รายงานการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2546

เรื่อง ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

Antimicrobrial activity from *Chlorella* sp. extracts

วีนา ชูโชติ

RCH
QK
569
C49
ว8175
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 64420
วัน,เดือน,ปี 1 1 ก.ย. 2549
b.11648521
i.....

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella* sp. 5 สายพันธุ์ที่ส กัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทนได้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 6 ชนิด ด้วยวิธี disc diffusion จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus cereus* และ *Pseudomonas fluorescens* และสาหร่าย *Chlorella* sp. อีก 1 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 3 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus*

สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 และ *Chlorella* sp. A0505 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัม/แผ่น สูตรอาหารที่เลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 มีผลต่อการผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย คือ สูตรอาหาร N-8 ดัดแปลงที่ลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The crude extracts of five strains of unicellular green algae, *Chlorella* sp. were extracted in dichoromethane. Antibacterial bioassay against six species of pathogenic bacteria was conducted using disc diffusion method. It found that the extracts of four strains of *Chlorella* sp. Inhibited four species of bacteria, *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* while one strain of *Chlorella* sp. exhibited activity against three species of bacteria, *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis and Bacillus cereus*

The extracts from *Chlorella* sp. B2 and *Chlorella* sp. A 0505 strongly inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* at the concentrations of 5 and 10 mg/disc. The effect of medium on production for antibacterial substance of *Chlorella* sp. B2 was obtained by modified N-8 medium with the reduction of all macronutrients to half concentration. The highest level of inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* produced on the 6th day of cultivation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญรูป (ต่อ)	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	2
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	8
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	12
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	32
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยตัวทำลายต่างๆ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 5 มิลลิกรัม	13
4.2 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม	15
4.3 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม	16
4.4 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม	17
4.5 การยับยั้งการเจริญของ *S.aureus* ด้วยสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
3.1 *Chlorella* sp. ในอาหารสูตร N-8 ความเข้มแสง 2400 ลักซ์	10
3.2 การทำให้เซลล์สาหร่ายแตกด้วยเครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง	10
4.1 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	18
4.2 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	18
4.3 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	19
4.4 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	19
4.5 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	20
4.6 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	20
4.7 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	21
4.8 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	21
4.9 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	22
4.10 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	22
4.11 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	23
4.12 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtillis* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.13	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	24
4.14	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	24
4.15	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	25
4.16	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	25
4.17	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	26
4.18	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	26
4.19	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	27
4.20	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	27
4.21	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม	28
4.22	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcua aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม ในอาหาร N-8 ที่เพิ่มแหล่งไนโตรเจนเป็นสองเท่า	30
4.23	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcua aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม ในอาหาร N-8 ที่ลดธาตุอาหาร	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

สาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวขนาดเล็กพบในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไปทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำทะเลสาหร่าย *Chlorella* sp. มีความสำคัญต่อระบบนิเวศในแง่เป็นผู้ผลิตลำดับแรกของห่วงโซ่อาหาร การนำสาหร่าย *Chlorella* sp. มาใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่จะใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพสำหรับมนุษย์และเป็นอาหารของลูกสัตว์น้ำเศรษฐกิจ เช่น ลูกกุ้ง ลูกปลา และหอยสองฝา นอกจากนั้นยังใช้เป็นอาหารของไรแดงและแพลงก์ตอนสัตว์ เนื่องจากสาหร่าย *Chlorella* sp. มีคุณค่าทางอาหารสูงผลิตโปรตีน วิตามิน และสารเคมีอื่นๆ และไม่ทำให้น้ำเสีย นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

ปัจจุบันนี้ได้มีโรคใหม่ๆ เกิดขึ้นเสมอ ดังนั้นยาปฏิชีวนะจึงเป็นยากลุ่มที่มีความสำคัญที่ใช้ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวางไม่เฉพาะกับมนุษย์ แต่ยังใช้กับสัตว์เลี้ยงด้วย Hirsch (1999) รายงานว่าตรวจพบสารปฏิชีวนะหลายชนิดในแหล่งน้ำธรรมชาติ การใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปลาก็เริ่มมีผลเสียต่อสภาพแวดล้อม เพราะการใช้ยาจำนวนมากแต่ปริมาณที่ยาถูกดูดซึมโดยตัวปลาได้น้อย ดังนั้นยาเหล่านี้จึงปนเปื้อนอยู่ในน้ำ เป็นผลให้แบคทีเรียที่อยู่ในน้ำสร้างสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะซึ่งยานี้มีพิษโดยตรงต่อพืชและสัตว์น้ำขนาดเล็ก และอาจเป็นภาวะเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ผู้บริโภคอาหารที่ปนเปื้อนนี้ (Rigos และคณะ, 2004) Tendencia และ dela Pena (2003) รายงานว่าการเลี้ยง *Chlorella* sp. ร่วมกับการเลี้ยงกุ้งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเรืองแสง (luminous bacteria) ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งแชบ๊วย *(Penaeus merguriensis*)

ดังนั้นการศึกษาหาสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์น้ำและจะเป็นผลดีต่อสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำด้วย

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาหาสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค
2. ศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยสารละลายต่างกัน
3. ศึกษาปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค
4. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

สาหร่าย *Chlorella* sp.

สาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวจัดอยู่ในดิวิชัน Chlorophyta คลาส Chlorophyceae อันดับ Chlorellales ครอบครัว Chlorellaceae (Lee, 1999) พบแพร่กระจายทั่วไปทั้งในดิน น้ำจืดน้ำกร่อยและน้ำเค็ม อาจพบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือรวมกันเป็นกลุ่ม บางครั้งพบอาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์อื่น เช่น พารามีเซียม ไฮดร้าและฟองน้ำ เซลล์มีลักษณะกลมหรือรูปไข่ขนาดแตกต่างกันประมาณ 2-12 ไมโครเมตร คลอโรพลาสต์เป็นรูปถ้วยมีไพรีนอยด์ซึ่งเป็นบริเวณที่สะสมอาหารจำพวกแป้ง สารสีสำหรับสังเคราะห์ด้วยแสงอยู่ภายในคลอโรพลาสต์ซึ่งประกอบด้วย คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี แอลฟา เบต้าและแกมมา แคโรทีน (α , B และ γ – carotene รวมทั้งแซนโทฟิลล์ หลายชนิด การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างออโตสปอร์ (autospore) ที่มีจำนวน 4 8 หรือ 16 สปอร์ (กาญจนภาชน์, 2527) สาหร่าย *Chlorella* sp. เจริญเติบโตง่ายและมีปริมาณโปรตีนสูง ซึ่งใน *Chlorella vulgaris* มีโปรตีน 44.3 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบ-ไฮเดรท 39.5 เปอร์เซนต์และกรดนิวคลีอิก 15.4 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง (Tanaka และคณะ, 1986) จึงได้มีการนำสาหร่าย *Chlorella* sp. มาใช้ประโยชน์ในรูปอาหารเสริมในคนซึ่งนอกจากจะได้โปรตีนแล้วยังได้แร่ธาตุและวิตามิน เช่น วิตามินบี 12 บี 1 ไบโอติน ไนอาซินและกรดโฟลิก เป็นต้น (ยุวดี, 2546) แต่ผนังเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นเซลลูโลสค่อนข้างหนาทำให้ไม่สามารถย่อยและดูดซึมได้ในกระเพาะอาหารของคน ดังนั้นการผลิตสาหร่าย *Chlorella* sp. ในรูปอาหารเสริมจึงต้องผ่านกระบวนการบดหรือย่อยให้ผนังเซลล์แตกก่อน (สรวิศ, 2543) และมีการนำสาหร่าย *Chlorella* sp. มาเป็นอาหารเพื่อเลี้ยงไรแดงและโรติเฟอร์ ซึ่งพบว่าไรแดงและโรติเฟอร์เจริญและเพิ่มประชากรสูงกว่าการเลี้ยงตามธรรมชาติ (ยุวดี, 2546) นอกจากนั้นยังพบว่าสาหร่าย *Chlorella vulgaris* สามารถสร้างสารต้านแบคทีเรีย (Tanaka และคณะ, 1986) สารต้านไวรัส (Witvrouw และ De Cleroq, 1997 อ้างตาม Schaeffer และ Krylov, 2000) สารยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Chen และคณะ, 2003) สามารถสร้างสารสีแคโรทีนอยด์ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Gouveia และ Empis, 2003) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเรืองแสงที่ทำให้เกิดโรคในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (Tendencia และ dela Pena, 2003) การเลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโฟสต์ลาร์วา (พี 5 – พี 7) ด้วยอาหารที่มีชีวิต (อาร์ทีเมีย) และอาหารไม่มีชีวิต (ไข่ตุ๋น) พบว่า การเลี้ยงกุ้งกุลาดำร่วมกับสาหร่าย *Chlorella* sp. มีอัตราการเจริญและมีความแข็งแรงมากกว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในน้ำที่ไม่มีสาหร่าย *Chlorella* sp. (ชาญเดช, 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่ายจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งการเจริญได้ส่วนใหญ่ คือ เชื้อแบคทีเรีย รองลงมาคือเชื้อราและยีสต์ (Vlachos และคณะ, 1997) Pratt และคณะ (1944) รายงานว่าสารสกัด chlorellin จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella pyrenoidosa* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 5 ชนิดคือ *Bacillus subtilis, Bacterium coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes* และ *Pseudomonas aeruginosa* ตั้งแต่นั้นมาก็มีการรายงานการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายในกลุ่มสารต่าง ๆ เช่น กรดไขมัน (Pratt, 1944, Imada และคณะ, 1992 อ้างตาม Naviner และคณะ, 1999) เทอฟีน (terpenes) (Chang, 1993) โบรโมฟีนอล (bromophenols) (Xu และคณะ, 2003) สารประกอบฮาโลจีเนท (halogenated compounds) (Vairappan และคณะ, 2001 ; Vairappan, 2003) เปปไทด์ (Skulberg, 2000) และพอลิแซค-คาไรด์ (Schaeffer และ Krylov, 2000) ซึ่งสารเคมีเหล่านี้ส่วนใหญ่ยังไม่ได้จัดจำแนก (identify) สารเคมีเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา สาหร่ายและไวรัส สารเคมีบางชนิดสร้างแล้วปล่อยออกนอกเซลล์ และอีกหลายชนิดสามารถปล่อยออกนอกเซลล์ได้โดยขึ้นกับอิทธิพลของภาวะชักนำในการเพาะเลี้ยง (Skulberg, 2000)

Allen and Dawson (1960) ได้ทดลองนำสาหร่ายทะเลสายพันธุ์ต่าง ๆ จากชายฝั่งทะเลตะวันตกของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศเม็กซิโก ได้แก่ *Cladophoropsis gracillima, Dictyota divaricata, Enteromorpha prolifera, Enteromorpha compressa* และ *Derbesia* sp. พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* และ *Mycobacterium smegmalis* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ คือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*

Tanaka และคณะ (1986) ได้ทดลองให้สารสกัดจากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่สกัดด้วยน้ำร้อนแก่หนูก่อนการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เข้าไปในตัวหนูพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย *C. vulgaris* มีชีวิตรอดได้นานกว่าหนูที่ไม่ได้รับสารสกัดจาก *C. vulgaris*

