



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การจำแนกชนิดและวิเคราะห์ไฟโลเจเนติกของ
Cylindrospermopsis spp.
ที่แยกในประเทศไทยโดยเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์

Identification and Phylogenetic Analysis of *Cylindrospermopsis* spp.

Isolated in Thailand by Molecular Techniques

โดย

ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มีนาคม 2546

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การจำแนกชนิดและวิเคราะห์ไฟโลเจเนติกของ
Cylindrospermopsis spp.
ที่แยกในประเทศไทยโดยเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์

Identification and Phylogenetic Analysis of *Cylindrospermopsis* spp.
Isolated in Thailand by Molecular Techniques

คณะผู้วิจัย

ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย

สังกัด

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นางสาวเดือนรัตน์ ชลอุดมกุล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (Thailand Research Fund) ที่ให้ทุนวิจัย รหัสโครงการ BGJ/39/2543 และขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้การสนับสนุน เครื่องมือ อุปกรณ์ในการวิจัย

รหัสโครงการ BJC/39/2543

ชื่อโครงการ การจำแนกชนิดและวิเคราะห์ไฟโลเจเนติกของ *Cylindrospermopsis* spp. ที่
แยกในประเทศไทยโดยเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์

ชื่อนักวิจัย ดร.วิเชียร ยงมานิตชัย ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail fsciwcy@ku.ac.th

ระยะเวลา 1 ปี

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแพร่กระจายและแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ไซยาโนแบคทีเรียพิษ *Cylindrospermopsis* ในประเทศไทย และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และอนุพันธุศาสตร์ เพื่อการจัดจำแนก ผลการสำรวจพบว่าจากจำนวนแหล่งน้ำจืดทั้งหมด 175 แหล่ง พบไซยาโนแบคทีเรียพิษ 37 ตัวอย่าง ลักษณะของ trichome ที่พบมีทั้ง 2 แบบ คือแบบเส้นตรง และแบบเกลียว ลักษณะรูปร่างของ heterocyst ที่มีอยู่ 2 แบบเช่นกัน คือรูปใบหอก และรูปไข่ จากการคัดแยกสามารถรวบรวมสายพันธุ์บริสุทธิ์ได้ 19 สายพันธุ์

ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ปกติ heterocyst และ akinete ของ *Cylindrospermopsis* sp. 24 สายพันธุ์ (จากประเทศไทย 19 สายพันธุ์ ออสเตรเลีย 2 สายพันธุ์ และญี่ปุ่น 3 สายพันธุ์) พบว่ามีความแตกต่างทั้งขนาด รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ แต่ทั้งหมดมีลักษณะโดยทั่วไปเหมือนกับ *C. raciborskii* การศึกษาทางด้านสรีรวิทยาได้แก่ ลักษณะการเจริญและอุณหภูมิที่เหมาะสมของ 12 สายพันธุ์จากประเทศไทยก็ให้ผลคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้การวิเคราะห์องค์ประกอบของรงควัตถุในเซลล์ก็ไม่มี ความแตกต่างกัน

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าขนาดของชิ้น 16S rDNA จาก 24 สายพันธุ์มีค่าอยู่ระหว่าง 1354-1374 bp เมื่อทำการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามี ความเหมือนกันมากกว่า 99.5% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไซยาโนแบคทีเรียเหล่านี้มีความใกล้ชิดกันและเมื่อพิจารณาจากต้นไม้วิวัฒนาการทั้งหมดรวมกลุ่มเป็น cluster เดียวกัน

การตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค PCR ของ short tandemly repeated repetitive (STR) โดยใช้ primer หลายคู่แสดงความแตกต่างของ band pattern ระหว่างสายพันธุ์ของ ขนาดของชิ้น DNA หลังจากการทำ PCR อยู่ระหว่าง 0.3 ถึง 5.6 Kb คู่ primer ระหว่าง STR1R กับ STR3R ให้ผลดีที่สุดที่แสดงให้เห็นความแตกต่าง จนสามารถแยกกลุ่มสายพันธุ์ที่มี trichome แบบเกลียวและแบบเส้นตรงออกจากกัน ถึงแม้ว่าจะเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งน้ำเดียวกัน อย่างไรก็ตาม primer ทุกคู่ให้ผลเหมือนกันในการแยกสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นออกจากสายพันธุ์อื่นๆ ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างขึ้นมาจากข้อมูล STRR แยกสายพันธุ์ทั้งหมดออกเป็น 3 cluster ตามแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ สำหรับการสร้างสารพิษพบเฉพาะใน Cluster I ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย ส่วนสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นไม่พบว่ามีสารพิษ

คำหลัก toxic cyanobacteria, *Cylindrospermopsis*, Thailand, phylogenetics

Project Code BJG/39/2543

Project Title การจำแนกชนิดและวิเคราะห์ฟีโลเจเนติกของ *Cylindrospermopsis* spp. ที่แยกในประเทศไทยโดยเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์

Investigator ดร.วิเชียร ยงมานิตชัย ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail fsciwcy@ku.ac.th

Project Period 1 ปี

The objectives of this research are to study diversity and isolate axenic cultures of a toxic cyanobacterium, *Cylindrospermopsis* in Thailand. Morphological, physiological, biochemical and molecular characteristics were carried out for taxonomic studies. The cyanobacterium was observed in 37 samples out of 175 collected. Two trichome formations, namely straight and coiled, and two heterocyst shapes, *i.e.*, spear head and oval, were recorded. Single trichome isolation yielded 19 axenic cultures.

Morphological observations on sizes of vegetative cell, heterocyst and akinete were performed to characterize twenty-four strains of *Cylindrospermopsis* spp. (19 strains from Thailand, 2 strains from Australia and 3 strains from Japan). Although differences in size, shape and formation were noticed, all strains shared common morphological traits characteristic of *C. raciborskii*. Twelve strains from Thailand were subjected to physiological studied. The results revealed similar growth patterns and temperature tolerance among them. Pigment composition of the twelve strains also gave similar findings.

Analysis of 16S rDNA sequences was conducted to determine their phylogenetic relationship. The size of nucleotide fragments of 24 strains were in the range of 1354-1373 bp. All strains showed high 16S rDNA sequence similarity over 99.5% and formed a defined cluster after alignment and construction of phylogenetic tree.

PCR fingerprint of short tandemly repeated repetitive (STRR) sequence analysis was also carried out. Various combinations of STRR primers revealed different DNA band patterns and represented unique band among strains of *Cylindrospermopsis*. Size of amplified PCR products ranged from 0.3 to 5.6 Kb. The greatest variations of band patterns were found in combination of primers STRR1R and STRR3R which were able to obviously distinguished coiled trichomes from straight trichomes, even cultures isolated from the same populations. All primer combinations were clearly shown that Japanese strains are highly significant differences from Thai strains and Australian strains. Constructed phylogenetic tree revealed that the *C. raciborskii* strains were separated into the three genotypic clusters which is mostly corresponding to the geographic origins of strains. Toxic strains were restricted to Cluster I composed of Thai strains. In particular, the Japanese strains formed a clearly distinct cluster from others and were not toxic, suggesting a geographically differentiated genotype.

Keywords toxic cyanobacteria, *Cylindrospermopsis*, Thailand, phylogenetics

บทนำ

จากการที่แหล่งน้ำต่าง ๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งลักษณะทางเคมี ฟิสิกส์ และกระบวนการทางชีววิทยา ซึ่งมีผลกระทบต่อระบบนิเวศและสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ จึงกระตุ้นให้เกิดปรากฏการณ์ ยูโทรฟิเคชัน (eutrophication) เนื่องจากในแหล่งน้ำมีปริมาณธาตุอาหารเพิ่มขึ้น มีการดำเนินกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตสูงขึ้นและการตกตะกอนของอินทรีย์วัตถุจากลำน้ำ โดยเฉพาอย่างยิ่งกิจกรรมการใช้น้ำของมนุษย์ เช่น เพื่ออุปโภค-บริโภค เพื่อการเกษตร และเพื่อการอุตสาหกรรม เป็นปัจจัยสำคัญที่เร่งให้เกิดยูโทรฟิเคชัน

การเกิดยูโทรฟิเคชันทำให้สิ่งมีชีวิตจำพวกพืชน้ำและสาหร่าย (algae) หลายชนิดเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ชนิดของสาหร่ายที่พบจะมีความแตกต่างกันตามปัจจัยหลายประการ เช่น คุณภาพน้ำ สภาพภูมิศาสตร์และฤดูกาล ตัวอย่างเช่นในฤดูหนาวจะพบไดอะตอม (diatom) และสาหร่ายสีเขียว (green algae) เป็นจำนวนมาก ส่วนในฤดูร้อนจะพบสาหร่ายสีเขียวมากที่สุด ส่วนช่วงปลายฤดูร้อนต่อฤดูฝนจะพบไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) มากที่สุด การเพิ่มขึ้นของสาหร่ายเป็นจำนวนมากในแหล่งน้ำ จะมีผลกระทบโดยตรงต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ รวมทั้งการใช้ประโยชน์จากน้ำของมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Microcystis* ที่พบว่าหลายชนิดที่สามารถผลิตสารพิษ ได้แก่ *Microcystis aeruginosa*, *M. viridis*, *M. wesenbergii* และ *M. flos-aquae* แต่ชนิดที่พบมากที่สุด คือ *Microcystis aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin. (Bishop et al., 1959) สารพิษจาก *Microcystis* เรียกโดยทั่วไปว่า Microcystin เป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ตับ (hepatotoxin) ความรุนแรงของสารพิษขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ ปริมาณของสารพิษ และขนาดของสัตว์ที่ได้รับสารพิษนั้น (อาภารัตน์, 2542)

ปัจจุบันแหล่งน้ำหลายแห่งทั่วโลกทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อนกำลังประสบปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย ซึ่งนอกจากจะก่อให้เกิดปัญหาสำคัญต่อการจัดการแหล่งน้ำแล้ว ยังพบว่ามีสาหร่ายหลายสกุลที่สามารถผลิตสารพิษที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดการตายอย่างกว้างขวางของปลุสัตว์ สัตว์เลี้ยงตามบ้าน สัตว์ปีกที่อพยพย้ายถิ่นที่บริโภคน้ำในแหล่งน้ำที่มีการเจริญเติบโตของสาหร่ายอย่างหนาแน่นมาเป็นเวลานาน มนุษย์ก็สามารถได้รับสารพิษจากสาหร่ายและก่อให้เกิดอาการต่างๆ นอกจากนี้กิจกรรมบางอย่าง เช่น การเล่นกีฬาทางน้ำบางประเภทที่ทำให้มนุษย์ต้องหายใจเอาละอองน้ำ หรือการกลืนน้ำที่มีสาหร่ายปนเปื้อนเข้าไปโดยไม่ได้ตั้งใจ ในบางกรณีพบว่าทำให้เกิดอาการแพ้หรือเกิดอาการที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (Falconer, 1989)

โดยที่ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย จากการสำรวจพบว่าแหล่งน้ำหลายแห่งในประเทศไทยกำลังประสบปัญหาการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย และเมื่อทำการจัดจำแนกพบว่าส่วนใหญ่เป็นสาหร่ายที่ผลิตสารพิษที่เป็นอันตราย ถึงแม้ว่าจะยังไม่มีรายงานหรือการติดตามศึกษาเกี่ยวกับปัญหาที่เกิดขึ้น แต่ถ้าประชากรโดยเฉพาะประชากรที่อยู่ในชนบทใช้น้ำจากแหล่งน้ำที่มีสาหร่ายที่ผลิต

สารพิษปนเปื้อนเป็นเวลานาน หรือแม้แต่ประชากรในเมืองที่อาจได้รับสารพิษจากสาหร่ายที่ปนเปื้อนมากับน้ำประปา อาจก่อให้เกิดปัญหาการเจ็บป่วยดังที่ได้เกิดกับหลายประเทศมาแล้ว อย่างไรก็ตามปัญหาที่เกิดขึ้นในประเทศไทยยังไม่ชัดเจนพอที่จะทำให้บุคคลหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องหันมาสนใจและให้ความสำคัญต่อผลร้ายที่จะเกิดขึ้นในอนาคต

ไซยาโนแบคทีเรียพิษที่มีลักษณะเป็นสาวยาวในกลุ่ม *Cylindrospermopsis* สามารถสร้าง alkaloid hepatotoxin ที่เรียกว่า cylindrospermopsin (Ohtani *et al.*, 1992) และ neurotoxin ที่เรียกว่า saxitoxin analogs (Lagos *et al.*, 1999) ในปี ค.ศ. 1979 ได้เกิดการระบาดของโรคตับอักเสบที่ Solomon Dam, Palm Island ในมลรัฐ Queensland ของประเทศออสเตรเลีย โดยมีผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลถึง 148 ราย (Byth, 1980; Bourke, *et al.*, 1983) ซึ่งต่อมาพบว่าผู้ป่วยเหล่านี้ใช้น้ำที่มี *C. raciborskii* เจริญอยู่อย่างหนาแน่น

เมื่อไม่นานมานี้ได้มีรายงานถึงการพบ *Cylindrospermopsis* spp. ในแหล่งน้ำจืดต่างๆ เช่น อ่างเก็บน้ำ เขื่อน และบ่อน้ำ ทั่วทุกภาคของประเทศไทยทั้งในรูปของสาຍ trichome แบบเกลียวและแบบเส้นตรงที่มีรูปร่างของ heterocyst แบบกลมรีและแบบใบหอก (Yongmanitchai *et al.*, 1999; Chonudomkul *et al.*, 2000) ต่อมาได้มีรายงานเป็นครั้งแรกในเอเชียที่พบสารพิษ cylindrospermopsin และ deoxycylindrospermopsin ใน *C. raciborskii* ที่แยกจากอ่างเก็บน้ำในประเทศไทย (Li *et al.*, 2001).

