



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรสิ่งแวดล้อม)
ปริญญา

วิทยาศาสตรสิ่งแวดล้อม

สาขา

วิทยาลัยสิ่งแวดล้อม

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อควบคุมสาหร่าย
ที่ผลิตสารพิษ *Microcystis aeruginosa*

Controlling of Toxic Alga, *Microcystis aeruginosa* by Bioactive Compounds from
Blue-Green Algae

นามผู้วิจัย นางสาวเพ็ญประภา หวานสนิท

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์พนธ์ ดังคนานุรักษ์, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุชุม เจริญใจ, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์อภารัตน์ มหพันธ์, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ศาสตราจารย์เกษม จันทร์แก้ว, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจฉริยะกุล, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 10 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อควบคุมสาหร่ายที่ผลิตสารพิษ
Microcystis aeruginosa

Controlling of Toxic Alga, *Microcystis aeruginosa* by Bioactive Compounds from Blue-Green
Algae

โดย

นางสาวเพ็ญประภา หวานสนิท

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรบัณฑิต)
พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-1477-2

เพื่อประกาศ หวานสนิท 2549: การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน
เพื่อควบคุมสาหร่ายที่ผลิตสารพิษ *Microcystis aeruginosa* ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม วิทยาลัยสิ่งแวดล้อม
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ นิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์, Ph.D. 94 หน้า
ISBN 974-16-1477-2

นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 29 สายพันธุ์ มาคัดเลือกหาสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน
ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 การ
คัดเลือกเบื้องต้นโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่ามีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 16 สายพันธุ์ ผลิตสารออกฤทธิ์
ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 และมี 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง ได้ดีที่สุดเรียง
ตามลำดับ คือ *Anabaena* sp. TISTR 8077, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225, *Anabaena variabilis*
TISTR 8404 เมื่อนำสารสกัดหยาบจากสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ที่สกัดด้วย คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ ใน
อัตราส่วน 6 ต่อ 4 ต่อ 1 ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อแผ่น มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการ
เจริญเติบโตของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

สาหร่ายสายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077 สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ปริมาณมากที่สุด
ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BGA + N ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ (คิดเทียบเป็น
ความเข้มข้นของ gentamicin) คือ 0.07 มิลลิกรัมต่อลิตรของอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยง หรือ 0.35 มิลลิกรัมต่อ
กรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 25-50 องศาเซลเซียส และมี
ความคงตัวที่ระดับความเป็นกรด-เบส 6 ถึง 7

จากการแยกสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี พบว่าตัวทำละลายที่
เหมาะสมต่อการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปน คือ คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ ใน
อัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 1 ตำแหน่งของสารอยู่ที่ค่า $R_f = 0.53$ และ $R_f = 0.62$ และ สารออกฤทธิ์ที่ได้ให้ผล
การทดสอบเป็นลบกับ ninhydrin reaction, biuret reaction, Molisch's test, anthrone test, unsaturation test
รวมทั้งการทดสอบด้วยเอนไซม์โปรตีเอส

เขียนประกาศ หวานสนิท
ลายมือชื่อนิติ


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

27 / เมษายน / 2549

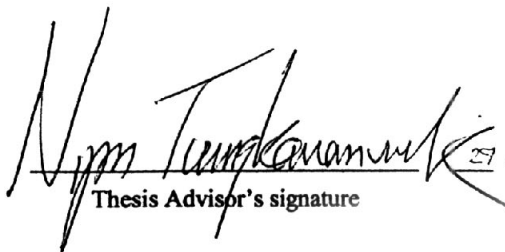
Penprapa Wansanit 2006: Controlling of Toxic Alga, *Microcystis aeruginosa* by Bioactive Compounds from Blue-Green Algae. Mater of Science (Environmental Science),
Major Field: Environmental Science, College of Environment. Thesis Advisor:
Associate Professor Nipon Tungkananuruk, Ph.D. 94 pages.
ISBN 974-16-1477-2

Screening for cyanobacterial strain that can inhibit growth of toxic *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 strain was conducted. Totally 29 strain cyanobacteria were co-cultivated on the lawn of *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 for preliminary screening. It was found that 16 strain expressed their inhibition on *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 which the potent strains were *Anabaena sp.* TISTR 8077, *Hapalosiphon fontinalis*. TISTR 8225 and *Anabaena variabilis*. TISTR 8404. Among these 3 strain potent strain, the crude extract of *Anabaena sp.* TISTR 8077, *Hapalosiphon fontinalis*. TISTR 8225 and *Anabaena variabilis*. TISTR 8404, which obtained from the solvent, chloroform : methanol : H₂O (6:4:1) at the concentration of 1000 µg/disc showed the best inhibition on *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305.

Anabaena sp. TISTR 8077 showed the highest bioactive compound production after 14 day of cultivation in BGA + N medium. The bioactive compound productivity was 0.07 mg gentamicin equivalent /l medium or 0.35 mg gentamicin equivalent /g all dried weight. This bioactive compounds were stable at 25-50 °C and at pH range 6-7.

Partial purification of bioactive compound was done using TLC. The bioactive compounds could be obtained at the $R_f = 0.53$ and 0.62 which the solvent system of chloroform :methanol : H₂O at the ratio of 7:3:1 was applied. The bioactive compounds showed the negative result with from ninhydrin reaction, biuret reaction, Molisch 's test, anthrone test, usaturation test including protease inhibition.

Penprapa Wansanit
Student's signature


Thesis Advisor's signature

27 / 04 / 2006

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาจาก ดร. อาภารัตน์ มหาจันทร์ กรรมการ
วิชาการ ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำ และอำนวยความสะดวกทางด้านข้อมูล ในการทำวิทยานิพนธ์
เป็นอย่างดี ตลอดจนการแก้ไขวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นิพนธ์ ดังคณานุรักษ์ ประธาน
กรรมการ รองศาสตราจารย์ สุขุม เจริญ กรรมการวิชาเอก และ ดร.สุพร ลิขิจำเนียร ผู้แทนบัณฑิต
วิทยาลัย ที่ได้ให้คำปรึกษา และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการวางแผนการวิจัยใน
วิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วว.)ที่ได้
เอื้ออำนวยความสะดวก และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง รวมถึงพี่ๆทุกคน พี่น้อย พี่รี พี่เป้ พี่วัช ที่
คอยช่วยเหลือข้าพเจ้าตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ หลักสูตรวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่ให้ความช่วยเหลือ
แนะนำ และเป็นแรงผลักดันให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่พล ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านและเป็นกำลังใจ
ในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

เพ็ญประภา หวานสนิท

กุมภาพันธ์ 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(3)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	4
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	4
สารเคมีที่พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดต่างๆ	17
สาหร่ายที่ผลิตสารพิษ <i>Microcystis aeruginosa</i>	22
อุปกรณ์และวิธีการศึกษา	35
อุปกรณ์และสารเคมี	35
วิธีการศึกษา	38
ผลการศึกษาและวิจารณ์	49
การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Microcystis aeruginosa</i> TISTR 8305	49
ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Microcystis aeruginosa</i> TISTR 8305	51
การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจาก <i>Anabaena</i> sp. TISTR 8077 ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Microcystis aeruginosa</i> TISTR 8305 โดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography, TLC)	57
การศึกษาคูณสมบัติบางประการของสารสกัดจาก <i>Anabaena</i> sp. TISTR 8077	59
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	65
สรุปผลการศึกษา	65
ข้อเสนอแนะ	66
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	81
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	82
ภาคผนวก ข วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	85
ภาคผนวก ค น้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดสอบ	90
ภาคผนวก ง รูปร่างเซลล์สำหรับ 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือก และวิธีการทำทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี ((thin layer chromatography, TLC)	92

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 สารพิษจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและคุณลักษณะทั่วไป	24
2 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 30 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง	37
3 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้ง การเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Microcystis aeruginosa</i> TISTR 8305	50
4 ผลของสารสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Microcystis aeruginosa</i> TISTR 8305	54
5 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย <i>Anabaena</i> sp. TISTR 8077	60
ตารางผนวกที่	
ข1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำหรับเขียนกราฟมาตรฐานของ gentamicin ตาม method of least squares	88

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างสารพิษอะนาทอกซิน	25
2 โครงสร้างสารพิษไซลินโดรสเพอโมบซิน	25
3 โครงสร้างสารพิษโนคูลาริน	25
4 โครงสร้างหลักของสารพิษไมโครซิสติน	27
5 ขั้นตอนการคัดเลือกหาสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีศักยภาพสูงในการผลิต สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Microcystis aeruginosa</i> TISTR 8305	41
6 รูปแบบการทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์คัดเลือก โดยวิธี paper disc plate บน algal lawn ของ <i>Microcystis aeruginosa</i> TISTR 8305	43
7 ช่วงเวลาการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย <i>Anabaena</i> sp. TISTR 8077	56
8 ผลของสารสกัดจาก <i>Anabaena</i> sp. TISTR 8077 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Microcystis aeruginosa</i> TISTR 8305 ที่ค่า $R_f = 0.62$	58
9 ผลของสารสกัดจาก <i>Anabaena</i> sp. TISTR 8077 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Microcystis aeruginosa</i> TISTR 8305 ที่ค่า $R_f = 0.53$	58
10 ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย <i>Anabaena</i> sp. TISTR 8077 ที่ระดับความเป็นกรด-เบส ต่างๆ	62
11 ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย <i>Anabaena</i> sp. TISTR 8077 ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ	63
 ภาพผนวกที่	
ข1 กราฟมาตรฐานของ gentamicin	89
ง1 รูปร่างเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ <i>Anabaena</i> sp. TISTR 8077	93

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง2 รูปร่างเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ <i>Anabaena variabilis</i> TISTR 8404	93
ง3 รูปร่างเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ <i>Hapalosiphon fontinalis</i> TISTR 8225	93
ง4 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยใช้ TLC	94
ง5 แผ่นTLC ที่ผ่านการส่องรังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร	94

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อควบคุมสาหร่ายที่ ผลิตสารพิษ *Microcystis aeruginosa*

Controlling of Toxic Alga, *Microcystis aeruginosa* by Bioactive Compounds from Blue-Green Algae

คำนำ

ปัจจุบันการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อความเจ็บป่วยของมนุษย์ และการตายของสัตว์เลี้ยงในพื้นที่หลายแห่งทั่วโลก รวมทั้งต่อระบบนิเวศอย่างกว้างขวาง โดยส่วนใหญ่เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae, cyanobacteria) สารพิษที่สาหร่ายสร้างขึ้นจะปนเปื้อนอยู่ในน้ำที่นำมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ ทั้งโดยตรงและทางอ้อม เมื่อสะสมนานวันก็จะก่อให้เกิดอันตราย เช่น เป็นสาเหตุให้ประชากรใน Plam Island รัฐ Queensland ประเทศออสเตรเลียเป็นโรคตับอักเสบอย่างรุนแรง (Bourke และคณะ, 1983) และยังทำให้เกิดมะเร็งตับระยะเริ่มต้นของประชากรในประเทศจีน (Delong, 1979; Yu, 1989) ซึ่งสาหร่ายที่สร้างสารพิษเป็นมะเร็งต่อนี้ ส่วนใหญ่ผลิตโดยสกุล *Microcystis*

อาภารัตน์ และคณะ (2542) ตรวจพบสาหร่ายที่ผลิตสารพิษในแหล่งน้ำของไทยสายพันธุ์ที่สำคัญ (dominant species) เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Microcystis aeruginosa* ผลิตสารพิษต่อดับในกลุ่มของ ไมโครซิสติน (microcystin) ในแหล่งน้ำจาก 5 แหล่ง ได้แก่ เขื่อนแม่กวง จังหวัดเชียงใหม่ เขื่อนลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมา อ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี เขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี และสระน้ำเลี้ยงเปิดหน้าเรือนจำคลองเปรม กรุงเทพมหานคร โดยตรวจพบความเข้มข้นของสารพิษที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์อยู่ระหว่าง 0.3-0.8 มิลลิกรัมต่อกรัม เซลล์สาหร่ายแห้ง และได้สรุปว่าแหล่งน้ำในประเทศไทยขณะนี้กำลังอยู่ในสภาพเสื่อมโทรม และอาจก่อให้เกิดอันตรายหากประชากรมีการบริโภคน้ำจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารพิษเป็นประจำ

สำหรับในประเทศไทยปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษดังกล่าวในแหล่งน้ำเป็นปัญหาใหม่ที่น่าสนใจและควรเร่งดำเนินการแก้ไข ซึ่งถ้าเกิดปัญหาการเพิ่มปริมาณอย่างมากและปล่อยสารพิษ

ลงสู่แหล่งน้ำที่นำไปผลิตน้ำประปาจะก่อให้เกิดปัญหาในขั้นตอนการบำบัดสารพิษและกำจัดสารอินทรีย์ ที่ถูกปล่อยออกนอกเซลล์ซึ่งต้องผ่านกรรมวิธีต่างๆ ที่ยุ่งยาก ซับซ้อนและเสียค่าใช้จ่ายสูง โดยที่ระบบผลิตน้ำประปาในประเทศไทยเองสามารถทำได้เพียงการกรองเซลล์หรือเชื้อจากพิษเท่านั้น การทำลายพิษไม่สามารถขจัดให้หมดได้โดยการกรอง ตกตะกอน เดิมคลอรีนหรือแม้แต่การต้มได้ (อาภารัตน์, 2539)

จากการศึกษาของ Moore และคณะ (1987) พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Hapalosiphon fontinalis* สามารถสร้างสารแฮพาลินโดล (hapalindoles) ซึ่งเป็นอินโดลอัลคาลอยด์ (indole alkaloid) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย และนอกจากนี้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่น ๆ ก็มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ซึ่งสารออกฤทธิ์เหล่านี้เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา (antifungal) แบคทีเรีย (antibacterial) สาหร่าย (antialgal) โปรโตซัว (antiprotozoal) และไวรัส (antiviral) เป็นต้น (Patterson และคณะ, 1991; Borowitzka, 1995; Kreitlow และคณะ, 1999; Schlegel และคณะ, 1999)

ดังนั้นการควบคุมปริมาณสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* โดยสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้ไม่ให้เพิ่มจำนวนมากเกินไปก็เท่ากับว่าสามารถลดปัญหาที่จะเกิดขึ้นได้ การควบคุมโดยใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมายับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจศึกษาค้นคว้า เนื่องจากยังไม่มีผู้ศึกษามากนัก

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งสาหร่ายพิษ *Microcystis aeruginosa*
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ (crude extract) จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในการยับยั้งสาหร่ายพิษ *Microcystis aeruginosa* ในระดับห้องปฏิบัติการ

3. เพื่อศึกษาวิธีการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์บางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สมมุติฐานการวิจัย

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน บางสายพันธุ์ สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษ *Microcystis aeruginosa*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแนวทางในการวิจัยนำสารสกัดจากสาหร่ายชนิดอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายพิษ *Microcystis aeruginosa* มาใช้ในงานวิจัยด้านสิ่งแวดล้อม และทางการแพทย์

2. ได้องค์ความรู้ที่เป็นแนวทางในการควบคุมปริมาณสาหร่ายพิษ *Microcystis aeruginosa* ด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการกำจัดเซลล์สาหร่ายพิษ *Microcystis aeruginosa* ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ

ทุนสนับสนุนงานวิจัย

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก บัณฑิตวิทยาลัยแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) จัดอยู่ใน Division Cyanophyta หรือมีชื่ออื่นอีกชื่อหนึ่งคือ Cyanochloronta (Bold และ Wynne, 1978) นอกจากนี้ยังมีชื่อสามัญอีกชื่อหนึ่งคือ Cyanobacteria (Carr และ Whitton, 1973) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดอยู่ในกลุ่ม โปรคาริโอต (prokaryote) ซึ่งเป็นพวกเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่แตกต่าง คือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีคลอโรฟิลล์ เอ จึงสามารถสังเคราะห์แสงได้ และมีออกซิเจนเกิดขึ้นจากการสังเคราะห์แสง ซึ่งคุณสมบัตินี้จะไม่พบในแบคทีเรีย สาหร่ายกลุ่มนี้ไม่มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศ บางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ เปลี่ยนสีของเซลล์ได้ พบได้ทั่วทุกแห่งในโลกทั้งน้ำจืด ทะเล น้ำพุร้อน นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน อาจขึ้นรวมอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่นได้ทั้งพืชและสัตว์

1.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

1.1.1 รงควัตถุสำหรับสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigments) ประกอบด้วย

1) คลอโรฟิลล์ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) เป็นแหล่งสำคัญในการดูดซับพลังงานแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร (สีแดง) และ 662 นาโนเมตร (สีน้ำเงิน)

2) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) สามารถดูดซับพลังงานแสงในช่วงคลื่นที่คลอโรฟิลล์ เอ ไม่สามารถดูดซับได้ แล้วจะถ่ายทอดพลังงานแสงที่รับไว้ให้แก่คลอโรฟิลล์ เอ (Harold, 1980) แคโรทีนอยด์ประกอบด้วย 2 กลุ่มคือ

2.1) เบตา-แคโรทีน (β -carotene)

2.2) แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) มีหลายชนิด ได้แก่ มิโซแซนทิน (myxoxanthin), มิโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll), ซีอาแซนทิน (zeaxanthin)

3) ไฟโคบิลิโปรตีน (phybiliprotein) ประกอบด้วย

3.1) ซี-ไฟโคไซยานิน (c-phyococyanin)

3.2) ซี-อัลโลไฟโคไซยานิน (c-allophycocyanin)

3.3) ซี-ไฟโคอีริทริน (c-phycoerythrin)

รงควัตถุสำหรับสังเคราะห์แสงเหล่านี้ไม่พบอยู่ในพลาสติด (plastid) แต่พบอยู่ในไทลาคอยด์ (thylakoid) ไทลาคอยด์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่างไปจากไทลาคอยด์ของสาหร่ายอื่นๆ ตรงที่ไม่มีเยื่อบาง ๆ หุ้ม เพื่อให้เกิดเป็นคลอโรพลาสต์ แต่จะอยู่เดี่ยว ๆ และเป็นอิสระในไซโตพลาสซึม คลอโรพิลล์ เอ จะอยู่ในไทลาคอยด์ ส่วนรงควัตถุอื่น ๆ จะเกาะอยู่บนผิวของไทลาคอยด์ในลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ เรียกว่า ไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) (Glazer, 1987)

1.1.2 ส่วนประกอบของเซลล์

1) ผนังเซลล์ (cell wall)

ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน แบ่งออกเป็น 2 ชั้น มีองค์ประกอบสำคัญคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) ผนังชั้นในประกอบด้วย มิวโคเพปไทด์ (mucopeptide) และกรดมิวรามิก (muramic acid) ส่วนรอบนอกผนังเซลล์มักจะเป็นเมือกใสๆ ที่เรียกว่า ซีท (sheath) หุ้มอยู่โดยรอบ มีลักษณะเป็นไมโครไฟบริล (microfibril) 3 ชั้น (Kumar, 1990)

ซีทนี้มีความหนาบางต่างกัน อาจมีสี ไม่มีสี หรือแบ่งออกเป็นชั้นๆ ซีทอาจใส ไม่มีสีทำให้มองเห็นไม่ชัดเจน หรืออาจมีสีน้ำตาล น้ำเงิน แดง และเหลือง ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอาศัยอยู่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะสร้างรงควัตถุขึ้นมาภายในซีทภายใต้ความเข้มแสงสูง และจะไม่มีการสร้างรงควัตถุภายใต้ความเข้มแสงต่ำ (Fogg และคณะ, 1974)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้รับแสงอาทิตย์โดยตรงเป็นเวลานาน ๆ หรือได้รับคลื่นความถี่สูง รังควัตถุที่อยู่ภายในเซลล์จะเคลื่อนย้ายเข้ามาอยู่ภายในซีท และการที่ซีทปรากฏสีเหลืองน้ำตาล โดยทั่วไป แล้วเป็นผลมาจากหลาย ๆ กรณี และสาเหตุหนึ่งมาจากเชื้อราเข้ามาเป็นปรสิต (Smith, 1950)

การที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีซีทหุ้มอยู่ภายนอก จึงทำให้สามารถเจริญอยู่ในสภาพที่แห้งแล้งได้ เพราะซีทสามารถดูดซึมน้ำ และอุ้มน้ำได้ดี (กาญจนภาชน์, 2527)

2) ไซโตพลาสซึม (cytoplasm)

ไซโตพลาสซึม อยู่ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปข้างในมีเยื่อบาง ๆ เรียกว่า พลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) หุ้มไซโตพลาสซึมไว้ ไซโตพลาสซึมส่วนนอกที่อยู่ใกล้ผนังเซลล์มักมีสารสีกระจายอยู่จำนวนมาก เรียกส่วนนี้ว่า โครโมพลาสซึม (chromoplasm) ส่วนไซโตพลาสซึมส่วนในมีลักษณะคล้ายนิวเคลียส เรียกส่วนนี้ว่า เซนโตรพลาสซึม (centroplasm) เนื่องจากส่วนนี้ไม่มีผนังหุ้ม จึงถือว่าไม่ใช่นิวเคลียสที่แท้จริง ในส่วนของโครโมพลาสซึมจะมีไซยาโนไฟซินแกรนูล (cyanophycin granule) เป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป เม็ดเล็กๆ นี้ เป็นอาหารสะสมพวกแป้งชนิดไซยาโนไฟเซียน (cyanophycan starch) (ลัดดา, 2540)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไม่มีนิวเคลียสชัดเจนเหมือนสาหร่ายอื่น แต่มีสารที่ทำหน้าที่คล้ายนิวเคลียสอยู่ภายในเซนโตรพลาสซึม เพียงแต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) สารนี้ คือ ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) ซึ่งอาจจะจับตัวกันแน่นมากมีรูปร่างต่างๆ ก็ได้ (ยวดี, 2538)

3) แก๊สแวกิวโอล (gas- vacuole)

แก๊สแวกิวโอล ลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็กกระจายอยู่ในโครโมพลาสซึม รูปร่างไม่แน่นอน มีลักษณะเป็นถุงมีเยื่อบาง ๆ หุ้ม เยื่อนี้ประกอบด้วยสารจำพวกโปรตีน สามารถให้ออกซิเจนซึมผ่านได้ เพื่อใช้ประโยชน์ในการหายใจ ส่วนแก๊สที่อยู่ภายในถุงเป็นแก๊สไนโตรเจน หรือสารประกอบของไนโตรเจนพวกเอมีน (amine)

แก๊สแควคิวโอล ช่วยในการลอยตัวของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ถูกสร้างขึ้นมาเมื่อได้รับความเข้มแสงต่ำๆ และจะหายไปเมื่อความเข้มแสงสูง เมื่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้รับแสงจะสังเคราะห์แสงและผลิตน้ำตาลขึ้นมา เป็นผลให้แรงดันออสโมติกภายในเซลล์สูงขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ แก๊สแควคิวโอลหายไป ทำให้แรงลอยตัวลดลงเป็นผลทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจมลงจากผิวน้ำลงสู่ใต้น้ำ (ลัดดา, 2540)

1.1.3 รูปร่างของเซลล์

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีรูปร่างลักษณะ 2 แบบ คือ

1) รูปร่างเป็นเซลล์ที่ไม่มีหนวดที่เรียกว่า คอคคอยด์ (coccoid form) ซึ่งพบทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) กลุ่มเซลล์ (colony) และแบบพาลเมลลา (palmella form)

