รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

แบคทีเรียจำเพาะต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ในฟาร์มกุ้งทะเล

Using the specific bacteria for controlling the blue green algae blooms strain Osci-TK01 in a shrimp farm

ดร. ธีญาภรณ์ แก้วทวี

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก เงินรายได้มหาวิทยาลัย ทุนดรุณาจารย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2557 รหัสโครงการ NAT570393S

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อแบคทีเรียในการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ที่คัดแยกจากน้ำเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 มีความคล้ายคลึงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Limnothrix* จากนั้นจึงคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำเลี้ยงกุ้งทะเล ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ภายใน 48 ชั่วโมง ได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ คือ P2, H5, HW6, T7 และ T12 เมื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปจำแนกชนิดโดยวิธีการทางโมเลกุลาร์ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Enterobacter* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio alginolyticus* และ *Vibrio* spp. ตามลำดับ โดยแบคทีเรีย P2, H5, HW6 และ T12 ไม่มีผลต่อการตายของลูกกุ้งขาวแวนนาไมภายหลังจากแช่ในเชื้อเหล่านี้ นอกจากนี้ยังไม่มีผลในการยับยั้งแพลงก์ตอนพืชชนิด *Chlorella* sp. *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. ตามลำดับ ยกเว้นแบคทีเรีย T7 มีผลต่อการทำลายเซลล์ของ *Chlorella* sp. และทำให้ลูกกุ้งตาย 100% ภายในระยะเวลา 3 วันหลังการแช่เชื้อ

Abstract

The aims of this study are to isolate and identify blue green algae strain Osci-TK01 and Osci-TK01-killing bacteria from water in shrimp culture pond. Blue green algae strain Osci-TK01 was similar to the genus *Limnothrix* which was identified by 16S rRNA gene sequencing analysis. Five strains of isolated Osci-TK01-killing bacteria; H5, HW6, P2, T7 and T12 showed the strong killing effect on Osci-TK01 within 48 hours. Result of 16S rRNA gene sequence analysis showed that strains P2, H5, HW6, T7 and T12 were closely related to *Enterobacter* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio* spp., respectively. Four strains (P2, H5, HW6 and T12) had no negative effects on the survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and had no killing effect on other phytoplankton species (*Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp. and *Chaetoceros* sp.). Except T7 showed killing effect on *Chlorella* sp. and killed white shrimp 100% within 3 days after immersion.

Keywords: Blue green algae, Algicidal bacteria, Shrimp culture, *Litopenaeus vannamei*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และคณะทรัพยากรธรรมชาติ สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ Prof. Dr. Masao Adachi และ Dr.Tomohiro Nishimura Laboratory of Aquatic Environmental Science, Faculty of Agriculture, Kochi University, JAPAN ที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการจำแนกชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ขอขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งทะเลจังหวัดสงขลา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณโมอาน่าไทยแอมฟาร์ม ที่ให้ความอนุเคราะห์ลูกพันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้

สารบัญ

บทคัดย่อ

กิตติกรรมประกาศ

สารบัญ

สารบัญภาพ

สารบัญตาราง

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

บทที่ 3 วิธีการศึกษา 19

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา 24

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา 43

เอกสารอ้างอิง 45

ภาคผนวก 50

สารบัญตาราง

Table 1 General water quality parameters in shrimp culture 25

Table 2 Density of cyanobacteria strain Osci-TK01 in shrimp culture 25

Table 3 Universal primers for PCR and DNA sequencing of cyanobacteria 28

Table 4 Density of blue green algae strain Osci-TK01 at 560 nm by different pH 31

Table 5 Osci-TK01 density at 560 nm by different concentration of NaCl 32

Table 6 Osci-TK01 density at 560 nm by different concentration of $NaNO_3$ 33

Table 7 Effect of total bacteria in the water of shrimp culture pond on blue green algae Osci-TK01 growth 35

Table 8 Characteristics of isolated bacteria strains 39

Table 9 Percentage (%) of phytoplankton after incubation with isolated bacteria 39

Table 10 Percentage of shrimp Litopenaeus vannamei mortality 40

Table 11 16S rRNA of Osci-TK01 killing bacteria for H5, HW6, P2, T7 and T12 41

สารบัญภาพ

Figure 1 Procedure for bacterial screening and isolation for algal - killing activity 23

Figure 2 Fluctuation of cyanobacteria strain Osci-TK01 in shrimp culture 26

Figure 3 Morphological studies of Cyanobacteria strain Osci-TK01 27

Figure 4 Blue green algae Osci-TK01 cell density at 560 nm 31
by different pH

Figure 5 Blue green algae Osci-TK01 cell density at 560 nm 32
by different concentration of NaCl

Figure 6Blue green algae Osci-TK01 cell density at 560 nm 33
by different concentration of NaNO3

Figure 7 Effect of total bacteria in the water of shrimp culture pond on 35
blue green algae Osci-TK01 growth

Figure 8 Osci-TK01 were killed after inoculation with isolated bacteria 38

Figure 9 Phylogenetic tree of 16S rRNA of Osci-TK01 killing bacteria 42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของไทยมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528 ในระยะแรกมีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยพัฒนาเป็นระบบการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่น (Intensive shrimp culture) จนทำให้ประเทศไทยมีผลผลิตกุ้งและส่งออกผลผลิตกุ้งทะเลเป็นอันดับหนึ่งของโลกในปี พ.ศ. 2543 (Prompoj and Songsangjinda, 2004) ต่อมามีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม *Litopenaeus vannamei* ซึ่งเป็นกุ้งสายพันธุ์ต่างประเทศ มีการแปรรูปและส่งออกจนเป็นที่ยอมรับของตลาดทั่วโลก และนำรายได้เข้าสู่ประเทศปีละแสนล้านบาท แต่ปัจจุบัน ผลผลิตกุ้งทะเลของไทยลดปริมาณลงมาก ในระหว่างปี 2553 ถึง 2554 ลดลงถึง 60,000 ตัน คิดมูลค่าประมาณ 10,500 ล้านบาท (Songsangjinda *et al.,* 2011) เนื่องจากเกษตรกรประสบปัญหาหลายด้าน เช่น พ่อแม่พันธุ์ และลูกพันธุ์กุ้งทะเลที่ไม่มีคุณภาพ นอกจากนี้การจัดการคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยง รวมถึงการจัดการด้านการให้อาหารไม่เหมาะสม ก็เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งที่จะนำไปสู่การเกิดโรคระบาด และการเลี้ยงกุ้งไม่ประสบความสำเร็จ โดยปัญหาเรื่องโรคกุ้งที่พบในขณะนี้ คือ โรคกุ้งด่วนตาย (Early mortality syndrome, EMS) เป็นจำนวนมากในทุกพื้นที่การเลี้ยง โดยเฉพาะตามชายฝั่งทะเลตะวันออก และทางภาคใต้ของประเทศ ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงและแปรรูปกุ้งทะเลเป็นอย่างมาก ซึ่งสาเหตุการเกิดโรค EMS ยังไม่สามารถระบุแน่ชัดในขณะนี้

การเลี้ยงกุ้งทะเลแบบหนาแน่น (Intensive aquaculture) โดยการปล่อยกุ้งลงเลี้ยงที่ความหนาแน่นสูง และมีการให้อาหารในปริมาณมาก เพื่อให้ได้ผลผลิตต่อพื้นที่เลี้ยงสูงที่สุด ส่งผลให้บ่อเลี้ยงกุ้งเกิดสภาวะที่มีปริมาณธาตุอาหารสูง (Tucker, 1996; Zimba and Grimm, 2003) มีการสะสมของของเสียที่เป็นสิ่งขับถ่ายจากกุ้ง เศษอาหารเหลือตกค้าง ตลอดจนถึงซากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการเลี้ยง ที่พื้นก้นบ่อ (Funge-Smith and Briggs, 1998) ทำให้พื้นก้นบ่อมีปริมาณสารอาหาร และสารอินทรีย์มากกว่าในน้ำมาก (Avnimelech and Ritvo, 2003) เมื่อจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์จากเลนบริเวณก้นบ่อ จะได้สารอาหารที่พร้อมปลดปล่อยสู่มวลน้ำ (พุทธ และคณะ, 2543; จุฑารัตน์ และคณะ, 2551) โดยเฉพาะแอมโมเนียและไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งแอมโมเนียและไฮโดรเจนซัลไฟด์ส่งผลกระทบรุนแรงต่อสุขภาพกุ้งทะเล โดยทำให้กุ้งกินอาหารลดลง และทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้า (Avnimelech and Ritvo, 2003) นอกจากนี้ธาตุอาหารปริมาณมาก ที่อยู่ในรูปของสารละลายไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ที่ละลายอยู่ในน้ำ ยังส่งผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนอย่าง

รวดเร็วหรือเกิดการเจริญเติบโตอย่างผิดปกติของแพลงก์ตอนพืชในระหว่างการเลี้ยงได้ (Funge-Smith and Briggs, 1998) จากการศึกษาของ A-Rodriguesz and P-Osuna (2003) พบการบลูมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Synechocystis diplococcus* และ *Schizothrixcal cicola* ในบ่อเลี้ยงกุ้ง เป็นสาเหตุทำให้กุ้งตายจำนวนมาก นอกจากนี้ การเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis*, *Anabaena* และ *Oscillatoria* ในบ่อเลี้ยงปลาคาร์ปที่ประเทศอินเดีย ส่งผลทำให้เกิดการตายของปลาเป็นจำนวนมาก (Padmavathi and Durgaprasad, 2007)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ได้ (Gallon *et al*., 1991) มักเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนขึ้น เมื่อปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้น ในบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีฟอสเฟตปริมาณมาก ทำให้สาหร่ายกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีและรวดเร็วกว่าแพลงก์ตอนพืชชนิดอื่น ๆ (Yusoff *et al*., 2001) ซึ่งในปัจจุบันสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสกุล *Oscillatoria* สามารถพบได้ตลอดในทุกระยะของการเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากเป็นกลุ่มแพลงก์ตอนพืชที่เจริญได้ดีในแหล่งน้ำที่มีสารอินทรีย์ค่อนข้างสูง การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของ *Oscillatoria* ในบ่อเลี้ยงกุ้ง นอกจากส่งผลให้น้ำเกิดภาวะขาดออกซิเจนในเวลากลางคืนแล้ว *Oscillatoria* ยังเข้าไปติดและอุดตันที่เหงือกกุ้ง ทำให้กุ้งหายใจลำบาก หรือก่อให้เกิดโรคเหงือกดำได้ (สมศักดิ์, 2533) นอกจากนี้การมีแพลงก์ตอนพืชอยู่ในปริมาณมากนอกจากก่อให้เกิดปัญหาการขาดออกซิเจนในตอนกลางคืน แล้วยังทำให้เกิดอาการลอยตัวของกุ้งอยู่บริเวณขอบบ่อในตอนเช้าอีกด้วย (วีรานุชและคณะ, 2544) ซึ่งเมื่อ *Oscillatoria* ที่เพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว และตายลงเมื่อหมดธาตุอาหาร ทำให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ปริมาณมาก เกิดการย่อยสลายและเน่าเสีย ส่งผลให้กุ้งกินอาหาร และการเจริญเติบโตของกุ้งลดลง อีกทั้งส่งผลทำให้กุ้งมีสุขภาพอ่อนแอ และทำให้กุ้งติดเชื้อโรคได้ง่าย ซึ่งนี่ก็อาจจะเป็นสาเหตุความเสี่ยงหนึ่งที่ทำให้กุ้งเป็นโรค EMS ปัญหาที่เกิดจาก *Oscillatoria* หนาแน่นในบ่อเลี้ยงกุ้งมีมานานแล้ว เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอัตราการตายของกุ้งเนื่องจากการติดเชื้อสูงขึ้นจากสารพิษในบ่อเลี้ยงที่มีการบลูมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Oscillatoria, Lyngbya* sp.,และ *Nodularia* sp. ซึ่งเป็นพิษต่อระบบประสาท ทำให้กุ้งมีความอ่อนแอ เป็นสาเหตุให้เกิดพฤติกรรมการกินอาหารและระบบภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติเกิดการติดเชื้อได้ง่าย (Smith, 1996) และจากการตรวจเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกและขาว่ายน้ำของกุ้งกุลาดำ พบว่าแหล่งน้ำที่มีการบลูมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Oscillatoria* (ปริมาณมากกว่า 2,500 เซลล์/มล.) มักจะเกิดการอุดตันของสาหร่ายสกุลดังกล่าวที่ซี่เหงือก นอกจากนี้อาการผิดปกติที่พบ ได้แก่ กุ้งมีตะกอนอุดตันที่ซี่เหงือก และเกาะบริเวณขาว่ายน้ำ หางกุด ตับติดเชื้อแบคทีเรีย และซูโอแทมเนียมค่อนข้างมาก (วีรานุชและคณะ, 2544) ในอดีตมีการกำจัด *Oscillatoria* โดยใช้สารเคมีจำพวก บีเคซี (BKC) และ Copper Alkanolamine Complex แต่พบว่าสารเคมีเหล่านั้นสามารถฆ่าแพลงก์ตอนพืช สกุล *Chlorella* ซึ่งเป็นชนิดที่มีประโยชน์ด้วย (สราวุธ นิลเขต และ

คณะ, 2542) เกษตรกรส่วนใหญ่จะแก้ปัญหาการเกิดโรคระบาดโดยการใช้ยา และหรือ สารเคมี เพื่อการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ เหล่านั้น ซึ่งการใช้ยาและสารเคมีโดยขาดการควบคุมและความเข้าใจในการใช้อย่างถูกต้องนั้น ทำให้เกิดเป็นปัญหาต่อเนื่องมากมาย เช่น ยาไม่มีประสิทธิผลต่อเชื้อโรคทำให้เกิดการระบาดของโรค หรือ การกลายพันธุ์ของเชื้อโรคจนยากแก่การรักษาหรือป้องกัน สารเคมีมีผลต่อคุณภาพน้ำและระบบนิเวศน์ในบ่อเลี้ยงทำให้ผลผลิตลดลง การตกค้างของยาหรือสารเคมีในเนื้อกุ้งซึ่งกำลังเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อการส่งออกกุ้งทะเลไทยมากที่สุดในขณะนี้ (เจนนุช และคณะ, 2547)

แบคทีเรียบางชนิดที่ถูกคัดแยกมาจากน้ำทะเล มีความจำเพาะเจาะจงต่อการกระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชได้ (Riquelme *et al.,* 1988, Fukami, 1991,1996, Simon *et al.,* 2002) โดยแบคทีเรียชนิด *Mariobacteria salsuginis* BS2 ที่คัดแยกจากน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงกุ้งทะเลในบ่อดิน มีความจำเพาะเจาะจงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอนพืชชนิด *Noctiluca scintillans* ในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยไม่มีผลในการควบคุมหรือยับยั้งแพลงก์ตอนพืชชนิดอื่นๆ (Keawtawee *et al.,* 2011) ซึ่งการใช้แบคทีเรียจำเพาะชนิดนี้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชที่เป็นอันตรายต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตกุ้ง เป็นการช่วยให้อัตรารอดของกุ้งทะเลเพิ่มขึ้น (Keawtawee *et al.,* 2012) นอกจากนี้ Imai *et al.,* (2010) พบว่าแบคทีเรียชนิด *Agrobacterium vitis* สามารถฆ่าเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis aeruginosa* ได้ ดังนั้นการใช้แบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงกุ้ง จึงมีความเป็นไปได้สูง ที่จะนำมาใช้ในการกำจัดหรือควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในบ่อเลี้ยงกุ้งได้เช่นกัน การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการค้นหาและทดสอบแบคทีเรียจำเพาะที่คัดแยกจากน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงกุ้ง เพื่อใช้ในการยับยั้งและควบคุมการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่ยังไม่มีการรายงานผลการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้มาก่อน

ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ค้นหาชนิดของแบคทีเรียที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการยับยั้งหรือควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยคัดแยกแบคทีเรียจำเพาะดังกล่าวจากน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงกุ้งในบ่อดิน ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ มีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถช่วยแก้ปัญหาการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยวิธีธรรมชาติ โดยไม่ใช้สารเคมี อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาการจัดการเลี้ยงกุ้งทะเลให้ประสบความสำเร็จ ช่วยลดภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบาด และช่วยเพิ่มผลผลิตกุ้งทะเลที่มีคุณภาพ ทำให้การเลี้ยงกุ้งทะเลยั่งยืน และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังเพื่อเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรและผู้ประกอบการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลสามารถใช้ทางเลือกในการจัดการคุณภาพน้ำ และการจัดการกับการเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอนพืชกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้ด้วยวิธีการควบคุมทางชีวภาพ ทำให้การเลี้ยงกุ้งทะเลประสบความสำเร็จมีความยั่งยืน และได้ผลผลิตที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาและคัดแยกเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล เพื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

2. เพื่อคัดแยก จำแนกและเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีความจำเพาะต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล

3. เพื่อศึกษาความสามารถในการใช้แบคทีเรียจำเพาะที่คัดแยกได้ข้างต้น ในการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ในห้องปฏิบัติการ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำเลี้ยงกุ้งสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สายพันธุ์ Osci-TK01

1.4 สมมติฐานการทดลอง

แบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำเลี้ยงกุ้งทะเลบางสายพันธุ์ มีความสามารถในการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล Osci-TK01 โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชชนิดอื่น และไม่มีผลกระทบหรือก่อโรคในกุ้งทะเล

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตกุ้งทะเล คัดแยกและจำแนกแบคทีเรียจำเพาะต่อการเจริญเติบโต และการเพิ่มจำนวนของ Osci-TK01 จากน้ำทะเลในบ่อเลี้ยงกุ้ง แล้วใช้แบคทีเรียจำเพาะที่คัดแยกได้ ควบคุมการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทย

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย ได้รับการพัฒนารูปแบบอย่างต่อเนื่องจนกลายเป็นระบบอุตสาหกรรม และได้รับความสำเร็จในเชิงผลผลิตตลอดระยะเวลา 15 ปี ที่ผ่านมา อย่างไรก็ตามในช่วงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 เป็นต้นมา ได้ประสบปัญหาต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมการผลิตกุ้งทะเลไทย อาทิ ผลผลิตลดลง การตกค้างของยาปฏิชีวนะในกุ้งส่งออก และการเกิดโรคระบาด ทำให้เกษตรกรหันมาใช้ยา และหรือ สารเคมี เพื่อการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ เหล่านั้น ซึ่งการใช้ยาและสารเคมีโดยขาดการควบคุมและความเข้าใจในการใช้อย่างถูกต้องนั้น ทำให้เกิดเป็นปัญหาต่อเนื่องมากมาย เช่น ยาไม่มีประสิทธิผลต่อเชื้อโรคทำให้เกิดการระบาดของโรค หรือการกลายพันธุ์ของเชื้อโรคจนยากแก่การรักษาหรือป้องกัน สารเคมีมีผลต่อคุณภาพน้ำและระบบนิเวศน์ในบ่อเลี้ยงทำให้ผลผลิตลดลง การตกค้างของยาหรือสารเคมีในเนื้อกุ้งซึ่งกำลังเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อการส่งออกกุ้งทะเลไทยมากที่สุดในขณะนี้ (เจนนุช และคณะ, 2547) การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) หรือกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยเริ่มต้นในปี 2545 กรมประมงได้อนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (Specific Pathogen Free, SPF) จากต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยงแทนการเลี้ยงกุ้งกุลาดา (*Penaeus monodon*) ที่ประสบปัญหากุ้งโตช้า มีขนาดที่แตกต่างกันมาก เกษตรกรต้องใช้ระยะเวลา ในการเลี้ยงนานขึ้น และส่วนใหญ่ประสบปัญหาขาดทุน กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งที่มีการพัฒนาสายพันธุ์มาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานทำให้อัตราการเจริญเติบโตดี ให้ผลผลิตสูงในระยะเวลาสั้น ทาให้เกษตรกรจานวนมากหันมาเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแทน (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล, 2547)

ในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลแบบหนาแน่น การให้อาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูงเพื่อให้ได้ผลผลิตกุ้งทะเลสูงที่สุด (Kureshy and Davis, 2002) ไนโตรเจนเกือบทั้งหมด (97%) ที่เข้าสู่บ่อเลี้ยงกุ้ง มาจากอาหารที่ให้กุ้งกิน กุ้งสามารถเก็บไนโตรเจนไว้ในเนื้อกุ้งได้ ประมาณ 21.8% ไนโตรเจนอีกประมาณ เกือบ 80% นั้นจะตกค้างอยู่ในบ่อในรูป ของเศษอาหารและขี้กุ้งที่บริเวณก้นบ่อ ประมาณ 70% และในรูปของสิ่งขับถ่ายที่ละลายน้ำได้ เช่น อินทรีย์ไนโตรเจน แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทประมาณ 9% (พุทธ และคณะ, 2537) ไนโตรเจนที่สะสมอยู่ในบ่อจะมีการเปลี่ยนแปลงจากรูปที่สามารถเป็นอาหารของแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (อินทรีย์ไนโตรเจน) ให้อยู่ในรูปของสารประกอบที่เป็นพิษกับกุ้ง (แอมโมเนีย และไนไตรท์) หมุนเวียนไปมาในระบบนิเวศของบ่อเลี้ยงกุ้ง บางส่วนจะถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซไนโตรเจนและจะออกจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

ซึ่งแอมโมเนียและไนเตรทในน้ำเป็นปุ๋ยที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืช นอกเหนือจากนี้ ยังต้องการ ปุ๋ยฟอสเฟต ซิลิเกต แสงแดด และคาร์บอนไดออกไซด์สำหรับการเจริญเติบโตด้วย ผลจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนพืช จะมีออกซิเจนเกิดขึ้น และละลายอยู่ในน้ำ การสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนพืช ขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิ แสง และปริมาณสารอาหาร (Steele, 1962; Eppley, 1972) นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลก โดยเฉพาะอุณหภูมิและแสง มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดของแพลงก์ตอนพืช และเกิดผลกระทบในระดับที่รุนแรงแตกต่างกัน เนื่องจากแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิดมีช่วงอุณหภูมิและความเข้มแสงที่เหมาะสมแตกต่างกัน (Nicklishch et al., 2007) ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่อยู่ในน้ำถูกใช้โดยแพลงก์ตอนพืชและเป็นกระบวนการหลักในการเปลี่ยนสารประกอบอนินทรีย์ละลายน้ำให้กลับมาเป็นสารประกอบอินทรีย์อีกครั้ง เนื่องจากแพลงก์ตอนพืชมีประสิทธิภาพในการนำสารอาหารประเภทไนโตรเจนในน้ำมาใช้ได้ดีกว่าแบคทีเรีย จึงสามารถนำมาใช้ได้อย่างรวดเร็ว และเก็บสะสมอยู่ในตัวในรูปไนโตรเจนอินทรีย์ ในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ของ Heterotrophic bacteria จะเปลี่ยนไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (Mineralization) เป็นแอมโมเนียและฟอสเฟต ด้วยการเปลี่ยนไนโตรเจนในอนุภาค (PON, PP) เป็น ไนโตรเจนอินทรีย์ละลายน้ำ (DON, DOP) และแอมโมเนียรวม (TAN, DIP) ตามลำดับ ผลการศึกษาของพุทธ และคณะ (2537) พบว่า การเปลี่ยนแปลงประชาคมแพลงก์ตอนพืชในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนียทั้งหมด เพราะโดยทั่วไปแล้วแพลงก์ตอนพืชชอบใช้แอมโมเนียมากกว่าไนเตรทและไนไตรท์ ตลอดจนถึงไนโตรเจนรูปอื่น ๆ (มนุวดี, 2532; Hargreaves, 1998) นอกจากนี้ Hargreaves (1998) ยังพบว่า แพลงก์ตอนพืชจะใช้ไนเตรทเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำลดลงต่ำกว่า 0.03 mg-N/l ซึ่งกระบวนการพื้นฐานทางเคมีและชีวะที่เกิดขึ้นในพลวัตไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ได้แก่ กระบวนการไนตริฟิเคชั่น (Nitrification) ประกอบด้วยกระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์และกระบวนการเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรท เป็นกระบวนการที่ต้องการใช้ออกซิเจน เกิดขึ้นได้ทั้งในน้ำและดินตะกอน และกระบวนการดีไนตริฟิเคชั่น (Denitrification) เป็นกระบวนการเปลี่ยนไนเตรทเป็นก๊าซไนโตรเจน ซึ่งกระบวนการนี้ไม่ต้องการใช้ออกซิเจน จะเกิดมากในดินตะกอนชั้นที่มีออกซิเจนน้อยหรือขาดออกซิเจน การเกิดกระบวนนี้จะถูกยับยั้งเมื่อปริมาณออกซิเจนมากกว่าหรือเท่ากับ 2 มก./ล. ในการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาในระบบเปิดไนโตรเจนที่เข้ามาในบ่อถูกกำจัดด้วยกระบวนการดีไนตริฟิเคชั่น 30% (Funge-Smith and Briggs, 1998) การควบคุมสีน้ำเป็นวิธีการจัดการควบคุมการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนไม่ให้มีมากเกินไปจนตาย ลงในบ่อเลี้ยง ในขณะที่แพลงก์ตอนพืชมีชีวิตอยู่แพลงก์ตอนพืชจะดูดซับเอาสารอาหารส่วนเกินในบ่อเลี้ยงกุ้งที่เกิดจากการย่อยสลายของอาหารและขี้กุ้ง และผลิตออกซิเจนออกมาในปริมาณมาก จึงทำให้สภาพแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้งดี

เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต สารอินทรีย์และปุ๋ยที่มีมากในบ่อ เป็นสาเหตุให้มีแพลงก์ตอนพืช จุลินทรีย์ และแบคทีเรียมาก ตามไปด้วย ซึ่งอาจจะทำให้เกิดผลเสียกับการเลี้ยงกุ้ง คือ ทำให้ความต้องการออกซิเจนของบ่อเลี้ยงกุ้งสูงขึ้น อาจจะทำให้เกิดการขาดออกซิเจนในเวลากลางคืน โดยเฉพาะช่วงเวลาหลังเที่ยงคืน จนกระทั่งถึงเช้าตรู่ แพลงก์ตอนที่มีมากจะทำให้มีการสังเคราะห์แสงในเวลากลางวันทำให้น้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งมีค่าพีเอชสูงขึ้น ทำให้แอมโมเนียอิสระที่เป็นพิษกับกุ้งเพิ่มปริมาณมากขึ้น สีน้ำที่เข้มอยู่เป็นเวลานาน จะเสี่ยงต่อการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลระบบนิเวศอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะกรณีของการตายของแพลงก์ตอนพืชจะทำให้เกิดซากอินทรีย์จำนวนมากเป็นสาเหตุร่วมของปัญหาแอมโมเนียของน้ำสูงหลังจากแพลงก์ตอนตายลงอย่างรวดเร็ว จะทำให้เกิดการสังเคราะห์แสงลดลง และการดูดซึมแอมโมเนียไปใช้ลดลง นอกจากนี้ยังทำให้การผลิตออกซิเจนลดลงด้วย ส่งผลทำให้ กุ้งเครียด อ่อนแอ และอาจจะรุนแรงทำให้เกิดการติดเชื้อโรคได้ง่าย และทำให้กุ้งตายในที่สุด เชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาทมากในโรคกุ้งจะเป็นเชื้อวิบริโอ (vibrio sp.) ซึ่งมักจะเป็นแบคทีเรียเคลื่อนไหวได้ รูปร่างทรงกระบอกหรือท่อนโค้ง มักย้อมติดแกรมลบ เชื้อ แบคทีเรียเหล่านี้จะมีบทบาทเข้าทำลายเม็ดเลือด และการกระจายตัวไปตามระบบทางเดินโลหิต เคลื่อนตัวเข้าสู่ระบบของต่อมสร้างน้ำย่อย หรือตับอ่อน เมื่อเนื้อเยื่อเหล่านี้ถูกทำลาย การทำงานของ ต่อมสร้างน้ำย่อยก็จะเสียไป ทำให้กุ้งไม่กินอาหาร และตายในที่สุด โรคที่เกิดจากแบคทีเรียในกุ้งขาวที่มักจะพบและรุนแรง ได้แก่

1) โรควิบริโอซีส (Vibriosis) สาเหตุเกิดจากแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ได้แก่ *V. parahemolyticus, V. vulnificus* เป็นต้น ลักษณะอาการกุ้งกินอาหารลดลง ตัวกรอบแกรบ เปลือกนิ่ม ขึ้นข้างหรือว่ายวนขอบบ่อ อาจมีดวงขาวที่เปลือกทั้งส่วนหัวและลำตัว ตัวกุ้งอาจมีสีแดงกล้ามเนื้อ ตายมักมีสีขาวขุ่น กุ้งมีอัตราการตายสูงโดยเฉพาะในกุ้งอายุ 1-2 เดือน ติดต่อผ่านทางน้ำเป็นหลัก

2) โรคแบคทีเรียเรืองแสง สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง (*Vibrio harveyi*) ซึ่งพบอัตราการตายสูงในกุ้งระยะวัยอ่อนถึงวัยรุ่น ลอยหัว มีแสงเรืองในเวลากลางคืน หรือในที่มืด ในกุ้งวัยรุ่นจะว่ายขึ้นผิวน้ำ ขอบบ่อ กุ้งกินอาหาร ลดหรือไม่กินอาหาร มักพบเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด และกล้ามเนื้อ ติดต่อ ผ่านทางน้ำเป็นหลัก โดยส่วนใหญ่การเข้าทำลายกุ้งของเชื้อแบคทีเรียมักมีสาเหตุหลักมาก่อน เมื่อกุ้งอ่อนแอ ในบ่อเลี้ยงมีเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นๆ อยู่ ก็จะสามารถติดเชื้อแบคทีเรียต่อไปได้ (secondary infection) สาเหตุหลักมักเกิดจากที่ไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในบ่อได้ สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ อุณหภูมิ ขึ้นอยู่กับชนิดแบคทีเรีย โดยส่วนมากในประเทศไทย จะเป็นแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในอุณหภูมิปานกลาง ประมาณ 21-40 องศาเซลเซียส สารอาหาร มักประกอบด้วยสารที่เป็นตัวให้และรับไฮโดรเจน แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ และ growth factor ได้แก่ กรดอะมิโน purine และ

pyrimidine ก๊าซที่สำคัญ คือไนโตรเจนออกซิเจน และ คาร์บอนไดออกไซด์ และรังสี มีผลต่อการทำลายแบคทีเรียเป็นสำคัญ มี 2 ชนิด ตาม สารละลายทำลาย คือ ionization radiation เป็นรังสีที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา ionization เป็นรังสีเอกซ์ รังสีแกมมา และรังสีคาโธด เป็นต้น และ รังสีอุลตร้าไวโอเลต เป็นแสงสีม่วงน้ำเงิน (blue violet) ที่ พบในแสงแดดและอื่น ๆ การทำลายเชื้อแบคทีเรียสามารถทำได้ทั้งกายภาพและเคมี oxidizing agent เป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ดี ที่นิยมใช้มากได้แก่ คลอรีน ไอโอดีนฟลูออไรด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) นอกจากนี้กุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียยัง สามารถรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมได้อีกด้วย

3. โรค EMS หรือ Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) พบครั้งแรกในประเทศจีนในปี พ.ศ. 2553 ต่อมาในปี พ.ศ. 2554 พบในประเทศเวียดนามและมาเลเซีย โรค EMS/AHPNS พบทั้งในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และ กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) โดยเกิดโรคภายใน 20-30 วัน หลังการปล่อยลูกกุ้งลงบ่อ ลักษณะอาการของโรค ช่วงแรกกุ้งจะไม่แสดงอาการผิดปกติ แต่จะเริ่มพบกุ้งตายในยอและตายที่ก้นบ่อ หลังจากนั้นจะพบซากกุ้งลอยขึ้นมา และจะมีการตายอย่างด่วนภายระยะเวลาประมาณ 30 วัน โรค EMS/PHPNS ที่เกิดในกุ้งกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และ กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) มีลักษณะพยาธิของโรคที่เหมือนกัน จากการเก็บตัวอย่างกุ้งมาทำการศึกษาพบว่า บริเวณตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ของกุ้งถูกทำลายส่งผลให้การสะสมไขมันและการหลั่งสารลดลง ในระยะท้ายของโรคมีการติดเชื้อพวกวิบริโอ ในที่สุดกุ้งที่ตายจะเกิดจากการที่ตับและตับอ่อนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ (Lightner, 2012) สำหรับประเทศไทยพบโรค EMS/AHPNS ในกุ้งขาวแวนนาไม ช่วงปลายปี พ.ศ. 2554 ถึงปัจจุบัน ทางภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศ พบบ่อยในบ่อที่มีน้ำเขียวเข้ม และมีสาหร่ายขี้ปลาวาฬ จากการตรวจวินิจฉัยของสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง พบแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในตับและตับอ่อนของกุ้งที่ป่วย และเนื้อเยื่อตับถูกทำลาย แต่เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียไปทดสอบยืนยันพบว่าไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้ ตรวจทางพีซีอาร์ไม่พบไวรัสที่สำคัญในไทย ขณะนี้ปัญหาของโรค EMS ในประเทศไทย ยังไม่สามารถระบุสาเหตุของโรคที่แท้จริงได้

2.2 ชีววิทยาและลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สาหร่าย (algae) เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารได้ด้วยตนเองจากกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชทั่วไป มีขนาดเล็กตั้งแต่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็นจนกระทั่งถึงขนาดใหญ่มีความยาวหลายร้อยเมตร เช่น สาหร่ายหลายชนิด สาหร่ายมีรูปร่างหลายแบบ อาจจะเป็นเซลล์เดียวหลายเซลล์มารวมกลุ่มกัน เรียกว่ากลุ่มเซลล์หรือโคโลนี เป็นเส้นสายทั้งแตกแขนงและไม่แตกแขนงเป็นทัลลัสที่คล้ายมีราก ลำต้น และใบคล้ายพืชชั้นสูง แต่ไม่มีระบบท่อลำเลียงดังเช่นพืชชั้นสูง ทุกเซลล์ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงเพื่อดำรงชีวิตเหมือนๆ กัน (ยุวดี, 2556)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue Green Algae) ประกอบด้วยผนังเซลล์สองชั้นรอบนอกมีชีทซึ่งเป็นสารเมือกหุ้ม ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปในเป็นเยื่อบางบางเรียกว่าเยื่อพลาสมา (plasma membrane) หุ้มไซโตพลาสซึมไว้ ไซโตพลาสซึมส่วนนอกที่อยู่ใกล้ผนังเซลล์มักมีสารสีกระจายอยู่มาก เรียกส่วนนี้ว่า โครโมพลาสซึม (chomoplasm) ส่วนไซโตพลาสซึมส่วนในมีลักษณะคล้ายนิวเคลียสจึงเรียกส่วนนี้ว่าเซนต์โตพลาสซึม เนื่องจากส่วนนี้ไม่มีผนังหุ้มจึงถือว่าไม่ใช่นิวเคลียสที่แท้จริง ในส่วนของ โครโมพลาสซึมจะมีไซยาโนซินแกรนูลซึ่งเป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไปเม็ดเล็ก ๆ มีเป็นสารอาหารสะสมพวกแป้งชนิดไซยาโนไฟเซียน

นอกจากไซยาโนไฟซินแกรนูลแล้วยังมีแก๊สแวคิวโอล (gas vacuole) ลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็กกระจายอยู่ในโครโมพลาสซึม แก๊สแวคิวโอลมีรูปร่างไม่แน่นอน อาจจะมีลักษณะเป็นถุงกลมเช่นในสกุล *Oscillatoria* แก๊สแวคิวโอลในแพลก์ตอน บางชนิดอาจจะหายไปถ้าอยู่ในที่มืดหรือแสงสลัว ๆ และจะปรากฏขึ้นอีกเมื่อมีแสงจัด จึงคาดว่าแก๊สแวคิวโอลทำหน้าที่เป็นตัวกรองแสง ส่วนในพวกที่ก่อให้เกิดการบลูมของน้ำ (water bloom) แก๊สแวคิวโอลจะช่วยให้เซลล์ลอยตัว ตอนแรกเซลล์จะอยู่ตามพื้นหรือระดับที่ต่ำกว่าผิวน้ำเมื่อสร้างแก๊สแวคิวโอลแล้วจะลอยขึ้นมาที่ผิวน้ำพอได้รับแสงจะสังเคราะห์แสง ทำให้ความดันในเซลล์เพิ่มขึ้น ในทางกลับกันแก๊สแวคิวโอลจะลดลงจนหมดในที่สุดและเซลล์ก็จะจมตัวลง (ดัดแปลงจากลัดดา, 2544) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นพืชชั้นต่ำที่เรียกว่า โปรคาริโอต (prokaryote) ซึ่งจัดรวมอยู่ในพวกเดียวกับแบคทีเรียแต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างออกไปคือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีคลอโรฟิลล์เอ จึงสามารถสังเคราะห์แสงได้และมีออกซิเจนซึ่งเกิดจากการสังเคราะห์แสงด้วย ซึ่งคุณสมบัตินี้จะไม่พบในแบคทีเรีย สาหร่ายกลุ่มนี้ไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เปลี่ยนสีของเซลล์ได้ สามารถขึ้นอยู่ได้ทุกแห่งทั่วโลกทั้งน้ำจืด ทะเล น้ำพุร้อน นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน อาจขึ้นรวมอยู่กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้ทั้งพืชและสัตว์ สาหร่ายแต่ละชนิดมีแหล่งที่อยู่อาศัย และช่วงของความทน (range of tolerance) ต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมือนกัน ดังนั้นในแหล่งน้ำต่างกันจึงมีชนิดของสาหร่ายไม่เหมือนกัน โดยทั่วไป สามารถแบ่งแหล่งน้ำตามความมากน้อยของสารอาหาร (trophic level) ออกเป็น 3 ระดับ คือ แหล่ง น้ำที่มีสารอาหารน้อย (oligotrophic)