ไซยาโนแบคทีเรียในยีนัส *Cylindrospermopsis* จัดแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาออกเป็น 8 สปีชีส์ ได้แก่ *C. raciborskii*, *C. africana*, *C. cuspidis*, *C. philippinensis* (Komarek and Kling, 1991), *C. curvispora* (Watanabe, 1995), *C. allantoidispora*, *C. catemaco* และ *C. tavernae* (Komakova, 1998) โดยการศึกษาส่วนใหญ่ใช้ตัวอย่างที่ได้มาจากแหล่งน้ำในธรรมชาติ ซึ่งทำการวิเคราะห์ลักษณะของ trichome ขนาดของเซลล์ปกติ (vegetative cell) ขนาดและรูปร่างของ heterocyst รอยคอดตรงบริเวณผนังกันเซลล์ (Komarek and Kling, 1991) แต่เนื่องจากสภาวะแวดล้อมของการเจริญมีผลต่อลักษณะต่างๆข้างต้น ทำให้ในปัจจุบันนี้มีข้อถกเถียงทางด้านการจัดจำแนกที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ดังนั้นข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์จึงเข้ามามีบทบาทอย่างมากในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ข้อมูลของ 16S rRNA ยีนใน *Cylindrospermopsis* เพื่อการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ โดยการนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการ ซึ่งมีรายงานว่าไซยาโนแบคทีเรียในยีนัส *C. raciborskii* นี้ถึงแม้จะมีรูปร่างของ trichome 2 แบบที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง (แบบเป็นเกลียว และแบบเส้นตรง) กลับมีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการที่จัดให้อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน (Sarker *et al.*, 1999; Sarker and Neilan, 2001; Li *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001) และยังมีรายงานเพิ่มเติมว่ายีน DNA-dependent RNA polymerase (rpoC1) ใน *C. raciborskii* เป็นส่วนที่ถูกอนุรักษ์ไว้อย่างดียิ่ง (Wilson *et al.*, 2000) และสามารถนำมาใช้ช่วยในการศึกษาทางอนุกรมวิธานเช่นเดียวกัน

ด้วยการนำข้อมูลจากการวิเคราะห์ 16S rRNA ยีนมาใช้ในการศึกษาทางด้านความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไซยาโนแบคทีเรียช่วยให้การจัดจำแนกเป็นไปได้อย่างถูกต้องและแม่นยำขึ้น เช่นในกรณีของ *Pseudoanabaena*, *Arthrospira* และ *Spirulina* และในบางครั้งช่วยให้การจัดจำแนกทำได้ง่ายขึ้น (Wilmotte, 1994)

Wilmotte et al. (1994) ยังได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 16S rRNA ยีนของไซยาโนแบคทีเรียน้ำเค็ม *Trichodesmium* sp. NIBB1067 และหลังจากได้สร้างต้นไม้วิวัฒนาการแล้วแสดงให้เห็นว่า *Trichodesmium* NIBB1067 กับ *Oscillatoria* PCC7515 มีความใกล้เคียงกัน โดยมีระดับความเหมือนถึง 94.9 %

Otsuka et al. (1998) ได้วิเคราะห์ลำดับวิวัฒนาการของ *Microcystis* 15 สายพันธุ์ ที่กระจายอยู่ใน 5 สปีชีส์ (จำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบของ phycobilin 2 ชนิด) โดยใช้ข้อมูลของยีน 16S rRNA และพบว่าทั้งหมดมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมมาก โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงมาก (บางครั้งเหมือน 100%) ทั้งๆที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและชนิดของ phycobilin จนจำแนกเป็นต่างสปีชีส์ เช่น *M. viridis* TAC17, *M. wesenbergii* TAC38 และ *M. aeruginosa* TAC71 มีความเหมือนร่วมกันถึง 100%

ในปี ค.ศ. 1999 Otsuka และคณะ ได้วิเคราะห์ยีน ITS (internal transcribed spacer) ที่อยู่ระหว่าง 16S rDNA กับ 23S rDNA ของ *Microcystis* 47 สายพันธุ์ โดยสร้างต้นไม้วิวัฒนาการจากเทคนิค maximum likelihood และ DNA distance และแสดงให้เห็นว่าสามารถแบ่ง *Microcystis* ออกเป็น 3 กลุ่ม (cluster) กลุ่มที่หนึ่งประกอบด้วยสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและไม่สร้างสารพิษ กลุ่มที่สองเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ และกลุ่มที่สามเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าโครงสร้างของต้นไม้วิวัฒนาการไม่ได้บอกถึงความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบของ phycobilin และลักษณะทางพันธุกรรมแบบหนึ่งอาจมีการแสดงออกได้หลายลักษณะ ซึ่งการใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน มีความผันแปรค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับ 16S rDNA อย่างไรก็ตามความเหมือนในสายนิวคลีโอไทด์ของ 16S-23S ITS ก็ยังสูงมากถึง 93.3-100%

Sarker และคณะ (1999) ได้ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ *C. raciborskii* ที่มี trichome แบบเกลียวและแบบเส้นตรงพบที่มีความเหมือนถึง 99.8% ซึ่งจากข้อมูลของยีน 16S rRNA ในไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆที่อยู่ใน Order Nostocales สามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่มตามลำดับวิวัฒนาการและพบว่า *Cylindrospermopsis* มีความใกล้เคียงกับยีนอื่นๆ โดยมีค่าความเหมือนมากกว่า 92% โดยมีค่าสูงสุดที่ 94.7% เมื่อเทียบกับ *A. cylindrica* NIES19 ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีสายวิวัฒนาการมาจากต้นกำเนิดเดียวกัน และมีค่าความเหมือนสูงถึง 97% เมื่อเทียบกับ *Nostoc* และ *Cylindrospermum*

นอกจากนี้ยังได้มีการนำเทคนิคอื่นๆ ทางอนุพันธุศาสตร์ เช่น DNA polymorphism มาใช้ในการศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของ *C. raciborskii* สายพันธุ์ต่างๆ ตัวอย่างเช่น

Sarker และ Neilan (2001) วิเคราะห์ยีน HIP1 (highly iterative palindrome) (HIP1) และ Wilson และคณะ (2000) ได้วิเคราะห์ยีน STRR (short tandemly repeated repetitive และได้แสดงถึงความแตกต่างระหว่าง *C. raciborskii* สายพันธุ์ต่างๆ สำหรับสาย STRR sequences ถูกค้นพบในจีโนมของไซยาโนแบคทีเรียยีส *Calothrix* โดย Marzel และคณะ ในปี ค.ศ. 1990 โดยพบว่ามีประมาณ 100 ชุดต่อจีโนมและแต่ละชุดประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 7 ตัว ปัจจุบันนี้มีการใช้ STRR เป็น primers ในการทำลายพิมพ์ DNA เพื่อศึกษาการกระจายของพันธุกรรมในไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับ *Gunnera* (Rasmussen and Svenning, 1998; Nilsson *et al.*, 2000) และ *Azolla* (Zheng *et al.*, 1999)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสำรวจการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียพิษ *Cylindrospermopsis* sp. ในแหล่งน้ำจืดทั่วประเทศ
2. เพื่อคัดแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ (axenic culture) ของไซยาโนแบคทีเรียพิษ *Cylindrospermopsis* sp. เพื่อการจัดจำแนกด้วยเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์
3. เพื่อศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียพิษ *Cylindrospermopsis* sp. จากข้อมูลทางฐานข้อมูล สรีระวิทยา และชีวเคมี

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างน้ำ

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างน้ำจากอ่างเก็บน้ำ เขื่อน และบึงต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย การเก็บตัวอย่างใช้ plankton net ขนาดรู 25 μm จากนั้นตรวจสอบการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียพิษ *Cylindrospermopsis* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง ตัวอย่างที่พบไซยาโนแบคทีเรียพิษนี้จะทำการคัดแยกเบื้องต้น โดยเทคนิค repeated pipetting and washing (Hoshaw and Rosowski, 1973) แล้ว enrich ในอาหาร CT medium (Ichimura, 1971) ที่มีส่วนประกอบดังนี้

Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	15	mg
KNO ₃	10	mg
β -Na ₂ -glycerophosphate	5	mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4	mg
Vitamin B12	0.01	μg
Biotin	0.01	μg
Thiamine HCl	1	μg
PIV metals	0.3	ml
TAPS	40	mg
Distilled water	99.7	ml
pH	8.2	

PIV metals (Provasoli and Pintner, 1959)

FeCl ₃ ·6H ₂ O	19.6	mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	3.6	mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.2	mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.4	mg
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	mg
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100	mg
Distilled water	100	ml

2. การคัดแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค repeated pipetting and washing

นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนในข้อ 1 มาบ่มไว้ในตู้แสงควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C ความเข้มแสงประมาณ 2,000 lux และ dark:light period = 12:12 ชั่วโมง จนสังเกตเห็นการเจริญด้วยคาเปล่า จึงนำมาแยกขั้นที่ 2 ด้วยเทคนิค repeated pipetting and washing เช่นเดิม จนได้ unialgal หรือ axenic culture โดยทำการตรวจสอบในอาหาร CTYT (Watanabe *et al.*, 2000) ที่ประกอบด้วย CT medium 100 มิลลิลิตร yeast extract 10 มิลลิกรัม และ tryptone 20

มิลลิกรัม หลังจากบ่มในตู้แสงควบคุมสภาวะแวดล้อมนาน 3-4 สัปดาห์ จึงนำมาตรวจสอบลักษณะต่างๆ เพื่อการจัดจำแนกโดยอาศัยหลักการของ Saker และคณะ (1999), Watanabe (1995), Brancò and Senna (1991) และ Komarek and Kling (1991) ต่อไป

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาประกอบด้วยรูปร่างและขนาดของ trichome ขนาดของเซลล์ รูปร่าง ตำแหน่งและขนาดของ heterocyst เชื้อที่ใช้ในการศึกษาจะเลี้ยงใน CT medium ในสภาวะแวดล้อมข้างต้นนาน 2-3 สัปดาห์

4. การศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา (physiological characteristics)

การศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาประกอบด้วยจลนพลศาสตร์ของการเจริญ อัตราการเจริญจำเพาะ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร CT medium ที่ 25°C นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของการขาดไนโตรเจน (nitrogen free medium) การขาดฟอสฟอรัส (phosphorus free medium) และอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญ การสร้าง heterocyst และการสร้าง akinete

5. การศึกษาลักษณะทางชีวเคมี (biochemical characteristics)

การศึกษาทางชีวเคมีทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของรงควัตถุในเซลล์โดยเทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu, model UV-160) ทั้ง *in vivo* และ *in vitro*

6. การศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ (genetic characteristics)

การศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อบริสุทธิ์ ประกอบด้วย

6.1 การวิเคราะห์ 16S RNA gene sequence

6.1.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย axenic culture ของ *Cylindrospermopsis* ทั้งหมด 24 สายพันธุ์ โดยแยกได้จากประเทศไทย 19 สายพันธุ์ จากประเทศญี่ปุ่น 3 สายพันธุ์ และจากประเทศออสเตรเลีย 2 สายพันธุ์ และใช้ *Anabaena* เป็น out-group ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมดในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ CT medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในตู้แสงความเข้ม 2,000 lux อุณหภูมิ 25°C ช่วงมีดะสว่าง 12:12 ชั่วโมง จนได้ความเข้มข้นเซลล์ที่ต้องการ

6.1.2 การสกัด genomic DNA ของไซยาโนแบคทีเรีย

นำเชื้อ *Cylindrospermopsis* ที่เพาะเลี้ยงในระยะ exponential ปริมาณ 10 มิลลิลิตร มาเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย 2% cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 500 μ l และ

mercaptoethanol 5 µl หลังจากบ่มที่ 50 °C นาน 1 ชม นำสารผสมมาปั่นให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Mini-Beadbeater™ (ใช้เม็ดแก้วขนาด 0.1 มม) นาน 30 วินาที 3 ครั้ง ทำการสกัด DNA โดยการเติมสารทำละลาย 500 µl ที่ประกอบด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) นำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที นำตะกอน DNA ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAEX II kit

6.1.3 การเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยเทคนิค PCR

สำหรับ 16S rRNA gene จะใช้ universal primers สำหรับไซยาโนแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ 107F และ 1497R โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นดังนี้

107F

5'-GGCGCACGGGTGAGTANNNNNN-3'

1497R

5'-ACGGCTACCTTGTTACGACNNNNN-3'.

ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA (Li, 1998) ใช้สารผสมที่มี 10XEXTaq™ buffer (Takara Biomedicals, Otsu, Shiga, Japan) 100 µl เป็นตัวกลาง และประกอบด้วย

genomic DNA	10	ng
primer	50	pmol
Takara EX Taq™ *	2.5	U
dNTP	2.5	mM

สภาวะการเกิดปฏิกิริยาทำใน Takara PCR Thermal Cycler (Takara Biomedicals, Otsu, Shiga, Japan) เริ่มด้วยการ denature ที่ 95°C นาน 3 นาที 1 รอบ หลังจากนั้นทำการเพิ่มชิ้น DNA 30 รอบ โดยการ denaturation ที่ 94°C นาน 10 วินาที ต่อด้วย annealing ที่ 53°C นาน 10 วินาที และ extension ที่ 72°C นาน 1.5 นาที สุดท้ายรักษาอุณหภูมิที่ 72°C อีก 8 นาที หลังจากนั้นทำการ purified PCR product โดยใช้ Wizard PCR purification system

6.1.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene

ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Cylindrospermopsis* 16S rDNA ใช้ primer 8 ชนิด ได้แก่

Primer	Sequence (5'—3')
107F	GGCGCACGGGTGAGTAA
1497R	ACGGCTACCTTGTTACGAC
522F	CAGCAGCCGCGGTAATAC
959R	TTCGCGTTGCATCGAATTAA
882F	CCGCCTGGGGAGTACG
517R	ACCGCGGCTGCTGGCACG
1185F	GTGGGGATGACGTCAAGTC
1387R	GGGCGGTGTGTACAAGGC

โดยนำ PCR product จากข้อ 6.1.3 ปริมาณประมาณ 0.1 pmol และ primer แต่ละชนิดปริมาณ 1.5-2.5 pmol มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ Dye namic ET terminator cycle sequencing kit ซึ่งใช้สภาวะสำหรับปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ ประกอบด้วย 95°C 20 วินาที 50°C 15 วินาที และ 60°C 1 นาที สุดท้ายรักษาสภาพที่ 4°C โดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation)

6.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ในส่วนของ Short Tandemly Repeated Repetitive (STR) Sequences

6.2.1 การสกัด DNA การสกัด genomic DNA ของไฮยาโนแบคทีเรีย ใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 6.1.2

6.2.2 การเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ด้วยเทคนิค PCR

สำหรับ STR gene จะใช้ primers 4 ชนิด (Mazel, *et al.*, 1990) คือ

STRR1F: (5'-CCCCARTCCCCART-3')

STRR1R: (5'-GGGGAYTGGGGAYT-3')

STRR3F: (5'-CAACAGTCAACAGT-3')

STRR3R: (5'-ACTGTTGACTGTTG-3')

ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA (Li, 1998) ใช้ 10X EX Taq™ buffer 50 µl เป็นตัวกลางและ ที่ประกอบด้วย

genomic DNA	10	ng
primer	50	pmol
Takara EX Taq™	2.5	U
dNTP	2.5	mM

สภาวะการเกิดปฏิกิริยาทำใน Takara PCR Thermal Cycler (Takara Biomedicals, Otsu, Shiga, Japan) เริ่มด้วยการ denature ที่ 94°C นาน 10 นาที 1 รอบ หลังจากนั้นทำการเพิ่มขึ้น DNA 30 รอบ โดยการ denaturation ที่ 94°C นาน 30 วินาที ต่อด้วย annealing ที่ 42°C นาน 1 นาที และ extension ที่ 65°C นาน 4 นาที สุดท้ายรักษาอุณหภูมิที่ 65°C อีก 7 นาที

6.2.3 การวิเคราะห์ band pattern ของ STRR PCR products

การวิเคราะห์ band pattern ของ STRR PCR products ทำใน agarose gel electrophoresis (Mupid 0832, Advanced Co., Ltd., Tokyo) โดยใช้ agarose 1%

6.3 Phylogenetic analysis

6.3.1 16S rRNA

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย automate DNA sequencer มาเทียบโดยใช้โปรแกรม ClustalW 1.8 จากนั้นทำการสร้างและวิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม Mega 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) โดยเทคนิค neighbour-joining ที่ทำการ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

6.3.2 ลายพิมพ์ DNA ของ STRR gene

ทำการวิเคราะห์ band pattern ของ STRR gene ใช้ซอฟต์แวร์ Image Master 2 Deluxe Version 2.00 โดยแปลงค่า band pattern ของลายพิมพ์ DNA เป็นค่า binary (มี = 1 และ ไม่มี = 0) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณลักษณะความแตกต่างและทำการสร้างและวิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการโดยเทคนิค neighbour-joining ด้วยโปรแกรม PUAP

