ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณอิออนและสารออสโมโพรเทคแทนต์ในไซยาโนแบคทีเรีย

ปริญญานิพนธ์

ของ

โพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มีนาคม 2556

ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณอิออนและสารออสโมโพรเทคแทนต์ในไซยาโนแบคทีเรีย

ปริญญานิพนธ์

ของ

โพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

มีนาคม 2556

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณอิออนและสารออสโมโพรเทคแทนต์ในไซยาโนแบคทีเรีย

บทคัดย่อ

ของ

โพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มีนาคม 2556

โพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์. (2556). *ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณอิอออนและสารออสโม-โพรเทคแทนต์ในไซยาโนแบคทีเรีย*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ดร.อภิรดา สถาปัตยานนท์, ดร.สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ.

งานวิจัยนี้มีวัตุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณอิอออนและสารออสโมโพรเทคแทนต์ในไซย าโนแบคทีเรีย ในไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยง BG_{11} ภายใต้ภาวะที่ความเค็ม ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 – 1 โมลาร์ พบว่าการเจริญที่ เหมาะสม ของไซยาโนแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลื อโซเดียมคลอไรด์ สำหรับ *Arthrospira* sp. PCC 8005 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.25 โมลาร์ ภาวะที่มีความครียดจากเกลือ คือ ภาวะที่ทำให้การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียลดลงครึ่ง หนึ่งของภาวะปกติ จากนั้นติดตามปริมาณ อิออน น้ำตาลรีดิวซ์ ไขมัน โพรลีน และบี-เทน ของ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ภายใต้ภาวะปกติ และภาวะที่ มีความเครียดจาก เกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ที่ภาวะเครียดจากเกลือให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ไขมัน โพรลีน และบีเทน สูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า ส่วนปริมาณของอิออน พบว่า Na^{+} มีปริมาณสูงที่สุด รองลงมา คือ Mg^{2+}, K^{+} และ Ca^{2+} ตามลำดับ โดยภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้ปริมาณอิออนทั้ง 4 ชนิด สูงกว่าภาวะปกติ ดังนั้นอธิบายได้ว่าไซยาโนแบคทีเรีย ทั้ง 5 ชนิด สะสมปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ไขมัน โพรลีน บีเทน โพรลีน และปริมาณอิออนชนิดสูงขึ้นภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ

คำสำคัญ: ไซยาโนแบคทีเรีย อิออน สารออสโมโพรเทคแทนต์ ความเครียดจากเกลือ

EFFECT OF SALT STRESS ON IONS AND OSMOPROTECTANT CONTENTS IN CYANOBACTERIA

AN ABSTRACT

BY

POTITORN KANCHITANURAK

Presented in Partial Fulfillment of Requirements for the

Master of Science Degree in Biology

at Srinakharinwirot University

March 2013

Potitorn Kanchitanurak. (2013). *Effect of salt stress on ions and osmoprotectant contents in cyanobacteria*. Master thesis, M.Sc. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Asst. Apirada Sathapattayanon, Ph.D.; Assoc. Surasak Laloknam, Ph.D.

The research aimed to study the effect of salt stress on ions and osmoprotectant contents in cyanobacteria. The five strains of cyanobacteria including, *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp., and *Tolypothrix* sp. were grown in BG_{11} medium containing various NaCl ranging concentration of 0 to 1 M. The optimum growth rate of *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. and *Tolypothrix* sp. were condition without NaCl. Also, *Arthrospira* sp. PCC 8005 showed optimum growth rate at 0.25 M NaCl. The growth rate of cyanobacteria was decreased significantly under salt stress with 50% reduction after 12 days. Ions, reducing sugar, lipid, proline and betaine found to be increased under NaCl stress. It was found that Na^{+} was higher than Mg^{2+}, K^{+} and Ca^{2+},respectively. This study suggests that salt stress generated by NaCl enhanced the accumulation of ions and osmoprotactants in all cyanobacteria strains.

Keywords: Cyanobacteria, Ion, Osmoprotectant, Salt stress

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณอิออนและสารออสโมโพรเทคแทนต์ใน
ไซยาโนแบคทีเรีย

ของ
โพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์
ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ ..... เดือน มีนาคม พ.ศ. 2556

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(อาจารย์ ดร.อภิรดา สถาปัตยานนท์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมชัย วงศ์วัฒนะ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.อภิรดา สถาปัตยานนท์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.วุฒินันท์ รักษาจิตร์)

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.อภิรดา สถาปัตยานนท์ ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ รองประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางในการดำเนินการวิจัย จัดหาอุปกรณ์การวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ปริญญานิพนธ์ให้สำเร็จสมบูรณ์ไปด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ รศ.เฉลิมชัย วงศ์วัฒนะ และ อาจารย์ ดร.วุฒินันท์ รักษาจิตร์ ที่กรุณาแนะนำและตรวจแก้ไขปริญญานิพนธ์ใ ห้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ให้ความเมตตาเอาใจใส่และให้ข้อแนะนำในการเรียนและการทำวิจัยแก่ผู้วิจัยเป็นอย่างยิ่ง และขอบคุณนิสิตร่วมรุ่นทุกคนที่ช่วยเสริมกำลังใจในด้านการศึกษาขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องที่คอยเป็นกำลังใจให้สามารถก้าวผ่านอุปสรรคต่างๆ จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

โพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
	ความสำคัญของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย	3
	สถานที่ทำการทดลอง	3
	นิยามศัพท์เฉพาะ	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	ไซยาโนแบคทีเรีย	5
	ผลของความเครียดจากเกลือ	10
	อิออน	12
	สารออสโมโพรเทคแทนต์	14
	น้ำตาลรีดิวซ์	14
	ไขมัน	16
	โพรลีน	17
	บีเทน	19
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	22
	วัสดุอุปกรณ์	22
	สารเคมี	22
	ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	23
	วิธีการทดลอง	23
	การวัดการเจริญ	23
	การวิเคราะห์อิออน	24
	การตรวจสอบปริมาณไขมัน	24
	การตรวจสอบปริมาณโพรลีน	25
	การตรวจสอบปริมาณบีเทน	25

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	**ผลการทดลอง**	26
	ตอนที่ 1 การวัดการเจริญ	26
	ตอนที่ 2 การตรวจสอบปริมาณอิออนภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากเกลือ	32
	ตอนที่ 3 การตรวจสอบสารออสโมโพรเทคแทนต์ภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากเกลือ	34
	การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	34
	การตรวจสอบปริมาณไขมัน	36
	การตรวจสอบปริมาณโพรลีน	38
	การตรวจสอบปริมาณบีเทน	40
5	**สรุปและอภิปรายผลการทดลอง**	42
	สรุปผลการทดลอง	42
	อภิปรายผลการทดลอง	43
บรรณานุกรม		48
ภาคผนวก		56
ประวัติย่อผู้วิจัย		66

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเซลล์เดี่ยว (ก) *Aphanothece hegewaldii*
(ข) *Monoraphidium saxatile* (ค) *Chroococcus sp.* 6

2 ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสาย (ก) *Anabaena* sp. (ข) *Arthrospira* sp. PCC 8005
(ค) *Nostoc* sp. (ง) *Oscillatoria* sp. (จ) *Tolypothrix* sp. 7

3 สูตรโครงสร้างน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำตาลกลูโคส..... 15

4 สูตรโครงสร้างโพรลีน 17

5 สูตรโครงสร้างบีเทน..... 19

6 กลไกการขนส่งสารประกอบเข้าสู่เซลล์ 20

7 การเจริญของ*Anabaena* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียม
คลอไรด์ (ก) เครื่อง Spectophotometer (ข) น้ำหนักแห้ง..... 27

8 การเจริญของ*Arthrospira* sp. PCC 8005 ภายใต้ภาวะปกติและภาวะความเครียดจาก
เกลือโซเดียมคลอไรด์ (ก) เครื่อง Spectophotometer (ข) น้ำหนักแห้ง..... 28

9 การเจริญของ*Nostoc* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียม
คลอไรด์ (ก) เครื่อง Spectophotometer (ข) น้ำหนักแห้ง..... 29

10 การเจริญของ*Oscillatoria* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะความเครียดจากเกลือ
โซเดียมคลอไรด์ (ก) เครื่อง Spectophotometer (ข) น้ำหนักแห้ง..... 30

11 การเจริญของ*Tolypothrix* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะความเครียดจากเกลือ
โซเดียมคลอไรด์ (ก) เครื่อง Spectophotometer (ข) น้ำหนักแห้ง..... 31

12 ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณอิออนของ Na^+, K^+, Mg^{2+} และ Ca^{2+}
(ก) *Anabaena* sp. (ข) *Arthrospira* sp. PCC 8005 (ค) *Nostoc* sp.
(ง) *Oscillatoria* sp. (จ) *Tolypothrix* sp. 33

13 ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(ก) *Anabaena* sp.
(ข) *Arthrospira* sp. PCC 8005 (ค) *Nostoc* sp. (ง) *Oscillatoria* sp.
(จ) *Tolypothrix* sp..... 35

14 ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณไขมัน(ก) *Anabaena* sp.
(ข) *Arthrospira* sp. PCC 8005 (ค) *Nostoc* sp. (ง) *Oscillatoria* sp.
(จ) *Tolypothrix* sp. 37

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

15 ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณโพรลีน (ก) *Anabaena* sp. (ข) *Arthrospira* sp. PCC 8005 (ค) *Nostoc* sp. (ง) *Oscillatoria* sp. (จ) *Tolypothrix* sp. 39

16 ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณบีเทน (ก) *Anabaena* sp. (ข) *Arthrospira* sp. PCC 8005 (ค) *Nostoc* sp. (ง) *Oscillatoria* sp. (จ) *Tolypothrix* sp. 41

17 การแลกเปลี่ยนอิออนและการสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ในไซยาโนแบคทีเรีย 47

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) เป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มโพรคาริโอต (prokaryote) มีความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น อุณหภูมิสูงหรือความเค็มสูง (Hagemann; & Erdmann. 1997) โครงสร้างของ ไซยาโนแบคทีเรีย มีผนังเซลล์ที่มีส่วนประกอบของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) คล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ไม่มีแฟลกเจลลา (flagella) นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ เช่น เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) เป็นกลุ่ม (colony) และเป็นสาย (filaments) นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียอาจมีโครงสร้างที่เรียกว่า อะคินีท (akinete) ทำหน้าที่ในการสร้างสปอร์เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งพบเฉพาะในพวกที่เป็นเส้นสาย มีผนังเซลล์หนาทำให้ทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี (อุดมลักษณ์ มณีโชติ. 2552)

ไซยาโนแบคทีเรีย บางชนิดมีความสามารถ ในการตรึงแก๊สไนโตรเจน (nitrogen fixation) ในอากาศเพื่อช่วยในการปรับปรุงคุณภาพดินใน การทำนาข้าว (Venkataraman. 1981) บางชนิดมีเซลล์พิเศษ เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ (heterocysts) เป็นเซลล์ที่มีผนังหนา สามารถตรึงแก๊สไน โตรเจนจากอากาศเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีประโยชน์ต่อเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนั้นๆ ได้ แก๊สสำหรับการตรึงไนโตรเจน เกิดขึ้นบริเวณเฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรีย ในภาวะที่เซลล์ขาดสารประกอบ ไนโตรเจน (Wolk; Ernst; & Elhai. 1994) และการที่ไซยาโนแบคทีเรียจะนำธาตุไนโตรเจนไปใช้ประโยชน์ได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณของธาตุไนโตรเจนในสิ่งแวดล้อมขณะนั้นด้วย (Viets. 1965)

ปัญหาดินเค็มเป็นปัญหาสำคัญทางการเกษตร พบว่าประมาณร้อยละ 7 ของพื้นที่ทำการเกษตรได้รับผลกร ะทบจากความเค็มและมีแนวโน้มว่า พื้นที่ ที่มีความเค็ม มีจำนวนเพิ่มขึ้น (Szablocs. 1994) ในประเทศไทย พบปัญหาดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและพื้นที่ติดชายทะเลซึ่งส่งผลให้การเจริญเติบโต ผลผลิต คุณภาพของพืช และรายได้ของเกษตรกรลดลง (อรุณี ยูวะนิยม. 2554) พบว่า เกลือที่พบในดินเค็ม ได้แก่ NaCl และ Na_2SO_4 (USSL. 1954) เมื่อดินมีเกลือมากเกินไป ส่งผลให้ดินมีเนื้อแน่นทึบ ทำให้รากพืชชอนไชยาก แร่ธาตุบางอย่างละลายออกมาจนเป็นพิษต่อเซลล์ (วิชิตพล มีแก้ว; ณัฐพล ขันธปราบ ; และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ . 2553) ทำให้พืชมีการตอบสนองแตกต่ างกันออกไป เช่น พืชมีการเจริญช้าลงทำให้มีการนำเข้าสารอินทรีย์จำพวกธาตุอาหารเข้ามาภายในเซลล์น้อยลง ได้แก่ ไนโตรเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนและแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ เป็นต้น (ศรีสม สุวรรณวงศ์. 2547)

ความเค็ม ทำให้เกิดความแตกต่า งของค่าชลศักย์ (water potential) ส่งผลให้ปริมาณอิออนภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น เซลล์มีการสูญเสียน้ำที่อยู่ภายใน (Hagemann; & Erdmann. 1997) และ

เกิดความเป็นพิษเนื่องจาก อิออนบางชนิด (ionic toxicity) ในไซยาโนแบคทีเรีย จะดูดและสะสม อิออนเหล่านั้นจนถึงระดับเป็นพิษ มีผลโดยตรงต่อสรีรวิทยาของไซยาโนแบคทีเรีย (วิชิตพล มีแก้ว; ณัฐพล ขันธปราบ; และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. 2553) ไซยาโนแบคทีเรีย จะมีการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อความเครียดจากเกลือ มี 2 กลไก คือ การเพิ่มประสิทธิภาพ กลไกการแลกเปลี่ยน อิออน และการสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ เช่น โพรลีน บีเทน น้ำตาล และกรดไขมัน เป็นต้น (Reed; & Stewart. 1985, วิชิตพล มีแก้ว; ณัฐพล ขันธปราบ; และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. 2553)

ไซยาโนแบคทีเรียมี การนำมาใช้ ประโยชน์ เช่น เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ สารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียใช้รักษาโรค และกำจัดน้ำเสีย เป็นต้น (เสน่จิต กิตตินานนท์. 2542) นอกจากนี้พบว่า มีการนำไซยาโนแบคทีเรียมาทำปุ๋ย เนื่องจ ากไซยาโนแบคทีเรียมีความสามารถในการอุ้มน้ำและรักษาความชุ่มชื้นให้กับดินอยู่เสมอ รวมถึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ (Dawson. 1966) มีรายงานการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชเป็นเวลานาน ในปริมาณที่มากจะทำให้ดินกลายเป็นดินเค็ม (อรุณี ยูวะนิยม. 2554) ดังนั้น เพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีในพืช และ ลดการทำลายคุณภาพดิน งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาผลของความเครียดจากเกลือต่อ ปริมาณอิออนและสารออสโมโพรเทคแทนต์ในไซยาโนแบคทีเรียเพื่อประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปผลิตปุ๋ยชีวภาพทดแทนปุ๋ยเคมี เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้และสามารถนำมาเพาะเลี้ยงโดยไม่เปลืองพื้นที่สำหรับการทำการเกษตรอีกด้วย

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. ศึกษาผลของความเครียดจากเกลือต่อ การเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC8005., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp.
2. ศึกษาผลของความเครียดจากเกลือต่อ ปริมาณอิออนและสารออสโมโพรเทคแทนต์ในไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด

ความสำคัญของการวิจัย

1. ได้ไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญได้ดีภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือ
2. ได้ข้อมูลปริมาณอิออนและสารออสโมโพรเทคแทนต์ในไซยาโนแบคทีเรีย
3. ได้ข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเกษตร

ขอบเขตของการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษา การเจริญ ของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากเกลือ

ตรวจวัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0, 0.25, 0.5 และ 1 โมลาร์

ตอนที่ 2 การตรวจสอบปริมาณอิออนภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากเกลือ

ปริมาณอิออนที่ตรวจสอบ ได้แก่ อิออนของ Mg^{2+}, Ca^{2+}, Na^{+} และ K^{+}

ตอนที่ 3 การตรวจสอบสารออสโมโพรเทคแทนต์ภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากเกลือ

สารออสโมโพรเทคแทนต์ที่ตรวจสอบ ได้แก่ น้ำตาลรีดิวซ์ ไขมัน โพรลีน และบีเทน

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เริ่มตั้งแต่ กันยายน 2554 – มกราคม 2556

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์อาคาร 15 ห้อง 623 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2. International Center for Green Biotechnology, Meijo University, Tenpaku-ku, Nagoya, Japan

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ความเครียดจากเกลือ (salt stress) หมายถึง ภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นจากโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิด BG_{11}

2. ไซยาโนแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria or bluegreen algae) หมายถึง สิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในดิวิชั่น Cyanophyta มีโครงสร้างของเซลล์คล้ายแบคทีเรียเนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้ม ออร์แกเนลล์ แต่มีลักษณะที่แตกต่างจาก แบคทีเรีย คือ สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้และผลิตออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ส่วนใหญ่มีสีเขียวแกมน้ำเงิน แต่บางชนิดมีสีแดงหรือม่วง

3. ปริมาณอิออน หมายถึง ปริมาณอิออนสุทธิที่เกิดขึ้นจาก การเคลื่อนที่ของอิออนผ่านเยื่อสิ่งมีชีวิตเข้าไปในเซลล์ หรือการเคลื่อนย้ายของอิออนในของเหลวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เข้าไปภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตซึ่งไซยาโนแบคทีเรียจะนำธาตุอาหารต่างๆ ไปใช้ในรูปของอิออน เช่น อิออนของ Mg^{2+}, Ca^{2+}, Na^{+} และ K^{+}

4. สารออสโมโพรเทคแทนต์ (osmoprotectant) หมายถึง สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลของน้ำ และแรงดันออสโมติกภายในเซลล์กับสิ่งแวดล้อม ทำให้สิ่งมีชีวิตปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ สารออสโมโพรเทคแทนต์มีหลายชนิด ได้แก่ น้ำตาล ไขมัน อนุพันธ์ของน้ำตาล กรดอะมิโน และอนุพันธุ์ของกรดอะมิโน ตัวอย่างของสารออสโมโพรเทคแทนต์ ได้แก่ โพรลีน ไกลซีน-บีเทน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. ไซยาโนแบคทีเรีย
2. ผลของความเครียดจากเกลือที่มีต่อไซยาโนแบคทีเรีย
3. อิออน
4. สารออสโมโพรเทคแทนต์

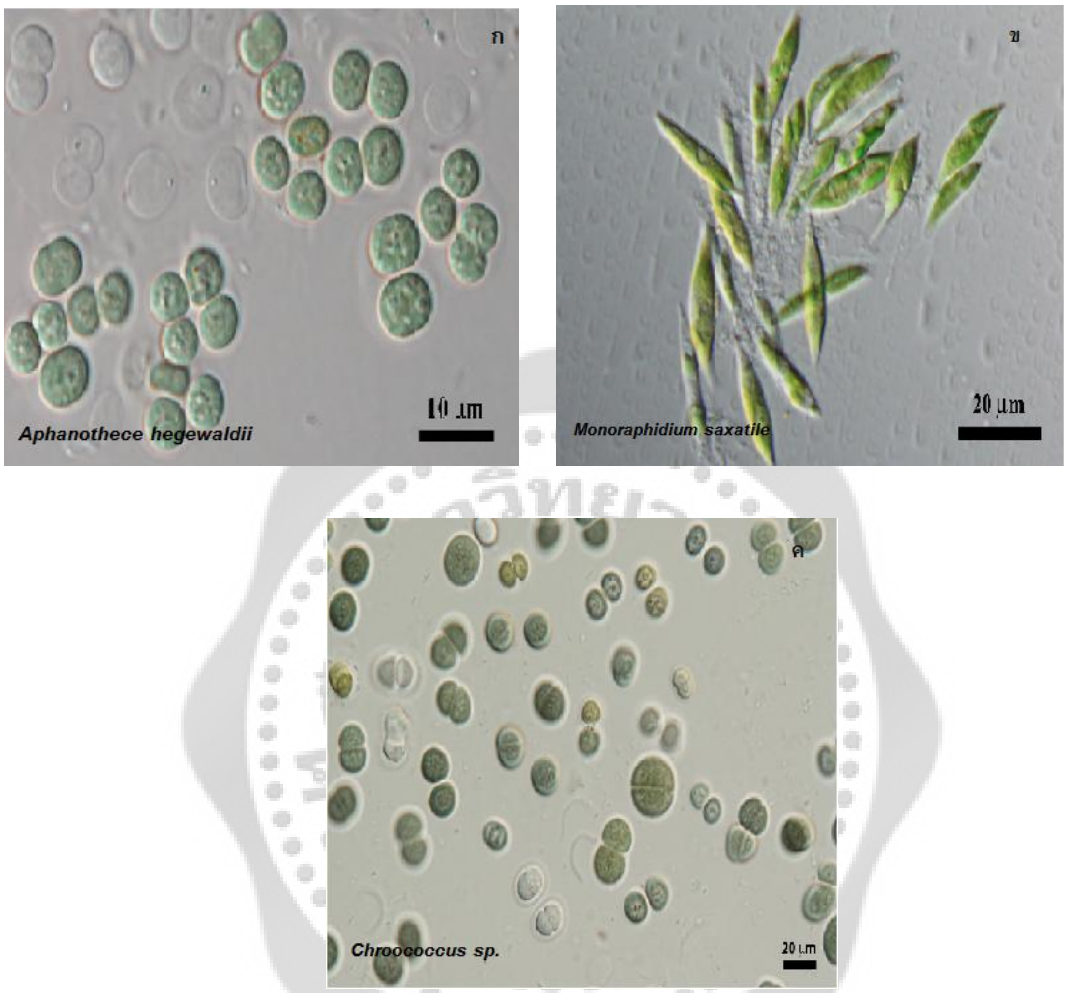
ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) เป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มโพรคาริโอต (prokaryote) มีความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) สามารถอาศัย อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ แตกต่างกัน เช่น อุณหภูมิสูงหรือความเค็ มสูง (Hagemann; & Erdmann. 1997) โครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย มีผนังเซลล์ที่มีส่วนประกอบของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) คล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ไม่มีแฟลกเจลลา (flagella) นอกจากนี้ ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ เช่น เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) เป็นกลุ่ม (colony) และเป็นสาย (filaments) (ภาพประกอบ 1 และ 2) นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียอาจมี โครงสร้างที่เรียกว่า อะคินีท (akinete) ทำหน้าที่ในการสร้างสปอร์เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งพบเฉพาะในพวกที่เป็นเส้นสาย มีผนังเซลล์หนาทำให้ทนทานต่อสภาพแ วดล้อมได้ดี (อุดมลักษณ์ มณีโชติ . 2552)

ไซยาโนแบคทีเรีย บางชนิดมีความสามารถ ในการตรึงแก๊สไนโตรเจน (nitrogen fixation) ในอากาศเพื่อช่วยในการปรับปรุงคุณภาพดินใน การทำนาข้าว (Venkataraman. 1981) บางชนิดมีเซลล์พิเศษ เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ (heterocysts) เป็นเซลล์ที่มีผนังหนา สามารถตรึง แก๊สไนโตรเจนจากอากาศเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีประโยชน์ต่อเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย ในการตรึงไนโตรเจน ที่เกิดขึ้นบริเวณ เฮเทอโรซิสต์ ของ ไซยาโนแบคทีเรียในภาวะที่เซลล์ ขาดสารประกอบไนโตรเจน (Wolk; Ernst; & Elhai. 1994) และการที่ไซยาโนแบคทีเรียจะนำธาตุไนโตรเจนไปใช้ประโยชน์ได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณของธาตุไนโตรเจนใน สิ่งแวดล้อมขณะนั้นด้วย (Viets. 1965)

นอกจากนี้ยัง มีการนำไซยาโนแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ เช่น เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ ใช้รักษาโรค และกำจัดน้ำเสีย เป็นต้น (เสน่จิต กิตตินา นนท์. 2542) และพบว่า มีการนำไซยาโนแบคทีเรียมาทำปุ๋ย เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียมีความสามารถในการอุ้มน้ำ และรักษาความชุ่มชื้นให้กับดินอยู่เสมอ (Dawson. 1966) ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียที่ศึกษา เป็นชนิดเส้นสาย มี 5 ชนิด

ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp.

