สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp.

นาย ชิตเวท แสงสวัสดิ์
นาย ทนงศักดิ์ บุญขันธ์
นาย นพพล ดีภัก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67271
วัน.เดือน,ปี 22 พ.ย. 2548

.b 11622112
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# Antimicrobial efficiency of extract from *Chlorella* sp.

**Mr. Chittawet Sangsawasd**

**Mr. Tanongsak Bunkan**

**Mr. Noppon Deepak**

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

**the Degree of Bachelor of Science**

**Department of Applied Biology**

**Faculty of Science**

**King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang**

**Academic Year 2005**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**โครงงานพิเศษเรื่อง** ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp.


**นักศึกษา** นาย ชิตเวท แสงสวัสดิ์ รหัสประจำตัว 45050734

นาย ทนงศักดิ์ บุญขันธ์ รหัสประจำตัว 45050739

นาย นพพล ดีภัก รหัสประจำตัว 45050745

**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์

**สาขาวิชา** จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผศ.วีนา ชูโชติ

**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์

**คณะวิทยาศาสตร์** สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง


อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

| คณะกรรมการตรวจสอบ | ลายมือชื่อ |
|---|---|
| ประธานกรรมการ รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ | |
| กรรมการ ผศ.วีนา ชูโชติ | |
| กรรมการ ดร.จิตติ ท่าไว | |

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา


ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**โครงงานพิเศษเรื่อง** ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp.

**นักศึกษา** นาย ชิตเวท แสงสวัสดิ์
นาย ทนงศักดิ์ บุญขันธ์
นาย นพพล ดีภัก

**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

**สาขาวิชา** จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

**ปีการศึกษา** 2548

**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผศ.วีนา ชูโชติ

## บทคัดย่อ

สารสกัดจาก *Chlorella* sp. จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. $B_2$ และ *Chlorella* sp. $C_2$ ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231โดยใช้แผ่นทดสอบพบว่าสารสกัดจากน้ำหมักของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต ที่ได้จากการสกัดโดยวิธีลำดับขั้วของตัวทำละลายเมทานอล เฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล ตามลำดับ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* ATCC 10231และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ดีที่สุด มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 14.00 และ 12.33 มิลลิเมตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Special Project Title** | Antimicrobial efficiency of extract from *Chlorella* sp. |
| **Name** | Mr.Chittawet Sangsawasd |
| | Mr.Tanongsak Bunkan |
| | Mr.Noppon Deepak |
| **Department** | Applied Biology |
| **Program** | Industrial Microbiology |
| **Academic Year** | 2005 |
| **Special Project Advisor** | Asst. Prof. Weena Choochote |


**Abstract**

The extracts from three strains of *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. $B_2$ and *Chlorella* sp. $C_2$ were tested for antimicrobial activity against three genera : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 10231 by the disc diffusion method. The fermented broth of *Chlorella* sp. A0505, extracted by sequencial extraction with methanol, hexane, ethyl acetate and butanol respectively. From the results, ethyl acetate-extract of the broth was found to inhibit the growth of *Candida albicans* ATCC 10231 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 at the concentration of 3 mg / 20 µl.


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษา ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ซึ่งโครงงานพิเศษนี้จะไม่สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดีหากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.วีนา ชูโชติ ที่ให้คำปรึกษา ความรู้ต่างๆเกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะการตอบข้อซักถามของผู้จัดทำ และข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทดลองจนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ทางผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการ ดร.จิตติ ท่าไว กรรมการ ที่ให้คำแนะนำปรึกษาและกรุณาช่วยตรวจแก้ไขงานวิจัยฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องต่างๆในการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้ใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจและให้คำปรึกษาในการทำโครงงานพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆน้องๆที่คอยให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในเรื่องต่างๆทำให้โครงงานพิเศษเป็นไปด้วยดี

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้

นายชิตเวท แสงสวัสดิ์
นายทนงศักดิ์ บุญขันธ์
นายนพพล ตีภัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | ฉ |
| สารบัญรูป | ซ |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| 1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย | 2 |
| 1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ | 3 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ | |
| 2.1 ประวัติโดยสังเขปของการผลิต *Chlorella* sp. | 4 |
| 2.2 ลักษณะของสาหร่าย *Chlorella* sp. | 5 |
| 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของ *Chlorella* sp. | 8 |
| 2.4 ประโยชน์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. | 10 |
| 2.5 คุณสมบัติที่ทำให้ *Chlorella* sp. เป็นที่สนใจ ของนักวิทยาศาสตร์ | 13 |
| 2.6 วิธีการคัดเลือกพันธุ์สาหร่าย | 13 |
| 2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย | 14 |
| 2.8 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายชนิดต่างๆ | 15 |
| 2.9 ลักษณะของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย | 16 |
| 2.10 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจาก *Chlorella* sp. | 17 |
| 2.11 คุณสมบัติของยาปฏิชีวนะที่ใช้ | 24 |
| 2.12 คุณสมบัติของยาต้านจุลินทรีย์ที่ดี | 25 |
| 2.13 การจัดจำแนกประเภทของสารปฏิชีวนะ | 26 |
| 2.14 กลไกการออกฤทธิ์ของยาระงับเชื้อและยาทำลายเชื้อ | 26 |
| 2.15 คุณสมบัติของตัวทำละลายที่ดี | 27 |
| 2.16 ปัจจัยที่อาจกระทบต่อผลการทดสอบ | 27 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)


หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 29

3.2 สารเคมีและเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ 29

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง 31

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ปริมาณน้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 40

4.2 ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ 41

4.3 เปรียบเทียบสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่มีประสิทธิภาพสูง ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 43

4.4 เปรียบเทียบระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. เพื่อผลิตสาร ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด 48

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 53

เอกสารอ้างอิง 54

ภาคผนวก

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย 59

ข. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย สูตรอาหาร Mueller-hinton agar (MHA) 60

อาหารที่ใช้เก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย สูตรอาหาร Nutrient agar (NA) 60

ค. อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ สูตรอาหาร Sabourand's dextrose agar (SDA) 61

ง. คุณสมบัติทางกายภาพของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด 62

จ. ผลการยับยั้งจุลินทรีย์โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. 71

ช. การวิเคราะห์ทางสถิติ 75


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | หน้า |
|---|---|
| 2.1 แสดงส่วนประกอบทางโภชนาการ | 8 |
| 2.2 แสดงปริมาณวิตามินและเกลือแร่ | 8 |
| 2.3 แสดงปริมาณกรดไขมัน | 9 |
| 2.4 แสดงปริมาณกรดอะมิโน (w/w%) | 9 |
| 4.1 แสดงปริมาณน้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 | 40 |
| 4.2 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร | 44 |
| 4.3 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตที่ความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร | 47 |
| 4.4 แสดงปริมาณน้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตทุกๆ 2 วันที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร | 49 |
| จ-1 แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ | 71 |
| จ-2 ความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp.ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตที่ความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร | 72 |
| จ-3 แสดงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบโดยยาปฏิชีวนะ | 73 |
| จ-4 แสดงค่าเฉลี่ยความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบโดยยาปฏิชีวนะ | 74 |
| ช-1 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albican* ATCC โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลาย | 75 |
| ช-2 การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Escherichia coli* ATCC 25922ที่ 1 มิลลิกรัม | 76 |
| ช-3 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม | 76 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง (ต่อ)

**ตารางที่** **หน้า**

ช-4 การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร 77

ช-5 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม 77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

**รูปที่** **หน้า**


2.1 บ่อเลี้ยง *Chlorella* sp. แบบเปิด 5

2.2 เซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. 7

2.3 กลุ่มเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. 7

2.4 เซลล์สาหร่าย *Chlorella* อัดเม็ด 12

2.5 เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* 20

2.6 เซลล์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* 20

2.7 เซลล์ยีสต์ *Candida* sp. 21

2.8 เส้นใยราเทียมของยีสต์ *Candida* sp. 22

2.9 การแตกหน่อของยีสต์ *Candida* sp. 22

2.10 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของแอมพิซิลลิน 25

2.11 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของนิสตาติน 25

3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนเครื่องเขย่า 31

3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเพิ่มปริมาณในหลอดเพาะเลี้ยงขนาด 300 มิลลิลิตร 32

3.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ในกรวยแยก 33

3.4 การทำให้สารสกัดแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน 34

3.5 แสดงสารสกัดแห้งที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก 34

3.6 ขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเซลล์สาหร่าย 35

3.7 แสดงอุปกรณ์ในการศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 36

3.8 ขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักเชื้อ (Fermentation Broth) สาหร่าย 37

3.9 การเตรียมแผ่นทดสอบที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 38

4.2ก ผลของสารสกัดจากเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และเฮกเซนต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633 41

4.2ข ผลของสารสกัดจากเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล-อะซีเตตและบิวทานอลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633 42

4.2คผลของสารสกัดจากเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633 43


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)

**รูปที่** **หน้า**


4.3ก ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. $B_2$ และ *Chlorella* sp. $C_2$ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม) 45

4.3ข ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. $B_2$ และ *Chlorella* sp. $C_2$ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 (ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม) 46

4.3ค ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. $B_2$ และ *Chlorella* sp. $C_2$ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Candida albicans* ATCC 10231 (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม) 46

4.4 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วันต่างๆ 50

4.5 ผลของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตจากสาหร่าย *Chlorella* sp.A0505 ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่วันต่างๆ 51

4.6 ผลของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัม ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 51

4.7 ผลของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัม ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922 52

4.8 ผลของยาปฏิชีวนะนิสตาตินที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัม ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ATCC 10231 52

ง-1 สูตรโครงสร้างของสารบิวทานอล 62

ง-2 โครงสร้างของสารเอทิลอะซีเตต 64

ง-3 โครงสร้างของสารเฮกเซน 66

ง-4 โครงสร้างของสารเมทานอล 68


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบันสาหร่ายได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันมากขึ้น อาทิเช่น ใช้เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมีทั้งในรูปแคปซูล และเป็นอาหารเสริมคุณค่าทางโภชนาการ สามารถพบเห็นได้จากการประกาศขายผลิตภัณฑ์เหล่านี้ตามเว็บไซต์ต่างๆ นอกจากนี้ถ้าศึกษาจากรายงานทางวิชาการเราจะพบว่าสาหร่ายถูกนำมาใช้ในงานด้านเกษตรกรรม งานด้านโภชนาการ รวมทั้งใช้ในด้านการแพทย์และเภสัชกรรม เช่น ใช้ในการแก้ไขอาการท้องผูก ใช้รักษาอาการเป็นแผลในกระเพาะอาหาร (Lee and Rosenbaum, 2530) ใช้เป็นยาปฏิชีวนะ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์

*Chlorella* มีกำเนิดมาตั้งแต่สมัย Pre-Cambrain เป็นเวลากว่า 2พัน 5ร้อยล้านปีมาแล้ว มันเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรกที่มีนิวเคลียสแท้ภายในเซลล์ การที่มันมีชีวิตอยู่จนถึงปัจจุบันนี้ได้แสดงให้เห็นถึงความคงที่ของการเกิดและการเจริญเติบโต ความแข็งแกร่งและลักษณะพิเศษของกลไกดีเอ็นเอ คุณสมบัตินี้สำคัญยิ่งต่อการสมานบาดแผลในคน การศึกษาสาหร่ายเซลล์เดียวชนิดนี้จึงจะช่วยให้เราเข้าใจการทำงานของเซลล์ เนื่องจากว่ามันเป็นพืชขนาดเล็กมาก เบเยอริงน์ค (Beyerinck) จึงพึ่งค้นพบ *Chlorella* เป็นคนแรกในปี ค.ศ. 1890 (Steenblock, 2530)

*Chlorella* 1 กิโลกรัม มีคลอโรฟิลล์สูงกว่าสาหร่ายสไปรูลินา 4 เท่า คือมี 28.9 กรัม *Chlorella* หนัก 100 กรัม จะมีเบต้า-แคโรทีน จำนวน 180 มิลลิกรัม (Steenblock, 2530) ซึ่งเบต้า-แคโรทีน 1 โมเลกุล เป็นตัว "ต้านการให้ออกซิเจน" ที่มีฤทธิ์แรงที่สุดเมื่อเทียบกับสารประเภทแคโรทีนอยด์อย่างอื่น *Chlorella* เป็นแหล่งวิตามิน บี 12 ที่เชื่อถือได้และมีมากกว่าตับวัว *Chlorella* 1 ช้อนโต๊ะให้วิตามิน บี 12 ได้ถึง 333% ของปริมาณคนที่โตเต็มที่แล้วต้องการในหนึ่งวัน (Lee and Rosenbaum, 2530)

นอกจากนี้มีการศึกษาวิจัยพบว่าสารสกัดจาก *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260, *Chlorella vulgaris* TISTR 8261 และ *Chlorella* sp. TISTR 8445 โดยทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูงแล้วนำมาสกัดด้วยวิธีลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลายโดยใช้ตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน อะซีโตนอลและเมทานอลแล้วนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในปลา 4 สายพันธุ์ คือ *Aeromonas hydrophila, Aeromonas sobria, Edwardsiella tarda* และ *Pseudomonas flurescence*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในปลา 1 สายพันธุ์ คือ *Staphylococus aureus* พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลนั้นสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila, Staphylococus aureus* ได้ดีที่สุด(จิตราและคณะ, 2546)

ดังนั้นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไม่ว่าจะเป็นสารสกัดที่ได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ล้วนเป็นแหล่งสำคัญสำหรับการวิจัยเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่และมีประสิทธิภาพสำหรับนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคซึ่งในปัจจุบันมีเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวนมากสามารถพัฒนาตัวเองจนสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้มากขึ้น

เนื่องจากเหตุผลและความสำคัญดังกล่าว จึงทำให้โครงงานการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. เพื่อหาสายพันธุ์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ มีความสำคัญต่อการดำเนินการวิจัยในระดับสูงต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

2. เพื่อศึกษาหาสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง

3. เพื่อศึกษาหาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ทดสอบหาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

2. ทดสอบประสิทธิภาพของความเข้มข้นของสารสกัดที่ 1 และ3 มิลลิกรัมในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

3. ทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

2. ทราบสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

3. ทราบช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สาหร่ายแต่ละสายพันธุ์สร้างสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์มากที่สุด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

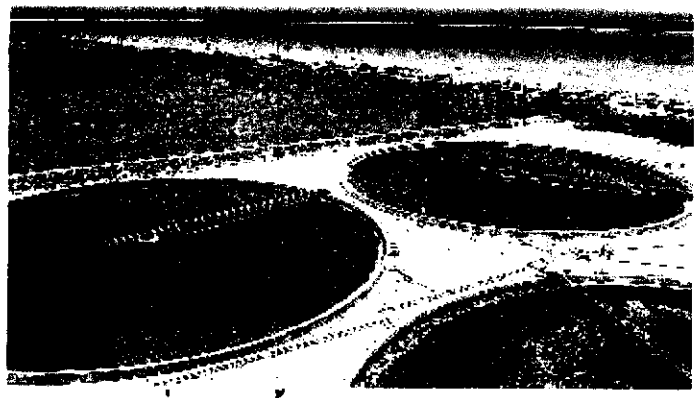
# บทที่ 2
# ทฤษฎีและหลักการ

## 2.1 ประวัติโดยสังเขปของการผลิต *Chlorella* sp.

สรวิศ (2543) กล่าวถึงประวัติของการผลิต *Chlorella* sp. ว่า ในปี 1980 Beijerinck นักแบคทีเรียวิทยาชาวฮอลันดาได้คัดแยกสาหร่าย *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp. มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยปราศจากแบคทีเรียได้เป็นครั้งแรก ต่อมาการเลี้ยงสาหร่ายใน Photobioreactor ครั้งแรกเกิดขึ้น ในปี 1944 โดย Myer and Clark ได้สร้าง Photobioreactor ระบบอัตโนมัติ ขนาด 10 ลิตรเพื่อเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. แต่ยังไม่สามารถดำเนินการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous culture) ได้ ในปี 1948-1950 ได้มีการประเมินทางเศรษฐศาสตร์โดย Stanford Research Institute สรุปว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเลี้ยง *Chlorella* sp. ในปริมาณมากเพื่อเป็นแหล่งโปรตีน ในปี 1958 ได้มีการเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ในบ่อเปิดขนาด 1,600 ตารางฟุตในประเทศญี่ปุ่น (รูปที่ 2.1) โดยสามารถดำเนินการติดต่อกันได้ตลอดปี ได้ผลผลิต 12.7 ตัน/เอเคอร์/ปี ในปี 1960 เป็นต้นมา Taiwan Chlorella Company ได้เริ่มผลิตสาหร่าย *Chlorella* sp. ในระดับอุตสาหกรรม หลังจากนั้นจึงได้มีบริษัทต่างๆผลิต *Chlorella* sp. ออกสู่ตลาดอาหารเสริมสุขภาพอีกเป็นจำนวนมาก แต่ส่วนใหญ่จะเป็นบริษัทของญี่ปุ่นและไต้หวัน การผลิตสาหร่าย *Chlorella* sp. แบบอุตสาหกรรมเริ่มขึ้นประมาณปี 1965 จนถึงกลางทศวรรษ 1970 มีการสร้างบ่อเลี้ยงขนาด 100,000 ลิตรในประเทศไต้หวัน ผลผลิตที่ได้ประมาณ 800 ตันต่อปีส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น

*Chlorella* sp. มีผนังเซลล์ที่แข็งแกร่งจึงช่วยป้องกันไม่ให้ตัวมันเองถูกย่อยทำลาย ต่อมาในปี 1977 มีการค้นพบวิธีทำให้ผนังเซลล์แตก หรือที่เรียกว่า Dyno-mill (Steenblock, 2530) เป็นการทำให้ผนังเซลล์ของสาหร่ายแตกออกโดยไม่ได้ทำลายสารอาหารภายใน (วิสัย, 2534) ทำให้ในปีเดียวกันที่ประเทศไต้หวันมีโรงงานผลิต *Chlorella* sp. 30 โรงงาน ซึ่งผลิตได้มากกว่า 1,000 ตันต่อปี เพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ (Sasson, 1991) ในปัจจุบันกระบวนการผลิต *Chlorella* sp. จะใช้การเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิค หรือเฮเทอโรโทรฟิค โดยใช้กรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เนื่องจากความ "เขียว" ของคลอโรฟิลล์เป็นคุณสมบัติสำคัญของผลิตภัณฑ์ จึงต้องมีขั้นตอนการผลิตในช่วงท้ายที่ให้สาหร่ายได้รับแสงในสภาพที่มีปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนต่ำ ซึ่งสาหร่ายจะมีปริมาณของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น (สรวิศ, 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 2.1** บ่อเลี้ยง *Chlorella* sp. แบบเปิด
ที่มา: www.chlorella-alg.com

