

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
ABSTRACT	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ฎ
รายการอักษรย่อ	ฒ
บทที่ 1 บทนำ และวัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	3
2.1 การเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษ	3
2.2 สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรีย	11
2.3 วิธีการกำจัดไซยาโนแบคทีเรีย และสารพิษไมโครซิสติน	14
2.4 กลไกของแบคทีเรียในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย และย่อยสลายไมโครซิสติน	19
2.5 การตรึงเซลล์แบคทีเรีย	22
2.6 วัสดุแก้วพูน	25
2.7 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุในงานด้านสิ่งแวดล้อม	26
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	28
3.1 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	28
3.2 วิธีการวิจัย	31
บทที่ 4 ผลการวิจัย	41
4.1 การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นพิษด้วย <i>Bacillus</i> sp. AK3	41
4.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไมโครซิสตินของ <i>Bacillus</i> sp. AK3	47
4.3 การจัดจำแนกแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. AK3	50
4.4 การศึกษาการตรึงแบคทีเรียบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ	50

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5	การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียด้วยแบคทีเรียเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแก้วพรุน	53
4.6	การใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ ในการควบคุม <i>Microcystis</i> spp. และย่อยสลายไมโครซิสตินจากธรรมชาติ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร	56
บทที่ 5	อภิปรายผลการวิจัย	63
5.1	การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นพิษด้วย <i>Bacillus</i> sp. AK3	63
5.2	การย่อยสลายไมโครซิสตินด้วย <i>Bacillus</i> sp. AK3	68
5.3	การจัดจำแนกแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. AK3	70
5.4	การตรึงแบคทีเรียลงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ	71
5.5	การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียด้วยแบคทีเรียเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแก้วพรุน	72
5.6	การใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ ในการควบคุม <i>Microcystis</i> spp. และย่อยสลายไมโครซิสตินจากธรรมชาติ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร	73
บทที่ 6	สรุปผลการวิจัย	77
เอกสารอ้างอิง		79
ภาคผนวก		98
ภาคผนวก ก	สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ	99
ภาคผนวก ข	สารเคมีสำหรับทำไมโครซิสตินให้บริสุทธิ์	102
ภาคผนวก ค	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ 16s rRNA	104
ภาคผนวก ง	ตาราง และกราฟผลการทดลองเพิ่มเติม	106
ภาคผนวก จ	องค์ประกอบเคมีของแก้วพรุนแบบลอยน้ำ	116
ประวัติผู้เขียน		117

สารบัญตาราง

หน้า		
5	ตารางที่ 1	ระดับความรุนแรงของการเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษในแหล่งน้ำ ที่อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพ
12	ตารางที่ 2	สารพิษจากไซยาโนแบคทีเรีย ประเภทของสารพิษ และระดับความเป็นพิษ (LD ₅₀)
20	ตารางที่ 3	สารออกฤทธิ์จากแบคทีเรียที่สามารถควบคุมแพลงก์ตอนพืชได้
27	ตารางที่ 4	รายงานการใช้แบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุเพื่อควบคุมไซยาโนแบคทีเรียและไดอะตอม
45	ตารางที่ 5	ผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อประสิทธิภาพในการควบคุม <i>Cylindrospermopsis</i> sp. C013 ของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. AK3
46	ตารางที่ 6	ผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อประสิทธิภาพในการควบคุม <i>Dolichospermum</i> sp. C014 ของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. AK3
46	ตารางที่ 7	ผลของ pH และอุณหภูมิ ต่อประสิทธิภาพในการควบคุม <i>Microcystis</i> sp. C028 ของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. AK3
51	ตารางที่ 8	ลักษณะของวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ
62	ตารางที่ 9	การเปลี่ยนแปลงโดยเฉลี่ยของปัจจัยทางชีวภาพ เคมี และกายภาพบางประการ ภายในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร ในระยะเวลา 8 วัน
65	ตารางที่ 10	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ <i>Bacillus</i> sp. AK3 ในการควบคุมไซยาโนแบคทีเรีย กับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้
70	ตารางที่ 11	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ <i>Bacillus</i> sp. AK3 ในการย่อยสลายไมโครซิสติน กับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้
72	ตารางที่ 12	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์แบคทีเรียของวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ กับวัสดุตรึงเซลล์แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 13 ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของ BIOTAQ™ DNA polymerase	105
ตารางที่ 14 สภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ของยีน 16s rRNA	105
ตารางที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 27F และ 1492R	105
ตารางที่ 16 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของไซยาแบคทีเรียโดย <i>Bacillus</i> sp. AK3	106
ตารางที่ 17 จำนวนเซลล์ของ <i>Microcystis</i> sp. C028 เมื่อควบคุมด้วย ส่วนของเหลว (supernatant) และตะกอนเซลล์ (cell pellets) ของ <i>Bacillus</i> sp. AK3	106
ตารางที่ 18 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของ <i>Microcystis</i> sp. C028 เมื่อควบคุมด้วย ส่วนของเหลว (supernatant) และตะกอนเซลล์ (cell pellets) ของ <i>Bacillus</i> sp. AK3	107
ตารางที่ 19 จำนวนของ <i>Bacillus</i> sp. AK3 ที่เกาะติดบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ ในการทดลองแปรผันระยะเวลาในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย บนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ	109
ตารางที่ 20 จำนวนเซลล์ของ <i>Microcystis</i> sp. C028 ในการทดลอง ใช้ <i>Bacillus</i> sp. AK3 แบบเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูน ในการควบคุม <i>Microcystis</i> sp. C028	110
ตารางที่ 21 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของ <i>Microcystis</i> sp. C028 โดย <i>Bacillus</i> sp. AK3 แบบเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูน	110
ตารางที่ 22 จำนวนเซลล์ของ <i>Microcystis</i> sp. C028 เมื่อควบคุมด้วย แบคทีเรียเซลล์อิสระที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	111
ตารางที่ 23 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของ <i>Microcystis</i> sp. C028 เมื่อควบคุมด้วย แบคทีเรียเซลล์อิสระที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	111
ตารางที่ 24 จำนวนเซลล์ของ <i>Microcystis</i> spp. ระยะเวลา 8 วันของการทดลอง	112
ตารางที่ 25 ปริมาณ Chlorophyll- <i>a</i> ของ <i>Microcystis</i> sp. C028 ในระยะเวลา 8 วันของการทดลอง	112
ตารางที่ 26 ปริมาณ microcystin-RR ที่ละลายในน้ำ ในระยะเวลา 8 วันของการทดลอง	113