7. การวิเคราะห์สารพิษ cylindrospermopsin

การวิเคราะห์สารพิษในไซยาโนแบคทีเรีย *Cylindrospermopsis* ใช้เทคนิค HPLC/MS เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร Jaworski's medium (Thompson *et al.*, 1988) นาน 1 เดือน ในตู้แสงควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C ความเข้มแสงประมาณ 2,000 lux และ dark:light period = 12:12 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ขึ้นปั่น 10 มิลลิลิตร ทำการเหวี่ยงแยกเซลล์แล้วสกัดสารพิษด้วยเมทานอล นำสารสกัดไประเหยจนแห้งภายใต้สุญญากาศ ละลายตะกอนที่เหลือด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านดลักรอง ODS (Sep-Pak C18, Waters Corporation, Massachusetts, USA) เก็บส่วนใสที่ผ่านดลักรอง แล้วนำมาระเหยให้เข้มข้นภายใต้สุญญากาศ นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/MS โดยใช้คอลัมน์ TSK-gel Amide-80 (Tosoh Corporation, Tokyo, Japan) ขนาด 100x2 มิลลิเมตร ใช้ mobile phase ประกอบด้วย linear gradient 100 ถึง 60 %

acetonitrile/น้ำ อัดราไหล 0.2 มิลลิลิตร/นาที และใช้ Photodiode array (ที่ 262 นาโนเมตร, SIM) ร่วมกับ Ma ($M+416$ m/z และ $M-414$ m/z) เป็น detector

ผลและวิจารณ์

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างน้ำ

จากการสำรวจแหล่งน้ำจืดทั้งหมด 176 แหล่ง ใน 64 จังหวัดของภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ (Figure 1 และ Table 1) พบการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียพิษค่อนข้างกว้างขวางใน 24 จังหวัด รวมตัวอย่างที่พบ 38 ตัวอย่าง ลักษณะของ trichome ที่พบมีทั้ง 2 แบบ คือแบบเส้นตรง (straight trichome) และแบบขดเกลียว (coiled trichome) (Figure 2) ตามที่ได้เคยมีรายงานไว้ (Saker และคณะ, 1999) ในจำนวนนี้ 26 ตัวอย่างพบเฉพาะแบบเส้นตรง 4 ตัวอย่างพบเฉพาะแบบขดเกลียว และอีก 8 ตัวอย่างพบทั้ง 2 แบบ (Table 2) นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นความแตกต่างของลักษณะรูปร่างของ heterocyst ที่มีอยู่ 2 แบบเช่นกัน คือ รูปใบหอก (spear-head) และรูปไข่ (oval) (Figure 3) ซึ่งส่วนใหญ่แล้ว *Cylindrospermopsis* sp. ที่พบจะมีรูปร่าง trichome แบบเส้นตรงและ heterocyst รูปไข่

2. การคัดแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค repeated pipetting and washing

การคัดแยกให้ได้ *Cylindrospermopsis* sp. ในลักษณะ axenic culture จากทั้งหมด 37 ตัวอย่าง (ที่เก็บในประเทศไทย) ด้วยเทคนิค repeated pipetting and washing สามารถแยกได้ทั้งหมด 19 สายพันธุ์ ประกอบด้วย 13 สายพันธุ์ trichome เป็นแบบ เส้นตรง และ 6 สายพันธุ์ trichome เป็นแบบขดเกลียว (Table 3) โดยสายพันธุ์ทั้งหมดมีลักษณะของ trichome ที่ใกล้เคียงกับ *C. raciborskii* (Table 4) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบเป็นส่วนใหญ่ในแหล่งน้ำทั่วโลก (Sarker et al., 1999) นอกจากนี้ยังได้แยก *Cylindrospermopsis* sp. ที่พบในประเทศออสเตรเลีย และประเทศญี่ปุ่นได้อีก 2 และ 3 สายพันธุ์ตามลำดับ ซึ่งนับเป็นความสำเร็จอย่างมากที่นักวิจัยของโครงการสามารถแยกสาหร่ายพิษชนิดนี้ให้บริสุทธิ์ได้ เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานที่ได้ดำเนินการแยก axenic culture ของสาหร่ายพิษชนิดนี้ได้สำเร็จ ในจำนวนนี้ 15 สายพันธุ์ (51001 – 51012, CRJ1, CRJ2 และ CRJ*) ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษารายละเอียดทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา ชีวเคมี เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้ในระยะแรกของโครงการฯ แต่ในการศึกษาทางอนุพันธุศาสตร์ใช้ทั้งหมด 24 สายพันธุ์ (51001-51019, CRJ1, CRJ2, KAJ1, KAJ2 และ KAJ3) สายพันธุ์ *Cylindrospermopsis* sp. ทั้งหมดเก็บรักษาอยู่ที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 3 แห่ง คือ Bioresource Laboratory (ภาควิชาจุลชีววิทยา) ห้องปฏิบัติการสาหร่าย (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร) และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ฝ่ายศูนย์เครื่องมือกลาง) นอกจากนี้ยังได้ฝากเก็บไว้ที่ Culture collection ของ National Institute for Environmental Studies เมือง Tsukuba ประเทศญี่ปุ่น

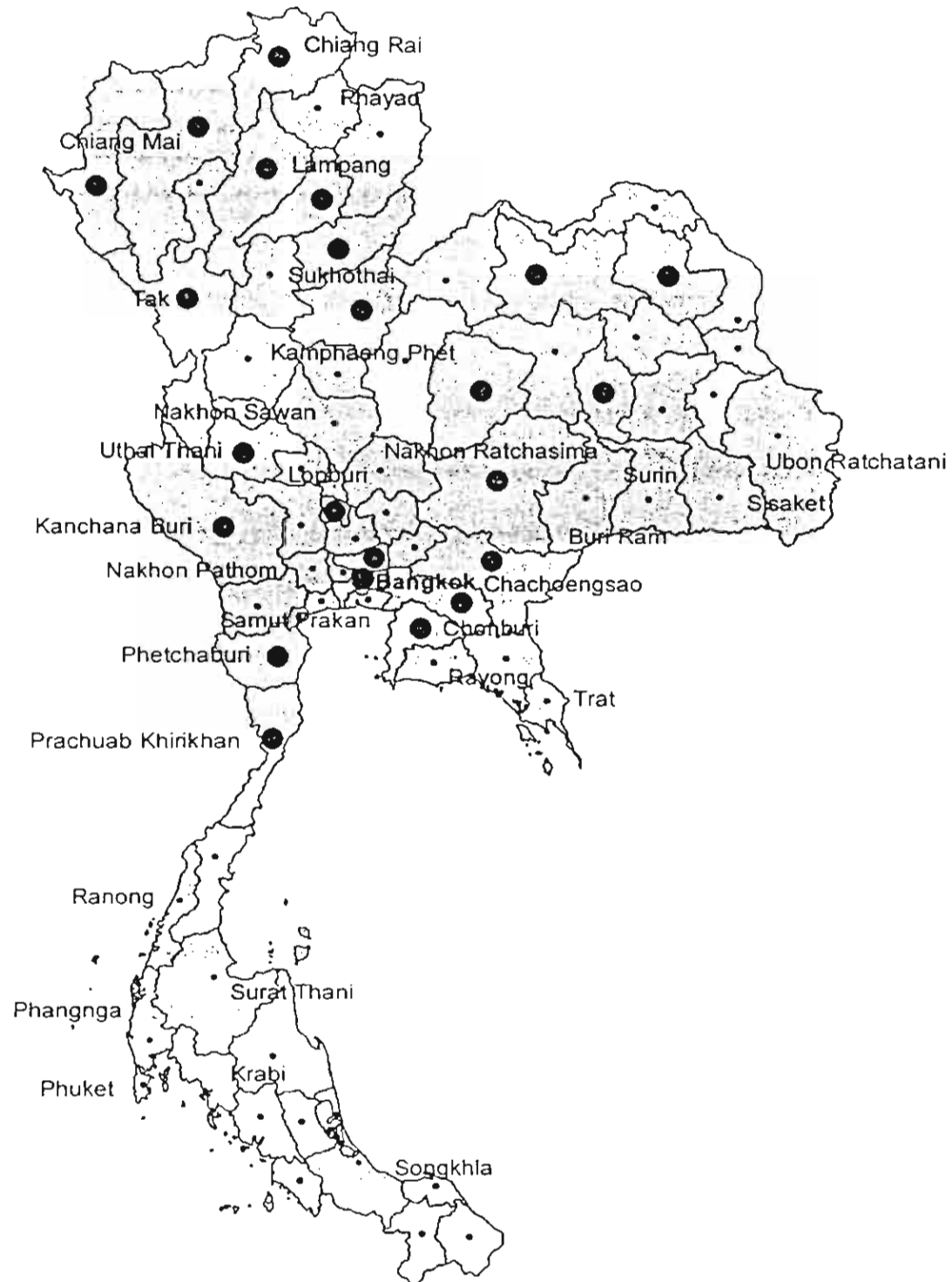


Figure 1 แผนที่แสดงจังหวัดที่ได้สำรวจการกระจายของสาหร่ายพิษ *Cylindrospermopsis*
(●) และจังหวัดที่พบ(⋯)

Table 1 Sampling sites.

No.	Place	Province	Usage
1	Lam Takhong Dam	Nakhon Ratchasima	Agriculture, consumption and recreation
2	Lam Phra Phloeng Dam	Nakhon Ratchasima	Agriculture and consumption
3	Non Thai	Nakhon Ratchasima	None
4	Bung Jasam 1	Nakhon Ratchasima	Agriculture
5	Bung Jasam 2	Nakhon Ratchasima	Agriculture
6	Huai Suppradoo	Nakhon Ratchasima	Agriculture and recreation
7	Bung Kra Ton	Nakhon Ratchasima	Consumption
8	Huai Chora Khe Mak Reservoir	Buri Ram	Agriculture and recreation
9	Ban Khra Dueng	Buri Ram	None
10	Huai Talat Reservoir	Buri Ram	Agriculture and recreation
11	Huai Sawai Reservoir	Buri Ram	Agriculture and recreation
12	Huai Kan Lueng Reservoir	Buri Ram	Agriculture
13	Pond in Buri Ram Park	Buri Ram	None
14	Krong Ma Now Reservoir	Buri Ram	Agriculture and consumption
15	Lam Nang Rong Dam	Buri Ram	Agriculture, consumption and recreation
16	Huai Lam Pok Reservoir	Surin	Agriculture
17	Huai Sanaeng Reservoir	Surin	Agriculture and recreation
18	Fish Pond Wat Ban Chaneng	Surin	Raising fish
19	Huai Kra Lao	Surin	Agriculture

Table 1 (continued).

No.	Place	Province	Usage
20	Pond Near Rajapat Institute	Ubon Ratchatani	None
21	Pond in Wat Thung Sri Muang	Ubon Ratchatani	None
22	Sirinthon Dam	Ubon Ratchatani	Agriculture, consumption and recreation
23	Chulaphorn Dam	Chaiyaphum	Agriculture and recreation
24	Ubolrat Dam	Khonkaen	Agriculture and recreation
25	Nong Pra Jak	Udon Tani	Recreation
26	Huai Luang Dam	Udon Tani	Agriculture
27	Pond in Udon Thani	Udon Tani	None
28	Nong Mek	Udon Tani	Agriculture
29	Ban Bang Pun	Nong Khai	None
30	Fish Pond in Fishery Station 1	Nong Khai	Raising Fish
31	Fish Pond in Fishery Station 2	Nong Khai	Raising Fish
32	Fish Pond in Fishery Station 3	Nong Khai	Raising Fish
33	Fish Pond in Fishery Station 4	Nong Khai	Raising Fish
34	Bung Kan	Nong Khai	Recreation
35	Nong Bo Nak Reservoir	Nong Khai	Agriculture
36	Ban Kok Kang	Nong Khai	None
37	Ban Tha Rai Thai Charoen	Nong Khai	None
38	Ban Had Phaeng	Nakhon Phanom	Agriculture
39	Somdet Pra Srinakarin Public Park	Sakhon Nakhon	Recreation
40	Nam Un Dam	Sakhon Nakhon	Agriculture
41	Nam Phung Dam	Sakhon Nakhon	Agriculture

Table 1 (continued).

No.	Place	Province	Usage
42	Huai Deak Reservoir	Sakhon Nakhon	Agriculture
43	Lam Pao Dam	Kalasin	Agriculture
44	Pond in Kalasin	Kalasin	None
45	Huai Pong Reservoir	Kalasin	Agriculture
46	Pla Koon Reservoir	Roi Et	Agriculture
47	Tawatchai Reservoir	Roi Et	Agriculture
48	Bung Palanchai	Roi Et	Recreation
49	Fish Pond in Fishery Research Center 1	Roi Et	Raising Fish
50	Fish Pond in Fishery Research Center 2	Roi Et	Raising Fish
51	Fish Pond in Fishery Research Center 3	Roi Et	Raising Fish
52	Fish Pond in Fishery Research Center 4	Roi Et	Raising Fish
53	Fish Pond in Fishery Research Center 5	Roi Et	Raising Fish
54	Nong Tha Chok Reservoir	Roi Et	Agriculture
55	Ban Non Mai	Roi Et	None
56	Fish Pond At Suwannaphum 1	Roi Et	Raising Fish
57	Fish Pond At Suwannaphum2	Roi Et	Raising Fish
58	Nong Phu	Yaso Thon	Agriculture
59	Nong Bo Mau Reservoir	Yaso Thon	Agriculture
60	Nong Luang	Amnat Charoen	Agriculture
61	Duck Pond At	Mahasarakham	None

Table 1 (continued).

No.	Place	Province	Usage
	Phayakhaphumphisai		
62	Duck Pond	Nakhon Pathom	None
63	Pond in Somdet Park	Kanchana Buri	None
64	Khun Pan Dam	Kanchana Buri	Agriculture, consumption and recreation
65	Tha Thung Na Dam	Kanchana Buri	Agriculture and consumption
66	Srinakarin Dam	Kanchana Buri	Agriculture, consumption and recreation
67	Khao Laem Dam	Kanchana Buri	Agriculture, consumption and recreation
68	Home Putae	Kanchana Buri	None
69	Muang Thong Tani	Bangkok	None
70	Pond Near Don Muang Airport	Bangkok	None
71	Pond Around Chitrarada Palace	Bangkok	None
72	Suan Luang Rama IX Public Park	Bangkok	Recreation
73	Pond Near Bang Na	Bangkok	None
74	Fish Pond in Kasetsart University 1	Bangkok	Raising Fish
75	Fish Pond in Kasetsart University 2	Bangkok	Raising Fish
76	Fish Pond in Kasetsart University 3	Bangkok	Raising Fish
77	Shrimp Pond	Chachoengsao	Raising shrimp
78	Bang Prong	Samut Prakan	None
79	Pond in Hua Chiew University	Samut Prakan	None

Table 1 (continued).

No.	Place	Province	Usage
80	Pond in Wutvittaya School	Chon Buri	None
81	Nong Phai Khaew	Chon Buri	None
82	Pond Near Nong Yai	Chon Buri	None
83	Bang Phra Reservoir	Chon Buri	Agriculture
84	Fish Pond in Bang Phra Reservoir 1	Chon Buri	Raising fish
85	Fish Pond in Bang Phra Reservoir 1	Chon Buri	Raising fish
86	Fish Pond in Bang Phra Reservoir 1	Chon Buri	Raising fish
87	Nong Khlo Reservoir	Chon Buri	Agriculture
88	Mab Pra Chan Reservoir	Chon Buri	Consumption
89	Nong Klang Dong Reservoir	Chon Buri	Agriculture
90	Pond in Kasetsart University	Chon Buri	None
91	Ban Mun Chitr Reservoir	Chon Buri	Agriculture
92	Dok Krai Reservoir	Rayong	Agriculture
93	Nong Pra Lai Reservoir	Rayong	Agriculture
94	Khao Chuk Reservoir	Rayong	Agriculture
95	EM Gardern	Trat	None
96	Duck Pond	Trat	None
97	Ban Plet Nai	Trat	None
98	Pa Sak Chonsit Dam	Lopburi	Agriculture and consumption
99	Huai Sup Lek Reservoir	Lopburi	Agriculture and consumption
100	Huai Som Reservoir	Lopburi	Agriculture and consumption
101	Duck Pond	Lopburi	None

Table 1 (continued).

