ต่อการเจริญของสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย จำนวน 20 สายพันธุ์ จากศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) พบว่า *Alcaligenes* sp. มีผลยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Anabaena*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Oscillatoria* และ *Phormidium* โดยสามารถยับยั้งไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* TISTR 8012 ได้ดีที่สุด โดยไม่มีผลต่อสาหร่ายสีเขียวทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น จึงควรมีการศึกษาต่อทางด้าน สรีรวิทยาและนิเวศวิทยาของ *Alcaligenes* sp. หรือแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ เพื่อนำไปใช้ในการป้องกันและควบคุมการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษต่อไป

5.2.2 เพื่อความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ ควรมีการศึกษาและใช้งานจริงในระดับบ่อทดลอง และเปรียบเทียบกับแหล่งน้ำที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของ *M. aeruginosa* ซึ่งจะมีตัวแปรทั้งทางด้านเคมีและกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณธาตุอาหารในแหล่งน้ำ รวมทั้งสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศของแหล่งน้ำเข้ามาเกี่ยวข้อง

5.2.3 ควรมีการศึกษารูปแบบและวิธีการใช้ การเก็บรักษา หรือการปรับปรุงให้สะดวกต่อการนำไปใช้ในการควบคุม รวมถึงรูปแบบการผลิตที่จะเป็นไปได้ ซึ่งจะเป็นการทดแทนและลดการใช้สารเคมีที่ใช้ในการควบคุมและกำจัดสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียที่เกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในแหล่งน้ำต่อไป

5.2.4 ควรมีการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ เช่น อาศัยเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและคุณภาพให้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

- ดวงพร คันทโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์.
กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พรินต์ติ้งเฮาส์.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประมง
คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภารัตน์ มหาจันทร์. 2539. "สารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำ." วารสารวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยี. ปีที่11(ฉบับที่1) : 39-53.
- อภารัตน์ มหาจันทร์. 2541, 14 มิถุนายน. "ผลกระทบของการเกิดสาหร่ายที่ผลิตสารพิษใน
แหล่งน้ำจืด." แนวหน้า. หน้า 15.
- Allen, M.M. and Smith, A.J. 1969. " Nitrogen Chlorosis in Blue-Green Algae." **Arch.
Microbiol.** 69 : 114-119.
- Barnet, Y.M., Daft, M.J. and Stewart, W.D.P. 1981. " Cyanobacteria-Cyanophage
Interactions in Continuous Culture." **J. Appl. Bacteriol.** 51 : 541-552.
- Berg, K. Skulberg, O.M. and Skulberg, R. 1987. " Effects of Decaying Toxic Blue-
Green Algae on Water Quality- a Laboratory Study". **Arch. Hydrobiol.** 108 :
549-563.
- Berland, B.R., Bonin, D.J. and Maestrini, S.Y. 1972. "Are Some Bacteria Toxic for
Marine Algae?." **Mar. Biol.** 12 : 189-193.
- Bishop, C.T., Anet, E.F. and Gorham, P.R. 1959. " Isolation and Identification of the
Fast-Death Factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1." **Can. J. Biochem.
Physiol.** 37 : 453.
- Botan, E.A., Miller, J.J. and Kleerekoper, H. 1960. " A Study of the Microbial
Decomposition of Nitrogenous Organic Matter in Fresh Water." **Arch.
Hydrobiol.** 56 : 334-353.
- Botes, D.P., Wessels, P.L., Kruger, H., Runnegar, M.T.C., Santikarn, S., Smith, R.J.,
Barna, J.C.J. and Williams, D.H. 1985. " Structural Studies on Cyanoginosin-
-LR, -YR, YA, and -YM, Peptide Toxins from *Microcystis aeruginosa*." **J. Chem. Soc. I** : 2747.
- Bourke, A.T.C., Hawes, R.B., Neilson, A. and Stallman, N.D. 1983. " An Outbreak of
Hepato-Enteritis (the Palm Island Mystery Disease) Possible caused by
Algal Intoxication." **Toxicon. Suppl.** 3 : 45-48.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Burnham, J.C., Stetak, T. and Locher, G. 1976. "Extracellular Lysis of the Blue-Green Alga *Phormidium luridum* by *Bdellovibrio Bacteriovorus*." **J. Phycol.** 12 : 306-313.
- Caldwell, D.E. and Caldwell, S.J. 1978. "Zoogloea sp. Associated with Blooms of *Anabaena flos-aquae*." **Can. J. Microbiol.** 24 : 922-931.
- Carmichael, W.W., 1981. "Freshwater Blue-Green Algae (Cyanophyta) Toxins." in Carmichael, W.W. **The Water Environment. Algal Toxins and Health.** New York : Plenum Press.
- Carmichael, W.W., 1988. "Toxins of Freshwater Algae ." in Tu, A. T. **Handbook of Natural Toxins.** New York : Marcel Dekker.
- Carmichael, W.W., Mahmood, N.K. and Hyde, E.G. 1990. "Natural Toxins from Cyanobacteria (Blue-Green Algae)." in Hall, S and Strichart, Z. G. **Marine Toxins, Origin, Structure and Molecular Pharmacology.** Washington, D.C. : American Chemical Society.
- Carmichael, W.W. 1994. "The Toxins of Cyanobacteria." **Sci. Am.** 64-72.
- Cole, J.J., Likens, G.E. and Strayer, D.L. 1982. "Photosynthetically Produced Dissolved Organic Carbon : an Important Carbon Source for Planktonic Bacteria." **Limnol. Oceanogr.** In press.
- Coleman, J.R. and Colman, B. 1981. "The Effect of pH on Photosynthesis and Inorganic Carbon Accumulation in a Blue-Green Alga." in Akoyunoglon, G. **Photosynthesis IV Regulation of Carbon Metabolism.** Philadelphia : Balaban International Science Service.
- 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." **Environ. Toxicol. Chem.** 8: 915-922.
- Daft, M.J., McCord, S.B. and Stewart, W.D.P. 1973. "The Occurrence of Blue-Green Algae and Lytic Bacteria at a Waterworks in Scotland." **Water. Treat. Exam.** 22 : 114-124.
- Daft, M.J., McCord, S.B. and Stewart, W.D.P. 1975. "Ecological Studies on Algal-Lysing Bacteria in Freshwaters." **Freshwater Biol.** 5 : 577-596.