## 2.2 ลักษณะของสาหร่าย *Chlorella* sp.

สาหร่าย *Chlorella* sp. เข้าใจกันว่าเป็นเปลาะแรกแห่ง "ห่วงโซ่อาหาร" ในโลก เนื่องจากเป็นพืชเซลล์เดียวมีผนังเซลล์ที่สมบูรณ์ (วิสัย, 2534) ชื่อ *Chlorella* มาจากคำในภาษากรีกว่า คลอโรส (Chloros) แปลว่า "เหลืองเขียว" กับคำในภาษาลาตินต่อท้ายคือ เอลล่า (Ella) แปลว่า "เล็ก" (Lee and Rosenbaum, 2530) สาหร่าย *Chlorella* sp. จัดอยู่ใน Division Chlorophyta, Class Chlorophyceae, Order Chlorellales ซึ่งเป็นแพลงก์ตอนพืชสีเขียวเซลล์เดียวที่มีขนาดเล็ก รูปร่างกลมหรือรี (กาญจนภาชน์, 2527) ไม่มี Spine ไม่สร้าง Zoospore (สกานต์, 2536) ไม่มีแฟลกเจลลา (Flagella) มีผนังเซลล์ 2 ชั้น(สิริรัตน์, 2525) *Chlorella* sp. เป็นเซลล์เดี่ยวที่มีลักษณะของเซลล์ครบถ้วน มีโครงสร้างชัดเจน (รูปที่ 2.2) นิวเคลียสค่อนข้างใหญ่ มีคลอโรพลาสต์ลอยอยู่ในไซโตพลาสซึม (วินัย, 2535) คลอโรพลาสต์มีลักษณะเว้าเป็นรูปถ้วย หรือไม่เว้า (วิภา, 2507) ภายในบริเวณคลอโรพลาสต์ จะพบไพรีนอยด์ (Pyrenoids) จำนวนไพรีนอยด์จะเป็นตัวกำหนดชนิด (Species) ของ *Chlorella* sp. (สิริรัตน์, 2525) สาหร่ายชนิดนี้สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศอย่างเดียว โดยการสร้างออโตสปอร์ มีจำนวน 4, 8 หรือ 16 (กาญจนภาชน์, 2527) โดยที่เซลล์เดิมจะแบ่งนิวเคลียสจนได้หลายๆอันในเซลล์เดิม แล้วปล่อยออกสู่ภายนอก โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ออโตสปอร์จะมีขนาดรูปร่างเหมือนเซลล์เดิมทุกประการ (สิริรัตน์, 2525) สามารถพบทั่วไปทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม และอาจอยู่ร่วมกันกับสิ่งที่มีชีวิตอื่นๆ (กาญจนภาชน์, 2527) *Chlorella* sp. แบ่งตัวขยายพันธุ์ได้รวดเร็วเช่นเดียวกับสัตว์และพืชชั้นต่ำเซลล์เดียวชนิดอื่นๆ โดยแบ่งตัวทวีคูณทุก 16-20 ชั่วโมง เมื่อมีอาหาร คาร์บอนไดออกไซด์ และแสงแดดเพียงพอ (วินัย, 2535) (รูปที่ 2.3) นอกจากนี้ *Chlorella* sp. ยังเป็นสาหร่ายที่ไม่ต้องการช่วงเวลากลางคืน(ช่วงเวลาที่ไม่มีแสง) และยังเป็นสาหร่ายที่ถูกนำไปใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการเป็นตัวแรก ในเรื่องการสังเคราะห์ด้วยแสง (Lund และ Lund, 1995) *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีผนังเซลล์แตกต่างจากสาหร่ายชนิดอื่น คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสปอโรโพลเลนนิน (sporopollenin) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไอโซพรีน มันประกอบด้วยผนังเซลล์แบบ โพลเลน (pollen) (Sengbusch, 2003)

*Chlorella* sp. เท่าที่พบมี 11 ชนิด ได้แก่ *Chlorella vulgaris, Chlorella pyrenoidosa, Chlorella conglomerala, Chlorella simplex, Chlorella miniala, Chlorella ellipsoidea, Chlorella protothecoides, Chlorella saccharophila, Chlorella acuminate, Chlorella faginea* และ *Chlorella variegata* โดยมีลักษณะที่ใช้ในการจำแนกคือ รูปร่างเซลล์ ความหนาแน่นของผนังเซลล์ ขนาดของเซลล์ ลักษณะของเม็ดแป้ง (สกานต์, 2536) ชนิดที่นิยมนำมาใช้เป็นอาหารมากที่สุดคือ *Chlorella pyrenoidosa* ซึ่งมีสารอาหารที่ทรงคุณค่าอยู่มากมายภายในเซลล์ เติบโตรวดเร็ว แต่มีผนังเซลล์หนากว่าชนิดอื่น (วินัย, 2535) *Chlorella* เป็นอาหารเสริมที่จำหน่ายมากที่สุดในประเทศญี่ปุ่น ประมาณถึงปีละ 1,000 ตัน มีจำหน่ายในรูปของเม็ดขนาดเล็ก ชนิดผง หรือชนิดน้ำ ซึ่งเรียกว่า CGF (Chlorella Growth Factor)

Buri และคณะ (1976) พบว่า *Chlorella* sp. สามารถทนและปรับตัวในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือสูงได้ดี โดยพบอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญจากสภาวะปกติ

*Chlorella* sp. มีขนาดเล็ก 3 - 5 ไมโครเมตร นิยมใช้เป็นอาหารของโรติเฟอร์ *Brachionus plicatilis* โรติเฟอร์ตังกล่าวโดยเฉพาะที่เลี้ยงด้วย เป็น *Chlorella* sp. อาหารที่ดีของลูกกุ้ง (ธิดาและมาวิทย์, 2538) *Chlorella* sp. บางชนิดพบอยู่ในสิ่งมีชีวิตไม่มีกระดูกสันหลัง เรียกว่า *Zoochlorella* โดยในพวก Ciliate นั้น จะมี *Chlorella* sp. อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Symbiotic form) เพื่อใช้ประโยชน์จากผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสง (Lund และ Lund, 1995) โดยการอาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันนี้ *Chlorella* sp. จะอาศัยอยู่ในแวคิวโอลและสังเคราะห์ด้วยแสงพร้อมทั้งปลดปล่อยน้ำตาลมอลโตสให้แก่เซลล์เจ้าบ้าน (Host) โดย *Chlorella* sp. นั้นจะอาศัยอยู่ ในแวคิวโอล ที่มีสภาพความเป็นกรดด่างต่ำ (Lee, 1999) *Zoochlorella* นั้นมีขนาดเล็ก รูปร่างกลมหรือรูปไข่ อาศัยอยู่เดี่ยวๆหรืออยู่เป็นกลุ่ม โดยเฉพาะบนดิน และบนพื้นผิวที่เปียกชื้น (Prescott, 1987) นอกจากนี้ ยังพบมันอาศัยอยู่ร่วมกับไฮดราโดยยึดเกาะที่ลำตัวและหนวดของมัน (Lund และ Lund, 1995) ฟองน้ำและสัตว์ขนาดเล็กๆ (Microfauna) อื่นๆ (Prescott, 1987) *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีผนังเซลล์แตกต่างจากสาหร่ายชนิดอื่น คือ เป็นสปอโรโพลเลนนิน (Sporopollenin) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไอโซพรีน มันประกอบด้วยผนังเซลล์แบบ โพลเลน (Pollen) (Sengbusch, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 2.2** เซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp.

ที่มา: CNN, 2000

**รูปที่ 2.3** กลุ่มเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp.

ที่มา: Itasca State Park Microbial Observatory

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของ *Chlorella* sp.

**ตารางที่ 2.1** แสดงส่วนประกอบทางโภชนาการ (วิสัย, 2534)

| | |
|---|---|
| ความชื้น | 4.6 % |
| โปรตีน | 58.4 % |
| คาร์โบไฮเดรต | 23.2 % |
| ไขมัน<br>(มากกว่า 80% เป็นไขมันอิ่มตัว) | 9.3 % |
| ไฟเบอร์ | 0.3 % |
| เถ้า | 4.2 % |
| คลอโรฟิลล์ | 1.7 % |
| แคลอรี | 411 ต่อ 100 กรัม |

**ตารางที่ 2.2** แสดงปริมาณวิตามินและเกลือแร่ (Steenblock, 2530)

| | |
|---|---|
| วิตามิน เอ | 55,500.0 ไอยู/100 ก. |
| เบต้า-แคโรทีน | 180.8 ม.ก./100 ก. |
| คลอโรฟิล เอ | 1469.0 ม.ก./100 ก. |
| คลอโรฟิล บี | 613.0 ม.ก./100 ก. |
| Thiamine (วิตามิน บี-1) | 1.5 ม.ก./100 ก. |
| Riboflavin (วิตามิน บี-2) | 4.8 ม.ก./100 ก. |
| Pyridoxine (วิตามิน บี-6) | 1.7 ม.ก./100 ก. |
| วิตามิน บี-12 | 125.9 ม.ก./100 ก. |
| วิตามิน ซี | 15.6ม.ก./100 ก. |
| วิตามิน อี | <1.0 ไอยู/100 ก. |
| Niacin | 23.8 ม.ก./100 ก. |
| Pantothenic acid | 1.3 ม.ก./100 ก. |
| Folic acid | 26.9 ม.ก./100 ก. |
| Biotin | 191.6 ม.ก./100 ก. |
| PABA | 0.6 ม.ก./100 ก. |
| Inositol | 165.0 ม.ก./100 ก. |
| แคลเซียม | 203.0 ม.ก./100 ก. |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.2 (ต่อ)**

| | |
|---|---|
| ฟอสฟอรัส | 989.0 ม.ก./100 ก. |
| ไอโอดีน | 600.0 ม.ก./100 ก. |
| แมกนีเซียม | 315.0 ม.ก./100 ก. |
| เหล็ก | 167.0 ม.ก./100 ก. |
| สังกะสี | 71.0 ม.ก./100 ก. |
| ทองแดง | 0.08 ม.ก./100 ก. |

**ตารางที่ 2.3** แสดงปริมาณกรดไขมัน (Steenblock, 2530)

| | |
|---|---|
| กรดไขมันไม่อิ่มตัว | 81.8 % |
| กรดไขมันอิ่มตัว | 18.2 % |
| $C_{14:0}$ | 0.6 % |
| $C_{14:1}$ | 0.9 % |
| $C_{14:2}$ | 0.9 % |
| $C_{16:0}$ | 15.6 % |
| $C_{16:1}$ | 9.1 % |
| $C_{16:2}$ | 5.5 % |
| $C_{16:3}$ | 17.1 % |
| $C_{18:0}$ | 2.0 % |
| $C_{18:1}$ | 10.0 % |
| $C_{18:2}$ | 15.5 % |
| $C_{18:3}$ | 22.8 % |

**ตารางที่ 2.4** แสดงปริมาณกรดอะมิโน (w/w%) (Steenblock, 2530)

| | |
|---|---|
| Lysine | 3.46 |
| Histidine | 1.29 |
| Arginine | 3.64 |
| Aspartic acid | 5.20 |
| Threinine | 2.70 |
| Serine | 2.78 |
| Glutamic acid | 6.29 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.4 (ต่อ)**

| | |
|---|---|
| Proline | 2.93 |
| Glycine | 3.40 |
| Alanine | 4.80 |
| Cystine | 0.38 |
| Valine | 3.64 |
| Methionine | 1.45 |
| Isoleucine | 2.63 |
| Leucine | 5.26 |
| Tyrosine | 2.09 |
| Phenylalanine | 3.08 |
| Ornithine | 0.06 |
| Tryptophan | 0.59 |

## 2.4 ประโยชน์ของสาหร่าย *Chlorella* sp.

ในปี พ.ศ.2525 มีรายงานว่า *Chlorella* ช่วยกำจัดสารประกอบแอมโมเนีย ซึ่งเป็นของเสียในบ่อปลาโดยทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella* แบบต่อเนื่องในขวดขนาด 4 ลิตร เพื่อถ่ายลงในบ่อเลี้ยงปลา เปรียบเทียบคุณภาพน้ำในบ่อที่ใส่และไม่ใส่ พบว่าน้ำในบ่อที่ใส่ *Chlorella* มีสมบัติทั่วไปทางกายภาพดีกว่า และใช้เวลานานกว่าก่อนที่จะเปลี่ยนน้ำ จากนั้นเมื่อนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี พบว่าสารประกอบแอมโมเนียไนโตรเจนซึ่งเป็นของเสียในบ่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนเตรตโดยสมบูรณ์ และไม่พบว่ามีไนไตรต์เหลืออยู่ (สิริรัตน์, 2525) ต่อมาในปีพ.ศ. 2538 มีรายงานการตกตะกอน *Chlorella* น้ำเค็มเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากเป็นอาหารที่ดีของลูกกุ้งทะเลในระยะ mysis (ธิดาและมาวิทย์, 2538) และยังมีรายงานการนำ *Chlorella* sp. (K3) ที่ได้จากการเลี้ยงในน้ำกากส่าเหล้าเพื่อเป็นอาหารของ *Moina macrocopa* ซึ่งเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่เป็นอาหารจำเป็นต่อลูกปลาน้ำจืด (จรูญ, 2531) ในทางด้านการแพทย์ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella pyrenoidosa* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบได้คือ *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Bacillus subtilis, Bacterium coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Pratt และคณะ, 1944) ในด้านการค้นคว้าเกี่ยวกับแร่ธาตุทางโภชนาการ ได้มีการใช้สาหร่ายเซลล์เดียว เช่น *Chlorella* มาศึกษา เพื่อที่จะศึกษาปัญหาสำคัญในทางสรีรวิทยาของพืช เพื่อเป็นหลักในการที่จะเข้าใจความสำคัญของแร่ธาตุต่างๆที่เกี่ยวข้องกับพืชขั้นสูง (Burlow, 1953 อ้างถึงใน วิภา, 2507)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนั้น ยังได้ประโยชน์ในการศึกษาทางเทคนิคเกี่ยวกับเอนไซม์สภาพของการขาดธาตุอาหารทุกชนิด สามารถศึกษาได้โดยไม่ต้องใช้เวลานาน การเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึม และการแลกเปลี่ยนแก๊สก็สามารถวัดหรือตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว และมีความแน่นอนมากกว่าพืชอย่างอื่น (Pirson, 1955 อ้างถึงใน วิภา, 2507) มีการค้นพบผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ (Natural product) ประเภท Peroxy ในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ซึ่งเป็นสาร Steroidal endoperoxides ที่พบว่ามีการยับยั้งของการชักนำให้เกิดการอักเสบและส่งเสริมการเกิดเนื้องอกในหนูทดลอง (Casteel, 1999)

สิริรัตน์ (2525) ได้กล่าวถึงประโยชน์ *Chlorella* sp. ดังนี้

1.ใช้เป็นอาหาร

1.1 เป็นอาหารมนุษย์ โดยใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนในอนาคต ใช้ผสมลงในน้ำนมทำเป็นเครื่องดื่มทำให้รสดีขึ้น

1.2 เป็นห่วงโซ่อาหาร คือ ใช้เป็นอาหารสัตว์ทะเลตัวอ่อน เช่น ลูกกุ้ง ลูกปลา หรือใช้เป็นอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนสัตว์

2. ทางด้านนิเวศวิทยา เป็นแหล่งสำคัญในการผลิดก๊าซออกซิเจน หรือใช้ในขบวนการกำจัดน้ำเสีย น้ำโสโครก

3. ด้านกสิกรรม ช่วยปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของดินให้เหมาะแก่การเจริญของพืช

4. ด้านการแพทย์ ใช้ผลิตสารแอนติไบโอติค คือ สารคลอเรลลิน (Chlorellin) ซึ่งเป็นสารใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

5. ด้านวิจัยและการศึกษา เช่นใช้ในการศึกษาขบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ขบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีภายใน (Metabolism)

Hansakul (1991) พบว่า *Chlorella* sp. มีประโยชน์หลายอย่าง อาทิเช่น ช่วยทำให้การขับถ่ายดีขึ้น เป็นอาหารเสริมให้กับผู้หญิงตั้งครรภ์ ป้องกันการเป็นไข้หวัด ช่วยทำลายสารพิษ กระตุ้นการเจริญเติบโตของเด็ก ช่วยให้ร่างกายฟื้นฟูได้รวดเร็วขึ้น

Steenblock (2530) กล่าวถึงประโยชน์ของ *Chlorella* sp. คือ *Chlorella* sp. ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโรค โดยการฉีด คลอเรลแลน(Chlorellan) แล้วพบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดสารคาร์บอนดีกว่าเม็ดเลือดขาวธรรมดา ส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาร์ไรด์จากผนังเซลล์ของ *Chlorella* sp. ทำปฏิกิริยากับมะเร็งโดยไปกระตุ้นการผลิต Interferon และลดจำนวนเซลล์กำจัดเพิ่มเซลล์ช่วยในผู้ป่วยโรคมะเร็ง *Chlorella* sp. ช่วยในการกำจัดสารพิษ เช่น แคดเมียม และการป้องกันการเมาค้าง โดยช่วยทำให้ตับขจัดแอลกอฮอล์ออกจากร่างกาย อีกทั้งยังช่วยปรับภาวะเป็นพิษของลำไส้ให้เป็นปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lee and Rosenbaum (2530) กล่าวถึงประโยชน์ของ *Chlorella* sp. คือ เพิ่มความแข็งแรงให้กับระบบภูมิคุ้มกันโรคแก่เรา เร่งการหายของแผล ทั้งแผลที่เกิดจากการบาดเจ็บและแผลเรื้อรัง (Ulcers) ช่วยปกป้องเราจากสารพิษและมลภาวะ ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารเป็นปกติและช่วยในการขับถ่ายอุจจาระ กระตุ้นการเจริญเติบโตของร่างกายและทดแทนซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสื่อมสลายชะลอความชรา และปกป้องเราจากกัมมันตภาพรังสีทั้งหลาย และ ได้รายงานว่ามีการศึกษาการใช้สาหร่าย *Chlorella* sp. เพื่อป้องกันโรคไข้หวัดในประเทศญี่ปุ่น ในปี 1971 โดยการทดลองกับกะลาสีเรือญี่ปุ่นจำนวน 1000 คนซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกจะได้รับประทานสาหร่าย *Chlorella* sp. อัดเม็ด (รูปที่ 2.4) วันละ 2 กรัมต่อวัน(10 เม็ด) ส่วนกลุ่มที่สองไม่ได้รับประทานสาหร่าย *Chlorella* sp. อัดเม็ด เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน พบว่ากลุ่มกะลาสีเรือที่ไม่ได้รับประทานสาหร่าย *Chlorella* sp. อัดเม็ดจะเป็นไข้หวัดมากกว่ากะลาสีกลุ่มที่ได้รับสาหร่าย *Chlorella* sp. อัดเม็ดถึง 41% และในปี 1973 ในประเทศญี่ปุ่นได้ศึกษาพบว่าเส้นใยจากผนังเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. มีประสิทธิภาพในการดูดซับโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว แคดเมียม เมื่อรับประทานสาหร่าย *Chlorella* sp. โลหะหนักที่มีอยู่ในร่างกาย จะถูกกำจัดออกมาทางปัสสาวะและอุจจาระ นอกจากนี้คลอโรฟิลล์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. จะช่วยเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างวิตามินบีในลำไส้ซึ่งจะช่วยให้การเคลื่อนตัวของลำไส้ดีขึ้นจึงมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคท้องผูก

**รูปที่ 2.4** เซลล์สาหร่าย *Chlorella* อัดเม็ด

**ที่มา:** www.chlorella-alg.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 คุณสมบัติที่ทำให้ *Chlorella* sp. เป็นที่สนใจ ของนักวิทยาศาสตร์

สกานต์ (2536) ได้กล่าวถึงคุณสมบัติที่ทำให้นักวิทยาศาสตร์สนใจการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ดังนี้

1. มีคุณค่าทางอาหารสูง มีโปรตีนอยู่มาก ประมาณ 55.6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก

2. สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมหลายแบบ ดังนั้นสามารถเลี้ยงในบ่อเปิดซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสง อยู่ตลอดเวลาได้ ทำให้ต้นทุนต่ำกว่าระบบปิด

3. สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงระดับอุตสาหกรรม ซึ่งมักจะเพาะเลี้ยงแบบ Batch culture การใช้สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็ว จะทำให้สามารถเลี้ยงได้หลายครั้งในระยะเวลาเท่ากันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีการเจริญเติบโตช้ากว่า

4. ประกอบไปด้วยวิตามินที่สำคัญต่อมนุษย์หลายชนิด เช่น มี เบตา-แคโรทีน ซึ่ง 1 มิลลิกรัม จะให้วิตามิน เอ 1,500 ไอยู ดังนั้นสามารถใช้เป็นวิตามินทดแทนได้

5. อาจใช้เป็นวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ไขมันของสาหร่ายมีลักษณะใกล้เคียงกับไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ที่ใช้ในการทำสีและแล็กเกอร์ ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารหลายชนิด เช่น ขนมปัง คุกกี้ ไอศกรีม หมากฝรั่ง และนอกจากนี้ยังมี เบตา-แคโรทีน ซึ่งสามารถนำไปใช้ทำสีผสมอาหารได้

6. ใช้ในโครงการอวกาศ เพื่อใช้สร้างออกซิเจน และกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์

7. ใช้ในทางการแพทย์ ทั้งนี้เพราะมีสารประกอบหลายชนิดที่ช่วยในการเจริญของสัตว์ และช่วยต่อต้านแผลมีหนองได้ (Opposing ulcers)

8. ใช้ในการกำจัดน้ำเสีย และ *Chlorella* sp. ที่ได้จากการนี้สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้

9. ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงน้อย ทั้งนี้เพราะเมื่อต้องการโปรตีนในปริมาณเท่ากันจะต้องใช้พื้นที่ในการเลี้ยงพืชหรือสัตว์มากกว่าในการเลี้ยง *Chlorella* sp.