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 27 ปริมาณ microcystin-RR รวม ของ <i>Microcystis</i> spp. ในวันที่ 8 ของการทดลอง	113
ตารางที่ 28 จำนวนแบคทีเรียภายในน้ำ และภายในวัสดุแก้วพูน ในระยะเวลา 8 วันของการทดลอง	114
ตารางที่ 29 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของของยีนส์ 16s rRNA ของ <i>Bacillus</i> sp. AK3 ด้วยโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	114
ตารางที่ 30 องค์ประกอบเคมีของส่วนประกอบที่ใช้ในการผลิตแก้วพูนแบบลอยน้ำ	116

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	การก่อตัวของคราบไซยาโนแบคทีเรีย และการสะสมไมโครซิสตินในแหล่งน้ำ
ภาพที่ 2	การเจริญอย่างรวดเร็วของ <i>Microcystis</i> spp.
ภาพที่ 3	ปัจจัยที่ส่งเสริม และยับยั้งการเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำ
ภาพที่ 4	การเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษ และการปรากฏของสารพิษไมโครซิสตินในแหล่งน้ำทั่วโลก
ภาพที่ 5	การเจริญอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย และไมโครซิสตินในแหล่งน้ำของประเทศไทย
ภาพที่ 6	โครงสร้างทางเคมีของ microcystin-LR
ภาพที่ 7	การย่อยสลาย microcystin-LR โดยเอนไซม์จากแบคทีเรีย
ภาพที่ 8	การย่อยสลาย microcystin-RR โดยเอนไซม์จากแบคทีเรีย
ภาพที่ 9	วิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรีย
ภาพที่ 10	กระบวนการเกิดรูพรุนของแก้ว
ภาพที่ 11	การผลิตวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ
ภาพที่ 12	การทดสอบประสิทธิภาพของ <i>Bacillus</i> sp. AK3 ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพรุนแบบลอยน้ำ ในการควบคุม <i>Microcystis</i> spp. และย่อยสลายไมโครซิสตินจากธรรมชาติ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร
ภาพที่ 13	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุล ด้วย <i>Bacillus</i> sp. AK3
ภาพที่ 14	เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สกุล
ภาพที่ 15	ผลของส่วนของเหลว (supernatant) และตะกอนเซลล์ (cell pellets) ของ <i>Bacillus</i> sp. AK3 ต่อการเจริญของ <i>Microcystis</i> sp. C028
ภาพที่ 16	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ <i>Microcystis</i> sp. C028 โดยส่วนของเหลว (supernatant) และตะกอนเซลล์ (cell pellets) ของ <i>Bacillus</i> sp. AK3
ภาพที่ 17	ผลของ pH ต่อการเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. AK3 ในอาหาร BG-11

