ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

ผลของสารสกัดจากสาหร่ายต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด

Effect of algal extract on Inhibitory against bacteria

ชื่อนักศึกษา นางสาวอุษา พูลสวัสดิ์
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุนีรัตน์ เรืองสมบรูณ์
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.ปวีณา ทวีกิจการ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย
อาจารย์ที่ปรึกษา.....สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุนีรัตน์ เรืองสมบรูณ์)

ภาควิชารับรองแล้ว
.....
(รองศาสตร์ตราจารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ)
หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
วันที่ 16 เดือน พ.ย. พ.ศ. ๒๕๕๙

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๑๐๕๓๗

ปัญหาพิเศษ
เรื่อง

ผลของสารสกัดจากสาหร่ายต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด

Effect of algal extract on Inhibitory against bacteria

T099171

โดย

นางสาวอุษา พูลสวัสดิ์

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520
ปีการศึกษา 2547

ป.พ.
๐๘๖๔๑
๒๕๔๗

เลขหมู่.....
ลงทะเบียน.....99171
วันเดือนปี.....15 มิถุนายน 2548

ลิขสิทธิ์เป็นของผู้เขียน ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของสารสกัดจากสาหร่ายต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด

Effect of algal extract on Inhibitory against bacteria

จากการศึกษาความสามารถของสารสกัดจากสาหร่ายในกลุ่ม Cyanophyta, Chlorophyta และ Rhodophyta ทดสอบกับเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescence*, *Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ที่ก่อโรคทั้งคนและสัตว์น้ำ พบว่าสาหร่ายในกลุ่ม Chlorophyta คือ *Enteromorpha sp.* ที่ความเข้มข้น 14.96 mg/disc สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 5 ชนิดได้ โดยจะยับยั้งเชื้อ *S. aures* ได้มากที่สุดทุกระดับความเข้มข้น และจะยับยั้ง *V. harveyi* ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 3.74 mg/disc ได้น้อยที่สุด ส่วนสาหร่ายในกลุ่ม Rhodophyta คือ *Acanthophora sp.* ที่ความเข้มข้น 9.6 mg/disc พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดี คือ 10 ม.ม. แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 2.4, 4.8 และ 7.2 mg/disc รวมทั้ง *V. harveyi* ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 2.4 mg/disc โดยระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ 9.6 mg/disc และ 7.2 mg/disc สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *P. fluorescen* รองลงมาตามลำดับ คือ 7.8 ม.ม และ 6.4 ม.ม ส่วน *Gracilaria sp.* สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ 7.5 mg/disc คือ 7.9 ม.ม แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.5 mg/disc เชื้อ *E.coli* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.5, 5 และ 7.5 mg/disc เชื้อ *P. fluorescen* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.5 mg/disc เชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.5 mg/disc และ เชื้อ *V. harveyi* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.5 mg/disc สาหร่ายกลุ่ม Cyanophyta พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อทุกตัวได้เลยในระดับความเข้มข้น 1 – 25 mg/disc

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.สุนีรัตน์ เรืองสมบรูณ์ และ ดร. ปวีณา ทวีกิจการ อาจารย์ที่ปรึกษา และ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมเป็นอย่างยิ่งที่ให้คำแนะนำที่ดี รวมทั้งคำปรึกษาต่างๆ จนถึงแนวทางในการดำเนินการทดลอง แนวทางในการแก้ไขปัญหา และ ชี้ข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลอง จนปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ และ ผศ.ดร จำรูญ เล้าสินวัฒนา ที่กรุณาในเรื่องการใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน ในด้านการสกัด และสถานที่ในการสกัดสาร รวมทั้งแนะนำความรู้และเทคนิคในการสกัดสาหร่าย

ขอขอบคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ และ คุณสุดา โสภารักษ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านการแนะนำต่างๆ สารเคมีและอุปกรณ์การทดลอง

ขอขอบคุณ บรรจงฟาร์ม ที่ให้ความช่วยเหลือด้านตัวอย่างสาหร่ายที่นำมาทดลองรวมถึงน้องๆประมงที่ให้การร่วมมือประสานงานในการเก็บสาหร่าย

ขอขอบคุณ คุณชุติมา ไข่มุกข์ คุณ บงกชกร กนกธร คุณ นภาพร นุ่นแก้ว และ คุณ อรทัย กุดแถลง ที่มีน้ำใจคอยช่วยเหลือทุกๆด้านอย่างเต็มที่และจริงใจ

ขอขอบคุณ คุณ นริศ สุทธิไกร ที่เป็นกำลังใจ และ ผลักดันให้ทำปัญหาพิเศษผ่านพ้นไปได้ดีคอยช่วยเหลือทุกๆอย่างที่สามารถทำได้อย่างจริงใจและคอยอยู่เคียงข้างตลอดการทดลอง

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้าที่คอยเป็นกำลังใจคอยสนับสนุน และเป็นแรงผลักดันอยู่เบื้องหลัง ให้ข้าพเจ้าขยันและเอาใจใส่ในการศึกษาจนประสบความสำเร็จด้วยความภาคภูมิใจเป็นอย่างยิ่ง

นางสาว อุษา พูลสวัสดิ์

เมษายน พ.ศ. 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
ตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	22
ผลการทดลองและวิจารณ์	28
สรุปและข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงน้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่าย เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง	28

ตารางผนวกที่		หน้า
1	จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Density) ต่างๆ	35
2	จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Density) ต่างๆ	35
3	เชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Density) ต่างๆ	36
4	จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescence* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Density) ต่างๆ	36
5	จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Density) ต่างๆ	36
6	ผลการเกิด Inhibition zone (mm) ของเชื้อแบคทีเรียต่อชนิดสาหร่าย	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เซลล์สาหร่าย *Gloeocapsa sp.*	4
2	เซลล์สาหร่าย *Oscillatoria sp.*	5
3	เซลล์สาหร่าย *Calothrix sp.*	6
4	เซลล์สาหร่าย *Enteromorpha* sp.	8
5	เซลล์สาหร่าย *Gracillaria sp*	14
6	เซลล์สาหร่าย *Acanthophora sp.*	15
7	การเลี้ยงและการเก็บสาหร่าย	25
8	การกรองสาหร่ายด้วยกระดาษกรองเบอร์1	25
9	สารสกัดจากสาหร่ายนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator	26
10	การเตรียมแผ่นทดสอบจากสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย	26
11	การบ่มเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ อุณหภูมิ 30 °C นาน 18 – 24 ช.ม.ด้วยเครื่อง shecker	26
12	การเหวี่ยงสารละลายเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง centrifuge	27
13	ผลของสารสกัดจาก *Enteromorpha sp.* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	29
14	ผลของสารสกัดจาก *Acanthophora sp.* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	30
15	ผลของสารสกัดจาก *Gracilaria sp.* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	30

ภาพผนวกที่		หน้า
1	การ dilution แบบ ten – fold เพื่อนับจำนวน Colony ในการทำ Standard curve	37
2	กราฟ Standard curve ของเชื้อ *A. hydrophila*	38
3	กราฟ Standard curve ของเชื้อ *E. coli*	38
4	กราฟ Standard curve ของเชื้อ *P fluorescen*	39
5	กราฟ Standard curve ของเชื้อ *S. aureua*	39
6	กราฟ Standard curve ของเชื้อ *V. harveyi*	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

7 ผลของแผ่นทดสอบจากสารสกัด *Enteromorpha sp.* 4 ความเข้มข้น คือ 3.74, 7.48, 11.22 และ 14.96 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบที่ยับยั้งเชื้อ *S. aures aures* (ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง) 40

8 ผลของแผ่นทดสอบจากสารสกัด *Enteromorpha sp.* 4 ความเข้มข้น คือ 3.74, 7.48, 11.22 และ 14.96 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบที่ยับยั้งเชื้อ *P. fluorescen* (ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง) 41

9 ผลของแผ่นทดสอบจากสารสกัด *Enteromorpha sp.* 4 ความเข้มข้น คือ 3.74, 7.48, 11.22 และ 14.96 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบที่ยับยั้งเชื้อ *E.coli* (ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง) 41

10 ผลของแผ่นทดสอบจากสารสกัด *Acanthophora sp.* 4 ความเข้มข้น คือ 2.4, 4.8, 7.2 และ 9.6 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบที่ยับยั้งเชื้อ *P. fluorescen* (ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง) 42

11 ผลของแผ่นทดสอบจากสารสกัด *Acanthophora sp.* 4 ความเข้มข้น คือ 2.4, 4.8, 7.2 และ 9.6 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบที่ยับยั้งเชื้อ *S. aures* (ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง) 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายมีมากมายหลายด้าน เช่น ใช้ผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ การผลิตสี นอกจากนี้ยังใช้สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ยับยั้งจุลินทรีย์ ในอดีตมีการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมายหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตจากเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะได้ เช่น Penicillin จากเชื้อ *Penicillium sp.* และ Streptomycin จากเชื้อ *Streptomyces sp.* เป็นต้น (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2539) จึงมีการศึกษาหาแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ และพบว่าสาหร่ายเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีการให้ความสนใจอย่างมาก

ในปัจจุบันมีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากสาหร่ายที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา รวมทั้งยับยั้งสาหร่ายด้วยกันเอง จากรายงานของ (Pratt และ คณะ, 1944) สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella sp.* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เรียกว่า *Chlorellin* ซึ่งมีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacterium coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa*

จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าสาหร่ายในกลุ่มอื่นๆที่พบทั่วไปน่าจะมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกัน จึงได้มีการทดสอบถึงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคน และในสัตว์น้ำ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดจากสาหร่ายในกลุ่ม Cyanophyta, Chlorophyta และ Rhodophyta ทดสอบกับเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *Psedomonas fluoresen*, *Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aures* และ *E.coli* ที่ก่อโรคทั้งคน และสัตว์น้ำ เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้เป็นยาปฏิชีวนะรักษาโรค หรือยับยั้งเชื้อโรค ทั้งในคน และสัตว์น้ำในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม หรือเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆที่เป็นประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่าย *Gloeocapsa sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Calothrix sp.*, *Enteromorpha sp.*, *Acanthophora sp.*, และ *Gracilaria sp.* ต่อการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescence*, *Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

1. Division Cyanophyta

Division Cyanophyta มีชื่อสามัญคือ สาหร่ายเขียวแกมน้ำเงิน หรือ Cyanobacteria ชื่อดิวิชันอีกชื่อหนึ่งคือ ดิวิชัน Cyanochlorota จัดเป็นพืชชั้นต่ำที่เรียกว่า prokaryotic cell สามารถสังเคราะห์แสง ให้ออกซิเจน เปลี่ยนสีของเซลล์ได้ และตรึงไนโตรเจนได้ สาหร่ายในกลุ่มนี้ไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ พบได้ทั่วไปทุกแห่งในโลก ทั้งในน้ำจืด ทะเล น้ำพุร้อน และอาจอยู่รวมกับสิ่งมีชีวิตอื่นได้ทั้งพืชและสัตว์ (Anon, 2544)

ลักษณะทั่วไป

1. สารสีสำหรับการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigments) ประกอบด้วย chlorophyll a ส่วน carotenoids ประกอบด้วย β-carotene และ แซนโธฟิลล์ ได้แก่ myxoxanthin, myxoxantophll, phycobiloproteins ประกอบด้วย c-phycpcyanin, c-allophycocyanin และ c-phycoerythrin ผนังเซลล์ (cell wall) มี 2 ชั้น องค์ประกอบคล้าย bacteria gram negative รอบนอก เซลล์มีเมือกใสๆหุ้มโดยรอบเรียกว่า sheath อาจมีหรือไม่มีสี และอาจ แบ่งเป็นชั้นๆ หนวด (flagella) ไม่มีหนวดทั้งเซลล์ปรกติและเซลล์สืบพันธุ์ เคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement) ผลผลิตจากการสังเคราะห์แสง (photosynthetic product) ได้แก่ แป้ง cayanophocean starch เป็นเม็ดเล็กๆกระจายอยู่ เรียกว่า cyanophycin granule ลักษณะพิเศษประจำดิวิชัน คือ เป็นพืชชั้นต่ำ prokaryote สารสีไม่อยู่ในพลาสติก กระจายอยู่ในไซโตพลาสซึม ไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริงและสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

2. คุณสมบัติพิเศษของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

2.1 การเคลื่อนที่ (movement) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการเคลื่อนที่ 3 แบบ คือ แบบเลื่อนไหล (gliding movement) แบบเป็นคลื่น (waving movement) และแบบหมุนเป็นเกลียวหรือควงสว่าน (spiral movement) สาเหตุของการเคลื่อนไหวของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีสาเหตุมาจาก การยืดหดตัวของเซลล์, การผลิตสารเมือกแล้วถูกปล่อยออกไปในน้ำ, การแลกเปลี่ยนน้ำกับสารละลายภายในเซลล์ และเมื่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม

2.2 การเปลี่ยนแปลงสี (chromatic adaptation) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถเปลี่ยนสีได้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้สัมพันธ์กับความยาวคลื่นแสง (wave length) เพื่อให้สัมพันธ์กับความเข้มของแสง (light intensity) เพื่อให้สัมพันธ์กับปริมาณธาตุอาหาร และเพื่อประโยชน์ในการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การบลูมของน้ำ (water bloom)

3.1 Eutrophication เป็นปรากฏการณ์ที่แหล่งน้ำมีธาตุอาหารอุดมสมบูรณ์จนสาหร่ายหรือแพลงก์ตอนพืชชนิดเดียวหรือ 2-3 ชนิด มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มักเกิดในช่วงฤดูร้อน (อุณหภูมิสูงขึ้น) และเกิดในช่วงลมสงบ ชนิดที่ก่อให้เกิดการบลูมของน้ำ ได้แก่ *Microcystis aeruginosa*, *Anabaenopsis elekinii*, *Anabaena catenula A. macrospora*, *Gloeotrichia echinulata*, *Spirulina platensis*, *Oscillatoria erythraea*, *Lyngbya limnertica* เป็นต้น *Oscillatoria erythraea* และ *O .thiebautii* เป็นชนิดที่เกิดการบลูมในทะเลแถบร้อน ทำให้ปลาตาย เนื่องจากเซลล์เป็นเส้นสายจึงเข้าไปอุดตันเหงือก ทำให้ปลาขาดออกซิเจนในตอนกลางคืน

3.2 Nitrogen fixation เกิดจากการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เช่น *Richelia intracellularis* และ *Anabaena azolla* ผลที่ได้คือ ปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์เกิด heterocyst (สะสมอาหารและสร้างสปอร์) เพิ่มมากขึ้นแต่ถ้าแอมโมเนียซึ่งจะเปลี่ยนรูปเป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เช่น asparatic acids และ glutamic acids ทำให้เกิดสารพิษ (toxin)

