

ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง อิทธิพลของสารสกัดจากสาหร่ายขนนก *Myriophyllum brasiliense* ในการยับยั้ง
การเจริญของสาหร่ายเซลล์เดียว และแบคทีเรีย
Effects of parrot feather *Myriophyllum brasiliense*, extracted on inhibiting
microalgal and bacterial growth

ชื่อนักศึกษา นายพรเทพ แซ่ก้วย

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ดร.อัฉริ เรืองเดช

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เล่าหะวิสุทธิ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

(ดร. อัฉริ เรืองเดช)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เล่าหะวิสุทธิ)

ภาควิชารับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

วันที่ .../6... เดือน ...พ.ค... พ.ศ. ...50.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

อิทธิพลของสารสกัดจากสาหร่ายขนนก *Myriophyllum brasiliense* ในการยับยั้ง
การเจริญของสาหร่ายเซลล์เดียว และแบคทีเรีย
Effects of parrot feather *Myriophyllum brasiliense*, extracted on inhibiting
microalgal and bacterial growth



T099397



๒๒๓.
พ ๒๕๔๐
๒๕๔๙

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

๑๑๓๑๗

b.....
i.....

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา ๒๕๔๙

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

อิทธิพลของสารสกัดจากสาหร่ายขนนก *Myriophyllum brasiliense* ในการยับยั้ง การเจริญของสาหร่ายเซลล์เดียว และแบคทีเรีย Effects of parrot feather *Myriophyllum brasiliense*, extracted on inhibiting microalgal and bacterial growth

ยาปฏิชีวนะ หากนำมาใช้กับฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำ ก็จะถูกยกขึ้นมาเป็นข้อกีดกันทางการค้า เนื่องจากจะเกิดปัญหาสารตกค้าง ทำให้สินค้าอาหารไม่ปลอดภัย ดังนั้น การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อลดปัญหาดังกล่าว และเพิ่มความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคได้มากขึ้น สารสกัดจากพรรณไม้น้ำ *Myriophyllum brasiliense* ซึ่งเป็นพืชที่โตไว มีระยะเวลาปลูกสั้น โดยใช้ส่วนของต้นสดทั้งต้น สกัดด้วย เมทานอล 99.8% นำมาทดสอบ ควบคุมการเจริญเติบโตของ สาหร่ายเซลล์เดียว คือ *Microcystis* sp. และ *Chlorella* sp. ด้วยระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่างกัน 5 ระดับ เก็บผลที่ได้โดยวิธีการนับเซลล์ ผลคือ สารสกัดความเข้มข้นตั้งแต่ 5 ppm ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของ *Microcystis* sp. ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วน *Chlorella* sp. ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงอิทธิพลของสารสกัดนี้ที่มีต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ซึ่งก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งทะเล พร้อมกับ *Bacillus* sp. โดยวิธีการทดสอบ Clear zone ด้วยระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่างกัน 11 ระดับ เทียบกับยาปฏิชีวนะ Neomycin ซึ่งเป็น broad spectrum (ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด) และยังมีการใช้อยู่ในปัจจุบัน ผลการทดสอบกับแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* คือ สารสกัดความเข้มข้นตั้งแต่ 5-200 ppm เกิด clear zone เพิ่มมากขึ้น ตามลำดับ ส่วนการทดสอบกับ *Bacillus* sp. ผลที่ได้คือ สารสกัดความเข้มข้นตั้งแต่ 10-200 ppm เกิด clear zone เพิ่มมากขึ้น ตามลำดับ เช่นกัน แต่ยังมีขนาดของ clear zone ไม่กว้างเท่ากับยาปฏิชีวนะ Neomycin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ขอขอบคุณทุกคนท่านผู้มีส่วนร่วมให้ปัญหาพิเศษนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตามวัตถุประสงค์ ที่ตั้งไว้ทุกประการ ได้แก่ ท่านอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.อัฉริ เรืองเดช และท่านอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.นงนุช เลหาะวิสุทธิ ที่ให้คำแนะนำ ในการทำปัญหาพิเศษนี้ในทุก ๆ เรื่อง คุณบุปผา จงพัฒน์ และ คุณณภพล เป่ามนัส นักวิทยาศาสตร์/เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง ที่อำนวยความสะดวกด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี เป็นอย่างดี รวมถึงเพื่อน ๆ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกคน ที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณสิทธิกร กมลასันฯ เพื่อนร่วมปัญหาพิเศษ ที่ช่วยกันทำปัญหาพิเศษนี้ ตั้งแต่เริ่มแรก และเสร็จสิ้นลงได้ด้วยดี

นายพรเทพ แซ่ก๊วย

มีนาคม 2550



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	10
ผลการทดลองและวิจารณ์	14
สรุป	17
เอกสารอ้างอิง	18
ภาคผนวก	20



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	clear zone (mm) ของแบคทีเรีย <i>Vibrio harveyi</i> และ <i>Bacillus</i> sp. ที่ได้รับสารสกัดจากพรรณไม้น้ำ <i>Myriophyllum brasiliense</i> ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับยาปฏิชีวนะ Neomycin	16
ตารางผนวกที่		หน้า
1	สูตรอาหารบีจี-11 (BG-11 Medium)	20
2	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อคลอเรลล่า (สูตรดัดแปลง)	21



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของ tellimagrandin II	3
2	ผลการวิเคราะห์ HPLC ของสารสกัดเมทานอลที่ได้จาก <i>M. spicatum</i>	4
3	ผลที่ได้จาก HPLC (a) เทียบกับสารประกอบมาตรฐานทางการค้า (b)	5
4	โครงสร้างของ polyphenols	5
5	chromatogram ที่ได้มาจากการวิเคราะห์ APCI-MS	6
6	chromatogram ที่ได้มาจาก APCI-MS ลดหน่วยความเข้มข้นลง	6
7	อิทธิพลการยับยั้งของ บนการโตสูงสุดของ <i>M. aeruginosa</i>	7
8	การเจริญเติบโตของ <i>M. aeruginosa</i> ที่ได้รับอิทธิพลโดยความเข้มข้นของ PA ที่ระดับต่าง ๆ	7
9	อิทธิพลการยับยั้งการโตของ <i>M. aeruginosa</i> โดยสารผสมของ PA, GA, CATECH และ EA	8
10	การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว <i>Microcystis</i> sp. ที่ได้รับสารสกัดจากพรรณไม้น้ำ <i>Myriophyllum brasiliense</i> ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	14
11	การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว <i>Chlorella</i> sp. ที่ได้รับสารสกัดจากพรรณไม้น้ำ <i>Myriophyllum brasiliense</i> ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	15
ภาพผนวกที่		หน้า
1	พรรณไม้น้ำ <i>Myriophyllum brasiliense</i>	21
2	สาหร่ายเซลล์เดียว <i>Microcystis</i> sp. กำลังขยาย 600 เท่า	22
3	สาหร่ายเซลล์เดียว <i>Chlorella</i> sp. กำลังขยาย 600 เท่า และ unicellular	22
4	แบคทีเรีย <i>Vibrio harveyi</i> กำลังขยาย 1,000 เท่า	22
5	แบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. กำลังขยาย 1,000 เท่า	22
6	การเจริญเติบโตมาตรฐานของ <i>Microcystis</i> sp.	23
7	การเจริญเติบโตมาตรฐานของ <i>Chlorella</i> sp.	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

การระบาดของรุนแรงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน อันเป็นที่ไม่พึงปรารถนาในหลายประเทศ ซึ่งมีผลกระทบกับการใช้ประโยชน์ของแหล่งน้ำต่าง ๆ ทำให้เกิดความสนใจการศึกษาถึงความสัมพันธ์แบบต่อต้านกันที่เกิดขึ้นระหว่างพืชขนาดใหญ่ (macrophytes) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในแหล่งน้ำ เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ไม่ต้องการนี้