พวกคอคคอยด์ จะมีรูปร่างได้หลายแบบตั้งแต่ กลม ทรงกระบอก กระสวย ฯลฯ การแบ่งเซลล์อาจจะแบ่งทิศทางเดียว หรือ 2-3 ทิศทาง อาจจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวเดี่ยวๆ เช่น *Chroococcus* หรืออาจจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเซลล์แบบพาลเมลลา เช่น *Merismopedia*, *Eucapsis*, *Anacystis* เป็นต้น ส่วนพวก *Coelosphaerium* และ *Gomphosphaeria* จะมีเซลล์เรียงกันเป็นชั้นๆ ในกลุ่มเซลล์รูปกลม

2) รูปร่างเป็นเส้นสาย (filamentous form) เกิดจากเซลล์หลายเซลล์มาต่อกันจนเป็นรูปร่างเป็นเส้นยาว

พวกที่เป็นเส้นสายส่วนของเซลล์ที่เรียงกันเป็นแถว เรียกว่า ทริโคม (trichome) ดังนั้นในแต่ละเส้นสายจึงประกอบไปด้วยทริโคมและซีทรวมกัน เส้นสายนี้อาจตรงและเรียบไม่มีการแตกแขนง เช่น *Oscillatoria*, *Lyngbya* บางชนิดอาจมีปลายโค้งงอ หรือบิดเป็นเกลียว เช่น *Arthrospira* เป็นต้น

1.1.4 เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst)

เฮเทอโรซิสต์ เป็นเซลล์พิเศษที่แตกต่างจากเซลล์ปกติ (vegetative cell) ทั่วไป เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (active growth) (Fogg, 1994) มีผนังหนา ภายในเซลล์เป็นสีเหลืองจาง ๆ เกิดอยู่ระหว่าง เซลล์ปกติในเส้นสาย เช่น *Anabaena* ซึ่งเรียกตำแหน่งของเฮเทอโรซิสต์ แบบนี้ว่า อินเทอร์คาลารีเฮเทอโรซิสต์ (intercalary heterocyst) และอีกแบบหนึ่งเป็นเฮเทอโรซิสต์ที่เกิดตรงปลายข้างใดข้างหนึ่งของเส้นสาย หรือทั้งสองข้าง เรียกตำแหน่งของเฮเทอโรซิสต์ แบบนี้ว่า เทอร์มินัลเฮเทอโรซิสต์ (terminal heterocyst) ถ้าเฮเทอโรซิสต์อยู่ที่ฐานของสายเซลล์ ซึ่งเซลล์ปกติมีขนาดไม่เท่ากันทั้งสาย เรียกว่า เบซัลเฮเทอโรซิสต์ (basal heterocyst) เช่น *Gloeotrichia*

เฮเทอโรซิสต์ เกิดขึ้นโดยเซลล์ใดเซลล์หนึ่งในสายสะสมอาหารไว้มาก จนทำให้ขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้น ทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนเป็นรูปกลม (Fay, 1973) หลังจากนั้นไซโตพลาสซึมจะไหลผ่านรูเล็กๆ ที่ผนังเซลล์ไปยังเซลล์ข้างเคียงทำให้สีของเซลล์เดิมซีดลง รูเล็กๆ นี้จะมีแกรนูล (granule) มาปิดรูไว้ ทำให้เห็นเป็นลักษณะเม็ดกลม ๆ เรียกว่า โพลาร์โนตช์ (polar notch) หรือ โพลาร์โนดูล (polar nodule) ดังนั้นพวกเฮเทอโรซิสต์ ที่อยู่ระหว่างเซลล์ปกติในเส้นสายจะมี โพลาร์โนดูล 2 อันอยู่ตรงข้ามกัน ส่วนในพวก เฮเทอโรซิสต์ ที่เกิดตรงปลายข้างใดข้างหนึ่งของเส้นสายจะมีโพลาร์โนดูลเพียงแห่งเดียวที่อยู่ติดกับเซลล์ข้างเคียง และในชนิดที่มีการแตกแขนงแท่งเป็นรูปตัว V กว่า เช่น *Mastigocladus laminosus* (Venkataraman, 1957) ซึ่งทำให้เฮเทอโรซิสต์สามารถเชื่อมต่อกับเซลล์ปกติได้ทั้ง 3 เซลล์ โดยปกติแล้วเฮเทอโรซิสต์ มักเกิดเดี่ยวๆ ซึ่งอาจมีเฮเทอโรซิสต์เพียง 1 เซลล์ หรือมากกว่าในแต่ละสายก็ได้ แต่ในบางชนิดจะเกิดติดกันเป็นคู่ ๆ

เฮเทอโรซิสต์ มีหน้าที่หลักในการช่วยตรึงไนโตรเจน โดยการสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ซึ่งเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย และหน้าที่สำคัญอีกประการคือ ช่วยในการสร้างสปอร์ เนื่องจากพบว่า เซลล์ที่สร้างสปอร์ที่เรียกว่า อะคิเน็ต (akinetes) หรือ โกนีเดีย (gonidia) มักจะอยู่ติดกับเฮเทอโรซิสต์และได้รับการถ่ายทอดอาหารมาจากเฮเทอโรซิสต์ (Morris, 1968)

1.1.5 อะคีนิต (akinete)

อะคีนิตเป็นเซลล์พิเศษที่มีผนังหนา โดยปกติจะมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติ และสามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้นานกว่า อะคีนิตอาจมีรูปร่างเป็นทรงกลม เช่น *Anabaena* ทรงแบน เช่น *Nodularia* หรือยาวเรียวยาว เช่น *Gloeotrichia* และ *Cylindrospermum* ซึ่งใน 2 สกุลหลังนี้ อะคีนิตจะเกิดอยู่ชิดกับเฮเทอโรซิสต์ *Anabaena* บางชนิด เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพที่ขาดไนโตรเจน อะคีนิตจะถูกสร้างขึ้นมาอยู่ตรงกลางระหว่างเฮเทอโรซิสต์ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เจริญในสภาพที่มีไนโตรเจนจะมีการสร้างอะคีนิต แต่ไม่มีการสร้างเฮเทอโรซิสต์ เชื่อว่าการขาดฟอสเฟต จะทำให้อะคีนิตถูกสร้างขึ้นมา แต่ไม่พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทุกชนิด (Rai และคณะ, 1985) นอกจากนี้แสงยังเป็นปัจจัยสำคัญเช่นเดียวกันในการสร้างอะคีนิต โดยปกติอะคีนิตจะถูกสร้างมากเมื่อความเข้มแสงลดลง

1.1.6 การแตกแขนง (branching)

การแตกแขนงที่พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มี 2 ประเภท ได้แก่ การแตกแขนงแท้ (true branching) และการแตกแขนงเทียม (false branching)

1) การแตกแขนงแท้ เป็นการแตกแขนงที่พบได้ทั่วไปในสาหร่ายหลายชนิด รวมทั้งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน การแตกแขนงแท้ มี 3 แบบ คือ

1.1) การแตกแขนงข้าง (lateral branching) เกิดจากเซลล์ใดเซลล์หนึ่งในสาย ทำการแบ่งตัวในแนวตั้งฉากกับการแบ่งเซลล์ปกติ หลังจากนั้นเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่จะแบ่งตัวต่อไปอีก ทำให้เกิดเป็นแขนงงอกยาวออกไปทางด้านใดด้านหนึ่ง หรือทั้ง 2 ด้าน

1.2) การแตกแขนงคู่ (dichotomous branching) เกิดจากการแบ่งเซลล์ยอด (apical cell) ของเส้นสาย โดยทำการแบ่งตามแนวนานกับแนวแกนได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ หลังจากนั้นทั้ง 2 เซลล์จะแบ่งตัวต่อไปอีกได้เป็นแขนงใหม่อยู่ตรงปลายเป็นคู่

1.3) การแตกแขนงแบบตัว V คว่ำ (mastigocladaceous หรือ reverse V shaped branching) เกิดจากการแบ่งเซลล์ตามแนวแกนปกติ ต่อจากนั้นเซลล์ใหม่ทั้งสองที่เกิดใหม่จะยึดตัวแล้วดันไปทางเดียวกัน ต่อจากนั้นจะชะงักการเจริญทำให้มีลักษณะเป็นรูปตัว V คว่ำ

2) การแตกแขนงเทียม พบเฉพาะในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเท่านั้น เกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์ในเส้นสายแบ่งตัวตามปกติให้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ ผนังเซลล์ส่วนที่ชนกันจะโค้งมน หลังจากนั้นเซลล์ใหม่ทั้ง 2 เซลล์หรือ เพียงเซลล์เดียวจะทำการแบ่งตัวเกิดเป็นแขนงเทียมคู่ (false branch in pair)

การเกิดแขนงเทียมนี้แขนงที่เกิดใหม่อาจดันชีวิตที่หุ้มติดไปด้วย หรืออาจแทงทะลุหุ้มออกไปทำให้เกิดมีรอยขาดของชีวิตเดิม เรียกรอยนี้ว่า โอครีเรีย (ocrea)

1.1.7 การสืบพันธุ์

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพียงอย่างเดียว

1) การแบ่งเซลล์

เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์จาก 1 เป็น 2 จาก 2 เป็น 4 ... ดังนั้น ถ้าเป็นเซลล์เดียวที่มีชีวิตหุ้ม เมื่อเซลล์ทำการแบ่งเซลล์หลายๆ ครั้ง จะทำให้เกิดกลุ่มเซลล์อยู่รวมกันภายในชีวิตเดียวกัน หลังจากนั้นกลุ่มเซลล์จึงหลุดจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ในกลุ่มเซลล์เมื่อมีการแบ่งเซลล์จะทำให้ขนาดของกลุ่มเซลล์ใหญ่ขึ้น ต่อมาจึงหลุดออกเป็นเซลล์ย่อยโดยวิธีการฉีกขาด (fragmentation)

สำหรับพวกเส้นสาย การแบ่งเซลล์จะทำให้ทริโคมยืดยาวออก แต่เมื่อมีการกระทบกระเทือนจะเกิดการขาดท่อน แต่ละท่อนสามารถเจริญเป็นทริโคมใหม่ต่อไป เช่น *Oscillatoria*

พวกเส้นสายที่มีเฮเทอโรซิสต์ อาจมีการสร้างเซลล์พิเศษที่เรียกว่า อะคีนีด หรือ โกนีเดีย อะคีนีดอาจเกิดเดี่ยวๆ หรือคู่ หรืออาจเกิดติดต่อกันเป็นสาย เช่น *Nodularia*

2) การสร้างสปอร์

สปอร์ที่สร้างขึ้นเป็นสปอร์ที่ไม่มีหนวด สำหรับเคลื่อนไหว (non-motile spore) ซึ่งมี 2 ชนิด คือ

2.1) เอนโดสปอร์ (endospore) หมายถึง สปอร์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยการแบ่งโปรโตพลาสต์ออกเป็น 2 ส่วน หรือหลายส่วน แต่ละส่วนเมื่อหลุดออกจากผนังเซลล์จะงอกเป็นต้นใหม่ต่อไป

2.2) เอกโซสปอร์ (exospore) หมายถึง สปอร์ที่เกิดขึ้นโดยการแบ่งส่วนของเซลล์ออกมาเป็นสปอร์มีจำนวน 1 หรือหลายสปอร์เรียงต่อกัน พบเฉพาะในสกุล *Chamaesiphon*

1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ปัจจัยทางกายภาพ และปัจจัยทางเคมี

1.2.1 ปัจจัยทางกายภาพ

1) แสง (light)

แสงเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง และการเจริญเติบโต ถ้าได้รับความเข้มแสงมากเกินไป การเจริญเติบโตจะถูกยับยั้ง จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้รับ และการสังเคราะห์แสง พบว่า การสังเคราะห์แสงจะเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับความเข้มแสงเพิ่มขึ้น และจากนั้นจะค่อยๆลดลง เมื่อความเข้มแสงถึงระดับอิ่มตัว Watt (1969) กล่าวว่า การปลดปล่อยสารประกอบประเภทคาร์บอน ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์แสง จะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มแสงด้วย โดยที่ความเข้มแสงสูงๆ จะไปยับยั้งการปลดปล่อยผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์แสง

แสงมีผลต่อการเกิด photoinhibition และ photoinactivation ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยปรากฏการณ์ photoinhibition จะเกิดขึ้นเมื่อมีความเข้มแสงประมาณ 2,000 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ส่วนคุณภาพแสง หรือช่วงคลื่นแสงต่างๆ ทั้งคลื่นแสงเหนือม่วง หรือ อัลตราไวโอเลต (ultraviolet) และคลื่นแสงที่ตาสามารถมองเห็นได้ (visible light) มีผลต่อการเกิด photoinhibition เช่นกัน โดยเฉพาะรังสีอัลตราไวโอเลต มีผลโดยตรงต่อกรดนิวคลีอิก ซึ่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ได้ สำหรับ photoinactivation เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวเคมี โดยพบว่าคลื่นแสงสีฟ้าสามารถทำลายเอนไซม์ ribulose biphosphate (RuBP) carboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง นอกจากนี้ ยังพบว่า แสงสีฟ้ายังทำลายไซโตโครมได้อีก (Sokawa and Hase, 1968)

2) อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโต และกิจกรรมต่าง ๆ ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยอุณหภูมิมีผลต่อโครงสร้างขององค์ประกอบภายในเซลล์โดยเฉพาะ โปรตีนและไขมัน นอกจากนี้ อุณหภูมิยังมีอิทธิพลร่วมกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ โดยอุณหภูมิไม่มีผลต่อพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาเหล่านี้ (Richmond, 1986)

Sato and Murata (1980) กล่าวว่า อุณหภูมิเป็นหนึ่งในปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมัน จากการทดลองย้าย *Anabaena variabilis* จากอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ไปเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส พบว่า ใน 10 ชั่วโมงแรกการสังเคราะห์กรดไขมันของ *Anabaena variabilis* ลดลง และเมื่อย้ายจากอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เช่นเดิม พบว่า ภายใน 5 ชั่วโมงหลังจากย้าย มีการสังเคราะห์กรดไขมันเพิ่มขึ้น

อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะอยู่ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส (สรวิศ, 2543)

3) ความเป็นกรดเป็นเบส (hydrogen ion concentration)

ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายๆ ชนิด ความเป็นกรดเป็นเบสของอาหารเพาะเลี้ยงระหว่าง 7.0 ถึง 10.0 มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แสง เนื่องจากไบคาร์บอเนตไอออน (HCO_3^-) ละลายได้มากที่สุดในช่วงระดับความเป็นกรดเป็นเบสนี้จึง สามารถใช้ไบคาร์บอเนตไอออน เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์แสง ทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้สูงที่สุดในช่วงความเป็นกรดเป็นเบสนี้ (Coleman and Coleman, 1981)

ความเป็นกรดเป็นเบสของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมี ผลต่อการละลายของเกลือและสารประกอบต่างๆ (Cook, 1965) ซึ่งการละลายของเกลือและสารประกอบต่างๆ อาจเป็นพิษหรือไปยับยั้งปฏิกิริยาต่างๆ ได้ นอกจากนี้ถ้าความเป็นกรดเป็นเบสเพิ่มขึ้น ยังมีผลต่อการทำให้จุลธาตุบางตัวไม่ละลายได้

4) ความเค็ม และแรงดันออสโมติก (salinity and osmotic effect)

การสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด จะถูกยับยั้ง ถ้าย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่มีความเค็มสูง หรือ มีค่าแรงดันออสโมติกสูง (Batterton and van Baalen, 1971) ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นมีอิทธิพลต่ออัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมากกว่าตัวเพิ่มแรงดันออสโมติกตัวอื่น ๆ

1.2.2 ปัจจัยทางเคมี

การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ขึ้นอยู่กับธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน แบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1) ธาตุอาหารหลัก (macronutrient) ประกอบด้วยธาตุต่อไปนี้

1.1) ออกซิเจน (oxygen)

ธาตุนี้เป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์เกือบทั้งหมดในเซลล์ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถใช้โมเลกุลของออกซิเจนได้โดยตรงจากบรรยากาศ หรือที่ละลายอยู่ในน้ำ ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดพบว่า ออกซิเจนมีผลต่อการสังเคราะห์แสง และการตรึงไนโตรเจน โดยการยับยั้งจะเริ่มปรากฏขึ้นเมื่อปริมาณออกซิเจนในบรรยากาศลดต่ำลง (Fay, 1992)

1.2) คาร์บอน (carbon)

จากการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่าประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ขององค์ประกอบของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน คือ คาร์บอน (Kaplan และคณะ, 1986) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต้องการอนินทรีย์คาร์บอนในการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืช แต่ปริมาณคาร์บอนในอากาศบางครั้ง ไม่เพียงพอกับความต้องการ เนื่องจากปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีอยู่ในอากาศมีค่าต่ำเกินไป คือมีเพียง 0.03 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Becker, 1994) สำหรับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนั้นมักใช้ในรูปแบบของอากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ หรือให้ในรูปแบบของคาร์บอนेट หรือไบคาร์บอนेट อยู่ในรูปของเกลือ

1.3) ไนโตรเจน (nitrogen)

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญ สำหรับการสร้างชีวมวล สัดส่วนของไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 7- 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นในการผลิตสาหร่าย 1 กรัมเซลล์แห้งในอาหาร 1 ลิตร ปริมาณโปแตสเซียมไนเตรท (KNO_3) ต่ำสุดที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต้องการ คือ 500- 600 มิลลิกรัมต่อลิตร (Vonshak, 1986)

สารประกอบไนโตรเจนทั้งที่เป็นสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ในจุลสาหร่ายหลายชนิด และนอกจากนี้สาหร่าย

สีเขียวแกมน้ำเงิน ยังสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสามารถเปลี่ยนจากแก๊สไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนีย ในกระบวนการรีดักชัน (reduction) โดยใช้เอ็นไซม์ไนโตรจีเนสเป็นตัวช่วย

Canto de Loura และคณะ (1987) พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถนำสารประกอบไนโตรเจนที่เก็บสะสมไว้มาใช้ได้ การทดลองนำ *Oscillatoria splendida* ไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน พบว่ารงควัตถุไฟโคไซยานินถูกสลายไปเป็นไนโตรเจนที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถใช้ได้ ทำให้ปริมาณไฟโคไซยานินลดลงอย่างเห็นได้ชัด และไฟโคไซยานินจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อเติมไนโตรเจนลงในอาหาร และยังมี การสะสมของแป้งและไขมันเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน

1.4) ฟอสฟอรัส (phosphorus)

ฟอสฟอรัสเป็นหนึ่งในธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เพราะมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายเทพลังงาน และกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (Talling, 1962)

จากการศึกษาของ Prieto (1997) พบว่า เซลล์ที่ขาดฟอสเฟต เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่มีฟอสเฟตจะสามารถดูดซึมฟอสเฟตได้ในปริมาณที่สูง และเร็วกว่าเซลล์ที่ไม่ขาดฟอสเฟตทั้งในสภาพที่มีแสง และไม่มีแสงภายใต้สภาพมีออกซิเจน แต่ในสภาพที่ขาดออกซิเจนแสงจำเป็นต่อการดูดซึมฟอสเฟต

สรวิศ (2543) กล่าวว่า วัฏจักรของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะสะสมฟอสฟอรัสในเซลล์มากกว่าความต้องการ โดยเก็บสะสมในรูปของพอลิฟอสเฟต ซึ่งจะถูกนำมาใช้เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ขาดฟอสฟอรัส

1.5) ซัลเฟอร์ (sulfur)

ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เพราะซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็น โดยปกติซัลเฟอร์ที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินใช้จะอยู่ในรูปของสารอนินทรีย์

1.6) แคลเซียม (calcium)

แคลเซียมอาจใช้ในรูปของสารประกอบรวมกับแร่ธาตุอื่น ๆ

1.7) โซเดียมและโปแตสเซียม (sodium and potassium)

โซเดียมช่วยในการเปลี่ยนโมเลกุลในโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียในการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โปแตสเซียมเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์หลายชนิด ภายใต้อาการขาดโปแตสเซียม การเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แสงลดลง แต่การหายใจจะสูงขึ้น

1.8) แมกนีเซียม (magnesium)

แมกนีเซียม เป็นองค์ประกอบของรงควัตถุที่ใช้สังเคราะห์แสง และมีบทบาทต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์

2) ธาตุอาหารรอง (micronutrient)

ธาตุอาหารรองเป็นธาตุอาหารที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ต้องการใช้ในปริมาณน้อย มักมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร ธาตุอาหารรองเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลที่จำเป็น เช่น เอนไซม์ ซึ่งเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต หรือเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลของเอนไซม์ที่สำคัญบางชนิด หรือจำเป็นสำหรับเป็นตัวเร่งของเอนไซม์

2.1 เหล็ก (iron)

เหล็กเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม เพราะเป็นองค์ประกอบของไซโตโครมต่าง ๆ และนอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญต่อการดูดซึมไนโตรเจน และกระบวนการสังเคราะห์แสง เนื่องจากมีผลต่อการสังเคราะห์รงควัตถุ ที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน และ คลอโรฟิลล์ เอ (Oquist, 1971)

เหล็กเป็นธาตุที่มักจะตกตะกอนในสารละลาย ฉะนั้น จึงต้องใส่สารที่ป้องกันการตกตะกอน เรียกว่า คีเลเตอร์ หรือ chelating agent เหล็กที่ใช้อาจอยู่ในรูปของสารประกอบ เช่น $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ แต่สารประกอบเหล็กนี้จะดูดน้ำทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ ฉะนั้นจึงนิยมใช้สารประกอบพวกเหล็กอีดีทีเอ (FeEDTA) แทนเพราะเสถียรกว่า (ลัดดา, 2539)

2.2 แมงกานีส ทองแดง และ สังกะสี (manganese, copper and zinc)

ธาตุเหล่านี้เป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง รวมทั้งเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเอนไซม์อีกหลายชนิด

2.3 โมลิบดีนัม (molybdenum)

โมลิบดีนัม เป็นธาตุอาหารที่เป็นปัจจัยจำกัดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจน เนื่องจากโมลิบดีนัม เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไนเตรดรีดักเตส (nitrate reductase) และ ไนโตรจีเนส (nitrogenase) (สรวิศ, 2543)

2. สารเคมีที่พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดต่าง ๆ

2.1 ไขมัน (lipid) และกรดไขมัน (fatty acid)

ไขมันของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechocystis* PCC 6803 ประกอบด้วย glycerolipid 4 ชนิด คือ monogalactosyl diglycerides (MGDG), digalactosyl diglycerides (DGDG), sulfoquinovosyl diglycerides (SQDG) และ phosphatidyl glycerol (PG) เป็นส่วนใหญ่

และมีการค้นพบกรดไขมันจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็นเส้นสาย เช่น *Anabaena variabilis*, *Anabaena cylindrica*, *Oscillatoria chalybea*, *Nostoc calcicola* และ *Tolypothrix* sp. (Wada และ Murata, 1990)

มีการศึกษาถึง sulfolipids ในส่วนของ glycolipids ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Lyngbya*, *Phormidium*, *Oscillatoria* เพื่อใช้เป็นสารต่อต้านมะเร็งและโรคเอดส์

นอกจากนี้ยังพบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina maxima* ประกอบด้วย ไขมัน 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำกรดไขมันไปวิเคราะห์ด้วย แผ่น TLC พบว่าประกอบด้วย digalactosyl diglycerides 23.4 เปอร์เซ็นต์ phosphatidyl glycerol 25.9 เปอร์เซ็นต์ monogalactosyl diglycerides 4.6 เปอร์เซ็นต์ sulfolipid 5 เปอร์เซ็นต์ และกรดไขมันที่เป็นกลาง (neutral lipids) 7.6 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ยังพบว่า กรดไขมันที่สำคัญของสาหร่าย คือ polyunsaturated fatty acid โดยเฉพาะ γ -linoleic acid และ β -linoleic acid ซึ่งพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในกลุ่ม *Oscillatoriaceae* (Canto de Loura และคณะ, 1987)