- Darveau, R.P. and Lynch, D.L. 1977. "The Antibiotic Activity of Prodigiosins Against Certain Blue-Green Algae." **Phycologia**. 16 : 349-351.
- Delucca, R. and McCracken, M.O. 1978. "Observations on Interaction between Naturally Collected Bacteria and Several Species of Algae." **Hydrobiol.** 55 : 71-75.
- Depinto, J.V. and Verhoff, F.H. 1977. "Nutrient Regeneration from Aerable Decomposition of Green Algae." **Environ. Sci. Technol.** 17 : 371-377.
- Desikachary, T.V. 1959. **Cyanophyta**. New Delhi : Indian Council of Agricultural Research.
- Falconer, I.R., Beresford, A.M. and Runnegar, M.T.C. 1983. "Evidence of Liver Damage by Toxin from a Bloom of Blue-Green Algae, *Microcystis aeruginosa*." **Med. J. Aust.** 1 : 511.
- Fogg, G.E. 1966. "The Extracellular Products of Algae." **Oceanogr. Mar. Biol.** 4 : 195-212.
- Fogg, G.E. 1971. "Extracellular Products of Algae in Freshwater." **Arch. Hydrobiol.** 5 : 1-25.
- 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 : Academic Press.
- Foter, M.J., Palmer, C.M. and Maloney, T.E. 1953. "Antialgal Properties of Various Antibiotics." **Antibio. Chem.** 3 : 505-508.
- Francis, G. 1878. "Poisonous Australian Lakes." **Nature**. 18 : 11-12.
- Galloway, R.A. and Krauss, R.W. 1959. "Mechanisms of Action of Polymycin B on *Chlorella* and *Scenedesmus*." **Plant Physiol.** 34 : 380-389.
- Goldman, J.C., Oswald, W.J. and Jenkins, D. 1974. "The Kinetics of Inorganics Carbon Limited Algal Growth." **J. Water Pollut. Cont. Fed.** 46 : 553.
- Golterman, H.L. 1964. "Mineralization of Algae under Sterile Conditions or by Bacterial Breakdown." **Verh. Int. Ver. Limnol.** 15 : 544-548.
- Granhall, U. and Berg, B. 1972. "Antimicrobial Effects of *Cellovibrio* on Blue-Green Algae." **Arch. Microbiol.** 84 : 234-242.
- Gunnison, D. and Alexander, M. 1975. "Basis for the Resistance of Several Algae to Microbial Decomposition." **Appl. Environ. Microbiol.** 29 : 729-738.

- Healy, F.P. 1973. "Inorganic Nutrient Uptake and Deficiency in Algae." **CRC Crit. Rev. Microbiol.** 3 : 69.
- Healy, F.P. 1982. "Phosphate." in Carr, N.G. and Whitton, B.A. Ed. **The Biology of Cyanobacteria.** Oxford : Blackwell Scientific.
- Hu, N.T., Thiel, T.H., Giddings, Jr. and Volk, C.P. 1981. "New *Anabaena* and *Nostoc* Cyanophages from Sewage Setting Ponds." **Virology**. 114 :236-246.
- Ichimura, T. 1978. "Media for Blue-Green Algae." in Nishizawa, K. and Chihara, M. Ed. **Method in Algological Studies.** Tokyo : Kyoritsu.
- Imai, I., Ishida, Y. and Hata, Y. 1993. "Killing of Marine Phytoplankton by a Gliding Bacterium *Cytophaga* sp., Isolated from the Coastal Sea of Japan." **Mar. Biol.** 116 : 529-532.
- Iturriaga, R. and Hoppe, H.G. 1977. "Observations of Heterotrophic Activity on Photoassimilated Organic Matter." **Mar. Biol.** 40 : 101-108.
- Jone, G.J. and Orr, P.T. 1994. "Release and Degradation of Microcystin Following Algicide Treatment of *Microcystis aeruginosa* Bloom in a Recreational Lake, as Determined by HPLC and Protein Phosphatase Inhibition Assay." **Water. Res.** 28 : 871.
- Kaya, K. and Sano, T. 1996. "Algicidal Compounds in Yeast Extract as a Component of Microbial Culture Media." **Phycologia.** 35(6) : 117-119.
- Kaya, K and Watanabe, M.M. 1994. Chemistry and Toxicology of the Cyclic Heptapeptide Toxins, the Microcystins, from Cyanobacteria. **Microbiol. Cult. Coll.** 10 : 5-33.
- Keating, K.I. 1978. "Blue-Green Algal Inhibition of Diatom Growth : Transition from Mesotrophic to Eutrophic Community Structure." **Science.** 199 : 971-973.
- Kerstens, K. and De Ley, J. 1984. "Genus *Alcaligenes*." 361. in Krieg, N.R. and Holt, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Baltimore : Williams & Wilkins.
- Kruger, G.H.J. and Eloff, J.N. 1978. "The Effect of Temperature on Specific Growth Rate and Activation Energy of *Microcystis* and *Synechococcus* Isolates Relevant to the Onset of the Natural Blooms." **J. Limnol. Soc. S. Afr.** 4(1) : 9.
- Kumar, H.D. 1988. **Introductory Phycology.** New Delhi : Affiliated East-West Press Pvt Ltd.

