



ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจำเพาะต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกม  
น้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ในห้องปฏิบัติการ

Efficiency of Specific Bacteria to Control Growth of Blue Green Algae strain  
LmTK01 in Laboratory (*in vitro*)

กนกวรรณ มาเอียด

Kanokwan Maa-iad

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science in Aquatic Science

Prince of Songkla University

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์





ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจำเพาะต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกม  
น้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ในห้องปฏิบัติการ

Efficiency of Specific Bacteria to Control Growth of Blue Green Algae strain  
LmTK01 in Laboratory (*in vitro*)

กนกวรรณ มาเอียด

Kanokwan Maa-iad

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science in Aquatic Science

Prince of Songkla University

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์      ประสิทธิภาพของแบบที่เรียจำเพาะต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของ  
 สำหรับยีสี่เขี้ยวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ในห้องปฏิบัติการ  
 ผู้เขียน                นางสาวกนกวรรณ มาเอียด  
 สาขาวิชา              วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก


คณะกรรมการสอบ


.....  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธิญาภรณ์ แก้วทวี)

.....ประธานกรรมการ  
 (ดร. พุทธ ส่องแสงจินดา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธิญาภรณ์ แก้วทวี)

  
 .....  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มินตรา ศीलอุดม)

  
 .....กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มินตรา ศीलอุดม)

.....กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุทธพงษ์ สังข์น้อย)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
 ของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกกิง วงศ์ศิริโชติ)  
 รักษาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(3)

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธัญภรณ์ แก้วทวี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มินตรา ศีลอุดม)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....

(นางสาวกนกวรรณ มาเอียด)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวกนกวรรณ มาเอียด)

นักศึกษา

**วิทยานิพนธ์** ประสิทธิภาพของแบคทีเรียจำเพาะต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ในห้องปฏิบัติการ

**ผู้เขียน** นางสาวกนกวรรณ มาเอียด

**สาขาวิชา** วาริชศาสตร์

**ปีการศึกษา** 2565

### บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 มีการรายงานการค้นพบในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่มีผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมน้อย ทางภาคใต้ของประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาผลของปัจจัย อุณหภูมิ พีเอช และความเค็ม ต่อการเจริญเติบโตของ LmTK01 รวมถึงผลกระทบของ LmTK01 ต่ออัตราการรอดของลูกกุ้งขาวแวนนาไม จากนั้นจึงศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตของ LmTK01 ด้วยแบคทีเรียจำเพาะที่คัดแยกจากน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ผลการศึกษาพบว่า ลักษณะทางกายภาพของ LmTK01 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Limnothrix* มีลักษณะเป็นเส้นยาวไม่แตกแขนง ไม่มีเมือกหุ้มเซลล์ ปลายเซลล์มีลักษณะกลมมน มีช่องว่างระหว่างเซลล์ และร่างแหไทลาคอยด์มีการจัดเรียงตัวกันอย่างมีระเบียบ สามารถเจริญเติบโตภายใต้อุณหภูมิที่มีการควบคุม ( $28.00 \pm 1$  องศาเซลเซียส) มีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร เฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ  $0.611 \pm 0.02$  มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ สูงสุด เท่ากับ 97.78 ไมโครกรัมต่อลิตร สาหร่ายชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงพีเอชและความเค็มค่อนข้างกว้าง โดยมีการเจริญได้ดีที่สุดที่ พีเอช 8.00 และ ความเค็ม 15.00 ส่วนในพัน ตามลำดับ เมื่อทดลองเลี้ยงกุ้งขาวร่วมกับสาหร่ายที่ความหนาแน่นแตกต่างกันที่ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เท่ากับ 336.17, 703.70 และ 1,390.63 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า มีการตายของลูกกุ้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ในทุกชุดการทดลอง โดยพบว่า กุ้งที่ตายมีเซลล์ของสาหร่ายติดอยู่บริเวณยางค์ เหงือก และลำไส้ของกุ้ง แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายเข้าไปรบกวนกระบวนการหายใจและระบบการย่อยอาหารของกุ้งโดยตรง อีกทั้งยังส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำในระหว่างการเลี้ยงลดลง ในขณะที่ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเมื่อสาหร่ายมีการเพิ่มจำนวน

ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากการเก็บน้ำตัวอย่างในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยทำการทดสอบผลการยับยั้งการเจริญเติบโตกับสาหร่าย LmTK01 สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 53 ไอโซเลท

(6)

และพบว่า แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ LmTK01 ได้ดีที่สุดภายใน 7 วัน มี 5 ไอโซเลท ได้แก่ BP5, A2, A5, A7 และ HW5 ตามลำดับ โดย BP5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ LmTK01 ได้สูงถึง 99.94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง BP5 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง โคโลนิที่มีสีส้มครีม และมีการสร้างเอ็นโดสปอร์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า BP5 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Fictibacillus* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ LmTK01 ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $10^7 - 10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า BP5 มีความจำเพาะเจาะจงต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของ LmTK01 โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสาหร่ายชนิดอื่น ได้แก่ *Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ *Spirulina* sp. ตามลำดับ การทดสอบกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไอโซเลท BP5 ต่อการเจริญเติบโตของ LmTK01 พบว่า BP5 สร้างสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ LmTK01 ได้ถึง  $95.20 \pm 9.75$  เปอร์เซ็นต์ โดยพบซากเซลล์ของสาหร่ายที่แตกสลายหลังจากเลี้ยงในของเหลวที่ได้จากการเลี้ยง BP5 และยังพบว่า BP5 เป็นแบคทีเรียที่ไม่ส่งผลกระทบต่อตายของลูกกุ้ง เมื่อทำการเลี้ยงกุ้งด้วย BP5 และเมื่อทดลองเลี้ยงกุ้งร่วมกับ LmTK01 และ BP5 พบว่า ลูกกุ้งมีอัตราการรอดเท่ากับ  $76.67 \pm 11.15$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียและ LmTK01 จากผลการศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้ง ส่งผลกระทบต่อเชิงลบต่อกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการควบคุมปริมาณของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำสกุล *Fictibacillus* ไอโซเลท BP5 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ได้ดีที่สุด ไม่ส่งผลกระทบต่อสาหร่ายชนิดอื่นๆ และอัตราการรอดของกุ้งขาวแวนนาไม ดังนั้นความเป็นไปได้ในการควบคุมการเจริญเติบโตสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในการเลี้ยงกุ้ง โดยใช้แบคทีเรียจำเพาะที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ มีแนวโน้มช่วยเพิ่มอัตราการรอดตายและผลผลิตของกุ้ง



<b>Thesis Title</b>	Efficiency of Specific Bacteria to Control Growth of Blue Green Algae strain LmTK01 in Laboratory ( <i>in vitro</i> )
<b>Author</b>	Miss Kanokwan Maa-iad
<b>Major Program</b>	Aquatic Science
<b>Academic Year</b>	2022

### Abstract

Blue green algae known as cyanobacteria strain LmTK01 was observed blooming in white-leg shrimp ponds with low shrimp productivity in Songkhla province, Thailand. The objectives of this study were to investigate groups of algae and their physical characteristics and to determine how temperature, pH, and salinity affect the growth of LmTK01. The other objectives included determining the impact of LmTK01 on white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) survival rates and the effectiveness of certain bacteria isolated from shrimp pond water in controlling LmTK01 growth. Bacteria with algicidal activity for controlling the growth of LmTK01 were screened, isolated, and tested in shrimp/algae co-culturing systems to find out the fatal concentration and shrimp survival rate. The results revealed that the typically found in shrimp ponds, blue green algae LmTK01, was round at the cell's end, filamentous without branches, and lacking a mucous sheath. The morphology was like the cyanobacteria genus *Limnothrix*. There was an aerotrope between the cell and the thylakoid arrangement was a parietal structure. Under controlled temperature ( $28.00 \pm 1$  °C), the algae exhibited the fastest growth with the maximum optical density (OD, 680 nm.) of  $0.611 \pm 0.02$  and the highest amount of Chl *a* (97.78 microgram per milliliter). The algae can grow under a relatively wide range of pH and salinity, with optimum growth at pH 8.00 and salinity 15.00 ppt. Co-culturing of these algae at different concentrations (336.17, 703.70 and 1,390.63 microgram Chl *a* per liter) with

white-leg shrimp for 96 hours revealed more than 50% shrimp mortality in all treatments. The algal cells were found in the shrimp's appendages, such as legs, gills, and intestine. This shows that the algae directly interfere with the shrimp's respiratory and digestion system, lower the level of dissolved oxygen, and elevate pH.

Fifty-three strains of bacteria from aquaculture pond in Songkhla province were inoculated with LmTK01. It was found that five strains of bacteria were able to inhibit the growth of algae. The bacteria that inhibited algae growth within 7 days were BP5, A2, A5, A7 and HW5, respectively. BP5 showed the highest algicidal activity (99.94%). Endospore formation was also observed in this gram-positive, rod-shaped, creamy, orange-colored colony. The 16s rRNA gene demonstrated that BP5 belonged to the *Fictibacillus* genus that can inhibit the growth of LmTK01 at an initial concentration of  $10^7$  -  $10^8$  CFU/mL and without affecting other algae (*Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., and *Spirulina* sp.). BP5 indirectly affects the growth of LmTK01 ( $95.20 \pm 9.75\%$ ), indicated by remaining decomposed algal cells. Additionally, BP5 had no impact on the mortality of shrimp larvae. The effect of BP5 on LmTK01 and white-leg shrimp co-cultivation indicated that shrimp survival ( $76.67 \pm 11.15\%$ ) was not different from the control ( $P > 0.05$ ). In conclusion, the white-leg shrimp culture system provides ideal circumstances for cyanobacteria strain LmTK01 growth, which has a detrimental influence on the shrimp. This negative impact can be mitigated by utilizing bacteria taken from shrimp ponds, genus *Fictibacillus*, to suppress the growth of cyanobacteria genus *Limnothrix* strain LmTK01. The isolated bacteria BP5 had the highest algicidal activity and did not affect the survival rate of white shrimp or other microalgae. Therefore, the possibility to control cyanobacteria growth in shrimp culture by specific isolated bacteria. It will be promising to increase survival and product of shrimp.

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีฎาภรณ์ แก้วทวี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ได้ให้โอกาส คำปรึกษา คำแนะนำ และการช่วยเหลือในการดำเนินการศึกษาวิจัยเสมอมา ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มินตรา ศีลอุดม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และคำแนะนำ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น

ขอขอบพระคุณการสนับสนุนทุนการศึกษาและทุนวิจัยจากสาขาความเป็นเลิศการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน (DoE for Sustainable Aquaculture) และโครงการ Participatory and Integrative Support for Agricultural Initiative (PISAI) Project ภายใต้การสนับสนุนจาก ERASMUS +-Capacity Building in Higher Education Programme ในการสนับสนุนให้ข้าพเจ้าได้ร่วมเรียนรู้ในโครงการหลักสูตรปริญญาร่วมแบบสองปริญญา และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติมา ตันตีกิตติ ผู้อำนวยการสาขาความเป็นเลิศการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน (DoE for Sustainable Aquaculture) ที่พิจารณาสนับสนุนและให้โอกาสตลอดการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยส่วนหนึ่งจากศูนย์วิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 3 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 3 มา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุทธพงษ์ สังข์น้อย อาจารย์อานนท์ อุบลลัภย์ และคณาจารย์ บุคคลากรจากสาขาวิชาวาริชศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการทุกท่าน ที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ กำลังใจ และคอยอำนวยความสะดวก ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณคุณดาริยา เลิศอริยะพงษ์กุล เจ้าหน้าที่ประจำ โรงเพาะฟักลูกกุ้งท่าบอน บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) และคุณสมหญิง เขียรสุวรรณกุล ฟาร์มกุ้งพัฒนา อำเภอ สทิงพระ จังหวัดสงขลา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ตลอดจนอำนวยความสะดวกต่าง ๆ และศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์น้ำทะเลตลอดระยะเวลาในการดำเนินการทดลอง

ขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือ คอยให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจเสมอมา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณสุนิภา จันทร์แก้ว นักศึกษาปริญญาเอก ที่คอยให้คำแนะนำ เสียสละเวลา

และให้การช่วยเหลือตลอดการดำเนินการทดลอง และนายวัชรยศ ต้นไฟโรจน์ ที่คอยช่วยเหลือ เป็นกำลังใจให้แก่วันที่ต้องพบเจอกับปัญหา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่เข้าใจและเป็นกำลังใจให้อยู่เสมอ อีกทั้งยังให้การสนับสนุนและส่งเสริมในทุก ๆ ด้าน ทำให้ข้าพเจ้าอดทน และฟันฝ่าอุปสรรคต่าง ๆ จนประสบความสำเร็จในการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตในครั้งนี้

กนกวรรณ มาเอียด

2565

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(11)
สารบัญตาราง	(12)
สารบัญรูปภาพ	(14)
บทที่	
1. บทนำ	1
1 บทนำต้นเรื่อง	1
2. การตรวจเอกสาร	3
3. วัตถุประสงค์	25
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	26
1. วัสดุ	26
2. อุปกรณ์	26
3. วิธีการทดลอง	29
3. ผลการทดลอง	39
4. วิเคราะห์ผลการศึกษา	68
5. สรุปผลการศึกษา	80
บรรณานุกรม	83
ภาคผนวก	103
ประวัติผู้เขียน	109

### สารบัญตาราง

<b>Table 1.</b> Blue green algae toxins: their function and mechanism of action.	12
<b>Table 2.</b> Correlations (Pearson) between cyanobacteria and concentrations of two odorous compounds in tilapia pond.	16
<b>Table 3.</b> Quantities and types of odor-causing blue-green algae in integrated tilapia ponds.	16
<b>Table 4.</b> Lysis of blue green algae by different bacterial pathogens.	20
<b>Table 5.</b> Average length and width of trichomes and filamentous length of cyanobacteria strain LmTK01.	40
<b>Table 6.</b> Variation of pH in cyanobacteria strain LmTK01 cultivated at different temperatures.	44
<b>Table 7.</b> Variation of pH in cyanobacteria strain LmTK01 cultivated at 6 different pH levels for 10 days.	45
<b>Table 8.</b> Variation of pH in cyanobacteria strain LmTK01 cultivated at 7 different salinity levels for 10 days.	46
<b>Table 9.</b> Water qualities and survival rate of Pacific white shrimp cultured with cyanobacteria strain LmTK01 for 102 hours.	48
<b>Table 10.</b> Percentage of algicidal activity of 5 isolates of bacteria on the growth of cyanobacteria strain LmTK01 for 7 days.	52
<b>Table 11.</b> Morphology of 5 isolates bacteria, which showed strong inhibitory effect on cyanobacteria strain LmTK01.	54
<b>Table 12.</b> Homology of nucleotide sequences on 16S rRNA gene of BP5.	55
<b>Table 13.</b> Percentage of algicidal activity of BP5 at different cell densities on the growth of cyanobacteria strain LmTK01 for 5 days.	58
<b>Table 14.</b> Percentage of algicidal activity of BP5 on the growth of 6 types of microalgae for 5 days.	60

**สารบัญตาราง (ต่อ)**

<b>Table 15.</b> Percentage of algicidal activity of BP5 on the growth of cyanobacteria strain LmTK01 for 5 days.	63
<b>Table 16.</b> Survival rate of Pacific white shrimp cultured with cyanobacteria strain LmTK01 and BP5.	66
<b>Table 17.</b> Chlorophyll-a concentration of cyanobacteria strain LmTK01 cultured with Pacific white shrimp and BP5 for 10 days.	67

## สารบัญรูปภาพ

<b>Figure 1.</b> Physical characteristics of the cyanobacteria strain LmTK01 (Osci-TK01) under a 1000x magnification microscope.	2
<b>Figure 2.</b> Mortality characteristics of Pacific white shrimp fry cultured with blue green algae <i>Oscillatoria brevis</i> .	6
<b>Figure 3.</b> Chemical structure of anatoxin-a, anatoxin-a(s) and saxitoxin.	13
<b>Figure 4.</b> Effects of microcystin on the inhibition of protein phosphatases PP1 and PP2A and changes in hepatocellular structure, capillaries and hemorrhage.	14
<b>Figure 5.</b> Attacking modes of cyanobactericidal bacteria against cyanobacteria.	21
<b>Figure 6</b> Conceptual model summarizing the fate of a <i>Microcystis</i> cell during lytic action by <i>Bacillus mycooides</i> B16.	23
<b>Figure 7.</b> Mechanism of inhibition of <i>Anabaena</i> by <i>Saprospira</i> sp. strain PdY3.	24
<b>Figure 8.</b> Research process.	29
<b>Figure 9.</b> Micrographs of cyanobacteria strain LmTK01.	39
<b>Figure 10.</b> The morphology of cyanobacteria strain LmTK01	40
<b>Figure 11.</b> The growth of cyanobacteria strain LmTK01 at different factors for 11 days.	43
<b>Figure 12.</b> Survival rate of Pacific white shrimp and water qualities.	47
<b>Figure 13.</b> Mortality characteristics of Pacific white shrimp cultured with cyanobacteria strain LmTK01 at different density.	49
<b>Figure 14.</b> Effect of 5 isolates bacteria on growth inhibition of cyanobacteria strain LmTK01 for 7 days.	51
<b>Figure 15.</b> Gram stain of 5 isolates bacteria, which showed strong inhibitory effect on cyanobacteria strain LmTK01	53
<b>Figure 16.</b> Phylogenetic tree of BP5 based on the 16S rRNA gene sequence.	54



**สารบัญรูปภาพ (ต่อ)**

<b>Figure 17.</b> Growth inhibition of cyanobacteria strain LmTK01 cultured with BP5 at different cell densities for 5 days.	57
<b>Figure 18.</b> Effect of BP5 on the growth of 6 types of microalgae for 5 days.	59
<b>Figure 19.</b> Inhibition of growth of cyanobacteria strain LmTK01 by BP5 for 6 days.	62
<b>Figure 20.</b> Growth inhibition of cyanobacteria strain LmTK01 with BP5 under a microscope at 400x magnification.	62
<b>Figure 21.</b> Survival rate of Pacific white shrimp and chlorophyll-a during co-cultured with cyanobacteria strain LmTK01 for 10 days.	65
<b>Figure 22.</b> Specific effects of <i>Fictibacillus</i> sp. strain BP5 on growth control of cyanobacteria strain LmTK01.	81

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 บทนำต้นเรื่อง

การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยระบบความหนาแน่นสูง (Intensive system) ทำให้ปริมาณอาหารเหลือและของเสียจากการขับถ่ายสะสมอยู่ในบ่อเป็นจำนวนมาก เป็นปัจจัยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอนพืชในบ่อเลี้ยง (พจมาน และคณะ, 2549) และส่งผลกระทบต่อ การเลี้ยงกุ้งทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยเฉพาะการสะสมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) ซึ่งพบได้ทั่วไปในที่มีความชื้น ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม อีกทั้งพบอยู่ในดินและผิวดิน หรือแม้แต่ในหิมะหรือน้ำพุร้อน (ยุวดี, 2558) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดสามารถสร้างและปลดปล่อยสารพิษ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลอินทรีย์ (Rodgers, 2008) เช่น *Anabaena* spp., *Oscillatoria* spp., *Limnothrix* spp. *Microcystis* spp. และ *Nodularia* spp. เป็นต้น (Jiri, 2001) โดยสารพิษที่สร้างจากสาหร่ายกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ สารพิษที่มีผลต่อระบบประสาท (Neurotoxins) ด้วยการทำลายระบบประสาทของสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และสารพิษที่มีผลต่อตับ (Hepatotoxins) ด้วยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ส่งผลให้เกิดการทำลายของเซลล์ตับ (อรพิน และณัฐธา, 2546) ก่อให้เกิดผลเสียต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำลดลง อ่อนแอ และเสี่ยงต่อการติดเชื้อก่อโรค (Alonso and Páez, 2003) รวมถึงความปลอดภัยของอาหาร คุณภาพของผลผลิต และคุณภาพน้ำ (Rodgers, 2008) นอกจากนี้ยังมีการสร้างสารบางชนิด เช่น จีออสมิน และเอ็มไอปี ซึ่งก่อให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ในสัตว์น้ำ และทำให้รสชาติของอาหารเปลี่ยนไป (Newman, 2013) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Limnothrix* สายพันธุ์ LmTK01 (เดิมชื่อ Osci-TK01) หรือที่ชาวบ้านเรียกว่า สาหร่ายขนแมวเป็นสาหร่ายชนิดใหม่ที่พบการสะสมในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลที่ให้ผลผลิตกุ้งน้อย โดยช่วงที่พบความหนาแน่นเซลล์สาหร่ายสูงสุดมีค่า  $1507.79 \pm 210.20$  ( $\times 1000$  ฟิลาเมนต์ต่อลิตร) มีลักษณะเป็นเส้นยาว ตรีโคเมตร ประกอบด้วยเซลล์เรียงต่อกันเป็นสาย เจริญเติบโตได้ในช่วงความเค็มกว้างที่พีเอชระหว่าง 8.20 - 9.63 และเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น (สีญาภรณ์, 2557)



**Figure 1.** Physical characteristics of the cyanobacteria strain LmTK01 (Osci-TK01) under a 1000x magnification microscope.

**ที่มา:** ธีญาภรณ์ (2557)

การกำจัดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในแหล่งน้ำสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ แต่บางวิธีต้องใช้ต้นทุนสูง และอาจทำให้เกิดการปลดปล่อยสารพิษลงสู่แหล่งน้ำเพิ่มมากขึ้น การนำแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาใช้ในการกำจัดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการแก้ไขปัญหาโดยอาศัยกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (Chorus and Bartram, 1999) เช่น แบคทีเรีย WMK06 ที่คัดแยกจากแหล่งน้ำและตะกอนดินจากอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธาราและคูเมืองเชียงใหม่ สามารถใช้ควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Dolichospermum* sp. AARL C014 และ *Microcystis* sp. AARL C028 และยังช่วยลดปริมาณสารพิษ microcystin-LR ได้ (ณัฐวุฒิ และจිරพร, 2558) สารสกัดของแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* sp. สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Microcystis aeruginosa* ได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 7 วัน (Liu *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียชนิด *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ p52 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Microcystis*, *Anabaena* และ *Nodularia* ได้ (Wang *et al.*, 2013)

ดังนั้นการใช้แบคทีเรียควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม จึงเป็นวิธีทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและมีความเป็นไปได้ ในการนำแบคทีเรียที่คัดแยกจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมาควบคุมหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ซึ่งเป็นชนิดที่เกิดการสะสมพิษในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล แล้วส่งผลให้ผลผลิตกุ้งในบ่อลดลง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเลี้ยงกุ้งให้ประสบความสำเร็จต่อไป

## 1.2 ตรวจสอบเอกสาร

### 1.2.1. กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นกุ้งทะเลชนิดหนึ่งที่มีการนำเข้ามาจากต่างประเทศเพื่อทดแทนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ประสบปัญหาโรคระบาด เนื่องจากกุ้งขาวเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่ายโตไวให้ผลผลิตสูง และมีการปรับปรุงสายพันธุ์มาเป็นเวลานาน อีกทั้งยังเป็นสินค้าอาหารทะเลที่ต้องการของตลาดโลก ผู้ประกอบการสามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีความหลากหลายออกสู่ตลาดเพื่อเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับสินค้าได้อีกด้วย (ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย, 2560) ประเทศไทยติดอันดับหนึ่งในห้าประเทศของเอเชียที่มีผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงมากที่สุด โดยมีกำลังผลิต 1.28 ล้านตันของผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในเอเชียในปี 2555 รวมทั้งเป็นผู้นำในด้านส่งออกสินค้าสัตว์น้ำมากที่สุด และเป็นประเทศหลักที่ส่งออกกุ้งขาวแวนนาไมสู่ตลาดในประเทศสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น (FAO, 2012 อ้างโดย จริยาวดี, 2557) ในช่วง 3 เดือนแรกของปี 2565 ผลผลิตกุ้งทะเลได้แก่ กุ้งขาวแวนนาไม และกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงแบบพัฒนามีผลผลิตรวม 50,760.08 ตัน โดยแบ่งเป็นกุ้งขาวแวนนาไม 46,327.03 ตัน (91.27 เปอร์เซ็นต์) และกุ้งกุลาดำ 4,433.05 ตัน (8.73 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเมื่อเทียบกับช่วงเวลาเดียวกันของปีก่อนพบว่า ผลผลิตกุ้งเพิ่มขึ้นทุกพื้นที่ รวมถึงราคาผลผลิตกุ้งเฉลี่ยปรับตัวเพิ่มขึ้นและมีเสถียรภาพมากกว่าปีก่อน การส่งออกกุ้งขาวแวนนาไมในช่วง 3 เดือนแรกของปี 2565 มีปริมาณการส่งออก 20,522.07 ตัน หรือคิดเป็น 64.45 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการส่งออกกุ้งทะเลทั้งหมด โดยตลาดส่งออกที่สำคัญ คือ ญี่ปุ่น 31.17 เปอร์เซ็นต์ สหรัฐอเมริกา 28.71 เปอร์เซ็นต์ จีน 12.36 เปอร์เซ็นต์ และประเทศอื่น ๆ 27.76 เปอร์เซ็นต์ (พัชรินทร์, 2565)

รูปแบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงแบบหนาแน่นสูง จึงมักพบปัญหาการเพิ่มจำนวนสาหร่ายอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นปัญหาที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง สาเหตุการสะสมของแพลงก์ตอนพืชในแหล่งน้ำส่วนหนึ่งมาจากปริมาณของแร่ธาตุในแหล่งน้ำ เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญแก่แพลงก์ตอนพืช มักพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสกุล *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* และ *Phormidium* ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำและคุณภาพดิน บางชนิดสร้างสารพิษที่อาจเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ หรือเข้าไปติดตามเหนือกรบวงจรของสัตว์น้ำ ส่งผลทำให้เกิดกลิ่นโคลนหรือกลิ่นไม่พึงประสงค์ ซึ่งกลิ่นดังกล่าวไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและ

ต่างประเทศ (จรียาวดี และชนัดดา, 2560; Reddy and Mastan, 2011; Ruangrit *et al.*, 2011; Tayaban *et al.*, 2018)

### 1.2.2 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green algae)

#### 1) ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) จัดอยู่ใน Division Cyanophyta กำเนิดมาก่อนสาหร่ายกลุ่มอื่น ๆ และมีความคล้ายคลึงกับพวกโพรแคริโอต เพราะไม่มีเยื่อหุ้มอแกเนลล์ ได้แก่ นิวเคลียส, ไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ โครงสร้างบางส่วนคล้ายกับแบคทีเรียแกรมลบ มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายแบคทีเรีย และมีสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ แต่ในสาขาสาหร่ายวิทยามีการจัดกลุ่มของสาหร่ายกลุ่มนี้แยกจากแบคทีเรีย เนื่องจากสาหร่ายกลุ่มนี้มีคลอโรฟิลล์ เอ สามารถสังเคราะห์แสงได้เหมือนพืชและมีสีเขียวน้ำเงิน (photosynthetic pigments) มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์ (binary fission) มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ มีบทบาทในการหมุนเวียนวัฏจักรสาร และมีความสำคัญกับโครงสร้างและความหลากหลายทางชีวภาพของแหล่งน้ำ บางชนิดช่วยลดแก๊สไนโตรเจน ( $N_2$ ) และคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ ) สาหร่ายบางชนิดสามารถเปลี่ยนรูป  $N_2$  ให้อยู่ในรูปของ  $NH_3$  ได้ ลักษณะของเซลล์มีทั้งเซลล์เดี่ยว โคลนี และเส้นสาย ปกคลุมด้วยเปลือกหรือเมือก สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถพบได้ทั่วไปในที่มีน้ำขุ่น ทั้งในดินและแหล่งน้ำต่าง ๆ เช่น น้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม หรือแม้แต่ในหิมะหรือน้ำพุร้อน ปัจจัยด้านสารอาหารหรือสภาพแวดล้อมส่งผลให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีการผลิตสารพิษต่าง ๆ ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ (ยูวดี, 2558; สรฉัตร, 2559) บริเวณที่เกิดการสะสมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เรียกว่าเขต Dead Zone หรือเขตที่มีปริมาณออกซิเจนน้อยเกินกว่าที่จะมีสิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่ได้ (Newman, 2013)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิดที่พบทางตอนใต้และตะวันออกเฉียงใต้ตามแนวชายฝั่งของสหรัฐอเมริกาทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติที่ไม่พึงประสงค์ในน้ำและสัตว์น้ำ บางชนิดสามารถปล่อยสารพิษเมื่อเกิดการตายหรือเกิดการทับถมบริเวณพื้นบ่อหลังการตาย เมื่อกักกินสัตว์น้ำดินจึงได้รับสารพิษเข้าไป สารพิษจะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียในธรรมชาติและจะไม่ทำให้เกิดผลกระทบทางชีวภาพ แต่สารพิษบางชนิดที่ยังคงอยู่ในแหล่งน้ำอาจจะส่งผลกระทบต่อทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อ

สัตว์น้ำ อีกทั้งยังสร้างสารประกอบที่มีกลิ่นคล้ายดินหรือโคลน ซึ่งกุ้งสามารถดูดซึมเข้าไปในเนื้อได้ หรือกินเข้าไปโดยตรง ทำให้เนื้อกุ้งมีกลิ่นโคลน (Newman, 2013)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดอย่าง *Anabaena* และ *Microcystis* สามารถผลิตสาร microcystins หรือ cyanobacterin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น สารปฏิชีวนะ (antibiotic) หรือ แอลลีโลพาติก (allelopathic substance) ซึ่งสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายและพืชชั้นสูงได้ (สุนิรัตน์ และคณะ, 2556) สารพิษเหล่านั้นยังเป็นพิษต่อ สัตว์น้ำ สัตว์ป่า ปศุสัตว์ และมนุษย์ โดยการสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำหลาย ๆ ด้าน เช่น ยับยั้งการทำงานของระบบประสาทที่ควบคุมกล้ามเนื้อ ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรงและเป็นอัมพาตในที่สุด ยับยั้งเอนไซม์ที่สำคัญที่สร้างจากตับทำให้ระบบการย่อยอาหารไม่สมบูรณ์ ยับยั้งขบวนการลอกคราบของกุ้งทำให้กุ้งมีอาการเปลือกนึ่มและทยอยตาย (Robarts and Zohary, 1987)

## 2) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสกุล *Oscillatoria*

สาหร่ายในสกุล *Oscillatoria* ลักษณะเป็นเส้นสายเหยียดตรงหรือเป็นเกลียวเล็กน้อย ไม่แตกแขนง มีเซลล์เรียงต่อกันเป็นแถวยาวเรียกว่า ไตรโครม (trichome) เซลล์มีขนาดกว้างสม่ำเสมอตลอดสาย เซลล์ยอด (apical cell) มีลักษณะกลมมน ไม่มีเมือกหุ้ม อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มหนาแน่น เคลื่อนไหวแบบถอยหน้าถอยหลังหรือแกว่งซ้ายขวา ไม่มีเซลล์ Heterocysts หรือสปอร์ (กาญจนภานันท์, 2527) จึงไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ และไม่มีการสร้าง akinetes เซลล์สืบพันธุ์เรียกว่า Hormogonium เซลล์ Hormogonia ที่หลุดออกจากเซลล์แม่จะล่องลอยไปที่อื่นและสร้าง ไตรโครมอันใหม่ขึ้นมา สามารถผลิตสารพิษ Anatoxin-a ที่ส่งผลต่อระบบประสาท (neurotoxins) พบได้ในแหล่งน้ำนิ่ง น้ำไหลเอื่อย บนผิวดินที่ชื้นหรือแม้กระทั่งน้ำพุร้อน (ยุวดี, 2558) และพบได้ทั่วไปตามบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีความเค็มต่ำ โดย *Oscillatoria* ที่ความหนาแน่น 1,000 - 10,000 พิลาเมนต์ต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้อัตราการรอดของลูกกุ้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Massaut, 2003)



**Figure 2.** Mortality characteristics of Pacific white shrimp fry cultured with blue green algae *Oscillatoria brevis*.