2.2 สารปฏิชีวนะ (antibiotic)

สารปฏิชีวนะ หมายถึง สารประกอบที่ผลิตหรือสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่ง อาจเป็น แบคทีเรีย เชื้อรา หรือแอคติโนมัยซีท สารที่ผลิตขึ้นได้นี้สามารถไปยับยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง หรือไปมีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์กลุ่มนั้น ๆ ได้โดยใช้ในปริมาณน้อย ดังนั้นสารปฏิชีวนะเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มสารต้านจุลินทรีย์ที่แยกได้จากจุลินทรีย์นั่นเอง (มาลิน, 2532) ปัจจุบันจะรวมถึงสารกึ่งสังเคราะห์ (ยากึ่งสังเคราะห์ หมายถึง สารที่ใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีร่วมกับวิธีผลิตตามธรรมชาติ) ที่ใช้ยาปฏิชีวนะเป็นต้นแบบด้วย (ดวงพร, 2530)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ได้ทั้ง แบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และยับยั้งสาหร่ายด้วยกันเอง รวมถึงเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor)

ได้มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยมีการพบกรดอะคริลิก (acrylic acid) ครั้งแรกใน *Phaeocystis pouchetii* (Sieburth, 1960) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ

Fish และคณะ (1994) รายงานว่า เมื่อแยกสารสกัดที่ได้จาก *Phormidium* sp. ด้วย C_{18} Sep-Park และสารที่อยู่ในส่วนที่ชะด้วยเมทานอลระหว่าง 50-80 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* NCIMB 3251 และนอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วย

Park และคณะ (1992) รายงานว่า พบสารชนิดใหม่ที่แยกได้จากสารสกัดจาก *Fischerella muscicola* (Thuret) Gomont (UTEX 1829) คือ fischerindole L ซึ่งเป็น octahydroindeno [2,1-b] indoleisonitrile ตัวแรกที่สามารถแยกได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและยีสต์ *Aspergillus oryzae*, *Penicillium notatum*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Trichophyton mentagrophytes*

Walter และ Frankmole (1992) ได้รายงานว่ สาร laxaphycin A และ B เป็นสาร cyclic peptide ที่ผลิตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena laxa* FK-1-2 สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราได้

Bloor และ England (1989) ได้รายงานการผลิตสารปฏิชีวนะจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Nostoc muscorum* โดยเลี้ยงสาหร่ายในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้แสงที่มีความเข้ม 50 ไมโครไอสไดน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที และพ่นด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในอากาศ นำสารสกัดจากสาหร่ายในระยะหลังอัตราการเจริญเติบโตคงที่ (post-exponential) มาทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* นอกจากนั้น ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarum* และ *Hormocornis resinae* รวมไปถึงเชื้อยีสต์ สายพันธุ์ *Candida albicans* และ *C. pseudotropicalis* โดยสารปฏิชีวนะที่พบนั้น มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 2,000- 3,000 ดาลตัน

Kashiwagi และคณะ (1980) พบว่า *Lyngbya majuscula* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่อาศัยอยู่ในน้ำเค็ม แพร่กระจายอยู่ทั้งในน้ำคั้น และน้ำลึกลง มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่น่าสนใจ คือ สารที่ผลิตจากสาหร่ายชนิดนี้ทำให้เกิดการแพ้ทางผิวหนังแก่ผู้ที่ลงเล่นน้ำ สารสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบและผื่นตามผิวหนังนี้มีชื่อว่า lyngbyatoxins, aplysiatoxins และ oscillatoxins

Gross และคณะ (1991) รายงานว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Fischerella muscicola* (thur.) Gom. UTEX 1829 สามารถสังเคราะห์สาร โดยให้ชื่อว่า fischerellin ซึ่งสารนี้สามารถยับยั้งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่นๆ เช่น *Anabaena variabilis* P9 (ATCC 29413), *Anabaena* sp. ATCC 27893 (PCC 7120), *Synechococcus* sp. PCC 6911, *Synechocystis* sp. CB-3 รวมทั้งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตในสาหร่ายสีเขียวบางตัว ได้แก่ *Ankistrodesmus falcatus*, *Nannochloris* sp. SAG 55-81 และ *Scenedesmus obliquus* โดยวิเคราะห์ได้ว่าสารออกฤทธิ์ตัวหลักเป็นสารไลโปฟิลิก (lipophilic) มีคุณสมบัติทนกรด ทนความร้อน แต่จะสลายตัวในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 ชั่วโมง คุณสมบัติอื่นๆ ของ fischerellin คือ สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์หลายๆชนิด รวมไปถึง เมทานอล (methanol), เอทานอล (ethanol), อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile), อะซิโตน (acetone), ไดเอทิลอีเทอร์ (diethylether) และเตอร์ทิวทิลเมทิลอีเทอร์ (tert-butylmethylether) แต่ละลายในน้ำได้น้อย เซลล์ที่ทำให้แห้งในสภาพแข็งที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล (methanol) รวมทั้งสารสกัดที่บริสุทธิ์แล้วสามารถเก็บรักษาไว้ได้หลายเดือนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยไม่เสื่อมประสิทธิภาพ

สารปฏิชีวนะ tubercidin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพิษต่อเซลล์นั้น เดิมพบใน *Streptomyces tubercidicus* ยังพบใน *Tolypothrix byssoidea* ด้วย สารนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (Barchi และคณะ, 1983) ส่วนสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Aphanizomenon flos-aquae* ผลิตสาร aphantoxin ซึ่งเป็นสาเหตุการแพ้ของสารพิษในน้ำ (Sasner และคณะ, 1981)

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators, PGR)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (PGR) เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพควบคุม หรือ

มีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ผลิตในธรรมชาติ พบในราและสาหร่ายทะเล สำหรับในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยเฉพาะสาหร่ายที่เป็นเส้นสาย และตรึงไนโตรเจน ได้นำมาทดสอบกับธัญพืช ได้แก่ พริกไทย ผักกาด และ มะเขือเทศ พบว่ามีผลต่อการเจริญของพืช (Cresswell และคณะ, 1989)

2.4 เอนไซม์ (enzyme)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina platensis* สามารถผลิตเอนไซม์ phosphoglycerate kinase (PGK) ที่ใช้ในการตรวจหา ATP นอกจากนั้นยังพบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิด เช่น *Anabaena*, *Mastigocladus* และ *Microcoleus* ผลิตเอนไซม์ restriction endonuclease ทำหน้าที่ทำลายสารพันธุกรรมที่แปลกปลอมเข้าไปในเซลล์ (Richmond, 1986)

2.5 สารฆ่าสาหร่าย (algicide)

Bachi และคณะ (1993) ศึกษาเกี่ยวกับผลของสารสกัดจาก *Oscillatoria laete-virens* ต่อการเจริญเติบโต การสังเคราะห์แสง และความเป็นพิษของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis aeruginosa* พบว่า สารสกัดดังกล่าวมีผลทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ และโปรตีนของ *Microcystis aeruginosa* ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากได้รับสารสกัด ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณเซลล์ และความเป็นพิษของสารพิษลดลง เช่นกัน สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่มีผลในการยับยั้ง *Microcystis aeruginosa* อยู่ระหว่าง 16-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Boris และคณะ (1991) รายงานว่าสาร cyanobacterin LU-1 ที่ผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Nostoc linckia* CALU 892 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เช่น *Synechococcus* sp. R-2 PCC 7942, *Anabaena variabilis* ATCC 27829, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Microcystis aeruginosa* และ *Nostoc punctiforme* str. Gromov 1964/1 และยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย (eukaryotic algae) บางชนิด เช่น *Ankistrodesmus acicularis* str. Basleva ปริมาณที่น้อยที่สุดที่สารจะออกฤทธิ์ยับยั้ง (minimum effective dose) การเจริญเติบโตของสาหร่ายดังกล่าว คือ ไม่นเกิน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามสารปฏิชีวนะ cyanobacterin LU-1 นั้น ไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย และรา รวมทั้งไม่มีพิษต่อหนูด้วย

Thongaram และคณะ (1999) พบว่าสามารถใช้แบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. จำกัดการเจริญเติบโตของ *Microcystis aeruginosa* อย่างได้ผล โดย *Alcaligenes* ความเข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถทำลาย *Microcystis aeruginosa* ความหนาแน่น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรหมดภายใน 3 วัน

3. สาหร่ายที่ผลิตสารพิษ *Microcystis aeruginosa*

3.1 ลักษณะทั่วไปของ *Microcystis*

Microcystis เป็นสกุล (genus) หนึ่งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จัดเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำจำพวกโปรคาริโอต (prokaryotic) มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลมหรือรี ขนาด 3-8 ไมครอน อยู่รวมกันเป็นกลุ่มเซลล์โดยการฝังตัวอยู่ในเมือกหุ้ม (amorphous mucilage) ทำให้อาจเห็นรูปร่างของกลุ่มเซลล์กลม เบี้ยว หรือแหวนเว้า การสืบพันธุ์เกิดขึ้นในลักษณะแบ่งตัวแบบ binary fission ใน 3 ระยะเวลา ที่ไม่สมมาตรกันคล้ายคลึงกับการแบ่งตัวของแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus*

เนื่องจาก *Microcystis* ไม่มีการสร้างเซลล์พิเศษ เช่น อะกินีต หรือ เฮเทอโรซิสต์ ดังนั้นการจำแนกเชิงอนุกรมวิธานจึงต้องใช้ขนาด รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ในกลุ่มเซลล์ในการจัดแบ่งสายพันธุ์ ซึ่งมักจะยึดถือระบบที่เสนอโดย Komarek และ Anagnostidis (1986) จากระบบทั้งสองนี้สามารถแบ่ง *Microcystis* ออกเป็น 4 สายพันธุ์ คือ *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, *Microcystis wesenbergii* และ *Microcystis flos-aquae* ซึ่งทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษได้ โดยที่ *Microcystis aeruginosa* เป็นสายพันธุ์แรกที่ได้มีการคัดแยกเพาะเลี้ยงให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ และใช้เป็นตัวอย่างศึกษาในห้องปฏิบัติการ (Bishop และคณะ, 1959)

Microcystis มีการดำรงชีวิตอย่างอิสระบนผิวน้ำโดยใช้ แก๊สแวนิโอด ภายในเซลล์เป็นตัวช่วยพองให้สามารถลอยตัวบนผิวน้ำได้ มีการนำคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งเกิดขึ้นที่ผิวทั้งสองด้านของบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในที่มีการโค้งเว้าเป็นพิเศษเรียกว่า ไทลาคอยด์ รังควัตถุหลักที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ, แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน แบ่งเป็น ไฟโคไซยานิน และ อัลโลไฟโค

ไซยานิน ซึ่ง คลอโรฟิลล์ เอ เป็นรงควัตถุชนิดเดียวกันกับ ที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของพืชชั้นสูง และสาหร่ายทั่วไป ทำให้ผลิตผลจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของ *Microcystis* มีการปลดปล่อย แก๊สออกซิเจนในรูปของโมเลกุลอิสระเกิดขึ้น (Holt และคณะ, 1994)

3.1.1 *Microcystis aeruginosa*

เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเซลล์เดี่ยวที่ผลิตสารพิษต่อตับในกลุ่ม “ ไมโครซิสติน ” (microcystins) สามารถจัดจำแนกตามลำดับอนุกรมวิธานของ Desikachary (1959) ได้ดังนี้

Division Cyanophyta

Class Chroococcaceae

Order Chroococcales

Family Chroococcaceae

Genus *Microcystis*

Species *aeruginosa*

ลักษณะเฉพาะของ *Microcystis aeruginosa* คือ เซลล์จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเซลล์ มีรูปร่างไม่แน่นอน (amorphous colony) คล้ายตาข่าย กลม ยาว รูปวงรี ฯลฯ เซลล์ในกลุ่มเซลล์ เรียงตัวจับกันเป็นกลุ่มแน่น เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ เซลล์ประมาณ 3 - 7 ไมครอน วงจรชีวิตของ *Microcystis aeruginosa* เริ่มจากกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็กจำนวน 1 กลุ่มเซลล์ ต่อมากลุ่มเซลล์จะมีการแบ่งเซลล์และขยายขนาดของเซลล์ภายในกลุ่ม เซลล์ หรือมีปริมาตรเพิ่มขึ้น จากนั้นจะเกิดช่องว่างภายในกลุ่มเซลล์ และขอบนอกของกลุ่มเซลล์ จะมีลักษณะคล้ายตาข่าย เมื่อเซลล์ในกลุ่มเซลล์แบ่งเซลล์มากขึ้น โครงสร้างของกลุ่มเซลล์จะมี ขนาดใหญ่ และหลุดเป็นกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ มีการแบ่งเซลล์เจริญเป็นกลุ่มเซลล์ใหม่ต่อไป และ โดยทั่วไปจะมีแก๊สแวนิวโอไลภายในเซลล์

3.2 สารพิษสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

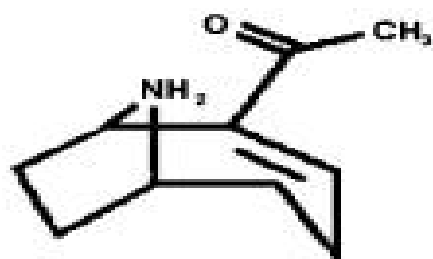
สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีด้วยกันหลายกลุ่มที่ผลิตสารพิษ เช่น

Microcystis aeruginosa ผลิตสารพิษไมโครซิสติน (microcystin) มีโครงสร้างสารพิษเป็นวงแหวนเปปไทด์ *Nodularia* ผลิตสารพิษโนดูลาริน (nodularin) มีโครงสร้างสารพิษเป็นกลุ่มพันธะเปปไทด์ *Aphanizomenon flos-aquae* ผลิตสารพิษ อะฟานทอกซิน (aphantoxin), *Anabaena flos-aquae* ผลิตสารพิษ อะนาทอกซิน (anatoxin), *Cylindrospermopsis* ผลิตสารพิษไซลินโดรสเพอมอปซิน (cylindrospermopsin) มีโครงสร้างสารพิษอยู่ในกลุ่มอัลคาลอยด์ *Calothrix crustacean*, *Oscillatoria nigroviridis*, *Nostoc muscorum* ผลิตสารพิษอะพลายเซียทอกซิน (aplysiatoxin) มีโครงสร้างสารพิษอยู่ในกลุ่มอัลคิลฟีนอล (ตารางที่ 1)

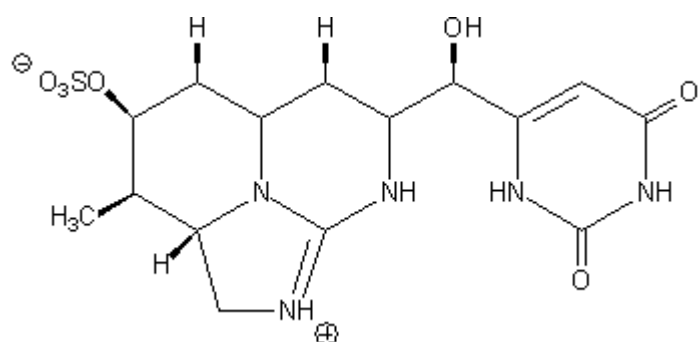
ตารางที่ 1 สารพิษจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและคุณลักษณะทั่วไป

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (cyanobacterium)	สารพิษ (toxin)	โครงสร้าง (structure)	อวัยวะเป้าหมายของการได้รับพิษ (primary target organ in mammal)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Microcystin	Cyclic peptide	Liver
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Aphantoxin	Alkaloids	Nerve axons
<i>Anabaena flos-aquae</i>	Anatoxin	Alkaloids	Nerve synapse
<i>Lyngbya gracilis</i>	Debromo- Aplysiatoxin	Alkyl phenols	Skin, gastrointestinal tract
<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	Aplysiatoxin	Alkyl phenols	Skin
<i>Calothrix crustacean</i>	Aplysiatoxin	Alkyl phenols	Skin
<i>Nostoc muscorum</i>	Aplysiatoxin	Alkyl phenols	Skin
<i>Nodularia</i>	Nodularin	Peptides	Liver
<i>Cylindrospermopsis</i>	Cylindrosper- mopsin	Alkaloids	Liver

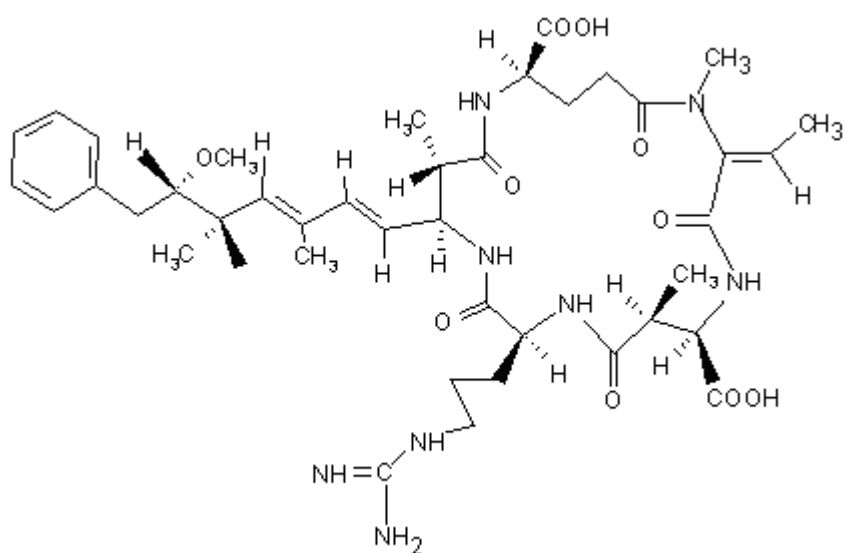
ที่มา : ดัดแปลงตารางมาจาก Metting and Pyne, 1986 ; Chorus and Bartram, 1999



ภาพที่ 1 โครงสร้างสารพิษอะนาทอกซิน



ภาพที่ 2 โครงสร้างสารพิษไซลินโดรสเฟอมอบซิน



ภาพที่ 3 โครงสร้างสารพิษโนดูลาริน

3.3 สารพิษไมโครซิสติน (microcystins)

อาภารัตน์ (2539) กล่าวว่า สารพิษจากสาหร่าย คือ สารทุติยภูมิ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างและสลายของเซลล์ (secondary metabolite) เป็นสารที่ไม่เกี่ยวข้องหรือจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย บางครั้งอาจช่วยในการอยู่รอดในธรรมชาติ ในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงเหตุผลที่แท้จริงในการผลิตสารพิษของสาหร่าย แต่คาดว่าสารพิษที่สร้างขึ้นทำหน้าที่เป็นเสมือนสารป้องกันตัว (allelopathic agent) จากศัตรูหรือคู่แข่งในธรรมชาติ

สารพิษชนิดนี้ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกจาก *Microcystis aeruginosa* สายพันธุ์ NRC-1 (Bishop และคณะ, 1959)

ไมโครซิสตินเป็นสารพิษที่ผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งชนิดหลัก คือ *Microcystis aeruginosa* โดยมีชนิดอื่นที่สามารถผลิตสารพิษไมโครซิสตินได้ เช่น *Anabaena*, *Oscillatoria* และ *Nostoc* โดยที่ปริมาณสารพิษในเซลล์สาหร่ายขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น ธาตุอาหาร แสง และ อุณหภูมิ (Vander Westhuizen และ Eloff, 1985; Watanabe และ Oishi, 1985; Sivonen, 1990)

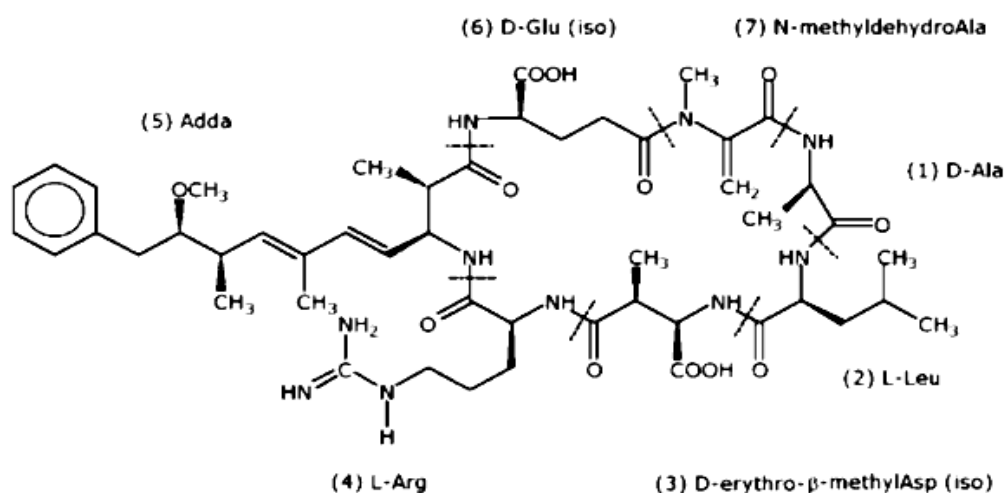
แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของสาหร่ายและการสร้างสารพิษของ *Microcystis* พบว่าแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ทำหน้าที่ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงโดยเปลี่ยนรูปไปมาระหว่าง CO_2 , H_2CO_3 , HCO^- และ CO_3^{2-} ซึ่งอยู่ในรูปใดขึ้นอยู่กับค่า ความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

Codd และ Poon (1988) ศึกษาผลของปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการสร้างสารพิษของสาหร่าย *Microcystis* sp. โดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร BG-11 พ่นด้วยอากาศ และเพาะเลี้ยงแบบเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงในอาหารด้วย เปรียบเทียบการสร้างสารพิษของสาหร่าย พบว่า สาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบพ่นด้วยอากาศ สร้างสารพิษน้อยกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงแบบพ่นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ประมาณ 10 เท่า

ไมโครซิสตินเป็นสารพิษที่มีความเสถียรมากและจะไม่ทำปฏิกิริยา hydrolysis หรือ oxidation ที่ระดับความเป็นกรดต่างไกล่เคียงสภาพธรรมชาติ ไมโครซิสตินยังคงมีความเป็นพิษหลังจากการต้ม และในที่มีดไมโครซิสตินอาจอยู่เป็นเดือนหรือเป็นปี (Harada และคณะ, 1996)

3.3.1 โครงสร้างทางเคมีและลักษณะจำเพาะของไมโครซิสติน

ไมโครซิสตินมีสูตรโครงสร้างเป็นวงแหวนเปปไทด์ (cyclic peptide) โดยมี กรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 7 ชนิด ได้แก่ D-alanine อยู่ในตำแหน่งที่ 1; มี L-amino acids สองตัว อยู่ในตำแหน่งที่ 2 และ 4; γ -linked D-glutamic acid อยู่ในตำแหน่งที่ 6; β -linked D-erythro- β -methylaspartic acid (MeAsp) อยู่ในตำแหน่งที่ 3; (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid (Adda) อยู่ในตำแหน่งที่ 5 และ N-methyldehydroalanine (Mdha) อยู่ในตำแหน่งที่ 7 ดังแสดงไว้ในภาพที่ 4 สารพิษไมโครซิสตินมีโครงสร้างมากกว่า 50 รูปแบบ โดยแต่ละรูปแบบจะมีความแตกต่างอยู่ที่ L-amino acids สองตัว ในตำแหน่งที่ 2 และ 4 และ methylation/demethylation ในรูปของ MeAsp และ Mdha (Dawson, 1998)