## 2.6 วิธีการคัดเลือกพันธุ์สาหร่าย

วิภา (2507) กล่าวถึงวิธีการคัดเลือกพันธุ์สาหร่ายไว้ว่า การคัดเลือกพันธุ์สาหร่ายที่กำลังเจริญเติบโตเหมาะสม ย่อมมีความสัมพันธ์ในการที่จะคัดเลือก หรือออกแบบเครื่องมือในการเพาะเลี้ยง ปัจจุบันนี้ มีการมุ่งที่จะคัดเลือกพันธุ์ที่เติบโตเร็วมีน้ำหนักมาก และอาจจะคัดเลือกจนถึงคุณค่าในทางอาหารและส่วนประกอบทางเคมี นอกจากนี้ ยังอาจจะคำนึงถึง

ก) ความสามารถที่จะทนทานต่อการปะปนของจุลินทรีย์อย่างอื่น

ข) การขับถ่ายสารอินทรีย์ออกจากเซลล์ในระหว่างที่กำลังเติบโต เราต้องการให้ขับถ่ายให้น้อยที่สุดเท่าที่จะน้อยได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค) ขนาดเซลล์ไม่ใหญ่จนกระทั่งตกตะกอนง่าย หรือเล็กมากจนกระทั่งยากที่จะทำให้แยกออกจากกันได้

## 2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย

วิภา (2507) พบว่าการเลี้ยง *Chlorella* sp. ในห้องปฏิบัติการในสภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวชนิดนี้ให้เติบโตได้ดี มีดังต่อไปนี้ คือ

1. ต้องมีธาตุอาหารในปริมาณความเข้มข้นที่พอเหมาะ พร้อมทั้งมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่พอดี

2. ต้องจัดสภาพแสงที่มีความเข้มที่เหมาะสม

3. รักษาอุณหภูมิให้อยู่สภาพที่เหมาะกับความต้องการ

4. ต้องมีการกวน เพื่อป้องกันการตกตะกอนของเซลล์ เพื่อให้สาหร่ายสามารถจะได้รับแสงและธาตุอาหารอย่างสม่ำเสมอกัน

สกานต์ (2536) ได้กล่าวถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยง *Chlorella* sp. ดังนี้

1. องค์ประกอบของอาหาร ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และธาตุอาหารที่ต้องการปริมาณมากอื่นๆ ได้แก่ ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แมกนีเซียม ฯลฯ นอกจากนี้คือ พวกธาตุอาหารที่ต้องการปริมาณน้อย ได้แก่ แมงกานีส เหล็ก สังกะสี ทองแดง และโมลิบดีนัม

2. สภาวะการเพาะเลี้ยง

2.1 แสง เป็นปัจจัยสำคัญมากตัวหนึ่งในการสังเคราะห์ด้วยแสง อัตราการเจริญของ *Chlorella* sp. เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแสงเพิ่มขึ้น และจะเริ่มคงที่เมื่อแสงมีความเข้มถึงจุดอิ่มตัว ซึ่งจุดอิ่มตัวของแสงนี้อยู่ในช่วง 4,000-30,000 ลักซ์ แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่าย

การได้รับแสงในปริมาณมากเกินไป จะทำให้รงควัตถุถูกทำลาย สาหร่ายจะมีสีซีดจางและตายในที่สุด หลังจากกระบวนการ โฟโตออกซิเดชัน (หรือโฟโตลิซิส) โฟโตออกซิเดชัน จะกิดขึ้นหลังจากมีระยะ แล็กเฟส และมีการลดลงของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงซึ่งเรียกช่วงนี้ว่า โฟโตอินฮิบิชัน

2.2 อุณหภูมิ *Chlorella* sp. สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่จำกัดตั้งแต่ 15-40 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่าย

2.3 การให้อากาศ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อ *Chlorella* sp. มีการเพิ่มจำนวนจะมีการตกตะกอนทำให้สาหร่ายได้รับแสงไม่ทั่วถึง ดังนั้นจึงต้องมีการให้อากาศเพื่อช่วยให้ได้รับแสงอย่างทั่วถึงและยังเป็นการกระจายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำด้วย รวมทั้งเป็นการทำให้ก๊าซออกซิเจนกลับสู่บรรยากาศได้เร็วขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของสาหร่าย นอกจากนี้ยังมีบทบาทต่อการละลายของเกลือ และสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆในน้ำซึ่งอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษ หรือยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงต้องควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารให้อยู่ในช่วง 5.6-6.5

2.5 น้ำ ถ้าใช้น้ำประปาจะต้องคำนึงถึงปริมาณคลอรีนที่อาจมีมากเกินไป ซึ่งอาจแก้ปัญหาได้โดยการเก็บน้ำไว้มากกว่า 1 วันก่อนนำไปใช้ ถ้าใช้น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ อาจมีแร่ธาตุต่างๆปนอยู่ ดังนั้นจึงควรที่จะมีการตรวจสอบปริมาณแร่ธาตุในแหล่งน้ำที่เลือกใช้ก่อนนำมาใช้

## 2.8 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายชนิดต่างๆ

มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella pyrenoidosa* พบว่าสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เรียกว่า คลอเรลลิน (Chlorellin) ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Bacillus subtilis, Bacterium coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Pratt และคณะ, 1944) และมีเอกสารรายงานว่า สามารถแยกโปรตีนชนิดใหม่ที่มีชื่อว่า Cyanovirin-N (CV-N) ซึ่งกำลังเป็นที่สนใจในคุณประโยชน์ของสาร คือเป็นสาร Anti-human immunodeficiency virus (HIV) ซึ่งสามารถแยกได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Nostoc ellipsosporum* (O'Keefe, 2001) นอกจากนี้เอกสารของ Lima-Filho และคณะ (2002) ศึกษาวิจัยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสาหร่ายขนาดใหญ่ 6 ชนิด ที่เก็บจากชายฝั่งทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล พบว่าสารสกัดที่สกัดจาก *Amasia multifida* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่อยู่ในดิวิชัน โรโดไฟร์ต้า ที่ใช้เฮกเซนเป็นตัวสกัดให้ผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi, Salmonella choleraesuis, Serratia marcescens, Vibrio cholerae* และแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*

ชลธิชาและชัยสิทธิ์ (2545) สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ทำโดยวิธีสกัดแบบลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลายโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์มและเมทานอล ตามลำดับ เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สกัดโดยวิธีทำให้เซลล์สาหร่ายแตก จากนั้นใช้ตัวทำละลายดังกล่าวและเซลล์สาหร่าย ในอัตราส่วน 1:1 โดยเทียบเป็นมิลลิลิตรของสารละลายต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งมาสกัด ซึ่งจะใช้เวลา 48 ชั่วโมงในการสกัดแต่ละตัวทำละลาย แล้วนำแต่ละชั้นของตัวทำละลายมาทำให้แห้ง จากนั้นจึงนำสารสกัดแต่ละชั้นมาทำละลายในเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พงศ์ธรและคณะ (2544) สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. โดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดพร้อมๆกัน ซึ่งวิธีการสกัดนั้นทำได้โดยการนำเซลล์สาหร่ายไปทำให้แตกโดยเครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูง (Sonics vibra cell) แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย อันประกอบไปด้วย น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1:2:1 โดยเทียบเป็นมิลลิลิตรของสารละลายต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง สารละลายจะแบ่งได้เป็น 3 ชั้น เลือกชั้นที่เป็นคลอโรฟอร์ม แล้วนำไประเหยแห้งแบบลดความดันจนสารสกัดแห้ง จากนั้นนำมาทำละลายในเมทานอล

Bansimir และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาวิจัยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาจากสาหร่ายทะเล 26 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดจาก *Asparagopsis ammata*, *Ceramium rubrum*, *Drachiella minuta*, *Falkenbergia rufolanosa*, *Gracilaria cornea* และ *Halopitys incurvus* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้ง *Vibrio anguillarum* และ *Pseudomonas anguilliseptica*

Xu และคณะ (2003) ทำการสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสาหร่ายสีแดง *Rhodomela confervoides* โดยนำมาผึ่งให้แห้งจากนั้นทำหมักด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน สารสกัดเมทาโนอิกที่ได้ นำมากรอง และระเหยแห้งภายใต้สภาวะลดความดันเมื่อแห้งนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ จากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต แล้วนำไปใส่ใน ซิลิกาเจลคอลัมน์แล้วฉีด สารผสมของคลอโรฟอร์ม-เมทานอลเพื่อ เป็นตัวชะล้าง นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ โดย 4 สายพันธุ์แรกเป็นแบคทีเรียมาตรฐาน คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli ATCC* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 อีก 4 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากคลินิก คือ *Staphylococcus aureus* 02-60, *Staphylococcus epidermidis* 02-04, *Escherichia coli* 02-26, *Pseudomonas aeruginosa* 02-29

## 2.9 ลักษณะของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (สุวณี, 2536)

### 2.9.1 หน้าที่ของผนังเซลล์

นอกจากหน้าที่สำคัญของผนังเซลล์คือ การป้องกันและรักษาความดันภายในเซลล์แล้ว ผนังเซลล์ยังมีบทบาทสำคัญในการแบ่งตัว และยังทำหน้าที่เป็นสารตัวแรก (Precursor) ในขบวนการสังเคราะห์สารต่างๆ ผนังเซลล์ชั้นต่างๆเป็น Antigenic determinants ที่สำคัญของผิวเซลล์ โดยปกติผนังเซลล์จะยอมให้สารต่างๆผ่านเข้าออกเซลล์ได้โดยไม่เลือกเฉพาะสารใดสารหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามเยื่อหุ้มชั้นนอกของผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบจะขัดขวางสารที่มีโมเลกุลใหญ่ๆ เช่น แอนติบอดี และ Lytic enzymes ไม่ให้ผ่านเข้าเซลล์ จึงส่วนช่วยในการป้องกันเซลล์

**2.9.2 แบคทีเรียแกรมบวก**

แบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์หนาประมาณ 20-80 นาโนเมตร ซึ่งหนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ และคิดเป็น 20-40% ของน้ำหนักแห้ง องค์ประกอบส่วนใหญ่คือ เปปติโดกลัยแคน (60-100%) นอกจากนี้มีโพลีแซ็กคาร์ไรด์ โปรตีน และไลปิด โพลีแซ็กคาร์ไรด์ในผนังเซลล์ได้แก่ แมนโนส อะราบิโนส กาแล็กโทส แรมโนส กลูโคซามีน น้ำตาลที่เป็นกรด เช่น กรดกลูคิวโรนิก และกรดแมนนิวโรนิก (Mannuronic acid) รวมทั้งกรดทีโคอิก (Teichoic acid) ซึ่งเป็น Sugar alcohol

**2.9.3 แบคทีเรียแกรมลบ**

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบางกว่าแกรมบวก แต่มีส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างซับซ้อนมากกว่า คือประกอบด้วยเยื่อหุ้มชั้นนอก และชั้นเปปติโดกลัยแคนซึ่งอยู่ในช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า Periplasmic space. ไลโปโพลีแซ็กคาร์ไรด์ (LPS) เป็นส่วนประกอบที่มีเฉพาะในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น และมีความสำคัญทั้งในแง่โครงสร้างและหน้าที่เพราะเป็นส่วนประกอบของแอนติเจนที่ผิวเซลล์ คือ โอแอนติเจน (O antigens) และเอนโดทอกซิน (Endotoxin) ไลโปโพลีแซ็กคาร์ไรด์เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและซับซ้อนประกอบด้วยส่วนที่เป็นไลปิด เรียกว่า ไลปิด เอ (Lipid A) ต่อติดอยู่กับโพลีแซ็กคาร์ไรด์ที่เป็นแกนกลาง (Core polysaccharides) ซึ่งจะเหมือนๆกันสำหรับแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน และส่วนปลายที่เป็นโพลีแซ็กคาร์ไรด์จำเพาะ (Specific polysaccharide region) ซึ่งเป็นหน่วยซ้ำๆของน้ำตาลที่มีคาร์บอนในโมเลกุล 3 ตัว (Triose) หรือ 5 ตัว (Pentose) ต่อกันเป็นสายเรียกว่า O-specific chains โพลีแซ็กคาร์ไรด์ส่วนปลายนี้จะยื่นออกมาจากเยื่อหุ้มชั้นนอก จึงเป็นส่วนที่ป้องกันเซลล์จากแอนติบอดี (Antibody) และคอมพลีเมนท์ (Complement)

## 2.10 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจาก *Chlorella* sp.

***Escherichia coli*** ลักษณะของเชื้อเป็นเซลล์รูปท่อน แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ อาจเคลื่อนที่ได้หรือไม่เคลื่อนที่ (รูปที่ 2.5) บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สามารถสร้างแคปซูลได้ โคโลนีเรียบ ไม่มีสี มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตรในเวลา 18 ชั่วโมง แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารที่แสดงความแตกต่าง(Differential media) เช่น Mac conkey agar โคโลนีสีแดงชมพูขนาดใหญ่ เนื่องจากเฟอร์เมนต์แล็กโทส หรือเลี้ยงในอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) และ Endo agar โคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะ มีบางสายพันธุ์ที่เฟอร์เมนต์แล็กโทสได้ช้า ถ้าเลี้ยงบนอาหารผสมเลือด บาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67271

สายพันธุ์เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบบีดาฮีโมไลซิส เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45 องศาเซลเซียส) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60 องศาเซลเซียส 15 นาที หรือ 55 องศาเซลเซียส 60 นาที

ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรค การที่ *E. coli* ทำให้เกิดโรคได้เนื่องจากมีไวรูเลนซ์แฟกเตอร์ (Virulence factors) หลายชนิดที่ไม่พบใน *E. coli* ที่มีเชื้อประจำถิ่น อย่างน้อยที่สุดจะต้องมีปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่ง คือ

1. มีความสามารถที่จะเกาะติดกับเซลล์บางชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

2. ความสามารถที่จะบุกรุกและเข้าไปเจริญในเซลล์ของเยื่อบุผิวลำไส้

3. ความสามารถในการสร้างเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) ที่ทำให้ร่างกายสูญเสียน้ำและของเหลว จึงเกิดอาการท้องร่วง การสร้างไซโททอกซิน (Cytotoxin) ที่ไปขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนจึงทำให้เกิดการตกเลือดที่ลำไส้

4. การมีแคปซูลที่ป้องกันไม่ให้ถูกเม็ดเลือดขาวจับกิน (นงลักษณ์, 2547 )

นอกจากนี้ โสภณ (2524) ยังกล่าวถึงรายละเอียดเกี่ยวกับ Enterotoxigenic *E. coli* (E.T.E.C.) ดังนี้

1. สารพิษ E.T.E.C. สร้างสารพิษอย่างน้อยสองชนิด คือ

1.1 Heat-labile enterotoxin (LT) เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ น้ำหนักมากกว่า 100,000 มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน การออกฤทธิ์ต่อลำไส้ ทำให้หลั่งสารน้ำและโซเดียมออกมา เนื่องจากท็อกซินไปกระตุ้น Adenyl cyclase ของเซลล์ และเพิ่ม cyclic adenosine monophosphate ในเซลล์เหมือนกับฤทธิ์ของท็อกซินจากเชื้ออหิวาต์

1.2 Heat-stable enterotoxin (ST) เป็นโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ไม่หนัก จึงไม่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน การออกฤทธิ์ที่พบในสัตว์ทดลอง เช่น กระต่าย หนู ทำให้เกิดการหลั่งสารน้ำได้เช่นเดียวกับ LT แต่กลไกต่างจาก LT และยังไม่สามารถบอกได้

E.T.E.C บางเชื้อสายจะสูญเสียความสามารถในการสร้างท็อกซินเมื่อถ่ายเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเพียง 2-3 ครั้ง แต่บางเชื้อสายมีความสามารถดังกล่าวได้นานเป็นปี

2. ยีนส์ควบคุมการสร้างเอ็นเตอโรท็อกซิน

ส่วนที่ทำควบคุมการสร้างเอ็นเตอโรท็อกซินอยู่ที่ Plasmid ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์อื่นได้

3. พยาธิกำเนิด (Pathogenesis)

E.T.E.C ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารได้ทั้งเด็กและผู้ใหญ่ ลักษณะของโรคมีสองแบบคือ

3.1 ลำไส้ใหญ่อักเสบ (Colitis) หรือกลุ่มอาการคล้ายโรคบิด เชื้อสายที่ก่อโรคลักษณะนี้ไม่สามารถสร้างสารพิษ ในรายที่รุนแรงจะมีไข้สูง มีอาการปวดเบ่ง อุจจาระเป็นมูกเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุจจาระร่วง (Watery diarrhea) มีอาการรุนแรงได้คล้ายโรคอหิวาต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมารของเชื้อ ภูมิคุ้มกัน และvirulenceของแบคทีเรียเชื้อสายที่สร้างเอ็นเตอโรท็อกซินทั้งLT,ST หรือเพียชนิดเดียว

นงลักษณ์ (2547) กล่าวถึง *Escherichia coli* ไว้ว่าสามารถก่อให้เกิดโรค ท้องร่วง ทางเดินปัสสาวะอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กทารก

โสภณ (2524) กล่าวถึงการที่ *E. coli* ทำให้เกิดโรคในระบบต่างๆของร่างกายแบ่งออกได้ตามระบบที่พบบ่อย ดังนี้

1. โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ

2. การก่อโรคทั่วไป (นอกระบบทางเดินอาหาร-ปัสสาวะ) *E. coli* ถ้าเข้าสู่ส่วนอื่นของร่างกายก็สามารถก่อโรคได้ ที่ตำแหน่ง หรืออวัยวะต่างๆมีดังนี้ บาดแผล แผลไฟไหม้-น้ำร้อนลวก แผลผ่าตัด ทางน้ำดี ถุงน้ำดี ทำให้เกิดทางน้ำดีอักเสบเฉียบพลัน ถุงน้ำดีอักเสบเฉียบพลัน ทางตับทำให้เกิดฝีในตับ ทางช่องท้องทำให้เกิดเยื่อบุช่องท้องอักเสบ ทางปอดทำให้เกิดปอดบวม ส่วนใหญ่เกิดจากการ สูด-สำลัก หลังผ่าตัด ทางเยื่อหุ้มสมองอาจจะก่อโรคที่ตำแหน่งนี้ตั้งแต่แรก หรือจากภาวะเซพติซีเมีย ทางกระแสเลือดทำให้เกิดเซพติซีเมีย อาจจะเป็นผลสืบเนื่องจากการติดเชื้อในตำแหน่งต่างๆที่กล่าวแล้ว หรือเกิดขึ้นเอง (Endogenous infection) โดยไม่พบแหล่งติดเชื้อปฐมภูมิ

3. โรคท้องร่วง

บางซีโรไทป์ของเชื้อ *E. coli* สามารถทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงโดยเฉพาะในเด็กเล็ก การตรวจเชื้อจึงต้องหาซีโรไทป์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องรู้ให้ละเอียดว่าเชื้อทั้งหมดมีส่วนประกอบของแอนติเจนต่างๆเป็นกี่ชนิด ซึ่งต่อมาพบว่าแอนติเจนของเชื้อ *E. coli* ประกอบด้วย

1. Somatic antigen group (O)

2. Capsular antigen (K)

3. Flagella antigen (H)

เชื้อ *E. coli* ที่เกี่ยวข้องกับโรคท้องร่วงในเด็กจากทั่วโลกได้นำมาตรวจหาชนิดของแอนติเจนแล้ว พบว่ามีอยู่เพียง 9 OB serogroup เท่านั้น คือ

O26 : B6 (K60) O55 : B5 (K59) O86 : B7 (K61) O111 : B4 (K58)
O119 : B14 (K69) O125 : B15 (K70) O126 : B16 (K71) O127 : B8 (K63) O128 : B12 (K67)

ซึ่ง 9 กลุ่มนี้ประกอบด้วยซีโรไทป์ต่างๆมากกว่า 130 ซีโรไทป์ และพบเพียง 20 ซีโรไทป์เท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับโรคท้องร่วง และเชื้อ *E. coli* ทั้ง 9 กลุ่มนี้ มีชื่อเรียกเฉพาะว่า Enteropathogenic *Escherichia coli* (E.E.C.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 2.5** เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli*

