ผลของความเค็มต่อการเจริญและปริมาณบีเทนของไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสาย *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp.

โพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์[1] กนกกานต์ นาคทอง[1] ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ[1] และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ[2,3*]

[1]ภาควิชาชีววิทยา [2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป และ [3]หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110
*E-mail: surasakl@swu.ac.th

รับบทความ: 10 เมษายน 2555 ยอมรับตีพิมพ์: 18 พฤษภาคม 2555

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ในอาหารเลี้ยง BG_{11} ภายใต้ภาวะความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 – 1 โมลาร์ พบว่า ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่ออัตราการเจริญของ *Spirulina* sp. เท่ากับ 0.25 โมลาร์ ซึ่งเจริญได้ดีใกล้เคียงกับภาวะปกติที่ไม่เติมเกลือ ส่วน *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. เจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0 M NaCl) และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ทำให้อัตราการเจริญของ *Anabaena* sp. ลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของภาวะที่เหมาะสม เท่ากับ 0.25 โมลาร์ ในขณะที่ *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. เท่ากับ 0.5 โมลาร์ จากนั้นติดตามปริมาณบีเทนของ *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ พบว่า ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ให้ปริมาณบีเทนสูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า ดังนั้นอธิบายได้ว่าไซยาโนแบคทีเรียมีการสะสมบีเทนภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์

คำสำคัญ: ไซยาโนแบคทีเรีย บีเทน ความเครียดจากเกลือ

Effect of Salinity on Growth and Betaine Content of Filamentous Cyanobacteria *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. and *Spirulina* sp.

Potitorn Kanchitanurak[1], Kanokgarn Naktong[1], Chaiyasad Kachensuwan[1] and Surasak Laloknam[2,3*]

[1] Department of Biology, [2]Department of General Science and [3]Research Unit on Science Technology and Environment for Learning, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Wattana, Bangkok 10110, Thailand

*E-mail: kiatisak@swu.ac.th

Abstract

The growth of cyanobacterium *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. and *Spirulina* sp. was stimulated by increasing of salinity range of 0 – 1 M NaCl in BG_{11} medium. The optimal growth rate of *Spirulina* sp. under salinity was 0.25 M NaCl nearest with 0 M NaCl, and the optimal growth rate of *Anabaena* sp. and *Nostoc* sp. were condition without NaCl (0 M NaCl), The salt stress condition is growth rate half of optimal growth rate of *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. and *Spirulina* sp. as 0.25, 0.5 and 0.5 M NaCl, respectively. The betaine content in all cyanobacteria was determined under normal and salt stress conditions. At the salt stress condition, all cyanobacteria showed betaine content higher than normal condition about 2 folds. These results suggested that all cyanobacteria *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. and *Spirulina* sp. were accumulated betaine under salt stress condition.

Keywords: Cyanobacteria, Betaine, Salt stress

บทนำ:

ความเค็มเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากรบกวนการทำงานของเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ดังนั้นสิ่งมีชีวิตจึงมีความจำเป็นที่ต้องปรับตัวโดยควบคุมปริมาณไอออน และรักษาความเป็นกรด-เบส ให้อยู่ในภาวะสมดุลเพื่อทำให้กิจกรรมของเซลล์ดำเนินเป็นปกติ (Kapper et al, 1996; Padan and Schuldiner, 1996; Waditee et al., 2002, 2005)

สิ่งมีชีวิตบางชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย และไซยาโนแบคทีเรียมีกลไกรักษาสมดุลของเซลล์โดยการสะสมสารคอมแพทิเบิลโซลูท (compatible solute) หรือสารออสโมโพรเทคแทนต์ (osmoprotectant) ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ช่วยรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ให้คงที่ เช่น โพรลีน (proline) โคลีน (choline) และไกลซีน-บีเทน (glycine betaine) (Bohnert and Jenzen, 1996; Laloknam et al., 2006; Mackey et al., 1984; Zhu et al., 1997)

การสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ในสิ่งมีชีวิตทำได้ 2 วิธี คือ การสังเคราะห์สารขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะที่มีความเครียด สารที่สะสมนั้นจะเป็นกรดอะมิโน และอนุพันธ์ของกรดอะมิโน เช่น การสะสมไกลซีนบีเทนใน *Aphanothece halophytica* ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ โดยเปลี่ยนไกลซีนเป็น ซาร์โคซีน (sarcosine) ไดเมทิลไกลซีน (dimethyl glycine) และไกลซีนบีเทน ตามลำดับ โดยอาศัยเอนไซม์ glycine sarcosine methyl transferase และ dimethyl transferase (สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ, 2554) นอกจากนี้ยังมีการนำเข้าสารออสโมโพรเทคแทนต์โดยโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ใน *Escherichia coli* มีระบบการขนส่งสารได้แก่ ProP ProU และ BetT โดยขึ้นอยู่กับความจำเพาะในการขนส่งสารแต่ละชนิด (Kemp and Bremer, 1998)

กรดอะมิโนเป็นสารชีวโมเลกุลที่แสดงสมบัติเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ในสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ในการรักษาสมดุลของเซลล์ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ *B. subtilis* มีการสะสมกรดอะมิโน โพรลีน (proline) และกลูตาเมต (glutamate) (Kemp and Bremer, 1998)

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญและปริมาณบีเทนในไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตรในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มทดสอบผลของความเค็มต่อการเจริญของไซยาโน-แบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0 – 1 โมลาร์ ภายใต้ภาวะที่มีแสงสีขาว (30 $\mu Em^{2}s^{-1}$) ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) และทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เพื่อติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เพื่อหาภาวะที่ทำให้การเจริญของไซยาโน-แบคทีเรียดีที่สุด และภาวะที่ทำให้การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียลดลงครึ่งหนึ่งของภาวะปกติ (ภาวะเครียด)

ทดสอบบีเทนของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl

เพาะเลี้ยง *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่ไม่มีเกลือ NaCl (ภาวะปกติ) และภาวะที่มีความเครียดจาดเกลือ NaCl (*Anabaena* sp. ใช้ความเข้มข้นของ NaCl 0.25 โมลาร์ ส่วน *Spirulina* sp. และ *Nostoc* sp. ใช้ความเข้มข้นของ NaCl 0.5 โมลาร์) ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 วัน เพื่อติดตามปริมาณบีเทนของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด จากนั้นวัดปริมาณบีเทนโดยดัดแปลงจากวิธีของ Grieve and Grattan (1983) โดยการนำไซยาโนแบคทีเรียตัวอย่างหนัก 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร ตามด้วย 2N H_2SO_4 250 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 35 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15 นาที เติมโพแทสเซียมไอโอไดด์ 5 ไมโครลิตร แช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่งที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 1 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้เติมด้วยไดคลอโรมีเทน 1 มิลลิลิตร และวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 365 nm) หลังจากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับมาตรฐานบีเทน

ผลการวิจัยและอภิปราย

ผลของความเค็มต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG_{11} ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 1 โมลาร์ แล้วทำการติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด เป็นระยะเวลา 30 วัน เพื่อหาภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl (ภาพที่ 1 - 3)

จากภาพที่ 1 – 3 แสดงให้เห็นว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด เจริญได้ถึงระยะกลางแบบทวีคูณ (mid-log phase) อยู่ระหว่างวันที่ 12 – 18 วัน และ ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด เจริญได้ดีที่สุดเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด แสดงดังตาราง 1 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl สูงขึ้น การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด จะลดลง และเมื่อเลี้ยงที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.5 โมลาร์ขึ้นไป *Spirulina* sp. และ *Nostoc* sp. ไม่สามารถเจริญได้ ในขณะที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.25 โมลาร์ขึ้นไป *Anabaena* sp. ไม่สามารถเจริญได้ (ตาราง 1)