น้ำจะมีคุณภาพดี แหล่งน้ำที่มีสารอาหารปานกลาง (mesotrophic) น้ำมีคุณภาพปานกลาง และแหล่งน้ำที่มีสารอาหารมาก (eutrophic) น้ำมีคุณภาพ ไม่ดี ในแหล่งน้ำแต่ละสภาพจะมีสาหร่ายที่อยู่ในรูปของแพลงก์ตอนพืชแตกต่างกัน ดังนี้ ในแหล่งน้ำที่มีสารอาหารน้อย (คุณภาพน้ำดี) จะพบสาหร่ายสีเขียวประเภทเดสมิดส์ ได้แก่ *Staurastrum, Staurodesmus, Cosmarium* และ *Closterium* เป็นต้น ในแหล่งน้ำที่มีสารอาหาร ปานกลางจะพบสาหร่ายไดโนแฟลเจลเลต เช่น *Peridinium, Gymnodinium* และ *Ceratium* เป็น ต้น ส่วนแหล่งน้ำที่มีสารอาหารมากมักจะพบสาหร่ายน้อยประเภท แต่ละประเภทมีจำนวนมาก 10 บางครั้งอาจพบสาหร่ายเพียงชนิดเดียวแต่มีปริมาณมากก็เป็นได้ มักพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria* และ *Phormidium* สาหร่ายยูกลีนอยด์ เช่น *Euglena*, *Phacus* และ *Trachelomonas* (ยุวดี, 2549) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) หรือ ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) : Division Cyanophyta สาหร่ายกลุ่มที่มีกำเนิดมาก่อนสาหร่ายกลุ่มอื่นๆ และมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย โดยเป็นพวกนิวเคลียสไม่มีเยื่อหุ้มหรือพวกโพรคาริโอตพบได้ทั่วไปในทีที่มีความชื้น ในน้ำจืด น้ำกร่อย น้ำเค็ม ทั้งในน้ำที่มีคุณภาพดีและไม่ดีพบอยู่ทั้งในดินและผิวดินแม้แต่ในหิมะหรือน้ำพุร้อน บางชนิดอาจเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในแหล่งน้ำที่มีสารอาหารสูงหรือสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมแล้วสร้างสารพิษออกมาซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำบริเวณนั้น (ยุวดี, 2556) และเนื่องจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในอันดับ Chroococcales วงศ์ *Oscillatoria*ceca และ Nostocaceae ซึ่งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 150 สกุล 1,500 ชนิด ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนมีสาหร่ายหลายชนิด สามารถเจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็วในเวลาอันรวดเร็วเกิดการบลูมทำให้มีปริมาณมหาศาลจนทำให้แหล่งน้ำนั้นๆ มีสีตามสีของตัวมันเองและในบางกรณีน้ำจะเปลี่ยนสีไปอันเกิดจากการบลูมของสาหร่ายเพียงชนิดเดียว การเจริญเติบโตและแพร่พันธุ์แบบที่กล่าวมานั้น เรียกว่า “water bloom” (ลัดดา, 2544)

2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตได้แก่ สารอาหาร, ความเค็ม หรือความเข้มข้นของไอออน, สภาพแสง, ความปั่นป่วน และการผสม, อุณหภูมิ และผู้บริโภคพืช (Rodgers, 2008)

1. ความเข้มแสง มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะความเข้มแสงที่แตกต่างกันมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากรายงานพบว่าการได้รับแสงมีผลต่อคุณค่าทางโภชนาการและ

การสร้างรงควัตถุ โดยการใช้มูลสุกรผสมในปุ๋ยสำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina platensis* (สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์ และคณะ, 2553)

2. อุณหภูมิ มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน การสืบพันธุ์ และทำให้ปริมาณของออกซิเจนในน้ำลดลง สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความต้องการอุณหภูมิในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน จากการศึกษา Nostoc commune ซึ่งกำลังได้รับความนิยมในประเทศไทยนำมาเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุด คือ 8.1 ± 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำหนักแห้งมากที่สุดคือ 1.36 ± 0.01 กรัมต่อลิตร (สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์, 2549)

3. ความขุ่นของน้ำ เกิดจากสารแขวนลอย ทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ รวมทั้งสิ่งมีชีวิตในน้ำ อนุภาคสารแขวนลอย เช่น ฟอสเฟตทำให้พืชน้ำเจริญเติบโตได้ดี มีผลต่อปริมาณแสงในน้ำ (Kjellstrom, 2006) ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทำให้เจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่

4. ค่า pH ในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตจะอยู่ในช่วง 6.8-8.0 ทั้งนี้ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความต้องการpHที่แตกต่างกัน จากการศึกษาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Phormidium tenue, Synechococcus cedrorum และ Synechococcus pevalekii เจริญเติบโตได้ดีที่สุดใน BGA medium ที่ pH 7.5 (Nagle et al., 2009)

5. ปริมาณสารอาหาร สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญเติบโตได้เหมือนสิ่งมีชีวิตทั่วไป มีความต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโต เพื่อนำมาสร้างพลังงานและสารประกอบที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ โดยแบ่งความต้องการปริมาณสารอาหารของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้เป็น แร่ธาตุที่ต้องการเป็นปริมาณมาก และแร่ธาตุที่ต้องการเป็นปริมาณน้อย (Ivaonne et al., 2011)

จากการศึกษาของ Venkataramana Reddy et al. (2013) ได้ศึกษาผลของชนิดอาหารที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Anabaena ambigua) โดยเลี้ยงในอาหาร BBM, BG-11 และ FOG's เลี้ยงที่ความเข้มแสง 4,000lux พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหาร BG-11 และในอาหาร FOG's และ BBM มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน จากการศึกษาเดียวกัน Venkataramana Reddy et al. (2013) ได้ศึกษาผลของค่า pH (3, 5, 7, 9 และ 11) ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Anabaena ambigua) บนอาหาร BG11 พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถเจริญเติบโต

ได้ดีที่สุดที่ค่า pH 7 และรองลงมาคือ 9 และ 11 ตามลำดับ (Venkataramana Reddy et al., 2013) และ จากการศึกษาของ โพธิธรณ์ และคณะ (2555) ที่ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 ชนิดด้วยกันได้แก่ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 1 โมลาร์ พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 3 ชนิด เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl เมื่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl สูงขึ้น การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 3 ชนิดลดลง และเมื่อเลี้ยงที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.5 โมลาร์ขึ้นไป *Spirulina* sp. และ *Nostoc* sp. ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.25 โมลาร์ขึ้นไป *Anabaen*a sp. ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (โพธิธรณ์ และคณะ, 2555)

2.4 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สกุล *Oscillatoria*

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria* มีลักษณะเป็นเส้นสายเดี่ยว ๆ หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มหนาแน่นแต่ละสายไม่แตกแขนง ทรัยโคม ประกอบด้วย เซลล์แถวเดียวเรียงต่อกันเป็นสาย โดยมีความกว้างของเซลล์สม่ำเสมอตลอดสาย โดยปกติแต่ละเซลล์มักมีขนาดกว้างมากกว่ายาวยกเว้นบางชนิดเท่านั้นที่เฉพาะเซลล์ปลายๆทรัยโคมเท่านั้นที่อาจเรียวยาวหรือแคบลงและเซลล์ปลายสุด (apical cell) อาจมีคาลิพทรา (calyptra) อยู่ซึ่งมีลักษณะคล้ายหมวกปีกหรือมีผนังเซลล์พองออก (capitate) *Oscillatoria* เป็นสกุลที่ไม่มีชีทหุ้ม แต่อาจมีน้ำใสๆหุ้มอยู่ สามารถเคลื่อนไหวได้ทั้งแบบเลื่อนไหล (gliding) หรือแกว่งซ้ายขวา (oscillating) สืบพันธุ์โดยการเกิดเซลล์ตายภายในสายและสร้างเซพาเรชันดิส (separation disc) แบ่งทรัยโคมออกเนฮอร์โมโกนหรือฮอร์โมโกเนีย เป็นแพลงก์ตอนที่พบทุกแหล่งน้ำ ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย ทะเล และทะเลสาบน้ำเค็ม หรือตามที่ชื้นแฉะทั่วไปนักเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนิยมเรียก *Oscillatoria* ว่า สาหร่ายขนแมว (ลัดดา, 2544)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสกุล *Oscillatoria* เป็นแพลงก์ตอนพืชที่พบได้ตลอดในทุกระยะของการเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากเป็นกลุ่มแพลงก์ตอนพืชที่เจริญได้ดีในแหล่งน้ำที่มีสารอินทรีย์ค่อนข้างสูง บางสกุลสามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศเปลี่ยนเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่พืชและสัตว์น้ำสามารถนำไปใช้ได้ อีกทั้งช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ซึ่งเป็นปัจจัยจำกัดที่สำคัญต่อการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ อย่างไรก็ตาม การมีแพลงก์ตอนพืชอยู่ในปริมาณมากย่อมก่อให้เกิดปัญหาการขาดออกซิเจนในตอนกลางคืน และเกิดอาการลอยตัวของกุ้งอยู่บริเวณขอบบ่อในตอนเช้าอีกด้วย (วีรานุชและคณะ, 2544) นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Oscillatoria* หรือ สาหร่ายขนแมวบางชนิดนั้น มีความสามารถในการสร้างสารพิษ ซึ่งสารพิษดังกล่าวนั้น เป็นพิษที่ส่งผลต่อระบบประสาท ทำให้กุ้งมีความอ่อนแอ

เป็นสาเหตุที่ทำให้กุ้งมีพฤติกรรมการกินอาหารและระบบภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติและทำให้กุ้งเกิดการติดเชื้อได้ง่าย (Smith, 1996) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เช่น สกุล *Oscillatoria*, *Mycrocystis* sp., *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp., *Aphanizomenon* sp., *Symploca* sp., *Phromidium* sp. และแบคทีเรีย สกุล *Streptomyces* sp.ยังมีความสามารถในการสังเคราะห์สาร Geosmin ขึ้นที่ก่อให้เกิดกลิ่นโคลนในตัวสัตว์น้ำทำให้ขายได้ราคาไม่ดี ผลผลิตไม่มีคุณภาพ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เป็นสาเหตุให้เกิดกลิ่นโคลนในสัตว์น้ำนั้นได้แก่ ปริมาณธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ชนิดและปริมาณของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ความเค็มของน้ำ อุณหภูมิของน้ำ และ ความเข้มแสง การดูดซึมและการสะสมสารประกอบ Geosmin ในสัตว์น้ำ เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยสาร Geosmin เข้าไปจับกับไขมันในกระแสเลือดแล้วแพร่กระจายตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย (ปิยะวิทย์, 2553)

2.5 บทบาทของแพลงก์ตอนพืชในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

แพลงก์ตอนพืชเป็นผู้ผลิตขั้นปฐมภูมิที่สำคัญในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ นอกจากนี้ยังเป็นตัวชี้ วัดคุณภาพน้ำ (ลัดดา, 2544) และมีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำภายในบ่อ (บุณฑริกา ทองดอนพุ่ม, 2547) อย่างไรก็ตามแพลงก์ตอนพืชมีวงจรชีวิตเพียง 1-2 สัปดาห์จากนั้นจะตาย (Boyd, 1982) แต่การเปลี่ยนแปลงของแพลงก์ตอนในระหว่างการเลี้ยง หรือที่เรียกว่า plankton crash หรือ แพลงก์ตอนดรอป หรือที่เกษตรกรเรียกว่า สีน้ำล้ม จะเกิดหลังจากที่มีการบลูมของแพลงก์ตอนแล้วระยะหนึ่ง ซึ่งจะพบแพลงก์ตอนกลุ่มเด่นเพียงหนึ่งกลุ่มหรือสองกลุ่มเท่านั้น การเกิดสีน้ำล้มในประเทศไทยส่วนใหญ่จะมีสาเหตุมาจาก 1) การสะพรั่งของแพลงก์ตอน 2) ขาดธาตุอาหารกลุ่มไนโตรเจนและฟอสฟอรัส 3) ท้องฟ้าปิดเนื่องจากฝนตกหนักติดต่อกันเป็นระยะเวลายาวนาน 4) การเปลี่ยนถ่ายน้ำในปริมาณมาก (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล, 2547) การเปลี่ยนแปลงของแพลงก์ตอนภายในบ่ออย่างรุนแรง หรือ การเกิด plankton crash ในระหว่างการเลี้ยงจะมีความรุนแรงมาก เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ และสภาพบ่ออย่างเฉียบพลัน การตายของแพลงก์ตอนจะทำให้เกิดฟอง หรือฝ้าจำนวนมากที่ผิวหน้าน้ำ พบตะกอนจานวนมากในมวลน้ำ น้ำหนืด มีกลิ่นคาวอย่างรุนแรง (โสภณ อ่อนคง และชูสินธุ์ ชนะสิทธิ์, 2542) การตายของแพลงก์ตอนดังกล่าว ภายหลังการบลูมของแพลงก์ตอนภายในบ่อนอกจากจะเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำภายในบ่อแล้วยังมีผลต่อการปลดปล่อยสาร Geosmin หรือ(trans - 1, 10 -dimethyl - trans - 9 -decalol) และ MIB (2 -methylisoborneol (1, 2, 7, 7 - tetramethyl - exo - bicyclo - [2,2,1] -heptan - 2 -ol) จะถูกปล่อยออกมาสะสมในเนื้อเยื่อสัตว์น้ำ (Johnsen *et al*., 1996) สารประกอบ Geosmin และ MIB เป็นสารประกอบแอลกอฮอล์อิ่มตัวที่ระเหยได้ โครงสร้างประกอบด้วยหมู่เมทิลและหมู่ไฮดรอกซิล คุณสมบัติทั่วไปคือละลายในไขมัน

ได้ดี ไม่ชอบน้ำ ทาให้กระจายตัวและสะสมในเนื้อเยื่อที่มีองค์ประกอบของไขมัน ทาให้กำจัดได้ยาก จึงทาให้เกิดกลิ่นโคลนหรือกลิ่นไม่พึงประสงค์ (Izaguirre *et al*., 1982) การเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของแพลงก์ตอนพืชกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ทำให้เกิดความเป็นพิษ พบปริมาณเพิ่มขึ้นทั่วโลก ทั้งในทะเลสาบ บ่อ และ ในน้ำดื่ม (Cronberg and Annadotter, 2006) Oscillatoria เป็นแพลงก์ตอนพืชพวกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดหนึ่งที่สามารถดึงเอาไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ได้โดยตรงผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Gallon et al., 1991) สามารถเจริญเติบโตได้ดีและรวดเร็วว่าแพลงก์ตอนพืชชนิดอื่น ๆ ในบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีปริมาณฟอสเฟตสูง นอกจากนี้ Yusoff et al. (2001) ยังพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของ *Oscillatoria* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มฟอสฟอรัส สอดคล้องกับ การศึกษาแพลงก์ตอนพืชในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาในเขตพื้นที่น้ำจืด จังหวัดราชบุรี ของ พัชริดา และคณะ (2543) พบ *Oscillatoria* มากกว่าแพลงก์ตอนพืชสกุลอื่นๆ เช่นกัน เนื่องจากเลี้ยงกุ้งทะเลแบบพัฒนามีปริมาณสารอินทรีย์และสารอาหารไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำสูงสอดคล้องกับผลการศึกษาของคณิตและคณะ (คณิต และคณะ, 2535)

จากการศึกษาถึงผลกระทบของการบลูมหรือการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของแพลงก์ตอนพืชในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล พบว่าการบลูมของแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดโนแฟกเจลเลตชนิด *Alexandrium tamarence* เป็นสาเหตุทำให้กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในประเทศไต้หวันตายจำนวนมาก (Huei-Meei et al., 1993) และพบการบลูมของ *Noctiluca scintillans* ในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลที่ประเทศจีน ทำให้กุ้งทะเลในประเทศจีนเป็นโรค ส่งผลให้ผลผลิตกุ้งตกต่ำ (Chen and Gu, 1993) การเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis, Anabaena* และ *Oscillatoria* ในบ่อเลี้ยงปลาคาร์ปที่ประเทศอินเดีย ส่งผลให้เกิดการตายของปลาเป็นจำนวนมาก (Padmavathi and Durgaprasad , 2007) นอกจากนี้ ยังพบการบลูมของแพลงก์ตอนพืชกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Synechocystis diplococcus* และ *Schizothrixcal cicola* ในประเทศแมกซิโก เป็นสาเหตุทำให้กุ้งตายจำนวนมาก (A-Rodriguesz and P-Osuna, 2003) ซึ่งการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของ *Oscillatoria* ในบ่อเลี้ยงกุ้ง นอกจากส่งผลให้น้ำเกิดภาวะขาดออกซิเจนในเวลากลางคืนแล้ว *Oscillatoria* ยังเข้าไปติดและอุดตันที่เหงือกกุ้ง ทำให้กุ้งหายใจลำบาก หรือก่อให้เกิดโรคเหงือกดำได้ (สมศักดิ์, 2533) นอกจากนี้ *Oscillatoria* ที่เพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว และตายลงเมื่อหมดธาตุอาหาร ทำให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ปริมาณมาก เกิดการย่อยสลายและเน่าเสีย ส่งผลให้กุ้งกินอาหาร และการเจริญเติบโตของกุ้งลดลง อีกทั้งส่งผลทำให้กุ้งมีสุขภาพอ่อนแอ และทำให้กุ้งติดเชื้อโรคได้ง่าย