ที่มา: Massaut (2003)

### 1.2.3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิดสามารถเจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็วหากอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมโดยเฉพาะในน้ำนิ่ง และจะลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำจนมองเห็นพื้นน้ำเป็นสีเขียว เรียกว่า สกัม (scum) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในแหล่งน้ำ ได้แก่ *Microcystis aeruginosa*, *Anabaenopsis elekinii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Nodularia spumigena*, *Anabaena catenula*, *Anabaena circinalis*, *Anabaena levandi*, *Spirulina platensis*, *Oscillatoria agardhii*, *Oscillatoria prolifica*, *Lyngbya limnetica* และ *Lyngbya hieronymusii* เป็นต้น ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ได้แก่ แสง พีเอช อุณหภูมิ สารอาหาร และความเค็ม เป็นต้น (ศิริประภา, 2553; Boyd, 2009; Xing *et al.*, 2019)

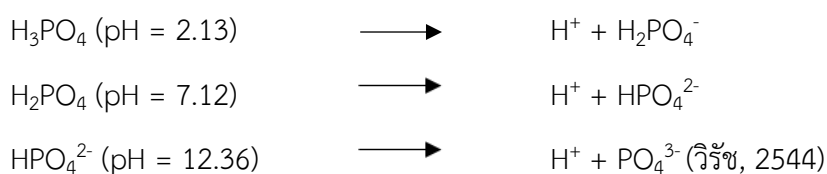
การเพิ่มจำนวนของสาหร่ายในแหล่งน้ำมีทั้งแบบที่สามารถปลดปล่อยสารพิษและไม่ปลดปล่อยสารพิษ ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของชนิดสาหร่าย แต่ไม่สามารถแยกแยะได้แน่ชัดหากอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน (Rodgers, 2008) ถึงแม้ว่าสาหร่ายเหล่านั้นจะเป็นสกุลเดียวกันที่แยกมาจากแหล่งน้ำเดียวกัน มีจำนวนชนิดของสารไมโครซิสตินเท่ากัน แต่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่างกัน ก็มีความเป็นพิษแตกต่างกัน โดยมีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (สุจิตา, 2556) ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย มีดังนี้

### 1) ความยาวคลื่นแสง (Wavelength) และความเข้มแสง (Intensity)

แสงหรือความเข้มแสงมีอิทธิพลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (WHO, 1999) ความเข้มแสงในน้ำขึ้นอยู่กับ สถานที่ ฤดูกาล เวลาในรอบวัน ระดับความลึกของน้ำ สี ความขุ่น และปริมาณเกลือแร่ที่ละลายอยู่ในน้ำ (สุริดา, 2556) Gaidukov ได้ตั้งสมมติฐานว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความสามารถในการเปลี่ยนสีได้ ขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นแสง (wavelength) และความเข้มแสง (intensity) ที่ได้รับ เรียกว่า “Gaidukov phenomenon” ซึ่งทดลองกับ *Oscillatoria* พบว่า เมื่อเลี้ยงไว้ในแสงสีเขียวจะไปกระตุ้นรงควัตถุสีแดง คือ ไฟโคอิริทริน (phycoerythrin) และแสงสีแดงจะไปกระตุ้นรงควัตถุสีน้ำเงิน คือ ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) และเมื่อนำไปเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มแสงมาก *Oscillatoria* จะมีสีน้ำเงิน แต่ถ้าความเข้มของแสงน้อยจะเป็นสีแดง ดังนั้นแสงสีต่างกันจะทำให้สีของสาหร่ายต่างกันไปด้วย เนื่องจากแสงสีต่างกันทำให้ปริมาณรงควัตถุที่เซลล์สร้างขึ้นมามีมากน้อยต่างกันไป และยังพบอีกว่าเมื่อแสงเพิ่มมากขึ้นการเคลื่อนไหวของสาหร่ายจะมากขึ้นตามไปด้วย (Desikachary, 1959 อ้างโดย กาญจนภาชน์, 2527)

### 2) ความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรดต่างมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟอสเฟต เมื่อความเป็นกรดต่างสูงขึ้น จะส่งผลให้ปริมาณของฟอสเฟตเพิ่มขึ้นด้วย ปฏิกิริยาการแตกตัวของ  $H_3PO_4$  เมื่ออยู่ในสภาพกรดต่างสูงต่ำฟอสเฟตก็จะอยู่ในรูป  $H_2PO_4^-$  และเมื่อสภาพกรดต่างอยู่ในระดับปานกลางฟอสเฟตก็จะอยู่ในรูปของ  $HPO_4^{2-}$  และเมื่อค่าสภาพกรดต่างสูงจะอยู่ในรูปของ  $PO_4^{3-}$  ดังสมการ



ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอยู่ในช่วง 6.00 - 9.00 ซึ่งที่พีเอช 10.00 หรือสูงกว่านั้นจะส่งผลให้ค่าการสังเคราะห์แสงลดลง โดยแหล่งน้ำที่พบการสะสมของ *M. aeruginosa* มีพีเอชอยู่ในช่วง 7.50 - 9.50 และสูงสุดที่พีเอช 10.50 (Fang et al., 2018) *Synechocystis* ที่เลี้ยงในสภาวะพีเอช 11 พบการลดลงของน้ำหนักรวม ปริมาณไฟโคไซยานิน และไขมัน (Touloupakis et al., 2016) นอกจากนี้ค่าพีเอชในน้ำยังส่งผลต่อการละลายของธาตุอาหาร และลักษณะทางกายภาพของสาหร่าย (Rubban et al., 2014) โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อ *Hapalosiphon* sp. อยู่ในช่วง 9.06 - 9.38 (ณัฐฐา และคณะ, 2553) สอดคล้อง



กับกาญจนภาชน์ (2527) กล่าวว่า การเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอนอย่างรวดเร็วมักพบในช่วงที่น้ำมีความเป็นด่างสูง ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 7.80 - 11.00 มีปริมาณสารอินทรีย์ที่ละลายในน้ำสูง 10.00 - 15.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

### 3) อุณหภูมิ (Temperature)

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในน้ำ มีผลทำให้แพลงก์ตอนมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในปริมาณที่แตกต่างกัน (ยูธากรณ, 2545) อุณหภูมิของน้ำในสิ่งแวดล้อมสามารถเพิ่มสูงถึง 10.00 - 30.00 องศาเซลเซียส ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในช่วงหน้าร้อนจะพบการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมากที่สุด (Davis *et al.*, 2009) และยังพบอีกว่าอุณหภูมิที่แตกต่างกันมีผลต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการศึกษาของ สุนีรัตน์ (2549) เเพาะเลี้ยง *Nostoc commune* ในอุณหภูมิที่แตกต่างกันภายใต้อุณหภูมิ 15.00, 20.00, 25.00, 30.00, 35.00 และ 40.00 องศาเซลเซียส พบว่า ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (9.7 ไมโครกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ปริมาณคลอโรฟิลล์ ( $8.1 \pm 0.3$  มิลลิกรัมต่อลิตร) และน้ำหนักรวม ( $1.36 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร) ของสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25.00 องศาเซลเซียส มีปริมาณสูงที่สุด และต่ำที่สุดที่ 15.00 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในกลุ่ม *Anabaena*, *Oscillatoria* และ *Microcystis* อยู่ระหว่าง 25.00 - 35.00 องศาเซลเซียส (Sevrin-Reyssac and Pletikovic, 1990) เช่นเดียวกับ *Arthrospira platensis* มีปริมาณไฟโคไซยานิน และอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดที่อุณหภูมิ 28.00 องศาเซลเซียส รองลงมาเป็นอุณหภูมิ 29.00 และ 30.00 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Mohite and Wakte, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นการเคลื่อนไหวของสาหร่ายก็เพิ่มขึ้น (กาญจนภาชน์, 2527) และยังเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อ metabolic activity และการสังเคราะห์กรดไขมัน (Xin *et al.*, 2011)

### 4) สารอาหาร (Nutrients)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความต้องการสารอาหารสูงกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่น ๆ มักพบในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำเนื่องจากในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการให้อาหารตลอดระยะเวลาการเลี้ยง อาหารสัตว์ที่ใช้ประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุ ซึ่งโปรตีนในอาหารสัตว์ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 50.00 - 55.00 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 6.50 - 7.50 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจน 21.50 - 23.50 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน 15.50 - 18.00 เปอร์เซ็นต์ และซัลเฟอร์ 0.50 -

2.00 เปอร์เซ็นต์ (Lovell, 1989) สารอาหารที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ได้แก่ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืช โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียม ( $\text{NH}_4^+$ ) แอมโมเนีย ( $\text{NH}_3$ ) ไนไตรท์ ( $\text{NO}_2^-$ ) ไนเตรท ( $\text{NO}_3^-$ ) และสารประกอบอินทรีย์ เช่น ยูเรีย อีกทั้งยังตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศได้โดยตรง สำหรับไนโตรเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลส่วนใหญ่มาจากการขับถ่ายของกุ้งหรืออาหารเหลือในบ่อ ซึ่งจะสะสมอยู่ตามพื้นบ่อในรูปของสารอินทรีย์ และมาจากปุ๋ยที่เกษตรกรใช้ในการสร้างสีน้ำ หรือสร้างอาหารธรรมชาติ (จรรยาดี, 2557) ทำให้ *Microcystis* sp. เพิ่มจำนวนมากขึ้นและจะไปกุดการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชชนิดอื่น (Paerl and Tucker, 1995)

นอกจากไนโตรเจนแล้วยังมีฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารอีกหนึ่งชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืช เพราะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการถ่ายเทพลังงาน และกระบวนการสร้างกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ฟอสฟอรัสที่แพลงก์ตอนและแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้โดยตรง ได้แก่ ออร์โธฟอสฟอรัส (orthophosphorus) (Correll, 1988) แพลงก์ตอนพืชใช้ออร์โธฟอสฟอรัสในการสร้างพลังงานในกระบวนการ phosphorylation, oxidative phosphorylation และ photophosphorylation ดังสมการ



แหล่งน้ำที่มีออร์โธฟอสเฟตที่ความเข้มข้นเพียง 0.23 ส่วนในล้าน ก็ทำให้เกิดการสะพรั่งของ *Microcystis* sp. ได้ (Robarts and Zohary, 1987) อีกทั้งยังเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับแพลงก์ตอนพืชกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศได้เอง โดยเฉพาะแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มที่สร้างพิษ ได้แก่ *Oscillatoria* และ *Microcystis* ซึ่งแพลงก์ตอนพืชกลุ่มนี้มีการเจริญเติบโตแปรผันตรงกับปริมาณฟอสฟอรัสในน้ำ (Oh *et al.*, 2000) สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุธิดา (2556) ศึกษาการสะสมสารพิษไมโครซิสติน-แอลอาร์ ในกัวโนพะเยาพบว่า ปริมาณของ *Microcystis aeruginosa* Kütz และ *Microcystis wesenbergii* Kom มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าออร์โธฟอสเฟตอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยช่วงที่มีปริมาณออร์โธฟอสเฟตสูงที่สุดเป็นช่วงเดียวกับที่

*Microcystis* spp. มีปริมาณมากที่สุด และพบโคโลนีอย่างหนาแน่นบริเวณผิวน้ำในช่วงเก็บตัวอย่าง

#### 5) ความเค็ม (Salinity)

ระดับของความเค็มที่ต่างกันมีผลต่อการกระจายของสาหร่าย (ยูธากรณ์, 2545) สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถทนอยู่ในสภาวะที่ความเค็มสูงได้ เรียกกลุ่มของสาหร่ายที่ชอบความเค็มว่า Halophilic algae ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และไดอะตอม โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสาหร่ายที่พบมากที่สุดใสภาพแวดล้อมที่มีความเค็ม และเจริญเติบโตได้ในช่วงความเค็มที่กว้าง (สิริแซ และคณะ, 2550) เช่น *Chaetomorpha* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงความเค็ม 0.00 - 37.00 ส่วนในพัน (Jagadeesan *et al*, 2012) Rafiqul และคณะ (2003) รายงานว่า *Spirulina fusiformis* เจริญเติบโตได้ในช่วงกว้างของความเค็ม ซึ่งขึ้นอยู่กับกลไกทางกายภาพ รวมถึงปริมาณของสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ที่แพร่เข้าสู่เซลล์ (osmoregulation) โดย *S. platensis* จะปรับตัวที่ระดับความเค็มต่าง ๆ ทำให้ค่า carbohydrate metabolism เพิ่มสูงขึ้น เมื่อความเค็มสูงจะมี biomass และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลงหรือช้าลง เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการหายใจถูกยับยั้ง ซึ่งเกิดจากการแพร่ของโซเดียมเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว เป็นผลมาจากการแยกตัวของไฟโคบิลิโซมออกจากเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ นอกจากนี้ยังพบว่า ความเค็มสูงจะมีค่าคลอโรฟิลล์และปริมาณโปรตีนต่ำ (Vonshak *et al.*, 1996) สาหร่ายขนาดเล็กหลายสายพันธุ์สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มได้ แต่องค์ประกอบทางเคมีจะเปลี่ยนไป เช่น ปริมาณโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โดยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตจะมีค่าสูงสุดที่ความเค็ม 25.00 และ 30.00 ส่วนในพัน ในช่วง stationary phase (ณิษา และ อมรรัตน์, 2563)

### 1.2.4 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สร้างสารพิษ

#### 1) สารพิษที่สร้างจากสาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน

สารพิษที่สาหร่ายพิษสีเขียวแกมน้ำเงินผลิตขึ้นมาเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างและสลายเซลล์ เป็นสารที่ไม่เกี่ยวข้องต่อการเจริญเติบโต ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงในการผลิตสารพิษของสาหร่าย แต่คาดว่าสารพิษนี้สร้างขึ้นเพื่อเป็นสารป้องกันตัว (protective compound) มีลักษณะเป็นแบบอัลลีโลพาธี (allelopathy) สาหร่ายบางชนิดสามารถสร้างสารพิษได้มากกว่า 1 ชนิด โดยสารพิษจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินประกอบด้วย 3 กลุ่ม ได้แก่ Cyclic peptide, Alkaloid และ Lipopolysaccharide (LPS) (Table 1) สารพิษเหล่านี้มีผลต่ออวัยวะเป้าหมายที่แตกต่างกันออกไป เช่น ตับ ระบบประสาท เซลล์ และ gastrointestinal ก่อให้เกิดการอักเสบที่ระบบช่องท้อง (สุธิตา, 2556)

World Health Organization (WHO) (1998) กำหนดให้ร่างกายของมนุษย์รับสารไมโครซิสตินได้ไม่เกิน 0.04 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวต่อกิโลกรัมต่อวัน สำหรับแหล่งน้ำดื่ม ปริมาณของสารไมโครซิสติน-แอลอาร์ (microcystin-LR) ถูกกำหนดไว้ไม่เกิน 1.00 ไมโครกรัมต่อลิตร และจำนวนเซลล์ของสาหร่ายได้ไม่เกิน 20,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ National Health and Medical Research Council Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand (NHMRC) ประเทศออสเตรเลียได้กำหนดปริมาณของสารไมโครซิสติน-แอลอาร์ในแหล่งน้ำไม่เกิน 1.30 ไมโครกรัมต่อลิตร และสำหรับประเทศไทย Peerapornpisal และคณะ (2002) กล่าวว่าแหล่งน้ำในประเทศควรใช้มาตรฐานตามองค์การอนามัยโลก คือ มีสารไมโครซิสติน-แอลอาร์ ไม่เกิน 1.00 ไมโครกรัมต่อลิตร

**Table 1.** Blue green algae toxins: their function and mechanism of action.

Toxin group	Toxin	Primary target	
		organ in mammals	Taxon
Cyclic peptide	Microcystins	Liver	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Nostoc</i>
	Nodularins	Liver	<i>Nodularia</i>
Alkaloids	Anatoxin-a	Nerve synapse	<i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Aphanizomenon</i>
	Anatoxin-a (s)	Nerve synapse	<i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> ( <i>Oscillatoria</i> ), <i>Aphanizomenon</i>
	Aplysiatoxins	Skin	<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Planktothrix</i>
	Cylindrospermopsins	Liver	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Umezakia</i>
	Lyngbyatoxin-a	Skin-gastrointestinal tract	<i>Lyngbya</i>
	Saxitoxins	Nerve axons	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i>
Lipopolysaccharide (LPS)	LPS	Potential irritant; affects any exposed tissue	All Cyanophyceae

ที่มา: Mankiewicz และคณะ (2003)

ผลกระทบจากการได้รับสารพิษที่สร้างจากสาหร่ายกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

### 1.1) สารพิษที่มีผลต่อระบบประสาท (Neurotoxins)

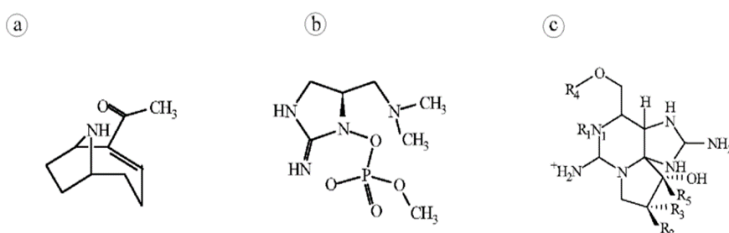
Neurotoxins เป็นโมเลกุลของสารอินทรีย์ที่สามารถทำลายระบบประสาทของสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สร้างสารพิษชนิดนี้ได้แก่ จีโนส *Anabaena* sp. และ จีโนส *Oscillatoria* sp. โดยการผลิตสารพิษที่ส่งผลต่อระบบประสาท (neurotoxins) ก่อให้เกิดอาการชาที่ริมฝีปาก นิ้วมือ นิ้วเท้า และเวียนศีรษะ อีกทั้งยัง

พบว่า น้ำดื่มที่มีการเจือปนสาหร่ายชนิดนี้จะทำให้กลิ่นและรสชาติของน้ำเปลี่ยนไป (ยุวดี, 2558) Neurotoxins สร้างสารพิษต่อระบบประสาทได้ 3 ชนิด ดังนี้

- Anatoxin-a ยับยั้งการส่งสัญญาณที่เชื่อมต่อกับกล้ามเนื้อ (Rodgers, 2008) Anatoxin-a จะไปจับกับ acetylcholine receptor เหมือน acetylcholine (ACh) ปกติ ACh จะถูกทำลายด้วย acetylcholinesterase (AChE) ยับยั้งการทำงานของ post synaptic depolarization เกิดการ over stimulation ของกล้ามเนื้อ และเกิด muscle twitching และ cramp ในช่วงแรก ออกฤทธิ์ที่รอยต่อระหว่างประสาทกับกล้ามเนื้อ (neuromuscular junction) ส่งผลให้เกิดกล้ามเนื้ออ่อนแรง (paralysis) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สร้าง anatoxin-a ได้แก่ กลุ่ม *Anabaena* sp. และ *Oscillatoria* sp. (ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี, 2542)

- Anatoxin-a (s) ยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase (Rodgers, 2008) anatoxin-a (s) มีที่มาจาก salivation บ่งบอกถึงอาการของสัตว์ที่ได้รับพิษเข้าไปจะมีการหลั่งน้ำลายออกมาจำนวนมาก โดย anatoxin-a (s) จะไปจับกับ AChE ทำให้ AChE ทำลาย ACh ที่หลั่งออกจากปลายประสาทไม่ได้ เกิด over stimulation ของปลายประสาททำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรง ซึ่งจะออกฤทธิ์ที่ neuromuscular junction เหมือนกับ anatoxin-a (ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี, 2542) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สร้าง anatoxin-a (s) ได้แก่ กลุ่ม *Anabaena* sp. *Oscillatoria* sp. และ *Aphanizomenon* sp. (Mankiewicz et al., 2003)

- Saxitoxin และ Neosaxitoxin ยับยั้งการถ่ายเท Sodium ion ผ่าน Sodium channels ทำให้การส่งกระแสประสาทถูกยับยั้งไปด้วย นอกจากนี้ยังยับยั้งการหลั่งของ Ach (ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี, 2542) ส่งผลให้เกิดกล้ามเนื้ออ่อนแรง สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สร้าง saxitoxin และ neosaxitoxin ได้แก่ กลุ่ม *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Aphanizomenon flos-aquae* ซึ่งมีการตรวจพบความเป็นพิษของสาหร่ายทั้งสามชนิดในสัตว์น้ำทั่วโลก (Briand et al., 2003)



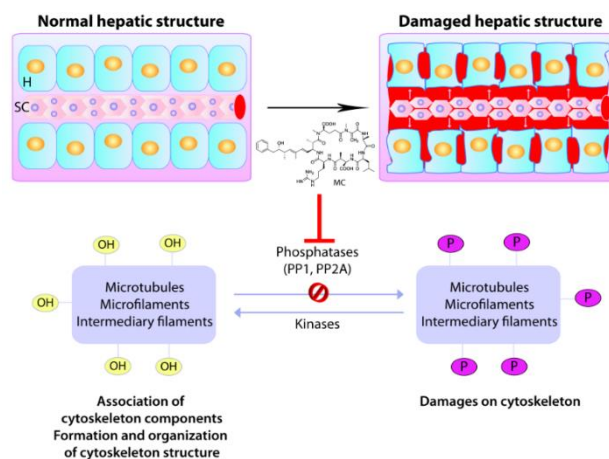
**Figure 3.** Chemical structure of anatoxin-a (a), anatoxin-a(s) (b) and saxitoxin (c).

ที่มา: Mankiewicz และคณะ (2003)

## 1.2) สารพิษที่มีผลต่อตับ (Hepatotoxins)

Hepatotoxins เป็นสารพิษที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสร้างขึ้นโดยมีอวัยวะเป้าหมาย คือ ตับ ซึ่งแบ่งสารพิษที่ส่งผลต่อตับได้ 2 ชนิด ได้แก่ Microcystins (MCYSTs) และ Nodularin (NODLN) ผลิตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในจีนัส *Microcystis* sp., *Aphanizomenon flos-aquae* และ *Microcystis viridis* (Chorus และ Bartram, 1999) ซึ่งมีค่า LD<sub>50</sub> 50.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ สาร Nodularin (NODLN) ผลิตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จีนัส *Nodularia* sp. ซึ่งมีค่า LD<sub>50</sub> ประมาณ 50.00 - 70.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Ohta *et al.*, 1994)

สารพิษทั้งสองตัวจะออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ตับ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โปรตีนฟอสฟาเตส (protein phosphatase: PP) โดยเฉพาะ PP1 และ PP2A ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและการทำงานของ intermediate filament และ microfilament ของ cytoskeletal ของเซลล์ ส่งผลต่อการควบคุมเมตาโบลิซึมต่าง ๆ ของคาร์โบไฮเดรต การแบ่งเซลล์ และการยึดหดของกล้ามเนื้อ (อรพิน และณัฐธา, 2546) โดยจะไปเร่งอัตราการทำงานของกระบวนการ phosphorylation และเร่งการเกิดเนื้องอก ดังนั้นสารพิษกลุ่มนี้จึงสามารถส่งเสริมการเกิดมะเร็งได้ (Menezes *et al.*, 2013) หากได้รับในปริมาณที่มากพอจะเกิดอาการพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) คือ การทำลายเส้นเลือดฝอยภายในตับ โดยเซลล์ตับจะถูกทำลาย ก่อให้เกิดเลือดคั่งภายในตับและเกิดอาการช็อคได้ (Figure 4) (Kaya, 1996) และทำให้ความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืชชนิดอื่นลดลง (Narayana *et al.*, 2017)



**Figure 4.** Effects of microcystin on the inhibition of protein phosphatases PP1 and PP2A and changes in hepatocellular structure, capillaries and hemorrhage; H - hepatocyte, SC - sinusoidal capillary, MC - microcystins, OH - hydroxyl group, P - phosphate group, PP1 - protein phosphatase 1, PP2 - protein phosphatase2.

ที่มา: Mankiewicz และคณะ (2003)

### 1.2.5 ผลกระทบของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

การสะสมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือการเจริญเติบโตเพิ่มอย่างรวดเร็วทำให้การผลิตสารพิษของสาหร่ายเพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยสาหร่ายที่สร้างสารชีวพิษที่เป็นอันตรายสิ่งแวดล้อม สัตว์ รวมถึงมนุษย์ เรียกว่า HABs (Harmful Algal Blooms) สัตว์น้ำบางชนิดมีการสะสมพิษในตัวเอง เช่น หอยมีพฤติกรรมในการกรองกินแพลงก์ตอน หากหอยได้รับแพลงก์ตอนที่มีการผลิตสารพิษเข้าไปจะทำให้เกิดการสะสมพิษในหอย และสามารถถ่ายทอดสารพิษแก่สิ่งมีชีวิตในห่วงโซ่อาหารได้ เช่น ปลา นก และมนุษย์ หากได้รับสารพิษเข้าไปในปริมาณมากจะก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรง อาจถึงแก่ชีวิต นอกจากนี้การสะสมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินยังทำให้ปริมาณสัตว์น้ำที่จับได้ลดลงและทำให้สัตว์น้ำตาย เพราะปริมาณออกซิเจนที่มีน้อยลงในแหล่งน้ำ อีกทั้งยังก่อให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ทำให้รสชาติของอาหารเปลี่ยนไป (Newman, 2013; Keawtawee *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016)

#### 1) ผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยง

การเพิ่มจำนวนสาหร่ายอย่างรวดเร็วก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งเกิดจากการตายของกุ้งหรือสัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตช้าและอ่อนแอได้ง่าย เนื่องจากผลกระทบจากสารพิษของสาหร่ายทำให้ผลผลิตกุ้งลดลง (Alonso and Páez, 2003) และยังทำให้ผู้บริโภครังเกียจในเรื่องของความความปลอดภัยของอาหารอีกด้วย (ยุวดี, 2558) อีกทั้งยังก่อให้เกิดการสะสมกลิ่นโคลนในเนื้อสัตว์ พรพิมล และคณะ (2558) ศึกษาปริมาณแพลงก์ตอนพืชในบ่อเลี้ยงปลานิลแบบผสมผสานในจังหวัดเชียงราย โดยเก็บน้ำในเดือน พฤษภาคม 2556 ถึง 2557 พบว่า แพลงก์ตอนพืชในดิวิชัน Cyanophyta เป็นชนิดที่พบปริมาณมากกว่าชนิดอื่น ๆ ซึ่งก่อให้เกิดกลิ่นโคลนในทุกฤดูและมีการเพิ่มปริมาณตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงปลานิล โดยสายพันธุ์ที่พบเยอะได้แก่ *Anabaena circinalis* ( $83.30 \times 10^3$  ยูนิิตต่อลิตร) และ *Pseudanabaena limnetica* ( $45.41 \times 10^3$  ยูนิิตต่อลิตร) สอดคล้องกับ Pimolrat และคณะ (2015) ศึกษาลักษณะทางกายภาพที่ก่อให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ในบ่อเลี้ยงปลานิลพบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Lyngbya* และ *Phormidium* มีความสัมพันธ์กับปริมาณของจีโอสมิน ในขณะที่ *Pseudanabaena* มีความสัมพันธ์กับปริมาณของเอ็มไอบี (2-methylisoborneol: MIB) (Table 2) ซึ่งก่อให้เกิดการสะสมกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในสัตว์น้ำ เช่นเดียวกับการรายงานของ นิวุฒติ และบัญชา (2555) ตรวจสอบความเข้มข้นของสารจีโอสมินและเอ็มไอบี ในเนื้อปลานิลมีค่า  $2.14 \pm 1.02$  และ  $2.21 \pm 1.90$  ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าระดับ threshold level ของปริมาณสารจีโอสมิน คือ 0.90 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Robertson *et al.*, 2006) และ



สารเอ็มไอพี คือ 0.60 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Persson, 1980) โดยพบ *Oscillatoria* sp. และ *Anabaena* sp. เป็นชนิดเด่น (Table 3)

**Table 2.** Correlations (Pearson) between cyanobacteria and concentrations of two odorous compounds in tilapia pond.

Cyanobacteria (unit L <sup>-1</sup> )	Geosmin (µg L <sup>-1</sup> )	MIB (µg L <sup>-1</sup> )
<i>Anabaena</i> sp.	0.51**	0.22
<i>Lyngbya</i> sp.	0.80**	0.12
<i>Oscillatoria</i> sp.	0.78**	0.15
<i>Pseudanabaena</i> sp.	0.50**	0.57**
<i>Phormidium</i> sp.	0.56**	0.00

\*\* Significant correlation  $P < 0.01$

ที่มา: Pimolrat และคณะ (2015)

**Table 3.** Quantities and types of odor-causing blue-green algae in integrated tilapia ponds.

Type of blue green algae	Quantity of blue green algae (x10 <sup>3</sup> cell/milliliter)
<i>Anabaena</i> sp.	67.43
<i>Oscillatoria</i> sp.	81.74
<i>Phormidium</i> sp.	31.17
<i>Pseudanabaena</i> sp.	18.09

ที่มา: นิวุฒิ และบัญชา (2555)

รายงานจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในหลายประเทศมีข้อมูลยืนยันว่าสารพิษในสาหร่ายส่งผลกระทบต่อสุขภาพในสัตว์น้ำในช่วงวันแรกหลังจากปล่อยลงบ่อได้ไม่นาน โดยผลทางพยาธิวิทยาสอดคล้องกับสารพิษที่ส่งผลกระทบต่อตับ (hepatotoxins) ซึ่งตรวจพบในกุ้ง (Newman, 2013) เช่นเดียวกับ ปรานด์นัส (2549) ศึกษาการผสมสาหร่าย *M. aeruginosa* ในอาหารปลานิลสัดส่วน 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยให้อาหารปลานิลติดต่อกันเป็นระยะเวลา 30 และ 60 วัน และติดตามผลการตาย น้ำหนักตัว ผลต่อโลหิตวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของตัวพบว่า ปลานิลที่ได้รับสาหร่ายทุกกลุ่มมีจำนวนการตาย น้ำหนักตัว น้ำหนักตับ ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและปริมาณเม็ดเลือดขาว

โดยรวมไม่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม แต่ในวันที่ 60 ของการทดลอง ปลาชนิดที่ได้รับ *M. aeruginosa* มีน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ผลทางจุลพยาธิวิทยาของตับปลาพบความผิดปกติของตับปลาทุกกลุ่มที่ได้รับสาหร่าย *M. aeruginosa* มีการแตกของเส้นเลือด (hemorrhage) ที่ hepatic vein และ sinusoid และเกิดเลือดคั่ง (congestion) ภายใน hepatic vein (HV) เซลล์ตับเกิดการตาย และมีการจัดเรียงตัวของเซลล์ตับไม่เป็นระเบียบซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุม มีแวกิวโอล (vacuole) สะสมในไซโตพลาสซึม มีเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรกปะปนอยู่ภายในเนื้อเยื่อตับ ความรุนแรงเป็นไปตามปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับสาหร่าย และมีแนวโน้มในการลดการเจริญเติบโตของปลานิล

## 2) ผลกระทบต่อระบบนิเวศ

การสะสมของแพลงก์ตอนพืชในแหล่งน้ำเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดปัญหาคุณภาพน้ำ โดยส่งผลให้ค่าออกซิเจนละลายน้ำลดลง และส่งผลต่อเสถียรภาพของค่าพีเอชในน้ำ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในแหล่งน้ำ (Wangwibulkit *et al.*, 2008; Supriatna *et al.*, 2017) การผลิตสารพิษของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินยังส่งผลกระทบต่อแพลงก์ตอนสัตว์ ซึ่งมีการศึกษา ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เทคนิคทางนิเวศวิทยาเพื่อตรวจสอบสารพิษในน้ำที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ ซึ่งทดลองกับแพลงก์ตอนสัตว์ 3 ชนิด ได้แก่ *Moina micrura* (two clones), *Daphnia laevis* (two clones) และ *Daphnia similis* ในการทดสอบสารพิษที่สกัดจาก *Microcystis* ที่เก็บตัวอย่างจากบ่อเก็บน้ำ 2 แห่ง ในประเทศโคลัมเบีย ตรวจสอบสารพิษและวัดปริมาณด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งสารสกัด microcystin-LR จากทั้ง 2 แห่ง มีความเข้มข้นสูงสุดอยู่ที่ 434 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 538 ไมโครกรัมต่อกรัม และส่งผลกระทบต่อตัวไรน้ำ Cladocerans มากที่สุด การวัด LC<sub>50</sub> ต่อการสืบพันธุ์ของไรน้ำพบว่า สารพิษมีการยับยั้งการสืบพันธุ์และหยุดชะงักการผลิตไข่ของไรน้ำ อีกทั้งยังพบว่า ไรน้ำในระยะวัยอ่อนได้รับผลกระทบจากสารพิษแบบเฉียบพลัน ในชุดการทดลองที่มีการเติมสาร microcystin-LR (Chorus and Bartram, 1999) เช่นเดียวกับ Magalhaes และคณะ (2003) ศึกษาการสะสมของ microcystins ในระบบห่วงโซ่อาหารในปลา กุ้ง และปูที่อยู่อาศัยในอ่าว Sepetiba ประเทศบราซิล ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤศจิกายน 1999 จากการตรวจสอบพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechocystis aquatilis f. aquatilis* ซึ่งสามารถผลิตสาร microcystins ได้ และพบการตกค้างของสาร microcystins ในเนื้อเยื่อของปูปลา และกุ้ง จากการตรวจสอบด้วยวิธี enzyme – linked immunosorbent assay

(ELISA) เป็นระยะเวลา 11 เดือน พบว่า บางเดือนตรวจพบปริมาณ microcystins มากกว่าที่ WHO กำหนดให้ได้รับต่อวัน (0.04 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน) โดยตรวจพบปริมาณ microcystins มากที่สุดในปู ปลา และกุ้ง ตามลำดับ โดยปริมาณ microcystins ที่พบในปูมากที่สุดมีค่า 0.52 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และน้อยที่สุดคือ 0.25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในเดือนมกราคมแสดงปริมาณ MCYSTs (Maximum concentration of microcystins) ที่ปูได้รับโดยประมาณ 0.198 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานที่ WHO กำหนดไว้ถึง 13 เท่า นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลกระทบต่อการพัฒนาตัวอ่อนของคางคก *Bufo marinus* ที่มีการเลี้ยงร่วมกับ *Limnothrix* สายพันธุ์ AC0243 ที่ความหนาแน่น 100,000 เซลล์ต่อมิลลิตร เป็นเวลา 7 วัน โดยพบความผิดปกติ โนโตคอร์ด ตา สมองดับ ตับอ่อน ไต หัวใจ และระบบทางเดินอาหาร (Daniels *et al.*, 2014)

### 3) ผลกระทบต่อมนุษย์

การเพิ่มจำนวนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในแหล่งน้ำ นอกจากจะส่งผลกระทบต่อการใช้เพาะเลี้ยง และระบบนิเวศวิทยา ยังมีการรายงานถึงผลกระทบต่อมนุษย์ โดย Jochimsen และคณะ (1998) ตรวจสอบปัจจัยเสี่ยงและแหล่งที่มาของ microcystins เนื่องจากในเดือนกุมภาพันธ์ 1996 ศูนย์ฟอกไต A ใน Caruaru ที่ประเทศบราซิล พบผู้ป่วยจำนวน 116 คน (89 เปอร์เซ็นต์) จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 130 คน มีอาการเกี่ยวกับการมองเห็น คลื่นไส้ อาเจียน ซึ่งมีผลเกี่ยวเนื่องมาจากการฟอกไต จนถึงวันที่ 24 มีนาคม 1996 ผู้ป่วยจำนวน 26 คน เสียชีวิตด้วยอาการไตวายเฉียบพลัน โดยทำการศึกษากลุ่มผู้ป่วยจากศูนย์ฟอกไต 2 แห่ง ศูนย์ล้างไต A มีจำนวนผู้ป่วย 130 ราย และศูนย์ล้างไต B มีจำนวนผู้ป่วย 47 ราย โดยตรวจสอบน้ำประปา อาการของผู้ป่วย และเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยที่เสียชีวิตเพื่อตรวจสอบหาสารไมโครซิสติน ผลการศึกษาพบว่า ศูนย์ฟอกไตทั้ง 2 ศูนย์ได้รับน้ำจากอ่างเก็บน้ำบริเวณใกล้เคียง น้ำที่ส่งไปยังศูนย์ฟอกไต B ได้รับการบำบัดก่อนนำไปใช้ด้วยวิธีการกรองและใช้คลอรีน ในขณะที่น้ำที่ส่งไปยังศูนย์ฟอกไต A นั้นไม่ได้รับการบำบัด จากการชันสูตรร่างของผู้เสียชีวิต ตรวจพบสาร microcystins ที่ผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากอ่างเก็บน้ำและน้ำจากศูนย์ล้างไต A และเนื้อเยื่อตับของผู้เสียชีวิต โดยพบความเข้มข้นของ microcystins ในเนื้อเยื่อตับจากผู้เสียชีวิตอยู่ในช่วง 0.03 - 0.60 กรัมต่อกิโลกรัมของเนื้อเยื่อตับ (ค่ากลาง, 0.18) และผู้เสียชีวิตจากศูนย์ล้างไต A ได้รับผลกระทบมากกว่าศูนย์ล้างไต B ซึ่งศูนย์ล้างไต A มีผู้ป่วยเสียชีวิต 124 ราย โดย 50 รายเสียชีวิตจากภาวะไตวายเฉียบพลัน เทียบกับผู้เสียชีวิตจากศูนย์ล้างไต B ไม่พบผู้เสียชีวิตจากอาการไตวายเฉียบพลันจากจำนวนผู้เสียชีวิตทั้งหมด 47 ราย

( $P < 0.001$ ) การตรวจสอบความเป็นพิษไม่พบยาฆ่าแมลงรวมถึง organophosphates ในตัวอย่างน้ำจากอ่างเก็บน้ำเส้นทางที่ใช้ในการขนส่งน้ำ และรถบรรทุกที่ใช้ในการส่งน้ำไปยังศูนย์ล้างไต หรือระบบขนส่งน้ำไปยังศูนย์ล้างไตที่อื่น ๆ ระบบขนส่งน้ำของเมืองและน้ำที่ผ่านการบำบัดจากศูนย์ล้างไต B ไม่พบ microcystins ในขณะที่ศูนย์ล้างไต A ตรวจพบ microcystins ในอ่างเก็บน้ำ รถบรรทุกที่ใช้ในการขนน้ำ ถังกักเก็บน้ำ และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องการตรวจสอบทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับจากผู้เสียชีวิต พบความผิดปกติของแผ่นตับและเซลล์เนื้อร้ายเป็นวงกว้าง พบการแทรกซึมของเม็ดโลหิตขาวและ hepatocytes multinucleated มีอาการบวมในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรีย เกิดความผิดปกติของ rough และ smooth endoplasmic reticula, lipid vacuoles และ residual bodies

### 1.2.6 การใช้แบคทีเรียควบคุมปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

การกำจัดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในแหล่งน้ำสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิทยาทายภาพมีการใช้คลื่นอัลตราโซนิก กระแสไฟฟ้าเพื่อแก้ปัญหาการบลูมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *M. aeruginosa* ได้ (Secher, 2009) นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธีทางเคมี เช่น การทำให้ตกตะกอน (flocculation) การควบคุมความเป็นกรดต่าง การควบคุมอุณหภูมิหรือการย่อยสลายโดยใช้แสงอาทิตย์ (photolysis) การใช้โอโซน (ozonization) ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถควบคุมปริมาณสาหร่ายได้ถึงร้อยละ 100 แต่ต้องใช้งบประมาณสูง (อรพิน และณัฐธา, 2546) การใช้สารเคมีคอปเปอร์ซัลเฟต โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต สารส้มหรือสารที่ทำให้เกิดการตกตะกอน หรือใช้ยาฆ่าสาหร่าย (algicide) เช่น คลอรีน หรือใช้ 2,3-dichloronaphthoquinone ซึ่งมีผลต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่ใช้ความเข้มข้น 20.00 - 25.00 ส่วนในพันล้าน นอกจากนี้ยังพบว่า สารปฏิชีวนะบางอย่าง เช่น สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) ประมาณ 2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหรือนีโอไมซิน (neomycin) 4.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดได้ (กาญจนภาพันท์, 2527) อย่างไรก็ตามการใช้วิธีการทางเคมีอาจส่งผลเสียให้เกิดสารเคมีตกค้าง ทำลายสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในแหล่งน้ำและอาจทำให้เกิดการปลดปล่อยสารพิษลงสู่แหล่งน้ำเพิ่มมากขึ้น (An et al., 2015; Dawah et al., 2015; Tekile et al., 2017; ณัฐวุฒิ และจิรพร, 2558) งานวิจัยบางส่วนรายงานว่าสารพิษ microcystin ของ *M. aeruginosa* ไม่มีผลต่อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus*

*subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas hydrophila* (Foxall and Sasner, 1988) แสดงให้เห็นว่าสารชีวพิษ microcystins ส่งผลกระทบต่อแบคทีเรียบางกลุ่มเท่านั้น ขณะที่แบคทีเรียบางกลุ่มก็มีผลต่อการลดความเป็นพิษของ microcystins ได้ด้วย (Chorus and Bartram, 1999) กลุ่มของแบคทีเรียที่ควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ได้แก่ *Bacillus* spp., *Flexibacter* spp., *Cytophaga* และ *Myxobacteria* เป็นต้น (Table 4) (Gumbo et al., 2008)

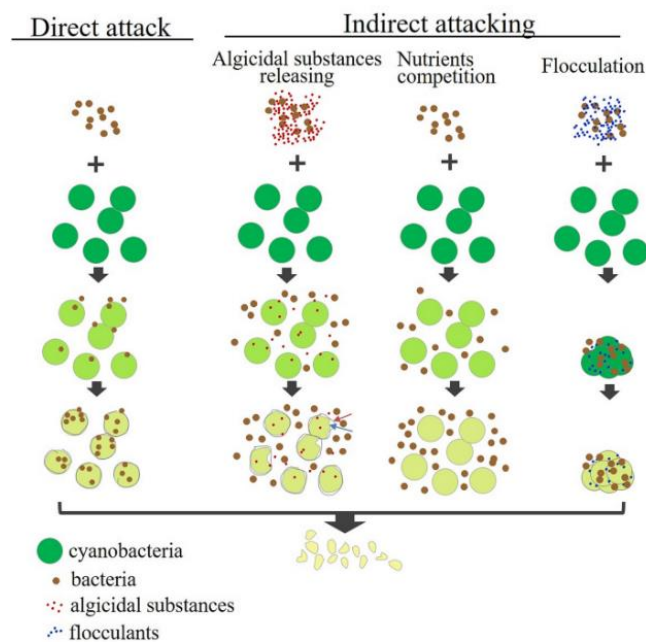
**Table 4.** Lysis of blue green algae by different bacterial pathogens.