3.3 ผลที่เกิดจากการบลูมของน้ำ

1) น้ำเปลี่ยนสี เช่น มีสีเขียวเข้ม

2) เกิดกลิ่นโคลนในตัวสัตว์น้ำและน้ำมีกลิ่นและรสเกิดจากการบลูมของ *Anabaena sp.* และ *Oscillatoria sp.* สร้างสารเคมี เช่น สารจีออสมิน และสารพวก 2-methyllisoborneol ปลาและกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่เกิดการบลูมของสาหร่าย เช่น *Anabaena sp.* และ *Osacillatiria sp.* ทำให้เกิดกลิ่นโคลนได้

3) เกิดสารพิษ (toxin) เช่น *Microcystis sp. Anabaena sp.Gloeotrichia sp.* เป็นพิษต่อระบบประสาท เรียกว่า neurotoxin เป็นพิษต่อตับ เรียกว่า hepatotoxins

4) เกิดความรำคาญ เช่น อาการคันตามหนัง เป็นผื่นหรือบวม

4. แหล่งที่อยู่ (habitat)

แหล่งที่อยู่ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้ 2 แหล่งคือ ในน้ำจืดและในน้ำทะเล ในแหล่งน้ำจืดพบประมาณ 80 % ของชนิดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งหมด โดยอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนิ่ง (lentic) ได้แก่พวกที่เป็นเซลล์เดี่ยว และพวกที่เป็นเส้นสายไม่มีซีทหุ้ม และปหล่งน้ำไหล (lotic) ส่วนพวกที่อาศัยอยู่ในทะเลหรือน้ำกร่อยพบพวกที่เป็นเส้นสายที่มีซีทหุ้มมีประมาณ 20% ของชนิดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งหมด ซึ่งอยู่ภายในเขต intertidal zone และ supertidal zone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจำแนกหมวดหมู่

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

Order 1 Chroococcales สาหร่ายในอันดับนี้มักเป็นพวกเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นกลุ่มเซลล์ไม่สร้างสปอร์อาจเรียกเป็นพวก " coccoid blue – green algae " โดยสาหร่ายในอันดับนี้มักมีรูปร่างกลม รี อยู่เดี่ยวๆ หริเป็นกลุ่มมี sheath หุ้ม ชั้นเดียวหรือหลายชั้น

Gloeocapsa ดำรงชีวิตในลักษณะที่เป็น plankton หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่ชื้นแฉะ ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างรี เมื่อเซลล์แบ่งตัวจะรวมกันอยู่ภายใน sheath เดิมเป็นกลุ่มมี sheath หุ้มแต่ละเซลล์และหุ้มทั้งกลุ่มเซลล์รวมกัน sheath ที่หุ้มอาจไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีน้ำตาลและอาจเห็น sheath ที่หุ้มเป็นชั้นๆได้ชัดเจน

ภาพที่ 1 เซลล์สาหร่าย *Gloeocapsa sp.*
ที่มา : http://www.marictta.edu/.../bio1202/microid/images.

Order 2 Chamaesiphonales สาหร่ายในอันดับนี้มักเป็นพวกที่เป็นเซลล์เดี่ยว มีส่วนโคนและส่วนปลายของเส้นสายที่สามารถสร้าง endospor หรือ exospor ได้

Order 3 Pleurocapsales สาหร่ายในอันดับนี้มีลักษณะของทัลลัสคล้ายเส้นสายไม่มี heterocyst ไม่สร้าง hormogone สืบพันธุ์โดยการสร้าง endospor

Order 4 Nostocales สาหร่ายในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นเส้นสายที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนงก็ได้

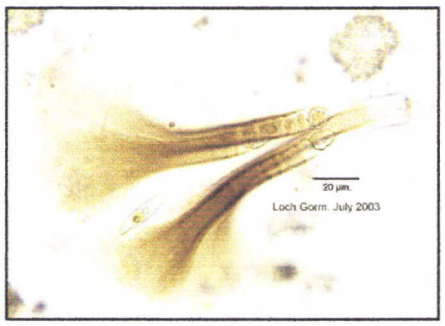
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oscillatoria ดำรงชีวิตในลักษณะที่เป็น plankton พบได้ทั้งในน้ำจืด, น้ำเค็ม หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่ชื้นแฉะ ลักษณะเป็นเส้นสายเดี่ยวๆหรืออยู่เป็นกลุ่มเซลล์ที่หนาแน่น เส้นสายไม่แตกแขนง สายรูปทรงกระบอก ส่วนเซลล์ที่อยู่ปลายสุดของเส้สายมีลักษณะกลมมนโดยอาจกว้างเท่าเซลล์ ในสายหรือเซลล์เล็กกว่าเซลล์ในเส้นสายและรูปร่างเซลล์เรียวสูงขึ้น สาหร่ายในสกุลนี้ไม่มี sheath หุ้มจึงเรียกเส้นสายสาหร่ายนี้ว่า trichom สาหร่ายสกุลนี้เคลื่อนไหวแบบเดินหน้า ถอยหลังหรือ แกว่งซ้ายขวา สาหร่ายในสกุลนี้สามารถสร้าง สาร geosmin ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดกลิ่นเหม็นโคลนในเนื้อสัตว์น้ำ โดยสารนี้จะเข้าสู่สาหร่ายสัตว์น้ำได้โดยการที่สัตว์น้ำกินสาหร่ายเข้าไปโดยตรง และอีกทางคือสาร geosmin ที่สาหร่ายปล่อยออกมาจากเซลล์และละลายอยู่ในน้ำนั้นซึมเข้าทางผิวหนังของสัตว์น้ำ

ภาพที่ 2 สาหร่าย *Oscillatoria sp*
ที่มา : http://www.Stcsc.edu/ecology/algae/Algae.htm

Calothrix พบอาศัยอยู่บริเวณก้อนหิน กิ่งไม้ ใบไม้ สาหร่ายขนาดใหญ่ พบได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม เซลล์เดี่ยวมีรูปร่างกลม มาเรียงตัวกันเป็นเส้นสาย เซลล์ที่บริเวณโคนของแต่ละเส้นสายมีขนาดใหญ่ และเรียวเล็กลงทางปลายเส้นสาย เซลล์ปลายเส้นสายอาจมนหรือเรียวแหลมเป็นเส้น เส้นสายไม่แตกแขนงหรืออาจพบแตกแขนงเทียม ถ้าพบว่ามีการแตกแขนงเทียมแขนงใหม่ที่ได้จะเป็นอิสระจากอันเดิม มี ขีทหุ้มแต่ละเส้นสายมักมี basal heterocyst มี akinete เกิดติดกับ *heterocyst* บางครั้งอาจพบ *intercalary heterocyst*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 เซลล์สาหร่าย *Calothrix sp.*

ที่มา : http://www.biol.napier.ac.uk/.../qcalothrix-c. jpg.

Order 5 Stigonematales

2. Division Chlorophyta

สาหร่ายในดิวิชั่นนี้พบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย น้ำทะเล บนบก บริเวณผิวดินที่ชื้นแฉะและในอากาศ ในรูปแบบของสปอร์ สาหร่ายในกลุ่มนี้มีขนาดตั้งแต่เล็กมาก จนถึงขนาดใหญ่เป็น thallus เห็นได้ชัดเจนด้วยตาเปล่า โดยสาหร่ายในกลุ่ม green algae ที่มีขนาดเล็กที่สุดคือสาหร่ายสกุล *Chlorella* รูปร่างได้หลายแบบ ทั้งรูปร่างเป็นแบบ uncial, colony, filament, parenchymatous form, siphonous form โดยมีทั้งสาหร่ายพวกที่เคลื่อนที่ไม่ได้

ลักษณะทั่วไป

1. ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวชั้นในเป็น cellulose ชั้นนอกมีเมือกเป็นพวก pectin บางชนิดอาจมี chitin, หินปูน หรือ silica หุ้มอีกทีหนึ่ง เวลาจับจึงกระด้างมือ สาหร่ายสีเขียวเป็นพวก eukaryotic cell โดยมี 1 หรือหลาย nucleus พวกที่มีหลาย nucleus คือมีหลายเซลล์แต่ไม่มีผนังกั้นระหว่างเซลล์จึงมองดูว่ามีหลาย nucleus อยู่ในเซลล์เดียว

2. choloplast สามารถเห็นได้ชัดเจน และใช้ในการจัดกลุ่มย่อยได้อีกด้วย โดย choloplast มีหลายรูปร่างโดยมีทั้งเป็นรูปถ้วย, รูปฟองน้ำ, รูปร่างแห, รูปดาว, เป็นขด, รูปตาข่าย, ขดเป็นวงรอบเซลล์, แถบข้างเซลล์หรือกลางเซลล์

3. อาหารสะสมมี pyrenoid ซึ่งทำหน้าที่สร้างแป้งอยู่บน choloplast บางชนิดที่ไม่มี pyrenoid จะสะสมอาหารในรูป oil แป้งที่สร้างขึ้นมาเป็นแป้งพวก amylose (unbranched chain ของ glucose residue), amylopectin (branched chain ของ glucose residue)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. รงควัตถุประกอบด้วย cholophyll a, b และในสาหร่ายบางชนิดมี iron tannin complex ซึ่งเป็นรงควัตถุสีม่วงอยู่ใน vacuole และพบรงควัตถุพวก α, β, δ-carotene, xanthophyll

5. สาหร่ายสีเขียวพวกเคลื่อนที่ได้จะพบว่ามี eye spot และหนวด ส่วนใหญ่หนวดยาวเท่ากัน และมักเป็นแบบ acronematic ยกเว้นบางชนิดจะมีหนวดเป็น panthonematic จำนวนหนวดมีแตกต่างกัน อาจเป็น 1, 2 หรือ 4 เส้น หรือมากกว่านั้น

การสืบพันธุ์

1. การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบนี้สาหร่ายจะสืบพันธุ์โดยสร้างสปอร์แบบต่างๆ หรือโดยการขาดท่อน โดยมีรูปแบบหลักๆ คือ

1.1 zoospore สร้างสปอร์ที่มีหนวด

1.2 aplanospore สปอร์ที่ไม่มีหนวด มีผนังเซลล์บาง

1.3 autospore สปอร์ที่มีลักษณะเหมือนเซลล์แม่ทุกประการเพียงแต่มีขนาดเล็กกว่า

1.4 fragmentation การสร้างเซลล์ใหม่โดยการขาดท่อนของเซลล์แม่

1.5 akinete การสร้างเซลล์สะสมอาหารที่มีผนังหนาทนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมได้ดี

2. การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เป็นการรวมของ gamete แบบต่างๆ คือ

2.1 isogamy เป็นการรวมตัวของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียที่มีขนาดเท่ากัน ลักษณะของทั้ง 2 เพศเหมือนกัน

2.2 anisogamy เป็นการรวมตัวของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะเหมือนกัน แต่ขนาดแตกต่างกัน

2.3 oogamy เป็นการรวมตัวของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียมีทั้งลักษณะและขนาดที่แตกต่างกัน

การจำแนกหมวดหมู่

Division Chlorophyte

Class Chlorophyte (green algae, grass-green algae / สาหร่ายสีเขียว)

Order 1 Volvocales สาหร่ายในอันดับนี้สามารถพบได้ทั้งในแหล่งน้ำจืด, น้ำกร่อย, น้ำเค็ม และบนดิน เป็นพวกที่มีหนวด 1, 2, 4 หรือ 6 เส้น ลักษณะกลุ่มเซลล์เป็นแบบ coenobium colony มักเคลื่อนที่เข้าหาแสง มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ หรือ gonidia หรือ สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยเป็นแบบ isogamy, anisogamy หรือ oogamy

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Order 2 Tetrasporales เซลล์เดี่ยวมีลักษณะเหมือน *Chlamydomonas* แต่ไม่เคลื่อนไหว หรือ เคลื่อนไหวเล็กน้อยในสารวุ้นที่หุ้มอยู่ สาหร่ายในอันดับนี้ส่วนใหญ่พบในน้ำจืด

Order 3 Chlorococcales เป็นเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ ไม่มีการเคลื่อนไหว ไม่มี stigma, ไม่มี contractile vacuole สาหร่ายในอันดับนี้ส่วนใหญ่พบในน้ำจืด และพบในน้ำกร่อยและน้ำเค็มได้

Order 4 Chlorellales เป็นเซลล์เดี่ยวและกลุ่มเซลล์ที่ไม่เคลื่อนไหว สาหร่ายในอันดับนี้พบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม แต่ส่วนใหญ่จะพบมากในน้ำจืด

Order 5 Ulotrichales เป็นเส้นสายที่ไม่แตกแขนง บางสกุลดำรงชีวิตแบบ plankton บางสกุลมี holdfast ยึดเกาะ สาหร่ายอันดับนี้พบมากในน้ำจืด

Order 6 Chaetophorales เป็นเส้นสายที่แตกแขนงได้ มีแบบเส้นสายยึดเกาะและคืบคลานไปตามพื้น แล้วมีส่วนแขนงตั้งขึ้นมาเหนือพื้น อีกแบบมีแขนงคืบคลานไปตามพื้น หรือตั้งตรงเหนือพื้นอย่างใดอย่างหนึ่ง สาหร่ายอันดับนี้พบมากในน้ำเค็ม

Order 7 Oedogoniales เป็นเส้นสายมีทั้งแตกแขนงได้และแตกแขนงไม่ได้ การแบ่งเซลล์มีการสร้าง apical caps ซ้อนกันหลายชั้น spore และ gamete มีหนวดหลายเส้นเป็นวงโดยรอบทางด้านบนสืบพันธุ์อาศัยแบบเพศเป็นแบบ oogamy สาหร่ายอันดับนี้พบมาในน้ำจืด

Order 8 Ulvales

Enteromorpha พบในทะเล มีชื่อสามัญ คือ "สาหร่ายไส้ไก่" ทัลลัสมีลักษณะเป็นหลอดกลวง มีความหนา 1 ชั้นเซลล์ทัลลัสอาจเรียบหรือหงิกงอ มีส่วน holdfast ยึดเกาะ บางชนิดเมื่อแก่จะหลุดลอยขึ้นมาผิวหน้าน้ำและลอยเป็นอิสระ เมื่อเริ่มงอกเป็นต้นใหม่ๆ จะมีเส้นสายที่เซลล์เรียงต่อกันแถวเดียว เมื่อมีการแบ่งเซลล์จะได้เป็นเส้นสายที่มีเซลล์หลายแถว และมีความหนา 2 ชั้นเซลล์ ต่อมาเซลล์ 2 ชั้นนี้จะแยกออกจากกัน เกิดเป็นหลอดกลวงตรงกลาง

ภาพที่ 4 เซลล์สาหร่าย *Enteromorpha*

ที่มา : http://www.hawaii.edu/.../cholo/enteromorpha3field.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Order 9 Claophorales เป็นเส้นสายทั้งแตกแขนงและไม่แตกแขนง แต่ละเซลล์มี nucleus มากกว่า 1 อัน

Order 10 Caulerpales ลักษณะของทัลลัสเป็นหลอดหรือท่อที่ไม่มีผนังเซลล์มาปิดกั้น นอกจากระยะสืบพันธุ์จะมี septum มากั้นเพื่อสร้าง gametangium