2.6 สารที่เกิดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สารที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสร้างสามารถแบ่งออกได้ 2 ประเภทใหญ่ คือ สารทุติยภูมิที่มีกลิ่น และสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Smith et al., 2008) กลิ่นคาวถือเป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ยกตัวอย่างอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาดุกในสหรัฐอเมริกาที่มีการคาดเดาว่า 30% ของรายได้ทั้งหมดหายไปกับการปนเปื้อนของสารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่น และรส ซึ่งเป็นค่าใช้จ่ายในการเลี้ยง และให้อาหารจนกว่าสัตว์น้ำจะหมดกลิ่น และรสชาติคาว รวมไปถึงค่าเสียโอกาสในความล่าช้าในการเก็บรักษาสัตว์น้ำจนกว่าจะได้การยอมรับในการขาย หรือการเก็บเกี่ยว และอัตราการตายของสัตว์น้ำที่เกิดจากการระบาดของโรคในบ่อที่เกิดจากสภาวะความเป็นพิษในบ่อเนื่องจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จากการสำรวจพบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดที่เป็นเส้นสายมากกว่า 25% สามารถผลิตสารที่ออกกลิ่นรส ชนิดที่รู้จักทั่วไป ได้แก่ Geosmin ([E1, 10-dimethyl-E-9-decalol) และ methylisoborneol (MIB) และสารที่ออกกลิ่นรสชนิดใหม่ที่เกิดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีรูปแบบ coccoid โดยเฉพาะ *Microcystis* sp. ได้แก่ Hydroxyketones และ Norcarotenoids (เช่น β-cyclocitral) (Smith et al., 2008)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จำนวนมาก และมีความหลากหลายทางชีวเคมี เป็นสารที่มีโอกาสเกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ไม่ว่าจะเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ หรืออวัยวะของเป้าหมาย หรือพฤติกรรมของสัตว์น้ำที่ได้รับสารนั้น (Smith et al., 2008) สารพิษ Hepatotoxins ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินพบสารพิษ microcystins มากกว่า 70 ชนิด และแบบ nodularins อีก 8 ชนิด โดยสารพิษ microcystins สามารถพบได้ทั่วโลกในสายพันธุ์ *Microcystis* sp., *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Oscillatoria* sp. หรือ *Planktothrix* sp. ในขณะที่สารพิษ nodularins จะพบในสายพันธุ์ *Nodularia* sp. ซึ่ง microcystins และ nodularins เป็น monocyclic แบบ heptapeptides และ pentapeptides ซึ่งชนิดของพิษจะแตกต่างกันออกไปตามตำแหน่งของกรดอะมิโน (Smith et al., 2008)

Microcystins และ Nodularins จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดไปทั่วลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum), เหงือกหรือเยื่อหุ้มปอด และเกิดการสะสมในเซลล์ตับมากเป็นพิเศษ เป็นผลมาจากความอุดมสมบูรณ์ของ organic anion transporting polypeptides (OATPs) ที่เป็นที่รู้จักกันในชื่อกรดน้ำดีในระบบขนส่ง ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งเตียรอยด์ และเปปไทด์ต่างๆ ซึ่งการดูดของสารพิษ hepatotoxins ไปยังอวัยวะต่างๆนั้นจะถูกจำกัดด้วยความจำเพาะของ OATPs และโมเลกุลที่ชอบน้ำ hepatotoxins สามารถสะสมอยู่ใน ไต, ลำไส้, และโครงสร้างกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และปลา และภายในของกล้ามเนื้อ,ลำไส้, อวัยวะสืบพันธุ์, หัวใจ และพังผืดที่เท้าของสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Smith et al., 2008)

สารพิษในกลุ่ม Cytotoxins ได้แก่ Cylindrospermopsin (CYL) ที่ผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 8 สายพันธุ์ได้แก่ *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans*, *Anabaena bergeii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon issatschenkoi*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Raphidiopsis curvata*, และ *Lyngbya wollei* โดยสารพิษนี้ได้รับรายงานว่าเป็นพิษต่อกุ้งทะเล และปลาในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยง (Smith et al., 2008)

Cylindrospermopsin ออกฤทธิ์ส่งผลกระทบต่อตับ แต่ก็ส่งผลต่ออวัยวะอื่นทั่วๆไปได้เช่นกัน ได้แก่ ไต, ปอด, หัวใจ, กระเพาะอาหาร และต่อมหมวกไต จึงได้รับการจำแนกให้อยู่ในกลุ่มของ cytotoxins การดูดซึมของสารพิษจะถูกแพร่ไปยังส่วนต่างๆของร่างกายผ่านระบบการขนส่งของกรดน้ำดี cylindrospermopsin จะออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้เซลล์ตาย, เสื่อม, การกระจายตัวของ DNA และเนื้องอก หรือการกลายพันธุ์ (Smith et al., 2008)

สารทุติยภูมิ Neurotoxins ที่ออกฤทธิ์ทำให้เกิดอัมพาตในสิ่งมีชีวิต สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่มใหญ่ตามโครงสร้างได้แก่ 1) กลุ่มอัลคาลอย ได้แก่ anatoxin-A, homoanatoxin-A, anatoxin-A(s), และparalytic shellfish poisoning (PSP) toxins (saxitoxin, gonyautoxin, และอนุพันธ์ที่ใกล้เคียง) และ 2) กลุ่ม lipopeptides ได้แก่ antillatoxins A และ B, kalkitoxin, และ jamaicamides ซึ่งกลุ่มอัลคาลอยจะพบในสายพันธุ์ *Anabaena* sp., *Aphanizomenon* sp., *Microcystis* sp., *Cylindrospermopsis* sp., และ *Planktothrix* sp.สำหรับกลุ่ม *lipopeptides* จะพบจากสายพันธุ์ *Lyngbya majuscule* (Smith et al., 2008) ชนิดที่ออกฤทธิ์ต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้แก่ anatoxin-a และ homoanatoxin-a ซึ่งออกฤทธิ์คล้ายกับอาการโดนยาฆ่าแมลง และ anatoxin-A(s) ที่จะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ส่วนชนิด saxitoxins, kalkitoxin และ jamaicamides (A, B และ C) ซึ่งจะออกฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของระบบประสาทกับเซลล์กล้ามเนื้อทำให้เกิดอัมพาต (Smith et al., 2008)

สารทุติยภูมิกลุ่ม Dermatoxins/tumor promoters ซึ่งได้แก่ Lyngbyatoxins และ aplysiatoxins ถูกสร้างโดย สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *L. majuscule* โดย Lyngbyatoxins (Lyngbyatoxins A(LA), B และ C) จัดเป็น indole alkaloids ในขณะที่ aplysiatoxins (aplysiatoxins (AT) และdebromoaplysiatoxin (DAT)) จัดเป็น phenolic bislactones (Smith et al., 2008) Lyngbyatoxins และ aplysiatoxins มีค่า LD100 ที่ทดลองกับหนูทดลองอยู่ที่ 250 µg/kg และทำให้เกิดเนื้องอก ทำให้เกิดเลือดออกในลำไส้ เป็นแผลในกระเพาะ และสุดท้ายจะเสียชีวิตเนื่องจากการช็อคจากการขาดเลือด (Smith et al., 2008) สารพิษ lipopolysaccharides (LPS) โดยทั่วไปถูกจัดอยู่ใน endotoxins ประกอบด้วยพอลิเมอร์คาร์โบไฮเดรตเป็นหลัก สามารถพบได้ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลากหลายชนิด ได้แก่ *Microcystis*, *Anabaena*, *Spirulina*

และ *Oscillatoria* (Smith et al., 2008) ทำให้เกิดไข้, การอักเสบ, เกิดการระเคืองผิวหนัง, และทางเดินอาหาร โดยมีค่า LD50 ของหนูทดลอง อยู่ในช่วง 45-190 mg/kg (Smith et al., 2008)

2.7 การควบคุมและยับยั้งการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืช

การศึกษาการควบคุมและยับยั้งการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชโดยเฉพาะกลุ่มไดโนแฟกเจลเลต (Dinoflegellate) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green algae) ที่มีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้รับความสนใจกันอย่างแพร่หลาย สารเคมีหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลนับตั้งแต่ในโรงเพาะฟัก โรงอนุบาล จนถึงในบ่อดิน โดยส่วนใหญ่มีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมสภาพแวดล้อมภายในบ่อทั้งด้านเคมี และด้านชีวภาพ เช่น ควบคุมเชื้อโรคต่าง ๆ ในสภาพแวดล้อมในลักษณะของ biosecurity หรือการควบคุมปริมาณสาหร่าย แพลงก์ตอนในน้ำ รวมไปจนถึงการรักษาและป้องกันโรคพยาธิภายนอกของกุ้งด้วย การศึกษาถึงประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติ (in vitro study) และความเป็นพิษของสารเคมีชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งทะเลไทย นอกจากการศึกษาทางด้านประสิทธิภาพและความเป็นพิษของสารเคมีแล้ว บางรายงานยังได้ระบุถึงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของน้ำที่อาจเป็นผลจากการใช้สารเคมี (เจนนุช, 2547) เช่น จากการศึกษาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์และความเป็นพิษเฉียบพลันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide=H2O2 50%) ทำให้สามารถนำผลการศึกษาที่ได้มาเปรียบเทียบกับสารเคมีตัวอื่นๆ ที่มีการใช้ในวัตถุประสงค์คล้ายคลึงกัน ดังเห็นได้จากการแสดงผลการศึกษาพิษเฉียบพลัน นอกจากผู้วิจัยรายงานประสิทธิภาพของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการออกฤทธิ์ต่อเชื้อ Vibrio ที่แยกจากกุ้งป่วย บางส่วนของการศึกษาแสดงประสิทธิภาพของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการกำจัดและควบคุมปริมาณแพลงก์ตอนพืชบางชนิดเพื่อลดปัญหาการเกิด off-flavor จากแพลงก์ตอนโดยทำการศึกษาใน blue green algae: Oscillatoria และ Chlorella sp. และ Chlorophyll a พบว่า H2O2 4.19-7.18 ส่วนในล้าน มีผลลดปริมาณของ Oscillatoria และ Chlorophyll a (ประพันธ์ศักดิ์, 2542) ซึ่งได้เป็นต้น อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีนั้นถือเป็นทางเลือกสุดท้ายในการควบคุมและจัดการคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากสารเคมีมีความรุนแรงอาจทำให้คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งเปลี่ยนแปลงไม่เหมาะสมต่อการเลี้ยง กุ้งที่เลี้ยงได้รับสารเคมีอาจทำให้เกิดความผิดปกติ และทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางสกุลเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำดีในบ่อเลี้ยงกุ้งลดลงไปด้วย

จากการศึกษาบทบาทของแบคทีเรียที่มีอยู่ในน้ำทะเลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและควบคุมการเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอนพืช พบว่าแบคทีเรียบางชนิดที่ถูกคัดแยกมาจากน้ำทะเล มีความจำเพาะเจาะจงต่อการกระตุ้น หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชได้ (Riquelme et al., 1988; Fukami, 1991,1992; Imai et al., 2001; Simon et al., 2002; Clinton

et al., 2005) สอดคล้องกับการศึกษาของ Keawtawee et al., (2011) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงกุ้งในฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเลเชิงพาณิชย์ ที่อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา แล้วศึกษาคุณบัติของการเป็นแบคทีเรียจำเพาะต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชชนิด *N. scintillans* พบว่า มีแบคทีเรีย 10 ชนิดที่สามารถฆ่าเซลล์ของ *N. scintillans* ได้ แต่แบคทีเรียชนิด *Mariobacteria salsuginis* สายพันธุ์ BS2 แสดงความสามารถในการฆ่าเซลล์แพลงก์ตอนได้สูงที่สุด นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะเจาะจงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอนพืชชนิด *N. scintillans* ในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยไม่มีผลต่อการควบคุมหรือยับยั้งแพลงก์ตอนพืชชนิดอื่น ๆ ซึ่งเมื่อนำแบคทีเรียชนิดนี้ไปทดสอบคุณสมบัติในการฆ่าแพลงก์ตอนพืชในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้ง พบว่า แบคทีเรียชนิดนี้ยังแสดงความสามารถในการฆ่าแพลงก์ตอนพืชชนิด *N. scintillans* ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้แบคทีเรียจำเพาะดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้ง อีกทั้งยังเป็นการช่วยให้อัตรารอดของกุ้งเพิ่มขึ้นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Keawtawee et al., 2012) นอกจากนี้ Imai และคณะ (2010) พบว่า แบคทีเรียชนิด *Agrobacterium vitis* สามารถฆ่าเซลล์ของแพลงก์ตอนพืชกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis aeruginosa* ได้ ดังนั้นวิธีการยับยั้งหรือควบคุมการเพิ่มจำนวนหรือการบลูมของแพลงก์ตอนพืชกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria* ในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลโดยการใช้แบคทีเรียจำเพาะที่คัดแยกจากน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงกุ้งในบ่อดิน จึงมีความเป็นไปได้สูง ที่จะสามารถช่วยแก้ปัญหาการเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอนพืชด้วยวิธีธรรมชาติ โดยไม่ใช้สารเคมี อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาการจัดการเลี้ยงกุ้งทะเลให้ประสบความสำเร็จ ช่วยลดภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบาด และช่วยเพิ่มผลผลิตกุ้งทะเลที่มีคุณภาพ ทำให้การเลี้ยงกุ้งทะเลยั่งยืน และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และได้ผลผลิตที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการคิดค้นการใช้จุลินทรีย์หรือแบคทีเรียต่างๆมาใช้ในการควบคุมหรือยับยั้งสาหร่ายหรือแพลงก์ตอนที่ก่อให้เกิดโทษในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น แบคทีเรียบางชนิดนั้นมีความต้องการเซลล์เพื่อยับยั้งเซลล์สาหร่าย ซึ่งมีความสามารถในการกระทำต่อเซลล์ *Noctiluca* ที่ผลิตสารบางอย่างขึ้นและพบว่าสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการทำลาย *Noctiluca* ได้เป็นกลุ่มของGammaproteobacteria ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเลือกใช้แบคทีเรียที่สามารถควบคุมและยับยั้งการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนที่เป็นอันตรายในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นสิ่งที่สำคัญมาก (Keawtawee, et al, 2011) และจากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย BS2 ที่คัดแยกได้จากน้ำในบ่อกุ้งพบว่าสามารถยับยั้งและกำจัด *N. scintillans* ภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งแบคทีเรีย BS2 นั้นไม่ส่งผลกระทบต่อสภาพกุ้งทั้งกุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งกุลาดำและอัตราการรอดตายของกุ้งเพิ่มขึ้น 26-98% จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกุ้ง การควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่เป็นอันตรายในลักษณะนี้ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งถือได้ว่าเป็นประโยชน์ที่สำคัญสำหรับการผลิตกุ้ง (Keawtawee et al, 2012)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

3.1.1 เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงกุ้งทะเลจากฟาร์มของเกษตรกร อ.สิงหนคร จังหวัดสงขลา ที่มีการจัดการเลี้ยงรูปแบบเดียวกันที่มีวิธีการจัดการเลี้ยงทั่วไปเหมือนกัน จำนวน 2 บ่อ คือ บ่อเลี้ยง 1 (pond 1) และบ่อเลี้ยง 2 (pond 2) สัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ ในระหว่างวันที่ 18 มิถุนายน ถึง 30 โดยตรวจวัดคุณภาพน้ำทั่วไป ได้แก่ ความลึกของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งทะเล อุณหภูมิน้ำ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO) พี เอช (pH) ความเค็ม (Salinity) ความโปร่งแสงของน้ำ (Transparency) ค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) และปริมาณของแข็งละลายลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolved Solid) ด้วยเครื่องวัดคุณภาพน้ำแบบหัวรวม

3.1.2 เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์หาความหนาแน่นของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เกิดการบลูมในบ่อ โดยการกรองน้ำปริมาตร 10-20 ลิตร (ขึ้นอยู่กับสีน้ำเลี้ยงกุ้ง) ผ่านถุงกรองแพลงก์ตอนขนาดตา 20 ไมโครเมตร จากนั้นทำการดองตัวอย่างเพื่อเก็บรักษาพันธุ์แพลงก์ตอนด้วยสารละลายฟอร์มาลีนที่เป็นกลาง (Naturalize fornmalin) ความเข้มข้นสุดท้าย 5 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำตัวอย่างไปนับจำนวนของเส้นสายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินภายใต้กล้องจุลทรรน์แบบคอมพาส์ว

3.1.3 คัดแยกเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากตัวอย่างน้ำเลี้ยงกุ้งทะเล ในระหว่างที่เกิดการบลูมของสาหร่ายและกุ้งประสบปัญหาในการเลี้ยง โดยคัดแยกเชื้อสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยเทคนิคการล้างเซลล์ด้วยไมโครปิเปต (Micropipette washing) จนกระทั่งได้เชื้อสาหร่ายที่ต้องการเพียงชนิดเดียว

3.1.4 นำหัวเชื้อสาหร่ายที่ได้ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG-11 medium ที่อุณหภูมิห้อง 28 ± 1 องศาเซลเซียส พี เอชอยู่ในช่วง 7.0-7.3

3.1.5 ศึกษาลักษณะทางกายภาพ รูปร่าง โครงสร้าง ความกว้างและความยาวของเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Compound รุ่น LEICA DM750 และใช้เทคนิค Confocal laser scaning microscope (LMS800) zeiss

3.1.6 จำแนกชนิดของสาหร่ายด้วยวิธีการทางโมเลกุลาร์ โดยการเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA ด้วยเครื่อง Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Primer set ที่ดัดแปลงขึ้นมาใหม่สำหรับวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่ายชนิดนี้

3.1.7 เมื่อได้ข้อมูลผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำข้อมูลนี้ไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ใน GenBank/EMBL/DDGB ด้วยโปรแกรม Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อจัดจำแนกชนิดของสาหร่ายที่คัดแยกได้

3.1.8 ศึกษาผลของสูตรอาหาร พี เอช (pH) ความเค็ม (NaCl) และปริมาณโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่คัดแยกได้ โดยใช้สูตรอาหารต่างกัน 2 ชนิด คือ Blue green 11 (BG-11) และ Zarrouk medium

3.2 **คัดแยกและสกรีนแบคทีเรียชนิดที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน**

3.2.1 เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลในเขตจังหวัดสงขลาที่ทำการเลี้ยงกุ้งมาแล้ว 60 วัน จำนวน 4 บ่อ คือ คือ P_1, P_2, P_3 และ P_4 มาทดลองเลี้ยงกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ ใน microplate โดยใส่สาหร่ายหลุมละ 0.5 ml ร่วมกับน้ำเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.8 µm ปริมาณ 0.5 ml นับจำนวนเซลล์ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง และนับจำนวนแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งแต่ละบ่อด้วยวิธี MPN Method (ดัดแปลงจาก Keawtawee *et. al*., 2011) โดยทำการเจือจางน้ำทะเลตัวอย่างก่อนนำไปเชื้อบนอาหารแข็ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเฉพาะ dilution ที่มีจำนวน colony อยู่ในช่วง 30-300 colony เท่านั้น แต่ละ dilution ทำ 3 ซ้ำ นำผลที่นับได้ไปคำนวณปริมาณโคโลนีทั้งหมด ดังสมการต่อไปนี้

