

การเจริญเติบโตและการสร้างอะคีนีต
ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดที่ตรึงไนโตรเจนได้

Growth Performance and Akinete Formation
of N₂- fixing Cyanobacteria

สมพร ชุนห์ลือชานนท์^{1/} เอกธิดา ไชยรินทร์^{1/} และ ชุติมณฑ์ สธิรพิตกุล^{2/}

Somporn Choonluchanon^{1/} Eaktida chairin^{1/} and Chutimon Sathirapitkul^{2/}

Abstract : Six isolates of soil isolated cyanobacteria were selected to study on growth characteristic and akinete formation. The tested isolates were evaluated in BG₁₁ nitrogen depleted medium under 4,000 lux of light intensity at 25 °C . Growth performances were evaluated within 12 hours intervals for 48 hours and at 3, 6, 12, 18 and 21 days after inoculation. The results indicated that dry biomass of cyanobacteria dramatically increased within 18 days and decreased thereafter. Significant differences on dry biomass were not found among the tested cyanobacteria. The chlorophyll and protein contents of most cyanobacteria continuously increased by cultivation period. The maximum cell number (10⁹ cell mL⁻¹) of *Nostoc* sp. 6CCR1-1 was obtained within 12 days while the others at 18-21 days. The most interesting point of view of this study was the akinete formation of the *Nostoc* sp. 6CCR1-1 cultivated in BG₁₁ with 5, 10 and 15 mg L⁻¹ of phosphorous under light intensity of 2,000 and 4,000 lux. Akinete formation of cyanobacteria was found significantly higher under cultivation in the medium containing 15 mg. L⁻¹ of phosphorous and light intensity of 4,000 lux. At the same time of akinetes increment, the heterocyst cells were found decreasing. This evidence indicated that low requirement of nitrogen for growth of cyanobacteria was observed during the vegetative cells being developed to be akinetes.

^{1/} ภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

^{2/} ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

^{1/} Department of Soil science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

^{2/} Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

บทคัดย่อ: เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการเกิดอะคิเน็ต (akinet) ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกและรวบรวมได้จากดินบริเวณภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จำนวนทั้งหมด 728 ตัวอย่าง โดยเลี้ยงในอาหารเหลว BG₁₁ ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน วางไว้ได้แสง 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บข้อมูลหลังการเลี้ยงสาหร่ายเป็นระยะ คือ 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง และ 3, 6, 12, 18, 21 วัน พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 6 สายพันธุ์ มีค่าเฉลี่ยมวลชีวภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยเพิ่มมากที่สุดที่ 18 วัน และหลังจากนั้นจะเริ่มลดลง ในขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์และโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะ-เวลาการเจริญเติบโตในสาหร่ายทั้ง 6 สายพันธุ์ โดย *Nostoc* sp. 6CCR1-1 มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและปริมาณเซลล์มากที่สุด (10⁹ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่ 12 วัน ขณะที่สายพันธุ์อื่นจะเพิ่มถึง 10⁹ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ 18-21 วัน สำหรับการกระตุ้นให้เกิดอะคิเน็ตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Nostoc* sp. 6CCR1-1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีปริมาณฟอสฟอรัส 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้อุณหภูมิแสงประมาณ 4,000 ลักซ์ ทำให้อะคิเน็ตมีจำนวนเพิ่มขึ้น มากกว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่มีฟอสฟอรัส 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 12 วัน ในขณะเดียวกันยังพบว่า เมื่อมีอะคิเน็ต เพิ่มขึ้นจำนวนของเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ลดลง แสดงให้เห็นว่าความต้องการไนโตรเจนในการเจริญเติบโตของ เซลล์ปรกติ (vegetative cell) น้อยลง เมื่อเซลล์สาหร่ายพัฒนาไปเป็น อะคิเน็ต

Index words: สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เฮเทอโรซิสต์ อะคิเน็ต
cyanobacteria, heterocyst, akinete