- Lawton, L.A. and Codd, G.A. 1991. Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins and their Significance in UK and European Waters." **J. Inst. Water Environ. Manage.** 54 : 460-465.
- Lee, K. and Nalevajko, C. 1978. "Photosynthesis, Extracellular Release and Glycolic Acid Uptake by Plankton : Fractionation Studies." **Verh. Int. Ver. Limnol.** 20 : 257-267.
- Mahmood, N.A. and Carmichael, W.W. 1986. "Paralytic Shellfish Poisons Produced by the Fresh-Water Cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5." **Toxicon.** 24 : 175.
- Mahmood, N.A. and Carmichael, W.W. and Pfahler, D. 1988. "Anticholinesterase Poisoning in Dogs from a Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Bloom Dominated by *Anabaena flos-aquae*." **Am. J. Vet. Res.** 49 : 500-503.
- Mankaeva, K.A. 1966. "Interactions between Bacteria and Algae in Aquatic Ecosystems." **Annual Reviews of Ecological Systems.** translated By Cole, J.J. New York : Annual Reviews Inc.
- Matsushima, R., Yoshizawa, S., Watanabe, M.F., Harada, K.-I., Furusawa, M., Carmichael, W.W. and Fujiki, H. 1990. "In vitro and in vivo Effects of Protein Phosphatase Inhibitors, Microcystins and Nodularins, on Mouse Skin and Fibroblasts." **Biochem. Biophys. Res. Com.** 171 : 867.
- Morris, I. 1974. "Nitrogen Assimilation and Protein Synthesis." in Stewart, W.D.P. **Algal Physiology and Biochemistry.** Oxford : Blackwell Scientific.
- Morris, A.L., Ramon, J. and Seider, M.R. 1992. **Microbial Ecology Principle Methods and Applications.** New York : McGraw-Hill.
- Motohashi, K. and Matsudaira, C. 1968. "On the Relation between the Oxygen Consumption and the Phosphate Regeneration from Phytoplankton Decomposing in Stored Sea Water." **J. Oceanogr. Soc. Jpn.** 25 : 249-254.
- Nalewajko, C., Dunstall, T.G. and Shear, H. 1976. "Kinetics of Extracellular Release in Axenic Algae and in Mixed Algal Bacterial Cultures : Significance in Estimation of Total (gross) Phytoplankton Excretion Rates." **J. Phycol.** 12 : 1-5.

- Overbeck, J. 1975. "Bacterial Distribution Patterns and Uptake Kinetics Response in a Stratified Eutrophic Lake." **Verh. Int. Ver. Limnol.** 19 : 2600-2615.
- Paerl, H.W. 1978. "Role of Heterotrophic Bacteria in Promoting N₂ Fixation in Aquatic Habitats." **Microbial Ecol.** 4 : 215-231.
- Paerl, H.W. 1983. "Partitioning CO₂ Fixation in the Colonial Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Mechanism Promoting of Surface Scums." **Appl. Environ. Microbiol.** 252.
- Payer, H.D., Chiemvichak, Y., Hosakul, K., Kongpanichkul, C., Kraidej, L., Nguitrakul, M., Reungmanipytoon, S. and Buri, P. 1980. **Algae Biomass.** Amsterdam : Elsevier.
- Pirt, S.J. 1975. **Principles of Microbe and Cell Cultivation.** Oxford : Blackwell Scientific.
- Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1982. "Introductory to the Gliding Bacteria." in Starr, M.P., Stolp, H., Trueter, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G. **The Prokaryotes.** Vol. I. Berlin : Springer-Verlag.
- Reim, F.L., Shane, M.S. and Cannon, R.E. 1974. "The Characterization of a Bacillus Capable of Blue-Green Bactericidal Activity." **Can. J. Microbiol.** 20 : 981-986.
- Richard, J.W. and Peter, G.T. 1990. "Environmental Factors Affecting the Production of Peptide Toxins in Floating Scums of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a Hypertrophic African Reservoir." **Environ. Sci. Technol.** 24 : 1413-1418.
- Rodriguez, L.M., Villarroja, M. and Monez-calvo, M.L. 1980. "Influence of Ammonium and Nitrate on Protein Content, Amino Acid Pattern, Storage Materials and Fine Structure of *Chlorella* 8H Recovering from N-Starvation." in **Algae Biomass.** North Holland : Elsevier.
- Safferman, R.S. and Morris, M.E. 1963. "Algal Virus : Isolation." **Science.** 140 : 679-680.
- Salvato, J.A. 1972. **Environmental Engineering and Sanitation.** 2nd ed. New York : Wiley-Interscience.
- Sangkhol, V. and Skerman, V.B.D. 1981. "*Chitinophaga*, a New Genus of Chitinolytic Myxobacteria." **Int. J. Syst. Bacteriol.** 31(3) : 285-293.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Shah, N.M. and Wright, N.M. 1974. "The Occurrence of Glycolic Acid in Coastal Sea Water." **Mar. Biol.** 24 : 121-124.
- Shilo, M. 1969. Morphological and Physiological Aspects of the Interaction of *Bdellovibrio* with Host Bacteria. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 50 : 174-204.
- Shilo, M. 1970 "Lysis of Blue-Green Algae by Myxobacter." **J. Bacteriol.** 104 : 453-461.
- Simidu, U., Achimo, K. and Kaneko, E. 1971. "Bacterial Flora of the Phyto- and Zooplankton in In-Shore Water of Japan." **Can. J. Microbiol.** 97 : 1157-1169.
- Singh, R.N. 1961. **Role of Blue-Green Algae in Nitrogen Economy of Indian Agriculture.** New Delhi : Indian Council of Agricultural Research.
- Sivonen, K. 1990. "Effect of Light, Temperature, Nitrate, Orthophosphate and Bacteria on Growth and Hepatotoxin Production by *Oscillatoria agardhii* Strains." **J. Appl. Environ. Microbiol.** 56 : 2658-2666.
- Sivonen, K., Kononen, K., Carmichael, W.W, Dahlem, A.M., Rinehart, K.L., Kiviranta, J. and Niemela, S.I. 1989. "Occurrence of Hepatotoxic Cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and Structure of the Toxin." **Appl. Environ. Microbiol.** 55.
- Smith, R.A. and Lewis, D. 1987. "A Rapid Analysis of Anatoxin-a, the Unstable Toxic Alkaloid from *Anabaena flos-aquae*, the Stable Non-Toxic Alkaloids Left after Bioreduction and a Related Amine which may be Nature's Precursor to Anatoxin-a. **Vet. Them. Toxicol.** 29 : 153-154.
- Solter, K.M. and Gibor, A. 1977. "The Release of Carbohydrates during Mating in *Chlamydomonas reinhardtii*." **Plant Sci. Letter.** 8 :227-231.
- Stanier, R.Y. 1947. "Studies on Nonfruiting Myxobacteria. I. *Cytophaga johnsonae*. n.sp., a Chitin-Decomposing Myxobacterium. **J. Bacteriol.** 53 : 297-315.
- Stanier, R.Y. and Bazize, G. 1971. "Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chlorococcales)." **J. Bact. Rev.** 35 : 171-205.
- Starr, M.P. 1975. "Bdellovibrio as Symbiont : the Association of Bdellovibrios with other Bacteria Interpreted in Terms of a Generalized Scheme." **Symp. Soc. Exp. Biol.** 29 :93-124.