บงกช บุญบูรพงษ์ และคณะ (2554) รายงานว่า *Synechococcus* sp. PCC7942 เป็นไซยาโนแบคทีเรียน้ำ-จืด ภาวะปกติของการเจริญ คือ ไม่มีเกลือ NaCl และภาวะเครียดจากเกลือ NaCl คือ 0.25 โมลาร์ และทนความเค็มได้น้อยกว่า 0.5 โมลาร์ ในขณะที่ *Synechocytis* sp. PCC6803 และ *Aphanothece halophytica* ทนเค็มได้สูงถึง 1.5 โมลาร์ และ 3.0 โมลาร์ ตามลำดับ

การติดตามปริมาณบีเทนของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl

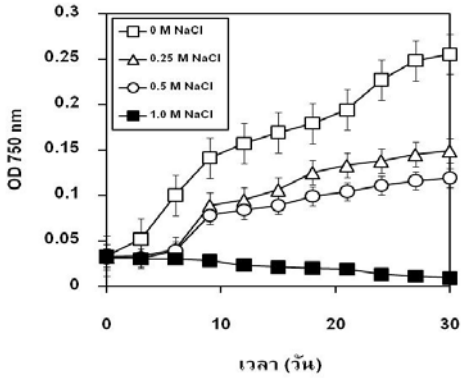
เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด คือ *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG_{11} ที่ภาวะปกติ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl และติดตามปริมาณบีเทนทุก 6 วัน ตามวิธีการทดลอง แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 4 – 6

ตาราง 1 แสดงภาวะต่างๆ ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ต่อการเจริญภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl

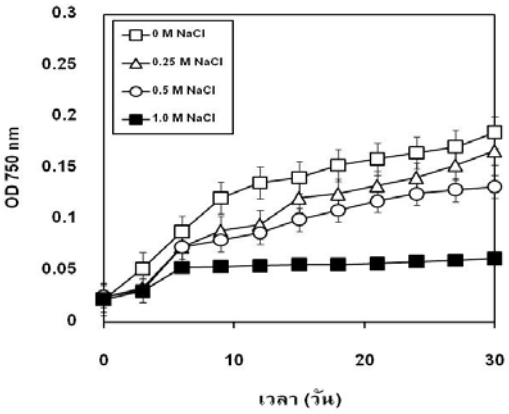
ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย	ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl* (โมลาร์)		
	ภาวะที่เหมาะสม	ภาวะที่มีความเครียด**	ความสามารถในการทนเค็ม
Anabaena sp.	0	0.25	<0.25
Nostoc sp.	0	0.5	<0.5
Spirulina sp.	0.25	0.5	<0.5

*ระดับความเข้มข้นของเกลือ *NaCl* ที่ใช้ในการศึกษา 0 – 1 โมลาร์

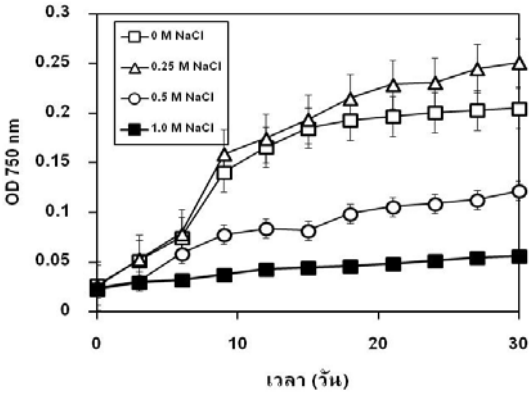
**ความเครียด คือ ภาวะที่ความเจริญลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของภาวะที่เหมาะสม



ภาพที่ 1 ผลของความเค็มต่อการเจริญของ *Anabaena* sp.