คำนำ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นจุลินทรีย์ที่บางชนิดมีคุณสมบัติที่สามารถตรึงไนโตรเจนและสังเคราะห์แสง ได้สารประกอบไนโตรเจนในรูป NH₄⁺ สารประกอบพวกสนับสนุนการเจริญเติบโต (growth promoting substances) และ กรดอะมิโน เป็นต้น จากการพบสารประกอบที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืชดังกล่าว ทำให้มีการทดลองนำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินไปใช้ในนาข้าวในหลายๆประเทศแล้วพบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทำให้ข้าวมีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้เพิ่มขึ้น (Samal and Kannaiyan, 1996) และลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนได้ประมาณ 33 % (Mahendranath and Pillai, 1996) สำหรับประเทศไทยนั้นสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ได้ทำการศึกษา การใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ พบว่า ข้าวเจริญเติบโตได้ดี เมล็ดข้าวมีขนาดใหญ่ขึ้น มีเมล็ดลีบน้อย รวงข้าวหนักกว่าแปลงที่ไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพ มีผลผลิตเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 10-25 % (พงเทพและคณะ, 2536) ผลการทดลองในระดับกระถางของ สมพรและคณะ (2534) ซึ่งสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้เต็มที่ พบว่า การใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทำให้ผลผลิตของข้าวเพิ่มประมาณ 12-26 % แต่เมื่อนำไปใช้ในนาข้าว พบว่า ผลผลิตเพิ่มขึ้นเพียง 3-5% ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของอานนท์และคณะ (2540) ที่ทดลองใช้ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินซึ่งผลิตจาก วว. ในนาข้าว พบว่าไม่สามารถเพิ่มผลผลิตข้าวได้ชัดเจน ทั้งที่การใช้อย่างเดียวและใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่ำ ส่วนการทดลองใช้ปุ๋ยชีวภาพดังกล่าวในดินนาชุดสันทราย pH 7.1 ในอัตรา 10 และ 100 เท่าของอัตราแนะนำ พบว่า ทำให้ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้นจากการไม่ใส่ปุ๋ย

เพียง 7% และ 8% ตามลำดับซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จากการไม่ใส่ปุ๋ย (ศรีวิชัย, 2537)

จากผลการทดลองที่แตกต่างกันนี้ แสดงว่าในการนำเอาสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมาใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตข้าวนั้นยังมีปัจจัยอีกหลายประการที่ควรพิจารณา เช่น การปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมในระบบนิเวศนาข้าว และความเป็นประโยชน์ของไนโตรเจนที่ตรึงได้โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินของดินข้าว เพราะประชากรของสาหร่ายที่ใส่ลงในนาข้าวมีน้อยจนไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้พอเพียงพอต่อการสร้างและปลดปล่อยสารประกอบให้พืชใช้ประโยชน์ ถึงแม้ว่าในระยะเริ่มต้นการผลิต เพื่อนำไปใช้ประโยชน์จะมีจำนวนประชากรสาหร่ายมากแต่ถ้าเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะที่เป็นเซลล์ปรกติอาจจะตายในระหว่างการขนส่ง หากสภาพของบรรจุภัณฑ์ไม่เหมาะสม ดังนั้นการพัฒนาให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีปริมาณเซลล์อะคินีมากขึ้นจะทำให้การนำไปใช้ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพมีประสิทธิภาพมากขึ้นด้วย เพราะอะคินีเป็นเซลล์ที่พัฒนามาจากเซลล์ปรกติทำให้มีความทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีและเมื่อพบสภาพที่เหมาะสมสามารถเจริญต่อไปได้ (Baker and Bellifemine, 2000) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เจริญเติบโตได้ดีและศึกษาปัจจัยที่ทำให้มีการพัฒนาเซลล์อะคินีเพิ่มมากขึ้น

วิธีการทดลอง

แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และการกระตุ้นพัฒนาการเซลล์อะคินีของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

1. การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 6 สายพันธุ์ได้แก่ *Nostoc* sp. 6CCR1-1 *Anabaena* sp. 6CCR2-6, *Anabaena* sp. 6NR3-6, *Anabaena* sp. 6NECR4-1, *Anabaena* sp. 6NECR4-5 และ *Anabaena* sp. 6NR4-8 ที่เก็บรวบรวมไว้โดย อภิชาติ, (2544) และ เอกธิดา (2544) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BG₁₁ (Atlas, 1993) ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน โดยเริ่มต้นให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายได้แสง 4,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าขวดเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) ทำ 3 ซ้ำรวมทั้งหมด 9 ชุด แต่ละชุดใช้เก็บข้อมูลหลังจากเลี้ยงสาหร่ายในแต่ละระยะเวลา ดังนี้คือ 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง และ 3, 6, 12, 18, 21 วัน โดยวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ต่อไปนี้ คือ มวลชีวภาพแห้ง (Dry Biomass) โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 ที่อบแห้งแล้ว กรองสาหร่ายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ก่อนนำไปอบให้แห้งอีกครั้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จึงนำมาชั่งเพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้งของสาหร่าย (ประกิจ, 2535) การนับจำนวนเซลล์ โดยทำให้สาหร่ายอยู่ในสภาพการกระจายแบบสุ่ม (random distribution) ด้วยการนำเข้าเครื่องปั่นให้เซลล์แยกจากกัน และนับจำนวนเซลล์ใช้ Petroff-Hausser counting chamber โดยการหยดตัวอย่างบนสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ รอให้เซลล์ตกตะกอนประมาณ 4-5 นาที ทำการนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (ยุวดี, 2538) วิเคราะห์คลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Wintemans and