No.	Place	Province	Usage
102	Fish Pond 1 Ban Don Tan	Lopburi	Raising fish
103	Fish Pond 2	Lopburi	Raising fish
104	Sub Ta Khien Reservoir	Lopburi	Recreation
105	Ban Fai Reservoir	Lopburi	Recreation
106	Pu Cae Gardern	Saraburi	None
107	Kang Kra Chan Dam	Phetchaburi	Agriculture, consumption and recreation
108	Phet Dam	Phetchaburi	Agriculture
109	Pran Buri Dam	Prachuap Khirikhan	Agriculture
110	Shimp Pond At Ngao	Ranong	Raising shimp
111	Ban Ngao	Ranong	None
112	Ban Bun Ya Ban	Ranong	None
113	Huai Ta Khang Reservoir	Ranong	Agriculture
114	Public Park At Phuket	Phuket	None
115	Klong Bang Yai	Phuket	Consumption
116	Ban Wat Dam	Phuket	Consumption and recreation
117	Ban Manik	Phuket	Consumption
118	Pond At Phuket	Phuket	None
119	Fish Pond At Thap Put	Phangnga	Raising fish
120	Somdet Phrasrinakharin Park	Phangnga	None
121	Pond At Khab	Khab	None
122	Tran Bok Khor Ra Nee National Park	Khab	Recreation
123	Pond Near Rajapat Institute	Songkhla	None

Table 1 (continued).

No.	Place	Province	Usage
124	Samila	Songkhla	None
125	Ratchaprapa Dam	Suratthani	Agriculture, consumption and recreation
126	Pond At Suratthani	Suratthani	None
127	Huai Pa Daeng Reservoir	Phetchabun	Agriculture
128	Huai Aee Mine Dam	Phetchabun	Agriculture
129	Ban Klong Kra Chang	Phetchabun	None
130	Nong Naree Gardern Park	Phetchabun	None
131	Nam Nao	Phetchabun	Recreation
132	Pond in Mae LA 1	Sing Buri	None
133	Pond in Mae LA 2	Sing Buri	None
134	Huai Som Khem Reservoir	Phitsanulok	Recreation
135	Pond in Phitsanulok Prison1	Phitsanulok	None
136	Pond in Phitsanulok Prison2	Phitsanulok	None
137	Bung Sri Fi	Phichit	Recreation
138	Wastewater Treatment Pond in Phichit	Phichit	Waste water treatment
139	Mae Man Reservoir	Phrae	Agriculture
140	Mae Thang Reservoir	Phrae	Agriculture
141	Fish Pond in Ban Mae Kam Mee Sri Phum	Phrae	Raising fish
142	Fish Pond Ban Noen Perm	Uthai Thani	Raising fish
143	Thap Salao Dam	Uthai Thani	Agriculture
144	Ban Nam Rob	Uthai Thani	Agriculture
145	Hin Cha Ngok	Kamphaeng Phet	Agriculture

Table 1 (continued)

No.	Place	Province	Usage
146	Pond in Rajapat Institute	Kamphaeng Phet	None
147	Boeng Boraphet	Nakhon Sawan	Agriculture and recreation
148	Huai Khong Krai Reservoir	Tak	Agriculture
149	Phumiphon Dam	Tak	Agriculture, consumption and recreation
150	Pond in Tak Public Park	Tak	None
151	Wastewater Treatment Pond	Tak	Wastewater treatment
152	Suan Luang Rama IX Public Park	Sukhothai	None
153	Huai Khong Maeng Cham Bon Reservoir	Uttaradit	Agriculture
154	Huai Nam Cham Reservoir	Uttaradit	Agriculture
155	Huai Dua Voak Reservoir	Uttaradit	Agriculture
156	Sirikit Dam	Uttaradit	Agriculture, consumption and recreation
157	Chong Khao Khat Dam	Uttaradit	Agriculture
158	Upper Huai King Reservoir	Lampang	Agriculture
159	Ang Kam Reservoir	Lampang	Agriculture
160	Mae Mor Sedimentation Pond	Lampang	Wastewater treatment
161	Mae Chang Reservoir	Lampang	Agriculture
162	Huai Sai Reservoir	Lampang	Agriculture
163	Kiew Lom Dam	Lampang	Agriculture, consumption and recreation
164	Kwan Phayao	Phayao	Agriculture and recreation
165	Fish Pond Wiang Pa Pao	Chiang Rai	Raising fish

Table 1 (continued).

No.	Place	Province	Usage
166	Pa Chan Reservoir	Chiang Rai	Agriculture
167	Ban Chang Khao Reservoir	Chiang Rai	Agriculture
168	Mae Kuang Udom Thara Dam	Chiang Mai	Agriculture, consumption and recreation
169	Ang Khaeo in Chiang Mai University	Chiang Mai	Consumption and recreation
170	Huai Tung Thao Reservoir	Chiang Mai	Recreation
171	Suan Luang Rama IX Public Park	Chiang Mai	Recreation
172	Fish Pond 1	Pathum Thani	Raising fish
173	Fish Pond 2	Pathum Thani	Raising fish
174	Fish Pond 3	Pathum Thani	Raising fish
175	Pond in Thanyaruk Hospital	Pathum Thani	None
176	Pond at Wat Chong Klang	Mae Hong Son	None

Table 2 Different morphological characteristics of *Cylindrospermopsis* sp. found in freshwater reservoirs, dams and ponds in Thailand.

Place	Province	Trichome		Heterocyst	
		Straight	Coiled	Oval	Spear head
Huai suppradoo	Nakhon Ratchasima	+	-	+	-
Bung Jasam 2	Nakhon Ratchasima	+	-	+	-
Ubolrat Dam	Khonkaen	+	-	+	-
Nong Pra Jak	Udon Thani	+	-	+	-
Huai Luang Dam	Udon Thani	+	-	+	-
Nong Mek	Udon Thani	+	-	+	-
Ban Bang Pon	Nong Khai	-	+	+	-
Fish pond in Fishery Station 3	Nong Khai	-	+	+	-
Ban Kok Kang	Nong Khai	+	-	+	-
Somdet Pra Srinakarin Public Park	Sakhon Nakhon	+	-	+	-
Fish pond at Suwannaphum 1	Roi Et	+	+	+	-
Fish pond at Suwannaphum 1	Roi Et	+	+	+	-
Tha Thung Na Dam	Kanchana Buri	+	-	+	-
Kang Kra Chan Dam	Phetcha Buri	+	-	+	-
Pran Buri Dam	Prachuap Khirikhan	+	-	+	-
Pa Sak Chonsit Dam	Lopburi	+	-	+	-
Sup Lek Reservoir	Lopburi	+	+	+	-
Shirmp pond	Chachoengsao	+	+	+	+
Nong Phai Khaew	Chonburi	+	+	+	-

Table 2 (continued)

Place	Province	Trichome		Heterocyst	
		Straight	Coiled	Oval	Spear head
Fish pond in Bang Phra Reservoir	Chonburi	+	+	+	-
Pond near Don Muang Airport	Bangkok	+	-	+	-
Fish pond in KU 1	Bangkok	+	+	+	-
Fish pond in KU 2	Bangkok	+	+	+	-
Pond in Thanyaruk hospital	Pathum Thani	-	+	+	-
Klong 5	Pathum Thani	+	-	+	-
Thap Salao Dam	Uthai Thani	+	-	+	-
Pond in Public Park	Tak	+	-	+	-
Wastewater treatment pond	Tak	+	-	+	-
Chong Khao Khat Dam	Uttaradit	+	-	+	+
Huai Sai Reservoir	Lampang	+	-	+	-
Pa Chan Reservoir	Chiang Rai	-	+	+	-
Huai Tung Thao reservoir	Chiang Mai	+	-	+	+
Suan Luang Rama IX public park	Chiang Mai	+	-	+	-
Mae Man Reservoir	Phrae	+	-	+	-
Mae Thang Reservoir	Phrae	+	-	+	-
Huai Pa Daeng Reservoir	Phetchabun	+	-	+	-
Pond in Phitsanulok prison	Phitsanulok	+	-	+	-
Pond at Wat Chong Klang	Mae Hong Son	+	-	+	-

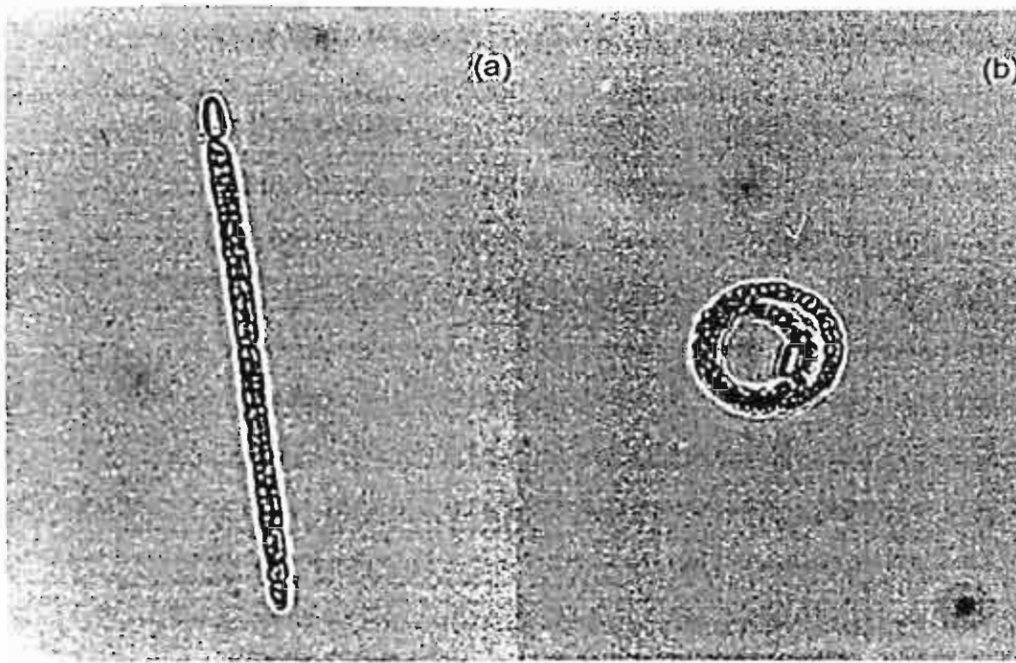


Figure 2 Two forms of trichome of *Cylindrospermopsis* sp. (a) straight and (b) coiled.

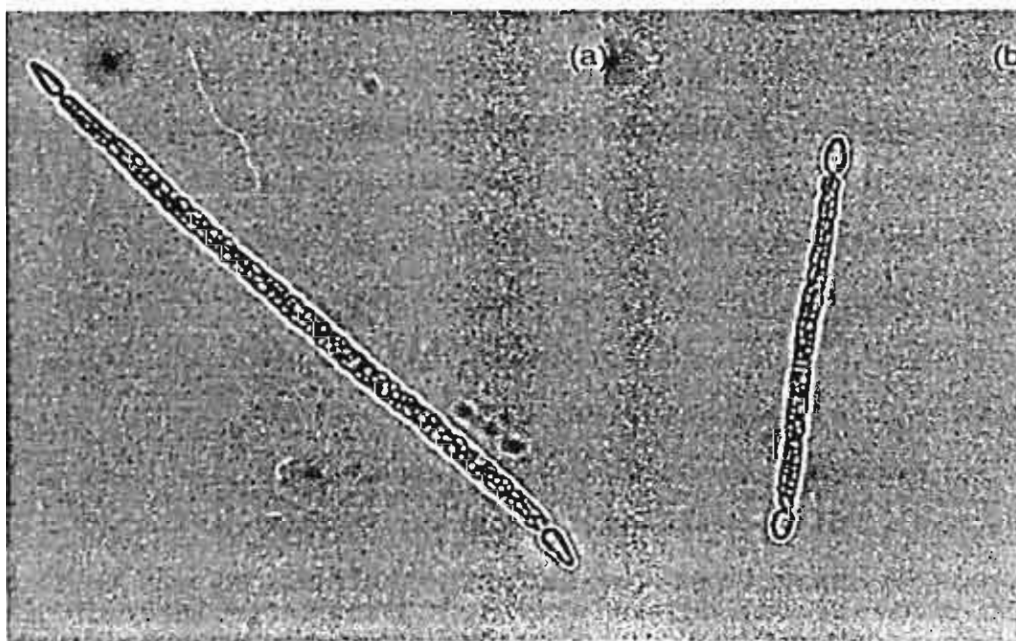


Figure 3 Shapes of heterocyst of *Cylindrospermopsis* sp. (a) spear head (b) ovoid.

Table 3 Axenic cultures of *Cylindrospermopsis* sp. obtained from various sources.

Strain No.	Forms of Trichome	Sources
51001	Straight	Huai Suppradoo, Nakhon Ratchasima
51002	Straight	Pond In Public Park, Tak
51003	Straight	Huai Tung Thao, Chiang Mai
51004	Coiled	Pa Chan Reservoir, Chiang Rai
51005	Coiled	Shirmp Pond, Chachoengsao
51006	Straight	Shirmp Pond, Chachoengsao
51007	Coiled	Nong Phai Khaew, Chonburi
51008	Straight	Nong Phai Khaew, Chonburi
51009	Coiled	Thap Salao Dam, Uthai Thani
51010	Straight	Thap Salao Dam, Uthai Thani
51011	Straight	Kang Kra Chan Dam, Phetchaburi
51012	Straight	Chong Khao Khat Dam, Uttaradit
51013	Straight	Huai Pa Daeng Reservoir, Phetchabun
51014	Straight	Ubolrat Dam, Khon Kaen
51015	Straight	Nong Mek, Udon Thani
51016	Straight	Ban Kok Kang, Nong Khai
51017	Coiled	Fish Pond at Suwannaphum1, Roi Et
51018	Straight	Fish Pond at Suwannaphum1, Roi Et
51019	Coiled	Fish Pond at Suwannaphum2, Roi Et
CRJ1	Coiled	Palm Island, Austraria [#]
CRJ2	Straight	Palm Island, Austraria [#]
CRJ*	Coiled	Palm Island, Austraria [#]
KJA1	Straight	Lake Kuono, Ibaraki, Japan
KJA2	Straight	Lake Kuono, Ibaraki, Japan
KJA3	Straight	Lake Kuono, Ibaraki, Japan

[#] Courtesy of Dr. M.M. Watanabe, National Institute of Environmental Studies, Tsukuba, Japan

Table 4 Trichome characteristics of *Cylindrospermopsis* spp. isolated from Thailand, Australia and Japan.

Strain	Trichome			
	Type	Apical cell	Cross wall	Coiled diameter (μm)
51001	Straight	Conical rounded	Not constricted	-
51002	Straight	Cylindrical rounded	Not constricted	-
51003	Straight	Conical pointed	Not constricted	-
51004	Irregularly coiled	Conical rounded	Not constricted	12.1-19.4
51005	Irregularly coiled	Cylindrical or conical ounded	Various degree of cross wall constriction	10.9-15.7
51006	Straight	Pointed	Not constricted	-
51007	Irregularly coiled	Cylindrical or conical ounded	Not constricted	12.1-18.2
51008	Straight	Conical rounded	Various degree of cross wall constriction	-
51009	Irregularly coiled	Cylindrical rounded	Not constricted	9.7-17.0
51010	Straight	Conical rounded or pointed	Various degree of cross wall constriction	-
51011	Straight	Cylindrical round	Not constricted	-
51012	Straight or slightly curved	Cylindrical or conical rounded	Not constricted	-
51013	Straight or slightly curved (rarely regular coiled)	Sharp pointed	Not constricted	-

Table 4 (continued).