Colony Forming Unit (CFU/mL) = (จำนวน Colony เฉลี่ย x dilution factor) / 0.1 mL

เมื่อ จำนวน colony เฉลี่ย คือ จำนวน colony เฉลี่ย ของทั้ง 3 ซ้ำ dilution หนึ่งๆ ที่มีจำนวน colony นับได้เฉพาะในช่วง 30- 300 colony

Dilution factor คือ ความเข้มข้น (dilution) หนึ่งๆ ที่ใช้ในการคำนวณจำนวน colony เฉลี่ยโดยต้องเปลี่ยนเลขยกกำลังให้เป็นบวกเสมอ

3.2.2 นำน้ำตัวอย่างจากแต่ละบ่อ มาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโดยเขี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการ Streak เชื้อจนกว่าจะได้เชื้อที่มีความบริสุทธิ์ (Figure 1)

3.2.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแกรม ถ่ายรูปแบคทีเรียแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาส์ว

3.2.4 นำเชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์มาทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งหรือฆ่าสาหร่าย ตามวิธีการของ Keawtawee และคณะ (2012) โดยการ ใช้ปิเปตดูดเชื้อแบคที่เรีย 0.5 ml ใส่ลงใน 16 - wells microplate ที่มีสาหร่าย 0.5 ml ส่วน control ใส่อาหารเหลวที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย 0.5 ml

3.2.5 นำเข้าตู้เลี้ยงแพลงก์ตอน โดยกำหนดอุณหภูมิที่ 28 ± 1 องศาเซลเซียส และให้แสงที่ความเข้มข้น 2000 ลักษ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน

3.2.6 นับเซลล์ของสาหร่ายที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ด้วยเครื่องนับจำนวน (Counter) และทำการวัดขนาดเซลล์ พร้อมถ่ายรูปลักษณะของเซลล์สาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2.7 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือฆ่าสาหร่ายได้ภายใน 48 ชั่วโมง ไปศึกษาคุณสมบัติและกิจกรรมการยับยั้งสาหร่ายต่อไป

3.3 **การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียชนิดที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่าย**

3.3.1 นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2 ทดสอบผลของแบคทีเรียต่อการยับยั้งแพลงก์ตอนพืชอื่น 3 ชนิด คือ *Chlorella* sp. *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. โดยใช้เชื้อแบคทีเรียปริมาตร 0.2 ml ต่อแพลงก์ตอนแต่ละชนิด 2 ml ใส่ใน 16 – well นับจำนวนเซลล์ที่เวลา 0, 24, และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ชุดควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NB ทดสอบกับสาหร่าย

3.3.3 สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของเซลล์สาหร่ายเมื่อใส่เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เวลา 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

3.3.4 ถ้าปริมาณสาหร่ายลดลงเหลือน้อยกว่า 50% แสดงว่าเซลล์แบคทีเรียหรือมีสารบางชนิดที่แบคทีเรียปล่อยออกมาสามารถยับยั้งหรือฆ่าสาหร่ายได้

3.4 **การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล**

3.4.1 นำแบคทีเรียที่ได้มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ ยุทธพงษ์, 2558

3.4.2 เพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA ด้วยเครื่อง Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.4.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย Gel Electrophoresis

3.4.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Ltd.โดยใช้ primer 27F ในการวิเคราะห์

3.4.5 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำข้อมูลนี้ไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ใน GenBank/EMBL/DDGB ด้วยโปรแกรม Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.4.6 สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)โดยนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่แยกได้ และเชื้ออื่นที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกันมาศึกษาลำดับวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA6 (Tamura *et. al*, 2013)

3.5 **การทดสอบผลของแบคทีเรียต่อการตายของลูกกุ้งขาวแวนนาไม**

3.5.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการทดลองข้างต้น ไปทดสอบกับลูกกุ้งขาวแวนนาไม ขนาด 3.0-3.5 กรัม โดยวิธีการแช่ลูกกุ้งในเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นแบคทีเรียเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 10^4 - 10^5 CFU/mL จำนวน 10 ตัวต่อตู้ ในน้ำทะเลฆ่าเชื้อความเค็ม 25 ppt แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

3.5.2 ให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลาและควบคุมค่าออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในช่วง 5.5-6.0 mg/L โดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ และไม่ให้อาหารตลอดการทดลอง เป็นระยะเวลา 7 วัน

3.5.3 สังเกตลักษณะของลูกกุ้ง โดยนับจำนวนลูกกุ้งที่ตายทุกวัน ถ้าเจอลูกกุ้งตายนำกุ้งที่ตายออกจากตู้ทดลองทันที

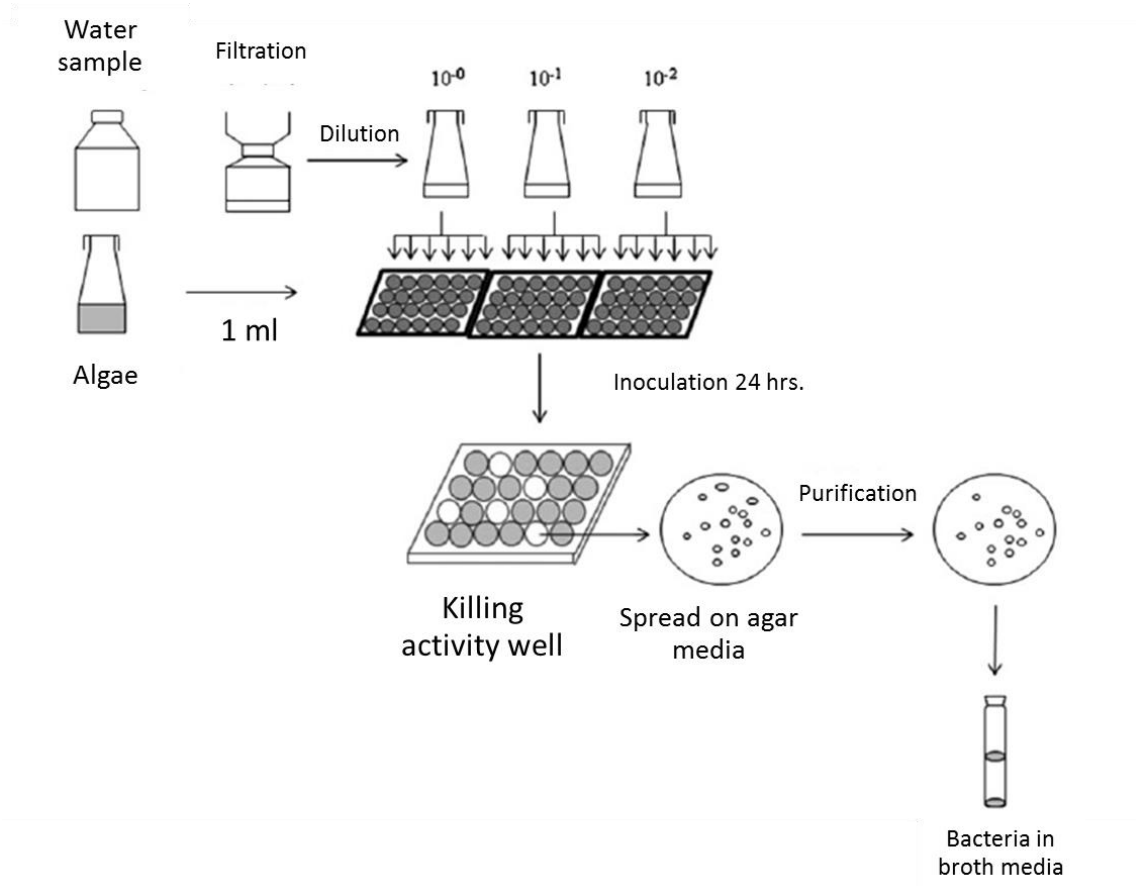


Figure 1 Procedure for bacterial screening and isolation for algal - killing activity using tissue culture microplates. White color of wells showed 100% of algal cells killed or lysed (Modified from Keawtawee *et.al*, 2011).

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

4.1 การคัดแยกและเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากน้ำเลี้ยงกุ้งทะเล

4.1.1 คุณภาพน้ำทั่วไปของบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างคุณภาพน้ำทั่วไปในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล จำนวน 2 บ่อ คือ บ่อเลี้ยง 1 (pond 1) และบ่อเลี้ยง 2 (pond 2) ที่มีวิธีการจัดการเลี้ยงทั่วไปเหมือนกัน สัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน เป็นเวลา 7 สัปดาห์ ในระหว่างวันที่ 18 มิถุนายน ถึง 30 กรกฎาคม 2558 พบว่า ความลึกเฉลี่ยของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งทะเล เท่ากับ 0.15 เมตร อุณหภูมิน้ำ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO) พีเอช (pH) ความเค็ม (Salinity) ความโปร่งแสงของน้ำ (Transparency) ค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) และปริมาณของแข็งละลายลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolved Solid) มีค่าอยู่ระหว่าง 27.63 - 30.53 ˚C 5.01 - 8.85 mg/L 8.03 - 10.24 2.60 - 31.57 ppt. 30 - 90 cm. 31.57 - 48.50 ms/cm และ 21.87 – 29.50 g/L ตามลำดับ (Table 1) จะเห็นได้ว่า คุณภาพน้ำทั่วไปของการเลี้ยงกุ้งทะเลทั้งสองบ่อมีค่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

4.1.2 การเปลี่ยนแปลงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล

ผลการศึกษาปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล จำนวน 2 บ่อ คือ บ่อเลี้ยง 1 (pond 1) และบ่อเลี้ยง 2 (pond 2) ที่มีวิธีการจัดการเลี้ยงทั่วไปเหมือนกัน สัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน เป็นเวลา 7 สัปดาห์ โดยนับปริมาณเส้นสายของสาหร่าย พบว่า ปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ในบ่อเลี้ยง 1 มีปริมาณต่ำสุดในสัปดาห์ที่ 5 เท่ากับ 61.728 ± 7.54 x 10^3 filaments/L และมีปริมาณสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 1507.79 ± 210.20 x 10^3 filaments/L ส่วนบ่อเลี้ยง 2 มีปริมาณต่ำสุดในสัปดาห์ที่ 1 เท่ากับ 9.68 ± 1.95 x 10^3 filamentous/L และสุงสุดในสัปดาห์ที่ 4 เช่นเดียวกันโดยมีปริมาณเท่ากับ 571.60 ± 40.66 x 10^3 filaments/L (Table 2, Figure 2) อย่างไรก็ตามปริมาณของ Osci-TK01 ในบ่อเลี้ยง 2 มีปริมาณน้อยกว่าบ่อเลี้ยง 1 ในทุกสัปดาห์ของการเก็บตัวอย่างจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยเฉพาะในสัปดาห์ที่ 4 ของการเก็บตัวอย่าง พบว่า ปริมาณ Osci-TK01 ในบ่อเลี้ยง 1 มีค่าสูงกว่าบ่อเลี้ยง 2 ถึงประมาณ 2.5 เท่า

Table 1 General water quality parameters in shrimp culture pond 1(pond 1) and pond 2 (pond 2) which were collected from June 18 to July 30, 2014.

General parameters	Average value ± SD	
	pond 1	pond 2
Depth (m)	0.15 ± 0.00	0.15 ± 0.00
Water temperature (C°)	28.04 ± 0.58	29.17 ± 0.59
DO (mg/L)	7.65 ± 1.09	7.27 ± 1.36
pH	8.65 ± 0.57	9.34 ± 0.50
Salinity (ppt)	29.11 ± 2.70	30.10 ± 2.41
Transparency (cm)	43.57 ± 6.93	56.43 ± 18.65
Conductivity (ms/cm)	45.15 ± 3.85	45.49 ± 5.70
Total Dissolved Solid (g/L)	27.61 ± 2.37	28.38 ± 2.09

Table 2 Density of cyanobacteria strain Osci-TK01 in shrimp culture pond 1 (pond 1) and pond 2 (pond 2) which were collected from June 18 to July 30, 2014.

Weekly sampling	*Oscillatoria* density (x 1000 filaments/L)	
	pond 1	pond 2
Wk1	980.80 ± 24.16	9.68 ± 1.95
Wk2	186.06 ± 29.58	22.77 ± 5.09
Wk3	324.368 ± 44.40	104.99 ± 8.17
Wk4	1507.79 ± 210.20	571.60 ± 40.66
Wk5	61.728 ± 7.54	107.29 ± 3.46
Wk6	247.48 ± 71.92	47.82 ± 5.65
Wk7	318.67 ± 137.12	31.29 ± 1.43

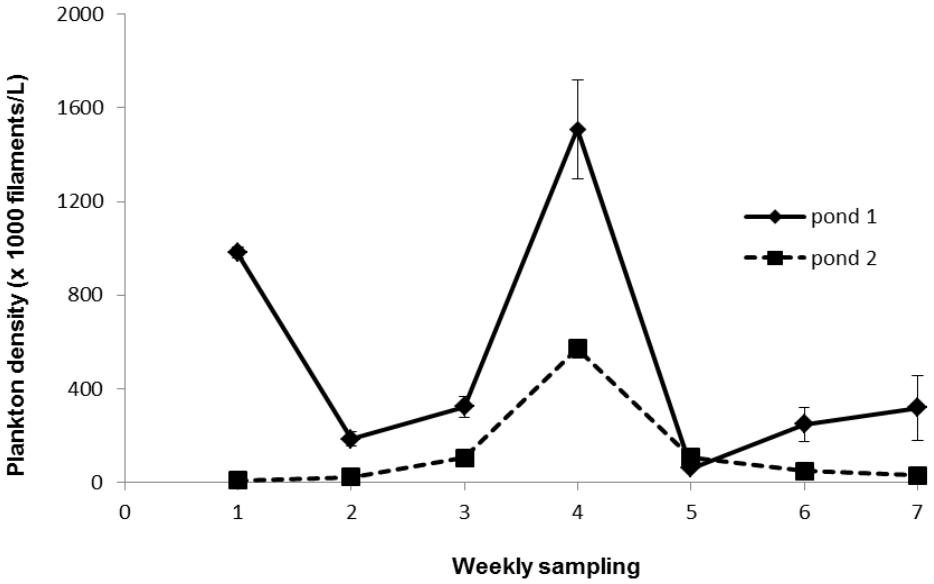


Figure 2 Fluctuation of cyanobacteria strain Osci-TK01 in shrimp culture pond 1 (pond 1) and pond 2 (pond 2) which were collected from June 18 to July 30, 2014.

4.1.3 การจำแนกชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01

ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 จากบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลในระหว่างที่เกิดการบลูมของสาหร่าย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Compound รุ่น LEICA DM750 พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 มีลักษณะเป็นเส้นสายเดี่ยวๆ ทรัยโคมตรงประกอบด้วยเซลล์เรียงต่อกันเป็นสาย แต่ละสายมีความยาวไม่เท่ากัน โดยมีความกว้างของเซลล์สม่ำเสมอตลอดสาย เซลล์ปลายสุดกลมมน เซลล์มีขนาดความกว้างประมาณ 1.8-2.1 µm ความยาวประมาณ 4.2-5.0 µm (Fig.3: a-b) และเมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Confocal laser scaning microscope (LMS800) zeiss แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ไม่มีชีทหุ้มเซลล์ ความกว้างของเซลล์น้อยความความยาวอย่างชัดเจน (Fig.3: c-d) ซึ่งแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล Oscillatoria ที่ความกว้างของเซลล์มากกว่าความยาว (ลัดดา, 2544) ผลการจำแนกชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ด้วยวิธีทางโมเลกุลาร์ โดยพัฒนา primers set สำหรับ PCR and DNA sequencing ทั้งหมด 8 primers (Table 3) เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank/EMBL/DDBJ โดยวิธีการ Blast ของ Tamura et al. (2013) พบว่า Osci-TK01 มีความคล้ายคลึงกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Limnothrix* sp. Osci-BM-01 ถึง 99%

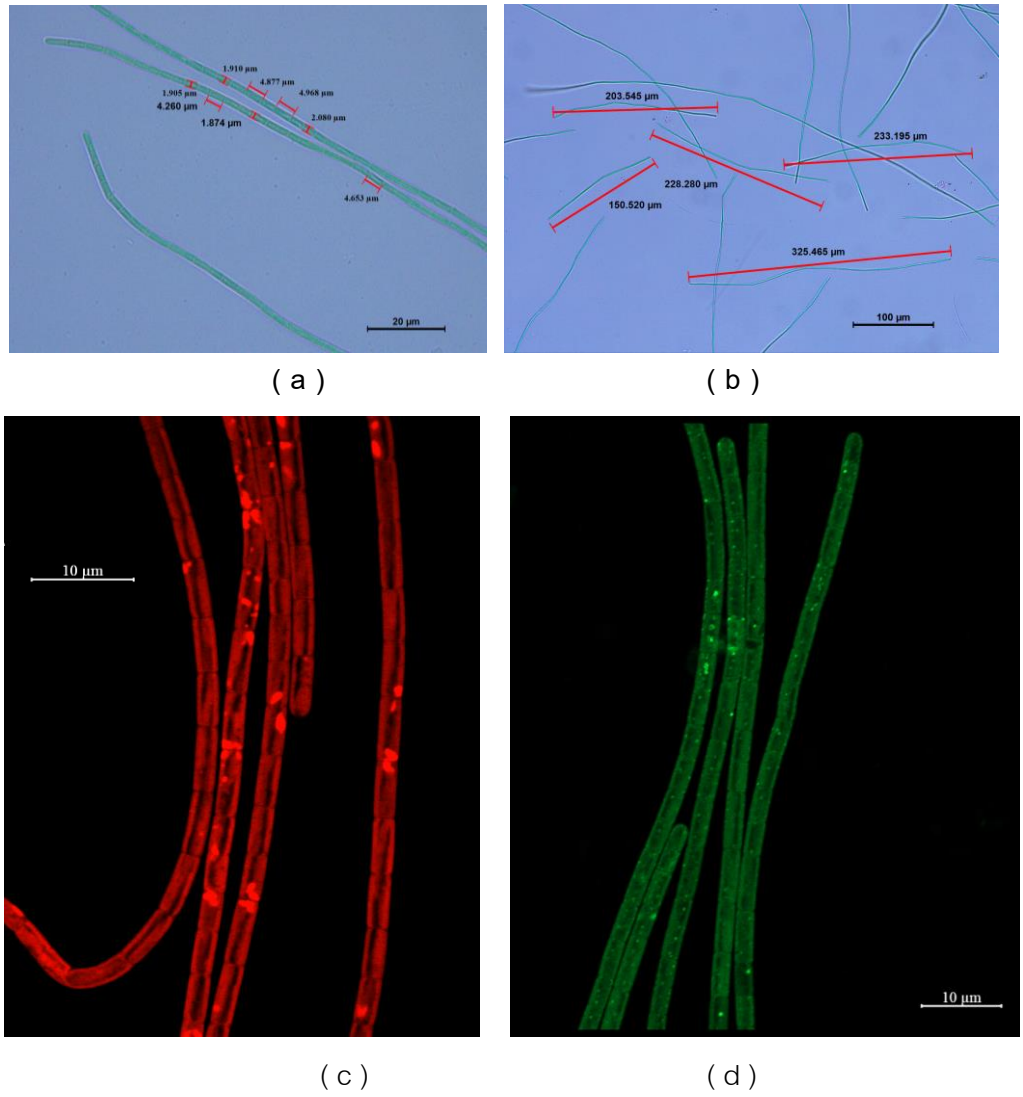


Figure 3 Morphological studies of Cyanobacteria strain Osci-TK01 under Compound microscope model LEICA DM750 (a-b) and Confocal laser scaning microscope (LMS800) zeiss (c-d).