Demots, (1965) โดยดูดสาหร่าย 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เซลล์ที่ได้เติมด้วย 95% เอทานอล 5 มิลลิลิตร จากนั้นบดละเอียดโดยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ ต่อนาที นาน 5 นาที วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายส่วนใสที่ความยาวคลื่น 665 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ยี่ห้อ Hitachi รุ่น U-100 ใช้ 95 % เอทานอล เป็น Blank หน่วยที่วัดได้เป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ นำส่วนที่ตกตะกอนไปหาปริมาณโปรตีนโดยละลายด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 % 0.5 มิลลิลิตร เติม 1 N NaOH 0.1 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วปรับปริมาตรส่วนผสมให้ได้ 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นใส่สารละลาย C (สารละลาย 2% Na หรือ K Tartrate 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 1 % CuSO₄ 1 มิลลิลิตร เข้าด้วยกันแล้วเอาส่วนผสมนี้ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 2% Na₂CO₃ ใน 0.1 N NaOH 50 มิลลิลิตร) บ่มในหลอดตัวอย่าง หลอดละ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ใส่สารละลาย 1 N Phenol 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ 30 นาที จึงวัดความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาดูด้วยเครื่อง Spectrophotometer ยี่ห้อ Hitachi รุ่น U-100 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้ 0.1 N NaOH เป็น Blank และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma A-9418) หน่วยที่ได้เป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Lowry *et al.*, 1951)

การวัดการตรึงไนโตรเจนใช้วิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) โดยเปลี่ยนบรรยากาศในขวดรูปชมพู่ ที่เลี้ยงสาหร่ายให้มี acetylene (C₂H₂) 10 % บ่มในบริเวณที่มีแสงสว่าง 1 ชั่วโมง ที่

อุณหภูมิห้อง ตรวจ ethylene (C₂H₄) ที่เกิดขึ้นโดยเครื่อง Gas Chromatography (Grant *et al.*, 1985) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC 14 B มีเครื่องตรวจสอบการแตกตัวไอออนด้วยเปลวไฟ (Flame ionization detector) column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 มิลลิเมตร ยาว 2.0 เมตร ที่บรรจุด้วยสารประกอบ Porapak-N

2. การกระตุ้นพัฒนาการเซลล์อะคินีตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ทดสอบการเกิด อะคินีต โดยเลี้ยงสาหร่ายให้มีปริมาณเริ่มต้นที่ 10⁶ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว BG₁₁ ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน โดยให้มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเท่ากับ 5, 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เข้าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ภายใต้แสง 2,000 และ 4,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจนับจำนวนเซลล์ปรกติ เซลล์เฮเทอโรซิสต์ และ เซลล์อะคินีต เมื่อครบ 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Nostoc* sp. 6CCR1-1, *Anabaena* sp. 6CCR2-6, *Anabaena* sp. 6NR3-6, *Anabaena* sp. 6NECR4-1, *Anabaena* sp. 6NECR4-5 และ *Anabaena* sp. 6NR4-8 (ภาพที่ 1) พบว่าเมื่อเลี้ยงสาหร่ายไวนาน 18 วัน สาหร่ายทั้ง 6 สายพันธุ์มีการเจริญเติบโตให้น้ำหนักแห้งมากที่สุดอยู่ระหว่าง 6.67-4.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจะเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญลดลง (declining relative growth rate) และระยะคงที่ (stationary phase) ตามลักษณะการเจริญเติบโตที่เพาะเลี้ยงในปริมาณจำกัด (ศิริเพ็ญ, 2537) โดยที่สาหร่าย *Nostoc*

sp. 6CCR1-1 มีจำนวนเซลล์ในปริมาณ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่ครบ 12 วันซึ่งมากที่สุดแตกต่างจากสายพันธุ์ อื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ส่วนอีก 5 สายพันธุ์พบว่าไม่มีปริมาณเซลล์ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อครบ 21 วัน ซึ่งสายพันธุ์ *Anabaena*

sp. 6NECR4-1 และ *Anabaena* sp. 6NR3-6 มีปริมาณเซลล์น้อยที่สุด (ภาพที่2) ดังนั้นในการพิจารณาถึงองค์ประกอบอื่นๆของสาหร่ายทั้ง 6 สายพันธุ์นี้ จึงใช้ค่าที่ได้เมื่อระยะ 12-18 วัน เป็นค่าเปรียบเทียบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร

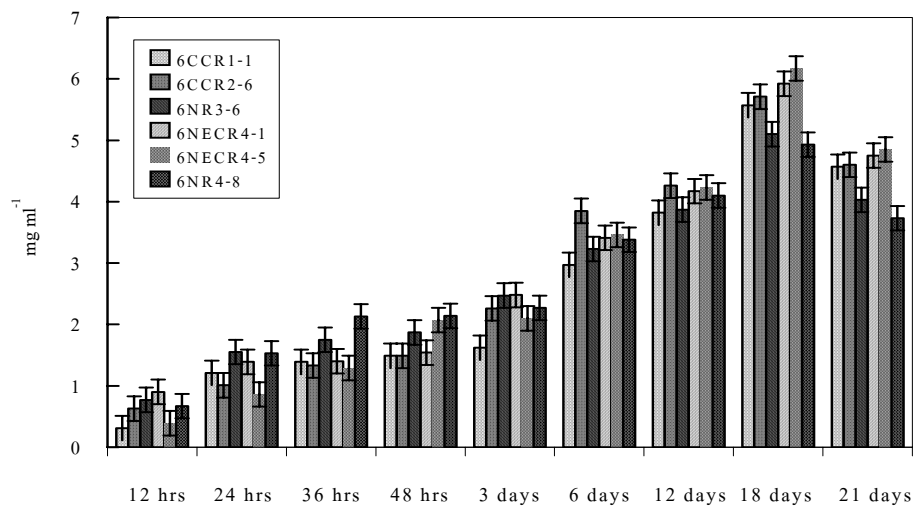


Figure 1 Comparison of dry biomass of 6 cyanobacterial isolates at different growth stages.

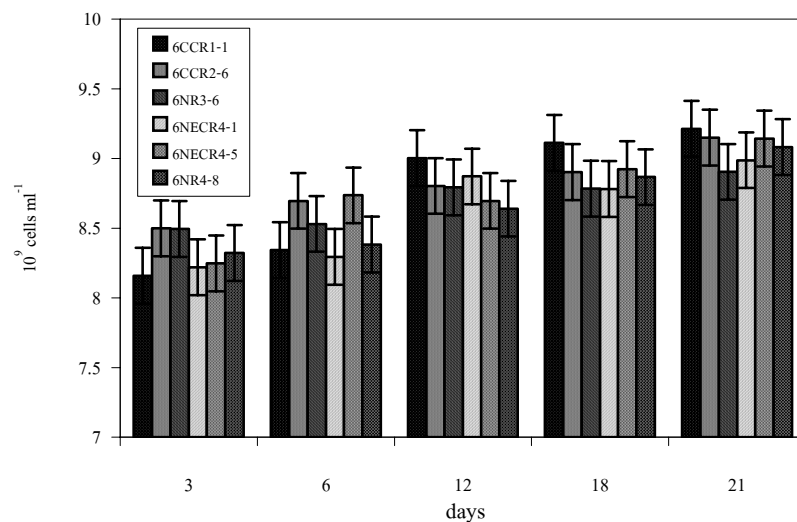


Figure 2 Total cells of cyanobacteria at different growth stages.

จากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและคลอโรฟิลล์ พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเจริญเติบโต โดยที่ 18 วัน *Nostoc* sp. 6CCR1-1 มีปริมาณโปรตีนและคลอโรฟิลล์มากกว่าสายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) คือมีคลอโรฟิลล์ 167.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (ภาพที่ 3) และมีโปรตีน 188.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (ภาพที่ 4) สำหรับประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนนั้น พบว่าที่ระยะเวลาครบ 12 ชั่วโมง สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 6 ตัวอย่างยังไม่มีมีการตรึงไนโตรเจน โดยจะเริ่มวัดการตรึงไนโตรเจนได้หลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง ยกเว้น *Nostoc* sp. 6CCR1-1 ที่เริ่มวัดการตรึงไนโตรเจนได้เมื่อครบ 48 ชั่วโมง เป็นต้นไป แสดงว่าในระยะแรกประชากรสาหร่ายยังมีปริมาณน้อยและต้องอาศัยเวลาในการปรับตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จึงยังไม่เกิดการตรึงไนโตรเจนหรืออาจจะเกิดน้อยจนวัดค่าไม่ได้ และเมื่อครบ 12 วัน *Nostoc* sp. 6CCR1-1 มีการตรึงไนโตรเจนมากที่สุดคือ 11.0 ไมโครโมล C_2H_4 ต่อ ชั่วโมงต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ (ภาพที่ 5) ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) และการตรึงไนโตรเจน