- Stewart, J.R. and Brown, R.M. 1969. "Cytophaga that Kills or Lyses Algae." **Science**. 164 : 1523-1524.
- Stewart, W.D.P. and Lex, M. 1970. "Nitrogenase Activity in Blue-Green Alga *Plectonema boryanum* Strain 594." **Arch. Microbiol.** 73 : 250.
- Stolp, H. and Starr, M.P. 1963. "Bdellovibrio Bacteriovorous Gen. et. sp. n; a Predatory, Endoparasitic and Bacteriolytic Microorganism." **Antonie Van Leeuwenhoek**. 29 : 217-248.
- Sugiura, N., Oyamada, N., Kurosawa, A. and Saito, T. 1993. "Lytic Characteristics of Blue- Green Alga, *Microcystis aeruginosa* by *Pseudomonas* sp." **Jpn. J. Toxicol. Environ. Health**. 39(2) : 94-99.
- Tanaka, N., Nakanishi, M., Kadota, H. 1974. " Nutritional Interaction Between Bacteria and Phytoplankton in a Pelagic Ecosystem." 495-509. in Colwell, R.R and Morita, R.Y. **Effects of the Ocean Environment on Microbial Activities**. Baltimore : University Park Press.
- Tanaka, Y., Takenak, S. Matsuo, H. Kitamori, S. and Tokiwa, H. 1993. "Levels of Microcystins in Japanese Lakes." **Environ. Chem**. 39 :21-39.
- Taylor, J.T. and Duerring, C. 1983. "Effects of Anuran Larvae on Aquatic Processes Associate with Water Quality." **Water Research and Technology**. Durham : University of New Hamshire.
- Tomisek, A. Reid, M.R., Short, W.A. and Skipper, H.E. 1957. "Studies on the Photosynthetic Reaction III the Effects of Various Inhibitors upon Growth and Carbonate-Fixation in *Chlorella pyrenoidosa*." **Plant Physiol**. 32 : 1-10.
- Vaccaro, R.F. 1965. " Inorganic Nitrogen in Sea-Water." in Riley, J.P. and Skirrow, G. **Chem. Oceanogr**. New York : Academic Press.
- Van der Mollen, J.M. Garty, J., Aardema, G.W. and Krumbein, W.E. 1978. "Growth Control of Algae and Cyanobacterial on Historical Monuments by a Mobile UV Unit (MUVU)." **Stud. Conserv**. 25 : 71-77.
- Van der Westhuizen, A.J. and Eloff, J.N. 1983. **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. translated from Z. Pflanzenphysiol. by Richmond, A. Florida : CRC Press.

- Verhoeven, J. 1993. "Implementing the New South Wales Algal Management Strategy ." **First Annual Report, State Algal Coordinating Committee.** New South Wales : Australia.
- Waksman, S.A., Stokes, J.L., Butler, M.R. 1937. "Relation of Bacteria to Diatoms in Sea Water." **J. Mar. Biol. Assoc. U.K.** 22 : 359-373.
- Walsby, A.E. and Armstrong, R.E. 1979. " Average Thickness of the Gas Vesicle Wall in *Anabaena flos-aquae*." **J. Molec. Biol.** 129 : 279.
- Watanabe, M.F., Harada, K.-I., Matsuura, K., Oishi, S., Watanabe, Y. and Suzuki, M. 1989. "Heptapeptide Toxins Contained in Natural Samples of *Microcystis* species." **Toxic. Assess.** 4 :487.
- Watanabe, M.F. Tsuji, K., Watanabe, Y., Harada, K.-I. and Suzuki, M. 1992. "Release of Heptapeptide Toxin (microcystin) during the Decomposition Process of *Microcystis aeruginosa*." **Natural Toxin.** 1 : 48.
- Watanabe, M.F. and Oishi, S. 1985. "Effects of Environmental Factors on Toxicity of a Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under Culture Conditions." **Appl. Environ. Microbiol.** 49 :1342.
- Watanabe, M.M., Zhang, X. and Kaya, K. 1996. "Fate of Toxic Cyclic Heptapeptides, Microcystins in Toxic Cyanobacteria upon Grazing by Mixotrophic Flagellate *Poterioochromonas malhamensis* (Ochromonadales, Chrysophyceae)." **J. Phycol.** 35 : 203-206.
- Watt, W.D. and Fogg, G.E. 1966. "The Kinetics of Extracellular Glycolate Production by *Chlorella pyrenoidosa*." **J. Exp. Bot.** 17 : 117-134.
- Wiebe, W.J., Smith, D.F. 1977. " Direct Measurement of Dissolved Organic Carbon Release by Phytoplankton and Incorporation by Microheterotrophs." **Mar. Biol.** 42 : 213-223.
- Wilkinson, C.R. 1979. " Bdellovibrio-Like Parasite of Cyanobacteria Symbiotic in Marine Sponges. **Arch. Microbiol.** 123 : 101-103.
- Wright, R.T. 1975. "Studies on Glycolic Acid Metabolism by Freshwater Bacteria." **Limnol. Oceanogr.** 20 : 626-633.
- Yamamoto, Y. 1978. " Detection of Algal Virus Biological Agents in Lakes by the Soft-Agar Overlayer Technique." **Jpn. J. Limnol.** 39 : 9-14.



ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. สูตรอาหาร BG-11 (Stanier *et al.*, 1971) สำหรับเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย มีส่วนประกอบดังนี้

NaNO ₃	1.500	กรัม
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.040	กรัม
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075	กรัม
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.036	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.006	กรัม
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), disodium magnesium salt	0.001	กรัม
Na ₂ CO ₃	0.020	กรัม
Trace metal mix A ₅ (see below)	1.000	มิลลิลิตร
Deionized water พีเอช 7.4	1000	มิลลิลิตร
Trace metal mix A ₅		
H ₃ BO ₃	2.860	มิลลิกรัมต่อลิตร
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.810	มิลลิกรัมต่อลิตร
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222	มิลลิกรัมต่อลิตร
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.390	มิลลิกรัมต่อลิตร
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079	มิลลิกรัมต่อลิตร
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.049	มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหาร MA (Ichimura, 1979; Watanabe, 1985) สำหรับเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรีย *Microcystis* มีส่วนประกอบดังนี้