Table 3 Universal primers for PCR and DNA sequencing of cyanobacteria developed in this study.

Primer name	Synthesis direction	Sequence (5'–3')	Anneals to[a]	Tm (°C)[b]	Amplification[c]
cyano11F	Forward	GTTTGATCCTGGCTCAGGAT	11-30	57.3	PCR/Seq.
cyano354F		GCAGTGGGGAATTTTCCG	354-371	56.0	PCR/Seq.
cyano674F		GAATTCCYRGTGTAGCG	674-690	52.8	Seq.
cyano906F		GAAACTCAAAGGAATTGACGG	906-926	55.9	Seq.
cyano369R	Reverse	AGGCTTTCGCCCATTGCGG	369-387	61.0	Seq.
cyano949R		GTTGCATCGAATTAAACCACAT	949-970	54.7	Seq.
cyano1051R		CTGACGACAGCCATGCAC	1051-1068	58.2	PCR/Seq.
cyano1490R		GGCTACCTTGTTACGACTTCA	1490-1510	57.9	PCR/Seq.

[a] Annealing site in the 16S rDNA sequence of *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655.

[b] Theoretical temperature for primer-template dissociation.

[b] PCR, DNA amplification primer; Seq., DNA sequencing primer.

4.1.4 ผลของสูตรอาหาร พี เอช (pH) ความเค็ม (NaCl) และปริมาณโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01

ผลจากการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01 ในอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอน 2 ชนิด คือ BG11 medium และ Zarrouk medium เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28.5-29.5 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ และให้แสงติดต่อกันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในอาหาร BG11 medium และ Zarrouk medium

ผลของ pH ต่อ การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01 ในอาหารสูตร BG11 ที่ระดับ pH ต่างกัน 6 ระดับ คือ 6.5, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 10.5 โดยวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีการวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 560 nm พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ที่ระดับ pH 9.0 และ 10.0 มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน โดยมีค่า O.D สูงสุดในวันที่ 10 ของการเลี้ยง มีค่าเท่ากับ 0.97 และ 0.99 ตามลำดับ และเริ่มเพิ่มจำนวนขึ้นเข้าสู่ระยะ log phase ตั้งแต่วันที่ 2 ของการเลี้ยง ระยะนี้ใช้เวลา 6 วัน จึงเข้าสู่ระยะคงที่ ไม่มีการเพิ่มหรือลดจำนวนของเซลล์ Stationary phase และเข้าสู่ระยะการตายของเซลล์ Dead phase ในวันที่ 14 ของการเลี้ยง

ส่วนการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ที่ระดับ pH อื่นๆ จะอยู่ในระดับต่ำกว่าที่ระดับ pH 9 และ pH 10 (Table 4, Figure 4) นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า pH ในทุกชุดการทดลองระหว่างเลี้ยงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง จะมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อปรับให้ค่า pH อยู่ระหว่าง 8.20 – 9.63 แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายสายพันธุ์ Osci-TK01 สามารถปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดในระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตซึ่งอยู่ช่วง 7.60 – 9.09 (นุชนรี, 2543)

ผลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01 ในอาหารสูตร BG11 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่างกัน 7 ระดับ คือ 0 ppt, 5 ppt, 10 ppt, 15 ppt, 20 ppt, 25 ppt, 30 ppt ตามลำดับ พบว่าการเจริญเติบโตของสาหร่าย ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ทั้ง 7 ระดับ ค่อยๆ เพิ่มปริมาณขึ้นจนมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 10 ของการเลี้ยง ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้น 0 ppt และ 25 ppt มีปริมาณสูงสุดในวันที่ 14 ของการเลี้ยง มีค่าเท่ากับ 1.02 และ 0.88 ตามลำดับ โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ คือ ที่ระดับความเข้มข้น 0ppt มีความหนาแน่นของสาหร่ายเฉลี่ย (ค่า O.D560) เท่ากับ 1.02 ± 0.15 ในวันที่ 14 ของการเลี้ยง (Table 5, Figure 5) แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01 เติบโตได้ดีที่สุดในอาหารที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ รุ่งรวี (2541) ที่พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria pseudogeminata* var. unigranulata Biswa เจริญเติบดีที่สุดในอาหารเลี้ยงสูตร BG11 ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ที่ระยะเวลาเลี้ยง 10 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ในที่ระดับความเค็มสูง สาหร่ายจะมีกระบวนการปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลออสโมซิส ภายในเซลล์และในสารละลาย การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน ในอาหารสูตร BG11 โดยกำหนดให้ pH เริ่มต้นของน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนเท่ากับ 10.00 พบว่าในระหว่างเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01 ค่า pH มีค่าอยู่ระหว่าง 8.46-10.00 เนื่องจากในระหว่างการสังเคราะห์แสง เพื่อการเติบโต สาหร่ายจะใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในน้ำและปล่อยก๊าซออกซิเจนออกมารวมตัวกับไฮโดรเจนอิออน เกิดเป็นไฮดรอกซีอิออน จึงทำให้มีค่า pH สูงขึ้น (Richmond, 1986)

ผลการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01 ในอาหารสูตร BG11 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 g/L แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 0.5 g/L อย่างไรก็ตาม ความหนาแน่นของเซลล์ในทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกัน (Table 6, Figure 6) ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ อุษณีย์ (2542) พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria pseudogeminata* var. unigranulata Biswa ในอาหารสูตร BG11 จะเจริญเติบโตดีที่สุดในอาหารที่ไม่เติมโซเดียมไนเตรท รองลงมาที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท 0.5, 1.5 และ 1.0

กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ (Watanabe, 1975 อ้างโดย เสนาะ, 2535) โดย *Oscillatoria sp.* สามารถตรึงไนโตรเจนแล้วเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ (Fogg, *et al*., 1973) ส่วนสกุล *Spirulina* ไม่สามารถใช้ไนโตรเจนจากอากาศ แต่ใช้โซเดียมไนเตรทจากอาหารเป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณของโซเดียมไนเตรทที่เพิ่มขึ้นจึงมีผลต่อการเติบโตของ *Spirulina* ดังนั้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01 ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร BG11 ที่เติมโซเดียมไนเตรทและไม่เติมโซเดียมไนเตรท สาหร่ายสามารถเติบโตได้ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า pH ในน้ำเลี้ยงแพลงก์ตอนทุกชุดการทดลองจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น 7.5 จนมีค่า pH สูงกว่า 9.0 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เพื่อปรับตัวให้สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วง pH ที่เหมาะสม

Table 4 Density of blue green algae strain Osci-TK01 at 560 nm by different pH.

Incubation (days)	Plankton density at 560 nm by different pH					
	6.5	7	8	9	10	10.5
0	0.12 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.04	0.16 ± 0.01
2	0.09 ± 0.04	0.09 ± 0.01	0.14 ± 0.06	0.14 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.17 ± 0.01
4	0.24 ± 0.00	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.20 ± 0.01
6	0.34 ± 0.12	0.38 ± 0.13	0.29 ± 0.05	0.48 ± 0.07	0.39 ± 0.12	0.24 ± 0.04
8	0.42 ± 0.06	0.53 ± 0.11	0.28 ± 0.10	0.91 ± 0.05	0.94 ± 0.12	0.35 ± 0.05
10	0.53 ± 0.14	0.89 ± 0.09	0.42 ± 0.08	0.97 ± 0.09	0.99 ± 0.09	0.40 ± 0.08
12	0.48 ± 0.01	0.79 ± 0.13	0.49 ± 0.09	0.92 ± 0.11	0.99 ± 0.17	0.45 ± 0.09
14	0.48 ± 0.08	0.48 ± 0.07	0.51 ± 0.11	0.87 ± 0.08	0.80 ± 0.04	0.52 ± 0.07

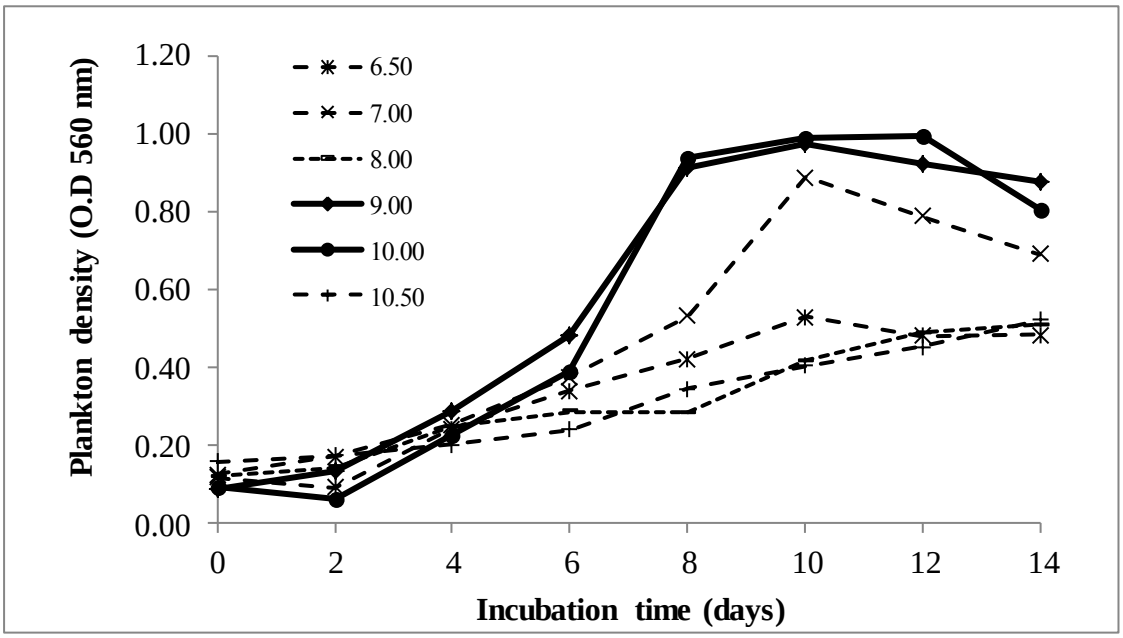


Figure 4 Blue green algae Osci-TK01 cell density at 560 nm by different pH.

Table 5 Blue green algae Osci-TK01 density at 560 nm by different concentration of NaCl.

Incubation	Plankton density at 560 nm with different NaCl						
(days)	0 ppt	5 ppt	10 ppt	15 ppt	20 ppt	25 ppt	30 ppt
0	0.11 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.02
2	0.12 ± 0.04	0.11 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.00	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.01
4	0.22 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.15 ± 0.02
6	0.39 ± 0.08	0.30 ± 0.08	0.23 ± 0.05	0.22 ± 0.04	0.34 ± 0.11	0.25 ± 0.07	0.19 ± 0.04
8	0.71 ± 0.14	0.26 ± 0.14	0.33 ± 0.05	0.29 ± 0.06	0.48 ± 0.01	0.55 ± 0.22	0.33 ± 0.14
10	0.91 ± 0.13	0.74 ± 0.12	0.58 ± 0.07	0.52 ± 0.12	0.68 ± 0.07	0.67 ± 0.17	0.43 ± 0.12
12	0.93 ± 0.18	0.73 ± 0.16	0.64 ± 0.07	0.53 ± 0.12	0.69 ± 0.03	0.67 ± 0.10	0.39 ± 0.16
14	1.02 ± 0.18	0.73 ± 0.16	0.72 ± 0.12	0.60 ± 0.13	0.63 ± 0.17	0.88 ± 0.13	0.51 ± 0.14

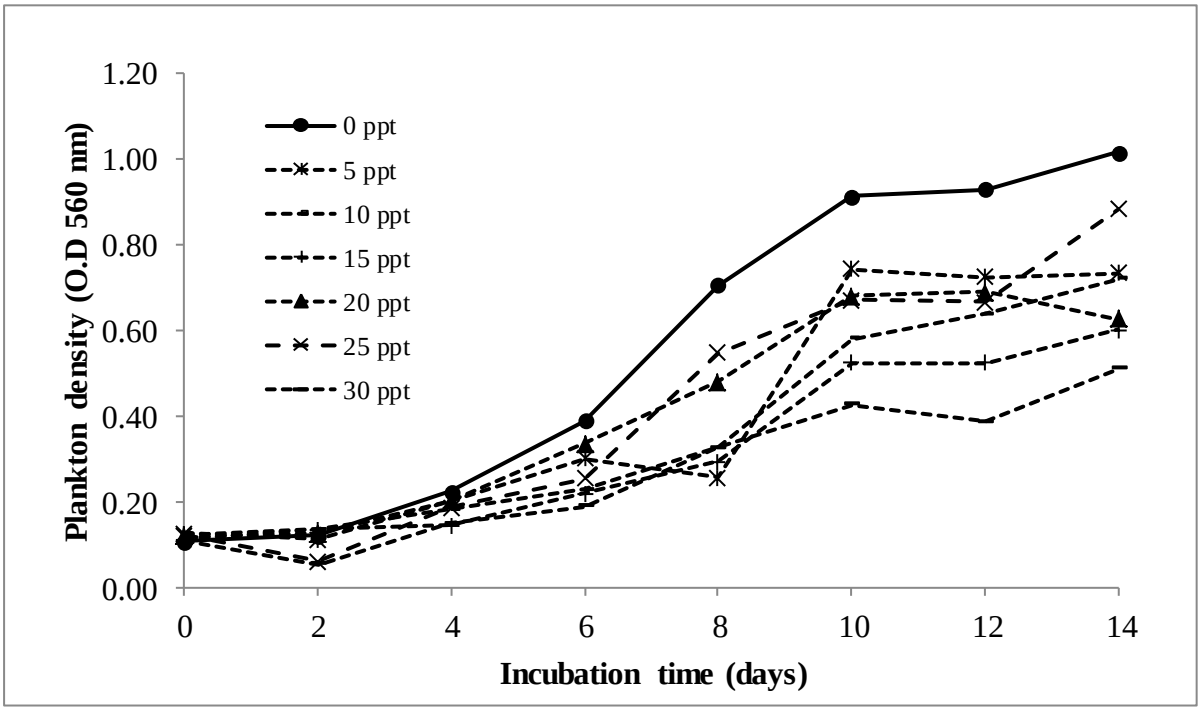


Figure 5 Blue green algae Osci-TK01 cell density at 560 nm by different concentration of NaCl.

Table 6 Blue green algae strain Osci-TK01 density at 560 nm by different concentration of $NaNO_3$.

Incubation	Plankton density at 560 nm by different NaNO3			
(days)	0.0 g/L	0.5 g/L	1.0 g/L	1.5 g/L
0	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.01
2	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
4	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.06	0.30 ± 0.02
6	0.25 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.26 ± 0.01
8	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.04	0.25 ± 0.01
10	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.02
12	0.33 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.34 ± 0.01
14	0.46 ± 0.04	0.51 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.48 ± 0.02

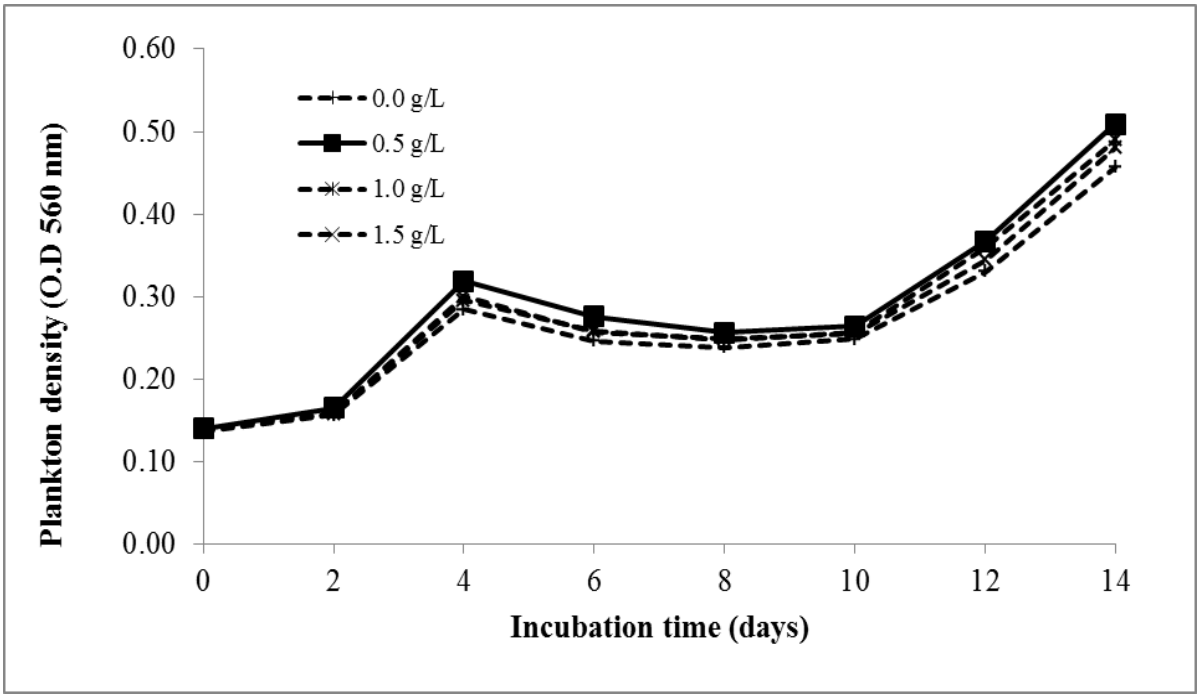


Figure 6 Blue green algae strain Osci-TK01 cell density at 560 nm by different concentration of $NaNO_3$.