ที่มา: Michael (2004)

ภาพที่ 4 โครงสร้างหลักของสารพิษไมโครซิสติน

ไมโครซิสตินเป็นสารพิษที่มีความจำเพาะโดยเป็นตัวยับยั้งโปรตีน ฟอสฟาเทส PP-1 และ PP-2A (Protein phosphatase PP-1 and PP-2A) ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ($IC_{50} \approx 0.1$ นาโนโมล) (Cohen และ Cohen, 1989; Yoshizawa และคณะ, 1990; Honkanen และคณะ, 1990; MacKintosh และคณะ, 1990; Nishiwaki-Matsushima และคณะ, 1991) ซึ่งมีความสำคัญต่อการควบคุมเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต การแบ่งเซลล์ และการยึด-หดตัวของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าสารพิษไมโครซิสติน ยังก่อให้เกิดอาการระคายเคืองที่ผิวหนังและตา มีอาการเป็นไข้ เวียนศีรษะ อ่อนเพลีย และเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร (Carmichael, 1992) หากได้รับสารพิษไมโครซิสตินในปริมาณมากก็จะทำให้ความเป็นพิษเพิ่มขึ้น จึงมีอาการ คลื่นไส้ อาเจียน เวียนหัว ปวดท้อง ท้องร่วง เป็นตะคริว ปวดตามร่างกายและอ่อนเพลีย (Sargunar และ Sargunar, 1990)

3.3.2 สมบัติทางกายภาพของสารพิษไมโครซิสติน

สารไมโครซิสติน เป็นของแข็งอสัณฐานที่ปราศจากสี และมักแสดงค่า specific rotation เป็นลบเมื่อเป็นสารละลายอยู่ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ หรือ เมทานอล สเปกตรัมในช่วงยูวีของสารกลุ่มนี้จะมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 238 นาโนเมตร เป็นผลมาจาก conjugated diene ในโมเลกุล ของ Adda ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อการตรวจจับสารกลุ่มนี้ด้วยเครื่อง HPLC (Kondo และคณะ, 1992)

3.3.3 ความคงตัวของสารพิษไมโครซิสติน

สารพิษในกลุ่มไมโครซิสติน เป็นสารประกอบวงแหวนชนิด heptapeptide ที่เสถียรต่อปฏิกิริยาเคมีสูง โดยสารพิษนี้จะมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 3 สัปดาห์ ภายใต้สภาวะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 1 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส การทำลายสารพิษอย่างสมบูรณ์นี้ จำเป็นต้องใช้การย่อยด้วยกรดที่มีฤทธิ์กัดกร่อนสูงมาก เช่น 6 นอร์มอล hydrochloric acid หรือ trifluoroacetic acid และสารกลุ่มนี้ยังทนต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป อย่างเช่น trypsin ผลการศึกษาถึงการสลายตัวของสารนี้มีผลอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตั้งสารละลายของสารนี้ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์นาน 26 วัน และน้ำที่มีส่วนผสมของรงควัตถุภายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เช่น คลอโรฟิลล์ เอ, เบต้า-แคโรทีน และ ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) ภายใต้แสงอาทิตย์เป็นเวลานาน 15 วัน พบว่าปริมาณของไมโครซิสตินจะลดลง แสดงว่ารงควัตถุเหล่านี้

มีส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของไมโครซิสติน แต่การทดลองทำนองเดียวกันนี้โดยใช้แสงฟลูออเรสเซน (fluorescence) กับสารไมโครซิสติน-แอลอาร์ (microcystin-LR) พบว่าแสงไม่มีผลต่อการสลายตัวแต่ประการใด (Tsuji และคณะ, 1994)

สารพิษในกลุ่มไมโครซิสตินโดยทั่วไปจะมีค่าความเป็นพิษ LD_{50} i.p. ในหนูอยู่ระหว่าง 45-1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สารพิษไมโครซิสตินที่พบมากในประเทศไทยมี 3 รูปแบบ ได้แก่ ไมโครซิสติน-แอลอาร์, ไมโครซิสติน-วายอาร์ และไมโครซิสติน-อาร์อาร์ โดยมีค่าความเป็นพิษ LD_{50} i.p. ในหนู 60, 70 และ 300-600 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (WHO, 2004)

3.3.4 การกำจัดสารพิษไมโครซิสตินโดยกระบวนการบำบัดน้ำ

สารพิษไมโครซิสตินมีบทบาทที่เด่นชัดว่าเป็นรูปแบบหนึ่งที่เกิดขึ้นในมิติของเสียและมลพิษ ซึ่งเมื่อปนเปื้อนเข้าสู่ระบบนิเวศแหล่งน้ำก็จะทำให้เกิดผลกระทบต่อระบบสิ่งแวดล้อมและระบบผลิตน้ำประปา หากน้ำที่มีสารพิษชนิดนี้ปนเปื้อนมาใช้ในการกระบวนการผลิตน้ำประปา จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ที่อุปโภคและบริโภคน้ำประปาได้ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำเพื่อลดสารพิษไมโครซิสติน

กระบวนการบำบัดน้ำเพื่อใช้ในการบริโภคที่มีอยู่นั้น สามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ ได้ 3 ประเภทด้วยกัน คือ กระบวนการจับตัวเป็นก้อนของแข็ง และการกรอง (filtration) กระบวนการใช้สารที่เป็น oxidant และกระบวนการดูดซับโดยผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon) จากการศึกษาพบว่าสารพิษไมโครซิสติน สามารถถูกทำลายอย่างรวดเร็วด้วยสารละลายคลอรีน (aqueous chlorine) และ แคลเซียมไฮโปคลอไรต์ (calcium hypochlorite) โดยสารทั้งสองมีประสิทธิภาพในการกำจัดอยู่ที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) มีประสิทธิภาพในการกำจัดสารพิษทั้งสองชนิดต่ำกว่า แคลเซียมไฮโปคลอไรต์มาก (ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์) (Nicholson และคณะ, 1994)

ผงถ่านกัมมันต์สามารถดูดซับสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำรวมทั้งสารพิษจากสาหร่ายหลายชนิดออกจากรู้อย่างได้ผล (Hoffmann, 1976; Keijola และคณะ, 1988; Falconer

และคณะ, 1989; Himberg และคณะ, 1989) อย่างไรก็ตามการทำงานของผงถ่านกัมมันต์นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของผงถ่าน และวิธีการเติมผงถ่านลงในน้ำที่ต้องการบำบัด

ถ่านกัมมันต์ มีความสามารถในการดูดซับสารพิษที่ปนเปื้อนในน้ำได้โดยอาภรณ์ และคณะ (2547) พบว่า ถ่านกัมมันต์ชนิดผง (powder activated carbon, PAC) มีประสิทธิภาพในการดูดซับไมโครซิสติน-แอลอาร์ ได้ดีกว่าถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ด (granular activated carbon, GAC) โดยสามารถลดสารพิษไมโครซิสติน-แอลอาร์ ลงได้ร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมถ่านกัมมันต์) อันเนื่องมาจากปริมาตรของรูพรุนและพื้นที่ผิวสัมผัส ซึ่งจะมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ของสารพิษที่ลดลง

Keijola และคณะ (1988) พบว่า ผงถ่านกัมมันต์ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดสารพิษที่มีผลต่อดับได้ถึงร้อยละ 90 โดยทำการบำบัดร่วมกับกระบวนการ pre-ozonation

ผลการศึกษาการกำจัดสารพิษด้วยโอโซน (ozone) พบว่าสามารถกำจัดสารพิษจากสาหร่ายไมโครซิสติน, โนคูลาริน และ อะนาทอกซิน-เอ ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้อย่างสมบูรณ์ (Keijola และคณะ, 1988) และประสิทธิภาพในการกำจัดนี้จะขึ้นอยู่กับปริมาณของโอโซน ที่ใช้ (Himberg และคณะ, 1989) ถึงแม้ว่ากระบวนการ ozonolysis ของไมโครซิสติน-แอลอาร์ และโนคูลารินจะให้สารสุดท้ายที่ไม่เป็นอันตราย แต่การศึกษาสารระหว่างกลาง (intermediate) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการสลายตัวนั้นยังคงจำเป็นต้องศึกษาต่อเพื่อหาสารที่อาจพบว่าเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยงได้ (Namikoshi และคณะ, 1989)

การบำบัดน้ำที่มีเซลล์สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวและสารพิษไมโครซิสตินปนเปื้อนอยู่นั้นจำเป็นต้องเลือกเทคโนโลยีที่เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อประสิทธิภาพของการบำบัด โดยที่ระบบการผลิตน้ำประปาในประเทศไทยสามารถทำได้เพียงการกรองเซลล์หรือเจือจางสารพิษเท่านั้น การทำลายพิษไม่สามารถขจัดให้หมดได้โดยการกรอง ตกตะกอน เดิมคลอรีนหรือแม้แต่การต้มได้ (อาภรณ์, 2539)

Lahiti และคณะ (1996) กล่าวว่า สารพิษไมโครซิสตินที่ลดลงในกระบวนการกรองอันเนื่องมาจากการดูดซับและการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation)

สารพิษไมโครซิสตินจะถูกปลดปล่อยจากเซลล์เมื่อเซลล์สาหร่ายแตกหรือถูกทำลายโดยกระบวนการตกตะกอน (coagulation) และกระบวนการกรอง (filtration)

ในระบบบำบัดน้ำไม่ควรทำ pre-chlorination หรือ pre-ozonation ภายหลังขั้นตอนการลดสารพิษที่ละลายอยู่ในน้ำ โดยที่สารพิษไมโครซิสตินจะถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็วโดยตัวออกซิไดซ์รวมทั้งโอโซน และ คลอรีน ซึ่งต้องควบคุมเวลาและความเป็นกรดต่าง เพื่อที่จะให้เกิดประสิทธิภาพมากที่สุด โดยที่การต้มไม่สามารถทำลายสารพิษไมโครซิสตินได้ ซึ่งการต้มน้ำที่มีเซลล์ปนเปื้อนอยู่จะนำไปสู่การปลดปล่อยสารพิษให้เป็นอิสระ (MRACC, 2002)

3.3.5 ความเป็นพิษของไมโครซิสติน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่พบมากตามแหล่งน้ำมีหลายชนิด แต่ชนิดที่ก่อให้เกิดพิษมากที่สุด คือ *Microcystis aeruginosa* และ *Anabaena flos-aquae* ซึ่งสามารถผลิตสารพิษและปล่อยออกมาจากเซลล์ได้ คือ ไมโครซิสติน และ อะนาทอกซิน ตามลำดับ ไมโครซิสตินเป็นสารพิษที่มีโครงสร้างเป็นกรดอะมิโน 7 ตัวที่มีบางส่วนต่อกันเป็นวงแหวน มีทั้งหมดมากกว่า 70 รูปแบบ (variant) เช่น ไมโครซิสติน-แอลอาร์, ไมโครซิสติน-วายอาร์ และไมโครซิสติน-อาร์อาร์ โดยชนิดหลังมีความเป็นพิษน้อยที่สุด สำหรับชนิดแรกเป็นชนิดที่ศึกษากันมากที่สุด

Tsuji และคณะ (1997) พบว่าพิษที่เห็นเด่นชัดของไมโครซิสติน คือพิษต่อตับ ไมโครซิสตินในปริมาณมากทำให้เซลล์ตับตายและทำลายเส้นเลือดที่หล่อเลี้ยงภายในตับ ศึกษาความเป็นพิษต่อตับ เมื่อให้ไมโครซิสติน-แอลอาร์ ทางปาก แก่หนูถีบจักรที่มีอายุมาก (32 สัปดาห์) กับหนูรุ่น (5 สัปดาห์) โดยให้ในปริมาณสูงถึง 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งหนูชนิดนี้จะมีน้ำหนักประมาณ 20-30 กรัม ดังนั้นปริมาณที่ให้คือ 10-15 ไมโครกรัม ประมาณ 60 % ของหนูแก่เท่านั้น ที่พบพยาธิสภาพที่ตับ หลังให้สารพิษนี้ 2 ชั่วโมง แต่ในขณะที่หนูรุ่นไม่พบการเปลี่ยนแปลง จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า พิษต่อตับของไมโครซิสติน อยู่กับอายุของหนูถีบจักร นอกจากนี้พบว่ายังขึ้นอยู่ความสามารถในการดูดซึมที่ลำไส้เล็กอีกด้วย

กลไกความเป็นพิษต่อตับของไมโครซิสติน เกิดขึ้นดังนี้ เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดจะอาศัยถุงน้ำดี (bile salt) เป็นตัวพาเข้าเซลล์ตับ (hepatocyte) สารพิษนี้ทำให้เซลล์ตับเหี่ยวเล็กลง ส่งผลให้เซลล์ตับที่ปกติอยู่ติดกัน แยกออกจากกัน และยังทำให้

เซลล์บุหลอดเลือดฝอยที่เข้าสู่ตับ (sinusoidal capillaries) ที่อยู่บริเวณติดกันแยกตามไปด้วย เลือดที่ถูกขนส่งมาตามหลอดเลือดฝอย จึงซึมออกมาที่เนื้อเยื่อตับและเกิดการสะสม ทำให้เนื้องอกจากเกิดการทำลายของเนื้อเยื่อบริเวณนี้ แล้วยังทำให้เกิดภาวะช็อคได้ การที่เซลล์ตับเหี่ยวเล็กลงผิดปกติไป เนื่องจากเมื่อไมโครซิสตินเข้าสู่เซลล์จะไปมีผลต่อส่วนไซโตสเกลิทอน (cytoskeleton) ที่อยู่ในเซลล์ เมื่อสารพิษจับที่ intermediate filament และ microfilament ซึ่งเป็น protein polymer ในไซโตสเกลิทอน ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ intermediate filament และ microfilament ตามลำดับ เมื่อเซลล์แรกหัดจะทำให้แยกออกจากเซลล์ข้างเคียงและเซลล์บุหลอดเลือดฝอย (Eriksson และคณะ, 1992)

นอกจากนี้ไมโครซิสติน ยังมีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีนฟอสฟาเทส (protein phosphatases) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ทำงานร่วมกับเอนไซม์โปรตีนไคเนส (protein kinase) ในการควบคุมปริมาณหมู่ฟอสเฟตที่ถูกเติมในโมเลกุลโปรตีน โดยโปรตีนไคเนสทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) แต่โปรตีนฟอสฟาเทส ทำหน้าที่ตัดหมู่ฟอสเฟตออก (dephosphorylation) การเกิดปฏิกิริยาทั้งสองแบบนี้มีบทบาทต่อโครงสร้าง และการทำหน้าที่ของ intermediate filament และ microfilament โดยไมโครซิสติน จะทำลายสมดุลระหว่าง phosphorylation และ dephosphorylation ดังนั้นจากการที่สารพิษชนิดนี้สามารถยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นได้ ถ้าผู้ได้รับสารพิษในปริมาณเล็กน้อยที่ไม่ทำให้ถึงตายหรือเกิดพิษฉับพลัน (non lethal dose) เป็นประจำ ก็จะส่งเสริมให้เกิดมะเร็งได้ เพราะเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับโปรตีนที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ (Yoshizawa และคณะ, 1990)

Nishiwaki และคณะ (1992) ใช้ไมโครซิสติน-แอลอาร์ ในปริมาณที่ไม่ทำให้พิษเฉียบพลัน ร่วมกับสารก่อมะเร็งไดเมทิลไนโตรซามีน (dimethylnitrosamine) พบว่าที่เนื้อตับเกิดจุดที่ให้ผลบวกกับเอนไซม์กลูตาไทโอน เอส-ทรานเฟอร์เรส (glutathione s-transferase) เพิ่มขึ้นเมื่อให้ ไมโครซิสตินเพิ่มขึ้น โดยจุดที่ให้ผลบวกกับเอนไซม์ดังกล่าว เป็นตัวบ่งบอกการเกิดมะเร็งตับชนิดหนึ่ง แต่ถ้าใช้สารพิษเพียงอย่างเดียวให้แก่สัตว์ทดลอง โดยไม่ได้ให้ร่วมกับสารก่อมะเร็ง พบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของจุดที่ให้ผลบวก ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า ไมโครซิสติน-แอลอาร์ ไม่เป็นสารก่อมะเร็งตับ แต่เป็นสารส่งเสริมการเกิดมะเร็งก็จะทำให้มีโอกาสเกิดมะเร็งตับเพิ่มขึ้น สำหรับกลไกของไมโครซิสติน-แอลอาร์ มีกลไกคล้ายกับ okadaic acid ที่สามารถยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์โปรตีนฟอสฟาเทส ชนิด 1 และ 2A ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการแบ่งตัวและขยาย

ขนาดของเซลล์ให้อยู่ในจำนวนที่เหมาะสม ถ้าเอนไซม์นี้ถูกปิดกั้นไม่ให้ทำงาน ทำให้กลไกการทำงานของเซลล์ในร่างกายแปรปรวน มีโอกาสเกิดมะเร็งได้

3.3.6 การขับออกของสารพิษไม่โครซิสตินออกจากร่างกาย

1) การขับออกของสารพิษออกจากร่างกายทั่วไป

กระบวนการกำจัดสารพิษของร่างกายที่สมบูรณ์ประกอบด้วย ปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 1 (Phase I reactions) และปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 (Phase II reactions) โดยปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 1 เป็นการเปลี่ยนโครงสร้างของสารที่ต้องการกำจัดให้อยู่ในรูปที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (reactive intermediates) เพื่อส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 ซึ่งเป็นการเติมหมู่ที่ละลายน้ำเข้าไปเพื่อการขับออกทางปัสสาวะเกิดขึ้นได้โดยง่าย ปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 1 เป็นการเปลี่ยนโครงสร้างของสารที่ต้องการกำจัดให้อยู่ในรูปที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา เพื่อให้การเกิดปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 ซึ่งเป็นการเติมหมู่ที่ละลายน้ำเข้าไปเพื่อการขับออกทางปัสสาวะได้ง่าย

เมื่อร่างกายได้รับสารประเภทหนึ่งปริมาณมากๆ ส่งผลให้เอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดสารชนิดนี้ถูกเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นให้ทำงานในอัตราที่เพิ่มขึ้น สารเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นให้เอนไซม์ทำงานมากขึ้นนี้แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ สารเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นเอนไซม์กลุ่มเดียวหรือชนิดเดียว (mono-functional inducers) และสารเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นเอนไซม์หลายกลุ่มหรือหลายชนิด (multi-functional inducers) การเหนี่ยวนำหรือกระตุ้นเอนไซม์เพียงกลุ่มเดียวหรือชนิดเดียว จะทำให้เกิดความไม่สมดุลในกระบวนการกำจัดสารพิษปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 1 จะทำให้เกิดสาร เมแทบอลิต์ที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา เป็นจำนวนมาก ทำให้ปริมาณเอนไซม์ในปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 มีไม่เพียงพอต่อการกำจัดสารเมแทบอลิต์ดังกล่าว (Liska, 1998) ส่งผลให้เกิดการสะสมของสารเมแทบอลิต์ที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (reactive metabolites) ที่เป็นพิษต่อ DNA, RNA และโปรตีน ซึ่งเป็นสาเหตุของความเป็นพิษต่อเซลล์ ตลอดจนภาวะการก่อกลายพันธุ์ และโรคมะเร็งในที่สุด (Nebert และคณะ, 1991)

โดยทั่วไปการเหนี่ยวนำ/กระตุ้นเอนไซม์ในปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2 (Phase II reactions) โดยเฉพาะเอนไซม์ glutathione S-transferase และ glucuronyl transferase ที่ถูกกระตุ้น

โดย สารกระตุ้นเอนไซม์หลายกลุ่มหรือหลายชนิด (multi-functional inducers) เป็นกลไกสำคัญในการกำจัดสารพิษที่สมบูรณ์

2) การขับออกของสารพิษไมโครซิสตินออกจากร่างกาย

เมื่อนีคปริมาณสารพิษ (sublethal dose) ไมโครซิสติน (35 ไมโครกรัมต่อ กิโลกรัม) เข้าทางเส้นเลือดของหนู ผลที่แสดงออกมาคือ หนูมีพฤติกรรมปกติ และน้ำหนักของตับ ไม่เพิ่มขึ้น ซึ่งที่ตับจะมีการรับสารพิษอย่างรวดเร็วโดยมีการสะสมสูงสุด 521 ± 14 พิโคโมลต่อกรัม (71 ± 7 %ของปริมาณสารพิษที่ได้รับ) ภายใน 30 นาที อัตราการขับออกผ่านทางอุจจาระ คือ 0.9 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อชั่วโมง ในเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง และประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ต่อวันที่ยังคงหลงเหลืออยู่ ภายใน 12 ชั่วโมงแรกจะมีการขับออกทางปัสสาวะ 74 เปอร์เซ็นต์ (Robinson, 1991) ที่ไซโตซอลของตับ สารพิษไมโครซิสตินจะถูกเปลี่ยนแปลง โดยที่เซลล์ตับของหนูจะแสดงเวลา และปริมาณสารที่ใช้ในการทำลายในการรวมตัวของกลูตาไทโอน (glutathione, GSH) กับ ไมโครซิสติน-วายเอ็ม (microcystin-YM) (Runnegar และคณะ, 1987) ในการทดลองกับหนูหลายๆ ตัว ที่ให้สารพิษ 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัมของ GSH 2 ชั่วโมง ก่อนที่จะให้ไมโครซิสติน-แอลอาร์ (Hermansky และคณะ, 1991) ผลที่ได้พบว่าไมโครซิสตินอาจเกิดการรวมตัวกับ GSH ซึ่ง GSH มีบทบาทสำคัญในการรวมกลุ่มต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) นำไปสู่การลดความเป็นพิษซึ่งจะเพิ่มการกำจัดออกของสารพิษ

ไมโครซิสตินจะประกอบด้วยสารประกอบ electrophilic α , β unsaturated carbonyl ใน methydehydro alanine กลุ่มของ thiol เช่น GSH และ cysteine สามารถเติม nucleophilically ที่ α , β - unsaturated carbonyl (Kondo และคณะ, 1992) อย่างไรก็ตาม thiol ที่รวมกลุ่ม (conjugated) กับไมโครซิสติน ตรวจไม่พบในตับของสัตว์ ค่า LD_{50} ของ GSH และ cysteine-conjugated microcystin-LR มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกว้างกว่าสารพิษเดิม แต่ระดับความเป็นพิษของ conjugated ยังคงอยู่ ผลที่ได้พบว่า สารพิษไมโครซิสติน-แอลอาร์ ที่ยังคงอยู่หลังจากเกิดการอิมตัวของ α , β unsaturated carbonyl ใน methyldehydroalanine (Meriluoto และคณะ, 1991) ถ้า GSH เกิดการ conjugation จะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ความเป็นพิษลดลง การ conjugated จะยังคงอยู่ในตับอย่างน้อยที่สุดเป็นเวลา 6 วัน หลังจากได้รับพิษความเป็นพิษจะเพิ่มขึ้น และจะส่งผลให้ตับถูกทำลายในเวลาต่อมา (Robinson และคณะ, 1991)