Mechanism of cell lysis	Predatory bacteria	Major host Cyanobacteria	Reference
Contact	<i>S. neyagawaensis</i>	<i>Microcystis</i>	Choi et al. (2005)
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Microcystis</i>	Nakamura et al. (2003)
	<i>Cytophaga</i>	<i>Microcystis</i>	Rashidan and Bird (2001)
	<i>Poteroiochromonas</i>	<i>Microcystis</i>	Zhang et al. (2008)
	<i>F. flexilis</i> , <i>F. sancti</i>	<i>Oscillatoria williamsii</i>	Sallal (1994)
Entrapment	<i>M. fulvus</i> BGO2	<i>Phormidium luridum</i>	Burnham et al. (1984)
	<i>M. xanthus</i> PCO2	<i>Phormidium luridum</i>	Burnham et al. (1981)
Endoparasitism	<i>Bdellovibrio-like bacteria</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Caiola and Pellegrini (1984)
Ectoparasitism	<i>B. bacteriovorus</i>	<i>Phormidium luridum</i>	Burnham et al. (1976)
	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	<i>Microcystis</i>	Mohamed et al. (2014)
Not specified	<i>Xanthomonas</i>	<i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i>	Walker and Higginbotham (2000)
	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Anabaena variabilis</i>	Wright and Thompson (1985)

ที่มา: Gumbo และคณะ (2008); Ndlela และคณะ (2018)

Algicidal bacteria คือ แบคทีเรียที่สามารถส่งผลกระทบต่อเซลล์ของสาหร่ายทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยผลทางตรงเกิดจากการย่อยสลายของผนังเซลล์หรือเนื้อเยื่อสาหร่ายโดยการสัมผัสกับตัวเซลล์โดยตรง ส่วนผลทางอ้อมในกรณีที่ไม่มีสัมผัสโดยตรงกับเป้าหมาย จะมีกลไกปล่อยสารละลายออกมาทำลายเซลล์ของสาหร่าย การเสื่อมสภาพของเซลล์สาหร่ายเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น การย่อยสลายโดยเอนไซม์จำพวกกลูโคซิเดส เซลลูเลส แลคเคส โปรติเอส และไคตินเนส เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงผลกระทบจากกลุ่มอัลคาลอยด์ กรดอะมิโน กรดไขมัน ความ

เข้มข้นของสารประกอบที่ถูกปลดปล่อยจากแบคทีเรีย และความหนาแน่นของแบคทีเรีย เมื่อสาหร่ายถูกย่อยสลายแบคทีเรียจะได้รับสารอาหารและเพิ่มจำนวนมากขึ้น algicidal bacteria ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ มีกลไกทำลายเซลล์ทางอ้อม และอีก 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นการทำลายเซลล์ทางตรง algicidal bacteria สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Cytophaga / Flavobacterium / Bacteroidetes (CFB group) และกลุ่ม  $\gamma$ -Proteobacteria ซึ่งมีการคัดแยก algicidal bacteria ได้ประมาณ 56 สายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม CFB group 50 เปอร์เซ็นต์ และอีกประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในกลุ่ม  $\gamma$ -Proteobacteria ส่วนสายพันธุ์ที่เหลือเป็นพวกแกรมบวก *Micrococcus*, *Bacillus* และ *Planomicrobium* มีข้อมูลชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียแกรมบวกและ  $\gamma$ -Proteobacteria ใช้วิธีการทำลายเซลล์สาหร่ายแบบทางอ้อมเป็นหลัก ในขณะที่กลุ่มของ CFB เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์เป้าหมายทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยแบคทีเรียบางชนิดสามารถส่งผลกระทบต่อสาหร่ายหลายชนิด แต่บางชนิดก็มีผลเฉพาะเจาะจงกับกับสาหร่ายชนิดนั้น ๆ (Roth *et al.*, 2008; Fuentes *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2020) (Figure 5)



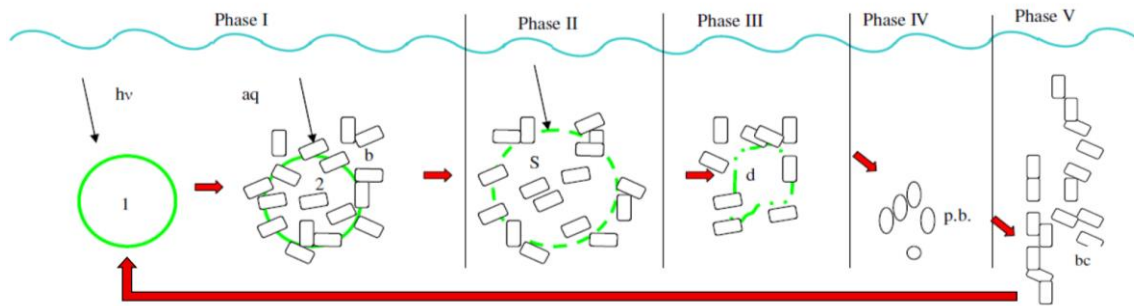
**Figure 5.** Attacking modes of cyanobactericidal bacteria against cyanobacteria; red arrow indicates cell wall, blue arrow indicates cell membrane.

ที่มา: Yang และคณะ (2020)

### 1) การใช้แบคทีเรียควบคุมปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยวิธีทางอ้อม

การใช้สารสกัดจาก *Aeromonas* sp. ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* สามารถลดจำนวนของสาหร่ายได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์หลังจากผ่านไป 7 วัน เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบความผิดปกติของผนังเซลล์และการเสียสภาพของไทลาคอยด์ในสาหร่ายอย่างรุนแรง เมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (Liu *et al.*, 2012) สอดคล้องกับการศึกษาของ Jia และคณะ (2014) ศึกษาสารละลายจาก *Brevibacillus laterosporus* ในปริมาณต่างกัน 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิลิตร เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของ *Oscillatoria* ผลการศึกษาพบว่า สารละลายที่ปราศจากเซลล์ที่ความเข้มข้นต่ำหรือน้อยกว่า 4 มิลลิลิตร ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Oscillatoria* อีกทั้งยังเร่งอัตราการเติบโตของ *Oscillatoria* ให้เพิ่มขึ้น ในส่วนของสารละลายที่ปราศจากเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงหรือมากกว่า 8 มิลลิลิตร สามารถการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Oscillatoria* ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยในชุดการทดลองที่เติมสารละลายจาก *B. laterosporus* ปริมาตร 8 และ 10 มิลลิลิตร พบว่า ปริมาณน้ำหนักรวบรวมของสาหร่ายลดลง 26.02 และ 45.30 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ เอ ลดลง 46.88 และ 63.73 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วัน ตามลำดับ

Gumbo และ Cloete (2011) รายงานถึงรูปแบบการยับยั้ง *Microcystis* จากการปล่อยของเหลวของ *Bacillus mycooides* B16 โดยออกเป็น 5 ระยะ ดังนี้ ระยะแรกแบคทีเรียจะไปบดบังการเข้าถึงของแสง และปล่อยสารออกจากเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของสาหร่ายถูกทำลาย ระยะที่สองเซลล์ของสาหร่ายเกิดการบวมเนื่องจากแรงดันออสโมซิสที่เพิ่มขึ้น แบคทีเรียได้รับสารอาหารจากการย่อยสลายของเซลล์สาหร่าย ระยะที่สามพบการบิดเบี้ยวของเซลล์สาหร่าย มีการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์สู่ภายนอกซึ่งเป็นสารอาหารให้แก่แบคทีเรียได้อีกทางหนึ่ง ระยะที่สี่ยังคงพบสารที่รั่วไหลออกจากเซลล์และ phosphate body ของเซลล์สาหร่าย ระยะที่ห้าพบการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียเนื่องจากการได้รับสารอาหาร รวมตัวกันเป็นสายและเริ่มอยู่รวมกันเป็นกระจุก (Figure 6)



**Figure 6.** Conceptual model summarizing the fate of a *Microcystis* cell during lytic action by *Bacillus mycoides* B16.

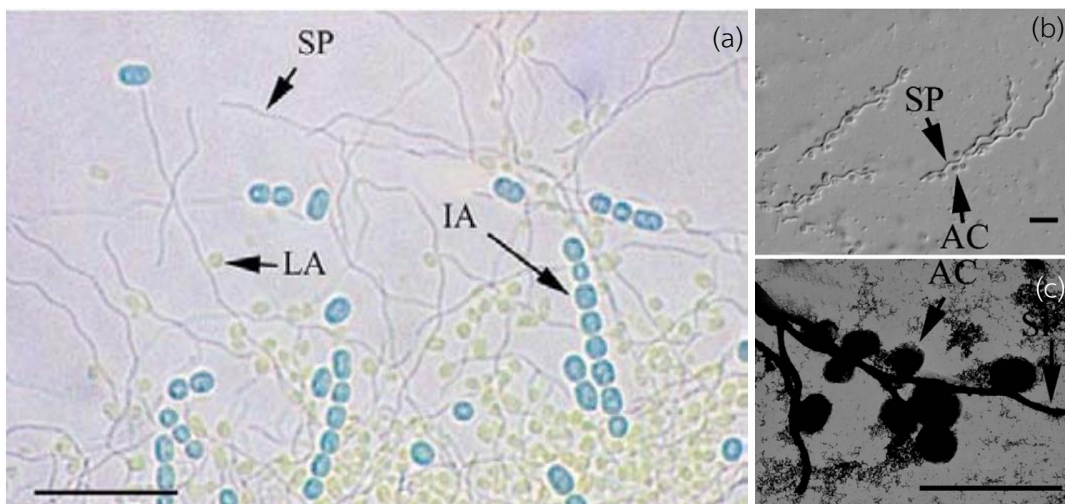
ที่มา: Gumbo และ Cloete (2011)

## 2) การใช้แบคทีเรียควบคุมปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยวิธีทางตรง

ผลกระทบทางตรงเป็นการสัมผัสกายภาพระหว่างตัวแบคทีเรียกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จนกระทั่งมีการเจาะเข้าไปในเซลล์เพื่อให้เกิดการสลายของสาหร่าย ตัวอย่างเช่น *Bacillus cereus* ที่คัดแยกมาจากแหล่งน้ำสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Aphanizomenon flos-aquae* โดยพบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ไพโคไซยานิน และกิจกรรมการสังเคราะห์แสง มีการลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเกิดจากกลไกการสัมผัสกันระหว่างเซลล์ (cell-to-cell contact mechanism) (Shi *et al.*, 2006a) Zeng และคณะ (2021) พบว่า *Streptomyces globisporus* สายพันธุ์ G9 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในบ่อน้ำที่มีการสะสมของสาหร่าย ส่งผลกระทบทางตรงต่อ *M. aeruginosa* โดยพบเส้นใยไฮฟี (hyphae) ของ *S. globisporus* สายพันธุ์ G9 พันล้อมรอบเซลล์สาหร่ายและใช้สารอาหารจากสาหร่ายในการเจริญเติบโต อีกทั้งยังพบการลดลงของปริมาณสารไมโครซิสติน-แอลอาร์ โดยเซลล์สาหร่ายที่อยู่ไกลจากแบคทีเรียยังคงมีรูปร่างปกติ เมื่อตรวจสอบสารละลายที่คัดแยกได้จากแบคทีเรีย (supernatant) ไม่พบสารกำจัดศัตรูพืช นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบเจาะจงต่อ *M. aeruginosa* เท่านั้น ขณะที่สาหร่ายสีเขียวได้รับผลกระทบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เช่นเดียวกับการรายงานของ Manage และคณะ (2000) พบว่าแบคทีเรียชนิด *Alcaligenes denitrificans* ที่แยกได้จากแหล่งน้ำที่มีการสะสมของแพลงก์ตอนพืช (hypereutrophic pond) ในประเทศญี่ปุ่น เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในกลุ่ม *M. Aeruginosa* ได้อย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาเป็น *M. viridis* และ *M. wesenbergii* ตามลำดับ แต่ไม่ส่งผลต่อสาหร่ายสีเขียว และเมื่อนำของเหลวที่คัดแยกได้จากการเลี้ยง



*A. denitrificans* เพียงอย่างเดียวมาทดสอบกับ *M. aeruginosa* พบว่า ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรีย *Saprospira* sp. สายพันธุ์ PdY3 สามารถย่อยสลาย *Anabaena* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยแบคทีเรียมีการรวมกลุ่มกันในลักษณะเหมือนร่างแห (Figure 7a) พฤติกรรมดังกล่าวช่วยเร่งกระบวนการยับยั้งได้อย่างมาก สามารถยับยั้งสาหร่ายได้สูงถึง 64 เปอร์เซ็นต์ภายในหนึ่งวัน ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นว่า *Saprospira* sp. สายพันธุ์ PdY3 เซลล์เดี่ยวสามารถยึดเซลล์ของ *Anabaena* หลายเซลล์เข้ากับผิวเซลล์ได้ (Figure 7b, 7c) (Shi *et al.*, 2006b)



**Figure 7.** Mechanism of inhibition of *Anabaena* by *Saprospira* sp. strain PdY3; SP = *Saprospira* sp. PdY3, IA = intact *Anabaena* cells, LA = lysed *Anabaena* cell (a); Micrographs illustrating the lytic mechanism of strain PdY3. Differential interference contrast (b) and transmission electron (c); Bar = 10 micrometre.

ที่มา: Shi และคณะ (2006b)

### 1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 เพื่อศึกษาลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

1.3.2 เพื่อศึกษาปัจจัยอุณหภูมิ พีเอช และความเค็ม ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 และผลกระทบของการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมร่วมกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ที่ความหนาแน่นเซลล์ต่างกัน

1.3.3 เพื่อคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

1.3.4 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่จำเพาะต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

#### 2.1 วัสดุ

##### 2.1.1 แพลงก์ตอนพืช

ตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ที่คัดแยกจากบ่อกึ่งทะเล, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ *Spirulina* sp. ระยะเวลาเก็บเกี่ยวจากห้องปฏิบัติการวิจัยแพลงก์ตอนและอาหารมีชีวิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และตัวอย่างไดอะตอม *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งตรัง อำเภอสีเกา จังหวัดตรัง

##### 2.1.2 กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลารวา 13 จำนวน 10,000 ตัว จากโรงเพาะฟักลูกกุ้งทำบอบ บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา และฟาร์มกุ้งพัฒนา อำเภอสทิงพระ จังหวัดสงขลา

##### 2.1.3 น้ำตัวอย่าง

น้ำตัวอย่างจำนวน 2 ลิตร จากบ่อปลาตู้สาขาวิชาวาริชศาสตร์และนวัตกรรมการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และฟาร์มกุ้งพัฒนา อำเภอสทิงพระ จังหวัดสงขลา

##### 2.1.4 น้ำทะเล

น้ำทะเลความเค็ม 28.00 – 30.00 ส่วนในพัน จำนวน 500 ลิตร จากศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมสัตว์น้ำชายฝั่ง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา

#### 2.2 อุปกรณ์

##### 2.2.1 อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์สาหร่าย

- ปีเปตขนาด 1, 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- ขวดรูปชมพู่ขนาด 250, 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร
- ปีกเกอร์ขนาด 50, 100, 250, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร

- สายยาง
- แท่งแก้ว
- หลอดทดลองแบบฝาเกลียว
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
- ตู้เพาะเลี้ยงสำหรับควบคุมอุณหภูมิ (Illuminated cooled incubator)
- เครื่องเติมอากาศแอร์ปั๊ม (Air pump)
- กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ (Compound microscope)
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereoscopic microscope)
- กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)

#### 2.2.2 อุปกรณ์สำหรับเก็บน้ำตัวอย่างและการวิเคราะห์น้ำ

- ขวดเก็บน้ำตัวอย่างขนาด 1,000 มิลลิลิตร
- กระจกตวงขนาด 50, 100 และ 500 มิลลิลิตร
- พีเอชมิเตอร์ (pH meter)
- ดีโอมิเตอร์ (DO meter)
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
- เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum filter)
- Hand refractometer

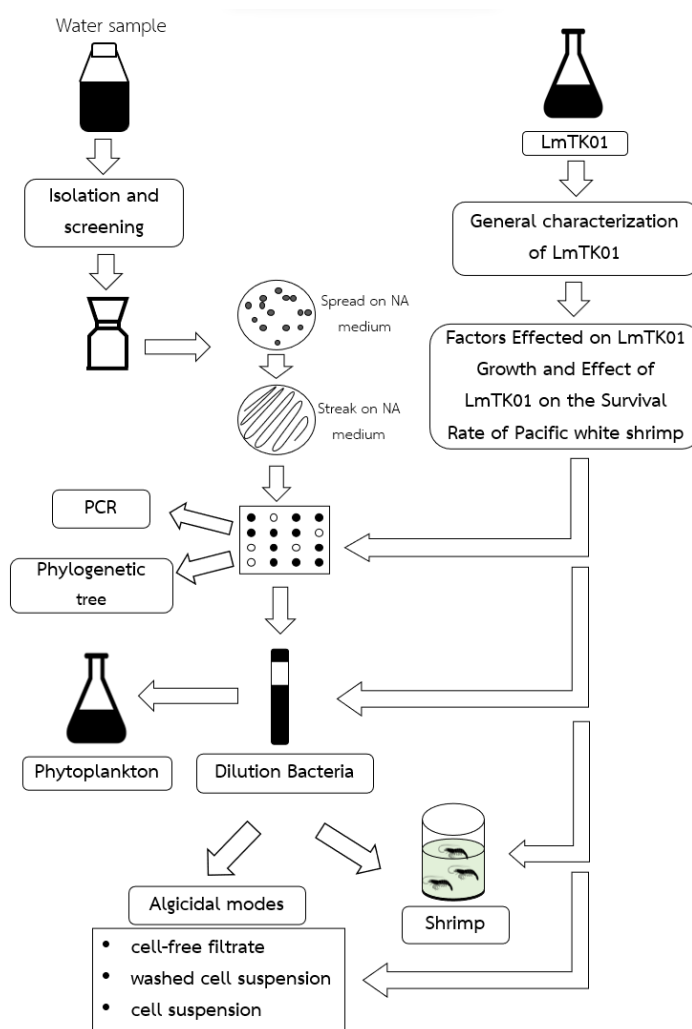
#### 2.2.3 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยา

- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubator)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer)
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate reader)
- เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator)

- เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)
- ถาดหลุมขนาด 24 และ 96 หลุม (24 and 96 well-plate)
- แท่งแก้วเขี่ยเชื้อสามเหลี่ยม (Spreader glass)
- ลูบเขี่ยเชื้อ (Inoculation loop)
- จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 2, 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- ปิเปต ทิป (Pipette tip) ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1,500 และ 2,000 ไมโครลิตร
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร
- ชุดสกัดดีเอ็นเอ (mini kit DNA)
- ชุด GenepHlow™ Gel/PCR kit

### 2.3 วิธีการทดลอง

การศึกษาลักษณะทั่วไป และปัจจัยต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 รวมถึงผลของความหนาแน่นเซลล์ของสาหร่าย LmTK01 ต่ออัตราการรอดของกุ้งขาวแวนนาไม และศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 โดยทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมและปลาตุ๊ก จนได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ นำไปทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 แล้วนำไปทดสอบกับสาหร่ายชนิดอื่น ๆ รวมถึงทดสอบผลของสาหร่าย LmTK01 ต่ออัตราการรอดตายของกุ้ง โดยวางแผนการวิจัยแสดงดังแผนภาพที่ 8 (Figure 8)



**Figure 8.** Research process (To study the effect of specific bacteria isolated from aquaculture ponds on growth inhibition of cyanobacteria strain LmTK01). (Adapted from Keawtawee *et al.*, 2011)

### 2.3.1 การศึกษาลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

1. เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 จากโดยเติมในอาหารเหลว BG-11 (Blue green algae medium) ที่ปราศจากเชื้อ ภายใต้อุณหภูมิห้อง 28.00 - 32.00 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์

2. ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ที่อยู่ในระยะเอ็กโพเนนเชียล ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงรุ่น Leica ICC50W ลักษณะของสาหร่ายถูกตรวจสอบตามอนุกรมวิธานของ Komárek (2003); Gkelis *et al.* (2005); Furtado *et al.* (2009); Zhu *et al.* (2012) และ Komárek *et al.* (2014)

3. ตรวจสอบโครงสร้างเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ระยะเอ็กโพเนนเชียล (exponential phase) โดยตรึงตัวอย่างด้วย 2.5 เปอร์เซ็นต์ Glutaraldehyde เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างมาล้างด้วยบัฟเฟอร์ 0.10 M PB 3 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ครั้งละ 5 นาที เติม 1 เปอร์เซ็นต์ Osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และปั่นเหวี่ยง ครั้งละ 5 นาที ย้อมขึ้นเนื้อชิ้นต้นด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ Uranyl 45 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 5 นาที จากนั้นเติม 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol แล้ว นำไปปั่นเหวี่ยง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม 80 เปอร์เซ็นต์ Ethanol แล้ว นำไปปั่นเหวี่ยง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม 90 เปอร์เซ็นต์ Ethanol แล้ว นำไปปั่นเหวี่ยง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม 100 เปอร์เซ็นต์ Ethanol แล้ว นำไปปั่นเหวี่ยง 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที เติม Propylene Oxide 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที เติม Propylene Oxide : Epoxy resin (1:1) 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จากนั้นเติม Propylene Oxide : Epoxy resin (1:2) ทิ้งไว้ 1 คืน แล้วจึงเติม Pure Epoxy Resin 2 ชั่วโมง เติม Pure Epoxy Resin ใน Beem capsule ประมาณ ¼ ของหลอด และใส่ฟองอากาศออกให้หมด จากนั้นเขี่ยตัวอย่างที่ต้องการลงใน Beem capsule และเติม Pure Epoxy จนเต็มหลอดตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง นำไปอบที่อุณหภูมิ 70.00 - 80.00 องศาเซลเซียส 1 คืน จากนั้นนำมาวางบนแผ่นรองรับตัวอย่าง (Piolofom-coated copper grids) นำตัวอย่างไปตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ ตรวจสอบโครงสร้างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) ที่ 60.00 กิโลโวลต์ (Gkelis *et al.*, 2005)

### 2.3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 และผลกระทบของสาหร่ายต่อกุ้งขาวแวนนาไม

1. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ภายใต้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 28.00 - 32.00 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการวิจัยแพลงก์ตอนและอาหารมีชีวิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรม การจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. ทดลองเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ระยะเอ็กโพเนนเชียล ที่อุณหภูมิต่างกันในช่วงรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยง BG-11 ความเค็ม 5.00 ส่วนในพันพีเอช 7.00 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121.00 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงสาหร่ายภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28.00 ± 1 องศาเซลเซียส (control temperature) และชุดการทดลองที่ 2 วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28.00 - 32.00 องศาเซลเซียส (uncontrol temperature) ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ และ ตรวจสอบการเจริญเติบโตด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร เป็นเวลา 10 วัน

3. ทดลองเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ระยะเอ็กโพเนนเชียล ที่ระดับพีเอชต่างกันในช่วงรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยง BG-11 ที่ปราศจากเชื้อ ความเค็ม 5.00 ส่วนในพัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28.00 - 32.00 องศาเซลเซียส ปรับความเข้มข้นของพีเอชในด้วยกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ แบ่งการทดลองออกเป็น 6 ชุด ตามความแตกต่างของค่าพีเอช ได้แก่ 6.00, 7.00, 8.00, 9.00, 10.00 และ 11.00 ตามลำดับ ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ตรวจสอบการเจริญเติบโตด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร เป็นเวลา 10 วัน

4. ทดลองเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ระยะเอ็กโพเนนเชียล ที่ความเค็มต่างกันในช่วงรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พีเอช 7.00 โดยปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยง BG-11 ที่ปราศจากเชื้อ แบ่งการทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลอง ตามความแตกต่างของความเค็ม ได้แก่ 0.00, 5.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00 และ 30.00 ส่วนในพัน ตามลำดับ ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28.00 - 32.00 องศาเซลเซียส



ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ตรวจสอบการเจริญเติบโตด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร เป็นเวลา 10 วัน

5. ทดสอบผลของสาหร่าย LmTK01 ต่ออัตราการรอดตายของกุ้ง โดยปล่อยกุ้งขาวแวนนาไมขนาด  $0.18 \pm 0.05$  กรัม ในแก้วพลาสติกจำนวน 1 ตัวต่อแก้ว ทำการทดลองชุดละ 10 ซ้ำ ( $n = 10$ ) โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็นดังนี้

ชุดควบคุม เติมน้ำที่ความเค็ม 15 ส่วนในพัน ปริมาณ 500 มิลลิลิตร (ไม่เติมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01)

ชุดการทดลองที่ 1 เติมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ปริมาณ 125 มิลลิลิตร ( $336.17 \pm 13.20$  ไมโครกรัมต่อลิตร)

ชุดการทดลองที่ 2 เติมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ปริมาณ 250 มิลลิลิตร ( $703.70 \pm 25.80$  ไมโครกรัมต่อลิตร)

ชุดการทดลองที่ 3 เติมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ปริมาณ 500 มิลลิลิตร ( $1,390.63 \pm 33.04$  ไมโครกรัมต่อลิตร)

ทำการวัดคุณภาพน้ำในแต่ละการทดลอง ได้แก่ พีเอช และ ค่าการออกซิเจนละลายน้ำ (DO) ด้วย pH meter, DO meter รุ่น YSI Pro2030 โดยทำการวัดคุณภาพน้ำทุกวันวันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 5 วัน และค่าคลอโรฟิลล์ (1) ตามวิธีการของสมหมาย (2538) ตรวจสอบอัตราการรอดของกุ้ง (2) ตามวิธีการของสุรชาติพิทย์ (2562) และเก็บตัวอย่างกุ้งที่ตายไปศึกษาลักษณะการตายที่มองเห็นได้จากภายนอก เช่น เหงือก และขว่ายน้ำภายใต้กล้องจุลทรรศน์พร้อมถ่ายภาพ

$$\text{คลอโรฟิลล์ เอ (ไมโครกรัมต่อลิตร)} = 11.9 (A_{665} - A_{750}) (V/L) (1,000/S) \quad (1)$$

เมื่อ	$A_{665}$	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร
	$A_{750}$	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร
	V	=	มิลลิลิตรของสาร Acetone ที่ใช้
	L	=	ความหนา (ซม.) ของ cuvette ที่ใช้กับเครื่องspectrophotometer
	S	=	มิลลิลิตรของน้ำตัวอย่างที่นำมากรอง

$$\text{อัตราการรอด (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนกุ้งทั้งหมดที่ปล่อยลงไป}} \quad (2)$$

### 2.3.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่ควบคุมการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์

#### LmTK01

1. เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวและปลาตุ๊ก กรองน้ำตัวอย่างผ่านกระดาษ GF/C ขนาด 0.8 ไมครอน นำไป เกลี่ยเชื้อบนอาหารสำเร็จรูปแบบแข็ง (Nutrient agar) 0.1 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ  $30.00 \pm 1$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ในตู้บ่มเชื้อ (Illuminated cooled incubator – FOC 2151L)

2. คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียเพื่อนำมาซีดเชื้อลงบนอาหารแข็งสำเร็จรูป (Nutrient agar) จำนวน 4 ครั้ง จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ย้อมแกรมด้วยสี crystal violet ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วหยดละลายไอโอดีนทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และหยดสารละลาย safranin ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่าแล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งไว้ให้แห้ง ตรวจสอบสัณฐานวิทยาและถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope)

3. เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (Nutrient Broth) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ  $30.00 \pm 1$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที (ณัฐวุฒิ และจิรพร, 2558)

4. คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 โดยเติมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ที่ค่าคลอโรฟิลล์ เอ เริ่มต้น 300 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในสภาพหลุมแบบ 96 หลุม และเติมเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ความหนาแน่นเริ่มต้น  $10^7 - 10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองชุดละ 5 ซ้ำ ให้แสง 2,500 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28.00 - 32.00 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงทุกวันเป็นเวลา 5 วัน วัดปริมาณของสาหร่ายโดยวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate spectrophotometer-Multiskan GO และคำนวณกิจกรรมการยับยั้งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 (Algicidal activity, %) ตามวิธีการของ Yang และคณะ (2012) ดังสมการ

$$\text{Algicidal activity (\%)} = [1 - (Tt - T0 + C0) / Ct] * 100$$

เมื่อ	C0	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร ในชุดควบคุมที่เวลาเริ่มต้น
	Ct	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร ในชุดควบคุม ณ เวลานั้น ๆ
	T0	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร ในชุดทดลองที่เวลาเริ่มต้น
	Tt	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร ในชุดทดลอง ณ เวลานั้น ๆ

5. ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งและฆ่าสาหร่าย LmTK01 โดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วย Genomic DNA minikit และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บน 16s rRNA ด้วยวิธี standard bacteriological method โดยทำการเพิ่มจำนวนยีนบน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primers จำนวน 2 primers คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-TACCTTG TTACGACTT-3') (Wu *et al.*, 2007) ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank/EMBL/DDGB ด้วยโปรแกรม Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Kimura, 1980)

6. วิเคราะห์และสร้าง Phylogenetic tree โดยนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาศึกษาลำดับวิวัฒนาการโดยสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar *et al.*, 2018)

### 2.3.4 การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรียต่อการควบคุมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

1. นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (Nutrient Broth) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30.00 ± 1 องศาเซลเซียส เวลา 24 - 48 ชั่วโมง

2. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ความเข้มข้นเซลล์ 10<sup>5</sup> - 10<sup>8</sup> ซีเอฟยูต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ ในการยับยั้งเซลล์สาหร่าย LmTK01 โดยเติมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ที่ค่าคลอโรฟิลล์ เอ เริ่มต้น 300 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในทุกชุดการทดลองลงในภาดหลุม 96 หลุม และตกตะกอนแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างกันจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบบเหลว (Nutrient Broth) ล้างเซลล์ด้วยอาหาร BG-11 จำนวน 2 - 3 ครั้ง และตกตะกอนอีกครั้ง ในอาหาร BG-11 เติม 100 ไมโครลิตร ในสภาพหลุมแบบ 96 หลุม โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็นดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เติมแบคทีเรียที่ความเข้มข้น  $10^5$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดการทดลองที่ 2 เติมแบคทีเรียที่ความเข้มข้น  $10^6$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 เติมแบคทีเรียที่ความเข้มข้น  $10^7$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดการทดลองที่ 4 เติมแบคทีเรียที่ความเข้มข้น  $10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน โดยการวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร (Yang *et al.*, 2012) และคำนวณกิจกรรมการยับยั้งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 (Algicidal activity, %) ตามวิธีการของ Yang และคณะ (2012)

3. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งสาหร่าย LmTK01 กับสาหร่ายชนิดอื่น ๆ ที่ค่าคลอโรฟิลล์ เอ เริ่มต้น 300 ไมโครกรัมต่อลิตร ในอัตราส่วน 1:1ทำการทดลองชุดละ 5 ซ้ำ โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็นดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เติมไดอะตอมสกุล *Chaetoceros* sp. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดการทดลองที่ 2 เติมไดอะตอมสกุล *Skeletonema* sp. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 เติมสาหร่ายสีเขียวสกุล *Chlorella* sp. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดการทดลองที่ 4 เติมสาหร่ายสีเขียวสกุล *Scenedesmus* sp. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดการทดลองที่ 5 เติมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Spirulina* sp. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดการทดลองที่ 6 เติมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

สังเกตการเปลี่ยนแปลงทุกวันเป็นเวลา 5 วัน โดยการวัดค่าความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร และคำนวณกิจกรรมการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Algicidal activity, %) ตามวิธีการของ Yang และคณะ (2012)

### 2.3.5 การทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรีย BP5 ในการยับยั้งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

1. เตรียมเซลล์ของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (Nutrient Broth) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ที่ความหนาแน่นเริ่มต้น  $10^7 - 10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร นำแบคทีเรียบางส่วนไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (Li *et al.*, 2016)

2. กรองส่วนของเหลวผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน และล้างเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง และเติม BG-11 ที่ปราศจากเชื้อ (Wang *et al.*, 2013) ทดสอบกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ที่ค่าคลอโรฟิลล์ เอ เริ่มต้น 300 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในสภาพหลุมแบบ 96 หลุม ทำการทดลองชุดละ 5 ซ้ำ โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็นดังนี้

ชุดควบคุมที่ 1 เติมอาหารเลี้ยงสาหร่ายแบบเหลว (BG-11) ที่ปราศจากแบคทีเรีย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดควบคุมที่ 2 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (nutrient Broth) ที่ปราศจากแบคทีเรีย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดการทดลองที่ 1 เติมแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (bacterial culture) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดการทดลองที่ 2 เติมสารละลายของเซลล์ที่ผ่านการกรอง (cell-free filtrate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 เติมเซลล์ที่ผ่านการล้างด้วย BG-11 (bacterial cells) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร และคำนวณกิจกรรมของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Algicidal activity, %) ตามวิธีการของ Yang และคณะ (2012)

### 2.3.6 การทดสอบผลของแบคทีเรีย BP5 ต่อลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

1. นำลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 13 มาปรับสภาพก่อนเริ่มทำการทดลองเป็นระยะเวลา 5 วัน ในน้ำความเค็ม 15.00 ส่วนในพัน โดยให้อาหาร 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 8:00 น. 11:00 น. 14:00 น. และ 17:00 น. ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์

2. นำกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนัก  $0.015 \pm 0.01$  กรัม จำนวน 10 ตัว ใส่ในโหลแก้วสำหรับทำการทดลองที่มีปริมาตรน้ำ 4 ลิตร ความเค็ม 15.00 ส่วนในพัน ให้แสงเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ให้อากาศตลอดเวลา และให้อาหารจนพ้ออิ่ม ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็นดังนี้

ชุดควบคุม ไม่มีการเติมแบคทีเรีย BP5 และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

ชุดการทดลองที่ 1 เติมแบคทีเรีย BP5 ที่ความหนาแน่นเริ่มต้น  $10^7 - 10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ 2 เติมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ที่คลอโรฟิลล์ เอ เริ่มต้น 120 ไมโครกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 เติมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ที่คลอโรฟิลล์ เอ เริ่มต้น 120 ไมโครกรัมต่อลิตร และแบคทีเรียสายพันธุ์ BP5 ที่ความหนาแน่นเริ่มต้น  $10^7 - 10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

3. ตรวจสอบค่าคลอโรฟิลล์ เอ ตามวิธีการของ สมหมาย (2538) และอัตราการรอดของกุ้งตามวิธีการของ สุธาทิพย์ (2562) (Keawtawee *et al.*, 2012; ธีญาภรณ์, 2557)

## 2.4 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

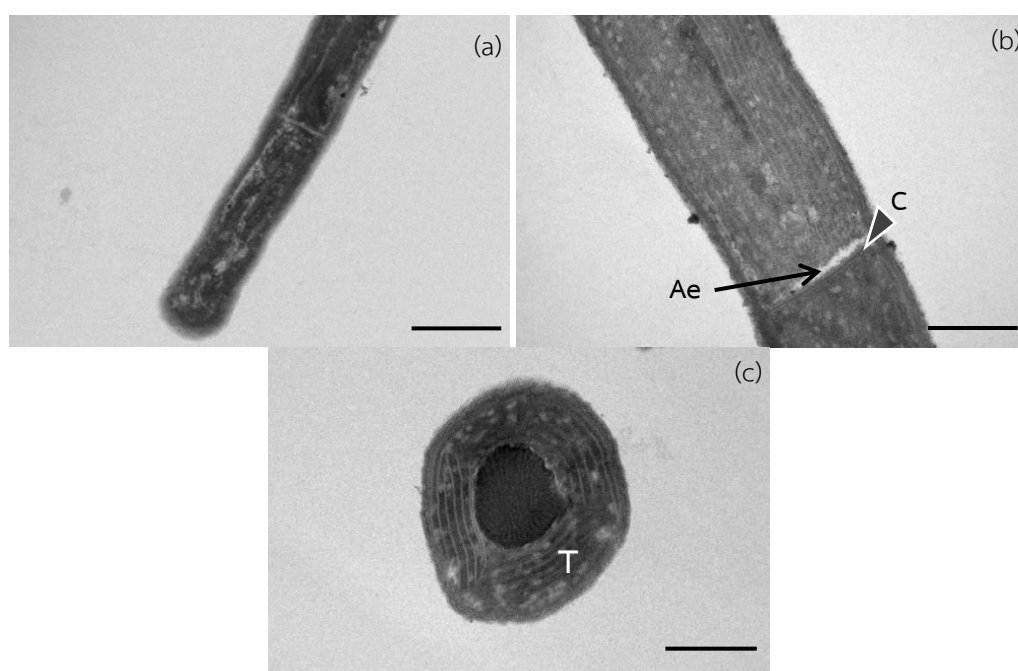
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มการทดลอง ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) โดยวิธี Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม R studio (version 4.0.1)

### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

#### 3.1 การศึกษาลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

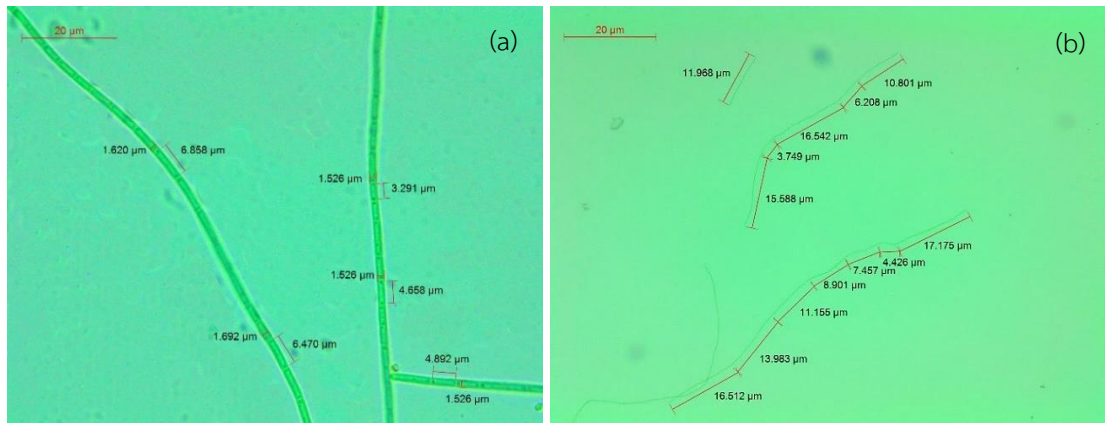
การศึกษาลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 พบว่า สาหร่ายมีสีเขียวเข้มอมฟ้า ลักษณะเป็นเส้นสาย ไม่แตกแขนง ไม่มีเยื่อหรือเมือกหุ้มเซลล์ ไม่พบเซลล์อะคีนีท (akinetes) และไม่พบเซลล์เฮเทอโรไซสต์ (heterocytes) ปลายยอดจะโค้งมน โดยไม่มีส่วน calyptra (Figure 9a) ภาพตัดตามยาวแสดงให้เห็นถึงด้านยาวมีความยาวมากกว่าด้านกว้าง และพบช่องว่างภายในเซลล์ไม่หนาหรือบางจนเกินไป (Figure 9b) ภาพตัดตามยาวแสดงให้เห็นถึงการเรียงตัวของร่างแหไทลาคอยด์จำนวนมากอย่างเป็นระเบียบ (parietal thylakoids) (Figure 9c)



**Figure 9.** Micrographs of cyanobacteria strain LmTK01; apical cell (a), separate disc (b), C = cross-wall, Ae = aerotope (Scale bar = 1 micrometre); thylakoid (T) (C) (Scale bar = 1 nanometre)

ค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาวของไตรโครมอยู่ที่  $1.64 \pm 0.11$  ไมโครเมตร และ  $5.41 \pm 1.25$  ไมโครเมตร ตามลำดับ ความยาวของไตรโครมยาวกว่าความกว้างในอัตราส่วน 3:1 (ยาว:กว้าง) ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นเท่ากับ  $41.51 \pm 27.24$  ไมโครเมตร (Figure 10) (Table 5) และมีจำนวนไตรโครมเฉลี่ยต่อฟิลาเมนต์  $54.85 \pm 54.02$  (1 - 196) ไตรโครมต่อฟิลาเมนต์





**Figure 10.** The morphology of cyanobacteria strain LmTK01; length and width of trichomes (a)1000x magnification microscope and length of filamentous (b) 100x magnification microscope.

**Table 5.** Average length and width of trichomes and filamentous length of cyanobacteria strain LmTK01.

Strain	Trichome		Average filament length (micrometre)
	Average length (micrometre)	Average width (micrometre)	
LmTK01	5.41 ± 1.25 (2.98 - 9.36)	1.64 ± 0.11 (1.45 - 2.06)	41.51 ± 27.24 (4.44 - 89.70)

### 3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 และผลกระทบของสาหร่ายต่อกุ้งขาวแวนนาไม

#### - อุณหภูมิ

การศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิ พีเอช และความเค็มต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ที่เลี้ยงในอาหาร BG-11 เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ในชุดการทดลองที่มีการควบคุมอุณหภูมิ ( $28.00 \pm 1$  องศาเซลเซียส) มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลอง มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ  $0.611 \pm 0.02$  (Figure 11a) ซึ่งมีค่าสูงกว่า LmTK01 ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้องที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ ( $28.00 - 32.00$  องศาเซลเซียส) มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ  $0.089 \pm 0.02$  ตามลำดับ (Table 6) โดย LmTK01 ในสภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิจะค่อย ๆ เพิ่มจำนวนอย่างช้า ๆ ในวันที่ 0 ถึงวันที่ 2 ของการทดลอง และจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วโดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลอง และลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 6 ไปจนถึงวันที่ 8 ของการทดลอง ขณะที่ในชุดการทดลองที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ พบว่า LmTK01 มีการเพิ่มจำนวนในวันแรกของการทดลอง จากนั้นลดจำนวนลงในวันที่ 2 จนถึงวันที่ 4 ของการทดลองและคงที่จนถึงวันที่ 9 ก่อนที่จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 10

#### -พีเอช

สำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ในสภาวะที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ 6.00, 7.00, 8.00, 9.00, 10.00 และ 11.00 พบว่า LmTK01 มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 8.00 มีค่า OD เท่ากับ  $0.95 \pm 0.13$  รองลงมาคือ พีเอช 7.00 มีค่า OD เท่ากับ  $0.637 \pm 0.07$  ตามลำดับ โดย LmTK01 ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8.00 สามารถเพิ่มจำนวนในช่วงสองวันแรก (วันที่ 0 ถึงวันที่ 2 ของการทดลอง) และค่อย ๆ เพิ่มจำนวนสูงขึ้นไปจนถึงวันที่ 9 ของการทดลอง ก่อนจะลดลงเล็กน้อยในวันที่ 10 สาหร่ายจะมีการเจริญเติบโตต่ำ เมื่อพีเอชสูงขึ้นอยู่ในช่วงระหว่างพีเอช 9.00 - 11.00 (Figure 11b) (Table 7) อย่างไรก็ตาม ค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 8.46 - 9.41 ในทุกชุดการทดลองที่เริ่มต้นพีเอชต่างกันอย่างวันชุดการทดลองที่พีเอช 6.00 มีค่าเฉลี่ยพีเอชตลอดการทดลองอยู่ที่ 6.50 ส่วนในชุดการทดลองเริ่มต้นที่ค่าพีเอช 10.00 และ 11.00 พบว่า ค่าพีเอชของน้ำเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในช่วง 8.00 - 9.00 ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

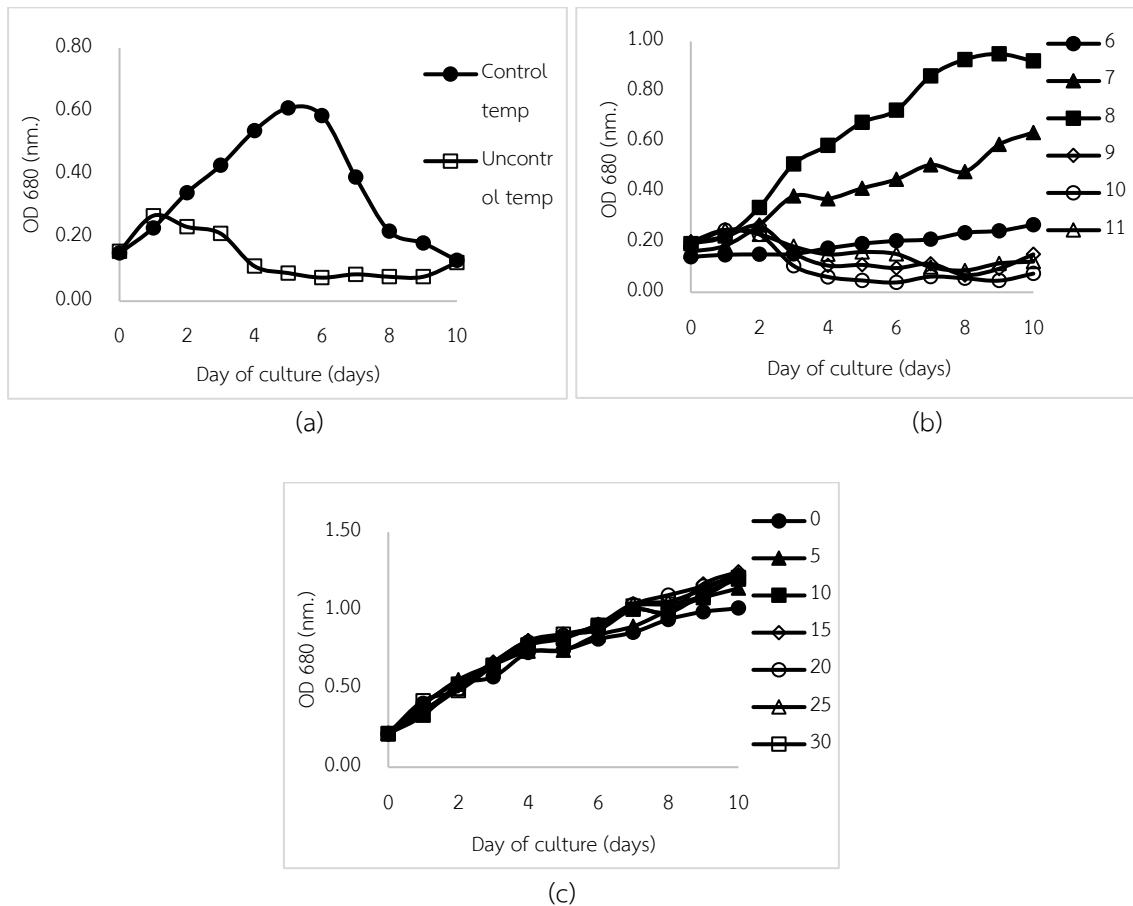
- ความเค็ม

ผลของปัจจัยความเค็มที่แตกต่างกัน 7 ระดับ ได้แก่ 0.00, 5.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00 และ 30.00 ส่วนในพัน พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 เจริญเติบโตได้ในทุกช่วงความเค็ม โดยมีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 10 ของการทดลอง ในค่าความเค็ม 15.00 ส่วนในพัน มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ  $1.246 \pm 0.04$  (Figure 11c) (Table 8) และมีค่าพีเอชเฉลี่ยอยู่ที่ 9.33 - 9.43 ตลอดทั้งการทดลอง รองลงมาเป็นความเค็มที่ 25.00 และ 20.00 ส่วนในพัน มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่  $1.231 \pm 0.05$  และ  $1.222 \pm 0.07$  ตามลำดับ

- อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม

ผลของความหนาแน่นเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ที่เลี้ยงร่วมกับกุ้งขาวแวนนาไม เป็นระยะเวลา 102 ชั่วโมง พบว่า อัตราการรอดของกุ้งที่ 24 ชั่วโมง ในชุดการทดลองที่ 1 (เติมสาหร่าย LmTK01 125 มิลลิลิตร) และชุดการทดลองที่ 2 (เติมสาหร่าย LmTK01 250 มิลลิลิตร) ต่ำกว่าชุดควบคุม (ไม่เติมสาหร่าย LmTK01) และชุดการทดลองที่ 3 (เติมสาหร่าย LmTK01 500 มิลลิลิตร) ที่มีอัตราการรอดอยู่ที่ 100 และ 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมง พบว่า ชุดการทดลองที่ 2 กุ้งมีอัตราการรอดอยู่ที่ 30 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เท่ากับ 985.74 ไมโครกรัมต่อลิตร ขณะที่ชุดการทดลองที่ 1 กุ้งมีอัตราการรอดลดลงเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เท่ากับ 543.07 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับอัตราการรอดของกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 66 ซึ่งมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เท่ากับ 1862.28 ไมโครกรัมต่อลิตร และมีค่าพีเอชเท่ากับ 9.02 โดยในชั่วโมงที่ 102 ในชุดการทดลองที่มีการเลี้ยงกุ้งร่วมกับสาหร่าย LmTK01 ทั้ง 3 ความหนาแน่นเซลล์ พบว่า กุ้งมีอัตราการรอด 0 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับชุดควบคุมที่ไม่มีการตายเกิดขึ้น (Figure 12a) เนื่องจากชุดควบคุมไม่มีการเลี้ยงสาหร่ายกับกุ้งร่วมกันและไม่พบการลอกคราบของกุ้ง ขณะที่ชุดการทดลองที่มีการเลี้ยงกุ้งร่วมกับสาหร่าย LmTK01 ที่ความหนาแน่นเซลล์ต่าง ๆ พบการลอกคราบของกุ้ง ซึ่งลักษณะของกุ้งที่ตายเป็นส่วนใหญ่จะมีสาหร่ายติดอยู่บริเวณเหงือกและรยางค์ขาว่ายน้ำ และยังตรวจพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ในกระเพาะอาหารลำไส้ และอุจจาระของกุ้ง (Figure 13) เมื่อตรวจสอบคุณภาพน้ำพบว่า ค่าพีเอชในช่วงเวลาเดียวกันของแต่ละวันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (Figure 12b) สอดคล้องกับการทดลองการเลี้ยงสาหร่ายในสภาวะความเค็มต่างกัน โดยชุดการทดลองที่มีความเค็ม 15.00 ส่วนในพัน ในชั่วโมงที่ 48 มีค่าพีเอช เฉลี่ยอยู่ที่  $8.90 \pm 0.21$  มีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ที่มีค่าพีเอช เท่ากับ  $8.93 \pm 0.11$  และ  $8.94 \pm 0.06$  ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าพีเอชในชุดควบคุม ( $7.52 \pm 0.10$ ) และชุดการทดลองที่ 3 ( $8.77 \pm 0.14$ ) (Table 9) และในชั่วโมงที่ 78 พบว่า อัตราการรอดของกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 เป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าพีเอชอยู่ที่  $9.65 \pm 0.00$  และ  $9.40 \pm 0.00$  ตามลำดับ ขณะที่ชุดควบคุม มีค่าพีเอช

อยู่ที่  $7.70 \pm 0.06$  โดยค่าพีเอชมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดของกึ่งอย่างมีนัยสำคัญ  $r=0.66$  ( $P < 0.05$ ) และค่าเฉลี่ยของค่าออกซิเจนละลายน้ำของชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 ตลอดทั้งการทดลองอยู่ที่  $7.96 \pm 0.14$ ,  $7.95 \pm 0.14$  และ  $8.00 \pm 0.14$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Figure 12d) ซึ่งมีความสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเลี้ยงกึ่งร่วมกับสาหร่ายที่มีค่าเท่ากับ  $7.69 \pm 0.06$  มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )



**Figure 11.** The growth of cyanobacteria strain LmTK01 at different factors for 11 days; temperatures (a), pH (b) and salinity (c).

**Table 6.** Variation of pH in cyanobacteria strain LmTK01 cultivated at different temperatures; control temperature ( $28.00 \pm 1$  °C) and uncontrol temperature ( $28.00 - 32.00$  °C) for 10 days.

Day of culture (days)	pH	
	Control temperature ( $28.00 \pm 1$ °C)	Uncontrol temperature ( $28.00 - 32.00$ °C)
0	$8.35 \pm 0.02^a$	$8.33 \pm 0.07^a$
1	$9.18 \pm 0.03^a$	$8.93 \pm 0.08^b$
2	$9.56 \pm 0.07^a$	$9.12 \pm 0.03^b$
3	$9.62 \pm 0.05^a$	$8.62 \pm 0.33^b$
4	$9.84 \pm 0.03^a$	$8.30 \pm 0.04^b$
5	$9.72 \pm 0.09^a$	$8.32 \pm 0.07^b$
6	$9.42 \pm 0.05^a$	$8.46 \pm 0.03^b$
7	$8.96 \pm 0.06^a$	$8.57 \pm 0.03^b$
8	$8.53 \pm 0.04^a$	$8.44 \pm 0.13^a$
9	$8.33 \pm 0.03^a$	$8.66 \pm 0.06^b$
10	$8.42 \pm 0.03^a$	$8.81 \pm 0.05^b$

Values shown are mean  $\pm$  SD (n = 4). Means with different letters in the same row mean a significant difference ( $P < 0.05$ )

**Table 7.** Variation of pH in cyanobacteria strain LmTK01 cultivated at 6 different pH levels for 10 days.

Day of culture (days)	pH					
	6	7	8	9	10	11
0	6.13 ± 0.06 <sup>a</sup>	7.02 ± 0.00 <sup>ab</sup>	8.09 ± 0.00 <sup>b</sup>	9.02 ± 0.0 <sup>b</sup>	10.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	11.01 ± 0.00 <sup>b</sup>
1	6.53 ± 0.08 <sup>a</sup>	8.08 ± 0.04 <sup>b</sup>	8.67 ± 0.03 <sup>c</sup>	9.02 ± 0.05 <sup>cd</sup>	9.45 ± 0.04 <sup>c</sup>	9.83 ± 0.03 <sup>c</sup>
2	6.52 ± 0.07 <sup>a</sup>	8.05 ± 0.03 <sup>b</sup>	9.28 ± 0.07 <sup>b</sup>	8.97 ± 0.06 <sup>b</sup>	9.31 ± 0.06 <sup>ab</sup>	9.52 ± 0.04 <sup>ab</sup>
3	6.52 ± 0.07 <sup>a</sup>	8.11 ± 9.03 <sup>bc</sup>	9.51 ± 0.07 <sup>c</sup>	8.30 ± 0.04 <sup>a</sup>	8.91 ± 0.07 <sup>a</sup>	9.23 ± 0.04 <sup>ab</sup>
4	6.55 ± 0.07 <sup>a</sup>	8.20 ± 0.04 <sup>b</sup>	9.69 ± 0.08 <sup>c</sup>	8.26 ± 0.03 <sup>d</sup>	8.60 ± 0.04 <sup>e</sup>	9.01 ± 0.04 <sup>a</sup>
5	6.50 ± 0.08 <sup>a</sup>	8.25 ± 0.07 <sup>b</sup>	9.79 ± 0.06 <sup>c</sup>	8.41 ± 0.04 <sup>d</sup>	8.67 ± 0.03 <sup>e</sup>	9.03 ± 0.03 <sup>a</sup>
6	6.54 ± 0.08 <sup>a</sup>	8.43 ± 0.06 <sup>b</sup>	9.79 ± 0.04 <sup>c</sup>	8.48 ± 0.04 <sup>d</sup>	8.75 ± 0.03 <sup>e</sup>	9.19 ± 0.04 <sup>a</sup>
7	6.53 ± 0.06 <sup>a</sup>	8.66 ± 0.05 <sup>b</sup>	9.98 ± 0.11 <sup>c</sup>	8.56 ± 0.06 <sup>d</sup>	8.82 ± 0.01 <sup>d</sup>	9.20 ± 0.07 <sup>d</sup>
8	6.60 ± 0.08 <sup>a</sup>	8.62 ± 0.11 <sup>b</sup>	10.00 ± 0.05 <sup>c</sup>	8.62 ± 0.06 <sup>d</sup>	8.93 ± 0.01 <sup>d</sup>	9.15 ± 0.02 <sup>d</sup>
9	6.63 ± 0.05 <sup>a</sup>	9.08 ± 0.04 <sup>b</sup>	9.89 ± 0.09 <sup>c</sup>	8.78 ± 0.12 <sup>d</sup>	9.17 ± 0.11 <sup>d</sup>	9.16 ± 0.02 <sup>d</sup>
10	6.50 ± 0.06 <sup>a</sup>	8.97 ± 0.12 <sup>b</sup>	9.50 ± 0.14 <sup>c</sup>	9.01 ± 0.18 <sup>b</sup>	8.98 ± 0.05 <sup>b</sup>	9.26 ± 0.03 <sup>c</sup>

Values shown are mean ± SD (n = 4). Means with different letters in the same row mean a significant difference ( $P < 0.05$ )

**Table 8.** Variation of pH in cyanobacteria strain LmTK01 cultivated at 7 different salinity levels for 10 days.

Day of culture (days)	pH							
	(ppt)	0	5	10	15	20	25	30
0		8.08 ± 0.00 <sup>a</sup>	8.08 ± 0.00 <sup>a</sup>	8.08 ± 0.00 <sup>a</sup>	8.08 ± 0.00 <sup>a</sup>	8.08 ± 0.00 <sup>a</sup>	8.08 ± 0.00 <sup>a</sup>	8.08 ± 0.00 <sup>a</sup>
1		8.41 ± 0.02 <sup>ac</sup>	8.32 ± 0.08 <sup>a</sup>	8.23 ± 0.09 <sup>ab</sup>	8.37 ± 0.14 <sup>abc</sup>	8.45 ± 0.07 <sup>ac</sup>	8.40 ± 0.04 <sup>abc</sup>	8.53 ± 0.04 <sup>c</sup>
2		9.14 ± 0.01 <sup>a</sup>	9.02 ± 0.07 <sup>a</sup>	8.93 ± 0.07 <sup>a</sup>	8.90 ± 0.20 <sup>a</sup>	8.97 ± 0.12 <sup>a</sup>	8.97 ± 0.13 <sup>a</sup>	8.98 ± 0.15 <sup>a</sup>
3		9.19 ± 0.09 <sup>ac</sup>	9.26 ± 0.07 <sup>abc</sup>	9.14 ± 0.02 <sup>c</sup>	9.41 ± 0.05 <sup>ab</sup>	9.35 ± 0.17 <sup>ab</sup>	9.38 ± 0.12 <sup>ab</sup>	9.31 ± 0.01 <sup>abc</sup>
4		9.41 ± 0.16 <sup>ab</sup>	9.42 ± 0.28 <sup>ab</sup>	9.68 ± 0.06 <sup>a</sup>	9.68 ± 0.08 <sup>a</sup>	9.59 ± 0.01 <sup>ab</sup>	9.52 ± 0.05 <sup>ab</sup>	9.54 ± 0.02 <sup>ab</sup>
5		9.57 ± 0.09 <sup>a</sup>	9.54 ± 0.05 <sup>a</sup>	9.58 ± 0.04 <sup>a</sup>	9.59 ± 0.10 <sup>a</sup>	9.61 ± 0.02 <sup>a</sup>	9.55 ± 0.03 <sup>a</sup>	9.57 ± 0.02 <sup>a</sup>
6		9.90 ± 0.09 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.02 <sup>a</sup>	9.98 ± 0.04 <sup>a</sup>	9.98 ± 0.12 <sup>a</sup>	9.98 ± 0.06 <sup>a</sup>	9.93 ± 0.04 <sup>a</sup>	9.97 ± 0.04 <sup>a</sup>
7		9.96 ± 0.07 <sup>abc</sup>	10.00 ± 0.03 <sup>abc</sup>	9.94 ± 0.09 <sup>abc</sup>	10.02 ± 0.10 <sup>ab</sup>	10.06 ± 0.10 <sup>ab</sup>	9.81 ± 0.12 <sup>ac</sup>	9.82 ± 0.08 <sup>ac</sup>
8		9.98 ± 0.06 <sup>a</sup>	10.07 ± 0.10 <sup>a</sup>	9.94 ± 0.23 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.07 <sup>a</sup>	10.03 ± 0.06 <sup>a</sup>	9.96 ± 0.07 <sup>a</sup>	9.87 ± 0.12 <sup>a</sup>
9		9.68 ± 0.12 <sup>a</sup>	9.76 ± 0.13 <sup>a</sup>	9.61 ± 0.11 <sup>a</sup>	9.73 ± 0.11 <sup>a</sup>	9.59 ± 0.18 <sup>a</sup>	9.60 ± 0.12 <sup>a</sup>	9.66 ± 0.09 <sup>a</sup>
10		9.71 ± 0.09 <sup>a</sup>	9.90 ± 0.12 <sup>a</sup>	9.78 ± 0.18 <sup>a</sup>	9.75 ± 0.08 <sup>a</sup>	9.69 ± 0.07 <sup>a</sup>	9.73 ± 0.05 <sup>a</sup>	9.76 ± 0.03 <sup>a</sup>

Values shown are mean ± SD (n = 4). Means with different letters in the same row mean a significant difference ( $P < 0.05$ )

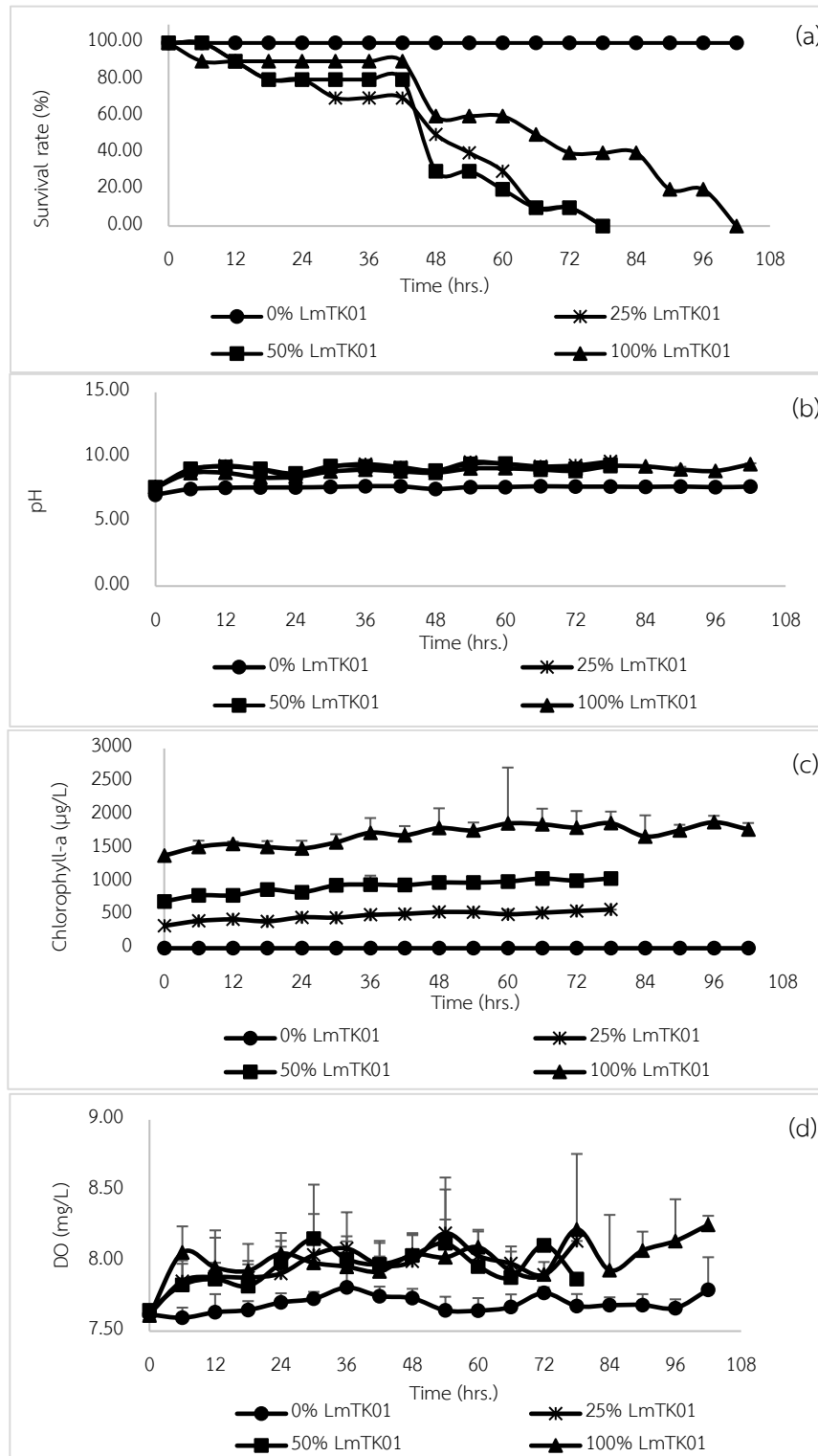


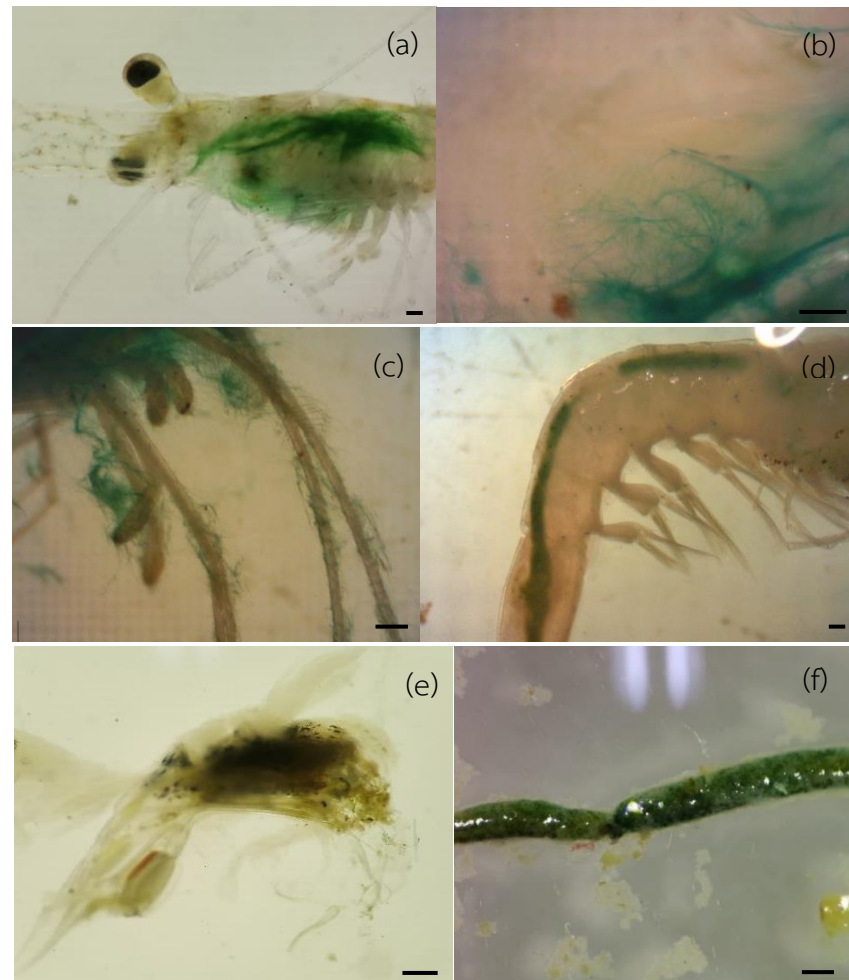
Figure 12. Survival rate of Pacific white shrimp (a) and water qualities; pH (b), chlorophyll-a (c) and dissolved oxygen (DO) (d) cultured with cyanobacteria strain LmTK01 at different density.



