สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจาก *Chlorella* sp.

T047313

นางสาวชลธิชา เรืองเอกพจน์

นายชัยสิทธิ์ ธีระพงษ์รามกุล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2545

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 47313
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2546

ข.....
เ.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Antibacterial activity of extracts from *Chlorella* sp.

Miss Chonticha Ruangekapoj

Mr.Chaiyasit Teepongramkul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจาก *Chlorella* sp.

โดย นางสาวชลธิชา เรืองเอกพจน์
นายชัยสิทธิ์ ธีระพงษ์รามกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. วีนา ชูโชติ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์	
กรรมการ รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ผศ. วีนา ชูโชติ	

.....
(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจาก *Chlorella* sp.

โดย นางสาวชลธิชา เรืองเอกพจน์

นายชัยสิทธิ์ ธีระพงษ์รามกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2545

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. วีนา ชูโชติ

บทคัดย่อ

สารสกัดจาก *Chlorella* sp. 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 , *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* , *Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. โดยใช้แผ่นทดสอบ พบว่า *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยวิธีลำดับส่วนโดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน , ไดคลอโรมีเทน , คลอโรฟอร์ม และเมทานอลนั้น ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ปริมาณมากที่สุดคือ 0.2653 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ สารสกัดจาก *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้ดีที่สุด มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 24.93 มิลลิเมตร และสารสกัดจาก *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 19.50 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดจาก *Chlorella* sp. TISTR 8445 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดใดได้เลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special project title	Antibacterial activity of extracts from *Chlorella* sp.
Name	Miss Chonticha Ruangekapoj
	Mr. Chaiyasit Teepongramkul
Depratment	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2002
Special Project Advisor	Asst. Prof. Weena Choochote

Abstract

The extracts from 3 strains of *Chlorella* sp , i.e., *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 , *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 and *Chlorella* sp.TISTR 8445 were tested for antibacterial activity against 5 genera of bacteria : *Bacillus subtilis* , *Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. using peper disc method. *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 was extracted by sequencial extraction with hexane ,dichloromethane, chloroform and methanol respectively . The highest yield of the extract (0.2653 g/g dry weight) was obtained from dichloromethane solvent. It was found that the algal extract (4 mg/disc) from *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 strongly inhibited the growth of *Bacillus subtilis* (inhibition zone of 24.93 mm.) and *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 strongly inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* (inhibition zone of 19.50 mm.). No activity was detected from the extract of *Chlorella* sp. TISTR 8445.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ. วีนา ชูโชติ รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง และรศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำตลอดการดำเนินงานและช่วยตรวจแก้ไขรูปเล่มโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน พี่พงศ์ธรที่ช่วยเหลือในทุกๆเรื่องตั้งแต่เริ่มดำเนินงานด้วยดีตลอดมา นอกจากนี้ยังมีบิดา มารดา และผู้มีพระคุณ ที่กรุณาอบรมสั่งสอนและอุปการะผู้จัดทำให้ศึกษาจนสำเร็จได้ด้วยดี

ชลธิชา เรืองเอกพจน์

ชัยสิทธิ์ ธีระพงษ์รามกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 สาหร่าย *Chlorella* sp.	3
2.2 ประโยชน์ของสาหร่าย *Chlorella* sp.	4
2.3 วิธีการคัดเลือกพันธุ์สาหร่าย	5
2.4 การเก็บรักษาสาหร่าย	6
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย	7
2.6 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายชนิดต่างๆ	7
2.7 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจาก *Chlorella* sp.	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1 อุปกรณ์	12
3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย	13
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	
4.1 ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่าย *Chlorella* sp.	18
4.2 ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 34
เอกสารอ้างอิง 36
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย 40
ภาคผนวก ข. ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยสารออกฤทธิ์ 41
ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp.
ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 47

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 แสดงปริมาณน้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. 18

4.2 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ 20

4.3 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดโดยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 24

4.4 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดโดยตัวทำละลายเฮกเซน 25

4.5 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดโดยตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม 26

4.6 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดโดยตัวทำละลายเมทานอล 27

4.7 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดโดยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 28

4.8 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่าย *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดโดยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 29

ข-1 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ 41

ข-2 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ 41

ข-3 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม ที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

ข-4 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยสารออกฤทธิ์ 42
ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลาย
คลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ
ข-5 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยสารออกฤทธิ์ทาง 43
ชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลาย
เมทานอลที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ
ข-6 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* โดยสารออกฤทธิ์ 43
ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลาย
เมทานอลที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ
ข-7 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยสารออก 44
ฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัว
ทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ
ข-8 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยสารออกฤทธิ์ 44
ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลาย
เมทานอลที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ
ข-9 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยสารออกฤทธิ์ทาง 45
ชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ในตัวทำละลาย
ไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ
ข-10 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยสารออก 45
ฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ในตัวทำละลาย
ไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ
ข-11 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยสารออก 46
ฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ในตัวทำละลาย
ไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ
ค-1 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ โดยสาร 47
สกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่ใช้ ไดคลอโรมีเทน
เป็นตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

ค-2 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่ปริมาณสารสกัด 1 ,2 ,3และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่ใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย 48

ค-3 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่ใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย 49

ค-4 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ปริมาณสารสกัด 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบโดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่ใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย 50

ค-5 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย 51

ค-6 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ปริมาณสารสกัด 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบโดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย 52

ค-7 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด 53

ค-8 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ปริมาณ 4 มิลลิกรัม ซึ่งมี เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และ เมทานอล เป็นตัวทำละลาย 54

ค-9 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่ใช้ไดคลอมีเทนเป็นตัวทำละลาย 55

ค-10 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่ปริมาณสารสกัด 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่ใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

ค-11 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ จากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 57

ค-12 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยสารสกัดจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่ใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย 57

ค-13 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม ต่อแผ่นทดสอบจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 59

ค-14 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยสารสกัดจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่ใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย 59

ค-15 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม ต่อแผ่นทดสอบจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 61

ค-16 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus* aureus โดยสารสกัดจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ซึ่งใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย 61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
3.1	สาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ในหลอดอาหารเอียง	13
3.2	สาหร่าย *Chlorella* sp. ในหลอดเพาะเลี้ยงขนาด 300 มิลลิลิตร	14
3.3	แสดงการทำให้เซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. แตกด้วยเครื่อง sonicator	14
3.4	แสดงการเปรียบเทียบเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. ก่อนทำให้เซลล์แตก และหลังทำให้เซลล์แตก	
3.5	การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ด้วยวิธี sequencial extraction ในกรวยแยก	16
3.6	การทำให้สารสกัดแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator	16
4.1	ผลจากสารสกัดของ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยเฮกเซนในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*	30
4.2	ผลจากสารสกัด *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*	30
4.3	ผลจากสารสกัด *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*	31
4.4	ผลจากสารสกัด *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยเมทานอลในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*	31
4.5	ผลจากสารสกัด *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์	32
4.6	ผลจากสารสกัดของ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureua*	32
4.7	ผลจากสารสกัดของ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa*	33
4.8	ผลจากสารสกัดของ *Chlorella* sp.TISTR 8445 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

สาหร่ายถูกนำมาใช้ประโยชน์มากมายหลายด้าน อาทิเช่น ใช้เป็นอาหารมนุษย์ ซึ่งปัจจุบันนิยมนำสาหร่ายมาเป็นอาหารเสริมสุขภาพ มีทั้งในรูปแบบสาหร่ายแห้งอัดเม็ด สาหร่ายในแคปซูล ซึ่งใช้เป็นแหล่งโปรตีนแทนอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ และ ถั่วเหลือง แต่การนำสาหร่ายมาเป็นอาหารมนุษย์นั้นมีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง เพราะจะต้องสะอาดปราศจากสารเคมีอันตรายปนเปื้อน ปัญหาสิ่งตกค้างในสาหร่ายเช่น โลหะหนักพวกปรอท ตะกั่ว และสารโพลีไซคลิกอะโรเมติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon) นอกจากนี้สาหร่ายยังถูกใช้ประโยชน์ในด้านอาหารสัตว์ ปุ๋ย สีผสมอาหาร รวมทั้งใช้เป็นยาปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นประโยชน์ทางเภสัชกรรม และ เครื่องสำอาง (สรวิศ , 2543)

ในอเมริกามีคนสนใจ *Chlorella* ในแง่สารต้านพิษ มีการทดลองใช้สารพิษไฮโดรคาร์บอนคลอดีโคนกับสัตว์ทดลองแล้วให้กิน *Chlorella* ผลการทดลองปรากฏว่า *Chlorella* สามารถหยุดยั้งปฏิกริยาของคลอดีโคนในกระแสเลือดแล้วขับออกจากร่างกายจนหมด จึงสรุปได้ว่า *Chlorella* สามารถใช้เป็นสารต้านพิษได้อย่างดี ไม่เฉพาะแต่ทำลายพิษของคลอดีโคนได้เท่านั้น แต่ยังสามารถทำลายสารพิษในกลุ่มเดียวกัน เช่น ไดออกซิน (วิสัย , 2536) ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีว-เคมีของเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะการเกิดเซลล์มะเร็ง และเป็นอันตรายต่อการทำงานของตับ (ข่าวชมรมเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมเพื่อธุรกิจ , 2542)

มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella pyrenoidosa* พบว่าสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เรียกว่า Chlorellin ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* , *Streptococus pyogenes*, *Bacillus subtilis* , *Bacterium coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Pratt; et. al. 1944) และมีรายงานการคัดแยกสาหร่ายทะเลเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้ไม่มีผลต่อ *E. coli* แต่สารสกัดจากสาหร่ายถึง 7 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ซึ่งได้แก่ *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 *Phorphyridium* sp. HS-366 (Chang; et. al. 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากเหตุผลและความสำคัญดังกล่าว จึงทำการศึกษาสายพันธุ์ของสาหร่าย วิธีการสกัดและความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสม เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียซึ่งก่อให้เกิดโรค โดยใช้สารสกัดจาก *Chlorella* นับว่าเป็นอีกหนทางหนึ่งในการใช้ประโยชน์จากสาหร่าย

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาหาสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณสูง
3. เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้สารสกัดเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย
4. เพื่อหาตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสูงในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Chlorella* sp.
5. เพื่อศึกษาว่าสารสกัดจาก *Chlorella* sp.สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดใดได้บ้าง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp.ในอาหารสูตร N-8 จากนั้นนำสาหร่ายที่เลี้ยงได้มาทำให้เซลล์แตกเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด รวมทั้งความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้สารสกัด โดยแปรผันสายพันธุ์สาหร่ายต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย
2. ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
3. ทราบถึงสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp.ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ปริมาณสูง
4. ทราบถึงตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
5. ทราบว่าสารสกัดที่ได้สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใดได้บ้าง
6. เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 สาหร่าย *Chlorella* sp.