Co(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.05	กรัม
KNO ₃	0.10	กรัม
NaNO ₃	0.05	กรัม
Na ₂ SO ₄	0.04	กรัม
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.05	กรัม
β - Na ₂ glycerophosphate	0.10	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
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
พีเอช 8.6		

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหาร Nutrient agar (NA) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย มีส่วนประกอบดังนี้

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	กรัม
พีเอช 6.8-7.0		

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. สูตรอาหาร Nutrient broth (NB) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย มีส่วนประกอบดังนี้

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	กรัม
พีเอช 6.8-7.0		

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. สูตรอาหาร Lake water agar (LWA) (Sanghobol and Skerman, 1981) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย มีส่วนประกอบดังนี้

Lake water	1000.0	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม
พีเอช 6.8		

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. สูตรอาหาร Peptone yeast extract agar (PYEA) (Sangkhobol and Skerman, 1981) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย มีส่วนประกอบดังนี้

Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
พีเอช 6.8		

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข

การเตรียมน้ำยาเคมีและวิธีการทดสอบ

1. สี้อมแกรม

1.1 Ammonium oxalate crystal violet

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์	20.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วเติม 1 เปอร์เซ็นต์ Ammonium oxalate aqueous solution 80 มิลลิลิตร

1.2 Gram's iodine

Crystal iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลเพื่อป้องกันแสง

1.3 Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์

1.4 Safranin water solution

Safranin solution	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

เตรียม Safranin solution โดยละลาย safranin 2.5 กรัม ใน ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ 100.0 มิลลิลิตร

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายกรดฟอสฟอริก 0.5 โมล โดยการชั่ง หลังจากนั้นนำสารละลายกรดฟอสฟอริกที่ได้มาเจือจาง 10 เท่า ให้ได้สารละลายกรดฟอสฟอริก 0.05 โมล เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 โมล นำมาปรับ pH ของสารละลายกรดฟอสฟอริก 0.05 โมล ให้มีค่าเท่ากับ 3

3. การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีโดยใช้การวิเคราะห์และการจำแนกชนิดจุลินทรีย์ตามระบบเอพีไอ (API)

อุปกรณ์และสารเคมี

- Kit contents : แถบทดสอบ API 20 NE
 กล่องสำหรับบ่มเชื้อทดสอบ
 หลอดแอมพูลบรรจุสารละลาย AUX medium
- สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ : สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์
 : รีเอเจนต์ ได้แก่ JAMES NIT1 NIT2 OX และ Zn
 : Mineral oil
 : McFarland Standard (No. 0.5)
- โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับการจัดจำแนก (Identification Software) หรือ คู่มือสำหรับการจัดจำแนก (API 20 NE Analytical Profile Index)

ขั้นตอนการวิเคราะห์และจำแนกชนิดจุลินทรีย์ตามระบบเอพีไอ แสดงดังรูปที่ ข-1

3.1 การเตรียม strip

3.1.1 เตรียมชุดทดสอบซึ่งประกอบด้วยถาดและฝา เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลุมของถาด เพื่อเป็นการให้ความชื้นในระหว่างการทดสอบ

3.1.2 วางชุด strip ลงบนถาดที่เตรียมไว้

3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

3.2.1 ถ่ายเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวๆ ประมาณ 1-4 โคโลนี จากจานเลี้ยงเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3.2.2 นำสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากข้อ 2.2.1 เทียบความขุ่นกับ McFarland Standard ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 McFarland

3.3 การเติมเชื้อทดสอบลงใน strip

3.3.1 เติมหาวนลอยของเซลล์แบคทีเรียจากข้อ 2.2.2 ลงในช่องของ strip ตั้งแต่ NO₃ ถึง PNPG ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

3.3.2 เติมหาวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่เหลือจากข้อ 2.3.1 ประมาณ 4-8 หยด ลงในสารละลาย AUX medium เขย่าให้เข้ากัน เติมลงในช่องของ strip ตั้งแต่ GLU ถึง LAC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 เติม mineral oil ปิดทับลงในช่องที่มีเครื่องหมาย GLU ADH และ URE

3.3.4 ปิดฝา และบ่มชุดทดสอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 การอ่านและวิเคราะห์ผล

3.4.1 ตรวจผลบันทึกผลลงในแบบฟอร์มบันทึกผล (แสดงดังรูปที่ ข-2)

3.4.2 การทดสอบ NO_3 และ TRP

- การทดสอบ NO_3

หยดสารละลาย NIT1 และ NIT2 ลงในช่อง NO_3 สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายในเวลา 5 นาที ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์ บันทึกผลเป็นบวก ถ้าผลเป็นลบจะไม่มีสีแดงเกิดขึ้น ต้องนำไปทดสอบต่อโดยใส่ผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย (2-3 มิลลิกรัม) หลังจาก 5 นาทีถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวซ์ด้วยผงสังกะสีจึงถือว่าเป็นผลลบที่แท้จริง และจะถือว่าการทดสอบเป็นบวกเมื่อไม่มีสีแดงเกิดขึ้น เพราะไนเตรตถูกแบคทีเรียใช้เปลี่ยนเป็นไนไตรต์ จากไนไตรต์ใช้ต่อไปเป็นไนโตรเจนในที่สุด