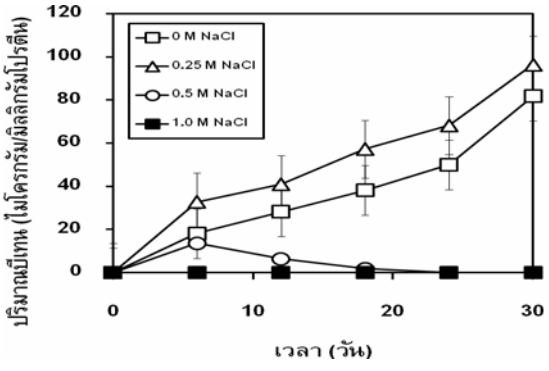
ภาพที่ 2 ผลของความเค็มต่อการเจริญของ *Nostoc* sp.



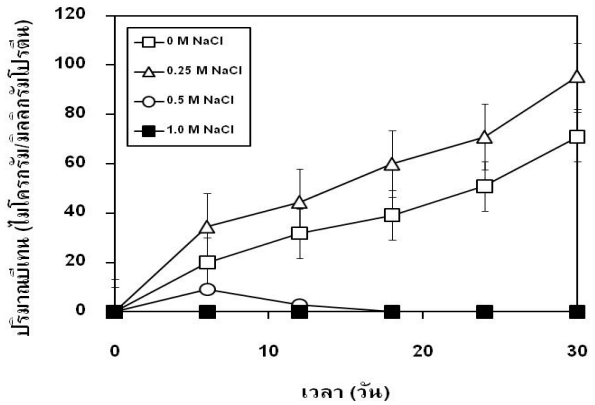
ภาพที่ 3 ผลของความเค็มต่อการเจริญของ *Spirulina* sp.

จากภาพที่ 4 – 6 พบว่า ปริมาณบีเทนของ *Anabaena* sp. *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ในวันที่ 6 12 18 24 และ 30 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณบีเทนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า โดยปริมาณบีเทนจะเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 6 และ 12 หลังจากนั้นปริมาณบีเทนจะคงที่จนถึงระยะเวลาที่ทำการศึกษา เมื่อเปรียบเทียบปริมาณบีเทนของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ (ภาพที่ 7) พบว่า *Nostoc* sp. ให้ปริมาณโพรลีนสูงที่สุด รองลงมาเป็น *Spirulina* sp. และ *Anabaena* sp. ตามลำดับ

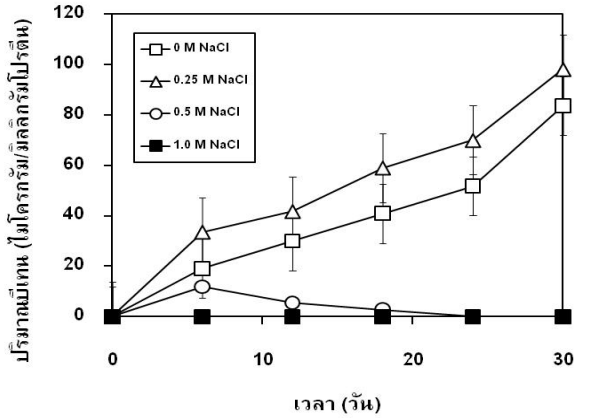
มีรายงานการเติมกรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ กลูทาเมต โพรลีน และ ไกลซีน ต่อการเจริญของ *Synechococcus* sp. PCC7942 *Synechocytis* sp. PCC6803 และ *Aphanothece halophytica* ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ พบว่า กรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด สามารถส่งเสริมการเจริญของ *A. halophytica* ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือได้ (บงกช บุญบูรพงษ์ และคณะ, 2554)



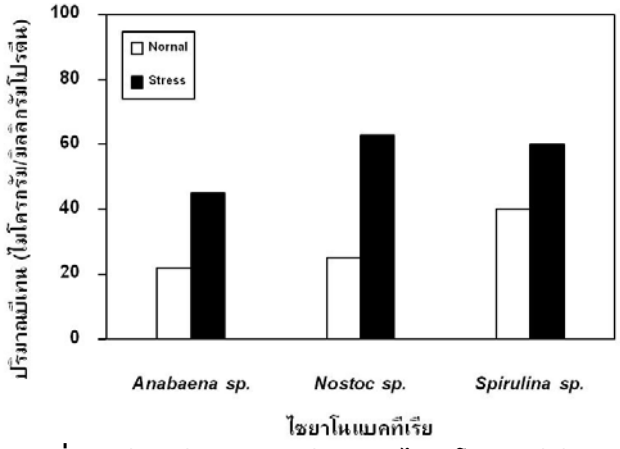
ภาพที่ 4 ผลของความเค็มต่อปริมาณบีเทนของ *Anabaena* sp.



ภาพที่ 5 ผลของความเค็มต่อปริมาณบีเทนของ *Nostoc* sp.



ภาพที่ 6 ผลของความเค็มต่อปริมาณบีเทนของ *Spirulina* sp.



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณบีเทนของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือในวันที่ 18

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Spirulina sp.* มีความสามารถในการทนความเค็มได้ต่างกัน โดย *Anabaena* sp. มีความสามารถในการทนความเค็มน้อยที่สุด ($\leq$ 0.25 โมลาร์ NaCl) ในขณะที่ *Nostoc* sp. และ *Spirulina* sp. มีความสามารถในการทนเค็มเท่ากันที่ 0.5 โมลาร์ NaCl และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด *Spirulina* sp. *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. มีการสะสมบีเทนสูงกว่าภาวะปกติประมาณ 2 เท่า ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มีการสะสมสารออสโมโพรเทคแทนต์ชนิดบีเทนภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ

เอกสารอ้างอิง

บงกช บุญบูรพงษ์ อาภรณ์ บัวหลวง อรัญ อินเจริญศักดิ์ ยุวธิดา นิลผาย ปนัดดา พ่วงขวัญ อภิญญาณ บุญ-ประกอบกูล และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2554). ผลของไกลซีน โพรลีน และกลูตาเมต ต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. PCC7942, *Synechocytis* sp. PCC6803 และ *Aphanothece halophytica* ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ. **วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้** 2(1): 48–58.

สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2554). การปรับตัวของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ. **วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้** 2(1): 82 – 88.

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

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

Kapper, R. M., Kempf, B., and Bremer, F. (1996). Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: character-ization of OpuD. **J. Bacteriol**. 178: 5071–5079.

Kemp, B., and Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high – osmolality environments. **Arch. Microbiol.** 170: 319–330.

Laloknam, S., Tanaka, K., Buaboocha, T., Waditee, R., Incharoensakdi, A., Hibino, T., Tanaka, Y., and Takabe, T. (2006). Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains a Betaine

transporter active at alkaline pH and high salinity. **Appl. Environ. Microbiol.** 72(9): 6018–6026.

Mackey, M. A., Norton, R. S., and Borowitzka, L. J. (1984). Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol.** 130: 2177–2191.

Padan, E., and Schuldiner, S. (1996). Bacterial Na+/H+ antiporters: molecular biology, biochemistry, and physiology. In **Handbook of Biological Physics**, Konings, W. N., Kaback, H. R. and Lolkema, J. (eds.). Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science.

Waditee, R., Bhuiyan, M. N. H., Rai, V., Aoki, K., Tanaka, Y., Hibino, T., Suzuki, S., Takano, J., Jagendorf, A. T., Takabe, T., and Takabe, T. (2005). Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102: 1318–1323.

Waditee, R., Hibino, T., Nakamura, T., Incharoensakdi, A., and Takabe, T. (2002). Overexpression of a Na+/H+ antiporter confers salt tolerance on a freshwater cyanobacterium, making it capable of growth in sea water. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99: 4109–4114.

Zhu, J.-K., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. (1997). Molecular aspects of osmotics stress in plant. **Crit. Rev. Plant Sci.** 16: 253–277.