การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียและย่อยสลายสารพิษไมโครซิสตินโดยแบคทีเรียจากแหล่งน้ำบางแห่งในจังหวัดเชียงใหม่

ณัฐวุฒิ หวังสมนึก[1*]
ศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์พหุวิทยาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
และ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
และ จีรพร เพกเกาะ[2]
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

บทคัดย่อ

การเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษมักพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดผลิตสารพิษไมโครซิสตินซึ่งเป็นอันตรายอย่างรุนแรงต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งมนุษย์ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการควบคุมการเจริญของ *Dolichospermum* sp. AARL C014 และ *Microcystis* sp. AARL C028 และการย่อยสลายสารพิษไมโครซิสตินโดยแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำและตะกอนดินจากอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธาราและคูเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 37 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบการควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียในอาหารเหลว BG-11 พบว่าไอโซเลท WMK06 ควบคุมการเจริญของ *Dolichospermum* sp. AARL C014 ได้ดีที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการทดลอง และควบคุม *Microcystis* sp. AARL C028 ได้ดีที่สุด 57 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 14 ของการทดลอง ส่วนการทดสอบการย่อยสลายสารพิษ microcystin-LR พบว่าไอโซเลท WMK01 สามารถย่อยสลายสารพิษได้ 50 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการทดลอง

คำสำคัญ : สาหร่ายพิษ / การควบคุมแบบชีววิธี / ไมโครซิสติน

* *Corresponding author: Nattawut__wh@outlook.co.th*

1 *นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์*

2 *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์*

Control of Cyanobacteria and Degradation of the Produced Microcystin by Aquatic Bacteria Isolated from Some Water Sources in Chiang Mai Province

Nattawut Whangsomnuek[1*]

Multidisciplinary Science Research Center, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai Province, 50200

and Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai Province, 50200

and Jeeraporn Pekkoh[2]

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai Province, 50200, THAILAND

Abstract

Blooms of toxin-producing cyanobacteria generally occur in natural water resources. Some cyanobacteria produce microcystin, which is extremely toxic to many organisms including humans. This work was to control the growth of *Dolichospermum* sp. AARL C014 and *Microcystis* sp. AARL C028, as well as to degrade microcystin by bacteria isolated from the water and sediments in reservoir of Mae Kuang Udomtara Dam Reservoir and Chiang Mai Moat in Chiang Mai province. Thirty seven bacterial isolates were obtained. They were tested for controlling the growth of *Dolichospermum* sp. AARL C014 and *Microcystis* sp. AARL C028 in liquid BG-11 medium. It was shown that isolate WMK06 100% inhibited *Dolichospermum* sp. AARL C014 on Day 3 and 57% inhibited *Microcystis* sp. AARL C028 on Day 14. Study on the biodegradation of microcystin-LR showed that WMK01 could degrade 50% of the toxin on Day 3 of the experiment.

Keywords : Toxic Algae / Biocontrol / Microcystin

* *Corresponding author: Nattawut__wh@outlook.co.th*

1 *Master of Science, Microbiology Section, Department of Biology, Faculty of Science.*

2 *Assistant Professor, Microbiology Section, Department of Biology, Faculty of Science.*

1. บทนำ

การเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษเป็นปัญหาที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ในพื้นที่หลายแห่งทั่วโลก รวมทั้งเป็นปัญหาในการผลิตเป็นน้ำประปา สารพิษที่พบส่วนใหญ่คือไมโครซิสติน (microcystins) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม cyclic heptapeptide hepatotoxins ที่มีผลต่อตับ (hepatotoxin) [1] ส่วนมากสร้างโดย *Microcystis* spp., *Anabaena* spp., *Oscillatoria* spp. และ *Nostoc* spp. [2] ซึ่งจะปลดปล่อยลงสู่แหล่งน้ำเมื่อเซลล์แก่หรือตาย [3] มนุษย์และสัตว์จึงได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายจากการบริโภคน้ำหรือสูดเอาละอองน้ำในแหล่งน้ำที่มีสารพิษเจือปนอยู่ [4] การเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษในประเทศไทยพบว่าจีนัสที่พบบ่อยคือ *Microcystis* [5] นอกจากนี้กรมควบคุมมลพิษ (Pollution Control Department) [6] รายงานการพบการเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษในอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธาราและอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่งัดสมบูรณ์ชล จังหวัดเชียงใหม่

การกำจัดไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำสามารถกระทำได้หลายวิธีเช่นการใช้คลื่นอัลตราโซนิค การใช้สารเคมีคอปเปอร์ซัลเฟต หรือโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต แต่พบว่าเป็นการทำลายเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียซึ่งจะทำให้เกิดการปลดปล่อยสารพิษลงสู่แหล่งน้ำเพิ่มมากขึ้น [4,7] วิธีการทางชีวภาพจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของไซยาโนแบคทีเรียและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม [8] โดยเฉพาะแบคทีเรีย ดังเช่นการใช้ *Bacillus* sp.Lzh-5 หรือ *Streptomyces aurantiogriseus* เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* [8,9] การศึกษาในครั้งนี้จึงศึกษาการควบคุมการเจริญของ *Dolichospermum* sp. AARL C014 (*Anabaena*) และ *Microcystis* sp. AARL C028 ด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกจากอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธาราและคูเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งคาดว่าจะเป็นแนวทางในการใช้แบคทีเรียเป็นทางเลือกหนึ่งของการลดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษในสิ่งแวดล้อมต่อไปในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

คัดแยกแบคทีเรียจากอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธาราและคูเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินมาทำการคัดแยกแบคทีเรียโดยใช้ dilution pour plate และ spread plate technique ในอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน จากนั้นทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค streak plate จนได้เชื้อบริสุทธิ์ [10]

2.2 การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ไซยาโนแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างไซยาแบคทีเรียจากแหล่งน้ำที่พบการเจริญอย่างรวดเร็วของ *Dolichospermum* spp. และ *Microcystis* spp. ได้แก่ คูเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ และคูเมืองลำพูน จังหวัดลำพูน โดยนำมาคัดแยกแบบ unialgal culture ด้วยเทคนิคการล้างเซลล์ด้วยไมโครปิเปตจากนั้นปิเปตเลือก *Dolichospermum* sp. และ *Microcystis* sp. และนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 [11] และ MA [12] ตามลำดับ ความเข้มแสง 40.50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อพบการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิด ทำการขยายขนาดในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร BG-11 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดลองถัดไป

2.3 การคัดกรองแบคทีเรียที่ควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว LB นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (150 รอบต่อนาที) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24-48 ชั่วโมง และปรับให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 1 จากนั้นจัดชุดการทดลองในหลอดที่มีฝาปิดโดยมีอาหาร BG-11 ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร แต่ละชุดการทดลองเติม *Dolichospermum* sp. หรือ *Microcystis* sp. จากข้อ 2.2 โดยให้มีค่า OD_{750} เริ่มต้นในอาหารใหม่เท่ากับ 0.1 และเติมแบคทีเรียปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 40.50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ทำการตรวจวัด

การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 680 และ 750 นาโนเมตร [9,13] นับจำนวนเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย และคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย (Inhibition activity, %) ตามวิธีการของ Li *et al.* (2015) ดังสมการ

$$I = \left(1 - \frac{D_{t-treatment}}{D_{t-control}}\right) x\ 100$$

เมื่อ $D_{t\text{-}treatment}$ คือ จำนวนเซลล์ในชุดทดลอง (เซลล์ต่อมิลลิลิตร); $D_{t\text{-}control}$ คือจำนวนเซลล์ในชุดควบคุม (เซลล์ต่อมิลลิลิตร); t (วัน) คือจำนวนวันในการทดลอง

2.4 การคัดกรองแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารพิษไมโครซิสติน

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหาร LB ในสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 2.3 จากนั้นนำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง centrifuge (1000x g; 4°C) นาน 15 นาที ทำการล้างตะกอนเซลล์ของแบคทีเรียอีกครั้งด้วย 0.1M PBS ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นปรับให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 ใน saline solution หลังจากนั้นทำการเติมแบคทีเรียปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงใน 96-well microplate และทำการเติม microcystin-LR ให้มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และวัดความสามารถในการย่อยสลาย microcystin-LR โดยใช้ Microcystest commercial kit สำหรับตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสติน (Zeulab S.L., Spain)

2.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการของแบคทีเรียในการควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการควบคุมการเจริญของ *Dolichospermum* sp. และ *Microcystis* sp. จากข้อ 2.3 ในอาหารเหลว LB นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (150 รอบต่อนาที) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24-48 ชั่วโมง และปรับให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 1 จากนั้นทำการทดสอบหา pH ที่แตกต่างกันคือ 6, 7, 8 และ 9 และอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียสในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตรที่มี BG-11 ปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร จากนั้นแต่ละชุดการทดลองทำการเติม *Dolichospermum* sp. และ *Microcystis* sp. โดยให้มีค่า OD_{750} เริ่มต้นในอาหารใหม่เท่ากับ 0.1 และเติมแบคทีเรียปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงและวัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียเช่นเดียวกับข้อ 2.3 (ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ, คุมควบคุมคือชุดที่มีการเติมเฉพาะแบคทีเรียและชุดที่มีการเติมเฉพาะไซยาโนแบคทีเรีย)

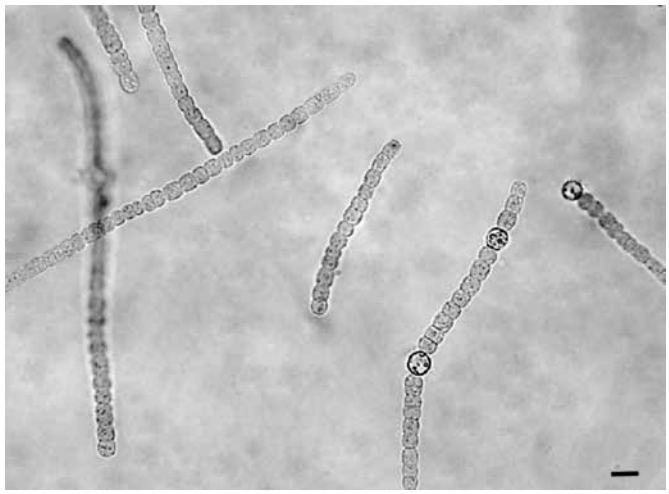
2.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียโดยลำดับ 16s rDNA

ทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บน 16s rDNA ด้วยวิธี standard bacteriological method โดยทำการเพิ่มจำนวนยีนบน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primers คือ 27F และ 1525R ทำการส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Ward Medic Ltd. และทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE__TYPE=BlastSearch) จากนั้นทำการวิเคราะห์และสร้าง Phylogenetic tree ด้วย neighbor-joining algorithm method (MEGA 4.1 software) ที่มีค่า Bootstrap analyses เท่ากับ 1,000 replicates เพื่อดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ [14]

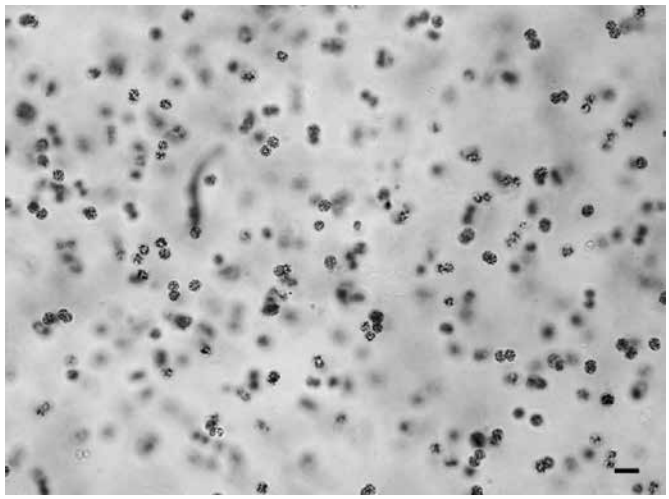
3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย

คัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำที่พบการเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียได้จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ *Dolichospermum* sp. AARL C014 และ *Microcystis* sp. AARL C028 (รูปที่ 1) และทำการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในคลังสาหร่ายของห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเมื่อตรวจสอบการสร้างสารพิษไมโครซิสตินด้วยชุดตรวจสอบ Microcystest ของบริษัท Zeulab S.L. พบว่า *Dolichospermum* sp. AARL C014 และ *Microcystis* sp. AARL C028 มีปริมาณสารพิษ microcystin-LR เท่ากับ 0.32 และ 2.85 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ



(ก)



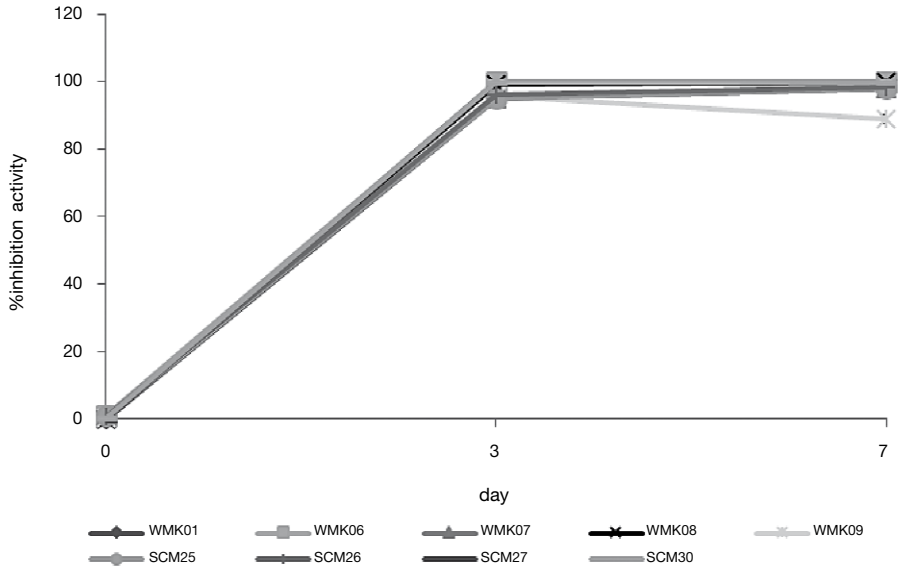
(ข)

รูปที่ 1 ไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้; ก) *Dolichospermum* sp. AARL C014; ข) *Microcystis* sp. AARL C028 (Scale bar = 10 ไมโครเมตร)