Strain	Trichome			
	Type	Apical cell	Cross wall	Coiled diameter (μm)
51014	Straight	Conical rounded	Not constricted	-
51015	Straight slightly curved	Cylindrical or conical rounded	Not constricted	-
51016	Straight	Cylindrical or conical rounded	Not constricted	-
51017	Irregularly coiled	Cylindrical rounded	Not constricted	ND
51018	Straight slightly curved	Cylindrical or conical rounded or pointed	Not constricted	-
51019	Irregularly coiled	Cylindrical rounded	Not constricted	12.1-26.9
CRJ1	Regularly coiled	Conical rounded	Not constricted	ND
CRJ2	Straight slightly curved	Cylindrical or conical rounded	Not constricted	-
CRJ*	Irregularly coiled (except around heterocyst)	Cylindrical or conical rounded	Not constricted	ND
KJA1	Straight	Cylindrical or conical rounded	Not constricted	-
KJA2	Straight	Cylindrical or conical rounded	Not constricted	-
KJA3	Straight	Cylindrical or conical rounded	Not constricted	-

* ND = Not determined

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

ในการศึกษาทางสัณฐานวิทยา จะทำการเพาะเลี้ยง *Cylindrospermopsis* sp. ทั้ง 24 สายพันธุ์ ในสภาวะแวดล้อมมาตรฐานคือ ใช้อาหาร CT medium อุณหภูมิ 25°C ความเข้มแสง 2000 lux ช่วงมืด:สว่าง = 12:12 ชั่วโมง นาน 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง ได้แก่ ขนาดของเซลล์ (Table 5) และขนาดของ heterocyst (Table 6) ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้ เซลล์ปกติมีรูปร่างทรงกระบอก ขนาดกว้าง 1.9-6.3 μm และยาว 3.0-18.5 μm คิดเป็นสัดส่วนความยาว:ความกว้าง 0.8-7.0 สาย trichome อาจมี heterocyst (terminal) ที่ปลายด้านใดด้านหนึ่ง หรือทั้ง 2 ด้านและมีขนาดกว้าง 1.9-7.0 μm และยาวเฉลี่ย 3.3-11.9 μm คิดเป็นสัดส่วนความยาว:ความกว้าง 0.9-5.2

นอกเหนือจากความแตกต่างของรูปร่าง trichome ที่มีอยู่ 2 แบบ คือแบบเกลียวและแบบเส้นตรงแล้ว สายพันธุ์ทั้งหมดมีลักษณะที่ใกล้เคียงกันมาก ได้แก่ บริเวณผนังกันเซลล์ของ trichome ทั้ง 2 แบบ ไม่มีรอยคอด หรือมีก็เพียงเล็กน้อย ภายในเซลล์มี gas vacuoles กระจายอยู่ทั่วไป รูปร่างของเซลล์ส่วนใหญ่เป็นทรงกระบอก มีขนาดกว้าง 1.9 – 6.3 μm และยาว 3.0 – 18.5 μm ทำให้สัดส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างมีค่าอยู่ระหว่าง 0.8 – 7.0 เซลล์สายพันธุ์ 51011 จะมีขนาดแคบที่สุด คือ $2.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$ และสายพันธุ์ 51004 จะมีขนาดเซลล์กว้างที่สุด ($4.7 \pm 0.7 \mu\text{m}$) ในขณะที่สายพันธุ์ 51005 จะมีเซลล์โดยเฉลี่ยสั้นที่สุดอยู่ระหว่าง $5.8 \pm 1.5 \mu\text{m}$ และสายพันธุ์ 51016 มีความยาวที่สุด $11.6 \pm 3.9 \mu\text{m}$ (Figure 4) เซลล์ตรงปลายสาย trichome มีรูปร่างทรงกระบอก หรือรูปกรวย หรือกลม สำหรับเซลล์ heterocyst ที่พัฒนามาจากเซลล์ปลายสายอาจเป็นเซลล์เดี่ยว หรือเซลล์คู่ และอาจมีเพียงปลายด้านเดียว หรือปลายทั้งสองด้าน เป็นที่น่าสังเกตว่าบางสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทยและออสเตรเลีย สามารถสร้างเซลล์ heterocyst บริเวณตรงกลางสายที่เรียกว่า intercalary heterocyst (Figure 5) รูปร่างของเซลล์ heterocyst เป็นท่อนตรงมีรูปร่างทรงกระบอก หรือรูปกรวย หรือกลม ขนาดกว้าง 1.9 – 7.0 μm และยาว 3.0 – 11.9 μm สายพันธุ์ 51011 มีขนาดแคบที่สุด (เช่นเดียวกับเซลล์ปกติ) $2.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$ และสายพันธุ์ CRJ* จากประเทศออสเตรเลียมีขนาดกว้างที่สุด $5.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (Table 6 และ Figure 6) ในขณะที่ความยาวโดยเฉลี่ยของเซลล์ heterocyst จะอยู่ระหว่าง $4.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (ในสายพันธุ์ 51009) ถึง $8.5 \pm 1.6 \mu\text{m}$ (ในสายพันธุ์ KJA3) akinete ที่ไซยาโนแบคทีเรียสร้างเป็นเซลล์พิเศษเพื่อการดำรงชีวิตในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้อต่อการเจริญ พบเพียงไม่กี่สายพันธุ์ ได้แก่ 51013, 51014 และ 51016 (จากประเทศไทย) CRJ1 และ CRJ2 (จากประเทศออสเตรเลีย) และ KJA1, KJA2 และ KJA3 (จากประเทศญี่ปุ่น) ตำแหน่งของ akinete มักอยู่ติดกับ heterocyst หรือห่างออกมา 2 เซลล์ ส่วนใหญ่พบเป็นเซลล์เดี่ยว บางครั้งอาจพบ 2 เซลล์อยู่ติดกันหรือแยกจากกัน ไม่ค่อยพบ akinete มากถึง 3 เซลล์ (Figure 7) รูปร่างเป็นทรงกระบอกขนาดกว้าง 2.8 – 7.0 μm และยาว 8.5 – 17.8 μm ทำให้มีสัดส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้าง 1.5 – 5.8 (Table 7 และ Figure 8) สายพันธุ์ 51014 มีขนาด akinete แคบที่สุดเฉลี่ย $3.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ และสายพันธุ์ CRJ2 มีขนาดกว้างที่สุดเฉลี่ย $5.3 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ความ

ยาวของ akinete อยู่ระหว่าง $11.3 \pm 2.1 \mu\text{m}$ (ในสายพันธุ์ 51014) ถึง $14.2 \pm 2.4 \mu\text{m}$ (ในสายพันธุ์ KJA2) จาก Figure 4, 6 และ 8 จะเห็นได้ว่าขนาดของเซลล์ปกติ heterocyst และ akinete ทั้งความกว้างและความยาวใกล้เคียงกันจนไม่สามารถใช้เป็นลักษณะที่ใช้ในการแยกหรือจัดกลุ่มสายพันธุ์ต่างเหล่านี้ได้ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ทั้งหมดนี้มีลักษณะที่ใกล้เคียงอย่างมากกับคำบรรยายทางสายพันธุ์ของ *C. raciborskii* (AF067818 and AF067819) ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ นอกจากนี้สายพันธุ์ทั้งหมดนี้มีความแตกต่างทางด้านรูปร่าง ลักษณะอย่างมากจาก *C. philippinensis* ที่มี trichome แบบเกลียวและ heterocyst ทรงกรวยและโค้งเล็กน้อย เมื่อเทียบกับ *C. africana* ที่เซลล์ด้านปลายกลมมน และมีค่าของสัดส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างระหว่าง 1.6-13.2 ในขณะที่ *C. cuspis* มีเซลล์ด้านปลายรูปกรวยแหลมและมีค่าของสัดส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างค่อนข้างสูงระหว่าง 4.2-22.8 ส่วน *C. curvispora* จะมี heterocyst ค่อนข้างเฉพาะตัวคือ รูปกรวย ปลายมน และค่อนข้างโค้ง จึงสามารถสรุปโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่าสายพันธุ์ *Cylindrospermopsis* ที่แยกได้ทั้งหมดนี้เป็น *C. raciborskii* เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปลักษณะ รูปร่างของไซยาโนแบคทีเรียจะเปลี่ยนไปตามสภาวะแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งไนโตรเจนจะมีอิทธิพลอย่างมาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมและนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน สำหรับ *C. raciborskii* ได้มีรายงานก่อนหน้านี้ถึงรูปร่างของ trichome ทั้ง 2 แบบ (Saker et al., 1999) ซึ่งสรุปได้ว่า *C. raciborskii* ทั้งหมดที่พบในประเทศออสเตรเลียเป็นสปีชีส์เดียวกันรวมทั้งที่มี trichome แบบเกลียวและแบบเส้นตรง (Saker et al., 1999; Wilson et al., 2000; Saker and Neilan, 2001) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ก็ยืนยันถึงผลที่ Saker และคณะได้รายงานไว้ (1999) รวมทั้งที่ต่อมา Saker and Neilan (2001) ได้ศึกษาเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ STRR ใน *C. raciborskii* 13 สายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศออสเตรเลียสามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์ที่มี trichome แบบเกลียวรวมอยู่ด้วยกันชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างรูปร่างกับลักษณะทางพันธุกรรม (Wilson et al., 2000)

Table 5 Vegetative cell size of *Cylindrospermopsis* sp.

Strain	Size (μm)		
	Width	Length	L : W ratio
51001	2.0-4.0	3.5-12.0	1.2-3.7
51002	3.0-4.5	4.0-10.0 (12.0)	0.9-3.3
51003	3.0-5.0	4.5-13.0	1.0-3.4
51004	3.0-6.0	4.0-12.0	1.0-3.3
51005	3.0-5.5	3.0-8.5	1.0-2.3
51006	2.5-5.0	4.0-13.0(18.5)	0.8-4.0
51007	3.0-4.5	4.0-11.0	1.0-3.7
51008	3.5-6.0	5.0-13.5 (20.0)	1.1-4.6
51009	3.0-5.5	(3.5) 4.5-10.00 (13.5)	1.0-3.4
51010	2.6-5.2	3.7-14.1(21.5)	1.1-4.8
51011	1.9-3.3	(3.7) 5.6-16.3 (17.8)	1.7-7.0
51012	2.6-4.4	4.1-10.4	1.1-3.9
51013	2.2-3.7	4.4-13.0 (15.6)	1.3-4.7
51014	2.2-4.8	4.4-18.5 (20.4)	1.4-6.0
51015	3.0-4.8	5.2-18.5 (22.2)	0.9-5.5
51016	3.3-5.6	6.3-18.5 (22.2)	1.3-5.0
51017	2.6-4.1	5.2-15.6	1.4-4.7
51018	3.0-4.8	5.2-14.0 (19.3)	1.1-4.4
51019	3.0-4.8	4.4-13.7	1.3-3.6
CRJ1	2.6-4.4	4.8-10.7	1.2-3.6
CRJ2	2.6-4.0	4.4-13.0	1.5-4.4
CRJ*	3.3-6.3	4.4-14.1 (16.7)	1.0-3.8
KJA1	2.2-3.7	4.8-14.8 (15.9)	1.6-6.3
KJA2	3.0-4.4	(5.2) 6.3- 15.6 (17.8)	1.6-4.8
KJA3	2.6-4.4	5.6-16.8 (17.4)	1.7-6.4

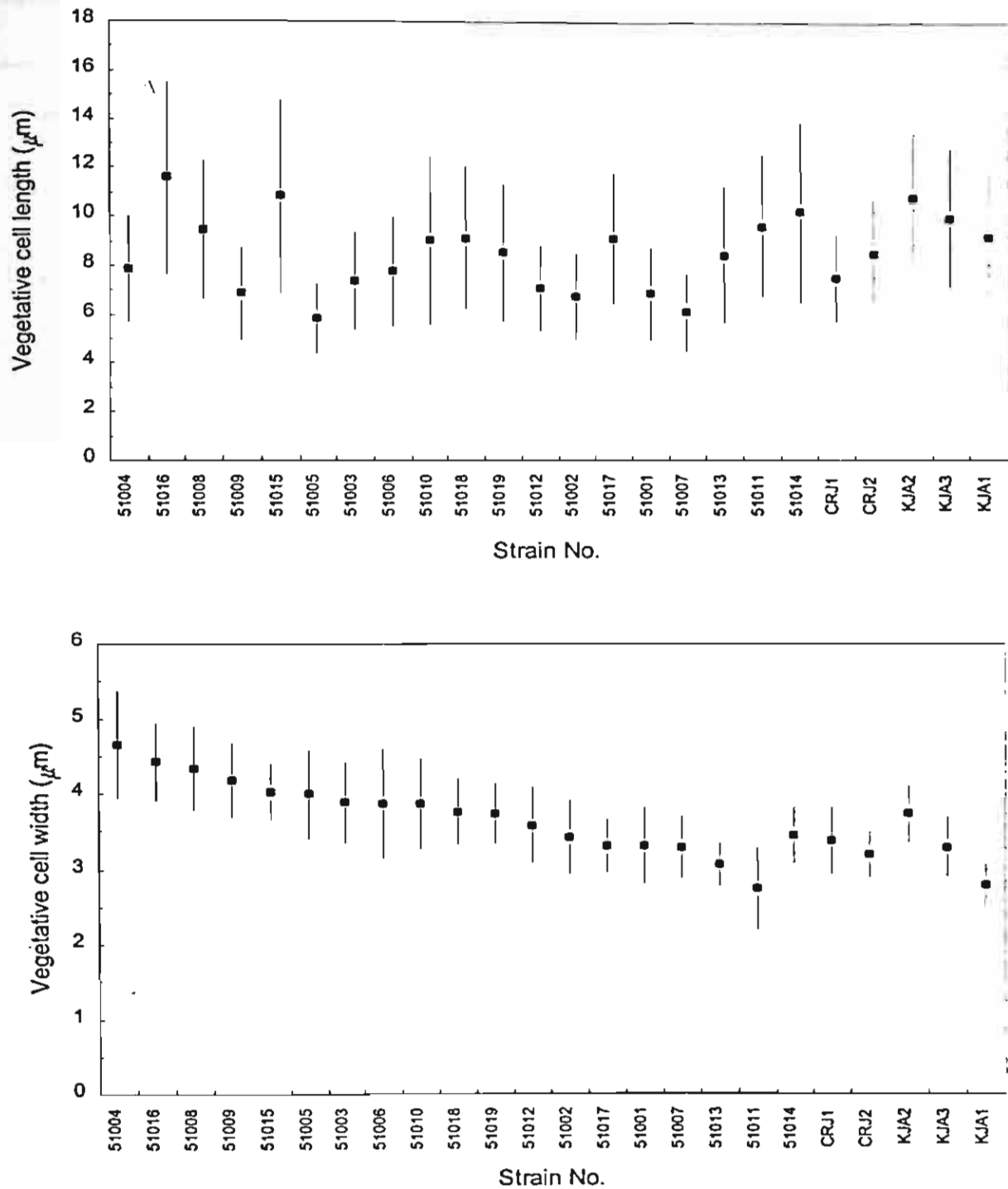


Figure 4 Vegetative cell dimension of *Cylandrospormopsis* sp. Isolated from Thailand, Australia and Japan. Spots indicate mean and narrow lines indicate standard deviation.