ในปี 1890 เอ็ม.ดับบลิว.ไบเจอร์นิก นักวิทยาศาสตร์ชาวดัทช์ได้ทำการศึกษาสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดหนึ่ง ซึ่งทำให้น้ำใสในสระกลายเป็นสีเขียวได้เร็วมาก เขาตั้งชื่อสาหร่ายที่พบใหม่ว่า คลอเรลลา ซึ่งมาจากภาษากรีกคือ "คลอรอส" ซึ่งแปลว่าสีเขียว กับ "เอลลา" ซึ่งแปลว่าเล็ก สาหร่ายคลอเรลลาที่คร. ไบเจอร์นิกพบเป็นครั้งแรกนี้คือ *Chlorella vulgaris* (วิสัย , 2536) ซึ่ง *Chlorella* sp. จัดเป็นสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดแรกที่ถูกแยกออกมาเป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) (สรวิศ , 2543)

สาหร่าย *Chlorella* sp. จัดอยู่ใน Division Chlorophyta , Class Chlorophyceae , Order Chlorellales (กาญจนภาชน์ , 2527) เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวรูปร่างกลม มีขนาดเล็กมากมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น มีเส้นผ่าศูนย์กลางเพียง 5 ไมโครเมตร (สรวิศ , 2543) หรือ 0.000195นิ้ว หรือ 0.006 มิลลิเมตร คือมีขนาดเท่ากับเม็ดเลือดแดงของเราเท่านั้น (สุเทพ , 2530) สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศอย่างเดียว โดยการสร้างออโตสปอร์ มีจำนวน 4 , 8 หรือ 16 แต่ละสปอร์มีลักษณะเหมือนเซลล์แม่ทุกประการ บางทีเรียกสปอร์เหล่านี้ว่า แอพลาโนสปอร์ (aplanospore) เมื่อหลุดออกจากเซลล์แม่จะเจริญเป็นเซลล์ใหม่ที่มีจำนวนโครโมโซมเดี่ยว (haploid) (สุเทพ ,2530) มีคลอโรพลาสต์เป็นแบบแถบข้างเซลล์ (parietal) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าประกอบด้วยไทลาคอยด์ (thylakoid) เรียงซ้อนกันเป็นชั้น เรียกกรานา (grana) และมีไพรีนอยด์ 1 อันซึ่งเป็นแหล่งสะสมอาหารอยู่บนคลอโรพลาสต์ รงควัตถุสังเคราะห์แสงอยู่ในคลอโรพลาสต์ประกอบด้วยคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แอลฟา เบตา และแกมมาแคโรทีน (α , β และ γ - carotene) รวมทั้งแซนโทฟิลล์หลายชนิด (กาญจนภาชน์ , 2527) ไม่มีแฟลกเจลลา มีโคมาโตฟอร์รูปถ้วย 1 อัน สามารถเจริญได้ในที่มืด (Round , 1973 อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ , 2540) บางครั้งพบอาศัยอยู่กับสัตว์อื่น เช่น *Paramecium bursaria* และ *Hydra varidis* (Bold and Wynne , 1978 อ้างถึงในทวีศักดิ์ , 2540)

Chlorella sp. มีผนังเซลล์ที่หนา ทำให้ไม่สามารถย่อยและดูดซึมได้ในกระเพาะอาหาร ดังนั้นผลผลิตของสาหร่าย *Chlorella* sp. จำเป็นต้องผ่านกระบวนการพิเศษเพื่อบดหรือย่อยให้ผนังเซลล์แตกออกก่อน ส่วนใหญ่ผลิต *Chlorella* เป็นการค้าในประเทศไต้หวัน โดยมีจุดขายคือมีปริมาณโปรตีนสูง (ประมาณร้อยละ 55-60) มีเบตาแคโรทีน และมี Chlorella Growth Factor (CGF) ที่เป็นสารช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต (สรวิศ , 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ประโยชน์ของสาหร่าย *Chlorella* sp.

ในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ญี่ปุ่นได้อาศัย*Chlorella* sp.เป็นอาหาร นอกจากนี้ *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายที่นิยมใช้ในการทดลอง เช่น ทดลองเกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง ในโครงการอวกาศก็มีการค้นคว้าเพื่อนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์อวกาศ (สุเทพ , 2530)

เนื่องจาก *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีขนาดเล็กมาก มีแพร่หลายอยู่ทั่วไปและเจริญได้อย่างรวดเร็วจึงมีประโยชน์มาก คือมีความสำคัญในฐานะเป็นผู้ผลิตของแหล่งน้ำ เพราะสามารถนำพลังงานแสงมาใช้ในการสังเคราะห์อาหารที่มีประโยชน์ได้โดยตรงต่อการดำรงชีวิต เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ดังนั้นจึงถือเป็นจุดเริ่มของห่วงโซ่อาหารสำหรับซูโอแพลงก์ตอน และตัวอ่อนของสัตว์ทะเลต่างๆ เช่น ตัวอ่อนของปู กุ้ง ปลา หอยต่างๆ และยังมีการนำเอา *Chlorella pyrenoidosa* และ *Chlorella vulgaris* มาเป็นอาหารเลี้ยงปลาคาร์พ (crucian carp) ซึ่งหลังจากการเลี้ยงได้ นำเนื้อปลาคาร์พมาวิเคราะห์ทางชีวเคมีพบว่ามีโปรตีนเพิ่มขึ้น 0.50-7.05 เปอร์-เซนต์ของน้ำหนักเปียก ไขมันเพิ่มขึ้น 14.30-54.01 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังทำให้ปลามีความอุดมสมบูรณ์เช่นเดียวกับการเลี้ยงด้วยโปรตีนจากยีสต์ หรือจากแพลงก์ตอนชนิดอื่น (Antsyshkina ; et. al. 1966 อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ , 2540) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการเจริญของไก่จะดีขึ้นเมื่อได้รับไรโบฟลาวิน แคโรทีน และวิตามิน ซึ่งสารเหล่านี้สามารถพบได้ใน *Chlorella* sp. และเมื่อไม่นานมานี้พบว่าเมื่อนำเอา *Chlorella* sp. มาผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงหนูจะทำให้หนูเจริญได้ดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากมีกรดอะมิโนพวกไลซีน (lysine) ทรีโอนีน (threonine) อยู่ (Tiffany , 1958 อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ , 2540)

สำหรับประโยชน์ที่มนุษย์นำมาใช้โดยตรงนั้น ได้แก่ นำมาเป็นอาหาร จากการศึกษาพบว่ามีกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อมนุษย์หลายชนิด ได้แก่ ไอโซลิวซีน (isoleusine) ลิวซีน (leusine) วาลีน (valine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ทรีโอนีน (threonine) ไลซีน (lysine) เป็นต้น (Dittmer , 1964 อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ , 2540) จึงได้มีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลาย เช่น ไต้หวัน ญี่ปุ่น โดยเฉพาะญี่ปุ่นได้นำมาใช้เป็นเครื่องปรุงรส อันประกอบด้วยวิตามินและโปรตีน ซึ่งมีราคาสูงมาก (Ravan ; et. al. 1976 อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ , 2540) นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านกำจัดน้ำเสีย โดยอาศัยออกซิเจนอันเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของ *Chlorella* sp.มาช่วยทำให้แบคทีเรียย่อยสลายสารอินทรีย์ในแหล่งน้ำได้ดี (Khan , 1970 อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ , 2540) ทางด้านการแพทย์ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella pyrenoidosa* พบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวก และแกรมลบได้ เช่น *Staphylococcus aureus* , *Streptococcus pyogenes* , *Bacillus subtilis* , *Bacterium coli* และ *Pseudomonas pyocyanea* (Pratt; et. al. 1944)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ขั้นตอนการคัดแยกสายพันธุ์สาหร่าย

การคัดเลือกพันธุ์สาหร่ายนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้สาหร่ายที่บริสุทธิ์ (pure culture) เพื่อนำไปศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน สัณฐานวิทยา หรือนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (สุนีย์ , 2524 อ้างถึงใน พงศ์ธร และคณะ , 2544)

1. วิธีการล้างเซลล์

หลักการของวิธีนี้คือ การล้างเซลล์สาหร่ายหลายๆ ครั้งในน้ำที่บริสุทธิ์จนกระทั่งแบคทีเรียและไวรัสหลุดออกไป ในการทดสอบว่าสาหร่ายที่ได้บริสุทธิ์หรือไม่นั้นจะใช้วิธีเพาะเชื้อในอาหารวุ้นที่มีอาหารสำหรับแบคทีเรียและไวรัส เกลี่ยหยดสาหร่ายให้ทั่วหน้าวุ้นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องให้แสงสว่างพอประมาณ ถ้าผ่านไป 2 สัปดาห์ ไม่มีแบคทีเรียหรือไวรัสที่อุณหภูมิห้องแสดงว่าสาหร่ายที่ทดสอบเป็นเชื้อบริสุทธิ์ (สุนีย์ , 2524 อ้างถึงใน พงศ์ธร และคณะ , 2544)

2. วิธีเพาะบนจานอาหารวุ้น

วิธีการนี้เตรียมอาหารในจานเพาะเชื้อโดยใช้วุ้นผง 1.5 เปอร์เซ็นต์ ต้มกับอาหารที่เลี้ยงสาหร่าย โดยอาหารที่ผสมนี้ต้องนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ถึง 20 นาที จึงนำมาเทลงในจานเพาะเชื้อให้หนาประมาณ 3 ถึง 5 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้เย็นจนแข็ง จากนั้นหยดน้ำตัวอย่างลงไป ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ลนไฟแล้วเกลี่ยให้กระจายทั่ววุ้น (spread plate technique) ตั้งทิ้งไว้ให้แสงประมาณ 2,000 ลักซ์ ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สังเกตลักษณะสาหร่ายจะขึ้นเป็นโคโลนีสีเขียว ถ้ามีแบคทีเรียในน้ำตัวอย่างแบคทีเรียจะขึ้นปะปนด้วย ให้ใช้ลูป (loop) ลนไฟเขี่ยกลุ่มสาหร่ายที่ไม่มีแบคทีเรียไปเขี่ยบนอาหารวุ้นใหม่ (cross streak technique) เพาะไว้อีกจนเห็นสาหร่ายเป็นจุดสีเขียวไม่มีกลุ่มของแบคทีเรีย ทำอย่างนี้ 3 ถึง 4 ครั้ง จนแน่ใจว่าสาหร่ายที่ได้บริสุทธิ์ จึงนำมาถ่ายเชื้อบนหลอดอาหารเอียง (agar slant) เก็บไว้ใช้งานต่อไป ซึ่งวิธีนี้ใช้ได้เฉพาะสาหร่ายที่เจริญได้บนอาหารวุ้นเท่านั้น เช่น *Chlorella* sp. (สุนีย์ , 2524 อ้างถึงใน พงศ์ธร และคณะ , 2544)

2.4 การเก็บรักษาสาหร่าย

การเก็บรักษาเชื้อสาหร่ายมักใช้วิธีการถ่ายเชื้อ ในทางปฏิบัติไม่นิยมเก็บรักษาด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง สาหร่ายหลายชนิดสามารถเจริญได้หลังจากทำแห้งแบบเยือกแข็ง 24 ชั่วโมง แต่ระดับการรอดชีวิตต่ำกว่าร้อยละ 1 และจะลดต่อไปเมื่อเก็บไว้นาน (สมบูรณ์ , 2539)

การถ่ายเชื้อสาหร่ายแม้จะเป็นวิธีการง่ายๆแต่ก็ไม่ดี เพราะจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุ-กรรมของบางสายพันธุ์ระหว่างการเลี้ยงยาวนาน ในทางปฏิบัติแต่ละสายพันธุ์จะแสดงความต้องการแตกต่างกัน ทั้งต่อแสง อุณหภูมิ พีเอช และชนิดของสารอาหาร มีทั้งกลุ่มที่ต้องการแสงมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อการสร้างรงควัตถุจนถึงพวกที่ไม่มีสี อย่างไรก็ตามการเจริญที่ดีต้องอาศัยอาหารพื้นฐานสามชนิดอย่างใดอย่างหนึ่ง ได้แก่อาหารไบฟาสิก (biphasic media) เป็นส่วนผสมของดินกับน้ำ อาหารเหลวและอาหารแข็งทั้งจานวุ้นหรือวุ้นเอียง การเลือกอาหารที่เหมาะสมต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่าง เช่น สถานภาพของสาหร่ายที่มีจุลินทรีย์อื่นเกี่ยวข้อง เมื่อเลี้ยงในอาหารเกลือแร่อาจได้รับสารอาหารที่จุลินทรีย์อื่นสร้างให้ การเจริญของสาหร่ายเพิ่มขึ้นอาจเป็นเพราะการเติมสารอินทรีย์ลงไปในอาหาร ซึ่งได้จากส่วนสกัดของดินและพืช สารอินทรีย์มากกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ นั้นเหมาะสมเฉพาะสายพันธุ์ซึ่งแยกจากอาหารที่ปราศจากแบคทีเรีย

สาหร่ายส่วนใหญ่ไม่ต้องการแสงมากนัก และสามารถใช้หรืออาจมีความต้องการจำเพาะต่อแหล่งอินทรีย์คาร์บอนภายนอก เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ไดอะตอม คลอโรคอกคลาเลส มีความต้องการน้ำตาล บางสปีชี่ส์ใช้กรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์แบบง่าย

แสงจำเป็นต่อสาหร่ายที่สังเคราะห์แสง หลอดฟลูออเรสเซนต์และหลอดไฟชนิดกระเปาะให้แสงได้เหมาะสมเหมือนกับแสงอาทิตย์ แต่ต้องหลีกเลี่ยงความร้อนที่เกินพอ ทั้งจากแหล่งแสง หรือการวางเชื้อโดยตรงต่อแสงอาทิตย์

เชื้อแต่ละชนิดมีความต้องการอุณหภูมิเฉพาะแตกต่างกัน สาหร่ายน้ำจืดส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ 20 องศาเซลเซียส การรวบรวมเชื้อใหม่โดยเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ และความเข้มของแสงต่ำกว่าปกติจะทำให้เชื้อเจริญต่อไปได้เพียงพอ แต่อัตราการเจริญต่ำลงจึงไม่ต้องต่อเชื้อหลายครั้ง การเลี้ยงเชื้อในห้องที่เปิดเผยต่อแสงและอุณหภูมิประมาณ 15 องศาเซลเซียสก็เหมาะสม (สมบูรณ์ , 2539)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย

การเลี้ยงสาหร่ายเพื่อการศึกษาการเจริญเติบโตไม่มีข้อจำกัดในแง่ของคาร์บอนไดออกไซด์หรือสารอาหารต่างๆ เมื่อเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิคงที่จะได้กราฟการเจริญเติบโตเหมือนจุลินทรีย์อื่นๆ (David ; et. al. 1964 อ้างถึงใน วีนา , 2542)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต คือ

