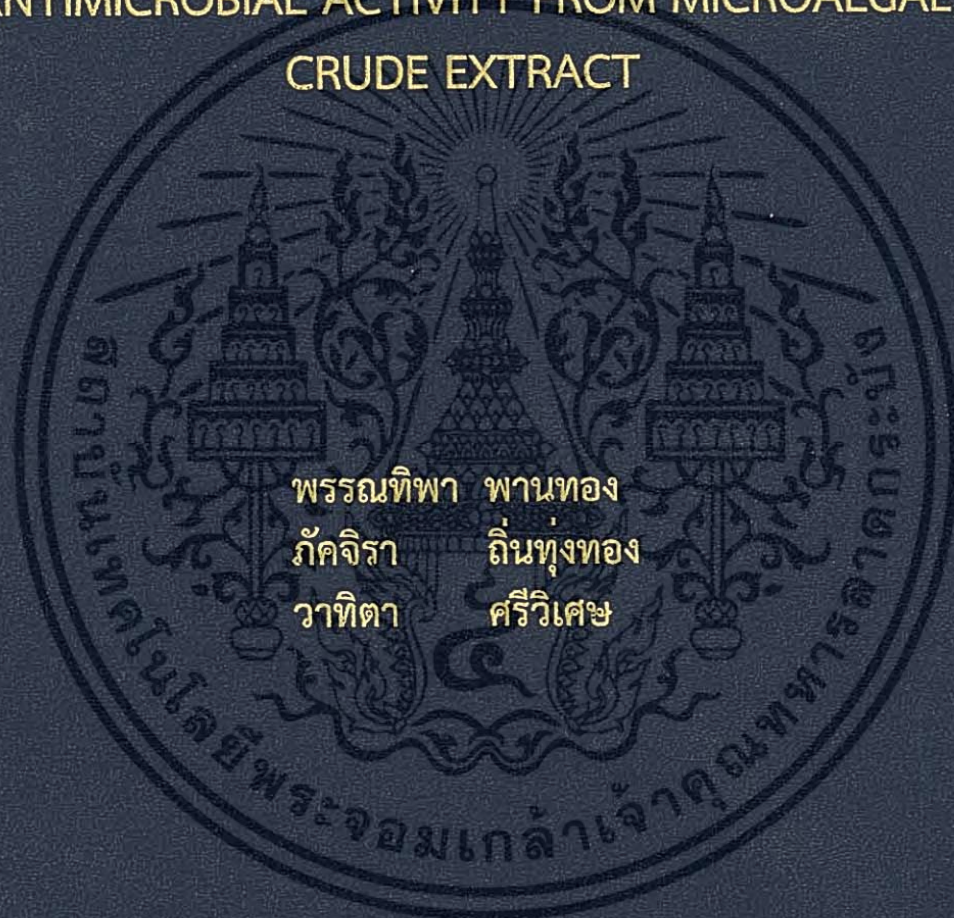


ศักยภาพการปรับตัวของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11
ต่อการคัดเลือกทางธรรมชาติและฤทธิ์ทางชีวภาพจาก
สารสกัดหยาบของสาหร่ายต่อเชื้อก่อโรค

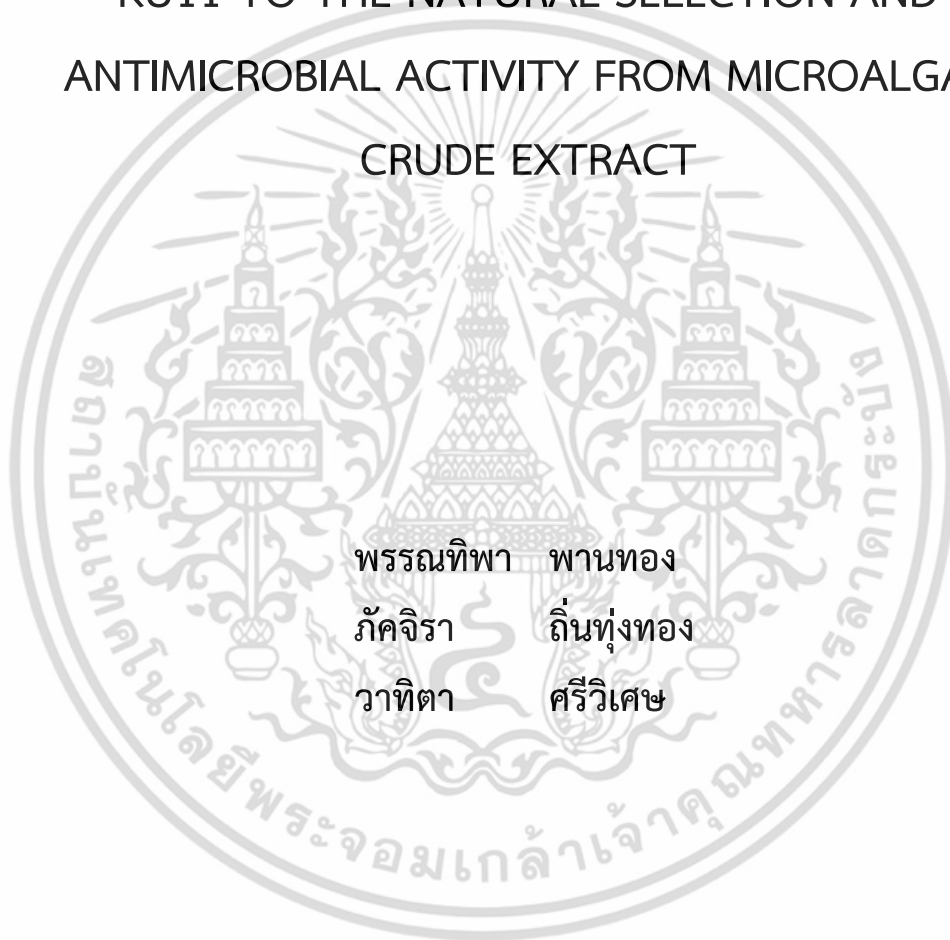
THE ADAPTIVE POTENTIAL OF *DUNALIELLA SALINA*
KU11 TO THE NATURAL SELECTION AND
ANTIMICROBIAL ACTIVITY FROM MICROALGAE
CRUDE EXTRACT



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

ศักยภาพการปรับตัวของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11
ต่อการคัดเลือกทางธรรมชาติและฤทธิ์ทางชีวภาพจาก
สารสกัดหยาบของสาหร่ายต่อเชื้อก่อโรค

THE ADAPTIVE POTENTIAL OF *DUNALIELLA SALINA*
KU11 TO THE NATURAL SELECTION AND
ANTIMICROBIAL ACTIVITY FROM MICROALGAE
CRUDE EXTRACT



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE ADAPTIVE POTENTIAL OF *DUNALIELLA SALINA*
KU11 TO THE NATURAL SELECTION AND
ANTIMICROBIAL ACTIVITY FROM MICROALGAE
CRUDE EXTRACT



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY PROGRAM)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

ศักยภาพการปรับตัวของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ต่อ
การคัดเลือกทางธรรมชาติและฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบ
ของสาหร่าย *Dunaliella* ต่อเชื้อก่อโรค
THE ADAPTIVE POTENTIAL OF *DUNALIELLA SALINA*
KU11 TO THE NATURAL SELECTION AND ANTIMICROBIAL
ACTIVITY FROM MICROALGAE CRUDE EXTRACT

ชื่อนักศึกษา

นางสาวพรรณทิพา พานทอง รหัสนักศึกษา 56051030
นางสาวภักจิรา ถิ่นทุ่งทอง รหัสนักศึกษา 56051042
นางสาววาทีตา ศรีวิเศษ รหัสนักศึกษา 56051069

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

ชีววิทยาประยุกต์


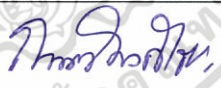
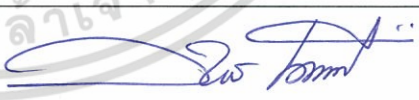
ปีการศึกษา

2559

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม ประธานกรรมการ	
ดร.กานต์ วงศ์าริยะ กรรมการ	
ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ศักยภาพการปรับตัวของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 ต่อการคัดเลือกทางธรรมชาติและฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบของสาหร่ายต่อเชื้อก่อโรค
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรรณทิพา พานทอง รหัสนักศึกษา 56051030 นางสาวภคจิรา ถิ่นทุ่งทอง รหัสนักศึกษา 56051042 นางสาววาทีดา ศรีวิเศษ รหัสนักศึกษา 56051069
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การศึกษาการปรับตัวของสาหร่าย *Dunaliella salina* สายพันธุ์ KU11 จากวิธีการคัดเลือกทางธรรมชาติ และทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *D. salina* KU11 และ *Chlorella* sp. ต่อเชื้อก่อโรคจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในการทดลองนี้ ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* KU11 ในอาหารเหลวสูตร Modified Ramaraj Medium จากนั้นจึงทำการถ่ายเชื้อทุกๆ วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ระยะ log) จนครบ 100 ครั้ง จากนั้นได้ทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่าง PD (Progenitor *Dunaliella*) และ ED (Evolved *Dunaliella*) ในเดือนตุลาคม (ED-62) และ กุมภาพันธ์ (ED-100) ผลการทดลองพบว่า ED-62 และ ED-100 มีระยะ log ที่ยาวนานขึ้นเป็นระยะเวลา 5 และ 7 วัน ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ PD ซึ่งมีระยะ log แค่วัน 4 วัน ซึ่งทั้ง ED และ PD มีอัตราการเจริญเติบโตที่เท่ากัน นอกจากนี้ ED-62 และ ED-100 ยังมีการเพิ่มปริมาณการสะสมจำนวนเซลล์ในช่วงระยะ log 1.1 และ 1.2 เท่า และในช่วงระยะ stationary 1.6 และ 2.6 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการวัดขนาดของเซลล์ และวัดปริมาณชีวมวลในช่วงระยะ log และ stationary ของ ED-100 พบว่าเซลล์ของ ED-100 ในช่วงระยะ stationary มีขนาดเล็กกว่า PD เป็น 0.7 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ชีวมวลของทั้ง ED-100 และ PD ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า วิธีการคัดเลือกทางธรรมชาติส่งผลทำให้ *D. salina* KU11 มีช่วงระยะ log ที่ยาวขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พร้อมทั้งมีปริมาณเซลล์สะสมที่เพิ่มมากขึ้นในระยะ log และ stationary ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการแบ่งเซลล์ ที่อาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรม

สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบของสาหร่าย *D. salina* และ *Chlorella* sp. ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion ต่อเชื้อทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ข้างต้น พบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *D. salina* ที่ปริมาณ 0.02 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ ในขณะที่สารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* ได้ โดยมีบริเวณยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 8 มิลลิเมตร จากผลการทดลองเบื้องต้นนี้สรุปได้ว่า สารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus mutans* ได้ ซึ่งผู้วิจัยวางแผนจะทำการวัดค่า MIC และ MBC ต่อไป เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีผลต่อเชื้อ *S. mutans*

คำสำคัญ: ดูนัลลีเอลล่า, คลอเรลล่า, การคัดเลือกทางธรรมชาติ, การเจริญเติบโต, เชื้อก่อโรค

Title	THE ADAPTIVE POTENTIAL OF <i>DUNALIELLA SALINA</i> KU11 TO THE NATURAL SELECTION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY FROM MICROALGAE CRUDE EXTRACT		
Students	Miss.Pantipa Pantong	Student ID	56051030
	Miss.Pakjira Thinhunghong	Student ID	56051042
	Miss.Vatita Sriwisat	Student ID	56051069
Degree	Bachelor of Science in Industrial Microbiology Program		
Department	Applied Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2016		
Advisor	Dr.Wipawee Dejtsakdi		

Abstract

The objective of this study is to explore an adaptive potential of *Dunaliella salina* KU11 using the natural selection and to test antimicrobial activity of *D. salina* KU11 and *Chlorella* sp. crude extract to 4 human pathogens that are *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. In the experiments, we grew *D. salina* KU11 in liquid Modified Ramaraj medium and used a regime of 4:100 ratios of 100-serial transfers. After that we compared PD (Progenitor *Dunaliella*, the 1st generation) and ED (Evolved *Dunaliella*) growth rate in October and February. This experiment showed that ED-62 and ED-100 expanded its log phase to 5 and 7 days, respectively whereas PD had 4 days of log phase and they showed the same growth rate. Moreover, cell accumulation of ED-62 and ED-100 was increased in log phase 1.1 and 1.2 fold and in stationary phase 1.6 and 2.6 fold, respectively compared with PD. Then, we also measured ED-100 cell size and biomass in log phase and stationary phase and found that ED-100 cells became significantly smaller in width approximately 0.7 fold compared with PD cells and both of their biomass were not significantly different. From this previous results, we concluded that the natural selection affected in *Dunaliella* log phase and cell accumulation both in log and

stationary phases and the change was presumably from regulation of cell division changed in genetically level

For antimicrobial activity test, *D. salina* and *Chlorella* sp. crude were extracted then tested with 4 human pathogens mentioned above by Agar Disc Diffusion. We found that 0.02 and 0.04 mg/ μ L of *Dunaliella* crude extract were not able to inhibit all pathogens. On the other hand, 1 mg of *Chlorella* crude extract was capability to inhibit *S. mutans* (an oral pathogen) indicated as the 8-millimeter of clear zone. This result suggested that *Chlorella* crude extract had an antimicrobial activity to the gram-positive *S. mutans*. We further planned to determine the minimum concentration of crude extract to inhibit *S. mutans* by using MIC or MBC.

Keywords : *Dunaliella salina*, *Chlorella* sp., Natural selection, Growth, Human pathogens



กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเรื่อง การศึกษาศักยภาพการปรับตัวของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ต่อการคัดเลือกทางธรรมชาติและฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดยับยั้งเชื้อก่อโรค นั้นสามารถสำเร็จ ลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือของผู้มีพระคุณหลายท่าน จึงใคร่ขอขอบพระคุณทุกท่านมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วิภาวี เดชตติศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่ได้ให้คำแนะนำ ความรู้ ด้านการเขียนงานวิจัย ข้อคิดเห็นต่างๆด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอนและประสบการณ์ต่างๆ อันเป็น ประโยชน์อย่างยิ่งในการทำโครงการ อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม ประธานกรรมการ และดร.กานต์ วงศาริยะ คณะกรรมการโครงการพิเศษ ที่มีความกรุณามอบเชื้อ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* ให้ในการทำงานวิจัย พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ความรู้และวิธีในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้โครงการพิเศษเล่มนี้ออกมาสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ประจำตีวิทยาศาสตร์หลังเก่า ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเบิกใช้อุปกรณ์ และคอยให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์และอุปกรณ์ วิทยาศาสตร์ต่างๆ

ทางคณะผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของผู้มีพระคุณทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือเป็น อย่างดี ทำให้โครงการพิเศษสำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ หากโครงการพิเศษเล่มนี้มีข้อผิดพลาดประการ ใดทางคณะผู้จัดทำจึงขออภัยมา ณ ที่นี้

พรรณทิพา พานทอง
ภคจิราภิน ทุ่งทอง
วาทีตา ศรีวิเศษ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สาหร่ายสกุล <i>Dunaliella</i>	3
2.1.1 อนุกรมวิธาน.....	3
2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	3
2.1.3 การแพร่กระจาย.....	4
2.1.4 กระบวนการสืบพันธุ์.....	5
2.1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายสกุล <i>Dunaliella</i>	5
2.1.6 ประโยชน์ของสาหร่ายสกุล <i>Dunaliella</i>	8
2.1.7 ข้อได้เปรียบของสาหร่ายสกุล <i>Dunaliella</i>	10
2.2 สาหร่ายสกุล <i>Chlorella</i>	10
2.2.1 อนุกรมวิธาน.....	11
2.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	11
2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายสกุล <i>Chlorella</i>	11
2.2.4 ประโยชน์ของสาหร่ายสกุล <i>Chlorella</i>	12
2.3 เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์.....	13
2.3.1 <i>Streptococcus mutans</i>	13
2.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.4 <i>Escherichia coli</i>	17
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
บทที่ 3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	20
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	20
3.3 อุปกรณ์แล้วเครื่องมือ	21
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน	22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	27
4.1 ศึกษาศักยภาพการปรับตัวของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 ต่อการคัดเลือกทางธรรมชาติ.....	27
4.1.1 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่าง PD และ ED.....	27
4.1.2 การวิเคราะห์ขนาดเซลล์ของ PD และ ED.....	29
4.1.3 การวิเคราะห์ชีวมวลของสาหร่าย PD และ ED	31
4.2 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 และ <i>Chlorella</i> sp. ต่อเชื้อก่อโรคด้วยวิธี Agar Disc diffusion.....	33
4.2.1 การทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดหยาบของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 ต่อเชื้อก่อโรค 2 สายพันธุ์ ได้แก่ <i>S. mutans</i> และ <i>P. aeruginosa</i>	33
4.2.2 ทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดหยาบของสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ต่อเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> และ <i>P. aeruginosa</i> ..	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	37
5.1 สรุปผลการวิจัย	37
5.2 ข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก ก	43
ภาคผนวก ข	46
ภาคผนวก ค	52
ภาคผนวก ง	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 ต่อเชื้อ <i>S. mutans</i> และ <i>P. aeruginosa</i>	33
4.2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย <i>Chlorella</i> sp. ต่อเชื้อ <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> และ <i>P. aeruginosa</i>	34
ก-1 อาหาร Modified Ramaraj Medium	43
ก-2 อาหาร Modified Ramaraj Medium สูตรอาหารแข็ง	44
ก-3 อาหาร Modified Johnson’s Medium	44
ก-4 อาหาร TAP Medium.....	45
ก-5 อาหาร Brain Heart Infusion (BHI) สูตรอาหารแข็ง	45
ค-1 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ ED-62 ในเดือนตุลาคม 2016	52
ค-2 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ ED-100 และ PD ในเดือนกุมภาพันธ์ 2017	53
ค-3 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ ED-100 และ PD ในอาหารสูตร Modified Johnson Medium เดือนมีนาคม 2017.....	54
ค-4 ขนาดเซลล์ด้านกว้างของ ED-100 และ PD ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium	55
ค-5 ขนาดเซลล์ด้านยาวของ ED-100 และ PD ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium	56
ค-6 ปริมาณชีวมวลของ ED-100 และ PD ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium	57
ง-1 แสดงจำนวนเซลล์ของการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 รุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) เดือนตุลาคมในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium.....	58
ง-2 แสดงจำนวนเซลล์ของการวัดเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 รุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) เดือนกุมภาพันธ์ ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium	60
ง-3 แสดงจำนวนเซลล์ของการวัดเจริญเติบโตของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 รุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) ในอาหารสูตร Modified Johnson’s Medium.....	62
ง-4 แสดงขนาดด้านกว้างของเซลล์วันที่ 4 ของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 PD และ ED ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium	64
ง-5 แสดงขนาดด้านยาวของเซลล์วันที่ 4 ของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 PD และ ED ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium.....	66
ง-6 แสดงขนาดด้านกว้างของเซลล์วันที่ 6 ของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 PD และรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง-7 แสดงขนาดด้านยาวของเซลล์วันที่ 6 ของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 PD และ รุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium.....	69
ง-8 แสดงขนาดด้านกว้างของเซลล์วันที่ 9 ของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 PD และ รุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium.....	71
ง-9 แสดงขนาดด้านยาวของเซลล์วันที่ 9 ของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 PD และ รุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium.....	73
ง-10 แสดงปริมาณชีวมวลในวันที่ 4 ของการวัดการเจริญของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 PD และ ED ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium	75
ง-11 แสดงปริมาณชีวมวลในวันที่ 6 ของการวัดการเจริญของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 PD และ ED ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium	76
ง-12 แสดงปริมาณชีวมวลในวันที่ 9 ของการวัดการเจริญของสาหร่าย <i>Dunaliella salina</i> KU11 PD และ ED ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium	77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 เซลล์ของสาหร่าย <i>D. salina</i> เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม.....	4
2.2 แสดงการเปลี่ยนรูปร่างของ <i>D. salina</i> (จากซ้ายไปขวา) ในที่ที่มีความเค็มสูง ซึ่งชักนำให้เกิดการสะสมของเบต้าแคโรทีน.....	4
2.3 โครงสร้างของเบต้าแคโรทีน.....	8
2.4 ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายสกุล <i>Chlorella</i>	11
2.5 ลักษณะของเชื้อ <i>S. mutans</i> เมื่อทำการย้อมสีแกรม โดยจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต	13
2.6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงแบคทีเรีย <i>Candida albicans</i> และ <i>S. mutans</i> ที่อยู่บนผิวฟันของมนุษย์.....	15
2.7 ลักษณะของ <i>S. aureus</i> เมื่อทำการย้อมสีแกรม โดยจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต	15
2.8 ลักษณะของ <i>P. aeruginosa</i> เมื่อทำการย้อมสีแกรม โดยติดสีแดงของซาฟรานิน	17
2.9 ลักษณะของ <i>E. coli</i> เมื่อทำการย้อมสีแกรม โดยติดสีแดงของซาฟรานิน	17
3.1 สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย	22
3.2 การวางแผนการทดลอง	23
3.3 การวัดขนาดเซลล์สาหร่าย <i>D.salina</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า.....	24
3.4 แสดงภาพเครื่องกรองสุญญากาศ และกระดากกรองที่มีเซลล์สาหร่าย.....	25
3.5 ภาพจานเพาะเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i>	25
4.1 แสดงกราฟการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่าง PD และ ED-62 ในเดือนตุลาคม	27
4.2 แสดงกราฟการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่าง PD และ ED-100 ในเดือนกุมภาพันธ์.....	28
4.3 แสดงกราฟการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่าง PD และ ED-100 ในอาหาร Modified Ramaraj Medium และ Modified Johnson's Medium.....	29
4.4 แสดงขนาดเซลล์ของ PD และ ED-100	29
4.5 แสดงกราฟเปรียบเทียบขนาดเซลล์ด้านกว้างของสาหร่าย PD และ ED-100 ในระยะ log (วันที่ 4) และระยะ stationary (วันที่ 6 และ 9) ในอาหาร Modified Ramaraj Medium	30
4.6 แสดงกราฟเปรียบเทียบขนาดเซลล์ด้านยาวของสาหร่าย PD และ ED-100 ในระยะ log (วันที่ 4) และระยะ stationary (วันที่ 6 และ 9) ในอาหาร Modified Ramaraj Medium	30

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณชีวมวลสาหร่าย PD และ ED-100 ในระยะ log (วันที่ 4) และระยะ stationary (วันที่ 6 และ 9) ในอาหาร Modified Ramaraj Medium.....	31
4.8 แสดงกราฟอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย <i>D. salina</i> KU11 ที่ถูกถ่ายเชื้อจนครบ 100 ครั้ง ในอาหาร Modified Ramaraj Medium.....	32
ข-1.1 แสดงลักษณะ Ocular Micrometer	46
ข-1.2 แสดงลักษณะ Stage Micrometer	46
ข-1.3 วิธีการใส่ Ocular Micrometer ลงใน Ocular lens.....	47
ข-1.4 ภาพขยายการเทียบสเกลของ Stage Micrometer กับ Ocular Micrometer.....	47
ข-2.1 แสดงลักษณะฮีมาไซโตมิเตอร์	48
ข-2.2 แสดงลักษณะตารางบนฮีมาไซโตมิเตอร์.....	48
ข-3.1 เครื่องกรองสุญญากาศ.....	49
ข-4.1 ภาพเซลล์แบคทีเรียที่ย้อมแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์	50
ค-1 กราฟมาตรฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย ED-62 และในเดือนตุลาคม 2016	52
ค-2 กราฟมาตรฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย ED-100 และในเดือนกุมภาพันธ์ 2016.....	53
ค-3 กราฟมาตรฐานแสดงการเจริญเติบโตของ ED-100 (Flask ที่ 1 และ 2) และ PD ในอาหารสูตร Modified Johnson's Medium ในเดือนมีนาคม 2017.....	54
ค-4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดเซลล์ด้านกว้างของ PD กับ ED-100 ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium	55
ค-5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดเซลล์ด้านยาวของ PD กับ ED-100 ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium	56
ค-6 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณชีวมวลของ PD กับ ED-100 ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium	57

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สาหร่าย *Dunaliella salina* เป็นสาหร่ายสีเขียว เซลล์เดี่ยวขนาดเล็ก ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) ซึ่งแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติทั้งในแหล่งน้ำเค็มและดินเค็มจัด จึงเรียกว่าสาหร่ายทนเค็ม สาหร่าย *D. salina* จัดเป็นแหล่งสะสมของสารทุติยภูมิ เช่น แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) เมื่อเซลล์ของสาหร่าย *D. salina* อยู่ในสภาวะที่มีความเข้มแสงสูง ความเค็มสูง และมีสภาวะขาดแคลนไนโตรเจน ในสภาวะดังกล่าวนี้เซลล์ของสาหร่ายจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวไปเป็นสีส้ม เนื่องจากสาหร่าย *D. salina* มีการผลิตสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) เช่น เบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) ปริมาณมากภายในเซลล์ (นิรันดร์, 2554) เบต้าแคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (pro vitamin A) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งถูกนำมาใช้ในทางด้านอุตสาหกรรมทางการแพทย์ และทางด้านเภสัช (Borowitzka and Siva, 2007) ดังนั้นสาหร่ายชนิดนี้จึงมีราคาสูงและเป็นที่ต้องการของตลาดมาก

เนื่องจากความสำคัญข้างต้นของสาหร่ายชนิดนี้ จึงได้ทำการศึกษาการปรับตัวของสาหร่าย *D. salina* โดยใช้การคัดเลือกทางธรรมชาติ ซึ่งคาดว่าจะส่งผลทำให้เกิดการปรับตัวการเจริญเติบโตของ *D. salina* ไปในทางที่ดีขึ้นดังเช่นการทดลองของ Perrineau *et al.* (2014) ที่ได้ศึกษาถึงการปรับตัวโดยการคัดเลือกทางธรรมชาติของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ที่ผ่านการถ่ายเป็นจำนวน 283 ครั้ง ส่งผลให้สาหร่าย *C. reinhardtii* ในรุ่นปรับปรุงพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* ในรุ่นแรกถึง 35 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยหัวข้อแรกนี้ได้ทำการศึกษาโดยนำสาหร่าย *D. salina* KU11 มาทำการถ่ายเชื้อจำนวนทั้งสิ้น 100 ครั้ง ในอาหาร Modified Ramaraj Medium โดยทำการวัดการเจริญเติบโต จากการนับจำนวนเซลล์ การวัดขนาดเซลล์ การวัดปริมาณชีวมวล และการวัดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ซึ่งจากงานวิจัยนี้ได้คาดหวังว่าสาหร่าย *D. salina* จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่าสาหร่ายรุ่นแรก

หัวข้อที่ 2 คือ ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบของสาหร่าย *D. salina* KU11 และ *Chlorella* sp. ต่อเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* โดยใช้วิธี Agar Disc Diffusion ซึ่งจากการทดลองคาดหวังว่าสารสกัดเบื้องต้นอาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับในการศึกษาต่อยอดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและชีวมวลของสาหร่าย *D. salina* KU11 โดยใช้วิธีการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (Natural Selection)
- 2) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบของสาหร่าย *D. salina* KU11 และ *Chlorella* sp. ต่อเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* โดยใช้วิธี Agar Disc Diffusion

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการเจริญเติบโตและศึกษาประสิทธิภาพการปรับตัวของสาหร่าย *D. salina* KU11 ภายใต้สภาวะความเข้มแสง 3010 ลักซ์ โดยถูกถ่ายเชื้อ (Sub-culture) เป็นประจำทุก 4 วัน และวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยใช้การนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้เครื่องฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) วัดขนาดเซลล์ และปริมาณชีวมวล อีกทั้งนำสารสกัดจากสาหร่าย *D. salina* KU11 และ *Chlorella* sp. ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบถึงประสิทธิภาพการปรับตัวของสาหร่าย *D. salina* KU11 โดยการวัดเจริญเติบโตโดยใช้การคัดเลือกโดยธรรมชาติ
- 2) ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบของสาหร่าย *D. salina* KU11 และ *Chlorella* sp. ต่อเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* โดยใช้ตัวทำละลาย Acetone ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายสกุล *Dunaliella*

2.1.1 อนุกรมวิธาน (Amotz, 2009)

Division Chlorophyta

Class Chlorophyceae

Order Volvocales

Family Polyblepharidaceae

Genus *Dunaliella*

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สาหร่ายสกุล *Dunaliella* เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวขนาดเล็กไม่มีผนังเซลล์แต่มีเพียงเยื่อเจลาตินที่เหนียวและยืดหยุ่นห่อหุ้มเซลล์สาหร่ายเอาไว้ มีแฟลกเจลลา 2 เส้นที่มีความยาวเท่ากัน มีลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกันไป เช่น รูปไข่ รูปทรงกระบอก รูปกระสวย และ รูปทรงกลม (นิรันดร์, 2554) ซึ่งเซลล์ของสาหร่ายอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ โดยจะเปลี่ยนเป็นรูปร่างค่อนข้างกลมเมื่อเจริญอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม และขนาดเซลล์ของสาหร่ายนั้นจะขึ้นอยู่กับสภาวะในการเจริญเติบโตและสภาวะความเข้มข้นแสง (Aharon, 2005) สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีนิวเคลียส 1 อันอยู่ที่ปลายด้านแหลมของตัวเซลล์และปกคลุมด้วยคลอโรพลาสต์รูปถ้วย จำนวน 1 อัน ขนาดใหญ่ประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตรเซลล์ (Duc *et al.*, 2013) มีไพรีนอยด์ที่ล้อมรอบด้วยเม็ดแป้งที่อยู่ด้านหน้าของคลอโรพลาสต์ สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีจุดตา (eyespot) ที่อยู่ติดกับไทลาคอยด์ซึ่งประกอบด้วยเม็ดไขมัน (Lipid globules) 1-2 แฉก และเมื่อเซลล์ของสาหร่ายมีอายุมากขึ้นจำนวนเม็ดไขมันจะเพิ่มขึ้นด้วย (Borowitzka and Siva, 2007) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และ 2.2

สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีการสะสมของคลอโรฟิลล์ เอ และ บี และมีการสะสมสารสีแคโรทีนอยด์ที่มีประโยชน์อย่างอื่นอีก เช่น แอลฟา และเบต้าแคโรทีน (Alpha and Beta-carotene) ไวโอแซนทีน (Violaxanthin) นีโอแซนทีน (Neoxanthin) ซีแซนทีน (Zeaxanthin) และลูทีน (Lutein)



รูปที่ 2.1 เซลล์ของสาหร่าย *D. salina* เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม
(ที่มา : www.2.bp.blogspot.com)



รูปที่ 2.2 แสดงการเปลี่ยนรูปร่างของ *D. salina* (จากซ้ายไปขวา) ในที่ที่มีความเค็มสูง ซึ่งชักนำให้เกิดการสะสมของเบต้าแคโรทีน (ที่มา : www.researchgate.net)

2.1.3 การแพร่กระจาย

สาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถดำรงชีวิตได้ในช่วงความเค็มที่กว้างตั้งแต่ 0.2-3.5% NaCl เมื่อสาหร่ายอยู่ในสภาวะที่มีความเค็มสูง เช่น ทะเล ทะเลสาบน้ำเค็ม หรือแหล่งน้ำที่มีความเค็มสูงกว่า 10 % NaCl จะสามารถสังเกตเห็นสาหร่ายได้ชัดเจนโดยสีของแหล่งน้ำจะกลายเป็นสีน้ำตาลแดง (นิรันดร์, 2554) สาหร่ายสกุล *Dunaliella* บางสายพันธุ์ เช่น *D. salina*, *D. parva* และ *D. pseudosalina* สามารถเจริญเติบโตในที่ที่มีความเค็มของเกลือสูงตั้งแต่ 5 ส่วนในพันส่วน (ppt) จนถึงระดับความเข้มข้นที่อิ่มตัวของเกลือสูงกว่า 300 ส่วนในพันส่วน โดยจะมีการสะสมเบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้น (Beta-carotene) เก็บไว้ในเม็ดไขมันในบริเวณช่องว่างของ ไทลาคอยด์ (Interthylakoid space) จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้สาหร่ายมีเซลล์สีแดง (Amotz *et al.*, 2009) และสาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถสะสมกลีเซอรอลได้สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เพื่อปรับความดันออสโมติกทั้งภายนอกและภายในเซลล์เพื่อรักษาสสมดุลของน้ำและแร่ธาตุ (Amotz, 2004)

2.1.4 กระบวนการสืบพันธุ์

สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีวงจรชีวิตที่ซับซ้อน โดยในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะเป็นการแบ่งตัวของเซลล์ปกติที่เคลื่อนที่ได้ (motile vegetative cells) อีกทั้งยังมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสามารถอธิบายได้ดังนี้

2.1.4.1 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นมักเกิดในสภาวะที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* โดยเกิดจากการรวมตัวของเซลล์เคลื่อนที่ได้ (motile vegetative cells) 2 เซลล์ที่มีรูปร่างและขนาดเหมือนกันมารวมกันได้เป็นไซโกต (zygote) ไซโกตที่ได้จะมีผนังเรียบและหนา และเมื่อเข้าสู่ระยะพักแล้ว ไซโกตจะแบ่งตัวแบบไมโอซิสได้ 32 เซลล์แล้วจะถูกปล่อยออกมาจากผนังเซลล์ของเซลล์แม่ (Aharon, 2005)

Martinez *et al.* (1995) ได้สังเกตผลจากที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำที่ 2% และ 5% จะมีกิจกรรมการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นของเกลือที่สูงถึง 30% นั้นกลับพบว่าทำให้มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศลดลง

2.1.4.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นเกิดขึ้นได้ 2 กรณี เกิดจากการแบ่งตัวตามยาวในสภาวะที่เซลล์มีการเคลื่อนที่ได้ (motile state) โดยแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Mitosis) ในเซลล์ปกติและอีกกรณี คือ สาหร่ายเกิดการสืบพันธุ์ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญมากๆ เช่น ในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร หรือสภาวะที่แห้งแล้ง สาหร่ายจะสร้างซิสต์ (Cyst) ออกมาหุ้มเซลล์ ซึ่งเซลล์เหล่านั้นจะถูกเรียกว่า อะพลาโนสปอร์ (aplanospores) โดยที่อะพลาโนสปอร์จะมีผนังเซลล์ที่หนา ขรุขระและมีสีออกแดงของคีโตแคโรทีน (Ketocarotene) และแคนทาแซนทีน (Canthaxanthin) ซึ่งอาจพบอยู่เป็นกลุ่มหรืออยู่เป็นเซลล์เดี่ยว แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ เซลล์จะถูกปล่อยออกเป็นอิสระ หรือแบ่งเซลล์ได้ 4-5 เซลล์ (นิรันดร์, 2554)

2.1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสกุล *Dunaliella*

2.1.5.1 คาร์บอน (Carbon) เนื่องจาก สาหร่ายสกุล *Dunaliella* เป็นสาหร่ายที่ต้องการพลังงานจากแสงมาใช้ในการสังเคราะห์แสง ซึ่งสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) เป็นแหล่งคาร์บอนอนินทรีย์ จากการศึกษาอัตราการสังเคราะห์แสงโดย Borowitzka *et al.* (2007) พบว่า การเพิ่มสารอนินทรีย์คาร์บอน เช่น การเพิ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยผสมลงในอากาศ หรือมีการเพิ่มโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) จะสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* เพิ่มมากขึ้น ซึ่งการเพิ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะทำให้พีเอชของน้ำลดลง และมีคาร์บอนไดออกไซด์ละลายในน้ำมากขึ้น

Amotz *et al.* (2004) ได้ทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ซึ่งใช้โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) ที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ จากการ

ทดลอง พบว่า สาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถเจริญในอาหารที่มีโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตสูงถึง 10 มิลลิโมลต่อลิตร (mmol L⁻¹)

2.1.5.2 ไนโตรเจน (Nitrogen) แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดของสาหร่าย *D. salina* คือ ไนเตรท (NO₃⁻) ซึ่งจัดเป็นรูปแบบของไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงในการนำมาใช้เป็นสารประกอบอินทรีย์ เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* ในสภาวะที่มีการจำกัดปริมาณของไนเตรทพบว่า สาหร่าย *D. salina* จะมีปริมาณเบต้าแคโรทีนสูงมาก ในขณะที่สาหร่ายมีปริมาณโปรตีนและคลอโรฟิลล์ต่ำ เมื่อเทียบกับเซลล์สาหร่าย *D. salina* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไนโตรเจนเพียงพอ (Amotz *et al.*, 2004) นอกจากนี้สาหร่ายสกุล *Dunaliella* ยังสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของไนไตรต์ (NO₂⁻) และแอมโมเนียมไอออน (NH₄⁺) ได้ แต่ในการใช้แอมโมเนียมไนเตรท (NH₄NO₃) หรือแอมโมเนียมคาร์บอเนต ((NH₄)₂CO₃) มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นและที่อุณหภูมิสูงนั้นจะเกิดสารพิษที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *D. salina* อย่างรวดเร็ว (Borowitzka *et al.*, 2007)

Dipak (2005) ได้ศึกษาถึงผลกระทบของการขาดไนโตรเจนต่อการเจริญของสาหร่าย *D. salina* ปริมาณเบต้าแคโรทีน และปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยในการศึกษาได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* ที่ความเข้มข้น 1200 ลักซ์ ทั้งอาหารที่มีการขาดไนเตรท และอาหารที่มี 0.75 มิลลิโมลลาร์ไนเตรท พบว่าในอาหารที่ขาดไนเตรทส่งผลให้ปริมาณเซลล์ของสาหร่ายลดน้อยลง โดยที่ปริมาณของเบต้าแคโรทีนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยเพิ่มจาก 1.65±0.13 พิโคกรัมต่อเซลล์ (pg/cell) เป็น 7.05±1.01 พิโคกรัมต่อเซลล์ (pg/cell)

2.1.5.3 ฟอสฟอรัส (Phosphorus) ฟอสฟอรัสในรูปของโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH₂PO₄) หรือโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH₂PO₄) ซึ่งเป็นรูปที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* โดยปริมาณที่เหมาะสมของฟอสฟอรัสในการเจริญเติบโตประมาณ 0.2 ไมโครกรัมต่อลิตร (µg L⁻¹) ของโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH₂PO₄) (Tafreshi and Shariati, 2009)

การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส จะส่งผลกระทบต่อการเจริญของสาหร่ายเป็นอย่างมากโดยจะมีผลมากกว่าการเกิดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว ซึ่งในการปรับอัตราส่วนของไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัสจะปรับให้เป็นไนโตรเจน 1 ส่วนต่อฟอสฟอรัส 50 ส่วน (นิรันดร์, 2554)

2.1.5.4 ความเป็นกรดต่าง (pH) สาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถทนต่อพีเอชได้ในช่วงกว้างตั้งแต่ 0 ถึง 11 แต่ค่าพีเอชที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 9 ถึง 11 (Tafreshi and Shariati, 2009) การสังเคราะห์แสงของสาหร่ายจะส่งผลให้ค่าพีเอชมีค่าสูงขึ้น ซึ่งสามารถทำให้ค่าพีเอชมีค่าต่ำลงได้โดยการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ร่วมกับไนเตรท (NO₃⁻) ทำให้เกิดการแตกตัวของไฮดรอกไซด์ไอออน (OH⁻) ส่งผลให้ค่าพีเอชของน้ำลดลง (Amotz *et al.*, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5.5 อุณหภูมิ (Temperature) สาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีความสามารถในการเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างตั้งแต่ -35 ถึง 45 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* อยู่ในช่วง 25 ถึง 35 องศาเซลเซียส หรือประมาณ 32 องศาเซลเซียส (Tafreshi and Shariati, 2009)

Tawfiq *et al.* (2009) ได้ทำการวิเคราะห์ถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* โดยได้เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ความเข้มข้น 10×10^3 ลักซ์ ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร Aquaculture Fisheries and Marine Sciences Department (AFMED) ซึ่งจากการศึกษาได้ใช้อุณหภูมิในช่วงต่างกัน ได้แก่ 20, 23, 26, 29 และ 32 องศาเซลเซียส พบว่าสาหร่าย *D. salina* เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสได้ดีที่สุด โดยได้มีจำนวนเซลล์สาหร่ายมากที่สุดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.90×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (cell/mL)

2.1.5.6 แสง (Light) แสงเป็นแหล่งพลังงานสำคัญสำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึม ในสาหร่าย *D. salina* การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 4.5 ถึง 10 เท่า (Borowitzka *et al.*, 2007) ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และ บี จะลดลงเมื่อความเข้มแสงมากจนถึงจุดอิ่มตัว (นิรันดร์, 2554)

Xu *et al.* (2016) ศึกษาถึงผลของการแปรผันระยะเวลาในการให้แสงและความเข้มแสงในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* สายพันธุ์ CCAP 19/30 ที่มีผลต่อจำนวนเซลล์ การสังเคราะห์แสง และการหายใจ ซึ่งพบว่าในระยะการให้แสงสาหร่ายมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น และจำนวนเซลล์สาหร่ายจะลดลงในช่วงเวลาที่ไม่ได้รับแสงและจะเกิดการผลิตกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มแสงมากกว่า 1000 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ($\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ส่งผลให้เซลล์ถูกทำลายด้วยแสง แต่เซลล์ยังคงรักษาระดับในการสังเคราะห์แสง การหายใจ และอัตราการเจริญเติบโตได้ในระดับสูง อีกทั้งปริมาณกลีเซอรอลภายในเซลล์ยังสูงขึ้นกว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในที่ที่มีความเข้มแสง 500 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ($\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

2.1.5.7 ความเค็ม (Salinity) สาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถเจริญได้ในแหล่งที่มีความเค็มช่วงกว้าง ซึ่งจัดได้ว่าเป็น Halotolerant Species โดยสาหร่ายที่ให้เบต้าแคโรทีนสามารถเจริญได้ดีที่ความเค็ม 0.5 – 4.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ (29.25 – 234 พีพีที) และที่ความเค็มสูงถึง 4.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์สาหร่ายจะมีการสะสมเบต้าแคโรทีนสูงกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งเซลล์ปกติมีการสะสมเพียง 0.3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้งเท่านั้น (Aharon, 2005) ระดับความเค็มที่เหมาะสมต่อการสะสมเบต้าแคโรทีนของสาหร่าย *D. salina* อยู่ที่ความเค็ม 4.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ หรือ 24 % NaCl (Amotz *et al.*, 2009) แต่ในที่ที่ความเค็มสูงนั้น ธาตุอาหารและก๊าซต่างๆ เช่น CO_2 และ O_2 จะละลายน้ำได้น้อยลง ทำให้ปริมาณของสาหร่าย *Dunaliella salina* มีปริมาณจำกัด เนื่องจากการขาดแคลน CO_2 และ O_2 (นิรันดร์, 2554)

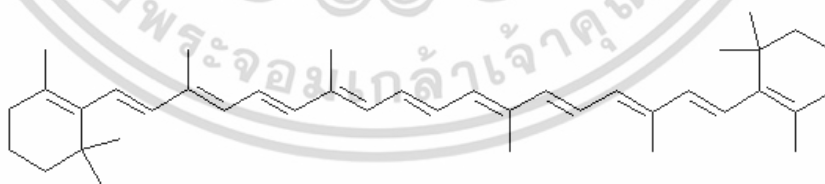
Nader (2011) ได้ศึกษาถึงผลกระทบของปัจจัยสิ่งแวดล้อมในการเจริญของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* จากทะเลเดดซี (Dead sea) ซึ่งมีการศึกษาถึงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไรต์ที่ 1.25%, 2.5%, 5%, 10%, 20% และ 30% พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อปริมาณคลอโรฟิลล์และการผลิตเบต้าแคโรทีนของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีความเข้มข้นที่ 2.5% NaCl ซึ่งมีปริมาณคลอโรฟิลล์และการผลิตเบต้าแคโรทีนของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* ได้ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) และ 4.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) ตามลำดับ และจากการทดลองสาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถทนต่อความเค็มสูงถึง 20% NaCl

2.1.6 ประโยชน์ของสาหร่ายสกุล *Dunaliella*

2.1.6.1 การสะสมเบต้าแคโรทีน เนื่องจากสาหร่ายสกุล *Dunaliella* สามารถพบได้ตามแหล่งน้ำที่มีความเค็มสูงมาก เช่น ทะเลสาบเดดซี (Dead sea) ประเทศอิสราเอล ทะเลสาบน้ำเค็มเกรท (Great salt lake) ประเทศสหรัฐอเมริกา และทะเลสาบสีชมพู (Pink lake) ในประเทศออสเตรเลีย ซึ่งสาหร่ายสกุล *Dunaliella* มีความสามารถในการสะสมเบต้าแคโรทีนได้มากกว่าร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้ง โดยเซลล์สาหร่ายจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีส้ม เนื่องจากการสะสมเบต้าแคโรทีนเมื่ออยู่ในสภาวะจำกัด เช่น ความเค็มสูง ความเข้มแสงสูง และปริมาณไนโตรเจนจำกัด (Borowitzka *et al.*, 2007)

เบต้าแคโรทีนเป็นสารสีแคโรทีนอยด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของแคโรทีน มีสีส้ม แดง ไม่ละลายทั้งในน้ำและแอลกอฮอล์ แต่ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม (Amotz *et al.*, 2009) โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยโมเลกุลของไฮโดรคาร์บอนที่ต่อกันเป็นสายยาวด้วยโมเลกุลของไอโซพรีนหลายๆหน่วยต่อกัน (รูปที่ 2.3) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่อิ่มตัว มีองค์ประกอบเป็นคาร์บอน 40 อะตอม และไฮโดรเจน 56 อะตอม มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{40}H_{56}$ มีน้ำหนักโมเลกุล 536.9 มีจุดหลอมเหลว เท่ากับ 184 องศาเซลเซียส และมีพันธะคู่ 11 พันธะ เบต้าแคโรทีนส่วนใหญ่ประกอบด้วยสเตอริโอไอโซเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ all-trans betacarotene และ 9-cis betacarotene (Nader *et al.*, 2011) ดังแสดงใน รูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเบต้าแคโรทีน

(ที่มา : www.cdn-3.sci-toys.com)

ปกติเมื่อเบต้าแคโรทีนอยู่ในรูปผลึกจะมีสีม่วงแดง แต่เมื่ออยู่ในสารละลายพวกน้ำมันจะให้สีต่างๆกันตั้งแต่สีเหลืองอ่อนถึงสีส้ม ขณะที่ละลายอยู่ในสารละลายพวกน้ำจะให้สีต่างๆไป คือ สีส้มสำหรับคุณสมบัติของ all-trans betacarotene คือละลายได้ยากในน้ำมันและมีแนวโน้มจะตกเป็นผลึก ในขณะที่ 9-cis betacarotene จะละลายได้ดีในสารจำพวกน้ำ (Hydrophilic solvents) และตกผลึกได้ยาก เบต้าแคโรทีนที่ใช้ในอุตสาหกรรม ประมาณ 90 % มาจากการสังเคราะห์จากธรรมชาติ โดยอยู่ในรูปแบบของ all-trans betacarotene ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์ได้พบเฉพาะในธรรมชาติเท่านั้น อัตราส่วนของสเตอริโอไอโซเมอร์ทั้งสองชนิดขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดกลืนแสงระหว่างที่เซลล์กำลังแบ่งเซลล์และสายพันธุ์ของสาหร่าย ถ้าความเข้มของแสงสูงสาหร่ายที่มีเบต้าแคโรทีนในเซลล์ต่ำจะมีอัตราส่วนของ 9-cis betacarotene ต่อ all-trans betacarotene ต่ำ เนื่องจาก 9-cis betacarotene ถูกเปลี่ยนไปเป็น all-trans betacarotene และสาหร่าย *D. salina* ที่มีเบต้าแคโรทีนในเซลล์สูง เมื่อได้รับแสงที่มีความเข้มแสงสูง จะส่งผลให้ปริมาณเบต้าแคโรทีนลดลงอย่างช้าๆ และสเตอริโอไอโซเมอร์ชนิด 9-cis betacarotene เท่านั้นที่จะถูกทำลายโดยแสง (Amotz *et al.*, 2004)

บทบาทของเบต้าแคโรทีน คือ เป็นสารที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) โดยในกระบวนการสังเคราะห์แสงเบต้าแคโรทีนเป็นรงควัตถุที่ทำหน้าที่เป็นตัวถ่ายทอดพลังงานรังสีที่ได้รับแล้วส่งต่อไปยังคลอโรฟิลล์ เอ และยังป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วยรังสีจากแสง (Photoprotection) โดยเป็นตัวป้องกันคลอโรฟิลล์ไม่ให้ถูกทำลาย ทำให้แคโรทีนอยด์ไปสะสมที่รอบๆคลอโรพลาสต์เป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดเสถียรภาพในการสังเคราะห์แสงของคลอโรฟิลล์มากขึ้น (นิรันดร์, 2554) นอกจากนี้เบต้าแคโรทีนยังทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมคาร์บอนจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่าย ซึ่งสาหร่ายจะนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานหากสารอาหารที่ใช้ในการดำรงชีวิตไม่เพียงพอ (Amotz *et al.*, 2009) และเบต้าแคโรทีนยังเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant) หรือสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถลดอนุมูลอิสระในร่างกายและจับออกซิเจนอะตอมเดี่ยวที่มีมักจะพบมากในสภาพที่มีมลภาวะทางอากาศ (นิรันดร์, 2554)

จากคุณสมบัตินี้จึงทำให้เบต้าแคโรทีนถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมไปถึงนำไปใช้ทางด้านโภชนาการ เช่น นำมาผลิตอาหารเสริมสุขภาพป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่างๆได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคระบบภูมิคุ้มกันทำงานผิดปกติได้ (นิรันดร์, 2554) เนื่องจากเบต้าแคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (Provitamin A) โดยเบต้าแคโรทีน 1 โมเลกุล สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ถึง 2 โมเลกุล ผ่านการทำงานของเอนไซม์ที่บริเวณของลำไส้เล็ก (อรชุน, 2539)

ในทางการแพทย์ มีการใช้เบต้าแคโรทีนในการรักษาผู้ป่วยโรคอิริโทรพอยอติก โพรโตพอร์ฟิเรีย (Erythropoietic protoporphyria, EPP) และโรคแพ้แสงอื่นๆ นอกจากนี้แล้วยังใช้เพื่อลดอาการจากการแพ้ยาที่เกิดขึ้นบริเวณผิวหนัง (Phototoxic drugs) โดยอาการการใช้ยาจะเริ่มเกิดหลังจากที่เข้ายาและมีการสัมผัสกับแสง (Bayerl, 2008) และเนื่องจากเบต้าแคโรทีนมีคุณสมบัติในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ใดๆ ไม่่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นตัวต้านอนุมูลอิสระจึงช่วยลดอนุมูลอิสระที่เป็นตัวทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ ในทางการแพทย์นั้นพบว่า เบต้าแคโรทีนสามารถใช้ในการผลิตยาต้านมะเร็งได้จึงนำเอาเบต้าแคโรทีนมาใช้ในการป้องกันการเกิดมะเร็งบางชนิด (Amotz *et al.*, 2009)

ทางด้านอุตสาหกรรม สีที่ได้จากเบต้าแคโรทีนจะมีสีเหลืองถึงส้ม โดยนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้กับอาหารจำพวกไขมัน เช่น ใช้ทำมาร์การีน เป็นส่วนผสมในขนมอบ เนื่องจากมีคุณภาพและคงตัวดี ไม่เป็นพิษระคายเคืองต่อการละลายในไขมัน (Nader *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังได้นำเบต้าแคโรทีนผสมลงในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มสีของสัตว์น้ำ เช่น ปลาแซลมอน ใช้ผสมลงในอาหารไก่เพื่อเพิ่มสีในไข่แดง และอาหารวัวเพื่อปรับปรุงสุขภาพและระบบสืบพันธุ์ของวัว (Borowitzka *et al.*, 2007) รวมถึงการนำเบต้าแคโรทีนเป็นสีเคลือบแคปซูลหรือใช้เป็นสีผสมในเครื่องสำอางค์ โดยเป็นส่วนผสมในครีมกันแดด (อรชุน, 2539)

2.1.6.2 การสะสมไขมัน สำหรับสาหร่าย *D. salina* เป็นสาหร่ายที่สามารถสร้างกรดไขมัน (Fatty acid) ที่จัดเป็นองค์ประกอบทางด้านชีวเคมีภายในเซลล์ที่ความสามารถในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Amotz *et al.*, 2009) หลายงานวิจัยได้มีการศึกษาถึงปริมาณน้ำมันและปริมาณกรดไขมันของสาหร่าย *D. salina* ซึ่ง Lamers *et al.* (2010) ได้ทำการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันในสาหร่าย *D. salina* พบว่ามีกรดไขมัน 5 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบหลักถึง 95 % ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด ได้แก่ Palmitic acid (C16:0) Hexadecatetraenoic acid (C16:4) Oleic acid (C18:1) Linoleic acid (C18:2) และ alpha-linolenic acid (C18:3)

Herrero *et al.* (2006) ได้ทำการวิเคราะห์สารสกัดจากสาหร่าย *D. salina* ที่ใช้ เอทานอล และเฮกเซนในการสกัด โดยสารสกัดที่ได้นี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันในสารสกัด พบว่ามีกรดไขมันชนิด palmitic alpha-linolenic และ oleic acids ที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดจากสาหร่าย

2.1.7 ข้อได้เปรียบของสาหร่ายสกุล *Dunaliella* (Amotz *et al.*, 2009)

2.1.7.1 สาหร่ายสกุล *Dunaliella* บางสายพันธุ์ เช่น *D. salina* และ *D. bardawil* มีความสามารถในการสะสมเบต้าแคโรทีนได้ในปริมาณสูงถึง 5-15% ของน้ำหนักแห้ง

2.1.7.2 สาหร่ายสกุล *Dunaliella* เจริญได้ในน้ำที่มีความเค็มสูง ทำให้สามารถลดโอกาสการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆได้

2.1.7.3 นอกเหนือจากเบต้าแคโรทีนแล้ว สาหร่ายสกุล *Dunaliella* ยังสามารถผลิตกลีเซอรอล 20-40% ของน้ำหนักแห้ง และโปรตีน 30-40% น้ำหนักแห้ง ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อได้

2.2 สาหร่ายสกุล *Chlorella*

2.2.1 อนุกรมวิธาน (Steenblock, 1987)

Division Chlorophyta

Class Trebouxiophyceae

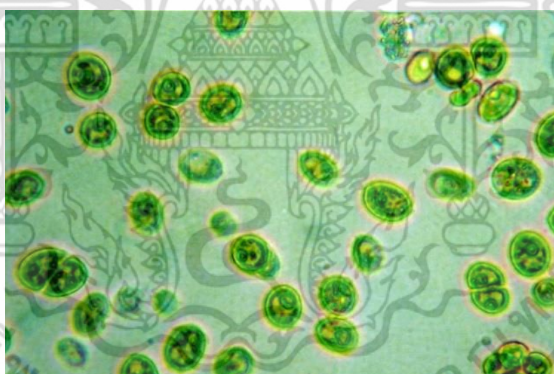
Order Chlorellales

Family Chlorellaceae

Genus *Chlorella*

2.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สาหร่ายสกุล *Chlorella* เป็นสาหร่ายสีเขียว มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวที่มีขนาดเล็ก ประมาณ 1-10 ไมโครเมตร ลักษณะของเซลล์มีหลายรูปแบบ เช่น ทรงกลม รูปไข่ และรูปรี เซลล์มีหลายขนาดในสภาพแวดล้อมเดียวกัน สาหร่ายสกุล *Chlorella* มีคลอโรพลาสต์รูปร่างคล้ายถ้วยหรือระฆัง หรือเป็นแบบแถบข้าง อาจมีหรือไม่มีเม็ดแป้ง ผนังเซลล์หนาและแข็งมี 3 ชั้น ผนังชั้นกลางจะหนาที่สุดประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ผนังเซลล์ชั้นนอกเป็นสารประกอบโพลีเมอร์ ซึ่งทำหน้าที่ในการจับกับโลหะหนักหรือสารพิษในร่างกาย ส่วนชั้นในเป็นชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (Kumar and Singh, 1971) ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายสกุล *Chlorella*

(ที่มา: www.healthyposts.files.wordpress.com)

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่ายสกุล *Chlorella*

2.2.3.1 คาร์บอน (Carbon) สาหร่ายสามารถใช้คาร์บอนได้ในรูปของสารอนินทรีย์ โดยทั่วไปจะพบคาร์บอนในรูปของ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) กรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) และคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดต่างของน้ำ ซึ่งคาร์บอนถือเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Richmond, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.2 ไนโตรเจน (Nitrogen) ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งเป็นตัวที่มีบทบาทเกี่ยวกับน้ำหนักแห้งของสาหร่าย โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึม ภายในเซลล์สาหร่ายมีปริมาณไนโตรเจนคิดเป็นร้อยละ 1-10 ของน้ำหนักแห้ง โดยสาหร่ายสกุล *Chlorella* มีอัตราการเจริญเติบโตสูงโดยใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปของไนเตรทหรือแอมโมเนีย สำหรับไนเตรทที่มีความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Richmond, 1986)

ธิดา และนิเวศน (2517) ได้ทดลองสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยพบว่า สารไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายสกุล *Chlorella* คือ โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ที่ปริมาณความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.3.3 ฟอสฟอรัส (Phosphorus) ฟอสฟอรัสในรูปของ H_2PO_4^- และ HPO_4^{2-} ซึ่งเป็นรูปที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของสาหร่ายสกุล *Chlorella* ซึ่งสาหร่ายสกุล *Chlorella* ต้องการฟอสฟอรัสร้อยละ 2-3 ของน้ำหนักแห้งเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (Richmond, 1986)

2.2.3.4 แสง (Light) แสงเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดการสังเคราะห์แสง ความเข้มของแสงเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การเจริญของสาหร่ายเพิ่มขึ้นด้วย โดยจะเพิ่มการสังเคราะห์แสงและเร่งการทำงานของเซลล์ แต่ความเข้มแสงที่สูงเกินไปจะมีผลยับยั้งการหายใจของเซลล์ สาหร่ายสกุล *Chlorella* ต้องการความเข้มแสงประมาณ 4500 ลักซ์ โดยให้ได้รับแสงช่วงสว่างต่อช่วงมืด เท่ากับ 16:8 (Bhumiratana *et al.*, 1974)

2.2.3.5 อุณหภูมิ (Temperature) สาหร่ายสกุล *Chlorella* เจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูงที่อุณหภูมิประมาณ 35-36 องศาเซลเซียส การเจริญเติบโตจะลดลงในอุณหภูมิที่สูงกว่า 41 องศาเซลเซียส (Richmond, 1986)

2.2.3.6 ความเป็นกรดต่าง (pH) สาหร่ายสกุล *Chlorella* สามารถเจริญได้ในค่าความเป็นกรดต่างในช่วงกว้าง โดยค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เท่ากับ 6 (Richmond, 1986)

2.2.4 ประโยชน์ของสาหร่ายสกุล *Chlorella*

เนื่องจากสาหร่ายสกุล *Chlorella* มีปริมาณโปรตีนในเซลล์สูงปริมาณร้อยละ 55-60 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิดในปริมาณค่อนข้างมาก เช่น ทรีโอนีน ไลซีน และลูซีน เป็นต้น รวมทั้งกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกายซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปกรดไขมันไม่อิ่มตัว สาหร่ายสกุล *Chlorella* ยังประกอบด้วยวิตามิน และเกลือแร่ที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น วิตามินเอ บี1 บี2 บี6 บี12 และไนอะซิน นอกจากนี้ยังมีปริมาณเบต้าแคโรทีนประมาณ 180 มิลลิกรัมต่อเซลล์แห้ง 100 กรัม ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดวิตามินเอ และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย (วิสัย, 2534)

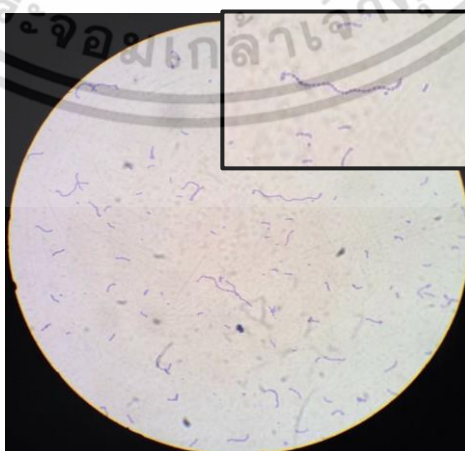
สาหร่ายสกุล *Chlorella* ยังนิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์และอุตสาหกรรม ซึ่งภายในเซลล์ของ *Chlorella* จะมีสารเร่งการเจริญที่เรียกว่า *Chlorella Growth Factor* (CGF) ที่ประกอบด้วย กรดอะมิโน เปปไทด์ โปรตีน วิตามิน น้ำตาล และกรดนิวคลีอิก ซึ่งมีรายงานว่า CGF มี

คุณสมบัติในการต่อต้านโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู และระงับการเจริญของเนื้องอกในหนูได้ ปริมาณร้อยละ 52.9 ต่อมาได้มีการนำ CFG มาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางโดยใช้สำหรับการชะลอความชรา (Steenblock, 1987) นอกจากนี้ CFG มีผลต่อระบบย่อยอาหารโดยจะเข้าไปช่วยทำให้เชื้อแลคโตบาซิลลัสในลำไส้เพิ่มจำนวนมากขึ้น และมีบทบาทในการล้างพิษในลำไส้ได้ อีกทั้งสำหรับสาหร่ายสกุล *Chlorella* สามารถรักษาแผลในกระเพาะ โดย CFG จะกระตุ้นเกิดการสมานแผลสำหรับสาหร่ายสกุล *Chlorella* ยังมีความสามารถในการลดระดับคอเรสเตอรอลในเลือด ตับ และน้ำเหลือง เพิ่มวิตามินบี12 และธาตุเหล็กให้กับผู้ป่วยโรคมะเร็งและยังช่วยป้องกัน และต้านสารพิษ โดยพบว่าหนูทดลองกิน *Chlorella* sp. วันละ 8 กรัม สามารถขับแคดเมียมออกจากร่างกายได้มากกว่าหนูซึ่งไม่กิน *Chlorella* sp. เปรียบเทียบ (Vonshak, 1990)

2.3 เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์

2.3.1 *Streptococcus mutans*

S. mutans เป็นแบคทีเรียก่อโรคฟันผุ และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ขนาด 0.5-0.75 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นสายสั้นๆหรือสายยาวปานกลาง ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวหรืออาหารแข็งที่มีสภาวะเป็นกรด เซลล์จะมีรูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ขนาด 1.5-3.0 ไมโครเมตร แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) (Jinthana *et al.*, 2017) ถ้าเลี้ยงบนอาหาร Blood agar (BA) และบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 2 วัน โคโลนีของ *S. mutans* จะมีสีขาวหรือสีเทา รูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน (Irregular) บางครั้งโคโลนีจะค่อนข้างแข็งและเกาะติดบนอาหาร *S. mutans* ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ หรือมี N_2 และ CO_2 หรือ CO_2 อย่างเดียว แต่จะเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยอุณหภูมิเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจะอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส (Sneath *et al.*, 1986) สามารถย่อยสลายสารประเภทคาร์โบไฮเดรต และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก (lactic) (Jennifer *et al.*, 2014)

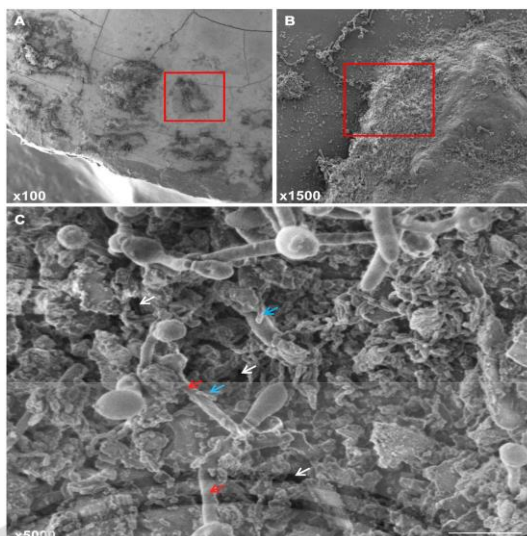


รูปที่ 2.5 ลักษณะของเชื้อ *S. mutans* เมื่อทำการย้อมสีแกรม โดยจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเล็ต เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย *S. mutans* เป็นแบคทีเรียก่อโรคโดยมีความสามารถในการยึดเกาะกับผิวฟัน อีกทั้งยังทนต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรง และสามารถทนกรดได้ดี ซึ่งเป็นปัจจัยหลักของการสร้างไบโอฟิล์มภายในช่องปาก ซึ่งมีโครงสร้างเป็น Multi-dimensional complex ที่เป็นตัวการที่ทำให้เกิดฟันผุ ในขั้นตอนแรกการสร้างไบโอฟิล์ม *S. mutans* จะสร้าง Acquired Salivary Pellicle (ซึ่งเป็นชั้นบางๆ ส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำลาย โปรตีน และ เอนไซม์ของแบคทีเรีย เช่น Glycosyltransferases (Gtfs) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถยึดกับช่องปากได้โดยตรง นอกจากนี้เอนไซม์ Gtfs แล้วยังสามารถสังเคราะห์กลูแคนบนเยื่อหุ้มผิวฟัน ตัวการหลักๆในการสร้างไบโอฟิล์ม ของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดฟันผุ คือเชื้อ *S. mutans* และน้ำตาลซูโครส (Salli *et al.*, 2016) โดยจะย่อยสลายสารจำพวกน้ำตาล กรดอะมิโน และกรดไขมัน ให้เป็นกรดอะซิติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ ก๊าซไฮโดรเจน ซูโครสที่ถูกแปรสภาพภายในช่องปากโดยแบคทีเรีย *S. mutans* จะทำให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด ซึ่งนำไปสู่การเสียหายของผิวฟัน (Salli *et al.*, 2016)

S. mutans เป็นแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดย *S. mutans* จะเกาะและฝังลงไปกับจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น ดังแสดงในรูปที่ 2.6 โดยจะขยายและแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆ ในเยื่อช่องปากโดยจะทำปฏิกิริยาร่วมกันของยีนส์และการส่งสัญญาณระหว่างโมเลกุล ในขั้นตอนสุดท้ายไบโอฟิล์มจะเปลี่ยนความสมดุลของความสมดุลภายในช่องปาก เป็นผลให้เชื้อแบคทีเรียเข้าถึงเนื้อเยื่อส่วนลึกและทำให้บริเวณเหงือกยุบตัว ทำให้ ผิวฟันและเนื้อฟัน เกิดการผุ เป็นโพรงฟันขึ้น *S. mutans* จะสร้างไบโอฟิล์มขึ้นมาป้องกันเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ฟันผุมากขึ้นเรื่อยๆ (Khalid *et al.*, 2013) การผุของฟันนั้น อาจทำให้เกิดโรคอื่นๆภายในช่องปากได้ อย่างเช่น โรคฟันผุ โรคเหงือกอักเสบ การติดเชื้อที่รากฟัน เกิดเข้าฟันอักเสบได้ โดยบ่อยครั้งจะเกิดการติดเชื้อที่มีต่อระบบทั่วไปของร่างกายร่วมด้วย เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคหลอดเลือดในสมอง การคลอดก่อนกำหนด โรคเบาหวาน โรคโลหิตจาง โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ และโรคปอดบวม ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีการติดเชื้อเฉพาะที่ (Theory of focal infection) ด้วยแนวคิดที่ว่า โรคในช่องปากอาจเป็นสาเหตุต่างๆที่เกี่ยวข้องกับโรคอื่นๆในร่างกาย (Alberta, 2017)

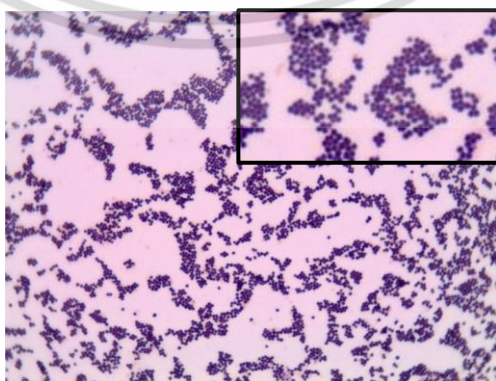
2.3.1.2 การยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. mutans* การกำจัดไบโอฟิล์มในช่องปากเป็นส่วนสำคัญในการป้องกันฟันผุ (Lee *et al.*, 2015) โดยสาร chlorhexidine ที่เป็นส่วนประกอบในน้ำยาบ้วนปาก จัดเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. mutans* ได้ แต่ได้มีงานวิจัยหลายงานที่เกี่ยวกับผลข้างเคียงของสารนี้ ทำให้มีการวิจัยและค้นคว้าวัสดุต่างๆ เพื่อมาป้องกันการเกิดคราบไบโอฟิล์มบนผิวฟัน เมื่อไม่นานมานี้มีหลายงานวิจัยได้ใช้สารสกัดจากสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Rezvani *et al.*, 2017)



รูปที่ 2.6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงแบคทีเรีย *Candida albicans* และ *S. mutans* ที่อยู่บนผิวฟันของมนุษย์ โดยมีการยึดบนผิวฟันและมีการสร้างไบโอฟิล์มระหว่าง hyphae ของเชื้อ *C. albicans* (ลูกศรสีแดง) และ *S. mutans* (ลูกศรสีน้ำเงิน) อีกทั้งยังมีการฝังตัวของเซลล์จุลินทรีย์ที่บริเวณ matrix (ลูกศรสีขาว) (ที่มา : Khalid *et al*, 2013)

2.3.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียรูปร่างทรงกลม และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.8-1.0 ไมโครเมตร ลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ มักพบเป็นคู่เกาะกันด้วยสายสั้นๆ เป็นกิ่ง หรือมีลักษณะคล้ายพวงองุ่น ซึ่ง *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ (Non-spore forming) และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เอง (Non-motile) สามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป เช่น Nutrient agar (NA) และ Tryptic soy agar (TSA) เป็นต้น (Loffler *et al.*, 2014) ดังแสดงในรูปที่ 2.7



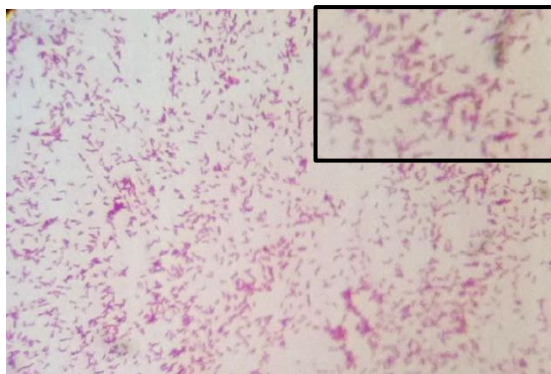
รูปที่ 2.7 ลักษณะของ *S. aureus* เมื่อทำการย้อมสีแกรม โดยจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ไปยังประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติทางเคมีของ *S. aureus* คือ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยและเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนในระดับปกติ มีการสร้างเอนไซม์คาตาเลส (Catalase) ทำให้เชื่อมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่อาจเกิดจากกระบวนการทางระบบคุ้มกันของมนุษย์และมีเอนไซม์โคแอกกูเลส (Coagulase) ทำให้พลาสมาเกิดการแข็งตัวและขัดขวางการเดินทางของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านเข้าสู่บริเวณที่เกิดการติดเชื้อ ในการเจริญของ *S. aureus* ยังสามารถย่อยน้ำตาลกลูโคส แลคโตส ซูโครส แมนโนส และกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ส่วนแหล่งของไนโตรเจน *S. aureus* จะได้รับจากกรดอะมิโนและยังต้องการวิตามินบี 1 (Thiamine) และกรดนิโคทีน (Nicotine) ในการเจริญ (Breed *et al.*, 1957)

S. aureus จะมีชีวิตอยู่ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหาร หรืออาหารบรรจุเสร็จ ซึ่งสำหรับมนุษย์และสัตว์จะพบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ เส้นผมและผิวหนัง อาจพบเชื้อชนิดนี้ถึง 60-80% ในผู้ที่สัมผัสโดยตรงกับผู้ป่วยหรือผู้ที่สัมผัสกับสภาพแวดล้อมในโรงพยาบาล ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียที่เป็นต้นเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ เนื่องด้วยแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการสร้างสารพิษ Enterotoxins ชนิดต่างๆ ได้แก่ A, B, C, D, E และ G1 อีกทั้งยังเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นบริเวณผิวหนัง โพรงจุมก หนองในบาดแผล ละเยื่อเมือกต่างๆ อาการโดยทั่วไปที่พบ คือ หลังจากรับประทานอาหารปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 2-4 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้อง และอ่อนเพลีย ในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการอื่นแทรกซ้อน เช่น ภาวะขาดน้ำอย่างรุนแรง ปวดหัว เป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะๆ รวมทั้งอาจมีการเต้นของชีพจรผิดปกติ ซึ่งโดยทั่วไปอาการจะดีขึ้นภายใน 2-3 วัน (Loffler *et al.*, 2014)

2.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต สามารถเคลื่อนที่ได้โดยแฟลเจลลาชนิดโมโนโทรคัส และเป็น Normal flora ในลำไส้คน *P. aeruginosa* สามารถก่อโรคได้ในคน รวมทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และแมลง *P. aeruginosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาสจะมีการติดเชื้อมักพบในผู้ป่วยที่มีความบกพร่องทางภูมิคุ้มกัน เช่น ผู้ป่วย AIDS ผู้ป่วยมะเร็ง ผู้ที่มีแผลไฟไหม้ ผู้ป่วยโรค Cystic fibrosis (CF) หรือผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาล (Lyczak *et al.*, 2000) ดังแสดงในรูปที่ 2.8

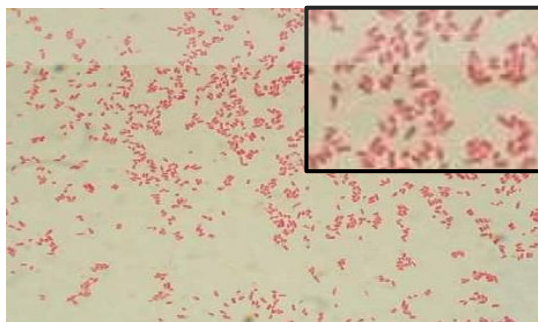


รูปที่ 2.8 ลักษณะของ *P. aeruginosa* เมื่อทำการย้อมสีแกรม โดยติดสีแดงของซาฟรานิน

การติดเชื้อ *P. aeruginosa* มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการทำให้เกิดโรค ได้แก่ ความสามารถในการเกาะติดยึดกับเยื่อบุผิว การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ การสร้างโปรตีนทำลายเนื้อเยื่อ นอกจากนี้เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้เกือบทุกอวัยวะ เช่น ผิวหนัง แก้วตา หู ทางเดินหายใจ กระดูก เป็นต้น ซึ่งเชื้อ *P. aeruginosa* มักเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด โดยอาจเกิดจากการดื้อยาโดยธรรมชาติจนถึงการได้รับยีนดื้อยาผ่านทาง Genetic mobile element ซึ่งมีพลาสมิด (Plasmid) Conjugative transposons และ intergron เป็นโครงสร้างที่สำคัญในการช่วยเคลื่อนย้ายและแพร่กระจายของยีนดื้อยา (Denis *et al*, 2005)

2.3.4 *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์เป็นรูปแท่ง โดยจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่ สามารถสร้างแคปซูลและสารพิษได้ ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลมๆ โค้งนูน มีขอบชัดเจน เคลื่อนที่โดยใช้แฟลเจลลา สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งจะเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *E. coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์ ซึ่งพบเชื้อนี้ได้ในอุจจาระ จึงนิยมใช้เชื้อ *E. coli* เป็นดัชนีบ่งชี้การปนเปื้อนอุจจาระ นอกจากนี้พบว่า *E. coli* เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในแผลภายนอกได้ (ภัทรชัย, 2549) ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ลักษณะของ *E. coli* เมื่อทำการย้อมสีแกรม โดยติดสีแดงของซาฟรานิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ไปยังกระดานข่าววิชาการใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.4.1 Sathasivam และ Juntawong (2013) ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่สามารถเพิ่มปริมาณเบตาแคโรทีนในสาหร่าย *D. salina* สายพันธุ์ KU11 โดยเลี้ยงในอาหาร Johnson's medium และ Ramaraj medium ที่ความเข้มข้น NaCl ต่างๆ (0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0) พบว่า *D. salina* สายพันธุ์ KU11 สามารถเจริญได้ดีในอาหาร Ramaraj medium ที่ความเข้มข้น NaCl 1.5 M และในอาหาร Johnson's medium สามารถผลิตเบตาแคโรทีนได้ 74.19 ± 0.27 g/cell (52.9 $\mu\text{g/mL}$) สูงกว่าในอาหาร Ramaraj medium ที่สามารถผลิตเบตาแคโรทีนได้ 62.23 ± 0.14 g/cell (51.8 $\mu\text{g/mL}$) ที่ความเข้มข้น NaCl 2.5 M

2.4.2 Wu *et al.* (2016) ได้ศึกษาผลของแสง อุณหภูมิ และสารอาหารต่อการเจริญและการสะสมสารสีของสาหร่าย *D. salina* 3 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินเค็ม พบว่าความเข้มแสงและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย คือ 135.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ และที่ 22 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่สภาวะมีความเข้มแสง 245.6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส จะชักนำให้มีการผลิตเบตาแคโรทีนสูงถึง 117.99 mg L^{-1} และความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ยูเรีย ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) และโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) สำหรับการเจริญของสาหร่ายมีค่าเท่ากับ 0.5 g L^{-1} , 0.36 g L^{-1} และ 1.5 g L^{-1} ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ยูเรีย ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) และโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) 0 g L^{-1} , 0.12 g L^{-1} และ 1.5 g L^{-1} ตามลำดับ จะมีการสะสมปริมาณเบตาแคโรทีนได้มากที่สุด

2.4.3 Farouk *et al.* (2016) ได้ศึกษาสารสกัดจากสาหร่าย *D. salina* ที่มีฤทธิ์ต้านต่อโรคเบาหวานในสาร Streptozotocin (STZ) ซึ่งในการศึกษานี้ได้ฉีด STZ 45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในหนูที่เป็นโรคเบาหวาน จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *D. salina* มีแนวโน้มที่จะสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดสูง อีกทั้งยังป้องกันโรคและชะลอการเกิดโรคเบาหวานได้

2.4.4 Pane *et al.* (2015) ได้ศึกษาถึงสารสกัดจากสาหร่ายที่มีฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรียในหูชั้นนอกได้ ในการทดลองนี้จะแยกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากผู้ป่วยด้วย Ear swabs และจะใช้เมทานอลในการสกัดสารจากสาหร่ายน้ำเค็ม *D. salina* และสาหร่ายน้ำจืด *Pseudokirchneriella subcapitata* สาหร่ายทั้งสองชนิดนี้จะถูกนำมาทดสอบกับเชื้อก่อโรคที่หูชั้นนอก ซึ่งมี *Staphylococcus* spp. (28.8%) และ *P. aeruginosa* (24.8%) เป็นเชื้อโรคหลัก จากการทดสอบนี้พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus* spp., *P. Aeruginosa*, *E. coli* และ *Klebsiella* spp. ได้ โดยมีค่า MIC (ความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้) ในช่วง 1.4×10^9 ถึง 2.2×10^{10} cell/mL

2.4.5 Fadoul และ Juntawong ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสาหร่าย 4 ชนิด ได้แก่ *Chara* sp., *Oscillatoria* sp., *Chlorella* sp. และ *D. salina* ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในมนุษย์ เช่น *E. coli*, *S. aureus*, *Psuedomonas* sp., *Bacillus* sp. และ *Candida albicans*

โดยในการสกัดสารมีการแปรผันตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ เมทานอล คลอโรฟอร์ม และไดเอธิลอีเทอร์ และใช้วิธีในการวิเคราะห์ คือ Agar Disc diffusion ผลการจากศึกษาพบว่าตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพที่สุดได้แก่ เมทานอล โดยบันทึกบริเวณใส (Clear Zone) จากการใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย และสารสกัดจาก *Chara* sp. โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายสามารถต่อต้านเชื้อ *S. aureus* ซึ่งวัดบริเวณใสได้ 13 มิลลิเมตร สารสกัดจาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายสามารถต่อต้านเชื้อ *S. aureus* ซึ่งวัดบริเวณใสได้ 12 มิลลิเมตร ตามด้วยสารสกัดจาก *D. salina* โดยใช้ไดเอธิลอีเทอร์เป็นตัวทำละลาย สามารถต่อต้านเชื้อ *E. coli* ซึ่งวัดบริเวณใสได้ 11 มิลลิเมตร และสารสกัดจาก *Chlorella* sp. โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายสามารถต่อต้านเชื้อ *Pseudomonas* sp. ซึ่งวัดบริเวณใสได้ 11 มิลลิเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

1. สาหร่าย *Dunaliella salina* สายพันธุ์ KU11 และ *Chlorella* sp. ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นิรันดร์ จันทวงศ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. เชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC25175 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.กานต์ วงศาริยะ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3. เชื้อทดสอบ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC28753 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.จิตติ ท๋าไว ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย *D. salina* สูตร Modified Ramaraj Medium

Micronutrient (Solution A)	1	mL/L
Concentrated mix (Solution B)	100	mL/L
Sodium Chloride (NaCl) 1.5 M	87.66	g/L
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	50	mL/L

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย *D. salina* สูตร Modified Johnson's Medium

Sodium Chloride (NaCl) 1.5 M	87.66	g/L
Magnesium Chloride Hexahydrate (MgCl ₂ .6H ₂ O)	1.5	g/L
Magnesium Sulfate Heptahydrate (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.5	g/L
Potassium Chloride (KCl)	0.2	g/L
Calcium Chloride dihydrate (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0.2	g/L
Potassium Nitrate (KNO ₃)	1.0	g/L
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	0.043	g/L
Potassium Dihydrogen Phosphate (KH ₂ PO ₄)	0.035	g/L
Fe-Solution	10	mL/L
Trace-Element Solution	10	mL/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย *Chlorella sp.* สูตร TAP Medium

Tris Base 1 M	20	mL
Phosphate Buffer II	1.0	mL
Solution A	10	mL
Hutner's Trace Element	1.0	mL
Glacial Acetic Acid	1.0	mL

*ปรับให้มีค่า pH เท่ากับ 7.0

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* สูตร Brain Heart Infusion

อาหาร Brain Heart Infusion สำเร็จรูป	37	g/L
Agar	15	g/L

5. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*

Nutrient both สำเร็จรูป	13	g/L
Agar	1.5	g/L

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Bright Field Microscope)
2. เครื่องชั่งน้ำหนักสี่ตำแหน่ง (Analytical Balance)
3. ตู้อบความร้อน (Hot Air Oven)
4. เครื่องเขย่า (Shaker)
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
6. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge)
8. ตู้เย็นเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย (Refrigerator)
9. สเตจไมโครมิเตอร์ และออกคิวลาร์ไมโครมิเตอร์ (Stage and Ocular Micrometer)
10. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)
11. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 100 มิลลิลิตร
12. กระบอกตวง (Graduated Cylinder) ขนาด 100 มิลลิลิตร
13. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร
14. ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 1000 มิลลิลิตร
15. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
16. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Eppendorf)
17. หลอดเซนตริฟิวก์ (Falcon Tube)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18. ออโตปิเปต (Autopipette)
19. เข็มฉีดยา (Needle)
20. หัวเข็มฉีดยา (Loop)
21. จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)
22. ครอบจานเพาะเชื้อ (Petri Dish Box)
23. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test Tube Rack)
24. หลอดทดลองฝาเกลียว (Test Tube With Screw Cap)
25. เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum Pump)
26. กระดาษกรอง (Filter Papers)

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 รุ่นแรก (PD) และรุ่นที่ถูกถ่ายเชื้อ (ED)

1. สภาพในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* KU11

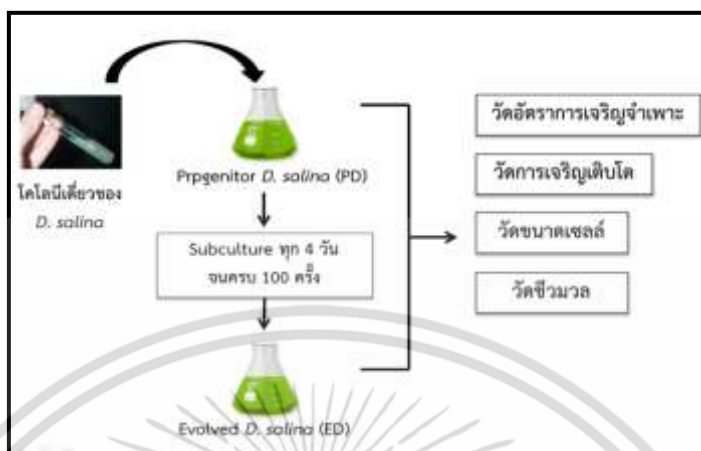
เพาะเลี้ยงสาหร่าย *D. salina* KU11 ในอาหารเหลวสูตร Modified Ramaraj Medium (ภาคผนวก ก-1) บนเครื่องเขย่า (Orbital shaker) ที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที (rpm) ภายใต้ความเข้มแสง 3010 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 สภาพการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แผนการทดลองการศึกษาการเจริญเติบโตของ *D. salina* KU11 ด้วยการคัดเลือกทางธรรมชาติ ดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 การวางแผนการทดลอง

ในการทดลองเบื้องต้นของยูลักซ์และแสงทิพย์ (2558) ได้ทำการถ่ายเชื้อสำหรับ Progenitor *Dunaliella* (PD) ลงอาหารใหม่ทุก 4 วัน เป็นจำนวน 41 ครั้ง (ED-41) ซึ่งการทดลองนี้ได้นำสำหรับ *D. salina* KU11 ที่ผ่านการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสูตร Modified Ramaraj Medium เป็นจำนวน 41 ครั้งมาใช้เป็นหัวเชื้อ ซึ่งนำมาถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 4 วัน จนครบ 100 ครั้ง โดยทำการเจือจางตัวอย่างสำหรับปริมาตร 4 มิลลิลิตรลงในอาหาร Modified Ramaraj Medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (ระยะ log) ซึ่งจากการศึกษาการเจริญเติบโตของสำหรับ *D. salina* KU11 ได้ทำการวัดการเจริญเติบโต, การวัดขนาดเซลล์, การวัดปริมาณชีวมวล และการวัดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ในเดือนตุลาคม และกุมภาพันธ์

2.1 การวัดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

ในแต่ละครั้งของการถ่ายเชื้อสำหรับ *D. Salina* KU11 ลงในอาหารใหม่ ได้ทำการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) เพื่อหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดังสูตร

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N}{N_0}\right)}{t}$$

โดย μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

N = ความหนาแน่นของเซลล์สำหรับวันสุดท้าย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

N_0 = ความหนาแน่นของเซลล์สำหรับวันแรก (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

t = เวลา (วัน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย PD กับ ED

นำสาหร่าย *D. salina* KU11 PD และ ED มาเพาะเลี้ยงโดยให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 5.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงตามข้อที่ 1

3.1 การนับจำนวนเซลล์

นำสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่ทำการเพาะเลี้ยงสำหรับการวัดการเจริญเติบโตมาทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ทุก 24 ชั่วโมง โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) (ภาคผนวก ข-2) บันทึกผลการทดลองและสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์สะสมกับวันที่ทำการเพาะเลี้ยง

3.2 การวัดขนาดเซลล์

โดยใช้ Ocular และ Stage Micrometer (ภาคผนวก ข-1) ในการวัดขนาดเซลล์ ซึ่งได้ทำการสุ่มตัวอย่างสาหร่าย *D. salina* KU11 จากการเพาะเลี้ยงในข้อที่ 3 เป็นจำนวน 30 เซลล์ โดยนำมาวัดขนาดเซลล์ทั้งด้านกว้าง และด้านยาว ในวันที่ 4 (ระยะ log) วันที่ 6 และ 9 (ระยะ stationary) ดังแสดงใน รูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 การวัดขนาดเซลล์สาหร่าย *D.salina* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

3.3 การวัดปริมาณชีวมวล

เลี้ยงสาหร่าย *D.salina* KU11 ตามข้อที่ 3 จากนั้นเก็บตัวอย่างสาหร่ายในวันที่ 4 (ระยะ log) วันที่ 6 และ 9 (ระยะ stationary) มาปริมาณ 10 มิลลิลิตร และนำไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum Pump) (ภาคผนวก ข-3) จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีเซลล์สาหร่ายไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3.4 ซึ่งคำนวณหาปริมาณชีวมวลโดย กระดาษกรองหลังอบที่มีเซลล์สาหร่าย - กระดาษกรองก่อนอบ = ปริมาณชีวมวล (กรัม)



รูปที่ 3.4 แสดงภาพเครื่องกรองสูญญากาศ (ซ้าย) และกระดาดากรองที่มีเซลล์สาหร่าย (ขวา)
(ที่มา ด้านซ้าย : www.es.aliexpress.com)

การทดลองที่ 2 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบของสาหร่าย *D. Salina* KU11 และ *Chlorella* sp. ต่อเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. mutans* บนอาหารแข็ง Brain Heart Infusion ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในสภาวะปลอดแก๊สออกซิเจน และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3.7

เพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* บนอาหารแข็ง Trypticase soy Agar ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิห้อง บ่มเป็นเวลา 24 -48 ชั่วโมง



รูปที่ 3.5 ภาพจานเพาะเชื้อ *Streptococcus mutans*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธีการสกัดสารของสาหร่าย

นำสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่เลี้ยงไว้เป็นเวลา 4 วัน และ *Chlorella* sp. ที่เลี้ยงไว้เป็นเวลา 10 วัน ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge) ที่ 5000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 3 นาที เอาส่วนเซลล์สาหร่าย (pellet) ที่ได้ไปอบที่ตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำเซลล์สาหร่ายที่แห้งมาบดด้วยโกร่ง แล้วนำไปด้วยตัวทำละลายอะซิโตน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งใช้อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อสารสกัด เป็น 25 มิลลิลิตร ต่อสาหร่ายแห้ง 5 กรัม จากนั้นนำไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ และนำไปแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัดด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary epeporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนำสารสกัดที่ได้ไปแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมเชื้อทดสอบ 4 สายพันธุ์

3.1 เตรียมเชื้อ *S. mutans* ด้วยวิธี broth microdilution method

นำเชื้อ *S. mutans* ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง Brain Heart Infusion เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง มาถ่ายลงในอาหารเหลว ปริมาตรอาหาร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจากอาหารเหลว 5 มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงอาหาร 10 มิลลิลิตร และนำเชื้อมาวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.08-0.13 (หากค่ามีการเปลี่ยนแปลง เติมน้ำตาลลงไปเพื่อปรับค่าให้คงที่) แล้วนำมาป้าย (Swab) ด้วยไม้พันสำลี ให้ทั่วอาหารแข็ง Brain Heart Infusion ที่เตรียมไว้ให้ทั่วจำนวน 3 เพลท (*Chlorella* sp., *D. salina* KU11 และ Control)

3.2 เตรียมเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa*

นำเชื้อมาถ่ายลงอาหาร Trypticase soy Agar บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาเจือจางกับนอมอลซาลิน (normal saline) และปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.5 Mcfarland เพื่อนำมาทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดสาหร่าย

4. ทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อเชื้อก่อโรค *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี Agar Disc diffusion

นำไม้พันสำลีมาจุ่มเชื้อทดสอบ และมาป้ายลงบนอาหารแข็งเป็น 3 แถว หยดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนดิสก์ ที่จุ่มไว้ประมาณ 30 วินาที แล้วนำดิสก์ไปวางบนอาหารแข็ง Brain Heart Infusion สำหรับ *S. mutans* และอาหาร Trypticase soy Agar สำหรับ *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* แล้วนำ *S. mutans* ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และนำ *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเก็บผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย

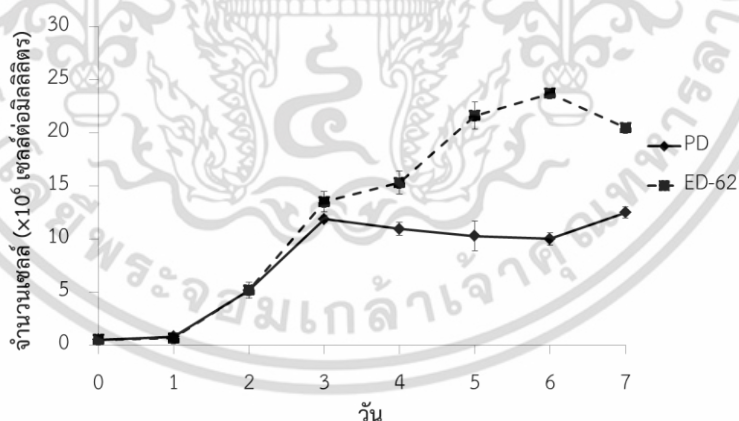
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ศักยภาพการปรับตัวของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ต่อการคัดเลือกทางธรรมชาติ

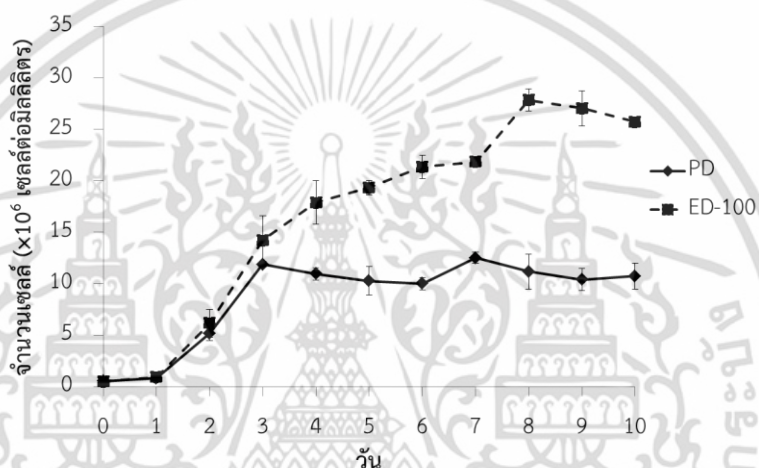
4.1.1 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่าง PD และ ED

จากการทดลองของยิวลักษณ์ และ แสงทิพย์ (2558) ได้ทำการถ่ายเชื้อจาก PD (Progenitor *Dunaliella*) จนถึงครั้งที่ 41 (ED-41) ในการทดลองนี้จึงได้ทำการถ่ายเชื้อจาก ED-41 จนถึง ED-100 และทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่าง PD และ ED ในเดือนตุลาคม (ED-62) และเดือนกุมภาพันธ์ (ED-100) ผลการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่าง PD และ ED-62 ในเดือนตุลาคม พบว่า ประชากรสาหร่าย PD และ ED-62 มีการเข้าสู่ระยะ log ในวันที่ 1 เช่นเดียวกัน ซึ่งต่อมาประชากร PD ได้เข้าสู่ระยะ stationary ในวันที่ 3 ในขณะที่ประชากร ED-62 ยังสามารถมีการเจริญเติบโตในช่วงระยะ log จนกระทั่งถึงวันที่ 6 ของการวัดการเจริญเติบโต จนกระทั่งเข้าสู่ระยะ stationary ด้วยจำนวนเซลล์ที่สูงถึง 2.4×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรโดยประมาณ (รูปที่ 4.1) จากผลการทดลองในเดือนตุลาคม สรุปได้ว่า ประชากร ED-62 มีการเปลี่ยนแปลงโดยมีการยืดของระยะ log ออกไปเป็นเวลา 3 วัน เมื่อเทียบกับ PD และมีปริมาณเซลล์สะสมในระยะ stationary ที่มากกว่า PD ถึง 1.6 เท่า



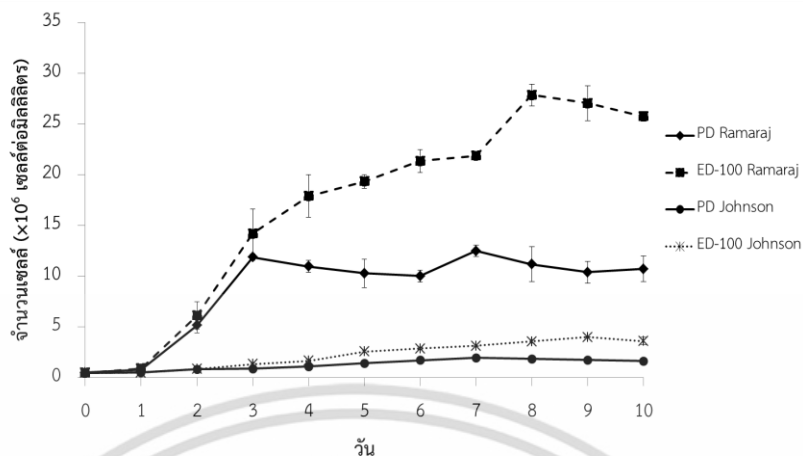
รูปที่ 4.1 แสดงกราฟการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่าง PD และ ED-62 ในเดือนตุลาคม

ผลจากการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตครั้งที่ 2 ในเดือนกุมภาพันธ์ พบว่า ประชากรสาหร่าย PD และ ED-100 เข้าสู่ระยะ log ในวันที่ 1 เช่นเดียวกัน ซึ่งประชากร PD ได้เข้าสู่ระยะ stationary ในวันที่ 3 ในขณะที่ประชากร ED-100 ยังสามารถมีการเจริญเติบโตในระยะ log เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงวันที่ 8 ของการวัดการเจริญเติบโต จนกระทั่งเข้าสู่ระยะ stationary ด้วยจำนวนเซลล์ที่สูงถึง 2.8×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรโดยประมาณ (รูปที่ 4.2) จากผลการทดลองในเดือนกุมภาพันธ์สรุปได้ว่า ประชากร ED-100 มีการเปลี่ยนแปลงโดยมีการยืดระยะ log ออกไปเป็นเวลา 5 วัน เมื่อเทียบกับ PD และมีปริมาณเซลล์สะสมในระยะ stationary ที่มากกว่า PD ถึง 2.6 เท่า



รูปที่ 4.2 แสดงกราฟการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่าง PD และ ED-100 ในเดือนกุมภาพันธ์

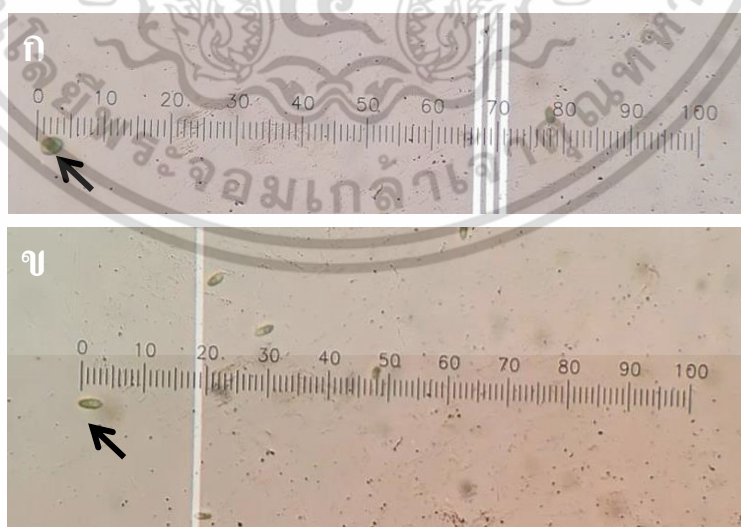
นอกจากนี้ ได้ทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่าง PD และ ED-100 ในอาหาร Modified Johnson's Medium เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองข้างต้น พบว่า ED-100 ยังคงมีการเพิ่มจำนวนเซลล์สะสมที่มากกว่า PD เป็น 2.2 เท่า สอดคล้องกับผลการทดลองในอาหาร Modified Ramaraj Medium (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 แสดงกราฟการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่าง PD และ ED-100 ใน อาหาร Modified Ramaraj Medium และ Modified Johnson's Medium

4.1.2 การวิเคราะห์ขนาดเซลล์ของ PD และ ED

จากการทดลองที่ 4.1.1 พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์สะสมในระยะ log และ stationary การทดลองนี้จึงทำการวัดขนาดของเซลล์เพื่อดูว่าขนาดเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ โดยทำการสุ่มตัวอย่างเซลล์จำนวน 30 เซลล์ ในช่วงระยะ log (วันที่ 4) และระยะ stationary (วันที่ 6 และ 9) มาวัดหาขนาดด้านกว้างและด้านยาว พร้อมทั้งสังเกตรูปร่างเบื้องต้นทางสัณฐานวิทยา ดังแสดงในรูป 4.4

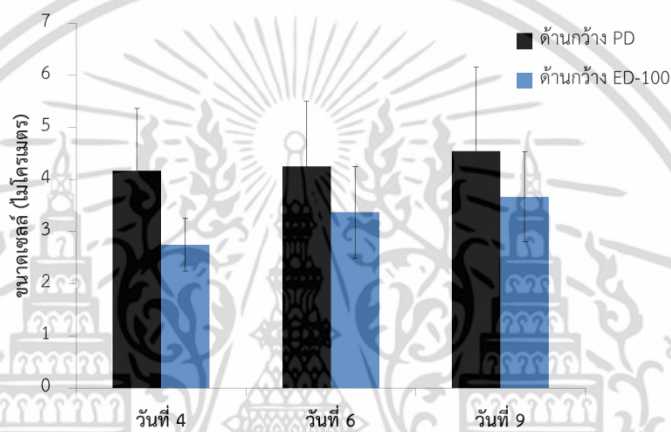


รูปที่ 4.4 แสดงขนาดเซลล์ของ PD (ก) และ ED-100 (ข)

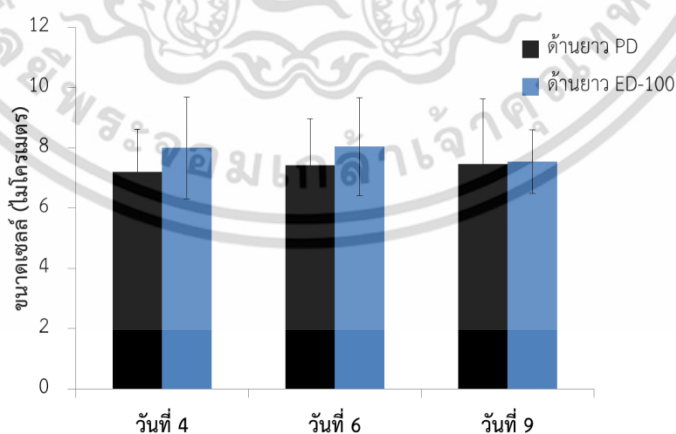
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการสังเกตลักษณะรูปร่างทางสัณฐานของ ED-100 และ PD พบว่า เซลล์ ED-100 มีลักษณะ ยาว เรียว เป็นรูปไข่ (รูปที่ 4.4 ก) ในขณะที่เซลล์ PD มีลักษณะรูปร่างกลม (รูปที่ 4.4 ข)

ผลการวัดขนาดเซลล์ระหว่าง ED-100 และ PD พบว่า ขนาดเซลล์ของ PD และ ED-100 ในระยะ log ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.5) แต่เมื่อวัดขนาดเซลล์ในช่วงระยะ stationary พบว่า ขนาดของเซลล์ทางด้านยาวเท่ากัน คือประมาณ 8 ไมโครเมตร แต่ขนาดเซลล์ทางด้านกว้างระหว่าง ED-100 และ PD มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยเซลล์ ED-100 มีขนาดเล็กกลองจาก 4.3194 ไมโครเมตร เป็น 3.2639 ไมโครเมตร คิดเป็น 0.7 เท่า เมื่อเทียบกับ PD ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และ 4.6



รูปที่ 4.5 แสดงกราฟเปรียบเทียบขนาดเซลล์ด้านกว้างของสาหร่าย PD และ ED-100 ในระยะ log (วันที่ 4) และระยะ stationary (วันที่ 6 และ 9) ในอาหาร Modified Ramaraj Medium

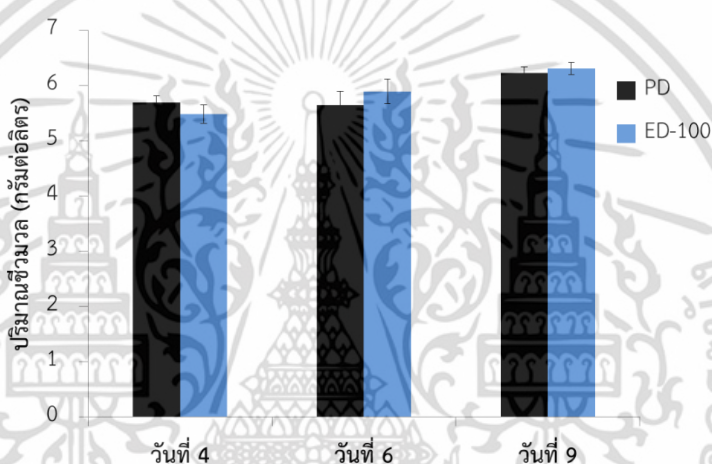


รูปที่ 4.6 แสดงกราฟเปรียบเทียบขนาดเซลล์ด้านยาวของสาหร่าย PD และ ED-100 ในระยะ log (วันที่ 4) และระยะ stationary (วันที่ 6 และ 9) ในอาหาร Modified Ramaraj Medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การวิเคราะห์ชีวมวลของสาหร่าย PD และ ED

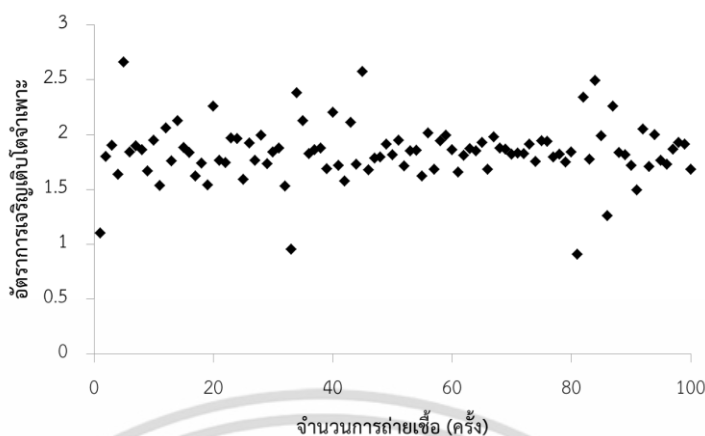
การทดลองนี้ได้ทำการเปรียบเทียบชีวมวลของ PD และ ED ในการทดลองดูว่าสาหร่ายทั้งสองมีการสะสมชีวมวลที่แตกต่างกันหรือไม่ เนื่องมาจากการมีปริมาณเซลล์สะสมที่แตกต่างกันข้างต้น การทดลองได้ทำการสุ่มตัวอย่างสาหร่ายปริมาตร 50 มิลลิลิตร มากรองและคำนวณหาน้ำหนักแห้ง ในระยะ log (วันที่ 4) และระยะ stationary (วันที่ 6 และ 9) ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณชีวมวลของ PD และ ED-100 ทั้งในระยะ log และระยะ stationary ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยทั้ง ED-100 และ PD มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งอยู่ในช่วง 5.4-6.3 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.7 แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณชีวมวลสาหร่าย PD และ ED-100 ในระยะ log (วันที่ 4) และระยะ stationary (วันที่ 6 และ 9) ในอาหาร Modified Ramaraj Medium

4.1.4 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 หลังจากการถ่ายเชื้อจำนวน 100 ครั้ง

ผลจากการถ่ายเชื้อทุกๆ วันที่ 4 เป็นจำนวนทั้งหมด 100 ครั้ง ในอาหารเหลวสูตร Modified Ramaraj Medium พบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่เกิดจากการถ่ายเชื้อแต่ละครั้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงโดยเห็นได้ชัดจากการกระจายค่าอัตราการเจริญจำเพาะในรูปที่ 4.9 โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่ายที่ถูกถ่ายเชื้อครั้งแรกเท่ากับ 1.1028 ส่วนสาหร่ายที่ถ่ายเชื้อครั้งที่ 100 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.6833 จากผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้ว่า เนื่องจากวันที่ 4 ของอัตราการเจริญของสาหร่าย ยังคงอยู่ในช่วง log ซึ่งอัตราการเจริญของ PD และ ED ยังไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.8 แสดงกราฟอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย *D. salina* KU11 ที่ถูกถ่ายเชื้อจนครบ 100 ครั้ง ในอาหาร Modified Ramaraj Medium

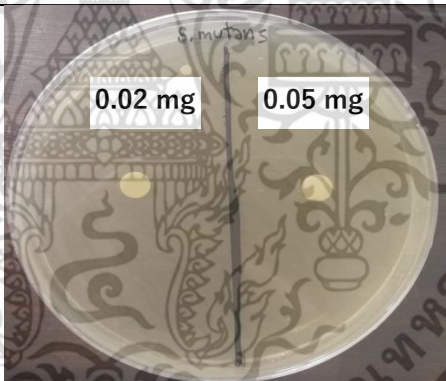
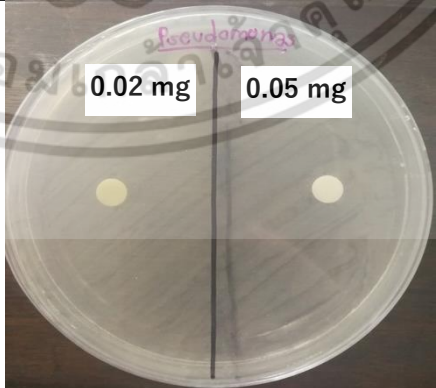
จากการศึกษาการปรับตัวของสาหร่าย *D. salina* KU11 ในรุ่น PD และ ED โดยการเปรียบเทียบการเจริญเติบโต ขนาดเซลล์ และปริมาณชีวมวล พบว่า ED มีการสะสมเซลล์มากขึ้นในช่วงท้ายของระยะ log จนถึงระยะ stationary และมีระยะ log ที่ยืดยาวขึ้น และเมื่อทำการวัดขนาดขนาดเซลล์ พบว่า เซลล์ของ ED มีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไป โดยมีลักษณะยาวเรียวเป็นรูปไข่ ซึ่งเซลล์ PD มีความกว้างน้อยกว่า PD เท่ากับ 0.7 เท่า แต่มีขนาดความยาวมีขนาดเท่ากัน จากผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Perrineau และคณะ (2014) เนื่องจากหลังจากการถ่ายเชื้อ สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ทั้งสิ้น 283 ครั้ง พบว่า สาหร่าย *C. reinhardtii* มีอัตราการเจริญที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ โดยสาหร่าย *C. reinhardtii* รุ่นสุดท้าย เรียกว่า The evolved Light (EL) มีระยะ log ที่สั้นลงกว่าสาหร่าย *C. reinhardtii* รุ่นแรก ที่เรียกว่า Progenitor Light (PL) เป็นจำนวน 1 วัน ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในสาหร่าย *C. reinhardtii* Perrineau et al. (2014) ได้อภิปรายว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนบางตัวที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ในวัฏจักรของเซลล์ ได้แก่ ยีน SCF, CycA และ PCNA ซึ่งเป็นไปได้ว่าจากผลที่เกิดขึ้นในการทดลองครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากสาหร่าย *D. salina* KU11 ในรุ่น ED อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมของยีนบางตัว หลังจากทำการคัดเลือกทางธรรมชาติ และส่งผลต่อในกระบวนการแบ่งเซลล์ของสาหร่าย ซึ่งในการทดลองต่อควรทำการศึกษาในระดับทางพันธุกรรม เช่น หาลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงในจีโนม หรือการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA เพื่อยืนยันการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวต่อไป

4.2 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 และ *Chlorella* sp. ต่อเชื้อก่อโรค ด้วยวิธี Agar Disc diffusion

4.2.1 การทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดหยาบของสาหร่าย *D. salina* KU11 ต่อเชื้อก่อโรค 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. mutans* และ *P. aeruginosa*

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากเซลล์แห้งของสาหร่าย *D. salina* KU11 จากเซลล์แห้งจำนวน 0.7 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองได้สารสกัดหยาบปริมาณทั้งสิ้น 22 มิลลิกรัม จากนั้นได้นำสารสกัดหยาบไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเชื้อทดสอบ 2 สายพันธุ์ข้างต้น ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *D. salina* KU11 ปริมาณ 0.02 และ 0.04 มิลลิกรัม โดยไม่แสดงบริเวณที่มีการยับยั้งเชื้อทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

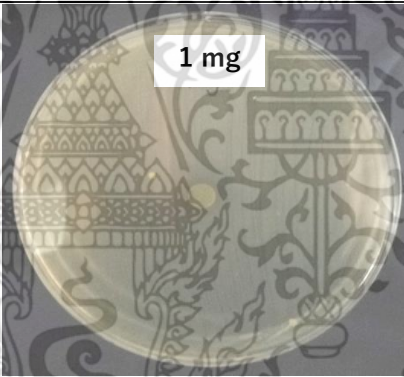
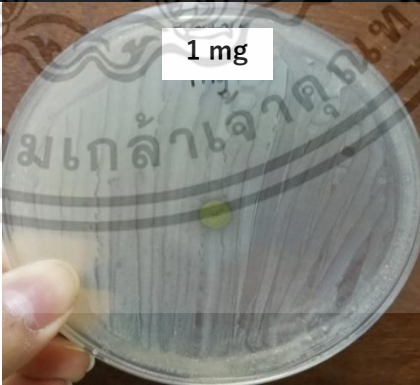
ตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *D. salina* KU11 ต่อเชื้อ *S. mutans* และ *P. aeruginosa*

เชื้อทดสอบ	ผลการทดสอบ	
	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
<i>Streptococcus mutans</i>		0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		0

4.2.2 การทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. ต่อเชื้อก่อโรค สายพันธุ์ ได้แก่ *S. mutans* , *S. aureus* , *E. coli* และ *P. aeruginosa*

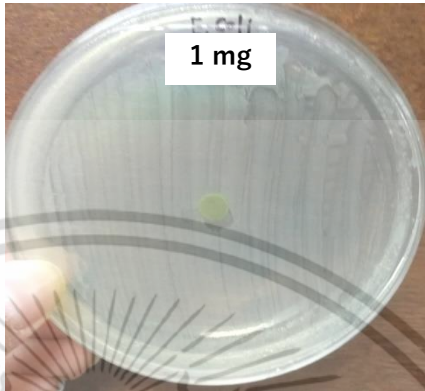

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella* sp. ประมาณ 1.03 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองได้สารสกัดหยาบปริมาณทั้งสิ้น 30 มิลลิกรัม จากนั้นได้นำสารสกัดหยาบไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเชื้อทดสอบ 4 สายพันธุ์ข้างต้น ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ปริมาณ 1 มิลลิกรัม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ได้โดยแสดงบริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone) 8 มิลลิเมตร แต่ไม่แสดงบริเวณที่มีการยับยั้งเชื้อทดสอบ *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์จากสารสกัดหยาบของสาหร่าย *Chlorella* sp. ต่อเชื้อ *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. Aeruginosa*

เชื้อทดสอบ	ผลการทดสอบ	
	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
<i>Streptococcus mutans</i>		8
<i>Staphylococcus aureus</i>		0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	ผลการทดสอบ	
	บริเวณการยับยั้ง (Inhibition Zone)	
<i>Escherichia coli</i>		0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		0

จากการทดลองที่ 4.2.1 และ 4.2.2 ได้ทำการทดลองสกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *D. salina* KU11 และสาหร่าย *Chlorella* sp. ซึ่งจากการศึกษาการวิจัยของ Ali *et al.* (2016) พบว่า ใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายในการสกัดสารสกัดจากสาหร่าย *Ulva lactuca* ซึ่งใช้ปริมาณสารสกัดเท่ากับ 40 มิลลิกรัม สามารถยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ได้ และอะซิโตนมีความมีขี้ตัว ทำให้สามารถระเหยสารสกัดจากสาหร่ายได้ง่าย จึงได้เลือกใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายในการทดลอง โดยวิธี Agar Disc Diffusion ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่า สารสกัดจาก *D. salina* ไม่แสดงบริเวณที่มีการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ปริมาณสารสกัด 0.02 และ 0.05 mg แต่สารสกัดจาก *Chlorella* sp. ที่ปริมาณสารสกัด 1 mg แสดงบริเวณที่มีการยับยั้งเฉพาะเชื้อ *S. mutans* แต่งานวิจัยของ Fadoul และ Juntawong (2014) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดหยาบของสาหร่ายโดยใช้ปริมาณของสารสกัดหยาบเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัม ซึ่งพบว่าตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารจากสาหร่าย *D. salina* และ *Chlorella* sp. คือ เมทานอล ซึ่งเมทานอลมีประสิทธิภาพในการสกัดสารสกัดจากสาหร่ายได้ในช่วงกว้าง จึงชี้ให้เห็น

ว่าอะซิโตนมีความสามารถในสกัดสารไมตีพอ เพราะต้องใช้ *Chlorella* sp. ปริมาณมากในการทดสอบ แต่อาจใช้ *D. salina* น้อยเกินไป ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าถ้าใช้ในปริมาณมากจะยับยั้งได้หรือไม่ เพราะตัวทำลายคนละชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีความสามารถในการสกัดสารไม่เท่ากัน ซึ่งในการทดลองครั้งต่อไปจึงมีการวางแผนให้ใช้ตัวทำลายเป็นเมทานอลแทนการใช้อะซิโตนเนื่องจากมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าในการสกัด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาศักยภาพการปรับตัวของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 ต่อการคัดเลือกทางธรรมชาติและฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบของสาหร่ายต่อเชื้อก่อโรค โดยได้ถ่ายเชื้อ *D. salina* KU11 จนครบ 100 ครั้ง (ED-100) และทำการเปรียบเทียบการเจริญ ขนาดเซลล์ และปริมาณชีวมวลระหว่าง ED และ PD พบว่า ED-100 มีการสะสมจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นในระยะ stationary 2.6 เท่า และมีระยะ log ยืดยาวขึ้นเป็นจำนวน 5 วัน และเมื่อเทียบกับ PD ED-100 มีขนาดเซลล์เล็กกว่า PD 0.7 เท่า แต่ปริมาณชีวมวลทั้ง ED-100 และ PD ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ

ส่วนหัวข้อการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *D. salina* KU11 และ *Chlorella* sp. ต่อเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. Aeruginosa* ด้วยวิธี Agar Disc diffusion โดยใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร พบว่า สารสกัดหยาบจากสาหร่าย *D. salina* ปริมาณสารสกัด 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัม ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ แต่ *Chlorella* sp. ปริมาณสารสกัด 1 มิลลิกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* ได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *D. salina* และ *Chlorella* sp. ต่อเชื้อก่อโรค ควรศึกษาตัวทำละลายตัวใหม่ เนื่องจากการหาข้อมูลเบื้องต้น ทำให้ทราบว่าสารตัวอื่นมีความสามารถเป็นตัวทำละลายที่ดีกว่าอะซิโตน ตัวอย่างเช่น เมทานอล ซึ่งอาจช่วยให้สามารถใช้ปริมาณสารสกัดที่น้อยลง ซึ่งอาจเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้สกัดสาร โดยเลือกตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารสกัดจากสาหร่ายได้ในช่วงกว้าง และช่วยลดปริมาณของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบให้น้อยลง

เอกสารอ้างอิง

- ธิดา วีระสกุล และนิเวศน เรืองพานิช. 2517. การทดลองเลือกใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับ
แพลงตอนพืช. รายงานประจำปี 2516-2517. สถานีประมงทะเลสงขลา.
- นันทวัน นันทวนิช และศศิวิมล แสงผล. 2552. 150 ปี ชาลส์ดาร์วินวิวัฒนาการของสัตว์และ พื ช
[Online]. Available: <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/150charlesdarwin/intro.html>. เข้าถึงเมื่อวันที่ 22 พ.ค 60
- นิรันดร์ จันทวงศ์. 2554. การพัฒนาสาหร่ายดุนาลิเอลล่าในการผลิตเบต้าแคโรทีนและส่งเสริมการ
ใช้ประโยชน์จากพื้นที่ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. กรุงเทพฯ: การวิจัยจาก
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- ภัทรชัย กิรติสิน. 2549. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ
แพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วิสัย วงศ์สายปิ่น. 2534. สาหร่ายเซลล์เดียว. สำนักพิมพ์รวมธรรมศน์, กรุงเทพฯ.
- อรชุน เลียววัฒนผล. 2539. ต้านโรคมะเร็งด้วยเบต้าแคโรทีน. สำนักพิมพ์รวมธรรมศน์, กรุงเทพฯ.
224น.
- A. Hosseini Tafreshi and M. Shariati. 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and
Applications. Journal of Applied Microbiology, 107: 14–35.
- Aharon Oren. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. BioMed
Central Ltd.
- Alberta Lucches. 2017. *Streptococcus mutans* antigen I/II and autoimmunity in
cardiovascular diseases. Autoimmunity Reviews 16: 456–460.
- Amotz Ami Ben, Adriana Katz and Mordgay Avron. 2004. Accumulation of beta-
Carotene in halotolerant algae : Purification and characterization of beta-
carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (chlorophyceae). Journal of
phycology, 18: 529-573.
- Amotz, Polle, & Rao. 2009. The Alga *Dunaliella*. NewHampshire : Science Publishers.
- Bhumiratana, payer, Feldheim, Phithakpol, Polsiri, Prabharalesa, Kongpanichkul,
Thananunkul, Duerr, Hosakul, Kugler, Kugler, Kraidej, and Chiemichak. 1972.
Algal Project Institute of Food Research and Product Development. Kasetsart
University, Bangkok. 41 pp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Borowitzka and Borowitzka. 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *JApplPhycol*, 19: 567-590.
- Breed, Murray, Smith. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7th edition). The Williams & Wilkins Company, USA.
- CariesReza Fekrazada, Bahman Serajb, Nasim Chiniforushc, Mehrak Rokoueid, Niloofar Mousavic and Sara Ghadimi. 2017. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on the counts of salivary *Streptococcus mutans* in children with severe early childhood caries. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 18: 319–322.
- Carlin, Guinebretiere, Choma, Pasqualini, Braconnier. and Nguyenthe. 2000. Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurised and chilled vegetable purées. *Food Microbiol*, 17: 153-165.
- Christiane Bayerl. 2008. Beta-carotene in dermatology: does it help?. *Acta Dermatoven APA Vol 17, No 4*.
- Denis Tielker, Stephanie Hacker, Remy Loris, Martin Strathmann, Jost Wingender, Susanne Wilhelm, Frank Rosenau and Karl-Erich Jaeger. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*, 151: 1313–1323.
- Dipak, Pisal and Lele. 2005. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*, pp 476-483.
- Duc Tran, Trung Vo and Sixto Portilla. 2013. Phylogenetic study of some strains of *Dunaliella*. *American Journal of Environmental Science* 9 (4): 317-321.
- Farouk K. El-Baz, Hanan F. Aly, Gamila H. Ali, Rehab Mahnoud and Safaa A. Saad. 2016. Antidiabetic efficacy of *Dunaliella salina* extract in STZ-induced Diabetic rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 7(3): (B) 465 -473.
- Gianluca Pane, Gabriele Cacciola, Elisabetta Giacco, Gian Luigi Mariottini and Erika Coppo. 2015. Assessment of the Antimicrobial Activity of Algae Extracts on Bacteria Responsible of External Otitis. *Marine drugs*, 13, 6440-6452.
- Haque A and Russell NJ. 2005. Phenotypic and genotypic characterisation of *Bacillus cereus* isolates from Bangladeshi rice. *Int J Food Microbiol*, 98(1): 23-34.

- Heon-Jin Lee, Se Chul Kim , Jinkyung Kim , Aejin Do , Se Yeong Han , Bhumgey David Lee , Hyun Ho Lee , Min Chan Lee , So Hui Lee , Taejun Oh , Sangbin Park and Su-Hyung Hong. 2015. Synergistic inhibition of Streptococcal biofilm by ribose and xylitol. *archives of oral biology*, 60: 304–312.
- Hind E. Fadoul and N. Juntawong. 2014. Antimicrobial Activity of Extracts from Aquatic Algae Isolated From Salt Soil and Fresh Water in Thailand. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, PP149-152.
- Jeffrey B Lyczaka, Carolyn L Cannon and Gerald B Pier. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, 1051-1060.
- Jinthana Lapidattanakula, Yukiko Takashimac, Pornpen Tantivitayakula, Thaniya Maudcheingkaa, Pattarawadee Leelataweewudb, Kazuhiko Nakanod and Michiyo Matsumoto-Nakanoc. 2017. Cariogenic properties of *Streptococcus mutans* clinical isolates with sortase Defects. *Archives of Oral Biology*, 81: 7–14.
- Khalid H. Metwalli, Shariq A. Khan, Bastiaan P. Krom and Mary Ann Jabra-Rizk. 2013. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the Human Mouth: A Sticky Situation. *PLOS Pathogens* Volume 9 Issue 10.
- K.M. Salli, S.D. Forssten, S.J. Lahtinen, A.C. Ouwehand. 2016. Influence of sucrose and xylitol on an early *Streptococcus mutans* biofilm in a dental simulator. *Archives of Oral Biology* 70: 39–46.
- Kumar H.D. and Singh, H.N. 1971. *A Textbook on Algae*. Affiliated East-West Press PVT. Ltd. New Delhi, India. 200 pp.
- Loffler B, Tuchscher L, Niemann S, Peters G. 2014. *Staphylococcus aureus* persistence in nonprofessional phagocytes. *Int J Med Microbiol* 304: 170-6.
- Lyczak JB, Cannon CL and Pier GB. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, 1051-1060.
- Marta Estela Saravia, Paulo Nelson-Filho, Izabel Yoko Ito, Le´a Asse Bezerra da Silva, Raquel Assed Bezerra da Silva, Claes-Goˆran Emilson. 2011. Morphological differentiation between *S. mutans* and *S. sobrinus* on modified SB-20 culture medium. *Microbiological Research*, 166: 63-67.

- Martinez, G. Cifuentes, A. Gonzalez, M. Parra, O. 1995. Effect of salinity on sexual activity of *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, strain CONC-006. Revista Chilena de Historia Natural.
- Mohammad Bagher Rezvani, Mohammad Niakan, Mohammad Kamalinejad, Fateme Sadat Ahmadi, Faeze Hamze. 2017. The synergistic effect of honey and cinnamon against *Streptococcus mutans* bacteria. Asian Pac J Trop Biomed 7(4): 314–320.
- Nader Fareid AbuSaraa, Sadeq Emeishb and Abdul-Karim Jaber Sallal. 2011. The Effect of Certain Environmental Factors on Growth and β -Carotene Production by *Dunaliella* sp. Isolated from the Dead Sea. Jordan Journal of Biological Sciences Pages 29- 36.
- Perrineau M-M, Gross J, Zelzion E, Price DC, Levitan O et al. 2014. “Using Natural Selection to Explore the Adaptive Potential of *Chlamydomonas reinhardtii*.” PLoS ONE 9(3): e92533.
- Ramaraj Sathasivam and Niranjana Juntawong. 2013. Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. 5: 67-73.
- Richmond, A. 1986. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Inc. Boca Raton Florida. 528 pp.
- 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.
- Schoeni, J.L. and Wong, A.C. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. J. Food Prot. 68: 636-648.
- Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME and Holt JG. 1986. BERGEY'S MANUAL of Systemic Bacteriology. Williams & Wilkins 2: 1054-1063.
- Steenblock, D. 1987. Chlorella Natural Medicinal Algal. Aging Research Institute. El Toro, California. 50 pp.
- Tawfiq S. Abu-Rezq, Suad Al-Hooti and Dangly A. Jacob. 2010. Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. Journal of algal biomass utilization 2:12-19.
- Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Arad, S. and Richmond, A. 1982. On the Production of *Spirulina* Biomass: Effects of Environmental factors and of the Population Density. Biomass, 2: 175: 185.

- W. Krzyściak & A. Jurczak & D. Kościelniak & B. Bystrowska & A. Skalniak. 2014. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33: 499-515
- Yanan Xu, Iskander M. Ibrahim, Patricia J. Harvey. 2016. The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (chlorophyta) CCAP 19/30. *Plant Physiology and Biochemistry* 106: 305-315.
- Zhe Wu, Promchup Duangmanee, Pu Zhao, Niran Juntawong, and Chunhong Ma. 2016. The Effects of Light, Temperature, and Nutrition on Growth and Pigment Accumulation of Three *Dunaliella salina* Strains Isolated from Saline Soil. *Jundishapur J Microbiol*, 9(1): e26732



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย *Dunaliella salina*

ตาราง ก-1 อาหาร Modified Ramaraj Medium (Sathasivam และ Juntawong, 2003)

อาหาร Modified Ramaraj Medium	
สารเคมี	ปริมาณสาร (mL/L)
Solution A (Micronutrient)	1
- Boric acid (H_3BO_3)	9.27507
- Manganese(II) Chloride Tetrahydrate ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	1.9790
- Zinc Chloride ($ZnCl_2$)	0.109024
- Copper(II) Chloride Dihydrate ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.051144
- Sodium Molybdate (Na_2MoO_4)	0.48
- Sodium Metavanadate ($NaVO_3$)	0.24386
- Cobalt(II) Chloride Hexahydrate ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.047586
Solution B (Concentrated mix)	100
- Potassium chloride (KCl)	2.0
- Calcium Chloride Dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.441
- Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4)	0.14
- Potassium Nitrate (KNO_3)	5.06
- Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	12.323
- Iron(III) Chloride Hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.0054
Sodium Chloride (NaCl)	87.66
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	50

* ไอรอน (III) คลอไรด์เฮกซาไฮเดรตละลายอยู่ใน 0.5 โมล EDTA (พีเอช 7.5) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ก-2 อาหาร Modified Ramaraj Medium (สูตรอาหารแข็ง)

อาหาร Modified Ramaraj Medium (สูตรอาหารแข็ง)	
สารเคมี	ปริมาณสาร
อาหารเหลว Modified Ramaraj Medium	1 L
ผงวุ้น (Agar)	15 g/L

ตาราง ก-3 อาหาร Modified Johnson's Medium (สูตรอาหารเหลว) (Borowizka, 1988)

อาหาร Modified Johnson's Medium (สูตรอาหารเหลว)	
สารเคมี	ปริมาณสาร
Sodium Chloride (NaCl)	87.66 g/L
Magnesium Chloride Hexahydrate (MgCl ₂ .6H ₂ O)	1.5 g/L
Magnesium Sulfate Heptahydrate (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.5 g/L
Potassium chloride (KCl)	0.2 g/L
Calcium Chloride Dihydrate (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0.2 g/L
Potassium Nitrate (KNO ₃)	1.0 g/L
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	0.043 g/L
Potassium Dihydrogen Phosphate (KH ₂ PO ₄)	0.035 g/L
Fe-solution	
- UltraPure Ethylenediaminetetraacetic Acid, Disodium Salt (Na ₂ EDTA)	189 mg/L
- Iron(III) Chloride Hexahydrate (FeCl ₃ .6H ₂ O)	244 mg/L
Trace-element solution	
- Boric acid (H ₃ BO ₃)	61 mg/L
- Ammonium molybdate tetrahydrate ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O)	38 mg/L
- Copper(II) Sulfate Pentahydrate (CuSO ₄ .5H ₂ O)	6.0 mg/L
- Cobalt(II) Chloride Hexahydrate (CoCl ₂ .6H ₂ O)	5.1 mg/L
- Zinc Chloride (ZnCl ₂)	4.1 mg/L
- Manganese(II) Chloride Tetrahydrate (MnCl ₂ .4H ₂ O)	4.1 mg/L

* ปรับให้ได้ pH 7.5 ด้วย ไฮโดรคลอริก (HCl)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สาหร่าย *Chlorella sp.*

ตาราง ก-4 อาหาร TAP Medium

อาหาร TAP Medium	
สารเคมี	ปริมาณสาร
ทริสเบส 1 โมลาร์ (1 M Tris base)	20 mL/L
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ II (Phosphate Buffer)	1.0 mL/L
- Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	108 g/L
- potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)	56 g/L
สารละลาย A (Solution A)	10 mL/L
- Ammonium Chloride (NH_4Cl)	40 g/L
- Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10 g/L
- Calcium Chloride Dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	5 g/L
Hutner's Trace element	1.0 mL/L
Glacial acetic acid	1.0 mL/L

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*

ตาราง ก-5 อาหาร Brain Heart Infusion (BHI) (สูตรอาหารแข็ง)

อาหาร Brain Heart Infusion (BHI) (สูตรอาหารแข็ง)	
สารเคมี	ปริมาณสาร (g/L)
อาหาร Brain Heart Infusion สำเร็จรูป	37
ผงวุ้น (Agar)	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการทดลอง

ข-1 การวัดขนาดเซลล์

การวัดขนาดเซลล์สาหร่าย *Dunaliella salina* ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เครื่องมือไมโครมิเตอร์(Micrometer) ซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์ 2 อย่าง คือ

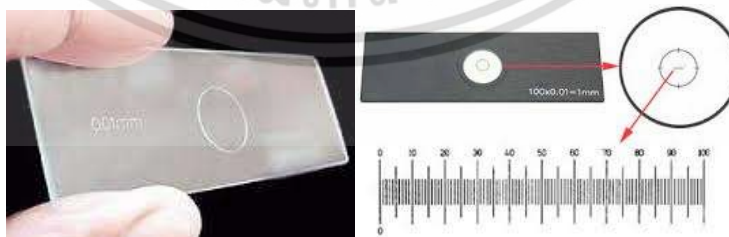
1. Ocular Micrometer หรือ Eyepiece Micrometer มีลักษณะเป็นแผ่นกระจกทรงกลม มีสเกลบนแผ่นกระจก 100 ช่อง มีขีดยาวและเลขกำกับไว้ทุกๆ 10 ช่อง



รูปที่ ข-1.1 แสดงลักษณะ Ocular Micrometer

(ที่มารูป ด้านซ้าย <https://www.microscopeworld.com/images/reticleA2.jpg>
ด้านขวา <https://www.mccrone.com/microscope-accessories>)

2. Stage Micrometer หรือ Objective Micrometer มีลักษณะเป็นแผ่นสไลด์แก้วทรงที่เหลี่ยมผืนผ้า มีสเกลบนแผ่นแก้ว มี 100 ช่อง แต่ละช่องกว้าง 0.01 มิลลิเมตร หรือ 1 ช่องของ Stage Micrometer กว้าง 0.01 มิลลิเมตร



รูปที่ ข-1.2 แสดงลักษณะ Stage Micrometer

(ที่มา : ด้านซ้าย <https://dir.indiamart.com/impcat/stage-micrometers.html>
ด้านขวา https://www.tedpella.com/mscope_html/Light-Microscopes.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการใช้เครื่องมือ Micrometer

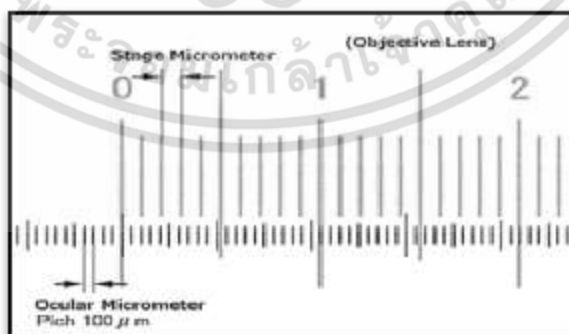
1. นำ Ocular Micrometer ใส่ลงในกระบอกเลนส์ตาของกล้องจุลทรรศน์



รูป ข-1.3 วิธีการใส่ Ocular Micrometer ลงใน Ocular lens

(ที่มา : <http://www.mecanusa.com/microscope/micrometer/Calibration.htm>)

2. นำ Stage Micrometer ใส่ลงในแท่นวางสไลด์ ส่องดูด้วยกำลังขยายต่ำสุดก่อน
3. ปรับเลื่อนให้สเกลของ Ocular Micrometer ตรงกับเส้นแรกของ Stage Micrometer
4. มองดูทางขวาว่าเส้นที่เท่าใดของ Ocular Micrometer และ Stage Micrometer ที่ตรงกันพอดี
5. นับจำนวนช่องระหว่าง Ocular Micrometer และ Stage Micrometer ไปจนถึงเส้นที่ทับกันสนิท เพื่อคำนวณหาขนาดสเกลแต่ละช่องของ Ocular Micrometer



รูปที่ ข-1.4 ภาพขยายการเทียบสเกลของ Stage Micrometer กับ Ocular Micrometer

(ที่มา : <http://www.mecanusa.com/microscope/micrometer/Calibration.htm>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณหาขนาดแต่ละช่องของ Ocular Micrometer

สมมติเรานับได้ 6 ช่องของ Ocular Micrometer ทับพอดี 13 ช่องของ Stage Micrometer โดยใช้ในการเทียบบัญญัติไตรยางศ์

$$\begin{aligned} 6 \text{ ช่องของ Ocular Micrometer} &= 13 \text{ ช่อง Stage Micrometer} \\ \text{ซึ่ง 1 ช่องของ Stage Micrometer มีขนาด} &= 0.01 \text{ มิลลิเมตร} \\ \text{ดังนั้น 1 ช่องของ Ocular Micrometer} &= (0.01 \times 13) / 6 = 0.022 \text{ มิลลิเมตร} \end{aligned}$$

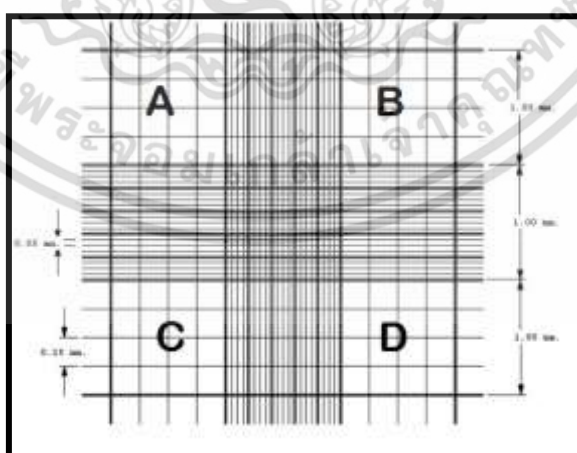
ข-2 การนับจำนวนเซลล์

นับจำนวนเซลล์สำหรับ *D. salina* ด้วยเครื่องมือฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) ฮีมาไซโตมิเตอร์มีลักษณะเป็นแก้วทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า บนฮีมาไซโตมิเตอร์ประกอบด้วยตารางสี่เหลี่ยมจำนวน 9 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 1 มิลลิเมตร และมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร พื้นที่ที่จะนับเซลล์จะนับที่มุมทั้ง 4 มุม มีจำนวนมุมละ 16 ช่อง และกระจกปิดสไลด์เพื่อช่วยในการนับจำนวนเซลล์



รูปที่ ข-2.1 แสดงลักษณะฮีมาไซโตมิเตอร์

(ที่มารูป : <http://www.graymed.com.au/haemocytometer-haemocytometers>)



รูปที่ ข-2.2 แสดงลักษณะตารางบนฮีมาไซโตมิเตอร์

(ที่มารูป : <http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการนับจำนวนเซลล์

1. วางกระจกปิดสไลด์ลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์
2. ทำการเจือจางตัวอย่างสาหร่ายในอัตราส่วน 1:9 (สาหร่าย:น้ำ) ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจางมาปริมาณ 10 ไมโครลิตรและไหลตกลงไปบนช่องระหว่างแชมเบอร์กับกระจกปิดสไลด์ น้ำตัวอย่างจะไหล ลงไปในช่องจนเต็มพื้นที่ตาราง
3. วางฮีมาไซโตมิเตอร์บนสเตทของกล้องจุลทรรศน์ ปรับเลนส์ใกล้วัตถุเป็นกำลังขยาย 40x จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ และทำการคำนวณได้จาก พื้นที่ตาราง × ความลึก

วิธีการคำนวณจำนวนเซลล์

ช่อง A B C D (รูปข-2.2) มีความกว้างและยาวเท่ากับ 1 มิลลิเมตร

ปริมาตรน้ำของช่อง A B C D เท่ากับ ความกว้าง × ความยาว × ความลึก

$$= 1 \text{ มิลลิเมตร} \times 1 \text{ มิลลิเมตร} \times 0.1 \text{ มิลลิเมตร}$$

$$= 0.1 \text{ เซนติเมตร} \times 0.1 \text{ เซนติเมตร} \times 0.01 \text{ เซนติเมตร}$$

$$= 0.0001 \text{ ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ } 0.0001 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$= 10^{-4} \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้น ความจำวนเซลล์ที่นับได้ = $(A + B + C + D) \div 4 = E$

$$= E \times 10^4 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร}$$

ข-3 การวัดปริมาณชีวมวล

วัดปริมาณชีวมวลสาหร่ายโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ เป็นการกรองโดยใช้เครื่องดูดอากาศ ช่วยดูดอากาศ ทำให้ความดันในขวดบูชเนอร์ต่ำกว่าความดันเหนือกรวยบูชเนอร์ ทำให้ของเหลวจากการกรองไหลผ่านกรวยกรองด้วยดี



รูปที่ ข-3.1 เครื่องกรองสุญญากาศ

(ที่มารูป : <http://www.labvalley.com/product/297/>)

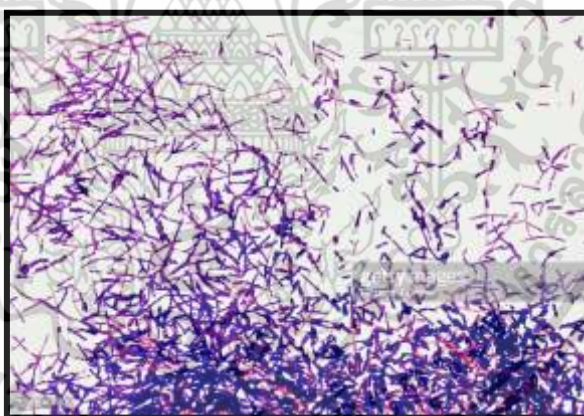
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการใช้เครื่องกรองสุญญากาศ

1. ต่อขวดกรองบุชเนอร์กับสายต่อท่อเครื่องปั๊มสุญญากาศ
2. ต่อข้อต่อสุญญากาศกับขวดกรองบุชเนอร์ นำกระดาษกรองไปจุ่มลงในอาหารให้ชุ่มแล้วนำไปวางตรงข้อต่อสุญญากาศ
3. นำกรวยบุชเนอร์มาวางทับแล้วหนีบเข้าด้วยคีมลือคอลลูมิเนียม
4. เปิดเครื่องปั๊มสุญญากาศ แล้วเทตัวอย่างสาหร่ายลงในชุดกรอง เครื่องจะทำการกรองให้เหลือแต่เซลล์สาหร่ายติดอยู่บนกระดาษกรอง เมื่อกรองเสร็จให้นำกระดาษกรองที่ได้ไปอบในตู้อบรมร้อน

ข-4 การย้อมแกรม

การย้อมแกรมเป็นเทคนิคการจัดจำแนกแบคทีเรียวิธีหนึ่ง โดยดูจากลักษณะการติดสี ที่จะแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม คือแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) จะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต(cystal violet) และแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bactive) จะติดสีแดงของซาฟานิน(safanin) การที่แบคทีเรียติดสีแกรมต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียและองค์ประกอบทางเคมี



รูปที่ ข-4.1 ภาพเซลล์แบคทีเรียที่ย้อมแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(ที่มารูป : <http://www.gettyimages.com/photos/gram-negative-bacteria>)

วิธีการย้อมแกรม

1. เตรียมสไลด์โดยล้างสไลด์ให้สะอาด เช็ดให้แห้ง แล้วหยดน้ำลงบนสไลด์ 1 หยด
2. ใช้ห่วงเชี่ยเชื้อ(loop)เผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 วินาที แล้วใช้ลูปเชี่ยเชื้อในจานเพาะเชื้อ
3. ใช้ห่วงเชี่ยเชื้อมา smear เชื้อลงบนสไลด์ จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปตรึง (fix) ด้วยไฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. หยดคริสตัลไวโอเล็ตให้ท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ
5. หยดแกรมไอโอดีนให้ท่วมสไลด์ 1 นาที แล้วล้างออกด้วย 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ประมาณ 20 วินาที
6. จากนั้นล้างออกด้วยน้ำ และหยดซาฟานินให้ท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ
7. ซับน้ำด้วยกระดาษ แล้วรอให้แห้ง แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ข-5 การ Cross streak

เทคนิคการ Cross streak เป็นการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยต้องแยกให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว โดยมีอุปกรณ์ที่ใช้ถ่ายเชื้อ ดังนี้ ห่วงเชิยเชื้อ, ตะเกียงแอลกอฮอล์, จานเพาะเชื้อ

วิธีการ Cross streak

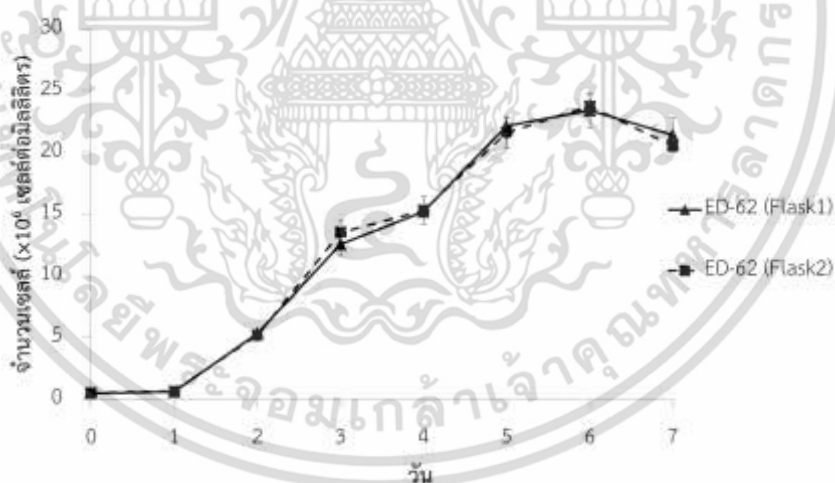
1. ใช้ห่วงเชิยเชื้อเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 วินาที
2. ใช้ห่วงเชิยเชื้อเชิยเชื้อในจานเพาะเชื้อ แล้วนำมาขีดบนอาหารวุ้นเป็นแนวเดียวกัน ประมาณ 4-5 เส้น
3. ทุกครั้งห่วงเชิยเชื้อต้องเผาไฟก่อนด้วยขีดบนอาหาร ลากเส้นตัดกัน 3-4 แนว ลากห่างกัน ไปเรื่อยๆจนได้โคโลนีเดี่ยว แล้วนำไปบ่มนาน 24-48 ชั่วโมง

ภาคผนวก ค

จำนวนเซลล์

ตารางที่ ค-1 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ ED-62 ในเดือนตุลาคม 2016

วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	ED-62 (Flask 1)	ED-62 (Flask 2)
0	0.49×10^6	0.50×10^6
1	0.62×10^6	0.66×10^6
2	5.34×10^6	5.17×10^6
3	12.54×10^6	13.52×10^6
4	15.17×10^6	15.32×10^6
5	22.15×10^6	21.63×10^6
6	23.38×10^6	23.72×10^6
7	21.41×10^6	20.50×10^6

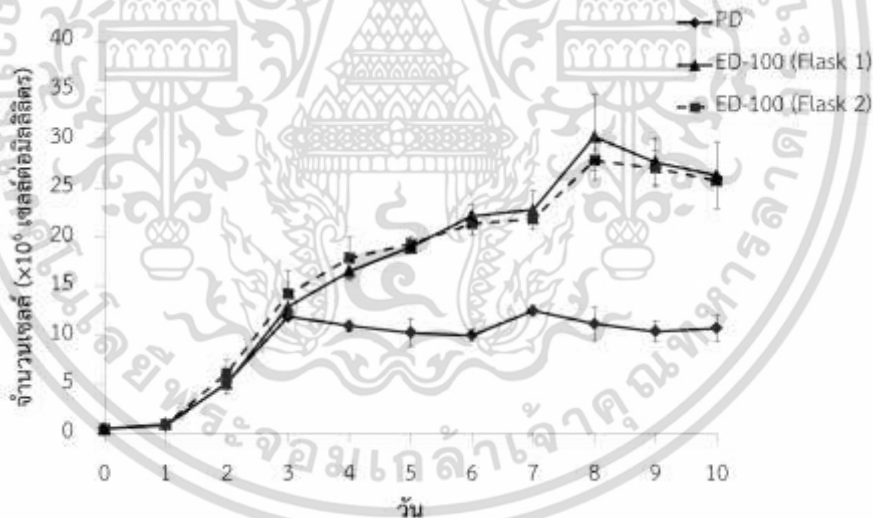


รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานแสดงการเจริญเติบโตของสาหร่าย ED-62 (Flask 1) และ (Flask 2) ในเดือนตุลาคม 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-2 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ ED-100 และ PD ในเดือนกุมภาพันธ์ 2017

วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	ED-100 (Flask 1)	ED-100 (Flask 2)	PD
0	0.49×10^6	0.49×10^6	0.51×10^6
1	0.97×10^6	0.91×10^6	0.81×10^6
2	5.12×10^6	6.14×10^6	5.17×10^6
3	12.92×10^6	14.22×10^6	11.89×10^6
4	16.57×10^6	17.90×10^6	10.97×10^6
5	19.00×10^6	19.33×10^6	10.28×10^6
6	22.17×10^6	21.36×10^6	10.02×10^6
7	22.79×10^6	21.86×10^6	12.51×10^6
8	30.24×10^6	27.85×10^6	11.18×10^6
9	27.64×10^6	27.05×10^6	10.41×10^6
10	26.31×10^6	25.75×10^6	10.73×10^6

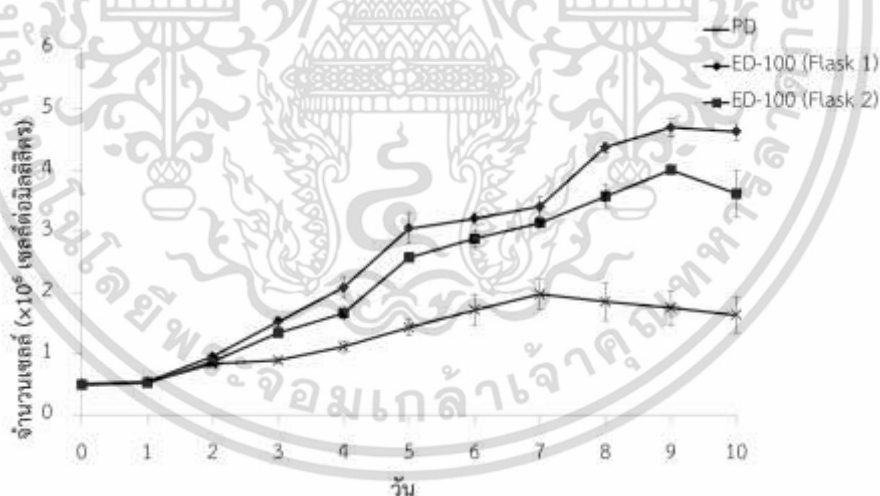


รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานแสดงการเจริญเติบโตของสายร่าย ED-100 (Flask 1) และ (Flask 2) ในเดือนกุมภาพันธ์ 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-3 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ ED-100 และ PD ในอาหารสูตร Modified Johnson Medium เดือนมีนาคม 2017

วันที่	จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	ED-100 (Flask 1)	ED-100 (Flask 2)	PD
0	0.51×10^6	0.49×10^6	0.49×10^6
1	0.54×10^6	0.52×10^6	0.53×10^6
2	0.95×10^6	0.87×10^6	0.83×10^6
3	1.52×10^6	1.34×10^6	0.89×10^6
4	2.08×10^6	1.66×10^6	1.11×10^6
5	3.05×10^6	2.57×10^6	1.42×10^6
6	3.21×10^6	2.88×10^6	1.72×10^6
7	3.41×10^6	3.14×10^6	1.97×10^6
8	4.37×10^6	3.57×10^6	1.85×10^6
9	4.70×10^6	4.01×10^6	1.75×10^6
10	4.63×10^6	3.62×10^6	1.63×10^6



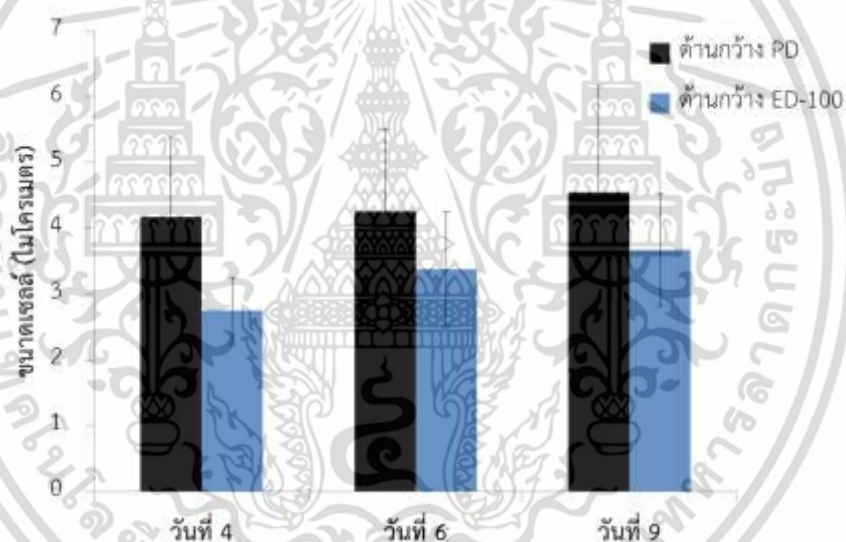
รูปที่ ค-3 กราฟมาตรฐานแสดงการเจริญเติบโตของ ED-100 (Flask ที่ 1 และ 2) และ PD ในอาหารสูตร Modified Johnson's Medium ในเดือนมีนาคม 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดเซลล์

ตารางที่ ค-4 ขนาดเซลล์ด้านกว้างของ ED-100 และ PD ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

วัน	รุ่น	ขนาดด้านกว้างเซลล์เฉลี่ย (μm)
วันที่ 4	PD	4.1667
	ED	2.7500
วันที่ 6	PD	4.2500
	ED	3.375
วันที่ 9	PD	4.5417
	ED	3.6667



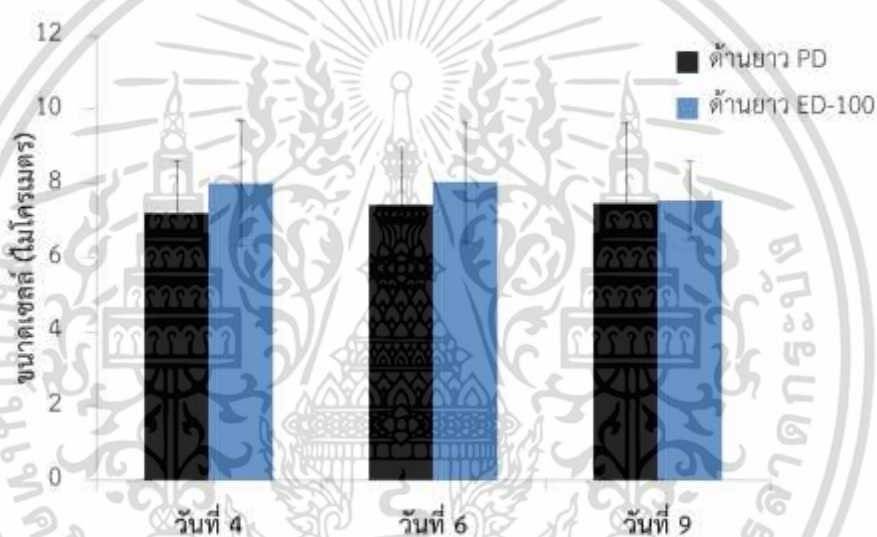
รูปที่ ค-4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดเซลล์ด้านกว้างของ PD กับ ED-100 ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-5 ขนาดเซลล์ด้านยาวของ ED-100 และ PD ในอาหารสูตร Modified Ramaraj

Medium

วัน	รุ่น	ขนาดด้านยาวเซลล์เฉลี่ย (μm)
วันที่ 4	PD	7.2083
	ED	8.0000
วันที่ 6	PD	7.4167
	ED	8.0417
วันที่ 9	PD	7.4583
	ED	7.5417



รูปที่ ค-5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบขนาดเซลล์ด้านยาวของ PD กับ ED-100 ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

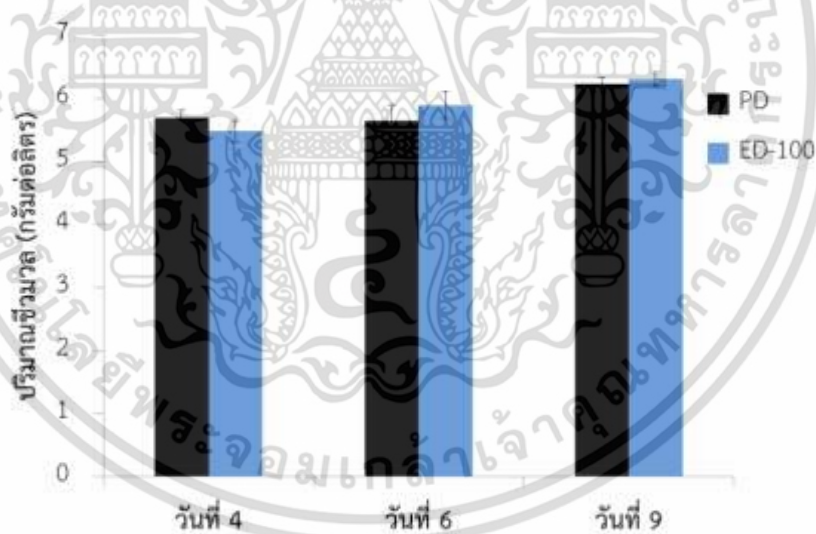
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวมวล

ตารางที่ ค-6 ปริมาณชีวมวลของ ED-100 และ PD ในอาหารสูตร Modified Ramaraj

Medium

วัน	รุ่น	ปริมาณชีวมวล (g/L)
วันที่ 3	ED1	5.4833
	ED2	5.1667
	PD	5.6900
วันที่ 6	ED1	5.8933
	ED2	5.7967
	PD	5.6467
วันที่ 8	ED1	6.3033
	ED2	6.2033
	PD	6.2200



รูปที่ ค-6 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณชีวมวลของ PD กับ ED-100 ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การคำนวณค่าทางสถิติ

การทดสอบความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในแต่ละการทดลอง โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

ตารางที่ ง-1 แสดงจำนวนเซลล์ของการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 รุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) เดือนตุลาคม ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

วัน	จำนวนเซลล์สาหร่ายในเดือนตุลาคม (*10 ⁶ cell/mL)		
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	รวม (Y _j)
0	0.4900	0.5008	0.9908
1	0.6158	0.6592	1.2750
2	5.3417	5.1750	10.5167
3	12.5417	13.5167	26.0583
4	15.1750	15.3167	30.4917
5	22.1500	21.6333	43.7833
6	23.3833	23.7250	47.1083
7	21.4083	20.5000	41.9083
รวม (Y _i)	101.1058	101.0267	202.1325 (Y _{..})
เฉลี่ย (Ȳ _i)	12.6382	12.6283	

หาค่าตาราง ANOVA โดยการคำนวณทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

Treatment เป็น ครั้งของการทดลอง (a) = 2

Block เป็น จำนวนวันของการทดลอง (b) = 8

N = ab = 16

1. ความผันแปรทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการทดลอง

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_T = \{(0.4900)^2 + (0.6158)^2 + \dots + (20.5000)^2\} - \frac{202.1325^2}{16}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด การค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$SS_T = 1254.7428$$

$$\text{ค่าองศาอิสระ (df}_T) = ab - 1 = 15$$

2. ความผันแปรที่เกิดจากทรีทเมนต์

$$SS_{Tr} = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_i^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_{Tr} = \frac{1}{8} \{ (101.1058)^2 + (101.0267)^2 \} - \frac{202.1325^2}{16}$$

$$SS_{Tr} = 0.0004$$

$$\text{ค่าองศาอิสระ (df}_{Tr}) = a - 1 = 1$$

3. ความผันแปรที่เกิดจากบล็อก

$$SS_{Bl} = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y_{.j}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_{Bl} = \frac{1}{2} \{ (0.9908)^2 + (1.2750)^2 + \dots + (41.9083)^2 \} - \frac{202.1325^2}{16}$$

$$SS_{Bl} = 1253.6382$$

$$\text{ค่าองศาอิสระ (df}_{Bl}) = b - 1 = 7$$

4. ความผันแปรที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{Bl}$$

$$SS_E = 1254.7428 - 0.0004 - 1253.6382$$

$$SS_E = 1.1042$$

$$\text{ค่าองศาอิสระ (df}_E) = (a-1)(b-1) = 7$$

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source	df	SS	MS	F _{cal}	F _{0.05}
Treatment	1	0.0004	0.0004	0.0025	5.59
Block	7	1253.6382	179.0912	1135.3187	
Error	7	1.1042	0.1577		
Total	15	1254.7428			

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

$$\text{กำหนดให้ } H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

เปิดตารางได้ค่าวิกฤต $F_{0.05;1,7} = 5.59$

จากตาราง ANOVA ได้ค่า $F_{cal} = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = 0.0025$

เนื่องจากค่า F_{cal} 0.0025 มีค่าน้อยกว่าค่าวิกฤต $F_{0.05;1,7}$ 5.59 ดังนั้นจึงไม่สามารถปฏิเสธ H_0 แสดงว่าในแต่ละครั้งของการทดลองไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ตารางที่ ง-2 แสดงจำนวนเซลล์ของการวัดเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 รุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) เดือนกุมภาพันธ์ ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

วัน	จำนวนเซลล์สาหร่ายในกุมภาพันธ์ (*10 ⁶ cell/mL)		
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	รวม (Y _j)
0	0.4900	0.4883	0.9783
1	0.9692	0.9092	1.8783
2	5.1250	6.1417	11.2667
3	12.9250	14.2167	27.1417
4	16.5667	17.9000	34.4667
5	19.0000	19.3333	38.3333
6	22.1667	21.3583	43.5250
7	22.7917	21.8583	44.6500
8	30.2417	27.8500	58.0917
9	27.6417	27.0500	54.6917
10	26.3083	25.7500	52.0583
รวม (Y _{i.})	184.2258	182.8558	367.0817 (Y _{..})

หา ANOVA โดยคำนวณทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

Treatment เป็น ครั้งของการทดลอง (a) = 2

Block เป็น จำนวนวันของการทดลอง (b) = 11

N = ab = 22

1. ความผันแปรทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_T = \{(0.4900)^2 + (0.9692)^2 + \dots + (25.7500)^2\} - \frac{367.0817^2}{22}$$

$$SS_T = 2126.0117$$

$$\text{ค่าองศาอิสระ (df}_T) = ab - 1 = 21$$

2. ความผันแปรที่เกิดจากทรีทเมนต์

$$SS_{Tr} = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_{i.}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_{Tr} = \frac{1}{11} \{(184.2258)^2 + (182.8558)^2\} - \frac{367.0817^2}{22}$$

$$SS_{Tr} = 0.0853$$

$$\text{ค่าองศาอิสระ (df}_{Tr}) = a - 1 = 1$$

3. ความผันแปรที่เกิดจากบล็อก

$$SS_{Bl} = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y_{.j}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_{Bl} = \frac{1}{2} \{(0.9783)^2 + (1.8783)^2 + \dots + (52.0583)^2\} - \frac{367.0817^2}{22}$$

$$SS_{Bl} = 2119.7612$$

$$\text{ค่าองศาอิสระ (df}_{Bl}) = b - 1 = 10$$

4. ความผันแปรที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{Bl}$$

$$SS_E = 2126.0117 - 0.0853 - 2119.7612$$

$$SS_E = 6.1651$$

$$\text{ค่าองศาอิสระ (df}_E) = (a-1)(b-1) = 10$$

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source	df	SS	MS	F _{cal}	F _{0.05}
Treatment	1	0.0853	0.0853	0.1384	4.96
Block	10	2119.7612	211.9761	343.8305	
Error	10	6.1651	0.6165		
Total	21	2126.0117			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

$$\text{กำหนดให้ } H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

$$\text{เปิดตารางได้ค่าวิกฤต } F_{0.05;1,10} = 4.96$$

$$\text{จากตาราง ANOVA ได้ค่า } F_{\text{cal}} = \frac{MS_{\text{Tr}}}{MS_E} = 0.1384$$

เนื่องจากค่า F_{cal} 0.1384 มีค่าน้อยกว่าค่าวิกฤต $F_{0.05;1,10}$ 4.96 ดังนั้นจึงไม่สามารถปฏิเสธ H_0 แสดงว่าในแต่ละครั้งของการทดลองไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ตารางที่ ง-3 แสดงจำนวนเซลล์ของการวัดเจริญเติบโตของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 รุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) ในอาหารสูตร Modified Johnson's Medium

วัน	จำนวนเซลล์สาหร่ายในอาหารสูตร Modified Johnson's Medium (*10 ⁶ cell/mL)		
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	รวม ($Y_{.j}$)
0	0.5108	0.4933	1.0042
1	0.5408	0.5233	1.0642
2	0.9542	0.8708	1.8250
3	1.5233	1.3433	2.8667
4	2.0842	1.6650	3.7492
5	3.0500	2.5750	5.6250
6	3.2083	2.8833	6.0917
7	3.4083	3.1417	6.5500
8	4.3750	3.5750	7.9500
9	4.7000	4.0083	8.7083
10	4.6333	3.6167	8.2500
รวม ($Y_{i.}$)	28.9883	24.6958	53.6842 ($Y_{..}$)
เฉลี่ย ($\bar{Y}_{i.}$)	2.6353	2.2451	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทา ANOVA โดยคำนวณทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

Treatment เป็น ครั้งของการทดลอง (a) = 2

Block เป็น จำนวนวันของการทดลอง (b) = 11

N = ab = 22

1. ความผันแปรทั้งหมดที่เกิดขึ้นในการทดลอง

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_T = \{(0.5108)^2 + (0.5408)^2 + \dots + (3.6167)^2\} - \frac{53.6842^2}{22}$$

$$SS_T = 43.6340$$

ค่าองศาอิสระ (df_T) = ab-1 = 21

2. ความผันแปรที่เกิดจากทรีทเมนต์

$$SS_{Tr} = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a Y_{i.}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_{Tr} = \frac{1}{11} \{(28.9883)^2 + (24.6958)^2\} - \frac{53.6842^2}{22}$$

$$SS_{Tr} = 0.8375$$

ค่าองศาอิสระ (df_{Tr}) = a-1 = 1

3. ความผันแปรที่เกิดจากบล็อก

$$SS_{Bl} = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b Y_{.j}^2 - \frac{Y_{..}^2}{ab}$$

$$SS_{Bl} = \frac{1}{2} \{(1.0042)^2 + (1.0642)^2 + \dots + (8.2500)^2\} - \frac{53.6842^2}{22}$$

$$SS_{Bl} = 42.2490$$

ค่าองศาอิสระ (df_{Bl}) = b-1 = 10

4. ความผันแปรที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

$$SS_E = SS_T - SS_{Tr} - SS_{Bl}$$

$$SS_E = 43.6340 - 0.8375 - 42.2490$$

$$SS_E = 0.5475$$

ค่าองศาอิสระ (df_E) = (a-1)(b-1) = 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

Source	df	SS	MS	F _{cal}	F _{0.05}
Treatment	1	0.8375	0.8375	15.2975	4.96
Block	10	42.2490	4.2249	77.1684	
Error	10	0.5475	0.0547		
Total	21	43.6340			

สมมติฐานทดสอบอิมพิลของการทดลองในแต่ละครั้ง

$$\text{กำหนดให้ } H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

$$\text{เปิดตารางได้ค่าวิกฤต } F_{0.05;1,10} = 4.96$$

$$\text{จากตาราง ANOVA ได้ค่า } F_{\text{cal}} = \frac{MS_{\text{Tr}}}{MS_E} = 15.2975$$

เนื่องจากค่า F_{cal} 15.2975 มีค่ามากกว่าค่าวิกฤต $F_{0.05;1,10}$ 4.96 ดังนั้นจึงสามารถปฏิเสธ H_0 และยอมรับ H_1 แสดงว่าในแต่ละครั้งของการทดลองแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

การทดสอบความแตกต่างของขนาดเซลล์สำหรับ *Dunaliella salina* KU11 ในรุ่น PD และ ED โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Z-test

ตารางที่ ง-4 แสดงขนาดด้านกว้างของเซลล์วันที่ 4 ของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 PD และ ED ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

PD (ไมโครเมตร)	ED (ไมโครเมตร)
3.75	2.5
7.5	2.5
5	2.5
3.75	3.75
3.75	2.5
5	2.5
7.5	2.5
3.75	3.75
2.5	2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูผู้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-4 (ต่อ)

PD (ไมโครเมตร)	ED (ไมโครเมตร)
3.75	3.75
3.75	3.75
5	2.5
5	2.5
3.75	2.5
3.75	2.5
5	2.5
5	2.5
2.5	2.5
3.75	2.5
3.75	2.5
3.75	2.5
2.5	2.5
3.75	2.5
2.5	2.5
3.75	2.5
3.75	2.5
3.75	3.75
5	2.5
3.75	2.5
5	3.75

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ t-test : Equal variances not assumed โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

Independent Sample Test						
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig.(2-tailed)
Cell Size	Equal variances assumed	10.063	0.002	5.959	58	0.000
	Equal variances not assumed			5.959	39.112	0.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมมติฐานทดสอบอทิพของการทดลองในแต่ละครั้ง

$$\text{กำหนดให้ } H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

จากผลการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า Sig.(2-tailed) 0.000 มีค่าน้อยกว่า α 0.05 แสดงว่าปฏิเสธ H_0 นั่นคือยอมรับ $H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$ (ในวันที่ 4 ของการวัดขนาดเซลล์ทางด้านกว้าง พบว่าขนาดเซลล์ด้านกว้างในรุ่นแรก (PD) แตกต่างจากขนาดเซลล์ในรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) อย่างมีนัยสำคัญ)

ตารางที่ ง-5 แสดงขนาดด้านยาวของเซลล์วันที่ 4 ของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 PD และ ED ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

PD (ไมโครเมตร)	ED (ไมโครเมตร)
7.5	7.5
7.5	7.5
5	7.5
7.5	7.5
12.5	5
7.5	5
7.5	7.5
8.75	12.5
7.5	10
6.25	6.25
6.25	7.5
7.5	7.5
5	6.25
7.5	7.5
7.5	10
7.5	10
7.5	7.5
7.5	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-5 (ต่อ)

PD (ไมโครเมตร)	ED (ไมโครเมตร)
7.5	7.5
7.5	8.75
8.75	10
6.25	7.5
7.5	8.75
6.25	7.5
7.5	8.75
6.25	8.75
7.5	10
7.5	7.5
5	7.5
5	10

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ t-test : Equal variances not assumed โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

Independent Sample Test						
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig.(2-tailed)
Cell Size	Equal variances assumed	2.020	0.161	-1.963	58	0.054
	Equal variances not assumed			-1.963	56.280	0.055

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

$$\text{กำหนดให้ } H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

จากผลการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า Sig.(2-tailed) 0.055 มีค่ามากกว่า α 0.05 แสดงว่ายอมรับ H_0 นั่นคือ $H_0 = \mu_1 = \mu_2$ (ในวันที่ 4 ของการวัดขนาดเซลล์ทางด้านยาว พบว่าขนาดเซลล์ด้านยาวในรุ่นแรก (PD) ไม่แตกต่างจากขนาดเซลล์ในรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) อย่างมีนัยสำคัญ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-6 แสดงขนาดด้านกว้างของเซลล์วันที่ 6 ของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 PD และรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

PD (ไมโครเมตร)	ED (ไมโครเมตร)
3.75	3.75
6.25	2.5
2.5	3.75
3.75	3.75
5	2.5
5	3.75
2.5	3.75
2.5	3.75
3.75	2.5
3.75	3.75
5	3.75
5	2.5
5	5
5	3.75
3.75	2.5
5	3.75
5	5
2.5	5
2.5	2.5
2.5	2.5
5	2.5
5	3.75
5	3.75
2.5	2.5
3.75	2.5
5	5
5	2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-6 (ต่อ)

PD (ไมโครเมตร)	ED (ไมโครเมตร)
3.75	3.75
7.5	2.5
5	2.5

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ t-test : Equal variances not assumed โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

Independent Sample Test						
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig.(2-tailed)
Cell Size	Equal variances assumed	4.195	0.045	3.130	58	0.003
	Equal variances not assumed			3.130	51.910	0.003

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

$$\text{กำหนดให้ } H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

จากผลการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า Sig.(2-tailed) 0.003 มีค่าน้อยกว่า α 0.05 แสดงว่าปฏิเสธ H_0 นั่นคือยอมรับ $H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$ (ในวันที่ 6 ของการวัดขนาดเซลล์ทางด้านกว้าง พบว่าขนาดเซลล์ด้านกว้างในรุ่นแรก (PD) แตกต่างจากขนาดเซลล์ในรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) อย่างมีนัยสำคัญ)

ตารางที่ ง-7 แสดงขนาดด้านยาวของเซลล์วันที่ 6 ของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 PD และรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

PD (ไมโครเมตร)	ED (ไมโครเมตร)
7.5	7.5
7.5	5
6.25	8.75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-7 (ต่อ)

PD (ไมโครเมตร)	ED (ไมโครเมตร)
7.5	7.5
12.5	8.75
7.5	8.75
7.5	7.5
6.25	8.75
7.5	5
5	5
8.75	7.5
7.5	7.5
10	5
7.5	10
7.5	8.75
7.5	10
8.75	8.75
7.5	11.25
7.5	8.75
6.25	8.75
8.75	7.5
5	7.5
7.5	7.5
7.5	7.5
6.25	8.75
5	7.5
7.5	11.25
8.75	7.5
7.5	7.5
5	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ t-test : Equal variances not assumed โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

Independent Sample Test						
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig.(2-tailed)
Cell Size	Equal variances assumed	1.011	0.319	-1.527	58	0.132
	Equal variances not assumed			-1.527	57.799	0.132

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

$$\text{กำหนดให้ } H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

จากผลการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า Sig.(2-tailed) 0.132 มีค่ามากกว่า α 0.05 แสดงว่ายอมรับ H_0 นั่นคือ $H_0 = \mu_1 = \mu_2$ (ในวันที่ 6 ของการวัดขนาดเซลล์ทางด้านยาว พบว่าขนาดเซลล์ด้านยาวในรุ่นแรก (PD) ไม่แตกต่างจากขนาดเซลล์ในรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) อย่างมีนัยสำคัญ)

ตารางที่ ง-8 แสดงขนาดด้านกว้างของเซลล์วันที่ 9 ของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 PD และรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

PD (ไมโครเมตร)	ED (ไมโครเมตร)
3.75	3.75
3.75	3.75
6.25	3.75
2.5	3.75
3.75	3.75
5	2.5
7.5	2.5
7.5	2.5
2.5	2.5
2.5	3.75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-8 (ต่อ)

PD (ไมโครเมตร)	ED (ไมโครเมตร)
5	5
7.5	3.75
5	5
3.75	3.75
2.5	5
5	5
6.25	3.75
2.5	2.5
7.5	3.75
5	2.5
3.75	3.75
5	3.75
3.75	3.75
2.5	2.5
5	3.75
5	2.5
3.75	3.75
5	5
5	5
2.5	3.75

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ t-test : Equal variances not assumed โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

Independent Sample Test						
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig.(2-tailed)
Cell Size	Equal variances assumed	12.496	0.001	2.605	58	0.012
	Equal variances not assumed			2.605	44.205	0.012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

$$\text{กำหนดให้ } H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

จากผลการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า Sig.(2-tailed) 0.012 มีค่าน้อยกว่า α 0.05 แสดงว่าปฏิเสธ H_0 นั่นคือยอมรับ $H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$ (ในวันที่ 9 ของการวัดขนาดเซลล์ทางด้านกว้าง พบว่าขนาดเซลล์ด้านกว้างในรุ่นแรก (PD) แตกต่างจากขนาดเซลล์ในรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) อย่างมีนัยสำคัญ)

ตารางที่ ง-9 แสดงขนาดด้านยาวของเซลล์วันที่ 9 ของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 PD และ ED ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

PD (ไมโครเมตร)	ED (ไมโครเมตร)
3.75	7.5
3.75	7.5
8.75	7.5
5	7.5
12.5	6.25
7.5	6.25
7.5	7.5
7.5	7.5
6.25	7.5
3.75	8.75
8.75	8.75
7.5	7.5
6.25	8.75
7.5	7.5
6.25	7.5
7.5	7.5
12.5	10
6.25	10
8.75	8.75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-9 (ต่อ)

PD (ไมโครเมตร)	ED (ไมโครเมตร)
6.25	7.5
8.75	7.5
8.75	6.25
7.5	7.5
6.25	6.25
7.5	7.5
10	6.25
7.5	7.5
10	7.5
5	5
8.75	7.5

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ t-test : Equal variances not assumed โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

Independent Sample Test						
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig.(2-tailed)
Cell Size	Equal variances assumed	8.478	0.005	-0.189	58	0.851
	Equal variances not assumed			-0.189	42.215	0.851

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

$$\text{กำหนดให้ } H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

จากผลการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า Sig.(2-tailed) 0.851 มีค่ามากกว่า α 0.05 แสดงว่ายอมรับ H_0 นั่นคือ $H_0 = \mu_1 = \mu_2$ (ในวันที่ 9 ของการวัดขนาดเซลล์ทางด้านยาว พบว่าขนาดเซลล์ด้านยาวในรุ่นแรก (PD) ไม่แตกต่างจากขนาดเซลล์ในรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) อย่างมีนัยสำคัญ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบความแตกต่างของปริมาณชีวมวลของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 PD) และ ED โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Z-test

ตารางที่ ง-10 แสดงปริมาณชีวมวลในวันที่ 4 ของการวัดการเจริญของสาหร่าย *Dunaliella salina*

KU11 PD และ ED ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

ปริมาณชีวมวล PD (g/l)	ปริมาณชีวมวล ED (g/l)
5.8200	5.6400
5.6700	5.3100
5.5800	5.5000

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ t-test : Equal variances not assumed โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

Independent Sample Test						
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig.(2-tailed)
Cell Size	Equal variances assumed	0.231	0.656	1.744	4	0.156
	Equal variances not assumed			1.744	3.665	0.163

สมมติฐานทดสอบอรรถิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

$$\text{กำหนดให้ } H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

จากผลการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า Sig.(2-tailed) 0.163 มีค่ามากกว่า α 0.05 แสดงว่ายอมรับ H_0 นั่นคือ $H_0 = \mu_1 = \mu_2$ (ในวันที่ 4 ของการวัดปริมาณชีวมวล พบว่าปริมาณชีวมวลของสาหร่ายในรุ่นแรก (PD) ไม่แตกต่างจากปริมาณชีวมวลของสาหร่ายในรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium อย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-11 แสดงปริมาณชีวมวลในวันที่ 6 ของการวัดการเจริญของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 PD และ ED ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

ปริมาณชีวมวล PD (g/l)	ปริมาณชีวมวล ED (g/l)
5.6800	5.9700
5.8700	5.6400
5.3900	6.0700

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ t-test : Equal variances not assumed โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

Independent Sample Test						
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig.(2-tailed)
Cell Size	Equal variances assumed	0.001	0.981	-1.294	4	0.265
	Equal variances not assumed			-1.294	3.980	0.265

สมมติฐานทดสอบอิทธิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

$$\text{กำหนดให้ } H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

จากผลการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า Sig.(2-tailed) 0.265 มีค่ามากกว่า α 0.05 แสดงว่ายอมรับ H_0 นั่นคือ $H_0 = \mu_1 = \mu_2$ (ในวันที่ 6 ของการวัดปริมาณชีวมวล พบว่าปริมาณชีวมวลของสาหร่ายในรุ่นแรก (PD) ไม่แตกต่างจากปริมาณชีวมวลของสาหร่ายในรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ง-12 แสดงปริมาณชีวมวลในวันที่ 9 ของการวัดการเจริญของสาหร่าย *Dunaliella salina* KU11 PD และ ED ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium

ปริมาณชีวมวล PD (g/l)	ปริมาณชีวมวล ED (g/l)
6.1200	6.2400
6.5600	6.4300
5.9800	6.2400

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ t-test : Equal variances not assumed โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24

Independent Sample Test						
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig.(2-tailed)
Cell Size	Equal variances assumed	3.824	0.122	-0.448	4	0.677
	Equal variances not assumed			-0.448	2.517	0.690

สมมติฐานทดสอบอรรถิพลของการทดลองในแต่ละครั้ง

$$\text{กำหนดให้ } H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

จากผลการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ค่า Sig.(2-tailed) 0.690 มีค่ามากกว่า α 0.05 แสดงว่ายอมรับ H_0 นั่นคือ $H_0 = \mu_1 = \mu_2$ (ในวันที่ 9 ของการวัดปริมาณชีวมวล พบว่าปริมาณชีวมวลของสาหร่ายในรุ่นแรก (PD) ไม่แตกต่างจากปริมาณชีวมวลของสาหร่ายในรุ่นปรับปรุงพันธุ์ (ED) ในอาหารสูตร Modified Ramaraj Medium อย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้