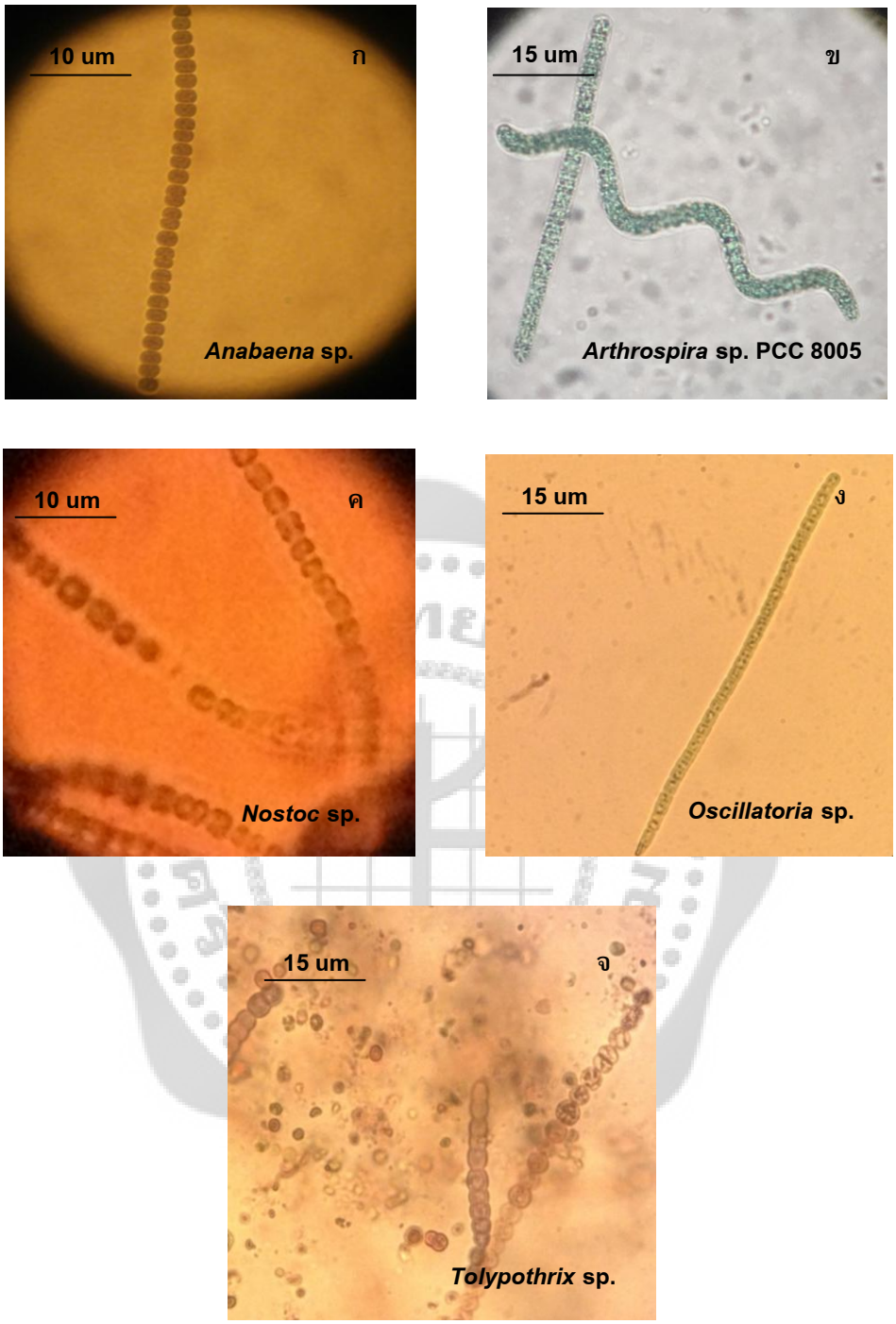


ภาพประกอบ 1 ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเซลล์เดี่ยว (ก) *Aphanothece hegewaldii* (ข) *Monoraphidium saxatile* (ค) *Chroococcus* sp.

ที่มา: *Aphanothece hegewaldii*. (2556). สืบค้นเมื่อ 20 มกราคม 2556, จาก http://ccala.butbn.cas.cz/col_images/16.jpg

ที่มา: *Monoraphidium saxatile*. (2556). สืบค้นเมื่อ 20 มกราคม 2556, จาก http://ccala.butbn.cas.cz/col_images/378.jpg

ที่มา: *Chroococcus* sp. (2556). สืบค้นเมื่อ 20 มกราคม 2556, จาก http://ccala.butbn.cas.cz/col_images/57.jp



ภาพประกอบ 2 ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสาย (ก) *Anabaena* sp.
(ข) *Arthrospira* sp. PCC 8005 (ค) *Nostoc* sp. (ง) *Oscillatoria* sp. (จ) *Tolypothrix* sp.

***Anabaena* sp.** (ภาพประกอบ 2 ก) เป็นไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะเป็นเส้นสายตรง มีเมือกหุ้ม เซลล์รูปร่างกลม สืบพันธุ์โดยการสร้างอะคินีทอยู่ภายในเส้นสาย มีเฮเทอโรซิสต์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527)

Kingdom: Monera
Division: Cyanophyta
Order: Oscillatoriales
Family: Nostocaceae
Genus: *Anabaena*
Species: *Anabaena* sp.

***Arthrospira* sp. PCC 8005** (ภาพประกอบ 2 ข) เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย มีขนาดเล็ก ซึ่งมีการศึกษาอนุภาคย่อยๆ ที่น่าสนใจสำหรับเชิงพาณิชย์ที่จะสามารถใช้เป็นอาหารเสริมทั้งมนุษย์และสัตว์ (Cohen; et al. 1997) หรือใช้ในอุตสาหกรรมผลิตยาและเครื่องสำอาง (Belay. 1993) นอกจากนี้ ช่วยในการบำบัดน้ำเสียได้เป็นอย่างดี (Lalibert´e; Olguin; & de la No¨ue. 1997)

Kingdom: Monera
Division: Cyanophyta
Order: Oscillatoriales
Family: Pseudanabaenaceae
Genus: *Arthrospira*
Species: *Arthrospira* sp. PCC 8005

***Nostoc* sp.** (ภาพประกอบ 2 ค) มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้าย *Anabaena* มาก แต่เส้นสายจะบิดงอมากกว่าและอยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก โดยฝังอยู่เป็นสารเมือกที่มีลักษณะเป็นวุ้นหนา มองดูเป็นก้อน ต้องขยี้เมือกที่หุ้มออกก่อน จึงจะเห็นเส้นสายจำนวนมาก เซลล์มีลักษณะกลมหรือค่อนข้างกลม เฮเทอร์โรซิสต์และอะคินีทจะอยู่ติดกัน หรือใกล้เคียงกัน และอยู่ในเส้นสาย ลักษณะที่ต่างจาก *Anabaena* อีกประการหนึ่งก็คือ ชีทที่หุ้มตรัยโคมมักจะหนามากกว่า *Anabaena* สาหร่ายชนิดนี้มักอยู่ตามพื้นดินที่ชื้นแฉะหรือตามหน้าผาชื้นๆ นำมารับประทานได้ โดยเฉพาะ *Nostoc commune* Vaucher มีลักษณะเป็นก้อนกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 - 2 เซนติเมตร บางชนิดมีลักษณะเหมือนเส้นผม ทางใต้เรียกว่า ผักผม นำมารับประทานได้เช่นกัน (ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549)

Kingdom: Monera
Division: Cyanophyta
Order: Oscillatoriales
Family: Nostocaceae
Genus: *Nostoc*
Species: *Nostoc* sp.

***Oscillatoria* sp.** (ภาพประกอบ 2 ง) เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นสายเดี่ยว แต่อาจจะรวมกลุ่มกันหนาแน่นในบางสภาพ ส่วนมากเซลล์ในเส้นสายมีความกว้างมากกว่าความยาวของเซลล์ ขนาดของเซลล์จะสม่ำเสมอตลอดสาย เซลล์ยอ ดจะมีลักษณะกลมมน ไม่มีชีทหุ้ม แต่มีน้ำใสๆ เรียกว่า วอเตอร์รีชีท (watery sheath) หุ้มอยู่ ไม่มีเฮเทอร์โรซิสต์ สืบพันธุ์ได้โดยขาดออกเป็นท่อนๆ (อุดมลักษณ์ มณีโชติ. 2552) สาหร่ายชนิดนี้เป็นชนิดที่พบได้บ่อยที่สุด และพบได้ทุกหนทุกแห่งที่มีความชื้น เช่น ตามพื้นดินที่ชื้นแฉะ ตามบ่อน้ำ คู ลำธาร ท่อระบายน้ำ ซึ่งมีอินทรีย์สารที่เน่าเปื่อย หรือบริเวณซักล้างที่มีการใช้ผงซักฟอก น้ำยาล้างจาน หรือสบู่ ซึ่งมีปริมาณฟอสเฟตสูง ไซยาโนแบคทีเรีย ชนิดนี้จึงจะเจริญเป็น กลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่เรียกว่า ตะไคร่น้ำ ซึ่งอาจมีสาหร่ายสกุลอื่นๆ เจริญอยู่ด้วย (ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549)

Kingdom: Monera
Division: Cyanophyta
Order: Oscillatoriales
Family: Oscillatoriaceae
Genus: *Oscillatoria*
Species: *Oscillatoria* sp.

***Tolypothrix* sp.** (ภาพประกอบ 2 จ) เป็นไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะเป็น เส้นสายที่แตกแขนงแบบแขนงเดี่ยว (false branch in single) ซึ่งมักเกิดติดกับเฮเทอร์โรซิสต์ที่อยู่ภายในเส้นสาย ลักษณะเซลล์คล้ายกับสกุล *Scytonema* ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มักพบอยู่ในน้ำ มีลักษณะเป็นก้อนหรือเป็นกระจุก เป็นปุยหรืออาจเกาะท่อนไม้ ก้อนหินที่จมอยู่ในน้ำ (อุดมลักษณ์ มณีโชติ 2552)

Kingdom: Monera
Division: Cyanophyta
Order: Oscillatoriales
Family: Microchaetaceae
Genus: *Tolypothrix*
Species: *Tolypothrix* sp.

ผลของความเครียดจากเกลือที่มีต่อไซยาโนแบคทีเรีย

ความเค็มเป็นปัจจัยสำคัญ สำหรับระบบนิเวศในน้ำ การเพิ่มความเค็มในอาหาร เลี้ยงไม่เพียงแต่ทำให้แรงดันออสโมติกสูงขึ้น แต่ ยังเพิ่มความเข้มข้นของ อิออนภายในเซลล์เป็นผลจากการสูญเสียน้ำที่มีอยู่ภายใ น (Hagemann; & Erdmann. 1997) เมื่อพืชได้รับความเครียดจากเกลือส่งผลให้ พืชเจริญภายใต้ภาวะที่มีความเค็มได้ไม่ดี เนื่องจ ากเกิดแรง ดันออสโมติกที่รากพืช เมื่อสัมผัสกับสารละลายที่มีเกลือในความเข้มข้นที่สูงทำให้เกิดความแตกต่างของค่าชลศักย์ (water potential) จึงเป็นผลทำให้พืชนำน้ำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยลงตามความเข้มข้นของสารละลายเกลือที่เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อความเข้มข้นของเกลือมากขึ้นทำให้ค่าของชลศักย์ของสารละลายในดินต่ำกว่าในต้นพืช จึงทำให้น้ำในเซลล์พืชเคลื่อนย้ายจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก ส่งผลให้พืชแสดงอาการขาดน้ำ และเกิดความเป็นพิษเนื่องจาก อิออนบางชนิด (ionic toxicity) เมื่อสารละลายในดินมีความเข้มข้นของ อิออนสูง ไซยาโนแบคทีเรีย จะดูดและสะสม อิออนเหล่านั้นจนถึงระดับเป็นพิษ และมีผลโดยตรงต่อสรีรวิทยาของ ไซยาโนแบคทีเรีย (วิชิตพล มีแก้ว ; ณัฐพล ขันธปราบ ; และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. 2553) ในไซยาโนแบคทีเรีย มีการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อความเครียดจากเกลือ โดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับสองกระบวนการ คือ การเพิ่มประสิทธิภาพระบบการ ขนส่งอิออน และการสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ (Reed; & Stewart. 1985) หลังจากการเพิ่มความเค็มในอาหารเลี้ยง ปริมาณ Na^+ และ Cl^- ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ตามด้วยการไหลออก ของอิออน Na^+ เกิดขึ้นแบบแอนติพอร์ท (antiport) ระหว่าง Na^+ และ K^+

แคนโตเดอลอรา ดูบาโค และโธมัส (Canto de Loura; Dubaco; & Thomas. 1987) พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถนำสารประกอบไนโตรเจนที่เก็บสะสมไว้มาใช้ได้ และเมื่อนำ *Oscillatoria splendid* ไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน พบว่ารงควัตถุไฟโคไซยานินถูกสลายไปเป็นไนโตรเจนที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถใช้ได้ ทำให้ปริมาณไฟโคไซยานินลดลงอย่าง

เห็นได้ชัด และไฟโคไซยานินจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อเติมไนโตรเจนลงในอาหาร และยังมีการสะสมของแป้งและไขมันเพิ่มมากขึ้น

อรัญ อินเจริญศักดิ์ (2532) ทำการศึกษาอิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของไซยาโนแบคทีเรียชนิด *Aphanothece halophytica* พบว่าในระยะ Late log phase เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จากสภาวะปกติ 0.5 โมลาร์ เป็น 1 โมลาร์ และ 2 โมลาร์ เซลล์มีความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นตามลำดับ ในช่วง Lag phase การเจริญของเซลล์ที่เลี้ยงในโซเดียมคลอไรด์ 2 โมลาร์ จะช้ากว่าที่เลี้ยงใน 1 และ 0.5 โมลาร์ ส่วนอัตราการเจริญในช่วง Log phase ไม่มีความแตกต่างกัน การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จาก 0.5 โมลาร์ เป็น 2 โมลาร์ หรือจาก 2 โมลาร์ เป็น 0.5 โมลาร์ อย่างกระทันหัน ทำให้แอคทิวิที (activity) ของเอนไซม์ไรโบนิว คลีเอสเพิ่มขึ้นในช่วงระยะเวลา 36 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ในระยะยาว อัตราการเปลี่ยนแปลงแอคทิวิที ของเอนไซม์ตัวนี้ไม่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 หรือ 1 หรือ 2 โมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่าในหลอดทดลองของโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลยับยั้งแอคทิวิทีของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

วิภาวี แบบประเสริฐ (2542) ศึกษาการนำไนเตรตและฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ภายใต้ภาวะปกติและความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ การเจริญเติบโตของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียลดลงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ พบว่าเมื่อความเข้มข้นเกลือเพิ่มขึ้นถึง 350 มิลลิโมลาร์ อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง อีกทั้งพบว่าภายใต้ภาวะที่ขาดไนเตรตในอาหารเลี้ยง เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ขณะที่ภายใต้ภาวะที่ขาดฟอสเฟตเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ แต่ต่ำกว่าปกติตั้งแต่วันที่ 3 แสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถปรับตัวได้ในภาวะที่ขาดฟอสเฟต ต่อมาศึกษาการนำไนเตรตและฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ภายใต้ความเครียดของเกลือพบว่า การนำไนเตรตและฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ลดลง 2 เท่าที่ความเข้มออสโมติก 685 mOsm/kg ซึ่งแสดงว่าการขนส่งไนเตรตและฟอสเฟตขึ้นอยู่กับความเค็มภายนอกเซลล์

สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ (2548) ศึกษาปริมาณสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่พบในไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* เจริญภายใต้ภาวะที่มีความเครียดของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 – 3.0 โมลาร์ พีเอช 6.5 – 10.5 พบว่าเซลล์เจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และ พีเอช 9.5 ตามลำดับ ศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญของเซลล์ ขนาดของเซลล์ สารประกอบภายในเซลล์ องค์ประกอบของกรดอะมิโน และ รูปแบบของโปรตีนภายใต้ภาวะที่มีความเครียดของเกลือ พบว่า การเจริญของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นภายใต้ภาวะที่มีความเครียดของเกลือ พบว่า เซลล์มีขนาดเพิ่มขึ้น มีการสะสมไกลซีนบีเทนเพิ่มขึ้น และไอออนโซเดียม โพแทสเซียม แอมโมเนียม และไนเตรต มีการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่เด่นชัด เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่มีความเครียดจากเกลือ กลูตามีนเป็นกรดอะมิโนที่พบมากที่สุดทั้งสองภาวะ และพบกรดอะมิโนกลูตามีน แอสปาเตต โพรลีน และกลูตาเมต เพิ่มขึ้นภายใต้ภาวะที่มีความเครียดของเกลือ

ศิริลักษณ์ นามวงศ์ (2553) ศึกษาแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือ ซึ่ง มีประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้หลากหลาย ในอุตสาหกรรมเครื่องสำ อางและด้านเอนไซม์เทคโนโลยี ใช้ Compatible solutes เช่น ectoine และ hydroxyectoine เป็นสารให้ความเสถียรต่อสารชีวโมเลกุลและสารลดสภาวะเครียดของเซลล์ สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเค็ม เช่น ไฮดานโตอิเนส (hydantoinase) อะกาเลส (agarase) และ โปรติเอส (protease) และอื่นๆ ที่สามารถแสดงกิจกรรมและมีความเสถียรในสภาวะที่มีเกลือ รวมทั้งเซลล์ของแบคทีเรียชอบเค็มมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตอาหารหมัก และการผลิตสารให้กลิ่นรส สำหรับด้านสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียชอบเค็มสามารถย่อยสลายสารมลพิษอินทรีย์และสามารถผลิต พอลีเมอร์ชีวภาพ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและพอลีแซคคาร์ไรด์

อิออน (ions)

อิออน คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่สูญเสีย หรือได้รับอิเล็กตรอนวงนอกสุด (valency electron) ที่มีประจุสุทธิทางไฟฟ้าเป็นบวก หรือเป็นลบ อิออนที่มีประจุลบ จะมี อิเล็กตรอน ในชั้นอิเล็กตรอน (electron shell) มากกว่าที่มันมีโปรตอนในนิวเคลียส เราเรียกอิออนชนิดนี้ว่า แอนอิออน (anion) ส่วนอิออนที่มีประจุบวก จะมีอิเล็กตรอนน้อยกว่าโปรตอน เราเรียกว่า แคทอิออน (cation) ตัวอย่างของอิออน เช่น Cl^-, Na^+, และ Ca^{2+} (Knoll. 1999)

การดูดอิออน (ion absorption) คือ การที่สารหนึ่งดูดอิออนเข้ามาสะสมไว้ในตัว หรือการเคลื่อนที่ของอิออนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์ หากมีอิออนอยู่บริเวณผนังเซลล์หรือบริเวณนอกเยื่อหุ้มเซลล์ เรียกว่า การดูดซับอิออน (ion adsorption)