4.2 การคัดแยกและสกรีนแบคทีเรียชนิดที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

4.2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งต่อปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01 ในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งต่อปริมาณสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล โดยนำน้ำเลี้ยงกุ้งทะเลที่มีแบคทีเรียรวมจำนวน 4 บ่อ คือ P1, P2, P3 และ P4 มาทดลองเลี้ยงกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ใน microplate โดยใส่ Osci-TK01 หลุมละ 0.5 mL ร่วมกับน้ำเลี้ยงกุ้งที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.8 µm ปริมาณ 0.5 mL นับจำนวนเซลล์ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ที่นำมาเลี้ยงด้วยน้ำเลี้ยงกุ้งทะเลในบ่อ P1 จำนวนเซลล์ลดลงจาก 6850.00 ± 852.94 filaments/mL เป็น 4887.50 ± 603.51 filaments/mL ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองส่วนบ่อ P2 P3 และ P4 มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 10425.00 ± 2543.13 filaments/mL, 12154.17 ± 338.75 filaments/mL และ 11912.50 ± 933.83 filaments/mL ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมในทุกชุดการทดลอง (Table 7 , Figure 7) แสดงให้เห็นว่า มีแบคทีเรียบางชนิดในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งทะเล มีคุณสมบัติทั้งในรูปแบบของการยับยั้งและการกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ที่เป็นเช่นนี้เพราะแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมมีคุณสมบัติบางประการในการยับยั้งและกระตุ้นการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชได้ (Fukami *et al.,* Kodama et al., 2006, Keawtawee *et al*., 2011)

Table 7 Effect of total bacteria in the water of shrimp culture pond on blue green algae Osci-TK01 growth at 0, 24 and 48 hours of incubation time.

Date		Density of Osci-TK01 ($\bar{x}$±S.D.) (filaments/ml)		
		T0	T24	T48
P1	Cont.	6850.00 ± 852.94	4733.00 ± 765.00	6066.67 ± 707.00
P2	Cont.	6616.67 ± 361.71	3900.00 ± 391.00	6133.00 ± 390.00
P3	Cont.	5966.67 ± 907.38	3533.00 ± 115.00	8133.00 ± 1193.00
P4	Cont.	4300.00 ± 589.49	3867.00 ± 321.00	10333.33 ± 782.00
P1	Treat.	6850.00 ± 852.94	4866.67 ± 127.68	4887.50 ± 603.51
P2	Treat.	6616.67 ± 361.71	4533.33 ± 688.45	10425.00 ± 543.13
P3	Treat.	5966.67 ± 907.38	4691.67 ± 574.50	12154.17 ± 1338.75
P4	Treat.	4300.00 ± 589.49	6104.17 ± 647.21	11912.50 ± 933.83

* Pond 1: P1; Pond 2: P2, Pond 3: P3 and Pond 4: P4

** Cont. : Control, Treat. : Treatment

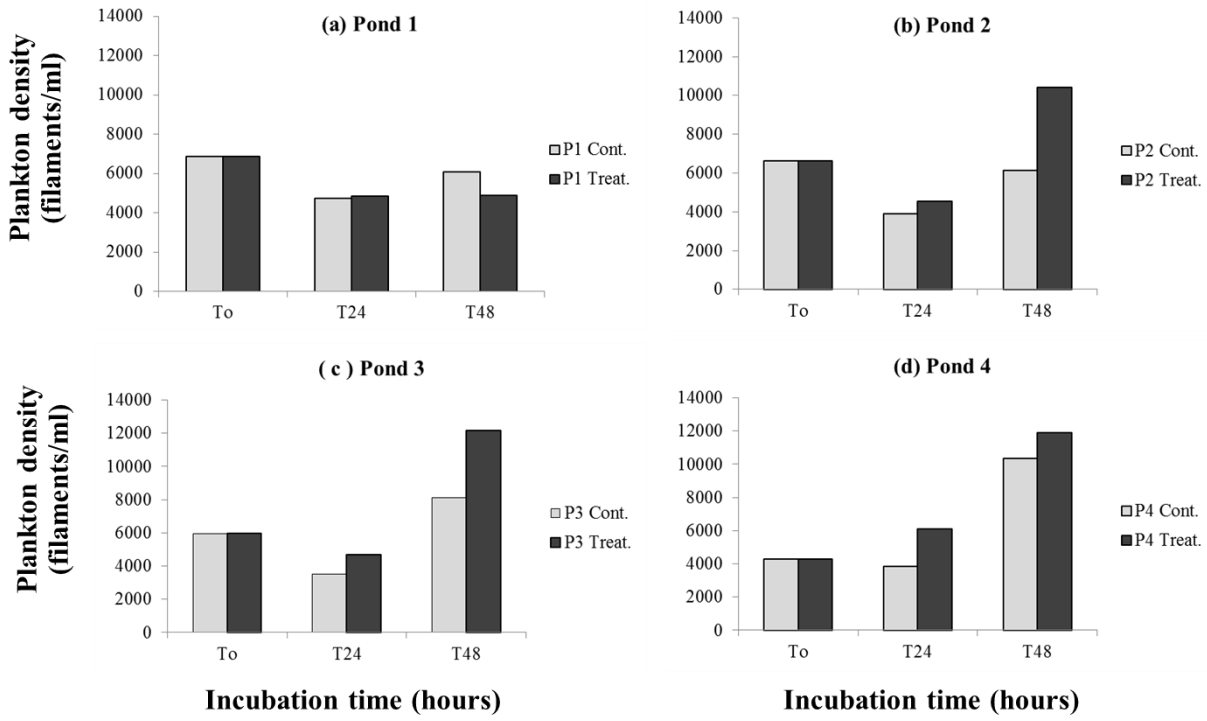


Figure 7 Effect of total bacteria in the water of shrimp culture pond on blue green algae Osci-TK01 growth at 0, 24 and 48 hours of incubation time.

4.2.2 การคัดแยกและสกรีนหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01

จากผลการศึกษา พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำเลี้ยงกุ้งทะเลได้ทั้งหมด 85 สายพันธุ์ มีแบคทีเรีย 17 สายพันธุ์ที่แสดงคุณสมบัติในการลดหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Osci-TK01 และได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ที่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ได้ภายใน 48 ชั่วโมง โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นทั้งแบคทีเรียแกรมลบ รูปกลม ย้อมติดสีแดง, แบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง ย้อมติดสีม่วง และแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ย้อมติดสีม่วง (Table 8) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถทำลายเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 โดยการทำให้สายของสาหร่ายขาดเป็นเส้นสั้นๆ ภายในเวลา 24 และแตกสลายไปในที่สุดภายในเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (Figure 8) ซึ่งคุณสมบัติอย่างหนึ่งของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม คือ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเซลล์ของแพลงก์ตอนพืชได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยแบคทีเรียบางชนิดมีการผลิตสารเคมีแล้วปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งสารเคมีเหล่านี้สามารถทำลายเซลล์ของแพลงก์ตอนพืชได้ (Doucett *et al*., 1998, Imai, 2006, Keawtawee *et al*., 2011)

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้กับแพลงก์ตอนชนิดอื่น

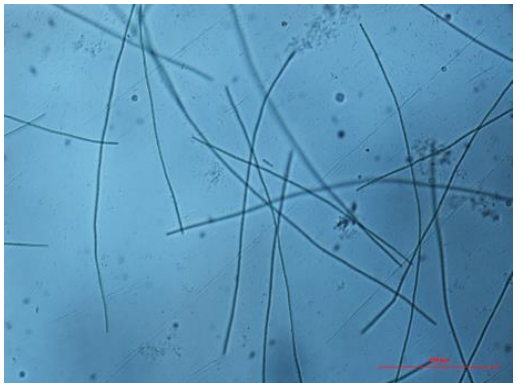
จากผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกมาทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ H5, HW6, P2, T7, และ T12 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปปรับความเข้มข้นและนำมาทดสอบกับแพลงก์ตอนพืช 3 ชนิด คือ *Chlorella* sp. *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. โดยใช้เชื้อแบคทีเรียปริมาตร 0.2 mL ต่อ แพลงก์ตอน 2 mL ใส่ใน 16 – well นับจำนวนเซลล์เริ่มต้นและ 48 ชั่วโมง (T48) หลังจากใส่เชื้อ ผลการศึกษาพบว่า จำนวนเซลล์ของสาหร่ายแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ลดลงในทุกชุดการทดลองที่ทดสอบกับแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด โดยแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ H5, HW6, P2 และ T12 ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของ *Tetraselmis* sp. *Chlorella* sp. และ *Chaetoceros* sp. เนื่องจากปริมาณของแพลงก์ตอนพืชทั้ง 3 ชนิดเพิ่มมากขึ้นหลังจากใส่เชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ T7 มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Chlorella* sp. โดยทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดตายของ *Chlorella* sp. ลดลงต่ำกว่า 50% หลังจากใส่เชื้อ 48 ชั่วโมง (Table 9)

4.4 ผลของแบคทีเรียยับยั้งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 (Osci-TK01 killing bactria) ต่อลูกกุ้งขาวแวนนาไมด์

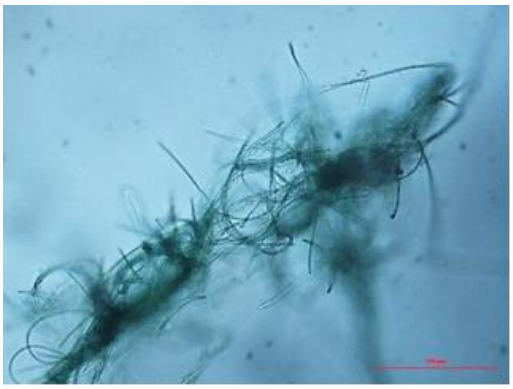
ผลของแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ต่อการตายของลูกกุ้งขาวแวนนาไมหลังทำการแช่เชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่า แบคทีเรีย ไม่พบอัตราการตายของลูกกุ้งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม Control 1 (น้ำทะเล) และ Control 2 (อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ) ยกเว้น แบคทีเรียสายพันธุ์ T7 ที่พบอัตราการตายของลูกกุ้ง 100 % หลังการแช่เชื้อ 3 วัน (Table 10) สอดคล้องกับการศึกษาของ Keawtawee *et al.,* (2012) ที่ใช้ แบคทีเรียสายพันธุ์ *Marinobacter salsuginis* strain BS2 ที่มีคุณสมบัติในการฆ่า *Noctiluca scintillans* และลดอัตราการตายของกุ้ง โดยพบว่า กุ้งมีอัตราการรอดในวันที่ 7 ปรับตัวดีขึ้น 23-87 % ทั้งในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดแยกสามารถยับยั้งแพลงก์ตอนพืชที่เป็นพิษต่อกุ้งได้โดยไม่มีผลทำให้กุ้งตาย

4.5 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มาศึกษายีน 16S rRNA และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank/EMBL/DDBJ โดยวิธีการ Blast ของ Tamura et al. (2013) พบว่าเชื้อ H5 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii* ถึง 99% ส่วน HW6 มีความคล้ายคลึงกับ *Pseudomonas oleovorans* ส่วน P2 T7 และ T12 มีความคล้ายคลึงกับ *Enterobacter cancerogenus* *Vibrio alginolyticus* และ *Vibrio shilonii* ตามลำดับ (Table 11, Fig. 9)

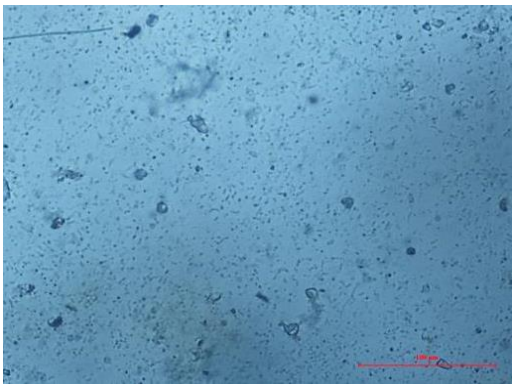


(a: 0h)

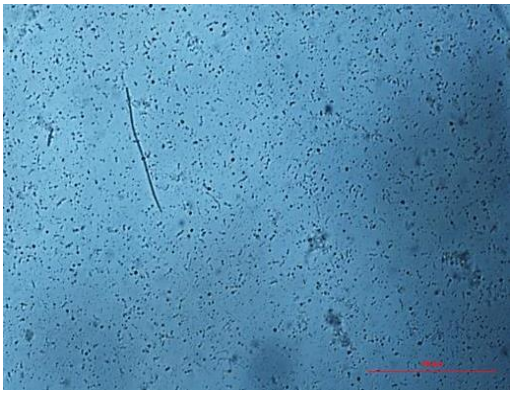


(b: 24h)

(c: 24h)



(d: 48h)



(e: 48h)

Figure 8 Osci-TK01 were killed after inoculation with isolated bacteria (Osci-Killer) at 0 (a), 24 (b-c) and 48 hours (d-e).

Table 8 Characteristics of isolated bacteria strains from shrimp water culture on blue green algae Osci-TK01 growth.

Sample	Pecentage of Osci-TK01 (%)				
	T0	T24	T48	Gram staining	Shape
Control	100 ± 0.00	147.77 ± 20.26	180.08 ± 17.03	-	-
H5	100 ± 0.00	85.95 ± 7.61	45.11 ± 1.62	Negative	Coccus
HW6	100 ± 0.00	16.50 ± 5.92	23.93 ± 8.34	Negative	Bacillus
P2	100 ± 0.00	26.23 ± 14.73	27.79 ± 11.66	Negative	Rod coccus
T7	100 ± 0.00	25.81 ± 11.94	27.20 ± 10.22	Negative	Rod coccus
T12	100 ± 0.00	49.38 ± 12.44	40.64 ± 9.27	Negative	Rod coccus

Table 9 Percentage (%) of phytoplankton after incubation with 5 isolated bacteria.

Bacterial strain	Percentage (%) of phytoplankton at 48 hours			
	Osci-TK01	*Tetraselmis*	*Chlorella*	*Chaetoceros*
Control	133.96 ± 16.28	101.27 ± 10.12	101.45 ± 9.06	109.54 ± 12.56
HW6	7.36 ± 1.06	144.30 ± 11.67	109.57 ± 10.34	115.13 ± 12.16
P2	6.91 ± 1.28	116.46 ± 9.06	116.91 ± 12.13	111.84 ± 10.96
H5	11.13 ± 1.57	110.13 ± 5.92	100.97± 10.04	92.11 ± 10.07
T7	5.55 ± 0.67	116.96 ± 11.28	43.48 ± 12.61	81.58 ± 8.65
T12	10.75 ± 2.62	115.82 ± 17.18	99.03 ± 16.11	98.03 ± 12.03

Table 10 Percentage of shrimp Litopenaeus vannamei mortality after incubation with Osci-TK01 killing bacteria for 7 days.

Incubation (Day)	% Shrimp Mortality						
	Con 1	Con 2	HW6	P2	H5	T7	T12
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	100	0
4	0	0	0	0	0	-	0
5	0	0	0	0	0	-	0
6	0	0	0	0	0	-	0
7	0	0	0	0	0	-	0

Table 11 16S rRNA of Osci-TK01 killing bacteria for 5 strains (H5, HW6, P2, T7 and T12).

No.	Strain	Related-species	% similarly	Accession
1	H5	*Acinetobacter baumannii* strain OVC6	99	(JQ660722)
2	HW6	*Pseudomonas stutzeri* strain X83	96	(HM137032)
		Pseudomonas pseudoalcaligenes strain PR51-16	96	(EU440977)
		Pseudomonas aeruginosa strain X1107	96	(HM137023)
		Pseudomonas mendocina strain 174	96	(AY870674)
		Pseudomonas oleovorans strain HNS030	96	(JN128264)
3	P2	*Enterobacter hormaechei* strain 65	96	(KJ742536)
		Enterobacter cloacae strain SP30	96	(JX317636)
		Enterobacter xiangfangensis strain CDDS 11	96	(KU170086)
		Enterobacter asburiae strain 3139O2	96	(KF598951)
		Enterobacter cancerogenus strain Nuan 11	96	(AB898033)
4	T7	*Vibrio azureus* strain CAIM 1457	99	(JN603238)
		Vibrio parahaemolyticus strain CHB-35	99	(KR347292)
		Vibrio natriegens strain CHB-36	99	(KR347293)
		Vibrio alginolyticus strain 39V7A2	100	(KT163392)
		Vibrio harveyi strain HL19	99	(JQ948038)
		Vibrio campbellii strain VSD714	99	(KC534349)
		Vibrio owensii strain F77007	99	(HQ908739)
5	T12	*Vibrio shilonii* strain VSS-012	97	(FJ485944)
		Vibrio sinaloensis strain CAIM 797	96	(NR_043858)
		Vibrio tubiashii strain T33	96	(KP329558)
		Vibrio brasiliensis strain G9C_35m_05	96	(KM041167)
		Vibrio mediterranei strain CAIM 1601	96	(HF541964)

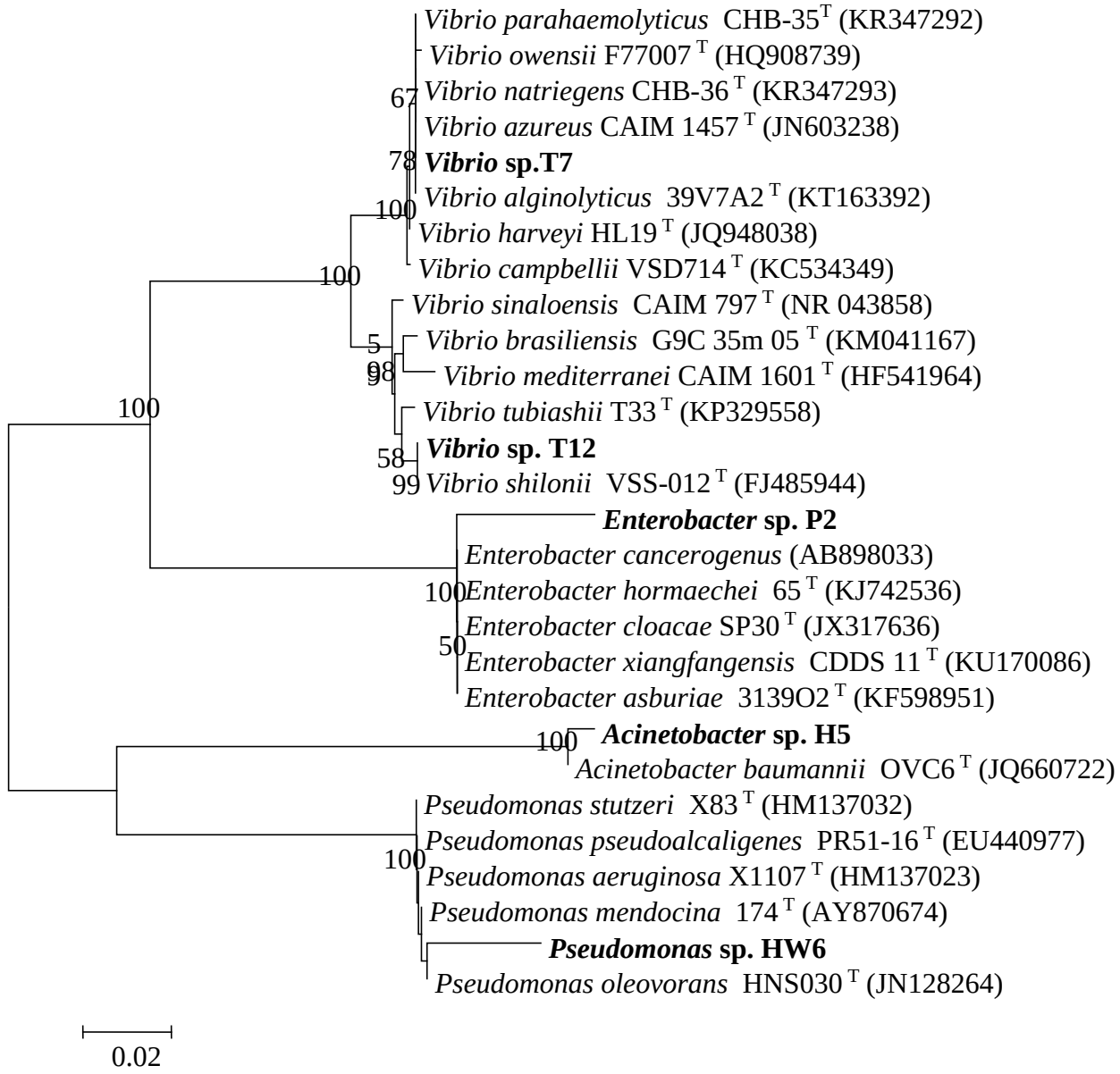


Figure 9 Phylogenetic tree of Osci-TK01 killing bacteria based on 16SrRNA gene sequences. Numbers on the branches represent percentages of 1000 bootstrap for replications.