ลดลงเมื่อเลี้ยงสาหร่ายไว้นานกว่า 15 วัน แสดงว่า *Nostoc* sp. 6CCR1-1 สามารถตรึงไนโตรเจนได้มากกว่าทุกสายพันธุ์ แม้ว่าในช่วง 12 - 36 ชั่วโมง จะไม่พบการตรึงไนโตรเจนซึ่งสอดคล้องกับมวลชีวภาพ, ปริมาณโปรตีน และปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ระยะแรกๆ มีค่าน้อยกว่าสาหร่ายสายพันธุ์อื่นๆ แต่จะมีน้ำหนักแห้ง และปริมาณโปรตีนมากที่สุดที่ 18 วัน ส่วนปริมาณเซลล์ มีจำนวนเซลล์ทั้งหมดมากที่สุดที่ 12 วัน ในขณะที่สาหร่ายสายพันธุ์อื่นมีปริมาณเซลล์เท่ากัน เมื่ออายุ 21 วัน ส่วนการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินลดลงเมื่ออายุ 18 และ 21 วัน นั้นเป็นไปตามการลดลงของเซลล์เฮเทอโรซิสต์

จากค่าองค์ประกอบต่างๆของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 6 สายพันธุ์ แม้ว่าจะไม่แตกต่างกันทางสถิติมากนักแต่ก็พบว่า *Nostoc* sp. 6CCR1-1 เป็นสาหร่ายที่มีลักษณะเด่นได้แก่ มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วและมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูง จึงได้นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์นี้ไปศึกษาในการกระตุ้นพัฒนาการเซลล์อะคินีตต่อไป

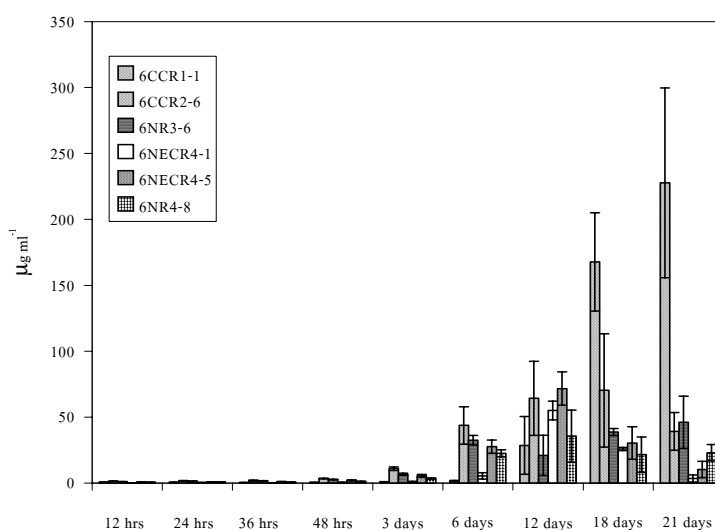


Figure 3 Chlorophyll content in 6 isolates of cyanobacterial cells at different growth stages.

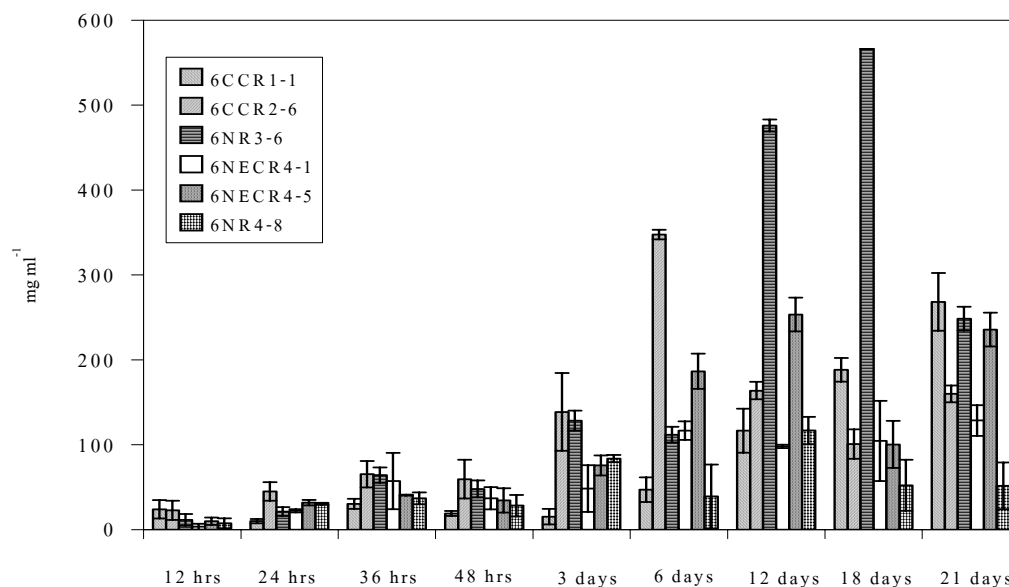


Figure 4 Protein content in 6 isolates of cyanobacterial cells at different growth stages.