Pesendo และ Caram (1984) รายงานการคัดแยกสาหร่ายทะเล 31 สายพันธุ์ในทะเลเมดิเตอร์เรเนียนซึ่งอยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายสีน้ำตาลเพื่อทดสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบและเชื้อราซึ่งก่อให้เกิดโรค พบว่าสาหร่ายที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวน 11 สายพันธุ์ คือ สาหร่ายสีน้ำตาล 3 สายพันธุ์คือ *Zanardinia prototypus, Cystoseira stricta* และ *Cystoseria compressa* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายสีน้ำตาล 3 สายพันธุ์ คือ *Dictyota dichotoma*, *Dictyota linearis* และ *Dilophus fasciola* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและสาหร่ายอีก 5 ชนิดคือสาหร่ายสีแดง 3 ชนิดคือ *Hypnea musciformis*, *Falkenbergia rufolanosa* และ *Laurencia obtusa* และสาหร่ายสีน้ำตาลอีก 2 สายพันธุ์คือ *Nereia filiformis* และ *Sporochnus pedunculatus* สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียและรา

Chang และคณะ (1993) รายงานการคัดแยกสาหร่ายทะเล 84 สายพันธุ์เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* พบว่าสารสกัดหยาบจากสาหร่าย 7 สายพันธุ์ คือ *Dunaliella bioculata* c-523, *Dunaliella primolecta* c-525, *Chlorococcum* sp. HS-101, *Chlorella* sp. HS-109, *Chlorella* sp. HS-110, *Synechococcus* sp. HS-364 และ *Phophyridium* sp. HS-366 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ แต่สาหร่ายทั้ง 84 สายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญ *E. coli* จากการทดลองต่อมาพบว่าสารสกัดหยาบจาก *D. primolecta* c-525 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีรีย *Straphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Enterobacter aerogenes*

EL-Masry และคณะ (1995) ได้ทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล 17 สายพันธุ์จากชายฝั่งประเทศอียิปต์พบว่า สาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Codium tomentosum*, *Jania rubens* และ *Padina pavonia* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งก่อให้เกิดโรค crown gall ในมันฝรั่ง

Naviner และคณะ (1999) รายงานว่าสารสกัดจากไดอะตอม *Skeletonema costatum* เป็นกรดไขมัน คือ 15-hydroxyeicosapentaenoic acid (Imada และคณะ, 1992 อ้างตาม Naviner และคณะ, 1999) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 4 ชนิดคือ *Listonella auquillarum*, *Vibrio mytili* T, *Vibrio* spp. S322 และ *Vibrio* spp. VRP

Robles และ Ballantine (1999) รายงานว่าแสงเป็นปัจจัยในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสาหร่ายสีแดง *Spyridia filamentosa* ที่ยับยั้งต่อการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* การเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงเป็นผลให้การยับยั้งการเจริญที่จำเพาะต่อจุลินทรีย์และระดับของการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ต่างกัน

Vairappan และคณะ (2001) รายงานว่าสารประกอบฮาโลจีเนทจากสาหร่ายสีแดง *Laurencia* sp. ซึ่งทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในทะเล 8 สายพันธุ์พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 6 ชนิดคือ *Alcaligenes aquamarinus*, *Alteromonas* sp., *Azomonas agilis*, *Azotobacter beijerinckii*, *Erwinia amylovora* และ *Escherichia coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gonzalez และคณะ (2001) รายงานว่าการทดสอบสารสกัดจากสาหร่ายทะเลในกลุ่มสาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายสีน้ำตาล จำนวน 44 ชนิด เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา พบว่าสาหร่าย 22 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย สาหร่าย 6 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียและรา ซึ่งสาหร่ายสีแดง *Asparagopsis taxiformis* และสาหร่ายสีเขียว *Cymopolia barbata* สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา

Hellio (2001) รายงานว่าสารสกัด 90 ตัวอย่างจากสาหร่ายทะเล 30 ชนิด ในกลุ่มทดสอบกับแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็น 35 สายพันธุ์พบว่ามีสารสกัดจากสาหร่ายเพียง 18 ตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งสารสกัด 3 ตัวอย่างยับยั้งการเจริญเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ สารสกัด 12 ตัวอย่างยับยั้งการเจริญเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกและสารสกัด 3 ตัวอย่างยับยั้งได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ

Viairappan (2003) รายงานว่าสาหร่ายสีแดง *Laurencia majuscula* สกัดสารประกอบฮาโลจิเนทได้ 2 ชนิดคือ elatol และ iso-obtusol ซึ่งพบว่า elatol สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดี 3 ชนิดคือ *Klebsiella pneumoniae, Salmonella* sp. และ *Staphylococcus epidermis* ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Citrobacter freundii* และ *Escherichia coli* ขณะที่ iso - obtusol สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้มี 2 ชนิดคือ *Klebsiella pneumoniae* และ *Salmonella* sp. แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermis* สารประกอบฮาโลจิเนทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเทียบเท่ากับหรือดีกว่ายาปฏิชีวนะทั้ง 6 ชนิดที่ใช้ทดสอบคือ Augmentin, Latamoxef, Ceflaclor, Ceftriaxone, Kanamycin และ Netilmicin ส่วน iso-obtusol สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้น้อยกว่า

Xu และคณะ (2003) พบว่าสารสกัดโบรโมฟีนอลจากสาหร่ายทะเลสีแดง *Rhodomela confervoides* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* 02-60, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis* 02-4, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Pseudomonas auruginosa* 02-29

Nezha และคณะ (2004) รายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเล *Cystoseira tamariscifolia* สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ 6 สายพันธุ์คือ *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces* sp., *Debaryomyces* sp., *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp. และ *Candida albicans* และเชื้อรา 2 สายพันธุ์คือ *Penicillium* sp. และ *Aspergillus flavus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wisespongpand และ Kuniyoshi (2003) รายงานว่าสาหร่ายสีน้ำตาล *Zonaria diesingiania* สร้างสาร phloroglucinals มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ยับยั้งการแบ่งเซลล์ในไข่ที่ได้รับการผสมแล้วของเม่นทะเล *(Echinometra mathaei)* และเป็นพิษต่อไรแดง *(Artemia salina)* ปลากินยุง *(Poecilia reticulate)* กุ้งฝอย *(Macrobrachium lanchesteri)* และไดอะตอม *(Chaetoceros gracilis)*

Berry และคณะ (2004) รายงานว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Lyngbya* sp. strain 15-2 สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ pahayokolide A มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium, Bacillus subtilis* และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa, Micrococcus luteus, Escherichia coli* และ *Streptococcus epidermis*

แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียวมีขนาดประมาณ 0.5 – 10 ไมโครเมตร สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มโดยการจัดจำแนกตามรูปร่างลักษณะได้ 3 ลักษณะคือ รูปร่างกลม (coccus) รูปร่างแท่ง (rod) และรูปร่างเป็นเกลียว (spiral) โดยปกติแบคทีเรียจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่าโคโลนี (colony) ซึ่งสามารถมองเห็นได้ แต่เมื่อแยกแบคทีเรียออกเป็นเซลล์เดี่ยวแล้วจะไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

Pseudomonas fluorescens เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่งทำให้เกิดโรคในปลาชื่อโรค Pseudomonas septicemia พบเชื้อนี้ทั่วไปทั้งน้ำจืดและน้ำทะเล การระบาดส่วนใหญ่จากปลาในบ่อเลี้ยงปลาสวยงามต่าง ๆ จำพวกปลาคาร์ฟและปลาทอง ทำให้ท้องบวม มีจุดเลือดตามผิวตัวและครีบ รวมทั้งช่องท้องและอวัยวะภายใน (ปภาศิริ, 2537)

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมอยู่รวมกันเป็นกระจุกเหมือนพวงองุ่นหรือเป็นคู่ต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์และไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีสีเหลืองทองสามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคที่ผิวหนังเช่น ฝี แผลอักเสบ (หยาดรุ้ง, 2544) รวมทั้งทำให้เกิดหนองและการติดเชื้อในกระแสเลือดและอาจก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น ลิ้นหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษจากการสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (นันทนา, 2537) ส่วนใหญ่ทำให้เกิดโรค foodborne

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน การเจริญใช้สารอาหารธรรมดาไม่ซับซ้อน เช่น แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ (ดวงพร, 2537) ทำให้เกิดการติดเชื้อทางเดินหายใจ (nasocomial infections) เช่น ปอดบวม (pneumonia) การติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection, UTIs) และการติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia) (http ://bacillus.ask.dyndns.dk/)

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่งมีแฟลกเจลลาออกทางด้านข้าง การแตกออกของสปอร์อยู่ที่ศูนย์กลางของเซลล์ ผิวของโคโลนีอาจเรียบหรือขรุขระ ทึบ สีครีมหรือน้ำตาล (ดวงพร, 2537) ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร (http : //bacillus.ask.dyndns.dk/)

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่ง สปอร์รูปร่างกลมเรียบ ชอบอุณหภูมิปานกลาง พบในธรรมชาติทั่วไป อาจทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ (food poisoning) (นงลักษณ์และปรีชา, 2544) และ foodborne illness (http ://bacillus.ask.dyndns.dk/)

Aeromonas hydrophila เป็นแบคทีเรียแกรม รูปร่าง ทำให้เกิดโรค motile aeromonas septicemia ทำให้เกิดโรคในกลุ่มปลาคาร์ฟ ปลาที่เลี้ยงรวมกันในบ่อ ปลาสวยงาม กลุ่มปลาแซลมอน ทำให้ท้องบวม ตาโปน เกล็ดตั้งพอง มีแผลตามตัว อวัยวะภายในตกเลือด (ปภาศิริ, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เชื้อสาหร่าย

เชื้อสาหร่าย 5 สายพันธุ์คือ *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. B2, *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260, *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค 6 ชนิดคือ *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus cereus* และ *Aeromonas hydrophila*

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องเขย่า (shaker : Gallenkamp SG 93)
2. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer : HACH DR / 4000 V)
3. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius analytic : A 2000 S)
4. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave : Panapolytech VS-1321-60)
5. ตู้เขี่ยเชื้อแบบลมเป่า (laminar airflow : Faster Bio 48)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifugc : Sanyo Falcon 6/300)
7. เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (rotary evaporatox : Heidolph laborota 4001)
8. เครื่องทำให้เซลล์แห้งที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส (freeze-dryer : Heto lyolab 3000)
9. เครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonics vibra cell : VCX 500)
10. ชุดเลี้ยงสาหร่ายแบบให้อากาศ
11. กรวยแยก
12. ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)
13. สารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยง สาหร่าย *Chlorella* sp. (analytical grade)
14. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
15. แผ่นทดสอบ (paper disc : Schleicher & Schuell) ขนาด 6 มิลลิเมตร
16. ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 4 ชนิดคือ เมธานอล ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์มและเฮกเซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

18. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยสารละลายต่างกัน

3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย

นำเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 และ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N – 8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 2400 ลักซ์เป็นเวลา 15 วัน

3.1.2 การเพาะเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp.

นำหัวเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. ทั้ง 2 สายพันธุ์จากข้อ 3.1.1 มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตร N-8 ปริมาตร 200 มิลลิลิตรในหลอดเลี้ยงสาหร่ายแบบให้อากาศขนาด 300 มิลลิตร ให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 2400 ลักซ์ (รูปที่ 3.1) เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นจึงเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. แต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธีการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง

3.1.3 การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. แต่ละสายพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวไว้ตามข้อ 3.1.2 มาใส่ในน้ำกลั่นปริมาณ 1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสี่ยงความถี่สูง (sonicator) (รูปที่ 3.2) จนกระทั่งเซลล์แตกเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำให้เซลล์แห้งที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียสประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปสกัดด้วยสารละลายต่างกัน 4 ชนิดคือ เฮกเซน เมธานอล คลอโรฟอร์มและไดคลอโรมีเทน แล้วนำสารสกัดที่ได้จากสารละลายต่างกันนี้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดันที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

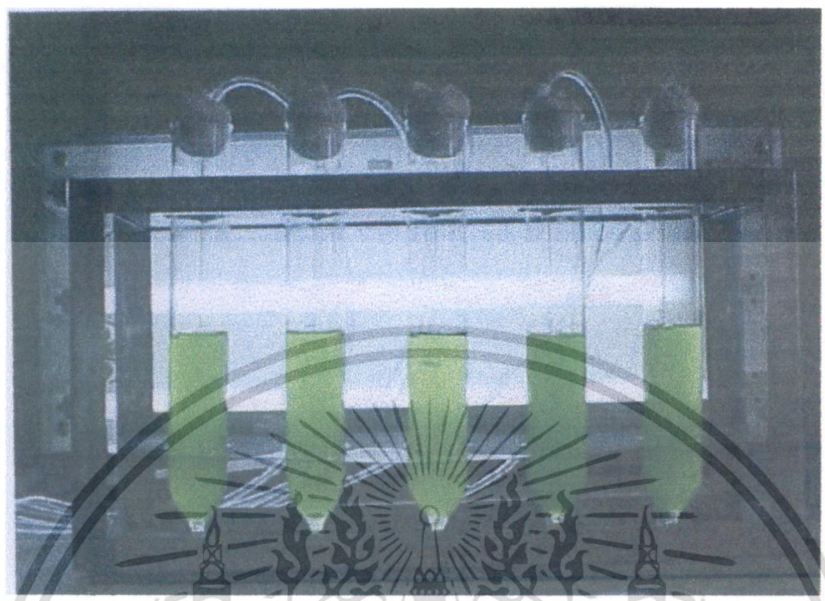
3.1.4 การเตรียมแผ่นทดสอบ

นำสารสกัดหยาบจากข้อ 3.1.3 ละลายในสารละลายชนิดเดียวกันที่ใช้ในการสกัดเซลล์สาหร่ายให้มีความเข้มข้น 0 และ 5 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ (มิลลิกรัมต่อ 30 ไมโครลิตร)

3.1.5 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิดคือ *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* ในหลอดอาหารเอียงมาเจือจางในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรให้ได้ OD. ประมาณ 0.3 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 *Chlorella* sp. ในอาหารสูตร N-8 ความเข้มแสง 2400 ลักซ์

รูปที่ 3.2 การทำให้เซลล์สาหร่ายแตกด้วยเครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient agar) ในจานอาหารที่เตรียมไว้ด้วยวิธี spread plate ทิ้งไว้จนสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียซึมลงเนื้อวุ้นจนแห้ง

3.1.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. กับแบคทีเรีย

นำแผ่นทดสอบที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1.4 ไปวางบนจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1.5 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

3.2 ศึกษาสายพันธุ์สาหร่ายและปริมาณความเข้มข้นสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

นำเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. ทั้ง 5 สายพันธุ์คือ *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. B_2 , *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260, *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 มาเพาะเลี้ยงและเก็บเกี่ยวเซลล์ตามข้อ 3.1.2 จากนั้นจึงเตรียมเป็นสารสกัดหยาบตามข้อ 3.1.3 โดยสกัดด้วยสารละลายชนิดที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุดจากการทดลองข้อ 3.1 จากนั้นจึงนำสารสกัดหยาบดังกล่าวละลายในสารละลายชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการสกัดสาหร่ายเพื่อเตรียมเป็นแผ่นทดสอบ 4 ความเข้มข้นคือ 0, 5, 10 และ 20 มิลลิลิตรต่อแผ่นทดสอบ (มิลลิกรัมต่อ 30 ไมโครลิตร) ใช้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 6 ชนิดคือ *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus cereus* และ *Aeromonas hydrophila* ที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.1.5 ด้วยวิธี disc diffusion เปรียบเทียบกับแผ่นทดสอบที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 0.5 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

3.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

นำสายพันธุ์ *Chlorella* sp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจรญของแบคทีเรียได้ดีที่สุดจากการทดลองข้อ 3.2 มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน 2 สูตรคือ อาหารสูตร N-8 ดัดแปลงโดยเพิ่มแหล่งไนโตรเจนเป็นสองเท่าและอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงโดยลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีอาหาร 2500 มิลลิลิตรและหัวเชื้อสาหร่าย 250 มิลลิลิตร ให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที อัตราการกวน 100 รอบต่อนาทีความเข้มแสง 5000 ลักซ์ (Choochote และคณะ, 2005) จากนั้นจึงนำมาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบตามข้อ 3.1.3 และเตรียมเป็นแผ่นทดสอบเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองข้อ 3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียตามข้อ 3.1.5 และ 3.1.6 ในวันที่ 2 4 6 8 10 และ 12 ของการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยสารละลายต่างกัน

ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำลายเฮกเซน เมธานอล คลอโรฟอร์มและไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบพบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เมธานอล คลอโรฟอร์มและไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ชนิดคือ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *B. cereus* แต่สารสกัดจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมีผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ที่สุด โดยมีขนาดของบริเวณยับยั้ง 10.50, 10.00 และ 7.50 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ส่วนสารสกัดจากตัวทำละลายเมธานอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เพียงชนิดเดียวคือ *B. cereus* และสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้เลย ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิดซึ่งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการละลายได้ในตัวละลายต่างชนิดกัน ซึ่ง Olesen และคณะ (1964 อ้างตาม Robles Centeno และ Ballantine, 1999) กล่าวว่าสาหร่ายบางชนิดอาจจะสร้างกิจกรรมได้หลายชนิดซึ่งกิจกรรมเหล่านี้อาจเกิดจากสารประกอบที่ต่างกัน Nezha (2004) รายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Cystoseira tamarisciforia* ที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และราส่วนสารสกัดจากตัวทำละลายอื่นคือ น้ำ เมทานอลและเฮกเซนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และราได้ Hellio และคณะ (2001) รายงานว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทะเล 30 ชนิดที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอลและไดคลอโรมีเทน พบว่าสารสกัดจาสาหร่ายที่สกัดด้วยเอทานอลและไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็น ส่วนวนิดา (2545) รายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำสามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้ง *B. cereus* และ *S. aureus*

4.2 ผลการศึกษาหาสายพันธุ์และปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

จากการทดลองสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. B2, *C. ellipsoidea* TISTR 8260, *C. vulgaris* TISTR 8261 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 พบว่าสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. 4 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *B. subtilis*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยตัวทำลายต่างๆ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 5 มิลลิกรัม

สารสกัดจากสาหร่าย	ตัวทำละลาย	ขนาดของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
		P. aeruginosa	*S. aureus*	*B. subtills*	*B. cereus*
Chlorella sp. A0505	เฮกเซน	-	7.33 ± 0.57	6.50 ± 00	7.33 ± 0.28
	เมธานอล	-	-	-	7.00 ± 00
	คลอโรฟอร์ม	-	6.67 ± 0.28	6.50 ± 00	8.17 ± 0.28
	ไดคลอโรมีเทน	-	10.5 ± 0.50	7.50 ± 0.50	10.00 ± 0.50

หมายเหตุ - ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

B. cereus และ *P.fluorescens* และสารสกัดของสาหร่าย 4 สายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* และ *A. hydrophila* ยกเว้น *C. vulgaris* TISTR 8261 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa, A. hydrophila* และ *P. fluorescens* (รูปที่ 4.1 – 4.23)

สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ซึ่งสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 13.17, 11.17 และ 11.00 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.2, รูปที่ 4.7, 4.1 และ 4.9)

เมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม พบว่าสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ซึ่งสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Chlorella* sp. B2 และ *C. ellipsoidea* TISTR 8260 มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 17.00, 16.33 และ 14.50 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.3, รูปที่ 4.1, 4.7 และ 4.13)

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม พบว่าสารสกัดสาหร่าย *C. vulgaris* TISTR 8261 สามารถยับยั้งการเจริญของ *B.subtilis* ได้ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้ง 13.33 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *Chlorella* sp. B2 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* มีบริเวณยับยั้ง 12.17 และ 11.50 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4, รูปที่ 4.16, 4.7 และ 4.19)

จากการทดลองนี้พบว่าสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิกรัม ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกได้คือ *S. aureus, B. subtilis* และ *B. cereus* ซึ่งส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ส่วนแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถยับยั้งได้มีเพียงชนิดเดียว คือ *P. fluorescens* แต่อีก 2 ชนิดไม่สามารถยับยั้งได้เลย คือ *P. aeruginosa* และ *A. hydrophila* ส่วนสารสกัดจากสาหร่าย *C. vulgaris* TISTR 8261 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 3 ชนิด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากภายในเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด และชนิดที่ละลายได้ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* และ *A. hydrophila* ซึ่ง Naviner และคณะ (1999) กล่าวว่าสารสกัดจากสาหร่ายที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำหรือสารละลายอินทรีย์รวมทั้งกระบวนการการสกัดและวิธีวิเคราะห์มีอิทธิพลต่อการทดลอง และผลการทดลองนี้คล้ายคลึงกับการทดลองของ Gonzalez และคณะ (2001) รายงานว่าสารสกัดในกลุ่มสาหร่ายที่อยู่ในอันดับ Dictyotales, Nemalieles, Ceramiales และ Caulerpales มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แกรมบวกดีกว่าแกรมลบ ซึ่งสารสกัดเหล่านั้นสามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* MB 964 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B. cereus และ *P.fluorescens* และสารสกัดของสาหร่าย 4 สายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* และ *A. hydrophila* ยกเว้น *C. vulgaris* TISTR 8261 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa, A. hydrophila* และ *P. fluorescens* (รูปที่ 4.1 – 4.23)

สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ซึ่งสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 13.17, 11.17 และ 11.00 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.2, รูปที่ 4.7, 4.1 และ 4.9)

เมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม พบว่าสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ซึ่งสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Chlorella* sp. B2 และ *C. ellipsoidea* TISTR 8260 มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 17.00, 16.33 และ 14.50 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.3, รูปที่ 4.1, 4.7 และ 4.13)

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม พบว่าสารสกัดสาหร่าย *C. vulgaris* TISTR 8261 สามารถยับยั้งการเจริญของ *B.subtilis* ได้ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้ง 13.33 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *Chlorella* sp. B2 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* มีบริเวณยับยั้ง 12.17 และ 11.50 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4, รูปที่ 4.16, 4.7 และ 4.19)

จากการทดลองนี้พบว่าสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิกรัม ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกได้คือ *S. aureus, B. subtilis* และ *B. cereus* ซึ่งส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ส่วนแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถยับยั้งได้มีเพียงชนิดเดียว คือ *P. fluorescens* แต่อีก 2 ชนิดไม่สามารถยับยั้งได้เลย คือ *P. aeruginosa* และ *A. hydrophila* ส่วนสารสกัดจากสาหร่าย *C. vulgaris* TISTR 8261 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 3 ชนิด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากภายในเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด และชนิดที่ละลายได้ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* และ *A. hydrophila* ซึ่ง Naviner และคณะ (1999) กล่าวว่าสารสกัดจากสาหร่ายที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำหรือสารละลายอินทรีย์ รวมทั้งกระบวนการการสกัดและวิธีวิเคราะห์มีอิทธิพลต่อการทดลอง และผลการทดลองนี้คล้ายคลึงกับการทดลองของ Gonzalez และคณะ (2001) รายงานว่าสารสกัดในกลุ่มสาหร่ายที่อยู่ในอันดับ Dictyotales, Nemalieles, Ceramiales และ Caulerpales มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แกรมบวกดีกว่าแกรมลบ ซึ่งสารสกัดเหล่านั้นสามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* MB 964 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม

สารสกัดจากสาหร่าย	ขนาดของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	S. aureus	*B. subtilis*	*B. cereus*	*P. aeruginosa*	*P. fluorescens*	*A. hydrophila*
Chlorella sp. A0505	17.00 ± 2.17	6.67 ± 0.28	8.33 ± 0.28	-	6.50 ± 0.25	-
Chlorella sp. B2	16.33 ± 0.58	15.83 ± 0.76	13.50 ± 0.50	-	8.17 ± 0.28	-
C. ellipsoidea TISTR 8260	14.50 ± 2.29	6.67 ± 0.28	8.33 ± 0.28	-	7.00 ± 0.50	-
C. vulgaris TISTR 8261	13.50 ± 0.86	9.17 ± 0.28	8.33 ± 0.76	-	-	-
Chlorella sp. TISTR 8445	10.50 ± 0.50	7.67 ± 0.28	9.67 ± 0.28	-	6.83 ± 0.35	-
แอมพิซิลิน (0.5 มก)	43.5 ± 1.32	31.4 ± 2.02	16.89 ± 1.39	13.70 ± 0.81	13.72 ± 0.77	10.20 ± 1.04

หมายเหตุ - ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

ตารางที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม

สารสกัดจากสาหร่าย	ขนาดของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	S. aureus	*B. subtilis*	*B. cereus*	*P. aeruginosa*	*P. fluorescens*	*A. hydrophila*
Chlorella sp. A0505	8.00 ± 0.50	7.33 ± 0.57	9.33 ± 0.28	-	6.67 ± 0.28	-
Chlorella sp. B2	12.17 ± 0.76	11.50 ± 1.32	9.17 ± 0.28	-	6.83 ± 0.28	-
C. ellipsoidea TISTR 8260	7.50 ± 0.50	6.67 ± 0.28	9.00 ± 0.50	-	7.17 ± 0.28	-
C. vulgaris TISTR 8261	8.00 ± 0.50	13.33 ± 0.57	7.50 ± 0.86	-	-	-
Chlorella sp. TISTR 8445	11.50 ± 0.50	7.17 ± 0.57	11.17 ± 0.76	-	7.17 ± 0.28	-
แอมพิซิลิน (0.5 มก)	43.50 ± 1.32	31.40 ± 2.02	16.89 ± 1.39	13.70 ± 0.81	13.72 ± 0.77	10.20 ± 1.04

หมายเหตุ - ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

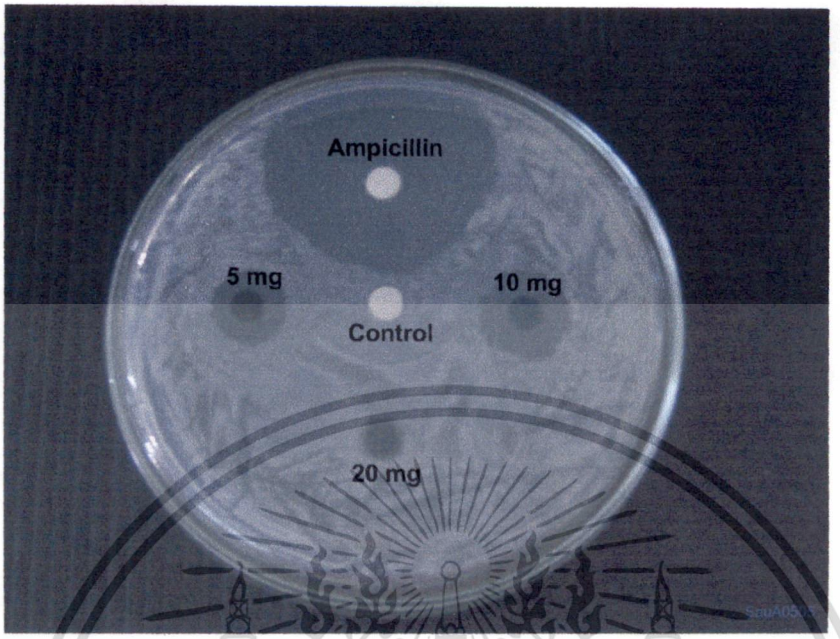
64420

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

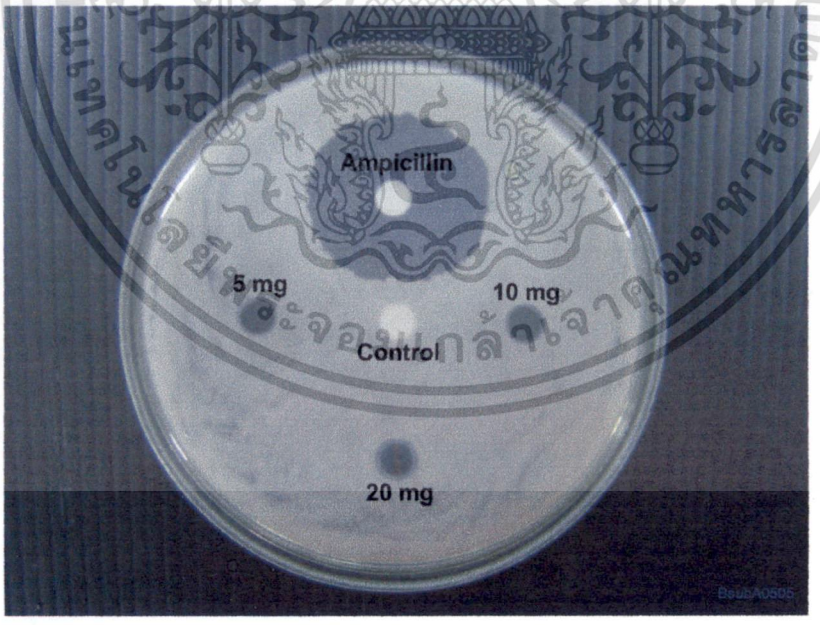
ตารางที่ 4.2 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม

สารสกัดจากสาหร่าย	ขนาดของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	S. aureus	*B. subtilis*	*B. cereus*	*P. aeruginosa*	*P. fluorescens*	*A. hydrophila*
Chlorella sp. A0505	12.17 ± 0.76	6.50 ± 0.00	7.33 ± 0.28	-	6.50 ± 0.00	-
Chlorella sp. B2	13.17 ± 1.04	7.33 ± 0.57	10.67 ± 1.20	-	7.33 ± 0.57	-
C. ellipsoidea TISTR 8260	9.83 ± 0.76	6.50 ± 0.00	8.17 ± 0.28	-	6.67 ± 0.28	-
C. vulgaris TISTR 8261	9.83 ± 0.28	7.33 ± 0.58	7.17 ± 0.28	-	-	-
Chlorella sp. TISTR 8445	13.00 ± 1.32	7.17 ± 0.28	9.00 ± 0.50	-	6.50 ± 0.00	-
แอมพิซิลิน (0.5 มก)	43.50 ± 1.32	31.40 ± 2.02	16.89 ± 1.39	13.70 ± 0.81	13.72 ± 0.77	10.20 ± 1.04