การขนส่งอิออน (ion transport) คือ การเคลื่อนย้ายของอิออนในของเหลวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เข้าไปภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (ยงยุทธ โอสถสภา. 2552)

สำหรับพืชหรือสิ่งมีชีวิตที่ส ามารถปรับตัวได้จะใช้กลไกการแลกเปลี่ยนอิออนระหว่างภายนอกและภายในเซลล์ หรือการสะสมสารบางชนิด เช่น สารอินทรีย์ กรดอะมิโนหรือ น้ำตาล ซึ่งได้มีการทดลองใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ทำให้เกิดภาวะเป็ นพิษ สารละลายนี้จะให้ โซเดียมอิ-ออนและคลอไรด์อิออน และใช้พอลิเอทธิลีนไ กลคอลทำให้เกิดภาวะแห้งแล้งดังเช่นที่เกิดขึ้นในธรรมชาติโดยควบคุมให้แรงดันออสโมติกเท่ากัน พืชที่ใช้ในการทดสอบคือ พืชเศรษฐกิจ 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวบาเลย์ ถั่วแดง และถั่วเขียว นำไปเพาะปลูกภายใต้สภาวะความเค็ม จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการกระจายตัวของสารอนินทรีย์ (Cl^-, Na^+, K^+ และ NO_3^-) สารละลายอินทรีย์ (กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ และ น้ำตาล) และปริมาณโพรลีน (Laloknam; et al., 2008; Saffan, 2008)

จุฑาแข วังสุภา (2544) ศึกษาการนำไนเตรตเข้าเซลล์ได้มีการศึกษาในแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* โดยการวัดปริมาณไนเตรตที่เหลืออยู่ในสารละลาย การศึกษากลไกทาง

จลนพลศาสตร์ของการนำไนเตรตเข้าเซลล์ พบว่าในภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากแรงดันออสโมติกมีค่า K_s = 416 และ 450 มิลลิโมลาร์ และอัตราเร็วสูงสุด = 9.1 และ 5.3 mmol/min/mgCh1 ตามลำดับ ความสามารถการนำไนเตรตเข้าเซล ล์ลดลงอย่างมากโดยการเติมแอมโมเนียมและตัวยับยั้งกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์คือ DL-glyceraldehyde ตัวยับยั้งการนำแอมโมเนียมไปใช้เช่น L-methionine sulfoximine ปลดปล่อยการถูกยับยั้งด้วยแอมโมเนียมจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการนำ ไนเตรตไปใช้ประโยชน์ถูกควบคุม โดยแอมโมเนียมและกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ไนไตรต์เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันที่มีประสิทธิภาพของการนำไนเตรตเข้าเซลล์ โดยมีค่า K_i = 84 มิลลิโมลาร์ ไนไตรต์และไนเตรตอาจถูกขนส่งด้วยตัวพาชนิดเดียวกัน monensin ลดการนำไนเตรตเข้าเซลล์ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการนำไนเตรตเข้าเซลล์ถูกควบคุมโดยการรักษาสภาพของ Na^+ electrochemical gradient ให้คงไว้ amiloride ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของกระบวนการ Na^+/H^+ antiport และ Na^+channels พบว่าลดอัตราการนำไนเตรตเข้าเซลล์ทำให้เห็นว่าการนำไนเตรตเข้าเซลล์ของ *Aphanothece halophytica* อาจมีผลมาจากกระบว นการ Na^+/H^+ antiport *N,N*-dicyclohexylcarbodiim และ carbonyl cyanide trifluoromethoxyphenylhydrazone เป็นตัวยับยั้งที่ดีของการนำไนเตรตเข้าเซลล์ใน *Aphanothece halophytica* จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า pH gradients ที่มาจากกระบวนการ H^+/ATPase น่าจะเป็นตัวขับดันให้เกิดการนำไนเตรตเข้าเซลล์ใน *Aphanothece halophytica*

ไร และชาร์มา (Rai; & Sharma. 2006) ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของฟอสเฟตใน *Anabaena doliolum* ที่คัดแยกได้จากบริเวณนาข้าวภายใต้ภาวะที่มีความเค็ม พบว่า การเจริญ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และปริมาณโปรตีนลดลงเมื่อปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น ปริมาณฟอสเฟตและการนำเข้าฟอสเฟตลดลง ผลรวมของแอคทิวิทีของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงขึ้น โดยในส่วนภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 7 เท่า และในส่วนที่จับกับเซลล์ลดลงประมาณ 3 เท่า อาหารที่ไม่มีฟอสเฟตมีผลกระทบต่อความเข้มข้นของโปรตีนและคลอโรฟิลล์มากกว่าอาหารที่มีฟอสเฟต ในขณะที่อาหารที่มีหรือไม่มีฟอสเฟตมีผลเล็กน้อยต่อความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรต สรุปได้ว่าการเจริญเติบโตภายใต้ภาวะที่มีความเค็มลดการนำเข้าฟอสเฟตใน *Anabaena doliolum*

ดิง และคณะ (Ding; et al. 2008) ศึกษาพบว่า การขาดแมกนีเซียมในพืชมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ ด้วยแสงและเมแทบอลิซึม โดยทำการศึกษาในข้าว (*Oryza sativa* L.cv. ‘Wuyunjing 7’) ปลูกด้วยวิธีไฮโดรโพนิกในห้องเรือนกระจก โดยตรวจสอบการเกิดภาวะอนุมูลอิสระเกินและผลจากการตอบสนองต่อสารต้านอนุมูลอิสระในใบข้าวในภาวะที่ขาดแมกนีเซียม เมื่อนำข้าวที่ปลูกเป็นเวลา 21 วัน มาตรวจสอบพบแมกนีเซียมต่ำลง (0.2 mmol L/ความต้องการแมกนีเซียมหลังปลูก 2 สัปดาห์) และปริมาณโพแทสเซียมสูงขึ้น (6 mmol L-1) แสดงให้เห็นว่าข้าวขาดแมกนีเซียมมากและแมกนีเซีย มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การขาดแมกนีเซียมในใบส่งผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ กระบวนการสังเคราะห์ ด้วยแสง และการละลายของโปรตีนที่ละลายน้ำ แต่ปริมาณน้ำตาล malondialdehyde (MDA) และแอคทิวิที superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)

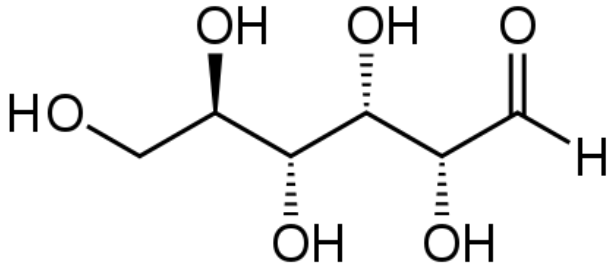
และ peroxidase (POD) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมในใบและการปลด ปล่อยชีวมวลซึ่งเป็นความสัมพันธ์เชิงลบกับแอคทิวิที 3 เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของ MDA ในใบ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเมื่อโพแทสเซียมสูงส่งผลให้เกิดการขาดแมกนีเซียมและสร้างความเสียหายแก่ข้าว

มิชรา และคณะ (Mishra; et al. 2010) ศึกษาการเคลื่อนที่ของ Ca^{2+} ที่ไม่บริสุทธิ์ในน้ำเค็มโดยไซยาโนแบคทีเรียจาก Gujarat coast ประเทศอินเดีย เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเกลือ พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Anabaena* และ *Synechocystis* เมื่อนำมาทดลองโดยการนำไซยาโนแบคทีเรียดังกล่าวมากำจัดแคลเซียมไอออนจากน้ำทะเลและดินเค็ม พบว่าปริมาณแคลเซียมในน้ำลดลง และเมื่อนำไซยาโนแบคทีเรียมาใช้อีกครั้งพบว่า มีการเคลื่อนที่ของแคลเซียมและมีการระเหยของน้ำมากขึ้นนอกจากการได้รับแสง เมื่อนำไซยาโนแบคทีเรียไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบผลึกเกลือแบบ aragonite และ calcite ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี SEM-EDX และ powder XRD

สารออสโมโพรเทคแทนต์

สารออสโมโพรเทคแทนต์ (osmoprotectant) หมายถึง สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลของน้ำ และแรงดันออสโมติกภายในเซลล์กับสิ่งแวดล้อม ทำให้สิ่งมีชีวิตปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ สารออสโมโพรเทคแทนต์มีหลายชนิด ได้แก่ น้ำตาล อนุพันธ์ของน้ำตาล กรดอะมิโน และอนุพันธุ์ของกรดอะมิโน เช่น น้ำตาลซูโครส โพรลีน และไกลซีนบีเทน เมื่อไซยาโนแบคทีเรียได้รับความกดดันจากสภาพแวดล้อม เช่น ความเค็มสูง การขาดน้ำ เป็นต้น ไซยาโนแบคทีเรียจะมีการปรับตัวโดยการพัฒนากลไกของร่างกายโดยการสร้างสารออสโมโพรเทคแทนต์ขึ้น (Ueda; Yamamoto-Yamane; & Takabe. 2007) ซึ่งสารออสโมโพรเทคแทนต์ที่พืชสร้าง ได้แก่

1. น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) เป็นน้ำตาลที่มีกลุ่มอัลดีไฮด์ (aldehyde) หรือคีโตน (ketone) ที่เป็นอิสระ ถูกออกซิไดส์ได้ง่ายด้วยตัวออกซิไดส์ (oxidizing agent) อย่างอ่อน หรือเกิดจากการรวมตัวกันของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของอะโนเมริคคาร์บอน (anomeric carbon: C1) ของน้ำตาลตัวหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของคาร์บอนอะตอมอื่นที่ไม่ใช่ อะโนเมริคคาร์บอนของน้ำตาลอีกตัวหนึ่ง ทำให้มีกลุ่มของน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ (Campbell; & Farrell. 2012) ดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำตาลกลูโคส

ที่มา: Reducing sugar. (2554). สืบค้นเมื่อ 20 มกราคม 2556, จาก http://en.wikipedia.org/wiki/File:Glucose_chain_structure.svg

เดสแพลทส์ และซาเลอโน (Desplats; Folco; & Salerno. 2005) ได้ค้นคว้าในเรื่องนี้ และสรุปว่า การสะสมซูโครสชั่วคราวร่วมกับบทบาทที่สำคัญของไดแซคคาไรด์ (disaccharide) ในเซลล์ *Synechocystis* เมื่อได้รับความเครียดจากเกลือ พบว่า เซลล์ในระยะ stationary phase ซูโครสอาจจะมีบทบาทที่แตกต่างในการเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ และนอกจากนี้เซลล์ *Synechocystis* เมื่อได้รับความเครียดจากเกลือมีการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสซึ่งอาจจะมีผลต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์ SPS (sucrose phosphate syntase) และการถอดรหัสของยีน SPS ในการสะสมชั่วคราวและระดับซูโครสที่ต่ำในภาวะความเครียดจากเกลือ อาจทำให้เข้าใจได้ว่าไดแซคคาไรด์อาจจะมีส่ วนร่วมในการเชื่อมต่อ และตอบสนองการทำงานทั่วไปเมื่อได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อม

ตุลาพร แก้วแก่น และ วัฒนา พัฒนากูล (2549) ศึกษาอิทธิพลของสภาวะขาดน้ำที่เกิดจากความแล้ง และที่เกิดจากความเครียดเกลือ ต่อลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการและเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (Oryza sativa L. cv. Khao Dawk Mali 105) ระยะต้นกล้า โดยทำการปลูกต้นข้าวในอาหารสูตร MS โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม สภาวะแล้งเกิดจากการเติม sorbitol ในอาหารเพาะเลี้ยงและสภาวะเครียดเกลือเกิดจากการเติม sodium chloride ในอาหารเพาะเลี้ยงในความเข้มข้น 0, 50,100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ ปลูกเป็นเวลา 15 วัน พบว่าข้าวที่ปลูกในสภาวะแล้งจะมีความยาวรากเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ข้าวที่ปลูกในสภาวะเครียดเกลือจะมีความยาวรากลดลง ความยาวลำต้นของข้าวทั้งสองกลุ่มมีค่าลดต่ำลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยข้าวที่ปลูกในสภาวะเครียดเกลือจะมีความยาวลำต้นต่ำกว่าข้าวที่ปลูกในสภาวะแล้ง น้ำหนักสดของข้าวที่ปลูกในสภาวะแล้งจะมีค่าต่ำกว่าข้าวที่ปลูกในสภาวะเครียดเกลือ ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในใบของข้าวทั้งสองกลุ่มลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในใบของข้าวพบว่า ปริมาณน้ำตาลรวมและน้ำตาลซูโครสในใบของข้าวทั้งสองกลุ่ม มี

ค่าเพิ่มขึ้นโดยข้าวที่ปลูกในสภาวะแล้งจะมีปริมาณน้ำตาลสูงกว่า นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณแป้งในใบของข้าวทั้งสองกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้น โดยข้าวที่ปลูกในสภาวะแล้งจะมีปริมาณแป้งสูงกว่าเมื่อเทียบกับข้าวที่ปลูกในสภาวะเครียดเกลือ

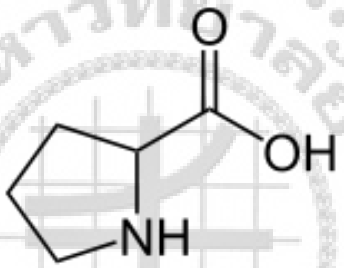
2. ไขมัน (Lipid) มีสมบัติทางกายภาพคือไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้ไม่ดี แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายไม่มีขั้ว เช่น เบนซีน (benzene) อีเทอร์ (ether) คลอโรฟอร์ม (chloroform) เฮกเซน (hexane) เป็นต้น การที่ไขมันไม่ละลายน้ำเป็นเพราะโ ครงสร้างทางเคมีมักจะไม่มีขั้ว (nonpolar) หรือมีขั้วน้อยมาก ซึ่งในเซลล์และออร์แกเนลล์ (organelle) จะมีฟอสโฟลิพิด (phospholipid) เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มชีวภาพ (membrane transport) (พัชรี บุญศิริ. 2551)

ซาเลม และคณะ (Salem; et al. 2004) ศึกษาผลของความเค็มต่อการเปลี่ยนแปลงไขมันใน *Catharanthus roseus* พบว่า เมื่อได้รับเกลือส่งผลให้การเจริญของ *Catharanthus roseus* ลดลง และพบว่ามีสารแขวนลอยจำพวกไขมันเพิ่มขึ้น สังเกตได้จากปริมาณของฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ที่สูงขึ้น ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) จำพวกฟอสฟาทิดิลโคลีน (phosphatidylcholine: PC) และ ฟอสฟาทิดิลเอธาโนลามีน (phosphatidylethanolamine: PE) ในขณะที่ไกลโคลิพิด (glycolipid) จำพวกโมโนกาแลคโตซิลไดอาซิล กลีเซอรอล (monogalactosyldiacylglycerol: MGDG) และไดกา-แลคโตซิวไดอาซิวกลีเซอรอล (digalactosyldiacylglycerol: DGDG) มีปริมาณลดลง และในที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ องค์ประกอบของกรดไขมันมีการปรับเปลี่ยนอย่างชัดเจน ในขณะที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ มีการ เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยที่ความเค็มส่งผลให้ปริมาณของกรดปามิติก (palmitic) ลดลง (16:0) และกรดไลโนเลอิก (linolenic) เพิ่มขึ้น (18:2) จากผลดังกล่าวพบว่า ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ในฟอสโฟลิพิดชนิด PC, PE และในไกลโคลิพิด จำพวก DGDG ค่าความหืนของไขมัน (Double Bond Index : DBI) เพิ่มขึ้นมากว่า 2 เท่าในกรดไขมัน ทั้งไกลโคลิพิดและฟอสโฟลิพิด และนอกจากนี้ ปริมาณสเตอรอล (sterol) อิสระ เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ free sterols /phospholipids (St/PL) อัตราส่วนลดลงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าผลของความเค็มทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้ของเหลวภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Catharanthus roseus* เพิ่มขึ้นด้วย

เนฟฟาติ และมาซุค (Neffati; & Marzouk. 2008) ศึกษาอิทธิพลของความเค็มต่อการผลิตน้ำมันหอมระเหยและองค์ประกอบกรดไขมันในใบผักชีตูนิเซียที่ปลูกโดยวิธีไฮโดรโพนิค วิเคราะห์หาองค์ประกอบของ สารระเหยและกรดไขมันของใบ ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น โซเดียมคลอไรด์ 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ ให้ผลผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้นอย่างมากถึง 18 และ 43% และลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเค็มสูง สารระเหยในใบที่สำคัญคือ (E) - 2 - decenal กับ 52% จากทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย ตามด้วย decenal, dodecanal, (*E*)-2-tridecenal และ(*E*)-2-

dodecenal ทั้งนี้ปริมาณสารขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ความเค็มลดลงทำให้ปริมาณกรดไขมันที่ใบเพิ่มขึ้น α-Linolenic (C18:3n3) เป็นองค์ประกอบหลักและตามด้วย linoleic (C18:2n6), linoleic (C18:2n6), heptadecenoic (C17:1n7) และ กรด palmitic (C16:0) การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดไขมันไม่อิ่มตัวไปเป็นกรดไขมันอิ่ มตัว การลดลงส่งผลให้เกิดเซลล์เมมเบรนที่แข็งแรงขึ้น

3. โพรลีน (Proline) เป็นกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็น สารออสโมโพรเทคแทนต์ที่รู้จักกันดี การสะสมของโพรลีนเป็นที่สังเกตกันอย่างแพร่หลายในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ภายใต้ความเค็ม (Ueda; Yamamoto-Yamane; & Takaba. 2007) และเป็นกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นโปรตีนของสิ่งมีชีวิตทั้งในพืช สัตว์ และแบคทีเรีย พบสองรูปแบบ คือ โพรลีนอิสระ และโพรลีนร่วม ที่ (สุกัญญา ใจโพธิ์. 2545) มีสูตรโมเลกุล $C_5H_9NO_2$ ดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างโพรลีน

ที่มา: Prolin – Proline. (2554). สืบค้นเมื่อ 1 พฤศจิกายน 2554, จาก http://en.wikipedia.org/wiki/File:Prolin_-_Proline.svg

สุกัญญา ใจโพธิ์ (2545) ศึกษาผลของสภาวะเครียดจากน้ำทั้งการงดน้ำและให้น้ำท่วมขังเป็นระยะเวลา 10 วัน ในระยะออกดอกและติดผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโพรลีน การเจริญเติบโตของต้นรวมถึงผลผลิตของสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทาน 70 พบว่าการงดน้ำทันทีในระยะออกดอกและติดผลของต้นที่ปลูกในกระถางทำให้ปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้นเป็น 6.24 และ 57.76 เท่าของต้นที่ได้รับน้ำปกติตามลำดับ สำหรับก ารให้น้ำท่วมขังในระยะติดผลมีการสะสมปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้นเป็น 5.53 เท่าของต้นที่ได้รับน้ำปกติ จากการทดลองในสภาพแปลงปลูกภายใต้การงดน้ำมีผลทำให้เกิดการสะสมของโพรลีนในระยะออกดอกและระยะติดผลเป็น 1.43 และ 4.35 เท่าของต้นที่ได้รับน้ำปกติ เมื่อพิจารณาจากการตอบสนอง ของต้นสตรอเบอรี่ที่ได้รับสภาวะเครียดจากการงดน้ำเป็นระยะเวลา 10 วัน จากลักษณะที่ศึกษา ได้แก่ ความกว้างใบ ความยาวใบ น้ำหนักสดและ

น้ำหนักแห้งของใบ ขนาดทรงพุ่ม จำนวนหน่อ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของราก รวมถึงขนาดผล ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ส่วนคุณภาพภายในผลภายใต้การ งดน้ำในระยะติดผลทั้งการงดน้ำทันที และงดน้ำทีละน้อย ทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้มีค่ามากกว่าต้นที่ได้รับน้ำปกติ ในสภาวะการให้น้ำท่วมขังของต้นที่ปลูกในกระถางมีผลทำให้การเจริญเติบโตทางลำต้นคือ ขนาดทรงพุ่ม ความกว้างใบ ความยาวใบ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของใบ และพื้นที่ใบไม่แตกต่างจากต้นที่ได้รับน้ำปกติ อย่างไรก็ตามการให้น้ำท่วมขังในระยะติดผลทำให้เปอร์เซ็นต์การติดผลลดลงเป็น 39.31 เปอร์เซ็นต์ ขนาดผลเล็ก และมีปริมาณวิตามินซีน้อยกว่าต้นที่ได้รับน้ำปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ปลูกในแปลงภายใต้สภาวะความเครียดจากน้ำ ทั้งสองแบบในระยะติดผลไม่มีความแตกต่างทางด้านการเจริญเติบโตที่ชัดเจนนักจากชุดควบคุม แต่จากการศึกษาการติดผลของต้นที่ได้รับการงดน้ำและให้น้ำท่วมขังในระยะติดผลมีค่าเท่ากับ 64.65 และ 66.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าต้นที่ได้รับน้ำปกติที่มีการติดผลเท่ากับ 49.21 เปอร์ซ็นต์ และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้มีค่ามากกว่าต้นที่ได้รับน้ำปกติ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองในกระถาง

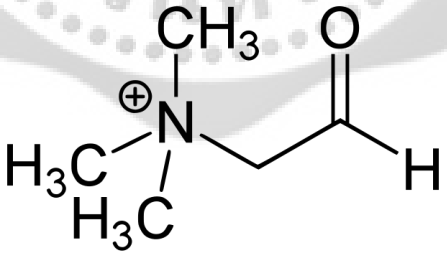
คริส และคณะ (Chris; et al. 2006) ศึกษาผลของความเค็มที่มีผลต่อไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนชนิด *Cylindrospermum* sp. โดยทำการศึกษาที่ ความเข้มของของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 50 และ 100 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 4 วัน พบว่า โซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้การเจริญ ปริมาณคลอโรฟิลล์ และแอคทิวิทีของPSII ลดลง แต่ระดับของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โพรลีน การไหลออกของสารอิเล็กโทรไลต์ และลิปิดเพอร์ออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ซึ่ งผลการทดลองเมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์ไม่แตกต่างกับการได้รับรังสี UV-B ที่ 15 และ 60 นาที (0.18 และ 0.72 กิโลจูลต่อตางรางเมตร ตามลำดับ) ในขณะเดียวกันการได้รับ UV-B และการได้รับโซเดียมคลอไรด์พร้อมกัน ส่งผลให้เปอร์ออกไซด์ , MDA (Malondialdehyde) และการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การได้รับโซเดียมคลอไรด์ก่อนการได้รับรังสี UV-B ทำให้การสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน และการไหลออกของสารอิเล็กโทรไลต์ลดลงเป็นอย่างมาก ซึ่งผลที่ได้ไม่แตกต่างกับเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียเมื่อมีสร้างโพรลีนขึ้นมาภายนอก และหลั งจากได้รับรังสี UV-B งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นบทบาทของการสะสมโพรลีนภายใต้ความเครียดจากเกลือที่สังเกตจากผลของความเค็มใน *Cylindrospermum* sp. จากการได้รับรังสี UV-B

อูเอดะ ยามาโมโตะยามาเนะ และทากาเบะ (Ueda; Yamamoto-Yamane; & Takabe. 2007) ศึกษาการสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ชนิดโพรลีนเพิ่มขึ้นเมื่อพืชมีการตอบสนองต่อความเค็ม เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Immunohistochemistry พบว่า โพรลีนทรานสพอร์เตอร์ (HvProT) มีการแสดงออกที่ปลายรากของข้าวบาร์เลย์ภายใต้ความเครียดจากเกลือ โพรลีนอิสระสะสมที่บริเวณส่วนฐานของรากมากกว่าส่ วนปลายของรากข้าวบาร์เลย์ภายใต้ความเครียดจากเกลือ ทั้งนี้ระดับการแสดงออกของ HvProT สูงกว่าที่บริเวณปลายราก ในทางตรงข้ามความเครียดจากเกลือเพิ่มปริมาณโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนในผนังเซลล์ส่วนปลายรากซึ่งอธิบายการใช้โพรลีน นอกจากนั้นการแสดงออกของยีนโปรตีนผนังเซลล์ (โปรตีนและเอกซ์เทนซินที่โพรลีนมาก) และมีการชักนำเอนไซม์เซลลูโลสซินเทสในรากข้าวบาร์เลย์ภายใต้ความเครียดจากเกลือ งานวิจัยนี้แสดง

ให้เห็นว่า โพรลีนอิสระขนส่งด้วย HvProT ที่เกี่ยวข้องกับส่วนประกอบของการสังเคราะห์ผนังเซลล์ในบริเวณปลายรากของข้าวบาร์เลย์ภายใต้ความเครียดจากเกลือ

วาสินี พงษ์ประยูร (2551) ศึกษาการสะสมโพรลีนในสายพันธุ์ข้าวที่ทนเค็มและไม่ทนเค็มของข้าวชนิดอินดิกา (*Oryza indica*) ซึ่งประกอบด้วย พันธุ์ข้าวทนเค็มจำนวน 8 พันธุ์ปลูก ประกอบด้วย พันธุ์ พ็อกคาลี หอมแพพะโล้ หอมสะดุ้ง หอมจัน หอมนางนวล หอมตั้ง หอมแม่จันทร์ หอมแพร่ และพันธุ์ไม่ทนเค็ม IR29 โดยการเพาะเลี้ยงภายใต้ระบบที่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งพลังงาน และให้ได้รับเกลือความเข้มข้น 0, 171, 342, 513, และ 684 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เป็นเวลา 4 วัน ต้นข้าวทุกพันธุ์มีปริมาณสารโพรลีนเพิ่มขึ้นตามความ เข้มข้นของเกลือที่เพิ่มมากขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งการสะสมสารโพรลีนมีรูปแบบในคล้ายกันในข้าวทุกพันธุ์ ยกเว้นในข้าวพันธุ์หอมแพพะโล้ที่มีการสะสมสารโพรลีนเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องตามความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ในพันธุ์ข้าวทนเค็ม ยังมีพื้นที่ใบเขียวมากกว่าในพันธุ์ข้าวไม่ทนเค็ม (IR29) อีกด้วย

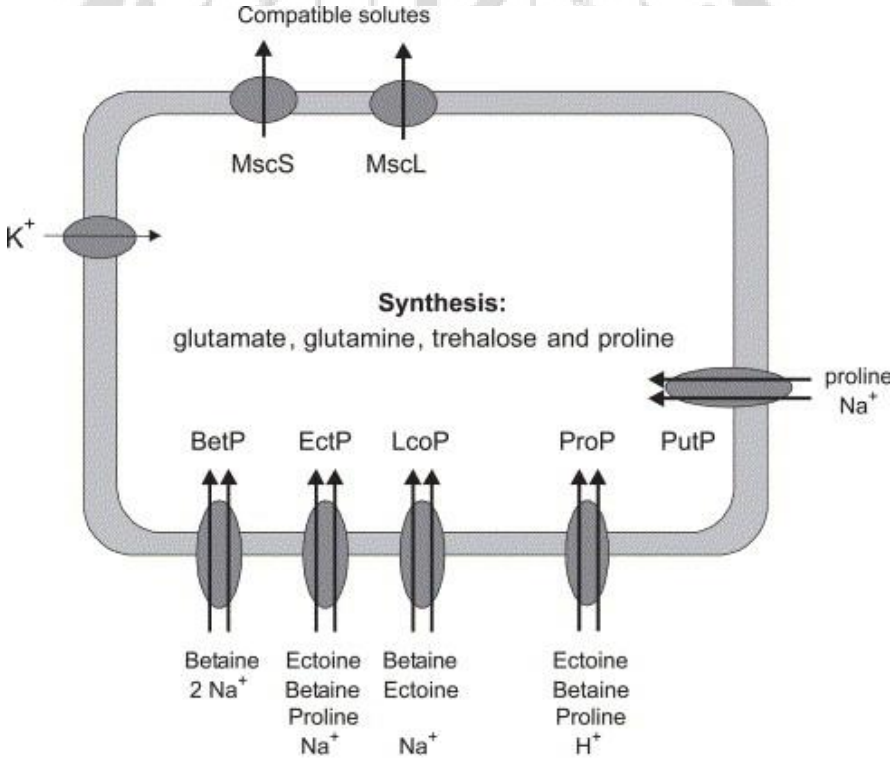
4. บีเทน (Betaine) เป็นสารประกอบชีวภาพ ซึ่งเป็นตัวกลางในกระบวนการเมแท - บอลิซึมของโคลีน (coline metabolism) (สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2548) และเป็นสารที่ไม่อันตรายต่อสิ่งมีชีวิต (Kettunen; Peuranen; Tiihonen. 2001) บีเทนเมื่อนำมาสกัดแล้วจะมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว โดยบีเทนมีคุณสมบัติ ได้แก่ เป็นสารที่สำคัญที่ให้หมู่เมทธิลในกระบวนการเมแทบอลิซึม (Scott. 1986) รวมทั้งทำหน้าที่เป็นสารที่ควบคุมสมดุลเกลือแร่ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมภายนอก (Castrol; Battaglia; & Virtanen. 1998) มีสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{38}N_2O_3$ ดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 สูตรโครงสร้างบีเทน

ที่มา: Betaine aldehyde. (2554). สืบค้นเมื่อ 1 พฤศจิกายน 2554, จาก http://en.wikipedia.org/wiki/File:Betaine_aldehyde.svg

บีเทนมีหน้าที่ช่วยป้องกันเซลล์จากความเครียดและกระบวนการป้องกันตัวเองของ บี-เทนในพืชและจุลินทรีย์จากแรงดันออสโมซิสในสภาวะความแห้งแล้ง ความเค็มสูงหรือจากอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป โดยไมโทรคอนเดรียจะสังเคราะห์บีเทนออกมา และจะ ไปเข้าไปสะสมที่เซลล์และสามารถแทนที่เกลืออนินทรีย์ รวมทั้งป้องกันเอนไซม์ภายในเซลล์จากแรงดันออสโมซิส หรือจากอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป (Craig. 2004) ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป สิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องมีการรักษาสมดุลของเหลวในร่างกายให้คงที่ โดยสร้างและสะสมสาร ประกอบที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งเรียกว่า ออสโมไลต์ (osmolyte) เมื่อปริมาณของสารละลายเพิ่มสูงขึ้นก็จะเข้าไปกระตุ้นการทำงานของระบบขนส่งออสโมไลต์ภายในระยะเวลาอันสั้น และทำหน้าที่ในการขนส่งออสโมไลต์ต่อไป (Chambers; et al. 1999) โดย Na^+-coupled transporter (Lang; et al. 1998) มีหน้าที่ช่วยในการขนส่งโซเดียมออกจากเซลล์ ในขณะเดียวกันก็จะมีในขณะเดียวกันก็จะมีการสังเคราะห์ตัวคอมแพททิเบิลโซลูทออกมา แล้วจึงมีการขนส่งสารประกอบเหล่านี้เข้าสู่เซลล์โดยโปรตีน ProP, BetP, EctP, LcoP และ PutP โดยโปรตีนกลุ่มนี้จะช่วยในกา รขนส่งโพรลีน (proline) บีเทน (betaine) และเอคโทอีน (ectoine) เข้าสู่ภายในเซลล์ควบคู่กับการทำงาน Na^+-coupled transporter (ภาพประกอบ 6)



ภาพประกอบ 6 กลไกการขนส่งสารประกอบเข้าสู่เซลล์

ที่มา: Kramer; & Morbach. (2004)

เมื่อเซลล์มีการสังเคราะห์บีเทนในครั้งแรกแล้ว จะมีการนำบีเทนเข้าสู่เซลล์โดยโปรตีน ProP, BetP, EctP, LcoP และ PutP ซึ่งโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขนส่งบีเทนเข้าสู่เซลล์คือ ProP และ BetP แต่พบว่า BetP จะมีความสำคัญที่สุดในการขนส่งบีเทนเข้าสู่ภายในเซลล์ (Kramer; & Morbach. 2004) โดย BetP จะมีปฏิกิริยาเมื่อปริมาณของโพแทสเซียมไอออนสูงขึ้น (Morbach. & Kramer. 2003) แต่จะไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของไอออนที่กระตุ้น (Rubenhagen; Morbach; & Kramer. 2001) หลังจากนั้นจะมีการนำบีเทนเข้าสู่เซลล์ต่อไป นอกจากนั้นบีเทนยังมีความสามารถในการเข้ากันได้ดีกับเซลล์มากกว่าโพแทสเซียมไอออน ทำให้ช่วยในการป้องกันอันตรายกับเซลล์ได้เป็นอย่างดี (Bowlus; et al. 1996)

นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล (2541) ศึกษาสารประกอบไกลซีนบีเ ทน (glycinebetaine) ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ของ *Aphanothece halophytica* เมื่ออยู่ในภาวะที่มีแรงดันออสโมติกภายนอกเซลล์สูง เซลล์นี้สามารถสะสมสารประกอบไกลซีนบีเทน โ ดยการสร้างขึ้นจากการดึงเอาสารประกอบบางชนิดจากอาหาร และจากการทดลองโดยอาศัยตัวติดตามทางรังสี พบว่า *Aphanothece halophytica* สามารถสร้างไกลซีนบีเทนโดยอาศัยสารประกอบโคลีนเป็นสารตั้งต้นผ่านสารประกอบตัวกลางในปฏิกิริยาคือ บีเทนอัลดีไฮด์ นอกจากสารประกอบตั้งต้นโคลีนแล้ว เอทธาโนลามีนและไกลซีนก็สามารถเปลี่ยนเป็นไกลซีนบีเทนได้ โดยเฉพาะไกลซีนนั้น สามารถเปลี่ยนเป็นไ กลซีนบีเทนได้ ในอัตราที่เร็วกว่าสารประกอบตั้งต้นตัวอื่น ที่ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือพบว่า *Aphanothece halophytica* สามารถสร้างไกลซีนบีเทนเพิ่มขึ้นโดยอาศัยโคลีน (choline) หรือเอทธาโนลามีน (ethanolamine) หรือไกลซีนเป็นสารตั้งต้น และระดับไกลซีนบีเทนภาย ในเซลล์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ หลังจากทำให้เซลล์แตกแอคติวิตี (activity) จำเพาะของโคลีนดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัว แรกในวิถีโคลีน ไกลซีนบีเทน อยู่ในส่วนของผนังเซลล์เป็นส่วนใหญ่ และแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือในอาหารสูงขึ้น

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. UV/Vis Spectrophotometer: Jenwey 6405, England
2. Autoclave: STURDY SA-300VL, USA
3. Water bath: MEMMERT, Germany
4. Mini centrifuge: HSIANGTAI M-630, Taiwan
5. Auto pipette: BOECO, Gemany
6. Mortar and Pestle
7. Ion chromatograph: Shimadzu PIA-1000, Japan
8. atomic absorption spectrophotometer: Shimadzu AA-6300, Japan
9. digital scale: DENVER INSTRUMENT TB-203, Thailand

สารเคมี

1. Dipotassium phosphate: Fisher Scientific, UK
2. Magnesium sulfate Heptahydrate: Fisher Scientific, UK
3. Calcium chloride Dihydrate: RANCHEM, India
4. Sodium carbonate: Fisher Scientific, UK
5. Ethylenediaminetetraacetic acid: Ajax Finechem, New Zealand
6. Citric acid: RANCHEM, India
7. Ferric ammonium citrate: Ajax Finechem, New Zealand
8. Boric acid: Ajax Finechem, New Zealand
9. Manganese Chloride Tetrahydrate
10. Zinc sulphate Heptahydrate: Ajax Finechem, New Zealand
11. Sodium molybdate: Ajax Finechem, New Zealand
12. Copper (II) sulfate Pentahydrate: Fisher Scientific, UK
13. Cobalt (III) Nitrate: Labachemie, India
14. Sodium nitrate: RANCHEM, India
15. Potassium chloride: Fisher Scientific, UK
16. Manganeses sulphate Heptahydrate: RANCHEM, India
17. Magnesium chloride Hexahydrate: RANCHEM, India

18. Calcium chloride Dihydrate: RANCHEM, India
19. Sodium chloride: Ajax Finechem, New Zealand
20. Sulfosalicylic acid: Fisher Scientific, UK
21. Toluene: RANCHEM, India
22. Potassium iodide: Ajax Finechem, New Zealand
23. Sodium hydroxide: Fisher Scientific, UK
24. Sulfuric acid: RANCHEM, India
25. Ninhydrin (2,2-Dihydroxyindane-1,3-dione): Ajax Finechem, New Zealand
26. Boric acid indicator: Ajax Finechem, New Zealand
27. Strontium chloride: Fisher Scientific, UK
28. Vanadate reagent: Ajax Finechem, New Zealand
29. Molybdate reagent: Ajax Finechem, New Zealand
30. Methanol: RANCHEM, India
31. Chloroform: Labachemie, India

ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

1. *Anabaena* sp. จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. *Arthrospira* sp. PCC 8005 จากภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
3. *Nostoc* sp. จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
4. *Oscillatoria* sp. จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
5. *Tolypothrix* sp. จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

วิธีการทดลอง

1. การวัดการเจริญ

นำไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. เลี้ยงในอาหารสูตร BG_{11} แบ่งใส่ขวดๆ ละ 100 มิลลิตร หลังจากนั้นเตรียมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นของ 0.25, 0.5 และ 1 โมลาร์ ตามลำดับ นำโซเดียมคลอไรด์ที่เตรียมใส่ลงในอาหารเลี้ยง แล้วนำเข้าเครื่อง Autoclave เพื่อฆ่าเชื้อ ใส่ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดอย่างละ 1 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้ แสงสีขาว โดยติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาทุก 4

วัน สามารถหาค่าการเจริญด้วยเครื่อง Spectrophotometer (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร)

2. การวิเคราะห์อิออน

นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25 , 0.5 และ 1 โมลาร์ อย่างละ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบไปแตกเซลล์ด้วยวิธีโซนิเคท(sonicate) ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตรวจสอบอิออนด้วยเครื่อง Ion Analyser ตามวิธีของละลอกน้ำ และคณะ (Laloknam; et al. 2010)

3. การตรวจสอบสารออสโมโพรเทคแทนต์

3.1 การตรวจสอบปริมาณ Reducing Sugar

นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25 , 0.5 และ 1 โมลาร์ อย่างละ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เติมกรดซัลฟูริก 1.5 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 20 นาที เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสเติม DNS 500 ไมโครลิตร ต้มเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นวัดค่าดูกลืนแสง ที่ 575 นาโนเมตร ตามวิธีของมิลเลอร์ (Miller. 1959)

3.2 การตรวจสอบปริมาณไขมัน

นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25 , 0.5 และ 1 โมลาร์ อย่างละ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย ที่ต้องการตรวจสอบไปแตกเซลล์ด้วยวิธี โซนิเคท (sonicate) ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้มา สกัดไขมันด้วย เมทานอล (methanol) : คลอโรฟอร์ม (chloroform) : น้ำ ในอัตราส่วน 6 : 2.5 : 0.5 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนนำไประเหยที่อุณหภูมิ 43 °C หลังจากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก ตามวิธีของรีแซนคา และคณะ (Rezanka; et al. 1982)

3.3 การตรวจสอบปริมาณโพรลีน

นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5 และ 1 โมลาร์ อย่างละ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ตรวจสอบปริมาณโพรลีน โดยนำไซยาโนแบคทีเรียบดกับซัลโฟซาลิไซลิค 3% จากนั้นต้ม 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดส่วนใส 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมนินไฮดรินแล้วนำไปต้มอีก 5 นาที เติมทูลูอีน 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน โดยเครื่องผสมสาร นาน 20 วินาที ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที ให้สารแยกชั้นดูดส่วนใส นำไปตรวจสอบปริมาณโพรลีนด้วยเครื่อง Spectrophotometer (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร) หลังจากนั้นผลมาเทียบกับโพรลีนบริสุทธิ์ ตามวิธีของเบทส์ วาลเดรน และเทียร์ (Bates; Waldren; & Teare. 1973)

3.4 การตรวจสอบปริมาณบีเทน

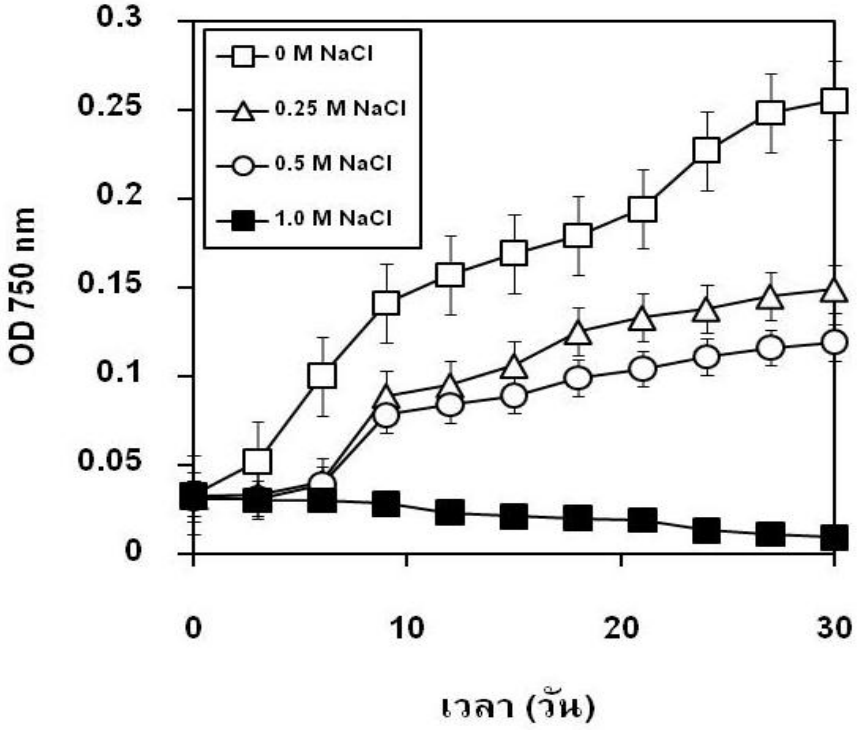
นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.25, 0.5 และ 1 โมลาร์ อย่างละ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่าง ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ตรวจสอบปริมาณบีเทน โดยการนำไซยาโนแบคทีเรียเติมน้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร ตามด้วย 2N H_2SO_4 ปริมาณ 250 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 35 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15 นาที เติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ 5 ไมโครลิตร แช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูดส่วนใสทิ้งนำตะกอนที่ได้เติมด้วยไดคลอโรมีเทน 1 มิลลิลิตร และวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร) หลังจากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับมาตรฐานบีเทนตามวิธีของกรีฟ และ แกรทแทน (Grieve; & Grattan. 1983)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