Table 6 Heterocyst characteristics of *Cylindrospermopsis* spp.

Strain	Shape	Inter calary	Size (µm)		
			Width	Length	L:W ratio
51001	Cylindrical or ovoid or conical; rounded end	+	2.2-4.4	3.7-7.4	1.2-2.8
51002	Ovoid or conical; rounded or slightly narrowed towards the end	+	1.9-3.7	3.7-8.9	1.3-3.3
51003	Long conical; slightly narrow towards the end, (slightly curved)	+	2.6-4.4	5.2-11.9	0.9-4.0
51004	Ovoid; rounded end	+	3.3-4.8	4.1-8.1	1.1-2.0
51005	Sphaerical or ovoid; rounded end	+	3.0-5.2	3.7-6.7	1.0-2.0
51006	Cylindrical or conical; slightly narrow towards the end, (slightly curved)	+	2.2-4.4	4.8-11.5	1.3-4.4
51007	Ovoid; rounded end	-	2.6-4.8	3.7-9.3	1.0-4.1
51008	Ovoid or conical; rounded end	+	2.6-4.1	4.4-8.5	1.3-2.6
51009	Ovoid or spherical, rounded end	+	2.6-5.2	3.3-5.9	1.0-2.0
51010	Conical or ovoid; rounded end or slightly narrow towards the end, (slightly curved)	+	2.2-4.4	4.4-8.1	1.2-3.0
51011	Cylindrical or ovoid or conical; rounded end	+	1.9-4.1	4.4-10.4	1.7-5.2
51012	Conical or ovoid; rounded end or slightly narrow towards the end, (slightly curved)	+	2.2-4.4	4.4-10.7	1.5-3.8
51013	Cylindrical; rounded end	-	2.2-3.7	4.8-9.3	1.9-3.5
51014	Cylindrical or ovoid; rounded end	-	2.6-5.6	5.2-10.0	1.0-2.8
51015	Cylindrical or ovoid or conical; rounded end	-	NC	NC	
51016	Conical; rounded end or slightly narrow towards the end	-	3.3-5.6	5.5-10.0	1.2-2.7
51017	Cylindrical or conical; rounded end (straight or slightly curved)	-	2.6-4.4	4.8-8.9	1.6-3.0

Table 6 (continued).

Strain	Shape	Inter calary	Size (μm)		
			Width	Length	L:W ratio
51018	Conical or ovoid; rounded end or slightly narrow towards the end, (slightly curved)	-	2.6-4.4	4.4-9.3	1.3-2.5
51019	Conical or ovoid; rounded end		3.0-4.8	4.8-8.5	1.2-2.2
CRJ1	Conical; pointed, slightly curved	+	3.0-4.8	4.8-8.5	1.5-2.5
CRJ2	Conical; rounded end	+	2.6-4.4	5.9-10.7	1.6-3.5
CRJ*	Conical; rounded end	-	3.7-7.0	5.2-8.1	1.0-1.5
KJA1	Cylindrical or conical; rounded end	-	2.6-4.1	4.8-8.5	1.4-2.9
KJA2	Cylindrical or conical; rounded end	-	2.6-3.7	5.2-10.4	1.5-3.1
KJA3	Cylindrical or conical; rounded end	-	2.6-4.7	5.6-11.9	1.7-4.1

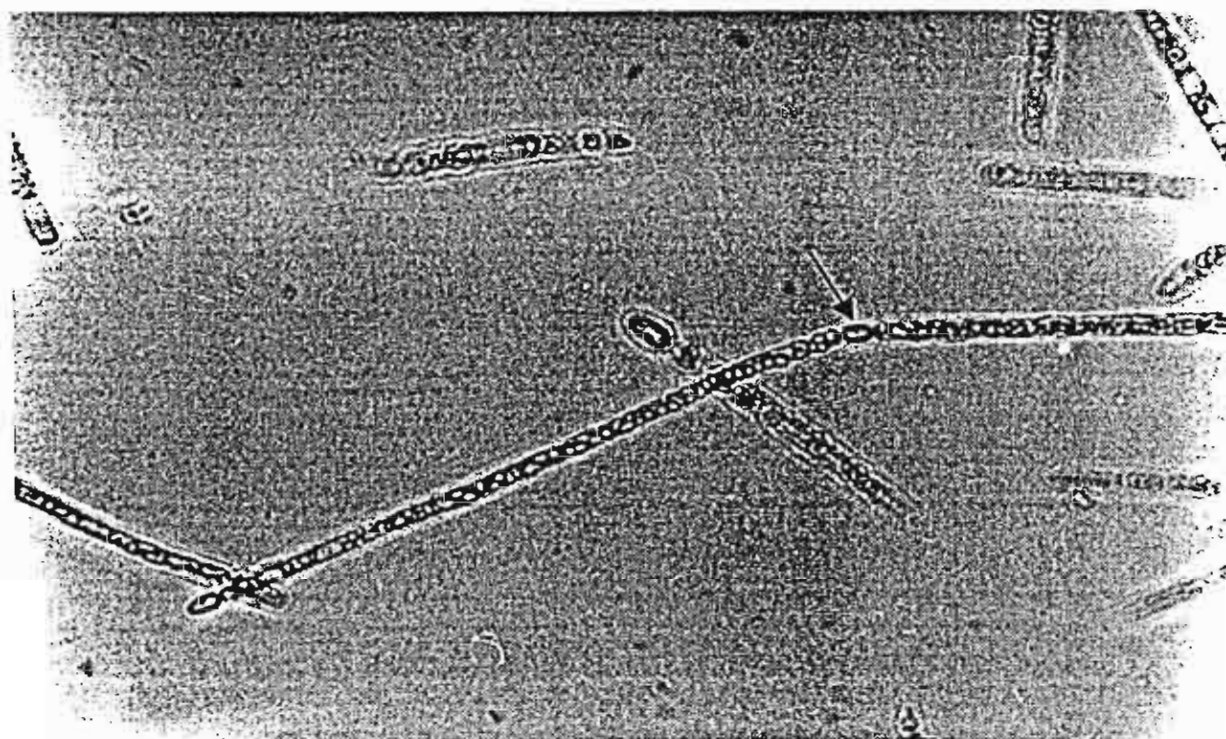


Figure 5 Special cell structure appear to be intercalary heterocyst observed in some *Cylindrospermopsis* sp. isolated from Thailand.

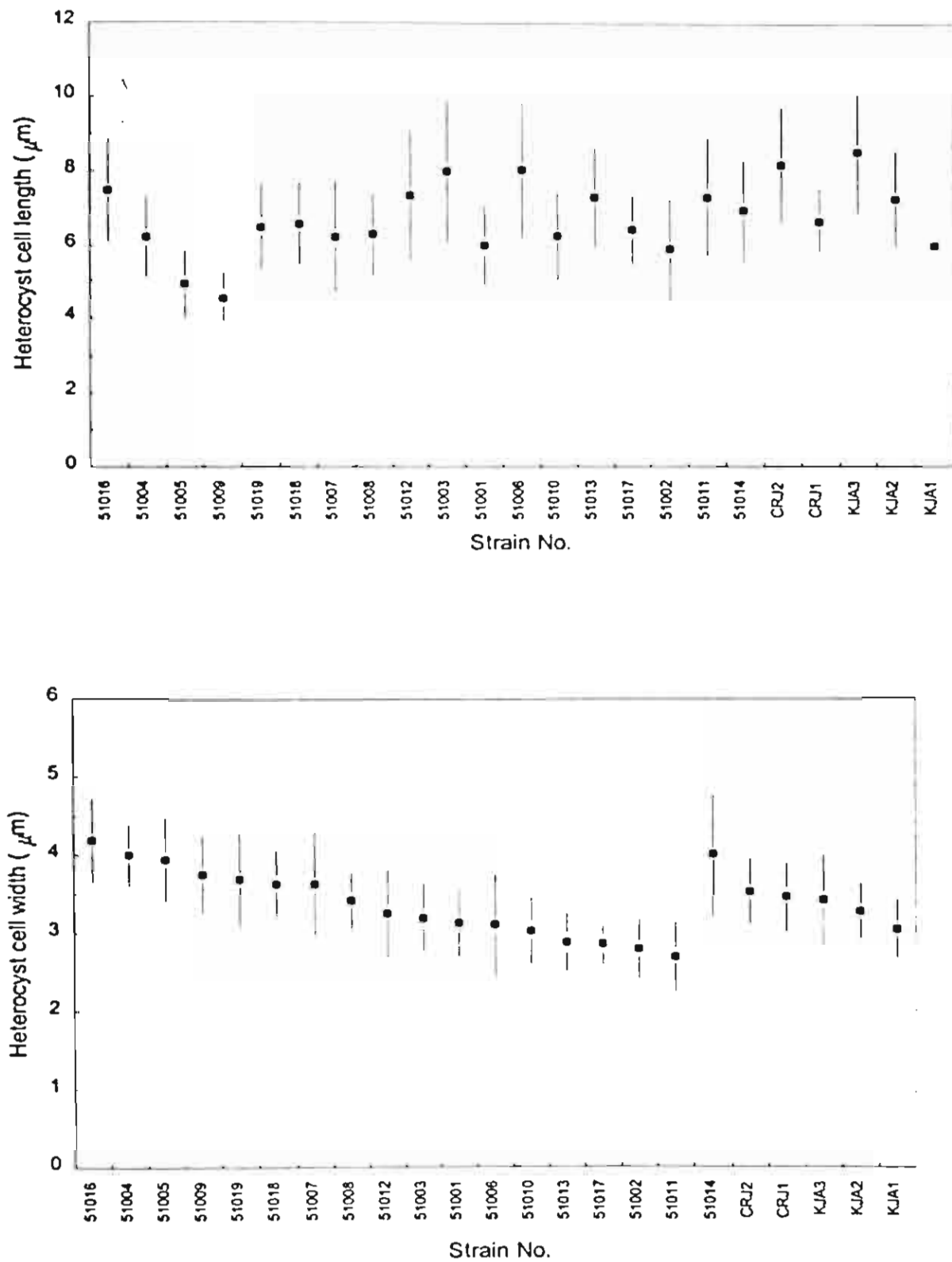


Figure 6 Heterocyst cell dimension of *Cylandropermopsis* sp. Isolated from Thailand, Australia and Japan. Spots indicate mean and narrow lines indicate standard deviation.

Table 7 Akinete characteristics of *Cylindrospermopsis* spp.

Strain [#]	Shape	Position	Size (μm)		
			Width	Length	L:W ratio
51013	Long cylindrical, rounded poles	Intercalary, solitary cell, attached to heterocyst or 2 cells distance	3.0-4.8	10.4-15.6	2.7-5.1
51014	cylindrical, rounded poles	Intercalary, solitary cell or in pair, attached to heterocyst or 2-4 cells distance	2.8-4.2	8.5-16.4	2.0-5.8
51016	cylindrical, rounded poles	Intercalary, solitary cell or in pair, attached to heterocyst	3.5-6.4	8.5-17.1	1.5-4.8
CRJ1	Cylindrical and curved, rounded poles	Intercalary, solitary or in pairs, attached to heterocyst or 2 cells distance	3.7-5.9 (6.7)	9.6-14.1	1.5-3.1
CRJ2	Cylindrical, rounded poles	Intercalary, solitary or in pairs or 4 cells in series, attached to heterocyst or 2 cells distance	4.4-7.0	8.9-14.8	1.7-3.1
KJA1	Cylindrical, rounded poles	Intercalary, solitary or in pairs or 3 cells in series, attached to heterocyst	2.8-4.2	7.8-15	2.0-4.4
KJA2	Cylindrical, rounded poles	Intercalary, solitary or in pairs, attached to heterocyst	2.8-4.2	10-17.8	2.4-5.8
KJA3	Cylindrical, rounded poles	Intercalary, solitary or in pairs, attached to heterocyst	2.8-4.2	7.8-16.4	2.2-4.8

Only some strains produced akinete in laboratory condition

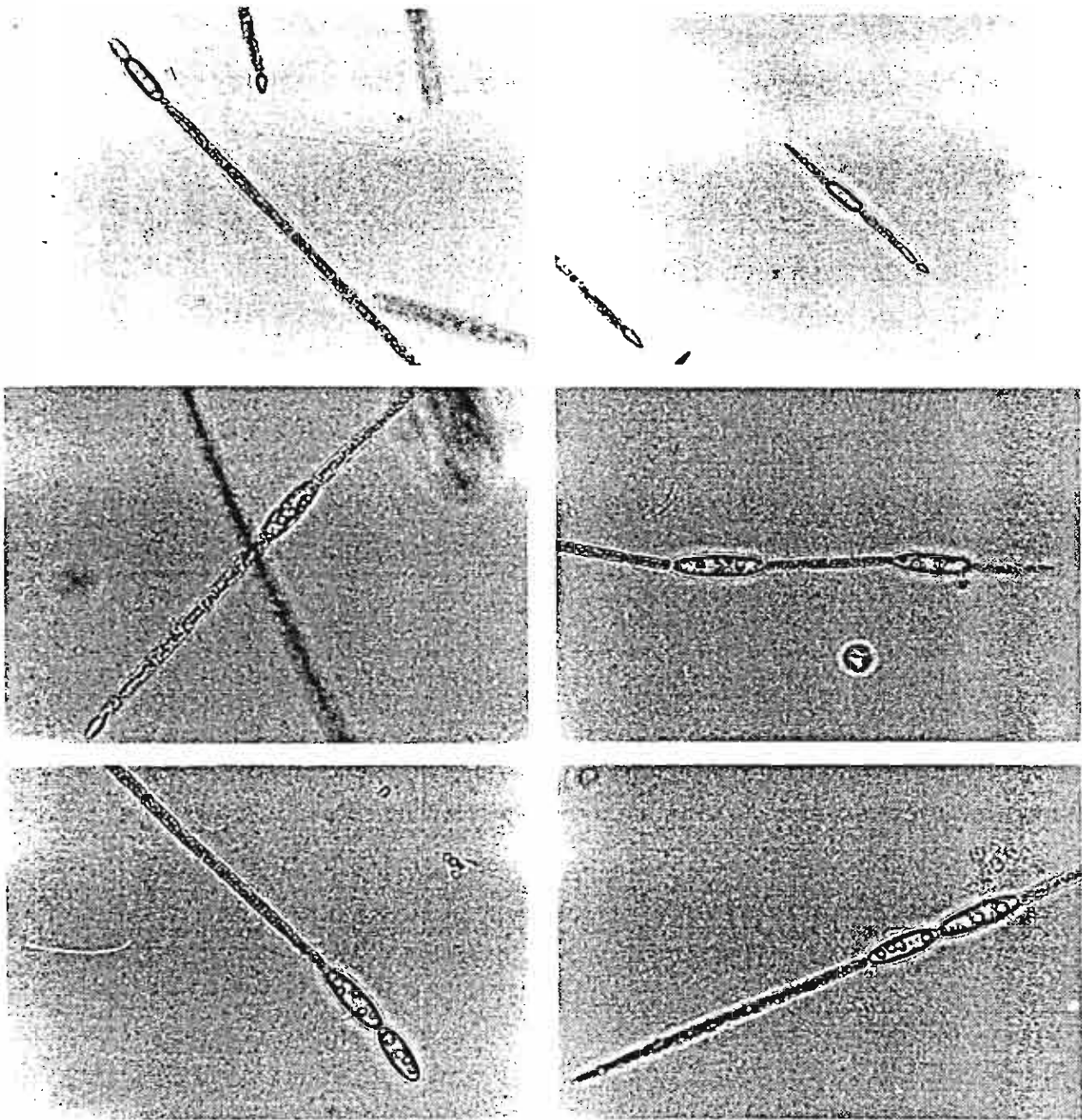


Figure 7 Various akinete formations found in strains of *C. raciborskii*.