ที่มา: The Ohio state university, 2004

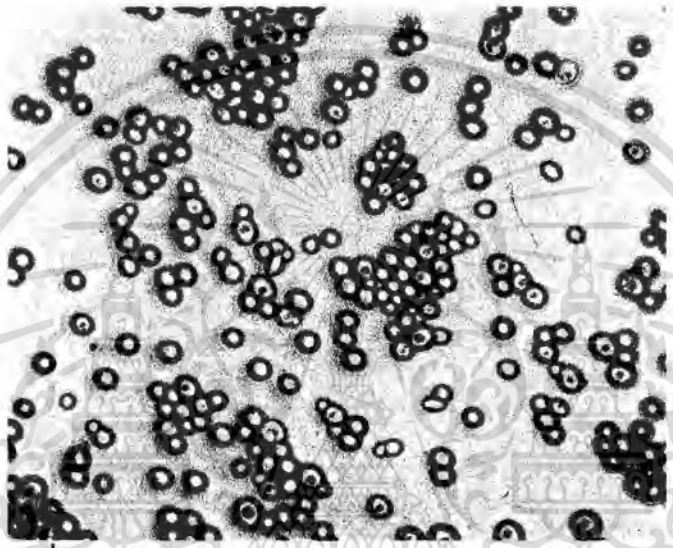
***Bacillus subtilis*** ลักษณะของเชื้อเป็นรูปท่อน สร้างสปอร์ภายใน มีแฟลกเจลลาเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีอากาศ สามารถเคลื่อนที่ได้สามารถพบได้ทั่วไปในดิน และอยู่อาศัยร่วมกับพืช สามารถสร้างแคปซูล คาร์โบไฮเดรตได้ (รูปที่ 2.6) สภาวะการเจริญเติบโตสามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิช่วง 25-43 องศาเซลเซียส ที่ภายใต้สภาวะที่มีอากาศและมีพีเอชอยู่ในช่วง 5.5-8.5 มีช่วงเวลาการเจริญแบ่งเซลล์เพื่อเจริญเติบโตประมาณ 20-30 นาที สามารถใช้ Nutrient broth (ส่วนประกอบ 0.8% Nutrient broth และ NaCl 0.4%) เป็นอาหารเร่งการเจริญเติบโตได้ (Dahl, 2000) สามารถสร้างเอกโซเอนไซม์ย่อยแป้งและเคซีน ซึ่งมีผลทำให้อาหารเน่าเสีย (นงลักษณ์ และปรีชา, 2544) *Bacillus subtilis* จัดอยู่ในคลาส 2 คือ เป็นเชื้อที่เป็นอันตรายปานกลางต่อคนและสิ่งแวดล้อม การติดเชื้ออาจจะเกิดได้จากผิวหนังถูกของแหลมมีคมบาดหรือทิ่มแทง (เสน่ห์, 2545)

**รูปที่ 2.6** เซลล์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

ที่มา: Berg, 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

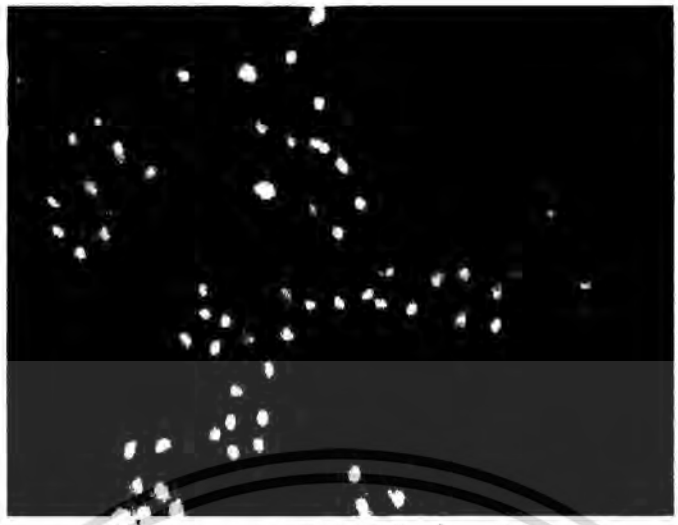
***Candida* sp.** อยู่ในพวก Presented imperfect state spores (Fungi imperfecti) Order Torulopsidales Family Cryptococcaseae Genus *Candida* (เมระนี, 2527) สามารถขึ้นได้ในภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน และภาวะที่มีปริมาณก๊าซออกซิเจนลดลง ถ้านำมาเลี้ยงในบนวุ้นซาบูโรด์ (Sabouraud) ภายใน 24 ชั่วโมง จะปรากฏโคโลนี และภายใน 1 สัปดาห์จะมีขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร โคโลนีสีขาวขุ่น เมื่อโคโลนีแก่ขึ้นเปลี่ยนเป็นสีครีมและสีน้ำตาลอ่อน ผิวหน้าโคโลนีเนียนโคโลนีแก่ปรากฏมีสายหยั่งลงไปในเนื้อวุ้น สามารถขึ้นได้ที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส



**รูปที่ 2.7** เซลล์ยีสต์ *Candida* sp.
ที่มา: Makimura, 2001b

*Candida* sp. มีรูปร่างกลมหรือรี (รูปที่ 2.7) มีการแตกหน่อ (Budding, Blastoconidia) เซลล์พ่อแม่หนึ่งเซลล์เกิดเซลล์ลูกได้หลายที่บนเซลล์พ่อแม่ (Multi-lateral budding) (รูปที่ 2.8) เซลล์มีขนาดกว้างประมาณ 2-3 ไมโครเมตรและยาวประมาณ 1-4 ไมโครเมตร อยู่โดดเดี่ยวหรือเป็นสาย (พรรณกร, 2535) ไม่สร้าง Arthrospore แต่มีเส้นใยราแท้ (True mycelium) และเส้นใยราเทียม (Pseudomycelium) (รูปที่ 2.9)รวมทั้ง Blastospore (เมระนี, 2527) ในภาวะที่เป็นเซลล์มีความสามารถในการก่อโรคได้มากกว่าภาวะที่เป็นสาย (พรรณกร, 2535) ปกติเชื้อ *Candida* sp. จะอาศัยอยู่ในตัวคนและสัตว์ เช่น ลำไส้ ช่องปาก และช่องคลอด เป็นต้น การเกิดพยาธิสภาพมีได้หลายตำแหน่ง ที่พบบ่อยๆ ได้แก่ ผิวหนัง รอยต่อระหว่างผิวหนังกับเยื่อเมือก (ศมนีย์, 2529) *Candida* sp. ทุกสายพันธุ์จัดเป็นเชื้อที่เป็นอันตรายปานกลางต่อคนและสิ่งแวดล้อม การติดเชื้ออาจจะเกิดได้จากผิวหนังถูกของแหลมมีคมบาดหรือทิ่มแทง (เสน่ห์, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 2.8** การแตกหน่อของยีสต์ *Candida* sp.

ที่มา: Makimura, 2001b

**รูปที่ 2.9** เส้นใยราเทียมของยีสต์ *Candida* sp.

ที่มา: Makimura, 2001b

***Candida albicans*** จัดเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงที่สุด สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สร้างเส้นใยราแท้หรือเส้นในราเทียม สามารถสร้างคลามิโดสปอร์ได้ เกิด germ tube สามารถย่อยสลายน้ำตาลและหมักกลูโคส มอลโตส และกาแลคโตส ทรีฮาโลส อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายน้ำตาลซูโครส และไซโลส(พรรณกร, 2535) เชื้อนี้โดยทั่วไปไม่ทำให้เกิดโรคในคนปกติ เนื่องจากการแบ่งตัวถูกจำกัดโดยปัจจัยต่างๆ เช่น แบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ Secretory IgA และระบบ CMI (เมระนี, 2527) *Candida albicans* แบ่งตามสมบัติของแอนติเจนได้เป็น 2 พวก คือ พวก A คล้ายกับ *Candida tropicalis* และพวก B คล้าย *Candida stellatoides* ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมาพบว่าการแบ่งเป็น 2 พวก ไม่สามารถบอกได้ว่าการเกิดโรคเนื่องจากเชื้อที่มีอยู่ในตัวผู้ป่วยเอง หรือได้รับเชื้อใหม่จากภายนอก จึงได้มีการจำแนกสายพันธุ์ย่อยโดยอาศัยความทนทานต่อสารเคมี และการทดสอบทางชีวเคมีรวม 10 ประการ คือการเจริญที่พีเอช 1.55 และ 1.40 การสร้าง โปรตีเนส (Proteinase) ความคงทนต่อ 5-Fc ขนาด 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การใช้ Urea, Sorbose, Citrate, Glycine ความคงทนต่อเกลือและ Safranine จัดจำแนกได้เป็นสายพันธุ์ย่อย (Biotyping) ซึ่งประกอบด้วยตัวเลข 3 ตัว ซึ่งต่อมาผู้รายงานคณะเดียวกันรายงานเพิ่มเติมว่า ควรใช้ความทนทานต่อกรด boric แทนการใช้ Glycine โดยวิธีนี้พบว่าสายพันธุ์ย่อยของ *Candida albicans* ที่พบได้บ่อยคือ 153, 157, และ 357 ส่วน *Candida albicans* ที่ก่อโรคในผู้ป่วยติดเฮโรอิน ได้แก่ สายพันธุ์ย่อย 153/7 และ 153 (พรรณกร, 2535)

การก่อโรคของเชื้อ *Candida albicans* มีรูปแบบต่างๆกันดังนี้

1. โรคติดเชื้อแคนดิดาในปาก (Candidiasis of oral cavity)

ลักษณะทางคลินิกของแคนดิดิเอสิสในช่องปากพบได้ (เมระนี, 2527)

1.1 Acute pseudomembranous candidiasis

ลักษณะของโรค (Thrush) ที่พบในปากจะเห็นเป็นฝ้า (Pseudomembrane) สีขาวหนาพอประมาณคลุมอยู่ที่ในกระพุ้งแก้ม ลิ้น เหงือก เพดาน ปาก ตลอดจนทอนซิล เมื่อใช้ปากคีบจับดูจะอ่อนยุ่ยคล้ายฝ้าน้ำนม (Milk curd) ซึ่งขูดออกได้ง่ายโดยเลือดไม่ออก

1.2 Angular cheilitis (ปากนกกระจอก)

ลักษณะทางคลินิก ผิวหนังตรงมุมปากที่เป็นโรคข้างใดข้างหนึ่ง หรือทั้ง 2 ข้างมีลักษณะเปื่อยยุ่ย (Maceration) เป็นคราบสีขาวและเห็นรอยปริ (Fissure) ซึ่งอาจพบน้ำเหลืองจับกรังเป็นสะเก็ดสีเหลืองอยู่ที่ขอบ ในรายที่เป็นมากๆ พื้นของแผลที่อยู่ลึกลงไปจะอักเสบสีแดงเรื่อๆ ผู้ป่วยมีความรู้สึกแสบๆคันๆ โดยเฉพาะเมื่อรับประทานอาหารรสจัด

1.3 Denture stomatitis

อาการของโรคนี้จะปรากฏเป็นแผลอักเสบเรื้อรังที่รอยต่อของขอบเหงือกกับฟันปลอม ซึ่งอาจเป็นแผลเดียวหรือมากกว่านั้นก็ได้ ในบางรายที่เป็นน้อยเยื่อบุเหงือกอาจมีลักษณะเพียงบวมแดงเท่านั้น แผลนี้เจ็บบ้างเล็กน้อย และรู้สึกแสบบ้างเมื่อรับประทานอาหารรสจัด

2. โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณผิวหนังและเล็บ (Cutaneous candidiasis) (พรรณกร, 2535)

ลักษณะทางคลินิก เริ่มเป็นตุ่มอักเสบเล็กๆสีแดงหลายๆเม็ดเกิดที่บริเวณรอยพับเหล่านี้จะกลายเป็นหนองแล้วแตกออกเป็นแผลตื้นๆ และมีฝ้าสีขาวของผิวหนังที่ตายติดอยู่ ตุ่มเหล่านี้จะขยายตัวรวมกันเป็นแผ่นฝ้าขนาดใหญ่ มองเห็นส่วนพื้นล่างเป็นสีแดง รอบๆบริเวณเดิมจะพบตุ่มแดงเล็กๆเกิดขึ้นใหม่อีกเป็นจำนวนมากกระจายตัวออกไป มีอาการคันและแสบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณผิวหนังและเยื่อบุชนิดเรื้อรัง (Chronic mucocutaneous candidiasis) (พรรณกร, 2535)

มักพบที่ผิวหนังบริเวณรอยพับ ในผู้ป่วยบางรายมีภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ เริ่มแรกลักษณะทางคลินิกจะเป็นตุ่มน้ำหนองเม็ดเล็กๆสีแดงเกิดขึ้นหลายตุ่มรวมกันอยู่เป็นกลุ่มๆซึ่งมีอาการเจ็บๆคันๆต่อมาตุ่มเหล่านี้จะแตกออกแล้วรวมกันเป็นแผ่นฝ้าปนกับสะเก็ดสีเหลือง ผิวหนังรอบๆแผ่นฝ้าจะมีอาการอักเสบ โรคค่อยๆขยายตัวออกไปโดยรอบ เกิดโรคขนาดเล็กขึ้นที่ขอบเดิมของโรค ผิวหนังที่เป็นโรคยกตัวเป็นแผ่นแข็งนูนขึ้นมาและมีสะเก็ดสีเหลืองปิดอยู่คล้ายเพลี้ยเกาะ เรียกว่า Crusty granuloma

4. โรคติดเชื้อแคนดิดาบริเวณอวัยวะเพศ (Candidiasis of the genitalia) (เมระนี, 2527)

ลักษณะโรคทางคลินิก ผู้ป่วยมีอาการคันในช่องคลอดพร้อมๆกับพบอาการตกขาว (Leucorrhoea) อาการคันจะเพิ่มมากขึ้นในขณะที่กำลังนอนหรือหลังอาบน้ำ นอกจากนั้นผู้ป่วยอาจมีอาการแสบจากการระคายเคืองเกิดขึ้นได้ เช่น ขณะปัสสาวะ การร่วมเพศ การตรวจภายในหรือขณะที่มีประจำเดือน ตกขาวมีลักษณะเป็นเมือกข้นสีขาวหรือเหลืองอ่อนๆหรืออาจจะใส มีกลิ่นเปรี้ยวคล้ายของหมักดอง อาการของโรคจะเป็นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการเกิดโรค ในผู้ป่วยที่มีตกขาวเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก เมือกนี้จะไหลออกมาภายนอกช่องคลอดทำให้เกิด Cutaneous candidiasis ซึ่งอาจลุกลามไปถึงรอบทวารหนักหรือขาหนีบ

5. โรคแคนดิดาตามระบบ (Systemic candidiasis) (พรรณกร, 2535)

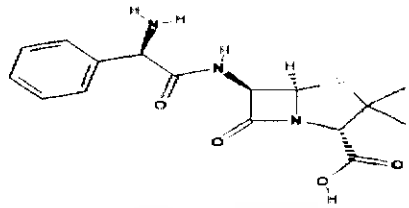
ระบบต่างที่มักเกิดโรค ได้แก่ ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบหัวใจ เกิดการอักเสบที่กล้ามเนื้อหัวใจ ผนังหรือเยื่อหุ้มหัวใจ ระบบประสาท อาจก่อให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เกิดฝีขนาดต่างๆขึ้นในสมอง

## 2.11 คุณสมบัติของยาปฏิชีวนะที่ใช้

1. แอมพิซิลลิน (Ampicillin) เป็นยาต้านแบคทีเรียในกลุ่ม Aminopenicillin มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ มีน้ำหนักโมเลกุล 349.406 กรัมต่อโมล มีชื่อในระบบ IUPAC ว่า (2R,5R,6R)-6-[[(2R)-2-amino-2-phenyl-acetyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0]heptane-2-carboxylic acid (Wikipedia the free encyclopedia, 2005a) (รูปที่ 2.10) ใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียตั้งแต่ ค.ศ.1961 ในบางครั้งอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียง คือ ท้องร่วง เป็นไข้ คัน หรือ อาการลำไส้ใหญ่บวม (Thomson Healthcare, 2005) การออกฤทธิ์เหมือนกับสารในกลุ่ม beta-lactam คือสามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบได้ โดยยับยั้งปฏิกิริยาขั้นที่ 3 และสุดท้ายของการสร้างผนังเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์เกิดการย่อยตัวเอง แอมพิซิลลินมักนำไปใช้ในงานทางชีววิทยาด้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

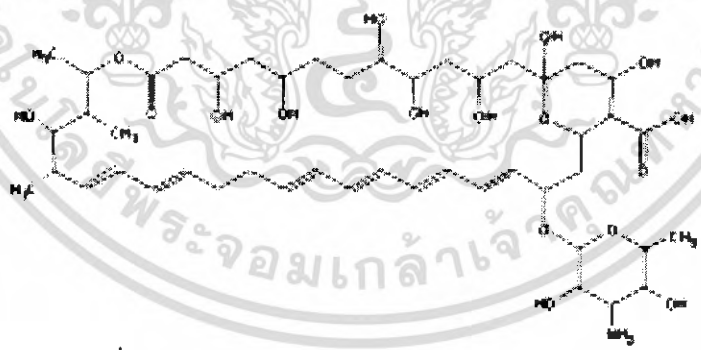
โมเลกุล (Molecular biology) โดยใช้ในการทดสอบยีนพลาสมิดที่ใส่เข้าไปในแบคทีเรีย เพื่อดูคุณสมบัติการต่อต้านยาปฏิชีวนะ (Wikipedia the free encyclopedia, 2005a)



**รูปที่ 2.10** ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของแอมพิซิลลิน

ที่มา: National Center for biotechnology information, 2005a

2. นิสตาติน (Nystatin) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{47}H_{75}NO_{17}$ มีน้ำหนักโมเลกุล 926.095 กรัมต่อโมล มีชื่อในระบบ IUPAC ว่า 33-(4-amino-3,5-dihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl)oxy-1,3,4,7,9,11,17,37-octahydroxy-15,16,18-trimethyl-13-oxo-14,39-dioxabicyclo[33.3.1]nonatriaconta-19,21,25,27,29,31-hexaene-36-carboxylic acid (National Center for biotechnology information, 2005c) (รูปที่ 2.11) นิสตาตินเป็นสารในกลุ่ม Polyene ใช้ในการต่อต้านเชื้อราซึ่งไวต่อเชื้อ *Candida* spp. (Wikipedia the free encyclopedia, 2005c) อาจก่อให้เกิดผลข้างเคียง คือ ปวดท้อง มีอาการท้องร่วง คัน (Medlineplus, 2005)



**รูปที่ 2.11** ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของนิสตาติน

ที่มา: Wikipedia the free encyclopedia, 2005c

## 2.12 คุณสมบัติของยาต้านจุลินทรีย์ที่ดี

มาลิน (2540) กล่าวถึงยาต้านจุลินทรีย์ที่ตามทฤษฎีนั้น ควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. มีฤทธิ์ต้านเชื้อดี และมีผลต่อเชื้อมากชนิด
2. มีการดูดซึมและการกระจายตัวในร่างกายดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ออกฤทธิ์ในส่วนต่างๆของร่างกายดี

4. มีพิษหรือมีฤทธิ์ข้างเคียงน้อยที่สุด

5. สามารถเข้าสู่ร่างกายด้วยวิธีการต่างๆ โดยเฉพาะทั้งฉีดและกิน

6. ผลิตได้ง่าย

7. ราคาถูก

8. ไม่ก่อหรือเหนี่ยวนำให้เชื้อดื้อยาในภายหลัง

## 2.13 การจัดจำแนกประเภทของสารปฏิชีวนะ

สมใจ (2547) ทำการแบ่งประเภทของสารปฏิชีวนะ เป็นหลายประเภทตามลักษณะ ดังนี้

1. แบ่งตามความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างได้ ดังนี้

1.1 Broad spectrum antibiotic ได้แก่ สารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆได้หลายชนิด เช่น เซฟาโลสปอริน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ

1.2 Narrow spectrum antibiotic ได้แก่ สารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เฉพาะบางชนิด เช่น เพนนิซิลิน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เฉพาะแกรมบวก

2. แบ่งกลไกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น คือ

2.1 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ เช่น เพนนิซิลิน และเซฟาโลสปอริน

2.2 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่นคลอแรมเฟนิคอล สเตรปโตมัยซิน

2.3 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ เช่น ไรแฟมพิน (Rifampin)

2.4 สารปฏิชีวนะที่ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น โพลีมิกซินบี (Polymixin B) และคีโตโคนาโซล (Ketokonazole)