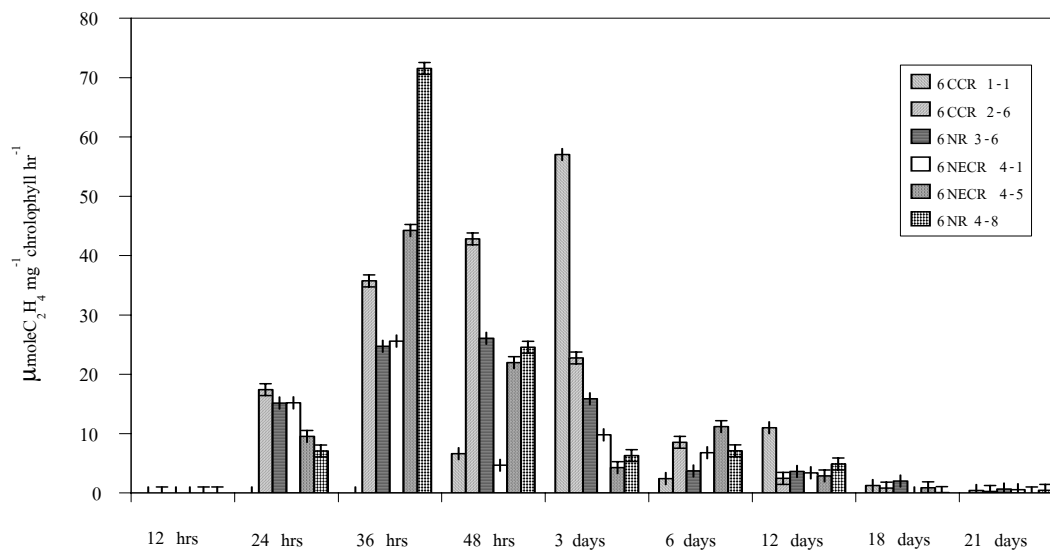


Figure 5 Nitrogen-fixing efficiency of 6 cyanobacterial isolates illustrated in acetylene (C_2H_2) reduction activity.

ในการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีปัจจัยแวดล้อมต่างกันเพื่อศึกษาการสร้างเซลล์อะคิเน็ตโดยใช้ค่าของอัตราส่วนระหว่างเซลล์ทั้งหมด (V) และเซลล์อะคิเน็ต (A); (V:A) เป็นตัวกำหนด พบว่าหลังจาก 6 วัน ค่า V:A มีค่าลดลงแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ แต่หลังจาก 12 วัน ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน กล่าวคือ ดำรับที่มีฟอสฟอรัส 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์มีค่า V:A ต่ำกว่าดำรับอื่นแสดงว่ามีเซลล์อะคิเน็ตมากที่สุด (ภาพที่ 6) ระยะเวลาในการเพิ่มเซลล์อะคิเน็ต ของสาหร่ายสายพันธุ์นี้ใกล้เคียงกับ *Anabaena circinalis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี

ธาตุเหล็ก กล่าวคือ เซลล์อะคิเน็ต จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 13 วัน (Hori *et al.*, 2001) และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณเซลล์เฮเทอโรไซสต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่ตรึงไนโตรเจน พบว่า เซลล์เฮเทอโรไซสต์น้อยลง ในขณะที่เซลล์ปรกติพัฒนาไปเป็น เซลล์อะคิเน็ต โดยมีค่า V:H สูงขึ้น (ภาพที่ 7) แสดงว่าในขณะที่มีการพัฒนาเซลล์ไปเป็นอะคิเน็ต (ภาพที่ 8) นั้น สาหร่ายมีความต้องการไนโตรเจนลดลงและต้องเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีฟอสฟอรัสเริ่มต้นประมาณ 15 มิลลิกรัมต่อลิตรระดับความเข้มของแสงประมาณ 4,000 ลักซ์

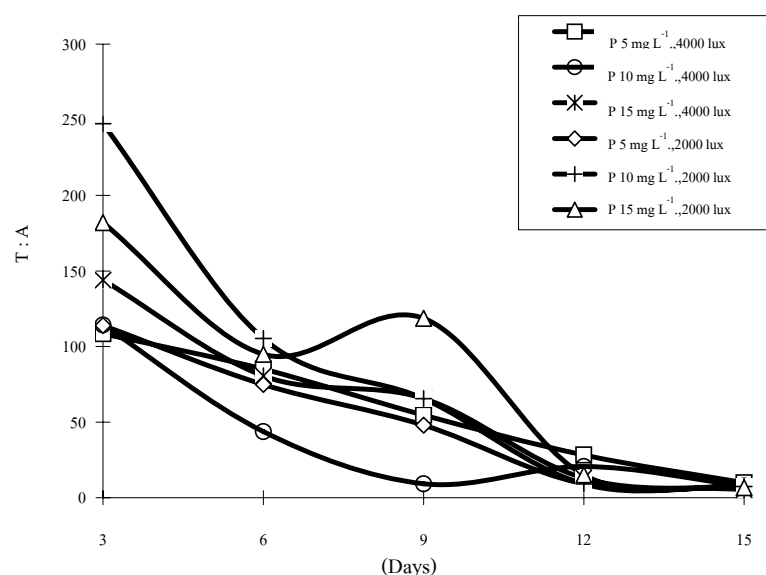


Figure 6 Effect of phosphorus concentrations and light intensities on the stimulation of akinete formation of *Nostoc* sp. 6CCR1-1 shown in the ratio of total cells (T) to akinete.

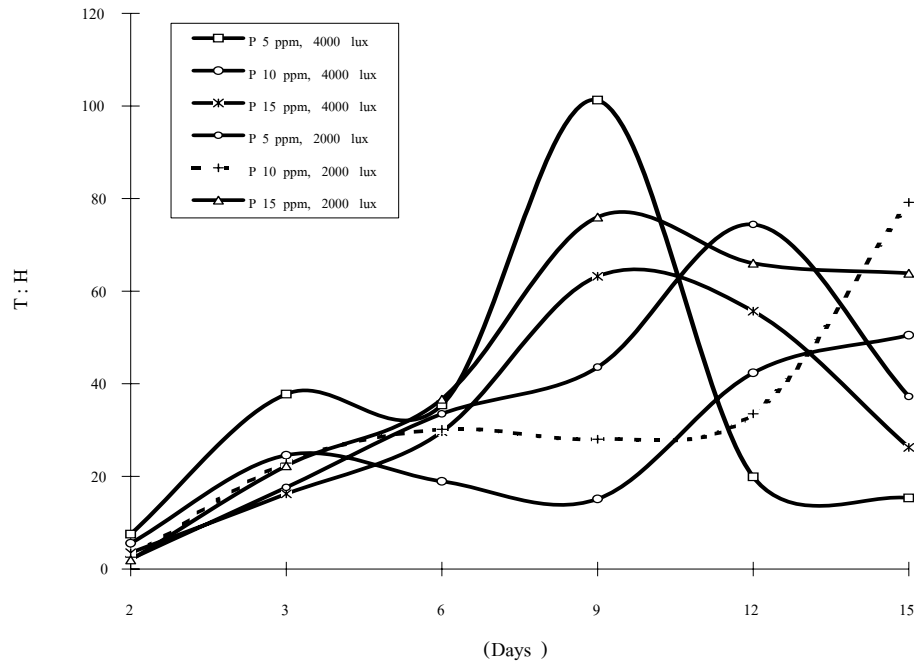


Figure 7 Effect of phosphorus concentrations and light intensities on heterocyst cells formation shown in the ratio of total cells (T) to heterocyst cells (H).

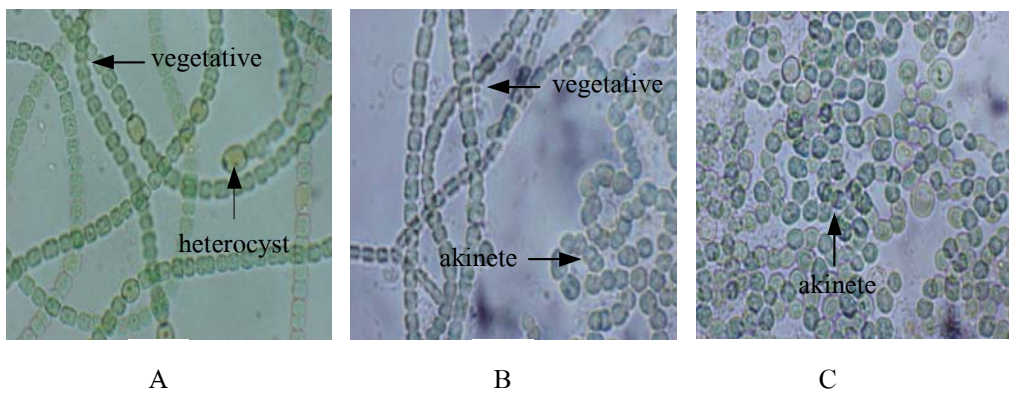


Figure 8 Development of cyanobacterial cells to be akinete cells A) at the beginning of cultivation B) 12 days of cultivation C) at the end of experiment.