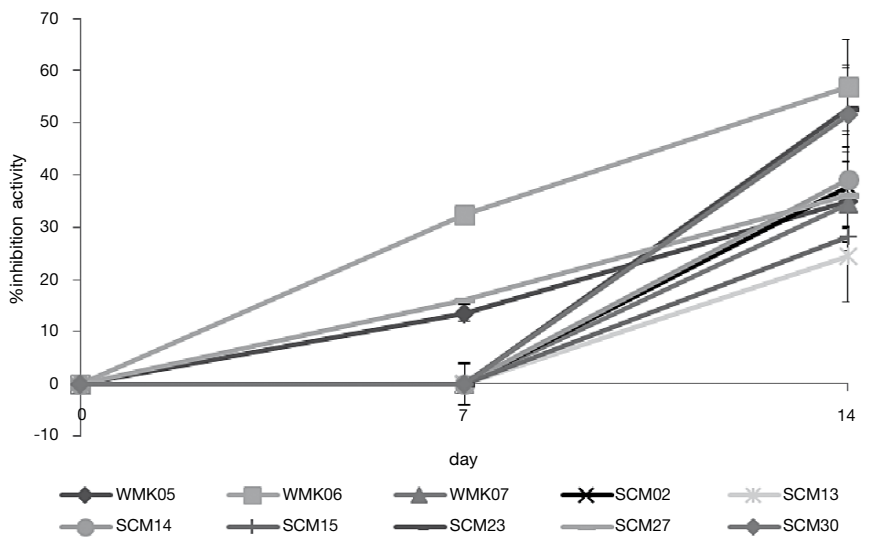
3.2 การคัดแยกและการคัดกรองแบคทีเรียในการควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 37 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับไซยาโนแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท (24.32 เปอร์เซ็นต์) สามารถลดปริมาณ *Doilichospermum* sp. AARL C014 ได้ในวันที่ 3 ของการทดลอง โดยไอโซเลท WMK06 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และพบว่าแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลท (27 เปอร์เซ็นต์) สามารถยับยั้ง *Microcystis* sp. AARL C028 โดยไอโซเลท WMK06 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเท่ากับ 57 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในวันที่ 14 (รูปที่ 2) ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียพบว่าไอโซเลท WMK06 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นรูปแท่งและสร้างเอนโดสปอร์ เมื่อทำการเปรียบเทียบ

ลำดับเบสบนฐานข้อมูล GenBank และทำการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าไอโซเลท WMK06 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Bacillus cereus* (รูปที่ 6 ก) จากนั้นจึงศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียไอโซเลท WMK06 ในการควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิด

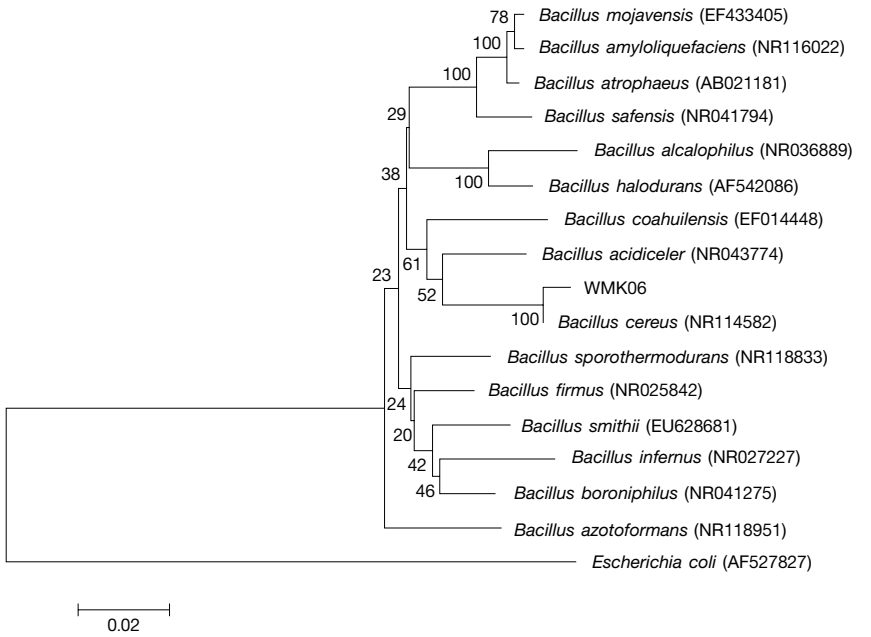


(ก)

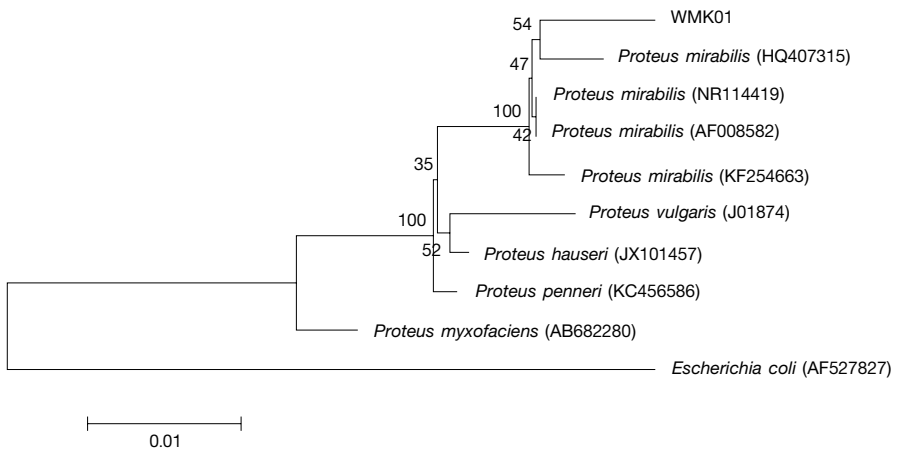


(ข)

รูปที่ 2 การคัดกรองประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมการเจริญ (เปอร์เซ็นต์); ก) *Dolichospermum* sp. AARL C014; ข) *Microcystis* sp. AARL C028



(ก)