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 1.1.1 จานเพาะเชื้อพลาสติก (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร (Bibby Sterilin LTD).
- 1.1.2 ตาข่ายกรองแพลงก์ตอน (plankton net) ขนาด 108 ไมครอน
- 1.1.3 แผ่นทดสอบ (BBL blank paper discs) (Becton Dickinson) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
- 1.1.4 กระดาษกรองเบอร์ 3 (Whatman filter paper No.3)
- 1.1.5 เครื่องแก้ว เช่น ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง กรวยกรอง บีกเกอร์ แท่งแก้วคนสาร ฯลฯ
- 1.1.6 เข็มเย็บเชื้อ (loop, needle)
- 1.1.7 เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)
- 1.1.8 เครื่องเขย่า (shaker)
- 1.1.9 ถังเพาะเลี้ยง (Nalgene) ขนาดความจุ 12 ลิตร
- 1.1.10 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge, Sorvall รุ่น SS -3)
- 1.1.11 เครื่องปั่นละเอียดให้เซลล์เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenizer, Polytron PT 205)
- 1.1.12 เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (rotary evaporator, Buchi รุ่น 461)
- 1.1.13 ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven, Memmert รุ่น/600)
- 1.1.14 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave, Tomy Seiko รุ่น SS-245)
- 1.1.15 กล้องจุลทรรศน์ (microscope Olympus รุ่น CH 30)
- 1.1.16 ตู้เย็บเชื้อ
- 1.1.17 แผ่น TLC (silica gel 60F₂₅₄ pre-coat for preparative, Merck)
- 1.1.18 แผ่น TLC อลูมิเนียม (TLC aluminum sheets silica gel 60F₂₅₄, Merck)
- 1.1.19 เครื่องวัดความเข้มแสง (lightmeter, Lutron Digital รุ่น LX 101)
- 1.1.20 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter, HANNA รุ่น HI 98128)

1.1.21 เครื่องทำให้เซลล์แห้งโดยการระเหิด (lyophilizer, Edwards Britain รุ่น 501 หรือ Edwards รุ่น super modulyo)

1.1.22 สารยาสีเขียวแอมโมเนียม 30 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2) จากศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.2.1 สารเคมีสำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแอมโมเนียม เป็น laboratory grade ของ Fluka, Sigma และ Merck และ Agarose type IX ultra-low gelling temperature (Sigma)

1.2.2 สารเคมีสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น น้ำยาแอนโทรน น้ำยาโมลิสต์ น้ำยานินไฮดริน น้ำยาไบยูเรต เอนไซม์โปรตีเอส เอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ไลเปส เป็น laboratory grade ของ Sigma และ Merck

ตารางที่ 2 สหรัยสีเขียวแกมน้ำเงิน 30 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง

TISTR no.	ชื่อวิทยาศาสตร์
8077	<i>Anabaena</i> sp.
8075	<i>Anabaena spiroides</i>
8014	<i>Anabaena tarulosa</i>
8404	<i>Anabaena variabilis</i>
8110	<i>Calothrix</i> sp.
8216	<i>Cylindrospermum</i> sp.
8215	<i>Fischerella muscicola</i>
8220	<i>Fischerella</i> sp.
8221	<i>Fischerella</i> sp.
8239	<i>Fischerella</i> sp.
8224	<i>Hapalosiphon delicatulus</i>
8225	<i>Hapalosiphon fontinalis</i>
8227	<i>Hapalosiphon intricatus</i>
8229	<i>Hapalosiphon</i> sp.
8231	<i>Hapalosiphon</i> sp.
8232	<i>Hapalosiphon</i> sp.
8233	<i>Hapalosiphon</i> sp.
8305	<i>Microcystis aeruginosa</i>
8172	<i>Nostoc microscopicum</i>
8172 (3)	<i>Nostoc microscopicum</i>
8164	<i>Nostoc muscorum</i>
8165 (1)	<i>Nostoc paludosum</i>
8165 (2)	<i>Nostoc paludosum</i>
8165 (3)	<i>Nostoc paludosum</i>
8165 (4)	<i>Nostoc paludosum</i>
8165	<i>Nostoc punctiforme</i>
8179	<i>Nostoc</i> sp.
8169	<i>Nostoc spongiaeforme</i>
8255	<i>Stigonema</i> sp.
8254	<i>Stigonema</i> sp.

2. วิธีการศึกษา

2.1 ขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

2.1.1 ^{ขั้น}เตรียมการ

1) เตรียมทำ algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 บน ultra-low-gelling-temperater agarose 1.6 เปอร์เซนต์ (Watanabe และคณะ, 1998)

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ในอาหารเหลว MA (Ichimura, 1978) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน เติมสารแขวนลอยของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ที่มีค่าความหนาแน่นของเซลล์ เป็น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตรลงไปให้ได้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 เป็น 20 เปอร์เซนต์ของปริมาตรสารแขวนลอยของสาหร่าย ต่อปริมาตรอาหาร ผสมให้เข้ากันกับอาหารวุ้น MA กึ่งแข็ง เตรียมโดยใช้ อากาโรส (ultra-low-gelling-temperature agarose) ความเข้มข้น 1.6 เปอร์เซนต์ แทนวุ้น (agar) ที่นั่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว เทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว แล้วพ่นด้วยพาราฟิล์ม นำไปวางไว้ใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไนด์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสงที่ให้ความสว่างต่อมิด 12:12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

2) เตรียมทำ algal lawn ของ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 29 สายพันธุ์

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (ตารางที่ 2) ในอาหารสูตร BGA (Antarikanonda, 1980) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน เติมสารแขวนลอยของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 29 สายพันธุ์ ยกเว้น *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ที่บดเซลล์ให้ละเอียดผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยที่บดเนื้อเยื่อ (tissue grinder) มีค่าความหนาแน่นของเซลล์ เป็น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร เป็น 20 เปอร์เซนต์ของปริมาตรสารแขวนลอยของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่อปริมาตรอาหาร ผสมให้เข้ากันกับ

อาหารวุ้น (agar) เตรียมโดยใช้ วุ้น ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่นึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว เทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ พ้นด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 60 ไมโครไอส์ไต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน

3) เตรียมทดสอบประสิทธิภาพของสารยาสีเขียวเกมน้ำเงิน 29 สายพันธุ์ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

นำ algal lawn ของ สาหร่ายสีเขียวเกมน้ำเงิน 29 สายพันธุ์ มาเจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำมาวางบน algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยวาง 4 ตำแหน่ง ห่างจากขอบจานเพาะเลี้ยงเชื้อด้านละ 14 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 60 ไมโครไอส์ไต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 10 วัน วัดขนาดโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นบน algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ และบันทึกผล

4) คัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวเกมน้ำเงินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยสังเกตจากขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้นในบริเวณกว้าง เพื่อนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.1.2 การเพาะเลี้ยงและเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายสีเขียวเกมน้ำเงินสายพันธุ์คัดเลือก

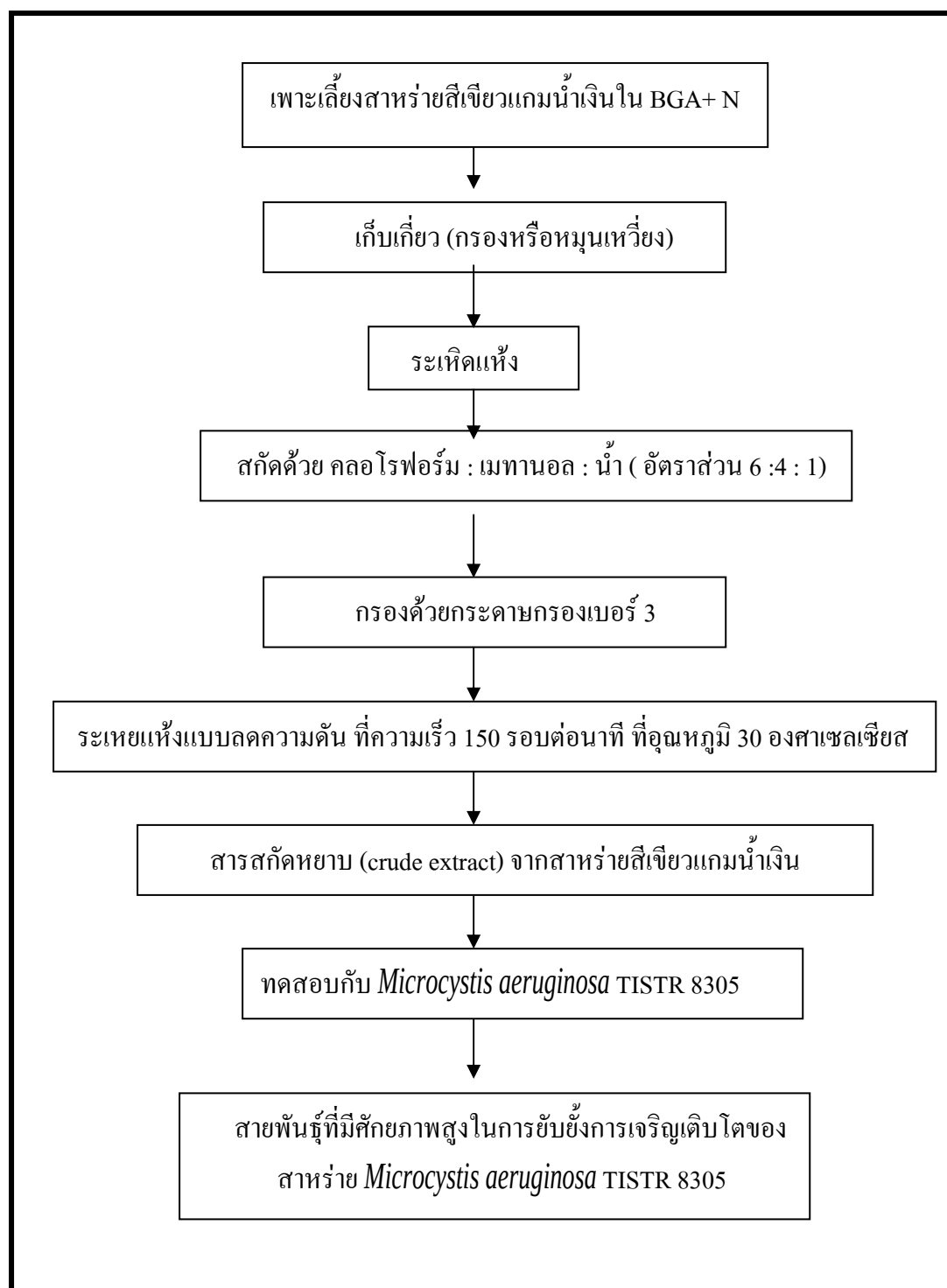
นำสาหร่ายสีเขียวเกมน้ำเงินแต่ละสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจากข้อ 2.1.1 มากระตุ้นการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงในอาหารเหลว BGA+N ที่ฆ่าเชื้อด้วยความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ตั้งบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 60 ไมโครไอส์ไต์ต่อตารางเมตรต่อวินาที

จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 7 วัน 14 วัน และ 21 วัน โดยกรองด้วยตาข่ายกรองแพลงก์ตอน (plankton net) ขนาด 108 ไมครอน ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง นำเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ไปทำให้แห้งแบบการระเหิดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องระเหิดแห้ง จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้มาชั่งด้วยเครื่องชั่งและ

ฉบับที่กผลของน้ำหนักแห้งก่อนนำไปสกัด

2.1.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ คัดเลือก

ทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อทดสอบกับ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยนำเซลล์แห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวได้มาบดให้เซลล์แตกด้วยที่บดเนื้อเยื่อ เติมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 6 : 4 : 1 ลงไปในตัวอย่างเซลล์ นำไปปั่นให้ละเอียดผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ เพื่อให้ได้สารผสมเนื้อเดียวกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 นำส่วนที่ได้จากการกรอง (filtrate) มาระเหยแห้งภายใต้สภาวะลดความดันด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดหยาบ (crude extract) แห้ง นำสารดังกล่าวมาชั่งน้ำหนัก เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการคัดเลือกหาสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

2.1.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสาหร่าย สีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

1) ขั้นตอนเตรียมแผ่นทดสอบ

ทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสาหร่าย
สีเขียวแกมน้ำเงิน ทดสอบโดยวิธี paper disc plate (Chmel และคณะ, 1980)

นำสารสกัดหยาบมาละลายในเมทานอล หยดลงบนแผ่นทดสอบ
BBL disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตรให้ได้ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่น
ตั้งทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหย

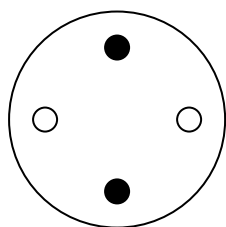
2) ขั้นตอนเตรียม algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 เพื่อ
นำมาทดสอบ (รายละเอียด ดังข้อ 2.1.1 ข้อย่อยที่ 1)

3) ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก
สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน บน algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

ทดสอบโดยการหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สาหร่าย
สีเขียวแกมน้ำเงินผลิตได้ โดยเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์กับสารมาตรฐาน gentamicin
(ภาคผนวก ข)

นำแผ่นทดสอบที่หยดสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน วางบน
ผิวหน้าของ algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ที่เตรียมไว้แล้ว โดยวางแผ่น
ทดสอบในแนวเส้นตรงเดียวกันในทิศทางตรงกันข้าม สำหรับในแนวตั้งฉากกับแผ่นทดสอบที่
หยดสารสกัด นำแผ่นทดสอบที่หยด gentamicin มาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อแผ่น
มาวางในลักษณะเดียวกัน ดังภาพที่ 6 แต่ละจานเพาะเชื้อจะวางแผ่นทดสอบ 4 แผ่นในตำแหน่งที่
สมดุล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงไฟ ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไนด์
ต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 7 วัน นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gentamicin

ดังนั้นความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ผลิตขึ้นจึงคำนวณ โดยเปรียบเทียบ เป็นค่าความเข้มข้นเทียบเท่ากับ gentamicin (gentamicin equivalent)



- แผ่นทดสอบที่หยดสารสกัดหยาบสาหร่าย ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อแผ่น
- แผ่นทดสอบที่หยด gentamicin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อแผ่น

ภาพที่ 6 รูปแบบการทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์คัดเลือก โดยวิธี paper disc plate บน algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

2.2 ขั้นตอนการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (physicochemical) บางประการของ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก

2.2.1 การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากสาหร่าย สายพันธุ์คัดเลือก ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography, TLC)

1) การศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

นำสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที หยดสารสกัดที่เข้มข้นลงบนแผ่นซิลิกาเจล (silica gel 60F₂₅₄) ที่มีความหนา 0.25 มิลลิเมตร กว้าง 2 เซนติเมตร และยาว 7 เซนติเมตร นำไปจุดในภาชนะที่อ้อมด้วยสารละลายผสมซึ่งมี อัตราส่วนผสมดังนี้

คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ	อัตราส่วน 6 ต่อ 4 ต่อ 1
คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ	อัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 1
คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ	อัตราส่วน 10 ต่อ 3 ต่อ 1

นำแผ่นซิลิกาเจลที่สารละลายผสมซึมผ่านขึ้นมาถึงระยะที่กำหนดมาทำให้แห้งและนำไปตรวจสอบหาตำแหน่งของสารต่างๆ ที่แยกออกมา โดยนำไปส่องด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร คำนวณหาค่า R_f ของแต่ละสารที่แยกออกมา จากนั้นนำไปตรวจสอบหาตำแหน่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวิธีออโตไบโอกราฟี (autobiograph) (Poon และคณะ, 1987; Al-Lay และคณะ, 1988) กับ สาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยนำสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ผสมลงในอากาโรส (agarose) ที่เตรียมไว้โดยหนึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว แทนวุ้น เทลงบนแผ่นซิลิกาเจลที่อยู่ในจานเพาะเชื้อจนอาหารท่วมทั้งแผ่น จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาทีแล้วพ่นด้วยพาราฟิล์ม นำไปวางไว้ใต้แสงหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไตนต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสงที่ให้แสงสว่างต่อมิด 12:12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ที่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ออกจากส่วนอื่นๆ ที่ปะปนได้อย่างชัดเจน ทำให้ทราบค่า R_f ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2) การใช้ทินแลเออร์โครมาโทกราฟี ในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* ออกจากสิ่งเจือปนเพื่อให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification)

หยดสารสกัดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ อัตราส่วน 6 ต่อ 4 ต่อ 1 จากสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก ที่ทำให้เข้มข้นลงบนแผ่นซิลิกาเจลที่มีความหนา 2.0 มิลลิเมตร กว้าง 20 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร วิธีการหยดจะหยดต่อกันไปเป็นเส้นตรงตลอดความยาวของแผ่นซิลิกาเจล โดยตำแหน่งที่หยดสารสกัดให้ห่างจากขอบล่าง 1.5 เซนติเมตร นำไปจุ่มในภาชนะอิมมิดด้วยสารละลายที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลอง เมื่อสารละลายผสมซึมผ่านขึ้นมาถึงระยะที่กำหนด นำแผ่นซิลิกาเจลออกจากภาชนะมาผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปส่องด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ตรวจสอบหาตำแหน่งของสารต่างๆ ที่แยกออกมาได้ ใช้ดินสอทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของสารในแต่ละแถบ (band) ขูดซิลิกาเจลบริเวณตำแหน่งสารแต่ละตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายไว้ บดให้ละเอียดและนำไปละลายในเมทานอลในปริมาณมากพอที่จะละลายสารที่แยกได้ออกมา กรองแยกส่วนที่เป็นซิลิกาเจลออกจากสารละลาย นำเอาส่วนใสที่กรองได้ไประเหย

เอาตัวทำละลายเมทานอลออกโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดันจนแห้ง นำมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาละลายในตัวทำละลายเดิมให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักสารต่อ ปริมาตรเมทานอล

นำสารแต่ละชนิดที่แยกได้ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของ สาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ด้วยวิธีในข้อ 2.1.1 ข้อย่อยที่ 3

2.2.2 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารสกัดจากสาหร่ายสายพันธุ์คัดเลือก

1) การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีบางประการของสารสกัดจากสาหร่าย สายพันธุ์คัดเลือกที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยทินแลเยอร์โครมาโทกราฟีมาศึกษาคุณสมบัติทาง เคมีบางประการดังนี้ (ภาคผนวก ก.)

1.1) ปฏิกริยานินไฮดริน (ninhydrin reaction)

ปฏิกริยานินไฮดริน เป็นปฏิกริยาการทดสอบกรดอะมิโน อิสระ และกรดอะมิโนเปปไทด์หรือโปรตีน โดยปีเปตต์สารละลายบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 5.0 ลงใน หลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยานินไฮดริน นำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสี ของสารละลาย ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินถึงม่วงให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก ซึ่งแสดง ว่าสารละลายตัวอย่างประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระ หรือกรดอะมิโนในเปปไทด์หรือโปรตีน

1.2) ปฏิกริยาไบยูเรต (biuret reaction)

ปฏิกริยาไบยูเรต เป็นปฏิกริยาการทดสอบสารที่ ประกอบด้วยพันธะเปปไทด์ตั้งแต่ 2 แห่งขึ้นไป ทดสอบโดยปีเปตต์สารละลายตัวอย่างใส่ในหลอด ทดลองปริมาตร 2 มิลลิเมตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ 1 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี ถ้าสีชมพูเกิดขึ้นให้บันทึกผลเป็นบวก ซึ่งแสดงว่าสารตัวอย่างประกอบด้วยพันธะเปปไทด์

1.3) ปฏิบัติการทดสอบโมลิช (Molisch's test)

การทดสอบโมลิช เป็นวิธีการทดสอบน้ำตาล โดยใช้กรดเข้มข้นดึงน้ำออกจากน้ำตาลเพนโตสและเฮกโซส ในกรณีของเฮกโซส จะกลายเป็นเฟอไฟวรัล และไฮดรอกซีเมทิลเฟอไฟวรัลเฮกโซส ถ้าเป็นอัลโดเฮกโซส จะได้อนุพันธ์เฟอไฟวรัลประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ และถ้าเป็นคีโตเฮกโซส จะได้อนุพันธ์เฟอไฟวรัล 20-25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการทดสอบน้ำตาลทำได้โดยใส่สารละลายตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำยาโมลิชลงไปหลอดละ 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน ค่อยๆ หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงข้างๆหลอดทดลองประมาณ 0.5 มิลลิลิตร สังเกตสีตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย ถ้าปรากฏเป็นสีชมพูถึงม่วงให้บันทึกผลเป็นบวก ซึ่งแสดงว่าสารตัวอย่างประกอบด้วยน้ำตาล

1.4) ปฏิบัติการทดสอบแอนโทรน (Anthrone test)

การทดสอบแอนโทรนเป็นวิธีการทดสอบน้ำตาล โดยใช้กรดกำมะถันดึงน้ำออกจากน้ำตาล กลายเป็นเฟอไฟวรัล หรือ อนุพันธ์ของเฟอไฟวรัล ซึ่งจะรวมกับแอนทรานอล (ในน้ำยาแอนโทรน) ได้สารละลายสีเขียวจนถึงน้ำเงิน ซึ่งการทดสอบน้ำตาลทำได้โดยใส่สารละลายตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำยาแอนโทรนปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี ถ้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอมเขียวให้บันทึกผลเป็นบวก

1.5) การทดสอบความไม่อิ่มตัวของไขมัน (unsaturation test)

โครงสร้างของไขมันแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดอิ่มตัว ไม่มีพันธะคู่อยู่ในโครงสร้าง และชนิดไม่อิ่มตัว มีพันธะคู่สามารถทำปฏิกิริยากับสารฟอกฮาโลเจน โดยจะฟอกสีฮาโลเจน จึงใช้คุณสมบัติในข้อนี้ทดสอบว่าไขมันที่นำมาทดสอบมีพันธะคู่อยู่ในโครงสร้างหรือไม่ ทดสอบโดยบีบตะกอลิฟอรัลลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายตัวอย่าง 2 หยด ลงในหลอดทดลองดังกล่าว จากนั้นค่อยๆ หยดสารละลายโบรมีนลงไปทีละหยดผสมให้เข้ากันโดยเกาะหลอดทดลองดังกล่าวด้วยฝ่ามือ ถ้าสารละลายตัวอย่างมีพันธะคู่อยู่ในโครงสร้าง จะฟอกสีโบรมีนได้ ให้บันทึกผลเป็นบวก

1.6) การทดสอบการยับยั้งโดยเอนไซม์โปรตีเอส (protease inhibition)

ใส่สารละลายตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่เอนไซม์โปรตีเอสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทั้ง 2 หลอด จากนั้นนำไปย่อยใน mineral oil bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนที่เหลืออีกหนึ่งหลอดจะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารที่ได้ทั้ง 2 หลอด หยดบนแผ่นทดสอบนำไปวางบนผิวหน้าของ algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจวัดผลโดยสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้น สารตัวอย่างซึ่งถูกย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสต้องเกิดโซนใส เนื่องจากเอนไซม์ถูกย่อยด้วยความร้อนทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ถูกทำลาย ส่วนหลอดที่ใส่เอนไซม์วางไว้ที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ถ้าไม่เกิดโซนใสให้รายงานผลเป็นบวก ส่วนตัวควบคุมจะใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลการทดสอบต้องเกิดโซนใส

2) การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ บางประการของสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena* sp. TISTR 8077

2.1) การศึกษาความคงตัวของสารสกัดในสภาพความเป็นกรดเป็นเบสต่างๆ

นำสารสกัดหยาบมาปรับความเป็นกรดเป็นเบสให้เท่ากับ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 และ 13 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มัล หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มัล ตามลำดับ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความเป็นกรดเป็นเบสให้เท่ากับ 7 ก่อนนำไปตรวจหาประสิทธิภาพของสารสกัดโดยวิธี paper disc plate และวิเคราะห์ผลในลักษณะเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์ (relative inhibition) กับชุดควบคุม คือ ปริมาณสารออกฤทธิ์จากสารสกัดที่ความเป็นกรดเป็นเบสเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังนี้

2.2) การศึกษาความคงตัวของสารสกัดที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