หมายเหตุ - ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

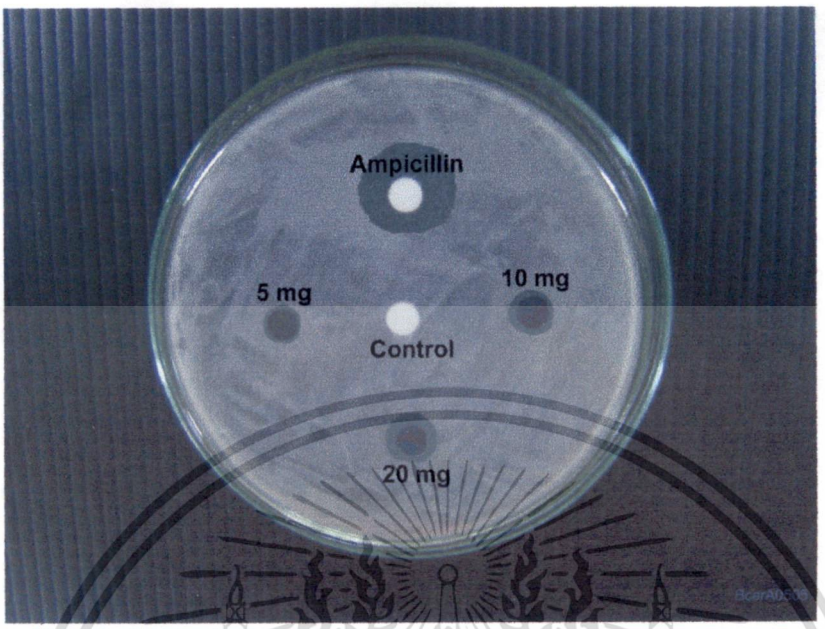


รูปที่ 4.1 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

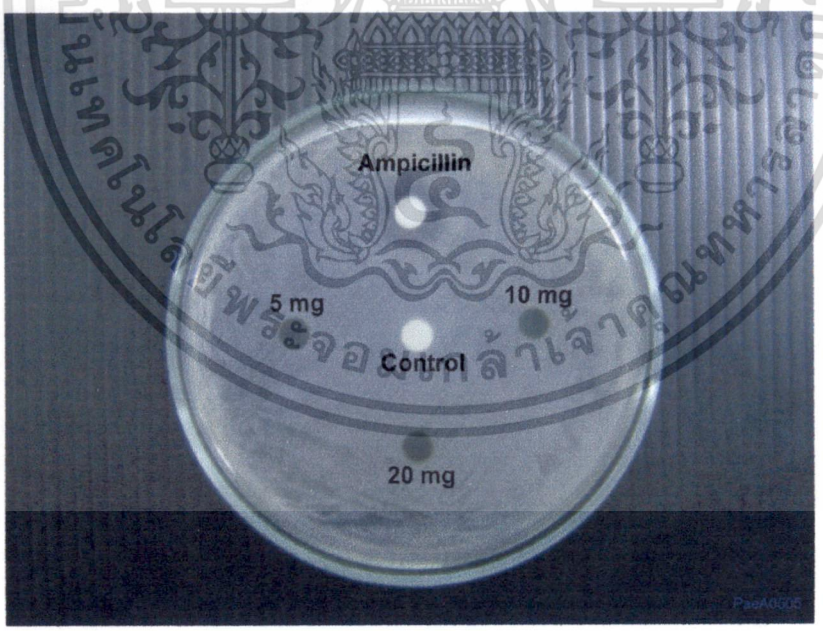


รูปที่ 4.2 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

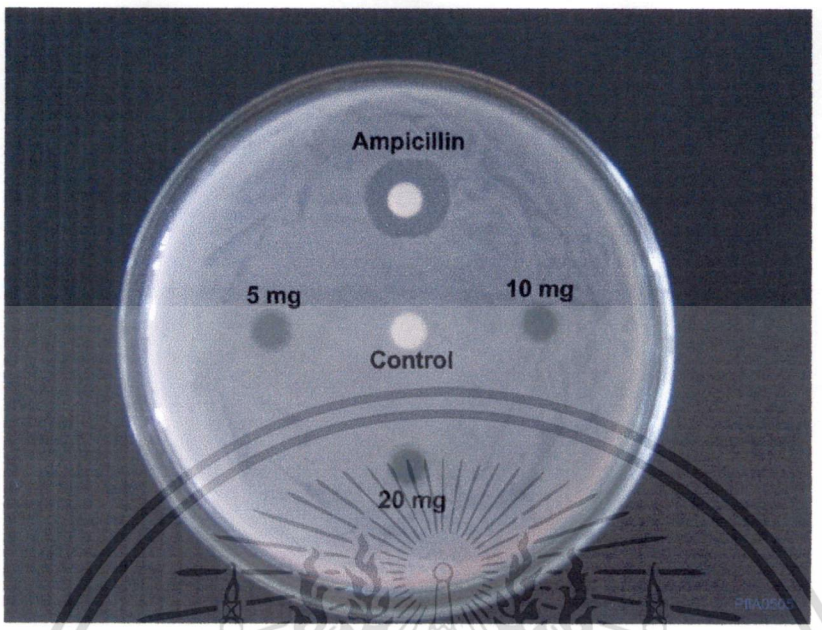


รูปที่ 4.3 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

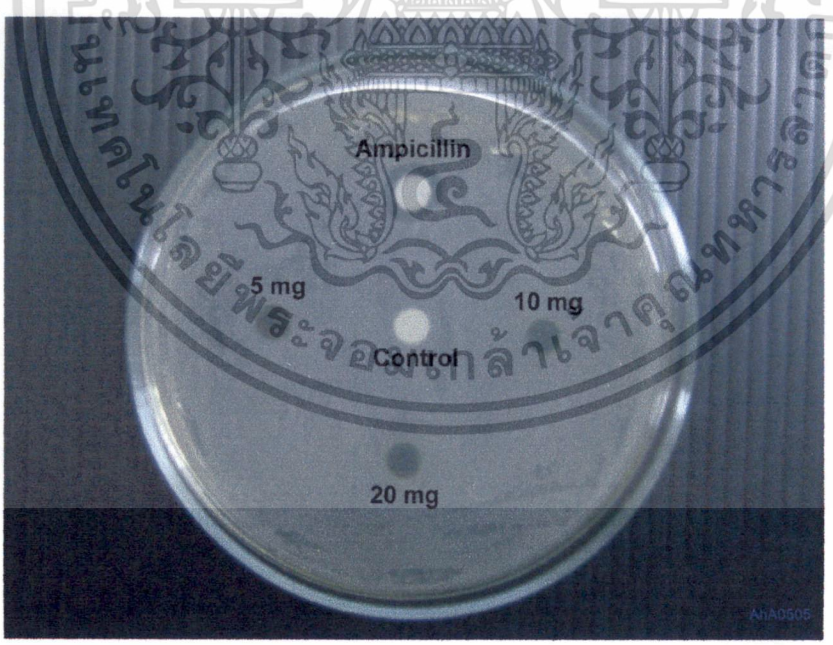


รูปที่ 4.4 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

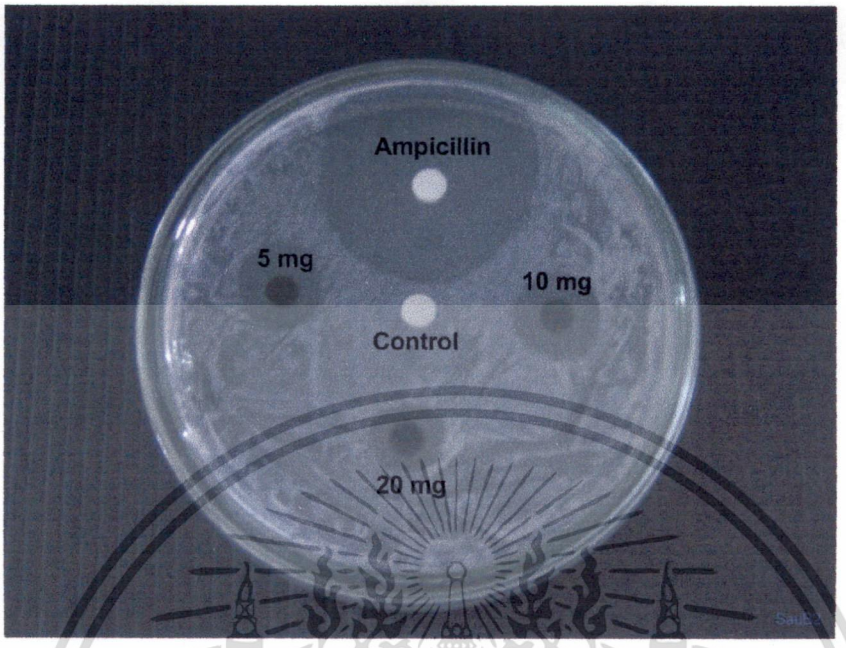


รูปที่ 4.5 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

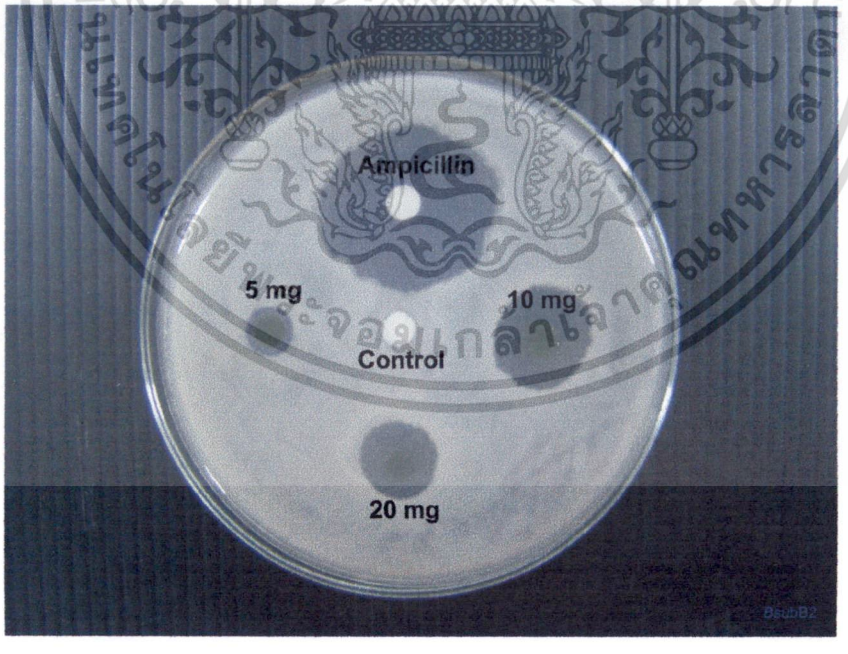