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

จากการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 จากน้ำเลี้ยงกุ้งทะเล ที่มีลักษณะคล้ายกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Oscillatoria* หรือที่ชาวบ้านเรียกว่าสาหร่ายขนแมว พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 มีลักษณะทางกายภาพ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกลับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Limnothrix* sp. โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 มีลักษณะเป็นเส้นสายเดี่ยวๆ ทรัยโคมตรงประกอบด้วยเซลล์เรียงต่อกันเป็นสาย แต่ละสายมีความยาวไม่เท่ากัน โดยมีความกว้างของเซลล์สม่ำเสมอตลอดสาย เซลล์ปลายสุดกลมมน ไม่มีชีทหุ้มเซลล์ ความกว้างของเซลล์น้อยความความยาวอย่างชัดเจน (Fig.3: a-d) ซึ่งแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Oscillatoria* ที่ความกว้างของเซลล์มากกว่าความยาว (ลัดดา, 2554) และสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้ง 5 สายพันธุ์ ที่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ได้ภายใน 48 ชั่วโมง โดยทำให้ปริมาณของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Limnothrix* sp. Osci-TK01 ลดลงมากกว่า 50% เมื่อเทียบกับจำนวนเริ่มต้น โดยแบคทีเรีย สายพันธุ์ คือ H5, HW6, P2, T7 และ T12 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ไปทดสอบกับแพลงก์ตอนชนิดอื่น พบว่า แบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด คือ H5, HW6, P2 และ T12 ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืช 3 สกุล คือ *Tetraselmis* sp. *Chlorella* sp. และ *Chaetoceros* sp. ตามลำดับ ยกเว้นแบคทีเรียสายพันธุ์ T7 ทำให้การเจริญเติบโตของ *Chlorella* sp. ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ T7 ทำให้ลูกกุ้งตาย 100% ภายใน 3 วันหลังการแช่เชื้อ โดยแบคทีเรีย T7 มีความคล้ายคลึงกับ *Vibrio alginolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ ส่วนสายพันธุ์ P2 มีความคล้ายคลึงกับ *Enterobacter cancerogenus* อย่างไรก็ตาม แม้ว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการควบคุมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ได้ดีที่สุดโดยสามารถทำลายเซลล์ได้ภายใน 48 ชั่วโมง แต่เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด เป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ และในมนุษย์จึงไม่สามารถนำมาใช้ในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลได้ ส่วนแบคทีเรียที่คัดแยกได้อีก 3 ชนิด คือ H5, HW6 และ T12 เมื่อนำมาศึกษายีน 16S rRNA พบว่า เชื้อ H5 มีความคล้ายคลึงกับ *Acinetobacter baumannii* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์และในสัตว์เช่นเดียวกัน สำหรับ HW6 ความคล้ายคลึงกับ *Pseudomonas oleovorans* และ T12 มีความคล้ายคลึงกับ *Vibrio shilonii* ซึ่งไม่ก่อโรคในมนุษย์และในสัตว์น้ำ ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า แบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำเลี้ยงกุ้งทะเลทั้ง 5 ชนิด มีเพียง 2 ชนิด คือ HW6 และ T12 เท่านั้น ที่มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในการยับยั้งและควบคุมการเจริญเติบโของสาหร่ายสี

เขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ได้ โดยสามารถทำให้ปริมาณของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Osci-TK01 ลดการเจริญเติบโตและตายไปในที่สุด โดยไม่มีผลกระทบทำให้เกิดการตายของลูกกุ้งขาวแวนนาไมและแพลงก์ตอนพืชชนิดอื่น ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาแบคทีเรียเหล่านี้ให้มีความจำเพาะต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์อื่นที่เป็นอันตรายเมื่อเกิดการสะพรั่งในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล อีกทั้งยังเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ ทำให้ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้การเลี้ยงกุ้งทะเลประสบความสำเร็จและมีความยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

คณิต ไชยาคำ, พุทธ ส่องแสงจินดา และดุสิต ตันวิไลย. 2535. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของน้ำและแพลงก์ตอนพืชในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2535. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 46 หน้า.

จริยาวดี สุริยพันธุ์. 2557. บทบาทของธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลแบบพัฒนา. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 19: 227-236.

จุฑารัตน์ กิตติวานิช, นรินทร์ สงสีจันทร์ และทวี จินดามัยกุล. 2551. การแลกเปลี่ยนสารอาหารผ่านแนวพื้นที่รอยต่อระหว่างน้ำและตะกอนดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannmei* Boone). วารสารการประมง 61: 565-571.

เจนนุช ว่องธวัชชัย. 2547. รายงานการวิจัยเรื่อง บทวิเคราะห์และ สังเคราะห์งานวิจัยกุ้งทะเลของประเทศไทย : ผลของยาและสารเคมีต่อสุขภาพกุ้ง. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 249-275.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: บริษัทเมจิค พับบลิเคชั่น จำกัด.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

บุณฑริกา ทองดอนพุ่ม. 2547. ความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำ คุณภาพดิน ความชุกชุมของแพลงก์ตอนพืชและผลผลิตของกุ้งกุลาดำ ในระบบการเลี้ยงแบบพัฒนา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประพันธ์ศักดิ์ ศรีษะภูมิ. 2542. การศึกษาพิษเฉียบพลันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon Fabricius*) วัยอ่อนและประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* spp.). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 145 หน้า.

ปิยะวิทย์ ทิพรส. 2553. การจัดการป้องกันและลดสารให้กลิ่นโคลน Geosmin ในผลิตภัณฑ์แปรรูปสัตว์น้ำภาควิชาวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะศิลปะศาสตร์และวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์.

พัชริดา เหมมัน, สิริ ทุกข์วินาศ และรังสิไชย ทับแก้ว. 2543. การศึกษาความผันแปรของแพลงก์ตอนพืชในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon Fabricius*) ในเขตพื้นที่น้ำจืด จังหวัดราชบุรี. ในเอกสารประกอบการประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 2. ณ โรงแรมรอยัลภูเก็ตซิตี้ จังหวัดภูเก็ต.

พุทธ ส่องแสงจินดา, ลักขณา ละอองศิริวงศ์ และชัชวาล อินทรมนตรี. 2543. ฟลักซ์ของสารประกอบไนโตรเจนที่ผิวสัมผัสของน้ำ-ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2543. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล , กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 13 หน้า.

พุทธ ส่องแสงจินดา. 2537. ผลของการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำต่อประชากรแพลงก์ตอนในบ่อเลี้ยงของการจัดการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา 2 ระบบ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 9/2537. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 14 หน้า.

มนูวดี หังสพฤกษ์. 2532. สมุทรศาสตร์เคมี. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. 329 หน้า.

ยุทธพงษ์ สังข์น้อย. 2558. เอกสารประกอบการสอนวิชา 530-307 บทปฏิบัติการวิชานิเวศวิทยาจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำ. ภาควิชาวารชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. สงขลา.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 546 หน้า.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2556. สาหร่ายน้ำจืดในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาชีววิทยา: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 434 หน้า.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2544. แพลงก์ตอนพืช (พิมพ์ครั้งที่ 2). คณะประมง.สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 851 หน้า.

วีรานุช ปลื้มทรัพย์, มาโนชน์ เจริญหงษ์ทอง, จริะศักดิ์ ภู่รุ่งเจริญ และธเนศ วงศ์ยะรา. 2544. การกระจายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ จังหวัดสุพรรณบุรี Distribution of cyanobacteria in shrimp ponds, Supanburi Province. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม 5-7 กุมภาพันธ์ 2544. กรุงเทพฯ. หน้า 161- 167

ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. 2547. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรัมบวกและกรัมลบ. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมศักดิ์ แสนสุข. 2533. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน. โรงพิมพ์ชัยเจริญ. กรุงเทพมหานคร. 3 หน้า.

สราวุธ นิลเขต, จารุนันท์ เตชกุลพงศ์กร และ เสาวภา อังสุภานิช. 2542. อิทธิพลความเข้มข้นระดับต่างๆ ของสารคอปเปอร์-เอ (คอปเปอร์อัลคาโนลาไมด์คอมเพลกซ์) และสารบีเคซี-80 (เบนซอลโคเนียมคลอไรด์) ต่อคลอเรลลาและออสซิลลาโทเรีย. วารสารกรมประมง. 52: 134-141.

Alonso RR, Osuna PF. 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: 317-336.

Avnimelech Y, Rito G. 2003. Shrimp and Fish Pond Soils: Processes and Management. Aquaculture 220: 549-567.

Chen YQ, Gu XG. 1993. An ecological study of red tides in the East China Sea. In: Smayda TJ, Schimizu L (eds) Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier Amsterdam pp. 217–221.

Clinton EH, Elif D, Kathryn CJ, CARY SC, Kirchman DL, David AH. 2005. A bacterium that inhibits the growth of Pfiesteria piscicida and other dinoflagellates. Harmful Algae 4: 221-234.

Cronberg G, Annadotter H. 2006. Manual on aquatic cyanobacteria. ISSHA 110 pp.

Eppley RW. 1972. Temperature and phytoplankton growth in the sea. Fish Bull 70 : 1063–1085.

Fukami K, Nishijima T, Murata H, Doi S, Hata Y. 1991. Distribution of bacteria influential on the development and the decay of Gymnodinium nagasakiense red tide and their effect on algal growth. Nippon Suisan Gakkaishi 57: 2321-2326.

Fukami K, Yuzawa A, Nishijima T, Hata Y. 1992. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of Gymnodinium nagasakiense. Nippon Suisan Gakkaishi 58: 1073-1077.

Funge-Smith SJ, Briggs MRP. 1998. Nutrient Budgets in Intensive Shrimp Ponds:Implications for Sustainability. Aquaculture 164: 117-133.

Gallon JR, Hashem MA, Chaplin AE. 1991. Nitrogen Fixation by Oscillatoria spp.Under Autotrophic and Photoheterotrophic Conditions. Journal of General Microbiology 137: 31-39.

Hargreaves JA. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. Aquaculture 166: 181-212.

Huei MS, Chiu LI, Men CY. 1993. Mass mortality of prawn caused by Alexandrium tamarense blooming in a culture pond in southern Taiwan. In: Smayda TJ, Shimizu Y (eds) Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, New York pp. 329-333.

Imai I, Kido T, Yoshinaga I, Ohgi K, Nagai S. 2010. Isolation of Microcystis-killer bacterium Agrobacterium vitis from the biofilm on the surface of the water plant Egeria densa. Proceeding of the 14th International conference on Harmful Algae. 1-5 November 2010, Hersonissos-Crete, Greece.

Izaguirre G, Hwang CJ, Krasner SW, Micheal J. 1982. Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply system. Applied and Environmental Microbiology 43: 708-714.

Johnsen PB, Lloyd SW, Vingad BT, Dionigi PC. 1996. Effect of temperature on uptake and depuration of 2-methylisoborneol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. World Aqua Soc., 27: 15-20.

Keawtawee T, Fukami K, Songsangjinda P, Muangyao P. 2011. Isolation and characterization of Noctiluca-killing bacteria from a shrimp aquaculture pond in Thailand. Fisheries Science 77: 657–664.

Keawtawee T, Fukami K, Songsangjinda P. 2012. Use of a Noctiluca-killing bacterium, *Marinobacter salsuginis* strain BS2 to reduce shrimp mortality caused by Noctiluca scintillans. Fisheries Science 78: 641-646.

Kureshy N, Davis A. 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei. Aquaculture 204: 125-143.

Lightner DV, Redman RM, Pantoja CR, Noble BL, Tran L. 2012. Early Mortaliry Syndrome Affects Shrimp In Asia. Global Aquaculture Advocate 15: 40.

Nicklisch A, Shatwell T, Kohler J. 2007. Analysis and modeling of the interactive effects of temperature and light on phytoplankton growth and relevance for the spring bloom. Journal of phytoplankton research 30: 75-91.

Prompoj W, Songsangjinda P. 2004. China-Thailand-Asian development bank greater Mekong sub-region (GMS) Aquaculture technology workshop. Ministry of agriculture people's republic of China pp.: 1-19.

Protist Information server. 2016. Cyanophyceae: Nostocales: *Oscillatoria*ceae. Available from:http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/Prokaryotes/*Oscillatoria*ceae/*Oscillatoria* /curviceps/sp_03.jpg. Accessior number: 25 May 2016.

Riquelme CE, Fukami K, Ishida Y. 1988. Effects of bacteria on the growth of a marine diatom, *Asterionella glacialis*. Bull. Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology 3: 29–34.

Simon N, Biegala IC, Smith EA, Vaulot D. 2002. Kinetics of attachment of potentially toxic bacteria to *Alexandrium tamarense*. Aquatic Microbial Ecology 28: 249–256.

Smith PT. 1996. Toxic effects of blooms of marine species of *Oscillatoria*les on farmed prawns (*Penaeus monodon, Penaeus japonicus*) and brine shrimp (*Artemia salina*). Toxicon 34 : 857-869.

Songsnagjinda P, Kittiwanich J, Muangyao P. 2011. Sub-theme 6.2 Experienced and conceptual framework of the modeling study for mitigation of the impacts of climate change on shrimp farming in Thailand. In the proceding of the ASEAN-SEAFDEC Conference on Sustainable Fisheries for Food Security Towards 2020. 13-17 June 2011, The Sofitel Centara Grand Bangkok Hotel, Thailand : 1-3.

Steele JH. 1962. Environmental control of photosynthesis in the sea. Limnology oceanography 7: 137-150.

Tucker CS. 1996. The ecology of channel catfish culture ponds in northwest Mississippi. Rev. Fisheries Science 4: 1–54.

Yusoff FM, Matias HB, Khalid ZA, Phang S. 2001. Culture of Microalgae Using Interstitial Water Extracted from Shrimp Pond Bottom Sediments. Aquaculture 201: 263-270.

Zimba PV, Grimm CC. 2003. A synoptic survey of musty/muddy odor metabolites and microcystin toxin occurrence and concentration in southeastern USA channel catfish (*Ictalurus punctatus* Ralfinesque) production ponds. Aquaculture 218: 81–87.

ภาคผนวก

1. **สูตรอาหาร** BG11 **สำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน** (Rippka et al., 1979)

	ความเข้มข้น (กรัม ต่อ ลิตร)
$NaNo_3$	1.500
$K_2HPO_4 . 3H_2O$	0.040
$MgSO_4 . 2H_2O$	0.075
$CaCl_2 . 2H_2O$	0.036
Citric acid	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
EDTA disodium magnesium salt	0.001
Na_2CO_3	0.020
Trace metal mix A_3	0.1
Deioized water	1000

Trace metal mix A_3	**ความเข้มข้น (มิลลิกรัม ต่อ ลิตร)**
H_2BO_3	2.860
$MnCl_2 . 4H_2O$	1.810
$ZnSO_4 . 7H_2O$	0.222
$Na . MoO_4 . 2H_2O$	0.390
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.0079
$Co(NO_3)_2 . 6H_2O$	0.0494

2. **สูตรอาหาร** Zarrouk medium (Zarrouk, 1966)

	ความเข้มข้น (กรัม ต่อ ลิตร)
$NaHCO_3$	16.80
$NaNO_3$	2.50
K_2HPO_4	0.50
K_2SO_4	1.00
$MgSO_4.7H_2O$	0.20
NaCl	1.00
$CaCl_2.2H_2O$	0.04
$FeSO_4.7H_2O$	0.01
EDTA	0.08
A5 Solution	1.00 ml.L-1
B6 Solution	1.00 ml.L-1

สารละลาย A5 solution

	ความเข้มข้น (กรัม ต่อ ลิตร)
H_3CO_3	2.86
$MnCl_2.4H_2O$	1.08
$ZnSO_4.7H_2O$	0.22
MoO_3	0.01
$CuSO_4.5H_2O$	0.08

สารละลาย B6 solution

	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม ต่อ ลิตร)
NH_4VO_3	22.90
$NiSO_4.7H_2O$	47.80
Na_2WO_4	17.90
$Ti(SO_4)_3$	40.00
$CO(NO_3)_2.6H_2O$	4.40

3. สูตรอาหารที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย (ดวงพร, 2537)

Nutrient Agar	กรัม ต่อ ลิตร
Beef extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

Nutrient Broth (NB)	
Bacto – broth extract	3.0 กรัม
Bacto – peptone	5.0 กรัม
Potassium nitrate	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

4. การย้อมสีแกรม (ศุภยางค์, 2547)

สารเคมีสำหรับการย้อมสีแกรม

Crystal violet

Iodine

Safranin

95% (Ethyl alcohol)

ขั้นตอนการย้อมสีแกรม

1. ป้ายแผ่นฟิล์มเชื้อบนสไลด์ (smear) สำหรับย้อมสี ทิ้งให้แห้งกลางอากาศ (air-dry) แล้วผ่านเปลวไฟ (heat-fix) 2-3 ครั้ง

2. หยด crystal violet ให้ท่วมรอย smear ที่ป้ายไว้นาน 1 นาที

3. ล้างน้ำและเทน้ำออกให้หมด

4. หยด Gram's iodine 1-2 นาที

5. ล้างน้ำและเทน้ำออกให้หมด

6. ล้างสีด้วย ethanol 95% โดยเอียงสไลด์ไปมาประมาณ 15-20 วินาที

7. ล้างน้ำ ระวังอย่าล้างสีนานเกินไป เพราะจะทำให้สี crystal violet-iodine complex หลุด