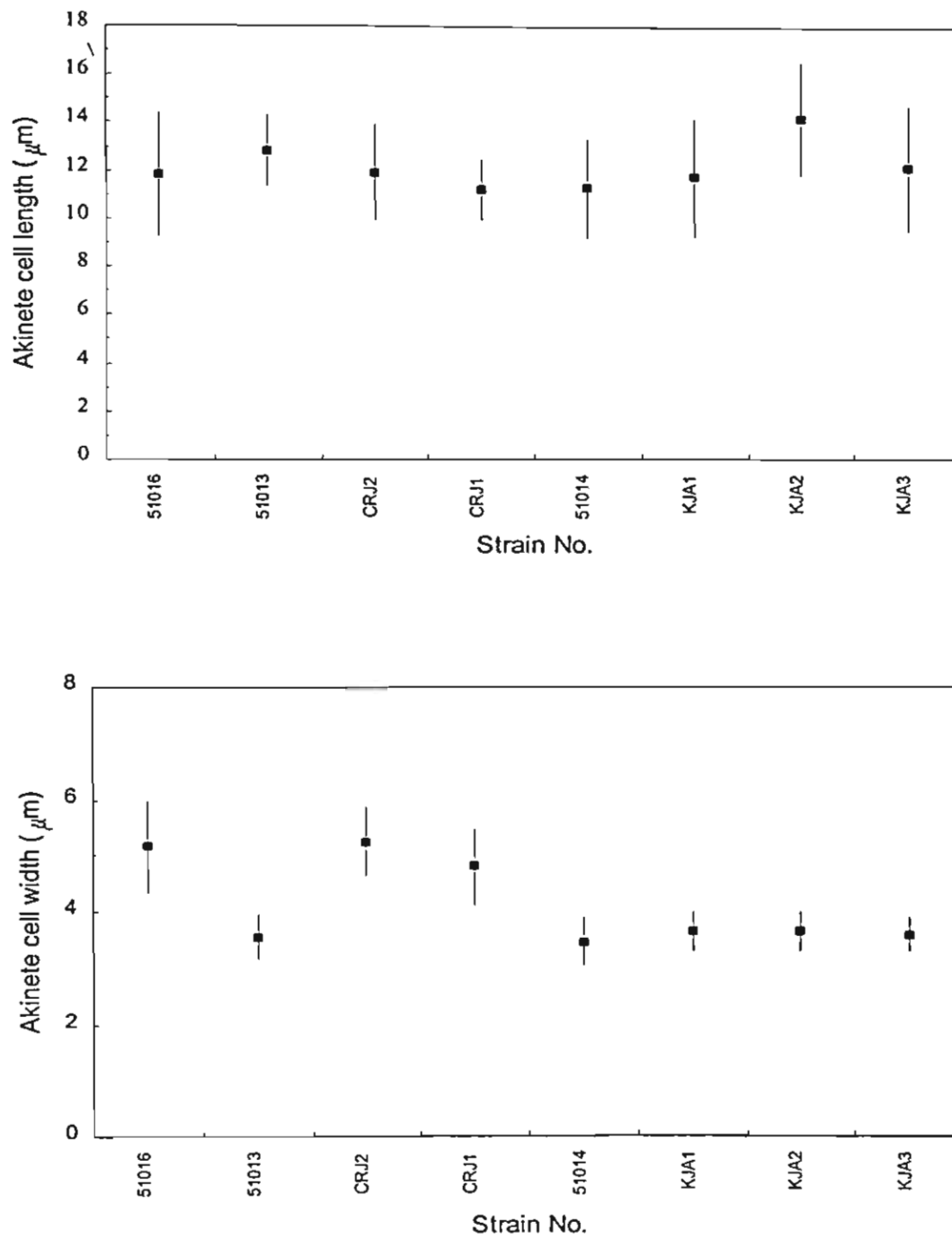


Figure 8 Akinete cell dimension of *Cylandrospermopsis* sp. Isolated from Thailand, Australia and Japan. Spots indicate mean and narrow lines indicate standard deviation.

4. การศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา (physiological characteristics)

4.1 ลักษณะการเจริญของ *Cylindrospermopsis* sp.

การศึกษาลักษณะการเจริญของ *Cylindrospermopsis* sp. ได้ทำการทดลองเพียง 12 สายพันธุ์ (51001-51012) เป็นตัวแทนในการศึกษาเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้ในระยะแรก ของโครงการฯ ในการเพาะเลี้ยงใช้สภาวะมาตรฐานโดยใช้ CT medium พบว่าทั้งหมดมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน (Figure 9) โดยที่สายพันธุ์ 51002 มีอัตราการเจริญสูงสุดถึง 9.9×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใน 4 สัปดาห์ ในขณะที่สายพันธุ์ 51003 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ 0.2700 วัน⁻¹ ส่วนสายพันธุ์ 51011 มีอัตราการเจริญต่ำสุดที่ 1.6×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลาเดียวกันและสายพันธุ์ 51009 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.1387 วัน⁻¹ ในสัปดาห์ที่ 3 (Table 8)

Table 8 Specific growth rate of *Cylindrospermopsis* sp. isolated from Thailand in CT medium at 25°C.

Strain	Specific Growth Rate (day ⁻¹)	Strain	Specific Growth Rate (day ⁻¹)
51001	0.1425	51007	0.1871
51002	0.2306	51008	0.1976
51003	0.2700	51009	0.1387
51004	0.1706	51010	0.2211
51005	0.1626	51011	0.1803
51006	0.1932	51012	0.1875

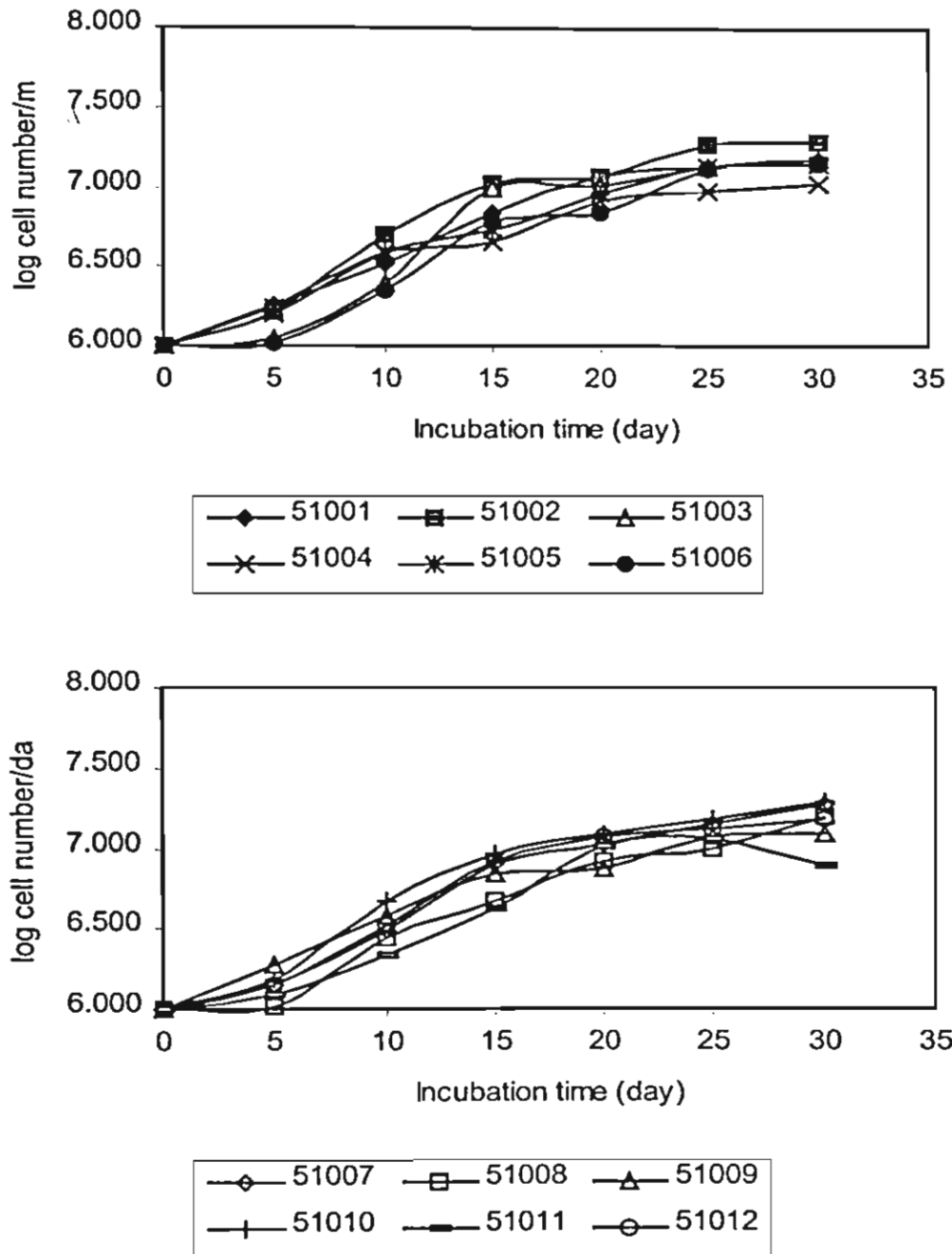
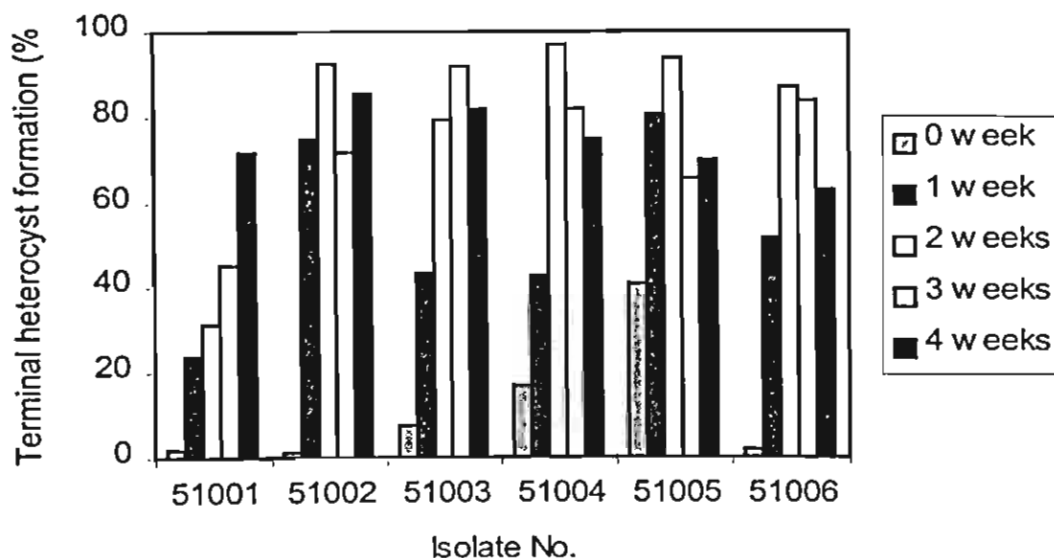


Figure 9 Growth pattern of *Cyindrospermopsis* sp. isolated from Thailand in CT medium at 25°C.

4.2 ผลของการขาดไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้าง heterocyst

เนื่องจาก heterocyst เป็นเซลล์พิเศษที่มีหน้าที่หลักในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ดังนั้นเมื่อเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหารที่มีธาตุอาหารอย่างสมบูรณ์ไซยาโนแบคทีเรียนี้มักจะสร้าง heterocyst การทดลองนี้จึงศึกษาถึงอิทธิพลของการขาดไนโตรเจนต่อการเหนี่ยวนำให้ไซยาโนแบคทีเรียนี้กลับมาสร้าง heterocyst อีก (Figure 10) ซึ่งก็พบว่าจากเชื้อเริ่มต้นที่ trichome ส่วนใหญ่ไม่พบ heterocyst เมื่อเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง จะมีจำนวน heterocyst เพิ่มขึ้นในทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ อย่างไรก็ตาม heterocyst จะมีอยู่ที่ปลายสายเพียงด้านเดียว ซึ่งค่อนข้างจะแตกต่างจากที่พบในธรรมชาติที่เกือบทั้งหมดจะมี heterocyst อยู่ทั้งสองด้าน นอกจากนี้จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ตัวอย่างที่ทำการเพาะเลี้ยงมานาน 1 สัปดาห์ พบว่าไซยาโนแบคทีเรียเกือบทั้งหมด (ยกเว้นสายพันธุ์ 51004 และ 51007) มีการสร้าง heterocyst อยู่ภายในสาย trichome (Table 9) คล้าย intercalary heterocyst (Figure 5) ที่พบใน *Anabaena* ซึ่งไม่เคยมีรายงานเช่นนี้มาก่อน เพราะลักษณะทางวิทยาศาสตร์ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้จะมี heterocyst แบบ terminal เท่านั้น จึงสันนิษฐานว่าการสร้าง heterocyst ภายในสายจะเป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นก่อนที่ไซยาโนแบคทีเรียนี้จะแบ่งสาย trichome ออกเป็นสองเส้น

ในสภาวะที่เซลล์ขาดธาตุไนโตรเจน (ทำการเลี้ยงใน nitrogen free medium) สายพันธุ์ 51004 ซึ่งมี trichome ลักษณะขดเกลียว มีอัตราการเจริญสูงสุด คือในสัปดาห์ที่ 4 มีจำนวนเซลล์สูงถึง 3.28×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สายพันธุ์ 51012 มีอัตราการเจริญต่ำสุด โดยในช่วงเวลาเดียวกันมีเซลล์เพียง 3.10×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เท่านั้น ซึ่งน่าจะเป็นผลสืบเนื่องมาจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศที่ไม่เท่ากัน เนื่องจากพบ heterocyst เกือบทุก trichome ในสายพันธุ์ 51004 (97.06%) ในระยะ 2 สัปดาห์แรก ในขณะที่สายพันธุ์ 51012 มีจำนวน heterocyst เพียง 62.53% ของ trichome ทั้งหมด และเกิดในช่วงสัปดาห์ที่ 4 (Table 10)



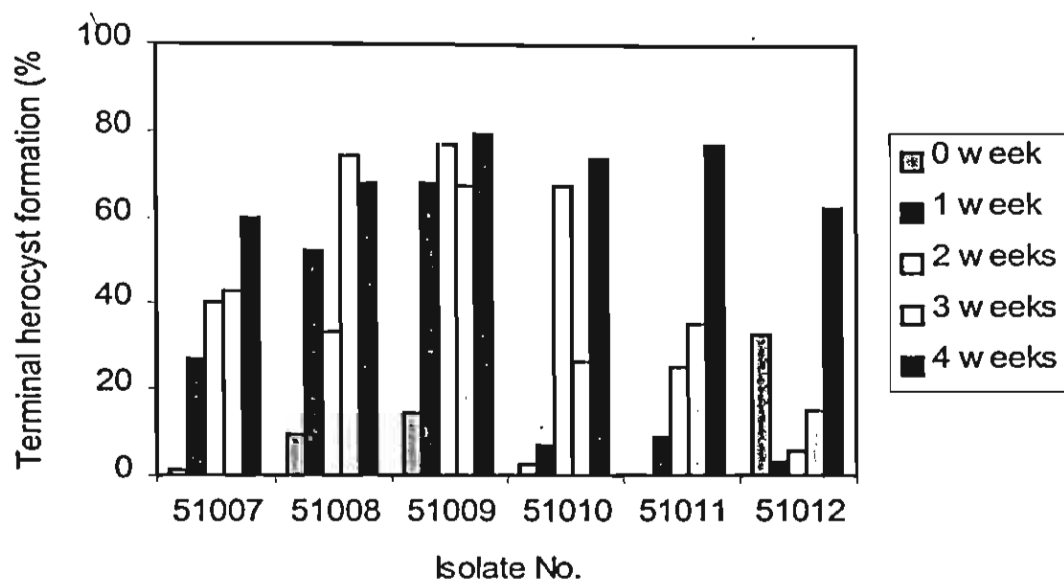


Figure 10 Frequency of heterocyst formation of *Cylindrospermopsis* sp. in nitrogen-free CT medium.