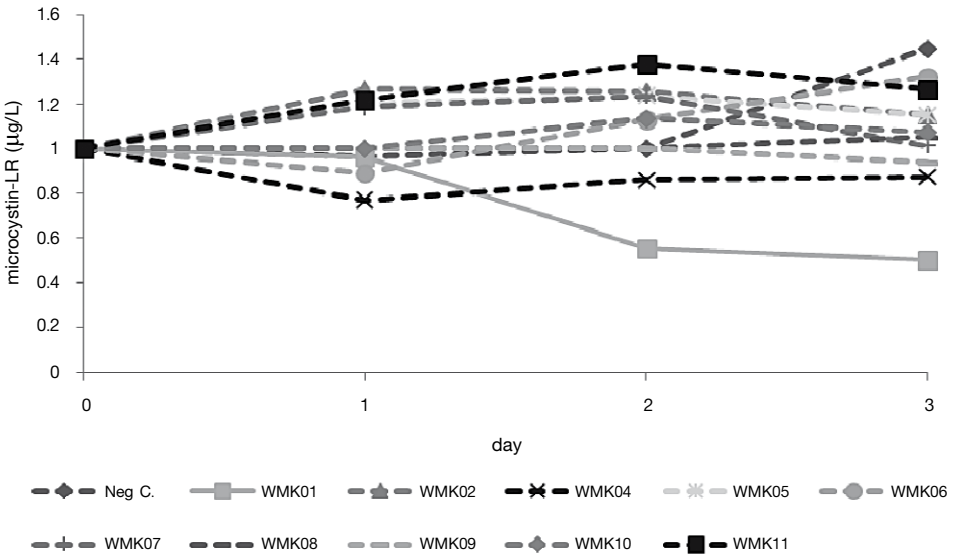


(ข)

รูปที่ 6 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธารา; ก) WMK06; ข) WMK01

3.3 การคัดกรองแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารพิษไมโครซิสติน

การศึกษาการย่อยสลายไมโครซิสตินด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธาราไอโซเลทWMK01 มีอัตราการย่อยสารพิษ microcystin-LR คงเหลือ 0.50 ไมโครกรัมต่อลิตรในวันที่ 3 ของการทดลอง (รูปที่ 3) เมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งสั้น เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสบนฐานข้อมูล GenBank และทำการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Proteus mirabilis* (รูปที่ 6 ข) เมื่อเปรียบเทียบกับ Ramani *et al.* [15] ที่คัดแยกแบคทีเรียจากทะเลสาบ Okeechobee พบว่าสามารถย่อยสลาย microcystin-LR (0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้ 74 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 20 ของการทดลอง และพบว่า *Proteus mirabilis* มีอัตราการย่อยสลายสารพิษได้ไม่สูงมากนัก และพบว่าไอโซเลท WMK06 ไม่สามารถย่อยสลายสารพิษไมโครซิสตินได้ ในขั้นถัดไปจึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของไอโซเลท WMK06 ในการควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิด

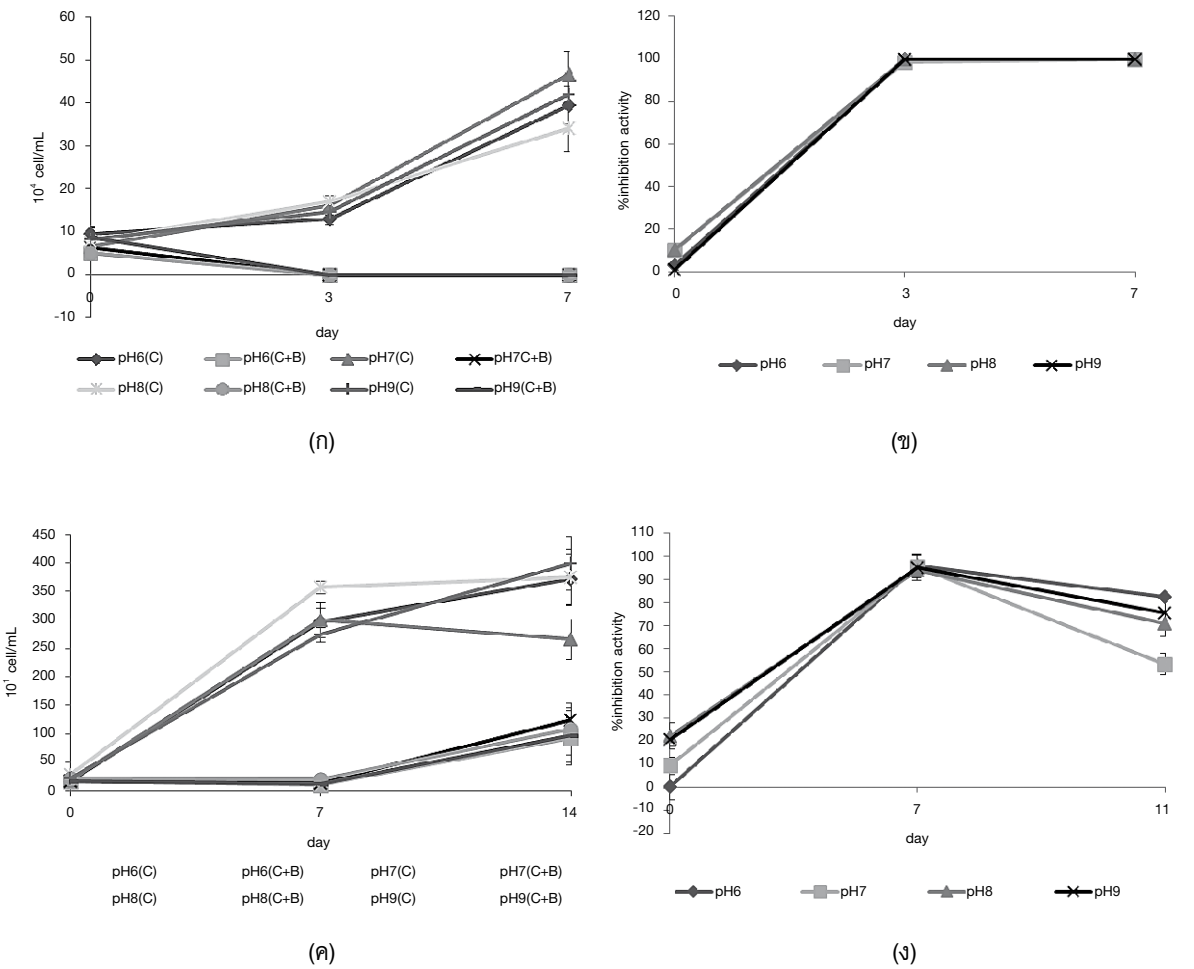


รูปที่ 3 การย่อยสลาย microcystin-LR โดยแบคทีเรียจากอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธารา

3.4 ความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการควบคุม *Doilichospermum* sp. AARL C014 และ *Microcystis* sp. AARL C028

เมื่อศึกษา pH ที่เหมาะสมของไอโซเลท WMK06 ในการควบคุมการเจริญของ *Doilichospermum* sp. AARL C014 พบว่าอาหารที่มี pH เท่ากับ 8 พบการเจริญน้อยที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้สูงที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย เมื่อศึกษาการควบคุม *Microcystis* sp. AARL C028 พบว่าในอาหารที่มี pH เท่ากับ 6 พบการเจริญของ *Microcystis* sp. AARL C028 น้อยที่สุด โดยมีประสิทธิภาพสูงที่สุดเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 ของการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย (รูปที่ 4) เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าในอาหารที่มี pH ต่างกันพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีการเติมเฉพาะแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในอาหารทุกชุดการทดลองจึงอาจแสดงได้ว่าไอโซเลท WMK06 สามารถเจริญได้ใน pH ช่วง 6 ถึง 9 เมื่อเปรียบเทียบกับ Yang *et al.* [16] ที่คัดแยกแบคทีเรีย *Pedobacter* sp. เพื่อควบคุมการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* พบว่ามี

ประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญสูงที่สุดเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 และเมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียในจีนัสเดียวกัน คือ *Bacillus aerophilus* และ *Bacillus altitudinis* พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญสูงที่สุดในวันที่ 10 เท่ากับ 64 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ [17] จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า *Bacillus cereus* ที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของ *Microcystis* สูงกว่า *Pedobacter* sp., *Bacillus aerophilus* และ *Bacillus altitudinis* นอกจากนี้มีการรายงานว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus* สามารถผลิตสารที่สามารถย่อยสลายเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียได้ [17] ซึ่งสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย

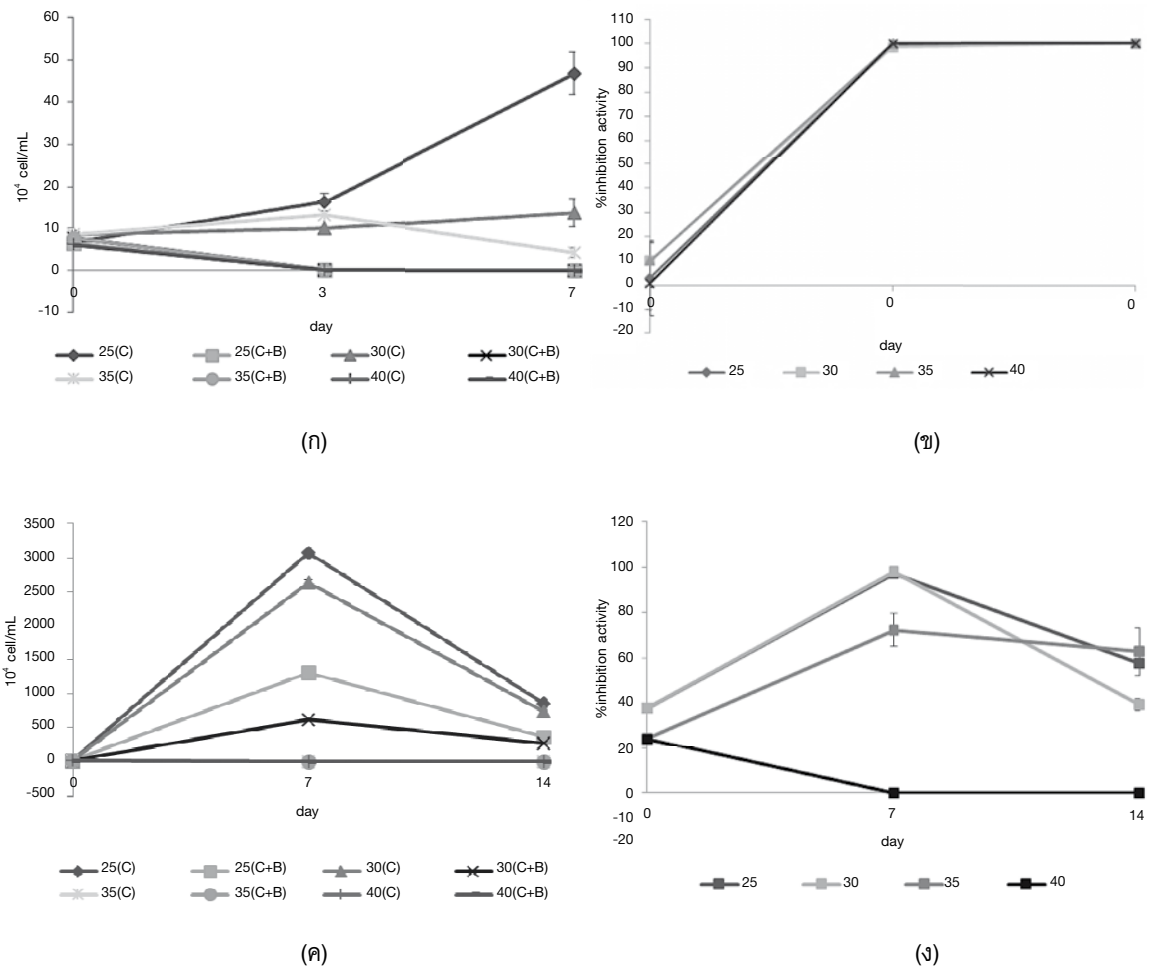


รูปที่ 4 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะของแบคทีเรียในการควบคุม *Dolichospermum* sp. AARL C014 (ก และ ข) *Microcystis* sp. AARL C028 (ค และ ง); ก) และ ค) จำนวนเซลล์; ข) และ ง) เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ

**C คือชุดที่มีการเติมเฉพาะไซยาโนแบคทีเรีย; C+B คือชุดที่มีการเติมไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรีย*

3.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการควบคุม *Doilichospermum* sp. AARL C014 และ *Microcystis* sp. AARL C028

การศึกษาอุณหภูมิที่แตกต่างกันในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียของไอโซเลท WMK06 พบว่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบการเจริญของ *Dolichospermum* sp. AARL C014 น้อยที่สุดซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Zhao *et al.* [18] พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus* มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมการเจริญของ *Anabaena flos-aquae* และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการควบคุม *Microcystis* sp. AARL C028 ได้สูงที่สุดเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 (รูปที่ 5) ซึ่ง Shao *et al.* [19] พบว่า *Bacillus* sp. และน้ำเลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้สามารถควบคุมการเจริญของ *Microcystis aeruginosa* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และพบว่าทั้งสองการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดไม่สามารถเจริญได้ เมื่อคำนวณ % inhibition activity จึงทำให้ค่าที่ได้มีค่าสูงตามการทดลองอื่นๆ ไปด้วย



รูปที่ 5 อุณหภูมิที่เหมาะของแบคทีเรียในการควบคุม *Dolichospermum* sp. AARL C014 (ก และ ข) *Microcystis* sp. AARL C028 (ค และ ง); ก) และ ค) จำนวนเซลล์; ข) และ ง) เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ

**C คือชุดที่มีการเติมเฉพาะไซยาโนแบคทีเรีย; C+B คือชุดที่มีการเติมไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรีย*

4. สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธาราที่พบการเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียสามารถควบคุมการเจริญของ *Dolichospermum* sp. AARL C014 ซึ่งถือได้ว่าเป็นการรายงานครั้งแรกในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ นอกจากนี้ยังสามารถควบคุม *Microcystis* sp. AARL C028 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังพบว่าสามารถลดปริมาณสารพิษไมโครซิสติน แต่อย่างไรก็ตามพบว่า *Bacillus cereus* สามารถควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่ไม่สามารถย่อยสลายสารพิษไมโครซิสตินได้ ซึ่งการพัฒนาต่อไปในอนาคตอาจใช้การทำงานร่วมกันของแบคทีเรียทั้งสองชนิดเพื่อควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียและในขณะเดียวกันก็สามารถย่อยสลายสารพิษไมโครซิสตินได้อีกด้วย ซึ่ง Kang *et al.* [20] กล่าวว่ามีเพียงรายงานเดียวที่แบคทีเรียชนิดเดียวกันสามารถควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียและในขณะเดียวกันก็สามารถย่อยสลายสารพิษไมโครซิสตินได้ ด้วยเหตุนี้ในอนาคตอาจสร้างผลิตภัณฑ์หรือนวัตกรรมที่สามารถใช้แบคทีเรียกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการทำงานร่วมกันเพื่อใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมการกระจายตัวของไซยาโนแบคทีเรียและสารพิษต่อไปในอนาคต

5. ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียซึ่งเป็นการคัดกรองโดยใช้ช่วงเวลาที่ค่อนข้างกว้าง จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในช่วงเวลาที่ถี่มากขึ้น (ทุก 3 วัน) เพื่อหาประสิทธิภาพในการควบคุมที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกในการควบคุมการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ เพื่อหาแนวทางและวิธีการพัฒนาในการใช้ต่อไปในอนาคต

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์พหุวิทยาการ คณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่มอบทุนสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ และขอขอบคุณ ผศ. ดร.ธีรศักดิ์ สมดี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และอาจารย์ ดร.อัญชนา สมดี สำนักวิชาศึกษาทั่วไป มหาวิทยาลัย ขอนแก่น ที่กรุณามอบความรู้และคำแนะนำเกี่ยวกับการศึกษาในครั้งนี้

7. เอกสารอ้างอิง

1. Sano, T., Takagi, H. and Kaya, K. 2004, ''A Dhb-microcystin from the Filamentous Cyanobacterium *Planktothrix rubescens*'', *Phytochemistry*, 65, pp. 2159-2162.