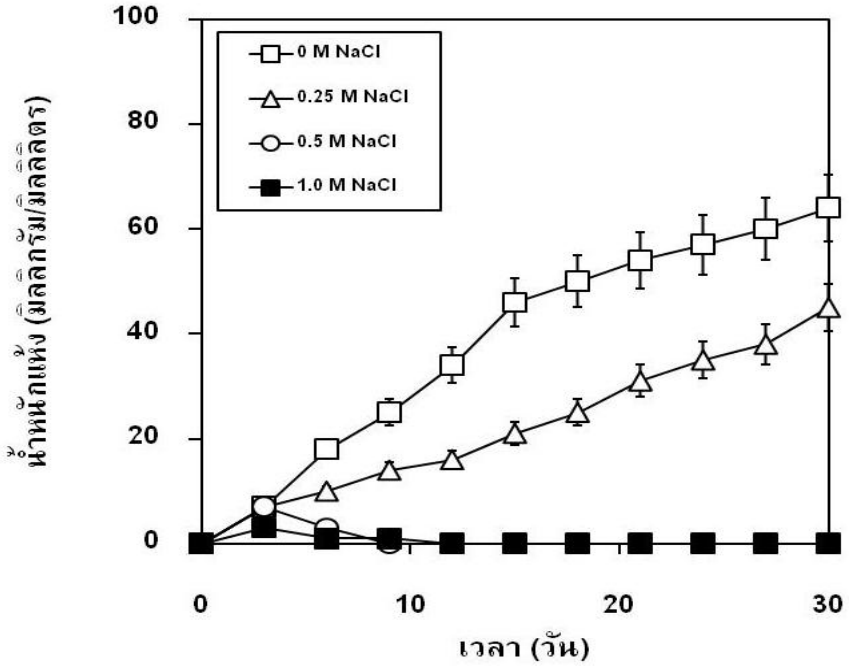
ตอนที่ 1 การวัดการเจริญ

นำไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} โดยแปรผันเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 – 1 โมลาร์ แล้วทำการติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด เป็นระยะเวลา 30 วัน เพื่อหาภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (ภาพประกอบ 7 - 11) พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด เจริญได้ถึงระยะกลางแบบทวีคูณ (mid log phase) ระหว่างวันที่ 12 – 18 วัน โดย *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. เจริญได้ดีที่สุด เมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในขณะที่ *Arthrospira* sp. PCC 8005 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.25 โมลาร์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดจะลดลง และเมื่อในอาหารเลี้ยงมีความเข้มข้นของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0.5 โมลาร์ ขึ้นไป *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp., และ *Tolypothrix* sp. ไม่สามารถเจริญได้ ในขณะที่ความเข้มข้นของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0.25 โมลาร์ ขึ้นไป *Anabaena* sp. ไม่สามารถเจริญได้

ดังนั้นการศึกษาในขั้นตอนต่อไป ภาวะ ปกติใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ เป็นส่วนผสมสำหรับเลี้ยง *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ยกเว้น *Arthrospira* sp. PCC 8005 เลี้ยงที่มีความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ สำหรับภาวะที่มีความเครียดจากเกลือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ สำหรับเลี้ยง *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ยกเว้น *Anabaena* sp. ใช้ที่ 0.25 โมลาร์

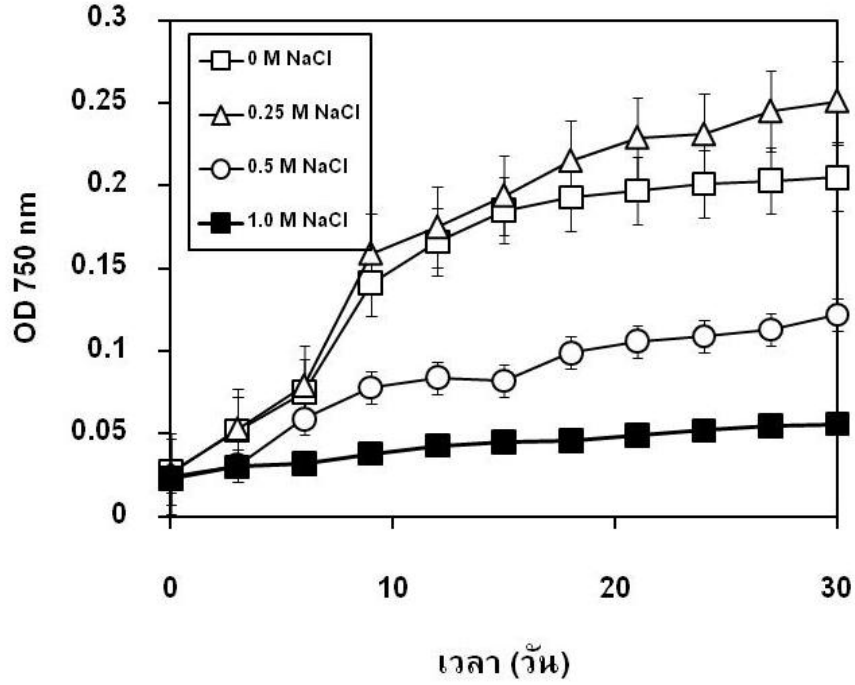


(ก)

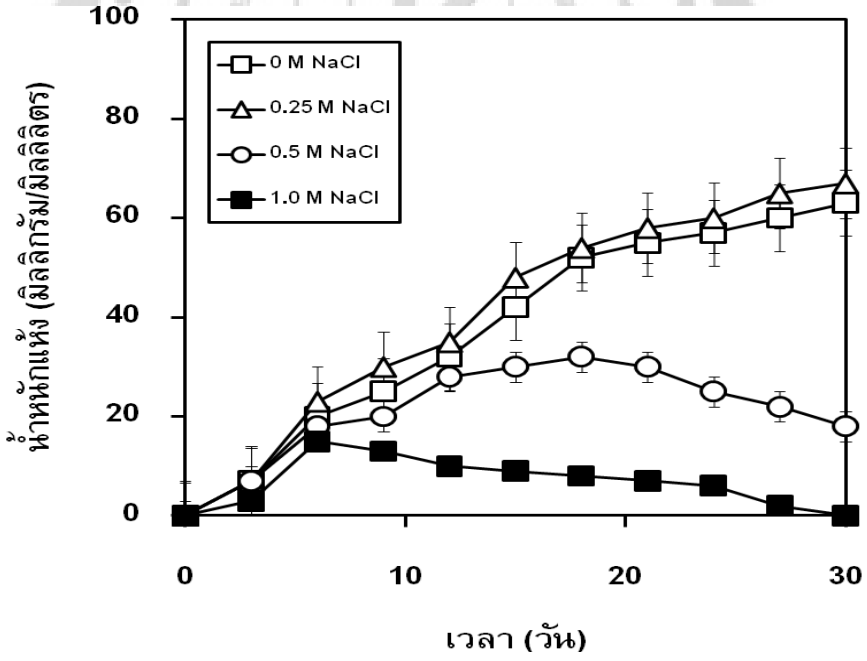


(ข)

ภาพประกอบ 7 การเจริญของ *Anabaena* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง

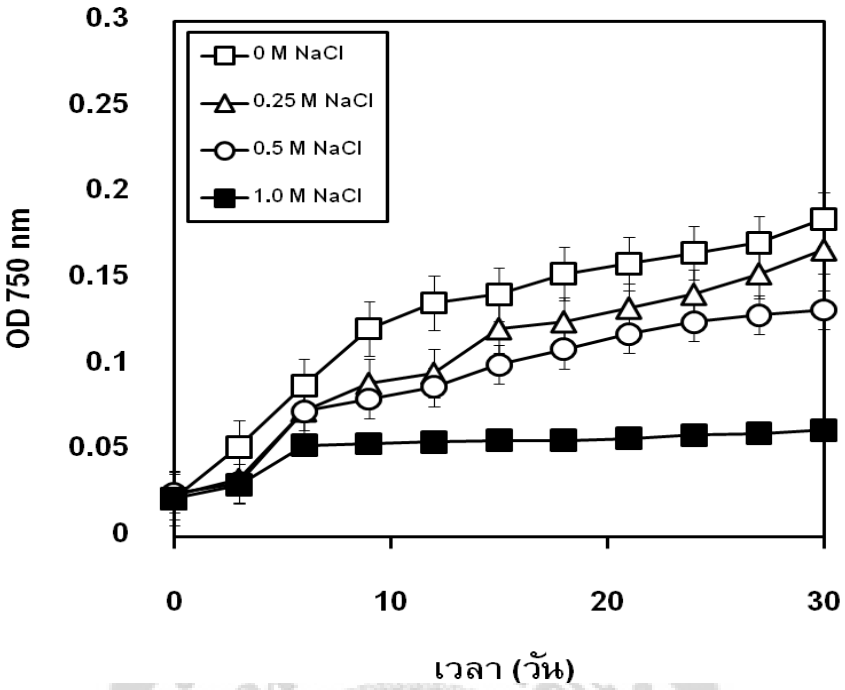


(ก)

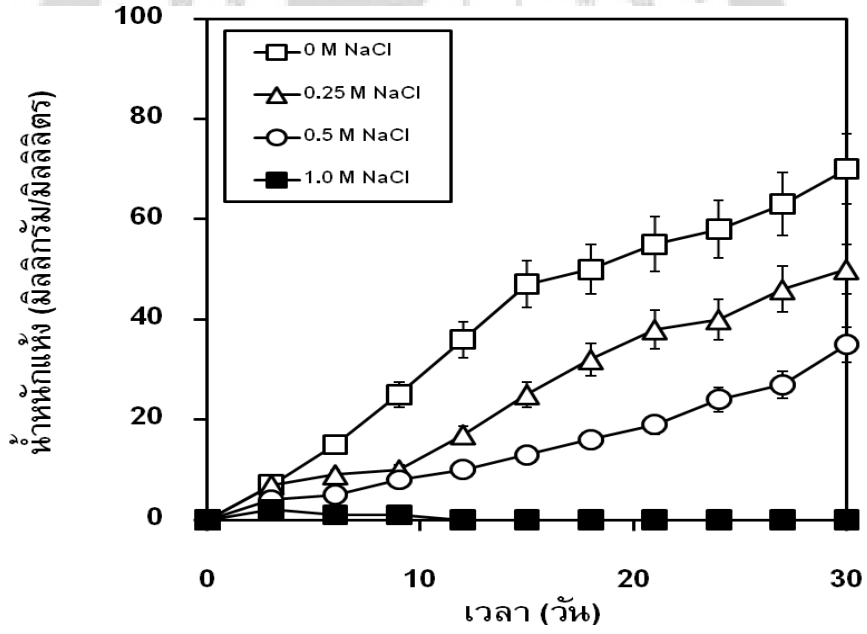


(ข)

ภาพประกอบ 8 การเจริญของ *Arthrospira* sp. PCC 8005 ภายใต้ภาวะปกติและภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง

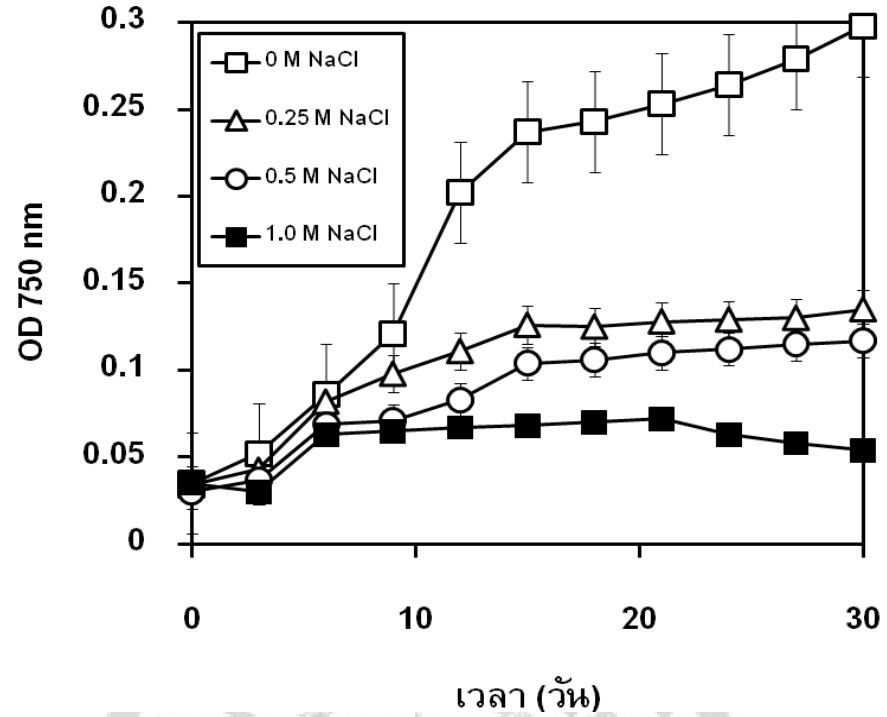


(ก)

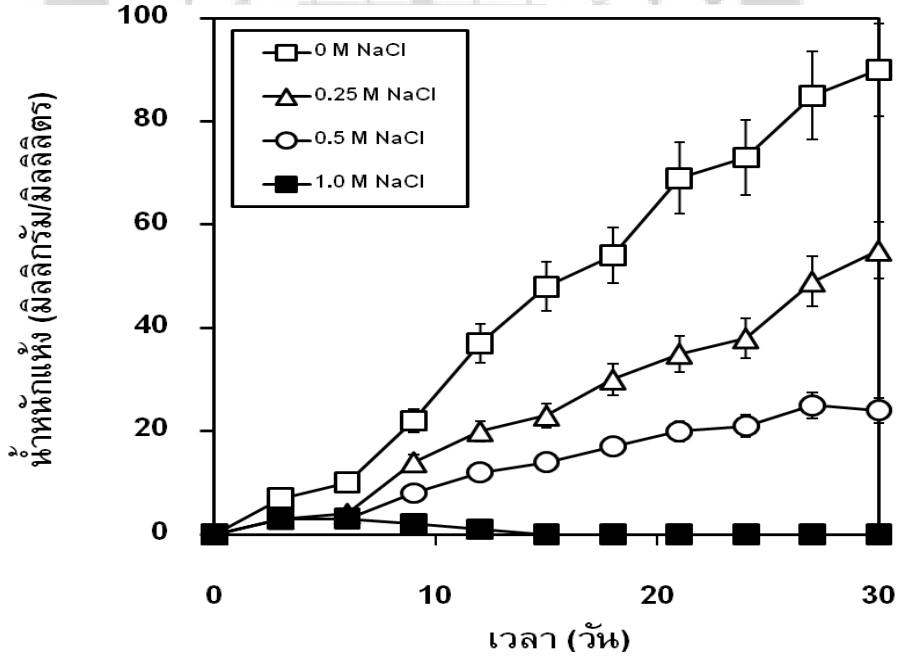


(ข)

ภาพประกอบ 9 การเจริญของ *Nostoc* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง

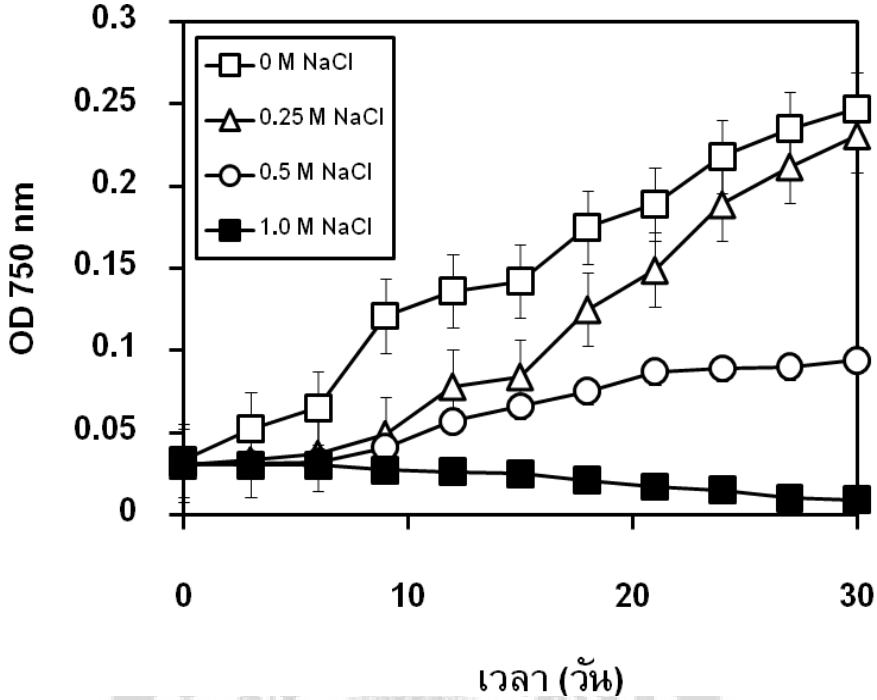


(ก)

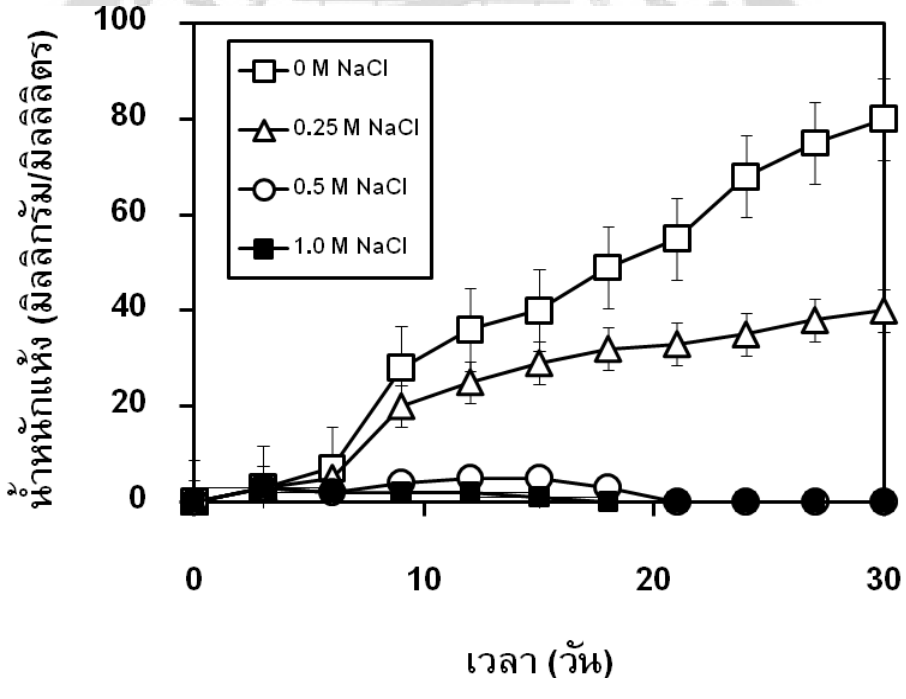


(ข)

ภาพประกอบ 10 การเจริญของ *Oscillatoria* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง



(ก)

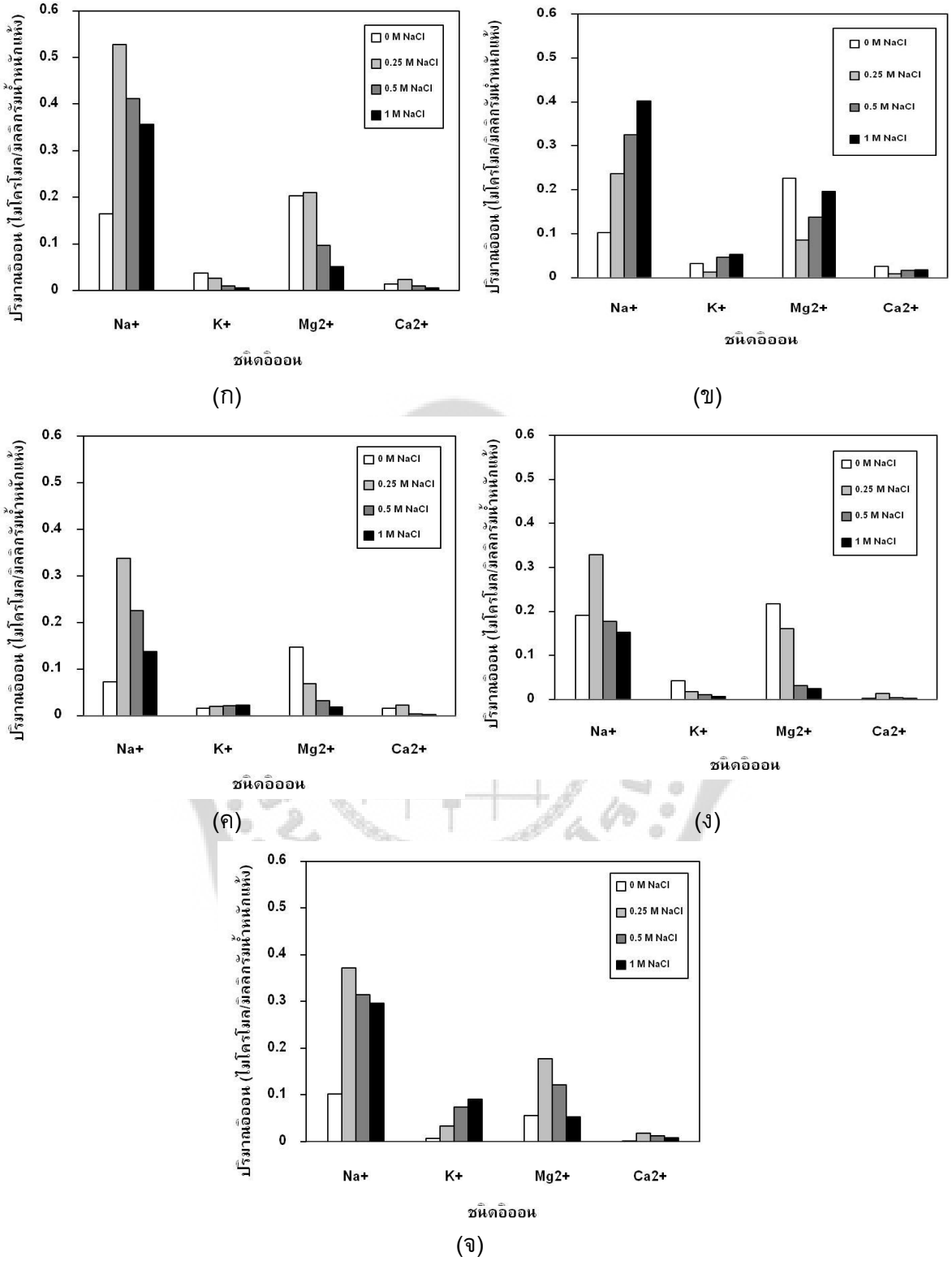


(ข)