Table 9 Formation of special cell structure appear to be intercalary heterocyst of *Cylindrospermopsis* sp. in nitrogen-free CT medium.

Strain No.	Intercalary heterocyst formation (%)				
	0 week	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
51001	0	1.73	1.26	6.40	14.06
51002	0	1.00	0.40	0.06	0.20
51003	0	2.13	3.53	1.53	3.66
51004	0	0	0	0	0
51005	0	0.06	0.06	0	0.26
51006	0	2.20	0.06	0.06	0
51007	0	0	0	0	0
51008	0	0.66	0	0.66	1.40
51009	0	0.06	0	0	0
51010	0	0	0	0.06	0
51011	0	0.13	0.40	0.46	3.73
51012	0	0	0	0.06	0.40

Table 10 Frequency of heterocyst formation of *Cylindrospermopsis* sp. isolated from Thailand in nitrogen-free CT medium.

Strain No.	Heterocyst formation (%)				
	0 week	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
51001	2.06	23.80	31.20	45.06	71.60
51002	1.40	74.66	92.46	71.93	85.46
51003	7.86	43.13	79.00	92.00	81.73
51004	17.13	42.80	97.06	81.73	74.53
51005	40.93	80.53	93.73	65.46	69.66
51006	1.93	51.60	86.60	83.46	63.13
51007	1.33	27.06	40.46	42.53	60.06
51008	9.33	52.20	33.60	74.46	67.93
51009	14.40	68.13	76.80	67.60	79.13
51010	2.53	6.66	67.13	26.33	73.73
51011	0.06	8.86	25.06	35.46	76.80
51012	0.33	3.06	5.60	15.13	62.53

4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้าง heterocyst

จากทั้งหมด 12 สายพันธุ์ที่ทำการทดสอบผลของอุณหภูมิ (25, 30, 35 และ 40°C) ต่อการเจริญพบว่าทั้งหมดไม่สามารถเจริญได้ที่ 40°C 7 สายพันธุ์ (51002, 51004, 51005, 51006, 51008, 51010 และ 51011) สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ 30°C โดยสายพันธุ์ 51005 มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ OD_{600nm} เท่ากับ 2.089 ใน 30 วันของการเพาะเลี้ยง และ 5 สายพันธุ์ที่เหลือ (51001, 51003, 51007, 51009 และ 51012) เจริญได้ดีที่สุดที่ 35°C โดยสายพันธุ์ 51007 มีอัตราการเจริญสูงสุดที่ OD_{600nm} เท่ากับ 2.146 หลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 30 วัน (Figure 11)

ทางด้านผลของอุณหภูมิต่อการสร้าง heterocyst พบว่า *Cylindrospermopsis* sp. มีการสร้าง heterocyst มากที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C ในทุกสายพันธุ์ โดยที่สายพันธุ์ 51006 สร้าง heterocyst ในเกือบทุก trichome (98.33%) และจากข้อมูลเกี่ยวกับการเจริญที่อุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิที่ไซยาโนแบคทีเรียมีอัตราการเจริญสูงสุดเช่นกัน จึงน่าจะเนื่องมาจากความต้องการไนโตรเจนมากในช่วงนี้จึงกระตุ้นให้มีการสร้าง heterocyst (Figure 12)

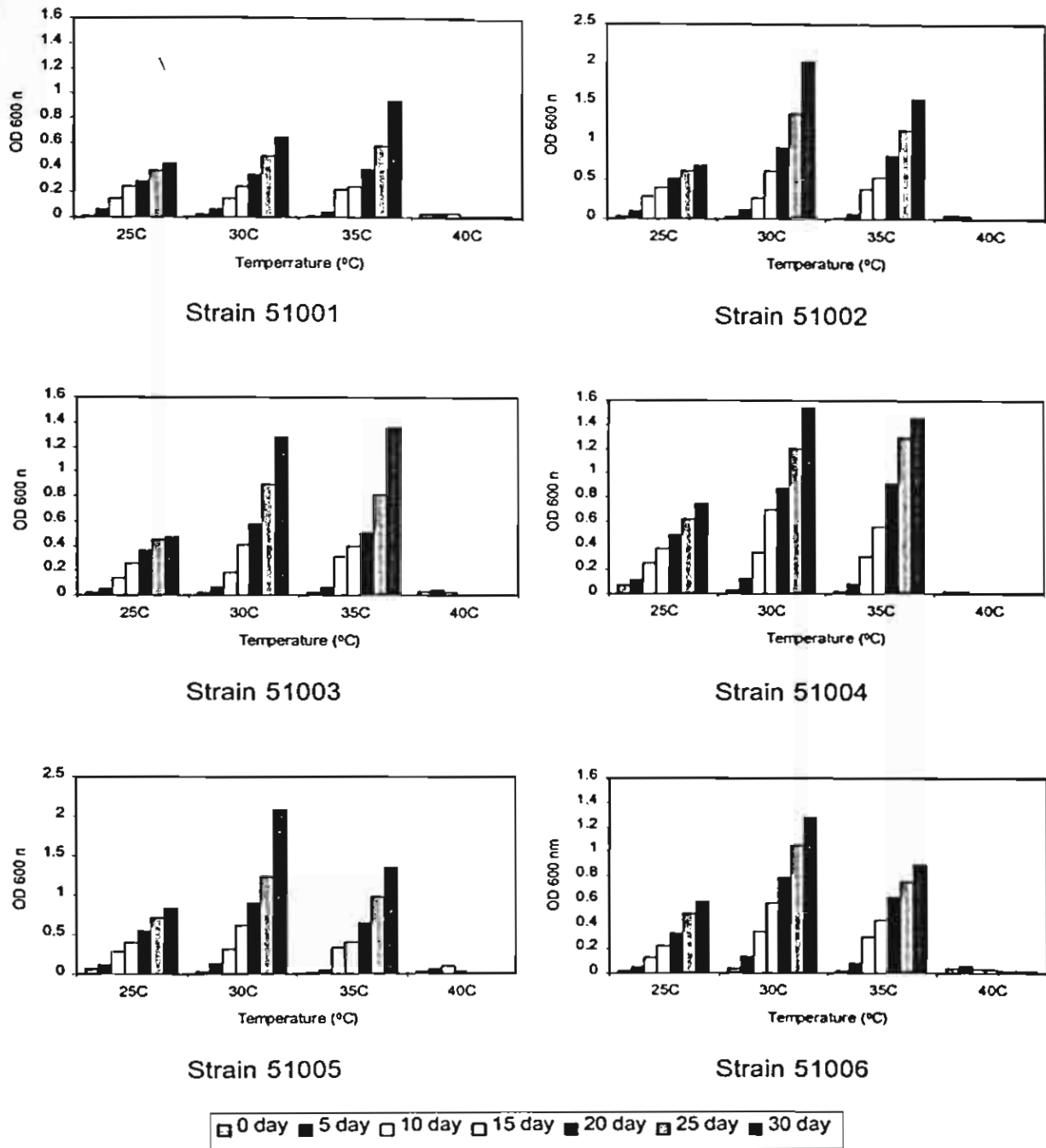


Figure 11 Effect of temperature on growth of *Cyindrospermopsis* sp. isolated from Thailand.

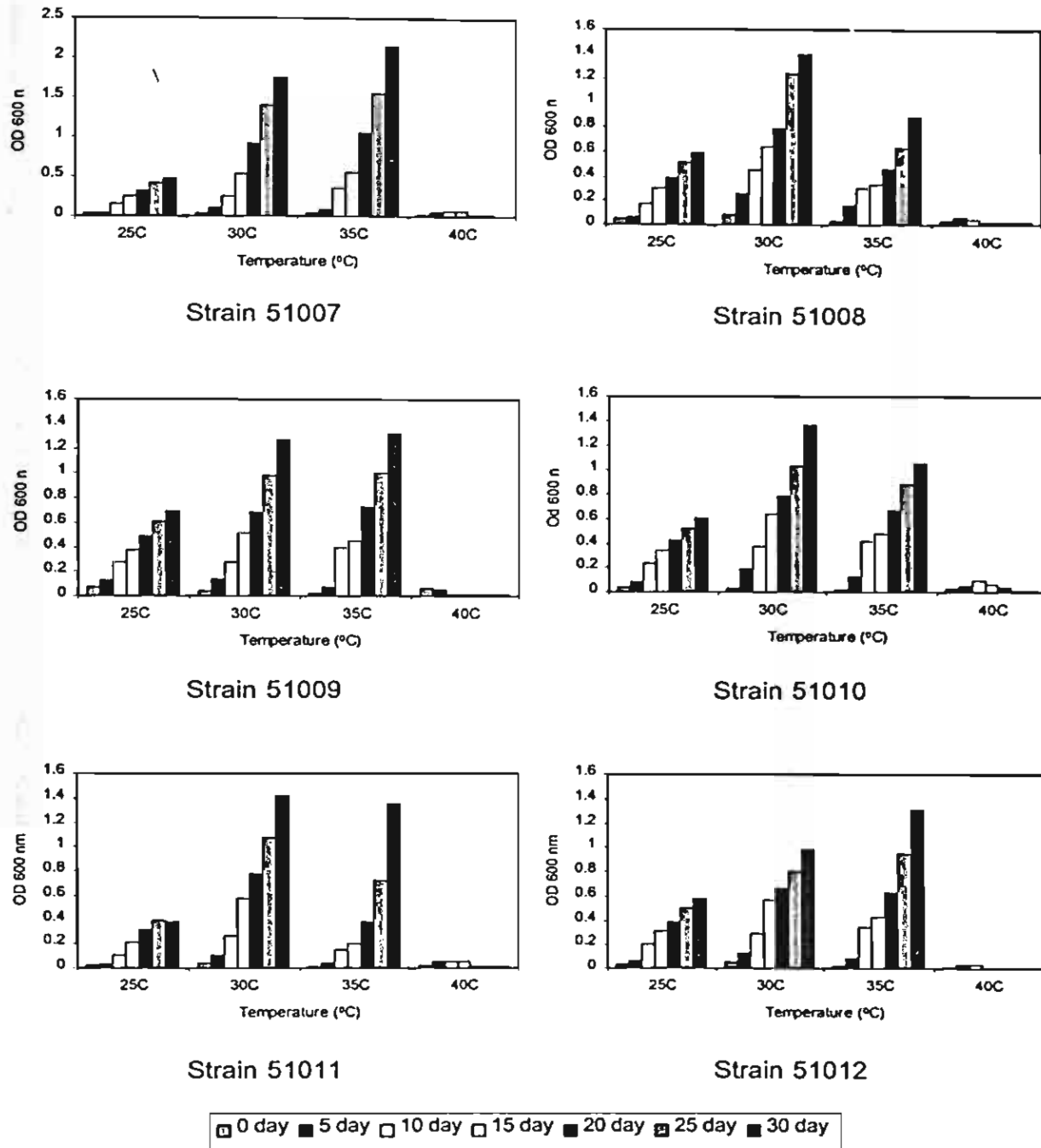


Figure 11 (continued).

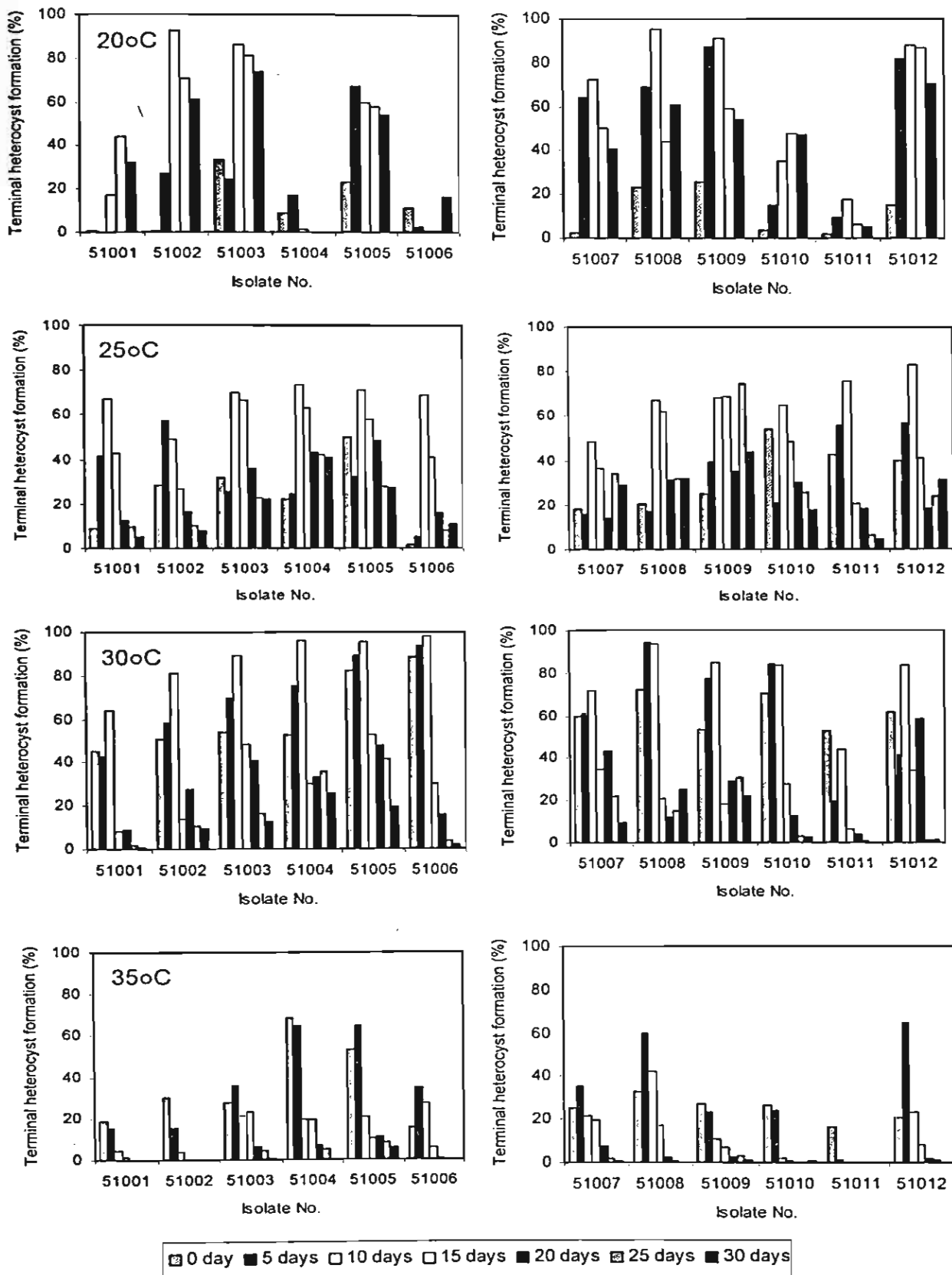


Figure 12 Effect of temperature on heterocyst formation of *Cylindrospermopsis* sp. isolated from Thailand.