2. Singh, S., Srivastava, A., Oh, H.M., Ahn, C.Y., Choi, G.G. and Asthana, R.K. 2012, ''Recent Trends in Development of Biosensors for Detection of Microcystin'', *Toxicon*, 60, pp. 878-894.

3. McElhiney, J. and Lawton, L.A. 2005. ''Detection of the Cyanobacterial Hepatotoxins Microcystins'', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203, pp. 219-230.

4. Somdee, T., 2002, ''Toxic Algae Crisis'', *KKU Science Journal*, 30 (2), pp. 99-107. (In Thai)

5. Pekkoh, J., 2008. Diversity and Cyanotoxin of Toxic Cyanobacteria in Some Water Resources of Thailand. Ph.D. Thesis, Graduate School, Chiang Mai University, Thailand.

6. Pollution Control Department, 2010, Survey, Collection and Analysis of Water Samples and Living Organisms in the Standing Water, Department Ministry of Natural Resources and Environment. (In Thai)

7. Srisuksomwong, P., Whangchai, N., Yagita, Y., Okada, K., Peerapornpisal, Y. and Nomura, N., 2011, ''Effect of Ultrasonic Irradiation on Degradation of Microcystin in Fish Ponds'', *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(1), pp. 67-70.

8. Li, Z., Geng, M. and Yang, H. 2015. ''Algicidal Activity of *Bacillus* sp.Lzh-5 and Its Algicidal

Compounds Against *Microcystis aeruginosa*'', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, pp. 981-990.

9. Somdee, T., Sumalai, N. and Somdee, A., 2013, ''A Novel Actinomyces *Streptomyces aurantiogriseus* with Algicidal Activity Against the Toxic Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*'', *Journal of Applied Phycology*, 25, pp. 1587-1594.

10. Mu, R., Fan, Z., Pei, H., Yuan, X., Liu, S. and Wang, X., 2007, ''Isolation and Algae-lysing Characteristics of the Algicidal Bacterium B5'', *Journal of Environmental Sciences*, 19, pp. 1336-134.

11. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stanier, R.Y., 1979, ''Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria'', *Journal of General Microbiology*, 111(1), pp. 1-61.

12. Watanabe, M.M., Kawachi, M., Hiroki, M. and Kasai, F., 2000, List of Strains. National Institute for Environmental Studies, Environment Agency, Japan.

13. Hua, X.H., Li, J.H., Li, J.J., Zhang, L.H. and Cui, Y., 2009, ''Selective Inhibition of the Cyanobacterium, *Microcystis*, by a *Streptomyces* sp.'', *Biotechnology Letters*, 31, pp. 1531-1535.

14. Wobus, A., Bleul, C., Maassen, S., Scheerer, C., Schuppler, M., Jacobs, E. and Röske, I., 2003, ''Microbial Diversity and Functional Characterization of Sediments from Reservoirs of Different Trophic State'', *FEMS Microbiology Ecology*, 46, pp. 331-347.

15. Ramani, A., Rein, K., Shetty, K.G. and Jayachandran, K., 2012, ''Microbial Degradation of Microcystin in Florida's Freshwaters'', *Biodegradation*, 23, pp. 35-45.

16. Yang, L., Maeda, H., Yoshikawa, T. and Zhou, G., 2012, ''Algicidal Effect of Bacterial Isolates of *Pedobacter* sp. Against Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa"*, *Water Science and Engineering*, 5(4), pp. 375-382.

17. Yang, L., Hongyi, W., Komatsu, M., Ishibashi, K., Jinsan, L., Ito, T., Yoshibashi, T. and Maeda, H., 2012, ''Isolation and Characterization of Bacterial Isolates Algicidal Against a Harmful Bloom-forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*'', *Biocontrol Science*, 17(3) : pp. 107-114.

18. Zhao, S., Pan, W. and Ma, C., 2012. ''Stimulation and Inhibition Effects of Algae-lytic Products from *Bacillus cereus* Strain L7 on *Anabaena flos-aquae*'', *Journal of Applied Phycology*, 24, pp. 1015–1021.

19. Shao, J., Jiang, Y., Wang, Z., Peng, L., Luo, S., Gu, J. and Li, R., 2014, ''Interactions between Algicidal Bacteria and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: Lytic Characteristics and Physiological Responses in the Cyanobacteria'', *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11, pp. 469-476.

20. Kang, Y., Park, C. and Han, M., 2012, ''*Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14 a Useful Bacterium Capable of Lysis *Microcystis aeruginosa* cells and Degrading Microcystins'', *Journal of Applied Phycology*, 24, pp. 1517-1525.