- การทดสอบ TRP

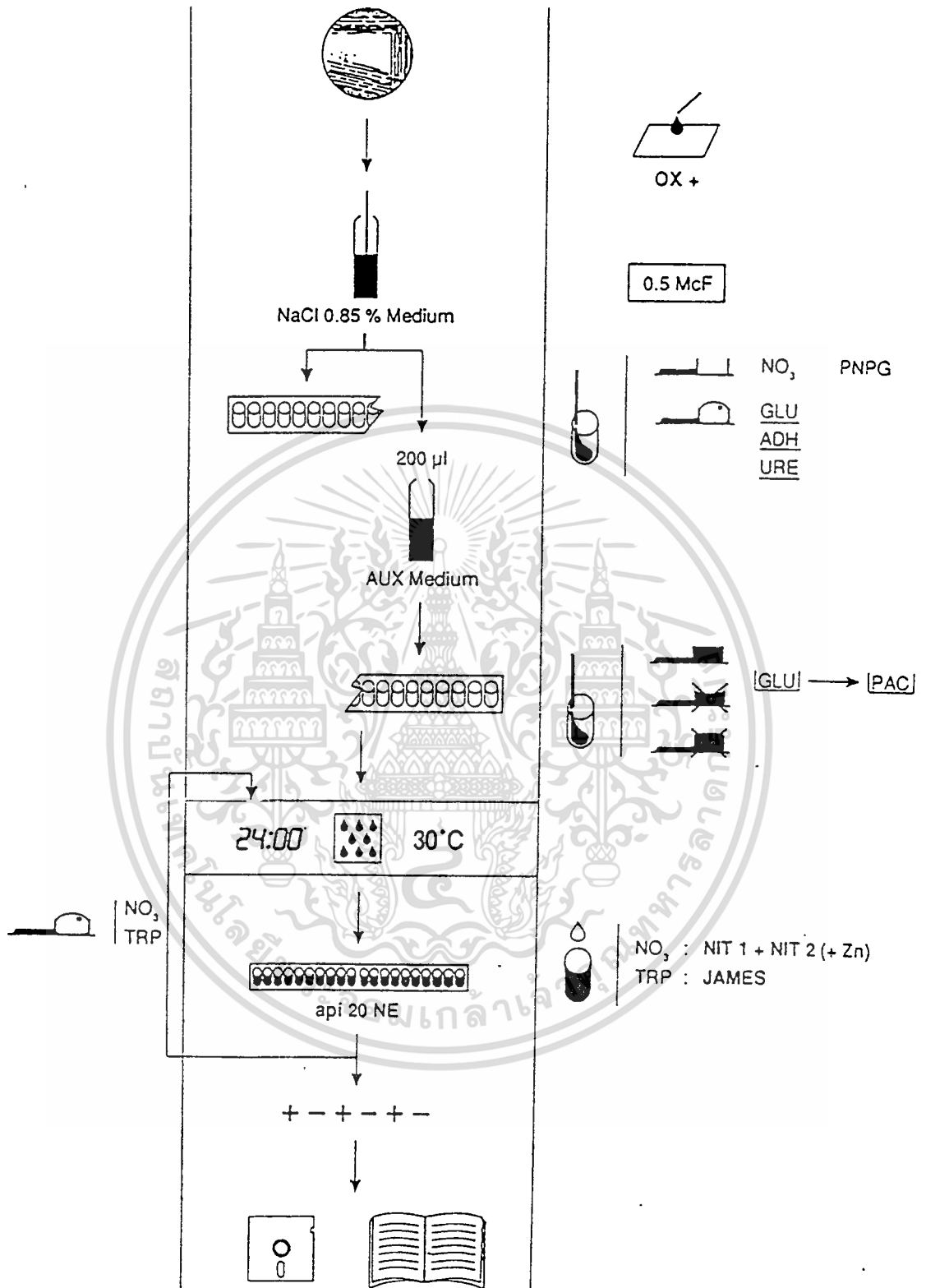
หยด JAMES รีเอเจนต์ลงในช่อง TRP ถ้ามีสีชมพูเกิดขึ้น บันทึกผลเป็นบวก หลังจากนั้นปิดฝาชุดทดสอบและนำไปบ่มต่อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจสอบผลในขั้นตอนต่อไป

3.4.3 assimilation test

บันทึกผลโดยสังเกตความขุ่นของสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียในช่องทดสอบตั้งแต่ [GLU] ถึง [PAC] เปรียบเทียบความขุ่นและบันทึกผลโดยใส่ค่าเป็น + หรือ -

3.4.4 identification

นำข้อมูลที่ได้จากการบันทึกผลในข้อ 2.4.3 ซึ่งอยู่ในรูปตัวเลข 7 หลักไปวิเคราะห์ผลการจัดจำแนกชนิดโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปหรือคู่มือสำหรับใช้ในการจัดจำแนก



รูปที่ ข-1 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์และจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ตามระบบเอพีไอ (API)


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

07224 A

api 20 NE

REF : _____

Origine / Source / Herkunft / Origen / Prelievo : _____



bioMérieux

	24 h	48 h	NO ₃	TRP	GIU	ADH	LRE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARAI	MNE	MAN	NAG	MAU	GNT	CAP	ADI	MLI	CIT	PAC	OX	
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
	24 h		48 h		24 h		48 h		24 h		48 h		24 h		48 h		24 h		48 h		24 h		48 h	

Imprimé en France / Printed in France

Autres tests / Other tests / Weitere Tests / Altri tests / Otros tests :

Ident. :

รูปที่ ข-2 แสดงตัวอย่างแบบฟอร์มสำหรับการบันทึกผลการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

1. การนับจำนวนจุลินทรีย์ (enumeration of microorganism)

1.1 การนับจำนวนแบคทีเรียโดยตรง (direct count) โดยใช้สไลด์นับเซลล์ชนิด

Petreoff-Hausser Haemocytometer

อุปกรณ์

1.1.1 Counting Chamber

haemocytometer slide ซึ่งตรงส่วนกลางสไลด์เป็นพื้นที่ เรียกว่า platform ล้อมรอบด้วยร่องเล็กๆ ที่มีระดับต่ำกว่าผิวสไลด์ลงไป 0.02 มิลลิเมตร พื้นที่ของ platform จะเท่ากับ 1 ตารางมิลลิเมตร ที่ประกอบด้วย สี่เหลี่ยมลูกบาศก์ 400 ช่อง แต่ละช่องมีพื้นที่เท่ากับ 0.0025 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรของแต่ละสี่เหลี่ยมลูกบาศก์จะเท่ากับ 0.02x0.0025 มิลลิลิตร

1.1.2 กระจกปิดสไลด์

1.1.3 สารแขวนลอยของเชื้อ หรือตัวอย่างวัสดุที่มีเชื้อ

วิธีการ

เจือจางสารแขวนลอยของเชื้อ ให้มีจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียประมาณ 5 หรือ 10 เซลล์ต่อพื้นที่สี่เหลี่ยมลูกบาศก์เล็ก ใช้สารแขวนลอยของเชื้อ 1 ลูบ ใส่ลงบนพื้นที่ platform ของ counting chamber แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (ระวังอย่าให้สารแขวนลอยของเชื้อ ไหลลงในร่องโดยรอบ) วางสไลด์ทิ้งไว้เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียเกาะอยู่กับที่ ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนแบคทีเรียจากพื้นที่สี่เหลี่ยมลูกบาศก์ 50-100 ช่อง โดยการสุ่ม จนกระทั่ง ได้จำนวนนับรวมประมาณ 500 เซลล์ แล้วหารด้วยจำนวนสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ที่นับ จะได้จำนวนเซลล์ต่อ 1 สี่เหลี่ยมลูกบาศก์ สมมติ = y (จำนวนเฉลี่ย)