ภาพประกอบ 11 การเจริญของ *Tolypothrix* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์(ก) การวัดความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง Spectophotometer (ข) การชั่งน้ำหนักแห้ง

ตอนที่ 2 การตรวจสอบ ปริมาณอิออนภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากเกลือ

เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณอิออนของ Na^+, K^+, Mg^{2+} และ Ca^{2+} ในไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณ Na^+ ของ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ที่ภาวะเครียดจากเกลือมีปริมาณของอิออ นสูงกว่าภาวะปกติ โดยภาวะเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ที่มีปริมาณอิออนสูงที่สุด ได้แก่ 0.25, 0.5 และ 1 โมลาร์ ตามลำดับ ปริมาณ K^+ ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดแตกต่างกันเล็กน้อยทั้งที่ภาวะปกติและภาวะเครียดจากเกลือ โดย *Anabaena* sp. และ *Oscillatoria* sp. มีปริมาณ K^+ ลดลงเมื่อปริมาณของโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น ส่วน *Nostoc* sp. และ *Tolypothrix* sp. มีปริมาณของ K^+ สูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ที่สูงขึ้น ส่วน *Arthrospira* sp. PCC 8005 ปริมาณ K^+ ต่ำสุดที่ 0.25 โมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าภาวะปกติและที่ภาวะความเครี ยดสูงขึ้นคือ 0.5 และ 1 โมลาร์ ปริมาณของ K^+ เพิ่มสูงขึ้นด้วยตามลำดับ ปริมาณ Mg^+ ของ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ลดลงเมื่ออยู่ในภาวะความเครียดสูงขึ้น ส่วนใน *Arthrospira* sp. PCC 8005 เมื่ออยู่ในภาวะเครียดจากเกลือที่ 0.25 โมลาร์ ปริมาณของ Mg^{2+} ลดลงเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับภาวะปกติ แต่ปริมาณ Mg^{2+} ที่ภาวะความเครียด 0.5 และ 1 โมลาร์ จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับภาวะวะความเครียดที่ 0.25 โมลาร์ และปริมาณ Ca^{2+} ที่ตรวจพบในไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณของอิออนแตกต่างกันเล็กน้อย (ภาพประกอบ 12)

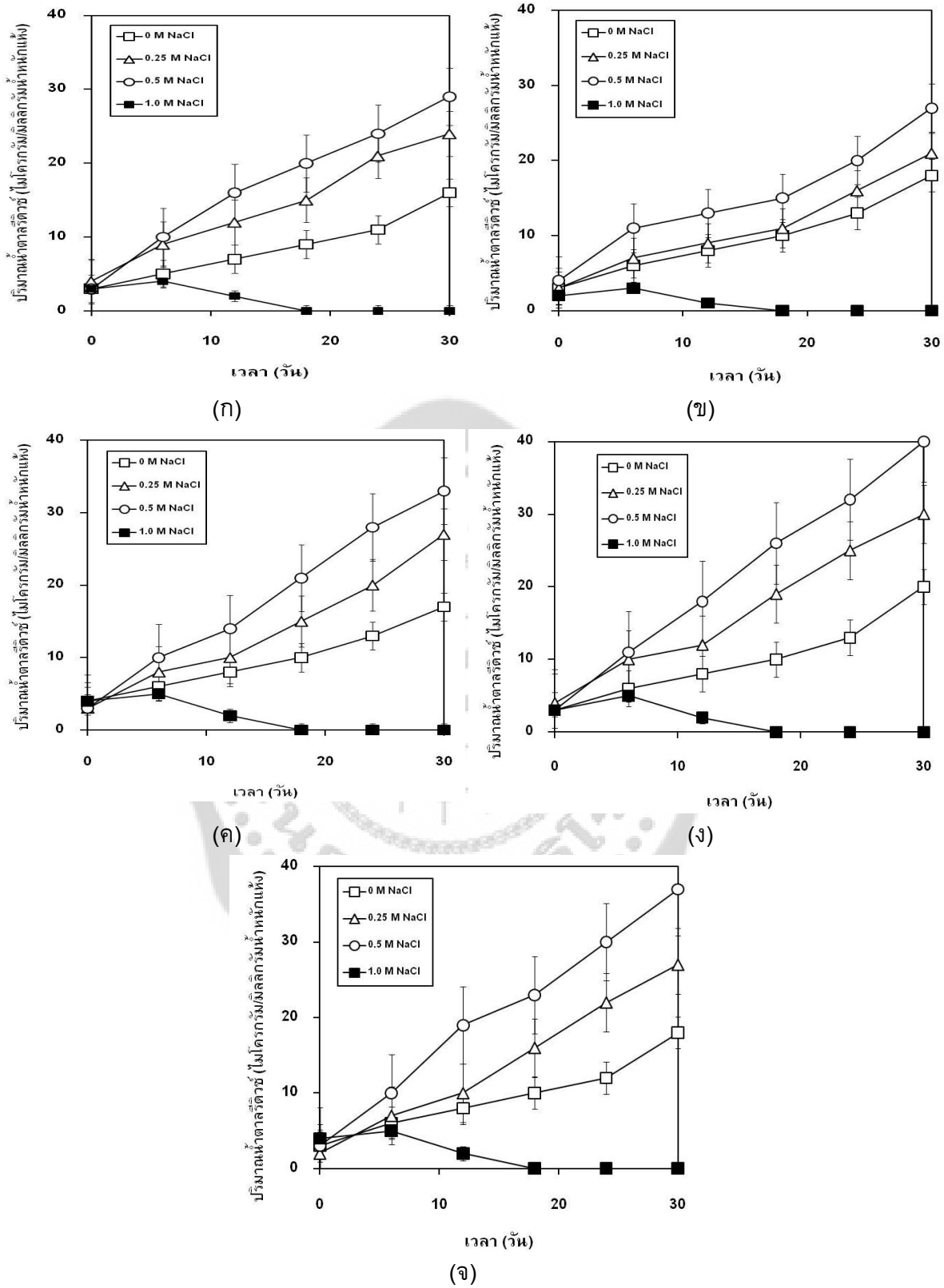


ภาพประกอบ 12 ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณอิออนของ Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+} และ Ca^{2+} (ก) *Anabaena* sp. (ข) *Arthrospira* sp. PCC 8005 (ค) *Nostoc* sp. (ง) *Oscillatoria* sp. (จ) *Tolypothrix* sp.

ตอนที่ 3 การตรวจสอบ สารออสโมโพรเทคแทนต์ภายใต้ภาวะปกติและภาวะเครียดจากเกลือ

การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

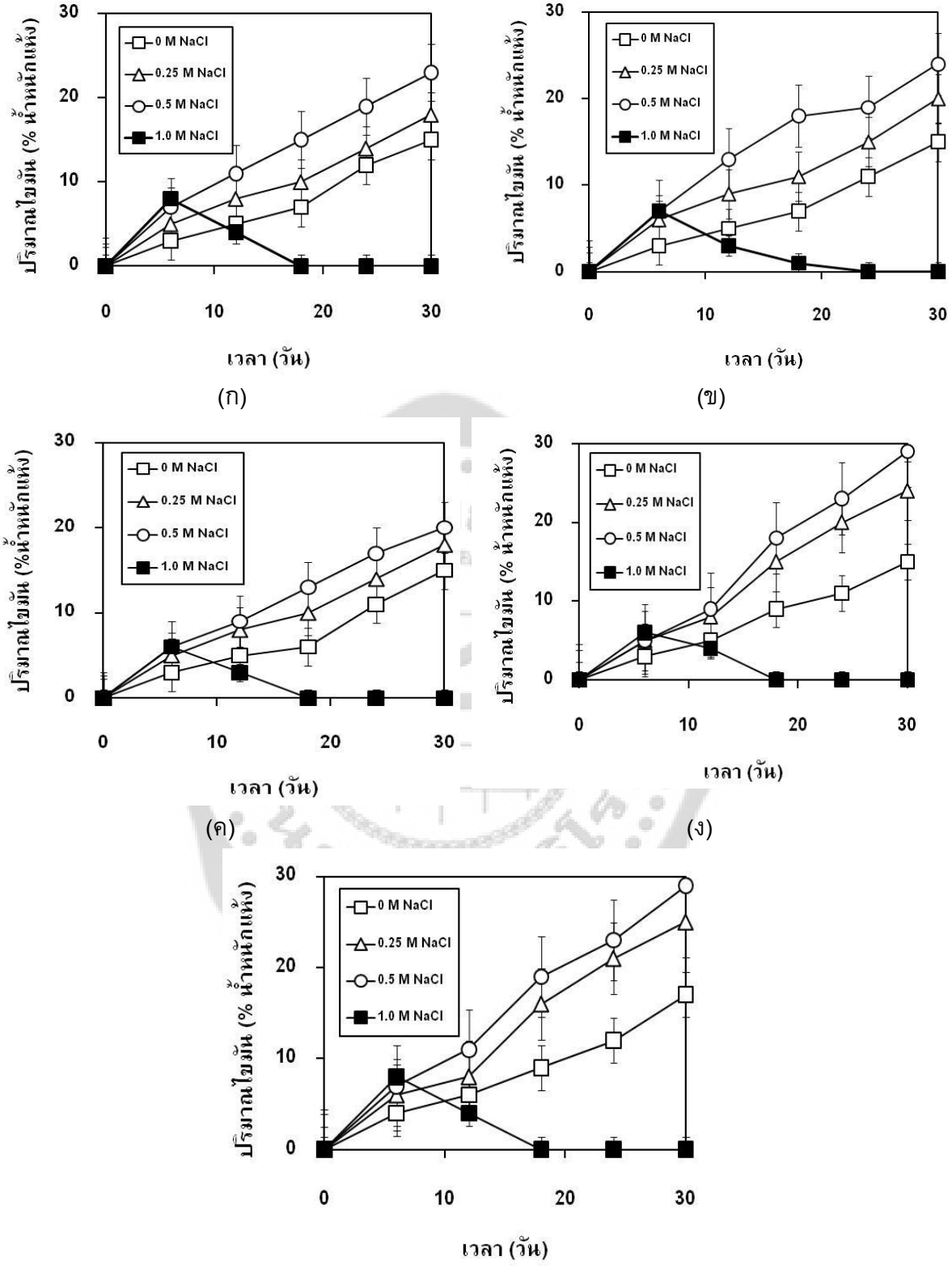
นำไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG_{11} ที่ภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ และติดตามปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทุก 6 วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน ตามวิธีการทดลอง แสดงผลการทดลอง (ภาพประกอบ 13) พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ในวันที่ 6, 12, 18, 24 และ 30 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด (ภาพประกอบ 13) พบว่า *Oscillatoria* sp. ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด รองลงมาเป็น *Tolypothrix* sp. , *Nostoc* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005 และ *Anabaena* sp. ตามลำดับ



ภาพประกอบ 13 ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(ก) *Anabaena* sp. (ข) *Arthrospira* sp. PCC 8005 (ค) *Nostoc* sp. (ง) *Oscillatoria* sp. (จ) *Tolypothrix* sp.

การตรวจสอบปริมาณไขมัน

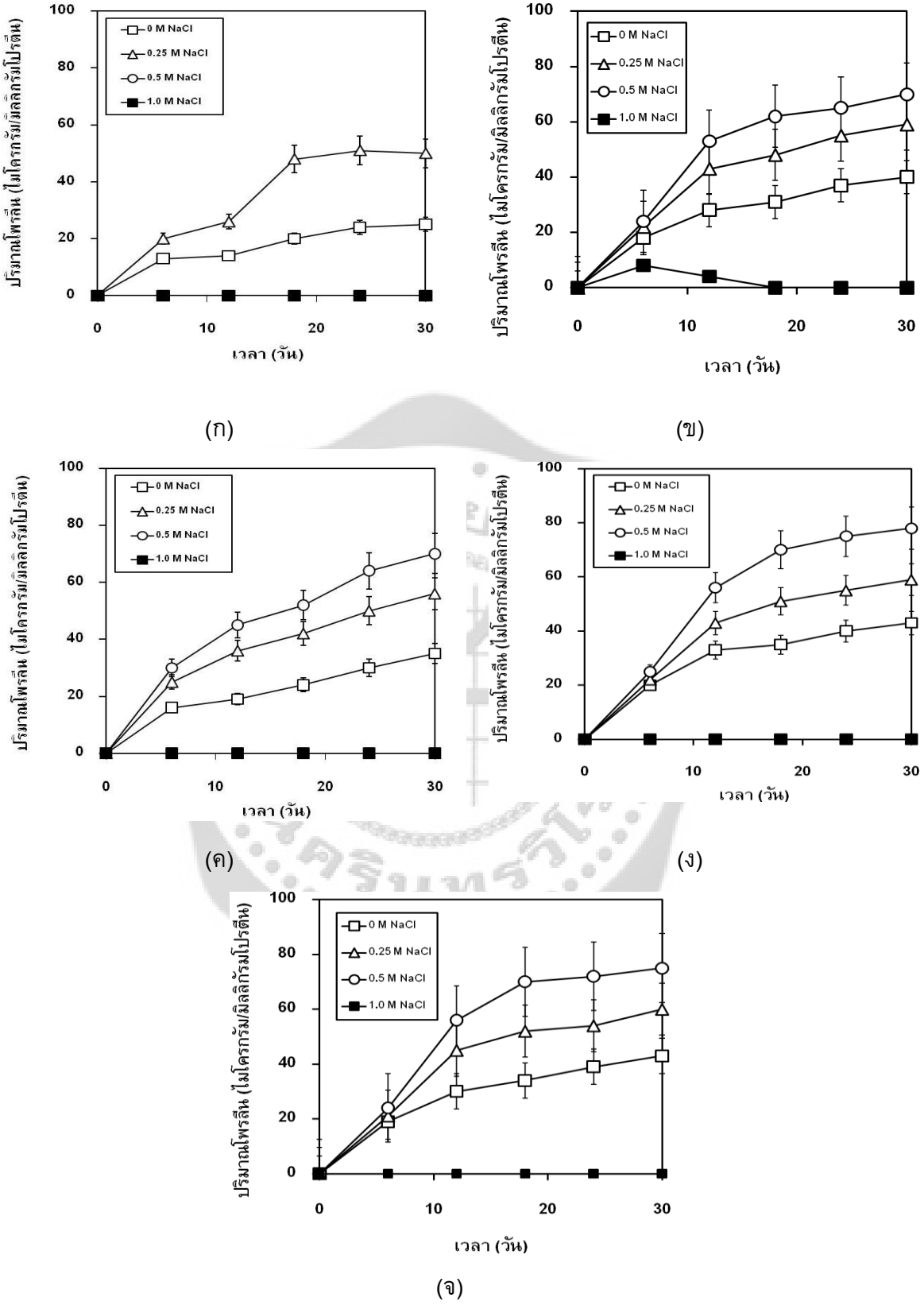
นำไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG_{11} ที่ภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ และติดตามปริมา ณไขมันทุก 6 วัน ตามวิธี การทดลอง แสดงผลการทดลอง (ภาพประกอบ 14**)** พบว่า ปริมาณไขมันของไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ในวันที่ 6, 12, 18, 24 และ 30 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณ ไขมันภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติ ประมาณ 2 เท่า โดยปริมาณไขมันจะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณ ไขมันจะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อทำการ เปรียบเทียบปริมาณไขมัน ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด (ภาพประกอบ 14) พบว่า *Tolypothrix* sp. ให้ปริมาณไขมัน สูงที่สุด รองลงมาเป็น *Oscillatoria* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ตามลำดับ



ภาพประกอบ 14 ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณไขมัน(ก) *Anabaena* sp. (ข) *Arthrospira* sp. PCC 8005 (ค) *Nostoc* sp. (ง) *Oscillatoria* sp. (จ) *Tolypothrix* sp.

การตรวจสอบปริมาณโพรลีน

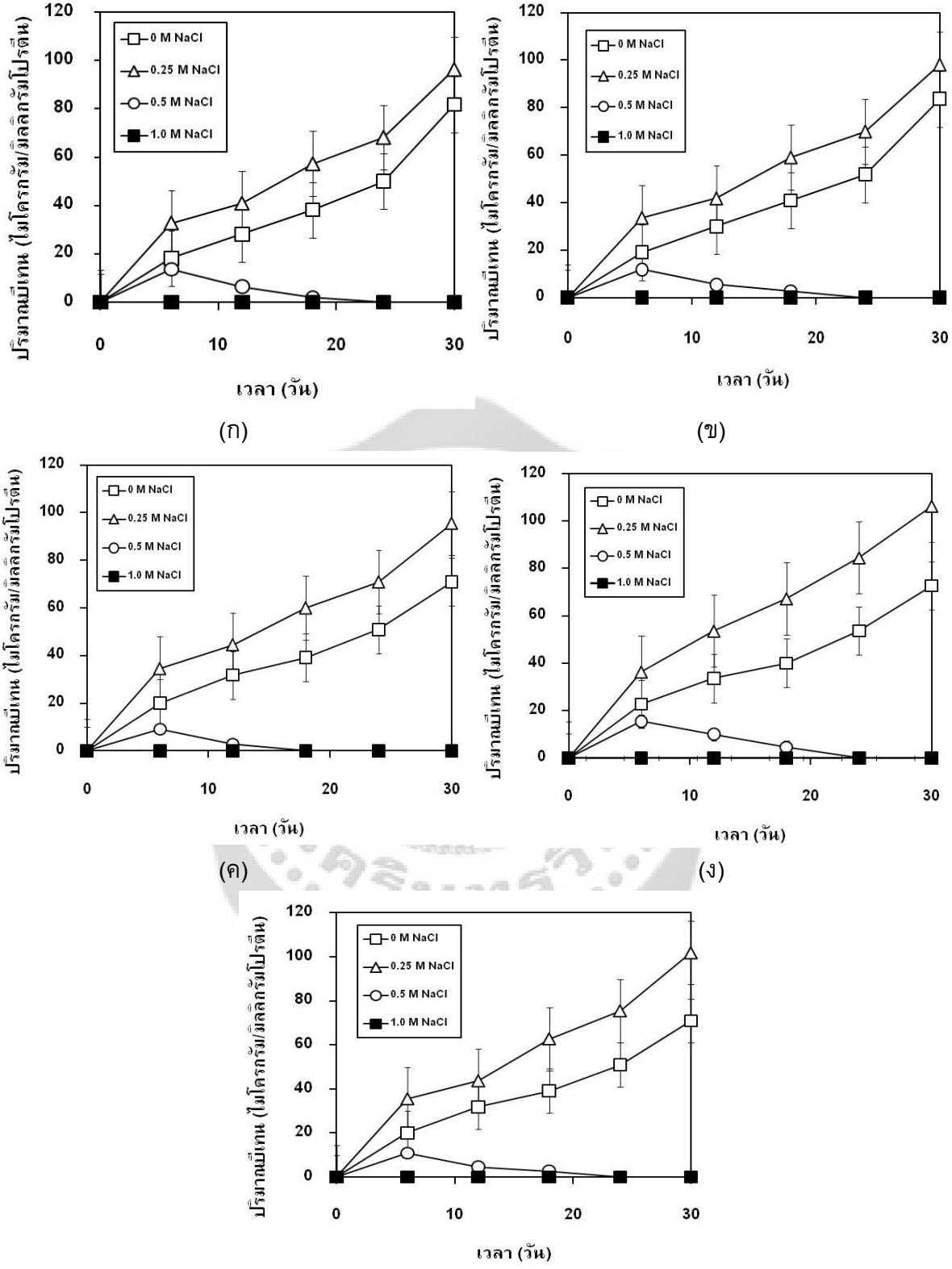
นำไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG_{11} ที่ภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ และติดตามปริมาณโพรลีนทุก 6 วัน ตามวิธีการทดลอง แสดงผลการทดลอง (ภาพประกอบ 15) พบว่า ปริมาณโพรลีนของไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ในวันที่ 6, 12, 18, 24 และ 30 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณโพรลีนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า โดยปริมาณโพรลีนจะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณโพรลีนจะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณโพรลีนของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด (ภาพประกอบ 15) พบว่า *Oscillatoria* sp.ให้ปริมาณโพรลีนสูงที่สุด รองลงมาเป็น *Tolypothrix* sp., *Nostoc* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005และ *Anabaena* sp.ตามลำดับ



ภาพประกอบ 15 ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณโพรลีน (ก) *Anabaena* sp. (ข) *Arthrospira* sp. PCC 8005 (ค) *Nostoc* sp. (ง) *Oscillatoria* sp. (จ) *Tolypothrix* sp.

การตรวจสอบปริมาณบีเทน

นำไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG_{11} ที่ภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ และติดตามปริ มาณบีเทนทุก 6 วัน ตามวิธี การทดลอง แสดงผลการทดลอง (ภาพประกอบ 16) พบว่า ปริมาณบีเทนของไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ในวันที่ 6, 12, 18, 24 และ 30 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณ บีเทนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า โดยปริมาณ บีเทนจะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณ บีเทนจะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณบีเทนของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด (ภาพประกอบ 16) พบว่า *Oscillatoria* sp.ให้ปริมาณบีเทน สูงที่สุด รองลงมาเป็น *Tolypothrix* sp., *Nostoc* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005และ *Anabaena* sp. ตามลำดับ



ภาพประกอบ 16 ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณบีเทน (ก) *Anabaena* sp. (ข) *Arthrospira* sp. PCC 8005 (ค) *Nostoc* sp. (ง) *Oscillatoria* sp. (จ) *Tolypothrix* sp.