นำสารสกัดมาปรับค่าความเป็นกรดเป็นเบสให้เท่ากับ 7
 ปิเปตต์สารสกัดใส่หลอดแก้วขนาดเล็กปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปประเหยแห้งในโถระเหย
 แห้งสุญญากาศ ชั่งหาน้ำหนักสารสกัด นำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 50 70 100 และ 120 องศา
 เซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างสารสกัดทุกๆ 15 นาที นำมาทดสอบประสิทธิภาพ
 โดยวิธี paper disc plate และวิเคราะห์ผลในลักษณะเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

1.1 การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* เบื้องต้น

นำตัวอย่างสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 29 สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมไว้ในศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) มาคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยใช้ ultra-low-gelling-temperature agarose 1.6 เปอร์เซ็นต์ ทำ algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* พบว่าเกิดโซนยับยั้ง 16 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 51.72 ของสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ใช้ในการคัดเลือกสาหร่ายทั้ง 16 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077, *Anabaena spiroides* TISTR 8075, *Anabaena variabilis* TISTR 8404, *Fischerella muscicola* TISTR 8215, *Fischerella* sp. TISTR 8239, *Hapalosiphon delicatulus* TISTR 8224, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8229, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8231, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8232, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8233, *Nostoc microscopicum* TISTR 8172, *Nostoc microscopicum* TISTR 8172 (3), *Nostoc muscorum* TISTR 8164, *Nostoc punctiforme* TISTR 8165 และ *Nostoc* sp. TISTR 8179

จากผลการศึกษาเบื้องต้นจึงคัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225, *Anabaena variabilis* TISTR 8404 ซึ่งสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ได้ดีที่สุดโดยมีโซนยับยั้งเป็นบริเวณกว้างเรียงตามลำดับจากมากไปน้อย 22.38, 21.49 และ 20.89 มิลลิเมตร มาใช้ในการทดสอบการสกัดสารในขั้นต่อไป

ตารางที่ 3 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของ
สาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

สายพันธุ์สาหร่าย	โซนยับยั้ง (มิลลิเมตร) $\pm$ SD
<i>Anabaena</i> sp. TISTR 8077	22.38 $\pm$ 0.32
<i>Anabaena spiroides</i> TISTR 8075	14.82 $\pm$ 0.25
<i>Anabaena tarulosa</i> TISTR 8014	-
<i>Anabaena variabilis</i> TISTR 8404	20.89 $\pm$ 0.20
<i>Calothrix</i> sp TISTR 8110	-
<i>Cylindrospermum</i> sp. TISTR 8216	-
<i>Fischerella muscicola</i> TISTR 8215	11.92 $\pm$ 0.15
<i>Fischerella</i> sp TISTR 8220	-
<i>Fischerella</i> sp. TISTR 8221	-
<i>Fischerella</i> sp. TISTR 8239	13.28 $\pm$ 0.18
<i>Hapalosiphon delicatulus</i> TISTR 8224	17.11 $\pm$ 0.14
<i>Hapalosiphon fontinalis</i> TISTR 8225	21.49 $\pm$ 0.29
<i>Hapalosiphon intricatus</i> TISTR 8227	-
<i>Hapalosiphon</i> sp. TISTR 8229	17.25 $\pm$ 0.20
<i>Hapalosiphon</i> sp. TISTR 8231	15.20 $\pm$ 0.25
<i>Hapalosiphon</i> sp. TISTR 8232	10.57 $\pm$ 0.13
<i>Hapalosiphon</i> sp. TISTR 8233	15.78 $\pm$ 0.22
<i>Nostoc microscopicum</i> TISTR 8172	9.45 $\pm$ 0.15
<i>Nostoc microscopicum</i> TISTR 8172(3)	15.84 $\pm$ 0.21
<i>Nostoc muscorum</i> TISTR 8164	17.21 $\pm$ 0.16
<i>Nostoc paludosum</i> TISTR 8165 (1)	-
<i>Nostoc paludosum</i> TISTR 8165 (2)	-
<i>Nostoc paludosum</i> TISTR 8165 (3)	-
<i>Nostoc paludosum</i> TISTR 8165 (4)	-
<i>Nostoc punctiforme</i> TISTR 8165	-
<i>Nostoc</i> sp. TISTR 8179	-
<i>Nostoc spongiaeforme</i> TISTR 8169	14.52 $\pm$ 0.21
<i>Stigonema</i> sp. TISTR 8254	16.88 $\pm$ 0.25
<i>Stigonema</i> sp. TISTR 8255	-

2. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

2.1 สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีผลต่อยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

ทดลองนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สายพันธุ์ คือ *Anabaena* sp. TISTR 8077, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 และ *Anabaena variabilis* TISTR 8404 ที่สกัดสารในวันที่ 7, 14, 21 ของการเพาะเลี้ยง มาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 พบว่าจากการนำแผ่นทดสอบที่หดยาสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ทั้ง 3 สายพันธุ์ วางบนผิวหน้าของ algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ที่เตรียมไว้แล้วได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4

สาหร่ายสายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077 สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ 7 วัน เกิดโซนยับยั้ง 16.84 มิลลิเมตร ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ (คิดเทียบเป็นความเข้มข้นของ gentamicin) คือ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.26 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย ที่ 14 วัน เกิดโซนยับยั้ง 19.60 มิลลิเมตร ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ 0.07 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.35 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย และ 21 วัน เกิดโซนยับยั้ง 13.25 มิลลิเมตร ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.18 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สาหร่ายสายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่สกัดสารในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุด เนื่องมาจากช่วงเวลาดังกล่าว สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุด พร้อมทั้งจะผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพปล่อยออกมาจากเซลล์ จึงทำให้สารที่สกัดได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ได้ดีที่สุด แต่ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงสารสกัดที่ได้มีประสิทธิภาพน้อยกว่าเนื่องมาจากว่า อยู่ในช่วงระยะกำลังเจริญเติบโต (exponential phase) ความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยังไม่เต็มที่ และในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยงอยู่ในช่วงปลายการเจริญเติบโตจึงทำให้ประสิทธิภาพของสารสกัดลดลง ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวจะสอดคล้องกับการศึกษาความสามารถในการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย

สาหร่ายสายพันธุ์ *Calothrix* sp. TISTR 8906 พบว่าสาหร่ายสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูงสุดในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นช่วงที่สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุดเช่นกัน (พัชร, 2540)

สาหร่ายสายพันธุ์ *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ 7 วัน เกิดโซนยับยั้ง 14.87 มิลลิเมตร ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ คือ 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.25 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย ที่ 14 วัน เกิดโซนยับยั้ง 15.55 มิลลิเมตร ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.30 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย ที่ 21 วัน เกิดโซนยับยั้ง 16.10 มิลลิเมตร ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ คือ 0.07 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.32 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย

จากผลการทดลองสาหร่ายสายพันธุ์ *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225 ที่สกัดสารในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยงสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นช่วงที่สาหร่ายเริ่มเข้าสู่ภาวะการเจริญเติบโตคงที่ ดังนั้นจึงพบว่าสารสกัดที่ 21 วันของการเพาะเลี้ยงสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ได้ดีที่สุด ซึ่งสารสกัดในช่วงระยะเวลา 7 วัน และ 14 วันของการเพาะเลี้ยง ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้มีผลในการยับยั้งน้อยกว่า ที่ ระยะเวลา 21 วัน

สาหร่ายสายพันธุ์ *Anabaena variabilis* TISTR 8404 สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ 7 วัน เกิดโซนยับยั้ง 14.24 มิลลิเมตร ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ คือ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.25 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย สารสกัดที่ 14 วันเกิดโซนยับยั้ง 14.80 มิลลิเมตร ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.26 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย สารสกัดที่ 21 วันเกิดโซนยับยั้ง 15.20 มิลลิเมตร ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ คือ 0.07 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.27 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย

จากผลการทดลองสาหร่ายสายพันธุ์ *Anabaena variabilis* TISTR 8404 จะเห็นได้ว่าสาหร่ายมีการผลิตสารออกฤทธิ์ได้มากที่สุดในช่วงวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนในวันที่ 7 และ 14 ของการเพาะเลี้ยง ประสิทธิภาพของสารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญเติบโตของสาหร่าย

Microcystis aeruginosa TISTR 8305 ได้น้อยกว่าสารที่สกัดในวันที่ 21 ซึ่ง สาหร่ายอยู่ในช่วง ปลายการเจริญเติบโต

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะพบว่า สาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ มีช่วงระยะเวลาในการ เจริญเติบโตไม่สัมพันธ์กับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหมือนกันทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยที่สาย พันธุ์ *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225, สายพันธุ์ *Anabaena variabilis* TISTR 8404 มีช่วง ระยะเวลาการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นไปในแนวทางเดียวกัน ซึ่งจะ สอดคล้องกับผลการทดลองเพาะเลี้ยง *Nostoc* sp. ATCC 53789 เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ cryptophytin พบว่า การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต (Schwartz และคณะ, 1990) คือ ตรวจพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุดในช่วงปลายการเจริญเติบโตของสาหร่าย ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง แต่สำหรับสายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077 พบว่าผลิตสารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพได้มากที่สุดในช่วงที่สาหร่ายมีการเจริญเติบโตสูงสุด คือในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งม ีความแตกต่างกับสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์ดังกล่าว

โดยที่สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่สกัดที่อายุการ เพาะเลี้ยง 14 วันสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงได้คัดเลือกสาหร่ายสายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077 มาทำการศึกษาต่อเกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ สายพันธุ์นี้ต่อไป

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

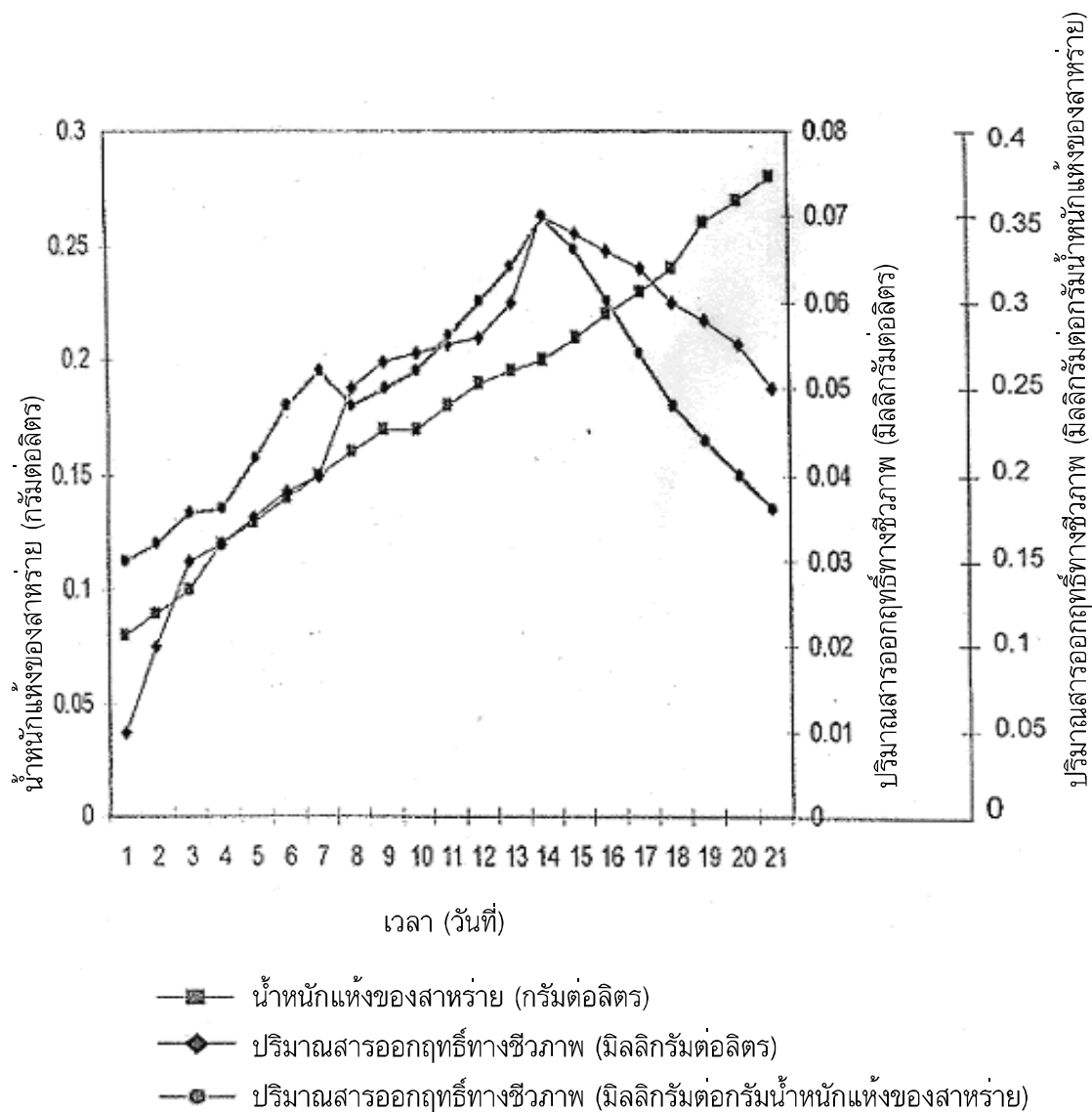
สารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	วันที่เพาะเลี้ยง	โชนยับยั้ง $\pm$ ค่า SD*	ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ**	
			(มิลลิกรัมต่อลิตร)	(มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)
<i>Anabaena</i> sp. TISTR 8077	7	16.84 $\pm$ 0.07	0.04	0.26
	14	19.60 $\pm$ 0.07	0.07	0.35
	21	13.25 $\pm$ 0.07	0.05	0.18
<i>Anabaena variabilis</i> TISTR 8404	7	14.24 $\pm$ 0.31	0.03	0.25
	14	14.80 $\pm$ 0.31	0.06	0.26
	21	15.20 $\pm$ 0.31	0.07	0.27
<i>Hapalosiphon fontinalis</i> TISTR 8225	7	14.87 $\pm$ 0.22	0.03	0.25
	14	15.55 $\pm$ 0.22	0.06	0.30
	21	16.10 $\pm$ 0.22	0.07	0.32

หมายเหตุ * ค่า SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ** ความเข้มข้นเทียบเท่า gentamicin (gentamicin equivalent)

2.2 การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายสายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077

เลี้ยงสาหร่ายในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร BGA + N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตั้งบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เก็บเกี่ยวสาหร่ายปริมาณเท่ากันทุกวัน เวลาเดียวกันตรวจวัดการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena* sp. TISTR 8077 โดยพบว่า การเจริญเติบโตของ *Anabaena* sp. TISTR 8077 เป็นไปอย่างช้าๆ และจากการศึกษาการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Anabaena* sp. TISTR 8077 โดยนำเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ในแต่ละวันมาสกัดสารและทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยวิธี paper disc plate และสามารถตรวจพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่เจริญเติบโตในสูตรอาหาร BGA+N ได้ตั้งแต่วันที่เริ่มปลูกเชื้อลงในอาหาร

ในช่วงเวลาระหว่างที่ *Anabaena* sp. TISTR 8077 มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ (exponential phase) การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Anabaena* sp. TISTR 8077 ก็เพิ่มขึ้นด้วยอย่างช้าๆ จนเมื่อเข้าสู่ปลายการเจริญเติบโตประมาณวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูงสุด โดยช่วงนี้ *Anabaena* sp. TISTR 8077 มีการเจริญเติบโตคิดเป็นน้ำหนักแห้งได้ 0.20 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ (คิดเทียบเป็นความเข้มข้นของ gentamicin) คือ 0.07 มิลลิกรัมต่อลิตรของอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยง หรือ 0.35 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย (ภาพที่ 7) และหลังจากวันที่ 14 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ *Anabaena* sp. TISTR 8077 จะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase)



ภาพที่ 7 ช่วงเวลาการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย

Anabaena sp. TISTR 8077

(เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหาร BGA+N

ฆ่าเชื้อด้วยความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วย

ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง

60 ไมโครไฮสโตนต่อตารางเมตรต่อวินาที)

3. การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยใช้วิธีทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography, TLC)

3.1 การศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี

จากการแยกสารสกัดออกจากสิ่งเจือปนโดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (preparative silicagel TLC) ในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ ของ คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ อัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 1 โดยจะใช้ระบบตัวทำละลาย สามารถตรวจพบแถบเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตจำนวน 2 แถบ คือ $R_f = 0.53$, $R_f = 0.62$

จากการตรวจหาตำแหน่งของสารโดยวิธีฮิสโตไคโอกราฟี โดยใช้สารละลายผสมของ คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำอัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 1 ซึ่งเป็นระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสิ่งเจือปนและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบตำแหน่งของสารที่มีผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 83052 ตำแหน่ง ที่ค่า $R_f = 0.53$, $R_f = 0.62$ โดยที่ค่า $R_f = 0.62$ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ดีกว่าที่ค่า $R_f = 0.53$

3.2 การใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี ในการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* ที่ผลิตโดย *Anabaena* sp. TISTR 8077 ออกจากสิ่งเจือปนเพื่อทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

เมื่อนำสารที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี และระบบตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำอัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 1) ในแต่ละแถบ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ มาทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยวิธี paper disc plate พบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเมื่อเปรียบเทียบกับ standard gentamicin พบว่าที่ค่า $R_f = 0.62$ เกิดโซนยับยั้ง 15.20 มิลลิเมตร มีปริมาณสาร 5.18 ไมโครกรัมต่อแผ่น (ดังภาพที่ 8) ส่วนที่ค่า $R_f = 0.53$ เกิดโซนยับยั้ง 13.25 มิลลิเมตร มีปริมาณสาร 3.42 ไมโครกรัมต่อแผ่น (ดังภาพที่ 9) ทั้งนี้เนื่องจากที่ค่า $R_f = 0.62$

องค์ประกอบหลักของสารเป็นโครงสร้างหลักของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่วนที่ค่า $R_f = 0.53$ เป็นอนุพันธ์ของโครงสร้างหลักของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงพบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยกว่า



- แผ่นทดสอบ (บน-ล่าง) ที่หยดสารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ค่า $R_f = 0.62$
- แผ่นทดสอบ (ซ้าย-ขวา) ที่หยด gentamicin

ภาพที่ 8 ผลของสารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ที่ค่า $R_f = 0.62$



- แผ่นทดสอบ (บน-ล่าง) ที่หยดสารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ค่า $R_f = 0.53$
- แผ่นทดสอบ (ซ้าย-ขวา) ที่หยด gentamicin

ภาพที่ 9 ผลของสารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ที่ค่า $R_f = 0.53$

จากผลการทดลองเห็นได้ว่า สารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่ค่อนข้างไปทางไม่มีขี้ ดังนั้นการใช้
คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ ในขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ออกมาจากสาหร่ายสีเขียว
แกมน้ำเงิน จะทำให้การสกัดสารออกฤทธิ์จาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 มีประสิทธิภาพ
มากยิ่งขึ้น

4. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077

4.1 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีบางประการของสารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077

4.1.1 การทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพภายหลังการแยก
ออกจากสิ่งเจือปน ด้วยวิธีทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี

จากการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี
ทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี มาทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี ได้แก่ ปฏิกิริยานินไฮดริน, ปฏิกิริยาไบ
ยูเรต, การทดสอบโมลิสซ์, การทดสอบแอนโทรอน, การทดสอบความไม่อิ่มตัวของไขมัน, การ
ทดสอบการยับยั้งด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 พบว่าสารออกฤทธิ์ทาง
ชีวภาพที่ผลิตโดย *Anabaena* sp. TISTR 8077 ให้ผลการทดสอบเป็นลบกับ ปฏิกิริยานินไฮดรินซึ่ง
ไม่พบกรดอะมิโนอิสระและกรดอะมิโนเปปไทด์หรือโปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าสารออก
ฤทธิ์ทางชีวภาพไม่มีส่วนประกอบของโปรตีน จึงทำการทดสอบปฏิกิริยาไบยูเรต ผลการทดสอบ
ให้ผลเป็นลบเช่นกัน ส่วนการทดสอบโมลิสซ์ และ การทดสอบแอนโทรอน เป็นการทดสอบน้ำตาล
ต่างๆไป ให้ผลเป็นลบ ในการทดสอบความไม่อิ่มตัวของไขมัน เพื่อหากรดไขมันชนิดอิ่มตัว และ
ชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ก็ให้ผลเป็นลบเช่นกัน

ส่วนการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส เพื่อเป็นการยืนยันผลการ
ทดลองปฏิกิริยานินไฮดริน ผลการทดลองให้ผลเป็นลบ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ถูกทำลาย
โดยเอนไซม์โปรตีเอส แสดงว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077
ไม่มีโครงสร้างที่เป็นเปปไทด์สั้นๆ จึงไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรตีเอส

จากการทดสอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้ผลเป็นลบทั้งหมด
อาจ เนื่องจากส่วนใหญ่แล้ว สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำพวก

cyclic peptide ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ การทดสอบทางเคมีต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น ไม่สามารถตัดพันธะได้ จึงไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาบวก

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผลิตโดย *Anabaena* sp.