2.5 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสังเคราะห์สารเมแทบอไลท์ที่จำเป็น เช่น ซัลฟานิลาไมด์ (Sulfanilamide) ซึ่งเป็นยาซัลฟาที่มีโครงสร้างคล้าย Para-aminobenzoic acid (PABA) จึงสามารถยับยั้งการสังเคราะห์กรดโฟลิกซึ่งเป็นโคเอนไซม์ในการสังเคราะห์พิวรีน ไพริมิดีน และกรดอะมิโนหลายชนิด

## 2.14 กลไกการออกฤทธิ์ของยาระงับเชื้อ (Antiseptics) และยาทำลายเชื้อ (Disinfectants) (พจนีย์ , 2524)

1. Protoplasmic membrane โดยไปทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ เสียไป เช่น กรดอะมิโน แร่ธาตุต่างๆและน้ำออกไปจากเซลล์ ตัวยาซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และไปทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารบางอย่างในไซโตพลาสซึม หรือไปขัดขวางการทำงานของเอ็นไซม์

2. Cellular ovembe โดยสารเคมีจะไปจับกับโปรตีน หรือไปทำให้โปรตีนแข็งตัว หรือไปทำให้เอ็นไซม์หมดฤทธิ์ ทำให้ทำหน้าที่ตามปกติไม่ได้ มีผลทำให้ขบวนการเมตาบอลิซึมชะงัก หรือดำเนินไปอย่างผิดปกติ

## 2.15 คุณสมบัติของตัวทำละลายที่ดี

นันทวัน (2536) กล่าวถึงการสกัดว่า ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ อยู่ที่การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติ

1. เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่เราต้องการสกัดได้ดีพอ
2. ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป
3. ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด
4. ไม่เป็นพิษ
5. ราคาพอสมควร

## 2.16 ปัจจัยที่อาจกระทบต่อผลการทดสอบ

มาลิน (2540) กล่าวว่ามีปัจจัยหลายชนิดสามารถกระทบต่อขนาดบริเวณใสที่เกิดจากยาต้านจุลินทรีย์ ดังนี้

1. ตัวยาทดสอบ คือ ความเข้มข้นของยาในกระดาษซับวงกลมที่จะใช้ทดสอบ คุณลักษณะของยา เช่น น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ ฯลฯ

2. ความหนาของอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปจะกำหนดประมาณ 4 มิลลิเมตร ซึ่งจะไม่กระทบขนาดบริเวณใสมากนัก การเทอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 25 และ 60 มิลลิลิตร ในจานที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 9 และ 15 เซนติเมตร ตามลำดับ จะให้ความหนาดังกล่าวประมาณ 4 มิลลิเมตร จานที่เทวุ้นไว้แล้วนี้ ถ้าต้องการเก็บไว้ใช้เกิน 5 วัน ควรใส่ในถุงพลาสติกปิด แล้วเก็บไว้ที่ 4-8 องศาเซลเซียส แต่ก็ไม่ควรเก็บเกิน 2 อาทิตย์ (ก่อนใช้ควรให้พื้นผิววุ้นแห้งก่อน)

3. ระยะเวลาการวางกระดาษซับวงกลมภายหลังเพาะเชื้อบนอาหารวุ้นแล้ว ควรวางกระดาษซับวงกลมไม่เกิน 15 นาทีหลังจากนั้น แต่ถ้าหลังการเพาะเชื้อแล้วผิววุ้นยังเปียกอยู่ จะต้องทิ้งให้แห้งระยะหนึ่ง (3-5 นาที) เพื่อป้องกันยาจากกระดาษซับวงกลมปนเข้าไปในที่เปียกชื้นนั้น

4. อุณหภูมิและเวลาการบ่มเพาะ มีผลกระทบต่อการเจริญและการซึมของยาในอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อได้ ภายหลังวางกระดาษซับวงกลมแล้ว ควรเข้าตู้บ่มเพาะทันที โดยใช้อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พจนีย์ (2524) กล่าวว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์

1. ความเข้มข้นของสารเคมี ขึ้นอยู่กับสิ่งของและเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทำลายโดยทั่วไปถ้าความเข้มข้นสูงจะออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal) ถ้าความเข้มข้นต่ำจะออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Bacteriostatic)

2. เวลา เมื่อยาสัมผัสกับเชื้อแล้วต้องการเวลานานพอสมควรในการออกฤทธิ์

3. อุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิสูงจะช่วยเร่งปฏิกิริยาเคมี

4. ภาวะแวดล้อม เช่น สารอินทรีย์ต่างๆ เลือด หนอง อุจจาระ ซีรัม ทำให้กระบวนการของการทำลายเชื้อช้าลง โดยสารอินทรีย์จะหุ้มรอบตัวจุลินทรีย์กันไม่ให้ยาทำลายเชื้อ เข้าถึงตัวเชื้อที่มีชีวิตอยู่ในสารอินทรีย์ที่แข็งตัวนั้นได้ และยาหลายชนิดที่รวมกับสารอินทรีย์แล้วจะมีฤทธิ์อ่อนลง หรือฤทธิ์ถูกลบล้างหมดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการทดลอง

## 3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

### 3.1.1 อุปกรณ์

1. กรวยแยก (Separatery funnel)
2. แผ่นทดสอบ (Filter paper disc) Macherey-nagael ขนาด 6 มิลลิเมตร
3. ไมโครปิเปตต์ขนาด 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
4. ชุดเครื่องแก้วสำหรับเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน
5. ชุดเครื่องแก้วสำหรับเครื่องระเหยแห้งภายใต้ระบบสุญญากาศ
6. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

### 3.1.2 เครื่องมือ

1. ชุดเลี้ยงสาหร่ายแบบให้อากาศ
2. ตู้เขี่ยเชื้อแบบลมเป่า (Laminar air flow) Model BVT123 : ISSCO
3. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) Model HA-300 MIV : Hirayama
4. เครื่องเขย่า (Platform shaker) Orbital shaker : Gallenkamp
5. เครื่องชั่งสารแบบใช้ไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง A2005 : Sartorius analytic
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectophotometer) DR/4000 : HACH
7. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) model 215 : Denver Instrument
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) 6/300 : Falcon
9. เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (Rotary evaporator) 4001- efficient : Laborota
10. เครื่องระเหยแห้งภายใต้ระบบสุญญากาศ (Freeze dryer) Lyolab3000 : Heto

## 3.2 สารเคมีและเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

### 3.2.1 ตัวทำละลาย (Solvent)

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 4 ชนิดเป็นแบบ commercial grade ได้แก่

1. เฮกเซน (Hexane) มีชื่อเคมีทั่วไปว่า Hexyl hydride ชื่อพ้องอื่นๆ Normal hexane, N-Hexane, Skellysolve B, Dipropyl, Gettysolve-b, Hex, N-Hexane มีสูตรโมเลกุลคือ $C_6H_{14}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เอทิลอะซีเตต (Ethyl acetate) ชื่อพ้องอื่นๆ Ethyl acetic ester, Acetoxyethane, Acetic ether, Vinegar naphtha, Acetidin, Acetic ester มีสูตรโมเลกุลคือ $C_4H_8O_2$

3. บิวทานอล (Butanol) มีชื่อเคมีทั่วไปว่า Hexyl hydride ชื่อพ้องอื่นๆ Normal hexane, N-Hexane, Skellysolve B, Dipropyl, Gettysolve-b, Hex, N-Hexane มีสูตรโมเลกุลคือ $C_6H_{14}$

4. เมทานอล (Methanol) มีชื่อเคมีทั่วไปว่า Methyl alcohol ชื่อพ้องอื่นๆ Wood alcohol, Carbinol, Methyl hydroxide มีสูตรโมเลกุลคือ $CH_4O$

**3.2.2 ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic)**

1. แอมพิซิลลิน (Ampicillin)

2. นิสตาติน (Nystatin)

**3.2.3 สาหร่ายที่ใช้ในการทดสอบ**

1. *Chlorella* sp. A0505

2. *Chlorella* sp. $B_2$

3. *Chlorella* sp. $C_2$

**3.2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ (Tested microorganisms) มีดังนี้**

1. แบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922

2. แบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3. ยีสต์ คือ *Candida albicans* ATCC 10231

**3.2.5 สารเคมีสำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว**

อาหารสูตร N-8 แสดงสูตรอาหารในภาคผนวก ก.

**3.2.6 อาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์**

1. Mueller-Hinton Agar (MHA) แสดงสูตรอาหารในภาคผนวก ข.

2. Sabourand's Dextrose (SDA) แสดงสูตรอาหารในภาคผนวก ค.

**3.2.7 อาหารสำหรับเก็บรักษาแบคทีเรีย**

1. Nutrient Agar (NA) แสดงสูตรอาหารในภาคผนวก ข.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

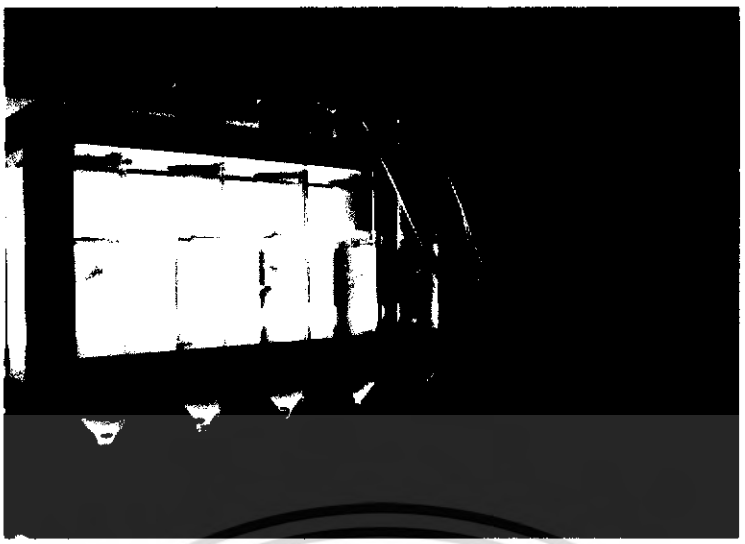
### 3.3.1 ศึกษาหาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

#### 3.3.1.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. 3 สายพันธุ์คือ *Chlorella* sp. A0505 *Chlorella* sp. $B_2$ และ *Chlorella* sp. $C_2$ ในอาหารเหลวสูตร N-8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 3.1) และให้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ที่ความเข้มแสง 2,400 ลักซ์ อย่างต่อเนื่องประมาณ 14 วัน (ชลธิชา, 2545) โดยนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง จนได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.3 แล้วจึงนำเชื้อสาหร่ายแต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในหลอดเพาะเลี้ยง (Culture tube) ขนาด 300 มิลลิลิตร(รูปที่ 3.2) ที่มีอาหารเหลวสูตร N-8 ปริมาตร 200 มิลลิลิตรอยู่โดยใส่หัวเชื้อสาหร่าย 20 มิลลิลิตร แล้วให้อากาศโดยเครื่องให้อากาศ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ที่ความเข้มแสง 2,400 ลักซ์ ต่อเนื่องเป็นเวลา 10 วัน

**รูปที่ 3.1** การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนเครื่องเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 3.2** การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเพิ่มปริมาณในหลอดเพาะเลี้ยงขนาด 300 มิลลิลิตร

**3.3.2 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp.**

นำตัวอย่างสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่เพาะเลี้ยงไว้แล้ว มา 1 สายพันธุ์ ทำการเก็บเกี่ยวตัวเซลล์โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนที่เป็นตัวเซลล์และน้ำหมักเชื้อ (Fermentation Broth) สาหร่ายออกจากกัน

**3.3.2.1 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเซลล์สาหร่าย**

นำส่วนที่เป็นตัวเซลล์ มาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งภายใต้ระบบสุญญากาศ (Lyophilization) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดด้วยเมทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกส่วนที่เป็นตัวเซลล์ออกไป นำสารละลายที่ได้มาเติมเฮกเซนในอัตราส่วน เมทานอล : เฮกเซน อัตราส่วน 1 : 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้นจากกัน ไขส่วนที่อยู่ชั้นล่างที่เป็นชั้นของเมทานอลออก จากนั้นจึงนำสารสกัดที่อยู่ในสารละลายเมทานอลและสารละลายเฮกเซนไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบจากสารละลายเฮกเซนและสารสกัดหยาบจากสารละลายเมทานอล (รูปที่ 3.6) นำสารสกัดที่ได้ไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้ง รอนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยนำไปไว้ในชุดเครื่องแก้วสำหรับเครื่องระเหยแห้งภายใต้ระบบสุญญากาศ

**3.3.2.2 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักเชื้อ (Fermentation Broth) สาหร่าย**

นำส่วนน้ำหมักเชื้อสาหร่าย มาสกัดในกรวยแยกโดยวิธีลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลาย ซึ่งใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เอทิลอะซีเตต บิวทานอล เฮกเซน และ เมทานอล โดยนำน้ำหมักเชื้อสาหร่ายใส่ในกรวยลำดับส่วน แล้วเติมสารละลายเอทิลอะซีเตต ลงไปในอัตราส่วน เอทิลอะซีเตต :อาหารเลี้ยง เป็น 1 : 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้นจากกัน (รูปที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3) ทำการไขส่วนที่อยู่ชั้นล่างออกเก็บไว้ (ส่วนที่เตรียมไว้เพื่อนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายบิวทานอล) และนำสารสกัดที่อยู่ในสารละลายเอทิลอะซีเตต (ชั้นบน) ไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (รูปที่ 3.4) จะได้สารสกัดหยาบจากสารละลายเอทิลอะซีเตต จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้นี้ไปเติมสารสะลาย เมทานอลเพื่อทำละลาย แล้วใส่ลงในกรวยลำดับส่วน แล้วจึงเติมตัวทำละลาย เฮกเซนลงไปในสารละลายเมทานอลดังกล่าวในอัตราส่วน 2 : 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้นส่วนที่ละลายได้ในตัวทำละลายเฮกเซนจะอยู่ชั้นบน และส่วนที่ละลายเมทานอลซึ่งได้จากตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตจะอยู่ชั้นล่าง ไขส่วนที่อยู่ชั้นล่างออก เพื่อแยกสารออกจากกัน จากนั้นนำทั้งสองส่วนไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบจากสารละลายเฮกเซนและเอทิลอะซีเตตซึ่งละลายในชั้นเมทานอล ต่อไปนำส่วนที่เตรียมไว้สำหรับนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายบิวทานอลที่เก็บไว้ใส่ลงในกรวยลำดับส่วนแล้วเติมตัวทำละลายบิวทานอลลงไปในอัตราส่วน 1 : 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น ไขส่วนที่อยู่ชั้นล่างออก ส่วนที่ละลายในบิวทานอลที่อยู่ชั้นบนให้นำไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดันจะได้ส่วนที่เป็นสารสกัดหยาบจากสารละลายบิวทานอล (รูปที่ 3.8)จากนั้นนำส่วนที่สกัดได้จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอลมาชั่งหาน้ำหนักแห้งและนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (รูปที่ 3.9)

**รูปที่ 3.3** การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ในกรวยแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 3.4** การทำให้สารสกัดแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน

**รูปที่ 3.5** แสดงสารสกัดแห้งที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก

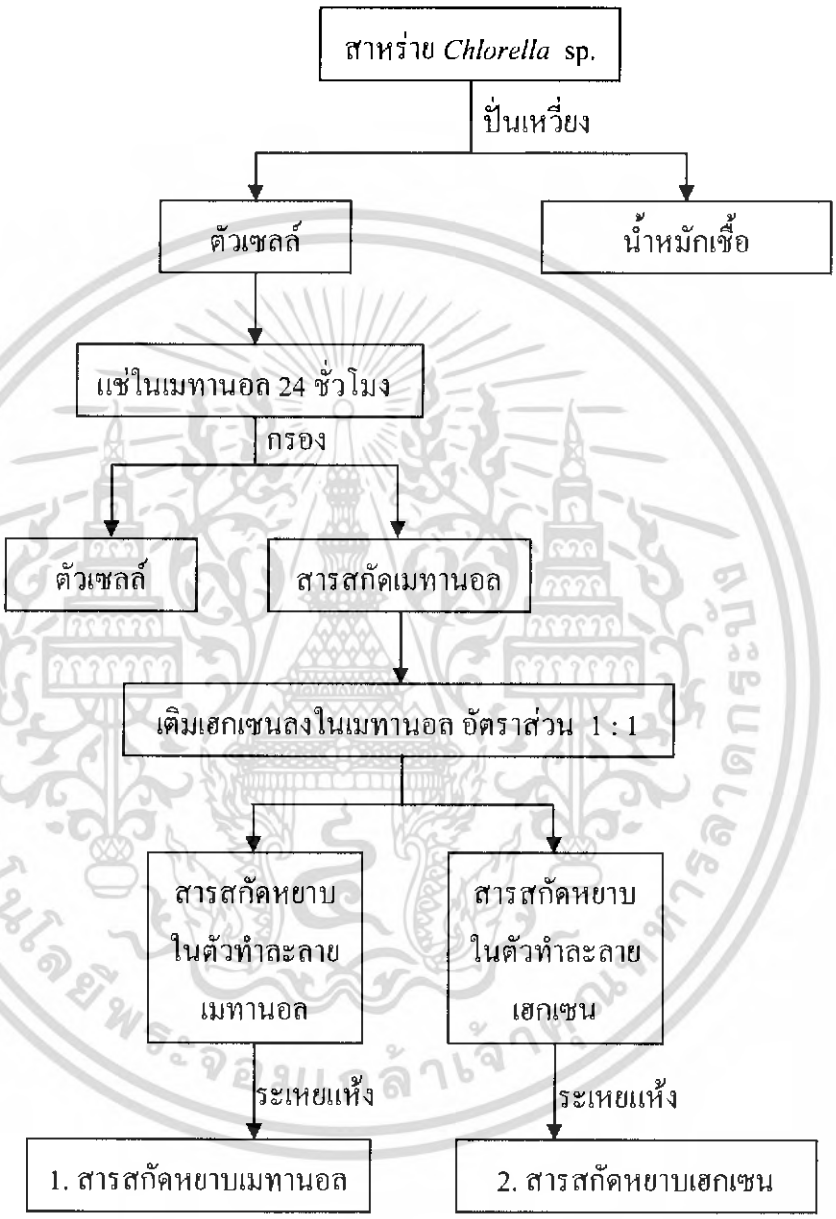
**3.3.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ**

**3.3.3.1 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดจากเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp.**

นำสารสกัดจากเซลล์สาหร่ายที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 (รูปที่ 3.5) คือ สารสกัดหยาบจากเมทานอลและสารสกัดหยาบจากเฮกเซนมาละลายในเมทานอล เพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิด (รูปที่ 3.7) คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Candida albicans* ATCC 10231 โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม (รูปที่ 3.9) โดยวิธี Single disk method (Saubolle และ Hoeprich, 1978) โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นทำการตรวจผลโดยดูบริเวณใสที่เกิดการยับยั้ง (Clear zone)

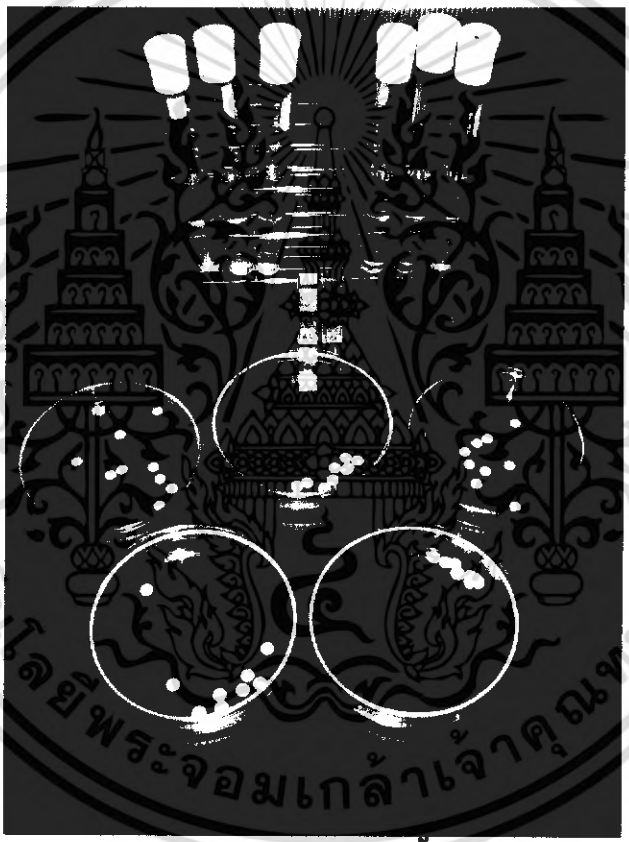



**รูปที่ 3.6** ขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเซลล์สาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