การแข่งขันกันเพื่อธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ และแสง คือความรู้ทั่วไปที่จะยับยั้งการโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จนกระทั่งมีการศึกษาและเสนองานวิจัยต่าง ๆ เพิ่มเติม ถึงการควบคุมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยพืชขนาดใหญ่ปล่อยสารเคมี (allelochemicals) ยับยั้งการเจริญของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งผลที่ได้คือ พืชขนาดใหญ่ *Myriophyllum spicatum* เป็นชนิดที่มีอิทธิพลในการยับยั้งมากที่สุด (Nakai et al., 1999) โดยสารที่ปล่อยนั้นคือสารประกอบ phenols และ/หรือ polyphenols

หนึ่งในการกระทำที่เด่นที่สุดของ polyphenols ที่ผลิตจากพืชขนาดใหญ่ คือความซับซ้อนของพวกมันกับโปรตีน สาหร่ายส่วนมากผลิต exoenzymes (phosphatases , glucosidases , peptidases) เพื่อเพิ่มสารอาหารที่เป็นประโยชน์กับตัวมัน ซึ่ง polyphenols จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้

ดังนั้นปัญหาพิเศษนี้ จึงได้ศึกษาถึงผลของสารสกัดจากพรรณไม้ น้ำสกุล *Myriophyllum* เช่นกัน แต่เป็น *Myriophyllum brasiliense* (ภาพผนวกที่ 1) (parrot feather หรือ สาหร่ายขนนก, Family Haloragaceae) ซึ่งเป็นพืชน้ำขนาดใหญ่ เป็นพืช Angiosperm (พืชที่มีเมล็ดอยู่ภายในผลหรือเมล็ดมีรังไข่ห่อหุ้ม) ใบเรียงกันเป็นวง วงละประมาณ 4-6 ใบ แต่ละใบจะแบ่งเป็นเส้นขนาดเล็กอีก 18 คู่ คล้ายขนนก โดยจะต่างจากชนิดอื่น คือ มีใบส่วนที่พันน้ำ ซึ่งจะเป็สีเขียวสว่างสามารถโตและแพร่กระจายพันธุ์ได้เร็ว

สารสกัดที่ได้นี้ จะใช้ในการยับยั้งการเจริญของสาหร่ายเซลล์เดียว คือ *Microcystis* sp. (ภาพผนวกที่ 2) และ *Chlorella* sp. (ภาพผนวกที่ 3) ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของสาหร่ายเซลล์เดี่ยวกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงิน และกลุ่มสีเขียว ตามลำดับ ที่อาจก่อให้เกิด ปัญหาการ บลุ่ม อันจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสมต่อสัตว์น้ำ คือ เมื่อมีธาตุอาหารโดยเฉพาะ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสในแหล่งน้ำมาก อันเนื่องมาจากของเสีย เศษอาหาร อินทรีย์วัตถุและสารซักฟอกที่ปล่อยมาจากครัวเรือน และได้รับปริมาณแสงมาก ในสภาวะอากาศนี้ สาหร่ายเซลล์เดียว จะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำหลักในรอบวัน โดยสาหร่ายเซลล์เดี่ยวทั้งสองชนิด จะดึง CO₂ ในน้ำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์แสงในเวลากลางวัน ทำให้ค่า pH สูง และตอนกลางคืนจะดึง O₂ จากน้ำมาใช้ ในกระบวนการหายใจทำให้ค่า DO ต่ำ เป็นการเอกลำนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แย่งใช้ O₂ กับสัตว์น้ำ นอกจากนี้ *Microcystis* sp. ซึ่งสามารถผลิตสารพิษ คือ ไมโครซิสติน (เป็นสารทุติยภูมิที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างและสลายของเซลล์ หรือ secondary metabolite เป็นสารที่ไม่เกี่ยวข้องหรือจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่าย) และมีองค์ประกอบภายในเซลล์เรียกว่า Gas vacuole ช่วยในการลอยตัวอยู่ในบริเวณผิวน้ำเมื่อถูกคลื่นและลมพัดพามาใกล้ฝั่ง หากสัตว์หรือมนุษย์ ดื่มน้ำที่มีสาหร่าย ที่สร้างสารพิษปนเปื้อนอยู่ จะเป็นอันตรายต่อตับ (Hepatotoxin) และอาจถึงตายได้

และส่วนสุดท้ายมีการทดสอบเพิ่มเติมถึง แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (ภาพผนวกที่ 4) ที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งทะเล พร้อมกับ *Bacillus* sp. (ภาพผนวกที่ 5) อีกด้วย ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของ แบคทีเรียแกรมลบและ แกรมบวกตามลำดับ

โดยคาดหวังว่าสารสกัดจากพรรณไม้น้ำนี้ จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต ของสาหร่ายเซลล์เดียวและแบคทีเรียนี้ได้ เพื่อนำมาใช้ทดแทน และ ลดผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์และผลิตภัณฑ์ยาต่าง ๆ ที่มีขายตามท้องตลาดและใช้กันทั่วไปในปัจจุบัน ต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของสารสกัดจากพรรณไม้น้ำ *Myriophyllum brasiliense* ที่มีต่อการเจริญของสาหร่ายเซลล์เดียว *Microcystis* sp. และ *Chlorella* sp.
2. เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของสารสกัดจากพรรณไม้น้ำ *Myriophyllum brasiliense* ที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และ *Bacillus* sp.

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะ และผลิตภัณฑ์ยาต่าง ๆ ที่อาจก่อให้เกิดปัญหาการตกค้าง ในแหล่งน้ำและในสัตว์น้ำได้
2. ลดปริมาณการใช้สารเคมีสังเคราะห์ โดยนำสารสกัดจากธรรมชาติ มาใช้ ซึ่งปลอดภัยต่อสัตว์น้ำ และผู้บริโภคสัตว์น้ำมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

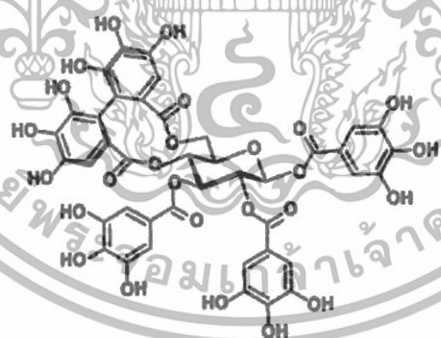
การตรวจเอกสาร

การใช้ยาและสารเคมีสังเคราะห์ที่มีขายตามท้องตลาดที่ใช้กันทั่วไปในปัจจุบัน เป็นวิธีการหนึ่งที่มีความสะดวกรวดเร็วในการควบคุมสารห่วยเซลส์เดี่ยว และแบคทีเรีย ที่มักเกิดขึ้นในบ่อเลี้ยง อย่างไรก็ตามคงไม่มีสารเคมีชนิดใดที่ปลอดภัยต่อสัตว์น้ำ 100 เปอร์เซ็นต์ หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานๆ สารสกัดจากพรรณไม้ น้ำจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อใช้ทดแทนและลดผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตในน้ำได้

สารที่พบในพรรณไม้ น้ำสกุล Myriophyllum

1. Tellimagrandin II

Gross et al. (1996) รายงานว่าพืชน้ำขนาดใหญ่ *Myriophyllum spicatum* ที่รวบรวมในระหว่างฤดูร้อนปี 1991-1994 จากทะเลสาบทางเหนือของประเทศเยอรมัน โดย snorkel และ scuba นำมาสกัดโดยใช้ยอดของ *M. spicatum* สกัดด้วย อะซีโตนเหลว พบสาร tellimagrandin II หรือ -1,2,3-tri-O-galloyl-4,6-(S)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose หรือ eugeniin เป็นสาร tannin ที่ละลายน้ำได้ (ภาพที่ 1) ซึ่งสารที่ได้สอดคล้องกับ Leu et al. (2002) และ Glomski et al. (2002) ซึ่งใช้เนื้อเยื่อพืช มาสกัดด้วยเมทานอล แล้ววิเคราะห์ high-performance liquid chromatography (HPLC) แสดงจุดยอดที่ 15.8 นาที (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ tellimagrandin II

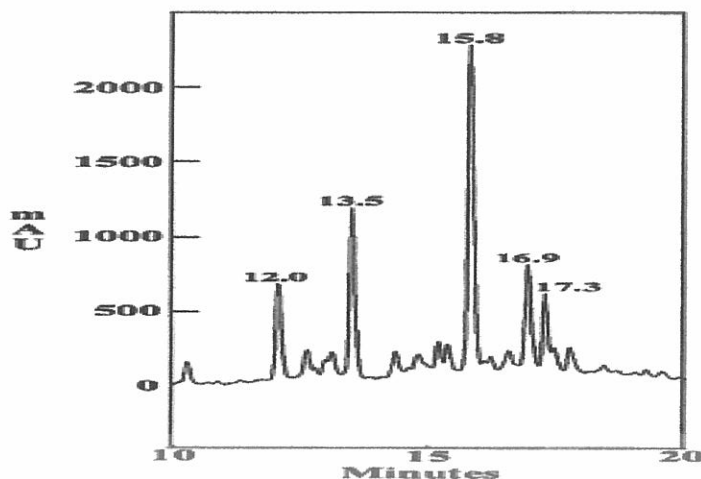
ที่มา : Gross et al. (1996)

2. Polyphenols

Nakai et al. (2000) รายงานว่า พืชน้ำขนาดใหญ่ *M. spicatum* รวบรวมจากแม่น้ำ Asakawa โตเกียว สกัดด้วย CHCl_3 จากนั้นนำมาแยกสารโดยใช้วิธี HPLC ตามด้วย atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS) เป็นการยืนยันปริมาณสารที่

ตรวจพบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



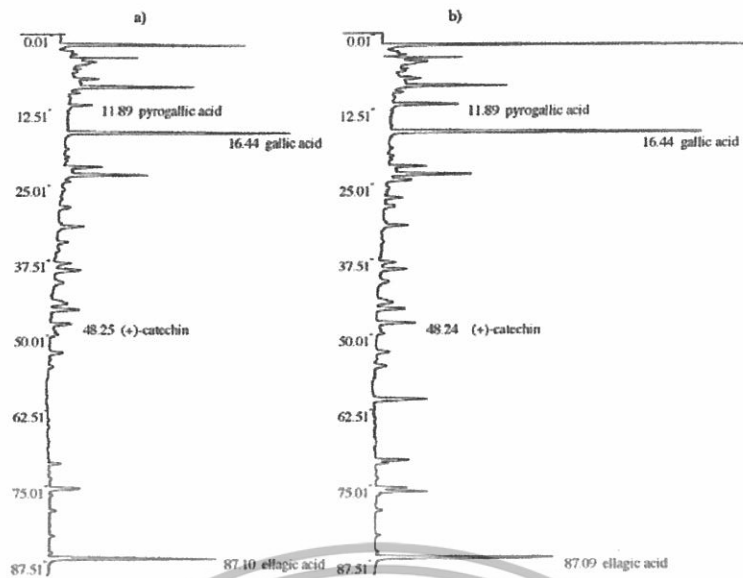
ภาพที่ 2 ผลการวิเคราะห์ HPLC ของสารสกัดเมทานอลที่ได้จาก *M. spicatum* ที่มา : Glomski et al. (2002)

ผลที่ได้จาก HPLC จะแสดงโดยใช้ spike test ซึ่งสารที่ได้จะเป็นความสูงของกราฟ เทียบกับสารประกอบมาตรฐานทางการค้า (ภาพที่ 3) โดยการตรวจสอบ จะใช้คุณสมบัติพื้นฐานของการมีขั้วและน้ำหนักโมเลกุล คือสารที่ออกมาแต่ละตัวจะถูกดูดซับและออกมาตามน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกันในเวลาที่แตกต่างกัน เนื่องจากส่วนที่สามารถ ละลายน้ำได้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 1000 เป็นส่วนน้อยนี้เท่านั้นที่ยับยั้งการโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ผลที่ได้ ภาพที่ 3(a) ผลมาจาก HPLC chromatogram จุดยอด 1 ที่ 11.89 นาที, 2 ที่ 16.44 นาที, 3 ที่ 48.25 นาที, 4 ที่ 87.10 นาที เทียบกับสารประกอบมาตรฐานทางการค้า ภาพที่ 3(b) ใช้อธิบาย polyphenols นั้นคือ pyrogalllic acid (PA), gallic acid (GA), (+)-catechin(CATECH), และ ellagic acid (EA) (ภาพที่ 4) ทั้งสองภาพคล้ายกันมากเป็นการยืนยันได้ในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตาม มีหลายจุดยอดที่ไม่รู้แสดงให้เห็น

ต่อมายืนยันผลของ HPLC ด้วย APCI-MS (ภาพที่ 5) ที่จุดยอดที่ 10.59, 12.46 และ 73.86 นาที มีการแบ่งน้ำหนักไอออน m/z (มวล : ประจุ) 127, 171 และ 303 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) คือ มีค่ามวล : ประจุน้อยจะมีน้ำหนักเบาและออกมาก่อนตามลำดับ สอดคล้องกับ PA, GA และ EA ที่ได้จาก HPLC แต่ก็ยังมีจุดยอดที่ 20.68 และ 26.19 นาที แสดงการมีอยู่ของสารอื่นที่ไม่รู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 ผลที่ได้จาก HPLC จะแสดงโดยใช้ spike test ซึ่งสารที่ได้จะเป็นความสูงของกราฟ (a)

เทียบกับสารประกอบมาตรฐานทางการค้า (b)

ที่มา : Nakai et al. (2000)



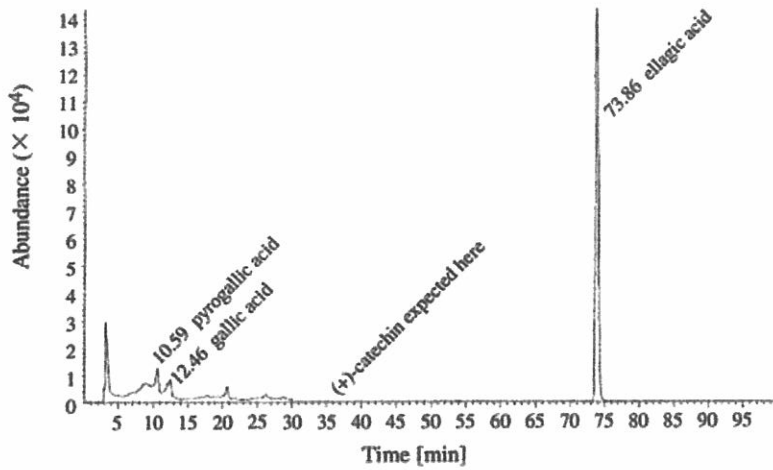
ภาพที่ 4 โครงสร้างของ polyphenols ได้แก่ PA, GA, (+)-CATECH และ EA

ที่มา : Nakai et al. (2000)

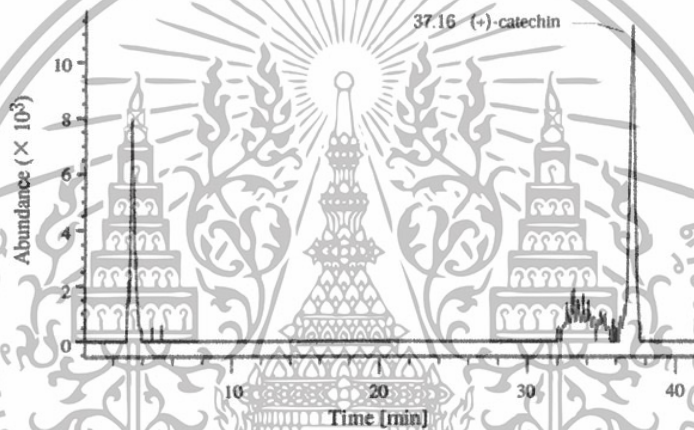
จากภาพที่ 5 ไม่พบ CATECH อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของ CATECH ต่ำกว่าจุดเริ่มต้นของตัวตรวจจสอบ จึงเปลี่ยนหน่วยจาก 10^4 เป็น 10^3 ผลที่ได้จุดยอดที่ 37.16 นาที ค่า $m : z$ เท่ากับ 291 (ภาพที่ 6) ซึ่งสอดคล้องกับสารประกอบมาตรฐาน CATECH

ดังนั้นเป็นการยืนยันสาร polyphenols ได้แก่ pyrogalllic acid (PA), gallic acid (GA), (+)-catechin(CATECH), และ ellagic acid (EA) ที่ปล่อยโดย *M. spicatum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 chromatogram ที่ได้มาจากการวิเคราะห์ APCI-MS
ที่มา : Nakai et al. (2000)



ภาพที่ 6 chromatogram ที่ได้มาจาก APCI-MS ลดหน่วยความเข้มข้นลง
ที่มา : Nakai et al. (2000)

การทดสอบเกี่ยวกับสารที่พบในพรรณไม้น้ำสกุล *Myriophyllum*

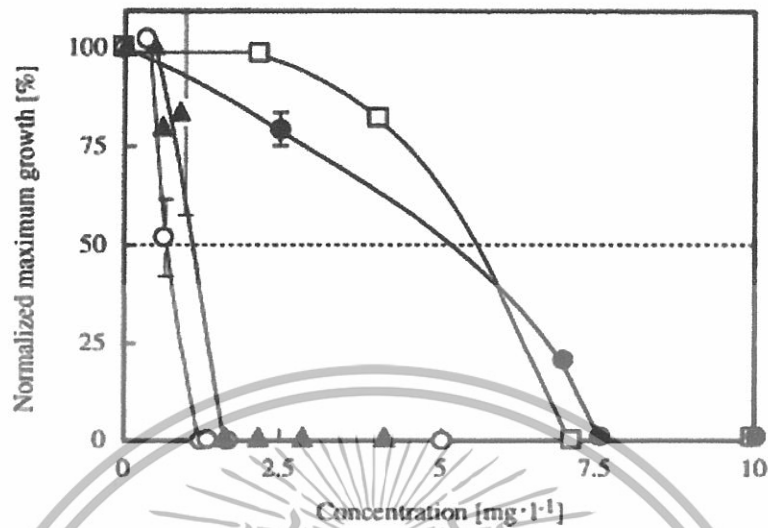
1. อิทธิพลการยับยั้งที่เกิดจากสารแต่ละชนิด

การทดสอบความสัมพันธ์การตอบสนองต่อปริมาณ (dose-response) ของ polyphenols ทั้ง 4 (ภาพที่ 7) ที่แต่ละระดับความเข้มข้นของแต่ละ polyphenols ที่ยับยั้งการโตปกติของ *M. aeruginosa* ลง 50% (EC₅₀) โดยค่า EC₅₀ ที่ได้ของ PA, GA, CATECH และ EA คือ 0.65, 1.0, 5.5 และ 5.1 mg l⁻¹ ตามลำดับ ด้วยเหตุนี้แสดงว่าในหมู่ polyphenols ทั้ง 4 PA และ GA มีอิทธิพลยับยั้งการโตของ *M. aeruginosa* มากกว่า CATECH และ EA

จากนั้นจึงทดสอบต่อด้วยระดับความเข้มข้นของ PA ที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 8) บนการโตของ *M. aeruginosa* ผลที่ได้คือ อิทธิพลการยับยั้งปรากฏตามความเข้มข้นของ polyphenols ที่

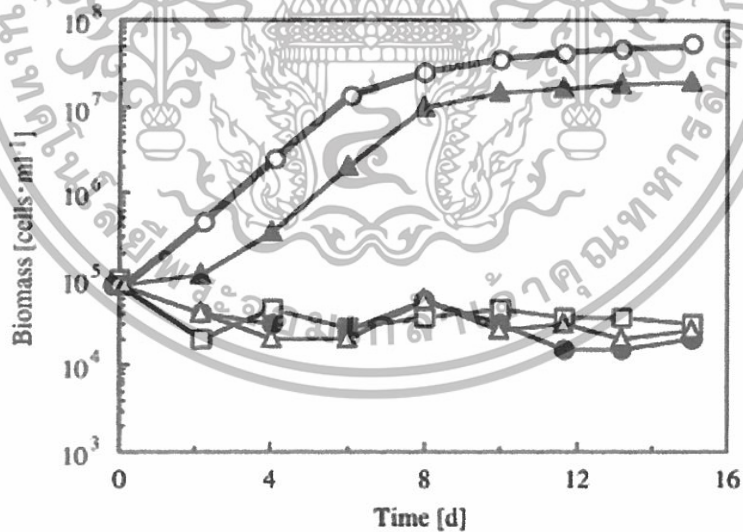
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มของ PA เข้มข้นเกิน 1.26 mg l^{-1} สามารถยับยั้งการโตของ *M. aeruginosa* ได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง



ภาพที่ 7 อิทธิพลการยับยั้งของ polyphenols ได้แก่ PA, GA, CATECH และ EA บนการโตสูงสุดของ *M. aeruginosa* สัญลักษณ์ (○) PA, (▲) GA, (□) CATECH และ (●) EA ค่า standard deviation n=3

ที่มา : NaKai et al. (2000)



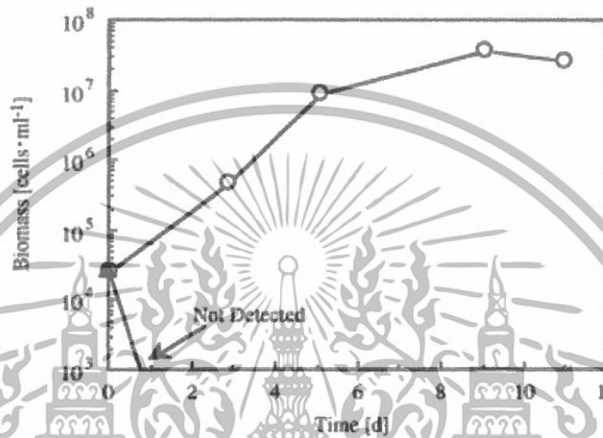
ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของ *M. aeruginosa* ที่ได้รับอิทธิพลโดยความเข้มข้นของ PA ที่ระดับต่าง ๆ สัญลักษณ์ (○) control, (▲) $0.63 \text{ [mg l}^{-1}\text{]}$, (□) $1.26 \text{ [mg l}^{-1}\text{]}$, (●) $2.52 \text{ [mg l}^{-1}\text{]}$ และ (Δ) $5.04 \text{ [mg l}^{-1}\text{]}$

ที่มา : NaKai et al. (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อิทธิพลการยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการใช้สารผสมของ polyphenols ทั้ง 4

หลังจากรู้ระดับความเข้มข้นของ PA ที่มีผลยับยั้งการโตของ *M. aeruginosa* แล้วจึงทดสอบต่อเกี่ยวกับอิทธิพลการยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการใช้สารผสมของ polyphenols ทั้ง 4 ว่าจะมีอิทธิพลยับยั้งการโตเป็นอย่างไร เทียบกับ control (การโตปกติ) (ภาพที่ 9) ภายใต้แสงเข้มข้น 5000 lux *M.aeruginosa* ถูกเพาะเลี้ยงใน C(CB) medium ที่ 25 °c ประมาณ 10-15 วัน การเจริญเติบโตตรวจสอบโดยการนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer ที่ระยะคงที่ ผลที่ได้คือ สารผสมมีอิทธิพลอย่างเห็นได้ชัดในการยับยั้งการโตของ *M. aeruginosa*



ภาพที่ 9 อิทธิพลการยับยั้งการโตของ *M. aeruginosa* โดยสารผสมของ PA, GA, CATECH และ EA สัญลักษณ์ (O) control, (▲) สารผสมของ polyphenols ทั้ง 4 ที่มา : NaKai et al. (2000)

การทดสอบเกี่ยวกับเกี่ยวกับสาหร่ายเซลล์เดียวและแบคทีเรีย

1. การทดสอบเกี่ยวกับเกี่ยวกับสาหร่ายเซลล์เดียว Kim et al. (2006) รายงานว่า การใช้สารสกัดจากต้น *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum* (เง็กเต็ก เป็นพืชบก ใช้เป็นสมุนไพร) ที่สกัดด้วยเมทานอล พบสาร L-2-azetidincarboxylic acid (AZC) ซึ่งสารที่ระดับความเข้มข้น 3.1, 6.2 และ 12.5 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของสาหร่ายเซลล์เดียว *Microcystis aeruginosa* ได้ 22.0%, 67.9% และ 87.1% ตามลำดับ ในขณะที่ สาร AZC เข้มข้นถึง 1,000 ppm สามารถยับยั้งการโตของสาหร่ายเซลล์เดียว *Chlorella* sp. ได้เพียงน้อยกว่า 10.0%

2. การทดสอบเกี่ยวกับแบคทีเรีย

2.1 Mazumder et al. (2001) รายงานว่า ตัวยา Trifluoperazine โดยการใช้เทคนิค agar dilution ที่ความเข้มข้น 10-50 µg/ml สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ได้ ในขณะที่ความเข้มข้น 10-100 µg/ml สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vibrio cholerae, *V. parahaemolyticus* และ *Shigella* spp. ได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomas* spp. ได้พอสมควร

2.2 บัณฑิต และคณะ (2533) รายงานว่าในการทดลองใช้ยา Neomycin และ Lincomycin + spectinomycin จำนวน 2 ครั้งสำหรับป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ ระยะโพสต์ลาร์วา ที่ 25 (PL25) โดย challenge ด้วยเชื้อ *Vibrio anguillarum* จำนวน 5.74×10^8 และ 3.50×10^8 CFU/ml หลังจากให้ยา 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราการรอดตายทั้งหมดทั้งหมดของกลุ่มที่ใช้ยา Lincomycin+spectinomycin ที่ 5 ppm เท่ากับ 90.32% และ 79.80% ที่ 10 ppm เท่ากับ 86.90% (ครั้งที่ 2) ส่วนกลุ่มที่ใช้ยา Neomycin 5 ppm เท่ากับ 90.43% และ 72.73% ที่ 10 ppm เท่ากับ 92.22% และ 73.40% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดตายทั้งหมดเท่ากับ 67.77% และ 52.08% ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใส่ยาจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.01$) แต่เมื่อใช้ยารชนิดเดียวกันในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วสำหรับเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว และแบคทีเรีย
2. อาหารเลี้ยงสาหร่าย ได้แก่ อาหารบีจี -11 และอาหารเลี้ยงคลอโรลลา (สูตรดัดแปลง)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Nutrient Broth, ู๋น, NaCl
4. กล้องจุลทรรศน์, สไลด์นับเม็ดเลือด, ที่นับเซลล์
5. เครื่อง spectrophotometer, คิวเวต
6. เครื่อง evaporator, เครื่อง sonicate
7. เครื่อง autoclave, ตู้ hot air oven, ตู้ Incubator
8. เครื่อง centrifuge, เครื่อง Vortex, เครื่องปั่นน้ำผลไม้
9. ผ้าขาวบาง สาลี และกระดาษกรองเบอร์ 1
10. เมทานอล 99.8%
11. ยาปฏิชีวนะ Neomycin ความเข้มข้น 30µg, แผ่น disc เปล่า ขนาด 5 มิลลิเมตร
12. สารละลาย McFarland No. 0.5 (เตรียมจาก 1.175% $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 1% H_2SO_4 99 มิลลิลิตร)

วิธีการ

แผนการทดลอง

1. สาหร่ายเซลล์เดียว ทำการทดลองแบบ CRD ปัจจัยที่พิจารณาคือ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด ทดลองทั้งหมด 5 ทริตเมนต์ ได้แก่ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 0 (ชุดควบคุม โดยใช้เมทานอล เพื่อแสดงถึงตัวทำละลายไม่มีอิทธิพลในการทดลอง), 2.5, 5, 7.5 และ 10 ppm ทำ 3 ซ้ำ
2. แบคทีเรีย ทำการทดลองแบบ CRD ปัจจัยที่พิจารณาคือ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด ทดลองทั้งหมด 12 ทริตเมนต์ ได้แก่ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 0 (ชุดควบคุม โดยใช้เมทานอล เพื่อแสดงถึงตัวทำละลายไม่มีอิทธิพลในการทดลอง), 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 ppm ทำ 3 ซ้ำ โดยทริตเมนต์ที่ 12 ใช้ยาปฏิชีวนะ Neomycin

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสาหร่ายเซลล์เดียว แบคทีเรีย และพอร์ณไม้น้ำ

1.1 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis* sp. เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร บีจี -11 pH 7.4 โดยใช้น้ำกลั่นที่อบฆ่าเชื้อแล้ว (121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ขออนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงในขวดน้ำเกลือขนาด 1 ลิตร ให้อากาศพร้อมทั้งปิดปากขวดด้วยสำลีและฟอยด์ ป้องกันการปนเปื้อน จากจุลินทรีย์อื่น ๆ ตั้งไว้ในที่ร่ม รับปริมาณแสงและช่วงเวลาตามธรรมชาติ (มืด : สว่าง , 12 :12 ชั่วโมง) ส่วนสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. เพาะเลี้ยงเหมือนกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทุกประการ ยกเว้นเปลี่ยนเป็นสูตรอาหารเลี้ยงคลอเรลล่า (สูตรดัดแปลง) pH 6.8 แทน

1.2 แบคทีเรียแกรมลบ *Vibrio harveyi* เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Borth เติมเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ ป่มในตู้บ่ม 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus* sp. เหมือนกับแกรมลบแต่อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ

1.3 พรอนไม้น้ำ *Myciophyllum brasiliense* เพาะเลี้ยง ในกระบะปลูกขนาด 1 x 1 เมตร ใช้วัสดุปลูกคือกรวดแม่น้ำ ขนาด 2-3 มิลลิเมตร หนาประมาณ 10 เซนติเมตร ปลูกกลางแจ้ง รับปริมาณแสงและช่วงเวลาตามธรรมชาติ (มืด : สว่าง , 12 : 12 ชั่วโมง)

2. เตรียมสารสกัด

- 2.1 นำพรอนไม้น้ำทั้งต้น ขนาดประมาณ 6-8 นิ้ว ล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา 10 นาที
- 2.2 สะเด็ดน้ำ นำมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กที่สุด แล้วปั่นให้ละเอียด ด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้
- 2.3 นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ เมทานอล 99.8% ในขวดสีชาขนาด 1 ลิตร อัตราส่วนของ พรอนไม้น้ำต่อเมทานอล เท่ากับ 100 g.wet / l
- 2.4 เก็บในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน
- 2.5 จากนั้นนำมากรองผ่าน ฟ้าขาวบาง สำลี และกระดาษกรองเบอร์ 1 ตามลำดับ แยกกาก และสารละลายออกจากกัน
- 2.6 นำสารละลายที่ได้ ไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง Evaporator จะได้สารสกัดหยาบ ติดที่ก้น flask
- 2.7 ทำ stock สารสกัด 100,000 ppm เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อร่อนไปทดสอบต่อ

3. การทดสอบสาหร่ายเซลล์เดียว

- 3.1 นำอุปกรณ์ ได้แก่ flask กระบอกตวง บีกเกอร์ อบฆ่าเชื้อ ที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
- 3.2 ปั่นเหียงสาหร่าย ที่ 3000 รอบ/นาที นาน 15 นาที เพื่อแยกเซลล์สาหร่ายและอาหารเลี้ยงสาหร่าย โดยเซลล์สาหร่ายจะตกตะกอนอยู่ด้านล่าง และเทอาหารเลี้ยงสาหร่ายเก่าทิ้ง
- 3.3 เจือจางสาหร่าย ในอาหารใหม่ที่เตรียมไว้ ให้ได้จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น ที่ประมาณ 10^6 cell/ml ใช้การวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร (Ma et al., 2002) แล้วแทนค่าในสมการเส้นแสดงการเจริญเติบโตมาตรฐาน ที่ทำไว้ (ภาพผนวกที่ 6 และ 7)

3.4 แบ่งสาหร่ายใส่ flask ขนาด 150 ml ปริมาตร 50 ml ให้เท่ากันในทุกหน่วยทดลอง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 เติมสารสกัดระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในหน่วยทดลอง (ตัวอย่างเช่น ที่ความเข้มข้น 2.5 ppm จะได้จาก ใน 1,000 ml ของ stock มีสาร 100,000 mg หากต้องการสาร 2.5 mg จึงใช้ stock 0.025 ml หรือ 25 μ l)

3.6 นำไปตั้งไว้ที่ชั้น อุณหภูมิห้อง ให้แสง 1600 lux ตลอด 24 ชั่วโมง เขย่าด้วยมือวันละ 2 ครั้ง และเริ่มเก็บผล บันทึกข้อมูล

4. การทดสอบแบคทีเรีย

4.1 นำอุปกรณ์เครื่องแก้ว อบฆ่าเชื้อ ที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

4.2 นำแบคทีเรียที่มีอายุการบ่มในอาหารใหม่ประมาณ 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ในการทดสอบแบคทีเรีย (Mazumder et al., 2001) มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 3000 รอบ/นาที 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย โดยเซลล์แบคทีเรียจะตกตะกอนอยู่ด้านล่าง และเทอาหารเลี้ยงแบคทีเรียเก่าทิ้ง

4.3 ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำเกลือที่อบฆ่าเชื้อแล้ว โดย *Vibrio harveyi* ใช้ น้ำเกลือ 2% และ *Bacillus* sp. ใช้ น้ำเกลือ 0.85% เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย ในการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วปั่นผลด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง

4.4 เทน้ำเกลือเก่าทิ้ง และเติมน้ำเกลือใหม่ บ่มผลให้เข้ากัน

4.5 เจือจางแบคทีเรียที่ได้ ให้มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับสารละลาย McFarland No. 0.5 (ค่า OD = 0.100) ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 1.5×10^8 โคโลนี/มล. (Colony Forming Unit/ml : CFU/ml) เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้นน้อยสุดที่ใช้ในการทดสอบ Clear zone

4.6 นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ มา spread plate และวางแผ่น disc ทั้ง 12 ทริตเมนต์ที่เตรียมไว้ (แช่แผ่น disc ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 1 ชั่วโมง และนำมาผึ่งให้แห้งอีก 1 ชั่วโมง)

4.7 นำไปบ่มในตู้ Incubator อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เก็บผล

การบันทึกข้อมูล

การทดสอบสารละลายเซลล์เดี่ยว บันทึกค่าที่ได้จากการนับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์, สไลด์นับเม็ดเลือด และที่นับเซลล์ ทุก 24 ชั่วโมง คือ 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง (7 วัน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบแบคทีเรีย บันทึกค่าที่ได้จากการทดสอบ clear zone ด้วยไม้บรรทัด หน่วยเป็น มิลลิเมตร (mm) หลังการ spread plate และ วางแผ่น disc ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้ว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ข้อมูล

โดยโปรแกรม SPSS 10.0 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติแบบ One-Way ANOVA ด้วยวิธีการของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง และ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

ระยะเวลาในการทดลอง

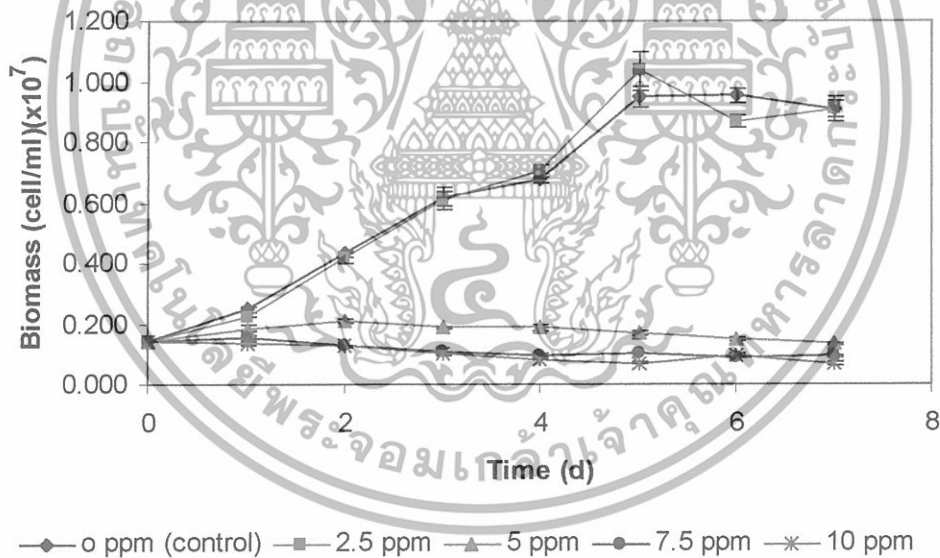
ประมาณ 60 วัน ตั้งแต่เดือน กุมภาพันธ์ ถึงเดือน มีนาคม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

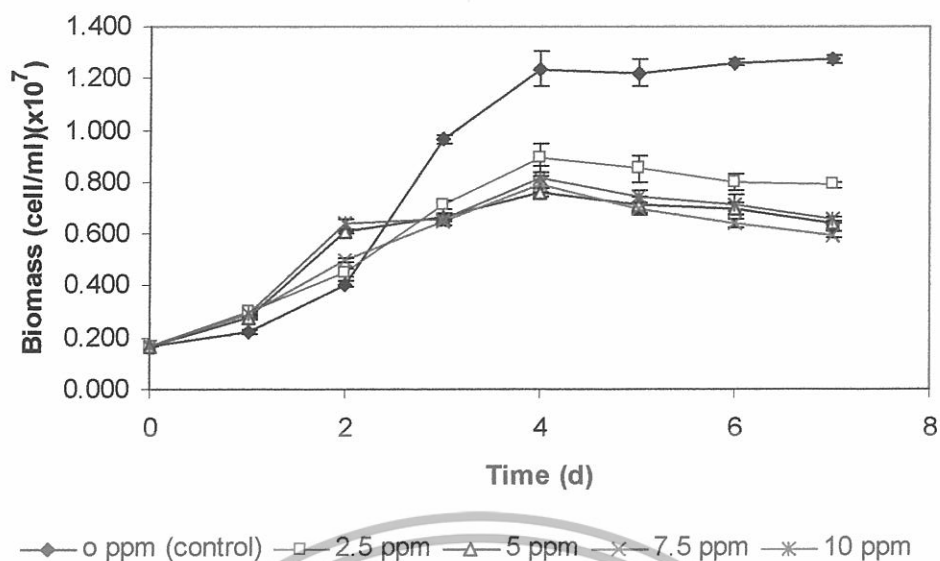
ผลการทดลองและวิจารณ์

สาหร่ายเซลล์เดี่ยว *Microcystis* sp. ที่ได้รับสารสกัดจากพรรณไม้น้ำ *Myriophyllum brasiliense* ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 10) ผลการทดลองคือ ในชุดควบคุม *Microcystis* sp. เจริญเติบโตเป็นปกติ คล้ายกับที่ความเข้มข้น 2.5 ppm โดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงวันที่ 5 (ประมาณ 1 ล้านถึง 10 ล้าน cell/ml) และเริ่มคงที่ตั้งแต่ วันที่ 5 เป็นต้นไป ที่ความเข้มข้น 5 ppm จำนวนเซลล์สาหร่าย ค่อนข้างคงที่ จนถึงวันที่ 4 แล้ว ลดลงจากจุดเริ่มต้นเล็กน้อย ส่วนที่ความเข้มข้น 7.5 และ 10 ppm จำนวนเซลล์สาหร่ายค่อย ๆ ลดลงจากจุดเริ่มต้น ตลอดการทดลอง เหลือประมาณหมื่น cell/ml ในวันสุดท้าย ผลการทดลอง สอดคล้องกับ Nakai *et al.* (2000) ซึ่งพบ polyphenols 4 ชนิดที่ได้จากพรรณไม้น้ำ *Myriophyllum spicatum* ได้แก่ pyrogalllic acid (PA), gallic acid (GA), (+)-catechin (CATECH), และ ellagic acid (EA) และใช้ PA มาตรฐานทดสอบต่อ กับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Microcystis aeruginosa* โดยระดับความเข้มข้นของ PA ที่เข้มข้นเกิน 1.26 mg l^{-1} สามารถ ยับยั้งการโตของ *M. aeruginosa* ได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$)



ภาพที่ 10 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดี่ยว *Microcystis* sp. ที่ได้รับสารสกัดจากพรรณไม้น้ำ *Myriophyllum brasiliense* ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

สำหรับสาหร่ายเซลล์เดี่ยว *Chlorella* sp. (ภาพที่ 11) ผลการทดลองคือ ในชุดควบคุม เจริญเป็นปกติ โดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น อย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 1-4 จากนั้นคงที่ ที่ประมาณ 13 ล้าน cell/ml ส่วนที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 7.5 และ 10 ppm จำนวนเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงวันที่ 1-4 จากนั้นคงที่ ที่ประมาณ 6-8 แสน cell/ml ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุม เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 การเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว *Chlorella* sp. ที่ได้รับสารสกัดจากพรรณไม้น้ำ *Myriophyllum brasiliense* ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ซึ่งผลการทดสอบที่ได้นี้ ต่างกันในสาหร่ายเซลล์เดียว *Microcystis* sp. และ *Chlorella* sp. อาจเนื่องมาจาก ความแตกต่างของสารที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์นั้น ๆ โดยที่ผนังเซลล์ของ *Microcystis* sp. เป็นแป้งธรรมชาติ ไม่ใช่เซลล์ลูไลส ในขณะที่ ผนังเซลล์ของ *Chlorella* sp. เป็นสารพวกเซลล์ลูไลส ที่มีความแข็งแรงมากกว่า ทำให้เซลล์ของ *Chlorella* sp. ได้รับอิทธิพลจากสารสกัดน้อยกว่า จึงยังมีการเจริญได้ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม

ในการทดสอบ Clear zone ของแบคทีเรียที่ได้รับสารสกัดจากพรรณไม้น้ำ *M. brasiliense* ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับยาปฏิชีวนะ Neomycin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) ผลการทดลองของ *Vibrio harveyi* คือ ในชุดควบคุมไม่เกิด clear zone เหมือนกับที่ความเข้มข้น 2.5 ppm ส่วนที่ความเข้มข้น 5, 7.5, 10 และ 25 ppm เกิด clear zone 7±0 mm ที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 ppm เกิด clear zone 8±0, 8.3±0.3 และ 9±0 mm ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 150 และ 200 ppm เกิด clear zone 10±0 mm และยาปฏิชีวนะ Neomycin เกิด clear zone 19.7±0.3 mm

ส่วนแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในชุดควบคุมไม่เกิด clear zone เหมือนกับที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 7.5 ppm ส่วนที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 ppm เกิด clear zone 7±0, 8.3±0.3, 9.7±0.3, 12±0, 12.7±0.3, 15.3±0.3, และ 18±0 mm ตามลำดับ และยาปฏิชีวนะ Neomycin เกิด clear zone 26.3±0.3 mm

โดยกลไกการออกฤทธิ์ของ Neomycin จะไปยับยั้งขบวนการสังเคราะห์โปรตีน ที่ mRNA ของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 Clear zone (mm) ของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และ *Bacillus* sp. ที่ได้รับสารสกัดจากพรรณไม้น้ำ *Myriophyllum brasiliense* ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับยาปฏิชีวนะ Neomycin

clear zone (mm)		
ความเข้มข้น (ppm)	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Bacillus</i> sp.
0 (control)	0.0 ^a	0.0 ^a
2.5	0.0 ^a	0.0 ^a
5	7.0±0 ^b	0.0 ^a
7.5	7.0±0 ^b	0.0 ^a
10	7.0±0 ^b	7.0±0 ^b
25	7.0±0 ^b	8.3±0.3 ^c
50	8.0±0 ^c	9.7±0.3 ^d
75	8.3±0.3 ^d	12.0±0 ^e
100	9.0±0 ^d	12.7±0.3 ^f
150	10.0±0 ^e	15.3±0.3 ^g
200	10.0±0 ^e	18.0±0 ^h
Neomycin	19.7±0.3 ^f	26.3±0.3 ⁱ

อักษรที่เหมือนกันแสดงว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

อักษรที่ไม่เหมือนกันแสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

สารสกัดจากสาหร่ายขนนก *Myriophyllum brasiliense* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายเซลล์เดียว *Microcystis* sp. ได้ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ 5 ppm ขึ้นไป ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) กับชุดควบคุมและที่ความเข้มข้น 2.5 ppm ส่วนสาหร่ายเซลล์เดียว *Chlorella* sp. สารสกัดจากสาหร่ายขนนก *M. brasiliense* ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้

สำหรับการทดสอบ Clear zone แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ผลที่ได้คือ ในชุดควบคุมและความเข้มข้น 2.5 ppm ไม่เกิด clear zone แตกต่างกับที่ระดับความเข้มข้น 5 -200 ppm ที่เกิด clear zone เพิ่มมากขึ้น ตามลำดับ ส่วนการทดสอบกับแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ผลที่ได้คือ ในชุดควบคุม, 2.5, 5, 7.5 ppm ไม่เกิด clear zone แตกต่างกับที่ระดับความเข้มข้น 10 -200 ppm ที่เกิด clear zone เพิ่มมากขึ้น ตามลำดับ เช่นกัน แต่ยังมีขนาดของ clear zone ไม่กว้างเท่ากับยาปฏิชีวนะ Neomycin



เอกสารอ้างอิง

บัณฑิต ลีลายนะ ธัชชัย แสงกุล และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2533. การใช้ยา Neomycin และ Lincomycin + spectinomycin ในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ. ใน รายงานความก้าวหน้าการวิจัยครั้งที่ 2 งานวิจัยกึ่งทะเลของประเทศไทย โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 20 น.

Gross, E.M., H. Meyer, and G. Schilling. 1996. Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*. *Phytochemistry* 41:133-138.

Glomski, L.A.M., K.V. Wood, R.L. Nicholson, and C.A. Lembi. 2002. The search for exudates from Eurasian Watermilfoil and Hydrilla. *J. Aquat. Plant Manage* 40:17-22.

Leu, E., A. Krieger-Liszkay, C. Goussias, and E.M. Gross. 2002. Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II. *Plant Physiology* 130:2011-2018.

Nakai, S., Y. Inoue, M. Hosokmi, and A. Murakami. 1999. Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. *Water Science Technology* 39:47-53.

Nakai, S., Y. Inoue, M. Hosokmi, and A. Murakami. 2000.

Myriophyllum spicatum –released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Water Research* 34:3026-3032.

Mazumder, R., K. Ganguly, S.G. Dastidar, and A.N. Chakrabarty. 2001. Trifluoperazine: a broad spectrum bactericide especially active on staphylococci and vibrios. *Antimicrobial Agents* 18:403 -406.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ma, J., L. Xu, S. Wang, R. Zheng, S. Jin, S. Huang, and Y. Huang. 2002. Toxicity of 40 Herbicides to the Green Alga *Chlorella vulgaris*. *Environmental Research* 51:128 -132.

Kim, J.S., J.C. Kim, S. Lee, B.H. Lee, and K.Y. Cho. 2006. Biological activity of L-2-azetidinedicarboxylic acid, isolated from *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*, against several algae. *Aquatic Botany* 85:1-6.

งานวิจัย – บทความวิทยาศาสตร์. 2003. *Vibrio harveyii* สาเหตุของ โรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ. เข้าถึงได้จาก www2.se-ed.net/.../research/photo2_vibrio.gif (March, 2007)

Aquacide Company. available <http://www.killakeweeds.com/weeds.cfm?=&Submersed> (March, 2007)

Presscott, G. W. 1951. *Algae of the Western Great Lakes*. available http://www.dnr.state.md.us/bay/cblife/algae/cyano/microcystis_sp.html (March, 2007)

Health Benefits Of *Chlorella* available <http://www.healingdaily.com/oral-chelation/health-benefit-of-chlorella.htm> (March, 2007)

<http://www.answers.com/topic/bacilli> (March, 2007)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 สูตรอาหารบีจี-11 (BG-11 Medium)

ลำดับที่	ส่วนผสม (Ingredient)	ความเข้มข้น (Concentration)	
1	โซเดียมไนเตรต (NaNO_3)	1.5 กรัม/ลิตร	17.65 มิลลิโมลล์ (mM)
2	ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 7-ไฮเดรต ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.04 กรัม/ลิตร	0.18 มิลลิโมลล์
3	แมกนีเซียมซัลเฟต 7-ไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.075 กรัม/ลิตร	0.30 มิลลิโมลล์
4	แคลเซียมคลอไรด์ 2-ไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.036 กรัม/ลิตร	0.25 มิลลิโมลล์
5	กรดซิตริก ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_{10}$)	0.006 กรัม/ลิตร	0.03 มิลลิโมลล์
6	เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรต (Ferric ammonium citrate)	0.006 กรัม/ลิตร	0.03 มิลลิโมลล์
7	ไดโซเดียมแมกนีเซียม EDTA	0.001 กรัม/ลิตร	0.003 มิลลิโมลล์
8	โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	0.02 กรัม/ลิตร	0.19 มิลลิโมลล์
9	* Trace Metal Mix A5 + Co เติมน้ำกลั่นให้ครบ		1 มิลลิลิตร 1 ลิตร
* Trace Metal Mix A5 + Co			
	- กรดบอริก (H_3BO_3)		2.86 กรัมต่อลิตร
	- แมงกานีสคลอไรด์ 4-ไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)		1.81 กรัมต่อลิตร
	- ซิงก์ซัลเฟต 7-ไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)		0.222 กรัมต่อลิตร
	- โซเดียมโมลิบเดต 2-ไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)		0.390 กรัมต่อลิตร
	- คอปเปอร์ซัลเฟต 5-ไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)		0.079 กรัมต่อลิตร
	- โคบอลต์ไนเตรต 6-ไฮเดรต [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]		0.049 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อคลอโรลลา (สูตรดัดแปลง)

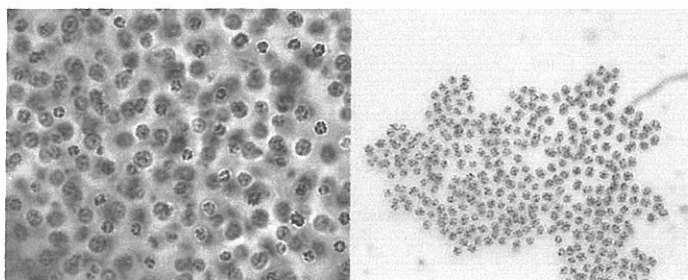
ลำดับที่	สารเคมี	ปริมาณ (mg/l)
1	NaNO ₃	117.00
2	KH ₂ PO ₄	15.00
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	8.75
4	CaCl ₂	1.67
5	EDTA	5.00
6	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.41
7	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.16
8	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.88
9	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.035
10	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.14
11	MoO ₃	0.07
12	H ₃ BO ₃	1.14



ภาพผนวกที่ 1 พรรณไม้น้ำ *Myriophyllum brasiliense*

ที่มา : <http://www.killlakeweeds.com/weeds.cfm?groupid=Submersed> (March, 2007)

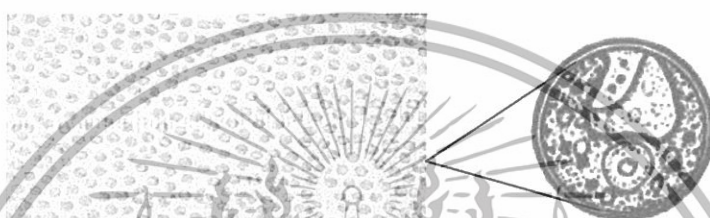
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 2 สาหร่ายเซลล์เดี่ยว *Microcystis* sp. กำลังขยาย 600 เท่า

ที่มา : http://www.dnr.state.md.us/bay/cblife/algae/cyano/microcystis_sp.html

(March, 2007)



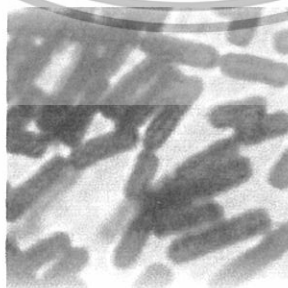
ภาพผนวกที่ 3 สาหร่ายเซลล์เดี่ยว *Chlorella* sp. กำลังขยาย 600 เท่า และ unicellular form

ที่มา : <http://www.healingdaily.com/oral-chelation/health-benefits-of-chlorella.htm>

(March, 2007)

ภาพผนวกที่ 4 แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* กำลังขยาย 1,000 เท่า

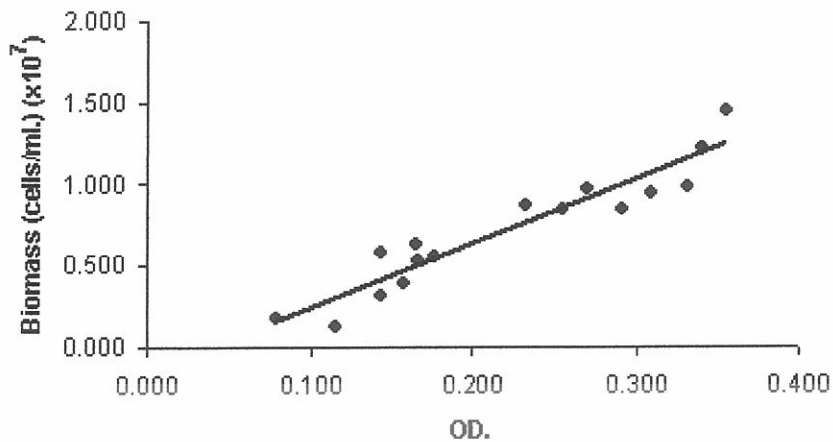
ที่มา : www2.se-ed.net/.../research/photo2_vibrio.gif (March, 2007)



ภาพผนวกที่ 5 แบคทีเรีย *Bacillus* sp. กำลังขยาย 1,000 เท่า

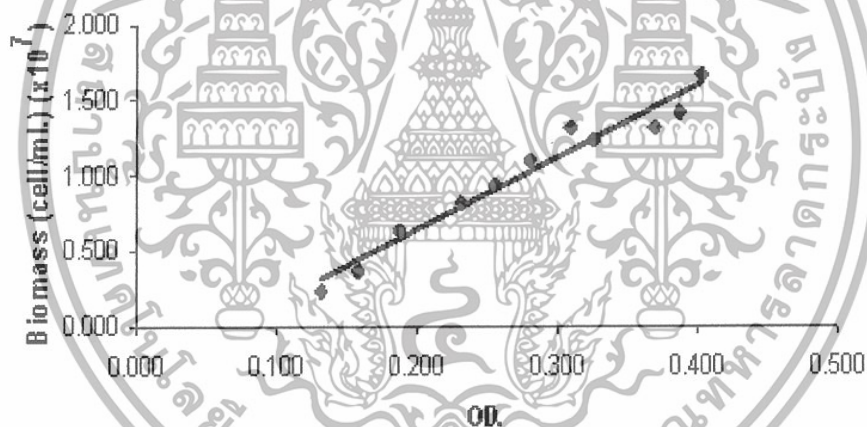
ที่มา : <http://www.answers.com/topic/bacilli> (March, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 6 การเจริญเติบโตมาตรฐานของ *Microcystis* sp.

$$\text{สมการ } y = 3920.5x - 143.09 ; R^2 = 0.8945$$



ภาพผนวกที่ 7 การเจริญเติบโตมาตรฐานของ *Chlorella* sp.

$$\text{สมการ } y = 4786.5x - 319.43 ; R^2 = 0.9614$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้