รูปที่ 4.6 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

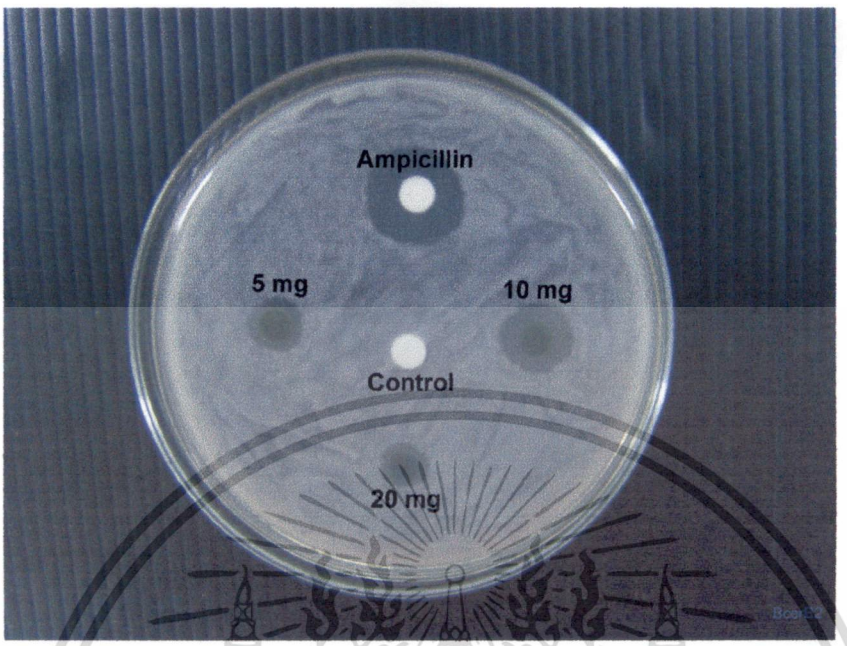


รูปที่ 4.7 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

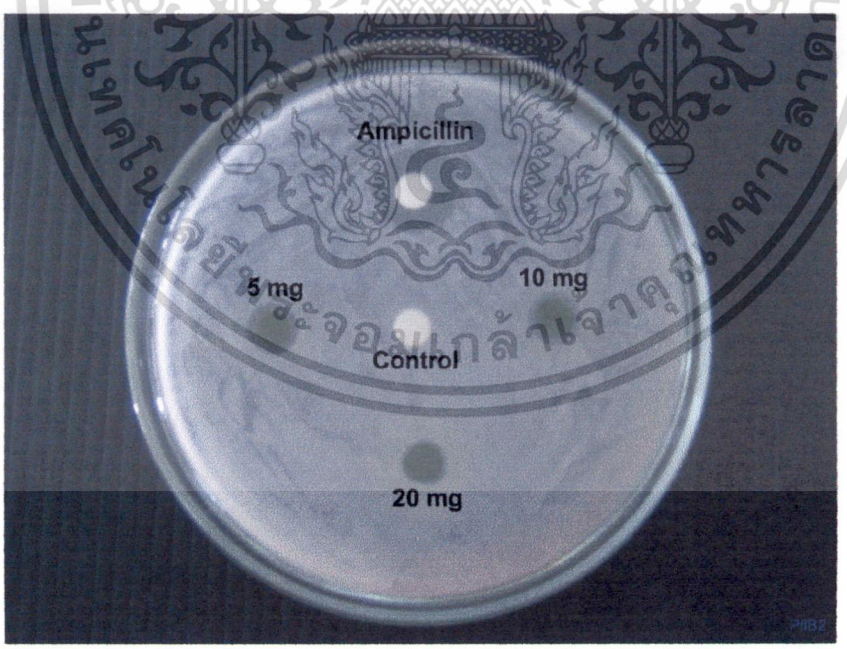


รูปที่ 4.8 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

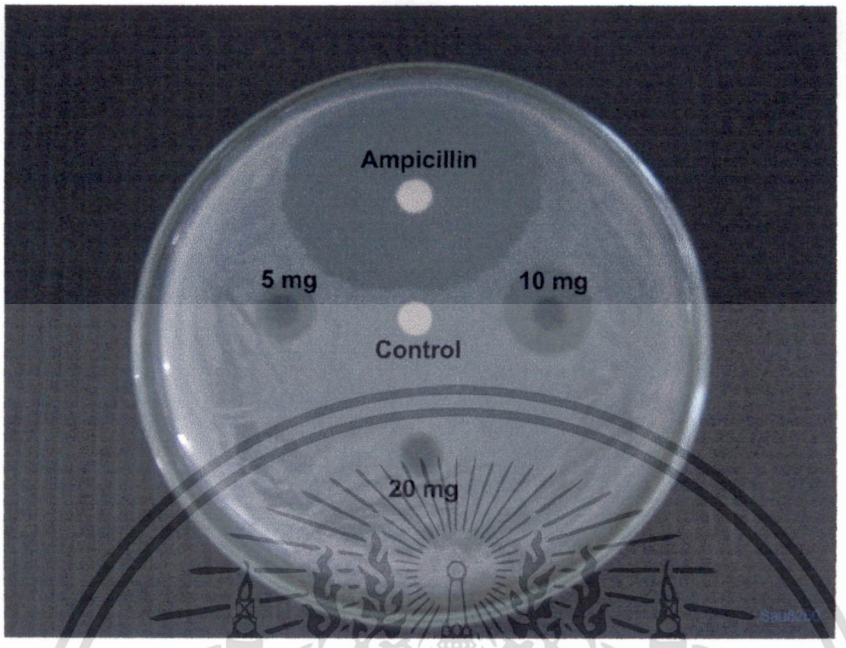


รูปที่ 4.9 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

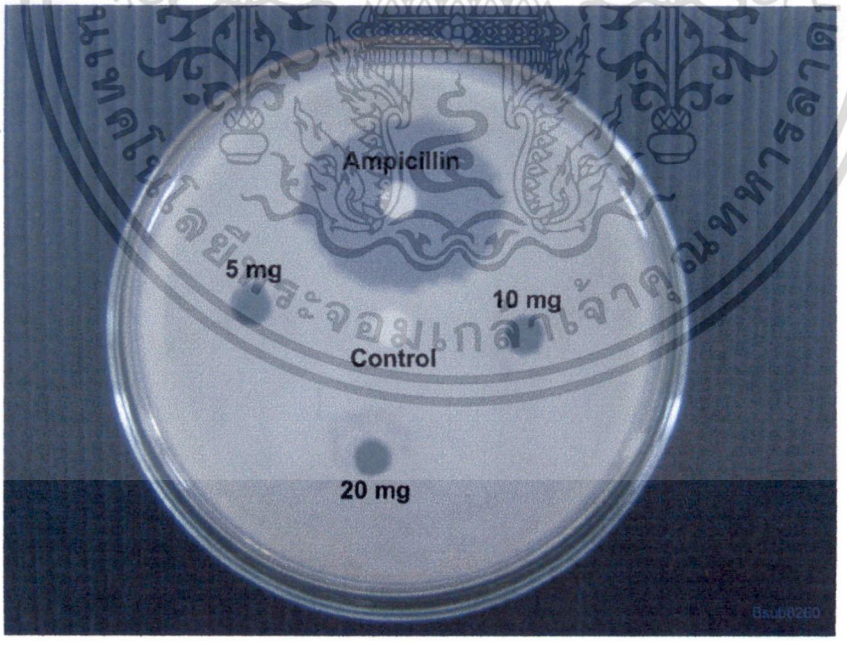


รูปที่ 4.10 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

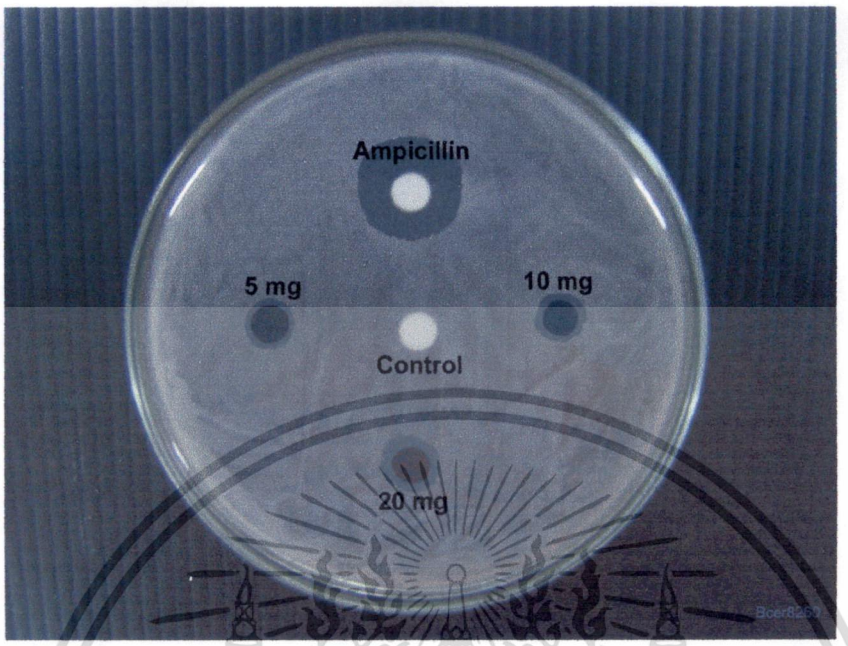


รูปที่ 4.11 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stapphylococcus aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