**Table 9.** Water qualities and survival rate of Pacific white shrimp cultured with cyanobacteria strain LmTK01 for 102 hours.

Time (hrs.)	DO (mg/L)				pH				Chlorophyll-a (µg/L)				Survival rate (%)			
	Control	T1	T2	T3	Control	T1	T2	T3	Control	T1	T2	T3	Control	T1	T2	T3
0	7.62 ± 0.33 <sup>a</sup>	7.62±0.01 <sup>a</sup>	7.65±0.01 <sup>b</sup>	7.61±0.02 <sup>a</sup>	7.08±0.02 <sup>a</sup>	7.57±0.04 <sup>d</sup>	7.66±0.03 <sup>b</sup>	7.69±0.03 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	336.17±13.20 <sup>d</sup>	703.70±25.80 <sup>c</sup>	1390.63±33.04 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>
6	7.60 ± 0.07 <sup>a</sup>	7.86±0.12 <sup>c</sup>	7.83±0.17 <sup>c</sup>	8.06±0.19 <sup>b</sup>	7.51±0.12 <sup>a</sup>	8.97±0.07 <sup>d</sup>	9.08±0.08 <sup>c</sup>	8.74±0.02 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	409.71±23.52 <sup>d</sup>	793.64±19.51 <sup>c</sup>	1522.21±93.60 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	90±31.62 <sup>a</sup>
12	7.63 ± 0.13 <sup>a</sup>	7.89±0.10 <sup>ab</sup>	7.87±0.34 <sup>ab</sup>	7.95±0.21 <sup>b</sup>	7.62±0.08 <sup>a</sup>	9.31±0.04 <sup>d</sup>	9.23±0.06 <sup>c</sup>	8.76±0.05 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	433.14±17.14 <sup>d</sup>	794.18±21.31 <sup>c</sup>	1565.37±36.85 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	90±31.62 <sup>a</sup>	90±31.62 <sup>a</sup>	90±31.62 <sup>a</sup>
18	7.65±0.06 <sup>a</sup>	7.88±0.12 <sup>b</sup>	7.82±0.15 <sup>b</sup>	7.93±0.19 <sup>b</sup>	7.64±0.06 <sup>a</sup>	9.04±0.12 <sup>c</sup>	9.08±0.10 <sup>c</sup>	8.41±0.10 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	403.76±38.27 <sup>d</sup>	882.86±41.16 <sup>c</sup>	1521.37±87.34 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	80±42.16 <sup>a</sup>	80±42.16 <sup>a</sup>	90±31.62 <sup>a</sup>
24	7.70±0.06 <sup>a</sup>	7.91±0.19 <sup>a</sup>	7.99±0.16 <sup>a</sup>	8.05±0.14 <sup>a</sup>	7.64±0.08 <sup>a</sup>	8.49±0.08 <sup>b</sup>	8.72±0.11 <sup>c</sup>	8.46±0.09 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	464.59±23.48 <sup>d</sup>	841.23±15.69 <sup>c</sup>	1497.68±116.52 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	80±42.16 <sup>a</sup>	80±42.16 <sup>a</sup>	90±31.62 <sup>a</sup>
30	7.73±0.05 <sup>a</sup>	8.04±0.29 <sup>b</sup>	8.16±0.38 <sup>b</sup>	7.98±0.13 <sup>ab</sup>	7.68±0.05 <sup>a</sup>	9.23±0.10 <sup>c</sup>	9.29±0.21 <sup>c</sup>	8.86±0.07 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	460.09±19.38 <sup>d</sup>	945.71±36.38 <sup>c</sup>	1590.41±121.55 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	70±48.30 <sup>a</sup>	80±42.16 <sup>a</sup>	90±31.62 <sup>a</sup>
36	7.81±0.11 <sup>a</sup>	8.09±0.26 <sup>b</sup>	8.01±0.16 <sup>ab</sup>	7.96±0.18 <sup>ab</sup>	7.74±0.08 <sup>a</sup>	9.44±0.11 <sup>c</sup>	9.26±0.24 <sup>c</sup>	9.00±0.15 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	501.61±20.28 <sup>d</sup>	956.68±133.55 <sup>c</sup>	1734.61±220.76 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	70±48.30 <sup>a</sup>	80±42.16 <sup>a</sup>	90±31.62 <sup>a</sup>
42	7.75±0.07 <sup>a</sup>	7.97±0.17 <sup>b</sup>	7.97±0.15 <sup>b</sup>	7.92±0.11 <sup>b</sup>	7.72±0.10 <sup>a</sup>	9.21±0.16 <sup>c</sup>	9.12±0.24 <sup>c</sup>	8.88±0.16 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	515.00±23.63 <sup>d</sup>	948.79±71.45 <sup>c</sup>	1696.55±183.23 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	70±48.30 <sup>a</sup>	80±42.16 <sup>a</sup>	90±31.62 <sup>a</sup>
48	7.73±0.07 <sup>a</sup>	8.00±0.19 <sup>b</sup>	8.04±0.16 <sup>b</sup>	8.04±0.15 <sup>b</sup>	7.52±0.10 <sup>a</sup>	8.93±0.11 <sup>c</sup>	8.94±0.06 <sup>c</sup>	8.77±0.14 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	543.07±21.85 <sup>d</sup>	985.74±48.40 <sup>c</sup>	1805.70±295.55 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	50±52.70 <sup>ab</sup>	30±48.30 <sup>b</sup>	60±51.64 <sup>ab</sup>
54	7.65±0.10 <sup>a</sup>	8.20±0.29 <sup>b</sup>	8.12±0.38 <sup>ab</sup>	8.02±0.27 <sup>ab</sup>	7.67±0.05 <sup>a</sup>	9.60±0.04 <sup>c</sup>	9.46±0.20 <sup>c</sup>	9.10±0.14 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	541.83±20.22 <sup>d</sup>	985.37±46.80 <sup>c</sup>	1770.06±247.23 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	40±51.64 <sup>b</sup>	30±48.30 <sup>b</sup>	60±51.64 <sup>ab</sup>
60	7.65±0.09 <sup>a</sup>	8.04±0.17 <sup>b</sup>	7.96±0.11 <sup>b</sup>	8.10±0.08 <sup>b</sup>	7.67±0.04 <sup>a</sup>	9.46±0.06 <sup>c</sup>	9.48±0.13 <sup>c</sup>	9.12±0.17 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	510.56±64.36 <sup>d</sup>	1002.19±64.06 <sup>c</sup>	1873.46±339.93 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	30±48.30 <sup>b</sup>	20±42.16 <sup>b</sup>	60±51.64 <sup>ab</sup>
66	7.67±0.09 <sup>a</sup>	7.98±0.08 <sup>b</sup>	7.88±0.08 <sup>ab</sup>	7.93±0.17 <sup>b</sup>	7.73±0.07 <sup>a</sup>	9.27±0.39 <sup>b</sup>	9.16±0.28 <sup>b</sup>	9.02±0.11 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	533.54±22.94 <sup>d</sup>	1046.35±47.16 <sup>c</sup>	1862.28±233.41 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	10±31.62 <sup>b</sup>	10±31.62 <sup>b</sup>	50±52.70 <sup>b</sup>
72	7.77±0.04 <sup>a</sup>	7.90±0.00 <sup>abc</sup>	8.11±0.00 <sup>c</sup>	7.90±0.09 <sup>b</sup>	7.70±0.07 <sup>a</sup>	9.34±0.00 <sup>c</sup>	9.09±0.00 <sup>bc</sup>	8.92±0.08 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	558.78±0.00 <sup>d</sup>	1014.81±0.00 <sup>c</sup>	1812.23±248.43 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	10±31.62 <sup>b</sup>	10±31.62 <sup>b</sup>	40±51.64 <sup>b</sup>
78	7.68±0.09 <sup>a</sup>	8.14±0.00 <sup>ab</sup>	7.87±0.00 <sup>ab</sup>	8.22±0.53 <sup>b</sup>	7.70±0.06 <sup>a</sup>	9.65±0.00 <sup>c</sup>	9.40±0.00 <sup>bc</sup>	9.29±0.08 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	580.41±0.00 <sup>d</sup>	1047.25±0.00 <sup>c</sup>	1877.75±174.03 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	0±0.00 <sup>b</sup>	0±0.00 <sup>b</sup>	40±51.64 <sup>c</sup>
84	7.68±0.06 <sup>a</sup>			7.93±0.39 <sup>a</sup>	7.68±0.07 <sup>a</sup>			9.27±0.08 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>			1679.03±221.76 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>			40±51.64 <sup>b</sup>
90	7.69±0.08 <sup>a</sup>			8.07±0.13 <sup>b</sup>	7.71±0.07 <sup>a</sup>			9.03±0.21 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>			1769.60±84.43 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>			20±42.16 <sup>b</sup>
96	7.66±0.02 <sup>a</sup>			8.14±0.30 <sup>b</sup>	7.66±0.09 <sup>a</sup>			8.92±0.08 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>			1891.72±97.21 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>			20±42.16 <sup>b</sup>
102	7.79±0.23 <sup>a</sup>			8.26± <sup>0.06b</sup>	7.70±0.05 <sup>a</sup>			9.44±0.07 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>			1785.38±95.59 <sup>b</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>			0±0.00 <sup>b</sup>

Values shown are mean ± SD (n = 10). Means with different letters in the same row mean a significant difference ( $P < 0.05$ )

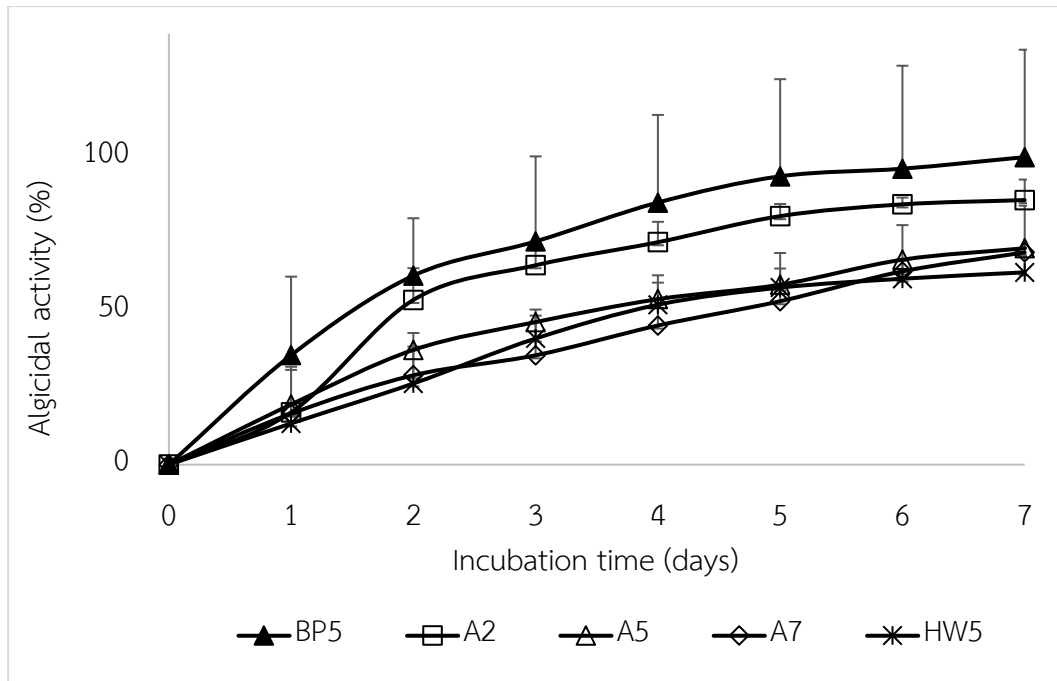


**Figure 13.** Mortality characteristics of Pacific white shrimp cultured with cyanobacteria strain LmTK01 at different density; filament of algae clogging on gill of shrimp (a-b), attached to pereopod (c), intestine (d), stomach (e) and feces (f). (Scale bar = 20,000 micrometre).

### 3.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่ควบคุมการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

การคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำที่ทำการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวและปลาตุ๊ก จังหวัดสงขลา สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด จำนวน 53 ไอโซเลท นำมาทดลองเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 พบว่า แบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BP5, A2, A5, A7 และ HW5 ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย LmTK01 ได้ดีที่สุดภายใน 7 วัน ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสาหร่าย LmTK01 ที่เลี้ยงร่วมกันอยู่ที่ 99.94, 85.99, 70.33, 68.98 และ 62.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 14) โดยแบคทีเรียไอโซเลท BP5 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาตุ๊ก สามารถลดการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้สูงถึง  $35.59 \pm 19.24$  เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง (Table 10) และสามารถควบคุมสาหร่าย LmTK01 ได้สูงสุด 99.94 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 ของการทดลอง

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ดีที่สุด 5 ไอโซเลท พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด ลักษณะสีของโคโลนี BP5 เป็นสีส้มอมครีม (orange cream color) A7 เป็นสีเหลือง A2, A5 และ HW5 เป็นสีขาว ตามลำดับ โดยลักษณะของไอโซเลท BP5 และ A2 เป็นรูปแท่ง (rod) มีการสร้างเอ็นโดสปอร์ภายในเซลล์ ขณะที่ไอโซเลท A5 และ HW5 มีลักษณะเป็นรูปแท่งสั้น และไอโซเลท A7 มีลักษณะเป็นรูปกลม (cocci) ตามลำดับ (Figure 15) (Table 11) เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank/EMBL/DDJB ด้วยวิธีการ Blast ตาม Kimura (1980) และทำการวิเคราะห์ Phylogenetic tree พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท BP5 มีค่าความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียชนิด *Fictibacillus halophilus* สายพันธุ์ AS8 ที่ระดับ 99.93 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น *Fictibacillus phosphorivorans* สายพันธุ์ RP3 ที่ระดับ 99.93 เปอร์เซ็นต์ และ *Bacillus nanhaiensis* สายพันธุ์ K-W39 ที่ระดับ 99.93 ตามลำดับ โดยกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียไอโซเลท BP5 จัดอยู่ในไฟลัม Firmicutes อันดับ Bacillales วงศ์ Fictibacillus จีนัส *Fictibacillus* (Figure 16) (Table 12)



**Figure 14.** Effect of 5 isolates bacteria on growth inhibition of cyanobacteria strain LmTK01 for 7 days.

**Table 10.** Percentage of algicidal activity of 5 isolates of bacteria on the growth of cyanobacteria strain LmTK01 for 7 days.

Isolate bacteria	Percentage of algicidal activity (%)							
	(Days)	1	2	3	4	5	6	7
BP5		35.59 ± 19.24 <sup>a</sup>	61.43 ± 17.91 <sup>as</sup>	72.55 ± 14.00 <sup>acf</sup>	85.19 ± 10.43 <sup>acf</sup>	93.71 ± 7.73 <sup>af</sup>	96.19 ± 7.75 <sup>acfg</sup>	99.94 ± 6.30 <sup>acf</sup>
A2		17.01 ± 14.81 <sup>ab</sup>	53.54 ± 10.30 <sup>acfh</sup>	64.81 ± 6.19 <sup>acf</sup>	72.30 ± 6.62 <sup>abf</sup>	80.77 ± 3.94 <sup>abcf</sup>	84.59 ± 2.22 <sup>abcfg</sup>	85.99 ± 6.68 <sup>abd</sup>
A5		19.56 ± 9.86 <sup>ab</sup>	37.29 ± 9.95 <sup>abcfh</sup>	46.33 ± 15.68 <sup>abcefg</sup>	53.79 ± 14.15 <sup>abef</sup>	58.49 ± 13.11 <sup>bcef</sup>	66.61 ± 7.92 <sup>abcefg</sup>	70.33 ± 7.78 <sup>abdf</sup>
A7		16.59 ± 14.21 <sup>ab</sup>	29.04 ± 13.75 <sup>bceefgh</sup>	35.54 ± 14.86 <sup>bcefg</sup>	45.22 ± 16.33 <sup>bef</sup>	53.12 ± 15.68 <sup>bcef</sup>	62.81 ± 15.05 <sup>abcefg</sup>	68.98 ± 15.19 <sup>abdf</sup>
HW5		13.40 ± 6.71 <sup>ab</sup>	26.38 ± 11.98 <sup>bceefgh</sup>	41.00 ± 7.43 <sup>abcefg</sup>	51.98 ± 7.17 <sup>abcef</sup>	57.53 ± 6.21 <sup>bcef</sup>	60.42 ± 5.88 <sup>a</sup> <sup>bcefg</sup>	62.49 ± 5.37 <sup>abef</sup>

Values shown are mean ± SD (n = 5). Means with different letters in the same column mean a significant difference ( $P < 0.05$ )

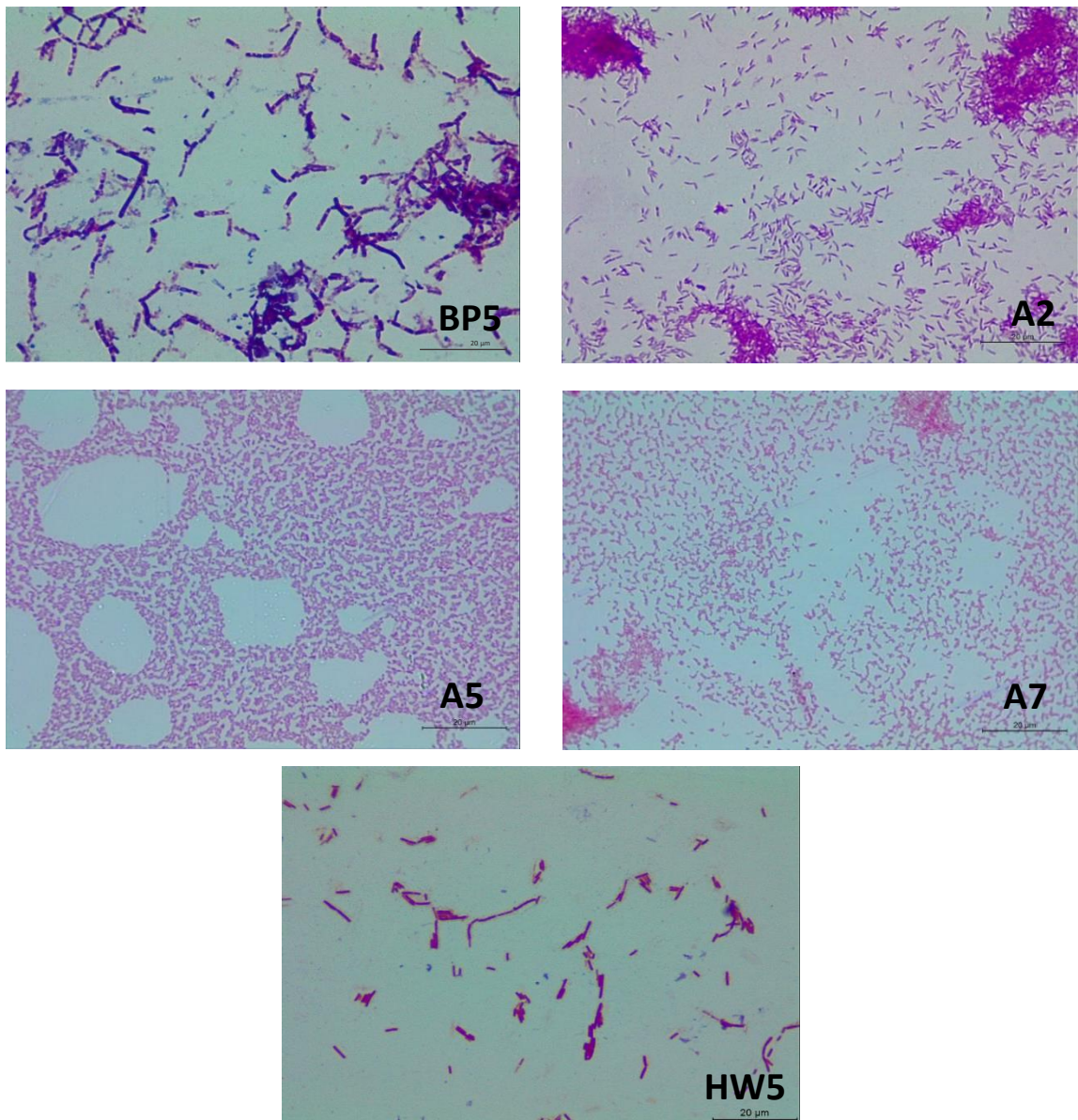
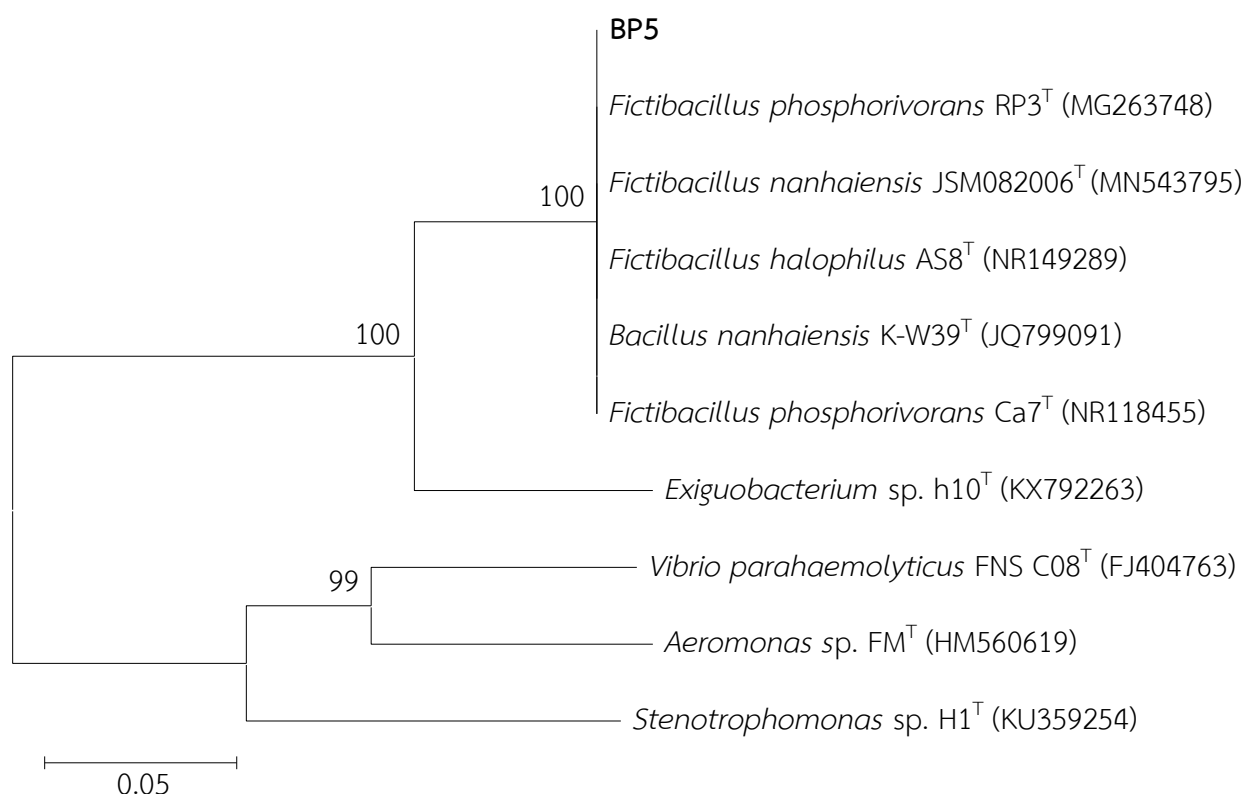


Figure 15. Gram stain of 5 isolates bacteria, which showed strong inhibitory effect on cyanobacteria strain LmTK01.

**Table 11.** Morphology of 5 isolates bacteria, which showed strong inhibitory effect on cyanobacteria strain LmTK01.

CHARACTERISTIC	BP5	A2	A5	A7	HW5
COLONY COLOR	Orange Cream	White	White	Yellow	White
CELL SHAPE	Rod	Rod	Short rod	Spherical	Rod
ENDOSPORE FORMING	Yes	Yes	No	No	No
GRAM'S STRAIN	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
SIMILAR	<i>Fictibacillus</i> sp.	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown



**Figure 16.** Phylogenetic tree of BP5 based on the 16S rRNA gene sequence (Scale bar = 0.05).

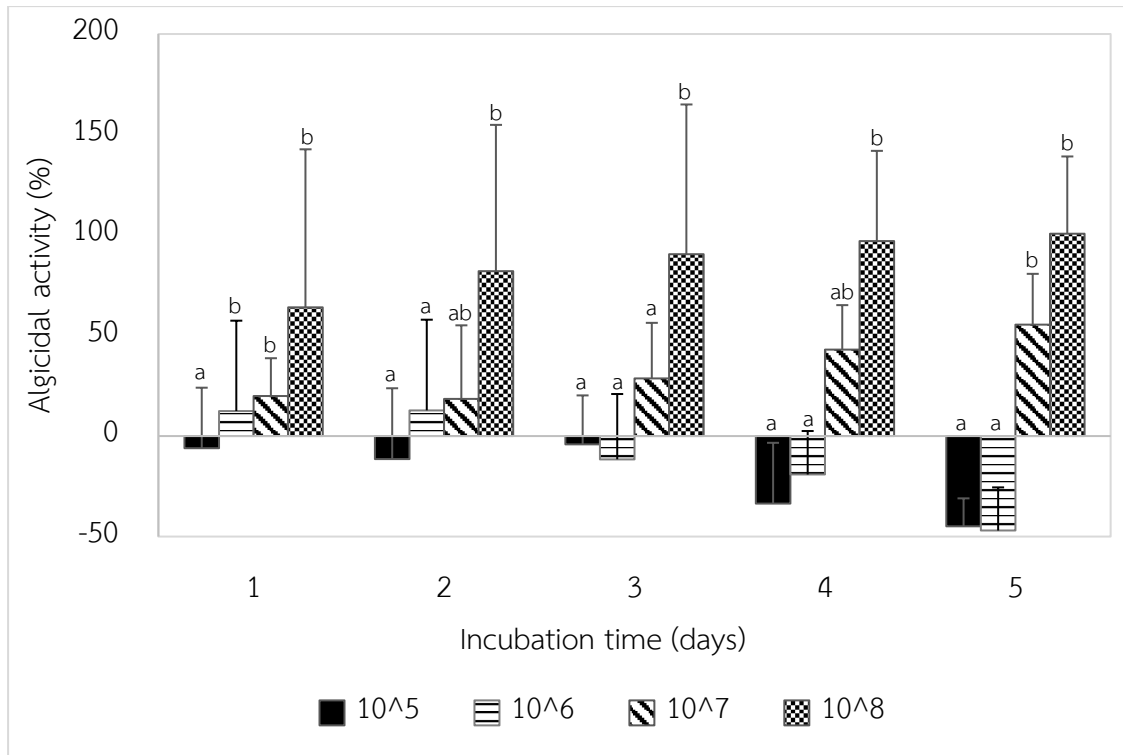
**Table 12.** Homology of nucleotide sequences on 16S rRNA gene of BP5.

Strain	Closest match in GenBank	16S rRNA gene fragment length (bp)	Identity (%)	Query coverage (%)	Accession number
BP5	<i>Fictibacillus halophilus</i> AS8	1,446	99.93	97	NR149289
	<i>Fictibacillus</i> <i>phosphorivorans</i> RP3	1,495	99.93	96	MG263748
	<i>Bacillus nanhaiensis</i> K-W39	1,504	99.93	96	JQ799091
	<i>Bacillus nanhaiensis</i> JZ-2013	1,454	99.51	97	KF841622
	<i>Fictibacillus</i> <i>nanhaiensis</i> JSM082006	1,429	99.93	96	NR117524



### 3.4 การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรียต่อการควบคุมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

การทดสอบความหนาแน่นของแบคทีเรีย BP5 ที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $10^5 - 10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เพื่อการยับยั้งการเจริญเติบโตสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ระยะเวลา 5 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่มีแบคทีเรีย BP5 ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $10^5$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ของไอโซเลท BP5 ไม่พบการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายตลอดระยะเวลา 5 วัน ขณะที่ชุดการทดลองที่มีแบคทีเรีย BP5 ความหนาแน่นเซลล์  $10^6$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย LmTK01 ในวันที่ 1 และ 2 ของการทดลอง หลังจากนั้นพบปริมาณของสาหร่าย LmTK01 เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 3 จนถึงวันที่ 5 ของการทดลอง ขณะที่แบคทีเรีย BP5 ที่มีความหนาแน่นเซลล์  $10^7 - 10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดเท่ากับ 55 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5 ของการทดลอง (Table 13) ซึ่งที่ความหนาแน่นเซลล์  $10^7$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร พบเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย LmTK01 เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 3 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยมีค่าการยับยั้งอยู่ที่  $55.38 \pm 25.31$  เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดการทดลองที่ความหนาแน่นเซลล์ของแบคทีเรีย BP5 เท่ากับ  $10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้สูงถึง 64 เปอร์เซ็นต์ ในวันแรกของการทดลองและสามารถกำจัดสาหร่าย LmTK01 ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดภายในเวลา 5 วัน ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) (Figure 17)



**Figure 17.** Growth inhibition of cyanobacteria strain LmTK01 cultured with BP5 at different cell densities for 5 days; ■  $3 \times 10^5$ , ▨  $3 \times 10^6$ , ▩  $3 \times 10^7$  and ▤  $3 \times 10^8$  CFU/mL. (Positive value = the bacteria can inhibit the growth of LmTK01; Negative value = the bacteria cannot inhibit the growth of LmTK01).

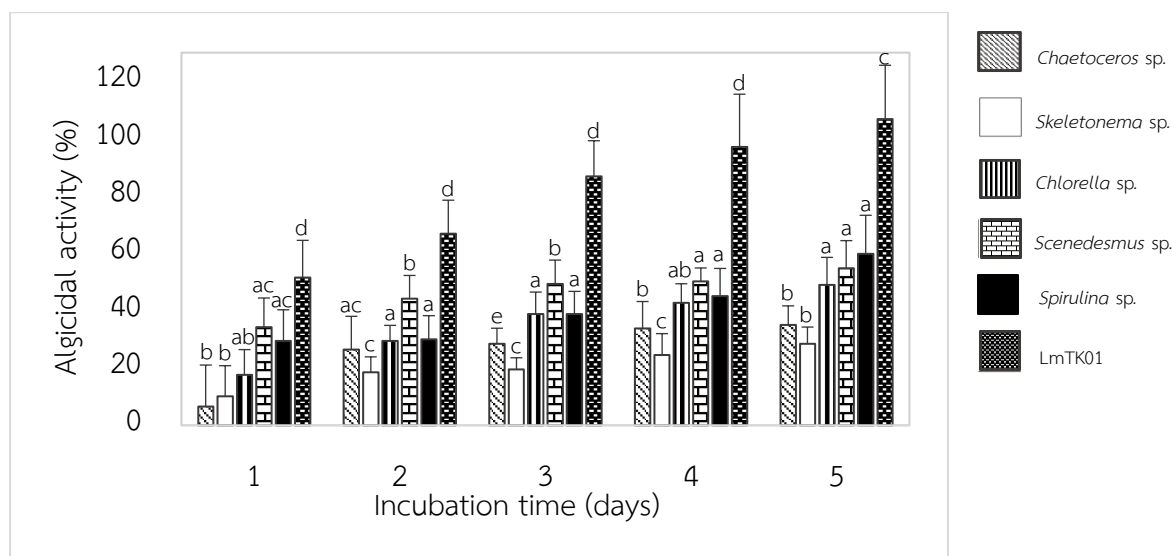
**Table 13.** Percentage of algicidal activity of BP5 at different cell densities on the growth of cyanobacteria strain LmTK01 for 5 days.

Densities of isolation BP5 (CFU/mL)	Percentage of algicidal activity (%)					
	(Days)	1	2	3	4	5
10 <sup>5</sup>		-6.02 ± 30.07 <sup>a</sup>	-11.39 ± 35.17 <sup>a</sup>	-4.11 ± 24.33 <sup>a</sup>	-33.58 ± 30.21 <sup>a</sup>	-44.91 ± 13.92 <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>		12.45 ± 44.93 <sup>b</sup>	12.80 ± 45.08 <sup>a</sup>	-11.55 ± 32.45 <sup>a</sup>	-19.12 ± 21.62 <sup>a</sup>	-46.99 ± 21.44 <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>		19.98 ± 18.73 <sup>b</sup>	18.53 ± 36.55 <sup>ab</sup>	28.60 ± 27.71 <sup>a</sup>	43.03 ± 22.09 <sup>ab</sup>	55.38 ± 25.31 <sup>b</sup>
10 <sup>8</sup>		63.97 ± 78.67 <sup>b</sup>	81.99 ± 72.80 <sup>b</sup>	90.52 ± 74.43 <sup>b</sup>	96.97 ± 44.91 <sup>b</sup>	100.66 ± 38.43 <sup>b</sup>

Positive value = the bacteria can inhibit the growth of LmTK01; Negative value = the bacteria cannot inhibit the growth of LmTK01.