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณอิออนและสารออสโมโพรเทคแทนต์ของไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} โดยแปรผัน เกลือโซเดียมไรด์ความเข้มข้น 0 – 1 โมลาร์ แล้วทำการติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด เป็นระยะเวลา 30 วันเพื่อเปรียบเทียบภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ในไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดได้ผลสรุป ดังนี้

1. ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด เจริญได้ถึงระยะกลางแบบทวีคูณ (mid log phase) ในวันที่ 12 – 18 วัน โดยไซยาโนแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. เจริญได้ดีที่สุด เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ยกเว้น *Arthrospira* sp. PCC 8005 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์0.25 โมลาร์

2. ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณของอิออนชนิด Na^{+} สูงที่สุด รองลงมา คือ Mg^{2+}, K^{+} และ Ca^{2+} เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์

3. ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติ โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด พบว่า *Oscillatoria* sp. ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด รองลงมาเป็น *Tolypothrix* sp., *Nostoc* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005 และ *Anabaena* sp. ตามลำดับ

4. ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณไขมันภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า โดยปริมาณไขมันจะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณไขมันจะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณไขมันของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด พบว่า *Tolypothrix* sp. ให้ปริมาณไขมันสูงที่สุด รองลงมาเป็น *Oscillatoria* sp., *Arthrospira* sp. PCC8005, *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ตามลำดับ

5. ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณโพรลีนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า โดยปริมาณโพรลีนจะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณโพรลีนจะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณโพรลีนของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด พบว่า *Oscillatoria* sp. ให้ปริมาณโพรลีนสูงที่สุด รองลงมาเป็น *Tolypothrix* sp., *Nostoc* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005 และ *Anabaena* sp.ตามลำดับ

6. ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณบีเทนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติ โดยปริมาณ บีเทนจะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณ บีเทนจะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณบีเทน ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด พบว่า *Oscillatoria* sp. ให้ปริมาณบีเทน สูงที่สุด รองลงมาเป็น *Tolypothrix* sp., *Nostoc* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005และ *Anabaena* sp.ตามลำดับ

อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณอิออนและสารออสโมโพรเทคแทนต์ของไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp.และ *Tolypothrix* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} โดยแปรผันความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 – 1 โมลาร์ แล้วติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด เป็นระยะเวลา 30 วัน เพื่อหาภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ และนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตร ในพื้นที่ที่มีความเค็ม โดยการนำไซยาโนแบคทีเรียมาทำปุ๋ย เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียมีความสามารถในการอุ้มน้ำ รักษาความชุ่มชื้นให้กับดินอยู่เสมอ(Dawson. 1966) รวมทั้งให้ปริมาณไนโตรเจนกับดิน ซึ่งสามารถลดการใช้สารเคมีในพืชได้

จากการทดลองเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} เพื่อเปรียบเทียบภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ใน ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด เจริญได้ถึงระยะกลางแบบทวีคูณ (mid log phase) อยู่ระหว่างวันที่ 12 – 18 วัน โดยไซยาโนแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Tolypothrix* sp. เจริญได้ดีที่สุด เมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ ไรและชามา (Rai; & Sharma. 2006) ได้ทำการศึกษาเมแทบอลิซึมฟอสเฟตในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena doliolum* ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ พบว่า ที่ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100-300 มิลลิโมลาร์ ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena doliolum* มีการเจริญลดลงจาก 2 วันแรก โดยลดลง 33-94% เมื่อเทียบกับภาวะปกติ ส่วน *Arthrospira* sp. PCC 8005 เจริญได้ดีที่ความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 0.25 โมลาร์ สอดคล้องกับ ซิเฟอร์รีและทีโบนี (Ciferri; & Tiboni. 1985) กล่าวว่า *Arthrospira* sp. เจริญได้ดีที่ pH 8.5-11 และจะเจริญลดลงเมื่อ pH สูงกว่า 11

โดยทั่วไปพืชหรือสิ่งมีชีวิตจะมีการตอบสนอง ต่อความเครียดจากเกลือ แตกต่างกันโดยสังเกตได้จาก การเจริญ ปริมาณอิออน และปริมาณของของเหลวภายในเซลล์ (Zhang; & et al. 2004) เนื่องจาก มีการปรับสมดุลออสโมติกและโครงสร้าง เพื่อให้ดำรงชีวิตอยู่ได้ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ (Flower; Troke; & Yeo. 1977) จะมีการแลกเปลี่ยนอิออนภายในเซลล์ เช่น K^+ และ Na^+ (Bohnert; & Jensen. 1996) เพื่อปรับตัวและใช้ในกลไกการแลกเปลี่ยน อิออนระหว่าง

ภายนอกและภายในเซลล์ (Laloknam; et al. 2008) เมื่อนำไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp.และ *Tolypothrix* sp. มาตรวจสอบปริมาณอิออน พบว่า ปริมาณของอิออนชนิด Na^+ สูงที่สุด รองลงมา คือ Mg^{2+}, K^+ และ Ca^{2+} เมื่ออยู่ในภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เอปและอลาฮารี (Apte; & Alahari. 1994) ได้ทำการศึกษาบทบาทของอิออนบวก (K^+ และ Na^+) และการปรับตัวภายใต้ความเครียดจากเกลือและแรงดันออสโมติกในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน พบว่า *Anabaena* sp. เมื่ออยู่ในภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ภายในเซลล์มีปริมาณอิออนชนิด Na^+ สูงขึ้น ซึ่งสูงกว่าปริมาณของ K^+

นอกจากการแลกเปลี่ยนอิออนที่เกิดขึ้นเพื่อปรับสมดุลออสโมติกแล้ว ไซยาโนแบคทีเรียจะมีการปรับตัวโดยการพัฒนากลไกของ เซลล์โดยการสร้างสารออสโมโพรเทคแทนต์ขึ้น (Ueda; Yamamoto – Yamane; & Takabe. 2007) แต่ส่วนมากจะอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ เช่น น้ำตาล (Bohnert; & Jensen. 1996) โพรลีน ไกลซีนบีเทน และอื่น ๆ (Nuccio; et al. 1999) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารชีวโมเลกุลที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ (Bohnert; & Jensen. 1996) การสะสมน้ำตาลในส่วนต่าง ๆ ของพืชหรือสิ่งมีชีวิตจะเพิ่มขึ้นตามภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม(Macleod; & Orquodale. 1958) โดยเมื่อนำไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp.และ *Tolypothrix* sp. มาตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติ โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์จะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด พบว่า *Oscillatoria* sp. ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด รองลงมาเป็น *Tolypothrix* sp. , *Nostoc* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005 และ *Anabaena* sp. ตามลำดับ ซึ่งการสะสมน้ำตาลในส่วนต่าง ๆ ของพืชหรือสิ่งมีชีวิตจะเพิ่มขึ้น เพื่อตอบสนองต่อภาวะความเครียดจากสิ่ง แวดล้อม (Garham; et al. 1981, Prado; et al. 2000) ปริมาณของการสะสมน้ำตาลเป็นตัวชี้วัดสภาพแวดล้อมที่ทำให้เกิดแรงดันออสโมติก (Quick; et al. 1989) สอดคล้องกับงานวิจัยของ แลนชูและคณะ (Lan-zhou; et al. 2006) ทำการศึกษาผลของความเครียดจากเกลือต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม ของ คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate metabolism) ในสาหร่ายชนิด *Microcoleus vaginatus* Gom. พบว่า ในภาวะที่ได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 50 และ 100 มิลลิโมลาร์/ลิตร ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสาหร่ายชนิด *Microcoleus vaginatus* Gom. เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับเมื่อเทียบกับภาวะปกติ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ มาดูห์ คาโรลิน และจีออฟฟรี (Madhu; Carolyn; Geoffrey. 1999) ได้ศึกษาการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือระดับปานกลาง (มากกว่า 1.8 โมลาร์) ใน *Scytonema* sp. พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 150 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 2 วัน ทำให้ปริมาณของน้ำตาล ทรีฮาโลส (trehalose) และน้ำตาลซูโครส (sucrose) เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับภาวะปกติ และในการศึกษาการสังเคราะห์น้ำตาลทรีฮาโลสและน้ำตาลซูโครส พบว่า น้ำตาลทั้ง 2

ชนิดเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟอสเฟต (phosphate synthesis) และเอนไซม์ฟอส ฟาเทส (phosphatase)

เมื่อนำ ไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด มาตรวจสอบปริมาณไขมัน พบว่าภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือ ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณ ไขมันภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า โดยปริมาณ ไขมัน จะเพิ่มขึ้นในช่วงวั นที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณไขมันจะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณไขมัน ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด พบว่า *Tolypothrix* sp. ให้ปริมาณไขมัน สูงที่สุด รองลงมาเป็น *Oscillatoria* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005, *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ชารัธชานดราและราจาชีคาร์ (Sharathchandra; & Rajashekhar. 2011) ศึกษาปริมาณกรดไขมันและน้ำมันในไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืด พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 13 ชนิด ได้แก่ *Oscillatoria calcuttensis*, *Oscillatoria acuminate*, *Nostoc linckia*, *Calothrix fusca*, *Lyngbya limnetica*, *Phormidium purpurescens*, *Microcystis aeruginosa*, *Lyngbya dendrobia*, *Oscillatoria perornata*, *Phormidium ambiguum*, *Oscillatoria amoena*, *Scytonema bohnerii* และ *Oscillatoria chlorine* เมื่อนำมาตรวจสอบ พบว่าไซยาโนแบคที เรียทุกชนิด มีองค์ประกอบของ กรดไขมันและน้ำมัน และนอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ เครียโรเลีย บิโชนอย และซิง (Kirrolia; Bishonoi; & Singh. 2011) ศึกษาปัจจัยความเค็ม ที่มีผลต่อ สรีรวิทยาและชีวเคมีของ *Scenedesmus quadricauda* พบว่า ที่ภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาณไขมันใน *Scenedesmus quadricauda* คือ 6.895369 % และภาวะปกติที่ไม่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ปริมาณไขมันใน *Scenedesmus quadricauda* คือ 6.756757 % แสดงให้เห็นว่าปัจจัยความเค็มส่งผลให้ *Scenedesmus quadricauda* สร้างไขมันเพิ่มมากขึ้น

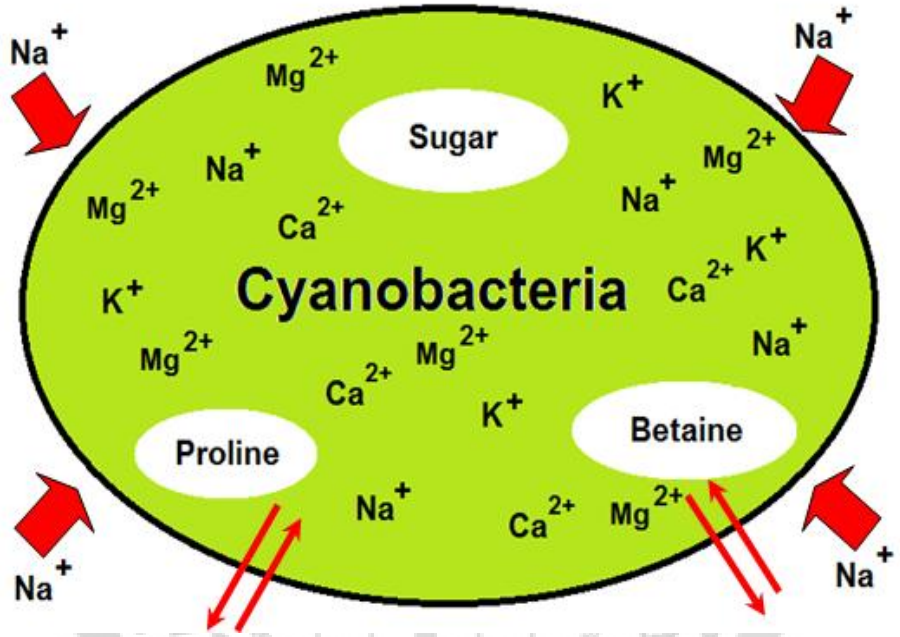
โพรลีน เป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ที่พบมากที่สุดในพืช หรือสิ่งมีชีวิต ทนเค็ม (Kavi Kishor; et al. 1995) เมื่อนำมาตรวจสอบปริมาณโพรลีน พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือมีปริมาณโพรลีนที่ไซยาโนแบคทีเรียสร้างขึ้น สูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า โดยปริม าณโพรลีนจะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณโพรลีนจะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณโพรลีนของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด พบว่า *Oscillatoria* sp.ให้ปริมาณโพรลีนสูงที่สุด รองลงมาเป็น *Tolypothrix* sp., *Nostoc* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005 และ *Anabaena* sp. ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ คริสและคณะ (Chris; et al. 2006) ศึกษาผลของความเค็มที่มีผลต่อไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนชนิด *Cylindrospermum* sp. โดยทำการศึกษาที่ ความเข้มของของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 50 และ 100 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 4 วัน พบว่า โซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสร้าง โพรลีนเพิ่มขึ้น

บีเทนเป็นหนึ่งในสารสำคัญในการปรับตัวของพืชทนเค็ม (Munns. 2002) การสะสมของบีเทนทำให้เกิดการปรับเปลี่ยนของของเหลว บริเวณเยื่อหุ้มเมมเบรนด์ เนื่องจากการไหลเข้าออกของ Na^+ (Kumar; Reddy; & Sudhakar. 2003) นอกจากนี้บีเทนยังช่วยป้องกันเอนไซม์โดยการรักษา

เสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีน (Bohnert; & Jensen. 1996) เมื่อทำการตรวจสอบ บีเทนในไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด พบว่าปริมาณบีเทนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติ โดยปริมาณบีเทน ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด สูงที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.25 โมลาร์ รองลงมาคือ 0, 0.5 และ 1 โมลาร์ ตามลำดับ บลัมวาล์ด (Blumwald. 2000) กล่าวว่า ในพืชทนเค็ม เมื่อปริมาณไกลซีนบีเทนลดลง ส่งผลให้เกิดการสะสม ปริมาณอิออนของ Na^+, K^+ และ Ca^{2+} เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผลการวิจัย ใน *Arthrospira* sp. PCC 8005 ปริมาณของบีเทนที่ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ลดลงแต่ส่งผลให้ปริมาณของอิออนของ Na^+, K^+ และ Ca^{2+} เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับที่ภาวะความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0.25 โมลาร์ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า *Arthrospira* sp. PCC 8005 เป็นไซยาโนแบคทีเรียนชนิดทนเค็มหรือสามารถทนเค็มได้ดีที่สุด และในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณ บีเทนจะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณบีเทน ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด พบว่า *Oscillatoria* sp.ให้ปริมาณบีเทนสูงที่สุด รองลงมาเป็น *Tolypothrix* sp., *Nostoc* sp., *Arthrospira* sp. PCC 8005 และ *Anabaena* sp.ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย ของละลอกน้ำและคณะ (Laloknam; et al. 2010) ศึกษาความเครียดจากเกลือชักนำให้เกิดการสะสมไกลซีน-บีเทนโดยแลกเปลี่ยนกรดอะมิโนและกรดไข มันในไซยาโนแบคทีเรียชนิด *Aphanothece halophytica* พบว่าภาวะความเครียดของเกลือ โซเดียมคลอไรด์สูงขึ้นส่งผลให้ *Aphanothece halophytica* มีการสร้างปริมาณของบีเทนสูงขึ้นประมาณ 3 เท่าเมื่อเทียบกับภาวะการเจริญปกติของเซลล์

จากงานวิจัยสรุปได้ว่า ภาวะปกติไซยาโนแบคที เรียจะมีกลไกการแลกเปลี่ยนอิออนผ่านช่องโปรตีนเพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม เมื่อไซยาโนแบคทีเรีย อยู่ในภาวะเครียดจากเกลือเซลล์จะเกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนอิออนระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อม ซึ่งโดยปกติภายในเซลล์จะประกอบไปด้วยอิออนหลาย ๆ ชนิด เช่น Na^+, K^+, Mg^{2+} และ Ca^{2+} เป็นต้น เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ จะพบว่า Na^+ ที่อยู่ภายนอกเซลล์จะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปสะสมอยู่ภายในส่งผลให้ปริมาณของ Na^+ ภายในเซลล์เ พิ่มสูงขึ้น ในการแลกเปลี่ยนอิออน ของไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในภาวะปกติ จะเห็นว่าเซลล์มีการส ะสม Na^+ สูงกว่าในไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในภาวะเครียดจากเกลือ นอกจากนี้ ไซยาโนแบ คทีเรีย ยังมีการสร้างสารออสโมโพรเทคแทนต์ขึ้นภายในเซลล์ เช่น น้ำตาลรีดิวซ์ โพรลีน บีเทน เป็นต้น เพื่อเป็นการรักษา สมดุลของ เซลล์ไว้ โดยองค์ประกอบหลักของเมือกหุ้มเซลล์จะเป็นพวกค าร์โบไฮเดรต ดังนั้น เมื่อเซลล์ได้รับความเครียดจากเกลือจึงทำให้เกิดการสะสมของน้ำตาลรีดิวซ์ เพิ่มสูงขึ้น เมื่ออยู่ในภาวะความเครียดจากเกลือทำให้ภายนอก เซลล์ มีความเข้มข้นของสารละลายสูงกว่าภายในเซลล์ เซลล์จึงต้องมีการปรับสมดุลความเข้มข้นของสารระหว่างภายในและภายนอก เรียกว่า ไฮเปอร์โทนิก (hypertonic solution) โดยเซลล์จะมีการสร้างโพรลีนและบีเทนขึ้น เนื่องจากโพรลีนมีความสำคั ญในการป้องกันและรักษาเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นแหล่งสะสม พลังงาน และไนโตรเจนแก่สิ่งมีชีวิต ส่วนบีเทนมีความสำคัญในการรักษาเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีน สำหรับพืชทนเค็มการสร้างบีเทนจะลดลง แต่มีการสะสมของอิออนพวก Na^+, K^+ และ Ca^+ ภายในเซลล์สูงขึ้น นอกจากการแลกเปลี่ยนอิออนและการสะสมสารออสโม

โพรเทคแทนต์แล้ว บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ยังมีการสะสมของไขมัน และน้ำมันเพิ่มขึ้นอีกด้วย ซึ่งไขมันเป็นองค์ประกอบหนึ่งของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ จึงทำให้มีการสะสมของไขมันบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้น เพื่อรักษาสมดุลและปรับตัวเพื่อความอยู่รอดต่อไป



ภาพประกอบ 17 การแลกเปลี่ยนอิออนและการสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ในไซยาโนแบคทีเรีย

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. (2527). *สาหร่าย.* กรุงเทพฯ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จุฑาแข วังสุภา. (2544). *การนำไนเตรตเข้าเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม Aphanothece halophytica.* วิทยานิพนธ์. วท.ม. (ชีวเคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

ตุลาพร แก้วแก่น; และวัฒนา พัฒนากูล. (2549). ผลของสภาวะขาดน้ำจากความแล้งและความเครียดเกลือต่อลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการและเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในข้าวระยะต้นกล้า. *วารสารวิจัยมข.* 11(4): 260-268.

นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล. (2541). *การสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนและบทบาทต่อการทนเค็ม ในไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม Aphanothece halophytica*. วิทยานิพนธ์. วท.ม. (ชีวเคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

ยงยุทธ โอสถสภา. (2552). *ธาตุอาหารพืช.* พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยุวดี พีรพรพิศาล. (2549). *สาหร่ายวิทยา*. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พัชรี บุญศิริ. (2551). *ตำราชีวเคมี.* กรุงเทพฯ: คลังนานาวิทยา.

วาสินี พงษ์ประยูร. (2551). *การตอบสนองต่อความเค็มโดยการสะสมโพรลีนในข้าวสายพันธุ์ไทย.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาการพืช). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล. ถ่ายเอกสาร.

วิชิตพล มีแก้ว; ณัฐพล ขันธปราบ; และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2553). การปรับตัวของพืชภายใต้ภาวะที่มีความเค็ม. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์.* 10(2): 28-37.

วิภาวี แบบประเสริฐ. (2542). *การผลิตไฮโดรเจนและการขนส่งไนเตรตในไซยาโนแบคทีเรีย Synechocystis sp. PCC 6803*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

ศรีสม สุวรรณวงศ์. (2547). *การวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริลักษ์ นามวงศ์. (2553). ศักยภาพของแบคทีเรียทนเค็ม และ แบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ทางเทคโนโลยีชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. (15): 122-132.

สุกัญญา ใจโพธิ์. (2545). *ผลของสภาวะความเครียดจากน้ำต่อปริมาณโพรลีนและการเติบโตของสตรอเบอรี่.* วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เกษตรศาสตร์). สงขลา: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. ถ่ายเอกสาร.

สุทธวัฒน์ เบญจกุล. (2548). *เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2548). *ผลของความเครียดจากเกลือต่อการขนส่งโคลีนเข้าสู่ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม Aphanothece halophytica*. วิทยานิพนธ์. วท.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2554). การปรับตัวของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือ. *วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้*. 2(1): 82-88.

เสน่จิต กิตติยานนท์. (2542). *การเจริญเติบโตและปริมาณโปรตีนของสาหร่ายเกลียวทองที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารและระดับความเค็มต่างกันในสภาพกลางแจ้ง*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). มหาสารคาม: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. ถ่ายเอกสาร.