Order 11 Siphonocladales สาหร่ายกลุ่มนี้พบในทะเลเขตร้อน

3. Division Rhodophyta

สาหร่ายในดิวิชั่นนี้พบในทะเลมากกว่าน้ำจืด มีขนาดตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่จนมองเห็นชัดเจนด้วยตาเปล่า สาหร่ายพวกที่มีขนาดใหญ่มักเป็นสาหร่ายที่ดำรงชีวิตแบบ benthic form, epiphytic หรือ epilithic สาหร่ายดิวิชั่นนี้มีสมาชิกประมาณ 4,000 ชนิด โดยเป็นพวกสาหร่ายที่อยู่ในน้ำจืดประมาณ 200 ชนิดเท่านั้น สาหร่ายสีแดงที่พบในเขตร้อนมักมีขนาดเล็ก ที่พบในเขตอบอุ่นและเขตหนาวมักมีขนาดใหญ่

ลักษณะทั่วไป

สาหร่ายสีแดงเป็นสาหร่ายที่ไม่มี flagella ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ (ไม่มีระยะใดในวงจรชีวิตที่มีหนวด) มีรงควัตถุช่วยในการสังเคราะห์แสงที่พิเศษจากสาหร่ายกลุ่มอื่นคือ phycobilin และ phycoerythrin ระหว่างเซลล์ของสาหร่ายสีแดงที่อยู่ติดกันจะมี pit connection ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้มีการติดต่อกันของไซโตพลาสซึมระหว่างเซลล์ อาหารสะสมของสาหร่ายสีแดงมีคุณสมบัติคล้ายกับอาหารสะสมของ blue green algae

รูปร่าง

ส่วนใหญ่สาหร่ายสีแดงจะเป็นเส้นสายที่แตกแขนง หรือรวมตัวกันเป็นแผ่น หรือแตกแขนงจนเป็นก้อนคล้ายปะการัง เนื่องจากมีหินปูนเป็นองค์ประกอบจึงดูแข็งแรงคล้ายปะการัง

ทัลลัสของสาหร่ายสีแดงส่วนมากจะมีแกน ประกอบด้วยเส้นสายเดี่ยว (uniaxial) หรือแกนประกอบด้วยหลายเส้นสาย (multiaxial) แกนแบบหลายเส้นสายจะทำให้สาหร่ายมีโครงสร้างเป็น pseudoparenchymatous การเจริญของทัลลัสจึงมาจากการเจริญของเส้นสายทั้งหลายจึงทำให้มีการเจริญได้หลายทิศทาง เจริญได้ในแนวสามมิติ

ลักษณะพิเศษของสาหร่ายสีแดง คือ มี hair หรือ tendril มีลักษณะเป็นเส้นสายใสไม่มีสี โดยส่วนของ hair หรือ tendril นี้เกิดจากเซลล์ cortical cell มีหน้าที่ป้องกันอันตรายจากแสงแดดที่มากเกินไปต่อความต้องการของสาหร่าย และเพิ่มพื้นที่ผิวเพื่อดูดซึมธาตุอาหาร และช่วยในการยึดเกาะกับสาหร่ายอื่นที่ตัวสาหร่ายสีแดงเองไปอาศัยเกาะอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายสีแดงบางชนิดใน Subclass Florideophycidae จะมีส่วน gland cell (vesical cell / secretory cell) มีลักษณะใส ภายในมีสารสะท้อนแสงอยู่ บางชนิดใน gland cell จะมีส่วนของ bromine, iodine อยู่ภายในเป็นจำนวนมาก

รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีแดงประกอบด้วย chlorophyll a เป็นหลัก และมี chlorophyll d อยู่เล็กน้อย ส่วน carotene จะประกอบด้วยชนิด α และ β-carotene, xanthophyll, phycobilin (phycocyanin, phycoerythrin) สามารถเจริญเติบโตในน้ำลึกได้เพราะ phycoerythrin ตัวนี้สามารถดูดแสงสีน้ำเงินเพื่อนำไปส่งต่อให้ chlorophyll a สังเคราะห์โดยแสงได้ และพบว่าที่ระดับความเข้มแสงต่ำ ค่าอัตราส่วนของ phycobilin : chlorophyll จะมีค่าสูง (phycobilin มากกว่า chlorophyll มาก) ความเข้มของแสงมากสาหร่ายสีแดงจะมีสีออกไปทางสีเขียว และที่ความเข้มแสงน้อยสาหร่ายสีแดงจะมีสีแดงสด

ส่วนประกอบของเซลล์สาหร่ายสีแดง

สาหร่ายสีแดงมีเซลล์ชั้นในเป็นเซลลูโลส ส่วนผนังชั้นนอกเป็น sheath ซึ่งเป็นสารพวก sulfate, galactan ซึ่งดีในพวก agar, porphylan, carrageenan (นำไปสกัดใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้) สำหรับ phloroplast ของสาหร่ายสีแดงใน Subclass Bangiophycidae จะมีรูปร่างเป็นแฉกรูปดาว ส่วนสาหร่ายสีแดงใน Subclass Florideophycidae จะมีรูปร่าง chloroplast เป็นแผ่นกลมแบน ในส่วนของ pyrenoid จะมีตำแหน่งอยู่ตรงกลาง chloroplast

อาหารสะสมของสาหร่ายสีแดงคือแป้งที่มีชื่อเรียกว่า floridean starch โดยแป้งนี้เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีเหลือง, สีน้ำตาล หรือสีม่วงแดง อาหารสะสมของสาหร่ายสีแดงอีกประเภทหนึ่งคือ น้ำตาล floridoside ซึ่งทำหน้าที่เหมือนน้ำตาล sucrose ในสาหร่ายสีเขียวและพืชชั้นสูงโดยทั่วไป

การเกิด pit connection

Pit connection มี 2 แบบ คือ

1. primary pit connection เป็นแบบที่พบในสาหร่ายสีแดงที่เป็นสมาชิกของ Subclass Florideophycidae เกือบทุกชนิด โดยเกิดขึ้นระหว่าง 2 เซลล์ ที่ได้จากการแบ่งเซลล์ปกติ 1 เซลล์ แต่ตรงกลางจะไม่ติดกัน ต่อมาตรงกลางมี vesicle ของ endoplasmic reticulum มาอุด เรียก *plug*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. secondary pit connection เป็นแบบที่พบในสาหร่ายสีแดงที่เป็นสมาชิกของ Subclass Florideophycidae เป็นส่วนใหญ่ โดยเกิดระหว่าง 2 เซลล์ปกติที่อยู่ต่างเส้นสายกันมาอยู่ใกล้ชิดกัน เมื่อแบ่งเซลล์เสร็จแล้วจะได้เซลล์ที่มีขนาดเล็ก 1 เซลล์ และเซลล์ที่มีขนาดใหญ่อีก 1 เซลล์ จึงเกิด pit connection ขึ้น ซึ่งเกิดโดยเซลล์ที่มีขนาดเล็กและเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่อยู่ติดกันเกิด pit connection เข้าด้วยกัน และเซลล์เล็กไปรวมกับเซลล์ใหญ่อีกด้านหนึ่ง (ของอีกเส้นสายหนึ่ง) และรวมเป็นเซลล์เดียว ซึ่งวิธีการแบบนี้เป็นวิธีที่สาหร่ายสีแดงใช้ทำให้เกิดกับ host อื่นที่มันอาศัยด้วย

การเกิดหินปูน calcification

หินปูนพวกนี้จะมีประโยชน์ในการทำให้โครงสร้างทัลลัสของสาหร่ายแข็งแรงขึ้นและทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะภายนอกได้ดี สาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเกาะเรียกว่า coralline red algae บางชนิดมี calcite เกาะ สาหร่ายสีแดงบางชนิดมีส่วนสำคัญในการเกิด coral reef เช่น *Lithophyllum, Corallina* หินปูนที่เกาะบนสาหร่ายสีแดงจะสะสมอยู่ในรูปของ calcite, aragonite ซึ่ง 2 แบบนี้จะแตกต่างกันตรงรูปร่างของผลึก

การอยู่ร่วมกับสาหร่ายชนิดอื่น

สาหร่ายสีแดงสามารถอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้หลายแบบ ทั้งแบบที่เรียกว่า adelphoparasite คือ สาหร่ายสีแดงที่ดำรงชีวิตเป็นปรสิตแบบสามารถสร้าง secondary pit connection ได้ และจะสามารถปรับตัวเข้ากับ host ได้ง่าย โดยเฉพาะการถ่ายทอดอาหารจาก host จะทำได้ง่าย สาหร่ายพวกนี้ส่วนใหญ่จะขึ้นเกาะบนพื้น หรือขึ้นในลักษณะ epiphyte บนสาหร่ายอื่น สาหร่ายที่ดำรงชีวิตเป็นปรสิตอีกแบบเรียกว่า เป็น alloparasite คือสาหร่าย สีแดงที่เป็นปรสิตจะอยู่ในกลุ่มที่ต่าง family กับ host โดยสาหร่ายพวกนี้จะไม่สามารถสร้าง secondary pti connection ได้

การสืบพันธุ์

ในสาหร่ายสีแดงทุกชนิดเซลล์สืบพันธุ์จะไม่มีหนวด การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสีแดงแบ่งได้เป็น

1. การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ asexual reproduction โดยการสร้างสปอร์ที่สร้างขึ้นมามีหลายแบบ เช่น

1.1 monospore คือ เซลล์ปกติเปลี่ยนแปลงให้ 1 monosporangium และจะสร้าง → 1 monospore หรือโดยที่เซลล์ปกติแบ่งเซลล์ให้ 2 เซลล์ขนากที่ไม่เท่ากัน เป็นเซลล์ขนาดใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเซลล์เล็ก ต่อมาเซลล์ที่มีขนาดเล็กจะเปลี่ยนเป็น → monosporangium และจะสร้าง → 1 monospore

1.2 bispore จะเกิดบนต้น diploid sporphyte เกิดโดยเซลล์ปกติเปลี่ยนแปลงให้ bisporangium และจะสร้างให้ 2 → spore

1.3 tetraspore จะเกิดบนต้น diploid sporphyte โดยเซลล์ปกติเปลี่ยนเป็น tetrasporangium และเกิดการแบ่งตัว → meiosis ได้ → 4 nucleus (n) จากนั้นได้ → tetraspore ซึ่งรูปแบบการแบ่งเซลล์เพื่อสร้าง tetraspore มีการแบ่งได้หลายแบบ คือ แบบ cruciate (cruciform) แบบ zonate และแบบ tetrahedral ซึ่งโดยทั่วไปสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีรูปแบบของ tetraspore เพียงแบบเดียว (ยกเว้นสาหร่ายสีแดงใน Order Nemalionales)

1.4 polyspore จะเกิดภายในส่วนของ polysporangium ซึ่งเกิดบนต้น diploid sporophyte จากนั้นทำการแบ่งแบบ → meiosis → spore โดยสปอร์ที่ได้เป็นจำนวนทวีคูณของ 4

1.5 paraspore การสร้างสปอร์จะคล้ายกับการสร้าง polyspore แต่เป็นลักษณะที่มี spore มากกว่า 1 ในแต่ละ sporangium ซึ่งไม่มี meiosis ขณะแบ่ง nucleus

2. การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ sexual reproduction โดยทำการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียขึ้นมาให้ผสมกันได้เป็นตัวอ่อน โดยจะมีการสร้างต่างกันในกลุ่มของสาหร่าย เช่น

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในสาหร่าย Subclass Bangiophycidae จะทำโดย เซลล์ปกติทำการแบ่ง protoplasm และทำการสร้างส่วนของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่เรียกว่า spermatium ส่วนสาหร่าย Subclass Florideophycidae จะแบ่งเซลล์ปกติให้เป็น spermatangium และทำการสร้าง → 1 spermatium ซึ่งการสร้างแบบนี้จะมีส่วนที่เรียกว่า spermatangial filament ซึ่งมีลักษณะเป็นแขนงสั้นๆ ประกอบด้วยเซลล์เพียง 4-5 เซลล์ และปลายแขนงจะเป็นที่อยู่ของ spermatangium เกิดอยู่โดยรอบและแต่ละ spermatangium จะทำการสร้างให้ 1 spermatium

สำหรับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย สาหร่ายสีแดงเป็นสมาชิกของ Subclass Bangiophycidea จะทำการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียโดยเซลล์ปกติสร้าง prototrichogyne ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงมีคอ สั้นๆเป็นส่วนที่มี spermatium มาเกาะ ส่วนสาหร่ายสีแดงในกลุ่ม Subclass Florideophycidae จะทำการสร้าง supporting cell และสร้างแขนง carpogonial filamentซึ่งมีลักษณะเป็นแขนงสั้นๆมี 3-4เซลล์ไม่แตกแขนง ไม่มี chromatophore แต่มี protoplast เข้มข้นกว่าปกติ และเกิด carpogonium บนส่วนนี้มีส่วนปลายสุดยื่นยาวออกมาเรียก trichogyne ซึ่งทำหน้าที่เป็น egg ให้ spermatium มาเกาะ

การสร้าง gonimoblast filament และcarpospore ของสาหร่ายสีแดงที่เป็นสมาชิกของ Subclass Bangiophycidae จะสร้างโดย carpogonium ได้รับการผสมเป็น zygote และสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็น carpospore หลังจากนั้นงอกเป็น cochocelis filament ซึ่งระยะนี้เรียกว่าconchocelis phase ส่วนสาหร่ายสีแดงที่เป็นสมาชิกของSubclass Florideophycidae จะสร้างโดยzygote สร้าง gonimoblast filament +carposporangium ขึ้นมาและเรียกระยะนี้ว่า carposporophyte phase การสร้าง gonimoblast filament ถ้านิวเคลียสของ zygote มีการแบ่งแบบ meiosis จะได้ haploid carposporophyte แต่ถ้าแบ่งแบบ mitosis จะได้ diploid carposporophyte การสร้าง gonimoblast filament อาจสร้างจาก zygote โดยตรง โดย zygote แบ่งนิวเคลียสแบบ meiosis ได้สองนิวเคลียสและมีผนังมาตัดแบ่งเซลล์ใหม่อีก 1 เซลล์อยู่ด้านล่าง มีนิวเคลียส 1 อันส่วนเซลล์บนจะแบ่งตัวต่อได้ lateral protuberance และแบ่งต่อได้อีกหลายครั้งได้ gonimoblast filament จำนวนมาก ปลาย gonimoblast filament คือ carposporangium ในสาหร่ายสีแดงจะมีส่วน cystocarp คือส่วนที่รวมของกลุ่มเซลล์ carposporangium + gonimoblast filament

การจำแนกหมวดหมู่

Division Rhodophyta

Class Rhodophyceae

เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นเส้นสาย มีทั้งแบบแตกแขนง ไม่แตกแขนง เป็นแผ่นแบนบาง การแบ่งเซลล์ในทัลลัสเป็นแบบ intercalary cell division แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสเพียง 1 อัน และมีคลอโรพลาสต์ลักษณะเป็นแฉกรูปดาว 1 อัน ไม่มี pit connection ยกเว้นระยะ conchocelis ของ *Porphyra*

Subclass 1 Bangiophycidae ไม่ค่อยพบ pit connection

Order 1 Porphyridiales เป็นเซลล์เดี่ยว บางครั้งมารวมเป็นกลุ่ม มีเมือกหุ้ม

Order 2 Goniotrichales เป็นสาหร่ายที่ดำรงชีวิตเป็น epiphyte เป็นพวกที่มีขนาดเล็ก โดยมักพบขึ้นอาศัยอยู่บนสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่