Values shown are mean ± SD (n = 5). Means with different letters in the same column mean a significant difference ( $P < 0.05$ ).

การทดสอบแบคทีเรียไอโซเลท BP5 ที่ความหนาแน่นเซลล์  $10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 และสาหร่ายขนาดเล็กชนิดอื่น ได้แก่ *Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ *Spirulina* sp. ในสัดส่วน 1:1 พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท BP5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ได้ดีที่สุดตลอดทั้งการทดลอง (วันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ของการทดลอง) แตกต่างกับชุดการทดลองที่มีการใช้สาหร่ายชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งสามารถยับยั้งได้เท่ากับ 51.50 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 1 ของการทดลอง และสามารถยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 5 วัน (Table 14) สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ โดยในวันที่ 5 ของการทดลองกลุ่มของไดอะตอม ได้แก่ *Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp. เป็นกลุ่มที่ได้รับผลกระทบน้อยสุด รองลงมาเป็น *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ *Spirulina* sp. ตามลำดับ (Figure 18)



**Figure 18.** Effect of BP5 on the growth of 6 types of microalgae for 5 days; *Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Spirulina* sp. and cyanobacteria LmTK01.

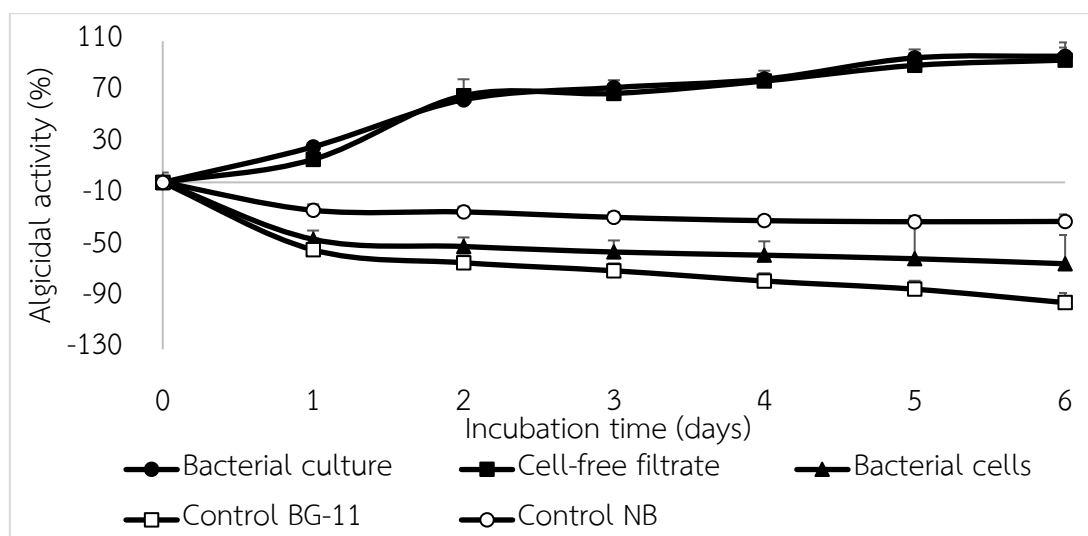
**Table 14.** Percentage of algicidal activity of BP5 on the growth of 6 types of microalgae for 5 days.

Types of algae	Percentage of algicidal activity (%)					
	(Days)	1	2	3	4	5
<i>Chaetoceros</i> sp.		6.59 ± 14.43 <sup>b</sup>	26.46 ± 11.56 <sup>ac</sup>	28.46 ± 5.39 <sup>e</sup>	33.73 ± 9.44 <sup>b</sup>	35.02 ± 6.64 <sup>b</sup>
<i>Skeletonema</i> sp.		10.10 ± 10.69 <sup>b</sup>	18.49 ± 5.39 <sup>c</sup>	19.46 ± 4.10 <sup>c</sup>	24.52 ± 7.46 <sup>c</sup>	28.40 ± 5.87 <sup>b</sup>
<i>Chlorella</i> sp.		17.62 ± 8.79 <sup>ab</sup>	29.42 ± 5.44 <sup>a</sup>	38.79 ± 7.69 <sup>a</sup>	42.69 ± 6.68 <sup>ab</sup>	48.97 ± 9.61 <sup>a</sup>
<i>Scenedesmus</i> sp.		34.27 ± 10.14 <sup>ac</sup>	44.14 ± 8.13 <sup>b</sup>	49.33 ± 8.30 <sup>b</sup>	50.22 ± 4.66 <sup>a</sup>	54.73 ± 9.69 <sup>a</sup>
<i>Spirulina</i> sp.		29.48 ± 10.81 <sup>ac</sup>	29.94 ± 8.30 <sup>a</sup>	38.80 ± 7.92 <sup>a</sup>	45.03 ± 9.69 <sup>a</sup>	59.86 ± 13.41 <sup>a</sup>
Cyanobacteria strain LmTK01		51.50 ± 13.02 <sup>d</sup>	66.88 ± 11.65 <sup>d</sup>	86.78 ± 12.49 <sup>d</sup>	97.07 ± 18.43 <sup>d</sup>	106.85 ± 18.75 <sup>c</sup>

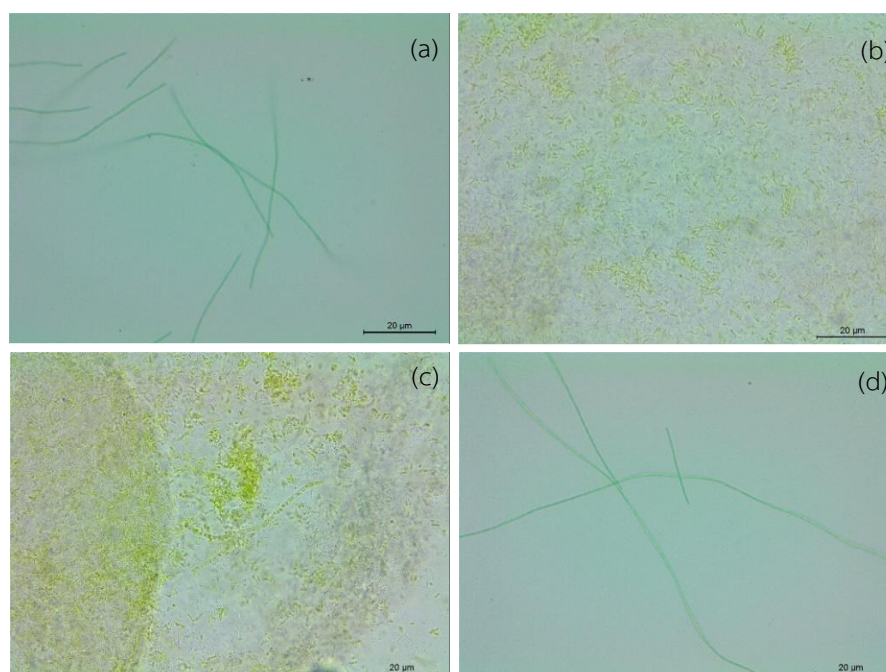
Values shown are mean ± SD (n = 5). Means with different letters in the same column mean a significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 3.5 การทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียในการยับยั้งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

การทดสอบกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย LmTK01 ด้วยแบคทีเรียไอโซเลท BP5 ที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่เลี้ยงสาหร่าย LmTK01 ร่วมกับแบคทีเรียไอโซเลท BP5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (bacterial culture) และของเหลวที่คัดแยกได้จากการเลี้ยงเซลล์ (cell-free filtrate) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งค่าการทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการทดลองและสูงสุดในวันที่ 6 โดยมีค่าเท่ากับ  $98.21 \pm 3.85$  และ  $95.20 \pm 9.75$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างจากชุดการทดลองที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ของแบคทีเรีย BP5 และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) (Table 15) ซึ่งไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย LmTK01 ได้ (Figure 19) เมื่อตรวจสอบลักษณะของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400x พบว่า เส้นสายของสาหร่ายในชุดการทดลองที่เลี้ยงสาหร่าย LmTK01 ร่วมกับเซลล์ของแบคทีเรีย BP5 เพียงอย่างเดียว มีรูปร่างสมบูรณ์เช่นเดียวกับชุดควบคุม แตกต่างจากชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย BP5 ในอาหารเหลว และของเหลวที่คัดแยกได้จากการเลี้ยงเซลล์ ที่พบซากเซลล์ของสาหร่าย LmTK01 ถูกทำลายและย่อยสลาย (Figure 20)



**Figure 19.** Inhibition of growth of cyanobacteria strain LmTK01 by BP5 for 6 days; ● bacterial culture, ■ cell-free filtrate, ▲ bacterial cells, □ control with BG-11 and ○ control with nutrient broth (Positive value = the bacteria can inhibit the growth of LmTK01; Negative value = the bacteria cannot inhibit the growth of LmTK01).



**Figure 20.** Growth inhibition of cyanobacteria strain LmTK01 with BP5 under a microscope at 400x magnification; control group (a), bacterial culture (b), cell-free filtrate (c) and bacterial cells (d).

**Table 15.** Percentage of algicidal activity of BP5 on the growth of cyanobacteria strain LmTK01 for 5 days.

Algicidal mode	Percentage of algicidal activity (%)						
	(Days)	1	2	3	4	5	6
Control BG-11		-52.51 ± 8.88 <sup>a</sup>	-62.58 ± 5.67 <sup>a</sup>	-68.84 ± 5.79 <sup>a</sup>	-76.81 ± 6.07 <sup>a</sup>	-83.18 ± 6.55 <sup>a</sup>	-93.64 ± 7.55 <sup>a</sup>
Control NB		-21.73 ± 4.67 <sup>b</sup>	-23.00 ± 4.09 <sup>b</sup>	-27.24 ± 4.01 <sup>b</sup>	-29.82 ± 3.51 <sup>b</sup>	-30.65 ± 4.61 <sup>b</sup>	-30.42 ± 5.49 <sup>b</sup>
Bacterial culture		27.67 ± 7.63 <sup>c</sup>	64.31 ± 2.69 <sup>c</sup>	73.75 ± 2.37 <sup>c</sup>	80.36 ± 1.18 <sup>c</sup>	96.88 ± 1.92 <sup>c</sup>	98.21 ± 3.85 <sup>c</sup>
Cell-free filtrate		17.87 ± 9.63 <sup>d</sup>	67.46 ± 12.80 <sup>c</sup>	69.22 ± 10.31 <sup>c</sup>	78.89 ± 8.04 <sup>c</sup>	91.06 ± 12.43 <sup>c</sup>	95.20 ± 9.75 <sup>c</sup>
Bacterial cells		-44.34 ± 6.83 <sup>e</sup>	-49.94 ± 7.09 <sup>d</sup>	-54.24 ± 9.02 <sup>d</sup>	-56.70 ± 10.79 <sup>d</sup>	-59.47 ± 26.27 <sup>d</sup>	-63.34 ± 22.36 <sup>d</sup>

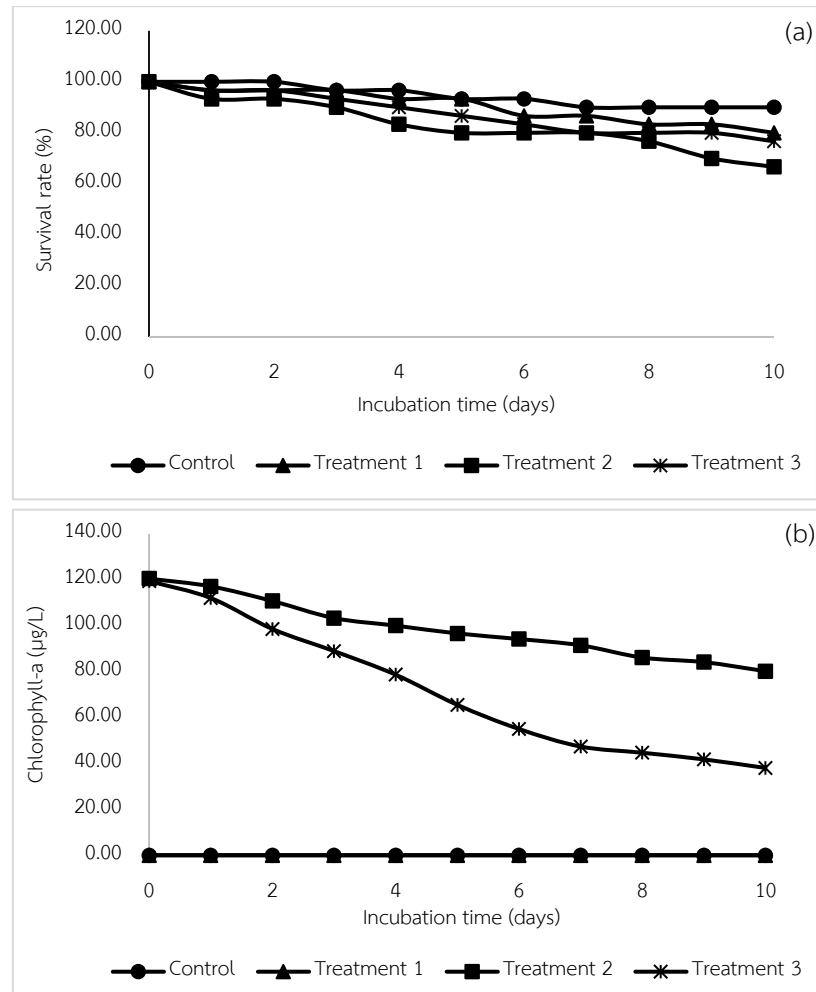
Positive value = the bacteria can inhibit the growth of LmTK01; Negative value = the bacteria cannot inhibit the growth of LmTK01.

Values shown are mean ± SD (n = 5). Means with different letters in the same column mean a significant difference ( $P < 0.05$ ).



### 3.6 การทดสอบผลของแบคทีเรีย BP5 ต่อลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

การทดสอบผลของแบคทีเรีย BP5 และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ต่อกุ้งขาวแวนนาไมในระยะเวลา 10 วัน พบว่า ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย BP5 และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 มีอัตราการรอดมากที่สุดอยู่ที่  $90.00 \pm 10.00$  เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งมีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ BP5 และชุดการทดลองที่ 3 ที่มีการเติมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 และแบคทีเรียสายพันธุ์ BP5 โดยมีอัตราการรอดของกุ้งอยู่ที่  $80.00 \pm 10.00$  และ  $76.67 \pm 11.15$  ตามลำดับ ขณะที่ชุดการทดลองที่ 2 ที่มีการเลี้ยงกุ้งร่วมกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 มีอัตราการรอดของกุ้งต่ำสุดอยู่ที่  $66.67 \pm 5.77$  เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ 1 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) (Table 16) สำหรับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในวันที่ 10 ของการทดลอง พบว่า ชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ 1 มีค่า  $0.00 \pm 0.00$  เนื่องจากไม่มีการเติมสาหร่าย LmTK01 ชุดการทดลองที่ 2 มีค่าคลอโรฟิลล์ เอ อยู่ที่  $80.17 \pm 4.23$  ไมโครกรัมต่อลิตร สูงกว่าชุดการทดลองที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งมีการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ BP5 พบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลงอย่างช้า ๆ ในช่วงวันแรก และลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 2 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งมีค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ หลงเหลืออยู่  $38.02 \pm 7.97$  ไมโครกรัมต่อลิตร (Figure 21) (Table 17)



**Figure 21.** Survival rate of Pacific white shrimp (a) and chlorophyll-a (b) during co-cultured with cyanobacteria strain LmTK01 for 10 days; ●— control, ▲— treatment 1 (Pacific white shrimp and BP5), ■—treatment 2 (Pacific white shrimp and cyanobacteria strain LmTK01) and \*—treatment 3 (Pacific white shrimp, cyanobacteria strain LmTK01 and BP5).

**Table 16.** Survival rate of Pacific white shrimp cultured with cyanobacteria strain LmTK01 and BP5.

Treatment	Percentage of survival rate (%)											
	(Days)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	100.00	100.00 ±	100.00 ±	96.67 ±	96.67 ±	93.33 ±	93.33 ±	90.00 ±	90.00 ±	90.00 ±	90.00 ±	90.00 ±
	± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>
Treatment 1	100.00	96.67 ±	96.67 ±	96.67 ±	93.33 ±	93.33 ±	86.67 ±	86.67 ±	83.33 ±	83.33 ±	80.00 ±	80.00 ±
	± 0.00 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>
Treatment 2	100.00	93.33 ±	93.33 ±	90.00 ±	83.33 ±	80.00 ±	80.00 ±	80.00 ±	80.00 ±	76.67 ±	70.00 ±	66.67 ±
	± 0.00 <sup>a</sup>	11.55 <sup>a</sup>	11.55 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	15.28 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	11.55 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	5.77 <sup>b</sup>
Treatment 3	100.00	96.67 ±	96.67 ±	93.33 ±	90.00 ±	86.67 ±	83.33 ±	80.00 ±	80.00 ±	80.00 ±	80.00 ±	76.67 ±
	± 0.00 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	1.15 <sup>a</sup>	0.58 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	10.00 <sup>a</sup>	11.15 <sup>a</sup>

Values shown are mean ± SD (n = 3). Means with different letters in the same column mean a significant difference ( $P < 0.05$ ).

**Table 17.** Chlorophyll-a concentration of cyanobacteria strain LmTK01 cultured with Pacific white shrimp and BP5 for 10 days.

Treatment	Chlorophyll-a ( $\mu\text{g/L}$ )											
	(Days)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control		0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Treatment 1		0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$	0.00 $\pm$
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Treatment 2		120.48	117.12 $\pm$	110.74 $\pm$	103.31 $\pm$	100.02 $\pm$	96.62 $\pm$	94.19 $\pm$	91.45 $\pm$	86.10 $\pm$	84.12 $\pm$	80.17 $\pm$
		$\pm$ 7.62 <sup>a</sup>	7.11 <sup>a</sup>	5.52 <sup>a</sup>	3.49 <sup>a</sup>	3.01 <sup>a</sup>	3.03 <sup>a</sup>	3.49 <sup>a</sup>	3.07 <sup>a</sup>	4.41 <sup>a</sup>	3.84 <sup>a</sup>	4.23 <sup>a</sup>
Treatment 3		119.42	112.03 $\pm$	98.55 $\pm$	88.92 $\pm$	78.65 $\pm$	65.51 $\pm$	55.00 $\pm$	47.35 $\pm$	44.65 $\pm$	41.75 $\pm$	38.02 $\pm$
		$\pm$ 6.31 <sup>a</sup>	7.07 <sup>a</sup>	6.94 <sup>a</sup>	6.74 <sup>b</sup>	7.87 <sup>b</sup>	8.71 <sup>b</sup>	8.60 <sup>b</sup>	8.07 <sup>b</sup>	8.21 <sup>b</sup>	7.92 <sup>b</sup>	7.97 <sup>b</sup>

Values shown are mean  $\pm$  SD (n = 3). Means with different letters in the same column mean a significant difference ( $P < 0.05$ ).

## บทที่ 4

### วิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 พบว่าลักษณะของสาหร่ายมีความใกล้เคียงกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในวงศ์ Pseudoanabaenaceae ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นสาย ประกอบด้วยไตรโคมจำนวนมากเรียงต่อกัน ไม่แตกแขนง แตกต่างจาก *Scytonemataceae* sp. และ *Hapalosiphonaceae* sp. (Komárek *et al.*, 2014) ไม่พบเซลล์อะคีนีท (akinetes) ที่มีหน้าที่ในการเก็บสะสมสารอาหารและสารพันธุกรรมแตกต่างจาก *Cylindrospermum* และ *Anabaena* sp. (สรฉัตร, 2559; Whitton *et al.*, 2000) และไม่พบเฮเทอโรไซสต์ (heterocytes) ซึ่งเป็นเซลล์พิเศษที่พบได้ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยจะมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติและมีหน้าที่ช่วยตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ต่างจาก *Nostoc* sp., *Nodularia cf. harveyana* และ *Aphanizomenon flos-aquae* (สรฉัตร, 2559; Komárek and Kováčik, 1989; Li *et al.* 2000; Taton *et al.* 2003) และไม่มีเมือกหรือเยื่อหุ้มเซลล์ แตกต่างจาก *Lyngbya* sp. (Komárek *et al.*, 2014) โดยภาพตัดตามขวางและตามยาวพบมีการจัดเรียงตัวของร่างแหไทลาคอยด์แบบเป็นระเบียบ (parietal thylakoids) และภาพตัดตามขวางพบกลุ่มร่างแหของไทลาคอยด์ประมาณ 2 - 3 กลุ่มต่อเซลล์ ซึ่งมีการกระจายตัวล้อมรอบจุดศูนย์กลางเซลล์ ภาพตัดตามยาวพบการเรียงตัวของร่างแหไทลาคอยด์ขนานไปกับด้านยาวของไตรโคม พบช่องว่างอากาศ (polar aerotopes) บริเวณส่วนปลายของไตรโคม (Mareš *et al.*, 2019; Komárek, 2003) ลักษณะดังกล่าวสามารถพบได้ในสาหร่ายจีนัส *Limnothrix* นอกจากนี้พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 มีด้านยาวของไตรโคมยาวมากกว่าด้านกว้าง โดยสอดคล้องกับอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจีนัส *Limnothrix* ที่มีความยาวเซลล์ของด้านยาวมากกว่าด้านกว้าง โดยด้านกว้างของไตรโคมมีความยาวน้อยกว่า 4.00 ไมโครเมตร (Komárek, 2003; Zhu *et al.*, 2012) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Limnothrix* sp. CENA 109 และ *Limnothrix* sp. CENA 110 มีอัตราส่วนความยาวของไตรโคมมากกว่าความกว้าง โดยวัดความยาวได้ 2.00 - 7.80 (4.50) ไมโครเมตร และ 1.30 - 1.8 (1.50) ไมโครเมตร ตามลำดับ (Furtado *et al.*, 2009) ซึ่งต่างจากสกุล *Oscillatoria* sp. ที่มีด้านยาวสั้นกว่าด้านกว้าง (Komárek *et al.*, 2018) ลักษณะดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับสาหร่ายในจีนัส *Limnothrix* ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพ เส้นสายประกอบด้วยไตรโคม 5 - 30 ไตรโคมต่อฟิลาเมนต์ ไม่มีเยื่อหรือเมือกหุ้ม ไตรโคมมีลักษณะตรง

และโค้งงอเล็กน้อย ปลายหรือยอดเซลล์โค้งมนไม่มี calyptra ไตรโครมมีความยาวและความกว้างเฉลี่ย 5.60 และ 2.40 ไมโครเมตร ผนังเซลล์ไม่หนาหรือบางจนเกินไป ภายในเซลล์พบเม็ดสีของไฟโคไซยานิน ไทลาคอยด์วางตัวแบบเป็นระเบียบและเป็นเส้นตรง โดยมีการวางตัวตามแนวขวางเป็นแนวสามเหลี่ยม (Gkelis *et al.*, 2005; Nishizawa *et al.*, 2010) ต่างจากจิ้งนัส *Anagnostidinema* ที่มีการเรียงตัวของร่างแหไทลาคอยด์เป็นระเบียบ (parietal thylakoids) แต่มีลักษณะของร่างแหไทลาคอยด์โค้งเหมือนคลื่น และมีส่วนปลายหรือยอดเซลล์ลักษณะเรียวยาวแคบและงอคล้ายกับตะขอ (Strunecy *et al.*, 2017) และแตกต่างจาก *Pseudanabaena catenata* ที่ภายในไตรโครมไม่มีช่องว่างอากาศ (polar aerotopes) และร่างแหไทลาคอยด์เรียงตัวเป็นวงกลมล้อมรอบศูนย์กลางเซลล์ (Komárek, 2003; Khan *et al.*, 2017)

#### 4.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 และผลกระทบของสาหร่ายต่อกุ้งขาวแวนนาไม

การศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 พบว่า LmTK01 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้การควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดเวลาเท่ากับ  $28.00 \pm 1$  องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า LmTK01 ที่เลี้ยงโดยไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอยู่ระหว่าง 20.00 - 30.00 องศาเซลเซียส (Konopka and Brock, 1978) การเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กที่อุณหภูมิต่างกันจะส่งผลให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน โดยอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไปจะส่งผลให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตช้าหรือหยุดการเจริญเติบโตในที่สุด (Xin *et al.*, 2011) ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์แสงและอัตราการหายใจของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 25.00 องศาเซลเซียส (Patel *et al.*, 2016; Roberts and Zohary, 1987) จากการรายงานของ You และคณะ (2018) พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Limnothrix* sp. 37-2-1 มีการเจริญเติบโตและมีปริมาณไฟโคไซยานินสูงสุดที่อุณหภูมิ 28.00 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ อุณหภูมิยังมีผลต่อการแพร่กระจายตัวของอนุภาคสาหร่าย และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis aeruginosa* โดยมีค่าการเจริญเติบโตสูงสุดที่อุณหภูมิ 28.00 และ 27.50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งระหว่าง 28.00 - 32.00 องศาเซลเซียส โดยผลผลิตของกุ้งในบ่อที่มีอุณหภูมิน้ำอยู่ที่ 26.00 - 28.00 องศาเซลเซียส สูงกว่าบ่อที่อุณหภูมิน้ำมากกว่า 33.00 องศาเซลเซียส (กรมประมง, ม.ป.ป.; Washim *et al.*, 2020) และจาก

การศึกษาปัจจัยพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน 6 ระดับ พบว่า ระดับของพีเอชที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 โดย LmTK01 เจริญเติบโตได้ดีที่พีเอชเริ่มต้น 8.00, 7.00 และ 6.00 ตามลำดับ โดยในช่วงพีเอชที่ 7.00 - 9.00 เป็นช่วงที่มีอัตราการสังเคราะห์แสงและปริมาณคลอโรฟิลล์สูงสุด ซึ่งพีเอชที่ต่ำกว่า 6.00 และสูงกว่า 10.00 มีผลทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงและคลอโรฟิลล์ต่ำลง สำหรับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอยู่ระหว่าง 7.50 - 9.00 (Wangwibulkit *et al.*, 2008) โดยระหว่างการทดลองพบว่า ค่าพีเอชในชุดการทดลองที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 7.00 - 11.00 ถูกปรับให้อยู่ในช่วง 8.46 - 9.41 ขณะที่ชุดการทดลองที่พีเอชเริ่มต้น 6.00 มีค่าเฉลี่ยพีเอชตลอดการทดลองอยู่ที่ 6.50 สอดคล้องกับการรายงานของ ธิญาภรณ์ (2557) กล่าวว่า ค่าพีเอชระหว่างการทดลองเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ระดับพีเอชต่างกันจะถูกปรับให้อยู่ในช่วง 8.20 - 9.63 โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีกระบวนการในการรักษาภาวะสมดุลของพีเอช ซึ่งมีปัจจัยจากแหล่งที่อยู่และความสามารถภายในเซลล์ของสาหร่ายแต่ละชนิด (Buck and Smith, 1995; Golda, 2017; Xing *et al.*, 2019) สำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกช่วงความเค็มตั้งแต่ 0.00 - 30.00 ส่วนในพื้น โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถพบในกลุ่มชอบเกลือ (halophilic) และกลุ่มทนเกลือ (halotolerant) เช่น *Pseudanabaena lonchoides*, *Synechocystis aquatilis* และ *Lyngbya contorta* (Bano and Siddiqui, 2004) โดยกลุ่มที่ชอบเกลือ (halophilic) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีปริมาณเกลือ 0.50 - 30.00 ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร และเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือ 5.00 - 15.00 ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร ขณะที่กลุ่มทนเกลือ (halotolerant) สามารถเจริญได้ดีที่สุดในสภาวะที่ไม่มีเกลือและเจริญได้ในช่วงความเข้มข้นของเกลือ 0.00 - 15.00 ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร (ศิริลักษณ์, 2553) ดังนั้นจากผลการศึกษาผลของความเค็มที่ระดับต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 จึงสรุปได้ว่าสาหร่าย LmTK01 จัดอยู่ในกลุ่มที่ชอบเกลือ (halophilic) เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้ดีตั้งแต่ความเค็ม 0.00 - 30.00 ส่วนในพื้น นอกจากนี้ความเค็มยังส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพ สมดุลไอออน และอัตราการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Wangwibulkit *et al.*, 2008) ซึ่งสาหร่าย *Spirulina fusiformis* สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงกว้างของความเข้มข้นอยู่กับกลไกทางกายภาพ ปริมาณของสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ที่แพร่เข้าสู่เซลล์ของสาหร่าย ซึ่งกระบวนการแพร่ของโซเดียมเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการแยกตัวของไฟโคบิลิโซม (phycobilisome) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มไทลาคอยด์

ส่งผลให้กระบวนการสังเคราะห์แสง และระบบหายใจภายในเซลล์ถูกยับยั้ง ทำให้เกิดการลดลงของมวลชีวภาพ (biomass) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Rafiqul *et al.*, 2003) ขณะที่สาหร่ายบางชนิดเมื่ออยู่ในสภาวะที่ความเค็มสูงจะมีการสร้างแควิวโอลซันภายในเซลล์เพื่อกักเก็บไอออน โดยเฉพาะ (Figler *et al.*, 2019) จากผลการทดลองพบว่า ช่วงความเค็มที่ LmTK01 เจริญเติบโตได้มีความใกล้เคียงกับช่วงความเค็มที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไม่สามารรถเจริญเติบโตได้ดี คือ 15.00 - 25.00 ส่วนในพัน (ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2556; Su *et al.*, 2010)

การศึกษาผลของความหนาแน่นของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ต่ออัตราการรอดตายของกุ้งพบว่า การเลี้ยงกุ้งร่วมกับสาหร่าย มีอัตราการรอดตายลดลง และพบการลอกคราบของกุ้ง รวมถึงเส้นสายของสาหร่ายติดตามยางค์ต่าง ๆ เช่น กรี รยางค์ปาก บริเวณเหงือก และในระบบทางเดินอาหาร สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย ได้แก่ *Limnothrix*, *Oscillatoria* และ *Lyngbya* เป็นต้น สามารถสร้างความเสียหายต่อตับและเหงือกของกุ้ง ซึ่งอาจเป็นปัจจัยทำให้กุ้งอ่อนแอและเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งได้มากขึ้น อีกทั้งยังส่งผลให้อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Massaut, 2003; Torres-ariño and Moraheredia, 2010) โดยกุ้งที่อาศัยอยู่ในบ่อเลี้ยงที่มีการบลูมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จะมีการตายของกุ้งในบ่อ ขณะที่บ่อที่ไม่มีการบลูมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไม่พบการตายของกุ้ง อีกทั้งยังเกิดการบวมและการสะสมของสาร microcystin-LR และ nodularin ในเนื้อเยื่อตับอ่อนของกุ้ง (Galanti *et al.*, 2013; Zimba *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำระหว่างทดลอง โดยจำนวนของสาหร่ายส่งผลให้ค่าพีเอชสูงขึ้นและมีปริมาณมากเกินกว่าที่จะกำจัดได้หมดในแต่ละวัน จึงส่งผลให้ค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยค่าความเป็นกรดต่างในน้ำส่วนมากจะมีค่าพีเอชมากกว่า 7 เนื่องจากในน้ำมีปริมาณไอออนของไบคาร์บอเนต คาร์บอเนต และไฮดรอกไซด์ เป็นองค์ประกอบ และส่วนหนึ่งเกิดจากการใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการหายใจของพืช ความเป็นต่างในแหล่งน้ำทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ช่วยควบคุมไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างอย่างรวดเร็ว ค่าพีเอชในน้ำสูงส่งผลโดยตรงต่อสัตว์น้ำและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในน้ำ เช่น การสระพังของ *Microcystis* ทำให้ค่าพีเอชในแหล่งน้ำสูงกว่า 9.2 ส่งผลให้การเจริญเติบโตของสาหร่ายในกลุ่มไดอะตอมลดลง (พิชยา, 2557; Tucker and Abramo, 2008; Zepernick *et al.*, 2021) กุ้งขาวแวนนาไม่ที่อยู่ภายใต้สภาวะพีเอชเท่ากับ 9.50 เป็นเวลานานจะมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักลดลงอย่างมี



นัยสำคัญ อีกทั้งยังพบการตายของกลุ่มเซลล์เยื่อบุผิว ผนังลำไส้บิดเบี้ยว และความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ลดลง เมื่อเทียบกับกุ้งที่เลี้ยงในสภาวะพีเอชเท่ากับ 8.00 (Yu *et al.*, 2020) ค่าพีเอชสูงไม่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากทำให้เยื่อบุเหงือกถูกทำลาย (gill epithelium) และทำให้เลือดอยู่ในสภาพเป็นกรด อีกทั้งยังส่งผลให้ความเป็นพิษของแอมโมเนียในเพิ่มมากขึ้น (วุฒิชัย และ กรรณิการ์, 2541) โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งควรอยู่ในช่วง 7.50 - 8.50 (กรกวี, 2559) โดยทั่วไปสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะเริ่มเพิ่มจำนวนในบ่อเลี้ยงกุ้งในช่วงเดือนที่ 2 ของการเลี้ยงเป็นต้นไป และกลายเป็นสาหร่ายชนิดเด่นที่พบได้มากในบ่อเลี้ยง (Cremen *et al.*, 2007; Yusoff *et al.*, 2002) และสามารถเพิ่มสูงถึง 312 ไมโครกรัมต่อลิตร ในช่วงท้ายของการเลี้ยง ส่งผลให้กุ้งมีความต้องการอาหารน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ (Keawtawee *et al.*, 2012) ซึ่งปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ มีความสัมพันธ์กับค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำบริเวณผิวน้ำ (Sriyasak *et al.*, 2015) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำในบ่อเลี้ยงควรอยู่ในช่วง 3.48 - 6.90 มิลลิกรัมต่อลิตร หากในน้ำมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำสูงในช่วงกลางวัน และต่ำในช่วงเวลากลางคืน อาจพบปริมาณแพลงก์ตอนพืชในบ่อเลี้ยงจำนวนมาก จึงส่งผลให้กุ้งเครียด มีความต้องการกินอาหารลดลง เจริญเติบโตช้า และเสี่ยงต่อการติดเชื้อก่อโรค (ยนต์ และคณะ, 2530; Supriata *et al.*, 2017)

#### 4.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่ควบคุมการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

การคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งน้ำเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ทำการคัดแยกได้ทั้งหมด 53 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรีย 5 ไอโซเลทมีความสามารถในการยับยั้งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท BP5 สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่าย LmTK01 ได้ดีที่สุด แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการควบคุมจำนวนสาหร่ายโดยการใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ เช่นเดียวกับแบคทีเรียไอโซเลท WMK06 ที่มีการคัดแยกมาจากตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากอ่างเก็บน้ำเขื่อนแม่กวงอุดมธาราและคูเมืองเชียงใหม่ สามารถควบคุมการเจริญของ *Dolichospermum* sp. AARL C014 และ *Microcystis* sp. AARL C028 ได้ดี อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายสารพิษ microcystin-LR ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (ณัฐวุฒิ และจิรพร, 2558) เช่นเดียวกับแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ Y2 ที่แยกได้จากแหล่งน้ำที่มีการบลูมของ *Microcystis* สามารถลดปริมาณสาร microcystins-RR และ microcystins-LR หมดภายในระยะเวลา 6 วัน (Park *et al.*, 2001) นอกจากนี้แบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*

Sp34 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ได้ ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งค่าการยับยั้งการเจริญของสาหร่ายสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (Liu *et al.*, 2019) เช่นเดียวกับการรายงานของ Zhang และคณะ (2021) พบว่า แบคทีเรียชนิด *Brevibacillus laterosporus* ที่ความหนาแน่น  $1 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เลี้ยงร่วมกับ *M. aeruginosa* พบการลดลงของค่าคลอโรฟิลล์ เอ ตั้งแต่วันที่ 2 และลดต่ำลงเรื่อย ๆ เนื่องจากการสังเคราะห์โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ถูกยับยั้ง และขัดขวางการเผาผลาญของเซลล์และโครงสร้างเซลล์ โดยสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนจะไปทำลายระบบ photosystem I และ complex I ส่งผลต่อการเกิดพลังงานและก่อให้เกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงนำไปสู่การเสื่อมของไขมัน (lipid peroxidation) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป็นสาเหตุที่ทำให้สาหร่ายตายในที่สุด

การศึกษาฐานวิธานและความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท BP5 พบว่า BP5 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในจีนัส *Fictibacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม ตะกอนดิน และในปะการังอ่อน บ่อน้ำพุร้อน และในประเทศไทยมีการพบในนาข้าวที่ไม่มีการใช้สารเคมี (Sharma *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2020; Aphimeteetamrong and Kittiwongwattana, 2019; Khaskheli *et al.*, 2020) โดยฐานวิธานของแบคทีเรียในจีนัส *Fictibacillus* คือ แกรมบวก มีลักษณะเป็นรูปแท่งขนาด 0.5-1.0 x 2-5 ไมโครเมตร อาจพบการเรียงตัวกันเป็นเส้นสาย พบเอนโดสปอร์รูปร่างกลมหรือรีอยู่ตรงตำแหน่งกลางหรือปลายเซลล์ โคลินีมีลักษณะกลม เรียบ มันวาว มีสีครีมจนถึงสีขาวอมเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar และ tryptic soy agar เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 15.00 – 42.00 องศาเซลเซียส และพีเอชอยู่ในช่วง 5.00 - 12.00 (Glaeser *et al.*, 2013; Dastager *et al.*, 2013) โดยลักษณะฐานวิธานมีความคล้ายคลึงกับจีนัส *Bacillus* แต่เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene sequence (1,419 bp) กลับมีความคล้ายคลึงกับจีนัส *Fictibacillus* มากกว่า (Dastager *et al.*, 2013) สอดคล้อง Sharma และคณะ (2016) รายงานว่า *Fictibacillus halophilus* สายพันธุ์ AS8T ที่วิเคราะห์ความคล้ายคลึงด้วยวิธี DNA-DNA hybridization มีความคล้ายคลึงกับจีนัส *Bacillus* น้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (Aphimeteetamrong and Kittiwongwattana, 2019; Khaskheli *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020) และ *Bacillus nanhaiensis* สายพันธุ์ JZ-2013 มีความคล้ายคลึงกับ *Fictibacillus nanhaiensis* สายพันธุ์ LJ151 99.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Zhang *et al.*, 2015)

#### 4.4 การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรียต่อการควบคุมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

การทดสอบความหนาแน่นเซลล์ของแบคทีเรีย BP5 ที่หนาแน่น  $10^5$  -  $10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 พบว่าแบคทีเรีย BP5 ที่ความหนาแน่นเซลล์  $10^7$  -  $10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย LmTK01 ได้ดีกว่า แบคทีเรีย BP5 ที่ความหนาแน่นเซลล์  $10^5$  และ  $10^6$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 5 วัน โดย *Bacillus* sp. Lzh-5 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $1 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ได้ในวันแรก แต่พบว่า เซลล์ของสาหร่ายลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย และสามารถยับยั้งการเจริญของสาหร่ายได้  $91 \pm 6.30$  เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 ของการทดลอง (Li *et al.*, 2015) เช่นเดียวกับ *Alcaligenes denitrificans* ที่ความหนาแน่น  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Microcystis* 3 ชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญ ทำให้ *M. aeruginosa* ลดลงอย่างรวดเร็วจากความหนาแน่น  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลดลงเหลือ  $10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใน 4 วัน ขณะที่ในสาหร่าย *M. viridis* และ *M. wesenbergii* มีการลดลงของจำนวนเซลล์สาหร่ายช้ากว่า *M. aeruginosa* แม้ว่าความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียมากถึง  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ก็ตาม (Manage, 2000) สอดคล้องกับการรายงานการศึกษาของ Wang และคณะ (2013) พบว่า *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ p52 สามารถลดการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ได้ดีที่สุด (93.5 เปอร์เซ็นต์) ที่ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ  $7.7 \times 10^7$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ภายในระยะเวลา 4 วัน และยังสามารถลดการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย ได้แก่ *Anabaena* และ *Nodularia* ได้ ขณะที่แบคทีเรีย B5 ที่ความหนาแน่น  $7.2 \times 10^5$  -  $7.2 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของ *M. aeruginosa* ในวันแรกได้สูงถึง 45.65, 58.92 และ 73.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Mu *et al.*, 2007) และจากการศึกษาความหนาแน่นเซลล์ที่เหมาะสมของแบคทีเรียเพื่อใช้ในการกำจัดสาหร่ายของ Liu และคณะ (2019) พบว่า *M. aeruginosa* ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตโดย Sp34 ที่ความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ  $1.35 \times 10^5$  -  $1.35 \times 10^7$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ขณะที่ความหนาแน่น  $1.35 \times 10^4$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร พบกิจกรรมการยับยั้งสาหร่ายในวันที่ 6 ของการทดลอง และเพิ่มขึ้นเพียง 12.7 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 8 ของการทดลอง สอดคล้องกับการรายงาน

ของ Hu และคณะ (2019b) รายงานว่า CZBC1 ที่ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น  $10^6$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ส่งผลต่อการย่อยสลายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria chlorina*, *O. tenuis* และ *O. planctonica* มากที่สุด และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่ในวันที่ 3 - 9 ของการทดลอง ขณะที่ความหนาแน่นเซลล์  $10^3$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายในช่วง 2 - 5 วันแรก แต่จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่นับได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ Y2 ที่ความหนาแน่นเซลล์  $2.5 \times 10^6$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณสารพิษ microcystin-RR ได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ขณะเดียวกันปริมาณความหนาแน่นของแบคทีเรีย Y2 เพิ่มขึ้นเป็น  $4-6 \times 10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (Park et al., 2001) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลของความหนาแน่นเริ่มต้นของแบคทีเรียที่สูงขึ้นมีอิทธิพลต่อการลดจำนวนของสาหร่ายและสารพิษที่ผลิตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ปริมาณความหนาแน่นของแบคทีเรียกลับมีการเพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อที่ต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและชนิดของสาหร่าย

การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียไอโซเลท BP5 ต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 และสาหร่ายชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. และ *Spirulina* sp. พบว่า BP5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ได้ดีที่สุดในระยะเวลา 5 วัน และส่งผลกระทบต่อกลุ่มไดอะตอมน้อยที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่มของสาหร่ายสีเขียว และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินตามลำดับ ซึ่งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 2 ชนิด ได้รับผลกระทบจากแบคทีเรีย BP5 แตกต่างกัน โดยสาหร่าย LmTK01 ได้รับผลกระทบจากแบคทีเรีย BP5 มากกว่า *Spirulina* sp. อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) แสดงให้เห็นถึงความสามารถที่เฉพาะเจาะจงของแบคทีเรีย BP5 ในการควบคุมปริมาณของสาหร่าย LmTK01 สอดคล้องกับ Manage และคณะ (2000) รายงานว่าแบคทีเรียชนิด *Alcaligenes denitrificans* ส่งผลทำให้เกิดการตายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis* ที่แตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ โดยกลุ่มของ *M. aeruginosa* มีการลดลงของจำนวนเซลล์ในระยะเอ็กโพเนนเชียลและระยะสเตชันนารีอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่นที่มีความสามารถในการสร้างสารชีวพิษ แต่ไม่ส่งผลต่อสาหร่ายสีเขียว Liu และคณะ (2019) พบว่า แบคทีเรีย Sp34 มีค่าการยับยั้งสาหร่าย *Microcystis* แต่ละสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน โดยส่งผลต่อ *M. aeruginosa* NIES-843 ( $97.1 \pm 0.86$ ) มากสุด รองลงมาเป็น *M. aeruginosa*

DCM3 ( $93.1 \pm 0.89$ ) *M. wesenbergii* DCM11 ( $82.4 \pm 2.09$ ) และ *M. Flos-aquae* DCM1 ( $7.9 \pm 1.36$ ) ในระยะเวลา 10 วัน อีกทั้งยังส่งผลต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena flos-aquae* FACHB-125 ที่มีลักษณะเป็นเส้นสายเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของ *Oscillatoria* sp. FACHB-868 เช่นเดียวกับสาหร่ายสีเขียว *Monoraphidium* sp. DCA4 ( $19.9 \pm 0.13$ ) และไม่ส่งผลต่อ *Mychonastes* sp. DCA10 นอกจากนี้แบคทีเรีย *Paracoccus* O-1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Karenia mikimotoi* ได้ แต่ไม่มีผลกระทบที่มีนัยสำคัญสำหรับสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* และ *Platymonas helgolandica* ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Ding et al., 2021)

#### 4.5 การทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียในการยับยั้งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย LmTK01 ด้วยแบคทีเรีย ไอโซเลท BP5 เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่เลี้ยงสาหร่าย LmTK01 ร่วมกับแบคทีเรีย ไอโซเลท BP5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (bacterial culture) และชุดการทดลองที่เลี้ยงสาหร่าย LmTK01 ร่วมกับของเหลวที่คัดแยกได้จากการเลี้ยงเซลล์ (cell-free filtrate) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังพบซากเซลล์ของสาหร่าย LmTK01 ที่ถูกย่อยสลาย ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เติมตะกอนเซลล์แบคทีเรีย BP5 เพียงอย่างเดียว โดยไม่พบการลดลงของสาหร่าย LmTK01 และเส้นสายของสาหร่ายมีรูปร่างปกติไม่ถูกย่อยสลาย เช่นเดียวกับของเหลวจากแบคทีเรีย CZBC1 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *O. planctonica* ได้ โดยจำนวนเซลล์ของสาหร่ายในชุดควบคุมเท่ากับ  $2.19 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรีย CZBC1 (bacterial culture) พบจำนวนเซลล์ของ *O. planctonica* มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงสองวันแรกและลดลงหลังจากนั้น และตายภายใน 7 วัน และชุดการทดลองที่มีการเติมของเหลวจากแบคทีเรีย CZBC1 ส่งผลให้ *O. planctonica* ลดลงตั้งแต่วันแรกของการทดลองและตายภายใน 5 วัน เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ SEM ลักษณะทางกายภาพในระยะแรกพบเส้นสายของสาหร่ายเริ่มแตกหักออกจากกัน ไม่พบการเกาะติดของแบคทีเรียบริเวณผิวหน้าของเซลล์สาหร่าย ในระยะที่สองเซลล์สาหร่ายมีรูปร่างผิดปกติอย่างเห็นได้ชัด และยังคงไม่พบการเกาะติดของแบคทีเรียบริเวณผิวหน้าของสาหร่าย ในระยะสุดท้ายพบเศษซากของเซลล์สาหร่ายที่ถูกย่อยสลาย โดยไม่พบการเกาะติดของแบคทีเรียบริเวณผิวหน้าเซลล์ของสาหร่าย

และไม่พบเซลล์ของสาหร่ายที่มีรูปร่างเป็นปกติ (Hu *et al.*, 2019b) การเลี้ยง *Cochlodinium polykrikoides* ที่ร่วมกับของเหลวจาก *Micrococcus luteus* SY-13 พบว่า เกิดการย่อยสลายเซลล์ สูญเสียการเคลื่อนไหว เซลล์หลุดออกจากสาย เกิดการบวมของเซลล์ และสลายเซลล์ (Kim *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงผลกระทบการแตกตัวของเซลล์ของสาหร่าย เกิดการยับยั้ง การสังเคราะห์แสงบริเวณเยื่อหุ้มและยับยั้งของสังเคราะห์นิวเคลียส ทำให้ของเหลวภายในเซลล์ไหล ออกมารวมตัวกันภายนอกเซลล์ (Lu *et al.*, 2021) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าชุดการทดลองที่เลี้ยง สาหร่ายร่วมกับแบคทีเรียไอโซเลท BP5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และของเหลวที่คัดแยกได้จากการ เลี้ยงเซลล์ แสดงให้เห็นถึงกลไกการยับยั้งของแบคทีเรีย BP5 มีความเป็นไปได้สูงในการปลดปล่อย สารบางอย่างออกมาเพื่อทำลายเซลล์ของสาหร่าย LmTK01 เช่นเดียวกับสาหร่าย *M. aeruginosa* 7820 ที่ได้รับผลกระทบทางอ้อมจากของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมากกว่าตัวเซลล์ของ *Exiguobacterium* sp. H10 โดยชุดการทดลองที่มีแบคทีเรียร่วมกับน้ำเลี้ยงมีผลต่อการยับยั้งการ เจริญเติบโตของสาหร่ายสูงสุด แต่ไม่พบผลกระทบจากชุดการทดลองที่เป็นตะกอนเซลล์และชุด ควบคุม และพบปริมาณสารสี (pigment content) มีการลดลงอย่างรวดเร็ว ขณะเดียวกันตรวจพบ ลักษณะทางกายภาพของสาหร่ายถูกทำลายอย่างชัดเจน เมื่อทำการวิเคราะห์ของเหลวที่ได้จากการ ปั่นเหวี่ยงพบว่า ของเหลวที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 1000 ดาลตัน เป็นสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ประกอบด้วยโปรตีน กรดนิวคลีอิก ไขมัน กลุ่มของคาร์ บอนิล หมูอะมิโน ฟอสเฟต และไฮดรอกซิล เป็นต้น ซึ่งบ่งชี้ว่าสารส่วนใหญ่เป็นสารผสม ไกลโคไลพิดที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (Li *et al.*, 2016) สารผสมไกลโคไลพิดรวมถึงสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพถูกใช้เป็นสารควบคุมการสะพรั่งของสาหร่ายที่เป็นอันตรายได้ เช่น Sophorolipid เป็น ไกลโคไลพิดที่สามารถลดแรงตึงผิว มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ ลดความเป็นพิษ และ ได้รับการยอมรับทางนิเวศวิทยา ซึ่งควบคุมการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนในกลุ่ม HABs ได้แก่ *Scipisella trochoidea*, *Prorocentrum minimum*, *Cochlodinium polykrikoides* และ *Heterosigma akashiwo* ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Baek *et al.*, 2003) นอกจากนี้แบคทีเรียบาง ประเภทยังมีความสามารถในการผลิตสารจำพวก allelochemicals ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโต ของสิ่งมีชีวิตอีกชนิด โดยสามารถสร้างความเสียหายให้แก่เยื่อหุ้มไทลาคอยด์ของสาหร่ายสีเขียวแกม น้ำเงินและทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายลดลง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี High - performance liquid chromatography - mass spectrometry

(HPLC - MS) พบว่า กลุ่มอะมิโน ไลซีน กลูตามิก ฮิสทีดีน อาร์จินีน และคลาวูลาเนต ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* อย่างมีนัยสำคัญ (Liu *et al.*, 2013) นอกจากนี้มีการรายงานถึงลักษณะของ *M. aeruginosa* ที่เลี้ยงร่วมกับของเหลวจากแบคทีเรีย พบว่า เซลล์ของสาหร่ายได้รับความเสียหายอย่างหนัก และพบซากเซลล์จำนวนมาก ขณะที่ชุดที่ไม่มีการเติมของเหลวจากแบคทีเรีย เซลล์สาหร่ายมีลักษณะกลม ผิวเรียบ และพบการแบ่งเซลล์สาหร่าย เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของ *M. aeruginosa* ได้แก่ *psaB*, *psbD1*, และ *rbcl* พบว่า การแสดงออกของยีนทั้งสามลดลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ 6 ชั่วโมงแรกที่ทำกรทดลอง (Liu *et al.*, 2019)

#### 4.6 การทดสอบผลของแบคทีเรีย BP5 ต่อลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

การทดสอบผลของแบคทีเรีย BP5 ต่อลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงร่วมกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 พบว่า ชุดการทดลองที่มีการเลี้ยงกุ้งร่วมกับสาหร่าย LmTK01 มีอัตราการรอดตายต่ำสุด และมีค่าคลอโรฟิลล์ เอ สูงสุด ในวันที่ 10 ของการทดลอง แตกต่างจากชุดควบคุมและชุดการทดลองที่มีการเลี้ยงกุ้งร่วมกับแบคทีเรีย BP5 โดยในชุดควบคุมกุ้งมีอัตราการรอดตายในวันที่ 10 ของการทดลอง อยู่ที่  $90.00 \pm 10.00$  เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดการทดลองที่เลี้ยงร่วมกับสาหร่าย LmTK01 กุ้งมีอัตราการรอด  $66.67 \pm 5.77$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโดยธรรมชาติของกุ้งมีพฤติกรรมการกินกันเอง (cannibalism) เมื่อกุ้งมีการลอกคราบจะเป็นช่วงที่กุ้งอ่อนแอ ทำให้กุ้งตัวอื่นเข้ามาทำอันตรายได้ง่าย (เมธาวี และคณะ, 2560) นอกจากนี้ Keawtawee และคณะ (2012) รายงานว่าการเจริญเติบโตของกุ้งในบ่อนอกจากจะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นในการปล่อยลูกกุ้ง การให้อาหาร และคุณภาพน้ำเลี้ยงแล้ว ปริมาณของแพลงก์ตอนในบ่อก็เป็นปัจจัยหลักอย่างหนึ่งเช่นกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมปริมาณของแพลงก์ตอนพืช โดยเฉพาะกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ การใช้วิธีทางชีวภาพโดยการใส่แบคทีเรียจำเพาะจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง โดยมีรายงานของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* CZBC1 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Oscillatoria* spp. ในระบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยทำให้ความหนาแน่นของ *Oscillatoria* มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่า กุ้งมีอัตราการรอดตาย น้ำหนักสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ สูงกว่าการเลี้ยงที่ไม่ใส่แบคทีเรีย (Xu *et al.*, 2019; Hu *et al.*,

2019a) ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจำนวนมาก เช่น การใช้จุลินทรีย์เป็นอาหารเสริมเพื่อช่วยในการย่อยอาหารสำหรับสัตว์ การควบคุมปริมาณแพลงก์ตอนพืช (Fuller, 1989; อุดมลักษณ์ และคณะ, 2561) การใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกจากบ่อเลี้ยงปลาในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย ในการกำจัดสารจืออสมินและเอ็มไอพี ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ พบว่า *Achromobacter denitrificans* ลดปริมาณของสารจืออสมินได้ 53.37 เปอร์เซ็นต์ และ *Acinetobacter calcoaceticus* สามารถลดปริมาณของเอ็มไอพีได้สูงสุด 49.35 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดของลูกปลานิล (พิชัย, 2558) และจากการรายงานของ Correia และคณะ (2014) ทำการศึกษาการอนุบาลกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยระบบไบโอฟลอค โดยใช้อาหารที่มีปริมาณโปรตีนต่างกันคือ 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่า คุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งที่มีการให้อาหารปริมาณโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ มีความเข้มข้นของไนโตรเจน ไนเตรท และฟอสเฟตสูงกว่าอาหารโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่อัตราการรอดของกุ้งและประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (protein efficiency ratio) ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของไบโอฟลอคสำหรับการเลี้ยงกุ้งโดยใช้อาหารที่มีปริมาณโปรตีนต่ำ ซึ่งมีราคาที่ถูกกว่า และยังส่งผลให้คุณภาพน้ำเลี้ยงดีขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการใช้แบคทีเรียในการลดค่าแอมโมเนียรวมและไนโตรเจนในน้ำ เนื่องจากเกิดการย่อยสลายโดยแบคทีเรียตามกระบวนการไนตริฟิเคชัน และเปลี่ยนผลผลิตเป็นไนเตรท ซึ่งการใช้แบคทีเรียมาช่วยในการเพาะเลี้ยงยังมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเฉลี่ย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (ADG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ปริมาณโปรตีนในเนื้อปลา และลดอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) อีกด้วย (อุดมลักษณ์ และคณะ, 2561; สุภาวดี, 2557)



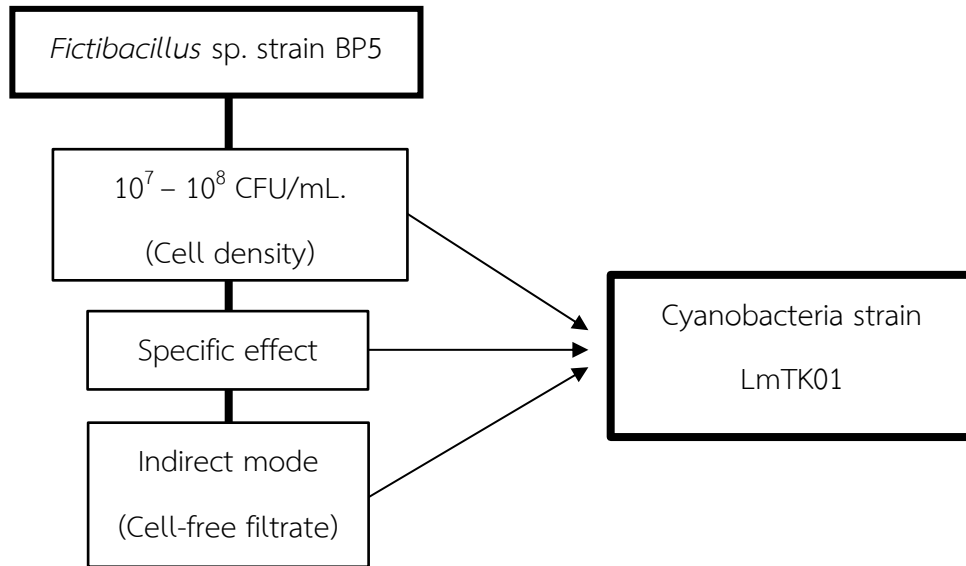
## สรุปผลการศึกษา

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 มีลักษณะทางกายภาพเป็นเส้นสายยาว ประกอบด้วยไตรโครม ซึ่งความยาวของไตรโครมยาวกว่าความกว้างของไตรโครม มีความคล้ายคลึงกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสกุล *Limnothrix* sp. ชั้น Cyanophyceae อันดับ Oscillatoriales วงศ์ Pseudoanabaenaceae ซึ่งเป็นสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ  $0.611 \pm 0.02$  และสามารถโตได้ในช่วงพีเอชค่อนข้างกว้าง โดยพีเอชที่ 7 - 8 สาหร่ายมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด และพบว่า สาหร่ายเจริญเติบโตได้ในช่วงความเค็มกว้างตั้งแต่ 0 - 30 ส่วนในพัน โดยมีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ความเค็ม 15 ส่วนในพัน การเลี้ยงสาหร่ายร่วมกับกิ้งขาวแวนนาไม พบว่าสาหร่าย LmTK01 ส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดตายของกิ้งขาวทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยตรวจพบเส้นสายของสาหร่ายติดตามอวัยวะต่าง ๆ ทำให้กิ้งมีปัญหาการลอกคราบ และพบการอุดตันของสาหร่ายที่บริเวณเหงือก และระบบทางเดินอาหารซึ่งส่งผลต่อการรบกวนการหายใจและการย่อยอาหารของกิ้ง นอกจากนี้หากค่าพีเอชในการเพาะเลี้ยงกิ้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กิ้งเครียด ส่งผลกระทบต่อสุขภาพและอ่อนแอ ทำให้มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อก่อโรคมามากขึ้นและตายในที่สุด

การควบคุมการเจริญเติบโตของ *Limnothrix* สายพันธุ์ LmTK01 ด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกจากแหล่งน้ำที่ทำการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งในบ่อกึ่งและบ่อปลา มีความสามารถในการควบคุมประชากรของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 ได้ โดยไอโซเลท BP5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของสาหร่ายสูงสุดซึ่งมีค่า 99.94 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง โคโลนีมีสีส้มอมครีม และพบการสร้างเอ็นโดสปอร์ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มีความคล้ายคลึงกับกลุ่มแบคทีเรียชนิด *Fictibacillus* sp. จัดอยู่ในไฟลัม Firmicutes อันดับ Bacillales วงศ์ Fictibacillus สกุล *Fictibacillus* โดยที่ความหนาแน่นเซลล์แบคทีเรีย  $10^7 - 10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เหมาะสมต่อการยับยั้งเจริญเติบโตของสาหร่ายได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถย่อยสลายเซลล์ของสาหร่ายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 5 วัน โดยส่งผลกระทบต่อประชากรของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 และส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดอื่น ๆ ได้แก่ กลุ่มสาหร่ายสีเขียว และกลุ่มไดอะตอม น้อยมาก โดยแบคทีเรีย BP5 ที่ความหนาแน่นเริ่มต้น  $10^8$  ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มีรูปแบบการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายเป็นแบบทางอ้อม (Indirect effect) ด้วยการสร้างสารบางชนิดที่ปลดปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยง ซึ่งมีความสามารถในการทำลายเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01

นอกจากนี้แบคทีเรีย *Fictibacillus* sp. สายพันธุ์ BP5 ไม่ใช่แบคทีเรียก่อโรคในกิ้งขาวแวนนาไม โดยเมื่อแสดงประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ LmTK01 แล้ว ไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพ และอัตราการรอดตายของกิ้งขาวแวนนาไม ดังนั้นการศึกษาดังนี้

แสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการควบคุมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความเหมาะสม และนำไปใช้ในการแก้ปัญหาการสะสมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อช่วยให้การเลี้ยงประสบความสำเร็จ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และมีความยั่งยืน



**Figure 2.2.** Specific effects of *Fictibacillus* sp. strain BP5 on growth control of cyanobacteria strain LmTK01.

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาสารชีวโมเลกุลของสารที่ปล่อยออกมาจากแบคทีเรียไอโซเลท BP5 ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายและโครงสร้างของสาหร่ายที่ถูกทำลายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) และต่อยอดเป็นนวัตกรรมขั้นสูง
2. ควรมีการศึกษาถึงผลกระทบของแบคทีเรีย BP5 ต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่นที่เป็นอันตรายในแหล่งน้ำรวมถึงสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในแหล่งน้ำ
3. ควรศึกษาบทบาทอื่น ๆ ของแบคทีเรีย BP5 เพิ่มเติม เช่น การนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกหรือไบโอฟลอก ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

### บรรณานุกรม

- กรกวี ศรีอินทร์. 2559. การศึกษาคุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งขาวในระบบปิดในพื้นที่อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร 64 หน้า.
- กรมประมง. ม.ป.ป. การจัดการความรู้ การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ตามมาตรฐาน จีเอพี. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง 69 หน้า.
- กาญจนาภาชน์ ลีวโนมนต์. 2527. สหรัย. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 343 หน้า.
- จริยวดี สุริยพันธุ์. 2557. บทบาทของธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชในบ่อเลี้ยงกุ้ง ทะเลแบบพัฒนา. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา มหาวิทยาลัยบูรพา 19(2): 227-236.
- จริยวดี สุริยพันธุ์ และชนัดดา เกตุมา. 2560. ปริมาณแพลงก์ตอนพืช คุณภาพน้ำ และปริมาณจืออสมินในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) แบบพัฒนาที่ระดับความเค็มแตกต่างกัน. วารสารแก่นเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น 45: 949-955.
- ณัฐา เสนีवास, ศรีสม สุวรรณวงศ์, ลิลลี่ กาวีตะ, สรัญญา วัชรโรทัย และรวีวรรณ ตันทวนิช. 2553. การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 3-5 กุมภาพันธ์ 2553 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 446-455.
- ณัฐวดี หวังสมนึก และจิรพร เพกเกาะ. 2558. การควบคุมไซยาโนแบคทีเรียและย่อยสลายสารพิษไมโครซิสตินโดยแบคทีเรียจากแหล่งน้ำบางแห่งในจังหวัดเชียงใหม่. วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี 38(2): 155-166.
- ณิชา สิรินนท์ธนา และอมรรัตน์ กนกรุ่ง. 2563. ผลของความเค็มต่อคุณค่าทางอาหารและกรดไขมันจำเป็นในสาหร่ายขนาดเล็ก *Thalassiosira* sp. วารสารแก่นเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น 48(2563) ฉบับพิเศษ 1: 899-906.
- ธีญาภรณ์ แก้วทวี. 2557. แบคทีเรียจำเพาะต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ในฟาร์มกุ้งทะเล. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 41 หน้า.

- นิวุฒิ หวังชัย และบัญชา ทองมี. 2555. การพัฒนากระบวนการผลิตสัตว์น้ำให้มีคุณภาพและปลอดภัย: การพัฒนาการเลี้ยงปลานิลให้ปลอดภัยจากการปนเปื้อนของกลิ่นไม่พึงประสงค์. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 47 หน้า.
- ปรานต์นภัส ฟ้าประทานชัย. 2549. การทดสอบความเป็นพิษของสาหร่าย *Microcystis aeruginosa* ต่อปลานิล *Oreochromis niloticus*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 98 หน้า.
- พจมาน เขยเดช, ชลอ ล้อมสุวรรณ, นิตี ชูเชิด และนันท์ทิภา พันธุ์สวัสดิ์. 2549. การศึกษาคุณภาพของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่เลี้ยงในบ่อดินและบ่อที่ปูด้วยโพลีเอททิลีนด้วยน้ำความเค็มต่ำ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2549 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 255-262.
- พรพิมล พิธีรัตน์, นิวุฒิ หวังชัย, ชนกันต์ จิตมนัส, จงกล พรมยะ, หลุยส์ เลอเบล, กรกนก กุลศักดิ์, พัชราลัย ศรียะศักดิ์ และสุพันธ์ณี สุวรรณภักดี. 2558. ผลของฤดูการต่อแพลงก์ตอนพืชที่ทำให้เกิดกลิ่นโคลนในบ่อเลี้ยงปลานิลแบบผสมผสาน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53 3-6 กุมภาพันธ์ 2558 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 1176-1183.
- พัชรินทร์ ลังกาปอน. 2565. สถานการณ์สินค้ากุ้งทะเลและผลิตภัณฑ์ ในช่วง 3 เดือนแรก ปี 2565. กลุ่มเศรษฐกิจการประมง กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง กรมประมง 15 หน้า.
- พิชชา ชุมก. 2557. ความหลากหลายของสาหร่ายขนาดใหญ่ แพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์และไดอะตอมพื้นท้องน้ำ และการใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำในแม่น้ำลำ จังหัดลำพูน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการสอนวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ 165 หน้า.
- พิชัย พงษ์อุดม. 2558. การกำจัดกลิ่นไม่พึงประสงค์ (จีออสมินและเอ็มไอบี) โดยใช้จุลินทรีย์ในแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 104 หน้า.
- พิมพ์พรรณ ต้นสกุล. 2534. ปฏิบัติการสาหร่ายวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เมธาวี รอดมงคลดี, วัฒนะ ลีลาภัทร และนันท์พร สุทธิ. 2560. ผลของวัสดุหลบซ่อนต่ออัตราการรอดตายของกุ้งก้ามกราม. วารสารเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 33(2): 257-265.

- ยูธากรณ์ ประวรรณรัมย์. 2545. ความสามารถในการลดสารประกอบไนโตรเจนที่เป็นพิษของ  
แพลงก์ตอนพืชในบ่อกึ่งกุลาดำพื้นที่ความเค็มต่ำ. สายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และ  
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 36 หน้า.
- ยูวดี พีรพรพิศาล. 2558. สหรัยน้ำจืดในประเทศไทย Freshwater Algae in Thailand.  
ห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะ  
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 440 หน้า.
- ยนต์ มุสิก, มะลิ บุญรัตผลิน และลิน ชี เคว. 2530. คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. รายงานการ  
ประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 25 3-5 กุมภาพันธ์ 2530  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 96-104.
- วิรัช จิวแหยม. 2544. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณภาพน้ำและการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในบ่อ  
เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. สำนักพิมพ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 166 หน้า.
- วุฒิชัย เจนการ และ กรรณิการ์ กาญจนชาติ. 2541. การวิเคราะห์น้ำจากฟาร์มกึ่งกุลาดำ ก่อนปล่อย  
ลงสู่สิ่งแวดล้อมในจังหวัดภูเก็ต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 20 หน้า.
- ศิริประภา ฟ้ากระจ่าง. 2553. ผลของผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica* Forsk.) ต่อการควบคุมการ  
เจริญเติบโตของสาหร่าย *Microcystis* sp. ในบ่อเลี้ยงปลาที่มีปริมาณสารอาหารสูง.  
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีการ  
ประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 100 หน้า.
- ศิริลักษณ์ นามวงษ์. 2553. ศักยภาพของแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางทาง  
เทคโนโลยีชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 15(2): 122-132.
- ศุภย์วิชัยกสิกรไทย. 2560. K SME Analysis: ส่งทางรอด ส่งออกอาหารทะเลแปรรูปไทย. ศุภย์วิชัย  
กสิกรไทย 8 หน้า.
- ศุภย์ พิษวิทยารามาธิ บดี. 2542. พิษจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน. สืบค้นจาก  
[https://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/bulletin/bul99/v7n1/Blue\\_gree\\_alg.n](https://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/bulletin/bul99/v7n1/Blue_gree_alg.n)  
ค้นเมื่อ 16 มิถุนายน 2561.
- ศุภย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ. 2556. องค์ความรู้: เลี้ยงกุ้งทะเล  
ในระบบปิด. ศุภย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัด  
จันทบุรี 45 หน้า.