การตรวจผล

จำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง

= จำนวนเฉลี่ยที่นับได้ต่อ1ลูกบาศก์(y) x 20,000,000 x ความเจือจางเริ่มต้น

1.2 การนับจำนวนเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียโดยตรง โดยใช้สไลด์นับเซลล์ชนิด Sedgewick Rafter Cell

วิธีการ

นำสารแขวนลอยของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน counting chamber ซึ่งประกอบด้วยช่องเล็กๆทั้งหมด 1,000 ช่อง วางทิ้งไว้เพื่อให้เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเกาะอยู่กับที่ ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนเซลล์สำหรับโดยการสุ่มประมาณ 50-100 ช่อง จนกระทั่งได้จำนวนนับรวม นำมาหารด้วยจำนวนช่องที่นับ จะได้จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อ 1 ช่อง

การตรวจผล

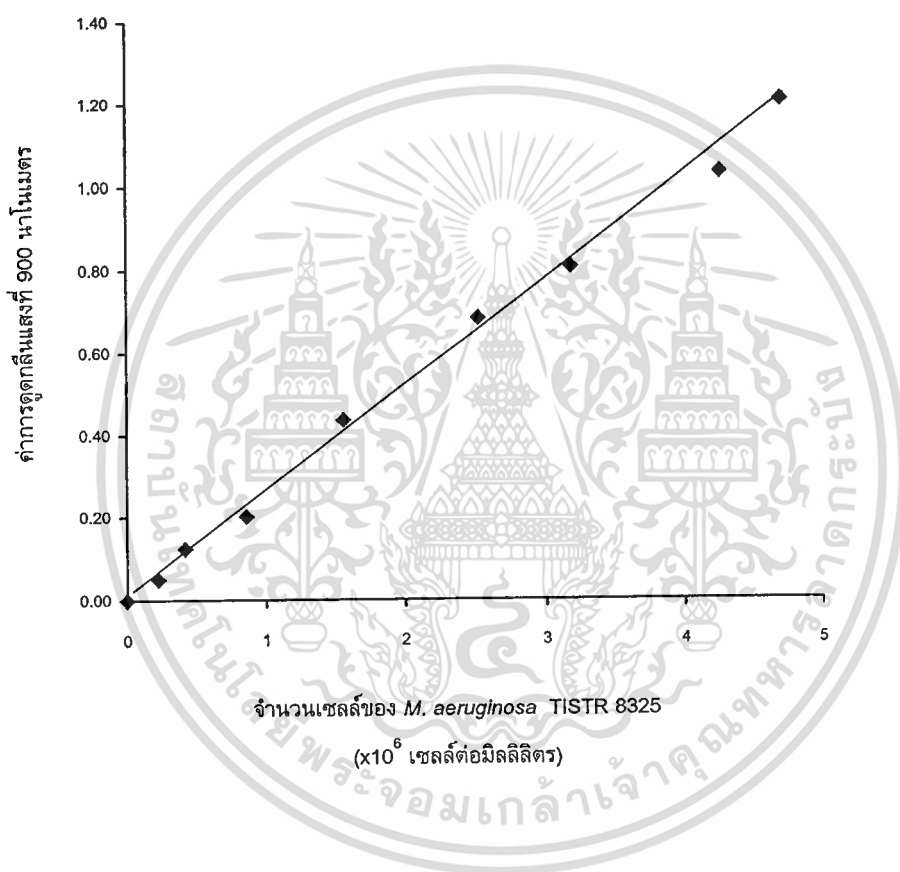
จำนวนเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง
= จำนวนเฉลี่ยที่นับได้ต่อ 1 ช่อง \times 1,000 \times ความเจือจางเริ่มต้น

2. ความสัมพันธ์ระหว่างการวัดการเจริญของเซลล์ในแบบต่างๆ

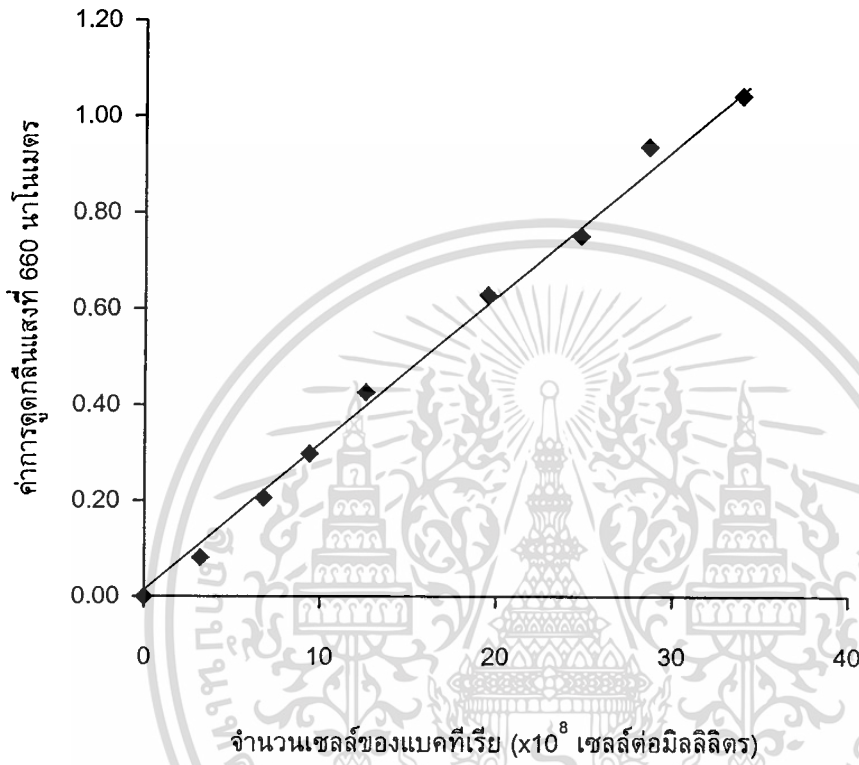
2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเซลล์และค่าการดูดกลืนแสง

ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง พิจารณาจากหลักความจริงว่า วัตถุขนาดเล็กในสารละลายสามารถกระจายแสงเป็นสัดส่วนกับปริมาณของขนาดสารภายในขอบเขตที่จำกัดของความเข้มข้นของสาร (Stanier *et al.*, 1971) นั่นคือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารในสารละลายจะมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับความเข้มข้นของสารในสารละลายนั้นภายในขอบเขตที่จำกัด

นำเซลล์ตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสงต่างๆ มานับจำนวนเซลล์ รูปที่ ค-1 และ ค-2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และค่าการดูดกลืนแสงเป็นเชิงเส้น นั่นคือ ค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์



รูปที่ ค-1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8325 และค่าการดูดกลืนแสงที่ 900 นาโนเมตร



รูปที่ ค-2 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียและค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

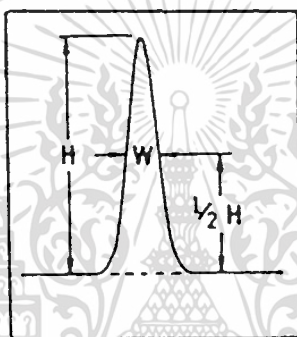
3. การคำนวณปริมาณสารพิษ

คำนวณหาพื้นที่ฟีกของสารพิษมาตรฐานและพื้นที่ฟีกของสารตัวอย่าง หลังจากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณสารพิษโดยคิดต่อตัวอย่างแห้ง (ในหน่วยน้ำหนัก) หรือ ตัวอย่างอาหาร (ในหน่วยปริมาตร)

การคำนวณ

คำนวณจากความสูงของฟีกคูณด้วยความกว้างของฟีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูงคือ

$$A = H \times W$$



Height X Width at Half-Height

โดย A = พื้นที่ของฟีก
 H = ความสูงของฟีก
 W = ความกว้างของฟีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง

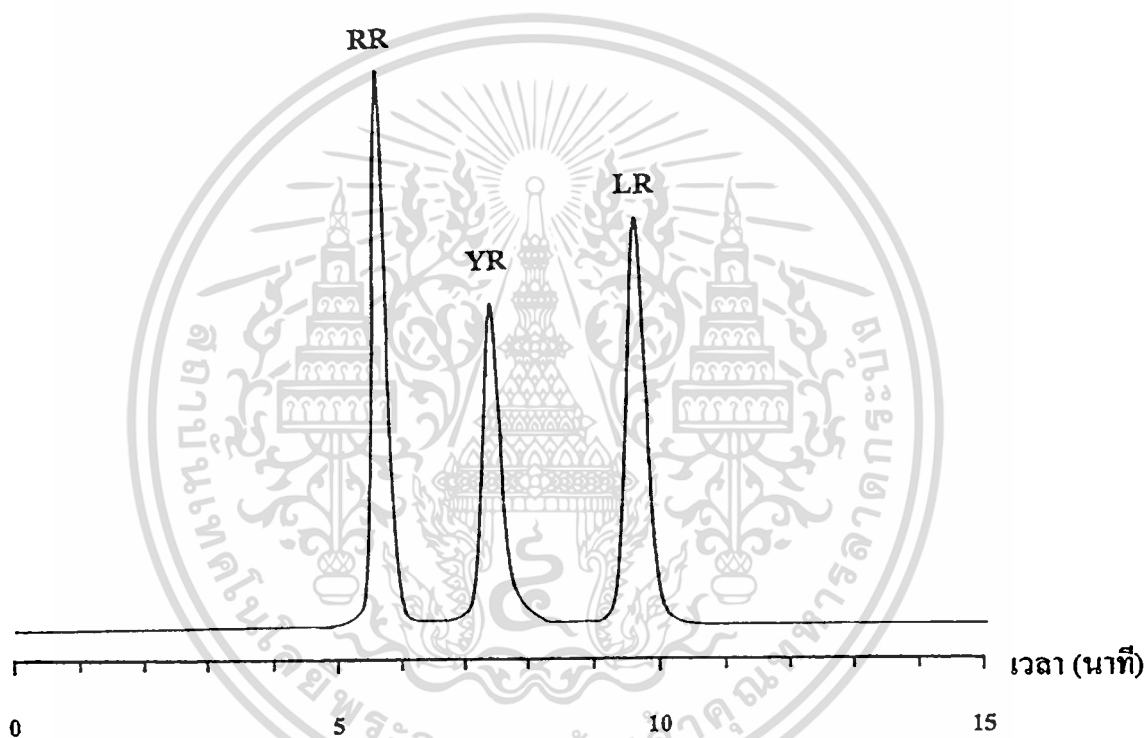
และ

$$\text{ปริมาณสารพิษ (ไมโครกรัม)} = \frac{\text{พื้นที่ฟีกของสารตัวอย่าง} \times 0.07^*}{\text{พื้นที่ฟีกของสารพิษมาตรฐาน}}$$

หมายเหตุ

จาก mixed original standard (MCYST-RR, MCYST-YR และ MCYST-LR) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 3.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อสารที่ฉีดมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร จึงประกอบด้วย 0.07 ไมโครกรัมต่อฟีก

0.07* คือ ค่าความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อฟีก



รูปที่ค-3 แสดงโครมาโตแกรมของสารพิษไมโครซิสตินมาตรฐาน (standard microcystin) microcystin-RR (MCYST-RR), microcystin-YR (MCYST-YR) และ microcystin-LR (MCYST-LR)

หมายเหตุ : ระบบของสารละลายเป็นเมทานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เท่ากับ 60:40 pH 3
 อัตราการไหลของสารละลายเท่ากับ 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที
 คอลัมน์ ODS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6x150 มิลลิเมตร
 วิเคราะห์ผลด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ประวัติผู้เขียน

นางสาวทักษวัน ทองอร่าม เกิดเมื่อวันที่ 3 มกราคม 2515 ที่จังหวัด
 กรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัย
 ศิลปากร ปีการศึกษา 2537



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้