1. ความเข้มแสง ถ้าทำการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* ที่สภาพอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ควรจะได้รับความเข้มแสงอย่างน้อย 100 แรงเทียน และความเข้มแสงสูงสุดประมาณ 400 แรงเทียน

2. อุณหภูมิในการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* แต่ละชนิดจะเจริญได้ดีในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

3. ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์

4. Autoinhibitor สาหร่ายมีการเจริญลดลงเมื่อถูกทิ้งไว้นาน เนื่องจากมีการสะสมของเสียที่ถูกขับมาจากเซลล์ แต่ปัญหานี้พบได้น้อยเพราะสาหร่ายมีการสังเคราะห์แสงสูง และมีระดับของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การขับถ่ายต่ำ นอกจากนี้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* สามารถขับสาร Chlorellin ออกมาภายนอกเซลล์ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิดอื่นๆ

5. ความเป็นกรดเป็นด่าง สภาพความเหมาะสมของความเป็นด่าง คือ 6.0 ถึง 6.5

6. สายพันธุ์ของสาหร่าย ซึ่งจะเป็นลักษณะเฉพาะของสาหร่าย

2.6 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายชนิดต่างๆ

มีการค้นพบว่าสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella pyrinoidosa* นั้นสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิดได้แก่ *Bacillus subtilis* , *Bacterium col* , *Staphylococcus aureus* , *Streptococcus pyogenes*และ*Pseudomonas aeruginosa* (Pratt ; et. al.1994) และเรียกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้ว่า คลอเรลลิน (Chlorellin) (Pratt ; et. al. 1944) ซึ่งมีลักษณะเป็นยางเหนียว สีน้ำตาล หรือสีเข้ม (Berdy ; et. al. 1982) ประกอบด้วยคาร์บอน 77.35 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 11.66 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 10.99 เปอร์เซ็นต์ (ทวีศักดิ์ , 2540 อ้างจาก Smith , 1951) Chang; et. al. (1993) รายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่ายเป็นสารประกอบในกลุ่ม กรดไขมัน (fatty acid) เทอร์พีน (terpenes) สารประกอบคาร์บอนิล (carbonyl compound) และโบรโมฟีนอล (bromophenol)

Rao and Prekh (1981) พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่ายในประเทศอินเดียจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ ซึ่งในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดออกมา (crude extract) เมื่อมีการเติมสารประกอบจำพวก phenol fatty acid และ unsponifiable lipid component จะมีผลให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบได้ด้วย

มีการทดลองใช้สารสกัดของ *Chlorella vulgaris* ยับยั้งการติดเชื้อ murine cytomegalovirus (MCMV) ในหนูขาว พบว่าหลังจากใช้สารสกัดจาก *Chlorella vulgaris* 10 มิลลิกรัม ในเวลา 3 วัน สามารถป้องกันการติดเชื้อ MCMV ได้ (Kazuhiko; et. al. 1990 อ้างถึงใน ชาญเดช ,2543)

ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* FABRICIUS) ระยะโพสต์ลาร์วา (พี5 – พี15) ในน้ำที่มี *Chlorella* sp. และไม่มี *Chlorella* sp. ที่ให้อาหารมีชีวิต (อาร์ทีเมีย) และอาหารไม่มีชีวิต (ไข่ผสมนมผงตุ๋น) เพื่อศึกษาอัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต และความแข็งแรงของลูกกุ้ง พบว่าอัตราการรอดตาย และความแข็งแรงของลูกกุ้งที่ให้อาร์ทีเมียเป็นอาหาร ในน้ำที่มี *Chlorella* sp. (เริ่มต้น 2 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และไม่มี *Chlorella* sp. ไม่มีความแตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญเติบโตในน้ำที่มี *Chlorella* sp. มีมากกว่า ส่วนลูกกุ้งที่เลี้ยงด้วยไข่ผสมนมผงตุ๋น พบว่าเมื่อเลี้ยงในน้ำที่มี *Chlorella* sp. (เริ่มต้น 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) มีอัตราการรอดตายมากกว่าลูกกุ้งที่เลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในน้ำที่ไม่มี *Chlorella* sp. ส่วนการเจริญเติบโตทางด้านความยาวและน้ำหนักของลูกกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มี *Chlorella* sp. มีมากกว่าลูกกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่ไม่มี *Chlorella* sp. นอกจากนี้ ลูกกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มี *Chlorella* sp. ยังมีความแข็งแรงมากกว่าลูกกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่ไม่มี *Chlorella* sp. ซึ่งพิจารณาจากอัตราการรอดตายหลังแช่ฟอร์มาลิน 200 พีพีเอ็ม ในเวลา 1 ชั่วโมง (ชาญเดช , 2543) และยังพบว่ามีสารประกอบพวกไกลโคโปรตีน ที่สกัดจาก *Chlorella* sp. โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 1.21×10^5 ประกอบด้วยอัตราส่วนของน้ำตาลต่อโปรตีน เท่ากับ 1: 1 มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (antitumer) ในสมองโดยมี (Matsueda; et. al. 1992 อ้างถึงใน ชาญเดช , 2543)

Olesen ;et.al. (1964 อ้างถึงใน Pedro; et. al. 1999) กล่าวว่าสาหร่ายแต่ละชนิดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์แตกต่างกันออกไปตามสารประกอบที่สกัดได้จากสาหร่ายชนิดนั้นๆ

Robles ;et.al. (1996 อ้างถึงใน Pedro; et. al. 1999) พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่ายนั้น ประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆมากมาย และมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแตกต่างกันออกไป ซึ่งขึ้นอยู่กับ แหล่งที่อยู่ ฤดูกาล และเวลาในการเก็บเกี่ยวสาหร่าย

Pesando and Caram (1984) ทดลองสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทะเล (Rhodophyceae , Phaeophyceae และ Chlorophyceae) พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งเชื้อราซึ่งเป็นตัวก่อให้เกิดโรคได้ โดยทำการสกัดจากสาหร่ายทะเล 31 ชนิด พบว่าสาหร่ายสีน้ำตาล 3 ชนิด คือ *Zanardinia prototypus* , *Cystoseira stricta* และ *Cystoseria compressa* ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียเช่น *Staphylococcus aureus* , *Staphylococcus epidermidis* และ *Micrococcus luteus* และสาหร่ายสีน้ำตาล 3 ชนิด คือ *Dictyota dichotoma* , *Dictyota lineris* และ *Dilophus fasciola* ให้ผลในการยับยั้งเชื้อรา เช่น *Aspergillus fumigatus* , *Sporothrix schenkii* และ *Microsporum fulvum* ส่วนที่เหลืออีก 5 ชนิดคือสาหร่ายสีแดง 3 ชนิดคือ *Hypnea musciformis* , *Falkenbergia rufolanosa* และ *Laurencia obtusa* และสาหร่ายสีน้ำตาลอีก 2 ชนิดคือ *Nereia filiformis* และ *Sporochnus pedunculatus* ให้ผลในการยับยั้งทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น *Staphylococcus aureus* , *Staphylococcus epidermidis* , *Bacillus subtilis* , *Sarcina lutea* , *Sporothrix schenkii* และ *Trichophyton mentagrophytes*

2.7 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจาก *Chlorella* sp.

สกุล *Staphylococcus*

รูปร่างเซลล์กลม พบอยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่ และเนื่องจากมีการแบ่งตัวมากกว่าหนึ่งระนาบ ทำให้พบอยู่เป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีระยะฟักตัว ติดสีแกรมบวก ดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph (ใช้ปฏิกริยาออกซิเดชันของสารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน และใช้อินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอน) กระบวนการเมแทบอลิซึมมีทั้งแบบ respiration และ fermentation อาจใช้คาร์โบไฮเดรตได้หลายชนิดโดยเฉพาะในสภาพที่มีอากาศ และจะสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊สภายใต้สภาพที่ไม่มีอากาศ เมื่อใช้กลูโคสจะได้กรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่

มีการสร้างเอนไซม์และสารพิษซึ่งจะถูกขับออกนอกเซลล์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 35-40องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสม 7.0-7.5 สามารถถูกทำลายได้ด้วยยาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น B-lactam , tetracycline , novobiocin และ chloramphenicol แต่ต้านทานต่อ polymyxin และ polyene ส่วนใหญ่พบตามผิวหนัง ต่อม และตามเยื่อบุของสัตว์เลือดอุ่น (ดวงพร , 2537)

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ coagulase มีความสำคัญทางการแพทย์มาก สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อกับทุกๆบริเวณของร่างกาย สามารถทำให้ติดเชื้ออย่างอ่อนจนถึงขั้นรุนแรง รวมทั้งเกิดหนอง การติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม *Staphylococci* จะเรียกว่า scalded-skin syndrome *S. aureus* อาจก่อให้เกิดอาการของโรคต่างๆมากมายเช่น ลิ้นหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบ และเป็นหนอง เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษซึ่งเป็นผลจากการสร้างเอนเทอโรทอกซิน (นันทนา , 2537)

Escherichia coli (E. coli)

เป็นเซลล์รูปท่อน แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ อาจเคลื่อนที่ได้โดยใช้ peritrichous flagellaหรือไม่เคลื่อนที่ บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สามารถสร้างแคปซูลได้ ให้โคโลนีเรียบ ไม่มีสี มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร ในเวลา 18 ชั่วโมง แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารที่แสดงความแตกต่าง (differential media) เช่น Mac Conkey agar โคโลนีมีสีแดงชมพู ขนาดใหญ่ เนื่องจากเฟอร์เมนต์แล็กโทส หรือเลี้ยงในอาหาร Eosin methylene blue agar และ Endo agar โคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะ มีบางสายพันธุ์ที่เฟอร์เมนต์แล็กโทสได้ช้า ถ้าเลี้ยงบนอาหารผสมเลือดบางสายพันธุ์ เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบตาฮีโมไลซีส เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45องศาเซลเซียส) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60 องศาเซลเซียส 15 นาที หรือ 55 องศาเซลเซียส 60 นาที (ดวงพร , 2537 และ นงลักษณ์ , 2544) *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญที่สุดในแง่การก่อให้เกิดโรค และเป็นสัญลักษณ์ของความสกปรกที่ปนเปื้อนด้วยอุจจาระ เนื่องจากพบมากที่สุดในลำไส้ใหญ่ของคน (นงลักษณ์ และ ปรีชา , 2539)

สกุล *Salmonella*

Salmonella เป็นสกุลหนึ่งใน Family Enterobacteriaceae ดำรงชีวิตแบบ Facultative anaerobe สามารถเจริญในอาหารค่อนข้างธรรมดาได้ ถิ่นที่อยู่ของเชื้อนี้คือลำไส้ของคนและสัตว์ ลักษณะของเชื้อ เป็นแกรมลบรูปท่อน สายพันธุ์ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา ที่อยู่รอบตัว เชื้อนี้ไม่มีแคปซูลและสปอร์ เจริญได้ดีในที่มีหรือไม่มีออกซิเจน สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลกลูโคส และแมน-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โนสได้กรด บางทีก็ได้แก๊สด้วย แต่ไม่สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลแล็กโทสและซูโครส ให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือแก๊สจากการเฟอร์เมนต์คาร์โบไฮเดรต เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา เชื้อส่วนใหญ่ไม่ต้องการวิตามินหรือกรดอะมิโน ยกเว้นเชื้อไทฟอยด์บางชนิดต้องการทริปโตเฟน นอกจากนี้ยังทนต่อสารเคมีบางอย่าง เช่น บริลเลียนกรีน โซเดียมเตตราไทโอเนต โซเดียมดีออกซีโคเลต ซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อพวกโคลิฟอร์ม

การเกิดโรคจาก เชื้อ *Salmonella*

1.ไข้เอนเทอริก (ไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์)

เป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญที่สุด อาการโรคคล้ายกัน แต่ไข้พาราไทฟอยด์หรือไข้รากสาดเทียมมีความรุนแรงน้อยกว่า และมีอาการค่อนข้างอ่อนกว่าไข้ไทฟอยด์ การเกิดโรคเกิดจากการกินเชื้อที่ปะปนอยู่กับอาหารหรือน้ำเข้าไป ทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ เชื้อจะบุกรุกผ่านเยื่อบุเมือก เข้าต่อมน้ำเหลืองในลำไส้ ซึ่งเชื้อจะเพิ่มจำนวนขึ้น และผ่านเข้ากระแสเลือดทางท่อน้ำเหลืองขนาดใหญ่ที่อก เชื้อกระจายเข้าตับ ถุงน้ำดี ม้าม ไต ไขกระดูก เชื้อบางส่วนถูกทำลายโดย phagocyte เชื้อส่วนที่เหลือจะเพิ่มจำนวนมากและเข้ากระแสเลือดใหม่ ทำให้เชื้อกระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ประมาณ 2-5 เปอร์เซ็นต์ ของผู้ป่วยที่หายจากโรคจะมีเชื้อ *Salmonella* อยู่ในร่างกายได้นานเป็นปีๆ หรือตลอดไป ผู้เป็นพาหะเรื้อรังจะมีเชื้ออาศัยอยู่ในถุงน้ำดี และถูกขับออกมากับปัสสาวะ และอุจจาระ จึงทำให้เชื้อนี้รอดชีวิตได้

2.ลำไส้อักเสบ

ยังไม่ทราบว่าเชื้อ *Salmonella* เข้าสู่เซลล์โฮสต์ได้อย่างไร แต่กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นโดยเซลล์แบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ เชื้อที่บุกรุกจะเพิ่มจำนวนในเซลล์ แต่ทำลายมิวโคซา หรือเกิดการอักเสบเพียงเล็กน้อย เชื้อจะแทรกผ่านเยื่อบุผิวอย่างรวดเร็ว และเพิ่มจำนวนใน lamina propria มีผลทำให้เกิดการอักเสบ

3.โลหิตเป็นพิษ

เมื่อเชื้อ *Salmonella* เข้าสู่ร่างกายจะไปเจริญในกระแสเลือด และเพิ่มจำนวนขึ้นทำให้ผู้ป่วยมีไข้สูง หนาวสั่น เบื่ออาหาร น้ำหนักลด การแยกเชื้อจะพบเชื้อในกระแสเลือดเท่านั้น มักไม่พบในอุจจาระ โรคนี้จะเป็นอยู่นานจนเรื้อรัง (นงลักษณ์,2544)

สกุล *Bacillus*

รูปร่างเซลล์เป็นแท่งตรงหรือเกือบตรง ส่วนใหญ่มีการเคลื่อนที่โดยใช้ lateral flagella เซลล์ติดสีแกรมบวก หรืออาจจะเป็นบวกเมื่ออายุยังน้อย ดำรงชีวิตแบบ Chemoorganotroph เมแทบอลิซึมเป็นแบบ respiration หรือ fermentation หรือทั้งสองอย่างขึ้นอยู่กับชนิด อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้อยู่ระหว่าง 25-75 องศาเซลเซียส และต่ำสุดที่เจริญได้อยู่ระหว่าง -5 ถึง 45 องศาเซลเซียส ทนเกลือได้อยู่ในช่วงน้อยกว่า 2-25 เปอร์เซ็นต์

Bacillus subtilis รูปร่างเป็นแท่งมีแฟลกเจลลาออกทางด้านข้าง การแตกออกของสปอร์อยู่ที่ศูนย์กลางของเซลล์ โคโลนีที่เจริญบนอาหารวุ้นผิวอาจเรียบหรือขรุขระ ทึบ สีครีม หรือ น้ำตาล สามารถย่อยเพกตินและพอลิแซ็กคาไรด์ของเนื้อเยื่อพืชได้ บางสายพันธุ์มีการสร้างรงควัตถุย่อยเจลาตินได้ ปกติดำรงชีวิตแบบ anaerobe สามารถพบสปอร์ได้ทั่วไปในวัสดุที่ผ่านความร้อนมาแล้ว เจริญในอาหารที่ไม่ใช่กรด ถ้ามีออกซิเจน จะสามารถใช้ออกซิเจนซึ่งเป็นสาเหตุให้ขนมปังเป็นเมือก (ดวงพร,2537)

Pseudomonas aeruginosa

มีลักษณะเป็นรูปแท่งหรือโค้งเล็กน้อย เคลื่อนที่ด้วยโพลาร์แฟลกเจลลา ติดสีแกรมลบ ผนังเซลล์ประกอบด้วยลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ ที่มีโครงสร้างคล้ายของแบคทีเรียตระกูล Enterobacteriaceae แต่มีสารเคมีบางหมู่แตกต่างกัน ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์เชนที่ยื่นออกจากเมมเบรนชั้นนอก เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับความจำเพาะทางซีโรโลยีและความไวต่อ Bacteriocin ดำรงชีวิตแบบใช้ออกซิเจน สามารถเจริญและได้พลังงานโดยใช้แหล่งของไนโตรเจนและคาร์บอนจากสารอาหารธรรมดา เช่น แอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ ในการเจริญจึงไม่ต้องการสารอาหารซับซ้อน สามารถมีชีวิตและเพิ่มจำนวนในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 20-42 องศาเซลเซียส ในสภาพแวดล้อมต่างๆได้ รวมทั้งในสภาพที่มีเกลือสูงๆได้ เชื้อสามารถใช้พลังงานจากกระบวนการออกซิเดทีฟ และสร้างไซโทครมออกซิเดสได้มาก จึงให้ผลกับออกซิเดสเป็นบวก ถึงแม้จะเป็นพวกที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ แต่ส่วนใหญ่ก็เพิ่มจำนวนได้ช้าๆในที่ไม่มีออกซิเจนถ้ามีไนเตรตเป็นตัวรับไฮโดรเจน เมื่อบ่มเชื้อไว้ค้างคืนจะเจริญขึ้นเป็นโคโลนี มักให้รงควัตถุสีเขียว โคโลนีขนาดใหญ่และแพร่กระจาย (ดวงพร ,2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter : HM-7E)
2. เครื่องเขย่า (shaker : GALLENKAMP : SG 93)
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer : HACH DR/4000 V)
4. ชุดเลี้ยงสาหร่ายแบบให้อากาศ (culture tube)
5. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartourius Analytic : A 2000 S)
6. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave : PANAPOLYTECH VS-1321-60)
7. ตู้เขี่ยเชื้อแบบลมเป่า (laminar air flow : FASTER Bio 48)
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge : SANYO Falcon 6/300)
9. เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (rotary evaporator : Heidolph LABOROTA 4001)
10. เครื่องทำให้เซลล์แห้งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส (freeze-dryer : Heto Lyolab 3000)
11. เครื่อง sonicator (sonics vibra cell : VCX 500)
12. กรวยแยก
13. สารเคมีสำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว เป็น analytical grade
14. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient agar)
15. ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล
16. แผ่นทดสอบ (blank paper discs : Becton Dickinson)
17. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

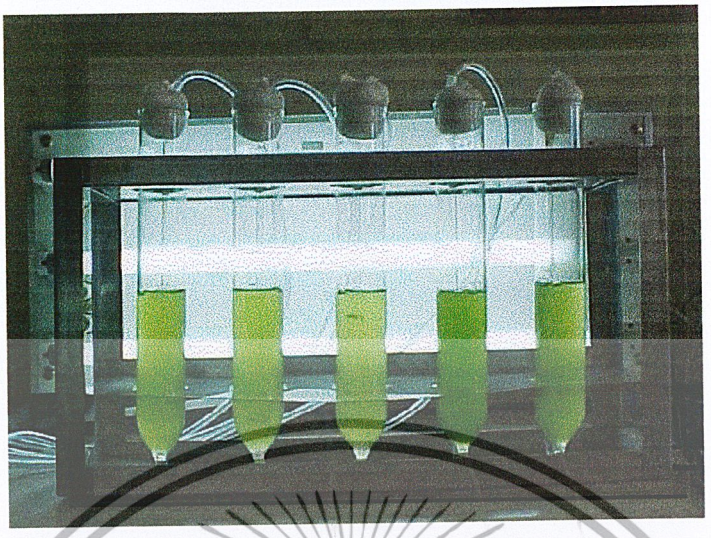
3.2.1 การเตรียมเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp.

นำสาหร่าย *Chlorella* จำนวน 3 สายพันธุ์จากหลอดอาหารเอียงคือ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 (รูปที่ 3.1)

รูปที่ 3.1 สาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580, *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ในหลอดอาหารเอียง

มาเตรียมหัวเชื้อ โดยใช้สาหร่าย 1 หลอดอาหารเอียงมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N-8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวางบนเครื่องเขย่า (shaker) ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง และให้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ที่ความเข้มแสง 2,400 ลักซ์ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน แล้วนำเชื้อสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในหลอดเพาะเลี้ยง (culture tube) ขนาด 300 มิลลิลิตร(รูปที่3.2) ที่มีอาหารเหลวสูตร N-8 ปริมาตร 200 มิลลิลิตรอยู่ แล้วให้อากาศโดยเครื่องให้อากาศ (air pump) ภายใต้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ที่ความเข้มแสง 2,400 ลักซ์ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง เป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 สาหร่าย *Chlorella* sp. ในหลอดเพาะเลี้ยงขนาด 300 มิลลิลิตร

จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง

3.2.2 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp.

นำตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวได้มาเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนักซึ่งจะเริ่มจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TSTIR 8580 เพียงสายพันธุ์เดียวก่อน จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator (sonics vibra cell) (รูปที่3.3)

รูปที่ 3.3 แสดงการทำให้เซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. แตกด้วยเครื่อง sonicator

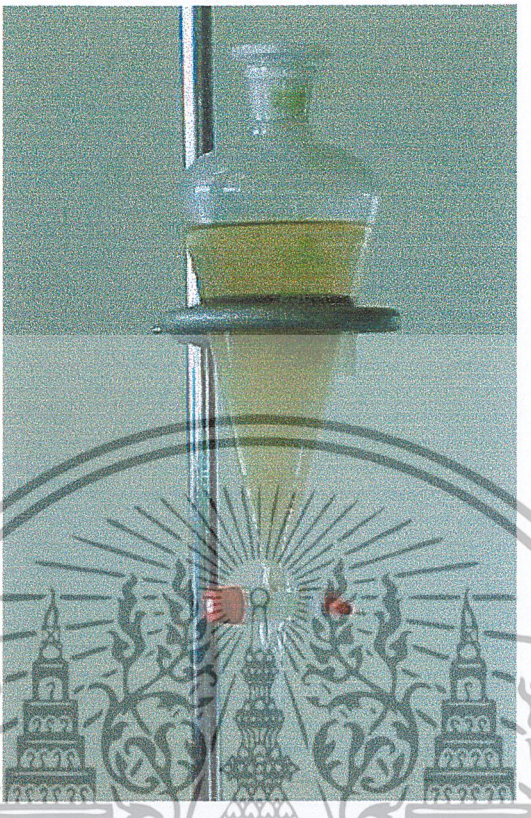
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาทำละลาย (thaw) ที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่3.4) เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นจึงนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้เครื่องทำให้เซลล์แห้ง

รูปที่ 3.4 แสดงการเปรียบเทียบเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp.
a ก่อนทำให้เซลล์แตก
b หลังทำให้เซลล์แตก

ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาสกัดในกรวยแยก (รูปที่3.5) ด้วยวิธีลำดับส่วน (sequencial extraction) โดยเติมตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล (99.99 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับในอัตราส่วน 1:1 โดยเทียบเป็นมิลลิลิตรของสารละลายต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งตัวทำละลาย 1 ชนิดจะใช้เวลา 48 ชั่วโมงในการสกัด นำส่วนที่เป็นชั้นของตัวทำละลายแต่ละชนิดมาทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (rotary evaporator) ที่ ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (รูปที่3.6) จนสารสกัดแห้ง จึงนำสารสกัดของแต่ละตัวทำละลายมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำสารสกัดมาทำละลายในเมทานอล โดยใช้อัตราส่วนสารสกัด 5 มิลลิกรัม ต่อ เมทานอล 100 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.5 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ด้วยวิธีลำดับส่วน (sequencial extraction) ในกรวยแยก

รูปที่ 3.6 การทำให้สารสกัดแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.2.3. ศึกษาผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ใส่ในจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ให้อาหารแข็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* , *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* , *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus* โดยเจือจางในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.3 แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ด้วยวิธี spread plate บนอาหาร NA ทิ้งไว้จนสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียซึมลงเนื้อวุ้นจนแห้ง แล้วจึงนำไปทำการทดสอบกับสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp.

2. การเตรียมแผ่นทดสอบ

นำสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TSTIR 8580 , *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่ทำละลายในเมทานอล มาเตรียมแผ่นทดสอบซึ่งมี 4 ความเข้มข้น คือ 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ โดยสารสกัดจากสาหร่าย 1 สายพันธุ์นำมาทำแผ่นทดสอบความเข้มข้นละ 25 แผ่น ส่วนการเตรียมแผ่นทดสอบที่เป็นตัวควบคุม (control) เตรียมทั้งหมด 25 แผ่น โดยหยดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพคือ เมทานอล ให้ได้ปริมาตรสารละลาย 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

3. การทดสอบสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp.

นำแผ่นทดสอบที่เตรียมได้วางลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นซึ่งทำการ spread plate เชื้อแบคทีเรียทิ้งไว้จนแห้ง โดยจานเลี้ยงเชื้อ 1 จาน จะวางแผ่นทดสอบ 5 แผ่น ประกอบด้วยแผ่นทดสอบที่มีสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella sp.*ในความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ และประกอบด้วยแผ่นทดสอบที่เป็นตัวควบคุม 1 แผ่นทดสอบซึ่งมีความเข้มข้นของเมทานอล 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ โดยทดสอบเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ละ 5 ซ้ำ เมื่อวางแผ่นทดสอบเสร็จให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูผลโดยวัดขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จะทำให้ทราบถึงตัวทำละลายตัวที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุดของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TSTIR 8580 จากนั้นจึงนำตัวทำละลายดังกล่าวมาใช้สกัดสาหร่าย *Chlorella* อีก 2 สายพันธุ์คือ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
47313

บทที่4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักสารออกออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp.

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Chlorella* sp. 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 , *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella sp.* TISTR 8445 ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล พบว่าสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงที่สุด คือ 0.2653 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ส่วนตัวทำละลาย เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล จะมีปริมาณ 0.0010 , 0.2285 และ 0.2305 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้งตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

ในขณะที่สาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 0.2537 และ 0.2349 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้งตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณน้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp.

สายพันธุ์สาหร่าย	ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง)
C. vulgaris TISTR 8580	เฮกเซน	0.0010
	ไดคลอโรมีเทน	0.2653
	คลอโรฟอร์ม	0.2285
	เมทานอล	0.2305
C. ellipsoidea TISTR 8260	ไดคลอโรมีเทน	0.2537
Chlorella sp. TISTR 8445	ไดคลอโรมีเทน	0.2349

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อคิดในรูปของน้ำหนักแห้งต่อเซลล์แขวนลอย 1 ลิตรของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล พบว่ามีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 0.0018 , 0.4883 , 0.4260 และ 0.4243 กรัมต่อเซลล์แขวนลอย 1 ลิตร ตามลำดับ และจากการทดลองครั้งนี้ พบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนนั้นมีน้ำหนักมากกว่าการทดลองของพงศ์ธร และคณะ(2544) ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น เมทานอล และคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 ต่อ 1 ได้ปริมาณสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 เท่ากับ 0.39 กรัมต่อเซลล์แขวนลอย 1 ลิตร และมากกว่าการทดลองของ Pratt; et. al. (1944) ที่สกัดสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยใช้คลอโรฟอร์มหรือเบนซีน ซึ่งได้ปริมาณสารสกัด 1.8 มิลลิกรัมต่อเซลล์แขวนลอย 1 ลิตร

4.2 ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดลองนำสารสกัดจากสาหร่าย *C. vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยวิธีลำดับส่วนโดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล พบว่าการใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นสารสกัดนั้นสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด (ตารางที่4.2) โดยจะยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ได้ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบคือ มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 19.50 และ 14.70 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่4.3) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella* sp. ส่วนการใช้ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอลเป็นสารสกัดพบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากเฮกเซนไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ (ตารางที่4.4) ในขณะที่คลอโรฟอร์มให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ดีที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบคือ มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 17.53 และ11.13 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่4.5) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ส่วนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากเมทานอลนั้นที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบมีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้มากสายพันธุ์ที่สุด คือสามารถยับยั้งได้ทั้ง *E. coli* , *B. subtilis* , *P. aeruginosa* และ *S. aureus*. ซึ่งมีขนาดของบริเวณยับยั้ง 8.30, 11.90 , 13.20 และ 17.67 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่4.6) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ขนาดของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)						
สาหร่าย	ตัวทำละลาย	*Bacillus subtilis*	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella* sp.
Chlorella vulgaris TISTR 8580	Hexane	-	-	-	-	-
	Dichloromethane	14.70 ± 0.45	-	-	19.50 ± 0.30	-
	Chloroform	11.13 ± 1.33	-	-	17.53 ± 0.72	-
	Methanol	11.90 ± 0.78	8.30 ± 0.60	13.20 ± 0.47	17.67 ± 0.94	-
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	Dichloromethane	24.93 ± 1.97	-	13.67 ± 1.28	17.60 ± 0.90	-
Chlorella sp. TISTR 8445	Dichloromethane	-	-	-	-	-

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เมื่อนำตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนซึ่งมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 พบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบคือ *P. aeruginosa* , *S. aureus* และ *B. subtilis* โดยมีขนาดของบริเวณยับยั้ง 13.67 , 17.60 และ 24.93 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่4.7) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* sp.ได้ ส่วนสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. TISTR 8445 นั้นจะไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์เลย (ตารางที่4.8)

ในกรณีของการใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 เพื่อยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. TISTR 8445 จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ส่วนสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือ มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 19.50 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย *C. ellipsoidea* TISTR 8260 ที่มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 17.60 มิลลิเมตร ในขณะที่สารสกัดที่ได้จากสาหร่าย *C. ellipsoidea* TISTR 8260 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดคือ มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 24.93 มิลลิเมตรซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 14.70 มิลลิเมตร (ตารางที่4.2) เช่นเดียวกับในการทดลองของ Pratt ;et.al. (1944) ที่ได้สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella pyrenoidosa* โดยใช้ คลอโรฟอร์ม หรือ เบนซีน (Benzene) พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียคือ *Bacillus subtilis* , *Bacterium coli* , *Staphylococcus aureus* , *Streptococus pyogenes* และ *Pseudomonas aeruginosa* หากแต่การใช้สายพันธุ์ของสาหร่าย วิธีการสกัดและตัวทำละลายนั้นแตกต่างกัน จึงทำให้ขนาดของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นแตกต่างกันตามไปด้วย และในการทดลองของ Vlachos; et. al. (1997) รายงานว่าการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายแห้งขนาดใหญ่ 3 กลุ่มคือ สาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta) สาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) และสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* EL 39 , *Leuconostoc mesenteroides* TA 10 , *Listeria monocytogenes* , *Listeria innocua* , *Micrococcus* sp. , *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *Acinetobacter lwoffii* , *Enterobactor* sp. , *Pseudomonas fluorescens* , *Salmonella enteritidis* , *Serratia* sp. ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ราและยีสต์คือ *Aspergillus* sp. , *Penicillium* sp. , *Candida albican*และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากกลุ่มของสาหร่ายสีน้ำตาลมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ และมีขนาดของบริเวณยับยั้งมากที่สุด โดยเฉพาะสาหร่ายสีน้ำตาล *Zonaria subarticulata* ซึ่งมีขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* EL 39 มากที่สุดคือ 25 มิลลิเมตร ในขณะที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากกลุ่มของสาหร่ายสีแดงมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียแกรมลบ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง *Carradoriella virgata* จะสร้างบริเวณยับยั้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในกลุ่มนี้ ส่วนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวนั้นมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้น้อยที่สุด โดยมีแนวโน้มในการยับยั้งคล้ายกับสาหร่ายสีแดง Chang ;et.al. (1993) ได้คัดแยกสาหร่ายทะเล และสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทั้ง 24 สายพันธุ์ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* แต่จะมีผลต่อเชื้อ *S. aureus* ถึง 7 สายพันธุ์ ซึ่งสาหร่ายที่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้คือ *Dunaliella bioculata* C-523 , *Dunaliella primolecta* C-525 , *Chlorococcum* sp. HS-101 *Synechococcus* sp. HS-364 , *Phorphyridium* sp. HS-366 และ *D. primolecta* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดโดยจะยับยั้งเชื้อ *S. aureus* , *Bacillus subtilis* , *B. cereus* และ *Enterobactor aerogenes* จากแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ แต่จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *Cladosporium cladosporides* , *Penicillium funculosum* *Paecilomyces variom* และ *Aspergillus niger* ซึ่งแสดงว่า *S. aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายได้

จากการทดลองยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับสารสกัดจากพืชสมุนไพร จากการทดลองของ หยาดรุ้ง (2544) ซึ่งได้นำพืชสมุนไพรชนิดต่างๆคือ กระเทียมซึ่งจะให้ขนาดของบริเวณยับยั้งใน *E. coli* และ *S. aureus* คือ 12.50 และ 14.00 มิลลิเมตรตามลำดับ กระเทียมผง ซึ่งจะให้ขนาดของบริเวณยับยั้งใน *S. aureus* คือ 10.00 มิลลิเมตร ขิงจะให้ขนาดของโซนใสใน *S. aureus* คือ 6.70 มิลลิเมตร พริกไทยดำจะให้ขนาดของบริเวณยับยั้งใน *E. coli* เท่ากับ 6.00 มิลลิเมตร ถือได้ว่าแตกต่างจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ซึ่ง *S. aureus* จะถูกยับยั้งโดยสาหร่าย 2 สายพันธุ์คือ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 และ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ซึ่งให้ขนาดของบริเวณยับยั้งที่มากกว่าคือ 19.50 และ17.60 มิลลิเมตรตามลำดับ แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chlorella sp. TISTR 8445 นั้นไม่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ (ตารางที่4.2) ส่วน *E. coli* จะถูกยับยั้งโดยสาหร่ายเพียงสายพันธุ์เดียวคือ *C. vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งให้ขนาดของบริเวณยับยั้งที่มากกว่าคือ 8.30 มิลลิเมตร (ตารางที่4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดโดยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	Bacillus subtilis	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella* sp.
Control	-	-	-	-	-
1	11.17 ± 0.33	-	-	17.13 ± 0.22	-
2	12.10 ± 0.20	-	-	17.80 ± 0.28	-
3	12.97 ± 0.49	-	-	18.37 ± 0.40	-
4	14.70 ± 0.45	-	-	19.50 ± 0.30	-

หมายเหตุ ● เครื่องหมาย – คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง (ไม่เกิด clear zone)

● Control จะใช้ เมทานอลปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 4.4 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดโดยตัวทำละลายเฮกเซน

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	Bacillus subtilis	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella* sp.
Control	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ● เครื่องหมาย – คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง (ไม่เกิด clear zone)

● Control จะใช้เมทานอลปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 4.5 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดโดยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	Bacillus subtilis	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella* sp.
Control	-	-	-	-	-
1	8.13 ± 0.34	-	-	14.33 ± 0.30	-
2	8.73 ± 0.49	-	-	15.07 ± 0.49	-
3	9.60 ± 0.88	-	-	15.87 ± 0.45	-
4	11.13 ± 1.39	-	-	17.53 ± 0.72	-

หมายเหตุ ● เครื่องหมาย – คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง (ไม่เกิด clear zone)

● Control จะใช้เมทานอลปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 4.6 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดโดยตัวทำละลายเมทานอล

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	Bacillus subtilis	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella* sp.
Control	-	-	-	-	-
1	7.43 ± 0.14	-	-	11.73 ± 0.64	-
2	8.20 ± 0.34	-	8.83 ± 0.30	13.23 ± 0.32	-
3	10.00 ± 0.28	-	11.50 ± 0.33	16.27 ± 0.80	-
4	11.90 ± 0.78	8.30 ± 0.60	13.20 ± 0.47	17.67 ± 0.94	-

หมายเหตุ ● เครื่องหมาย – คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง (ไม่เกิด clear zone)

● Control จะใช้เมทานอลปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 4.7 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดโดยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	Bacillus subtilis	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella* sp.
Control	-	-	-	-	-
1	14.73 ± 1.14	-	-	11.466 ± 0.34	-
2	18.53 ± 2.17	-	8.78 ± 0.36	14.120 ± 0.50	-
3	22.33 ± 2.09	-	11.53 ± 1.06	15.468 ± 0.91	-
4	24.93 ± 1.97	-	13.67 ± 1.28	17.600 ± 0.90	-

หมายเหตุ ● เครื่องหมาย – คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง (ไม่เกิด clear zone)

● Control จะใช้เมทานอลปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

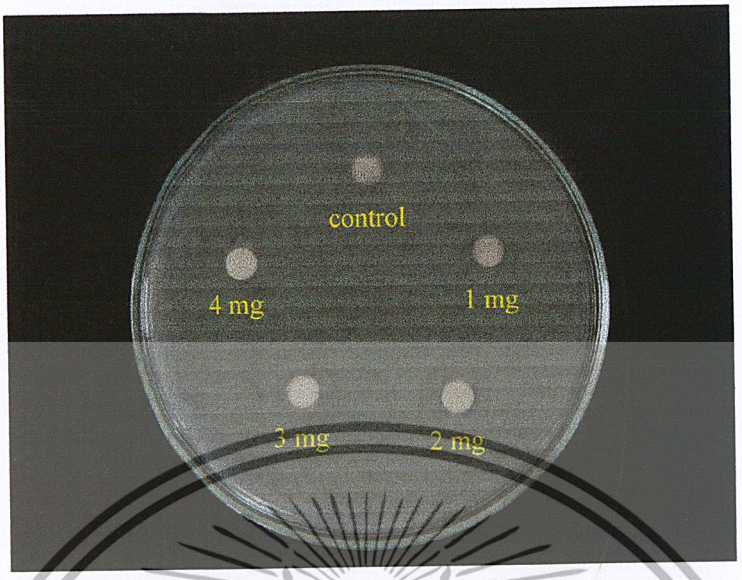
ตารางที่ 4.8 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากสาหร่าย *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดโดยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	Bacillus subtilis	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella* sp.
Control	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-

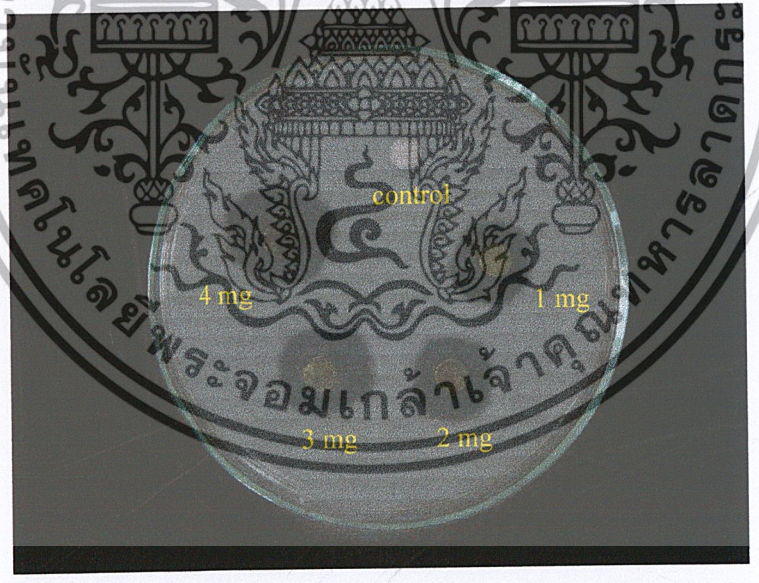
หมายเหตุ ● เครื่องหมาย – คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง (ไม่เกิด clear zone)

● Control จะใช้เมทานอลปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

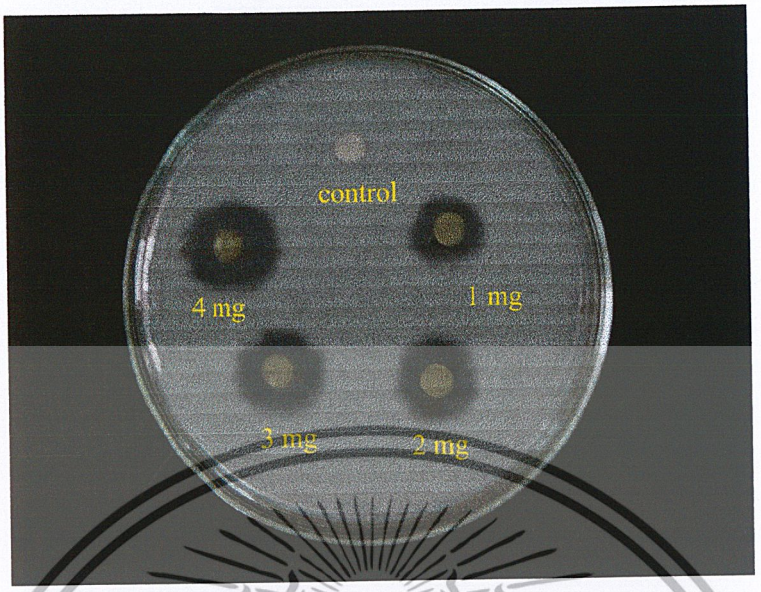


รูปที่ 4.1 ผลจากสารสกัดของ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยเฮกเซน ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*



รูปที่ 4.2 ผลจากสารสกัด *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วย ไดคลอโรมีเทนในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*

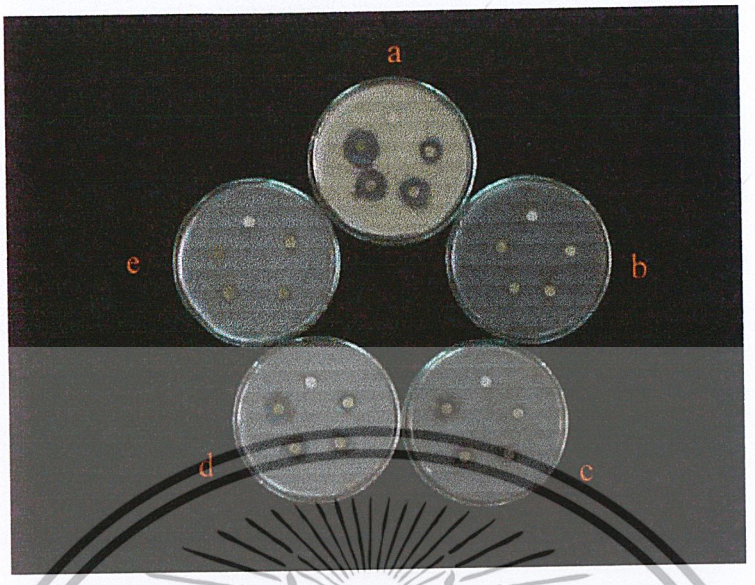
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ผลจากสารสกัด *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*

รูปที่ 4.4 ผลจากสารสกัด *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยเมทานอลในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*

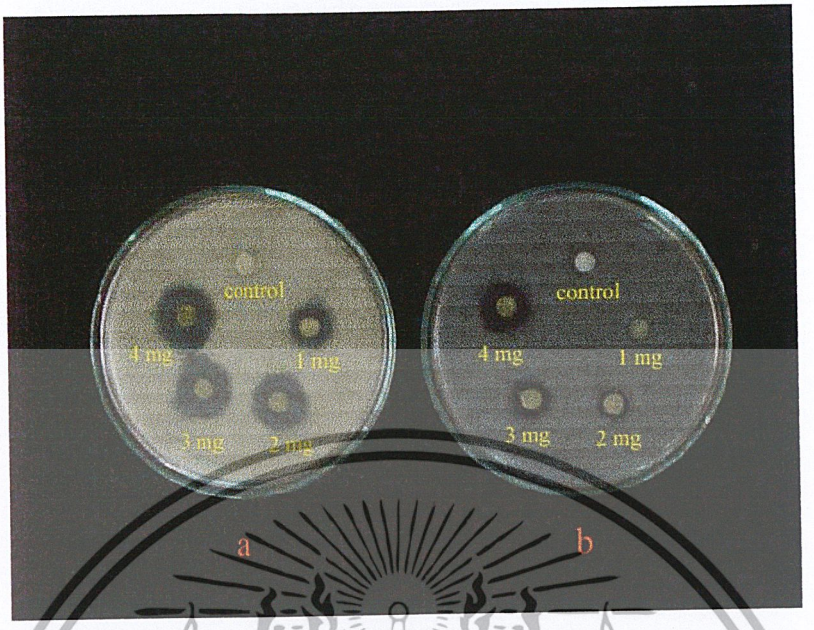
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ผลจากสารสกัด *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนในการยับยั้งเชื้อ a. *Bacilus subtilis* b. *Escherichia coli* c. *Pseudomonas aeruginosa* d. *Staphylococcus aureus* e. *Salmonella* sp.

รูปที่ 4.6 ผลจากสารสกัดของ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนในการยับยั้งเชื้อ a. *Bacillus subtilis*
b. *Staphylococcus aureua*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ผลจากสารสกัดของ *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนในการยับยั้งเชื้อ a. *Bacillus subtilis* b. *Pseudomonas aeruginosa*

รูปที่ 4.8 ผลจากสารสกัดของ *Chlorella* sp.TISTR 8445 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนในการยับยั้งเชื้อ a. *Bacillus subtilis* b. *Escherichia coli* c. *Pseudomonas aeruginosa* d. *Staphylococcus aureus* e. *Salmonella* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* , *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* , *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus* พบว่า

1. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *C. vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยวิธีลำดับส่วน (sequencial extraction) ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล จะได้ปริมาณสารสกัด 0.0010 , 0.2653 , 0.2285 และ0.2305 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้งตามลำดับ ซึ่งไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดแล้วได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพปริมาณมากที่สุด ส่วนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *C. ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่ใช้ไดคลอโรมีเทนสกัดนั้นจะมีปริมาณน้อยกว่า *C. vulgaris* TISTR 8580 คือ 0.2537 และ 0.2349 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

2. ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จากการนำสาหร่าย *C. vulgaris* TISTR 8580 มาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ด้วยวิธีลำดับส่วน พบว่าสารสกัดของ *C. vulgaris* TISTR 8580 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดและรองลงมาคือ *B. subtilis* โดยมีขนาดของบริเวณยับยั้งคือ 19.50 และ14.70 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพรองลงมาคือ คลอโรฟอร์ม ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดและรองลงมาคือ *B. subtilis* โดยมีขนาดของบริเวณยับยั้งคือ 17.53 และ11.13 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ส่วนการใช้เมทานอลสกัดนั้นจะมีขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *B. subtilis* , *P. aeruginosa* และ *S. aureus*. คือ 8.30 , 11.90 , 13.20 และ 17.67 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และสุดท้ายสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซนจะไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์เลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขณะที่สารสกัดจากสาหร่าย *C. ellipsoidea* TISTR 8260 จะสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ได้ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบโดยมีขนาดของบริเวณยับยั้ง 24.93 , 17.60 และ 13.67 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ส่วนสาหร่าย *Chlorella* sp. TISTR 8445 นั้นจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ใดได้เลย

ข้อเสนอแนะ

ควรทดลองหาสายพันธุ์สาหร่ายที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีกว่าสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ และวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดออกมาจากสาหร่ายด้วยว่ามีสารประกอบใดอยู่บ้าง ส่วนแบคทีเรียที่ใช้นั้นก็ควรที่จะเป็นแกรมบวกมากกว่าเนื่องจากสามารถถูกยับยั้งโดยสารสกัดจากสาหร่ายได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Rao and Prekh ,1981) นอกจากนี้ควรหาวิธีการที่ทำให้เซลล์แตกได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. สาหร่าย. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 102 น.

ข่าวชมรมเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมเพื่อธุรกิจ. 2542. ไดออกซินกับการปนเปื้อน. 5 (3 กรกฎาคม-กันยายน) : 2-4

ชาญเดช วังสะวิบูลย์. 2543. ผลของการใช้ *Chlorella* sp. ในการอนุบาลกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* FABRICIUS) ระยะโพสท์ลาร์วา (พี5-พี15) วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะวิทยาศาสตร์การประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ. 152 น.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2539. จุลชีววิทยาทั่วไป.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 735 น.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรบส์. โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮ้าส์. กรุงเทพฯ. 411 น.

วิสัย วงศ์สายปิ่น.2536.สาหร่ายเซลล์เดียวอาหารจากแสงตะวัน. สำนักพิมพ์รวมทรรศน์. กรุงเทพฯ. 139 น.

สมบูรณ์ ธนาศุกวัฒน์. 2539. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 124 น.

สรวิศ เผ่าทองศุข. 2543. สาหร่าย "ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย". สำนักผู้ประสานงานชุดโครงการ "อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ" สกว. 20 น.

สุนีย์ สุวภีพันธุ์. 2524. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว. ว. การประมง. 34 (3) : 324 น. อ้างถึงใน พงศ์ธร เครือวณิชธรรม พรรษ พุ่มประเสริฐ และ วิทวัส เจนเวชศักดา. 2544 ผลของสารสกัดจาก *Chlorella* sp. ต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด. โครงงานพิเศษ. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ ทหาร ลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

สุเทพ มงคลเลิศลพ. 2530. การสะสมสังกะสีโดยสาหร่ายเซลล์เดียว *Chlorella* sp. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะพลังงานและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์. 2544. ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท . คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Antsyshkina, L. M. and other. 1968. "Use of *Chlorella* as a fish food when volume of water is limited" Biological Adstract. 49:47416 Jan- Feb อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ พงษ์ปัญญา. 2540. การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. ในอาหารสูตรต่างๆ. วารสารทางวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 17 (1): 7-9

Berdy, J.; Adorjan, A. ; Melvin, B.;Karen, L. and Nitt, M.C. 1982. Handbook of antibiotic compound 9. Florida. CRC PRESS Inc. Eoca Rapon

Bold,H. C. and Wynne, M. J. 1978. Introduction to the algae. New Jersy, Prentice- Hall. 706 p. อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ พงษ์ปัญญา. 2540. การเจริญของสาหร่าย*Chlorella* sp.ในอาหารสูตรต่างๆ. วารสารทางวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 17 (1) : 7-9

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

Chang,T.; Ohta, S.; Ikegkmi, N.; Miyata, H.; Kashimoto, T. and Kondo, M. 1993. Antibiotic substances produced by a marine green alga, *Dunaliella primolecta*. Bioresource Tech. 44 : 149-153

David, A. E.; Dedrick, J.; French, C. S.; Milner, H. W.; Myers, J.; Smith, J. H. C. and Spoehr, H. A. 1964. Laboratory Experiments on *Chlorella* Culture at the Carnegie Institution of Washington Department of Plant Biology. อ้างถึงใน วินา ชูโชติ. 2542. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสาหร่าย *Chlorella* sp. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 186 น.

Dittmer, H. J. 1964. Phylogeny and form in the Plankton Kingdom. New York, D. B. Van Nostrand Company, 642 p. อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ พงษ์ปัญญา. 2540. การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. ในอาหารสูตรต่างๆ. วารสารทางวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 17 (1) : 7- 9

Kazuhiko, I. And Minamishima, Y. 1990. Effect of *chlorella vulgaris* extracts on murine cytomegalovirus infections. National Immune Cell Growth 9: 121-128 อ้างถึงใน ชาญเดช วังสะวิบูลย์. 2543. ผลของการใช้ *Chlorella* sp. ในการอนุบาลกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FABRICIUS) ระยะโพสท์ลาร์วา (พี5-พี15) วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะวิทยาศาสตร์การ-ประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Khan, M. 1970. Fundamentals of Phycology. Dehradum, The Hima Chai Times. อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ พงษ์ปัญญา. 2540. การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. ในอาหารสูตรต่างๆ. วารสารทางวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 17(1) : 7-9

Matsueda, S.; Ichita, J.; Abe, K.; Kanasawa, H. and Shinpo, K. 1992. Studies an antitumor activity glycoprotein from *Chlorella vulgaris* .J. Pharmacoltical Society of Japan,102: 447-451อ้างถึงใน ชาญเดช วังสะวิบูลย์. 2543. ผลของการใช้ *Chlorella* sp. ในการอนุบาลกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*FABRICIUS) ระยะโพสท์ลาร์วา (พี5-พี15) วิทยานิพนธ์ปริญญา-โท คณะวิทยาศาสตร์การประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Robles Centeno, P. O. and Ballantine, D. L. 1999. Effect of culture conditions on production of antibiotically active metabolites by the marine alga *Spyridia filamentosa* (Ceramiaceae, Rhodophyta). I. Light . J. 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.; Duniles,T.C.; Eiler, J.J.; Gunnison, J.B.; Kumler, W.D.; Oneto, J.F. and Strait, L.A. 1944. *Chlorella*, an antibacterial substance from *Chlorella*. Sci. 99 : 351-352

Rao, P.S. and Parekh, K.S. 1981. Antibacterial activity of Indian seaweed extracts. Bot. Mar. 24 : 577-582

Ravan, P.H. and others. 1976. Biology of plant. New York, Worth Publishers, Inc, 685 P. อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ พงษ์ปัญญา. 2540. การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. ในอาหารสูตรต่างๆ. วารสารทางวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 17 (1) : 7-9

Robles Centeno, P.O.; Ballantine, D.L.; Gerwick, W.H. 1996 Dynamics of antibacterial activity in three species of Caribbean marine algae as a function of habitat and life history. Hydrobiologia 326/327 : 457-4726 อ้างถึงใน Robles Centeno, P.O. and Ballantine, D. L. 1999 Effect

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

of culture conditions on production of antibiotically active metabolites by the marine alga *Spyridia filamentosa* (Ceramiaceae ,Rhodophyta) . I. Light. J. Phycol. 10 : 453-460

Round, F. E. 1973. The Biology of the Algae. London, Edward, Arnold Pubishers, 248 p. อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ พงษ์ปัญญา. 2540. การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. ในอาหารสูตรต่างๆ. วารสารทางวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 17 (1) : 7-9

Smith, G. M. 1951. Fresh-Water Algae of the United State. New York , McGraw - Hill Book Company, 718 p. อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ พงษ์ปัญญา. 2540. การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. ในอาหารสูตรต่างๆ. วารสารทางวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 17 (1) : 7-9

Tiffany, L. H. 1985. Algae. Linois, Charles C Thomas Publisher, 199 p. อ้างถึงใน ทวีศักดิ์ พงษ์ปัญญา. 2540. การเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. ในอาหารสูตรต่างๆ. วารสารทางวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 17 (1) : 7-9

Vlachos, V.; Critchley, A.T. and Holy, A.V. 1997.Antimicrobial activty of extracts from selected Southern African marine macroalgae. Southern African J. Sci. 93 : 328-332

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

สูตรอาหาร N-8 ที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* (Atthasampunna, 1995 อ้างถึงใน วีนา,2542)

$Na_2HPO_4.2H_2O$	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*	1.0	มิลลิกรัม
Distilled water to	1.0	ลิตร

***Trace element mixture for N-8 medium**

$Al_2(SO_4)_3.18H_2O$	3.58	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	12.98	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	1.83	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	3.20	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาผนวก ข.

ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp.

ตาราง ข-1 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่5 (มิลลิเมตร)	
Control	-	-	-	-	-	-
1	11.67	11.00	10.67	11.17	11.33	11.17
2	11.83	12.33	12.33	12.00	12.00	12.10
3	12.00	13.33	13.17	13.17	13.17	12.97
4	15.00	14.00	15.17	14.33	15.00	14.70

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

ตาราง ข-2 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่5 (มิลลิเมตร)	
control	-	-	-	-	-	-
1	17.50	17.17	16.83	17.00	17.17	17.13
2	17.67	17.83	17.50	18.33	17.67	17.80
3	18.00	18.17	18.67	19.00	18.00	18.37
4	19.33	19.00	19.67	19.67	19.83	19.50

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข-3 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่5 (มิลลิเมตร)	
Control	-	-	-	-	-	-
1	8.00	7.67	8.67	8.33	8.00	8.13
2	8.33	8.33	9.33	9.33	8.33	8.73
3	8.67	9.67	11.00	10.00	8.67	9.60
4	9.33	10.00	13.33	11.67	11.33	11.13

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

ตาราง ข-4 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่5 (มิลลิเมตร)	
Control	-	-	-	-	-	-
1	14.67	14.00	14.00	14.67	14.33	14.33
2	15.33	14.67	14.33	15.33	15.67	15.07
3	15.67	15.33	15.67	16.67	16.00	15.87
4	16.67	18.00	18.67	17.00	17.33	17.53

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข-5 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่5 (มิลลิเมตร)	
Control	-	-	-	-	-	-
1	7.33	7.67	7.33	7.50	7.33	7.43
2	7.67	8.67	8.33	8.00	8.33	8.20
3	10.33	10.00	10.00	10.05	10.17	10.00
4	10.67	12.67	11.67	11.67	12.83	11.90

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

ตาราง ข-6 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่5 (มิลลิเมตร)	
Control	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	8.50	7.67	9.00	8.84	7.50	8.30

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข-7 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่5 (มิลลิเมตร)	
control	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2	8.67	9.33	8.67	8.50	9.00	8.83
3	11.67	12.00	11.00	11.50	11.33	11.50
4	13.67	12.33	13.33	13.50	13.17	13.20

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

ตาราง ข-8 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ในตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่5 (มิลลิเมตร)	
Control	-	-	-	-	-	-
1	12.33	10.67	12.33	11.33	12.00	11.73
2	13.67	13.00	13.33	13.50	13.67	13.23
3	15.33	16.67	15.33	17.33	16.67	16.27
4	16.00	18.00	17.33	18.33	18.67	17.67

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข-9 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่5 (มิลลิเมตร)	
Control	-	-	-	-	-	-
1	13.00	16.33	15.00	14.00	15.33	14.73
2	17.33	16.33	22.67	18.33	18.00	18.53
3	20.33	21.00	26.00	23.33	21.00	22.33
4	21.67	26.33	27.33	25.33	24.00	24.93

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

ตาราง ข-10 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่5 (มิลลิเมตร)	
Control	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2	9.33	8.33	8.67	8.67	9.00	8.78
3	11.33	13.33	10.33	12.00	10.67	11.53
4	13.66	14.33	11.67	14.67	14.00	13.67

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข-11 แสดงขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่5 (มิลลิเมตร)	
control	-	-	-	-	-	-
1	12.00	11.33	11.33	11.00	11.67	11.47
2	13.33	14.67	14.00	14.00	14.67	14.12
3	14.00	15.67	16.00	16.67	15.00	15.47
4	16.00	17.33	18.00	18.00	18.67	17.60

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองนี้เป็นการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design = CRD)ซึ่งจะนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์วิธีทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังนี้

ตาราง ค-1 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis* *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ซึ่งใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดบริเวณยับยั้งของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 (มิลลิเมตร)					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	
Bacillus subtilis	1	11.67	11.00	10.67	11.70	11.33	11.17 ± 0.33
	2	11.83	12.33	12.33	12.00	12.00	12.10 ± 0.20
	3	12.00	13.33	13.17	13.17	13.17	12.97 ± 0.49
	4	15.00	14.00	15.17	14.33	15.00	14.70 ± 0.45
Escherichia coli	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	1	17.50	17.17	16.83	17.00	17.17	17.13 ± 0.22
	2	17.67	17.83	17.50	18.33	17.67	17.80 ± 0.28
	3	18.00	18.17	18.67	19.00	18.00	18.37 ± 0.40
	4	19.33	19.00	19.67	19.67	19.83	19.50 ± 0.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-1 (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดบริเวณยับยั้งของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 (มิลลิเมตร)					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	
Salmonella sp.	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

ตาราง ค-2 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่ปริมาณสารสกัด 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบโดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ซึ่งใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสาสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
S. aureus	4	19.5000[a]	*E. coli*	2	0.0000[i]
S. aureus	3	18.3680[b]	*E. coli*	1	0.0000[i]
S. aureus	2	17.8000[c]	*P. aeruginosa*	4	0.0000[i]
S. aureus	1	17.1340[d]	*P. aeruginosa*	3	0.0000[i]
B. subtilis	4	14.7000[e]	*P. aeruginosa*	2	0.0000[i]
B. subtilis	3	12.9680[f]	*P. aeruginosa*	1	0.0000[i]
B. subtilis	2	12.0980[g]	*Salmonella* sp.	4	0.0000[i]
B. subtilis	1	11.1680[h]	*Salmonella* sp.	3	0.0000[i]
E. coli	4	0.0000[i]	*Salmonella* sp.	2	0.0000[i]
E. coli	3	0.0000[i]	*Salmonella* sp.	1	0.0000[i]

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่า สารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอรเซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอรเซนต์นั้นมีแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์คือ *B. subtilis* และ *S. aureus* ที่ถูกยับยั้งการเจริญแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และที่ปริมาณสารสกัด 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบในแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นั้นต่างก็ให้ผลในการยับยั้งที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญด้วย ส่วนแบคทีเรียอีก 3 สายพันธุ์ คือ *E. coli* *P. aeruginosa* และ *Salmonella* sp. นั้นให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ และที่ปริมาณสารสกัด 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบในแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ก็ต่างให้ผลในการยับยั้งที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตาราง ค-3 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis* *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ซึ่งใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย

คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายสายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดบริเวณยับยั้งของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 (มิลลิเมตร)					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	
Bacillus subtilis	1	8.00	7.67	8.67	8.33	8.00	8.13 ± 0.34
	2	8.33	8.33	9.33	9.33	8.33	8.73 ± 0.49
	3	8.67	9.67	11.00	10.00	8.67	9.60 ± 0.88
	4	9.33	10.00	13.33	11.67	11.33	11.13 ± 1.39
Escherichia coli	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-3 (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดบริเวณยับยั้งของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 (มิลลิเมตร)					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	
Staphylococcus aureus	1	14.67	14.00	14.00	14.67	14.33	14.33 ± 0.30
	2	15.33	14.67	14.33	15.33	15.67	15.07 ± 0.49
	3	15.67	15.33	15.67	16.67	16.00	15.87 ± 0.45
	4	16.67	18.00	18.67	17.00	17.33	17.53 ± 0.72
Salmonella sp.	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

ตาราง ค-4 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ที่ปริมาณสารสกัด 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ซึ่งใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสาสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสาสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
S. aureus	4	17.5340[a]	*E. coli*	2	0.0000[h]
S. aureus	3	15.8680[b]	*E. coli*	1	0.0000[h]
S. aureus	2	15.0660[c]	*P. aeruginosa*	4	0.0000[h]
S. aureus	1	14.3340[d]	*P. aeruginosa*	3	0.0000[h]
B. subtilis	4	11.1320[e]	*P. aeruginosa*	2	0.0000[h]
B. subtilis	3	9.6020[f]	*P. aeruginosa*	1	0.0000[h]
B. subtilis	2	8.7300[g]	*Salmonella* sp.	4	0.0000[h]
B. subtilis	1	8.1340[g]	*Salmonella* sp.	3	0.0000[h]
E. coli	4	0.0000[h]	*Salmonella* sp.	2	0.0000[h]
E. coli	3	0.0000[h]	*Salmonella* sp.	1	0.0000[h]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่า สารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอรเซนต์

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอรเซนต์นั้นมีแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์คือ *B. subtilis* และ *S. aureus* ที่ถูกยับยั้งการเจริญแตกต่างกันมีนัยสำคัญ แต่มีเฉพาะที่ปริมาณสารสกัด 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบของเชื้อ *B. subtilis* ที่ให้ผลในการยับยั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนแบคทีเรียอีก 3 สายพันธุ์ คือ *E. coli* , *P. aeruginosa* และ *Salmonella* sp. นั้นให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ และที่ปริมาณสารสกัด 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบในแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ก็ ต่างให้ผลในการยับยั้งที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตาราง ค-5 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis* , *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ซึ่งใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดบริเวณยับยั้งของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 (มิลลิเมตร)					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	
Bacillus subtilis	1	7.33	7.67	7.33	7.50	7.33	7.43 ± 0.14
	2	7.67	8.67	8.33	8.00	8.33	8.20 ± 0.34
	3	10.33	10.00	10.00	10.50	10.17	10.00 ± 0.28
	4	10.67	12.67	11.67	11.67	12.83	11.90 ± 0.78
Escherichia coli	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	8.50	7.67	9.00	8.84	7.50	8.30 ± 0.60
Pseudomonas aeruginosa	1	-	-	-	-	-	-
	2	8.67	9.33	8.67	8.50	9.00	8.83 ± 0.30
	3	11.67	12.00	11.00	11.50	11.33	11.50 ± 0.33
	4	13.67	12.33	13.33	13.50	13.17	13.20 ± 0.47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-5 (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดบริเวณยับยั้งของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 (มิลลิเมตร)					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	
Staphylococcus aureus	1	12.33	10.67	12.33	11.33	12.00	11.73 ± 0.64
	2	13.67	13.00	13.33	13.50	13.67	13.23 ± 0.32
	3	15.33	16.67	15.33	17.33	16.67	16.27 ± 0.80
	4	16.00	18.00	17.33	18.33	18.67	17.67 ± 0.94
Salmonella sp.	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

ตาราง ค-6 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ที่ปริมาณสารสกัด 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ซึ่งใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสาสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสาสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
S. aureus	4	17.6660^{a}	*B. subtilis*	2	8.2000^{g}
S. aureus	3	16.2660^{b}	*B. subtilis*	1	7.4320^{h}
S. aureus	2	13.4340^{c}	*E. coli*	3	0.0000^{i}
P.aeruginosa	4	13.2000^{c}	*E. coli*	2	0.0000^{i}
B. subtilis	4	11.9020^{d}	*E. coli*	1	0.0000^{i}
S. aureus	1	11.7320^{d}	*P. aeruginosa*	1	0.0000^{i}
P. aeruginosa	3	11.5000^{d}	*Salmonella* sp.	4	0.0000^{i}
B. subtilis	3	10.2000^{e}	*Salmonella* sp.	3	0.0000^{i}
P. aeruginosa	2	8.8340^{f}	*Salmonella* sp.	2	0.0000^{i}
E. coli	4	8.3020^{gf}	*Salmonella* sp.	1	0.0000^{i}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ ในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่า สารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอรเซนต์นั้นพบว่า *B. subtilis* ที่ปริมาณสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ ให้ผลในการยับยั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติจาก *S. aureus* *P. aeruginosa* ที่ปริมาณสารสกัด 1 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ และ 3 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบตามลำดับ และ *S. aureus* ที่ปริมาณสารสกัด 2 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ ให้ผลในการยับยั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติจาก *P. aeruginos* ที่ปริมาณสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

ตาราง ค-7 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	ขนาดบริเวณยับยั้งของเชื้อ *Staphylococcus aureus*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่ 1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 5 (มิลลิเมตร)	
เฮกเซน	-	-	-	-	-	-
ไดคลอโรมีเทน	19.33	19.00	19.67	19.67	19.83	19.50 ± 0.30
คลอโรฟอร์ม	16.67	18.00	18.67	17.00	17.33	17.53 ± 0.72
เมทานอล	16.00	18.00	17.33	18.33	18.67	17.67 ± 0.94

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-8 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ปริมาณ 4 มิลลิกรัม ซึ่งมี เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และ เมทานอล เป็นตัวทำละลาย

ตัวทำละลาย	ค่าเฉลี่ย(มิลลิเมตร)
ไดคลอโรมีเทน	19.5000[a]
เมทานอล	17.6660[b]
คลอโรฟอร์ม	17.5340[b]
เฮกเซน	0.0000[c]

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่า สารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *C. vulgaris* TISTR 8580 พบว่ามีตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม ที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนเฮกเซน และ ไดคลอโรมีเทน ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-9 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis* *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ซึ่งใช้ไดคลอมีเทนเป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ขนาดบริเวณยับยั้งของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 (มิลลิเมตร)					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	
Bacillus subtilis	1	13.00	16.33	15.00	14.00	15.33	14.73 ± 1.14
	2	17.33	16.33	22.67	18.33	18.00	18.53 ± 2.17
	3	20.33	21.00	26.00	23.33	21.00	22.33 ± 2.09
	4	21.67	26.33	27.33	25.33	24.00	24.93 ± 1.97
Escherichia coli	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	1	-	-	-	-	-	-
	2	9.33	8.33	8.67	8.67	9.00	8.78 ± 0.36
	3	11.33	13.33	10.33	12.00	10.67	11.53 ± 1.06
	4	13.66	14.33	11.67	14.67	14.00	13.67 ± 1.28
Staphylococcus aureus	1	12.00	11.33	11.33	11.00	11.67	11.47 ± 0.34
	2	13.33	14.67	14.00	14.00	14.67	14.12 ± 0.50
	3	14.00	15.67	16.00	16.67	15.00	15.47 ± 0.91
	4	16.00	17.33	18.00	18.00	18.67	17.60 ± 0.90
Salmonella sp.	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-10 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่ปริมาณสารสกัด 1 ,2 ,3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบโดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ซึ่งใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณสาสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
B. subtilis	4	24.9320[a]	*P. aeruginosa*	2	8.8000[g]
B. subtilis	3	22.3320[b]	*E. coli*	4	0.0000[h]
B. subtilis	2	18.5320[c]	*E. coli*	3	0.0000[h]
S. aureus	4	17.6000[c]	*E. coli*	2	0.0000[h]
S. aureus	3	15.4620[d]	*E. coli*	1	0.0000[h]
B. subtilis	1	14.7320[d]	*P.aeruginosa*	1	0.0000[h]
S. aureus	2	14.1340[d]	*Salmonella* sp.	4	0.0000[h]
P. aeruginosa	4	13.6660[e]	*Salmonella* sp.	3	0.0000[h]
P. aeruginosa	3	11.5320[f]	*Salmonella* sp.	2	0.0000[h]
S. aureus	1	11.4660[f]	*Salmonella* sp.	1	0.0000[h]

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าสารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์สารสกัดจากสาหร่าย *C. ellipsoidea* TISTR 8260 ที่ปริมาณสารสกัด 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบสามารถยับยั้งการแจริญของเชื้อ *B . subtilis* ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ปริมาณสารสกัด 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบของเชื้อ *B . subtilis* และ*S . aureus* ตามลำดับ ซึ่งที่ปริมาณสารสกัด 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบของเชื้อ *B . subtilis* และ*S . aureus* ให้ผลในการยับยั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S . aureus* ที่ปริมาณสารสกัด 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเชื้อ *B. subtilis* ที่ปริมาณสารสกัด 1 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-11 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่ 1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 5 (มิลลิเมตร)	
Chlorella vulgaris TISTR 8580	15.00	14.00	15.17	14.33	15.00	14.70 ± 0.45
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	21.67	26.33	27.33	25.33	24.40	24.93 ± 1.97
Chlorella sp. TISTR 8445	-	-	-	-	-	-

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณบริเวณยับยั้ง

ตาราง ค-12 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยสารสกัดจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์คือ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ซึ่งใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์สาหร่าย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	4	24.9320^{a}
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	3	22.3320^{b}
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	2	18.5320^{c}
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	1	14.7320^{d}
Chlorella vulgaris TISTR 8580	4	14.7000^{d}
Chlorella vulgaris TISTR 8580	3	12.9680^{e}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-12 (ต่อ)

สายพันธุ์สาหร่าย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
Chlorella vulgaris TISTR 8580	2	12.0980[f]
Chlorella vulgaris TISTR 8580	1	11.1680[f]
Chlorella sp. TISTR 8445	4	0.0000[g]
Chlorella sp. TISTR 8445	3	0.0000[g]
Chlorella sp. TISTR 8445	2	0.0000[g]
Chlorella sp. TISTR 8445	1	0.0000[g]

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่า สารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้ดีที่สุดโดยที่ปริมาณสารสกัด 2 ,3 และ4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบมีความแตกต่างทางนัยสำคัญกับสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 แต่ที่ปริมาณสารสกัด 1 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบของสาหร่าย *C. ellipsoidea* TISTR 8260 ให้ผลในการยับยั้ง *B. subtilis* ไม่แตกต่างทางสถิติกับสารสกัดจากสาหร่าย *C. vulgaris* TISTR 8580 ที่ปริมาณสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-13 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่ 1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 5 (มิลลิเมตร)	
Chlorella vulgaris TISTR 8580	-	-	-	-	-	-
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	13.66	14.33	11.67	14.67	14.00	13.67 ± 1.28
Chlorella sp. TISTR 8445	-	-	-	-	-	-

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณโซนใส

ตาราง ค-14 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* โดยสารสกัดจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ซึ่งใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์สาหร่าย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	4	13.6660[a]
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	3	11.5320[b]
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	2	8.8000[c]
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	1	0.0000[d]
Chlorella sp. TISTR 8445	4	0.0000[d]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-14 (ต่อ)

สายพันธุ์สาหร่าย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
Chlorella sp. TISTR 8445	3	0.0000[d]
Chlorella sp. TISTR 8445	2	0.0000[d]
Chlorella sp. TISTR 8445	1	0.0000[d]
Chlorella vulgaris TISTR 8580	4	0.0000[d]
Chlorella vulgaris TISTR 8580	3	0.0000[d]
Chlorella vulgaris TISTR 8580	2	0.0000[d]
Chlorella vulgaris TISTR 8580	1	0.0000[d]

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่า สารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 เพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ได้และมีความแตกต่างทางนัยสำคัญกับสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. TISTR 8445 และ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ซึ่งไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ได้เลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-15 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ*Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	ขนาดของบริเวณยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*					ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่ 1 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 2 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 3 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 4 (มิลลิเมตร)	ซ้ำที่ 5 (มิลลิเมตร)	
Chlorella vulgaris TISTR 8580	19.33	19.00	19.67	19.67	19.83	19.50 ± 0.30
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	16.00	17.33	18.00	18.00	18.67	17.60 ± 0.90
Chlorella sp. TISTR 8445	-	-	-	-	-	-

- สัญลักษณ์แสดงว่าไม่เกิดบริเวณบริเวณยับยั้ง

ตาราง ค-16 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยสารสกัดจากสาหร่าย 3 สายพันธุ์คือ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ซึ่งใช้ได-คลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์สาหร่าย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
Chlorella vulgaris TISTR 8580	4	19.5000^{a}
Chlorella vulgaris TISTR 8580	3	18.3680^{b}
Chlorella vulgaris TISTR 8580	2	17.8000^{cd}
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	1	17.6000^{c}
Chlorella vulgaris TISTR 8580	4	17.1340^{c}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-16 (ต่อ)

สายพันธุ์สาหร่าย	ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	3	15.4680[d]
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	2	14.1340[e]
Chlorella ellipsoidea TISTR 8260	1	11.4660[f]
Chlorella sp. TISTR 8445	4	0.0000[g]
Chlorella sp. TISTR 8445	3	0.0000[g]
Chlorella sp. TISTR 8445	2	0.0000[g]
Chlorella sp. TISTR 8445	1	0.0000[g]

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าสารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดโดยที่ปริมาณสารสกัด 4 และ3 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบมีความแตกต่างทางนัยสำคัญกับสารสกัดสาหร่าย *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 แต่ที่ปริมาณสารสกัด 2 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบของสาหร่าย *C. vulgaris* TISTR 8580 ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ไม่แตกต่างทางสถิติกับสารสกัดจากสาหร่าย *C. ellipsoidea* TISTR 8260 ที่ปริมาณสารสกัด 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้