- สมหมาย เขียววารีย์สังจะ. 2538. เอกสารคำสอนวิชา 530-441 การจัดการคุณภาพน้ำ. ภาควิชาวาริช  
ศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 157 หน้า.
- สรณ์ตร เทียมดาว. 2559. เอกสารการสอนสาหร่ายวิทยา (Phycology). คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี 218 หน้า.
- สิริแข พงษ์สวัสดิ์, วัชรพงศ์ วรเศรษฐพงศ์, วราภรณ์ ปานอยู่, สมจันทร์ บุญพันธ์, ยุวดี พิรพรพิศาล  
และ Philip Heraud. 2550. การตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกม  
น้ำเงินทนเค็ม. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี  
ราชมงคลธัญบุรี 44 หน้า.
- สุธาทิพย์ บุญช่วย. 2562. ผลของไขมันจำเป็นที่สกัดจากพืช ต่อการเจริญเติบโต สภาพของตับและตับ  
อ่อนและอัตราการรอดของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) หลังจากได้รับเชื้อ  
*Vibrio parahaemolyticus*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การ  
ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 80 หน้า.
- สุธิดา วันโน. 2556. การสะสมสารพิษไมโครซิสตินในน้ำและปลาเศรษฐกิจของคว้านพะเยา.  
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีการ  
ประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 92 หน้า.
- สุนีรัตน์ เรืองสมบุรณ์. 2549. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโต ปริมาณโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์  
ของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc commune* Vaucher. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 14(2): 40-49.
- สุนีรัตน์ เรืองสมบุรณ์, ศักดิ์ชัย ชูโชติ และดุสิต เอื้ออำนวย. 2556. ผลของระยะเวลา แสง และ  
อุณหภูมิในการเก็บรักษาสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *Phormidium angustissimum* ต่อ  
ความสามารถในการยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาดเขียวกวางตุ้ง. วารสารวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น 41(4): 973-984.
- สุภาวดี โกยตุลย์. 2557. การกำจัดไนโตรเจนในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบไม่ทิ้งของเสียออก  
จากฟาร์ม.วารสารวิชาการ มทร. สุวรรณภูมิ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ  
2(1): 66-80.

- อรพิน เกิดชูชื่น และณัฐภา เลหากุลจิตต์. 2546. การลดปริมาณสารพิษจากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (Cyanobacteria) โดยใช้เปลือกไข่. คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- อุดมลักษณ์ สมพงษ์, เมราณี อินคา, จงกล พรมยะ และ นิวุฒิ หวังชัย. 2561. ผลการเพาะเลี้ยงปลา นิลแดงวัยอ่อนในระบบไบโอฟลอค. วารสารแก่นเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น 46(5): 833-242.
- An, X., Zhang, B., Zhang, H., Li, Y., Zheng, W., Yu, Z., Fu, L. and Zheng, T. 2015. Discovery of an algicidal compound from *Brevibacterium* sp. BS01 and its effect on a harmful algal bloom-causing species, *Alexandrium tamarense*. *Frontiers in Microbiology* 6: 1235.
- Alonso, R. R. and Páez, O. F. 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture* 219(1-4): 317-336.
- Aphimeteetamrong, S. and Kittiwongwattana, C. 2019. Diversity and plant growth promoting activities of rice epiphytic bacteria. *Current Applied Science and Technology* 19(2): 66-79.
- Baek, S. H., Sun, X. X., Lee, Y. J., Wang, S. Y., Han, K. N., Choi, J. K., Noh, J. H. and Kim, E. K. 2003. Mitigation of harmful algal blooms by sophorolipid. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 13(5): 651-659.
- Bano, A. and Siddiqui, P. 2004. Characterization of five cyanobacterial species with respect to their requirement for pH and salinity. *Pakistan Journal of Botany* 36(1): 133-143.
- Boyd, C. E. 2009. Phytoplankton in aquaculture ponds. from <https://www.globalseafood.org/advocate/phytoplankton-aquaculture-ponds/>. Retrieved November 20, 2020.



- Briand, J. F., Jacquet, S., Bernard, C. and Humbert, J. F. 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* 34(4): 361-377.
- Buck, D. P. and Smith, G. D. 1995. Evidence for a Na<sup>+</sup>/ H<sup>+</sup> electrogenic antiporter in an alkaliphilic cyanobacterium *Synechocystis*. *FEMS Microbiology Letter* 128(3): 315-320.
- Chen, Y., Wang, W., Zhou, D., Jing, T., Li, K., Zhao, Y., Tang, W., Qi, D., Zhang, M., Zang, X., Luo Y. and Xie, J. 2020. Biodegradation of lignocellulosic agricultural residues by a newly isolated *Fictibacillus* sp. YS-26 improving carbon metabolic properties and functional diversity of the rhizosphere microbial community. *Bioresource Technology* 310(3): 123381.
- Chorus, I. and Bartram, J. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon 1: 1-400.
- Correia, S. E., Wilkenfeld, S. J., Morris, C. T., Wei, L., Prangnell, I. D. and Samocha, M. T. 2014. Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a biofloc-dominated system. *Aquacultural Engineering* 59: 48-54.
- Correll, D. L. 1988. The role of phosphorus in the eutrophication of receiving water: A review. *Journal of Environmental Quality* 27(2): 261-266.
- Cremen, M. C. M., Martinez-Goss, R. M., Corre, Jr. L. V. and Azanza, V. R. 2007. Phytoplankton bloom in commercial shrimp ponds using green-water technology. *Journal of Applied Phycology* 19(6): 615-624.
- Daniels, O., Fabbro, L. and Makiela, S. 2014. The effects of the toxic cyanobacterium *Limnothrix* (Strain AC0243) on *Bufo marinus* larvae. *Toxins* 6(3): 1021-1035.
- Dastager, G. S., Mawlankar, R., Srinivasan, K., Tang, S., Lee, J., Ramana, V. V. and Shouche, S. Y. 2013. *Fictibacillus enclensis* sp. nov., isolated from marine sediment. *Antonie van Leeuwenhoek* 105(3): 461-469.

- Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L. and Gobler, C. J. 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 8(5): 715-725.
- Dawah, A., Soliman, A., Abomohra, E. A., Battah, M. and Anees, D. 2015. Influence of alum on cyanobacterial blooms and water quality of earthen fish ponds. *Environmental Science and Pollution Research* 22(21): 16502-16513.
- Ding, N., Du, W., Feng, Y., Song, Y., Wang, C., Li, C. and Zheng, N. 2021. Algicidal activity of novel indigenous bacterial strain, *Paracoccus* sp., against harmful algal bloom species, *Karenia mikimotoi*. *Archives of Microbiology* 203(8): 1-8.
- Fang, F., Gao, Y., Gan, L., He, X. and Yang, L. J. 2018. Effects of different initial pH and irradiance levels on cyanobacterial colonies from Lake Taihu, China. *Journal of Applied Phycology* 30(3): 1777-1793.
- Figler, A., Viktória, B., Dobronoki, D., Márton, K., Nagy, A. S. and Bácsi, I. 2019. Salt tolerance and desalination abilities of nine common green microalgae isolates. *Water* 11(12): 2527.
- Foxall, T. L. and Sanner, J. J. 1988. Effect of a hepatic toxin from the cyanophyte *Microcystis aeruginosa*. In: W.W. Carmichael [Ed.] *The Water Environment. Algal Toxins and Health*. Plenum Press, New York 10: 365-387.
- Fuentes, L. J., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-del-Valle, M. and Vilchez, C. 2016. Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Marine Drugs* 14(5): 100.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66(5): 365-378.
- Furtado, A. L. F. F., Calijuri, M. D. C., Lorenzi, A. S., Honda, R. Y., Genuário, D. B. and Fiore, M. F. 2009. Morphological and molecular characterization of

- cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiologia* 627(1): 195-209.
- Galanti, N. L., Amé, V. M. and Wunderlin, A. D. 2013. Accumulation and detoxification dynamic of cyanotoxins in the freshwater shrimp *Palaemonetes argentinus*. *Harmful Algae* 27: 88-97.
- Gkelis, S., Rajaniemi, P., Vardaka, E., Moustaka-Gouni, M., Lanaras, T. and Sivonen, K. 2005. *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert (Cyanobacteria) strains from Lake Kastoria, Greece form a separate phylogenetic group. *Microbial Ecology* 49(1): 176-182.
- Glaeser, P. S., Dott, W., Busse, H. and Kämpfer, P. 2013. *Fictibacillus phosphorivorans* gen. nov., sp. nov. and proposal to reclassify *Bacillus arsenicus*, *Bacillus barbaricus*, *Bacillus macauensis*, *Bacillus nanhaiensis*, *Bacillus rigui*, *Bacillus solisalsi* and *Bacillus gelatini* in the genus *Fictibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(8): 2934-2944.
- Golda, L. R. 2017. Assessing the influence of environmental pH on algal physiology using a novel culture system. United States: Oregon Health and Science University 150p.
- Gumbo, R. J. and Cloete, E. T. 2011. The mechanism of *Microcystis aeruginosa* death upon exposure to *Bacillus mycoides*. *Physics and Chemistry of the Earth Parts A/B/C* 36(14-15): 881-886.
- Gumbo, R. J., Ross, G. and Cloete, E. T. 2008. Biological control of *Microcystis* dominated harmful algal blooms. *African Journal of Biotechnology* 7(25): 4765-4773.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

- Hu, X., Wen, G., Xu, W., Xu, Y., Su, H., Yang, K., Xu, Y., Li, Z. and Cao, Y. 2019a. Effects of the algicidal bacterium CZBC1 on microalgal and bacterial communities in shrimp culture. *Aquaculture Environment Interactions* 11(2019): 279-290.
- Hu, X., Xu, Y., Su, H., Xu, W., Wang, L., Xu, Y., Li, Z., Cao, Y. and Wen, G. 2019b. Algicidal bacterium CZBC1 inhibits the growth of *Oscillatoria chlorina*, *Oscillatoria tenuis*, and *Oscillatoria planctonica*. *AMB express* 9(1): 144.
- Jagadeesan, K., Raja, S. and Sampath, K. 2012. Studies on effect of salinity on the culture of algal forms (*Oscillatoria* spp. and *Chaetomorpha* sp.) and their impact on shrimp (*Penaeus indicus*) culture, New Vistas in Indian Aquaculture - Book of Abstracts, 1045: 85.
- Jia, W., Huang, X. and Li, C. 2014. A preliminary study of the algicidal mechanism of bioactive metabolites of *Brevibacillus laterosporus* on *Oscillatoria* in prawn ponds. *The Scientific World Journal* 11 p.
- Jiri, P. 2001. The toxins of cyanobacteria. Faculty of Health and Social Studies, University of South Bohemia in České Budějovice. *Acta Medica (Hradec Králové)* 44(2): 69-75.
- Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J. S., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E., Antunes, M. B., De Melo Filho, D. A., Lyra, T. M., Barreto, V. S., Azevedo, S. M. and Jarvis, W. R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine* 338(13): 873-878.
- Kaya, K., Sano, T., Beattie, K. A. and Codd, G. A. 1996. Nostocyclin, a novel 3-amino-6-hydroxy-2-piperidonecontaining cyclic depsipeptide from the cyanobacterium *Nostoc* sp. *Tetrahedron Letters* 37: 6725-6728.
- Keawtawee, T., Fukami, K., Songsangjinda, P. and Muangyao, P. 2011. Isolation and characterization of *Noctiluca*-killing bacteria from a shrimp aquaculture pond in Thailand. *Fisheries Science* 77(4): 657-664.

- Keawtawee, T., Fukami, K. and Songsangjinda, P. 2012. Use of a *Noctiluca*-killing bacterium *Marinobacter salsuginis* strain BS<sub>2</sub> to reduce shrimp mortality caused by *Noctiluca scintillans*. *Fisheries Science* 78(3): 641-646.
- Khan, Z., Wan-Omar, W. M., Merican, S. M. M. F., Azizan, A. A., Foong, P. C., Convey, P., Najimuddin, N., Smykla, J. and Alias, A. S. 2017. Identification and phenotypic plasticity of *Pseudanabaena catenata* from the Svalbard archipelago. *Polish Polar Research* 38(4): 445-458.
- Khaskheli, A. M., Wu, L., Chen, G., Chen, L., Hussain, S., Song, D., Liu, S. and Feng, G. 2020. Isolation and characterization of root-associated bacterial endophytes and their biocontrol potential against major fungal phytopathogens of rice (*Oryza sativa* L.). *Pathogens* 9(3): 172.
- Kim, M. J., Jeong, S. Y. and Lee, S. J. 2008. Isolation, identification, and algicidal activity of marine bacteria against *Cochlodinium polykrikoides*. *Journal of Applied Phycology* 20: 1069-1078.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2): 111-120.
- Komárek, J. 2003. Planktic oscillatorialean cyanoprokaryotes (short review according to combined phenotype and molecular aspects). *Hydrobiologia* 502(1): 367-382.
- Komárek, J. 2018. Delimitation of the family Oscillatoriaceae (Cyanobacteria) according to the modern polyphasic approach (introductory review). *Brazilian Journal of Botany* 41(2): 449-456.
- Komárek, J. and Angnostidis, K. 1999. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chlorococcales. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart 548 p.
- Komárek, J. and Kovacik, L. 1989. Trichome structure of four *Aphanizomenon* taxa (Cyanophyceae) from Czechoslovakia, with 138 notes on the taxonomy and delimitation of the genus. *Plant Systematics and Evolution* 164: 47-64.

- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. and Johansen, R. J. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295-335.
- Kong, Y., Wang, Y., Miao, L., Mo, S., Li, J. and Zheng, X. 2022. Recent advances in the research on the anticyanobacterial effects and biodegradation mechanisms of *Microcystis aeruginosa* with microorganisms. *Microorganisms* 10(6): 1136.
- Konopka, A. and Brock, D. T. 1978. Effect of temperature on blue-green algae (cyanobacteria) in Lake Mendota. *Applied and Environmental Microbiology* 36(4): 572-576.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547-1549.
- Li, R., Watanabe, M. and Watanabe, M. M. 2000. Taxonomic studies of planktic species of *Anabaena* based on morphological characteristics in cultured strains. *Hydrobiologia* 438(1-3): 117-138.
- Li, Y., Liu, L., Xu, Y., Li, P., Zhang, K., Jiang, X., Zheng, T. and Wang, H. 2016. Stress of algicidal substances from a bacterium *Exiguobacterium* sp. h10 on *Microcystis aeruginosa*. *Applied Microbiology* 64(1): 57-65.
- 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(2): 981-990.
- Liu, J., Yang, C., Chi, Y., Wu, D., Dai, X., Zhang, X., Igarashi, Y. and Luo, F. 2019. Algicidal characterization and mechanism of *Bacillus licheniformis* Sp34 against *Microcystis aeruginosa* in Dianchi Lake. *Journal of Basic Microbiology* 59(11): 1112-1124.

- Liu, Y. M., Chen, M. J., Wang, M. H., Jia, R. B. and Li, L. 2013. Inhibition of *Microcystis aeruginosa* by the extracellular substances from an *Aeromonas* sp. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(9): 1304-1307.
- Liu, Y. M., Wang, M. H., Jia, R. B. and Li, L. 2012. Removal of cyanobacteria by an *Aeromonas* sp. *Desalination and Water Treatment* 47: 205-210.
- Lovell, T. 1989. *Nutrition and Feeding of Fish*. Auburn University, New York 260 p.
- Lu, L., Niu, X., Zhang, D., Ma, J., Zheng, X., Xiao, H., Huang, X., Lin, Z. and Hu, H. 2021. The algicidal efficacy and the mechanism of *Enterobacter* sp. EA-1 on *Oscillatoria* dominating in aquaculture system. *Environmental Research* 197(4): 111105.
- Magalhaes, V. F., Marinho, M. M., Domingos, P., Oliveira, A. C., Costa, S. M., Azevedo, L. O. and Azevedo, S. M. F. O. 2003. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxin) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* 42(3): 289-295.
- Manage, M. P., Kawabata, Z. and Nakano, S. 2000. Algicidal effect of the bacterium *Algaligenes denitrificans* on *Microcystis* spp. *Aquatic Microbial Ecology* 22(2): 111-117.
- Mankiewicz, J., Tarczyska, M., Walter, Z. and Zalewski, M. 2003. Natural toxins from cyanobacteria. *Acta biologica Cracoviensia* 45(2): 9-20.
- Mareš, J., Strunecký, O., Bučinská, L. and Wiedermannová, J. 2019. Evolutionary patterns of thylakoid architecture in cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology* 277: 1-22.
- Massaut, L. 2003. Cyanobacteria toxicity tested in shrimp larvae - *Oscillatoria brevis* reduces *P. vannamei* survival. *Global Aquaculture Advocate* 90-92.
- Menezes, C., Valério, E. and Dias, E. 2013. The kidney vero-E6 cell line: A suitable model to study the toxicity of microcystin. *New Insights into Toxicity and Drug Testing* 29-48.

- Mohite, S. Y. and Wakte, S. P. 2011. Assessment of factors influencing growth and c-phycocyanin production of *Arthrospira platensis* from Meteoritic Crater Lake. *Journal of Algal Biomass Utilization* 2(2): 53-68.
- 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(11): 1336-1340.
- Narayana, S., Mohanraju, R., Singh, P., Thamke, V., Tapase, S., Shouche, Y. and Kodam, K. 2017. New record of a bloom forming, genotoxic strain *Nodularia* strain (KT447209) from Andaman and Nicobar Islands, India. *Chemosphere* 174: 315-320.
- Ndlela, L. L., Oberholster, P. J., Van Wyk, J. H. and Cheng, P. H. 2018. Bacteria as biological control agents of freshwater cyanobacteria: is it feasible beyond the laboratory? *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(23): 9911-9923.
- Newman, S. G. 2013. Risks of toxins from blue green algae to aquaculture. *Infofish International* 5: 24-28.
- Nishizawa, T., Hanami, T., Hirano, E., Miura, T., Watanabe, Y., Takanezawa, A., Komatsuzaki, M., Ohta, H., Shirai, M. and Asayama, M. 2010. Isolation and molecular characterization of a multicellular cyanobacterium, *Limnothrix /Pseudanabaena* sp. strain ABRG5-3. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74(9): 1827-1835.
- Oh, H. M., Lee, S. J., Jang, M. H. and Yoon, B. D. 2000. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1): 176-179.
- Ohta, T., Sueoka, E., Iida, N., Komori, A., Suganuma, M., Nishiwaki, R., Tatematsu, M., Kim, S. J., Carmichael, W. W. and Fujiki, H. 1994. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Research* 54(24): 6402-6406.



- Paerl, H. W. and Tucker, C. S. 1995. Ecology of blue-green algae in aquaculture ponds. *Journal of the World Aquaculture Society* 26(2): 109-131.
- Park, H. D., Sasaki, Y., Maruyama, T., Yanagisawa, E., Hiraishi, A. and Kato, K. 2001. Degradation of cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environmental Toxicology* 16(4): 337-343.
- Patel, V., Berthold, E. D., Dhandayuthapani, S., Rathinavelu, A. and Gantar, M. 2016. Optimization of C-phycoyanin production by *Limnothrix* sp. 37-2-1. *Journal of Algal Biomass Utilization* 7(1): 104-111.
- Peerapornpisal, Y., Sonthichai, W., Suchotiratana, M., Lipigorngoson, S., Ruangyuttikarn, W., Ruangrit, K., Pekkoh, J., Prommana, R., Panuvanitchakorn, N., Ngearnpat, N., Kiatpradub, S. and Promkutkaew, S. 2002. Survey and monitoring of toxic cyanobacteria in water resources for water supplies and fisheries in Thailand. *Chiang Mai Journal of Science* 29(2): 71-79.
- Persson, P. E. 1982. Muddy odor: a problem associated with extreme eutrophication. *Hydrobiologia* 86: 161-164.
- Pimolrat, P., Whangchai, N., Chitmanat, C., Itayama, T. and Lebel, L. 2015. Off-flavor characterization in high-nutrient-load *Tilapia* ponds in northern Thailand. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 15(2): 273-281.
- Rafiqul, M. I., Hassan, A., Sulebele, G., Orosco, A. C., Roustaian, P. and Jalal, A. C. K. 2003. Salt stress culture of blue-green algae *Spirulina Fusiformis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6(7): 648-650.
- Reddy, M. R. K. and Mastan, S. A. 2011. Algal toxins and their impact on human health. *Biomedical and Pharmacology Journal* 4(1): 129-134.
- Robarts, D. R. and Zohary, T. 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom forming cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21(3): 391-399.

- Robertson, L. A., Kleinschmidt, C. E., White, D. G., Payne, G. A., Maragos, C. M. and Holland, J. B. 2006. Heritabilities and correlations of Fusarium ear rot resistance and fumonisin contamination resistance in two maize population. *Crop Science* 46(1): 353-361.
- Rodgers, J. H. 2008. Algal toxins in pond aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 4605.
- Roth, P. B., Twiner, M. J., Mikulski, C. M., Barnhorst, A. B. and Doucette, G. J. 2008. Comparative analysis of two algicidal bacteria active against the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. *Harmful Algae* 7(5): 682-691.
- Ruangrit, K., Whangchai, N., Pekkoh, J., Ruangyuttikarn, W. and Peerapornpisal, Y. 2011. First report on microcystins contamination in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and Nile Tilapia (*Tilapia nilotica*) cultured in earthen ponds. *International Journal of Agriculture and Biology* 13(6): 1025-1028.
- Rubban, K., Sughan, V., Wong, L. S. and Meekin, C. 2014. The effects of pH and cell density to the responses of immobilized cyanobacteria for copper detection. *Journal of Life Sciences and Technologies* 2(2): 78-81.
- Secher, S. 2009. Measures to control harmful algal blooms. *The Plymouth Student Scientist* 2(1): 212-227.
- Sevrin-Reyssac, J. and Pletikotic, M. 1990. Cyanobacteria in fish ponds. *Aquaculture* 88 (1): 1-20.
- Sharma, A., Kohli, P., Singh, Y., Schumann, P. and Lal, R. 2016. *Fictibacillus halophilus* sp. nov., from a microbial mat of a hot spring atop the Himalayan Range. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(6): 2409-2416.

- Shi, M., Zou, L., Liu, X., Gao, Y., Zhang, Z., Wu, W., Wen, D., Chen, Z. and An, C. 2006b. A novel bacterium *Saprospira* sp. strain PdY3 forms bundles and lyses cyanobacteria. *Frontiers in Bioscience* 11: 1916-1923.
- Shi, S., Liu, Y., Shen, Y. and Li, G. 2006a. Lysis of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacterium) by a bacterium *Bacillus cereus*. *Biological Control* 39(3): 345-351.
- Sriyasak, P., Chitmanat, C., Whangchai, N., Promya, J. and Lebel, L. 2015. Effect of water de-stratification on dissolved oxygen and ammonia in tilapia ponds in Northern Thailand. *International Aquatic Research* 7(4): 287-229.
- Strunecký, O., Bohunická, M., Johansen, R. J., Čapková, K., Lenka, R., Dvořák, P. and Komárek, J. 2017. A revision of the genus *Geitlerinema* and a description of the genus *Anagnostidinema* gen. nov. (Oscillatoriothycidae, Cyanobacteria). *Fottea* 17(1): 114-126.
- Su, Y., Ma, S. and Feng, C. 2010. Effects of salinity fluctuation on the growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei* at different temperatures. *Journal of Crustacean Biology* 30(3): 430-434.
- Supriatna, S., Koesman, M., Hariati, A. and Mahmudi, M. 2017. Dissolved oxygen models in intensive culture of white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in East Java, Indonesia. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation - International Journal of the Bioflux Society* 10(4): 768-778.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., Wit, D. R. and Wilmotte, A. 2003. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5157-5169.
- Tayaban, M. M. K., Pintor, L. K. and Vital, G. P. 2018. Detection of potential harmful algal bloom-causing microalgae from freshwater prawn farms in Central Luzon,

- Philippines, for bloom monitoring and prediction. *Environment Development and Sustainability* 20(12): 1311-1328.
- Tekile, A., Kim, I. and Lee, J. 2017. 200 kHz sonication of mixed-Algae suspension from a eutrophic lake: The effect on the caution vs. outbreak bloom alert levels. *Water* 9(12): 915.
- Torres-ariño, A. and Mora-heredia, E. 2010. Isolation and characterization of potentially toxic or harmful cyanobacteria from Oaxaca and Chiapas, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 45(1): 128-136.
- Touloupakis, E., Cicchi, B., Benavides, S. M. A. and Torzillo, G. 2016. Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poterioochromonas* sp.). *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(3): 1333-1341.
- Tucker, C. S. and Abramo, L. R. D. 2008. Managing high pH in freshwater ponds. Southern Regional Aquaculture Center, Publication No. 4604.
- Vonshak, A., Kancharaksa, N., Bunnag, B. and Tanticharoen, M. 1996. Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress. *Journal of Applied Phycology* 8: 119-124.
- Wang, M. H., Peng, P., Liu, Y. M., Jia, R. B. and Li, L. 2013. Algicidal activity of a dibenzofuran-degrader *Rhodococcus* sp. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(2): 260-266.
- Wangwibulkit, S., Limsuwan, C. and Chuchird, N. 2008. Effects of salinity and pH on the growth of blue-green algae, *Oscillatoria* sp. and *Microcystis* sp., isolated from pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ponds. *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin* 32(1): 1-9.

- Washim, R. M. M., Siddiky, M. S. N. M. and Ahmmed, S. 2020. Improved extensive shrimp farming uplifted yield of coastal Ghers in Southwest Bangladesh. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research* 52(1): 78-87.
- Whitton, B. A., Gemmell, J. J. and Robinson, P. J. 2000. Identification of Blue Green Algae of the British Isles. R&D Technical Report E84 Durham 51 p.
- World Health Organization. 1998. Guidelines for Drinking Water Quality 2nd ed. Geneva: Health Criteria and Other Supporting Information. World health organization 515 p.
- World Health Organization. 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon. London, England 858 p.
- Wu, X., Xi, W. Y., Ye, W. J. and Yang, H. 2007. Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology* 61(1): 85-96.
- Xin, L., Hu, H. and Zhang, Y. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology* 102(3): 3098-3102.
- Xing, R., Ma, W., Shao, Y., Cao, X., Chen, L. and Jiang, A. 2019. Factors that affect the growth and photosynthesis of the filamentous green algae, *Chaetomorpha valida*, in static sea cucumber aquaculture ponds with high salinity and high pH. *PeerJ* 7(4): e6468.
- Xu, W., Xu, Y., Huang, X., Hu, X., Xu, Y., Su, H., Li, Z., Yang, K., Wen, G. and Cao, Y. 2019. Addition of algicidal bacterium CZBC1 and molasses to inhibit cyanobacteria and improve microbial communities, water quality and shrimp performance in culture systems. *Aquaculture* 502(2019): 303-311.
- Yang, C., Hou, X., Wu, D., Chang, W., Zhang, X., Dai, X., Du, H., Zhang, X., Igarashi, Y. and Luo, F. 2020. The characteristics and algicidal mechanisms of cyanobactericidal

- bacteria, a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36(12): 188.
- 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): 375-382.
- You, J., Mallery, K., Hong, J. and Hondzo, M. 2018. Temperature effects on growth and buoyancy of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research* 40(1): 16-28.
- Yu, Q., Xie, J., Huang, M., Chen, C., Qian, D., Qin, G. J., Chen, L., Jia, Y. and Li, E. 2020. Growth and health responses to a long-term pH stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports* 100280.
- Yusoff, F. M., Zubaidah, M. S. and Kwan, T. S. 2002. Phytoplankton succession in intensive marine shrimp culture ponds treated with a commercial bacterial product. *Aquaculture Research* 33(4): 269-278.
- Zeng, Y., Wang, J., Yang, C., Ding, M., Hamilton, B. P., Zhang, X., Yang, C., Zhang, L. and Dai, X. 2021. A *Streptomyces globisporus* strain kills *Microcystis aeruginosa* via cell-to-cell contact. *Science of The Total Environment* 769: 144489.
- Zepernick, N. B., Gann, R. E., Martin, M. R., Pound, L. H., Krausfeldt, E. L., Chaffin, D. J. and Wilhelm, W. S. 2021. Elevated pH conditions associated with *Microcystis* spp. blooms decrease viability of the cultured diatom *Fragilaria crotonensis* and natural diatoms in Lake Erie. *Frontiers in Microbiology* 12: 598736.
- Zhang, J., Shi, H., Liu, A., Cao, Z., Hao, J. and Gong, R. 2015. Identification of a new microcystin-degrading bacterium isolated from Lake Chaohu, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 94(5): 661-666.
- Zhang, Y., Chen, D., Zhang, N., Li, F., Luo, X., Li, Q., Li, C. and Huang, X. 2021. Transcriptional analysis of *Microcystis aeruginosa* co-cultured with algicidal bacteria *Brevibacillus laterosporus*. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18(16): 8615.

Zhu, M., Yu, G., Li, X., Tan, W. and Li, R. 2012. Taxonomic and phylogenetic evaluation of *Limnothrix* strains (Oscillatoriales, Cyanobacteria) by adding *Limnothrix planktonica* strains isolated from central China. *Hydrobiologia* 698(1): 367–374.

ภาคผนวก



## สูตรอาหาร BG-11

1. โซเดียมไนเตรต ( $\text{NaNO}_3$ )	1.5 กรัมต่อลิตร
2. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0.4 กรัมต่อลิตร
3. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.75 กรัมต่อลิตร
4. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.36 กรัมต่อลิตร
5. โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	0.02 กรัมต่อลิตร
6. EDTA disodium salt	0.01 กรัมต่อลิตร
7. Citric Acid	0.06 กรัมต่อลิตร
8. Ferric ammonium citrate	0.06 กรัมต่อลิตร
9. โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ )	15 กรัมต่อลิตร
10. วิตามิน บี12	2 มิลลิลิตรต่อลิตร

- ปรับค่าพีเอชเป็น 7.4 -7.5 นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเย็น จากนั้นเติมสารละลายวิตามิน บี12 2 มิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก พิมพรรณ, 2534)

### ขั้นตอนการสกัด DNA

1. ตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1,500 ไมโครลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 – 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
2. เติมไลโซไซม์ (Lysozyme) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น 30 นาที พลิกหลอดทุก ๆ 10 นาที
3. เติมโปรตีเอส (Proteinase) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร 10 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พลิกหลอดทุก ๆ 3 นาที
4. เติม GB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร 10 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าสารละลายใส พลิกหลอดทุก ๆ 3 นาที และบ่ม Elution buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส
5. เติม Absolution ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร
6. วาง GD column ใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ย้ายสารละลายตัวอย่างจากหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ไปยัง GD column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 – 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
7. ย้าย GD column ไปยัง Collection tube อันใหม่
8. เติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 – 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
9. ทิ้งสารละลายใน Collection tube จากนั้นเติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 – 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
10. ทิ้งสารละลายใน Collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 – 16,000 เป็นเวลา 3 นาทีเพื่อทำให้ GD column แห้ง
11. ย้าย GD column ไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวก์อันใหม่ เติม Elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 – 16,000 เป็นเวลา 30 วินาที

12. ทิ้ง GD column นำตัวอย่างในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ไปตรวจสอบแถบ DNA ด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที

## ขั้นตอนการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

### PCR Material

1. H <sub>2</sub> O	18 ไมโครลิตร
2. Master mix (Gene direct)	5 ไมโครลิตร
3. Primer 27F	0.5 ไมโครลิตร
4. Primer 1492R	0.5 ไมโครลิตร
5. DNA template	1 ไมโครลิตร

### PCR Condition

1. Initial denaturing	95 องศาเซลเซียส	3 นาที
2. Denaturing	95 องศาเซลเซียส	1 นาที
3. Annealing	54 องศาเซลเซียส	40 วินาที
4. Extension I	72 องศาเซลเซียส	1 นาที
5. Extension II	72 องศาเซลเซียส	10 นาที
6. Hold	12 องศาเซลเซียส	Infinity

7. ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที

### ขั้นตอนการทำ Pure PCR

1. ผสม PCR product กับน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) โดยปรับให้มีปริมาตร 100 ไมโครลิตรในหลอดไมโครเซนติพิวีกขนาด 1,500 ไมโครลิตร
2. เติมสารละลาย Gel/PCR buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สังเกตสีของตัวอย่าง หากตัวอย่างเปลี่ยนจากสีเหลืองป็นสีม่วงให้เติม Sodium acetate 3 โมล ผสมให้เข้ากันจนสารละลายกลายเป็นสีเหลือง
3. วาง DFH column ลงใน Collection tube จากนั้นทำการย้ายตัวอย่างจากหลอดไมโครเซนติพิวีกขนาด 1,500 ไมโครลิตร ลงใน DFH column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 – 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
4. เทสารละลายที่อยู่ใน Collection tube ที่วาง DFH column ลงใน Collection tube อีกครั้งและเติม Wash buffer (ที่ทำการเติม Absolute ethanol แล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใน DFH column ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 – 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
5. เทสารละลายที่อยู่ใน Collection tube ที่วาง DFH column ลงใน Collection tube อีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 – 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ DFH column แห้ง
6. ย้าย DFH column ที่แห้งแล้วไปยังหลอดไมโครเซนติพิวีกขนาด 1,500 ไมโครลิตรหลอดใหม่ เติม Elution buffer 20 – 50 ไมโครลิตร ลงบริเวณตรงกลางของหลอด DFH column ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 – 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
7. ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวกนกวรรณ มาเอียด

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6110620019

## วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วาริชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2560

## ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการการศึกษา)

- Participatory and Integrative Support for Agricultural Initiative (PISAI) Project มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนสาขาความเป็นเลิศการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนศูนย์วิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 3 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนผู้ช่วยสอนของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

### การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Maa-iad, K., Keawtawee, T. and Seel-audom, M. 2021. Characterization of Cyanobacteria strain Osci-TK01. The 1<sup>st</sup> International Conference on “Sustainable Agriculture and Aquaculture” 11-12 January 2021. Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand. (Book of abstract)

Maa-iad, K., Keawtawee, T. and Seel-audom, M. 2022. Effect of Cyanobacteria strain LmTK01 on The Survival Rate of Shrimp *Litopenaeus vannamei* and Factor Effectuated on LmTK01 Growth. The 13<sup>th</sup> National Science Research Conference “Research and Innovation for the New Normal Life” 12-13 May 2022. Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, Thailand. (Book of abstract)

Maa-iad, K., Keawtawee, T. and Seel-audom, M. 2022. Growth control of cyanobacteria strain LmTK01 using specific bacteria in laboratory (*in vitro*). Tropentag 2022 “Can agroecological farming feed the world? Farmer’s and Academia’s view” 14-16 September 2022. Faculty of Tropical AgriSciences, Czech University of Life Science, Prague, Czech Republic. (Book of abstract)

Maa-iad, K., Keawtawee, T. and Seel-audom, M. 2023. Effect of Cyanobacteria *Limnothrix* strain LmTK01 on the Survival Rate of Shrimp *Litopenaeus vannamei* and Factors Effectuated on LmTK01 Growth. Burapha Science Journal 28(2): (*In press*).

### รางวัลที่ได้รับ

- Second Runner-up Poster Presentation. Characterization of Cyanobacteria strain Osci-TK01. The 1<sup>st</sup> International Conference on “Sustainable Agriculture and Aquaculture” 11-12 January 2021. Faculty of Natural Resources Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.
- Excellent Presentation Award. Effect of Cyanobacteria strain LmTK01 on The Survival Rate of Shrimp *Litopenaeus vannamei* and Factor Effected on LmTK01 Growth. The 13<sup>th</sup> National Science Research Conference 12-13 May 2022. Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, Thailand.