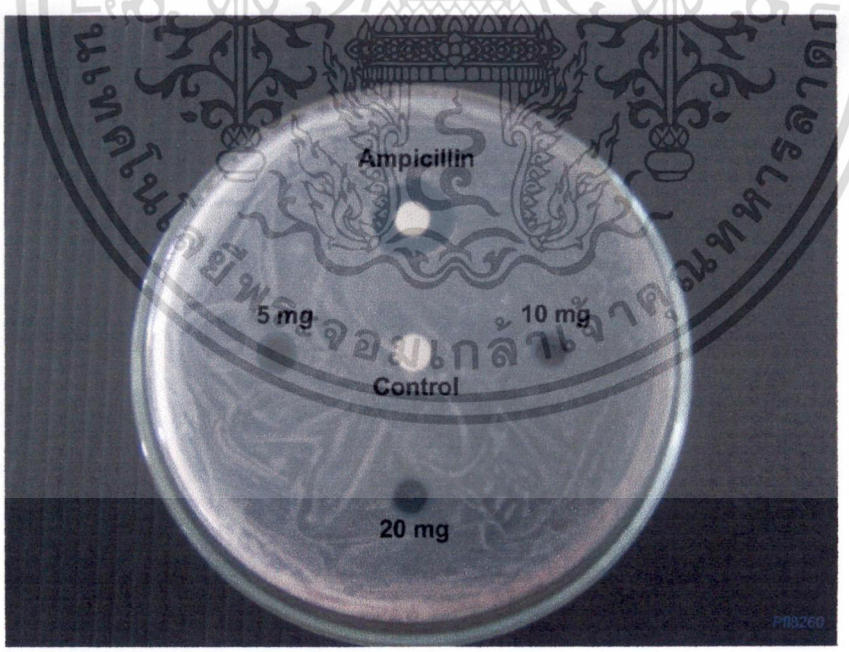


รูปที่ 4.12 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

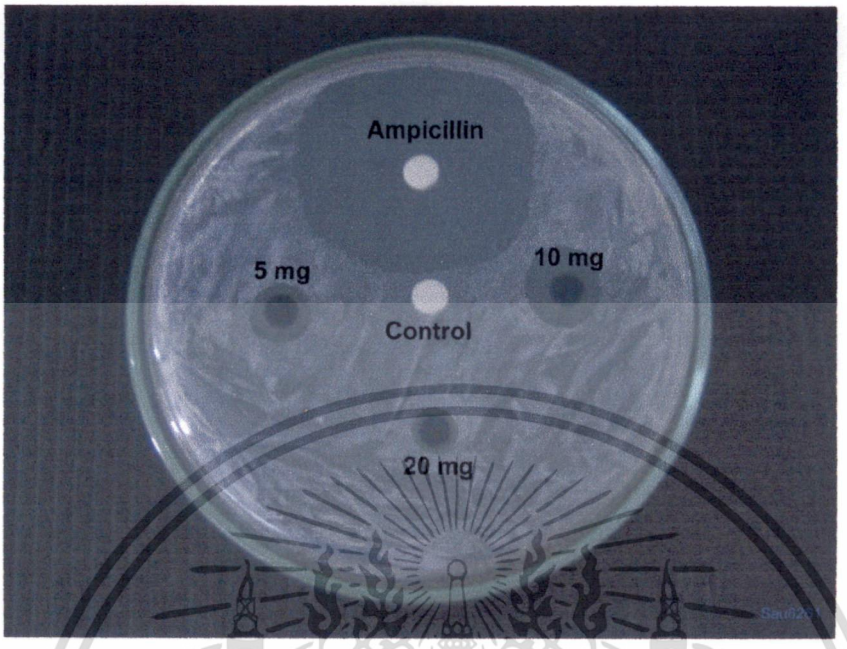


รูปที่ 4.13 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

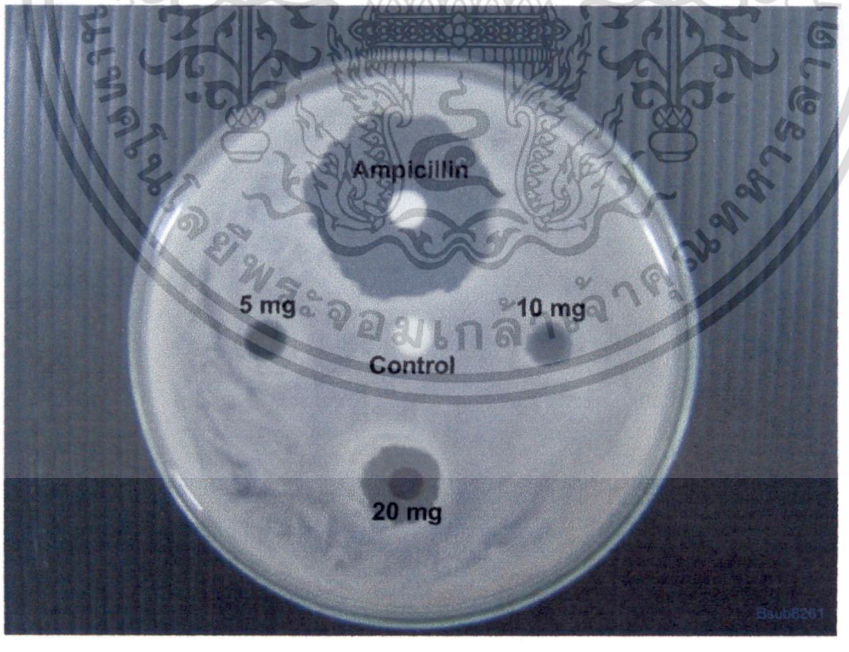


รูปที่ 4.14 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

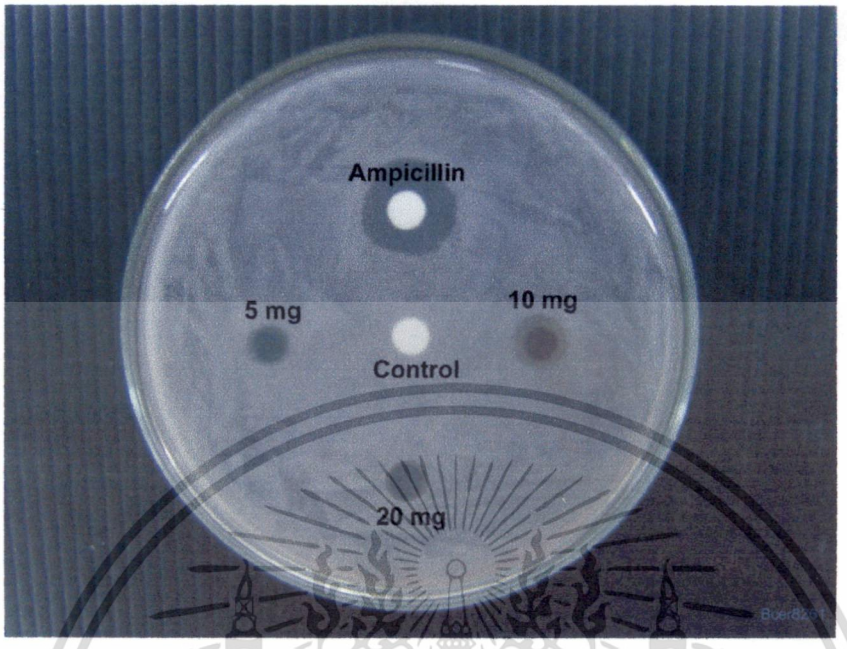


รูปที่ 4.15 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

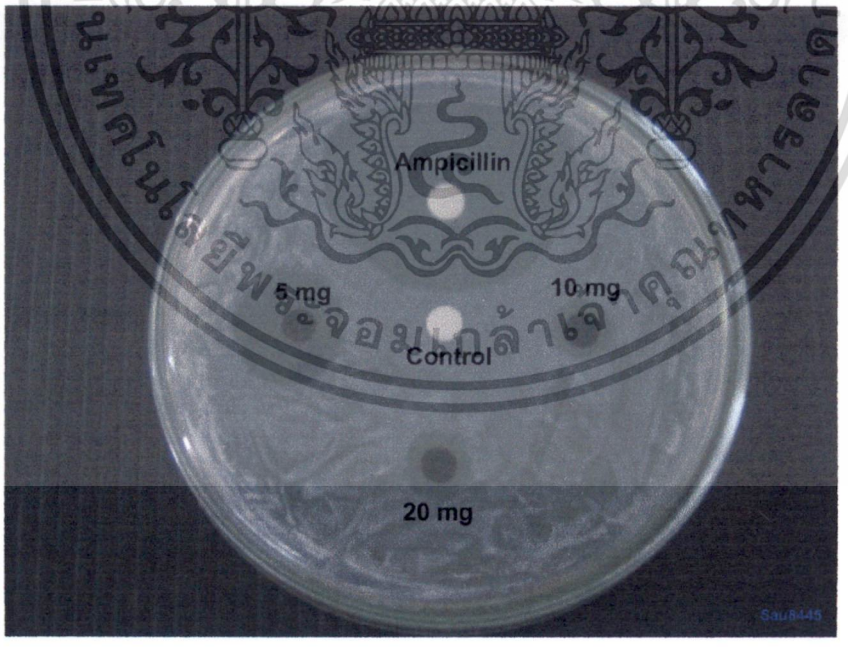


รูปที่ 4.16 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

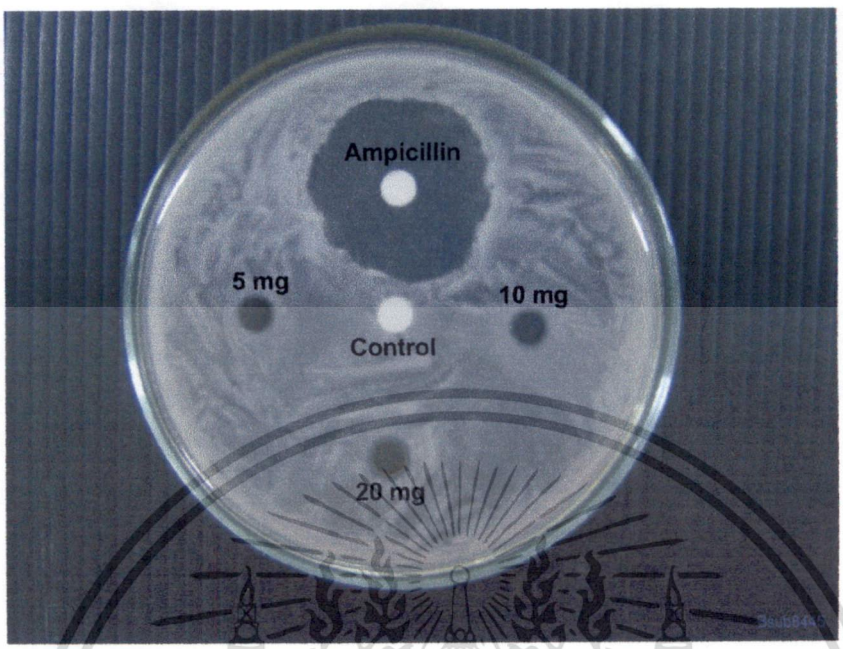


รูปที่ 4.17 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

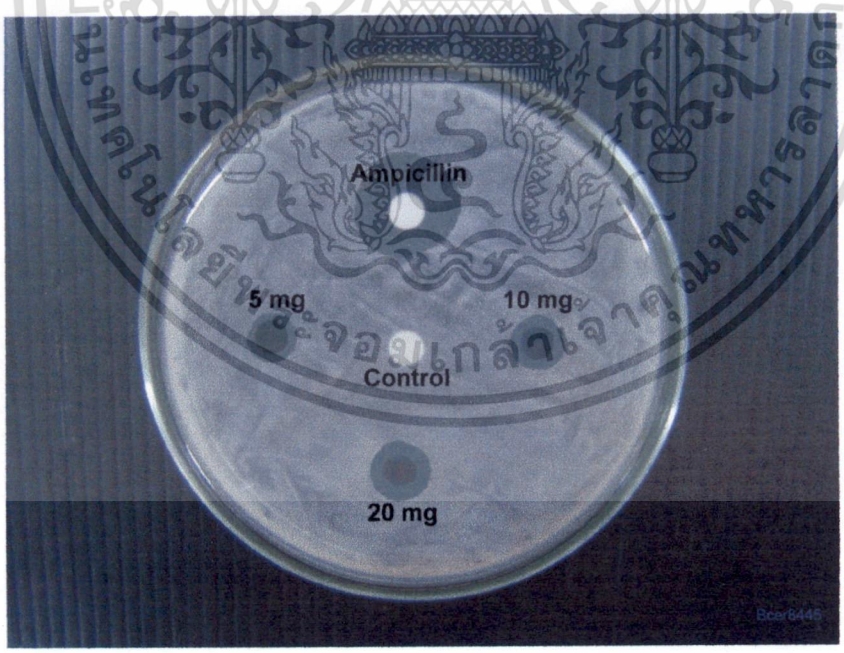


รูปที่ 4.18 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

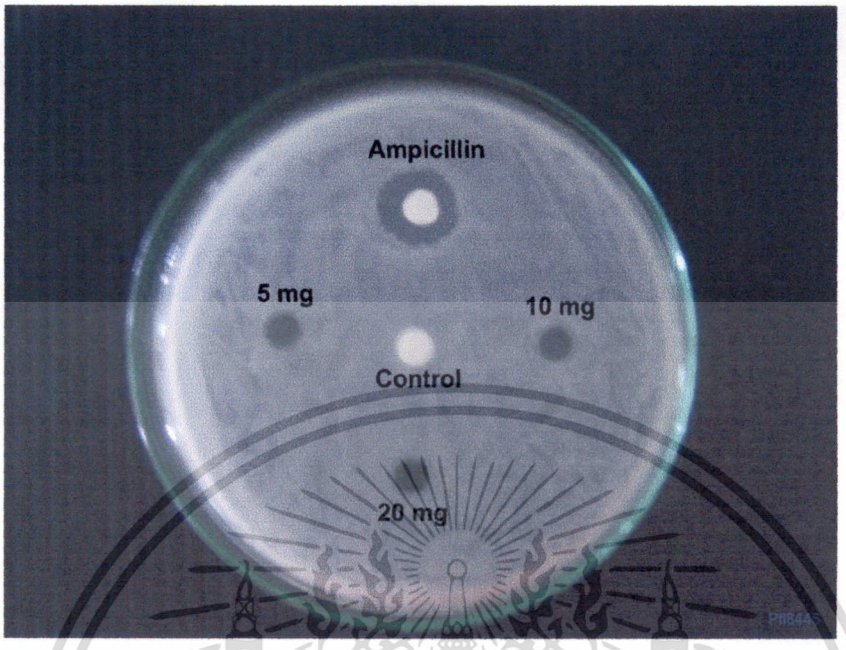


รูปที่ 4.19 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม



รูปที่ 4.20 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Staphylococcus aureus MB 5393 โดยได้จากสารสกัด 22 ชนิด และ 20 ชนิด ตามลำดับ และ Issa (1999) รายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria angustissima* และ *Carothrix parietina* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* และ *S. aureus* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *P.aeruginosa*

สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้น 5 และ 20 มิลลิกรัม ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* sp. 20 มิลลิกรัมส่วนใหญ่แล้วทำให้การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียลดลงยกเว้นสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ส่วนที่ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งในการทดลองของ Chang และคณะ (1993) รายงานว่า สารสกัดจากสาหร่าย *Dunaliella primolecta* ที่ความข้น 40 ไมโครลิตร (0.1 กรัมน้ำหนักสด/มล.) สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, B. subtilis* และ *B. cereus* โดยมีบริเวณยับยั้ง 18.5, 16.0 และ 15.5 มิลลิเมตรตามลำดับ Berry และคณะ (2004) รายงานว่าสารสกัด pahayokolide A จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Lyngbya* sp. Strain 15 – 2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* ได้ดีที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีบริเวณยับยั้ง 32 มิลลิเมตร

4.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

ผลการศึกษาในข้อ 4.2 พบว่าสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. B2 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 10 มิลลิกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุดมีขนาดบริเวณยับยั้ง 16.33 มิลลิเมตร จึงนำสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน 2 สูตร คืออาหารสูตร N-8 ดัดแปลงโดยเพิ่มแหล่งไนโตรเจนเป็นสองเท่าและอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงที่ลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง โดยพบว่าทั้ง 2 สูตรอาหารสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงโดยสารสกัดจาก *Chlorella* sp. B2 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงที่ลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 29 มิลลิเมตร ส่วนในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงที่เพิ่มแหล่งไนโตรเจนเป็นสองเท่า พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน แต่มีขนาดของบริเวณยับยั้งเพียง 13.83 มิลลิเมตร หลังจากวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงพบว่าขนาดของบริเวณยับยั้งลดลงตามลำดับ (ตารางที่ 4.5, รูปที่ 4.22 และ 4.23) จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุดทั้ง 2 สูตรอาหารในวันที่ 6 ของการทดลองหลังจากนั้นความสามารถในการเจริญลดลงตามลำดับซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพภายในเซลล์ได้ในปริมาณหนึ่ง หลังจากนั้นก็ขับออกภายนอกเซลล์

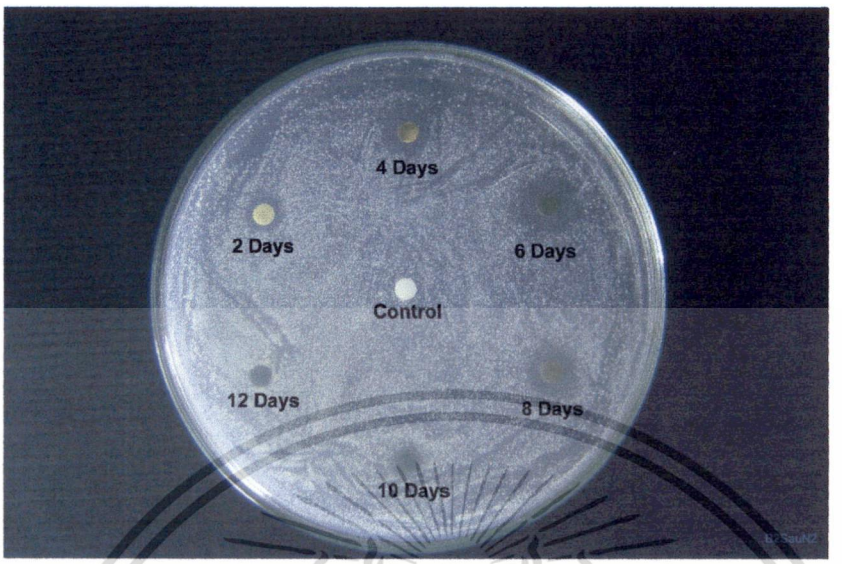
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การยับยั้งการเจริญของ *S.aureus* ด้วยสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม

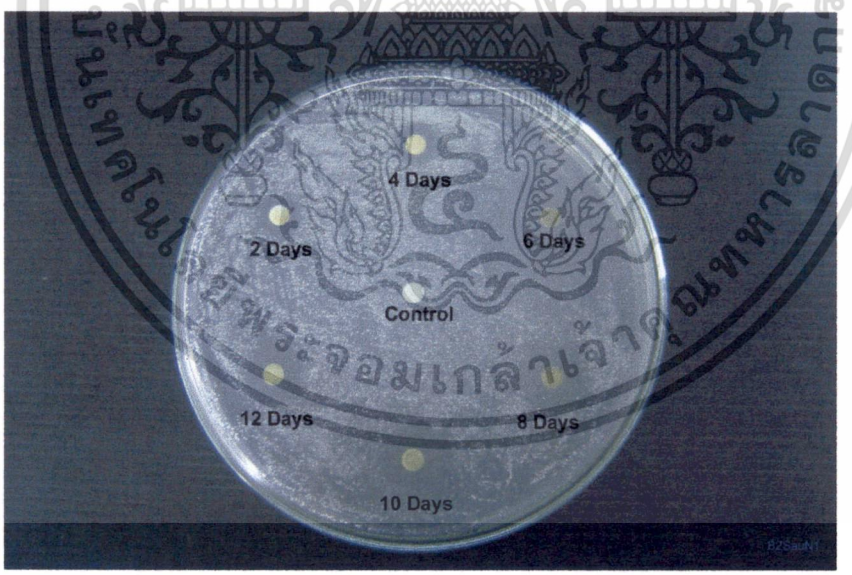
สูตรอาหาร	วันที่					
	2	4	6	8	10	12
N-8 + N2 เท่า	8.83 ± 0.28	12.17 ± 0.57	13.83 ± 1.04	12.17 ± 0.28	8.5 ± 0.50	-
N-8 + ลดธาตุอาหารหลักครึ่งหนึ่ง	10.33 ± 0.57	12.33 ± 0.57	29 ± 1.00	19.83 ± 1.04	20.83 ± 0.76	13.67 ± 0.57

หมายเหตุ - ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



รูปที่ 4.22 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcua aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม ในอาหาร N-8 ที่เพิ่มแหล่งไนโตรเจนเป็นสองเท่า



รูปที่ 4.23 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcua aureus* ด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม ในอาหาร N-8 ที่ลดธาตุอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของสภาพการเลี้ยงในที่นี้คือปริมาณธาตุอาหารทำให้สาหร่าย *Chlorella* sp. สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ในปริมาณที่แตกต่างกันเช่นเดียวกับ Robles และ Ballantine (1999) รายงานว่าการเปลี่ยนสภาพแวดล้อมทางฟิสิกส์ซึ่งในการทดลองคือแสงทำให้เกิดความแตกต่างหรือความหลากหลายของจำนวนสาร metabolite ที่สร้างขึ้น และแสงเป็นปัจจัยในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสาหร่ายสีแดง *Spiridia filamentosa* Issa (1999) รายงานว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria angustissma* และ *Calothrix parietal* สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส Gonzalez และคณะ (2001) ศึกษาผลของสภาวะในการเจริญต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในสภาวะที่ให้ความเครียดและสภาวะธรรมชาติพบว่าการเลี้ยงในสภาวะที่ให้ความเครียดมีแนวโน้มจะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าแต่ไม่ชัดเจนคือแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยสารละลายต่างกัน

ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือ *S. aureus, B. subtilis* และ B. cereus

5.2 ผลการศึกษาหาสายพันธุ์และปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคที่เรียก่อโรค

ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองมาคือสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 13.17, 11.17 และ 11.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Chlorella* sp. B2 และ *C. ellipsoidea* TISTR 8260 มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 17.00, 16.33 และ 14.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม สารสกัดจากสาหร่าย *C. vulgaris* TISTR 8261 สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้ง 13.33 มิลลิเมตรรองลงมาคือ *Chlorella* sp. B2 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 สามารถยับยั้งการเจริญ *S. aureus* มีบริเวณยับยั้ง 12.17 และ 11.50 ตามลำดับ

5.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

อาหารสูตร N-8 ดัดแปลงที่ลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่งโดยเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงมีขนาดของบริเวณยับยั้ง 29 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. สาหร่าย. มหาวิทยลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 102 หน้า.

ชาญเดช วังสะวิบูลย์. 2543. ผลของการใช้ *Chlorella* sp. ในการอนุบาลกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* FABRICIUS) ระยะโพสท์ลาร์วา (พี5 – พี15) วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 73 หน้า.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. 735 หน้า.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรบส์. โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮาส์. กรุงเทพฯ. 411 หน้า.

ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์. 2537. โรคและพยาธิของสัตว์น้ำ. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 497 หน้า.

วนิดา ศรีอินทร์. 2545. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลบางชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและการเป็นสารกันหืน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สรวิศ เผ่าทองศุข. 2543. สาหร่าย "ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย". ชุดโครงการอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ สกว. 20 หน้า.

หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์. 2544. ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Allen, M.B. and Dawson, E.Y. 1960. Production of antibacterial substances by benthic tropical marine algae. J. Bacteriol. 79(3) : 456 – 460.

Beress, A., Wassermann, O., Tahhan, S., Bruhn, T., Beress, L., Kraiselburd, E.N., Gonzalez, L.V., de Motta, G.E., and Chavez, P.I. 1993. A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides and polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosus*. J. Nat. Prod. 56 : 478 – 488. อ้างตาม Schaeffer, D.J. and Krylov, V.S. 2000. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. Ecotoxicol. Environ. Safety. 45 : 208 – 227.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Berry, J.P., Gantar, M., Gawley, R.E., Wang, M. and Rein, k. 2004. Pharmacology and toxiocology of pahayokolide A, a bioactive metabolite from a freshwater species of *Lyngbya* isolated from the Florida Everglades. Com. Biochem. Physiol. 139 : 231 – 238.

Chang, T., Ohta, S., Ikegami, N., Miyata, H., kashimoto, T and Kondo, M. 1993. Antibiotic substances produced by a marine green alga, *Dunaliella primolecta*. Biores. 44 : (149 – 153).

Chen, X., Smith, G. D. and Waring, P. 2003. Human cancer cell (Jurkat) killing by cyanobacterial metabolite calothrixin A. J. Appl. Phycol. 15(4) : 269 – 277.

El – Masry, M.H., Mostafa, H.M., Ibrahim, A.M. and El – Naggar, M.M.A. 1995. Marine algae that display anti – tumorihenic activity against *Agrobacterium tumefaciens*. FEMS. Microbiol. Letter. 128 : 151 – 156.

Gonzalez del Val, A., Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., Vicente, F., Protillo, E., Jimenez del Rio, M., Reina, G.G. and Pelaez, F. 2001. Sceening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). Int. Microbiol. 4 : 35 – 40.

Gouveia, L and Empis, J. 2003. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed : effect of storage conditions. Innovative Food Science and Emergine Technol. 4 : 227 – 233.

Hellio, C., De La Broise, D., Dufosse, L., Le Gal, Y. and Bourgougnon, N. 2001. Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae : potential use for environmentally friendly antifouling paints. Marine Environ. Research. 52 : 231 – 247.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K. and Kratz, K.L. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. Sci. Total. Environ. 225 : 109 – 118.

Imada, N., Kobayashi, K. , Isdmura, K., Saito, H., Imura, S., Tahara, K., Oshima, y., 1992. Isolation and identification of an autoinhibitor produced by *Skeletonema costatum*. Nippon. Suisan. Gakk. 58 : 1687 - 1692. อ้างถึงใน Naviner, M., Berge, J-P., Durand, P. and bris, H.L. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. Aquaculture. 174 : 15 – 24.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Issa, A.A. 1999. Antibiotic production by cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix parietina*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 8 : 33 – 37.

Lee, E.R. 1999. Phycology 3rd ed. Cambridge Univeristy Press. Cambridge.

Naviner, M., Berge, J-P., Durand, P. and Bris, H.L. 1999. Antibacterial activity of marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. Aquaculture. 174 : 15 – 24.

Nezha, S., Mohamed, L., Mohamed, F., and Khadija, F – Z. 2004. Inhibition of growth and mycotoxins formation in moulds by marine algae *Cystoseira tamaricifolia*. African J. Biotechnol. 3(1) : 71 – 75.

Olesen, P.E., Maretzki, A. and Almodovar, A.R. 1964. Aninvestigation of antimicrobial substances from marine algae. Bot. mar. 6 : 224 – 232. อ้างถึงใน Robles Centeno, P.O. and Ballantine, D.L. 1999. Effects of culture conditions on production of antibiotically active metabolites by the marine alga *Spyridia filamentosa* (Ceramiaceae, Rhodophyta). I. Light. J. Appl. Phycol. 10 : 453 – 460.

Pesando, D. and Caram, B. 1984. Screening of marine algae from the French Mediterranean coast for antibacterial and antifungal activity. Bot. Mar. 27 : 381 – 386.

Pratt, R., Daniles, T.C., Eiler, J.J. Gunnision, J.B., Kumler, W.D., Oneto, J.F. and Strait, L.A. 1944. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. Science. 99 : 351 – 352.

Rigos, G., Nengas, I., Alexis, M. and Troisi, G.M. 2004. Potential drug (oxytetracycline and oxolinic acid) pollution from Mediterranean sparid fish farm. Aquatic Toxicol. 69(3) : 281 – 288.

Robles Centeno, P.O. and Ballantine, D.L. 1999. Effects of culture condition on production of antibiotically active metabolites by the marine alga *Spyridia filamentosa* (Ceramiaceae, Rhodophyta). I. Light. J. Appl. Phycol. 10 : 453 – 460.

Schaeffer, D.J. and Krylov, V.S. 2000. Anti – HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. Ecotoxicol. Environ. Safety. 45 : 208 – 227.

Skulberg, O.M. 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. J. Appl. Phycol. 12 (3 – 5) : 341 – 348.

Tanaka, K., Koga, T., Konishi, F, Nakamura, M., Mitsuyama, M., Himeno, k., and Nomoto, K. 1986. Augmentation of host defense by a unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection. Infect. Immun. 53(2) : 267 – 271.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tendencia, E.A. and dela Pena, M.R. 2003. Investigation on some components of the greenwater culture system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria. Aquaculure. 218 : 115 – 119.

Vairappan, C.S. 2003. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodometaceae, Ceramiales). Biomol. Eng. 20 : 255 – 259.

Vairappan, C.S., Suzuk, M., Abe, T. and Masuda, M. 2001. Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawa *Laurencia* speicies. Phytochem. 58 : 517 – 523.

Vlachos, V., Critchley, A.T. and von Holy, A. 1997. Antimicrobial acitivity of extracts from selected southern African marine macroalgae. South African J. Sci. 93 : 328 – 332.

Wisepongpand, P. and kuniyoshi, M. 2003. Bioactive phloroglucinols from the brown alga *Zonaria diesingiana*. J. Appl. Phycol. 15 : 225 – 228.

Witvrouw, M. and De Cleroq, E. 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs Gen. Phamacol. 29 : 497 – 511 อ้างถึงใน Schaeffer, D.J. and Krylov, V.S. 2000. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. Ecotoxicol. Environ. Safety. 45 : 208 – 227.

Xu, N., Fan, X., Yan, X., Li., X., Niu, R. and Tseng, C.K. 2003. Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. Phytochem. 62, 1221 – 1224.

http://bacillus.ask.dyndns.dk/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงสาหร่าย

สูตรอาหาร N-8

$Na_2HPO_4.2H_2O$	260.0	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	740.0	มิลลิกรัม
$CaCl_2$	10.0	มิลลิกรัม
Fe EDTA	10.0	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	50.0	มิลลิกรัม
KNO_3	1000.0	มิลลิกรัม
Trace element mixture	1.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร โดยเติมน้ำไม่มีประจุ (deionized water) ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH หรือ HCl สำหรับอาหารแข็งเติมวุ้นปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi 15 นาที

* Trace element mixture สำหรับอาหาร N-8

$Al_2(SO_4)_3.18H_2O$	3.58	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	12.98	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	1.83	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	3.20	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้