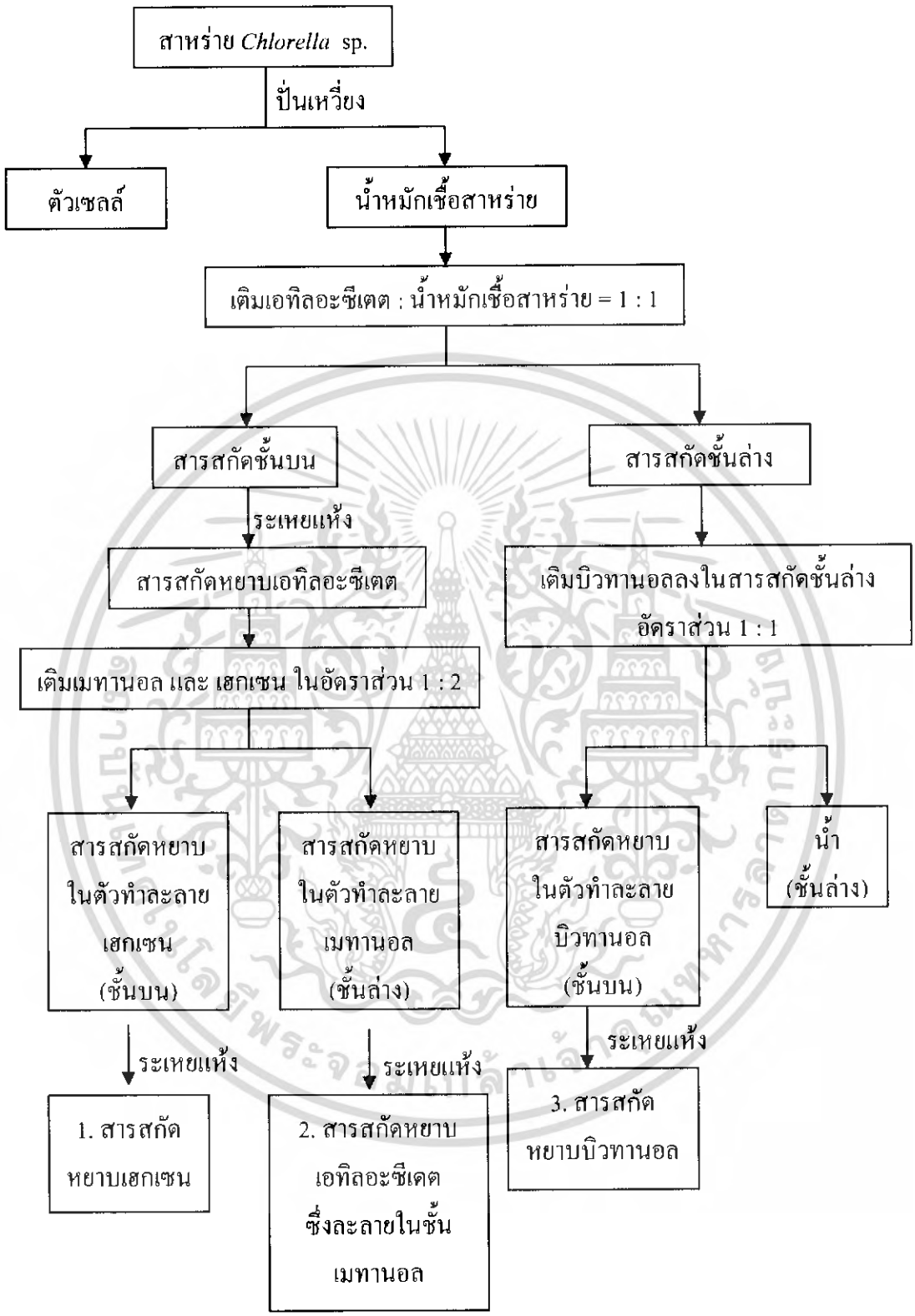
**3.3.3.2 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp.**

**นำสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่ายที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 (รูปที่ 3.5) คือ สารสกัดหยาบจากสารละลายเฮกเซนที่ได้มาละลายในเฮกเซน และสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซีเตตซึ่งละลายในชั้นเมทานอล สารละลายบิวทานอลที่ได้มาละลายในเมทานอล เพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิด (รูปที่ 3.7) คือ** *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231 โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมกรัม (รูปที่ 3.9) โดยวิธี Single disk method โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นทำการตรวจผลโดยดูบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (Clear zone)



**รูปที่ 3.7 แสดงอุปกรณ์ในการศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 3.8** ขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 3.9 การเตรียมแผ่นทดสอบที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ**

**3.3.4 ศึกษาหาสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์**

เก็บเกี่ยวตัวเซลล์ของสาหร่ายที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. $C_2$ และ *Chlorella* sp. $B_2$ การเก็บเกี่ยวตัวเซลล์ทำโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะได้ส่วนที่เป็นตัวเซลล์และน้ำหมักเชื้อสาหร่าย แยกส่วนที่เป็นตัวเซลล์ออก จากนั้นนำส่วนน้ำหมักเชื้อสาหร่ายมาสกัดในกรวยแยกโดยวิธีลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เอทิลอะซีเตต บิวทานอล เฮกเซน และเมทานอล ตามวิธีในข้อ 3.3.2.2 นำไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน แล้วเลือกเฉพาะส่วนของสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดที่ทราบได้จากการทดลองขั้นที่ 3.3.1 ของสาหร่ายทั้ง 3 สายพันธุ์ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิดโดยนำสารสกัดไปทำละลายในเมทานอล และทดสอบที่ความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัม โดยใช้วิธี Single disk method โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำการตรวจผลโดยดูบริเวณที่เกิดการยับยั้ง แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดมาเพียงสายพันธุ์เดียว

**3.3.5 ศึกษาหาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด**

นำสาหร่ายที่ผ่านการคัดเลือกสายพันธุ์ตามข้อ 3.3.4 มาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาการเจริญทุกๆ 2 วัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง จะได้ส่วนที่เป็นตัวเซลล์และน้ำหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อสาหร่าย จากนั้นนำส่วนที่เป็นตัวเซลล์ออกไป และนำส่วนน้ำหมักเชื้อสาหร่ายมาสกัดในกรวยแยกโดยวิธีลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เอทิลอะซีเตต บิวทานอล เฮกเซน และ เมทานอล ตามวิธีในข้อ 3.3.2.2 แล้วเลือกเฉพาะส่วนของสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดที่จะทราบได้จากการทดลองขั้นที่ 3.3.1 ไปทำการระเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน แล้วนำมาทำละลายในเมทานอล เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมด้วยวิธี Single disk method ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพของสารสกัดที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทุกๆ 2 วัน

### 3.3.6 สถิติที่ใช้ในการทดลอง

การทดลองนี้เป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Random Design, CRD) โดยใช้ Independent sample T-Test และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) มาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

Independent sample T-Test เป็นการทดสอบผลต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เกิน 2 กลุ่ม ในการทดลองนี้ใช้การทดสอบค่าที่เป็นแบบ Independent sample test เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นข้อมูลจากกลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระจากกัน

ANOVA เป็นการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป ในการทดลองนี้เป็นการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ใช้กับข้อมูลที่ได้จากการจำแนกหรือแบ่งกลุ่มโดยใช้หลักเกณฑ์แบบเดียวหรือทางเดียว (One-way ANOVA)

สำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติในการทดลองนี้ทำที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและวิจารณ์

## 4.1 ปริมาณน้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505

นำสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 มาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากตัวเซลล์และการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักเชื้อสาหร่ายโดยใช้สารสกัดคือ เมทานอล เฮกเซน เอทิลอะซีเตต เฮกเซน และบิวทานอล จากการทดลองพบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 จากตัวเซลล์ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย คือ เมทานอล และเฮกเซน คือ 38.30 และ 56.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 จากน้ำหมักเชื้อสาหร่ายที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เอทิลอะซีเตต เฮกเซน และบิวทานอล คือ 2.40, 0.60 และ 32.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากตัวเซลล์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน มีปริมาณสูงที่สุดคือ 56.30 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่4.1) ซึ่ง Pratt และคณะ (1944) ทำการสกัดตัวเซลล์โดยใช้ คลอโรฟอร์ม หรือ เบนซิน สกัดได้ 1-8 มิลลิกรัม ต่อ เซลล์แขวนลอย 1 ลิตร และจากการทดลองของ พงศ์ธรและคณะ (2544) ทำการสกัดตัวเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1: 2 : 1 ได้น้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 0.39 กรัม ต่อ เซลล์แขวนลอย 1 ลิตร ทั้งนี้ น้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้มีปริมาณน้อยกว่าการทดลองของ พงศ์ธรและคณะ (2544) อาจเกิดจากการไม่มีขั้นตอนการแตกเซลล์ก่อนทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

**ตารางที่ 4.1** แสดงปริมาณน้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505

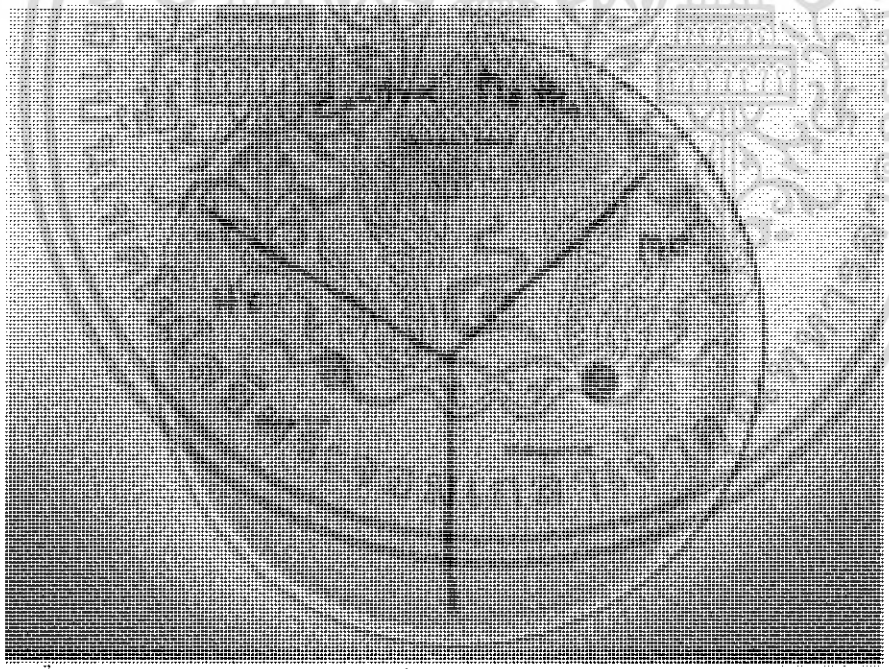
| สาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 | ตัวทำละลาย | น้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|
| ตัวเซลล์ | เมทานอล | 38.30 |
| | เฮกเซน | 56.30 |
| น้ำหมักเชื้อสาหร่าย | เอทิลอะซีเตต | 2.40 |
| | เฮกเซน | 0.60 |
| | บิวทานอล | 32.50 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

### 4.2.1 ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดจากเซลล์สาหร่าย

นำสารสกัดที่ได้จากเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยวิธีลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลายโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล และเฮกเซน มาทดสอบยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร พบว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายเมทานอลและตัวทำละลายเฮกเซน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 8.00 และ 8.60 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่4.2, รูปที่4.2ก) แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ซึ่งจากการทดลองของ Lima-Filho และคณะ (2002) ที่ทำการสกัดสารจาก *Amasia multifida* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่อยู่ในดิวิชันโรโดไฟร์ต้า พบว่าผลการทดลองนั้นมีความสอดคล้องกัน คือ สารสกัดที่สกัดจากเซลล์สาหร่ายโดยใช้จากตัวทำละลายเฮกเซนให้ผลการยับยั้งการเจริญดีที่สุดดีที่สุด



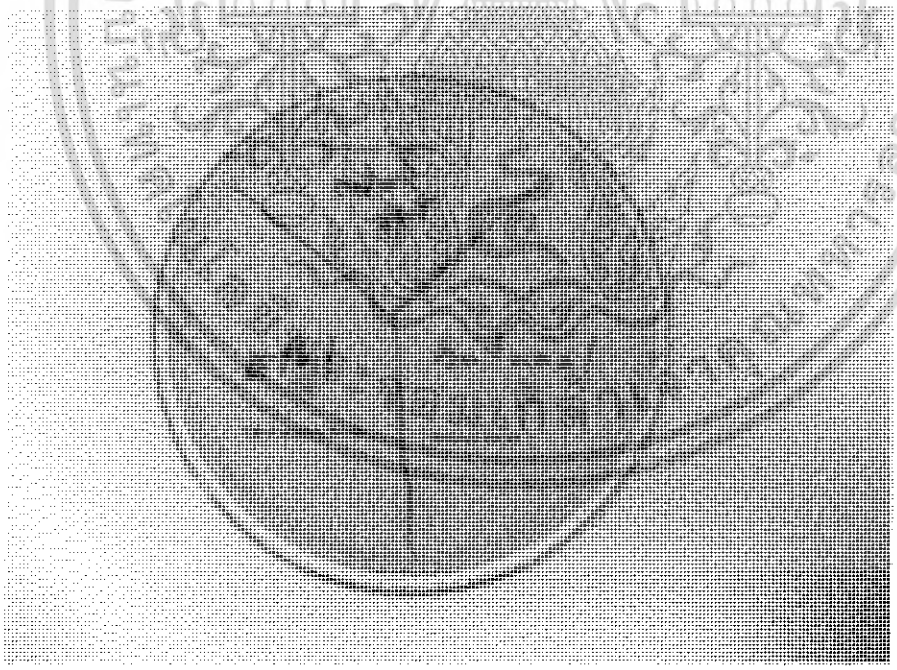
รูปที่ 4.2ก ผลของสารสกัดจากเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วย ตัวทำละลายเมทานอลและเฮกเซนต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.2.2 ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย**

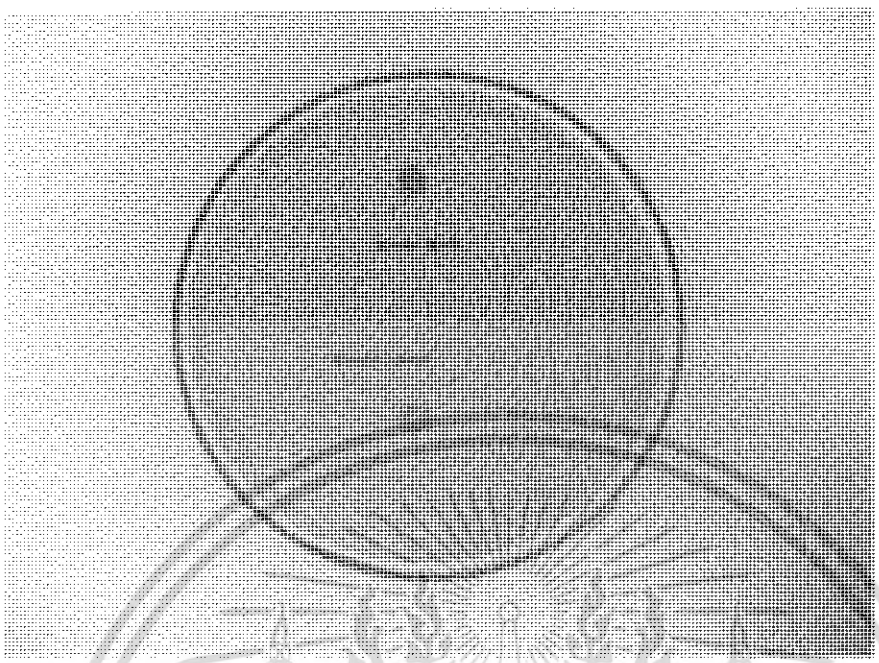
จากการทดลอง นำสารสกัดที่ได้จากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งสกัดด้วยวิธีลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลายโดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต เฮกเซน และบิวทานอล มาทดสอบยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร พบว่าตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 10.25 มิลลิเมตร (ตารางที่4.2, รูปที่4.2ข) แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ส่วนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากเฮกเซน และบิวทานอลไม่สามารถการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบทั้ง 3 ชนิด ซึ่งจากผลการทดลองนี้ ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้จากน้ำหมักสาหร่ายโดยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตให้ผลสอดคล้องกับสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซิทส์ในส่วนของน้ำหมักที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตต (กุสุมา, 2543) พบว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนเอทิลอะซีเตตมีประสิทธิภาพสูง

จากการทดลองขั้นตอนนี้ พบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดด้วย ตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต มีประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้นจึงได้นำตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตไปสกัดหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella* sp. $B_2$ และ *Chlorella* sp. $C_2$



**รูปที่ 4.2ข** ผลของสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตและบิวทานอล ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.2ค** ผลของสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633

## 4.3 เปรียบเทียบสายพันธุ์สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

เมื่อนำตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. $B_2$ และ *Chlorella* sp. $C_2$ พบว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีทั้งที่ความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร (ตารางที่ 4.3) โดยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม พบว่า *Chlorella* sp. A0505 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 คือ 10.00, 9.75 และ7.62 มิลลิเมตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม พบว่า *Chlorella* sp. A0505 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดคือ *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ*Escherichia coli* ATCC 25922 คือ 14.00, 12.33 และ9.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.3ก, 4.3ข และ 4.3ค) ซึ่งผลการทดลองนี้มีความขัดแย้งกับผลการทดลองของพงศ์ธรและคณะ (2544) ที่ทำการสกัดสารออกฤทธิ์สาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งพบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดโดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

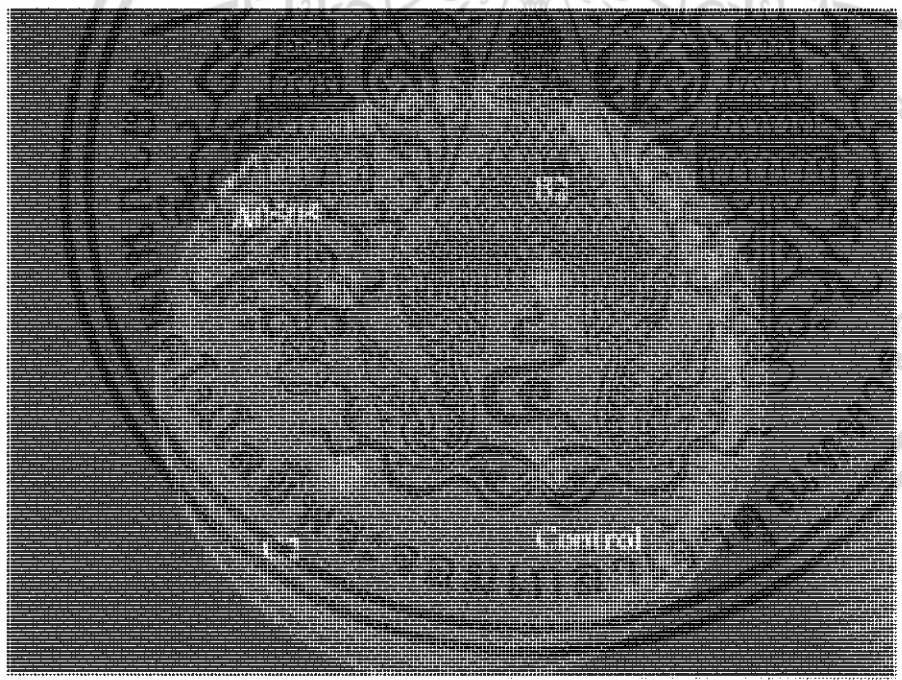
**ตารางที่ 4.2** แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร

| สาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 | ส่วนของสารสกัด (crude extract) | ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | *Escherichia coli* ATCC 25922 | *Candida albicans* ATCC 10231 |
| ตัวเซลล์ | เมทานอล | 8.00 | - | - |
| | เฮกเซน | 8.60 | - | - |
| น้ำหมักเชื้อ | เอทิลอะซีเตต | 10.25 | - | - |
| | เฮกเซน | - | - | - |
| | บิวทานอล | - | - | - |