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 18	ผลของอุณหภูมิ ต่อการเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. AK3 ในอาหาร BG-11 45
ภาพที่ 19	ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง UV ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร ของสารที่แยกได้จาก ion-exchange chromatography 47
ภาพที่ 20	โครมาโทแกรม (chromatogram) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC 48
ภาพที่ 21	ร้อยละการย่อยสลายของ microcystin-RR โดย <i>Bacillus</i> sp. AK3 49
ภาพที่ 22	โครมาโทแกรม (chromatogram) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC แสดงการย่อยสลายของ microcystin-RR โดย <i>Bacillus</i> sp. AK3 และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น 49
ภาพที่ 23	phylogenetic tree ของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. AK3 จากการจัดจำแนกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA 50
ภาพที่ 24	วัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ 51
ภาพที่ 25	การสร้าง exopolysaccharide (EPS) ของ <i>Bacillus</i> sp. AK3 52
ภาพที่ 26	ผลของระยะเวลาในการตรึงเซลล์ ต่อจำนวนของแบคทีเรีย ที่ยึดเกาะบนวัสดุ (CFU/g) 52
ภาพที่ 27	จำนวนเซลล์ของ <i>Microcystis</i> sp. C028 เมื่อควบคุมด้วย แบคทีเรียเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแก้วพูน 53
ภาพที่ 28	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของ <i>Microcystis</i> sp. C028 เมื่อควบคุมด้วย แบคทีเรียเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุแก้วพูน 54
ภาพที่ 29	กราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์แบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. AK3 กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร 54
ภาพที่ 30	จำนวนเซลล์ของ <i>Microcystis</i> sp. C028 เมื่อควบคุมด้วย แบคทีเรียเซลล์อิสระในความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกัน 55
ภาพที่ 31	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของ <i>Microcystis</i> sp. C028 โดยแบคทีเรียเซลล์อิสระในความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกัน 55
ภาพที่ 32	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของ <i>Microcystis</i> spp. โดยแบคทีเรีย ที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร 56

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 33 จำนวนเซลล์ของ <i>Microcystis</i> spp. เมื่อควบคุมด้วยแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร	57
ภาพที่ 34 ปริมาณ chlorophyll- <i>a</i> ของ <i>Microcystis</i> spp. เมื่อควบคุมด้วยแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ ในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร	57
ภาพที่ 35 ปริมาณ microcystin-RR ในน้ำ ภายในระยะเวลา 8 วัน	58
ภาพที่ 36 ปริมาณ microcystin-RR รวมทั้งหมด จากภายในเซลล์ (intracellular) และภายนอกเซลล์ (extracellular) ในวันที่ 8 ของการทดลอง	59
ภาพที่ 37 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียภายในน้ำ และภายในวัสดุแก้วพูนในการควบคุม <i>Microcystis</i> spp. และย่อยสลายไมโครซิสตินโดยแบคทีเรียที่ตรึงบนวัสดุแก้วพูนแบบลอยน้ำ	60
ภาพที่ 38 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen) ภายในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร	61
ภาพที่ 39 ค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) และปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำ (total dissolved solids) ภายในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร	61
ภาพที่ 40 ค่าความเข้มแสง (light intensity) และอุณหภูมิของน้ำภายในคอลัมน์แก้วปริมาตร 10 ลิตร	62
ภาพที่ 41 โครมาโทแกรม (chromatogram) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC แสดงการย่อยสลายของ microcystin-RR	69
ภาพที่ 42 การเจริญเติบโตของ <i>Cylindrospermopsis</i> sp. C013, <i>Dolichospermum</i> sp. C014 และ <i>Microcystis</i> sp. C028 ในสภาวะที่มี pH ต่างกัน ในวันที่ 7 ของการทดลอง	107
ภาพที่ 43 การเจริญเติบโตของ <i>Cylindrospermopsis</i> sp. C013, <i>Dolichospermum</i> sp. C014 และ <i>Microcystis</i> sp. C028 ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่างกัน ในวันที่ 7 ของการทดลอง	108
ภาพที่ 44 กราฟการเจริญเติบโตของ <i>Bacillus</i> sp. AK3 ในอาหาร LB broth ที่อุณหภูมิห้อง	108
ภาพที่ 45 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ microcystin-RR กับพื้นที่ใต้ peak ของโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC	109

รายการอักษรย่อ

°C	องศาเซลเซียส
pH	ความเป็นกรด-ด่าง
MIB	2-methylisoborneol
DMS	Dimethyl Sulfide
DMTS	Dimethyl Trisulfide
LD ₅₀	Lethal Dose 50
COD	Chemical Oxygen Demand
DO	Dissolved Oxygen
TDS	Total Dissolved Solids
PBS	Phosphate Buffer Saline
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
PCR	Polymerase Chain Reaction
OD	Optical Density
EPS	Exopolysaccharide
CFU	Colony Forming Unit
ppm	part per million

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved