



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตชุดตรวจสอบ ELISA KIT เชิงพาณิชย์
สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ

Commercial Production of ELISA Kit for Rapid Detection of
Microcystin in Water

โดย

ดร. วิเชียร ยงมานิตชัยและคณะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กุมภาพันธ์ 2550

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตชุดตรวจสอบ ELISA KIT เชิงพาณิชย์
สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ

Commercial Production of ELISA Kit for Rapid Detection of
Microcystin in Water

คณะผู้วิจัย

ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย

นางสุวรรณา กลัดพันธุ์

สังกัด

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

บทสรุปผู้บริหาร	3
บทคัดย่อ	4
Abstract	6
คำนำ	8
ความเป็นพิษและผลกระทบของสารพิษไมโครซิสติน	9
ผลของสารพิษไมโครซิสตินต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์	10
โครงสร้างทางเคมีและลักษณะจำเพาะของสารพิษไมโครซิสติน	11
ความคงตัวของสารพิษไมโครซิสติน	11
การตรวจวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสติน	12
วัตถุประสงค์ของโครงการ	13
อุปกรณ์และวิธีการ	14
1. ประเมินการใช้ชุด ELISA kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในแหล่งน้ำธรรมชาติ	14
2. อิทธิพลของคุณภาพน้ำต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดของชุดตรวจสอบ ELISA kit	16
3. การศึกษาอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ ELISA kit	17
4. การประเมินคุณภาพชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดสารพิษในระบบผลิตน้ำประปา เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วย LC/MS	18
5. การเผยแพร่และประชาสัมพันธ์ชุด ELISA Kit โดยการจัดสัมมนาและสาธิตร่วมกับ หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง	19
ผลและวิจารณ์	20
1. ประเมินการใช้ชุด ELISA kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในแหล่งน้ำธรรมชาติ	20
2. อิทธิพลของคุณภาพน้ำต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดของชุดตรวจสอบ ELISA kit	24
3. การศึกษาอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ ELISA kit	53
4. การประเมินคุณภาพชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดสารพิษในระบบผลิตน้ำประปา เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วย LC/MS	70
5. การเผยแพร่และประชาสัมพันธ์ชุด ELISA Kit โดยการประชุมเชิงปฏิบัติการ	72
6. การปรับปรุงชุดตรวจสอบ ELISA kit ให้มีขนาดกะทัดรัด	74
สรุปผลการทดลอง	75
ภาคผนวก	76
เอกสารอ้างอิง	81

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

สารพิษไมโครซิสตินเป็นสารพิษนี้สร้างโดยไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Microcystis* ที่พบในแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศไทย มีความเป็นพิษสูงต่อเนื่องเยื่อตับและกระตุ้นให้เกิดเนื้องอกซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง วิธีวิเคราะห์สารพิษนี้ส่วนใหญ่จะใช้ HPLC ซึ่งมีระดับความไวไม่เพียงพอที่จะใช้ในการหาปริมาณในระดับที่เป็นอันตรายที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก (1 ppb) โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบสำหรับการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยระหว่าง ปี พ.ศ. 2545 – 2548 จนได้ชุดต้นแบบสำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำได้สำเร็จ โดยสามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษได้ในระดับ 0.2 ppb โดยต้องการเครื่องอ่านค่า ELISA Reader และสามารถตรวจวัดได้ในระดับ 0.5 ppb โดยจะเห็นความแตกต่างด้วยตาเปล่า ซึ่งทั้งสองระดับนี้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลกที่ระดับไม่เกิน 1 ppb

จากผลสัมฤทธิ์ข้างต้น โครงการนี้จึงมีความประสงค์ที่จะนำชุดต้นแบบนี้ไปใช้จริงกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องที่มีก่อกวนปัญหาการปนเปื้อนของสาหร่ายพิษ *Microcystis* ในแหล่งน้ำต่างๆ ได้แก่ การประปานครหลวง การประปาส่วนภูมิภาค สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาค และการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย โดยวัตถุประสงค์ของโครงการ มีดังนี้

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ ความแม่นยำ และข้อจำกัดการใช้งานของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสติน
 2. เพื่อผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินเชิงพาณิชย์
- ซึ่งผลจากการวิจัยสามารถผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติได้โดยตรง และได้ผลเป็นที่น่าพอใจยิ่ง โดยประสิทธิภาพในการตรวจวัดมีความไวสูงกว่าวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ HPLC เป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำได้โดยตรง (ไม่จำเป็นต้องสกัดสารพิษจากตัวอย่างปริมาณมากเหมือน HPLC) และสามารถใช้ได้เป็นอย่างดีสำหรับการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำต่างๆ นอกจากนี้ชุดตรวจสอบนี้ยังสามารถใช้ตรวจวัดสารพิษไมโครซิสตินได้ผลเป็นอย่างดี ในตัวอย่างน้ำที่มี pH อยู่ในช่วง 5.5 – 7.5 มีระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่เกิน 100 mM หรือ 10 ppt ระดับความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมไม่เกิน 100 mM ระดับความเข้มข้นของเหล็กในรูปออกซิไดซ์ไม่เกิน 10 mM และคลอรีนและฟลูออไรด์ในระดับปกติไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้ควรบรรจุในถุงพลาสติกภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส (รวมทั้งน้ำยาอื่นๆ) จะทำให้สามารถรักษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบได้นาน 6 เดือน

เมื่อนำชุดตรวจสอบนี้ไปประเมินระดับของสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำจากระบบการผลิตน้ำประปาพบว่าสามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถยืนยันผลจากการวิเคราะห์ด้วย LC/MS

รหัสโครงการ : RDG4830016

ชื่อโครงการ : การผลิตชุดตรวจสอบ ELISA KIT เชิงพาณิชย์ สำหรับตรวจหาสารพิษ
Microcystin ในน้ำ

ชื่อนักวิจัย : วิเชียร ยงมานิตชัย¹, สุวรรณ กัลลพัฒน์²
¹คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
²สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail address : fsciwcy@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 พฤษภาคม 2548 – 30 เมษายน 2549

บทคัดย่อ

สารพิษไมโครซิสตินเป็นสารพิษนี้สร้างโดยไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Microcystis* ที่พบในแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศไทย มีความเป็นพิษสูงต่อเนื้อเยื่อตับและกระตุ้นให้เกิดเนื้องอกซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง วิธีวิเคราะห์สารพิษนี้ส่วนใหญ่จะใช้ HPLC ซึ่งมีระดับความไวไม่เพียงพอที่จะใช้ในการหาปริมาณในระดับที่เป็นอันตรายที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก (1 ppb) โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบสำหรับการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยระหว่าง ปี พ.ศ. 2545 – 2548 จนได้ชุดต้นแบบสำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำได้สำเร็จ โดยสามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษได้ในระดับ 0.2 ppb โดยต้องการเครื่องอ่านค่า ELISA Reader และสามารถตรวจวัดได้ในระดับ 0.5 ppb โดยจะเห็นความแตกต่างด้วยตาเปล่า ซึ่งทั้งสองระดับนี้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลกที่ระดับไม่เกิน 1 ppb วัตถุประสงค์ของโครงการ มีดังนี้

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ ความแม่นยำ และข้อจำกัดการใช้งานของชุดตรวจสอบ ELISA Kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสติน

2. เพื่อผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินเชิงพาณิชย์ ซึ่งผลจากการวิจัยสามารถผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติได้โดยตรง โดยประสิทธิภาพในการตรวจวัดมีความไวสูงกว่าวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ HPLC เป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำได้โดยตรง (ไม่จำเป็นต้องสกัดสารพิษจากตัวอย่างปริมาณมากเหมือน HPLC) จึงสามารถใช้ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำต่างๆ นอกจากนี้ชุดตรวจสอบนี้ยังสามารถใช้ตรวจวัดสารพิษไมโครซิสตินได้ผลเป็นอย่างดี ในตัวอย่างน้ำที่มี pH อยู่ในช่วง 5.5 – 7.5

มีระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่เกิน 100 mM หรือ 10 ppt ระดับความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมไม่เกิน 100 mM ระดับความเข้มข้นของเหล็กในรูปออกซิไดซ์ไม่เกิน 10 mM และคลอรีนและฟลูออไรด์ในระดับปกติไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้ควรบรรจุในถุงพลาสติกภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส (รวมทั้งน้ำยาอื่นๆ) จะทำให้สามารถรักษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบได้นาน 6 เดือน

เมื่อนำชุดตรวจสอบนี้ไปประเมินระดับของสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำจากระบบการผลิตน้ำประปาพบว่าสามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถยืนยันผลจากการวิเคราะห์ด้วย LC/MS

คำสำคัญ : ชุดตรวจสอบอีไลซ่า ไมโครซิสติน โพลีโคนอลแอนติบอดี ประเทศไทย

Project Code : RDG4830016

Project Title : Commercial Production of ELISA Kit for Rapid Detection of Microcystin in Water

Investigators : Yongmanitchai W.¹ and Cladpan S.²

¹Faculty of Science, Kasetsart University

²Research and Development Institute, Kasetsart University

E-mail address : fsciwcy@ku.ac.th

Project Duration : 1 May 2005 – 30 April 2006

Abstract

Microcystin is a hepatotoxic compound that leads to tumor and could develop to cancer cell. It is produced by a cyanobacteria, *Microcystis*, that commonly found in freshwater resources of Thailand. HPLC is the only standard method that used in analysis of this compound, but the sensitivity of the method is insufficient to detect the toxin at the level of 1 ppb which is the guideline recommended in drinking water issued by WHO. This research is the extension of the previous project, Development of ELISA Kit Prototype for Rapid Detection of Microcystin in Water, funded by Thailand Research fund in 2002 – 2004. The kit could detect toxin at the level as low as 0.2 ppb (by ELISA Reader) or at the level of 0.5 ppb (by naked eye). Both levels were far below safety limit recommended by World Health Organization at 1 ppb. The objectives of this project are:

1. To test the efficiency, accuracy and limitation of applying the ELISA kit in detection of microcystin,
2. To produce the ELISA kit for commercial applications.

Results revealed that the ELISA kit could detect microcystin in natural water samples with relatively accurate. The efficiency was much better than HPLC as far as the sensitivity was concerned due to its ability to analyze sample directly without pre-concentration as in the case of HPLC. Therefore, this kit could be used in monitoring of toxin contamination in water resources. This kit could analyze samples in the pH range of 5.5 – 7.5, sodium chloride concentrations less than 100 mM or 10 ppt, calcium salts

concentrations less than 100 mM, iron concentration less than 10 mM and chlorine and fluoride at normal levels did not affect the efficiency of the kit.

This ELISA kit should be packed under nitrogen atmosphere and stored in a refrigerator at 4°C. At this condition the shelf-life could be extended up to 6 months.

When this ELISA kit was tested against water samples collected from tap water production systems, the results were satisfactory as confirmed by LC/MS.

Keywords : ELISA Kit, Microcystin, polyclonal antibody, Thailand

คำนำ

ปัจจุบันไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษเป็นปัญหาสำคัญส่งผลกระทบต่อความเจ็บป่วยของมนุษย์และการตายของสัตว์เลี้ยงหลายแห่งทั่วโลก เช่น การปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำขนาดใหญ่ในประเทศไทย (อาภารัตน์และคณะ 2542) การเกิดโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลันรุนแรงในประชากรใน Palm Island รัฐ Queens land ประเทศออสเตรเลีย (Baurke และคณะ, 1983) การเกิดมะเร็งตับระยะเริ่มต้น ของประชากรในประเทศจีน (Delong, 1979 และ Yu, 1989) เป็นต้น ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษนี้ ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Microcystis* และ *Nodularia* โดยสามารถเจริญเติบโตรวดเร็วในแหล่งน้ำจืดทั่วไป และจะปนเปื้อนอยู่ในน้ำที่นำมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งมีผลกระทบต่อนิเวศวิทยาอย่างกว้างขวาง

ปัญหาการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษดังกล่าวในแหล่งน้ำจึงเป็นปัญหาใหม่ที่หน่วยงานต่างๆ กำลังให้ความสนใจและเร่งดำเนินการแก้ไข โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตน้ำเพื่อการบริโภคให้ปลอดจากสารพิษเป็นปัญหาสำคัญอันหนึ่งที่ต้องเร่งศึกษา เนื่องจากสารพิษถูกกำจัดได้ยากในกระบวนการการผลิตน้ำประปา มีรายงานว่าสามารถตรวจพบสารพิษไมโครซิสตินจากไซยาโนแบคทีเรียนี้ได้ น้ำประปาของประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และออสเตรเลีย ด้วยการใช่วิธีตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC, ELISA และทดสอบความเป็นพิษกับหนู (Chorus and Bartram, 1999) ซึ่งองค์การอนามัยโลก (WHO, 1997) จึงได้มีข้อกำหนดค่าความปลอดภัยสำหรับการปนเปื้อนของสารพิษ microcystin LR and equivalent ได้ไม่เกิน 1 ไมโครกรัมต่อลิตรในน้ำดื่ม

สำหรับข้อมูลในประเทศไทยพบว่าไซยาโนแบคทีเรียผลิตสารพิษสายพันธุ์ที่สำคัญ (dominant species) เป็นไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่ม *Microcystis aeruginosa* โดยตรวจพบในแหล่งน้ำจาก 5 แหล่ง ได้แก่ น้ำจากเขื่อนแม่กวง จังหวัดเชียงใหม่ เขื่อนลำตะคอง จังหวัดนครราชสีมา อ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี เขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี และสระน้ำเลี้ยงเปิดหน้าเรือนจำคลองเปรมกรุงเทพฯ และยังได้สรุปว่าแหล่งน้ำภายในประเทศขณะนี้กำลังอยู่ในสภาพเสื่อมโทรมก่อให้เกิดอันตราย หากประชากรมีการบริโภคน้ำจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารพิษนี้เป็นประจำ (อาภารัตน์และคณะ 2542) นอกจากนี้การสำรวจของ วิเชียร และคณะ (2001) ยังพบว่าการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ในแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศ ทั้งแหล่งน้ำที่ใช้เพื่อการเกษตร อุปโภค-บริโภค และเพื่อการพักผ่อน

จากปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษนี้แนวทางหนึ่งที่จักช่วยหลีกเลี่ยงการใช้น้ำที่มีสารพิษ ปนเปื้อน คือการหาวิธีตรวจที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำในแหล่งน้ำต่างๆ ที่ผ่านมาการวิเคราะห์หาสารพิษกลุ่มนี้จะใช้เทคนิคทาง HPLC ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษหลัก (microcystin-LR, -RR และ -YR) ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ แต่เนื่องจากวิธีการนี้มีความไวไม่เพียงพอในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีการปนเปื้อนระดับต่ำ อีกทั้งเครื่องมือมีราคาแพง และต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการควบคุมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษ ELISA เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสามารถตรวจหาสารพิษได้ครอบคลุมกว้างขวาง มีความไว

สูง ไม่เจาะจงชนิดของไมโครซิสตินที่มีอยู่มากชนิด และยังสะดวกในการตรวจหาสารพิษจากตัวอย่างจำนวนมาก จึงเป็นข้อดีอย่างยิ่งในการช่วยตรวจหาสารพิษในระยะปฐมภูมิ ปัจจุบันบริษัทในต่างประเทศได้ผลิต ELISA KIT ขายในราคา KIT ละ 396 เหรียญดอลลาร์สหรัฐ ราคาต่อตัวอย่างคิดเป็น 9 เหรียญ ซึ่งเป็นราคาวิเคราะห์ต่อตัวอย่างที่ค่อนข้างสูงมากอีกทั้งนำมีความจำเพาะต่อตัวอย่างในประเทศสหรัฐอเมริกา (Anonymous, 2001)

เมื่อปี พ.ศ. 2545 คณะผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจาก ฝ่ายสวัสดิภาพสาธารณะ (ฝ่าย 3) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ในโครงการวิจัย “การพัฒนา ELISA kit ต้นแบบเพื่อใช้ตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ” และประสบความสำเร็จในการผลิตชุดตรวจวิเคราะห์ต้นแบบที่มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับที่ผลิตขายโดยประเทศทางตะวันตก และสามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษในน้ำที่มีปริมาณเพียง 0.2 ppb และให้ผลความแม่นยำมากกว่า 90% ดังนั้นในการผลิตชุดตรวจสอบเชิงพาณิชย์ โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักในการนำเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นมา สำหรับผลิตชุดตรวจสอบเพื่อใช้ในประเทศ โดยหน่วยงานต่างๆ ทั้งภาครัฐ เอกชน และองค์การบริหารส่วนท้องถิ่น ให้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำที่ใช้ในการอุปโภค-บริโภคได้

ความเป็นพิษและผลกระทบของ Microcystin

การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของไซยาโนแบคทีเรีย ในแหล่งน้ำก่อให้เกิดผลกระทบอย่างกว้างขวางทั้งทางสิ่งแวดล้อม สังคม เศรษฐกิจ กลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียที่ลอยตัวอยู่บนผิวน้ำ นอกจากจะทำให้ทัศนียภาพโดยรวมต้องเสียไปและส่งกลิ่นที่ฉุนแฉะแล้ว ยังทำให้รสชาติของน้ำดื่มที่ผ่านการบำบัดแล้วเปลี่ยนไปอีกด้วย การย่อยสลายของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจำนวนมาก ทำให้ปริมาณของออกซิเจนในน้ำลดน้อยลง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำ และก่อให้เกิดผลกระทบต่อความสามารถในการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำต่างๆ ได้ ที่น่าเป็นห่วงที่สุดในแง่ของสุขภาพของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงก็คือ การผลิตสารพิษที่มีฤทธิ์เป็นพิษอย่างสูง ซึ่งสารพิษเหล่านี้มีทั้งชนิดที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxin) และชนิดที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (biotoxin) (Carmichael, 1992) สารพิษกลุ่มดังกล่าวนี้จะประกอบด้วยสาร alkaloid ที่เป็นพิษต่อระบบประสาทเช่น anatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxin และสารพิษที่ทำให้สัตว์น้ำชนิดมีเปลือกเกิดอาการอัมพาต โดยสารพิษที่เป็นอันตรายต่อตับในสัตว์ชั้นสูงที่พบเห็นได้บ่อย เช่น microcystins และ nodularins เป็นสารพวก cyclic peptide ส่วนสารพิษ cylindrospermopsin เป็นสารพวก alkaloid (Anderson และคณะ, 1993)

สารพิษไมโครซิสตินนั้นถูกสร้างโดย cyanobacteria ทั้งชนิดที่เป็นเส้นสาย (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, และ *Hapalosiphon*) หรือชนิดที่เป็นกลุ่มโคโลนีอย่าง *Microcystis* เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้มีการค้นพบสารที่มีโครงสร้างคล้ายไมโครซิสตินในแหล่งน้ำทะเล (Anderson และคณะ, 1993) แต่ยังไม่สามารถระบุถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษนี้

ผลของสารพิษไมโครซิสตินต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์

จากการรวบรวมหลักฐานการเจ็บป่วยของคนที่ได้รับสารพิษจาก cyanobacteria โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสารไมโครซิสตินการสัมผัสกับสารพิษนั้น ส่วนใหญ่เกิดจากการท่องเที่ยวตามทะเลสาบและแม่น้ำ (การสัมผัสทางปากและทางผิวหนัง) การดื่มน้ำหรือกินอาหารเสริมที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย (การสัมผัสทางปาก) และการใช้ท่อฝักบัวอาบน้ำ (การสัมผัสทางการสูดดม) ระยะเวลาที่ร่างกายจะมีโอกาสสัมผัสกับสารพิษนั้นจะขึ้นอยู่กับที่ตั้ง ทางภูมิศาสตร์ของสถานที่ (3-5 เดือนในหนึ่งปีสำหรับประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา จนถึง 6-10 เดือนสำหรับประเทศออสเตรเลียและสหภาพอัฟริกาใต้) ประเทศจีนได้มีการศึกษาทางระบาดวิทยาที่อาจพบความสัมพันธ์ระหว่างอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งกับการได้รับสารอาหาร และน้ำดื่มที่ปนเปื้อนสารพิษของ cyanobacteria (Falconer และคณะ, 1994)

การวิจัยทางด้านระบาดวิทยาที่กระทำการอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาหลายปีในประเทศจีนได้แสดงให้เห็นว่าอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งตับในมนุษย์นั้นน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับแหล่งของน้ำดื่ม โดยจะเห็นจากข้อมูลว่า ในกลุ่มประชากรชนบทที่ดื่มน้ำจากแหล่งน้ำบนผิวดินจะมีโอกาสเป็นโรคมะเร็งได้มากกว่ากลุ่มที่ดื่มน้ำจากบ่อน้ำ (Yu, 1989) การศึกษาของ Carmichael (1992) ได้ตั้งข้อสังเกตไว้ว่า ความสัมพันธ์ที่น่าจะสืบเนื่องมาจากการที่แหล่งน้ำดื่มบนผิวดินนั้นมีการปนเปื้อนของ cyanobacteria ซึ่งความเกี่ยวพันกันของข้อมูลนั้นได้มาจากการศึกษาผลทางชีวภาพของสารไมโครซิสติน ผู้ที่ได้รับสารพิษจาก cyanobacteria จะมีอาการระคายเคืองตาและผิวหนัง อาการใช้มึนงง เหนื่อยง่าย และกระเพาะลำไส้อักเสบเฉียบพลัน ซึ่งอาการเจ็บป่วยที่กล่าวมานี้ไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าเกิดขึ้นจากสารพิษจำพวก hepatotoxins หรือ neurotoxins

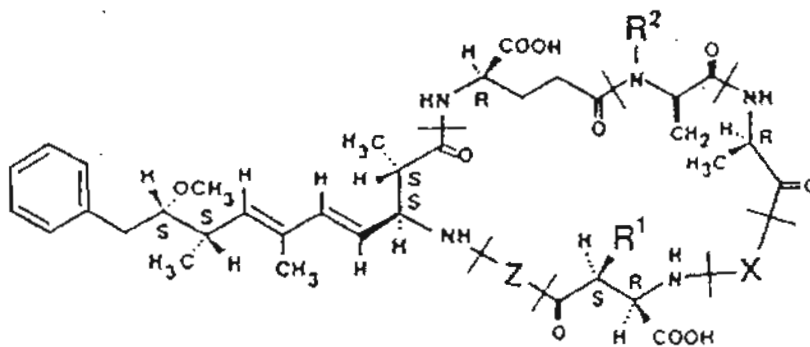
การตายและการเจ็บป่วยของ สัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และปลา รวมทั้งนก เนื่องจากการกลืนกินเอาสารพิษทั้งชนิด neurotoxins และ hepatotoxins ลงไปในปริมาณ 90% ของความเข้มข้นที่เป็นอันตรายถึงชีวิตลงไป กลับไม่ปรากฏผลที่เลวร้ายแต่ประการใด ขนาดและชนิดของสัตว์มีส่วนในการทำลายความเป็นพิษของสารที่กลืนกินลงไปภายในร่างกาย โดยปกติพบว่า สัตว์ที่มีกระเพาะเดียวจะมีความสามารถต้านทานสารพิษได้ดีกว่าสัตว์ที่มีสองกระเพาะ สาเหตุการตายของหนูที่ได้รับสารพิษนั้นเกิดจากการช็อคเนื่องจากเลือดไหลไม่หยุดและตับวาย (Theiss และคณะ, 1988)

Falconer และคณะ (1988) ได้ทำการทดลองให้หนูดื่มน้ำที่ปนเปื้อนด้วยสารสกัดจากเชื้อ *Microcystis aeruginosa* ในขนาดความเข้มข้นที่ต่ำกว่า lethal concentration เป็นเวลาติดต่อกันนาน 1 ปี ผลการศึกษาสรุปได้ว่า หนูที่ดื่มน้ำที่ปนเปื้อนสารพิษจะมีอัตราการตายสูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับสารพิษ และหนูเพศผู้จะมีอัตราการตายสูงกว่าหนูเพศเมีย นอกจากนี้ หนูที่ได้รับสารพิษแบบเรื้อรังยังมีการเกิดโรคปอดบวมสูงขึ้นตามอายุอีกด้วย

นอกจากนี้ไมโครซิสตินมีความคงทนต่อสภาพฟิสิกส์ที่เป็นกรดเท่ากับ 2-4 และทนต่อความร้อน ดังนั้นความเข้มข้นของสารพิษในแหล่งน้ำจึงอาจสะสมเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดเวลาในแหล่งน้ำได้นาน (Fitzgeorge และคณะ, 1994)

โครงสร้างทางเคมีและลักษณะจำเพาะของสารพิษไมโครซิสติน

Botes และคณะ (1982) พบว่าไมโครซิสตินมีโครงสร้างเป็นวงแหวนวงเดียวที่ประกอบขึ้นจากการดะมิโนมาตรฐาน 5 ตัวและกรดอะมิโนพิเศษ 2 ตัว กรดอะมิโนมาตรฐาน 5 ตัวนี้แบ่งออกเป็นกรดอะมิโนที่มีอยู่ในไมโครซิสตินทุกชนิดจำนวน 3 ตัวได้แก่ D-alanine (Ala), *erythro*- β -methylaspartic acid (β -Me-Asp), และ γ -linked glutamic acid (Glu) และกรดอะมิโนคู่ที่แตกต่างออกไปตามชนิดของสารพิษอีกจำนวน 2 ตัว ซึ่งเท่าที่มีการค้นพบมีจำนวนมากกว่า 50 ชนิด แต่ที่พบบ่อยมีอยู่ 3 ชนิด คือ arginine และ arginine (RR), leucine และ arginine (RR), tyrosine และ arginine (YR) สำหรับกรดอะมิโนพิเศษทั้ง 2 ตัวนั้น ได้แก่ 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2, 6, 8, -trimethyldeca-4, 6-dienoic acid (Adda) และ *N*-methyldehydroalanine (Mdha)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของสารพิษไมโครซิสติน Cyclo-(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷)

ความคงตัวของสารพิษไมโครซิสติน

สารพิษในกลุ่มไมโครซิสตินเป็นสารประกอบจำพวก heptapeptide ชนิดวงแหวนที่เสถียรต่อปฏิกิริยาเคมีสูง โดยสารพิษนี้จะมีครึ่งชีวิตประมาณ 3 สัปดาห์ภายใต้สภาวะที่พีเอชเท่ากับ 1 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส การทำลายสารพิษนี้อย่างสมบูรณ์จำเป็นต้องใช้การกลั่นด้วยกรดที่มีฤทธิ์กัดกร่อนสูงมากเช่น 6N hydrochloric acid หรือ trifluoroacetic acid และสารกลุ่มนี้ยังทนต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปอย่างเช่น trypsin ได้มีการศึกษาถึงการสลายตัวของสารไมโครซิสตินด้วยรังสี โดยใช้แสง fluorescence และแสงอาทิตย์ ผลการทดลองพบว่ารังสีไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการสลายตัวของสารนี้ เมื่อตั้งสารละลายของสารนี้ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ทิ้งไว้นาน 26 วัน และตั้งสารละลายของสารพิษนี้ในน้ำที่มีส่วนผสมของรงควัตถุภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น chlorophyll a, β -carotene, และ phycocyanins ภายใต้แสงอาทิตย์เป็นเวลา 15 วัน พบว่าปริมาณของไมโครซิสตินจะลดลง แสดงว่ารงควัตถุเหล่านี้มีส่วนสำคัญในการ

เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของไมโครซิสตินแต่การทดลองทำนองเดียวกันนี้โดยใช้แสง fluorescence กับสาร microcystin-LR พบว่าแสงไม่มีผลต่อการสลายตัวแต่ประการใด

จากการศึกษาผลของรังควัตถุที่มีต่อการเกิด isomerization สรุปได้ว่า ในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ กระบวนการสลายตัวด้วยแสงและกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเชิงเรขาคณิตของสารให้กลายเป็นสารที่ไม่มีพิษจะเกิดขึ้นพร้อมๆกัน การสลายตัวจะเกิดขึ้นเร็วกว่าหากมีความเข้มข้นของรังควัตถุสูง นอกจากนี้รังควัตถุยังส่งผลต่อการเกิด isomerization ของสาร โดยที่อัตรา การเกิด isomerization จะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของรังควัตถุ (Tsuji และคณะ, 1994)

การตรวจวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสติน

1. Thin Layer Chromatography (TLC)

การใช้เทคนิค TLC ทั้งประเภท normal phase และ reversed phase ในการสกัดและทำให้สารพิษที่เป็นสายเปปไทด์บริสุทธิ์ขึ้นนั้นเป็นสิ่งที่ไม่ยุ่งยากและไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อน และทั้งสองวิธีนี้จะใช้ตัวทำละลายผสม chloroform-methanol-water เป็น mobile phase (Al-Lay และคณะ, 1988) การใช้ระบบตัวทำละลายผสมที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยนั้นมีข้อดีอีกประการหนึ่งคือ น้ำจะช่วยลดการทำงานของสารประกอบจำพวก silanols บนผิวของแผ่น TLC สำหรับสารไมโครซิสตินนั้น พบว่าสามารถใช้ระบบตัวทำละลายผสม 2 ระบบด้วยกันคือ chloroform-methanol-water ในอัตราส่วน (4 : 6 : 1) และ ethyl acetate-isopropanol-water ในอัตราส่วน (4 : 3 : 7) (Harada และคณะ, 1988) ซึ่งระบบตัวทำละลายผสมชนิดหลังนี้ใช้ในการแยก desmethylated microcystin-LR (Harada และคณะ, 1991) นอกจากนี้ยังมีการใช้ระบบตัวทำละลายผสมอีกระบบหนึ่งคือ *n*-butanol-acetic acid-water เป็น mobile phase นอกเหนือจากการใช้ chloroform-methanol-water ในอัตราส่วน (4 : 6 : 1) ในการแยก microcystin-YR และ microcystin-LR ด้วย normal phase TLC (Kungswan และคณะ, 1988) และในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค TLC ให้สามารถแยกสารพิษไมโครซิสตินให้บริสุทธิ์มากขึ้นกว่าเดิมโดยใช้เทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) หลักการคือ ใช้แผ่น TLC ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลที่มีขนาดอนุภาคที่ละเอียดมาก ใช้สารละลายเคลื่อนที่เป็น chloroform-methanol-water ในอัตราส่วน (4 : 6 : 1) และตรวจดูสารพิษภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

2. Gas Chromatography (GC)

เทคนิคการวิเคราะห์หาไมโครซิสตินด้วยการใช้ gas chromatography นั้นสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณของไมโครซิสตินทั้งหมดในสารตัวอย่างได้เท่านั้น เนื่องจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ Adda ตัวหนึ่งคือ 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB) (Tanaka และคณะ, 1993) เทคนิคใหม่ล่าสุดที่มีผู้นำมาใช้วิเคราะห์หาไมโครซิสตินคือ capillary zone electrophoresis และตรวจจับด้วย laser fluorescence (Wright และคณะ, 1989)

3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินโดยใช้วิธี reversed phase HPLC ในการคัดแยกและทำให้สารพิษบริสุทธิ์ขึ้น เป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณของไมโครซิสตินเซลล์ที่ผ่านการ lyophilized (Birk และคณะ, 1988) หลังจากทีสารพิษผ่านการขจัดสิ่งที่ไม่ต้องการออกแล้ว นำมาแยกส่วนของสารพิษด้วย ODS silica gel โดยใช้ 26% acetonitrile ต่อ 10mM ammonium acetate เป็นสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) (Krishnamurthy และคณะ, 1986) และแม้ว่าวิธีการนี้จะถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางก็ตาม แต่ก็พบว่าไม่สามารถแยก microcystin-LR และ -YR ออกจากกันได้ (Harada และคณะ, 1988) จากการศึกษาต่อมาพบว่าการใช้สารละลายเคลื่อนที่เป็น methanol ต่อ 0.1% TFA จะสามารถแยกไมโครซิสตินทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันได้ (Kungswan และคณะ, 1987) ในระยะต่อมาได้มีการพัฒนาการใช้ระบบสารละลายเคลื่อนที่แบบผสมของ methanol ต่อ 0.05% TFA, methanol ต่อ 0.05M-phosphate buffer pH3 ในอัตราส่วน (60 : 40), และ methanol ต่อ 0.05M sodium sulfate โดยใช้ ODS column และใช้ UV detector ในการตรวจหาชนิดและปริมาณสารพิษ ที่ความยาวคลื่น 239 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานทำให้การวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินทำได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Harada และคณะ, 1988)

4. การตรวจวัดโดยเทคนิค ELISA

การใช้เทคนิคด้าน ELISA มาใช้ตรวจวัดปริมาณของสารพิษไมโครซิสตินนับว่าเป็นวิธีที่กำลังได้รับความสนใจมากที่สุดในการที่ต้องการตรวจสอบหาสารพิษในสารตัวอย่างจำนวนมากอย่างรวดเร็วเนื่องจากวิธีการนี้มีความไว ความจำเพาะ และความสะดวก (Chu, et al, 1989; Chu, et al, 1990) Kfir และคณะ (1986) เป็นผู้บุกเบิกการใช้ ELISA ในการตรวจวัดสารพิษไมโครซิสติน โดยการใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อ microcystin-LA

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ ความแม่นยำ และข้อจำกัดการใช้งานของชุดตรวจสอบ ELISA Kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสติน
2. เพื่อผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินเชิงพาณิชย์

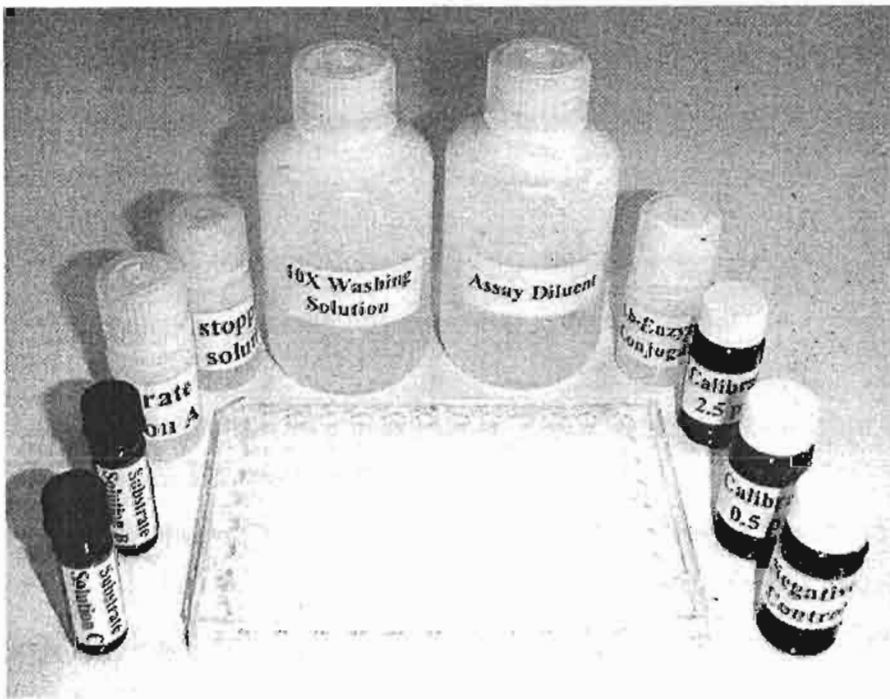
อุปกรณ์และวิธีการ

1. ประเมินการใช้ชุด ELISA kit ในการตรวจสอบสารพิษไมโครซิสตินในแหล่งน้ำธรรมชาติ

1.1 การตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำด้วย ELISA kit

1.1.1 ส่วนประกอบของชุดตรวจสอบ (ภาพที่ 2)

1. Antibody-coated micro-well plate
2. Negative Control
3. 0.2, 1 และ 5 ppb Microcystin RR calibrator
4. Assay diluent
5. Antibody-enzyme conjugate
6. 10X Wash salt solution
7. Substrate A, B and C (เตรียม substrate mixture ในอัตราส่วน A:B:C = 10 มิลลิตร : 100 ไมโครลิตร : 7 ไมโครลิตร ก่อนใช้งาน หลังผสมแล้วมีอายุการเก็บ 1 ชั่วโมง)
8. Stop solution



ภาพที่ 2 แสดงส่วนประกอบของชุดต้นแบบ ELISA kit สำหรับตรวจสอบสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ

1.1.2 วิธีการ

1. เตรียมสารละลายและอุปกรณ์ทั้งหมดให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน และอยู่ที่อุณหภูมิห้อง
2. เติมนegative control หรือ calibrator หรือ ตัวอย่างน้ำ (จำนวนซ้ำ $n \geq 12$) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม (ถ้าตัวอย่างน้ำมีปริมาณสารพิษสูงเกินไป ให้เจือจางด้วย assay diluent)
3. เติมนegative control หรือ calibrator หรือ ตัวอย่างน้ำ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
4. ผสมสารละลายใน micro-well plate ด้วยการหมุนในแนวราบเป็นวงกลม ประมาณ 20-30 วินาที
5. ปิดฝา micro-well plate แล้วบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
6. เทสารละลายทิ้งในอ่างน้ำ หรือภาชนะที่เหมาะสม
7. เติมนegative control หรือ calibrator หรือ ตัวอย่างน้ำ ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วดูดทิ้ง ทำทั้งหมด 3 ครั้ง
8. เติมนegative control หรือ calibrator หรือ ตัวอย่างน้ำ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ในที่มืด จะได้สารละลายสีฟ้าเกิดขึ้น
9. เติมนegative control หรือ calibrator หรือ ตัวอย่างน้ำ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จะได้สารละลายสีเหลืองเกิดขึ้น
10. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA Reader
11. คำนวณปริมาณสารพิษจาก %B/Bo ดังนี้

$$\%B/Bo = \frac{\text{Average Absorbance of Calibrator or Sample}}{\text{Average Absorbance of Negative Control}} \times 100$$

ค่า %B/Bo นี้เป็นค่าที่สัมพันธ์ (relative value) ที่ค่อนข้างคงที่ เนื่องจากเป็นค่าที่คำนวณเปรียบเทียบกับ calibrator ในทุกชุดของการตรวจวัด

ซึ่งในการตรวจวัดแต่ละครั้งจะต้องทำการกราฟมาตรฐานจาก calibrator ที่เตรียมไว้ (0.2, 1 และ 5 ppb) หลังจากนั้นจึงทำการคำนวณ โดย plot ค่า log ของความเข้มข้นของ calibrator แกน x และค่า %B/Bo บนแกน y ซึ่งถ้าค่า %B/Bo เมื่อเทียบแล้วได้มากกว่า 5 ppb ควรจะเจือจางตัวอย่างให้ปริมาณสารพิษอยู่ระหว่าง 0.2 – 5 ppb แล้วทำการตรวจวัดใหม่

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษด้วยเครื่อง HPLC

1.2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 20 ลิตรด้วยการกรองผ่านผ้าในลอนที่มีรูขนาดความถี่ 200 mesh เมื่อถึงที่พักในวันเดียวกันทำการกรองหยาดด้วย filter press ที่สามารถ

กรองได้ระดับ 1 ไมโครเมตร หลังจากนั้นกรองละเอียดด้วย membrane filter (Satorius, AG Germany) ที่มีขนาดของรู 0.45 ไมโครเมตร

1.2.2 การสกัดสารพิษไมโครซิสติน

นำน้ำที่ผ่านการกรองจากข้อ 1.2.1 ปริมาณ 10 ลิตร มากรองซ้ำอีกครั้งด้วย membrane filter (Satorius, AG Germany) ที่มีขนาดของรู 0.45 ไมโครเมตร หลังจากนั้นผ่านน้ำทั้งหมดไปยัง C₁₈ cartridge (Sep-pak, Millipore, Waters Associates) ที่จะทำการดูดซับสารพิษเอาไว้ภายใน cartridge (ก่อนนำ cartridge มาใช้ทำการล้างด้วยเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร) โดยในแต่ละตัวอย่างจะใช้ประมาณ 12 ชิ้น จากนั้นชะสารพิษทั้งหมดออกมาด้วย methanol นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง แล้วละลายด้วย 20% methanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ผ่าน Sep-pak C₁₈ อีกครั้ง แล้วชะสารพิษออกด้วย 20% methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในส่วนนี้จะได้ microcystin-RR แล้วชะสารพิษส่วนที่เหลือ (microcystin-LR และ microcystin-YR) ด้วย 100 % methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละส่วนไปทำการระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ภายใต้สุญญากาศ) จนเหลือตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้มากรองผ่านดิลูเตอร์ที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นนำสารที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Perkin Elmer, Connecticut, USA) ที่ประกอบด้วย LC pump (Series 200) และ programmable absorbance detector model 785 A โดยฉีดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ผ่าน HPLC คอลัมน์ Mightysil ODS (RP-18GP 150-4.6, Kanto Chemical, Co. Ltd., Tokyo, Japan) ใช้สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย เมทานอลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมล ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 (v/v) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจหาชนิดและปริมาณสารพิษ ด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 239 นาโนเมตร โดยเทียบระยะเวลาคงตัว (retention time) และ พื้นที่ใต้ peak กับสารพิษมาตรฐาน (Kanto Chemical, Co. Ltd., Tokyo, Japan)

2. อิทธิพลของคุณภาพน้ำต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดของชุดตรวจสอบ ELISA kit

2.1 ผลของ pH

ทำการปรับ pH ของน้ำบริสุทธิ์ให้มีค่า 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N หรือ สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N แล้วใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

2.2 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ปรับปริมาณของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl; MW 58.44) ในน้ำบริสุทธิ์ ให้มีระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150 และ 200 mM แล้วใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

2.3 ผลของเกลือแมกนีเซียม

ทำการปรับปริมาณของเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4 ; MW 102.4) ในน้ำบริสุทธิ์ ให้มีระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150 และ 200 mM แล้วใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

2.4 ผลของเกลือแคลเซียม

ปรับปริมาณของเกลือแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3 ; MW 100.1) ในน้ำบริสุทธิ์ ให้มีระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 300 mM แล้วใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

2.5 ผลของเหล็ก

ปรับปริมาณของเกลือเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; MW 278.0) หรือ เฟอริกซัลเฟต ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; MW 399.9) ในน้ำบริสุทธิ์ ให้มีระดับความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20 และ 30 mM แล้วใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

2.6 ผลของคลอรีน

ปรับปริมาณของคลอรีนที่แตกตัวมาจากโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaHClO_2 ; MW 100.1) ในน้ำบริสุทธิ์ ให้มีระดับความเข้มข้นของคลอรีนเท่ากับ 1, 2, 5, 10 และ 15 ppm แล้วใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

2.7 ผลของฟลูออไรด์

ปรับปริมาณของเกลือฟลูออไรด์ (NaF ; MW 278.0) ในน้ำบริสุทธิ์ ให้มีระดับความเข้มข้นของฟลูออไรด์เท่ากับ 0.5, 1, 2, 3 และ 5 ppm แล้วใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1.2

3. การศึกษาอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ ELISA kit

นำ antibody-coated micro-well plate ที่ต้องการศึกษามารวมบรรจุในถุงพลาสติกพอลิโพรพีลีน ที่มีความหนา 150 ไมโครเมตร ขนาด 3 x 6 นิ้ว แล้วผนึกปากถุงด้วยลวดร้อนภายใต้สภาวะ

3.1 ปกติ (normal pack)

3.2 สูญญากาศ (vacuum pack) โดยใช้ปั๊มสูญญากาศ (Gast, model 0523-V4-G21DX, USA) ที่ระดับสูญญากาศ 60 มิลลิบาร์

3.3 บรรจุไนโตรเจน (nitrogen pack)

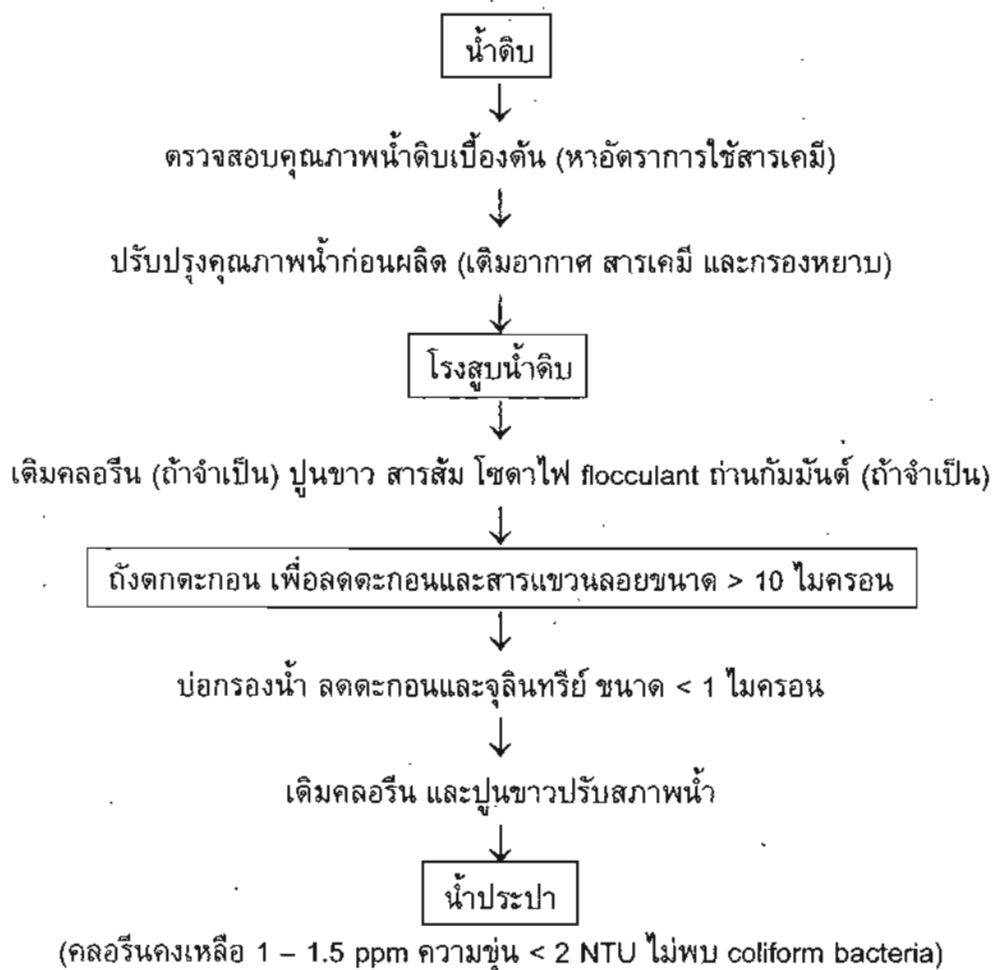
แบ่งชุดตรวจสอบที่บรรจุทั้ง 3 แบบ พร้อมน้ำยาและอุปกรณ์อื่นๆ ออกเป็น 2 ส่วน แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เหล็ก (อุณหภูมิห้อง) และตู้บ่ม 4 องศาเซลเซียส

ทำการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่เตรียมข้างต้นตามระยะเวลาที่กำหนด ได้แก่ อายุ 0, 1, 2, 3 และ 6 เดือน

4. การประเมินคุณภาพชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดสารพิษในระบบผลิตน้ำประปา เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วย LC/MS

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากระบบผลิตน้ำประปา ตามจุดต่างๆ ดังนี้

1. น้ำดิบ
2. โรงสูบน้ำดิบ
3. ถังตกตะกอน
4. น้ำประปา



ภาพที่ 3 กรรมวิธีการผลิตน้ำประปา

ที่มา : การประปาานครหลวง (http://www.mwa.co.th/treat_water.html)

4.1 การเก็บตัวอย่างน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 1 ลิตร แล้วกรองผ่าน glass fiber filter (GF/F, Whatman) เก็บในขวดพลาสติก และแช่เย็นในถังน้ำแข็งระหว่างเดินทาง

4.2 การสกัดสารพิษไมโครซิสติน

นำน้ำที่ผ่านการกรองจากข้อ 4.1 มากรองซ้ำอีกครั้งด้วย membrane filter (Satorius, AG Germany) ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร หลังจากนั้นผ่านน้ำทั้งหมดไปยัง C₁₈ SPE cartridge (Sep-pak, Millipore, Waters Associates) ที่จะทำการดูดซับสารพิษเอาไว้ภายใน cartridge จากนั้นล้างด้วยน้ำ 1 มิลลิลิตร ตามด้วย 20% methanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะสารพิษออกมาด้วย 80% methanol 0.4 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยน้ำอีก 0.6 มิลลิลิตร นำทั้ง 2 ส่วนมารวมกันจะเป็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4.3 การวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินด้วย LC/MS

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4.2 ด้วยเครื่อง LC/MS (Shimadzu, Kyoto, Japan) ที่ประกอบด้วย LC pump (LC-10AD) โดยฉีดสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ด้วย Autosampler (SIL-HT) ผ่านคอลัมน์ Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 x 150 mm, Agilent, USA) เก็บอยู่ใน column oven (CTO-10A) ใช้สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วยเมทานอล : น้ำที่มี formic acid 0.1% ในอัตราส่วน 55 ต่อ 45 (v/v) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจหาชนิดและปริมาณสารพิษ ด้วย photo-diode array (SPD – M10A) และ LC/MS – 2010A ใน SIM (selected ion monitor) mode โดยเทียบระยะเวลาคงตัว (retention time) และ พื้นที่ใต้ peak กับสารพิษมาตรฐาน (Kanto Chemical, Co. Ltd., Tokyo, Japan)

4.4 การวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินด้วย ELISA kit

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4.2 ด้วย ELISA kit ตามวิธีการในข้อ 1.1

5. การเผยแพร่และประชาสัมพันธ์ชุด ELISA Kit โดยการจัดสัมมนาและสาธิตร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

ทำการจัดประชุมเชิงปฏิบัติการการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA kit ให้กับบุคลากรของหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การประปานครหลวง การประปาสวนภูมิภาค สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาค และการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ซึ่งได้แจ้งให้ผู้เข้าร่วมประชุมนำตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจสอบมาใช้ในการวิเคราะห์ระหว่างการประชุม

ผลและวิจารณ์

1. ประเมินการใช้ชุด ELISA kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในแหล่งน้ำธรรมชาติ

จากการใช้ชุดตรวจสอบในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ที่ประกอบด้วยตัวอย่างน้ำจากเขื่อน 9 แห่ง จากอ่างเก็บน้ำขนาดกลาง 7 แห่ง และบึงหรือบ่อน้ำขนาดเล็ก 4 แห่ง พบว่าจากตัวอย่างน้ำ 9 เขื่อน เมื่อตรวจวัดด้วยชุดตรวจสอบ มี 2 แห่ง คือเขื่อนแก่งกระจาน จ.เพชรบุรี และเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ มีระดับของสารพิษไมโครซิสตินมากกว่าเกณฑ์มาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (ไม่เกิน 1 ppb) คือมีปริมาณสารพิษอยู่ 4.81 และ 4.56 ppb ตามลำดับ แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้ตัวอย่างน้ำ 2 – 10 ลิตร พบว่ามีปริมาณสารพิษ 3.24 และ 2.35 ppb ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าผลจากการตรวจวัดด้วยชุดตรวจสอบมีค่าใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่มีราคาแพงมาก ค่าใช้จ่ายในการสกัดตัวอย่างสูง ใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างนาน (ประมาณ 6 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตามปัจจุบันนี้การวิเคราะห์เชิงปริมาณยังต้องใช้ HPLC เป็นหลัก เนื่องจากมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือมากกว่าเทคนิคทาง ELISA โดยเฉพาะอย่างยิ่งชุดตรวจสอบที่ใช้พัฒนามาจาก polyclonal antibody ที่รายงานผลเป็นปริมาณสารพิษรวม ซึ่งไม่สามารถระบุชนิดของสารพิษที่มีมากกว่า 70 ชนิดได้ ในขณะที่วิธี HPLC สามารถจำแนกสารพิษเป็นชนิดได้ ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าสารพิษไมโครซิสตินจากเขื่อนทั้งสองแห่งมีส่วนประกอบที่ค่อนข้างแตกต่างกัน โดยสารพิษจากเขื่อนแก่งกระจานจะมี Microcystin-YR ในสัดส่วนที่มากกว่า Microcystin-RR ในขณะที่สารพิษในตัวอย่างน้ำจากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์เกือบทั้งหมดเป็น Microcystin-RR (ตารางที่ 1)

สำหรับตัวอย่างน้ำจากเขื่อนอีก 7 แห่งมีปริมาณสารพิษไมโครซิสต่ำกว่าเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกเมื่อตรวจวัดด้วยชุดตรวจสอบ โดยมีปริมาณสารพิษอยู่ระหว่าง 0.08 – 0.791 ppb และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC มีเพียงตัวอย่างน้ำจากเขื่อนภูมิพล และเขื่อนแม่กวงอุดมธาราที่พบสารพิษในปริมาณน้อยมากเพียง 0.57 และ 0.24 ppb ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างน้ำจากอีก 5 เขื่อนตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษด้วย HPLC (ตารางที่ 1)

สำหรับตัวอย่างน้ำจากอ่างเก็บน้ำขนาดกลาง มี 2 แห่งที่พบว่ามีปริมาณสารพิษมากกว่า 1 ppb เมื่อตรวจวัดด้วย ELISA kit ได้แก่ อ่างเก็บน้ำหมายเลข 1 ของ กฟภ. จังหวัดกระบี่ และอ่างเก็บน้ำห้วยชันเหล็ก พบสารพิษไมโครซิสติน 2.52 และ 4.41 ppb ตามลำดับ ที่น่าเป็นห่วงคืออ่างเก็บน้ำห้วยชันเหล็กเป็นแหล่งน้ำดิบสำหรับการผลิตน้ำประปาของจังหวัดลพบุรี และเมื่อนำตัวอย่างน้ำจากอ่างทั้งสองมาสกัดสารพิษและวิเคราะห์ด้วย HPLC พบปริมาณสารพิษในปริมาณ 1.89 และ 5.63 ppb ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยองค์ประกอบสารพิษส่วนใหญ่เป็น Microcystin-RR ส่วนอ่างเก็บน้ำอีก 5 แห่งที่เหลือตรวจพบสารพิษเพียงเล็กน้อยด้วย ELISA kit และตรวจไม่พบด้วย HPLC

ในจำนวนบึงหรือบ่อน้ำขนาดเล็ก 4 แห่ง บึงบ้านส่งคุ่มจังหวัดขอนแก่นเป็นแหล่งน้ำสำหรับประปาหมู่บ้าน ซึ่งทั้งหมดตรวจพบสารพิษในปริมาณเล็กน้อยด้วย ELISA kit ในระดับ 0.09 – 0.49 ppb และมี 2 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ด้วย HPLC ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับวิธี ELISA (ตารางที่ 1)

มีข้อมูลที่น่าสนใจจากการทดลองข้างต้นของตัวอย่างจากเขื่อนแก่งกระจาน และอ่างเก็บน้ำ หมายเลข 1 กฟภ. กระบี่ พบว่าเมื่อทำการเก็บตัวอย่างไว้นานประมาณ 4 เดือนที่อุณหภูมิห้อง พบว่าปริมาณสารพิษไมโครซิสตินที่ตรวจพบในระดับสูงตอนต้นมีปริมาณลดลงเหลือเพียง 0.08 และ 0.02 ppb ตามลำดับ เมื่อตรวจวัดด้วย ELISA kit และตรวจวิเคราะห์ไม่พบด้วย HPLC (ใช้ตัวอย่างน้ำเพียง 2 ลิตร) ซึ่งสาเหตุของการลดลงของสารพิษอาจจะมาจากการสลายตัวด้วยกิจกรรมของแบคทีเรียที่มีผู้รายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยสลายสารพิษไมโครซิสตินได้ หรือสารพิษอาจถูกดูดซับด้วยตะกอนสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำ (Dow, et al., 1994) ซึ่งเป็นวิธีธรรมชาติที่อาจนำไปปรับใช้ได้ในการที่มีสารพิษปนเปื้อนในระดับต่ำ

กล่าวโดยสรุปชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่ได้ผลิตขึ้นสามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติได้โดยตรง และได้ผลเป็นที่น่าพอใจยิ่ง โดยประสิทธิภาพในการตรวจวัดมีความไวสูงกว่าวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ HPLC เป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำได้โดยตรง (ไม่จำเป็นต้องสกัดสารพิษจากตัวอย่างปริมาณมากเหมือน HPLC) และสามารถใช้ได้เป็นอย่างดีสำหรับการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำต่างๆ อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณยังจำเป็นต้องใช้ HPLC เป็นหลัก เนื่องจากชุดตรวจสอบที่ได้มาจาก polyclonal antibody

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในแหล่งน้ำธรรมชาติด้วยวิธี ELISA กับ HPLC

ลำดับ ที่	สถานที่	R ² of Std.	Correlation Equation	Ave Abs. at 450 nm	Microcystin Conc. by ELISA (ppb)*	Microcystin Conc. by HPLC (ppb)**	Remarks
1.	เขื่อนแก่งกระจาน (1)	0.9726	$y = -18.111x + 72.634$	0.906	4.81	3.24	อายุ 1 สัปดาห์
	เขื่อนแก่งกระจาน (2)	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.126	0.08	ND	อายุ 4 เดือน RT
2.	เขื่อนลำตะคอง	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.260	0.09	ND	
3.	เขื่อนอุบลรัตน์	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.174	0.19	ND	
4.	เขื่อนจุฬาภรณ์	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.058	0.56	ND	
5.	เขื่อนศรีนครินทร์	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.121	0.32	ND	
6.	เขื่อนวชิราลงกรณ์	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.123	0.31	ND	
7.	เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	0.832	4.56	2.35	
8.	เขื่อนภูมิพล	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.022	0.791	0.57	
9.	เขื่อนแม่งวางอุดมธารา	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.029	0.736	0.24	
10.	อ่างเก็บน้ำ 1 กฟภ. กระบี่ (1)	0.9726	$y = -18.111x + 72.634$	0.982	2.52	1.89	อายุ 1 สัปดาห์
	อ่างเก็บน้ำ 1 กฟภ. กระบี่ (2)	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.236	0.02	ND	อายุ 4 เดือน RT
11.	อ่างเก็บน้ำบางพระ (1)	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.155	0.05	ND	ช่วงแล้ง
	อ่างเก็บน้ำบางพระ (2)	0.9976	$y = -17.356x + 70.777$	1.319	0.03	ND	หลังฝน

* n = 12

** สกัดจากตัวอย่างน้ำ 2 -10 ลิตร

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในแหล่งน้ำธรรมชาติด้วยวิธี ELISA กับ HPLC (ต่อ)

ลำดับ ที่	สถานที่	R ² of Std.	Correlation Equation	Ave Abs. at 450 nm	Microcystin Conc. by ELISA (ppb)*	Microcystin Conc. by HPLC (ppb)**	Remarks
12.	อ่างเก็บน้ำมาบประชัน (1)	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.111	0.01	ND	ช่วงแสง
	อ่างเก็บน้ำมาบประชัน (2)	0.9976	$y = -17.356x + 70.777$	1.392	0.02	ND	หลังฝน
13.	อ่างเก็บน้ำดอกกราย (1)	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.289	0.01	ND	ช่วงแสง
	อ่างเก็บน้ำดอกกราย (2)	0.9976	$y = -17.356x + 70.777$	1.364	0.02	ND	หลังฝน
14.	อ่างเก็บน้ำหนองปลาไหล (1)	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.374	0.00	ND	ช่วงแสง
	อ่างเก็บน้ำหนองปลาไหล (2)	0.9976	$y = -17.356x + 70.777$	1.385	0.02	ND	หลังฝน
15.	อ่างเก็บน้ำมอสิงโต	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.176	0.04	ND	
16.	อ่างเก็บน้ำห้วยชัยเหล็ก	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	0.832	4.41	5.63	
17.	บึงห้วยหนองเยียน	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.255	0.09	ND	
18.	บึงบ้านส่งคุ่ม	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.132	0.29	0.24	
19.	บ่อปลา ม.เกษตร	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.072	0.49	0.38	
20.	บึงสโมสรกองทัพอากาศ	0.9958	$y = -12.308x + 68.618$	1.186	0.17	ND	

* n = 12

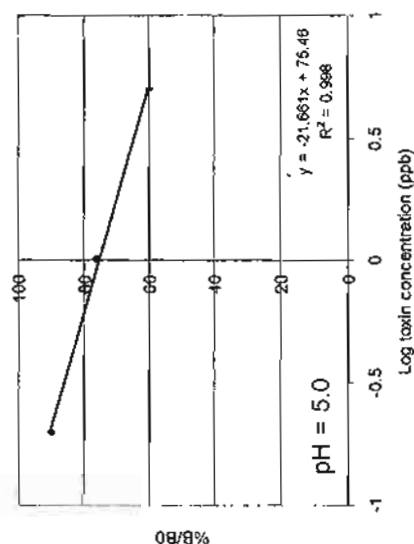
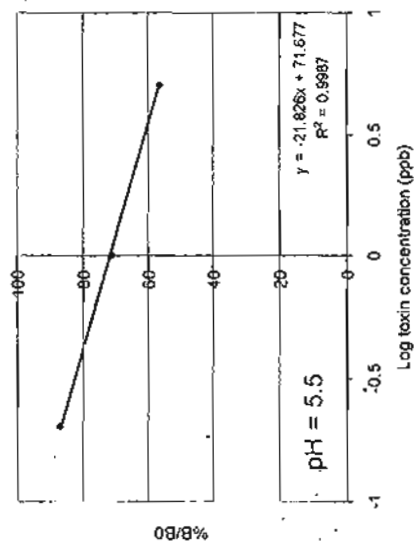
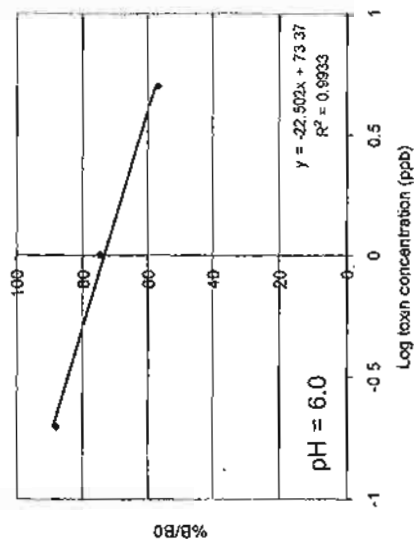
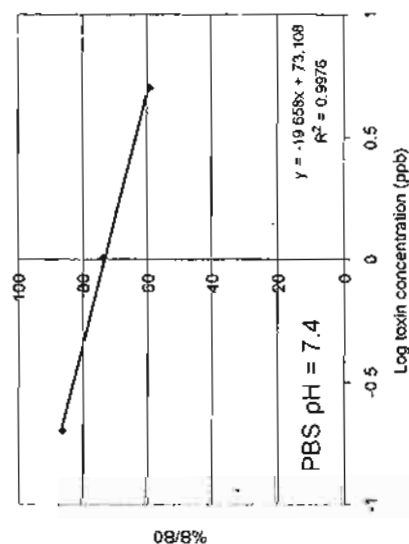
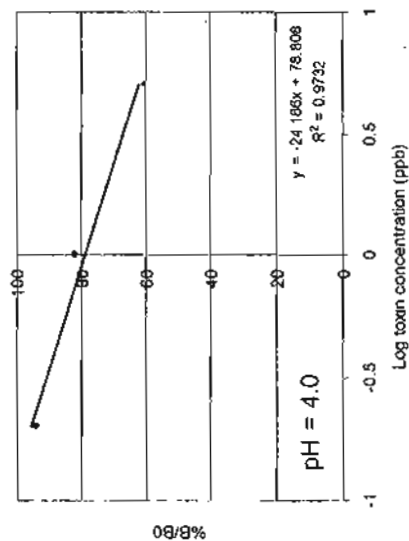
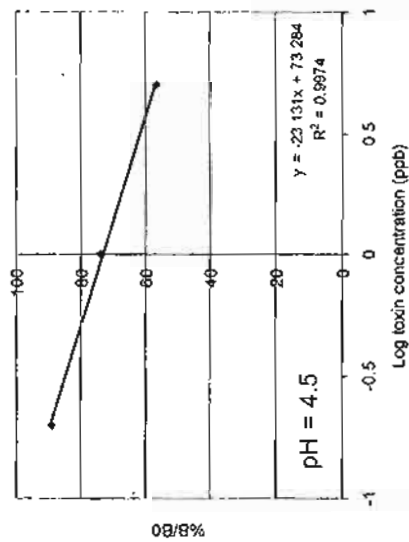
** สกัดจากตัวอย่างน้ำ 2 -10 ลิตร

2. อิทธิพลของคุณภาพน้ำต่อประสิทธิภาพการตรวจวัดของชุดตรวจสอบ ELISA kit

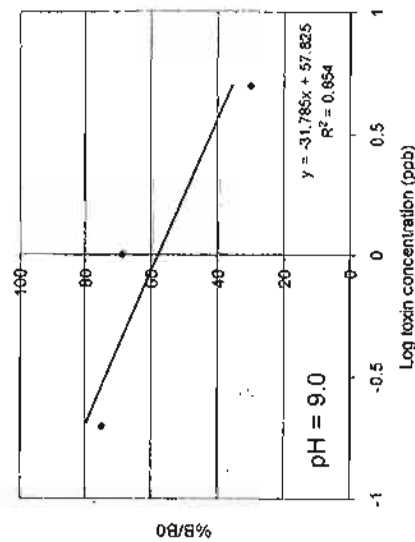
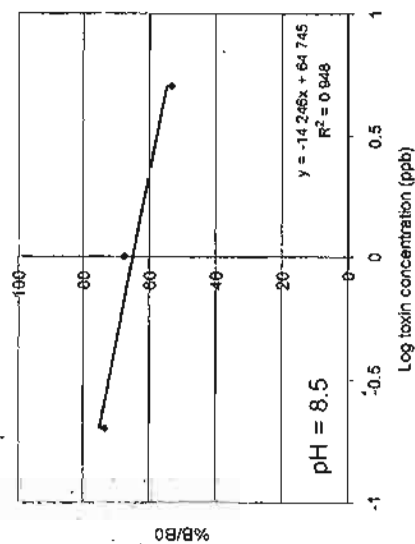
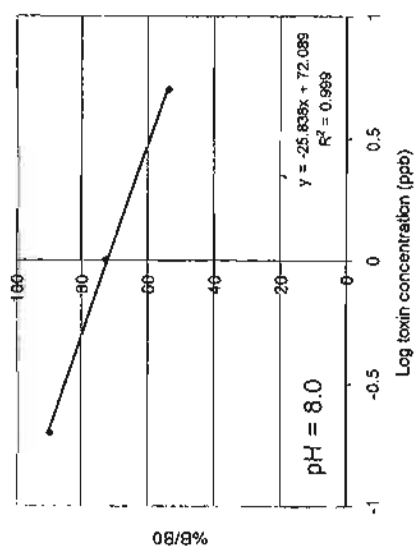
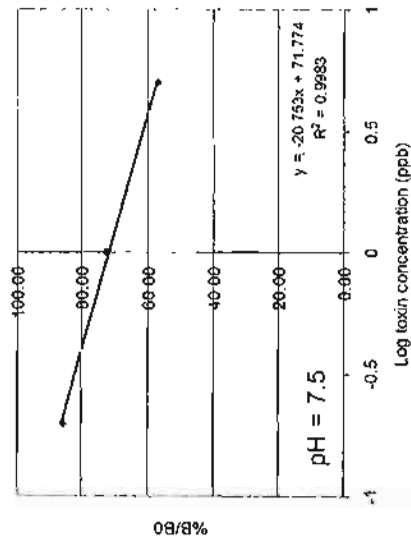
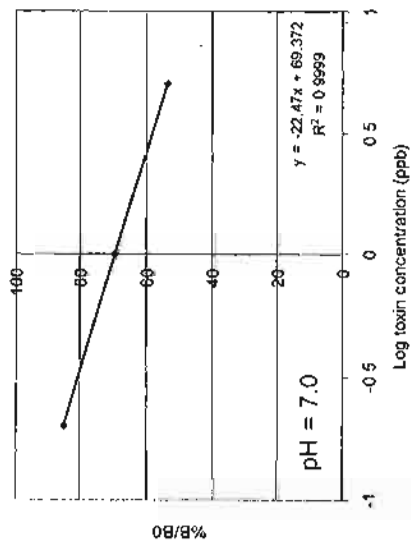
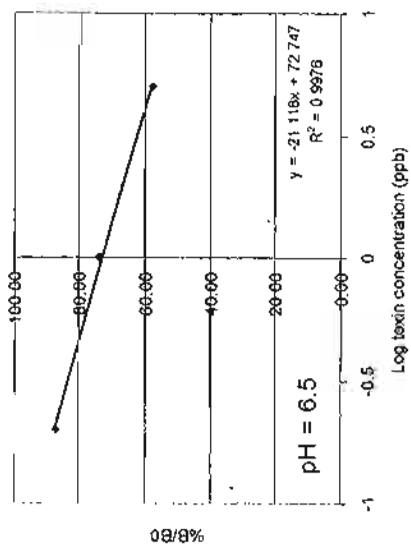
น้ำจากแหล่งธรรมชาติที่ใช้เพื่อการอุปโภคบริโภค หรือเป็นแหล่งน้ำดิบสำหรับการผลิตน้ำประปา มักจะมีคุณภาพแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เช่น ชนิดของดินและหินใกล้เคียง กิจกรรมการใช้ประโยชน์จากที่ดินของมนุษย์ (การเกษตร ที่พักอาศัย ฯลฯ) ปริมาณฝน เป็นต้น ทั้งหมดนี้จะพาเอาสารปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเกลือชนิดต่าง ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความขุ่นของสารแขวนลอยจากตะกอนดิน นอกจากนี้ไอออนของโลหะบางชนิด เช่น สนิมเหล็ก อาจจะมาจากการประปาที่เสื่อมสภาพ รวมทั้งสารคลอรีนที่ใช้ในการผลิตน้ำประปาอาจตกค้างอยู่ในตัวอย่างน้ำ และส่งผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบที่ผลิตขึ้น

2.1 ผลของ pH

ในแหล่งน้ำธรรมชาติ pH ของน้ำจะผันแปรและขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของดินและชนิดของหิน ในบริเวณใกล้เคียง เช่น แหล่งน้ำที่อยู่ในชุดดินรังสิต จะมี pH ต่ำ เนื่องจากดินมีฤทธิ์เป็นกรด ในขณะที่แหล่งน้ำที่อยู่ใกล้แหล่งหินปูนจะมี pH ก่อนข้างสูง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ปรับ pH ของน้ำที่ใช้ในการวัดปริมาณสารพิษให้มีค่า 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าช่วง pH ระหว่าง 4.0 – 8.0 ไม่พบว่ามีผลต่อการวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit แต่อย่างใด โดยจะสังเกตได้จากค่า R^2 ของทุกระดับ pH ในช่วงนี้มีค่าสูงกว่า 0.9900 (ภาพที่ 4) โดยมีค่า % recovery ของสารพิษที่คำนวณจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จากตัวอย่างที่เตรียมจาก PBS pH 7.4 มากกว่า 70 % (ยกเว้นที่ pH 4.0) (ตารางที่ 2) ในขณะที่ pH ก่อนไปทางด่างที่ 8.5 และ 9.0 จะมีผลรบกวนการตรวจวัดปริมาณสารพิษ โดยจะให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.948 และ 0.854 ตามลำดับ ซึ่งจะต่ำกว่าปกติเล็กน้อย (ภาพที่ 4) และเมื่อคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จากตัวอย่างที่เตรียมจาก PBS pH 7.4 จะได้ค่า % recovery ที่ผิดปกติเป็นอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับความเข้มข้นของสารพิษ 5 ppb อย่างไรก็ตามถ้าทำการคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ของตนเองจะได้ค่าที่ใกล้เคียงกับปริมาณสารพิษที่ใส่ลงไป (ตารางที่ 3) ซึ่งอาจสรุปได้ว่าชุดตรวจสอบนี้สามารถใช้ตรวจวัดสารพิษในตัวอย่างน้ำที่มักจะมี pH อยู่ในช่วง 5.5 – 7.5 โดยไม่มีปัญหาในการใช้งาน



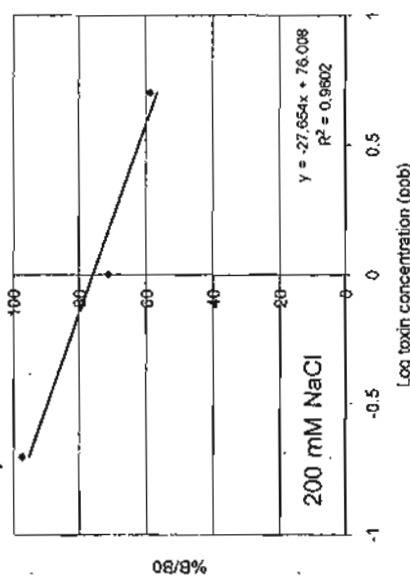
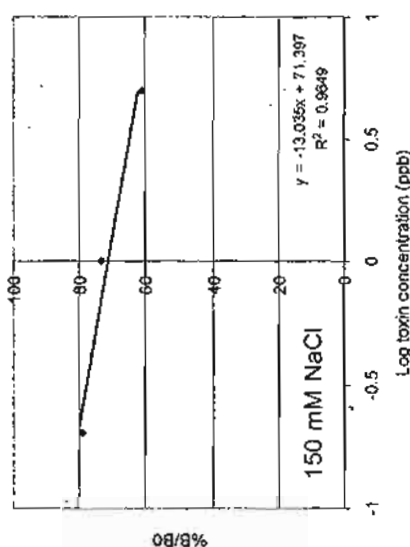
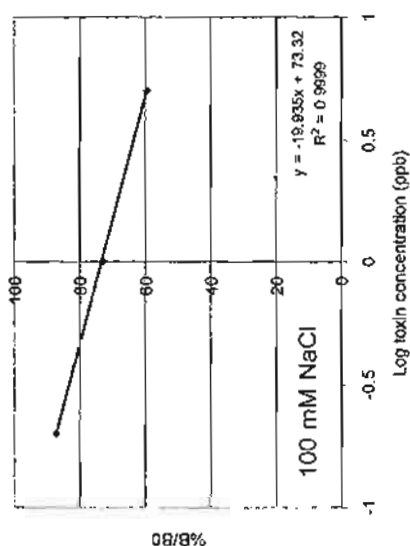
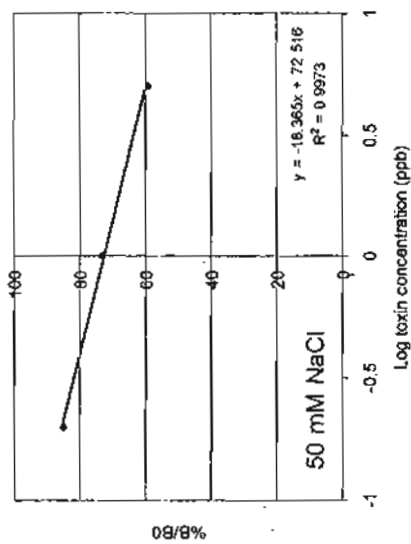
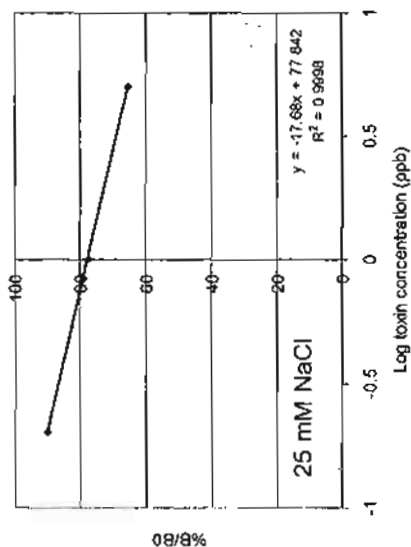
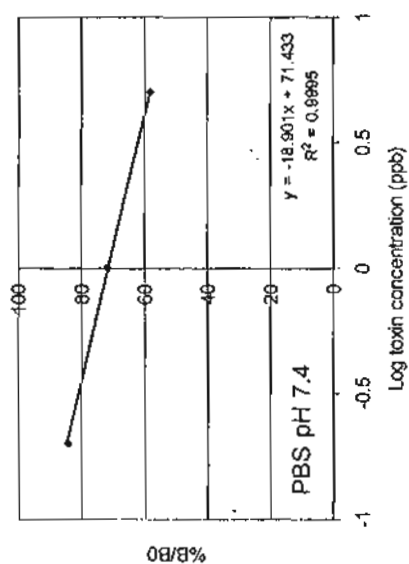
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการสหสัมพันธ์ ของผลการวิเคราะห์สารพิษไมโครทิสตินมาตรฐานจากการตรวจวัดด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดตัวอย่างน้ำที่มี pH 4.0 – 9.0



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการสหสัมพันธ์ ของผลการวิเคราะห์สารพิษไมโครซิस्टินมาตรฐานจากการตรวจวัดด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดตัวอย่างน้ำที่มี pH 4.0 – 9.0 (ต่อ)

2.2 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

NaCl เป็นเกลือที่พบปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณแถบชายทะเล และแหล่งน้ำที่ใกล้ดินเค็มในหลายจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในการทดลองนี้ได้ปรับปริมาณของ NaCl (MW 58.44) ในน้ำ ให้มีระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150 และ 200 mM จากการทดลองพบว่าปริมาณเกลือในระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 mM ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดสารพิษไมโครซิสติน โดยค่า R^2 จะมีค่าสูงอยู่ที่ 0.9995, 0.9996 และ 0.9973 ตามลำดับ (ภาพที่ 5) และในการคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จาก PBS pH 7.4 ได้ % recovery มากกว่า 70% (ตารางที่ 4) แต่เมื่อความเข้มข้นของ NaCl ในตัวอย่างน้ำสูงถึง 150 และ 200 mM ผลการตรวจวัดปริมาณสารพิษเริ่มมีค่าปกติถึงแม้ว่าค่า R^2 จะยังคงสูงกว่า 0.96 โดยที่ในตัวอย่างที่มีปริมาณสารพิษ 0.2 ppb ค่า % recovery จากการวัดด้วย ELISA kit ให้ผลผิดปกติ แต่เมื่อปริมาณสารพิษอยู่ในระดับสูง 1 และ 5 ppb การตรวจวัดสารพิษให้ค่า % recovery ปกติ อย่างไรก็ตามอิทธิพลของเกลือ NaCl ที่ระดับ 150 และ 200 mM ไม่น่าจะมีผลต่อการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดสารพิษไมโครซิสติน เนื่องจากไม่เคยมีรายงานว่าพบไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis* ที่ผลิตสารพิษนี้ในแหล่งน้ำที่มีเกลืออยู่ ดังนั้นในตัวอย่างน้ำที่มีความเค็มระดับ 150 – 200 mM จะเท่ากับความเค็มประมาณ 10 ppt คาดว่าคงไม่มีสาหร่ายพิษชนิดนี้เจริญได้ และทำการคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ของตนเองจะได้ค่า % recovery ที่สูงขึ้นและมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณสารพิษที่ใส่ลงไป (ตารางที่ 5) กล่าวโดยสรุปก็คือ ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้สามารถใช้ตรวจวัดสารพิษไมโครซิสตินอย่างมีประสิทธิภาพในแหล่งน้ำจืดทั่วไปที่มีระดับความเค็มจากเกลือ NaCl ไม่เกิน 10 ppt



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการการหาปริมาณสารพิษไมโครท็อกซินในตัวอย่างน้ำที่ปรับระดับความเข้มข้นของ NaCl 25, 50, 100, 150 และ 200 mM ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit

2.3 ผลของเกลือแมกนีเซียม

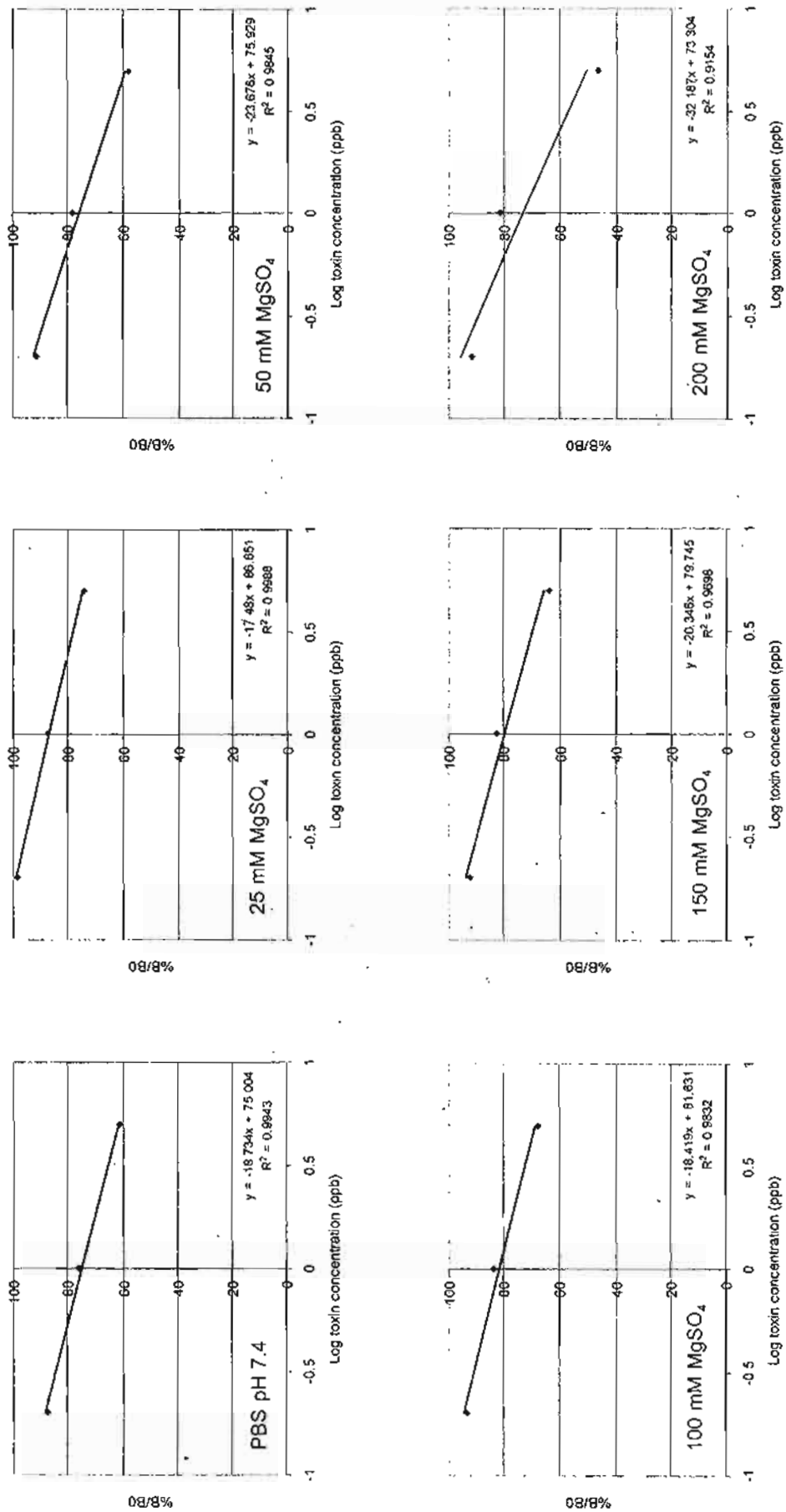
เกลือแมกนีเซียมที่พบในน้ำส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ MgSO_4 ซึ่งเป็นเกลืออีกชนิดหนึ่งที่พบปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณแถบชายทะเล และแหล่งน้ำที่ใกล้ดินเค็มในหลายจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในการทดลองนี้ได้ปรับปริมาณของ MgSO_4 (MW 102.4) ในน้ำ ให้มีระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150 และ 200 mM จากการทดลองพบว่าปริมาณเกลือ MgSO_4 ในทุกระดับความเข้มข้น มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดสารพิษไมโครซิสติน โดยจะให้ค่า % recovery จากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จาก PBS pH 7.4 ในระดับต่ำกว่าปกติ (เฉลี่ยประมาณ 50%) (ตารางที่ 6) ทั้งๆที่ค่า R^2 จะมีค่าค่อนข้างสูงอยู่ที่ 0.9968, 0.9845, 0.9632, 0.9698 และ 0.9154 ตามลำดับ (ภาพที่ 6) แต่เมื่อคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ของตนเองได้ค่า % recovery ในระดับที่น่าพอใจ (ตารางที่ 7) ดังนั้นอาจกล่าวโดยสรุปได้ว่า เกลือ MgSO_4 มีผลรบกวนต่อการตรวจวัดสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำ โดยมีแนวโน้มว่าผลการตรวจวัดจะได้ค่าต่ำกว่าที่ควรจะเป็นประมาณครึ่งหนึ่ง แต่ยังคงสามารถใช้ตรวจวัดสารพิษเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนได้

ตารางที่ 6 อิทธิพลของเกลือ $MgSO_4$ ต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit เมื่อคำนวณจากสมการสัมพัทธ์ที่ได้จาก PBS

n = 12

MgSO ₄ Concentration (mM)	Microcystin concentration (ppb)															
	0				0.2				1				5			
	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/B ₀	Conc. by ELISA	% Recovery	% Recovery
PBS*	0.971	0.035	NA	NA	NA	0.850	0.044	87.52	0.215	107.3	0.740	0.043	76.15	0.868	86.8	107.3
25	1.732	0.049	NA	NA	NA	1.579	0.053	91.18	0.166	83.1	1.173	0.028	67.74	0.635	63.5	74.2
50	1.949	0.053	NA	NA	NA	1.779	0.054	91.28	0.135	67.6	1.527	0.045	78.33	0.665	66.5	158.1
100	1.837	0.033	NA	NA	NA	1.718	0.028	93.53	0.101	50.5	1.535	0.044	83.58	0.265	26.5	24.5
150	1.260	0.079	NA	NA	NA	1.166	0.032	92.52	0.111	55.7	1.041	0.026	82.64	0.290	29.0	35.1
200	1.402	0.051	NA	NA	NA	1.288	0.026	91.85	0.119	59.4	1.138	0.063	81.20	0.334	33.4	186.0

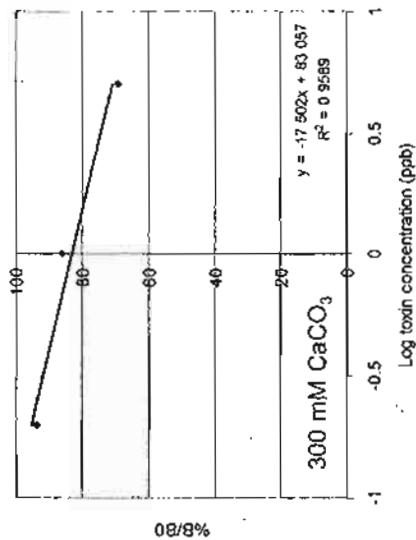
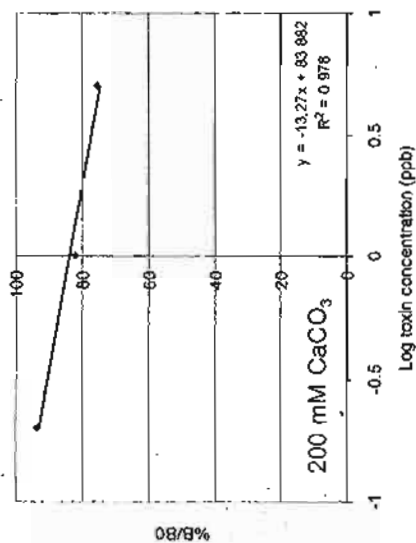
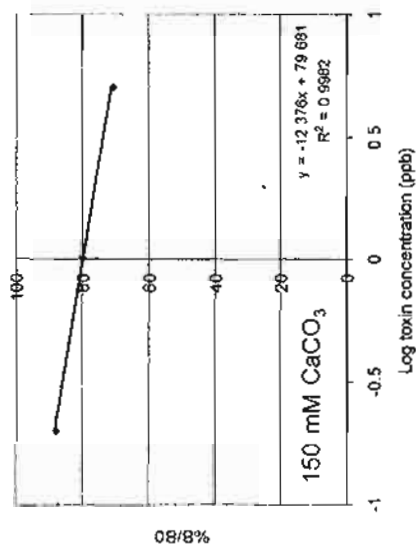
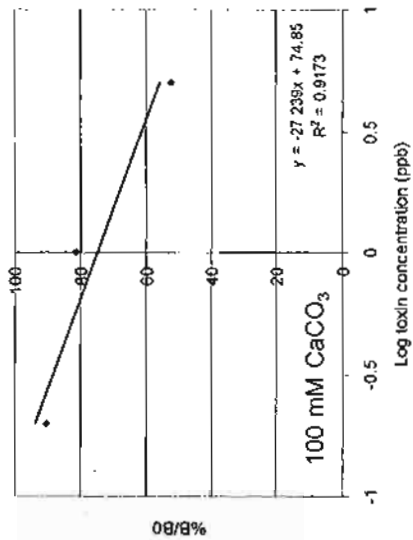
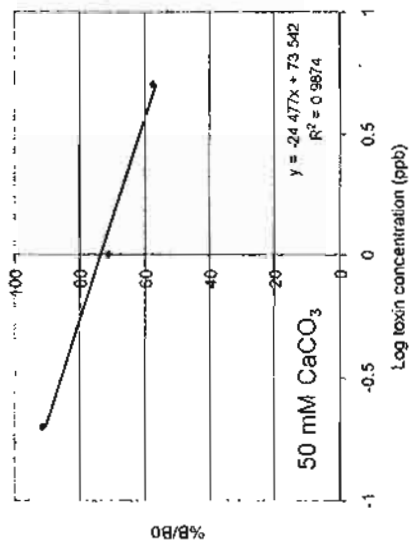
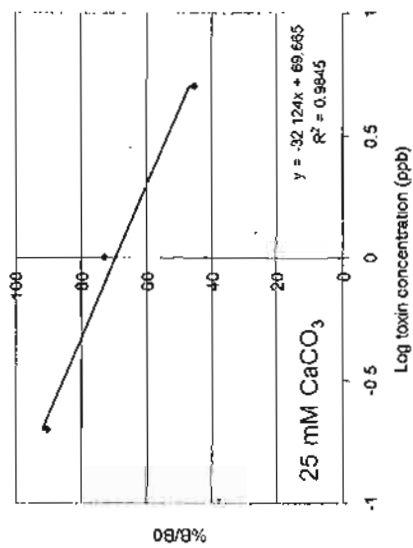
* Phosphate buffer solution pH 7.4; $R^2 = 0.9726$; $y = -23.764x + 69.87$



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการสหสัมพันธ์ ของผลการตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำที่ปรับระดับความเข้มข้นของ $MgSO_4$ 25, 50, 100, 150 และ 200 mM ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit

2.4 ผลของเกลือแคลเซียม

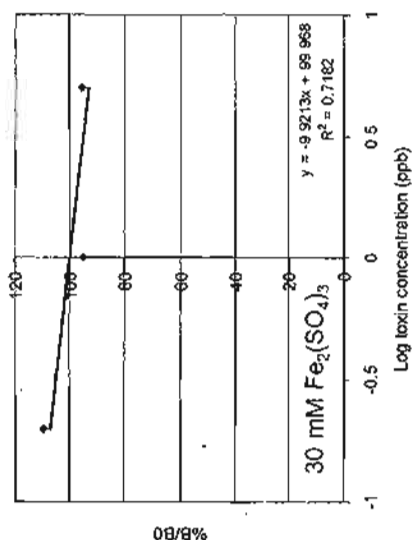
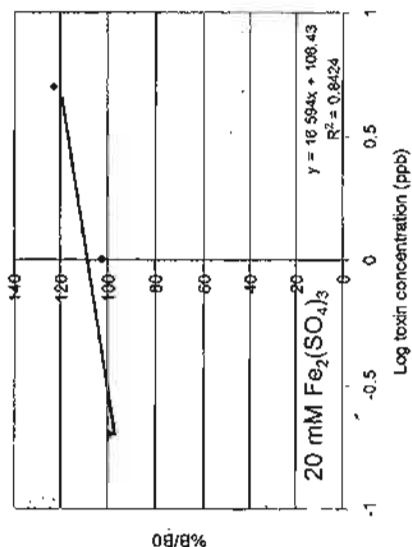
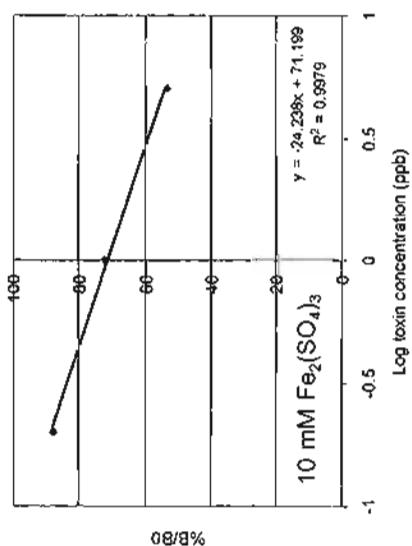
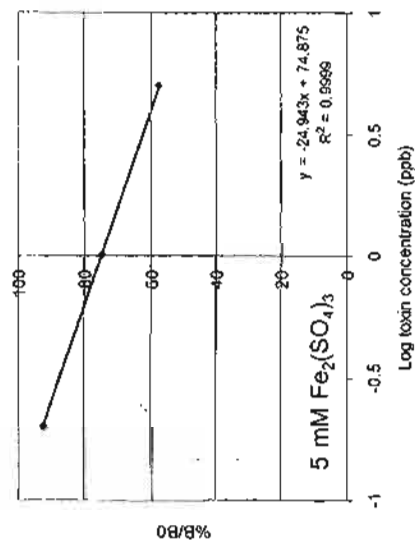
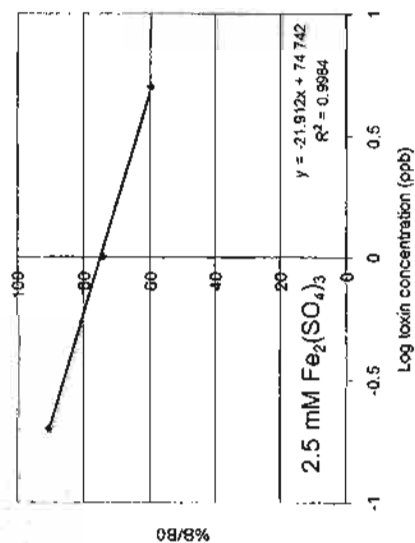
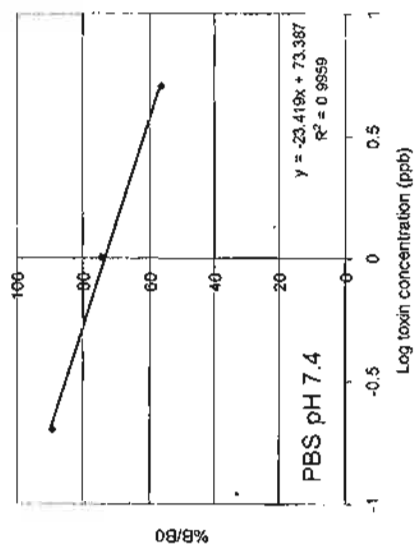
เกลือแคลเซียมในแหล่งน้ำมักจะอยู่ในรูป CaCO_3 หรือ $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ พบละลายอยู่ในแหล่งน้ำที่ใกล้เขาหินปูน ในการทดลองนี้ได้ปรับปริมาณของ CaCO_3 (MW 100.1) ในน้ำ ให้มีระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 300 mM จากการทดลองพบว่าปริมาณเกลือในระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 mM ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดสารพิษไมโครซิสติน โดยค่า R^2 จะมีค่าสูงอยู่ที่ 0.9845, 0.9874 และ 0.9173 ตามลำดับ (ภาพที่ 7) และในการคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จาก PBS pH 7.4 ได้ % recovery ประมาณ 70% หรือสูงกว่า (ตารางที่ 8) แต่เมื่อความเข้มข้นของ CaCO_3 ในตัวอย่างน้ำสูงถึง 150, 200 และ 300 mM ผลการตรวจวัดปริมาณสารพิษเริ่มมีค่าผิดปกติถึงแม้ว่าค่า R^2 จะยังคงสูงกว่า 0.95 โดยที่ในตัวอย่างที่มีปริมาณสารพิษ 0.2 ppb ค่า % recovery จากการวัดด้วย ELISA kit ให้ผลตามปกติ แต่เมื่อปริมาณสารพิษอยู่ในระดับสูง 1 ค่า % recovery จะอยู่ที่ระดับประมาณ 50 % และ ที่ระดับ 5 ppb ค่า % recovery จะอยู่ที่ระดับประมาณเพียง 25 % อย่างไรก็ตามถ้าคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ของตนเอง ค่า % recovery จะยังคงอยู่ในระดับสูงที่น่าพอใจ (ตารางที่ 9) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้สามารถใช้ตรวจวัดสารพิษไมโครซิสตินอย่างมีประสิทธิภาพในแหล่งน้ำจืดทั่วไปที่มีระดับความเค็มจากเกลือแคลเซียมไม่เกิน 100 mM และในกรณีที่พบว่ามี การรบกวนของเกลือแคลเซียม อาจจะสามารถลดปัญหาการรบกวนนี้ได้โดยการเตรียม calibrator ในสารละลายที่มีเกลือแคลเซียมในระดับที่ใกล้เคียงกับตัวอย่าง



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการสหสัมพันธ์ของผลการตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครท็อกซินในตัวอย่างน้ำที่ปรับระดับความเข้มข้นของ CaCO_3 25, 50, 100, 150, 200 และ 300 mM ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit

2.5 ผลของเหล็ก

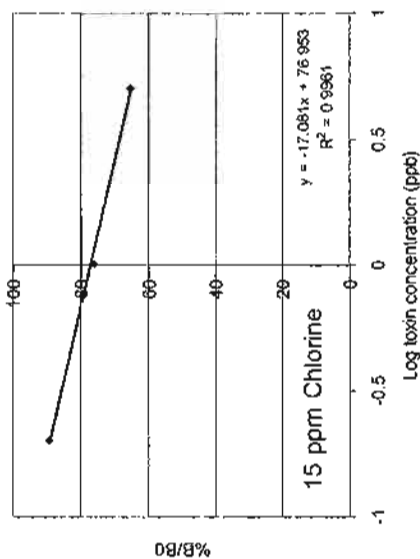
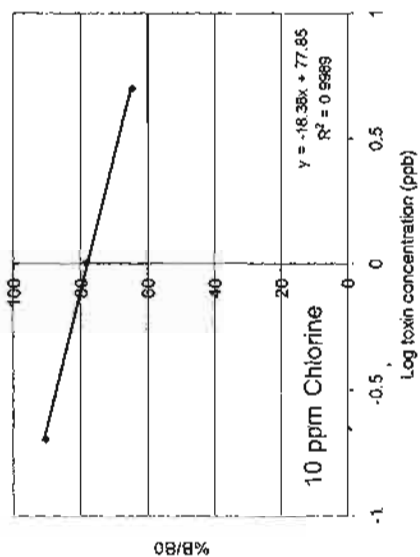
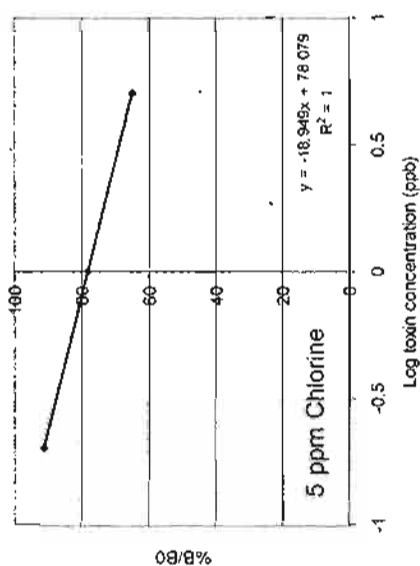
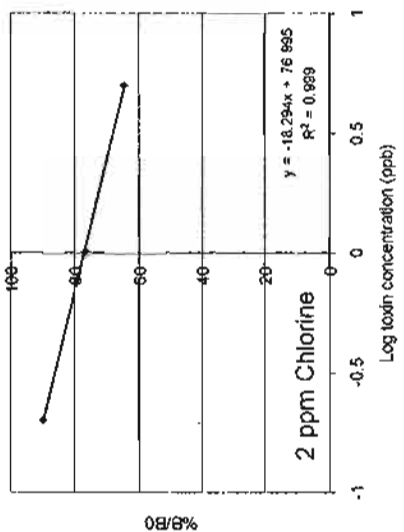
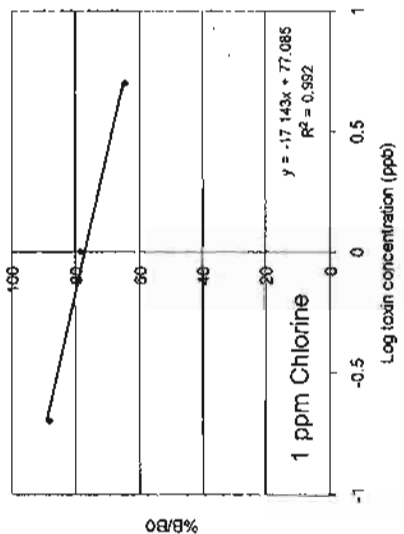
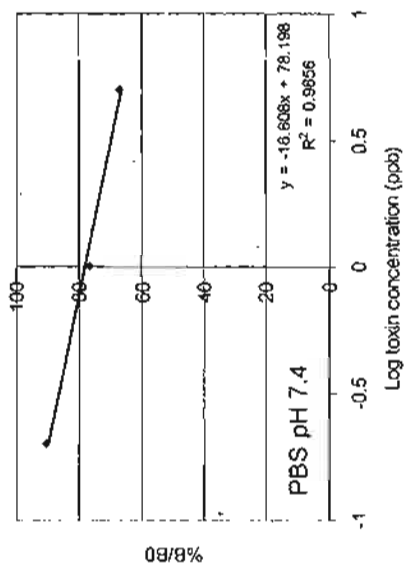
เหล็กที่ปนเปื้อนในน้ำมักจะอยู่ในรูปของเหล็กออกไซด์ (Fe_2O_3) โดยถ้าเป็นแหล่งน้ำธรรมชาติมักจะมาจากดินบริเวณใกล้เคียง ได้แก่ ดินลูกรัง หรือดินที่มีสีแดงส้ม (เช่น ชุดดินโคราช) แต่ถ้าเป็นระบบน้ำประปาจะมาจากท่อเหล็กที่ใช้ในการส่งน้ำมีสภาพเก่า และมีสนิมเหล็กละลายออกมา ในการทดลองนี้ได้ใช้เหล็กทั้งที่อยู่ในรูปรีดิวส์ (FeSO_4) และที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์ ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) ซึ่งในกรณีของ FeSO_4 ถึงแม้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยแค่ 2.5 mM ก็รบกวนการตรวจวิเคราะห์ของชุดตรวจสอบ ELISA จนไม่สามารถวัดผลได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แต่ในกรณีของ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (MW 399.9) ทำการปรับให้มีระดับความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20 และ 30 mM จากการทดลองพบว่าปริมาณ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ในระดับความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mM ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดสารพิษไมโครซิสติน โดยค่า R^2 จะมีค่าสูงอยู่ที่ 0.9984, 0.9999 และ 0.9979 ตามลำดับ (ภาพที่ 8) และในการคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จาก PBS pH 7.4 ได้ % recovery มากกว่า 75% (ตารางที่ 10) แต่เมื่อความเข้มข้นของ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ในตัวอย่างน้ำสูงถึง 20 และ 30 mM ผลการตรวจวัดปริมาณสารพิษแสดงค่าผิดปกติอย่างชัดเจน โดยที่ค่า R^2 จะค่อนข้างต่ำที่ 0.8424 และ 0.7182 ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น slope $-v'$ เส้นกราฟที่มี $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 20 mM ยังกลับทิศทาง และค่า %B/Bo มีค่าสูงมากจนบางตัวอย่างมากกว่า 100 (ซึ่งเป็นไปไม่ได้) อย่างไรก็ตามถ้าคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ของตนเอง ค่า % recovery จะยังคงอยู่ในระดับสูงที่น่าพอใจ (ตารางที่ 11) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้สามารถใช้ตรวจวัดสารพิษไมโครซิสตินอย่างมีประสิทธิภาพในแหล่งน้ำจืดทั่วไปที่มีระดับของเหล็กในรูปออกซิไดซ์ไม่เกิน 10 mM และถ้าเป็นเหล็กในรูปรีดิวส์การรบกวนจะรุนแรงมากจนไม่สามารถใช้ชุด ELISA kit นี้ได้



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการสหสัมพันธ์ ของผลการตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครทิสตินในตัวอย่างน้ำที่ปรับระดับความเข้มข้นของ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 2.5, 5, 10, 20 และ 30 mM ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit

2.6 ผลของคลอรีน

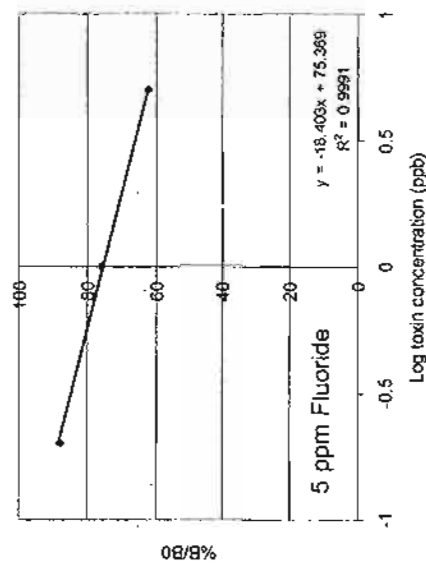
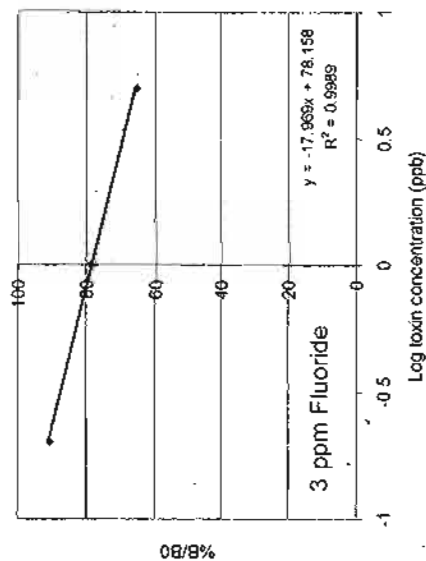
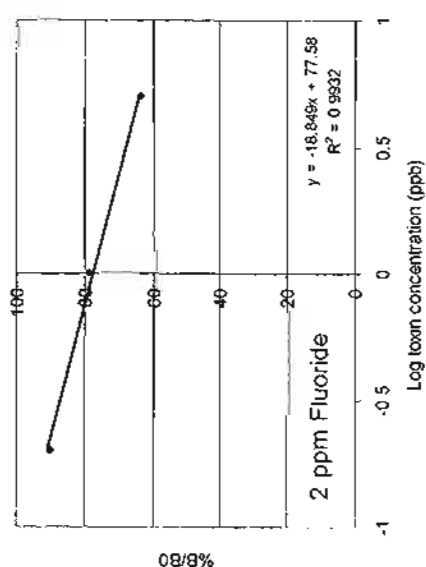
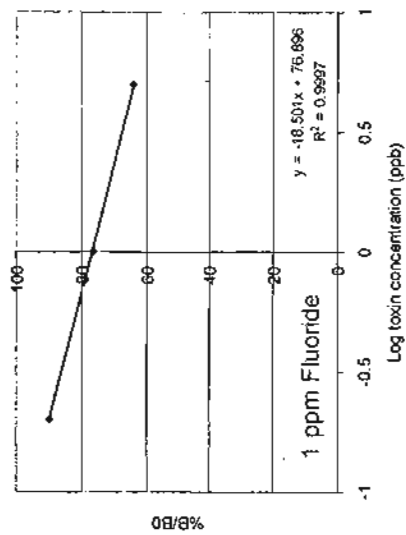
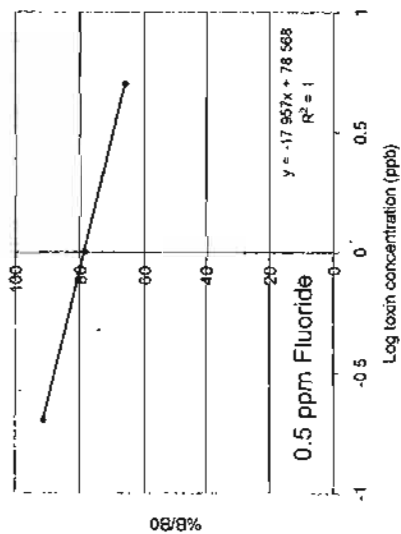
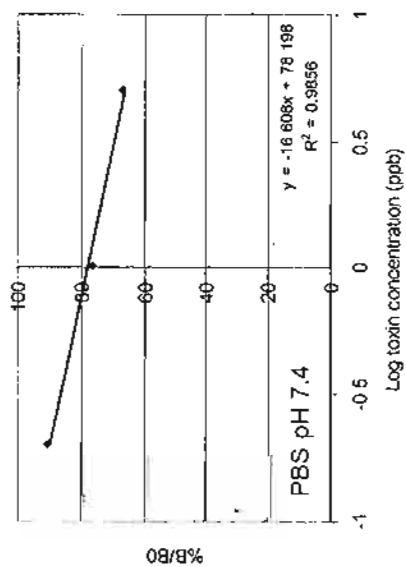
คลอรีนเป็นสารที่เติมลงไปในการบำบัดน้ำประปาเพื่อทำลายจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่ก่อโรค ในระบบการผลิตน้ำประปาจะใช้ก๊าซคลอรีนใส่ลงไปในน้ำโดยตรง แต่ในการทดลองนี้ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ซึ่งจะแตกตัวให้คลอรีนในน้ำ ปกติแล้วปริมาณคลอรีนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อในน้ำประปาจะอยู่ระหว่าง 5 – 10 ppm และเมื่อถึงผู้ใช้จะมีคลอรีนเหลืออยู่ประมาณ 0.5 – 1 ppm ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ระดับของคลอรีนที่ 1, 2, 5, 10 และ 15 ppm จากการทดลองพบว่าปริมาณคลอรีนในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดสารพิษไมโครซิสติน โดยค่า R^2 จะมีค่าสูงอยู่ที่ 0.9992, 0.9990, 1.0000, 0.9989 และ 0.9961 ตามลำดับ (ภาพที่ 9) และในการคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จาก PBS pH 7.4 ได้ % recovery มากกว่า 90% (ตารางที่ 12) และเมื่อคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ของตนเอง ค่า % recovery จะยังคงอยู่ในระดับสูงที่น่าพอใจ (ตารางที่ 13) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าในตัวอย่างน้ำที่มีปริมาณคลอรีนสูงที่ระดับ 10 และ 15 ppm ค่าการดูดกลืนแสงก่อนล้างค่า 1.149 และ 1.076 เมื่อเทียบกับตัวอย่างน้ำที่มีปริมาณคลอรีนต่ำ (0.5 – 5 ppm) จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่า 1.2 ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจาก bleaching effect ของคลอรีน อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่า ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้สามารถใช้ตรวจวัดสารพิษไมโครซิสตินอย่างมีประสิทธิภาพในตัวอย่างน้ำที่มีการเติมคลอรีนในระดับไม่เกิน 15 ppm



ภาพที่ 9 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการสหสัมพันธ์ของผลการตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำที่ปรับระดับความเข้มข้นของ คลอรีน 1, 2, 5, 10 และ 15 ppm ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit

2.6 ผลของฟลูออไรด์

ฟลูออไรด์เป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับการป้องกันฟันผุในเด็ก องค์การอนามัยโลกและ UNICEF กำหนดว่าไม่ควรมีความเข้มข้นเกินกว่า 1 ppm เพราะอาจเป็นพิษและมีผลต่อการเกิดโรค fluorosis (การเกิดจุดดำหรือรอยด่างบนฟัน) อย่างไรก็ตามมักพบฟลูออไรด์ปนเปื้อนอยู่ในน้ำดื่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคเหนือของประเทศไทย และมักตรวจพบในปริมาณที่สูงในน้ำบาดาล มากกว่าแหล่งน้ำจากพื้นผิว ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ระดับของฟลูออไรด์ที่ 0.5, 1, 2, 3 และ 5 ppm จากการทดลองพบว่าปริมาณฟลูออไรด์ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดสารพิษไมโครซิสติน โดยค่า R^2 จะมีค่าสูง อยู่ที่ 0.9920, 1.0000, 0.9932, 0.9989 และ 0.9991 ตามลำดับ (ภาพที่ 10) และในการคำนวณ ปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จาก PBS pH 7.4 ได้ % recovery สูงกว่า 90% (ตารางที่ 14) และเมื่อคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ของตนเอง ค่า % recovery จะยังคงอยู่ใน ระดับสูงที่น่าพอใจ (ตารางที่ 15) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้สามารถใช้ ตรวจวัดสารพิษไมโครซิสตินอย่างมีประสิทธิภาพในแหล่งน้ำจืดทั่วไปที่มีระดับการปนเปื้อนของฟลูออไรด์ไม่เกิน 5 ppm ในกรณีที่น้ำมีระดับฟลูออไรด์มากกว่า 5 ppm ไม่ควรนำมาใช้ในการบริโภค ยกเว้นแต่ว่าจะมีระบบดูดซับฟลูออไรด์ให้มีปริมาณลดลงจนอยู่ในระดับปลอดภัย



ภาพที่ 10 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการสหสัมพันธ์ ของผลการตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิस्टินในตัวอย่างน้ำที่ปรับระดับความเข้มข้นของ ฟลูออไรด์ 0.5, 1, 2, 3 และ 5 ppm ด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit

3. การศึกษาอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ ELISA kit

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบในการวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสติน เมื่อเก็บรักษาในถุงพลาสติกในสภาวะปกติ (normal pack) สภาพสุญญากาศ (vacuum pack) และในบรรยากาศก๊าซไนโตรเจน (nitrogen pack) หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (ในตู้ทึบแสง) และที่ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) แล้วนำชุดตรวจสอบมาทดสอบวิเคราะห์สารพิษหลังจากเก็บรักษาไว้ 1, 2, 3 และ 6 เดือน พบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพไม่ว่าจะเก็บในถุงพลาสติกสภาวะใดก็ตาม โดยจะเห็นได้ชัดเจนว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของ negative control (0 ppb microcystin) มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องตามอายุการเก็บ จากค่าเริ่มต้นที่ 1.239 ที่ 0 เดือน ลดลงเป็น 0.270, 0.216, 0.114 และ 0.101 เมื่อเวลาผ่านไป 1, 2, 3 และ 6 เดือน ตามลำดับ (ตารางที่ 16) นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาจากลักษณะเส้นกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์ (R^2) และสมการสหสัมพันธ์พบว่า มีลักษณะผิดปกติ โดยค่า R^2 ของผลการวิเคราะห์ที่ใช้ชุดตรวจสอบที่เก็บรักษาในถุงพลาสติกในสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้อง ลดลงจาก 0.9993 ที่ 0 เดือน ไปเป็น 0.8019, 0.7525, 0.8681 และ 0.1662 ในเดือนที่ 1, 2, 3 และ 6 ตามลำดับ (ภาพที่ 11) สำหรับการเก็บรักษาในสภาพสุญญากาศลดลงเป็น 0.9331, 0.7791, 0.5761 และ 0.2894 ในเดือนที่ 1, 2, 3 และ 6 ตามลำดับ (ภาพที่ 12) และในบรรยากาศก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้องก็มีผลในทำนองเดียวกัน โดยลดลงเป็น 0.9271, 0.7791, 0.5761 และ 0.2894 ในเดือนที่ 1, 2, 3 และ 6 ตามลำดับ (ภาพที่ 13) ซึ่งลักษณะเช่นนี้ทำให้ไม่สามารถคำนวณปริมาณสารพิษและ % recovery ได้ (ตารางที่ 17 และ ตารางที่ 18)

ในกรณีของการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่ออายุการเก็บรักษานานขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรของ negative control (0 ppb microcystin) ก็มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องตามอายุการเก็บเช่นกัน แต่ลดลงในอัตราที่น้อยกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องอย่างเห็นได้ชัด โดยจากค่าเริ่มต้นที่ 1.239 ที่ 0 เดือน ลดลงเป็น 0.593, 0.478, 0.298 และ 0.224 เมื่อเวลาผ่านไป 1, 2, 3 และ 6 เดือนตามลำดับ (ตารางที่ 19) แต่ที่สำคัญคือลักษณะเส้นกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์ (R^2) และสมการสหสัมพันธ์พบว่า มีลักษณะปกติ โดยที่ค่า R^2 ของผลการวิเคราะห์ที่ใช้ชุดตรวจสอบที่เก็บรักษาในถุงพลาสติกในสภาวะปกติที่ 4 องศาเซลเซียส มีค่าค่อนข้างคงที่ในระดับสูงจาก 0.9993 ที่ 0 เดือน เป็น 0.9993, 0.9905, 0.9111 และ 0.9995 ในเดือนที่ 1, 2, 3 และ 6 ตามลำดับ (ภาพที่ 14) ซึ่งแสดงว่าปฏิกิริยาในชุดตรวจสอบมีอัตราลดลงอย่างเป็นสัดส่วนกับระยะเวลาที่นานขึ้น นั่นหมายความว่าถึงแม้ปฏิกิริยาจะลดลงที่อายุการเก็บ 6 เดือน โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรเพียง 0.224 ก็ยังสามารถใช้ชุด ELISA kit นี้ในการตรวจสอบปริมาณสารพิษได้ เพียงแต่ค่าความเข้มของสีที่ได้ค่อนข้างต่ำและจำเป็นต้องใช้เครื่องอ่านผล ELISA reader ในการวิเคราะห์ จากการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์ (R^2) และสมการสหสัมพันธ์ที่มีลักษณะที่ดี ทำให้สามารถคำนวณปริมาณสารพิษจากสมการสหสัมพันธ์ที่ได้จากชุดตรวจสอบที่ 0 เดือน ($y = -24.549x + 66.651$) ได้ในระดับที่มีค่า % recovery เกือบทั้งหมดอยู่ในระดับมากกว่า 60% (ตารางที่ 19) แต่ถ้าใช้สมการสหสัมพันธ์ของตนเองจากชุดตรวจสอบในแต่ละเดือนจะได้ค่า % recovery ที่อยู่ในระดับใกล้เคียง 100% (ตารางที่

20) ซึ่งแสดงว่าการเก็บรักษาชุดตรวจสอบในถุงพลาสติกในสภาวะปกติที่ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บอย่างน้อย 6 เดือน และสามารถใช้ในการประเมินปริมาณสารพิษในน้ำได้ ซึ่งถ้าต้องการผลที่น่าเชื่อถือขึ้น ควรจะวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อยืนยันทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ

สำหรับการเก็บรักษาชุดตรวจสอบที่ 4 องศาเซลเซียส ด้วยถุงพลาสติกในสภาวะสุญญากาศ และในบรรยากาศก๊าซไนโตรเจนก็ให้ค่าการดูดกลืนแสงของ negative control ลดลงเช่นกันแต่อยู่ในสัดส่วนที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับการเก็บในบรรยากาศปกติ โดยการเก็บในสภาวะสุญญากาศมีค่าเป็น 0.628, 0.508, 0.336 และ 0.228 เมื่อเก็บนาน 1, 2, 3 และ 6 เดือน ตามลำดับ (ตารางที่ 21) ส่วนการเก็บในบรรยากาศก๊าซไนโตรเจนมีค่าเป็น 0.573, 0.371, 0.264 และ 0.238 ตามลำดับ (ตารางที่ 22) และเช่นเดียวกันค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของทั้งสองสภาวะการเก็บก็สูงมากใกล้กับ 1 (ภาพที่ 15 และภาพที่ 16) ซึ่งแสดงว่าการเก็บทั้งสองแบบสามารถนำมาใช้ในการประเมินปริมาณสารพิษในตัวอย่างน้ำได้อย่างค่อนข้างแม่นยำ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าค่า % recovery จากการคำนวณโดยใช้สมการสหสัมพันธ์ของชุดที่เก็บไว้ 0 เดือน พบว่าชุดตรวจสอบที่เก็บในสภาวะสุญญากาศมีค่าค่อนข้างต่ำ แต่ในชุดที่เก็บในบรรยากาศก๊าซไนโตรเจนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 60 % หรือสูงกว่า อย่างไรก็ตามถ้าทำการคำนวณปริมาณสารพิษโดยใช้สมการสหสัมพันธ์ของตนเองจะได้ค่า % recovery ใกล้เคียง 100% เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 21 และตารางที่ 24)

โดยสรุปจากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อตรวจหาสารพิษไมโครซิสติน ได้แก่การเก็บในถุงพลาสติกปิดสนิท ภายใต้บรรยากาศก๊าซไนโตรเจน และต้องเก็บในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 16 ผลของอายุการเก็บในถุงพลาสติกบรรจุแบบรวมดา (normal pack) เก็บที่สภาพอุณหภูมิห้อง (room temperature) ต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit

อายุการเก็บ (เดือน)	Microcystin concentration (ppb)														
	0					0.2					1				
	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/Bo	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/Bo	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/Bo	Conc. by ELISA	% Recovery
0	1.239	0.053	NA	NA	NA	1.042	0.074	84.07	0.195	97.6	0.819	0.063	66.13	1.060	105.0
1	0.270	0.043	NA	NA	NA	0.242	0.042	89.67	NC	NC	0.253	0.036	93.63	NC	NC
2	0.216	0.051	NA	NA	NA	0.192	0.045	89.00	NC	NC	0.222	0.035	102.8	NC	NC
3	0.114	0.018	NA	NA	NA	0.109	0.018	95.43	NC	NC	0.102	0.014	89.53	NC	NC
6	0.101	0.012	NA	NA	NA	0.105	0.007	104.3	NC	NC	0.099	0.007	98.2	NC	NC

NA = Not applicable

NC = Not calculated

ตารางที่ 17 ผลของอายุการเก็บในถุงพลาสติกกับบรรจุในสภาพสุญญากาศ (vacuum pack) เก็บที่สภาพอุณหภูมิห้อง (room temperature) ต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit

อายุการเก็บ (เดือน)	Microcystin concentration (ppb)														
	0					0.2					1				
	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/Bo	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/Bo	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/Bo	Conc. by ELISA	% Recovery
0	1.239	0.053	NA	NA	NA	1.042	0.074	84.07	0.195	97.6	0.819	0.063	66.13	1.050	105.0
1	0.174	0.053	NA	NA	NA	0.154	0.024	88.07	NC	NC	0.156	0.035	89.56	NC	NC
2	0.195	0.040	NA	NA	NA	0.185	0.039	95.0	NC	NC	0.187	0.031	95.8	NC	NC
3	0.089	0.023	NA	NA	NA	0.076	0.007	85.84	NC	NC	0.085	0.011	95.62	NC	NC
6	0.094	0.008	NA	NA	NA	0.096	0.006	102.4	NC	NC	0.102	0.006	108.8	NC	NC

NA = Not applicable

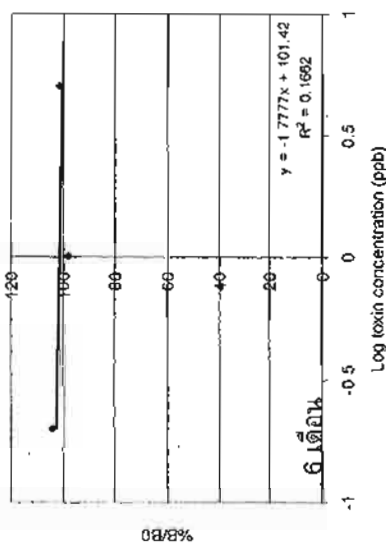
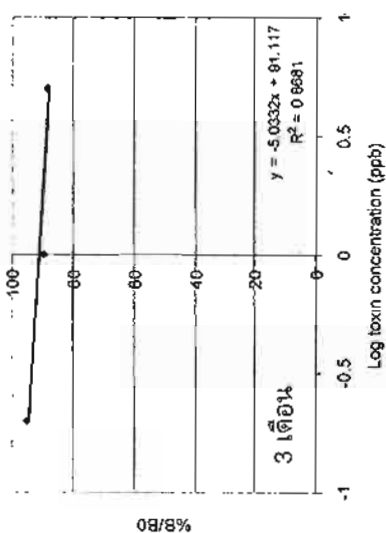
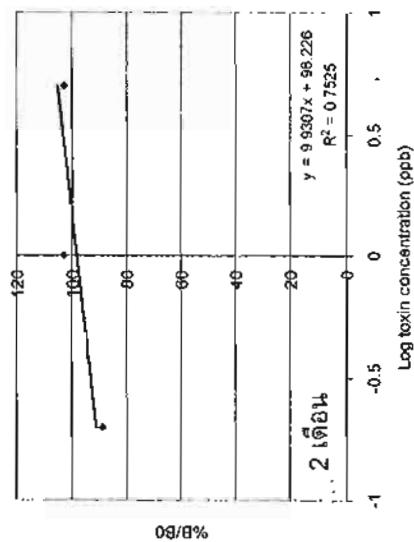
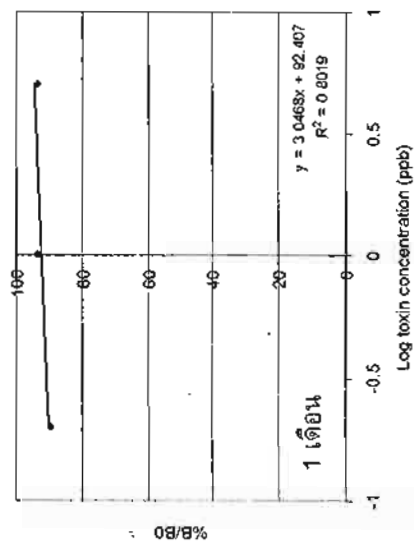
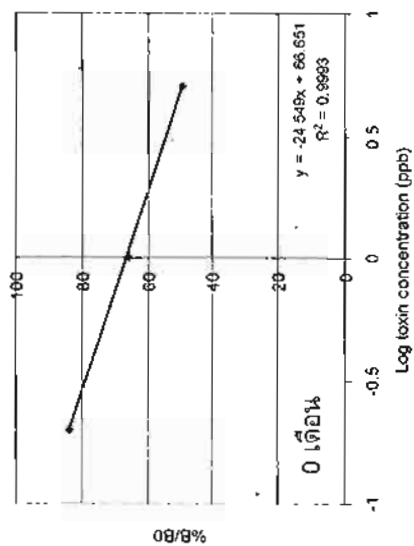
NC = Not calculated

ตารางที่ 18 ผลของอายุการเก็บในถุงพลาสติกบรรจุไนโตรเจน (nitrogen pack) เก็บที่สภาพอุณหภูมิห้อง (room temperature) ต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit

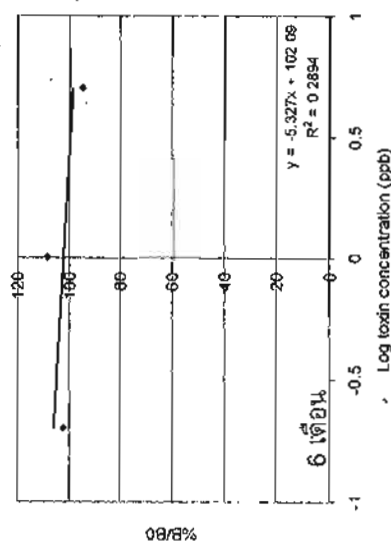
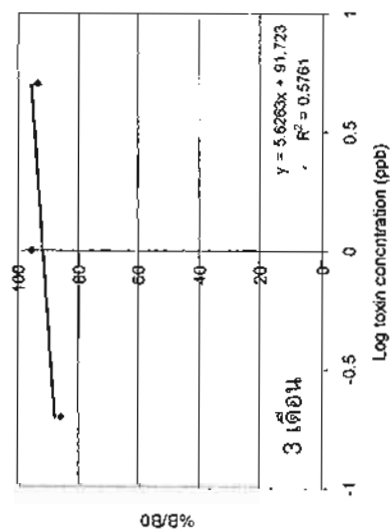
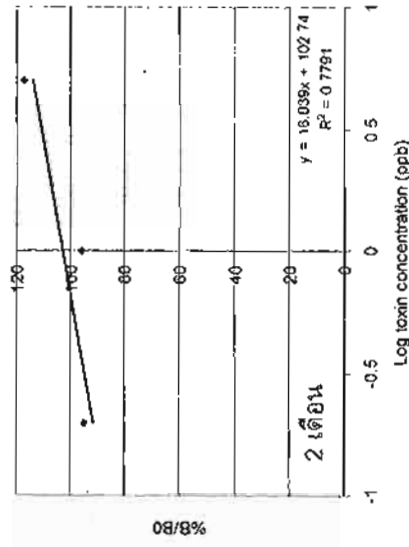
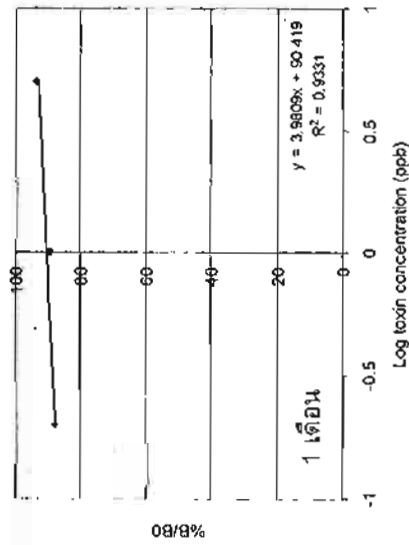
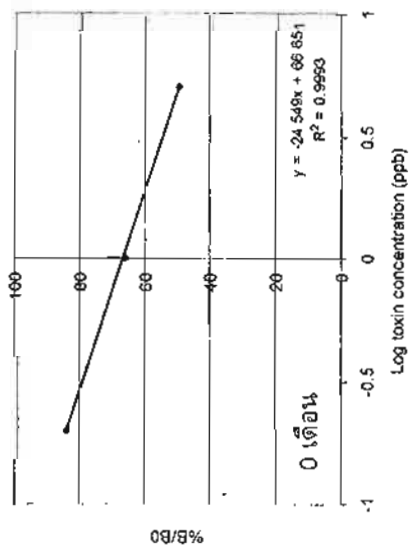
อายุการเก็บ (เดือน)	Microcystin concentration (ppb)																			
	0					0.2					1					5				
	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/Bo	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/Bo	Conc. by ELISA	% Recovery	Ave Abs. 450 nm	SD	% B/Bo	Conc. by ELISA	% Recovery	Average	SD	% B/Bo	Conc. by ELISA	% Recovery
0	1.239	0.053	NA	NA	NA	1.042	0.074	84.07	0.195	97.6	0.819	0.063	66.13	1.050	105.0	0.616	0.035	49.75	4.881	97.6
1	0.211	0.038	NA	NA	NA	0.258	0.040	122.5	NC	NC	0.279	0.059	132.4	NC	NC	0.286	0.100	135.8	NC	NC
2	0.211	0.038	NA	NA	NA	0.199	0.031	94.4	NC	NC	0.241	0.058	114.4	NC	NC	0.211	0.051	100.0	NC	NC
3	0.099	0.021	NA	NA	NA	0.096	0.011	97.57	NC	NC	0.093	0.012	94.13	NC	NC	0.092	0.014	93.52	NC	NC
6	0.107	0.012	NA	NA	NA	0.110	0.012	102.5	NC	NC	0.107	0.009	99.4	NC	NC	0.107	0.012	99.9	NC	NC

NA = Not applicable

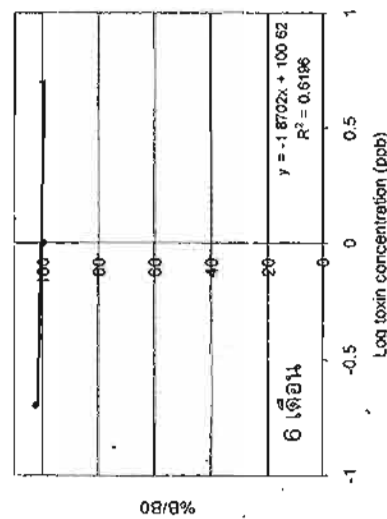
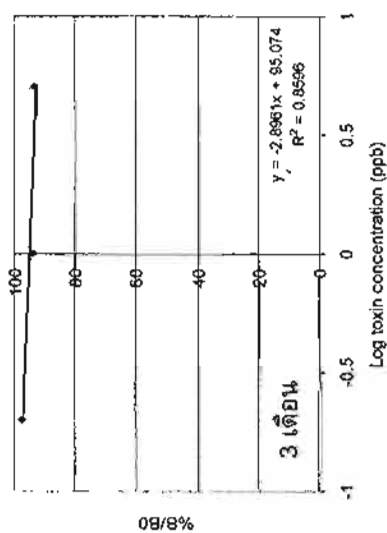
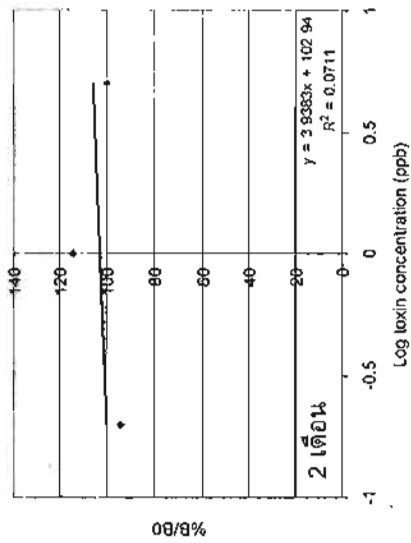
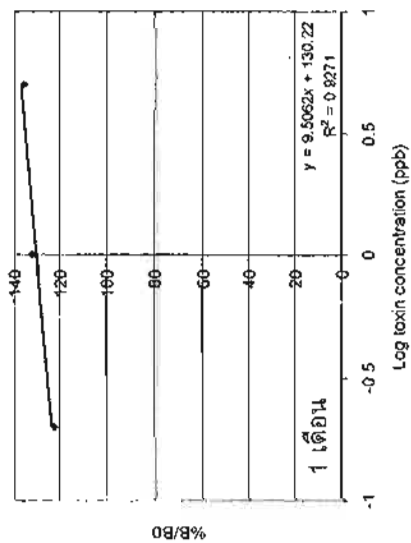
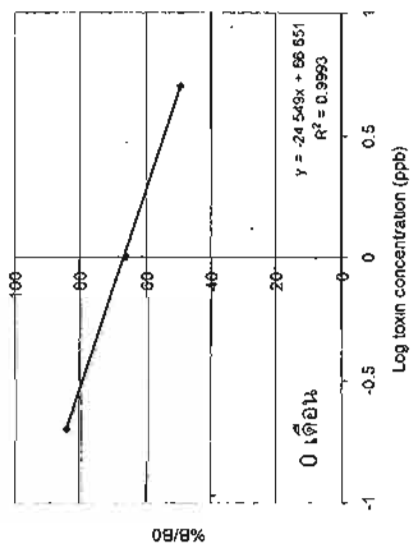
NC = Not calculated



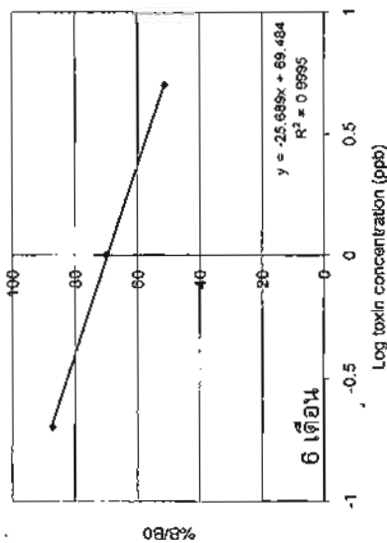
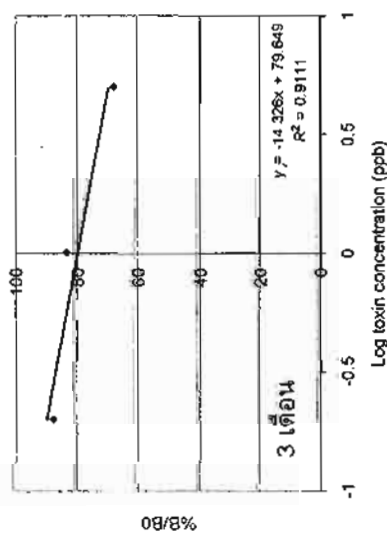
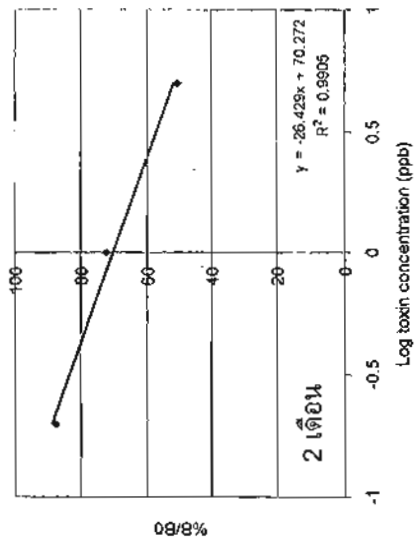
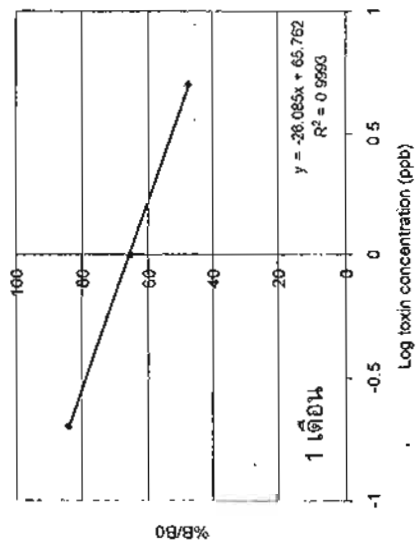
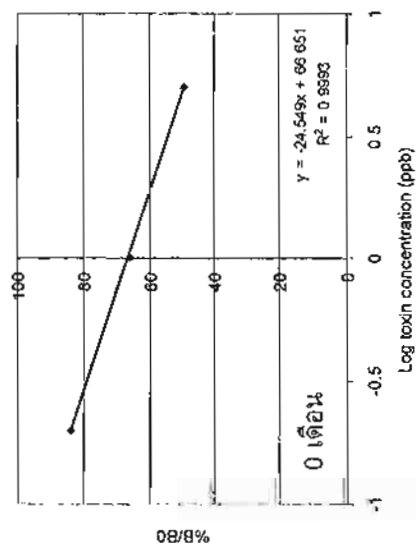
ภาพที่ 11 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และ
สมการสหสัมพันธ์ ของผลการวิเคราะห์
สารพิษไมโครบิโอสตินมาตรฐานจากการ
ตรวจวัดด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่
บรรจุในถุงพลาสติกแบบธรรมดา
(normal pack) แล้วเก็บรักษาที่
อุณหภูมิห้อง



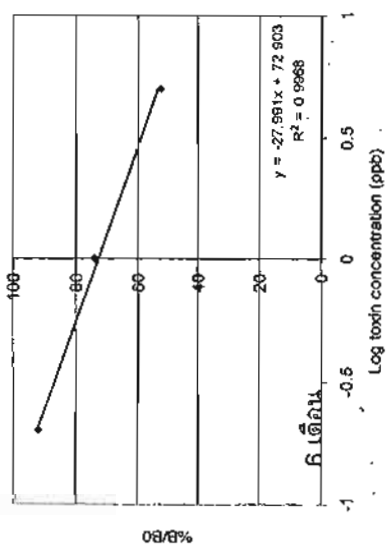
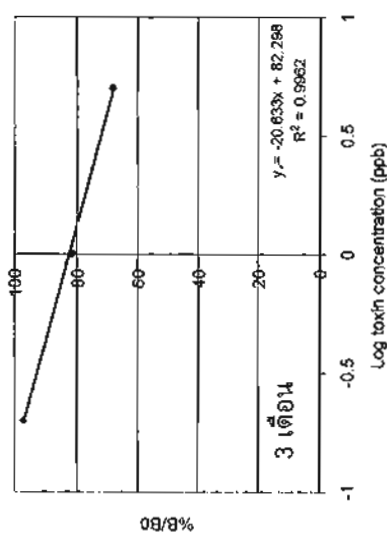
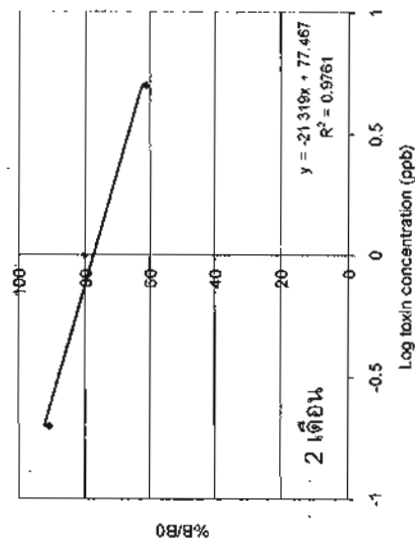
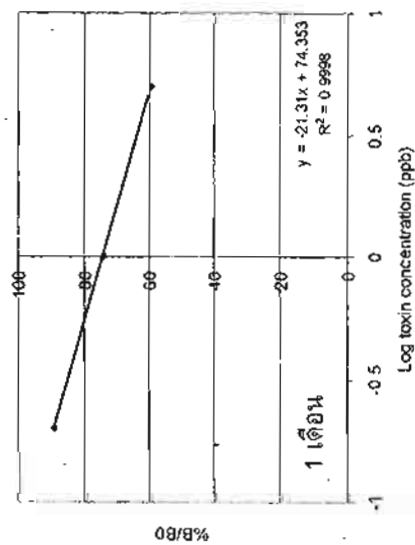
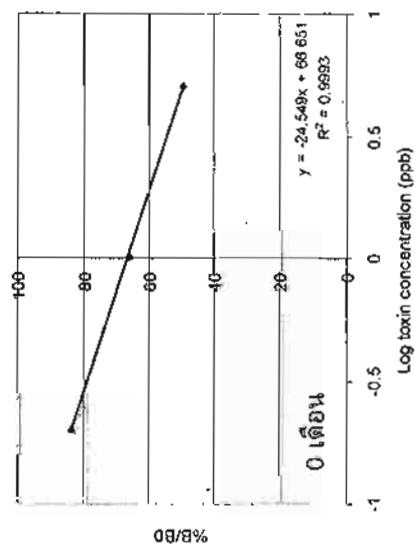
ภาพที่ 12 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการสหสัมพันธ์ ของผลการวิเคราะห์สารพิษไมโครซีสทีนมาตรฐานจากการตรวจวัดด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่บรรจุในถุงพลาสติกแบบสุญญากาศ (vacuum pack) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง



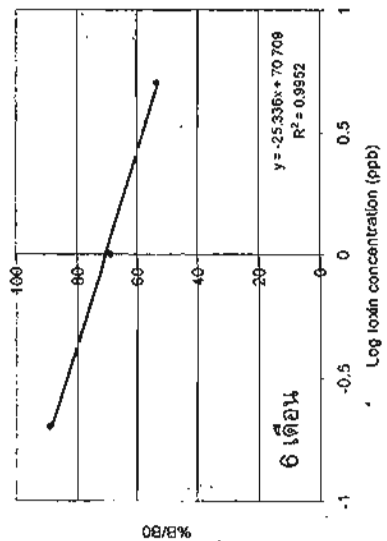
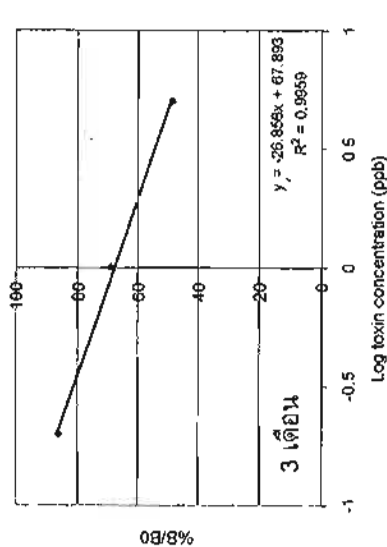
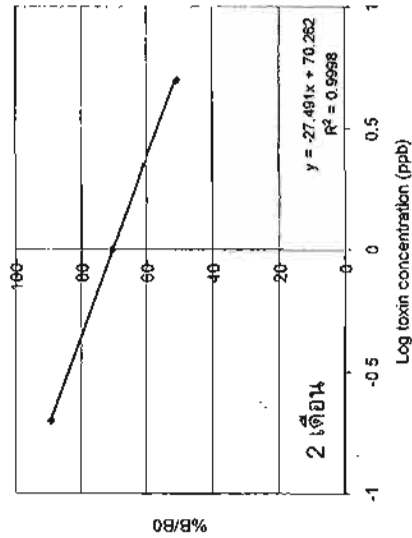
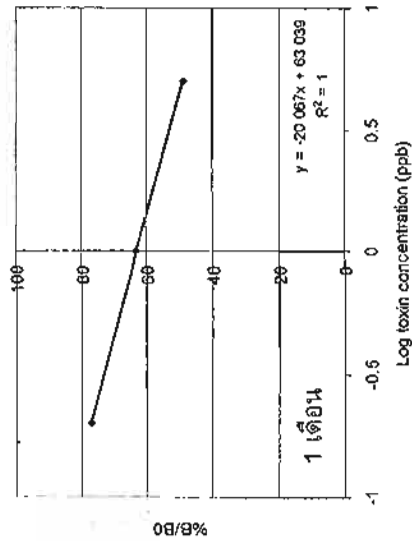
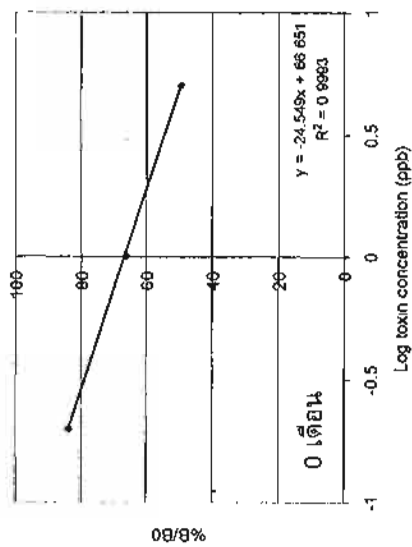
ภาพที่ 13 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการสหสัมพันธ์ ของผลการวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินมาตรฐานจากการตรวจวัดด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่บรรจุในถุงพลาสติกไนโตรเจน (nitrogen pack) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 14 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการสหสัมพันธ์ ของผลการวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินมาตรฐานจากการตรวจวัดด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่บรรจุในถุงพลาสติกแบบธรรมดา (normal pack) แล้วเก็บรักษาที่ 4°C



ภาพที่ 15 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการสหสัมพันธ์ ของผลการวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินมาตรฐานจากการตรวจวัดด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่บรรจุในถุงพลาสติกแบบสุญญากาศ (vacuum pack) แล้วเก็บรักษาที่ 4°C



ภาพที่ 16 แสดงลักษณะกราฟ ค่าสัมประสิทธิ์และสมการสหสัมพันธ์ ของผลการวิเคราะห์สารพิษไมโครทิสตินมาตรฐานจากการตรวจวัดด้วยชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่บรรจุในถุงพลาสติกในบรรจุภัณฑ์ก๊าซไนโตรเจน (nitrogen pack) แล้วเก็บรักษาที่ 4°C

4. การประเมินคุณภาพชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจวัดสารพิษในระบบผลิตน้ำประปา เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วย LC/MS

การตรวจวัดปริมาณสารพิษในระบบผลิตน้ำประปาได้ดำเนินการที่ โรงกรองน้ำบางเขน การประปาส่วนหลวง และโรงกรองน้ำบางพระ สำนักงานประปาเขต 1 การประปาส่วนภูมิภาค โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำในกระบวนการผลิต 4 จุด ๆ ละ 3 ข้ำ ได้แก่

1. น้ำดิบ
2. โรงสูบน้ำดิบ
3. ถังตกตะกอน
4. น้ำประปา

จากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำของโรงกรองน้ำบางเขนด้วยวิธี ELISA kit พบว่าตัวอย่างน้ำดิบและจากโรงสูบน้ำดิบมีปริมาณสารพิษไมโครซิสตินเล็กน้อย ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ที่องค์การอนามัยโลกกำหนดไว้ที่ 1 ppb อย่างไรก็ตามค่าที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่า detection limit เนื่องจากเป็นผลของการคำนวณจึงไม่น่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตามได้นำตัวอย่างน้ำดิบ (3) ซึ่งตรวจพบไมโครซิสติน 0.19 ppb ไปวิเคราะห์ด้วย LC/MS ซึ่งก็ไม่พบสารพิษแต่อย่างใด

สำหรับตัวอย่างน้ำจากโรงกรองน้ำบางพระเมื่อตรวจวัดด้วย ELISA kit พบสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำดิบ และจากโรงสูบน้ำดิบในระดับ 0.21 – 0.68 ppb จึงนำตัวอย่างเหล่านั้นไปตรวจวิเคราะห์ยืนยันด้วย LC/MS ก็สามารถวิเคราะห์ผลออกมาได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับ ELISA kit ยกเว้น 2 ตัวอย่างจาก ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ที่ให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่าชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่ผลิตขึ้นมาสามารถนำไปใช้จริงในระบบผลิตน้ำประปา

ตารางที่ 25 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินด้วยวิธี ELISA กับ LC/MS ในตัวอย่างน้ำจากระบบผลิตน้ำประปาของโรงกรองน้ำบางเขน การประปานครหลวง

n = 12

ลำดับ ที่	จุดเก็บตัวอย่าง	Microcystin Conc. (ppb)		Remarks
		ELISA*	LC/MS**	
1.	น้ำดิบ (1)	0.05	NA	ค่าต่ำกว่า Detection limit
2.	น้ำดิบ (2)	0.08	NA	ค่าต่ำกว่า Detection limit
3.	น้ำดิบ (3)	0.19	ND	
4.	โรงสูบน้ำดิบ (1)	ND	NA	
5.	โรงสูบน้ำดิบ (2)	0.04	NA	ค่าต่ำกว่า Detection limit
6.	โรงสูบน้ำดิบ (3)	0.06	NA	ค่าต่ำกว่า Detection limit
7.	ถังตกตะกอน (1)	ND	NA	
8.	ถังตกตะกอน (2)	ND	NA	
9.	ถังตกตะกอน (3)	ND	NA	
10.	น้ำประปา (1)	ND	NA	
11.	น้ำประปา (2)	ND	NA	
12.	น้ำประปา (3)	ND	NA	

* ใช้ตัวอย่างน้ำโดยตรง ** ตรวจวิเคราะห์เฉพาะตัวอย่างที่ให้ผลบวกจาก ELISA kit

ND = Not detected, NA = Not applicable

ตารางที่ 26 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษไมโครซิสตินด้วยวิธี ELISA กับ LC/MS ในตัวอย่างน้ำจากระบบการผลิตน้ำประปาของโรงกรองน้ำบางพระ การประปาส่วนภูมิภาค

n = 12

ลำดับ ที่	จุดเก็บตัวอย่าง	Microcystin Conc. (ppb)		Remarks
		ELISA*	LC/MS**	
1.	น้ำดิบ (1)	0.38	0.49	
2.	น้ำดิบ (2)	0.49	0.57	
3.	น้ำดิบ (3)	0.68	0.47	
4.	โรงสูบน้ำดิบ (1)	0.24	0.08	
5.	โรงสูบน้ำดิบ (2)	0.32	ND	
6.	โรงสูบน้ำดิบ (3)	0.21	0.11	
7.	ถังตกตะกอน (1)	0.05	NA	ค่าต่ำกว่า Detection limit
8.	ถังตกตะกอน (2)	0.07	NA	ค่าต่ำกว่า Detection limit
9.	ถังตกตะกอน (3)	ND	NA	
10.	น้ำประปา (1)	ND	NA	
11.	น้ำประปา (2)	ND	NA	
12.	น้ำประปา (3)	ND	NA	

* ใช้ตัวอย่างน้ำโดยตรง ** ตรวจวิเคราะห์เฉพาะตัวอย่างที่ให้ผลลบจาก ELISA kit

ND = Not detected, NA = Not applicable

5. การเผยแพร่และประชาสัมพันธ์ชุด ELISA Kit โดยการประชุมเชิงปฏิบัติการ

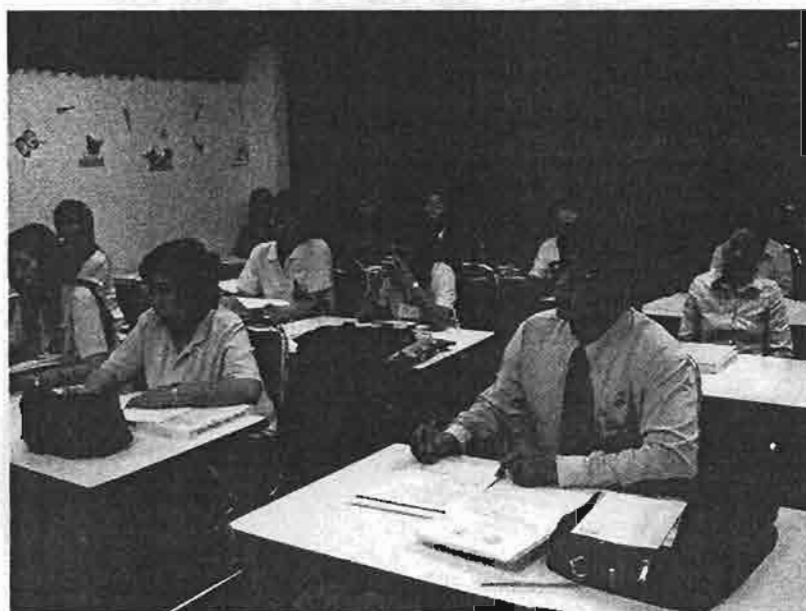
การจัดประชุมเชิงปฏิบัติการการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA kit ให้กับบุคลากรของหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การประปานครหลวง การประปาส่วนภูมิภาค สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาค และการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ในหัวข้อ Analysis of Microcystin in Water by LC/MS and ELISA Kit ได้จัดขึ้นระหว่างวันที่ 1 – 3 สิงหาคม 2549 ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน โดยมีวัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาขีดความสามารถด้านการวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินให้กับนักวิชาการจากหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมคุณภาพน้ำ
2. เพื่อแนะนำและใช้ชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่พัฒนาจากโครงการ ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนสารพิษไมโครซิสตินในแหล่งน้ำที่ใช้ในการอุปโภค-บริโภค

โดยในการประชุมประกอบด้วยภาคบรรยาย 1 วัน และภาคปฏิบัติ 2 วัน ซึ่งมีผู้เข้าร่วมการประชุมทั้งหมด 19 คน ประกอบด้วยนักวิชาการจาก

1. การประสานครหลวง 6 คน
2. การประสานส่วนภูมิภาค 4 คน
3. สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาค 7 คน
4. การไฟฟ้าฝ่ายผลิต 2 คน

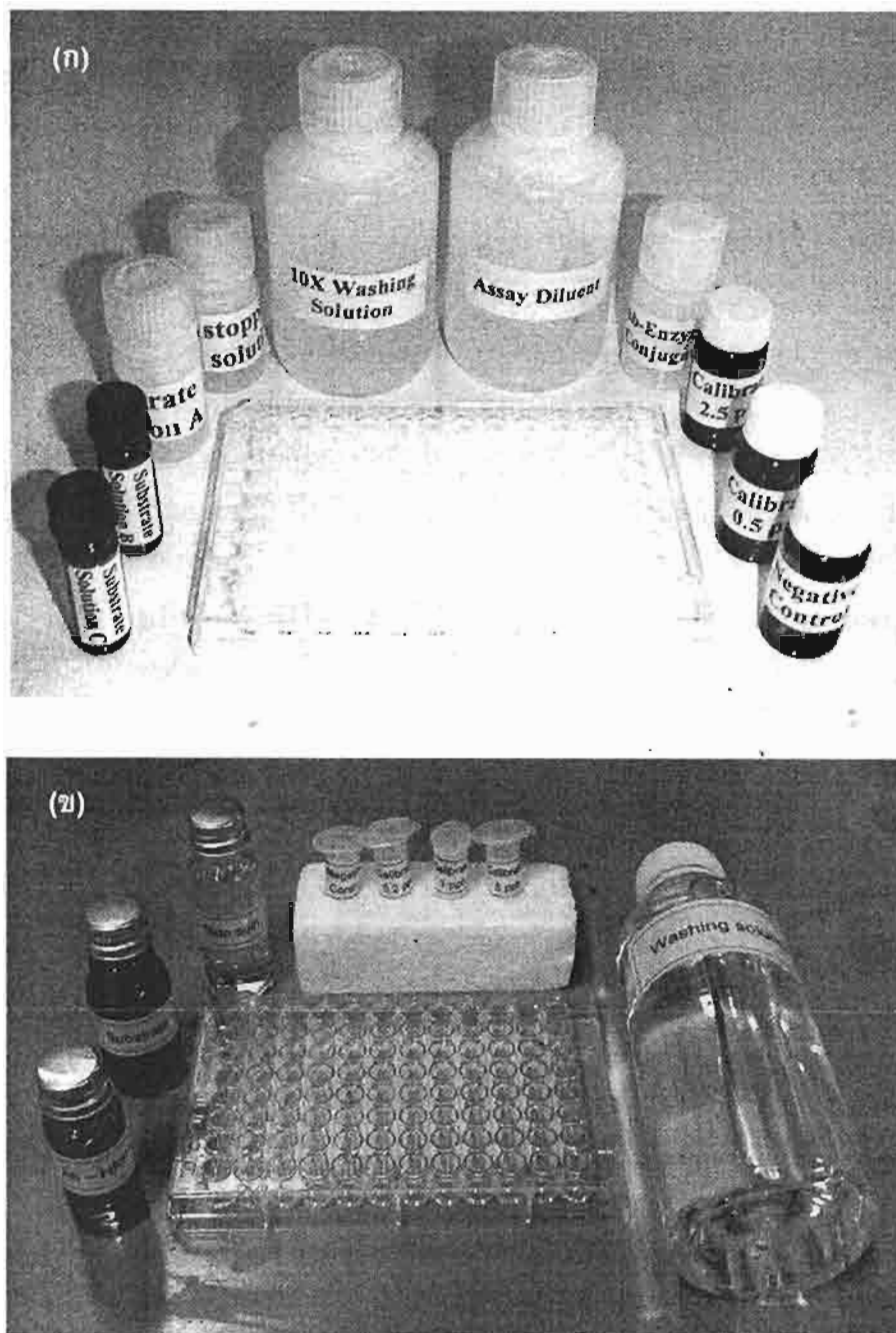
โดยผู้เข้าร่วมประชุมทุกคนแสดงความพอใจในประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่พัฒนาจากโครงการนี้ และมีความประสงค์ที่จะนำไปใช้ในหน่วยงานของตน



ภาพที่ 17 ภาพการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง Analysis of Microcystin in Water by LC/MS and ELISA Kit ระหว่างวันที่ 1 – 3 สิงหาคม 2549 ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การปรับปรุงชุดตรวจสอบ ELISA kit ให้มีขนาดกะทัดรัด

ในการปรับปรุงชุดตรวจสอบ ELISA kit ได้ทำการลดขนาดของขวดบรรจุให้เหมาะสม และใช้ substrate ที่เดิมประกอบด้วยน้ำยา 3 ชนิด มาเป็นน้ำยาสำเร็จรูป SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component) ของ KPL, Inc. (Maryland, USA) ทำให้ชุดตรวจสอบมีขนาดเล็กลงอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 เปรียบเทียบส่วนประกอบของ ELISA kit ชุดต้นแบบ (ก) กับชุดที่ได้รับการปรับปรุง (ข)

สรุปผลการทดลอง

1. ชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่ได้ผลิตขึ้นสามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติได้โดยตรง และได้ผลเป็นที่น่าพอใจยิ่ง โดยประสิทธิภาพในการตรวจวัดมีความไวสูงกว่าวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ HPLC เป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากสามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำได้โดยตรง (ไม่จำเป็นต้องสกัดสารพิษจากตัวอย่างปริมาณมากเหมือน HPLC) และสามารถใช้ได้เป็นอย่างดีสำหรับการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำต่างๆ อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณยังจำเป็นต้องใช้ HPLC เป็นหลัก เนื่องจากชุดตรวจสอบที่ได้มาจาก polyclonal antibody

2. ชุดตรวจสอบนี้สามารถใช้ตรวจวัดสารพิษไมโครซิสตินได้ผลเป็นอย่างดี ในตัวอย่างน้ำที่มีลักษณะดังต่อไปนี้

- pH อยู่ในช่วง 5.5 – 7.5
- ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่เกิน 100 mM หรือ 10 ppt
- ระดับความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมไม่เกิน 100 mM
- ระดับความเข้มข้นของเหล็กในรูปออกซิไดซ์ไม่เกิน 10 mM
- คลอรีนและฟลูโอไรต์ในระดับปกติไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

3. สภาพการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่เหมาะสม คือบรรจุ antibody coated microwell plate ในถุงพลาสติกภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส (รวมทั้งน้ำยาอื่นๆ) จะสามารถรักษาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบได้นาน 6 เดือน โดยอาจจะมีการลดลงของความไวต่อสารพิษบ้างเล็กน้อย

4. สามารถนำชุดตรวจสอบ ELISA kit ไปประเมินระดับของสารพิษไมโครซิสตินในตัวอย่างน้ำจากระบบการผลิตน้ำประปาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถยืนยันผลได้จากการวิเคราะห์ด้วย LC/MS

5. จากการนำชุดตรวจสอบนี้ไปใช้ในการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการให้กับนักวิชาการจากการประสานครหลวง การประปาส่วนภูมิภาค สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาค และการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ได้รับการยอมรับว่าสามารถนำไปใช้ได้จริง

ภาคผนวก

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ ความแม่นยำ และข้อจำกัดการใช้งานของชุดตรวจสอบ ELISA Kit ในการตรวจหาสารพิษไมโครซิสติน
2. เพื่อผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit สำหรับตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินเชิงพาณิชย์

ผลที่ได้รับตลอดโครงการ

ได้ผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ทั้ง 2 ประการ

บทความสำหรับเผยแพร่

ปัจจุบันไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษเป็นปัญหาสำคัญส่งผลกระทบต่อความเจ็บป่วยของมนุษย์และการตายของสัตว์เลี้ยงหลายแห่งทั่วโลก เช่น การรายงานการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียในแหล่งน้ำขนาดใหญ่ในประเทศไทย (อาภารัตน์และคณะ 2542) การเกิดโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลันอย่างรุนแรง ในประชากรใน Palm Island รัฐ Queens land ประเทศออสเตรเลีย (Bourke และคณะ, 1983) การเกิดมะเร็งตับระยะเริ่มต้น ของประชากรในประเทศจีน (Delong, 1979 และ Yu, 1989) เป็นต้น ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษนี้ ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Microcystis* และ *Nodularia* โดยสามารถเจริญเติบโตรวดเร็วในแหล่งน้ำจืดทั่วไป และจะปนเปื้อนอยู่ในน้ำที่นำมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องทั้งทางตรงและทางอ้อม และมีผลกระทบต่อนิเวศวิทยาอย่างกว้างขวาง

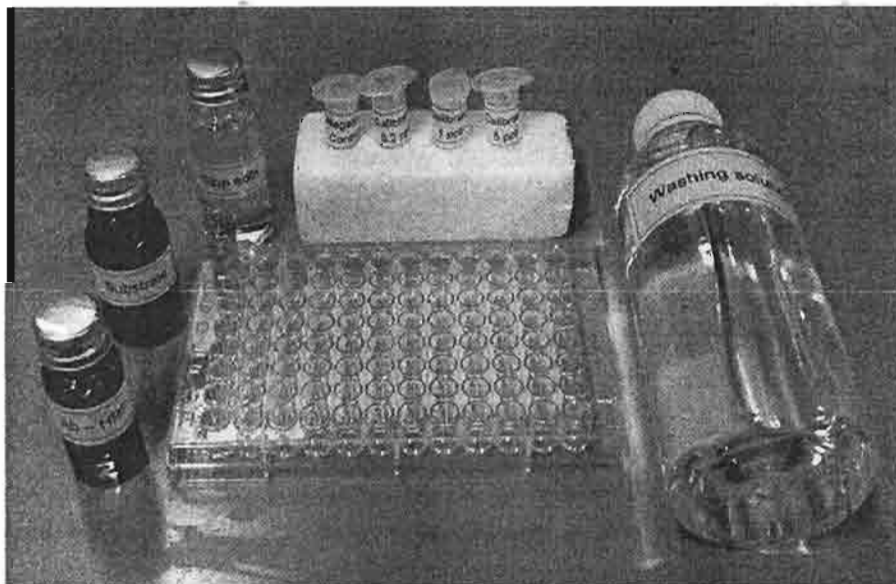
ปัญหาการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษดังกล่าวในแหล่งน้ำจึงเป็นปัญหาใหม่ที่หน่วยงานต่างๆ กำลังให้ความสนใจและเร่งดำเนินการแก้ไข โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตน้ำเพื่อการบริโภคให้ปลอดจากสารพิษเป็นปัญหาสำคัญอันหนึ่งที่จำเป็นต้องเร่งศึกษา เนื่องจากสารพิษถูกกำจัดได้ยากในกระบวนการการผลิตน้ำประปา มีรายงานว่าสามารถตรวจพบสารพิษไมโครซิสตินจากไซยาโนแบคทีเรียนี้ได้ในน้ำประปาของประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และออสเตรเลีย ด้วยการใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เทคนิค ELISA และทดสอบความเป็นพิษกับหนู (Chorus and Bartram, 1999) ซึ่งองค์การอนามัยโลก (WHO) จึงได้มีข้อกำหนดค่าความปลอดภัยสำหรับการปนเปื้อนของสารพิษ microcystin LR and equivalent ได้ไม่เกิน 1 ไมโครกรัมต่อลิตรในน้ำดื่ม

สำหรับข้อมูลในประเทศไทยพบว่าไซยาโนแบคทีเรียผลิตสารพิษสายพันธุ์ที่สำคัญ (dominant species) เป็นไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่ม *Microcystis aeruginosa* โดยตรวจพบในแหล่งน้ำจาก 5 แหล่ง ได้แก่ น้ำจากเขื่อนแม่งวง จังหวัดเชียงใหม่ เขื่อนลำนะทอง จังหวัดนครราชสีมา อ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี เขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี และสระน้ำเลี้ยงเป็ดหน้าเรือนจำคลองเปรมกรุงเทพฯ และยังได้สรุปว่าแหล่งน้ำภายในประเทศขณะนี้กำลังอยู่ในสภาพเสื่อมโทรมก่อให้เกิดอันตราย หากประชากรมีการบริโภคน้ำจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารพิษนี้เป็นประจำ (อาภารัตน์และคณะ 2542) นอกจากนี้การสำรวจของ วิเชียร และคณะ (2001) ยังพบว่ามีการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ในแหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศ ทั้งแหล่งน้ำที่ใช้เพื่อการเกษตร อุปโภค-บริโภค และเพื่อการพักผ่อน

จากปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษนี้แนวทางหนึ่งที่จักช่วยหลีกเลี่ยงการใช้น้ำที่มีสารพิษปนเปื้อน คือการหาวิธีตรวจที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำในแหล่งน้ำต่างๆ ที่ผ่านมาการวิเคราะห์หาสารพิษกลุ่มนี้จะใช้เทคนิคทาง HPLC ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษหลัก (microcystin-LR, -RR และ -YR) ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ แต่เนื่องจากวิธีการนี้มีความไวไม่เพียงพอในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีการปนเปื้อนระดับต่ำ อีกทั้งเครื่องมือมีราคาแพง และต้องใช้ผู้ตรวจวิเคราะห์ที่มีความชำนาญ จึงไม่

เหมาะที่จะนำมาใช้ในการควบคุมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษ ELISA เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสามารถตรวจหาสารพิษได้ครอบคลุมกว้างขวาง มีความไวสูง ไม่เจาะจงชนิดของไมโครซิสตินที่มีอยู่มากชนิด และยังสะดวกในการตรวจหาสารพิษจากตัวอย่างจำนวนมาก จึงเป็นข้อดีอย่างยิ่งในการช่วยตรวจหาสารพิษในระยะปฐมภูมิ ปัจจุบันบริษัทในต่างประเทศได้ผลิต ELISA KIT ขายในราคา KIT ละ 396 เหรียญดอลลาร์สหรัฐ ซึ่งเป็นราคาที่ค่อนข้างสูงมากอีกทั้งนำมีความจำเพาะต่อตัวอย่างในประเทศสหรัฐอเมริกา

โครงการวิจัยนี้จึงทำการผลิต ELISA Kit ต้นแบบเพื่อใช้ตรวจหาสารพิษไมโครซิสตินในน้ำ โดยการผลิตแอนติบอดีแบบ polyclonal antibody จากผลการทดลองชุดตรวจสอบ ELISA kit นี้สามารถตรวจวัดปริมาณสารพิษในน้ำได้ในระดับ 0.2 ppb (ต้องการเครื่องอ่านค่า ELISA Reader) และสามารถตรวจวัดได้ในระดับ 0.5 ppb โดยจะเห็นความแตกต่างด้วยตาเปล่า ซึ่งทั้งสองระดับนี้ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลกที่ระดับไม่เกิน 1 ppb ซึ่งต้นทุนในการผลิตชุดตรวจสอบนี้จะอยู่ที่ประมาณ 5,000 บาท (สำหรับการวิเคราะห์น้ำประมาณ 30 ตัวอย่าง) และมีความคุณภาพในการตรวจวัดเท่าเทียมกัน อีกทั้งยังมีความจำเพาะกับสารพิษในไซยาโนแบคทีเรียที่พบอยู่ในประเทศไทย โดยคาดว่าหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำเพื่อบริโภค เช่นการประปานครหลวง การประปาส่วนภูมิภาค ประปาหมู่บ้าน หรือหน่วยงานเป็นเจ้าของแหล่งน้ำเพื่อการอุปโภค เช่นการไฟฟ้าฝ่ายผลิต กรมชลประทาน และองค์การบริหารส่วนตำบล จะเป็นผู้นำชุดตรวจสอบนี้ไปใช้ในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษในน้ำ อีกทั้งยังใช้เป็นระบบเตือนภัยสำหรับเกษตรกรที่ใช้น้ำนั้นให้หลีกเลี่ยงการใช้น้ำที่มีการปนเปื้อนของสารพิษในระดับอันตราย



ชุดตรวจสอบ ELISA kit สำหรับวิเคราะห์สารพิษไมโครซิสตินในน้ำ

กิจกรรมที่วางแผนและกิจกรรมที่ดำเนินงานมา

กิจกรรม	ปีที่ 1											
	1-6						7-12					
1. ประเมินคุณภาพชุดตรวจสอบในการตรวจวัดสารพิษในระบบผลิตน้ำประปา 4 แห่งๆละ 4 จุด จำนวน 2 ซ้ำรวม 32 ตัวอย่าง	←→						←→					
2. เปรียบเทียบผลการตรวจสารพิษในน้ำประปาด้วยชุดตรวจสอบกับการวิเคราะห์ด้วย HPLC รวม 32 ตัวอย่าง	←→						←→					
3. ประเมินการใช้ชุดตรวจสอบในแหล่งน้ำธรรมชาติประมาณ 20 แห่ง	←→		←→				←→					
4. อิทธิพลของคุณภาพน้ำ เช่น pH ปริมาณคลอรีน เกลือชนิดต่างๆ ความขุ่น เป็นต้น ต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ		←→	←→				←→					
5. ศึกษาอายุการเก็บของชุดตรวจสอบ โดยเปรียบเทียบวิธีการบรรจุแบบต่างๆ	←→		←→				←→					
6. การปรับปรุงให้ชุดตรวจสอบมีความกระชับรัด เช่น ลดจำนวนขวดสารเคมี				←→	←→		←→					
7. การพัฒนาบรรจุภัณฑ์สำหรับชุดตรวจสอบ							←→					
8. การผลิตชุดตรวจสอบจำนวน 200 ชุด	←→											
9. การประเมินประสิทธิภาพชุดตรวจสอบในการใช้งาน	←→						←→					
10. เผยแพร่และประชาสัมพันธ์ชุด ELISA Kit โดยการจัดสัมมนาและสาธิตร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง									←→	←→		
11. สรุปและรายงาน											←→	←→

← → กิจกรรมที่วางแผน

← → กิจกรรมที่ได้ดำเนินงาน

ผลที่คาดว่าจะได้รับเทียบกับผลที่ได้รับจริง

ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ผลที่ได้รับจริง
1. ประเมินการใช้ชุดตรวจสอบในระบบการผลิตน้ำประปา	1. ชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่ผลิตมีประสิทธิภาพสูง สามารถใช้งานได้จริงในระบบการผลิตน้ำ
2. เปรียบเทียบผลการตรวจสอบสารพิษในน้ำประปาด้วยชุดตรวจสอบกับการวิเคราะห์ด้วย HPLC	2. ชุดตรวจสอบ ELISA kit มีประสิทธิภาพ ความแม่นยำใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วย HPLC ซึ่งได้ยืนยันผลด้วย LC/MS แต่มีข้อดีกว่าในด้านความไว (sensitivity) เนื่องจากสามารถตรวจวัดสารพิษจากตัวอย่างน้ำโดยตรง
3. ประเมินการใช้ชุดตรวจสอบสารพิษในแหล่งน้ำธรรมชาติ	3. มีความแม่นยำ และสามารถนำไปใช้งานในภาคสนาม
4. อิทธิพลของคุณภาพน้ำ เช่น pH คลอรีน เกลือ ความขุ่น เป็นต้น ต่อประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ	4. คุณภาพน้ำโดยทั่วไปไม่มีผลต่อประสิทธิภาพและความแม่นยำของชุดตรวจสอบ ยกเว้นในกรณีที่ pH ต่ำกว่า 5.5 หรือสูงกว่า 7.5 ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงกว่า 100 mM หรือ 10 ppt ความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมสูงกว่า 100 mM และความเข้มข้นของเหล็กในรูปออกซิไดซ์สูงกว่า 10 mM
5. ศึกษาอายุการเก็บรักษาชุดตรวจสอบ	5. ชุดตรวจสอบควรเก็บในถุงพลาสติกภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนและเก็บรักษาในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส
6. การปรับปรุงให้ชุดตรวจสอบมีความกะทัดรัด	6. เมื่อใช้น้ำยาในส่วน of substrate ที่ผลิตทางการค้าแบบ 1 component ทำให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีขนาดเล็กลงเหมาะแก่การนำไปใช้ในภาคสนาม

เอกสารอ้างอิง

- วิเชียร ยงมานิตชัย, ผกามาส อินทโชติ และ เตือนรัตน์ ชลอุดมกุล. 2001. การสำรวจความหลากหลายไซยาโนแบคทีเรียพิษในประเทศไทย. 6th WRC Workshop on Eutrophication and Toxic Cyanobacteria in Freshwater Reservoirs. 8-10 February 2001. Chiang Mai University.
- อภารัตน์ มหาจันทร์, ประไพภัทร คลังทรัพย์, พรพรรณรัตน์ รัตนโชติ, วัลลภา อรุณไพโรจน์, โทโมฮารุ ซาโน, มาโกโตะ เอ็ม วาดานาเบ, คูนิมิทซึ คายา และฟุนศุข อัดทะสัมปณณะ. 2542. ความ เป็นพิษของสาหร่ายที่ผลิตสารพิษในประเทศไทย วท.(14) 1 : หน้า 7-22.
- Al-Lay, J.K., G.K. Poon and G.A. Codd. 1988. Isolation and purification of peptide and alkaloid toxins from *Anabaena flos-aquae* using high performance thin-layer chromatography. J. Microbiol. Methods. 7 : 251-258.
- Anderson, R. J., H. A. Luu, D. Z. X. Chen, C. F. B. Holmes, M. L. Kent, L. Leblanc, F. J. R. Taylor and D. E. Williams. 1993. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon "netpen liver disease". Toxicon. 31: 1315-1323.
- Anonymous. 2001. <http://www.envirologix.com/microcysintinstubekit.html> .
- Bourke, A. T. C., R. B. Hawes, A. Nielson and N. D. Stallman. 1983. An outbreak of hepatoenteritis (the Palm Island mystery disease) possible caused by algal intoxication. Toxicon. Suppl. 3: 45-48.
- Botes, D.P., H. Kruger and C.C. Viljoen. 1982. Isolation and characterization of four toxins from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. Toxicon. 20: 945-953.
- Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. J. Appl. Bacteriol. 72: 445-459.
- Chorus, I. and J. Bartram. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E&FN Spon, London. pp.415.
- Chu, F.S., X. Huang, R.D. Wei and W.W. Carmichael. 1989. Production and characterization of antibodies against microcystins. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1928-1933.
- Chu, F.S., X. Huang and R.D. Wei. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. J. Assoc. Off. Analyt. Chem. 73: 451-456.
- Delong, S. 1979. Drinking water and liver cell cancer : An epidemiological approach to the etiology of this disease in China. Chin. Med. J. 92: 748-756.
- Dow, C.S., Swoboda, U.K. and Firth, P., 1994. Release and degradation of microcystin during a *Microcystis aeruginosa* bloom in a freshwater reservoir. In, Detection

- Methods for Cyanobacterial toxins, eds., Codd, G.A., Jefferies, T.M., Keevil, C.W. and Potter, E., pp. 158-160. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Falconer, I.R., J.V. Smith, A.R.B. Jackson, A. Jones and M.T.C. Runnegar. 1988. Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. *J. Toxicol. Environ. Health.* 24: 291-298.
- Falconer, I. R., M. D. Burch, D. A. Steffensen, M. Choice and O. R Coverdale. 1994. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9: 131-139.
- Fitzgeorge, R. B., S. A. Clack and C. W. Keevil. 1994. Routes of intoxication, pp. 69-74. *In*, Detection Methods for Cyanobacteria Toxins, G. A. Codd and T. M. Jefferies (eds.). The Royal Society of Chemistry. Bath University Press, Cambridge.
- Harada, K.I., K. Matsuura, M. Suzuki, H. Oka, M.F. Watanabe, S. Oishi, A. Dahlem, V.R. Beasley and W.W. Carmichael. 1988. Chemical analysis of toxic peptides produced by cyanobacteria. *J. Chromatogr.* 448: 275-283.
- Harada, K.I., K. Ogawa, K. Matsuura, H. Nagai, H. Murata, M. Suzuki, Y. Itezono, N. Nakayama, M. Shirai and M. Nakano. 1991. Isolation of two toxic hepatopeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139. *Toxicon.* 29: 479-489.
- Kfir, R., E. Johannsen and D.P. Botes. 1986. Monoclonal antibody specific cyanoginosin-LA preparation and characterization. *Toxicon.* 24: 543-552.
- Krishnamurthy, T., W.W. Carmichael, and E.W. Sarver. 1986. Investigations of freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxic peptides. I. Isolation, purification, and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon.* 24: 865-873.
- Kungswan, A., T. Noguchi, M. F. Watanabe, S. Matsunaga, S. Watanabe and K. Hashimoto. 1987. Isolation of two toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53: 2051-2560.
- Kungswan, A., K. Noguchi, S. Matsunaga, M.F. Watanabe, S. Watabe and K. Hashimoto. 1988. Properties of two toxins isolated from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon.* 26: 119-125.
- Tanaka, Y., S. Takenaka, H. Matsuo, S. Kitamori and H. Tokiwa. 1993. Levels of microcystins in Japanese lakes. *Toxicol. Environ. Chem.* 39: 21-28.

- Theiss, W.C., W.W. Carmichael, J. Wyman and R. Bruner. 1988. Blood pressure and hepato-cellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the freshwater cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. *Toxicon*. 26: 603-613.
- Tsuji, K., S. Naito, F. Kondo, N. Ishikawa, M.F. Watanabe, M. Suzuki and K.L. Harada. 1994. Stability of microcystins from cyanobacteria: Effect of light on decomposition and isomerization. *Environ. Sci. Technol.* 28: 173-177.
- Wright, B. W., G. A. Ross and R. D. Smith. 1989. Capillary zone electrophoresis with laser fluorescence detection of marine toxins. *J. Micro-column Separations*. 1: 85-92.
- Yu, S. Z. 1989. Drinking water and primary liver cancer. *In*, Primary Liver Cancer, Z. Y. Tang, M. C. Wu and S. S. Xia (eds.). China Academic Publishers, Bei Jing, Springer-Verlag, Berlin.