TISTR 8077

วิธีการทดสอบ	ผลการทดสอบ
ปฏิกิริยานินไฮดริน	ผลลบ
ปฏิกิริยาไบยูเรต	ผลลบ
การทดสอบโมลิสซ์	ผลลบ
การทดสอบแอนโทรน	ผลลบ
การทดสอบความไม่อึดตัวของไขมัน	ผลลบ
การทดสอบการยับยั้งด้วยเอนไซม์โปรตีเอส	ผลลบ

4.1.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์ (physicochemical) บางประการของสารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077

1) ความคงตัวของสารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ระดับความเป็นกรด-เบสต่างๆ

เมื่อนำสารสกัดหยาบมาละลายในเมทานอลแล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรด-เบสจากพบว่าความเป็นกรด-เบสของสารสกัดมีค่าประมาณ 7 และเมื่อปรับค่าความเป็นกรด-เบสของสารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 ให้เท่ากับ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 และ 13 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มัล หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มัล นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งกับสาหร่ายสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยวิธี paper disc plate (ภาพที่ 10)

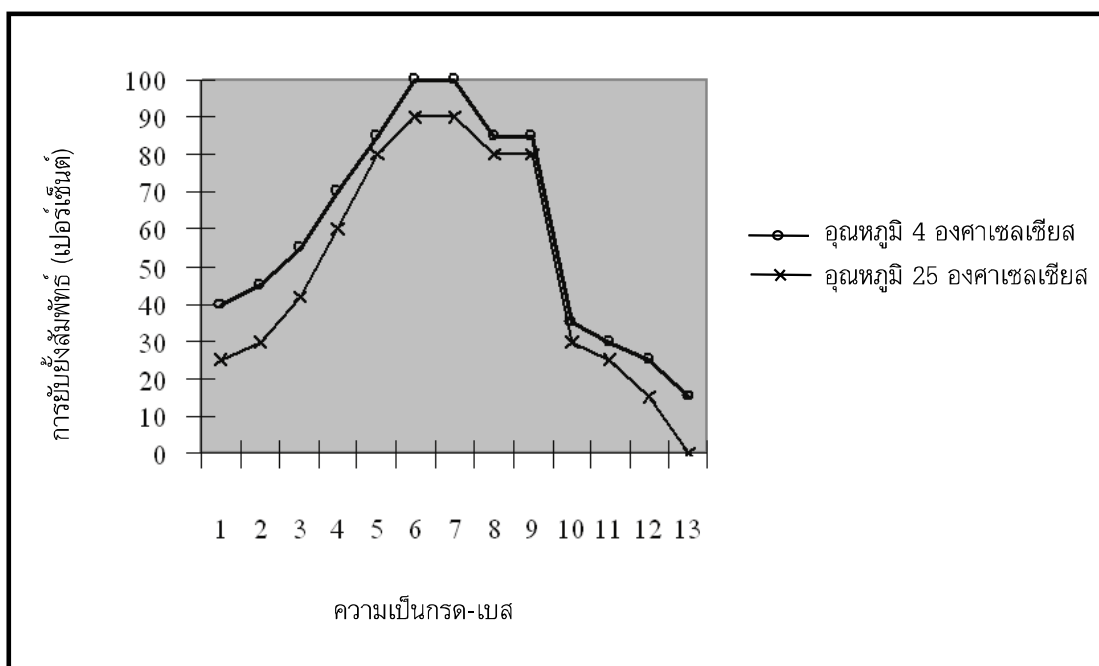
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในช่วงค่าความเป็นกรด-เบส 5 และในช่วง 8 ถึง 9 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์คงเหลือ 85 เปอร์เซ็นต์ และที่ค่าความเป็นกรด-เบส 6 ถึง 7 เปอร์เซ็นต์ การยับยั้งสัมพัทธ์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเป็นกรดตั้งแต่ค่าความเป็นกรด-เบส 5 และเพิ่มความเป็นเบสตั้งแต่ ค่าความเป็นกรด-เบส 9 ความสามารถในการยับยั้งสัมพัทธ์จะลดลงทั้งคู่ โดยที่ค่าความเป็นกรด-เบส 13 ความคงตัวของสารสกัดลดลงและมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์คงเหลือเพียงแค่ 15 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าในช่วงค่าความเป็นกรด-เบส 5 และในช่วง 8 ถึง 9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์คงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ และที่ค่าความเป็นกรด-เบส 6 ถึง 7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์คงเหลือ 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเป็นกรดตั้งแต่ค่าความเป็นกรด-เบส 5 และเพิ่มความเป็นเบสตั้งแต่ ค่าความเป็นกรด-เบส 9 ความสามารถในการยับยั้งสัมพัทธ์จะลดลงทั้งคู่ โดยที่ความเป็นเบสมากๆ คือที่ค่าความเป็นกรด-เบส 13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์เท่ากับ 0 จะเห็นได้ว่าสารที่ผลิตได้ไม่คงตัวอย่างมากในสภาพความเป็นกรด-เบสสูงๆ และพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส 6 และ 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารสกัดจะมีความคงตัวโดยมีความสามารถในการยับยั้งสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 สามารถคงตัวอยู่ได้ในช่วงความเป็นกรด-เบส ที่แคบ 2 ช่วง คือ 6-7 และช่วง 8-9 โดยที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความสามารถในการยับยั้งสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสความสามารถในการยับยั้งสัมพัทธ์ลดลงทั้ง 2 ช่วง คือเหลือ 90 เปอร์เซ็นต์ และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและการที่สารสกัดมีความคงตัวในช่วงความเป็นกรด-เบส ที่แคบและไม่สม่ำเสมอ ทั้งนี้เนื่องจาก สารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่สกัดได้อาจมีสารออกฤทธิ์อยู่หลายตัว (ผลจากการแยกสารให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีการทำ TLC แล้วนำมาส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต พบแถบเรืองแสง 2 แถบแสดงให้เห็นว่ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างน้อย 2 ตัว) และการแสดงออกของการยับยั้งกับสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 เป็นผลรวมของสารออกฤทธิ์ทั้งหมดที่มี

ดังนั้นการที่สารออกฤทธิ์ตัวใดตัวหนึ่ง มีความคงตัวในช่วงความเป็นกรด-เบส 6-9 ส่วนอีกตัวไม่มีความเสถียรหรือเสถียรลดลงที่ความเป็นกรด-เบส 8-9 ทำให้ผลรวมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแสดงให้เห็นดังกล่าว และค่าความเป็นกรด-เบส ตั้งแต่ 9 ขึ้นไป ผลของสาร

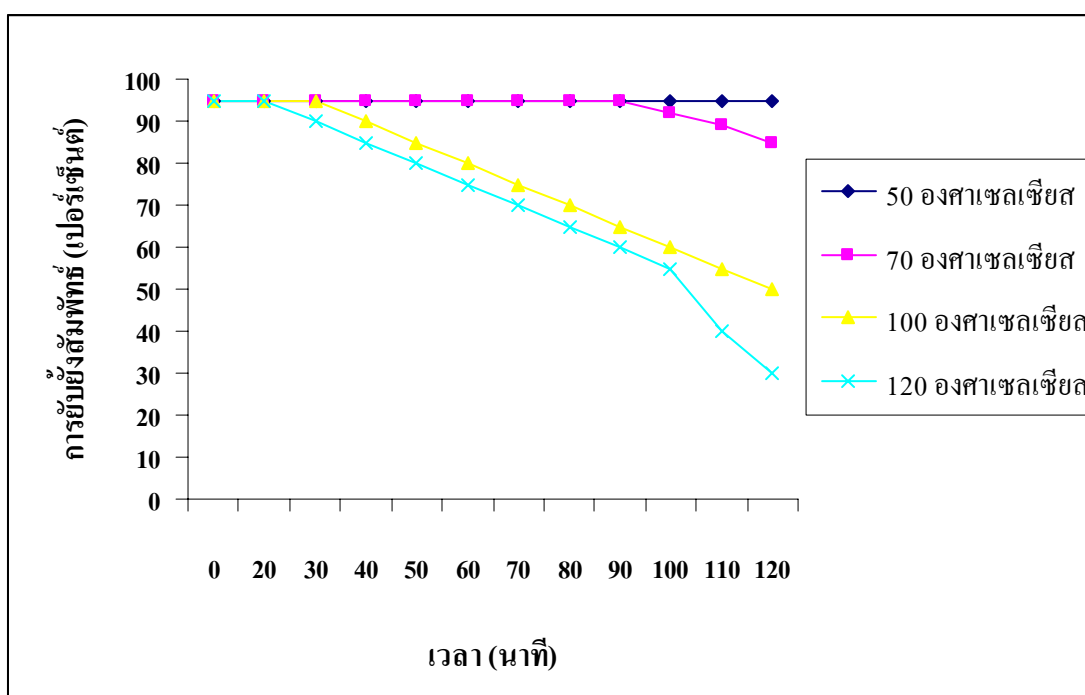
ออกฤทธิ์ทั้ง 2 ตัวสลายตัวหรือถูกทำลาย ทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์ลดลง จนกระทั่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์ลดลง เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 13 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีความคงตัวต่อความเป็นกรด-เบส ที่อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูงอีกด้วย



ภาพที่ 10 ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ระดับความเป็นกรด-เบส ต่างๆ

2) ความคงตัวของสารสกัดที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

จากการศึกษาความคงตัวของสารสกัดหยาบจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่อุณหภูมิ 50 70 100 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปรับสภาพให้เป็นกลาง ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 11 พบว่าสารสกัดมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สารสกัดมีความคงตัวเป็นเวลานานกว่า 120 นาที โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมผัสเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส สารสกัดมีความคงตัวเป็นเวลานาน 90 นาที โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมผัสเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นความคงตัวของสารสกัดจะค่อยๆ ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยความคงตัวจะลดลงเหลือ 85 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 120 นาที ส่วนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีความคงตัวเป็นเวลานานประมาณ 30 นาที จากนั้นความคงตัวจะลดลงเรื่อยๆจนเวลาผ่านไป 120 นาที ความคงตัวลดลงเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส สามารถคงตัวอยู่ได้ที่อุณหภูมินี้ 20 นาที และความคงตัวลดลงเหลือเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที



ภาพที่ 11 ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

จากภาพที่ 11 แสดงให้เห็นว่า ความคงตัวของสารสกัดที่อุณหภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียส เส้นกราฟมีความคงตัวในรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน โดยในช่วงแรกประมาณ 30 นาที ความคงตัวของสารสกัดจะลดลงอย่างรวดเร็ว ที่เป็นเช่นนี้ น่าจะยืนยันได้ว่า สารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ผลิตขึ้นมีสารออกฤทธิ์อยู่หลายตัว และการแสดงออกของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 เป็นผลรวมของสารออกฤทธิ์ทั้งหมดที่มี ดังนั้นการที่ช่วงแรกของสารสกัดมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์ลดลงอย่างรวดเร็ว เพราะสารออกฤทธิ์ตัวแรก หรือกลุ่มแรก ไม่สามารถคงตัวอยู่ได้นานที่ อุณหภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียส โดยผลรวมของสารออกฤทธิ์จะค่อยๆสลายตัวไปจนหมด เมื่อเวลาผ่านไปนานประมาณ 70 นาที ทำให้การแสดงออกของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งลดลงอย่างรวดเร็ว

ที่อุณหภูมิ 50 และ 70 องศาเซลเซียส สารสกัดมีความคงตัวเป็นเวลานานกว่า 80 นาที ที่เป็นเช่นนี้ เพราะยังมีการแสดงออกของฤทธิ์ยับยั้งของสารออกฤทธิ์ตัวอื่นที่สามารถคงตัวอยู่ได้นานหลายนาที โดยสังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสัมพัทธ์อยู่ที่ระดับถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากทดลองของ Kiviranta และ Abdel-Hameed (1994) ได้ศึกษาความคงตัวของสารสกัดจาก *Oscillatoria agardhii* 27 พบว่าสารสกัดมีความคงตัวอยู่ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลานานกว่า 15 นาที และที่อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส ความคงตัวก็จะลดลง แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายเริ่มไม่มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงเกินกว่า 80 องศาเซลเซียส เป็นเหตุผลสนับสนุนในผลการทดลองครั้งนี้

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

1 สรุปผลการศึกษา

การนำตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 29 สายพันธุ์ จากศูนย์จุลินทรีย์ (ศจล.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) คัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 พบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 16 สายพันธุ์ ได้แก่ *Anabaena spiroides* TISTR 8075, *Anabaena* sp. TISTR 8077, *Anabaena variabilis* TISTR 8404, *Fischerella* sp. TISTR 8239, *Fischerella muscicola* TISTR 8215, *Hapalosiphon delicatulus* TISTR 8224, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8229, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8231, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8232, *Hapalosiphon* sp. TISTR 8233, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225, *Nostoc punctiforme* TISTR 8165, *Nostoc microscopicum* TISTR 8172, *Nostoc microscopicum* TISTR 8172(3), *Nostoc muscorum* TISTR 8164 และ *Nostoc* sp. TISTR 8179

สาหร่าย 16 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 พบว่ามี 3 สายพันธุ์ซึ่งสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ได้ดีที่สุดเรียงตามลำดับ คือ *Anabaena* sp. TISTR 8077, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225, *Anabaena variabilis* TISTR 8404

จากการศึกษาผลของสารสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สายพันธุ์ คือ *Anabaena* sp. TISTR 8077, *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225, *Anabaena variabilis* TISTR 8404 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยวิธี paper disc plate พบว่า สาหร่ายสายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077 สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุด คือ 0.07 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.35 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย

การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายสายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077 โดยเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าการเจริญของสาหร่ายเริ่มเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 14 และพบการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ปริมาณมากที่สุด โดยเมื่อเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับ gentamicin มีปริมาณ 0.07 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 0.35 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสาหร่าย

การศึกษาความคงตัวของสารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Anabaena* sp. TISTR 8077 มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 25 และ 50 องศาเซลเซียส สารสกัดมีความคงตัวเป็นเวลานานกว่า 120 นาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส สารสกัดมีความคงตัวเป็นเวลานาน 90 นาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีความคงตัวเป็นเวลานานประมาณ 30 นาที และมีความคงตัวที่ระดับความเป็นกรด-เบส 6 ถึง 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อนำสารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 มาแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี เพื่อทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ คลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำ อัตราส่วน 7 ต่อ 3 ต่อ 1 และตำแหน่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวอยู่ที่ $R_f = 0.53$ และ $R_f = 0.62$ เมื่อนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกออกจากสิ่งเจือปน แล้วไปทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี ให้ผลลบกับปฏิกิริยานินไฮดริน, ปฏิกิริยาไบยูเรต, การทดสอบโมลิสซ์, การทดสอบแอนโทรน, การทดสอบความไม่อิ่มตัวของไขมัน ส่วนการทดสอบการยับยั้งด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ให้ผลลบเช่นกัน

2 ข้อเสนอแนะ

2.1 การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น ยังไม่ทราบถึง ปริมาณ ชนิด และสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ที่แท้จริง จึงควรจะมีการศึกษาต่อในด้านการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้อยู่ในสภาพที่บริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อนำไปศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับ โครงสร้างทางเคมีของสารและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต่อไป การทดสอบความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ และ การปรับปรุงวิธีการในการผลิตและปรับปรุงสายพันธุ์สาหร่ายที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.2 เนื่องจากในการทดลองนี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ สภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองจึงแตกต่างไปจากสภาพธรรมชาติจริง ดังนั้นจึงควรมีการนำสารสกัดจาก *Anabaena* sp.TISTR 8077 ไปทดสอบกับสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ที่มีอยู่ในแหล่งน้ำ รวมทั้งพัฒนารูปแบบของสารสกัดที่เหมาะสมในการนำไปใช้ด้วย เพื่อจะได้ทราบว่าสารสกัดจาก *Anabaena* sp. TISTR 8077 สามารถใช้ได้ผลจริงในสภาพธรรมชาติ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กาญจนาภรณ์ ลีวมโนมนต์. 2527. สาหร่าย (algae). คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 343 น.
- ดวงพร กันธโชติ. 2530. จุลชีวอุตสาหกรรมการผลิตจากจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 104 – 139 น.
- พัชรี ผดุงวงศ์. 2540. การใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 86 น.
- มาลิน จุลศิริ. 2532. ยาด้านจุลชีพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยมหิดล. 203 น.
- ยุวดี พิรพรพิศาล. 2538. สาหร่าย. ภาควิชาวิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 245 น.
- _____. 2539. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 389 น.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. แพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 389 น.
- สรวิศ เผ่าทองสุข. 2543. ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่าย. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 123 น.
- อาภารัตน์ มหาขันธ์. 2539. สารพิษจากสาหร่ายในแหล่งน้ำ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 11 (1) : 39-53.

อาภารัตน์ มหาจันทร์, ประไพภัทร คลังทรัพย์, พรรณรัตน์ รัตนโชติ, วัลลภา อรุณไพโรจน์,
โทโมฮารุ ซาโน, มาโกโตะ เอ็ม วาดานาเบ, คูนิมิทซึ คายา และ พูนสุข อัดทะสัมปณณะ.
2542. ความเป็นพิษของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษในประเทศไทย. **วารสารวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยี** 14 (1) : 7-22.

อาภารัตน์ มหาจันทร์, พุทธลักษณ์ ไชยประภา, สมศรี ทวีถาวร, ลัดดา แก้ววรา และ วัลลภา
อรุณไพโรจน์. 2547. ประสิทธิภาพของถ่านกัมมันต์ในการดูดซับไมโครซิสติน-แอลอาร์
จากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว *Microcystis aeruginosa* ในระดับห้องปฏิบัติการ.
โครงการวิจัยที่ ภ. 43/รายงานฉบับที่ 13, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่ง
ประเทศไทย. 27 น.

Antarikanonda, P. Berndt. H, Mayer F.1980. Hydrogen a new inhibitor of photosynthesis in the
blue-green alga (cyanobacterium) *Anabaena* sp. TA.1. **J. Arch. Microbiol.**
145 : 1-10.

Al-Lay, J.K., Poon and G.A. Codd. 1988. Isolation and purification of peptide and alkaloid toxin
from *Anabaena flos-aquae* using high performance thin-layer chromatography.
J. Microbiol. Methods. 7 : 251-258

Bachi, S.N., Chauhan, V.S. and Marwah, J.B. 1993. Effect of an antibiotic from *Oscillatoria
laete-virens* on growth, photosynthesis, and toxicity of *Microcystis aeruginosa*.
Cur. Microbiol. 26 : 223-228.

Barchi, J.J.JR., T.R. Norton, E. Furusawa, G.M.L. Patterson, R.E. Moore. 1983. Identification of
cytotoxin from *Tolypothrix byssoidea* as tubercidin. **Phytochem.** 22 : 2851-2862.

Batterton, J.C. Jr. and Van baalen, C. 1971. Growth responses of blue-green algae to sodium
chloride concentration. **Arch. Microbiol.** 76 : 151-165.

- Becker, E. W. 1994. **Microalgae : Biotechnology and Microbiology**. Cambridge University Press, Great Britain. 293.
- Bishop, C.T., E.F.L.J. Anet and P.R. Gorham. 1959. Isolation and identification of the fast death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. **Can. J. Biochem. Physiol.** 37 : 453-464.
- Bold, H.C. and M.J. Wynne. 1978. **Introduction to the Algae**. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 706.
- Borowitzka, M.A. 1995. Microalgae as source of pharmaceuticals and other biologically active compound. **J. Appl. Phycol.** 7 : 3-15.
- Borris, V.G. A.A. Vepritskiy, N.N. Titova, Kira A. Mamkayeva and Olga V. 1991. Production of the antibiotic cyanobacterin LU-1 by *Nostoc linckia* CALU 892 (cyanobacterium). **J. Appl. Phycol.** 3 : 55-59.
- Bourke. A.T.C., B.R. Hawes, A. Neilson and N. D. Stallman. 1983. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly cause by algal intoxication. **Toxicon.** 3 Supplement : 45-48.
- Bloor, S. and R.R England. 1989. Antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. **J. Appl. Phycol.** 1 : 367-372.
- Canto de Loura, I., Dubaco, J.P. and Thomas, J.C. 1987. The effect of nitrogen deficiency on pigments and lipids of cyanobacteria. **Plant. Physiol.** 83 : 838-843.
- Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolism—the cytotoxin. **J. Appl. Bacteriol.** 72 : 445-459.

- Carr, N.G. and B.A. Whitton (Eds). 1973. The biology of the smaller marine algae. **J. Mar. Biol. Assoc. U.K.**, 3 : 175-191.
- Chmel, H. and Louria, D.B. 1980. Antifungal antibiotic : mechanism of action, resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids. in Lorian, V. **Antibiotic in Laboratory Medicine**. New York : Academic Press. 429.
- Chorus, I. and Bartram, J. 1999. **Toxic Cyanobacteria in Water : A guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. Included in the plan of work of the rolling revision of the WHO guidelines for drinking-water quality. Great Britain : St Edmundsbury Press. 726.
- Codd, G.A. and Poon, G.K. 1988. Cyanobacterial toxin,. In Rojers, L.J. and J.G. Gallon. **Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria**. Carender Press, Oxford. 85-96.
- Cohen, P. and P.T.W. Cohen. 1989. Protein phosphatases come of age. **J. Biol. Chem.** 264 : 21435-21438.
- Coleman, J.R. and Coleman, B. 1981. **The Effect of pH on Photosynthesis and Inorganic Carbon Accumulation in Blue-Green Alga in Photosynthesis IV**. in akoyunoglou, g. regulation of carbon metabolism. Philadelphia :Balabam International Science Services. 298.
- Cook, J. R. 1965. Influence of light on acetate utilization in green Euglena. **Plant. Cell. Physiol.** 71 : 177-184.
- Cresswell, R.C., T.V.A. Rees and N. Shah. 1989. **Algal and Cyanobacterial Biotechnology**. Bath Press, Great Britain. 269.
- Crowe, A and Crown, A. 1969. **Mathematic for Biologist**. New York : Academic Press. 254.

- Dawson, R.M. 1998. The toxicology of microcystins. **Toxicon**. 36 : 653-662.
- Delong, S. 1979. Drinking water and liver cell cancer. An epidemiological approach to the etiology of this disease in China. **Chin. Med. J.** 92 : 748-756.
- Desikachary, T.V. 1959. **Cyanophyta**. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research. 236.
- Eriksson, J.E., Brautigan, D.L., Vallee, R., Olmsted, J., Fujiki, H., and Goldman, R.D., 1992. Cytoskeletal integrity in interphase cells requires protein phosphatase activity, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 89 : 11093-11115.
- Falconer, I.R., M.T.C. Runnegar, T. Buckley, V.L. Huyn and P. Bradshaw. 1989. Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing cyanobacterial bloom. **J. Am. Water Work Assoc.** 81 : 102-113.
- Fay, P. 1973. The Heterocyst. 238-259. in Carr, N.G. and Whitton, B.A. **The Biology of Blue-Green Algae**. Berkeley : University California Press. 387.
- Fay, P. 1992. Oxygen Relation of Nitrogen Fixation in Cyanobacteria. **Microbiol. Rev.** 50 : 340-373.
- Fish, S.A. and Cood, G.A. 1994. Antimicrobial and cytotoxic activity produced by an isolated of the thermotolerant cyanobacterium (blue-green alga) *Phormidium* sp. **Biotec.Tech.** 8 : 351-356.
- Fogg, G.E. 1994. Growth and Heterocyst Production in *Anabaena cylindrica* Lemm. **New. Phycol.** 43 : 164-175.

- Fogg, G.E., Steward, W.D.P., Fay, P. and Walsby, A.E. 1974. **The Blue-Green Algae**. 2nd.ed.
London : Academic Press. 659.
- Glazer, A.N. 1987. Phycobilisomes : Assembly and Attachment. 69-94. in Fay, P. and van
Baaen, C.**The Cyanobacteria**. Amsterdam : Elsevier/Science Publishers. 241.
- Gross, C. Peter Wolk and Friedrich Juttner. 1991. Fischerellin, A new allelochemical from the
freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola*. **J. Phycol.** 27 : 686-692.
- Harada, K.I., K. Tsuji and M.F. Watanabe. 1996. Stability of microcystins from cyanobacteria-
III. Effect of pH and temperature. **Phycologia**. 35 (6 Supplement): 83-88.
- Harold, J.H. and Susanne, R.W. 1980. **Introduction and Guide to Marine Blue-Green Algae**.
New York : John Wiley & Sons.
- Hermansky, S.J., Stohs, S.J., Eldeen, Z.M., Roche, V.F., and Mereish, K.A., 1991. Evaluation of
potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice, **J. Appl.**
Toxicol. 3 : 11-65.
- Himberg, K., A.M. Keijola, L. Hiisvirta, H. Pysalo and K. Sivonen. 1989. The effect of water
treatment process on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria*
cyanobacteria : a laboratory study. **Wat. Res.** 23 : 979-986.
- Hoffmann, J.R.H. 1976. Removal of *Microcystis* toxins in water purification process. **Wat. Sci.**
Appl. 2 : 58-64.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. **Bergey's Manual of**
Determinative Bacteriology. 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland. 246.

- Honkanen, R.E., J. Zwiller, R.E. Moore, S.L. Daily, B.S. Khatra, M. Dukelow and A.L. Boynton . 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. **J. Biol. Chem.** 265 : 19401-19404.
- Ichimura, T. 1978. Media for blue- green algae. *Toxic Microcystis* **CRC Press**, Boca Raton. 12-28.
- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. and Aaronson, S. 1986. Algal nutrition. 147-198. in Richmond, A. **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. Florida CRC Press.
- Kashiwagi, K., Mynderse, J.s., Moore, R.E. and Norton, J.R. 1980. Antineoplastic Evaluation of Pacific Basin Marine Algal. **J. Pharm. Sci.** 69 : 735 -745.
- Keijola, A.M., K. Himberg, A.L. Esala, K. Sivonen and L. Hiisvirta. 1988. Removal of cyanobacterial toxins in the water treatment processes: laboratory and pilot-scale experiments. **Toxicon**. 3 : 643-656.
- Komarek, J. and K. Anagnostidis. 1986. Modern approach to the classification system of cyanophytes 2-Chroococcales. **Arch. Hydrobiol.** 43(Suppl. 73) : 157-175.
- Kondo, F., Y. Ikai, H. Oka, M. Okumura, N. Ishikawa, M. F. Watanabe, M. Watanabe, K. I. Harada and M. Suzuki. 1992. Separation and identification of microcystins in cyanobacteria by fast atom bombardment liquid chromatography/ mass spectrometry. **Toxicon**. 30 : 227-230.
- Kiviranta, J. and Abdel-Hameed, A. 1994. Toxicity of the Blue-Green Algae *Oscillatoria agardhii* to the Mosquito *Aedes aegypti* and the Shrimp *Artemia salina*. **World. J. Microbiol. Biotec.** 10 : 517-520.