อรุณี ยูวะนิยม. (2554). ดินเค็มและการแพร่กระจาย. *การจัดการแก้ไขปัญหาดินเค็ม*. สืบค้นเมื่อ 25 สิงหาคม 2554, จาก http://www.ldd.go.th/Lddwebsite/web_ord/Technical/HTML/Technical03001.html

อรัญ อินเจริญศักดิ์. (2532). *การเปลี่ยนแปลงด้านเมแทบอลิสมในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Aphanothece halophytica ที่เจริญภายใต้ความเครียดของเกลือ*. สืบค้นเมื่อ 20 สิงหาคม 2554, จาก http://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/6298.

อุดมลักษณ์ มณีโชติ. (2552). *รายงานการประชุม เรื่อง การทบทวนระเบียนรายการสาหร่ายและแพลงก์ตอนพืชในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติ.

Aphanothece hegewaldii. (2556). สืบค้นเมื่อ 20 มกราคม 2556, จาก http://ccala.butbn.cas.cz/col_images/16.jpg

Apte, S.K.; & Alahari, A. (1994). Role of alkali cation (K^+ and Na^+) in cyanobacterial nitrogen fixation and adaptation to salinity and osmotic stress. *Indian J Biochem Biophys*. (4): 79-267.

Bates, L.S.; Waldren, R. P.; & Teare, D. (1973). Rapid determination of free proline for water stess studies. *Plant Soil*. (39): 205-297.

Belay, A.; Ota, Y.; Miyakawa, K.; & Shimamatsu, H. (1993). Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina. J. Appl. Phycol*. (5): 235–241.

Betaine aldehyde. (2554). Retrieved November 1, 2011, from http://en.wikipedia.org/wiki/File:Betaine_aldehyde.svg

Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol*. (12): 431-434.

Bohnert, H.J.; & Jensen, R.G. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol*. (14): 89-97.

Bowlus, G.; et al. (1996). Betaine distribution in the Labiatae. *Biochem. Syst. Ecol*. (24): 71-81.

Campbell, M.K.; & Farrell, S.O. (2012). *Biochemistry*. pp. 459. USA: Mary Finch.

Canto de Loura, I.; Dubaco, J.P.; & Thomas, J.C. (1987). The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipids of cyanobacteria. *Plant physiology*. (83): 838 - 843.

Castro, H.; Battablia, J.; & Virtanen, E. (1998). Effect of finnstim on growth and sea water adaptation of Coho salmon. *Aquaculture*. (168): 423-429.

Chambers, S.T.; et al. (1999). Inhibitors of bacterial growth in urine: what is the role of betaines. *Int. J. Antimicrob. Agents*. (11): 293-296.

Chris, A.; et al. (2006). Proline accumulation in *Cylindrospermum* sp. *Environmental and Experimental Botany.* (57): 154-159.

Chroococcus sp. (2556). Retrieved January 20, 2013, from http://ccala.butbn. cas.cz/col_images/57.jpg

Ciferri, O.; & Tiboni, O. (1985). The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Annual Review of Microbiology*. (15): 503-526.

Cohen, Z. (1997). The chemicals of spirulina. In *Cell-Biology and Biotechnology*. Vonshak, A. (Ed.). pp. 175-204. London: Taylor & Francis.

Craig, S.A.S. (2004). Betaine in human nutrition. *Am. Soc. Nutrition*. (80): 539-549.

Dawson, E.Y. (1966). *Marine Botany*. pp. 371. New York: Rinechart & Winston.

Desplats, P.; Folco, E.; & Salerno, G.L. (2005). Sucrose may play an additional role to that of an osmolyte in *Synechocystis* sp. PCC 6803 salt-shocked cells. *Plant Physiology and Biochemistry.* (43): 133-138.

Ding, Y.; et al. (2008). High Potassium Aggravates the Oxidative Stress Inducedy by Magnesium Deficiency in Rice Leaves. *Elsevier Limited and Science Press.* 18(3): 316–327.

Flower, T.J.; Troke, P.F.; & Yeo, A.R. (1977). The mechanism of salt tolerane in halophyte. *Annu. Rev. Plant Physoil*. (28): 89-121.

Garham, J.; Hughes, L.Y.; & Wynjanes, R.G. (1981). Low molecular weight carbohydrates in some salt stressed plants. *Physiol. Plant*. (53): 27-33.

Grieve, C.M.; & Grattan, S.R. (1983). Rapid assay for determination of water-soluble quaternary-aminocompounds. *Plant Soil*. (70): 303–307.

Hagemann, M.; & Erdmann,N. (1997). Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology. In *Springer Verlag.* Rai,A.K. (Ed.). pp. 155–221. New Delhi: Narosa Publishing House.

Kavi Kishor, P.B.; Hong, Z.; Miao, G.H.; Hu, C.A.A.; & Verma, D.P.S. (1995). Overexpression of Dl-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases Proline production and confers osmotolerlance in transgenic plants. *Plant Physiol*. (108): 1387-1394.

Kettunen, H.; Peuranen, S.; & Tiihonen, M. (2001). Intestinal uptake of betain in vitro and the distribution of methyl groups from betain, Choline and methionine in the body of broiler chicks. *Comp. Biochem. Physiol.* (128): 269-278.

Kirrolia, A.; Bishnoi, N.R.; & Singh, N. (2011). Salinity as a factor affecting the physiological and biochemical traits of *Scenedesmus quadricauda. J. Algal Biomass Utln.* (4): 28-34.

Knoll, G.F. (1999). *Radiation detection and measurement* (3rd ed.). New York: Wiley.

Kramer, R.; & Morbach, S. (2004). BetP of *Corynebacterium glutamicum*, atransporter with three different functions: betaine transport. osmosensing and osmoregulation. *Biochim. Biophys*. (16598): 31-36.

Kumar, S.G.; Reddy, A.M.; & Sudhakar, C. (2003). NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Sci*. (165): 1245-1251.

Lalibert´e, G.; Olguin, E.J.; & No¨ue, J. de la. (1997). Mass cultivation and wastewater treatment using Spirulina. In *Cell-Biology and Biotechnology.* Vonshak,A. (Ed.). pp. 159–173. London: Taylor & Francis.

Laloknam, S.; et al. (2008). *Betaine, Glycerol, and Proline enhance seed germination and plant growth of Mung bean (Vignaradiate L.) under high salinity*. (CDROM). The 34th Congress on Science and Technology of Thailand. Bangkok: Queen Sirikit National Convention Center.

Laloknam, S.; et al. (2010). Salt stress induced glycine-betaine accumulation with amino and fatty acid changes in cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *As. J. Food Ag-Ind.* 3(1): 25-34.

Lang, F.; et al. (1998). Functional significance of cell volume regulation mechanisms. *Physiol.* (78): 247-306.

Lan-Zhou, C; et al. (2006). Effect of salt stress on carbohydrate metabolism in desert soil alga *Microcoleus vaginatus* Gom. *Journal of Integrative Plant Biology*. (8): 914-919.

Macleod, A.M.; & Orquodale, M.C. (1958). Water soluble carbohydrates of seeds of the gramineae. *New Phytol*. (57): 168-182.

Madhu, P.S.; Carolyn, A.B.; & Geoffrey, D.S. (1999). Involvement of the compatible solutes trehalose and sucrose in the response to salt stress of a cyanobacterial Scytonema species isolated from desert soils. *Biochimica et Biophysica Acta*. (1472): 519-528.

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* (3): 426–428.

Mishra, S.; et al. (2010). Removal of Ca^{2+} impurities from brine by marine cyanobacteria from Gujarat coast of India for the production of Industrial grade salt. *current research*. 1241-1248.

Monoraphidium saxatile. (2556). Retrieved January 20, 2013, from http://ccala.butbn.cas.cz/col_images/378.jpg

Morbach, S. & Kramer, R. (2003). Impact of transport processes in the osmotic response of *Corynebacterium glutamicum. J. Biotechnol*. (104): 69-75.

Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ*. (25): 239-250.

Neffati, M.; & Marzouk, B. (2008). Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions. *industrial crops and products.* (28): 137-142.

Nuccio, M.l,; Rhodes, D.; McNeil, S.D.; & Hanson, A.D. (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol*. (2): 128-134.

Prado, F.E.; Boero, C.; Gallarodo, M.; & Gonzalez, J.A. (2000). Effect of NaCl on germination, growth and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* wild seeds. *Bot. Bull. Acad. Sin*. (41): 27-34.

Prolin – Proline. (2554). Retrieved November 1, 2011, from http://en.wikipedia.org/wiki/File:Prolin_-_Proline.svg

Quick, P.; Siegl, G.; Neuhaus, E.; Feil, R.; & Sttit, M. (1989). Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose phosphate synthase. *Planta*. (177): 535-546.

Rai, A.,K.; & Sharma, N., K. (2006). Phosphate metabolism in the cyanobacteria *Anabaena doliolum* under salt stress. *Current Microbiology*. (52): 6-12.

Reed, R.H.; Stewart, W.D.P. (1985). Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Mar Biol.* (88): 1–9.

Reducing sugar. (2554). Retrieved January 20, 2013, from http://en.wikipedia.org/wiki/File:Glucose_chain_structure.svg

Rezanka, T.; Zahradnik, J. & Podojil, M. (1982). Hydrocarbons in green and blue green algae. *Folia Microbiol*. (27): 450-454.

Rubenhagen, R.; Morbach, S.; & Kramer, R. (2001). The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K^+. *EMBO.* (20): 5412-5420.

Salem, E.; et al. (2004). Salt-induced lipid changes in *Catharanthus roseus* cultured cell suspensions. *Phytochemistry*. (65): 1911–1917.

Scott, M.L. (1986). *Nutrition of humans and selected animal species*. New York: John Wiley and Sons.

Sharathchandra, K.; & Rajashekhar, M. (2011). Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobaacteria. *J.Algal Biomass Utln*. (2): 83-97.

Szablocs, I. (1994). In *Handbook of Plant and Crop Stress*. Pessarkali,M. (Ed.). pp. 3-11. New York: Mercel Dekker.

Ueda, A.; Yamamoto-Yamane,Y.; & Takaba,T.. (2007). Salt stress enhances proline utilization in the apical region of barley roots. *Biochemical and Biophysical Communications*. (355): 61-66.

US Salinity Laboratory Staff. (1954). Diagnosis and Improvement of Saline and Alkaline Soils. *USDA Handbook No.60*. Washington DC.

Viets, F.G. (1965). *The plant's need for and use of nitrogen: Soil Nitrogen*. Wisconsin: Society of Agron.

Venkataraman. (1981). Blue green algae: a possible remedy to nitrogen scarcity. *Curr. Sci*. (50): 253-256.

Wolk, C.P.; Ernst, A.; & Elhai, J. (1994). Heterocyst metabolism and development. In *The Molecular Biology of the Cyanobacteria*. Bryant,D.A. pp. 769-823. Netherlands: Kluwer Academic Press.

Zhang, F.; Yang, Y.L.; He, W.L.; Zhao, X.; & Zhang, L.X. (2004). Effect of salinity on growth and compatible solutes of callus induced from *Populus euphratica*. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. (40): 491-494.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย BG_{11}

อาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย BG_{11}

การเตรียม Stock Solution

Stock Solution I (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

K_2HPO_4	6.27 g

Stock Solution II (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

$MgSO_4 * 7 H_2O$	1.50 g

Stock Solution III (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

$CaCl_2 * 2 H_2O$	7.20 g

Stock Solution IV (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

$NaCl_2CO_3$	4.00 g

Stock Solution V (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

EDTA	0.20 g
Citric acid	1.20 g
Ferric ammonium citrate	1.20 g

Stock Solution VI (Trace element A5 + Co ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

H_3BO_3	2.86 g
$MnCl_2 * 4 H_2O$	1.81 g
$ZnSO_4 * 7 H_2O$	0.22 g
$Na_2MoO_4 * 2 H_2O$	0.39 g
$CuSO_4 * 5 H_2O$	0.079 g
$Co(NO_3)_2 * 6 H_2O$	0.049 g

อาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย BG_{11} (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารเคมี

$NaNO_3$	1.50 g
KCl	0.67 g
$MnSo_4 * 7 H_2O$	6.92 g
$MgCl_2 * 6 H_2O$	5.50 g
$CaCl_2 * 2 H_2O$	1.47 g
Solution I	1.00 ml
Solution II	1.00 ml
Solution III	1.00 ml

Solution IV	1.00 ml
Solution V	1.00 ml
Solution VI	1.00 ml

ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 7.6 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave

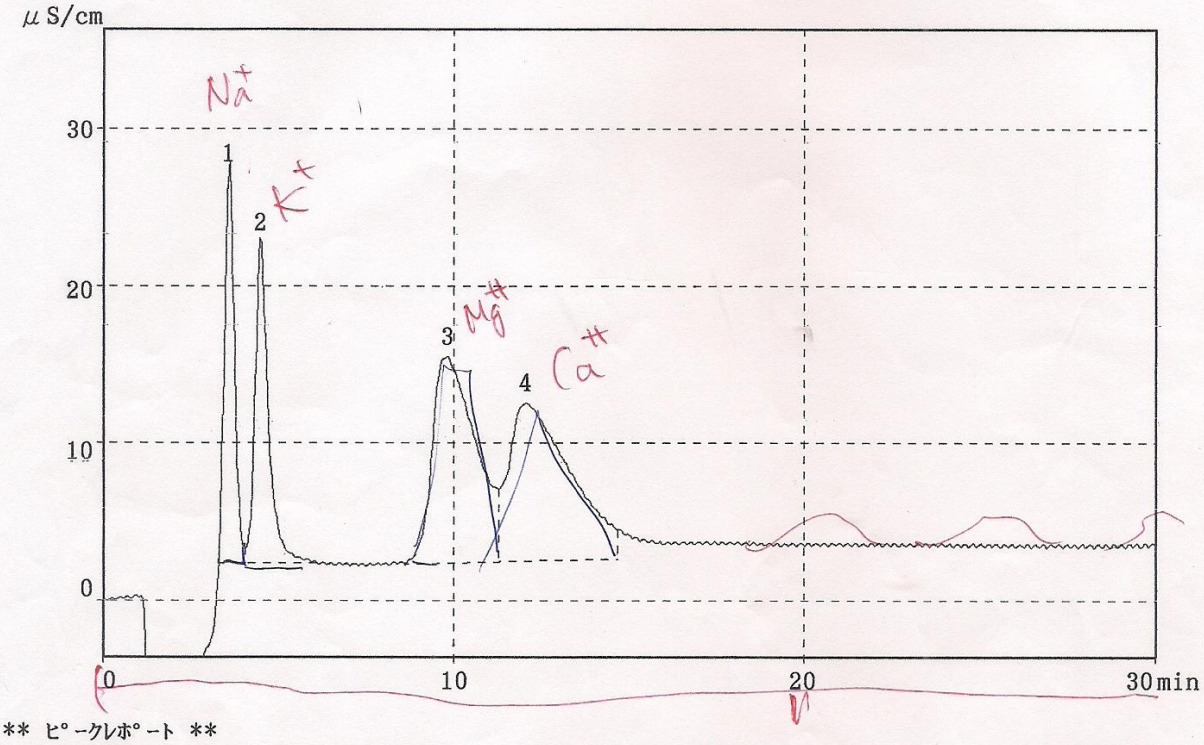
ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐานอิออน

กราฟมาตรฐานอิออน

PIA-1000 Ver.2.00A CH=1 Report No.1 ｸﾛﾏﾄ=121009U0.C00

ﾒｿｯﾄﾞﾌｧｲﾙ : C3STD001.MET 検量線作成日時 : 00/00/00 00/00/00
分析日時 : 12/10/09 13:15:07 ﾚﾎﾟｰﾄ出力日時 : 12/10/09 13:24:57
ｶﾗﾑ : Shim-pack IC-C3(S) (2.0 mm ID X 100 mm L)
移動相 : IC-MC3-1
流量 : 0.2mL/min 設定温度 : 35℃
ｶﾗﾑ圧力 : 31kgf/cm2 実測温度 : 35℃
検出 : 電導度 ﾎﾟﾗﾘﾃｨ : - ﾚｽﾎﾟﾝｽ : 3sec
試料 : 未知試料 注入量 : 10μL
ﾊﾞｲｱﾙID番号 : 20 希釈率 : 10

** ｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾑ **

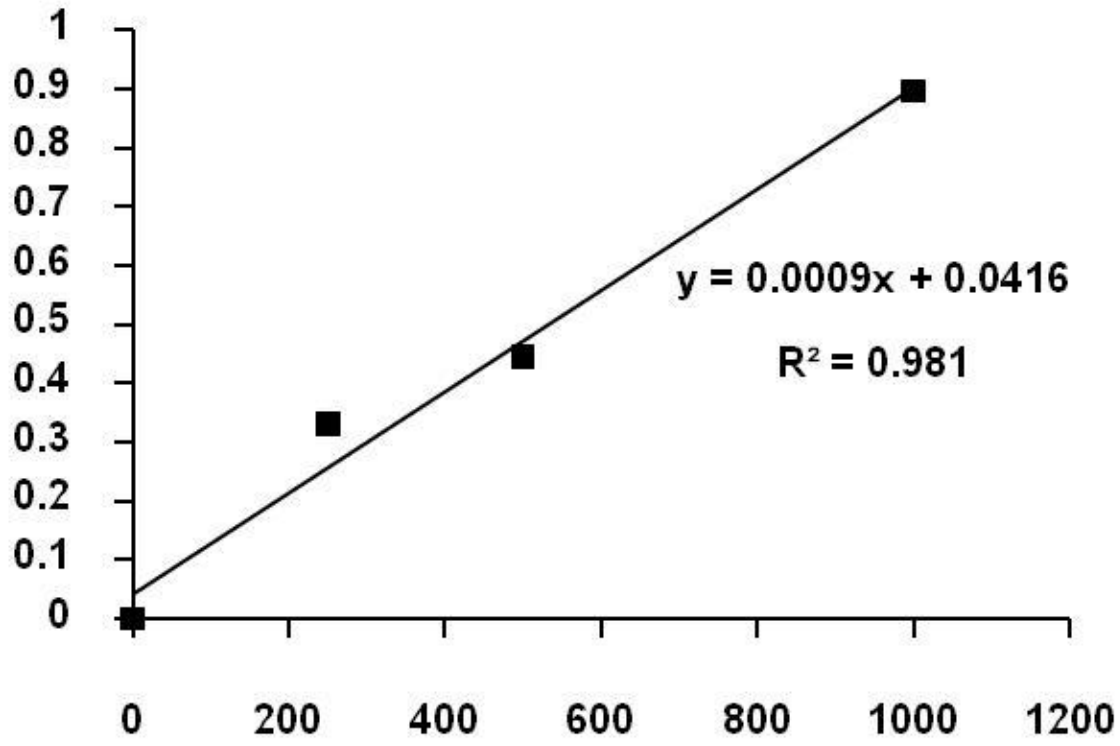


** ﾋﾟｰｸﾚﾎﾟｰﾄ **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	NAME	CONC(ppm)
1	1	3.592	5427996	255999				
	2	4.479	5791738	207246	SV			
	3	9.791	11588137	131542	V			
	4	12.059	12530244	101580	V			
	TOTAL		35338115	696367				

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐานโพรลีน

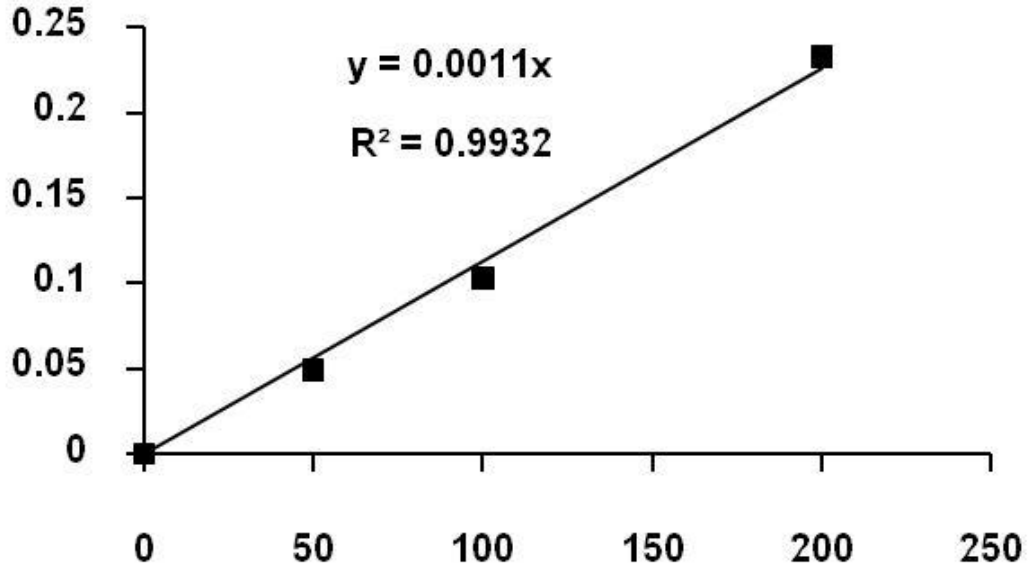
กราฟมาตรฐานโพรลีน



ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานบีเทน

กราฟมาตรฐานบีเทน



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวโพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์
วันเดือนปีเกิด	วันอังคารที่ 29 กระกฎาคม พ.ศ. 2529
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 9/36 หมู่ 8 ซอย 4 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลกระทุ่มล้ม อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2545	มัธยมศึกษาตอนต้นปีที่ 3 จาก โรงเรียนสิริธรราชวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม
พ.ศ. 2548	มัธยมศึกษาตอนปลายปีที่ 6 จาก โรงเรียนสิริธรราชวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม
พ.ศ. 2552	ปริญญาตรี การศึกษาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทั่วไป) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2556	ปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