Order 3 Compsopogonales สาหร่ายน้ำจืด พบเฉพาะเขตร้อน

Order 4 Bangiales

Subclass 2 Florideophycidae ทัลลัสมีหลายเซลล์ รูปร่างหลายแบบ

Order 1 Nemalionales ทัลลัสมีทั้งแบบแกน uniaxial,multyaxial

Order 2 Gelidiniales

Order 3 Cryptonemiales ทัลลัสเป็นเส้นสายหรือเป็นแผ่นประกอบด้วยเซลล์ pseudoparenchyma บางชนิดอ่อนนิ่ม แต่ส่วนมากมักมีหินปูนเป็นส่วนประกอบ

Order 4 Gigartnales โครงสร้างทัลลัสเป็นแบบ uniaxial แกนประกอบด้วยหลายเส้นสาย multiaxial และการแบ่งของ tetrasporangium เป็นแบบ zonate หรือ cruciate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Order 4 Gigartnales โครงสร้างทัลลัสเป็นแบบ uniaxial แกนประกอบด้วยหลายเส้นสาย multiaxial และการแบ่งของ tetrasporangium เป็นแบบ zonate หรือ cruciate

Gracillaria สาหร่ายสกุลนี้ใช้ประโยชน์ในการสกัด agar พบอาศัยในน้ำเค็ม ลักษณะรูปร่างของทัลลัสคือกลม แบนอวบน้ำ แตกแขนงมากน้อยสุดแต่ละชนิด บางชนิดแตกแขนงมากจนเป็นพุ่มใหญ่ ต้น gametophyte เหมือน sporophyte gametophyte สร้าง cystocarp เป็นปุ่มกลมๆขนาดหัวเข็มหมุดทั่วผิวทัลลัส

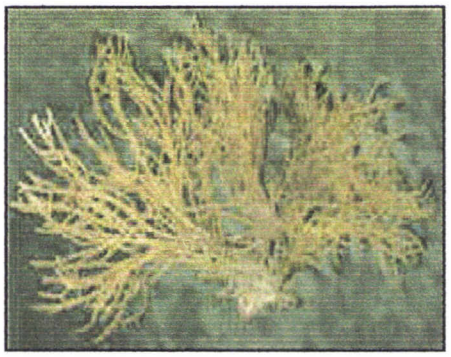
ภาพที่ 5 เซลล์สาหร่าย *Gracillaria sp*
ที่มา : http://www.refer.mg/cours/wel/wbalg/pages/p30.htm

Order 5 Rhodymeniales ทัลลัสมีแกนเป็นแบบ multiaxial

Order 6 Ceramiales

Acanthophora พบในทะเล ทัลลัสมีลักษณะตรง แตกแขนงมากหรือน้อยตามแหล่งน้ำที่ขึ้นอยู่ อาจแตกแขนงมากจนเป็นพุ่ม บนแขนงมีแขนงย่อย branchlet เป็นแฉกรูปดาวเกิดอยู่ทั่วไป ต้นแข็ง อวบน้ำ มี trichoblast เกิดที่ปลายแขนง มักหลุดร่วงไป cystocorp เป็นปุ่มกลมๆเกิดโคนแขนงย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 เซลล์สาหร่าย *Acanthophora sp.*

ที่มา : http://www.sms.si.edu/irlspec/Acantho_spicif.htm.

การเลี้ยงสาหร่าย

การเลี้ยงสาหร่ายจะมีวัตถุประสงค์หลายประการ ทั้งการเลี้ยงเพื่อใช้ศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยศึกษาเช่นทางด้านลักษณะโครงสร้าง รูปร่าง วัฏจักรชีวิต รูปแบบการสืบพันธุ์ หรือ คุณค่าทางอาหารของสาหร่ายชนิดนั้นๆเป็นต้น หรือเลี้ยงเพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์ หรืออาหารสัตว์น้ำ ซึ่งจะต้องเลี้ยงสาหร่ายให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อความต้องการ (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง, 2547)

1. ระยะเวลาของการเลี้ยงสาหร่าย

การแบ่งการเลี้ยงสาหร่ายตามระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

1.1 Long term culture การเลี้ยงระยะยาว เลี้ยงแบบนี้จะเลี้ยงสาหร่ายได้นาน 3 – 12 เดือนโดยไม่มีการถ่ายหัวเชื้อไปเลี้ยงในอาหารใหม่เพื่อรักษาให้มีชีวิต (subculture) วัตถุประสงค์เพื่อเก็บรักษาหัวเชื้อสาหร่ายในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับการเพาะสาหร่ายครั้งต่อไป (stock culture) และ เพื่อผลิตเป็นอุตสาหกรรม

1.2 Short term culture การเลี้ยงระยะสั้น การเลี้ยงสาหร่ายวิธีนี้เหมาะกับการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อทำการศึกษาในห้องเรียน หรือการทำอุตสาหกรรมระยะสั้น ต้องเลือกใช้สูตรอาหารให้เหมาะสมตามวัตถุประสงค์ในการศึกษาสาหร่าย

2. รูปแบบของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

รูปแบบการเลี้ยงสาหร่ายแบ่งตามความบริสุทธิ์สะอาดของสาหร่ายที่เลี้ยงได้ 3 แบบคือ

2.1 Unialgal culture การเลี้ยงสาหร่ายชนิดเดียว ไม่มีสาหร่ายอื่นปน

2.2 Axenic culture / Bacteria free culture การเลี้ยงสาหร่ายชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ได้ แต่ ไม่มีแบคทีเรียปน

2.3 Pure culture เลี้ยงสาหร่ายชนิดเดียว ไม่มีแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตอื่นปน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 Pure culture เลี้ยงสาหร่ายชนิดเดียว ไม่มีแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตอื่นปน

3. อาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย

โดยทั่วไปอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายจะมี 2 แบบคือ

3.1 Liquid media อาหารเหลว ต้องคำนึงถึงน้ำที่จะนำมาใช้เตรียมอาหารอาจเป็นน้ำกลั่นบริสุทธิ์ น้ำจืดหรือน้ำเค็ม หรือน้ำที่เตรียมได้จากการละลายดินที่มีแร่ธาตุอาหารสูงอาหารเหลวจะทำให้สาหร่ายเติบโตได้เร็วกว่าอาหารแข็ง

3.2 Solid or Agar media อาหารแข็งหรืออาหารวุ้น โดยเตรียมได้จากอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายแล้วนำมาเติมวุ้นลงไป 1.5 %

วิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย

มีหลายวิธีแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของสาหร่ายที่นำมาสกัด

1. การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่นำมาสารสกัดที่ได้นั้นไปควบคุมเชื้อราในโรคพืช (พัชรี, 2540) นำเซลล์สาหร่ายที่เก็บเกี่ยวได้มาเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ช.ม. นำมาทำละลาย (Thaw) ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เซลล์แตก ทำซ้ำ 2 ถึง 3 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่องปั่นละเอียด ที่ความถี่ 13,000 รอบต่อนาที จนกระทั่งเซลล์แตกเป็นเนื้อเดียวกัน จึงสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม ($CHCl_2$) และ เมทานอล (CH_3 OH) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนที่ได้จากการกรองมาระเหยแห้งแบบลดความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดแห้ง ก็จะได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2. การสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase คือ Oscillapeptin G จากสาหร่าย *Oscillatoria agardhii* (Sano and Kaya, 1996) โดยนำเซลล์ที่ทำให้แห้งด้วยวิธี freeze – dried มาทำเป็นเซลล์แขวนลอยในสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 ต่อ 1 น้ำสารที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรองจะได้ตัวอย่างประมาณ 0.23 กรัม แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี reversed – phase HPLC (Ultron ODS, 8 * 250 มิลลิลิตร, อัตราการไหล 3 มิลลิลิตรต่อนาที) สารละลายที่ใช้เป็น mobile phase ประกอบด้วย เมทานอล 55 เปอร์เซ็นต์ (เทียบอัตราส่วนปริมาตรต่อปริมาตร) ที่มีฟอสเฟต 0.05 โมล (pH 3) สุดท้ายจะได้สาร Oscillapepsin G บริสุทธิ์ 16 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นของแข็งไม่มีสี รูปร่างไม่แน่นอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่ายชนิดต่าง ๆ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่ายจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ ตามด้วยเชื้อราและยีสต์ (Vlachos et al., 1997)

(Mason et al., 1982 , Flores and Wolk, 1986) ได้มีทดลองการผลิตยาปฏิชีวนะจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 2 ชนิดที่มี filamentous คือ *Oscillatoria angustissima* และ *Calothrix parietina* ที่อุณหภูมิต่างกัน(Bagchi et al.,1990) ระดับการผลิตยาปฏิชีวนะสูงสุด 70.9 และ 82.5 mg antibiotic/g biomass ของ *Oscillatoria angustissima* และ *Calothrix parietina* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการรายงานของ (Vlachos et al., 1997) ที่รายงานไว้ว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่ายจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ ตามด้วยเชื้อราและยีสต์ (Issa,1999) รายงานผลของยาปฏิชีวนะที่ผลิตได้จาก *Oscillatoria angustissima* และ *Calothrix parietina* ต่อเชื้อรา 13 ชนิด โดย dermatophyte, *Microspoerum canis*, *Trichophyton rubrum*, *T. gaurgii* และ *Chrysosporium tropicum* จะถูกยับยั้งอย่างรุนแรง

Hernandez-Corona et al.,2002 รายงานผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Spirulina maxima* ที่สกัดในน้ำร้อนสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสหลายชนิดคือ herpes simplex virus (HSV-2), pseudorabies virus (PRV), human cytomegalovirus (HCMV) และได้ทดลองการแยกสารประกอบต่อการต่อต้านไวรัสโดยสกัดต่างกันที่อุณหภูมิห้อง ใช้ *Spirulina maxima* สกัดจาก hexane และตัวอย่างสาหร่ายอื่นสกัดด้วย Chloroform, methanol, methanol-water 3:1 และน้ำ พบว่าการทำงานต่อต้านไวรัสที่ถูกสกัดจากตัวตัวทำละลายที่มี polarity สูงเช่น methanol-water และน้ำร้อนชี้ให้เห็นการทำงานต่อต้านสามารถเกิดที่สารประกอบ polarity สูง

จากการทดลองของ Rao และ Parekh (1981) พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่ายประเภทอินเดีย จะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเฉพาะพวกแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้ จะมีส่วนประกอบหลักเป็น phenol fatty acid และ unsaponifiable lipid component ซึ่งจะเป็นตัวที่ยับยั้งการเจริญของพวกเชื้อแบคทีเรีย

Chang และคณะ (1993) คัดแยกสาหร่ายทะเลและสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E.coli* และแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้มา 40 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษทดสอบแล้วย้ายกระดาษไปทดสอบในจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย บ่มต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียขึ้นรอบๆ แผ่นทดสอบ ซึ่งเมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
99171

นำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแล้วจะไม่เกิดบริเวณยับยั้ง โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายที่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ คือ *Dunaliella bioculata* C-523 *D.primolecta* C-525 *Chlorococcum sp.* HS-101 *Chlorella sp.* HS-110 *Synechococcus sp.* HS-364 และ *Phorphyridium sp.* HS-366 ซึ่งสาหร่าย *Dunaliella primolecta* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้สูงสุด โดยจะยับยั้ง *S.aureus Bacillus subtilis B.cereus* และ *Enterobacter aerogenes* จากแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cladosporium cladosprides Penicillium funculosum Paecilomyces variom* และ *Aspergillusniger* สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่าย *Dunaliella primolecta* จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.aureus* ได้ดีเทียบได้กับยาปฏิชีวนะ ampicillin ซึ่งเป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทางการค้า

ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชได้มีการศึกษาโดยนำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำนวน 11 สกุล 165 สายพันธุ์ มาแยกและคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านเชื้อราโรคพืช ได้แก่ *Collectotrichum truncatum Curvularia lunata Fusarium oxysporum Bipolaris mydis Macrophomina phaseolina* และ *Pyricularia grisea* พบว่ามีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 3 สกุล ที่สามารถยับยั้งเชื้อราโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งได้แก่ สาหร่ายสกุล *Calothrix* 5 สายพันธุ์ สาหร่ายสกุล *Fischerella* 2 สายพันธุ์ และสาหร่ายสกุล *Scytonema* 1 สายพันธุ์ (พัชรี, 2540)

Borowitzka (1999) ได้คัดแยกสาหร่ายในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*cyanobateria*) มากกว่า 1,000 สายพันธุ์ เพื่อหาสายพันธุ์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีผลต่อเชื้อรา และยีสต์ พบว่ามีสาหร่ายมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการได้ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่น *Tolypothrix tjipanensis* จะประกอบด้วย tjipanazole ซึ่งเป็น indolo (2, 3 – a) carbozoles คล้ายกับที่พบในพวกเชื้อราแอคติโนมัยซิส (actinomyces) และราเมือก สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตัวแรกที่แยกได้จากสาหร่าย คือ acrylic acid ซึ่งสามารถพบได้ในสาหร่ายทั่วๆไป dimethylsulphide เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายกลุ่ม Chrysophyta ประกอบด้วยกรดไขมัน เช่น γ - linolenic acid และ *eicosapentaenoic acid* ซึ่งจะพบมากในสาหร่ายกลุ่มนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

1. *Aeromonas hydrophila*

A. *hydrophila* พบครั้งแรกโดย Sanarelli ปี1891 ซึ่งเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า *Bacillus hyrdophilus fuscus* แต่เดิมจัดอยู่ในกลุ่ม *Aeromonas* ซึ่งมีอยู่ 3 ชนิดคือ *Aeromonas punctata, A. hydrophila* และ *A. liguetaciens* ต่อมาได้มีการแบ่งออกเป็น 2 subspecies คือ anaerogens เป็นพวกที่ไม่ให้ก๊าซจากการใช้กลูโคสหรือไกลโคเจน กับ protcolytica เป็น chemoorganotroph จึงเจริญได้ดีในที่มีสารอินทรีย์ เพื่อ fement น้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรต จะให้กรดอย่างเดียวหรือทั้งกรดและก๊าซ นอกจากนี้ยังสร้างเอนไซม์ oxidase เปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ (ประกิตติ์สิน และคณะ,2526 ข)

1.1 ลักษณะของเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็นรูปร่างแท่งส่วนใหญ่สามารถที่ได้เนื่องจากมีแส้ อยู่ทั่วปลายด้านหนึ่งของเซลล์แต่มีบางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้ (Robert,1978) โคโลนีที่ขึ้นอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา มีลักษณะกลมโค้ง และผิวเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 -0.8 um × 1.0 - 1.5 um .

1.2 อาการของโรค

จะทำให้บริเวณผิวหนังเป็นสีดำๆขนาดใหญ่ อาจไม่สม่ำเสมอกัน ซึ่งเป็นอาการตกเลือด ตามผิวลำตัวและที่บริเวณครีบ จะทำให้เนื้อเยื่ออวัยวะภายในตายเนื่องจากอวัยวะภายในเกิดตกเลือดอย่างมาก ไตและม้ามเกิดการบวมน้ำขยายใหญ่จะเห็นเป็นน้ำของเหลวไหลออกมาจากภายใน ผนังลำไส้ที่ผลิตเมือกจะเกิดการตายของเนื้อเยื่อและบริเวณช่องว่างภายในหลอดเลือดจะมีการถลอก ซึ่งจุดสำคัญที่เกิดการตายของเนื้อเยื่อ ได้แก่ กล้ามเนื้อ หัวใจ ตับ gonad และตับอ่อน ผิวหนังเกิดการสึกกร่อน บริเวณหนังแท้เกิดการบวมน้ำผิวหนังชั้นนอกเกิดเป็นแผลเปื่อย (Robert,1978)

2. *Pseudomonas fluorescence*

P.fluorescence แบ่งเป็น 3 species *P. anguilliseptica, P. chloraphris* และ *P.fluorescence* (Ingris et al.1993) เป็นแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนไม่สามารถเจริญเติบโตในน้ำตาลกลูโคส ลักษณะโคโลนี กลมนูนหรือแบน โปร่งแสงสามารถมองเห็นเป็นสีเหลือง, โคโลนีที่เป็นสีเหลือง – เขียว เป็นพวก fluorescence ภายใต้แสง uv (Ingris et al.1993) *Pseudomonas sp.* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ช่วยลดระดับไนเตรทที่มีมากเกินพอ โดยจะทำงานในสภาพที่มีออกซิเจนและยังสามารถควบคุมสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ (สมาน,2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 ลักษณะของเชื้อ

P.fluorescence มีขนาด 0.8 um × 2.0– 3.0 um เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เคลื่อนที่โดยใช้แส้ มีลักษณะเซลล์เป็นแท่งตรงหรือโค้ง

2.2 อาการของโรค

อาการ Pseudomonas septicemia อาจจะมีอาการเฉียบพลันหรือเรื้อรัง บริเวณผิวหนังเกิดการสึกกร่อน ถลอกเป็นแผล ตกเลือดบริเวณกว้างแล้วจะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อ และยังมีผลต่ออวัยวะภายในทำให้เกิดการตกเลือดและเยื่อบุช่องตัวอักเสบ เป็นพิษต่อโปรตีนที่ทำให้เลือดแข็งตัว ที่บริเวณผิวหนังโดยทำให้ท่อเลือดที่ผิวหนังชั้นในเกิดการพองขยายออกเกิดการบวมน้ำและเกิดแผลเปื่อยอย่างรวดเร็ว

3. *Vibrio harveyi*

แบคทีเรียเรืองแสงพบเจริญแพร่หลายมากในบ่อเพาะฟักในขณะที่เกิดการตายของลูกกุ้งระยะต่างๆ ถึง 70 -100 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบทาง Pathogenicity พบว่าลูกกุ้งแชบ๊วยระยะ nauplii sensitivity มากที่สุด *V. harveyi* sensitivity ต่อยา คลอแรมฟีนิคอล, โนโวบิโอซิน แต่มีความต้านทานต่อยาสเตรปโตมัยซิน (ดารุณี และ คณะ, 2530)

3.1 ลักษณะของเชื้อ

Vibrio harveyi มีลักษณะโคโลนีกลมขอบเรียบ ต้องการเกลือในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS มีทั้งกลุ่มมีเขียวและสีเหลือง เรืองแสงและไม่เรืองแสงในที่มืด

3.2 อาการของโรค

กุ้งที่ติดเชื้อมีปริมาณเม็ดเลือดลดลง ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดสูงมาก ปริมาณซีรั่มลดลงในช่วง 24 ช.ม. แรกที่ติดเชื้อ ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่า ช่วงแรกที่กุ้งติดเชื้อเริ่มมี tubular lumen ของเซลล์บวม เซลล์ในท่อตับ ต่อมน้ำเหลืองตายเล็กน้อย เม็ดเลือดล้อมจับเซลล์ที่ตาย กุ้งติดเชื้อนาน 7 วัน พบเซลล์ในตับ ต่อมน้ำเหลือง เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือดตาย เป็นบริเวณกว้างกุ้งทยอยตาย ติดเชื้อนาน 14 วัน เซลล์ตับ ต่อมน้ำเหลืองตายเกิดเป็นลักษณะ hepatopancreatic tubular necrosis กุ้งไม่กินอาหารและตายหมด

4. *Staphylococcus aureus*

สามารถสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลส (coagulase) มีความสำคัญทางแพทย์มาก ดำรงชีวิตแบบเคโมออแกโนโทรป (*chemoorganotroph*) เมทาบอลิซึมเป็นทั้งแบบใช้อากาศและแบบการใช้การหมัก มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน อาจใช้คาร์โบไฮเดรตได้หลายชนิด โดยเฉพาะในสภาพที่มีอากาศ ภายใต้สภาพที่ไม่มีอากาศจะสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊สและเมื่อใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคสจะได้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ ขณะที่มีอากาศจะได้กรดแอซีติกเป็นส่วนใหญ่และคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณเล็กน้อย (นันทนา, 2537)

4.1 ลักษณะของเชื้อ

รูปร่างเซลล์กลม พบอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นคู่สอง หรือเป็นคู่สี่ และมีการแบ่งตัวมากกว่าหนึ่งระนาบทำให้พบอยู่เป็นกลุ่มๆคล้ายพวงองุ่น ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีระยะฟักตัว ติดสีแกรมบวก

4.2 อาการของโรค

สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อกับทุกๆบริเวณร่างกาย การติดเชื้อที่ผิวหนังสามารถทำให้ติดเชื้ออย่างอ่อนจนถึงขั้นรุนแรงได้ รวมทั้งทำให้เกิดหนอง และการติดเชื้อในกระแสเลือดรุนแรง การติดเชื้อในกลุ่มนี้เรียกว่า Scalded – skin syndrome โดยก่อโรค ลิ้นหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบ เป็นต้น บางสายพันธุ์ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ (นันทนา, 2537)

5. *Escherichia coli*

สามารถใช้แอซีเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่สามารถใช้ซิเตรท กลูโคสและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ เนื่องจากจะถูกหมักเกิดกรดแลคติก กรดแอซีติก และฟอร์มิก บางสายพันธุ์เป็นพวกไม่ใช้อากาศ ส่วนใหญ่หมักแลคโทส ได้แต่อาจช้า (ดวงพร,2537)

5.1 ลักษณะของเชื้อ

รูปร่างเป็นแท่งตรง อยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ เคลื่อนที่โดยใช้เพอริไตรเชียส แฟลกเจลา หรือไม่เคลื่อนที่ก็ได้ สามารถขึ้นได้บนอาหารง่ายๆ โคโลนีเรียบชื้น มัน สีเทา อาจมีลักษณะหยาบแห้ง

5.2 อาการของโรค

สามารถทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารและโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ พบมากที่สุดในลำไส้ของคนทุกคน (นงลักษณ์ และ ปรีชา,2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ อาคกระบี่

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ในการเลี้ยงเชื้อ
2. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ในการเลี้ยงสาหร่าย
3. เครื่องชั่ง
4. เครื่อง centifuge
5. Vortex mixture
6. Spectrophotometer รุ่น Spectronic 401
7. เครื่องระเหยแห้ง
8. ตู้อบเครื่องแก้ว
9. ตู้เขี่ยเชื้อแบบลมเป่า
10. ตู้บ่มเชื้อ
11. หม้อนึ่งความดันไอ
12. Plate
13. Micropipett และ tip
14. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย
15. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
16. แผ่นทดสอบ
17. สาหร่ายทั้ง 3 กลุ่ม
18. เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค 5 สายพันธุ์

วิธีการ

แผนการทดลอง

แผนการทดลองนี้จะเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดย มีสารสกัดจากสาหร่าย 6 ตัว ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ตัว ชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ

วิธีการทดลอง

1. การเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 5 สายพันธ์

1.1 การเตรียมหัวเชื้อของสาหร่าย

นำสาหร่ายในกลุ่ม Cyanophyta (*Oscillatoria sp.,Calothrix sp., Gleocapsa sp.)* จากขวดรูปชมพู่ที่เป็นหัวเชื้อมาเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG ในขวดน้ำเกลือ 1 ลิตรเป็นเวลา 15 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ที่ความเข้มข้นแสง 2400 ลักซ์ และแอร์ปั๊ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนสาหร่ายในกลุ่ม Chlorophyta (*Enteromorpha*) และ Rhodophyta (*Gracilaria sp., Acanthophora* เก็บจากบรรจงฟาร์ม

1.2 การเลี้ยงและเก็บสาหร่าย

1.2.1 นำหัวเชื้อมาเลี้ยงในขวดน้ำเกลือขนาด 1 ลิตรที่มีอาหารสูตร BG ให้อากาศและให้แสงตลอดการเลี้ยง 10 วัน

1.2.2 เก็บสาหร่าย *Oscillatoria sp. Calothrix sp .* ด้วยการกรอง ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ส่วน *Gleocapsa sp.* และ *Spirulina sp.* เก็บด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

1.2.3 นำสาหร่ายไปอบที่อุณหภูมิ 50-60 °C จนสาหร่ายแห้งนำไปเก็บที่ปราศจากความชื้น

2. การทำกราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรีย

2.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวใน flas ขนาด 250 ml แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30 °C นาน 18 – 24 ช.ม.

2.2 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบ นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 - 5 °C

2.3 เทอาหารส่วนบนทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 % ทำการล้างเซลล์ทั้งหมด 2 ครั้ง

2.4 เติมน้ำเกลือลงไปแล้วทำการ Mix ด้วยเครื่องปั่นแล้วนำไปวัดค่า OD (Optical Density) ที่ความยาวคลื่น 540 nm.

2.5 นำเชื้อแบคทีเรียที่ทราบค่า OD แล้วมาทำการกำหนดค่า OD ที่ระดับต่างๆด้วยสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$ โดยใช้น้ำเกลือ เป็นตัวเจือจาง 0.85 %

2.6 นำค่า OD ทุกระดับมาทำการเจือจางแบบ 10 เท่า และนำ 3 ความเข้มข้นสุดท้ายไปทำการนับจำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ โดยการ Speard plate

2.7 นำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 18 – 24 ช.ม. นับจำนวนเซลล์ที่ได้

2.8 นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟสมการเส้นตรงระหว่าง log จำนวนเซลล์แบคทีเรียกับค่า OD ที่ระดับต่างๆ

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่ายทั้ง 5 สายพันธุ์ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.1 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย

3.1.1 นำสาหร่ายที่อบจนแห้งแล้วมาสกัดด้วย น้ำ,เมทานอล และ คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1ต่อ 2 ต่อ 1โดยเทียบเป็นมิลลิลิตรของสารละลายต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง สกัดเป็นเวลา 3 วัน 72 ช.ม.จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำสารที่ได้มา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระเหยแห้งแบบลดความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator นำสารดังกล่าวมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำสารสกัดมาทำละลายด้วยเมทานอลโดยใช้อัตราส่วนสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อเมทานอล 100 ไมโครลิตร

3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

3.2.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30 °C นาน 18 – 24 ช.ม.

3.2.2 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบ นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 - 5 °C

3.2.3 เทอาหารส่วนบนทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 % ทำการล้างเซลล์ทั้งหมด 2 ครั้ง

3.2.4 เติมน้ำเกลือลงไปแล้วทำการ Mix ด้วยเครื่องปั่นแล้วนำไปวัดค่า OD (Optical Density) ที่ความยาวคลื่น 540 nm.

3.2.5 เตรียมเชื้อทั้ง 5 ตัวให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^6 CFU/ml. ปริมาตร 10 ml. จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ด้วยวิธี spread plate ทิ้งไว้จนสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียซึมลงเนื้อวุ้นจนแห้ง

3.3 การเตรียมแผ่นทดสอบ

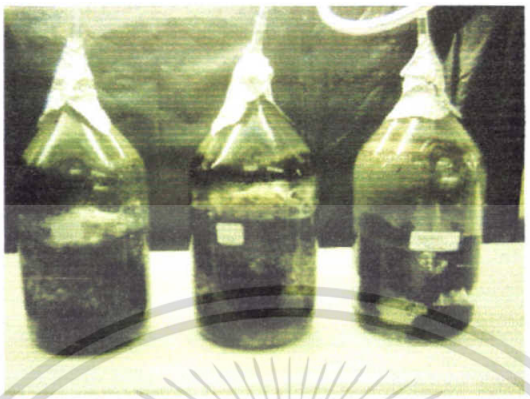
นำสารสกัดจากสาหร่าย แต่ละสายพันธุ์ที่ทำการละลายในเมทานอล โดยใช้อัตราส่วนสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อเมทานอล 100 ไมโครลิตรมาเตรียมแผ่นทดสอบ 4 ความเข้มข้น คือ 4, 3, 2 และ 1 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ โดยใช้ปริมาตรสารละลาย 80, 60, 40 และ 20 ไมโครลิตร ต่อแผ่นทดสอบตามลำดับ โดยสารสกัดจากสาหร่าย 1 สายพันธุ์นำมาทำแผ่นทดสอบความเข้มข้นละ 25 แผ่น ส่วนการเตรียมแผ่นทดสอบที่เป็นตัวควบคุม ให้เตรียมทั้งหมด 25แผ่น โดยหยดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้ได้ปริมาตรสารละลาย 80 ไมโครลิตรต่อแผ่นทดสอบ ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาตรสารละลายที่ใช้เตรียมแผ่นสารสกัดความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

3.4 การทดสอบสารสกัดจากสาหร่าย

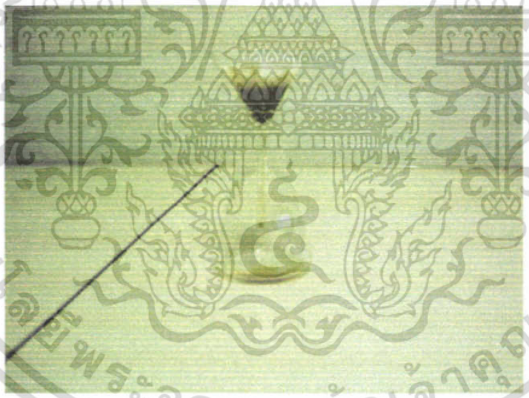
นำแผ่นทดสอบซึ่งหยดสารสกัดจากสาหร่าย วางบนผิวหน้าอาหารวุ้นที่ทำการ spread plate เชื้อแบคทีเรียที่ทิ้งไว้จนแห้ง โดยจานเลี้ยงเชื้อ 1 จาน วางแผ่นทดสอบทั้ง 4 ความเข้มข้น โดยความเข้มข้นละ 1 แผ่น รวมทั้งแผ่นควบคุมด้วย ทำการทดสอบสารสกัดจากสาหร่าย 6 สายพันธุ์กับเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ทดสอบเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ละ 5 ซ้ำ สำหรับเชื้อแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ ส่วนการวางแผ่นทดสอบ ให้วางแผ่นทดสอบ 2 แผ่นแรก ที่ตำแหน่งตรงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้ามตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลางและวางแผ่นทดสอบอีก 2 แผ่นที่เหลือ แบบตรงกันข้ามตามแนวจุดศูนย์กลางตั้งฉากกับแนวเดิม เมื่อวางเสร็จให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูผลโดยวัดขนาดของโซนใส

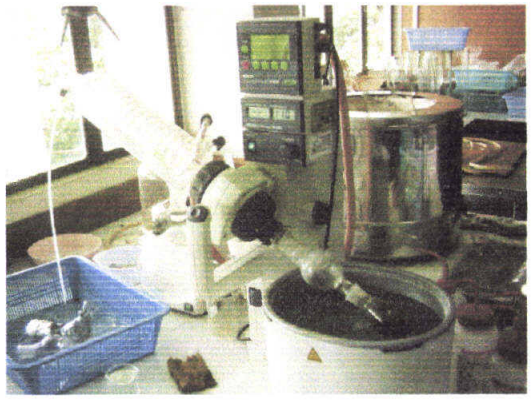


ภาพที่ 7 การเลี้ยงและการเก็บสาหร่าย

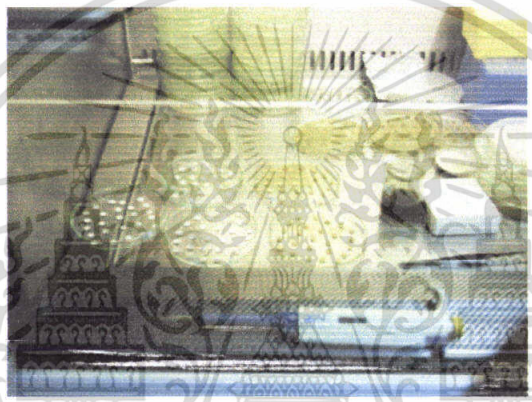


ภาพที่ 8 การกรองสาหร่ายด้วยกระดาษกรองเบอร์1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



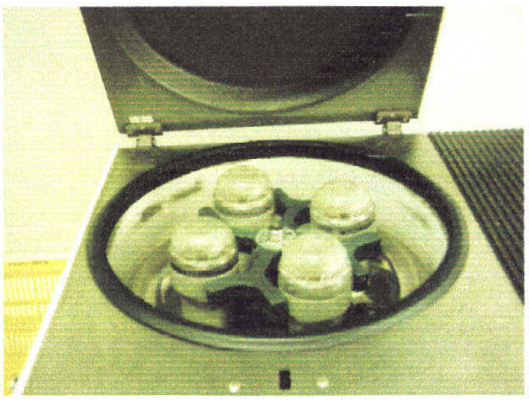
ภาพที่ 9 สารสกัดจากสาหร่ายนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator



ภาพที่ 10 การเตรียมแผ่นทดสอบจากสารสกัดที่ได้จากสาหร่าย

ภาพที่ 11 การบ่มเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ อุณหภูมิ 30 °C นาน 18 – 24 ช.ม.ด้วยเครื่อง shecker

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 12 การเหวี่ยงสารละลายเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง centrifuge

การบันทึกข้อมูล

ทำการวัด clear zone ที่เกิดขึ้นหลังบ่ม 18 – 24 ช.ม.

การวิเคราะห์ข้อมูล

Clear zone ที่เกิดขึ้นจะนำมาทำการเปรียบเทียบหาค่าความแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยโปรแกรม spss version 10 วิธีของ Duncan

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

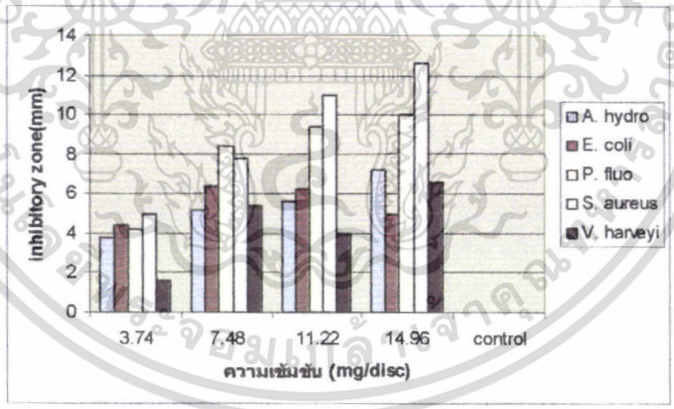
ระยะเวลาในการทำการทดลอง

เดือนธันวาคม พ.ศ. 2547 – เดือนเมษายน พ.ศ. 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

et al., 1982 , Flores and Wolk, 1986) ที่กล่าวไว้ว่า filamentous ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะหลั่งสารปฏิชีวนะที่ฆ่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินตัวอื่นๆ สารประกอบที่ฆ่าสาหร่ายเรียกว่า " cyanobacterin " สกัดจาก *Scytonema hofmanni*

สารสกัดจากสาหร่ายกลุ่ม Chlorophyta คือ *Enteromorphasp.*จากการทดลองพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของสารสกัด 14.96 mg/disc และ 11.22 mg/disc โดยเกิด clear zone 12.6 ม.ม และ 11 ม.ม ตามลำดับ รองลงมาคือ *E.coli* และ *P. fluorescen* คือ 10 ม.ม และ 6.4 ม.ม ตามลำดับ และยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 3.74 mg/disc ได้น้อยสุด ซึ่งสอดคล้องกันกับการรายงานของ (วีนา, 2542) สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. สามารถยับยั้งการทำงานของเชื้อแบคทีเรียได้ถึง 4 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis, P. aeruginosa, S. aureus* และ *S. pyrogenes* โดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *S. pyrogenes* ได้ดีที่สุดแต่จะไม่ยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella spp.*โดยเหมือนกันกับการรายงานของ (Chang et al.,1993) สารสกัดจากสาหร่าย *Dunaliella primolecta* ยับยั้งการโตของเชื้อ *S. aureus* อย่างรุนแรง แต่ไม่แสดงผลต่อ *E. coli* และ *Salmonella typhimurium* ในทำนองเดียวกัน (Vlachos et al., 1997) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเลของอเมริกาใต้จะทำการต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ



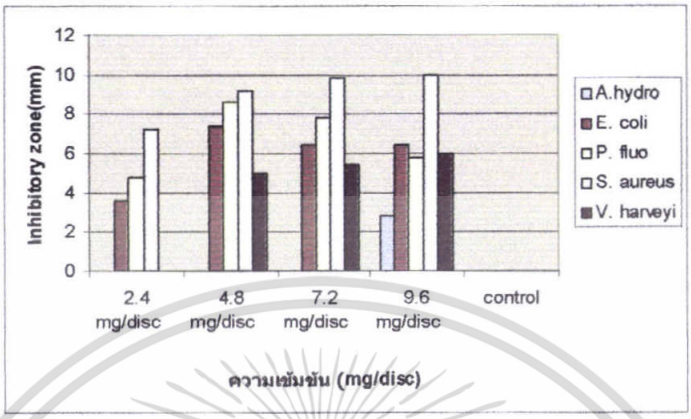
ภาพที่ 13 ผลของสารสกัดจาก *Enteromorpha sp.* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

สารสกัดจากสาหร่ายกลุ่ม Rhodophyta คือ

Acanthophora sp. พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ทุกระดับความเข้มข้น โดยระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ 9.6 mg/disc และ 7.2 mg/disc เกิดผลดีที่สุดคือ 10 ม.ม. และ 9.6 ม.ม แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.4, 4.8 และ 7.2

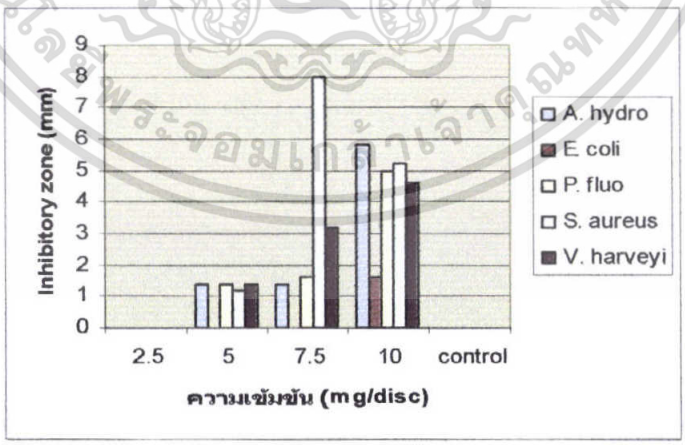
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

mg/disc รวมทั้ง *V. harveyi* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.4 mg/disc โดยระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ 8.96 mg/disc และ 7.2 mg/disc สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *P. fluorescen* รองลงมาตามลำดับ คือ 7.8 ม.ม และ 6.4 ม.ม



ภาพที่ 14 ผลของสารสกัดจาก *Acanthophora sp.* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Gracilaria sp. สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 7.5 mg/disc คือ 7.9 ม.ม แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.5 mg/disc, เชื้อ *E.coli* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.5, 5 และ 7.5 mg/disc เชื้อ *P. fluorescen* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.5 mg/disc, เชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.5mg/disc และ เชื้อ *V. harveyi* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2.5 mg/disc



ภาพที่ 15 ผลของสารสกัดจาก *Gracilaria sp.* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทั้ง 6 ชนิด คือ *Gloeocapsa sp.*, *Oscillatoria sp.* และ *Calothrix sp.*, *Enteromorpha sp.*, *Acanthophora sp.* และ *Gracilaria sp.* พบว่า

1. สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทั้ง 6 ชนิด ได้โดยใช้ตัวทำละลายเป็น น้ำ เมทานอล และ คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1 : 2 :1 ตามลำดับ และ ชนิดที่สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูงสุดคือ *Enteromorpha sp.* คือ 1.87 กรัม

2. จากการนำสารสกัดจากสาหร่ายทั้ง 6 ชนิดมาทดสอบกับแบคทีเรียโดยวิธี paper disc plate ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila.*, *Pseudomonas fluorescence.*, *Vibrio harveyi.*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli.* พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ทั้ง 5 เชื้อ โดยเชื้อ *Staphylococcus aureus* จะถูกยับยั้งมากที่สุด โดยสาหร่าย *Enteromorpha sp.* รองลงมา คือ สาหร่าย *Acanthophora sp.* และ *Gracilaria sp.* ตามลำดับ ส่วน *E.coli* และ *A. hydrophila* จะถูกยับยั้งน้อยที่สุด สาหร่ายในกลุ่ม cyanophyta จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดได้เลย

3. จากการทดลองสาหร่ายทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า สาหร่ายในกลุ่ม Chlorophyta สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดได้เป็นอย่างดีเมื่อเทียบกับสาหร่ายอีก 2 กลุ่ม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดลองใช้ตัวทำละลายอื่นในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายเพื่อทำให้ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่านี้และให้ผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้น

2. ควรมีการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายไปทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นๆ เพื่อศึกษาถึงความกว้างขวางของ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์. กรุงเทพฯ. 73 – 92.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2538. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 408 น.

ดารุณี แซ่อุ่ย, อนันต์ ตันสุตะพานิช และ ลิลา เรืองแป้น. 2530. *Vibrio harveyi* สาเหตุของโรคแบคทีเรียเรืองแสงของลูกกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*). เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 6/2530, ฝ่ายทดลองและวิจัยเพื่อการเพาะเลี้ยง กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง. 11น.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2539. จุลชีววิทยาทั่วไป. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 735 น.

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

ประกิตติ์สิน สีหนนท์, วีระวุฒิ มหามนตรี และ วนิดา โพธารามิก. 2526 ข. การศึกษานิเวศวิทยาของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* strain F 588. วารสารโรคสัตว์น้ำ. 6(3) : 115-124.

พัชรี ผดุงวงศ์. 2540. การใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อควบคุมเชื้อราโรคพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง. 2547. เอกสารประกอบการสอนวิชาสาหร่ายวิทยา. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 132 น.

สมาน กูจิ. 2538. การศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมี และแบคทีเรียที่ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Anon. 2004. *Acanthophora sp.*http://www.sms.si.edu/irlspec/Acantho_spicif.htm.

Anon.2004. *Calothrix sp.* http://www.biol.napier.ac.uk/.../gcalothrix-c. jpg.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anon. 2004. *Enteromorpha sp.* http://www.hawaii.edu/.../cholo/enteromorpha 3field.jpg

Anon. 2004. *Gloeocapsa sp.* http://www.marictta.edu/…/bio1202/microid/images.

Anon. 2004. *Gracillaria sp.* http://www.refer.mg/cours/wel/wbalg/pages/p30.htm

Anon. 2004. *Oscillatoria sp.* http://www.Stcsc.edu/ecology/algae/Algae.htm

Bagchi, S.N., Palod, A., Chauhan, V.S., 1990. Algicidal properties of a bloom – forming blue – green alga, *Oscillatoria sp.* Journal of Basic Microbiology 30 : 21-29. **อ้างโดย** Issa, A.A., 1999. Antibiotic Production by the cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrox parietina*. Environmental Toxicology and Pharmacology 8 : 33-37.

Borowitzka, A.M. 1997. Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. Chemicals from microalgae. T.J. International Ltd. UK. 314-347.

Cappoccino, J.G. and N.Sherman. 1992. Microbiology a laboratory Manual. 3rd edition The Benjamin/Cummings. New York. 462 p.

Chang T., S. Ohta, N.Ikegami, H.Miyata, T.Kashimoto and M. kondo. 1993. Antibiotic substances produced by amarine green algae, *Dunaliella primolecta*. Bioresoure Tech. 44 : 179-153

Choochote, W., P.Kruawanishthan, P.Phumprasert and W.Janvechsakda. 2544. Antibacterial Activity of extracts Derived from the Unicellular green algae, *Chlorella spp*. Department of Applied Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

Flores, E., Wolk, C.P., 1986. Production by filamentous, nitrogen fixing cyanobacteria, of a bacteriocin and of other antibiotics that kill related strains. Archive of Microbiology 145 : 215-219. **อ้างโดย** Issa, A.A., 1999. Antibiotic Production by the cyanobacteria *Oscillatoria*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

angustissima and *Calothrox parietina*. Environmental Toxicology and Pharmacology 8 : 33-37.

Hernandez-Corona., A., I. Nieves., M. Meckes., G. Chamorro.,B. L. Barron., 2002. Antiviral activity of Spirulina maxima against herpes simplex virus type 2. Antiviral Research. 56: 279-285.

Inglis, V., R. J. Roberts and N.R. Bromage. 1993. Bacterial Disease of fish. London.

Issa, A.A., 1999. Antibiotic Production by the cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrox parietina*. Environmental Toxicology and Pharmacology 8 : 33-37.

Mason, C.P., Edwards, R.R, Carlson. R.E., Pignalello, J., Gleason, F.K., Wood, J.M.,1982. Isolation of a chlorine – containing antibiotic from the freshwater cyanobacterium *Scytonema hofmanni*. Science 215, 400 - 402. **อ้างโดย** Issa, A.A., 1999. Antibiotic Production by the cyarobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrox parietina*. Environmental Toxicology and Pharmacology 8 : 33-37.

Pratt, R., T. C. Doniles, J. J. Eilev, J. B. Gunnison, W. D. Kumler, J. F. Oneto and L. A. Strait. 1994. *Chlorella*, an antibacterial substance from *Chlorella*. Sci. 99 : 351-352.

Roberts, R.J. 1978. Fish pathology. Bailliere Tindall. London. 318 p.

Sano,T. and K. Kaya. 1996. Oscillapeptin G, a tyrosinasel inhibitor from toxic *Oscillatoria aqurdhi*. 3. Nat. Prod. 59 : 90 - 92.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

การทำกราฟมาตรฐาน

จากการทดลองได้มีการทำ Standard curve ของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila, E. coli, P. fluorescence, S. aureus* และ *V. harveyi* หาความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD (Optical Density) กับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/ml.) ผลแสดงดังตารางที่ 1 ถึง 5 ซึ่งจากการวิเคราะห์ Regression จะได้

สมการเส้นตรงของเชื้อ *A. hydrophila* คือ $y = 0.3071 (x) + 6.3658$

สมการเส้นตรงของเชื้อ *E. coli* คือ $y = 0.4078 (x) + 6.7389$

สมการเส้นตรงของเชื้อ *P. fluorescence* คือ $y = 0.2425 (x) + 6.4147$

สมการเส้นตรงของเชื้อ *S. aureus* คือ $y = 0.6728 (x) + 6.4709$

สมการเส้นตรงของเชื้อ *V. harveyi* คือ $y = 0.3471 (x) + 7.3957$

ตารางผนวกที่ 1 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Density) ต่างๆ

	ค่า OD (Optical Density) ที่ความยาวคลื่น 540 nm					
	0.101	0.204	0.304	0.408	0.508	0.603
จำนวนเซลล์แบคทีเรีย(CFU/ml.)						
V. harveyi	5.8×10^7	1.84×10^8	$2..27 \times 10^8$	4.6×10^8	5.65×10^8	6.53×10^8
(log of cell bacteria)	(7.7634)	(8.2648)	(8.3560)	(8.6627)	(8.8129)	(9.8027)

ตารางผนวกที่ 2 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Density) ต่างๆ

	ค่า OD (Optical Density) ที่ความยาวคลื่น 540 nm					
	0.101	0.204	0.304	0.408	0.508	0.603
จำนวนเซลล์แบคทีเรีย(CFU/ml.)						
S. aureus	3.85×10^7	5.45×10^7	5.9×10^8	2.85×10^9	3.3×10^9	7.75×10^{10}
(log of cell bacteria)	(7.5797	(7.7363)	(8.7708)	(9.4548)	(9.5185)	(10.8893)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Density) ต่างๆ

	ค่า OD (Optical Density) ที่ความยาวคลื่น 540 nm					
	0.103	0.200	0.375	0.421	0.516	0.634
จำนวนเซลล์แบคทีเรีย(CFU/ml.)						
A. hydrophila	6.5×10^{6}	1.15×10^{7}	5.8×10^{7}	7.45×10^{7}	7.85×10^{7}	1.74×10^{8}
(log of cell bacteria)	(6.8129)	(7.0606)	(6.7634)	(7.8721)	(7.8948)	(8.2405)

ตารางที่ 4 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescence* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Density) ต่างๆ

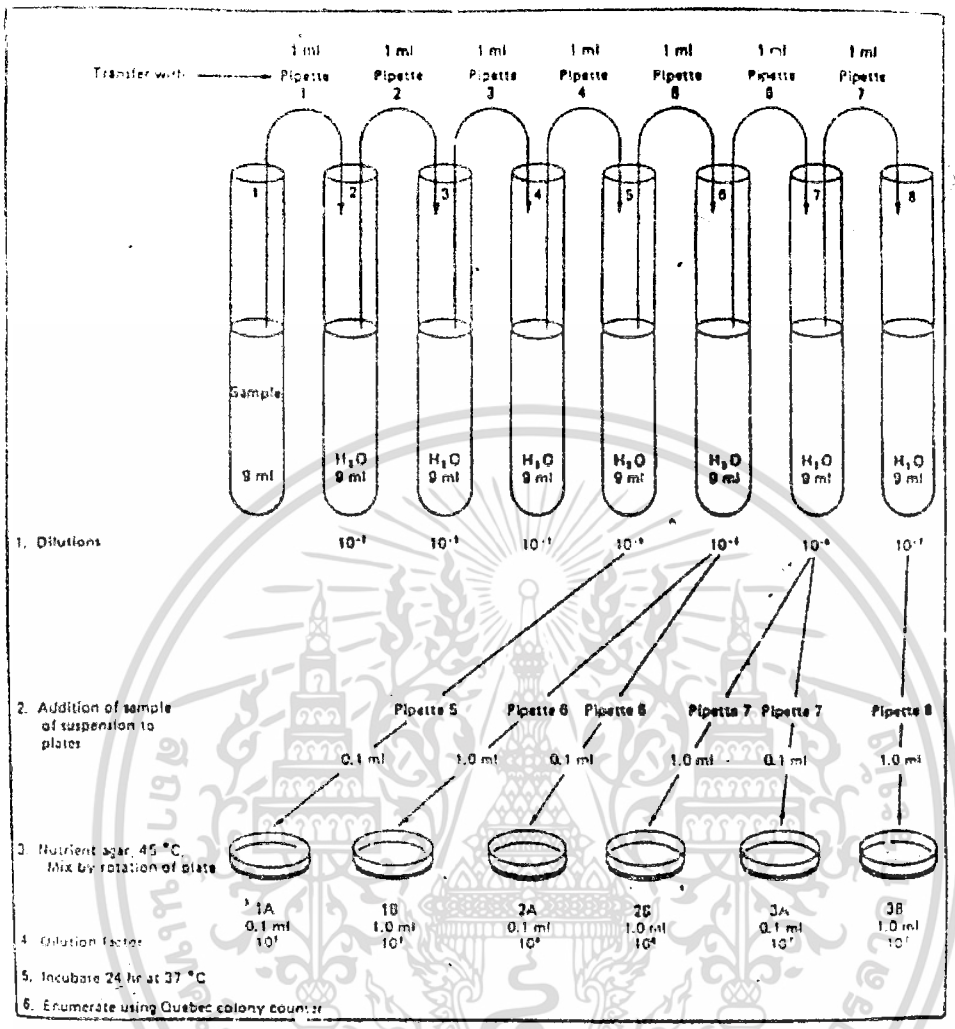
	ค่า OD (Optical Density) ที่ความยาวคลื่น 540 nm					
	0.119	0.219	0.328	0.470	0.578	0.620
จำนวนเซลล์แบคทีเรีย(CFU/ml.)						
A. hydrophila	5.75×10^{6}	7.2×10^{6}	9.45×10^{6}	2.85×10^{7}	4.4×10^{7}	7.75×10^{7}
(log of cell bacteria)	(6.7596)	(6.8573)	(6.9754)	(7.4548)	(7.6434)	(7.8893)

ตารางที่ 5 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (CFU/ml.) ที่ระดับ OD (Optical Density) ต่างๆ

	ค่า OD (Optical Density) ที่ความยาวคลื่น 540 nm					
	0.116	0.238	0.357	0.403	0.504	0.600
จำนวนเซลล์แบคทีเรีย(CFU/ml.)						
E. coli	2.8×10^{7}	3.45×10^{7}	5.5×10^{7}	1.56×10^{8}	2.31×10^{8}	5.2×10^{9}
(log of cell bacteria)	(7.4471)	(7.5378)	(7.7403)	(8.1931)	(8.3636)	(9.7160)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

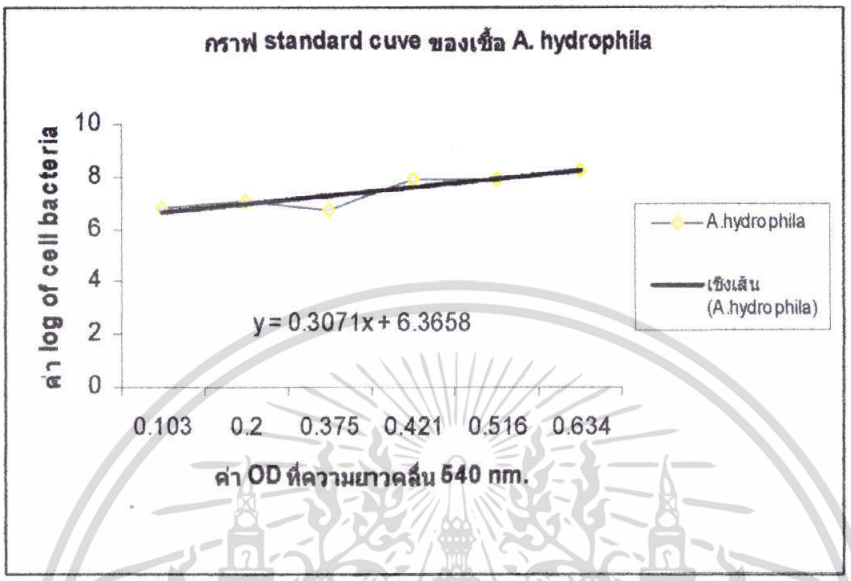
ภาพผนวกที่ 1 การ dilution แบบ ten – fold เพื่อนับจำนวน Colony ในการทำ Standard curve



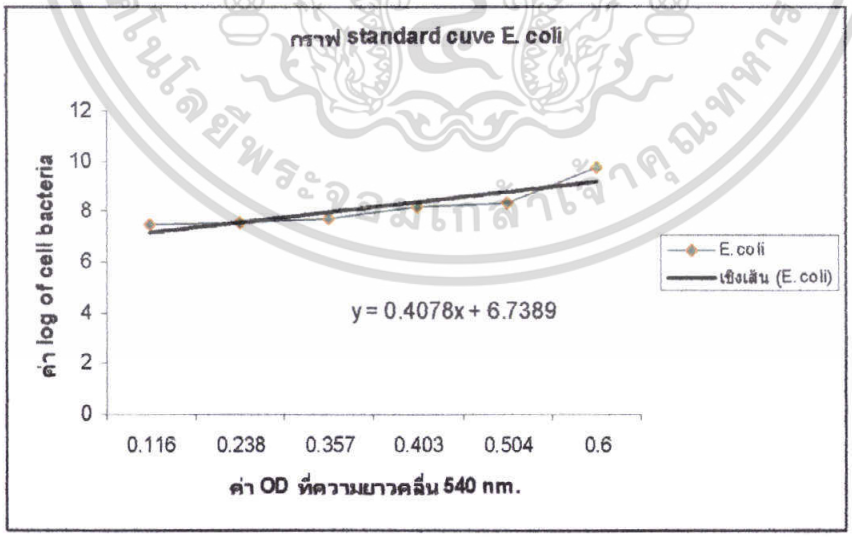
ที่มา : Cappoccino and Sherman. 1992

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 2 กราฟ Standard curve ของเชื้อ *A. hydrophila*

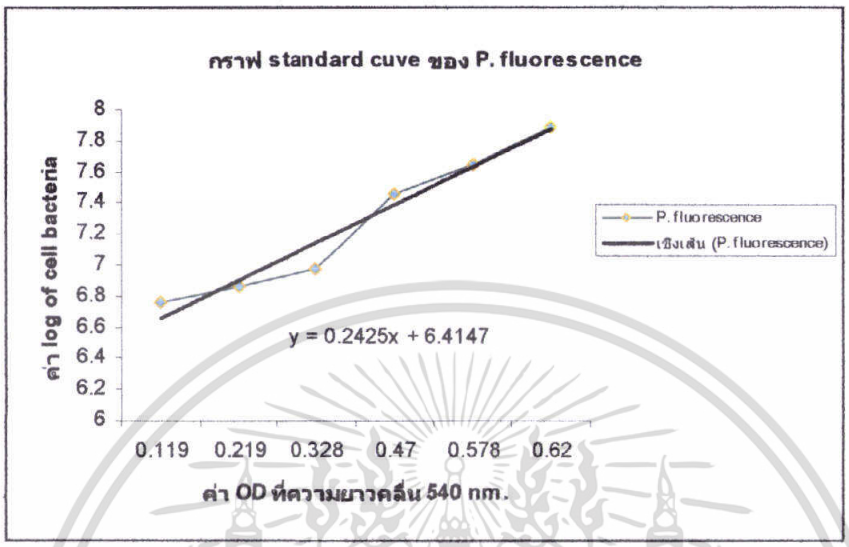


ภาพผนวกที่ 3 กราฟ Standard curve ของเชื้อ *E. coli*

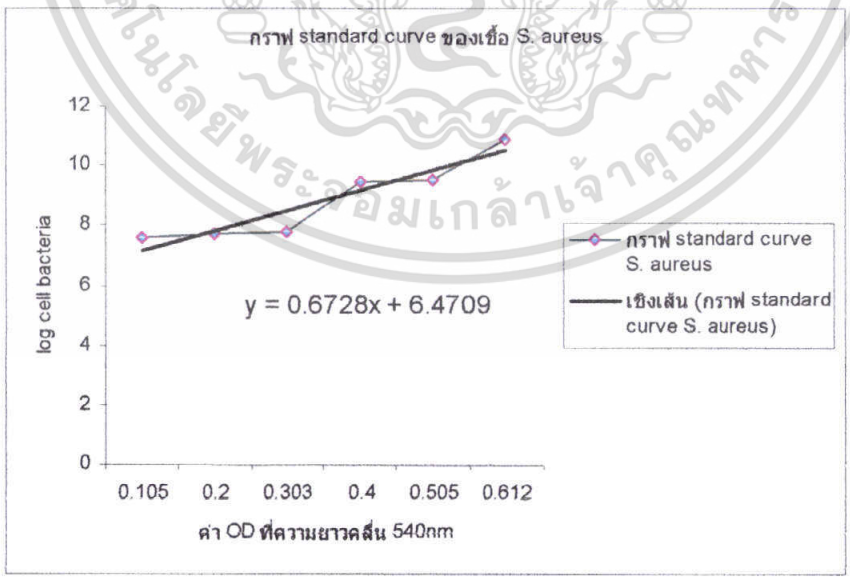


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 4 กราฟ Standard curve ของเชื้อ *P fluorescen*

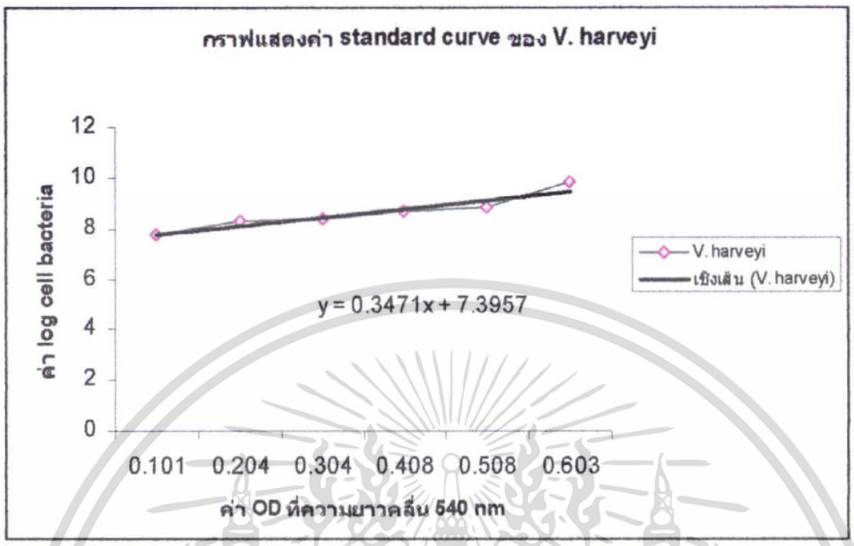


ภาพผนวกที่ 5 กราฟ Standard curve ของเชื้อ *S. aureua*

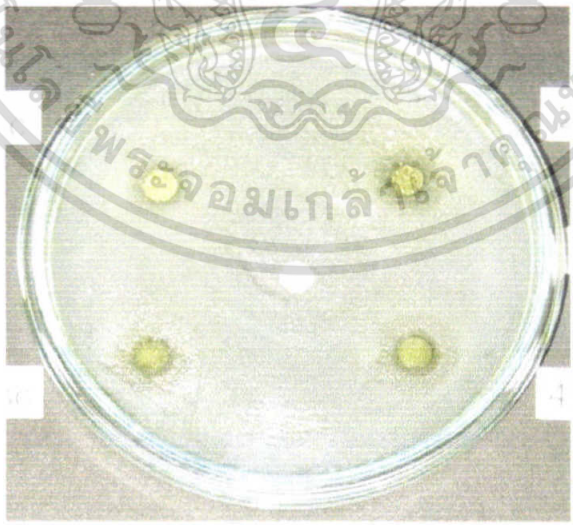


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 6 กราฟ Standard curve ของเชื้อ *V. harveyi*

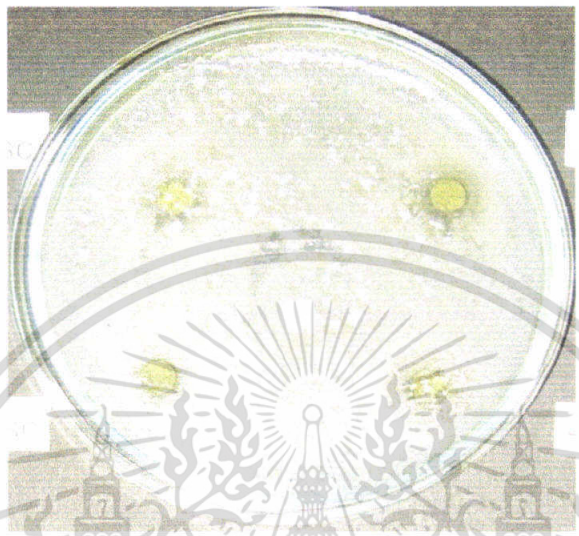


ภาพผนวกที่ 7 ผลของแผ่นทดสอบจากสารสกัด *Enteromorpha sp.* 4 ความเข้มข้น คือ 3.74, 7.48, 11.22 และ 14.96 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบที่ยับยั้งเชื้อ *S. aures* (ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง)

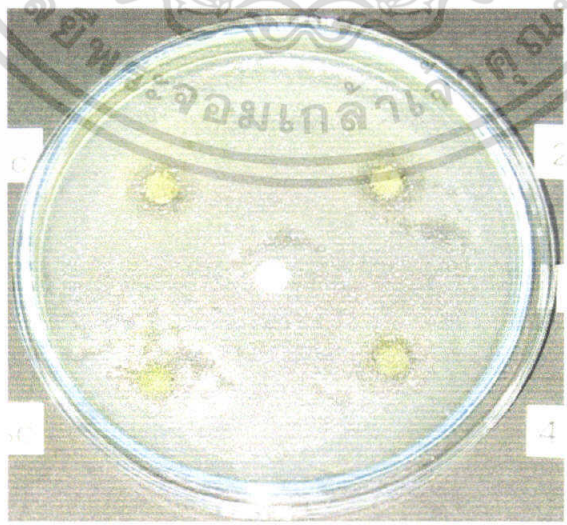


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 8 ผลของแผ่นทดสอบจากสารสกัด *Enteromorpha sp.* 4 ความเข้มข้น คือ 3.74, 7.48, 11.22 และ 14.96 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบที่ยับยั้งเชื้อ *P. fluorescen* (ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง)

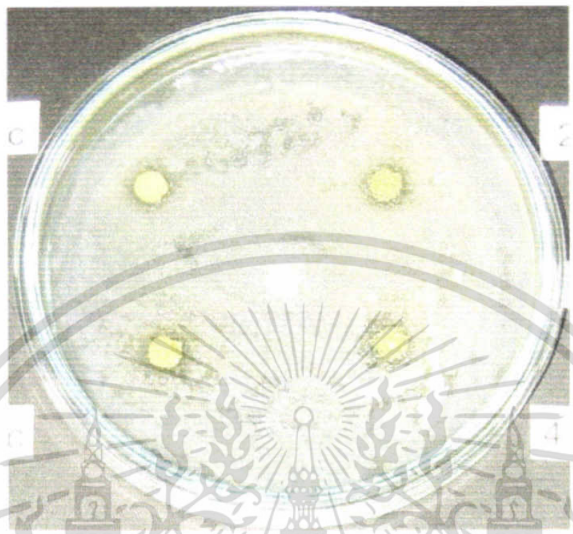


ภาพผนวกที่ 9 ผลของแผ่นทดสอบจากสารสกัด *Enteromorpha sp.* 4 ความเข้มข้น คือ 3.74, 7.48, 11.22 และ 14.96 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบที่ยับยั้งเชื้อ *E.coli* (ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง)

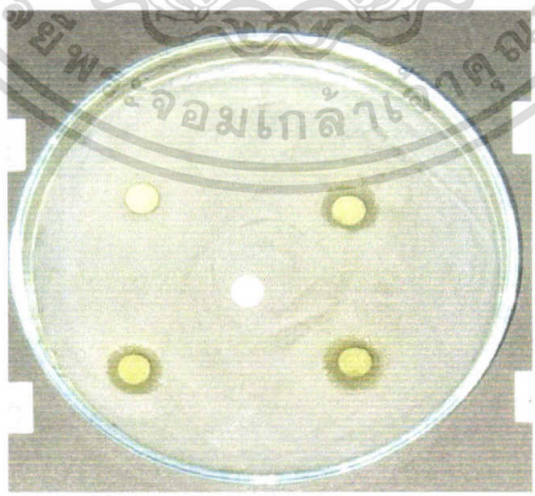


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 10 ผลของแผ่นทดสอบจากสารสกัด *Acanthophora sp.* 4 ความเข้มข้น คือ 2.4, 4.8, 7.2 และ 9.6 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบที่ยับยั้งเชื้อ *P. fluorescen* (ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง)



ภาพผนวกที่ 11 ผลของแผ่นทดสอบจากสารสกัด *Acanthophora sp.* 4 ความเข้มข้น คือ 2.4, 4.8, 7.2 และ 9.6 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบที่ยับยั้งเชื้อ *S. aures* (ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 6 ผลการเกิด Inhibition zone (mm) ของเชื้อแบคทีเรียต่อชนิดสาหร่าย

Strain	Inhibition zone (mm)				
	Gram – positive				Gram + positive
	A. hydrophila	P.fluorescence	*V. harveyi*	E.*coli*	*S.aureus*
Acanthophora sp.					
2.4 mg/disc	–	4.8±1.98 ^{ABCD}	-	3.6±2.20^{A}	7.2±0.2 ^{BCD}
4.8 mg/disc	-	8.6±0.67^{CD}	5±2.04^{ABCD}	7.4 ±1.96^{ABC}	9.2±0.58^{CD}
7.2 mg/disc	-	7.8±2.10^{BCD}	5.4±2.26^{ABCD}	6.4±2.61^{BCD}	9.8±0.37^{D}
9.6 mg/disc	2.8±2.24^{AB}	5.8±2.39^{BCD}	6±2.44^{BCD}	5.85±2.61^{BCD}	10±0.89^{D}
Gracilaria sp.					
2.5 mg/disc	-	-	-	-	-
5 mg/disc	1.4±1.4 ^{AB}	1.4±1.4^{AB}	1.4±1.4 ^{AB}	–	1.2±1.2^{AB}
7.5 mg/disc	1.4±1.4 ^{AB}	1.6±1.6^{ABC}	3.2±1.98^{ABC}	-	8±0.3^{D}
10 mg/disc	5.8±1.46 ^{CD}	5±2.04^{BCD}	4.6±1.88^{BCD}	1.6±1.6^{ABC}	5.2±2.13^{BCD}
Enteromorpha sp.					
3.74 mg/disc	3.8±2.45^{AB}	6.01±2.69^{AB}	1.6±1.6^{A}	4.4±1.83^{AB}	5±2.14^{AB}
7.48 mg/disc	5.2±2.22^{AB}	8.4±2.22^{ABC}	5.4±2.29^{AB}	6.4±2.65^{ABC}	7.8±2.00^{ABC}
11.22 mg/disc	5.6±2.43^{ABC}	9.4±0.24^{BC}	4±2.46^{AB}	6.2±2.55^{ABC}	11±0.94^{BC}
14.96 mg/disc	7.2±1.82^{ABC}	10±0.89^{BC}	6.6±2.71^{ABC}	5±3.06^{AB}	12.6±0.87^{D}
Gloeocapsa sp.					
1 mg/disc	-	-	-	-	-
2 mg/disc	-	-	-	-	-
3 mg/disc	-	-	-	-	-
4 mg/disc	-	-	-	-	-
10 mg/disc	-	-	-	-	-
15 mg/disc	-	-	-	-	-
20 mg/disc	-	-	-	-	-
25 mg/disc	-	-	-	-	-

- ไม่เกิด Inhibition zone (mm)

เทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างความเข้มข้นในสาหร่ายชนิดเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Strain	Inhibition zone (mm)				
	Gram – positive				Gram + positive
	A. hydrophila	P.fluorescence	*V. harveyi*	E.*coli*	*S.aureus*
Oscillatoria sp.					
1 mg/disc	-	-	-	-	-
2 mg/disc	-	-	-	-	-
3 mg/disc	-	-	-	-	-
4 mg/disc	-	-	-	-	-
10 mg/disc	-	-	-	-	-
15 mg/disc	-	-	-	-	-
20 mg/disc	-	-	-	-	-
25 mg/disc	-	-		-	-
Calothrix sp.					
1 mg/disc	-	-	-	-	-
2 mg/disc	-	-	-	-	-
3 mg/disc	-	-	-	-	-
4 mg/disc	-	-	-	-	-
10 mg/disc	-	-	-	-	-
15 mg/disc	-	-	-	-	-
20 mg/disc	-	-	-	-	-
25 mg/disc	-	-	-	-	-
Gloeocapsa sp.					
1 mg/disc	-	-	-	-	-
2 mg/disc	-	-	-	-	-
3 mg/disc	-	-	-	-	-
4 mg/disc	-	-	-	-	-
10 mg/disc	-	-	-	-	-
15 mg/disc	-	-	-	-	-
20 mg/disc	-	-	-	-	-
25 mg/disc	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 7 ผลการเกิด Inhibition zone (mm) ของเชื้อแบคทีเรียต่อชนิดสาหร่าย

Strain	Inhibition zone (mm)				
	Gram – positive				Gram + positive
	A. hydrophila	P.fluorescence	*V. harveyi*	E.*coli*	*S.aureus*
Acanthophora sp.					
2.4 mg/disc	–	4.8±1.98 ^{b}	-	3.6±2.20^{ab}	7.2±0.2 ^{b}
4.8 mg/disc	-	8.6±0.67^{bc}	5±2.04^{b}	7.4 ±1.96^{bc}	9.2±0.58^{c}
7.2 mg/disc	-	7.8±2.10^{b}	5.4±2.26^{ab}	6.4±2.61^{b}	9.8±0.37^{b}
9.6 mg/disc	2.8±2.24^{a}	5.8±2.39^{ab}	6±2.44^{ab}	5.85±2.61^{ab}	10±0.89^{b}
Gracilaria sp.					
2.5 mg/disc	-	-	-	-	-
5 mg/disc	1.4±1.4 ^{a}	1.4±1.4^{a}	1.4±1.4 ^{a}	–	1.2±1.2^{a}
7.5 mg/disc	1.4±1.4^{a}	1.6±1.6^{a}	3.2±1.98 ^{a}	-	8±0.3^{b}
10 mg/disc	5.8±1.46^{a}	5±2.04^{a}	4.6±1.88^{a}	1.6±1.6^{a}	5.2±2.13^{a}
Enteromorpha sp.					
3.74 mg/disc	3.8±2.45^{a}	6.01±2.69^{a}	1.6±1.6 ^{a}	4.4±1.83 ^{a}	5±2.14 ^{a}
7.48 mg/disc	5.2±2.22^{a}	8.4±2.22^{a}	5.4±2.29^{a}	6.4±2.65^{a}	7.8±2.00 ^{a}
11.22 mg/disc	5.6±2.43^{ab}	9.4±0.24^{ab}	4±2.46^{a}	6.2±2.55^{ab}	11±0.94 ^{b}
14.96 mg/disc	7.2±1.82^{ab}	10±0.89^{ab}	6.6±2.71^{ab}	5±3.06^{a}	12.6±0.87 ^{b}
Gloeocapsa sp.					
1 mg/disc	-	-	-	-	-
2 mg/disc	-	-	-	-	-
3 mg/disc	-	-	-	-	-
4 mg/disc	-	-	-	-	-
10 mg/disc	-	-	-	-	-
15 mg/disc	-	-	-	-	-
20 mg/disc	-	-	-	-	-
25 mg/disc	-	-	-	-	-

- ไม่เกิด Inhibition zone (mm)

เทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างเชื้อแบคทีเรียในสาหร่ายชนิดเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Strain	Inhibition zone (mm)				
	Gram – positive				Gram + positive
	A. hydrophila	P.fluorescence	*V. harveyi*	E.*coli*	*S.aureus*
Oscillatoria sp.					
1 mg/disc	-	-	-	-	-
2 mg/disc	-	-	-	-	-
3 mg/disc	-	-	-	-	-
4 mg/disc	-	-	-	-	-
10 mg/disc	-	-	-	-	-
15 mg/disc	-	-	-	-	-
20 mg/disc	-	-	-	-	-
25 mg/disc	-	-	-	-	-
Calothrix sp.					
1 mg/disc	-	-	-	-	-
2 mg/disc	-	-	-	-	-
3 mg/disc	-	-	-	-	-
4 mg/disc	-	-	-	-	-
10 mg/disc	-	-	-	-	-
15 mg/disc	-	-	-	-	-
20 mg/disc	-	-	-	-	-
25 mg/disc	-	-	-	-	-
Gloeocapsa sp.					
1 mg/disc	-	-	-	-	-
2 mg/disc	-	-	-	-	-
3 mg/disc	-	-	-	-	-
4 mg/disc	-	-	-	-	-
10 mg/disc	-	-	-	-	-
15 mg/disc	-	-	-	-	-
20 mg/disc	-	-	-	-	-
25 mg/disc	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้