Kreitlow, S., S. Mundt and U. Lindequist. 1999. Cyanobacteria-a potential source of new biologically active substances. **J. Biotech.** 70 : 61-63.

Kumar, K.D. 1990. **Introductory Phycology**. New Delhi : Affiliated East-West Press Private Limited. 213.

Lahti, K., J. Kilponen, A.L. Kivimaki, K. Erkoma and K. Sivonen. 1996. Removal of cyanobacteria and their hepatotoxins from raw water in soil and sediment columns. In: Kivimaki AL, T. Suokko. editors. **Artificial Recharge of Groundwater**. NHP/Report No. 38, Helsinki. 187-195.

Liska, D.J. 1998. The detoxication enzyme systems. **Alter. Med. Rev** ; 3 : 187-198.

MacKintosh, C., K.A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen and G.A. Codd. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEMS. Lett.** 264 : 187-192.

Metting, B. and Pyne, J.W. 1986. Biologically active compounds from marine microalgae. **Enz. Microbiol. Tech.** 8 : 386-394.

Meriluoto, J.A.O., Nygard, S.E., Dahlem, A.M., and Eriksson, E., .1990. Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog, **Toxicon**. 1420-1439.

Michael, G.W. 2004. Chemical structure of microcystin-LR. http://www.ch.tum.de/wasser/weller/microcystin_img.htm. 15/11/2004.

- Moore, R.E. C. Cheuk, X.Q.G. Yang and G.M.L. Patterson. 1987. Hapalindoles, antibacterial and antimycotic alkaloids from the cyanophyte *Hapalosiphon fontinalis*. **J. Org. Chem.** 52 : 1036-1043.
- Morris, I. 1968. **An Introduction to the Algae**. London: Hutchison & Co (Publishers)LTD. 320.
- Murray Regional Algal Coordinating Committee, MRACC. 2002. Blue-green algae management protocols. [http:// www. Murraybluegreenalgae. com /detailed_biology.htm](http://www.Murraybluegreenalgae.com/detailed_biology.htm). 15/11/2004.
- Namikoshi, M., L.K. Rinehart, R. Sakai, R.R. Stotts, M.A. Dahlem, R.V. Beasley, W.W. Carmichael .1989. Total synthesis of adda, the unique C20 amino acid of cyanobacterial hepatotoxins. **Tetra. Lett.** 30 : 4349-4352.
- Nebert D.W., et al. 1991. Human AH locus polymorphism and cancer : inducibility of CYP1A1 and other genes by combustion products and dioxin. **Pharmacogenetics**; 1: 68-78.
- Nicholson, B.C., J. Rositano and M. Burch. 1994. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chloramine. **Wat. Res.** 28 : 1297-1303.
- Nishiwaki-Matsushima, R., S. Nishiwaki, T. Ohta, S. Yoshizawa, M. Suganuma, K.I. Harada, M.F. Watanabe and H. Fujiki. 1991. Structure-function relationships of microcystin liver tumour promoters interaction with protein phosphatase. **Japan. J. Cancer. Res.** 82: 993-996.
- Nishiwaki- Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W.W., and Fujiki, H. 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR, **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** 118 : 420-435.

- Oquist, G. 1971. Changes in pigment composition and photosynthesis induced by iron-deficiency in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. **Phycol. Plant.** 25 : 188-195
- Patterson, G.M. and Caplin, C.M. 1991. Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (cyanophyta). **J. Phycol.** 27 : 530-536.
- Park, A., Moore, R.E. and Patterson, G.M.L. 1992. Fischerindole L, a New Isonitrile from the Terrestrial Blue-Green Alga *Fischerella muscicola*. **Tetra. Lett.** 33 : 3257-3260.
- Poon, G.K., I.M. Priestley, S.M. Hunt, J.K. Farwell and G.A. Codd. 1987. Purification procedure for peptide toxin from cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* involving high-performance thin layer chromatography. **J. Chroma.** 387 : 551-558.
- Prieto, B., Pardo, M.A., Garbisu, C., Llama, M.J. and Serra, J.L. 1997. Phosphate Uptake by Phosphorus-Starved Cells of the Cyanobacterium *Phormidium larinosum*. **World. J. Microbiol. & Biotech.** 59 : 786-788.
- Randerath, K. 1996. **Thin-Layer Chromatography**. Weinheim : Verlag Chemie. 298.
- Rai, A.N., Rao, V.V. and Singh, N.N. 1985. The Biology of Cyanobacterial (Blue – Green Algae) Akinetes (Spores). **J. Phycol. Sci.** 1 : 1-20.
- Richmond, A. 1986. Cell response to environmental factors. 69 -115. in Richmond, A. **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. Florida. : CRC Press. 560.
- Robinson, N.A., Pace, J.G., Matson, C.F., Miura, G.A., and Lawrence, W. B., 1991. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice, **J. Pharmacol. Exp. Therap.** 23 : 176-256.

- Runnegar, M.T., C., Andrews, J., Gerdes, R.G., and Falconer, I.R., .1987. Injury to hepatocytes induce by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*,. **Toxicon**. 25-1235.
- Sargunar, H. and A. Sargunar. 1990. **Division of chemistry & the environment (DCE) minutes** .In proceedings of the 4th international IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Abstract no. 610. Lausanne, Switzerland.
- Sasner, J.J.Jr, M. Ikawa, T.L. Foxall and W.H. Watson 1981. Studies on aphanotoxin from *Aphanizomenon flos-aquae* in New Hampshire. In Carmichael W W (ed). **The water environment-algal toxin and health**. Plenum Press. New York. 389-404.
- Sato, N. and Murata, N. 1980. Temperature Shift-Induce Responses in Lipids in the Blue-Green Alga, *Anabaena variabilis*. **Biochem. Biophys. Acta**. 619 :353.
- Schwartz, R.E., Hirsch, C.F., Sesin, D.F., Flor, J.E., Chartrain, M., Fromtling, R.E., Harris, G.H., Salvatore, M.J., Liesch, J.M. and Yudin, K. 1990. Pharmaceuticals from cultured algae. **J. Indus. Microbiol.** 5 : 113-124.
- Schlegel, I., N. Chazal and G.D. Smith. 1999. Antibiotic activity of new cyanobacterial isolates from Australia and Asia against green algae and cyanobacteria. **J. Appl. Sci.** 10 : 471-479.
- Sieburth, J.M. 1960. Acrylic acid an antibiotic principle in *Phaeocystis* bloom in Antarctic water. **J. Sci.** 132 : 676-699.
- Sivonen, K. 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate and bacteria on growth of and hepatotoxic production by *Oscillatoria agardhii* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 56 : 2658-2666.

- Smith, G.M. 1950. The Freshwater Algae, pp. 743-757. In R.A. Lewin. **Physiology and Biochemistry of Algae**. Academic Press, New York. 321.
- Sokawa, Y and Hase, E. 1968. Suppressive effect of light on the formation of DNA and on the increase of deoxythymidine monophosphate kinase in chlorella protothecoides. **J. Plant. Cell. Physio.** 9 : 461.
- Talling, J.F. 1962. **The Freshwater Algae**. In R.A. Lewin. Physiology and Biochemistry of Algae. : Academic Press, New York. 321.
- Tsuji, K., S. Naito, F. Kondo, N. Ishikawa, M.F. Watanabe, M. Suzuki and K.L. Harada. 1994. Stability of microcystin from cyanobacteria : Effect of light on decomposition and isomerization. **Environ. Sci. Technol.** 28: 173-177.
- Tsuji, K., T. Shinji , N. Koide, H. Hada, S. Sasaki, T. Oka, N. Takayama, H. Shiraha, K. Ujike, M. Nakamura, T. Hanafusa, Y. Yumoto. 1997. Reciprocal gene expression of rat fibroglycan and beta-actin during the course of regeneration after D-galactosamine liver injury. **Hepato-Gastroenterology.** 44 : 239-244.
- Vander Westhuizen, A.J. and J.N. Eloff. 1985. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue green algae *Microcystis aeruginosa* (UV-006). **Planta.** 163 : 55-59.
- Venkataraman, G.S. 1957. A note on the occurrence of three – pored heterocyst in *Mastigocladus Laminosus*. **Curr. Sci.** 26 : 254-273.
- Vonshak, A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In **CRC Handbook of Microalgae Mass Culture**. In Richmand, A. CRC Press Inc., Florida U.S.A.

- Wada, H. and Murata, N. 1990. Temperature-induced changes in the fatty acid composition on the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. **J. P. Phycol.** 92 : 1062-1069.
- Walter, P. and Frankmole. 1992. Antifungal cyclic peptides the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa*. **J. Antibio.** 75 : 1458-1466.
- Watt, W. D. 1969. Extracellular release of organic matter from two fresh water diatoms. **Annual Botanical.** 33 : 427-437.
- Watanabe, M.F. and S. Oishi. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. **Appl. Environ. Microbiol.** 49 : 1342-1344.
- Watanabe, M.F and Nakagawa M. 1998. Purification of freshwater picoplanktonic cyanobacteria by pour-plating in ultra-low – gelling-temperature agarose. **Phycol. Res.** 46 : 71-78.
- World Health Organization, (WHO). 2004. Algae and cyanobacteria in fresh water. http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwe1/en/. 29/11/2004
- Yoshizawa, S., R. Matsushima, M.R. Watanabe, K.A. Harada, A. Ichihara, W.W. Camichael, and H. Fujiki. 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. **J. C. Res. and C. Onco.** 116 : 609-614.
- Yu, S. Z. 1989. Drinking water and primary liver cancer, in primary liver cancer. **China Academic Publishers.** 19 : 30-37.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร BGA Medium (Antarikanonda, 1980) สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีส่วนประกอบดังนี้

NaCl	0.070	กรัม
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.380	กรัม
CaCl ₂	0.080	กรัม
K ₂ HPO	0.600	กรัม
Fe ₂ (SO ₄) ₃ • 6H ₂ O	0.010	กรัม
Titriplex III	0.027	กรัม
H ₃ BO ₃	0.003	กรัม
MnSO ₄ • 4H ₂ O	0.002	กรัม
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.008	กรัม
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.0003	กรัม
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.00008	กรัม
CoCl ₂	0.00002	กรัม
Deionized water	1000	มิลลิลิตร

pH 7.5

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ผสมกับน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ สูตรอาหาร BGA + N เติร์มโดยการเติมโซเดียมไนเตรต 1.5 กรัมต่อลิตร

2. สูตรอาหาร MA (Ichimura, 1978) สำหรับเลี้ยงสาหร่าย *Microcystis aeruginosa*

KNO_3	0.10	กรัม
NaNO_3	0.05	กรัม
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
β - glycerophosphate	0.10	กรัม
Bicine	0.5	กรัม
Na_2EDTA	0.005	กรัม
H_3BO_3	0.02	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.005	กรัม
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0008	กรัม
ZnCl_2	0.0005	กรัม
Na_2SO_4	0.04	กรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.005	กรัม
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0005	กรัม

pH 8.6

ภาคผนวก ข

วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. กราฟมาตรฐานของ gentamicin (standard curve of gentamicin)

1.1 เตรียม gentamicin มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 15 20 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อ 15 ไมโครลิตร

1.2 แผ่นทดสอบเปเปอร์ดิสก์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (BBL blank paper disc ของ Becton Dickinson)

1.3 เตรียมทำ algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยใช้ Ultra-low-gelling-temperature agarose 1.6 เปอร์เซ็นต์

1.4 ทดสอบประสิทธิภาพของ gentamicin มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ตามวิธี paper disc plate

1.4.1 เติมน้ำแขวนลอยของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ที่มีค่าความหนาแน่นของเซลล์ (optical density) ที่ความยาวคลื่น 900 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ให้ได้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 เป็น 20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรสารแขวนลอยของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* ต่อปริมาตรอาหาร ผสมให้เข้ากันกับอาหาร MA กึ่งแข็ง เตรียมโดยใช้ อากาโรส (agarose) ความเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ แทนวุ้น (agar) ที่นิ่งมาเชื้อเรียบร้อยแล้ว เทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว แล้วพ่นด้วยพาราฟิล์ม นำไปวางไว้ใต้แสงหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 60 ไมโครไอสไคน์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ช่วงแสงที่ให้แสงสว่างต่อมิด 12:12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

1.4.2 วิธีการหากราฟมาตรฐานของ gentamicin โดยเตรียม algal lawn ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 จากนั้นใช้ไมโครปิเปตต์หยด gentamicin มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 15 มิลลิลิตรที่ได้เตรียมไว้แล้ว (ข้อ 1.1) ลงบนแผ่นทดสอบใช้ปากกึบคิบแผ่นทดสอบ ที่ได้เตรียมไว้แล้วอย่างละ 2 แผ่น วางบนผิว algal lawn ของ *Microcystis*

aeruginosa TISTR 8305 โดยวางในลักษณะแนวเส้นตรงเดียวกันแต่ทิศทางตรงข้ามกัน สำหรับในแนวตั้งฉากกับแผ่นทดสอบที่หยด gentamicin ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อแผ่น มาวางในลักษณะเดียวกัน ดังนั้นในแต่ละจานเพาะเชื้อจะมีแผ่นทดสอบ 4 แผ่น ในตำแหน่งที่สมดุล และทุกๆจานเพาะเชื้อจะมีแผ่นทดสอบที่หยด gentamicin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อแผ่น ควบคู่ไปกับแผ่นทดสอบที่หยด gentamicin ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ ความเข้มแสง 60 ไมโครไอส์ไดน์ต่อตารางเมตรต่อวินาทีเป็นเวลา 7 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางที่มีการยับยั้งการเจริญเติบโต (inhibition zone) ของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 โดยวัดผ่านเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ

1.4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เพื่อนำไปเขียนกราฟมาตรฐานของ gentamicin จากข้อ 1.4.2 หาค่าเฉลี่ยของความกว้างบริเวณยับยั้งที่เกิดจากการใช้ gentamicin มาตรฐาน ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อแผ่น จากการทดลองทั้งหมด ดูความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทั้งหมดกับค่าเฉลี่ยที่ได้ในแต่ละจานเพาะเชื้อ ถ้าค่าเฉลี่ยทั้งหมดมีค่าน้อยกว่าให้นำค่าที่แตกต่างกันไปหักออกจากค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้ง ในทางตรงกันข้ามถ้าค่าเฉลี่ยทั้งหมดมีค่ามากกว่าให้นำค่าที่แตกต่างกันไปบวกเพิ่ม จากนั้นนำค่าความกว้างของบริเวณการยับยั้งซึ่งเกิดจาก gentamicin มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ปรับค่าแล้วไปเขียนกราฟ semi-logarithmic paper และใช้วิธีเขียนกราฟตาม method of least squares (Crowe and Crown, 1969) ตามสูตรดังนี้

$$\begin{aligned} \text{จาก } y &= ab^x \\ \log y &= \log a + X \log b \\ \sum_{i=1}^n \log y_i &= n(\log a) + (\log b) \sum_{i=1}^n \log y_i \quad (1) \\ \sum_{i=1}^n x_i \log y_i &= (\log a) \sum_{i=1}^n x_i + (\log b) \sum_{i=1}^n x_i^2 \quad (2) \end{aligned}$$

นำค่าจากตารางผนวกที่ 1 แทนในสมการ (1) และ (2)

$$12.2127 = 14 \log a + 315.43 \log b \quad (3)$$

$$323.9519 = 315.43 \log a + 8375.2127 \log b \quad (4)$$

จากสมการ(3) และ (4) จะได้

$$\begin{aligned}
 \log a &= 0.0049 \\
 \log b &= 0.0385 \\
 \text{จากความสัมพันธ์ } \log y &= \log a + X \log b \\
 \log y &= 0.0049 + 0.0385X \\
 X &= \frac{\log y - 0.0049}{0.0385}
 \end{aligned}$$

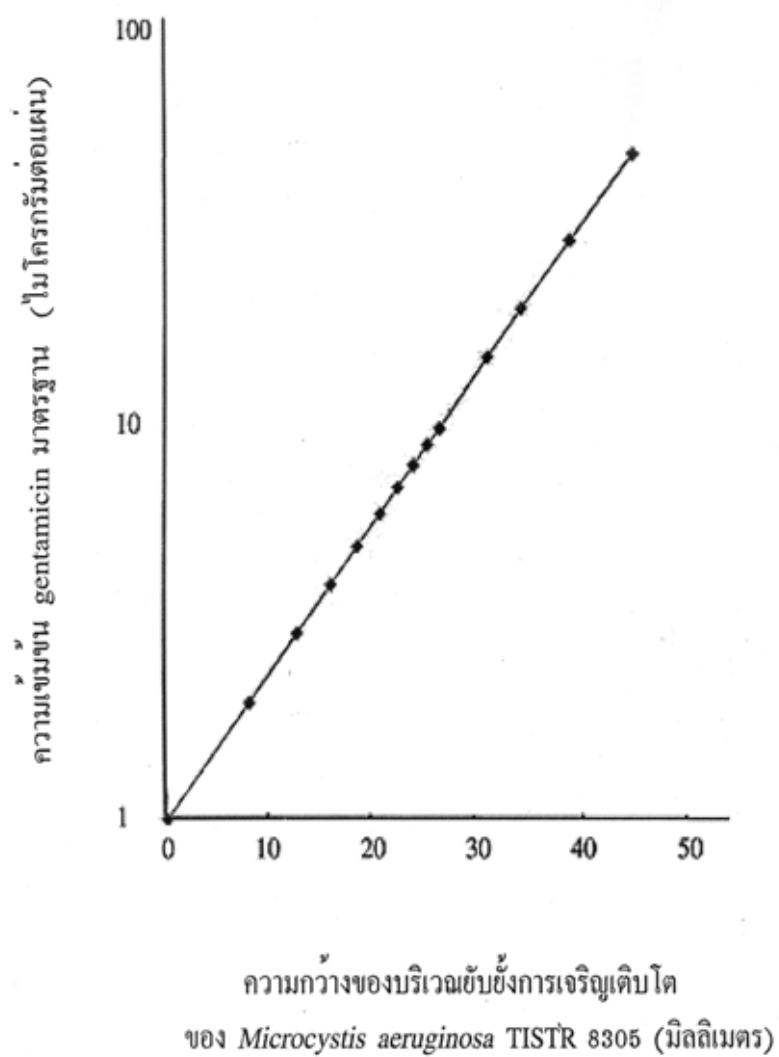
แทนค่า y ตามค่าในตารางผนวกที่ 1 จะได้ค่า x ค่าใหม่ ซึ่งเมื่อนำไปเขียนกราฟที่มีแกน y เป็น log scale จะได้เป็นเส้นกราฟ ดังแสดงในภาพผนวกที่ 1

ตารางผนวกที่ ข1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำหรับเขียนกราฟมาตรฐานของ gentamicin ตาม method of least squares

ลำดับข้อมูล	y_i	$\log y_i$	x_i	x_i^2	$x_i \log y_i$
1	1	0.0000	7.92	62.7294	0.0000
2	2	0.3010	11.44	130.8736	3.4434
3	3	0.4771	12.43	154.5049	5.9304
4	4	0.6020	14.34	205.6356	8.6327
5	5	0.6989	15.38	236.5444	10.7491
6	6	0.7782	20.30	412.0900	15.7975
7	7	0.8451	21.56	464.8336	18.2204
8	8	0.9031	22.59	510.3081	20.4010
9	9	0.9542	24.71	610.5841	23.5783
10	10	1.0000	25.89	670.2921	25.8900
11	15	1.1761	29.11	847.3921	34.2363
12	20	1.0310	32.40	1049.7600	33.4044
13	30	1.4771	34.98	1223.6004	51.6690
14	50	1.6989	42.38	1796.0644	71.9994
รวม		12.2127	315.43	8375.2127	323.9519

Y = ความเข้มข้น gentamicin มาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อแผ่น)

X = ความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 (มิลลิเมตร)



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐาน gentamicin

ภาคผนวก ค
นํ้ายาเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

น้ำยาเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

1. สารละลายนินไฮดริน

นินไฮดริน	0.2	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์	100.0	มิลลิลิตร

ละลายนินไฮดรินในเอทิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดเก็บไว้ในตู้เย็น สารละลายนินไฮดรินใช้สำหรับการตรวจหากรดอะมิโน

2. น้ำยาโมลิสซ์

สารละลายแอลฟาแอลฟาแนพทอล 5 เปอร์เซ็นต์ ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (ต้องเตรียมในวันทดลอง)

3. สารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0

กรดแอสติกเข้มข้น	5.6	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900.0	มิลลิลิตร

(ปรับพีเอช โดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทีละหยด เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร)

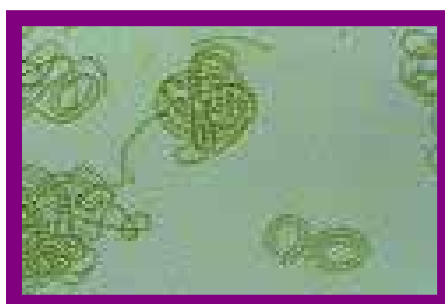
ภาคผนวก ง

รูปร่างเซลล์สาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือก และวิธีการทำทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี
(thin layer chromatography, TLC)

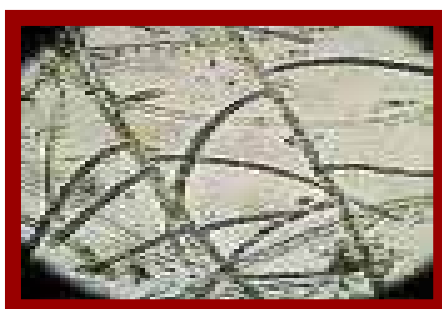
1. รูปร่างเซลล์สำหรับทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือก



ภาพผนวกที่ ๑1 รูปร่างเซลล์สำหรับสายพันธุ์ *Anabaena* sp. TISTR 8077

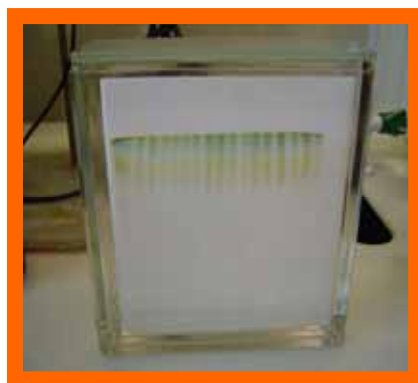


ภาพผนวกที่ ๑2 รูปร่างเซลล์สำหรับสายพันธุ์ *Anabaena variabilis* TISTR 8404



ภาพผนวกที่ ๑3 รูปร่างเซลล์สำหรับสายพันธุ์ *Hapalosiphon fontinalis* TISTR 8225

2. วิธีการทำthin layer chromatography (thin layer chromatography, TLC)



ภาพผนวกที่ 4 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยใช้ TLC



ภาพผนวกที่ 5 แผ่นTLC ที่ผ่านการส่องรังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร