ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* spp. ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

Antibacterial Activity of *Chlorella* spp. Extract against Pathogenic Bacteria

วีนา ชูโชติ

Weena Choochote

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlorella* spp. 5 สายพันธุ์คือ *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. B2, *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260, *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 ที่สกัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทนมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 6 ชนิด ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. B2, *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260, และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* , *Bacillus cereus* และ *Pseudomonas fluorescens* ขณะที่สาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้ 3 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงที่ลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 29 มิลลิเมตร

คำสำคัญ : *Chlorella* spp. การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย วิธี disc diffusion แบคทีเรียก่อโรค สาหร่ายขนาดเล็ก

E-mail address : kcweena@kmitl.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Crude extracts in dichloromethane of five strains of unicellular green algae: *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. B2, *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260, *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 and *Chlorella* sp. TISTR 8445 were prepared. Their antibacterial activities were tested against six species of pathogenic bacteria. It was found that the extracts of *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. B2, *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260, and *Chlorella* sp. TISTR 8445 were able to inhibit four species of bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* while the extract of *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 was able to inhibit three species of bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. The extract of *Chlorella* sp. B2 exerted the strongest inhibition on the growth of *Staphylococcus aureus* at the concentration of 10 mg/disc. This extract, cultured in a modified N-8 medium with half the concentration of macronutrients, exhibited an inhibition zone of 29 mm. The highest level of inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* was found on the 6 th day of cultivation.

Keywords: *Chlorella* spp., antibacterial activity, disc diffusion method, pathogenic bacteria, microalgae

1. บทนำ

สาหร่าย *Chlorella* spp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวขนาดเล็กพบในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป และมีความสำคัญต่อระบบนิเวศในด้านเป็นผู้ผลิตลำดับแรกของห่วงโซ่อาหาร การนำสาหร่าย *Chlorella* spp. มาใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่จะใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพสำหรับมนุษย์และเป็นอาหารของลูกสัตว์น้ำเศรษฐกิจ เช่น ลูกกุ้ง ลูกปลา และหอยสองฝา นอกจากนั้นยังใช้เป็นอาหารของไรแดงและแพลงก์ตอนสัตว์ เนื่องจากสาหร่าย *Chlorella* spp. มีคุณค่าทางอาหารสูง ผลิตโปรตีน วิตามิน สารเคมีอื่นๆ และไม่ทำให้น้ำเสีย นอกจากนี้ยังพบว่า *Chlorella vulgaris* สามารถสร้างสารต้านแบคทีเรีย [1] สารต้านไวรัส [2] สารยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง [3] สามารถสร้างสารสีแคโรทีนอยด์ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [4] Pratt และคณะ [5] รายงานว่าสารสกัด chlorellin จากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella pyrenoidosa* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 5 ชนิดคือ *Bacillus subtilis, Bacterium coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes* และ *Pseudomonas aeruginosa* ตั้งแต่นั้นมาก็มีการรายงานการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายในกลุ่มสารต่าง ๆ เช่น กรดไขมัน [6] เทอปีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(terpenes) [7] โบรโมฟีนอล (bromophenols) [8] สารประกอบฮาโลจีเนท (halogenated compounds) [9-10] เปปไทด์ [11] และพอลิแซคคาไรด์ [12] สารเคมีเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา สาหร่ายและไวรัส สารเคมีบางชนิดสร้างแล้วปล่อยออกนอกเซลล์ และอีกหลายชนิดสามารถปล่อยออกนอกเซลล์เมื่อได้รับชักนำในการเพาะเลี้ยง [11] Tanaka และคณะ [1] ได้ทดลองให้สารสกัดจากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่สกัดด้วยน้ำร้อนแก่หนูก่อนการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เข้าไปในตัวหนู พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* มีชีวิตรอดได้นานกว่าหนูที่ไม่ได้รับสารสกัดจาก *Chlorella vulgaris*

ปัจจุบันนี้ได้มีโรคใหม่ๆ เกิดขึ้นเสมอ ดังนั้นยาปฏิชีวนะจึงเป็นยากลุ่มที่มีความสำคัญที่ใช้ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวางไม่เฉพาะกับมนุษย์แต่ยังใช้กับสัตว์เลี้ยงด้วย Hirsch และคณะ [13] รายงานว่าตรวจพบสารปฏิชีวนะหลายชนิดในแหล่งน้ำธรรมชาติ การใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปลาก็เริ่มมีผลเสียต่อสภาพแวดล้อม เพราะการใช้ยาจำนวนมากแต่ปริมาณที่ยาถูกดูดซึมโดยตัวปลาได้น้อย ดังนั้นยาเหล่านี้จึงปนเปื้อนอยู่ในน้ำเป็นผลให้แบคทีเรียสร้างสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งยานี้นอกจากมีพิษโดยตรงต่อพืชและสัตว์น้ำขนาดเล็ก และยังอาจเป็นภาวะเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ผู้บริโภคอาหารที่ปนเปื้อนนี้ [14-15] Tendencia และ dela Pena [16] รายงานว่าการเลี้ยง *Chlorella* spp. ร่วมกับการเลี้ยงกุ้งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเรืองแสง (luminous bacteria) ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งแชบ๊วย *(Penaeus merguriensis*) Robles Centeno และ Ballantine [17] รายงานว่าการเปลี่ยนสภาพแวดล้อมทางฟิสิกส์ซึ่งในการทดลองคือแสงทำให้เกิดความแตกต่างหรือความหลากหลายของจำนวนสารเมแทบอไลท์ (metabolite) ที่สร้างขึ้น และแสงเป็นปัจจัยในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสาหร่ายสีแดง *Spiridia filamentosa* Issa [18] รายงานว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria angustissma* และ *Calothrix parietal* สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส Gonzalez del Val และคณะ [19] ศึกษาผลของสภาวะการเจริญต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในสภาวะที่ให้ความเครียดและสภาวะธรรมชาติ พบว่าการเลี้ยงในสภาวะที่ให้ความเครียดมีแนวโน้มจะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าแต่ไม่ชัดเจน (แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ)

ดังนั้นการศึกษาหาสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* spp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์น้ำ และจะเป็นผลดีต่อสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสายพันธุ์ ชนิดของสารละลายที่ใช้ในการสกัด และปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* spp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ตลอดจนสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรค

2. วิธีการทดลอง

2.1 สาหร่าย การเพาะเลี้ยง และการเก็บเกี่ยว

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

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค แบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด : *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus*, แบคทีเรียแกรมลบ 3 ชนิด : *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens,* และ *Aeromonas hydrophila* จากห้องปฏิบัติการสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นำเชื้อสาหร่าย *Chlorella* spp. แต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตร N-8 [20] ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในหลอดเลี้ยงสาหร่ายแบบให้อากาศขนาด 300 มิลลิลิตร ให้แสงต่อเนื่องด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 2400 ลักซ์ เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นจึงเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Sanyo : Falcon 6/300) ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง และนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* spp. ที่สกัดด้วยสารละลายต่างกัน

2.2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำเซลล์สาหร่ายที่เก็บเกี่ยวไว้ตามข้อ 2.1 มาใส่ในน้ำกลั่นปริมาณ 1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonic vibra cell model vcx 500) และทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-dryer : Heto Lyolab 3000) ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียสประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปสกัดด้วยสารละลายต่างกัน 4 ชนิดคือ เฮกเซน เมทานอล คลอโรฟอร์ม และไดคลอโรมีเทนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้จากสารละลายต่างกันนี้ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดันที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การเตรียมแผ่นทดสอบ

นำสารสกัดหยาบจากข้อ 2.2.1. ละลายในสารละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ในการสกัดเซลล์สาหร่ายให้มีความเข้มข้น 0 และ 5 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร)

2.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสาหร่าย *Chlorella* spp. กับแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด (OD 0.3) ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ด้วยวิธี spread plate ทิ้งไว้จนสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียได้ซึมลงเนื้อวุ้นจนแห้ง นำแผ่นทดสอบที่เตรียมไว้จากข้อ 2.2.2 ไปวางบนจานเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

2.3 ศึกษาสายพันธุ์สาหร่ายและปริมาณความเข้มข้นสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

เตรียมสารสกัดหยาบจากสาหร่าย ทั้ง 5 สายพันธุ์คือ *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. B2 , *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260, *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 โดยสกัดด้วยสารละลายชนิดที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคดีที่สุดจากการทดลองข้อ 2.2.3 จากนั้นจึงนำสารสกัดหยาบดังกล่าวละลายในสารละลายชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการสกัดสาหร่าย เพื่อเตรียมเป็นแผ่นทดสอบ 4 ความเข้มข้นคือ 0, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ ใช้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 6 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens* และ *Aeromonas hydrophila* ที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.2.3 ด้วยวิธี paper disc diffusion เปรียบเทียบกับแผ่นทดสอบที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 0.5 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้ผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

นำสายพันธุ์ *Chlorella* spp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุดจากการทดลองข้อ 2.3 มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน 2 สูตรคือ อาหารสูตร N-8 ดัดแปลงโดยเพิ่มแหล่งไนโตรเจนเป็นสองเท่าและอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงโดยลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหาร 2500 มิลลิลิตรและหัวเชื้อสาหร่าย 250 มิลลิลิตร ให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ที่ความเข้มแสง 5000 ลักซ์ [21] เป็นเวลา 12 วัน จากนั้นจึงนำมาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบและเตรียมเป็นแผ่นทดสอบที่ความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองข้อ 2.3 ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสิทธิภาพของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ในวันที่ 2 4 6 8 10 และ 12 ของการเพาะเลี้ยง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* spp. ที่สกัดด้วยสารละลายต่างกัน

ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เมทานอล คลอโรฟอร์ม และไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบพบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เมทานอล คลอโรฟอร์ม และไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ทั้ง 3 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* และ *Bacillus subtilis* โดยเฉพาะสารสกัดจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมีผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 10.50, 10.00 และ 7.50 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 3.1) ส่วนสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เพียงชนิดเดียวคือ *Bacillus cereus* เช่นเดียวกับสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Scytosiphon lomentaria* ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ได้ดีกว่าสารสกัดจากเมทานอลและเฮกเซน [22] และจากการทดลองพบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

ตารางที่ 3.1. ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำลายต่างๆ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

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

หมายเหตุ - ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

ค่าเฉลี่ย ± ค่า SD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายชนิด สารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการละลายได้ในตัวละลายต่างชนิดกัน ดังที่ Jayshree และคณะ [23] รายงานว่าสารสกัดจาก *Chlorella vulgaris* ประกอบด้วย อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอล แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ ซาโปนิน และไกลโคซายด์ จากรายงานการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดจากสาหร่ายในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ พบว่าสารสกัดของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์และราได้ดีกว่าสารที่สกัดจากน้ำและอะซิโตน [24] สาหร่ายสีเขียว *Haematococcus pluvialis* ระยะซีสต์สีแดงที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์และราได้ดีกว่าสารสกัดจากเฮกเซน [25] สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Trichodesmium erythraeum* ที่สกัดด้วยเฮกเซนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากเอทิลอะซิเตท [26] สารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Cystoseira tamarisciforia* ที่สกัดจากเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และรา ส่วนสารสกัดจากน้ำ เมทานอล และเฮกเซนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และราได้ [27]

3.2 ผลการศึกษาหาสายพันธุ์และปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

จากการทดลองนี้พบว่าสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* spp. ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิกรัม สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* ซึ่งส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดแต่น้อยกว่าฤทธิ์การยับยั้งจากยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน ส่วนแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถยับยั้งได้มีเพียงชนิดเดียว คือ *Pseudomonas fluorescens* ส่วนอีก 2 ชนิดไม่สามารถยับยั้งได้เลย คือ *Pseudomonas. aeruginosa* และ *Aeromonas hydrophila* ดังนั้นสารสกัดจาก *Chlorella* sp. B2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 3.2) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากภายในเซลล์สาหร่าย *Chlorella* spp. มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด และชนิดที่ละลายได้ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Aeromonas hydrophila* สารสกัดจากสาหร่ายที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป็นสารประเภทกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) ได้แก่กรดปาล์มมิติก กรดลิโนเลอิก และกรดลิโนเลนิก เป็นองค์ประกอบหลักร้อยละ 67 จาก *Chlorella vulgaris* [24] สารประกอบฟีนอลจาก *Chlorococcum humicula* [28] กรดไขมันบิวทาโนอิก และเมทิลแลคเตทจาก *Haematococcus pluvialis* ระยะซีสต์สีแดง [25] ปกติแบคทีเรียแกรมลบสามารถต่อต้านต่อสารยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เป็นเพราะคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบชั้นนอกสุดประกอบด้วยชั้นไขมันลิโพพอลิแซ็คคาไรด์ ดังนั้นผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2. การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* spp. ที่สกัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 5 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

สาหร่าย	ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัม)	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
		แบคทีเรียแกรมบวก			แบคทีเรียแกรมลบ		
		S. aureus	*B. subtilits*	*B. cereus*	*P. aeruginosa*	*P. fluorescens*	*A. hydrophila*
Chlorella sp. A0505	5	12.17±0.7	6.50±0.00	7.33±0.28	-	6.50±0.00	-
	10	16.0±2.17	6.67±0.28	8.33±0.28	-	6.50±0.25	-
	20	8.00±0.50	7.33±0.57	9.33±0.28	-	6.67±0.28	-
Chlorella sp. B2	5	13.17±1.04	7.33±0.57	10.67±1.20	-	7.33±0.57	-
	10	16.33±0.58	15.83±0.76	13.50±0.50	-	8.17±0.28	-
	20	12.17±0.76	11.50±1.32	9.17±0.28	-	6.83±0.28	-
Chlorella ellipsoidea	5	9.83±0.76	6.50±0.00	8.17±0.28	-	6.67±0.28	-
TISTR 8260	10	14.50±2.29	6.67±0.28	8.33±0.28	-	7.00±0.50	-
	20	7.50±0.50	6.67±0.28	9.00±0.50	-	7.17±0.28	-
Chlorella vulgaris	5	9.83±0.28	7.33±0.58	7.17±0.76	-	-	-
TISTR 8261	10	13.50±0.86	9.17±0.28	8.33±0.76	-	-	-
	20	8.00±0.50	13.33±0.57	7.50±0.86	-	-	-
Chlorella sp.	5	13.00±1.32	7.17±0.28	9.00±0.50	-	6.50±0.00	-
TISTR 8445	10	10.50±0.50	7.67±0.28	9.67±0.28	-	7.17±0.08	-
	20	11.50±0.50	7.17±0.57	11.17±0.76	-	7.17±0.08	-
Amphicillin	0.5	43.50±1.32	31.40±2.02	16.89±1.39	13.70±0.81	13.72±0.77	10.20±1.04

หมายเหตุ - ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง
ค่าเฉลี่ย ± ค่า SD

จึงยอมให้สารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก [26, 29] เช่นเดียวกับสารสกัดของสาหร่ายในอันดับ Dictyotales, Nemalieles, Ceramiales และ Caulerpales มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกดีกว่าแกรมลบ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* MB 964 และ *Staphylococcus aureus* MB 5393 [19] และสารสกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria angustissima* และ *Carothrix parietina* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่า *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* [23] ขณะที่สารสกัดจาก *Desmococcus, Chlorella และ Scenedesmus* สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนั้นชนิดของสารละลายที่ใช้ในการสกัด กระบวนการการสกัดและวิธีวิเคราะห์ล้วนมีอิทธิพลต่อการทดลอง [6]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

ผลการศึกษาในข้อ 3.2 พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 10 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis, Bacillus cereus* และ *Pseudomonas fluorescens* ได้ดีกว่า *Chlorella* spp. สายพันธุ์อื่น ๆ จึงนำสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน 2 สูตร คืออาหารสูตร N-8 ดัดแปลงโดยเพิ่มแหล่งไนโตรเจนเป็นสองเท่าและอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงที่ลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง โดยพบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 จากทั้ง 2 สูตรอาหารสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ดีที่สุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง โดยสารสกัดจาก *Chlorella* sp. B2 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงที่ลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ดีที่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 29 มิลลิเมตร ส่วนในอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงที่เพิ่มแหล่งไนโตรเจนเป็นสองเท่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้ดีในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน แต่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเพียง 13.83 มิลลิเมตร หลังจากวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงพบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งลดลงตามลำดับ (ตารางที่ 3.3) จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดทั้ง 2 สูตรอาหารในวันที่ 6 ของการทดลองหลังจากนั้นความสามารถในการเจริญลดลงตามลำดับแสดงให้เห็นว่า *Chlorella* sp. B2 สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพภายในเซลล์ได้ในปริมาณหนึ่ง หลังจากนั้นก็ขับออกจากเซลล์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียคือ chlorellin สกัดได้จาก *Chlorella vulgaris* ประกอบด้วยกรดไขมันในกลุ่ม C 18 [30] จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของสภาพการเลี้ยงที่มีปริมาณธาตุอาหารขาดแคลน ทำให้สาหร่าย *Chlorella* sp. B2 สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้มากขึ้น โดยทั่วไปธาตุอาหารไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักและมีความจำเป็นต่อการเจริญของสาหร่าย การเลี้ยงสาหร่ายในสภาพที่ขาดแคลนแหล่ง

ตารางที่ 3.3. การยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ด้วยสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. B2 ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ

สูตรอาหาร	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12
N-8 + N 2 เท่า	8.83 ± 0.28	12.17 ± 0.57	13.83 ± 1.04	12.17 ± 0.28	8.50 ± 0.50	-
N-8 + ธาตุอาหารหลักครึ่งหนึ่ง	10.33 ± 0.57	12.33 ± 0.57	29.00 ± 1.00	19.83 ± 1.04	20.83 ± 0.76	13.67 ± 0.57

หมายเหตุ - ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

ค่าเฉลี่ย ± ค่า SD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร เช่นไนโตรเจนทำให้สาหร่ายอยู่ในสภาวะเครียด การแบ่งเซลล์และการสังเคราะห์แสงลดลง จึงทำให้การเจริญลดลง แต่เพิ่มการสร้างอาหารสะสมประเภทคาร์โบไฮเดรทและไขมัน [31] สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ [19]

4. สรุป

สารสกัดหยาบของ *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำลายไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดีกว่าสารสกัดจากเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp.B2 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สาหร่าย *Chlorella* sp.B2 ที่เลี้ยงอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงที่ลดปริมาณธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่าอาหารสูตร N-8 ดัดแปลงที่เพิ่มแหล่งไนโตรเจนเป็นสองเท่า

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

[4] Gouveia, L and Empis, J., 2003. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed : effect of storage conditions. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*., 4, 227 –233.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

[7] Chang, T., Ohta, S., Ikegami, N., Miyata, H., Kashimoto, T and Kondo, M., 1993. Antibiotic substances produced by a marine green alga, *Dunaliella primolecta*. *Bioresour Technol.,* 44,149 – 153.

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

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

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

[11] Skulberg, O.M., 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *J. Appl. Phycol*., 12 , 341–348.

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

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

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

[15] Bansemir, A., Blume, M., Schroder, S. and Lindequist, U., 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquacult.,* 252, 79–84.

[16] Tendencia, E.A. and dela Pena, M.R., 2003. Investigation on some components of the greenwater culture system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria. *Aquacult*., 218, 115-119.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

[20] Vonshak, A., 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae, pp. 117–145. In: Richmond, A. (ed.), Handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Boca Raton, FL.

[21] Choochote,W., Paiboonsin, K., Ruangpan, S. and Pharuang, A., 2010. Effects of urea and light intensity on the growth of *Chlorella* sp. Proceeding of The 8th international symposium on biocontrol and biotechnology October 4-6, Pattaya, Thailand, 127-133.

[22] Demirel, Z., Yilmaz-Koz, F.F., Karabay-Yavasoglu, U.N.,Ozdemir, G. and Sukatara, A., 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea. *J. Serb. Chem. Soc*., 74, 619–628.

[23] Jayshree, A., Jayashree, S. and Thangaraju, N., 2012. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Chlorella vulgaris* Benjerinck. *Int. J. Curr. Res. Rev*., 4, 33.

[24] Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., Garcia–Blairsy Reina, G., Senorans, F.J. and Ibanez, E., 2012. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *Food Sci. Technol*., 46, 245–253.

[25] Santoyo, S., Rodriguez–Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., Garcia–Blairsy Reina, G., Senorans, F.J. and Ibanez, E., 2009. Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Food Sci. Technol*., 42, 1213– 1218.

[26] Thillairajasckar, K.,Duraipandiyan, V., Perumal, P. and Ignasimuthu, S., 2009. Antimicrobial activity of *Trichodesmium erythraeum* (Ehr) (microalga) from South East coast of Tamil Nadu, India. *Int. J. Integr. Biol.,* 5,167–170

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[28] Bhagavathy, S., Sumathi, P. and Jancy Sherene Bell, I., 2011. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific J. Tropic. Biomed*., S1-S7.

[29] Ordog,V., Strik, W.A., Lenobel, R., Bancirova, M., Strnad, M., van Staden, J., Szigeti, J. and Nemeth, L., 2004. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *J. Appl. Phycol*., 16, 309–304.

[30] Fergola, P., Cerasuoloa, M., Polliob, A., Pintob, G. and DellaGrecac, M., 2007. Allelopathy and competition between *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*: Experiments and mathematical model. *Ecol. Model*., 208, 205–214.

[31] Gao, Y., Yang, M. and Wang, C., 2013. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. *Biores. Technol*., 147,484–491.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้