สรุป

จากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน การสังเคราะห์ โปรตีน และคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ *Nostoc* sp. 6CCR1-1, *Anabaena* sp. 6CCR2-6, *Anabaena* sp. 6NR3-6, *Anabaena* sp. 6NECR4-1, *Anabaena* sp. 6NECR4-5 และ *Anabaena* sp. 6NR4-8 พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีการเจริญเติบโตเร็ว มีประสิทธิภาพตรึงไนโตรเจนสูง มีการสังเคราะห์โปรตีนมาก คือ *Nostoc* sp. 6CCR1-1 และเมื่อกระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์อะคีนิต พบว่า การเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในอาหาร BG₁₁ ที่มีฟอสฟอรัสเริ่มต้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มแสงประมาณ 4,000 ลักซ์ เป็นสภาพที่เหมาะสมที่ทำให้สาหร่ายสร้างเซลล์อะคีนิตได้มากที่สุด ซึ่งมีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปพัฒนาประสิทธิภาพของปฏิกิริยาผลิตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้

เอกสารอ้างอิง

- ประกิต สมัครคำ. 2535. ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่ออัตราการเจริญเติบโตและจำนวนเฮเทอโรซิสต์ของ *Anabaena* spp. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พงเทพ อันตะริกานนท์, สุริยา สาสนรักกิจ และประเสริฐ อะมริต. 2536. ปฏิกิริยาจาก สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน. นสพ. กสิกร. ปีที่ 66 ฉบับที่ 4. กรกฎาคม-สิงหาคม.
- ยุวดี พิรพรพิศาล. 2538. บทปฏิบัติการสาหร่ายวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 46-49.
- ศิริเพ็ญ ตรีชัยยาพร. 2537. สาหร่ายวิทยาประยุกต์. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 149-159.
- ศรีวุฒิ เจนศิริพิกุล. 2535. ผลของการใส่ปุ๋ยชีวภาพอัลจินัว ต่อปริมาณของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้ในดินที่มี pH ต่างกัน และผลของปุ๋ยอัลจินัวต่อหน้าข้าว. ปัญหาพิเศษ. ภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สมพร ชุนห์ลือชานนท์, บรรหาร แดงกล้า และจิรัช ด้วนวิญกุล. 2534. ผลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินต่อการเพิ่มผลผลิตข้าว. งานวิจัยปฏิกิริยาเคมีที่ 1. กลุ่มงานวิจัย จุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 60-78.
- อภิชาติ สุขสว่าง. 2544. พฤติประชากรสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ตรึงไนโตรเจนได้ในระบบบึงเวศที่ต่างกัน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อานนท์ สุขสวัสดิ์, ยลิสร์ อินทรสถิต, พันธ์ สุวรรณธาดา, คิเรก อินตาพรหม และ บุญโฮมชำนัญกุล. 2540. การศึกษาการใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นปุ๋ยชีวภาพในนาข้าว. เอกสารการสัมมนาทางวิชาการ เรื่อง การพัฒนาข้าวและธัญพืชเมืองหนาวครั้งที่ 9 ณ ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 46-53.
- เอกธิดา ไชยรินทร์. 2544. การประเมินการดูดใช้ไนโตรเจน-15 ที่ได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Atlas, R. M. 1993. Handbook of microbiological media. CRC. Press. U.S.A.
- Baker, P. D. and D. Bellifemine. 2000. Environmental influences on akinete germination of *Anabaena*

- circinalis* and implications for management of cyanobacterial bloom. *Hydrobiologia*. 427: 65-73.
- Grant, I.F., P.A. Roger and I. Watanabe. 1985. Effect of grazer regulation and algal inoculation on photodependent nitrogen fixation in a wetland rice field. *Biol. Fert. Soil*. 1:61-72.
- Hori, K., S. Ishii, G. Ikeda, J. Okamoto, Y. Tanji, C. Weerapashphong and H. Unno. 2001. Behavior of filamentous cyanobacterium *Anabaena* spp. in water column and its cellular characteristics. *Biochem. Eng. J.* 10:217-225.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement in the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:256-275.
- Mahendranath T.R. and R.N. Pillai. 1996. Effect of blue-green algae at vary level of nitrogen on the growth, yield attributes and yield of lowland rice. *Soil Bio. Biochem.* 27:450-510.
- Samal K.C. and S. Kannaiyan. 1996. Use of immobilized algae as biofertilizer in rice. Biotechnology unit, Dept. of Agricutrural Microboilogy. Tamil Nadu Agricultural University. India. p.5.
- Wintermans, J.F.G.M. and A. Demotes. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophyll a, b and their pheophytins in ethanol. *Biochemica et Biophysica Acta*. 109:440-453.
-