หมายเหตุ - = ไม่ยับยั้ง

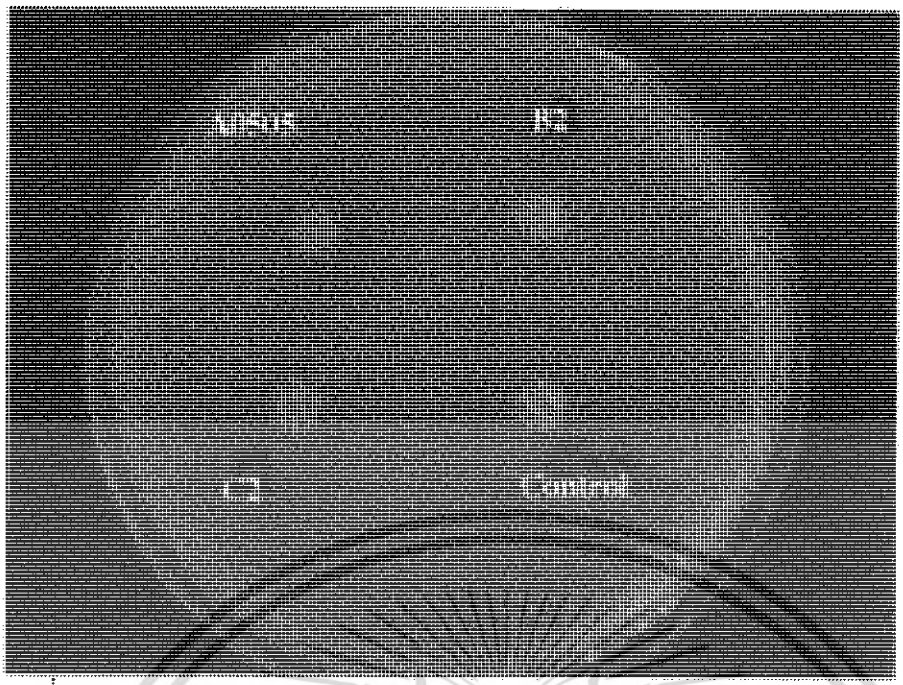
เมทานอลและคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1: 2 : 1 เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมนั้น ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* ได้

สำหรับสาหร่าย *Chlorella* sp. $B_2$สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633ได้ที่ความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.25 และ 7.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ สำหรับ *Chlorella* sp. $C_2$ ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.00 และ 7.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ และไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้ ซึ่งจากการทดลองนี้สรุปว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดีที่สุด จึงได้นำไปศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดในการทดลองที่ 4.4

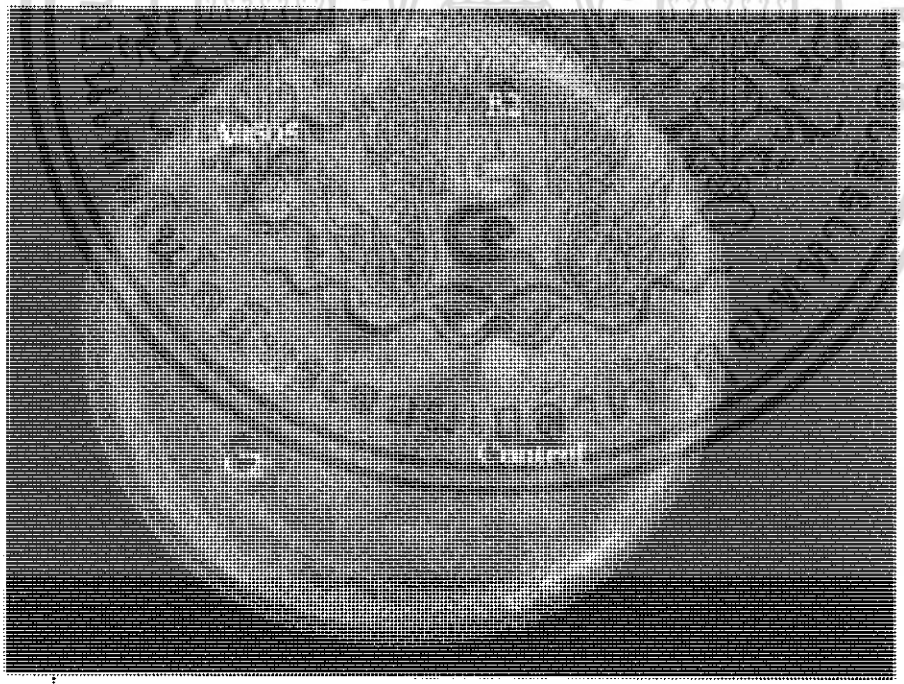


**รูปที่ 4.3ก** ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. $B_2$ และ *Chlorella* sp. $C_2$ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4. 3ข** ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. $B_2$ และ *Chlorella* sp. $C_2$ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 (ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม)



**รูปที่ 4.3ค** ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. $B_2$ และ *Chlorella* sp. $C_2$ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10231 (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3** แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตในส่วนน้ำหมักเชื้อที่ความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร

| สาหร่าย | ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | | *Escherichia coli* ATCC 25922 | | *Candida albicans* ATCC 10231 | |
| | 1 มิลลิกรัม | 3 มิลลิกรัม | 1 มิลลิกรัม | 3 มิลลิกรัม | 1 มิลลิกรัม | 3 มิลลิกรัม |
| *Chlorella* sp. A0505 | 10.00 | 12.33 | 7.62 | 9.25 | 9.75 | 14.00 |
| *Chlorella* sp. $B_2$ | 7.25 | 7.00 | - | - | - | - |
| *Chlorella* sp. $C_2$ | - | 7.00 | - | - | - | 7.00 |

หมายเหตุ - = ไม่ยับยั้ง

## 4.4 เปรียบเทียบระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

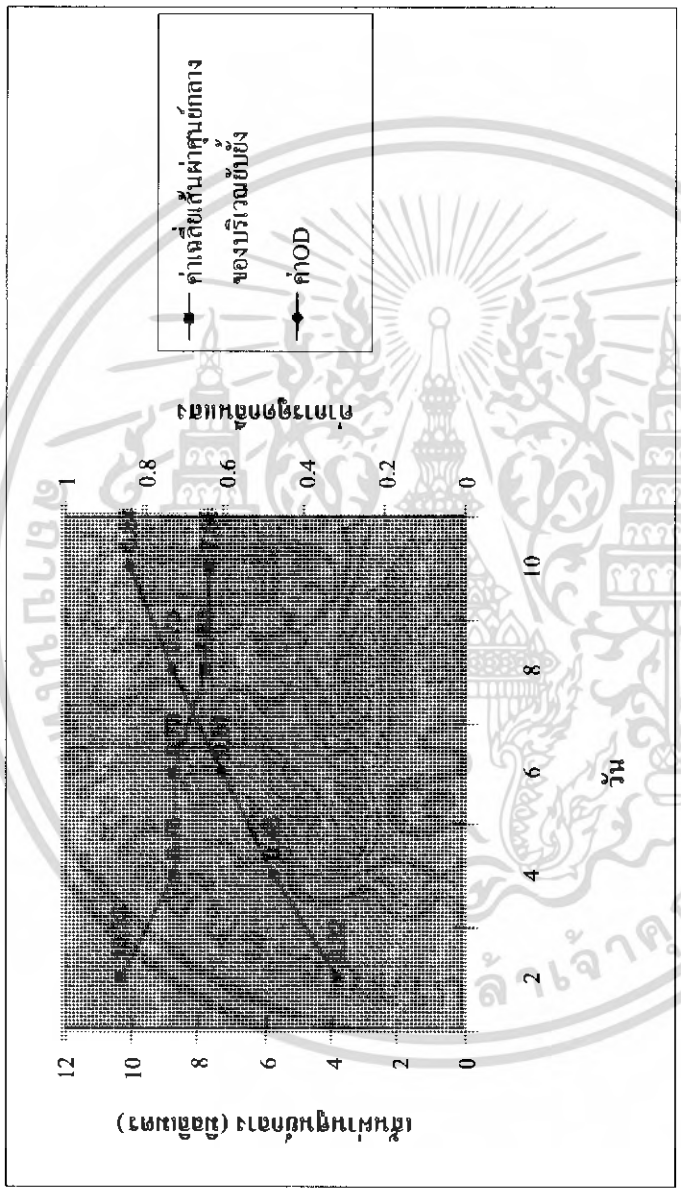
นำสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดเมื่อนำเอาน้ำหมักเชื้อสาหร่ายมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต โดยนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาระยะเวลาในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุกๆ 2 วัน พบว่าวันที่ 2, 4, 6, 8 และ10 มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต คือ 0.0158, 0.0085, 0.0056, 0.0089 และ 0.0038 กรัมต่อเซลล์แขวนลอย 1 ลิตร ตามลำดับ โดยในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุดคือ 0.0158 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4)

เมื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุกๆ 2 วัน ที่ทดสอบกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 พบว่าในวันที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง คือ 10.33, 8.75, 8.73, 7.83 และ 7.66 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.5) และเมื่อนำมาเขียนเป็นกราฟพบว่าประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะค่อยๆลดลงเมื่อปริมาณการเจริญของเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.4) แสดงว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ผลิตนั้นจะมีประสิทธิภาพดีในช่วงที่สาหร่ายมีการเจริญในระยะแรกและประสิทธิภาพจะค่อยๆลดลงเมื่อสาหร่ายเจริญเต็มที่ ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความแตกต่างกันกับผลการทดลองของวีนา (2547) ที่ทำการศึกษาสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคของสาหร่าย *Chlorella* $B_2$ พบว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* $B_2$ ที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร N-8 ที่ลดธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง มีประสิทธิภาพดีที่สุดในวันที่ 6 ของการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

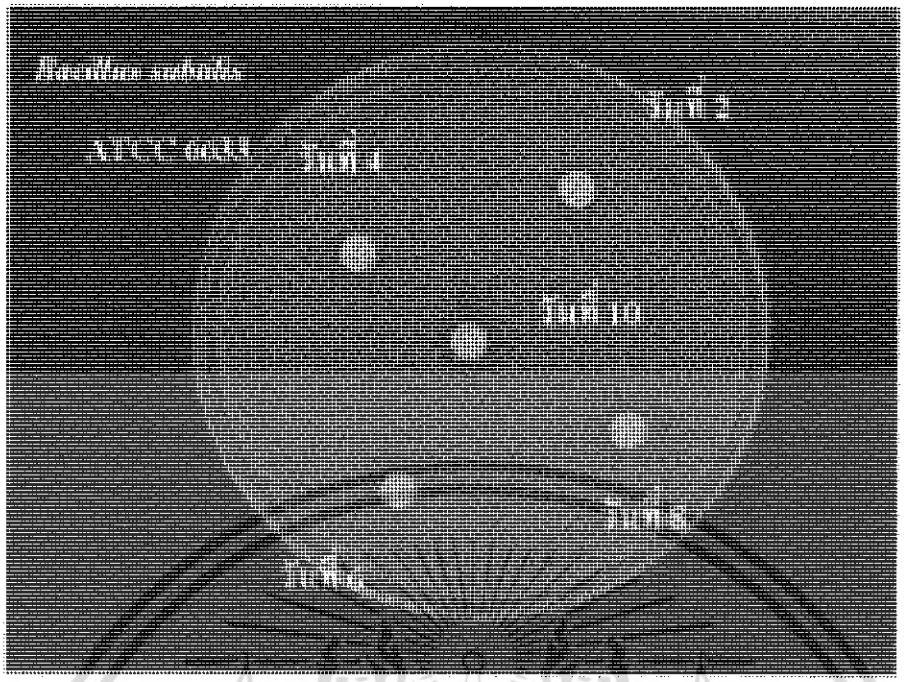
**ตารางที่ 4.4** แสดงปริมาณน้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตทุกๆ 2 วัน และความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร

| สาหร่าย | วันที่ | น้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (กรัมต่อลิตร) | ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) |
|---|---|---|---|
| *Chlorella* sp. A0505 | 2 | 0.0158 | 10.33 |
| | 4 | 0.0085 | 8.75 |
| | 6 | 0.0056 | 8.73 |
| | 8 | 0.0089 | 7.83 |
| | 10 | 0.0038 | 7.66 |

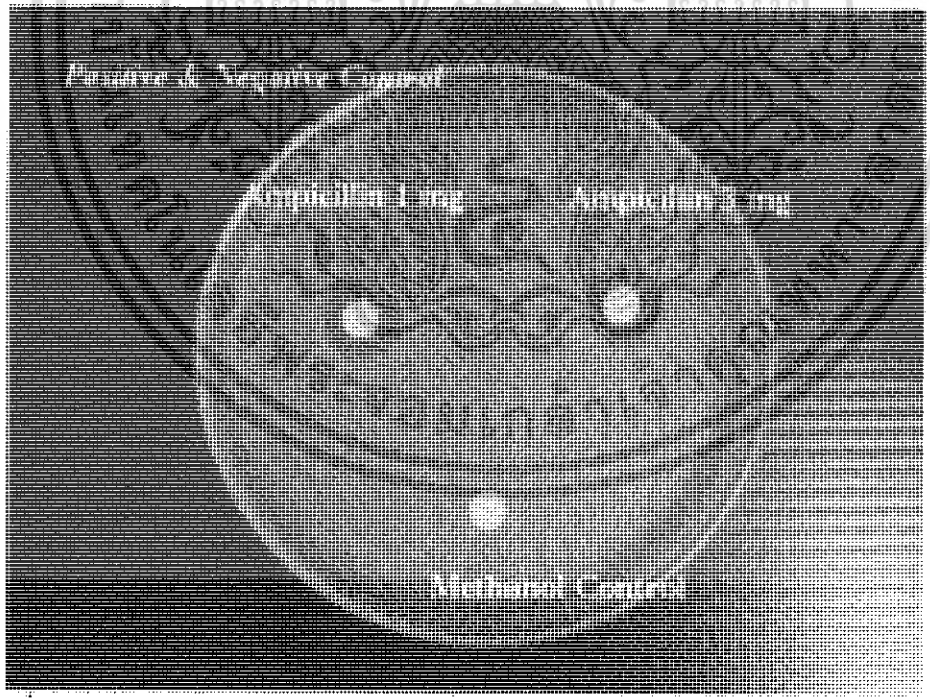



**รูปที่ 4.** 4 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วันต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

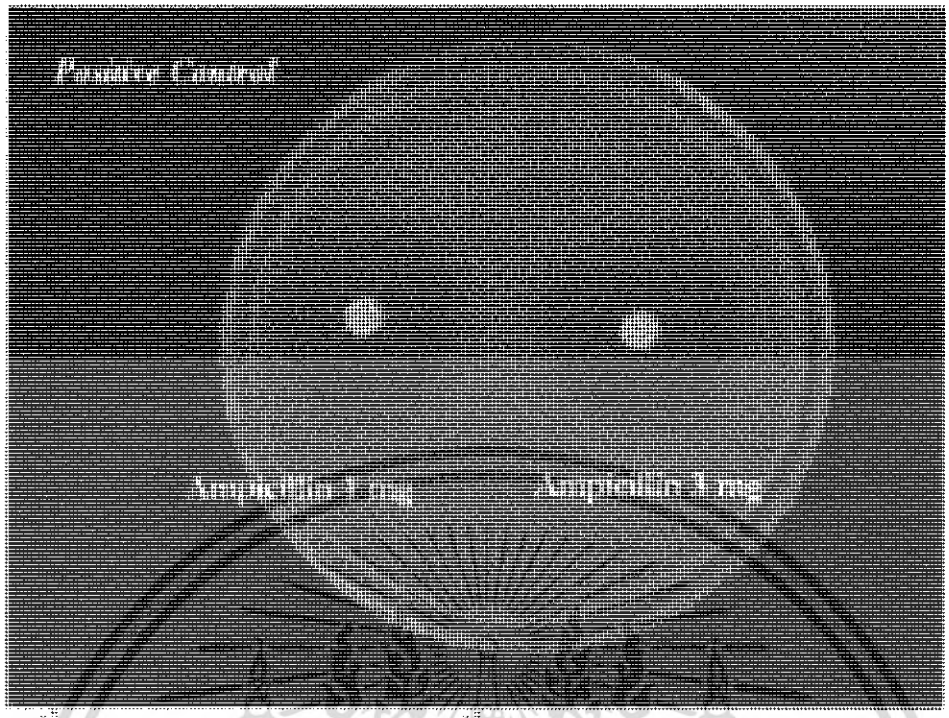


**รูปที่ 4.5** ผลของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่วันต่างๆ

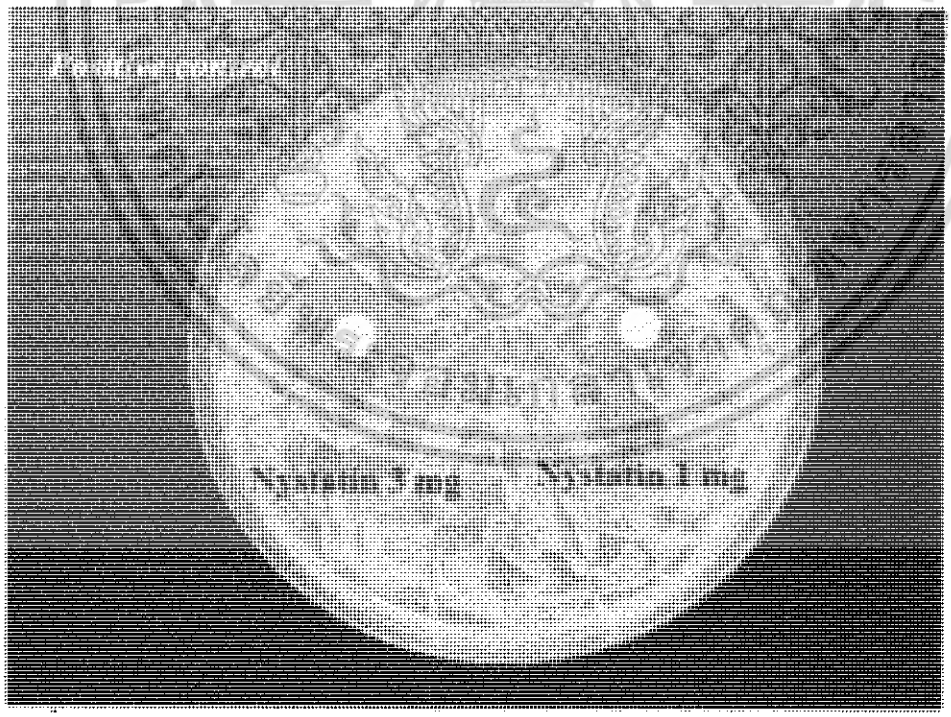


**รูปที่ 4.6** ผลของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัม ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.7** ผลของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัม ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922



**รูปที่ 4.8** ผลของยาปฏิชีวนะนิสตาตินที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัม ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ATCC 10231

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella* sp. A0505, *Chlorella* sp. $B_2$ และ *Chlorella* sp. $C_2$ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่า

1. สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 เมื่อสกัดด้วยวิธีลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลาย พบว่าที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร สารสกัดจากตัวเซลล์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด คือมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.60 มิลลิเมตร และสารสกัดจากน้ำหมักที่สกัดด้วย ตัวละลายเอทิลอะซีเตต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด คือมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.25 มิลลิเมตร

2. สารสกัดจากน้ำหมักของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตสามารถให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ดีที่สุด คือมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 14.00 มิลลิเมตร

3. การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต โดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน เป็นระยะเวลา 10 วัน ที่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด คือมีน้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 0.0158 กรัมต่อลิตรและมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.33 มิลลิเมตร

## ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงสาหร่าย เพื่อให้ได้สูตรอาหารที่ให้ผลการเจริญสูงที่สุดภายในช่วงเวลา 10 วัน

2. ควรทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ความเข้มข้นหลายๆค่า ในช่วงระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ เนื่องจากทำให้ทราบถึงค่าต่ำสุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ

3. ควรทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์หลายๆชนิด เพราะจะทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดว่าสามารถยับยั้งเชื้อชนิดใดได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ. ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์ (Chemical data bank). 2544. *เอกสารข้อมูลความปลอดภัยเคมีภัณฑ์ (MSDS).* [Online]. Avaliable : http://msds.pcd.go.th/search Name.asp?vID=113#พื้นฐาน

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. *สาหร่าย.* กรุงเทพฯ : คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กุสุมา แจ่มดี. 2543. *การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซิทส์ที่สร้างสารปฏิชีวนะจากดินในป่าชายเลน.* โครงงานพิเศษ. สาขาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยนเรศวร.

จรูญ ลีไตรรงค์. 2531. *การนำ Chlorella* sp. *(K3) ที่ได้จากการเลี้ยงในน้ำกากส่าเหล้า เพื่อเป็นอาหารของ Moinamacrocopa Straus.* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จิตรา เลาห์กมล ชัยวัฒน์ ชวลิตรจินดา คีตภัทร ปิยะจรรยาศิริ. 2546. *ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาโดยใช้สารสกัดจาก Chlorella* sp. โครงงานพิเศษ. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชลธิชา เรืองเอกพจน์ และ ชัยสิทธิ์ ธีระพงศ์รามกุล. 2545. *ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากสาหร่าย Chlorella* sp. โครงงานพิเศษ. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธิดา เพชรมณี และ มาวิทย์ อัศวอารีย์. 2538. *การตกตะกอนคลอเรลลาน้ำเค็มเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.* เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 10/2538. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. *แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค.* กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ Noble print.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. *จุลชีววิทยาทั่วไป.* พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย.

นันทวัน บุณยะประภัศร. 2536. ใน *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. เล่ม 1.* วันดี กฤษณพันธ์. หน้า 136. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.

พงศ์ธร เครือวณิชธรรม พรรษ พุ่มเจริญ และ วิทวัส เจนเวชศักดา. 2544. *ผลของการสกัดจาก Chlorella* sp. *ต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด.* โครงงานพิเศษ. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พจนีย์ โกมลภิส. 2524. ใน *แบคทีเรียทางการแพทย์ (โครงการตำรา-ศิริราช รายการที่ 74 9-2524).* โสภณ คงสำราญ, บรรณาธิการ. หน้า 67 กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์พิฆเณศ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรรณกร อิ่มวิทยา. 2535. *เชื้อราก่อโรคในคน Fungi pathogenic for humans.* กรุงเทพฯ : บริษัท สารมวลชน จำกัด.

เมระนี เทียนประสิทธิ์. 2527. *โรคเชื้อราที่ผิวหนัง (โครงการตำรา-ศิริราช รายการที่ 116 2-2527).* กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อักษรสัมพันธ์.

มาลิน จุลศิริ. 2540. *ยาต้านจุลชีพ : ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์.* พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน. 209 น.

วิภา โภคาสถิต. 2507. *การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว.* วิทยานิพนธ์ปริญญากสิกรรม และสัตวบาลบัณฑิต. คณะกสิกรและสัตวบาล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วินัย ดะห์ลัน. 2535. ใน *สารอาหารที่นิยมใช้เพื่อเสริมสุขภาพและต้านโรค.* ธิดา นิงสานนท์ และอรวรรณ เรืองสมบูรณ์, บรรณาธิการ. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.

วิสัย วงศ์สายปิ่น. 2534. *สาหร่ายเซลล์เดียว สารอาหารจากแสงตะวัน.* กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์รวมทรรศน์. 137 น.

วีนา ชูโชติ. 2547. *ผลของสารสกัดจากสาหร่าย Chlorella* sp. *ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.* รายงานการวิจัย. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศมนีย์ ศุขรุ่งเรือง. 2529. *เชื้อราก่อโรคและโรคเชื้อรา (Pathogenic fungi and fungal disease).* กรุงเทพฯ : บริษัท สารมวลชล จำกัด.

สกานต์ พูลทวี. 2536. *สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง Chlorella* sp. *สายพันธุ์ B.K.1.* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย.

สมใจ ศิริโภค. 2547. *จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.* พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สรวิศ เผ่าทองศุข. 2543. *ศักยภาพวิจัยและพัฒนา เพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย.* ชุดโครงการ อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

เสน่ห์ แก้วนพรัตน์. 2545. *บทบาทของจุลินทรีย์ในทางเภสัชกรรม.* พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาคเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุวณี สุภเวชย์. 2536. *แบคทีเรียพื้นฐาน (Basic bacteriology).* พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ศิริยอต (ประเทศไทย) จำกัด.

สิริรัตน์ วงศ์ไพโรจน์พานิช. 2525. *การเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาน้ำจืด.* ซีเนียร์ โปรเจ็ค. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย.

โสภณ คงสำราญ. 2524. *แบคทีเรียทางการแพทย์ (โครงการตำรา-ศิริราช รายการที่ 74 9-2524).* กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์พิฆเณศ.

Bansemir, A., Blume, M., Schroder, S., and Lindequist, U. 2005. Screening of cultivated

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

seaweeds for antibacterial activity fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*. 252: 79-84.

Berg, R. H. Donald danforth plant science center. 2005. Cell! An Education Resource. [Online]. Avaliable : http://www.danforthcenter.org/Cells/page2.htm

Buri, P., Sinchumpasuk, O., Visonkosol, S., and Kornkasem, P. 1976. Preliminary experiment on the cultivation of *Chlorella* spp. In sea water. *Reprint of "Food"*. 8(2): 32-38

Burlow, G.S. E.D. 1953. *Agriculture from laboratory to pilot plant.* Washington D.C. : อ้างถึงใน วิภา โกคาสถิต. 2507. *การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว.* วิทยานิพนธ์ปริญญากสิกรรม และสัตวบาลบัณฑิต. คณะกสิกรและสัตวบาล.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Casteel, D.A. 1999. Peroxy natural products. *Natural Product Report Article*. 16: 55-73.

CNN. 2000. Nature. Survival of the fittest: New model offers fresh clues. [Online]. Avaliable : http://archives.cnn.com/2000/NATURE/12/11/survival.fittest.enn/

Dahl, M.K. 2000. *Bacillus subtilis*. In : *Encyclopedia of food microbiology*, 135-136. Robinson, K.R. Sandiego. Academic press a Harcourt science and technology company.

EMD Chemicals Inc. 2005. Mueller-hinton broth [Online]. Avaliable : http:// www.emd chemicals.com/analytics/Micro_Manual/TEDISdata/prods/1_10293_0500.html.

Hansakul, W. 1991. *Chlorella* nutrients and its beneficial. *Research seminar and workshop on mass cultures of microalgae.* Nakhonpathom, Thailand. November 18-23, 1991 : P-9 – P-25.

Itasca state park microbial observatory. New species. [Online]. Avaliable : http://www. ndsu.nodak.edu/instruct/fawley/coccoids/Itasca/newspp.htm

Lee, R.E. 1999. *Phycology*. 3rd ed. Cambridge university press. New York, USA.

Lee, W.H. and Rosenbaum, M. 2530. *คลอเรลล่า อภิโภชนสารจาก พลังแสงอาทิตย์และนานาประโยชน์.* แปลจากเรื่อง *Chlorella : The sun-powered supernutrient and its beneficial properties.* โดย วงศ์เมือง หงสกุล. กรุงเทพฯ : บริษัท เพชรสยาม จำกัด. 31 น.

Lima-Filho, J.V.M., Carvalho, A.F.F.U., Freitas, S.M., and Melo, V.M.M. 2002. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33(4): 311-314.

Lund, H.C. and Lund, J.W.G. 1995. *Freshwater algae : their microscopic world explored.* Bristol, England. November : Biopress Ltd. 360 น.

Makimura, K. 2001a. *Pathogenic Fungi Database (PFDB).* List of media for fungal culture. [Online]. Avaliable : http://www.pfdb.net/html/list_iso.htm#iso_1.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Makimura, K. 2001b. *Pathogenic Fungi Database (PFDB). Candida albicans* [Online]. Avaliable : http://www.pfdb.net/php/s_html_create.php?direct=true&speid=14&PHPSESSID=31669335bee5e5f0e3fd53f252b66b83'

Medlineplus. 2005. Nystain. [Online]. Avaliable : http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/medmaster/a682758.html

National center for biotechnology information. 2005a. Substance Summary. [Online]. Avaliable : http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=8803

National center for biotechnology information. 2005b. Substance Summary. [Online]. Avaliable : http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=65740

O'Keefe, B.R. 2001. Biologically active Proteins from natural product extracts. *J. Nat. Prod.* 64: 1373-1381.

Pratt, R., Daniels, T.C., Eiler, J. J., Gunnison, J.B., Kumler, W.D., Oneto, J.F., Strait, L.A., Spoehr, H.A., Hardin, G.J., Milner, H.W., Smith, J.H.C., Strain, H.H. 1944. *Chlorellin*, an antibacterial substance from *Chlorella. Science.* 99: 351-352.

Preseott, G.W. 1987. *How to know the freshwater algae, 3rd Edition. Montana : The Pictured Key Nature Series.* Dubuque. Wm.C. Brown Company Publishers.

Pirson, A. 1955. *Functional aspects in mineral nutrition of green plant.* อ้างถึงใน วิภา โภคาสถิต. 2507. *การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียว.* วิทยานิพนธ์ปริญญากสิกรรม และสัตวบาลบัณฑิต. คณะกสิกรและสัตวบาล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Sasson, A. 1991. Cultures of microalgae : achievements and prospects. *Research seminar and workshop on mass cultures of microalgae.* Nakhonpathom. Thailand. November 18-23, 1991. K-15.

Saubolle, M.A. and Hoeprich, P.D. 1978. Disk agar diffusion susceptibility testing of yeast. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 14(4): 517–530.

Sengbusch, P.V. 2003. *Botany Online.* Cell walls of algae. [Online]. Avaliable : http:// www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e26/26d.htm.

Steenblock, D. 2530. *คลอเรลลา (CHLORELLA) พืชธรรมชาติที่ทรงคุณค่าทางยา.* แปลจากเรื่อง *Chlorella: Natural medicinal algae* โดย กิดานันท์ มลิทอง. จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย.

The ohio state university. *Research news.* 2004. Bad news for Pathogenic bacteria: scientists find protein essential for bacterial survival. [Online]. Avaliable : http:// researchnews.osu.edu/archive/proreg.htm

Thomson healthcare. 2005. Ampicillin. PDRhealth. [Online]. Avaliable : http://pdrhealth.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

com/drug_info/rxdrugprofiles/drugs/amp1568.shtml

Wikipedia the free encyclopedia. 2005a. Ampicillin. [Online]. Avaliable : http://en.wikipedia.org/wiki/Ampicillin

Wikipedia the free encyclopedia. 2005b. Ethyl acetate. [Online]. Avaliable : http://en.wikipedia.org/wiki/Ethyl_acetate

Wikipedia the free encyclopedia. 2005c. Nystain. [Online]. Avaliable : http://en.wikipedia.org/wiki/Nystatin

Wikipedia the free encyclopedia. 2005d. Methanol. [Online]. Avaliable : http://en.wikipedia/wiki/Methanol

World Health Organization. 2005. Guidelines on standard operating procedures for microbiology chapter 5 - Bacteriological media [Online]. Avaliable : http://w3.whosea.org/EN/Section10/Section17/Section53/Section482_1782.htm.

www.chlorella-alg.com/

Xu, N., Fan, X., Yan, X., Li, X., Niu, R. and Tseng, C.K. 2003. Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. *Phytochemistry*. 62: 1221-1224

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก.

# อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย

- **สูตรอาหาร N-8 ที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย *Chlorella***

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2HPO_4.2H_2O$ | 260.0 | มิลลิกรัม |
| $K_2HPO_4$ | 740.0 | มิลลิกรัม |
| $CaCl_2$ | 10.0 | มิลลิกรัม |
| Fe EDTA | 10.0 | มิลลิกรัม |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 50.0 | มิลลิกรัม |
| $KNO_3$ | 1000.0 | มิลลิกรัม |
| Trace element* | 1.0 | มิลลิกรัม |
| Distilled water to | 1.0 | ลิตร |

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข.

# อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

**สูตรอาหาร Mueller-hinton agar (MHA) ที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย** (EMD Inc., 2005)

สูตรอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) ประกอบด้วย (หน่วย กรัมต่อลิตร)

| | |
|---|---|
| Meat infusion | 2.0 |
| Casein hydrolysate | 17.5 |
| Starch | 1.5 |
| Agar-agar | 13.0 |

การเตรียมอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) โดยใช้อาหารสำเร็จรูป

ตักสารมา 34 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเข้าหม้อนึ่งความดันไอ ซึ่งตั้งอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารที่ได้จะมีลักษณะใส สีเหลืองค่อนข้างน้ำตาล

**สูตรอาหาร Nutrient agar (NA) ที่ใช้เก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย** (World Health Organization,2005)

| | | |
|---|---|---|
| Meat Extract | 10.0 | กรัม |
| Peptone | 10.0 | กรัม |
| Sodium chloride | 5.0 | กรัม |
| Distilled water | 1.0 | ลิตร |
| Agar | 15.0 | กรัม |

ผสมส่วนผสมดังกล่าว (โดยไม่ใส่วุ้น) แล้วละลายโดยการให้ความร้อน เมื่อเย็น ปรับพีเอชให้ได้ 7.5-7.6 จากนั้นเติมวุ้นลงไป ละลายวุ้นให้เข้ากันจากนั้นนำไปหม้อนึ่งความดันไอ ซึ่งตั้งอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาเตรียมลงในจานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค.

# อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

**สูตรอาหาร Sabourand's dextrose agar (SDA) ที่ใช้เลี้ยงยีสต์ *Candida albicans***

(Makimura, 2001a)

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 10 | กรัม |
| Glucose | 10 | กรัม |
| Distilled water | 1 | ลิตร |
| Agar | 15 | กรัม |
| ปรับ pH | 6.0 | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ง.

# คุณสมบัติทางกายภาพของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

## 1. บิวทานอล (Butanol) (กรมควบคุมมลพิษ, 2544)

- มีชื่อเคมีทั่วไปว่า Butyl alcohol ชื่อพ้องอื่นๆ N-butyl alcohol, 1-Butanol, Propylcarbinol, Butyric alcohol, Butan-1-ol มีสูตรโมเลกุลคือ $C_4H_{10}O$ (รูปที่ ง-1)

**รูปที่ ง-1** สูตรโครงสร้างของสารบิวทานอล
ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ, 2544

- การใช้ประโยชน์ ใช้เป็นสารละลายเคลือบผิวและสารอื่น ๆ
- มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี เป็นของเหลว ไม่มีสี มีกลิ่นคล้ายเอธานอล น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 74.12 มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 116-118 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลวหรือจุดเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -89.5 องศาเซลเซียส มีค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.810 ความหนาแน่นไอเท่ากับ 2.6 มีค่าความหนืดเท่ากับ 2.95 ความดันไอเท่ากับ 4 มิลลิเมตรปรอทที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และมีค่าความสามารถในการละลายน้ำที่ 7.7 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
- สามารถละลายใน แอลกอฮอลล์ อิเทอร์ ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ
- มีความเป็นอันตรายเมื่อ

1. หายใจเข้าไปจะทำให้เกิดการระคายเคือง การหายใจเอาสารที่ความเข้มข้นสูงๆเข้าไป สารนี้จะไปทำลายเยื่อเมือกและทางเดินหายใจส่วนบน ทำให้เกิดอาการไอ แผลไหม้ หายใจติดขัด กล่องเสียงอักเสบ ปวดศีรษะ หายใจถี่รัว คลื่นไส้ และอาเจียน

2. การสัมผัสถูกผิวหนังจะทำให้เกิดการระคายเคือง และเกิดการทำลายเยื่อบุที่ผิวหนัง ทำให้เกิดผื่นแดง

3. การกลืนหรือกินเข้าไป เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะไปกดระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เกิดอาการง่วงซึม เวียนศีรษะ มึนเมา (Inebriation) ความดันโลหิตลดลง หลอดเลือดเลี้ยงหัวใจผิดปกติ คลื่นไส้ อาเจียน ทำอันตรายต่อตับและไต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การสัมผัสถูกตา จะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อตาและทำลายเยื่อบุตา ทำให้ตาแดง ปวดตา และสายตาพร่ามัวได้ สารนี้มีอวัยวะเป้าหมายคือระบบประสาทส่วนกลาง ตา ตับ ไต โลหิต และระบบประสาทหู

- การปฐมพยาบาล

1. ถ้าหายใจเข้าไป ให้เคลื่อนย้ายผู้ป่วยออกไปที่ที่มีอากาศบริสุทธิ์ ถ้าผู้ป่วยหยุดหายใจ ให้ช่วยผายปอด ถ้าผู้ป่วยหายใจติดขัดให้ออกซิเจนช่วย นำส่งไปพบแพทย์

2. ถ้ากลืนหรือกินเข้าไป และผู้ป่วยยังมีสติอยู่ในบ้วนปากด้วยน้ำ แล้วนำส่งไปพบแพทย์

3. ถ้าสัมผัสถูกผิวหนัง ให้ฉีดล้างผิวหนังโดยทันทีด้วยน้ำปริมาณมาก ๆ อย่างน้อย 15 นาที พร้อมถอดเสื้อผ้า และรองเท้าที่เปรอะเปื้อนสารเคมีออก และให้ล้างทำความสะอาดเสื้อผ้าและรองเท้าที่เปรอะเปรื้อนก่อนนำมาใช้อีกครั้ง

4. ถ้าสัมผัสถูกตา ให้ฉีดล้างตาโดยทันทีด้วยน้ำปริมาณมาก ๆ อย่างน้อย 15 นาที และให้มั่นใจว่าฉีดล้างตาสะอาดทั่วถึงโดยใช้นิ้วถ่างแยกเปลือกตาออกขณะทำการล้าง

- สารนี้เป็นของเหลวไวไฟ เพราะฉะนั้นสามารถก่อให้เกิดอัคคีภัยและการระเบิดได้โดยสารนี้มีจุดวาบไฟที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส สามารถจุดลุกติดไฟได้เองที่อุณหภูมิ 342 องศาเซลเซียส โดยถ้ามีอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างไอระเหยของสารและอากาศสามารถก่อให้เกิดการระเบิดได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส ไอระเหยของสารนี้อาจเกิดการแพร่กระจายไปสู่แหล่งจุดติดไฟและเกิดการติดไฟย้อนกลับมาได้ ดังนั้นภาชนะบรรจุอาจเกิดการระเบิดขึ้นได้เมื่อถูกเพลิงไหม้

- สารดับเพลิงในกรณีเกิดเพลิงไหม้ให้ใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ผงเคมีแห้ง หรือโฟมที่เหมาะสม โดยใช้การฉีดเป็นฝอยเพื่อหล่อเย็นภาชนะบรรจุที่สัมผัสถูกเพลิงไหม้ น้ำจะมีประสิทธิภาพในการฉีดหล่อเย็น แต่จะไม่มีผลในการดับเพลิง

- ขั้นตอนการดับเพลิงรุนแรง ให้สวมใส่อุปกรณ์ช่วยหายใจชนิดมีถังอากาศในตัว (SCBA) และชุดป้องกันสารเคมีสัมผัสผิวหนัง และตา

- การดูแลและเก็บรักษา ให้เก็บในภาชนะบรรจุที่ปิดมิดชิด ในที่เย็นและแห้ง อยู่ห่างจากความร้อน ประกายไฟ เปลวไฟ และเก็บห่างจากสารออกซิไดส์ ล้างทำความสะอาดให้ทั่วภายหลังจากการเคลื่อนย้าย

- ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

1. เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ เป็นพิษต่อปลา และแพลงตอน

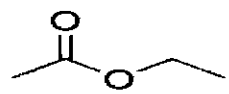
2. สามารถเกิดการสลายตัวทางชีวภาพได้ดี

3. ไม่ส่งผลอันตรายต่อระบบบำบัดน้ำทิ้ง หากมีการใช้และจัดการสารเคมีอย่างเหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2. เอทิล อะซีเตต (Ethyl acetate)**

- มีชื่อเคมีทั่วไปว่า Ethyl acetate ชื่อพ้องอื่นๆ Ethyl acetic ester, Acetoxyethane, Acetic ether, Vinegar naphtha, Acetidin, Acetic ester มีสูตรโมเลกุลคือ $C_4H_8O_2$ (รูปที่ ง-2)



**รูปที่ ง-2** โครงสร้างของสารเอทิล อะซีเตต

ที่มา: Wikipedia the free encyclopedia, 2005b

- การใช้ประโยชน์ ใช้ทำเครื่องสำอางค์ ใช้ในการกลั่นแยก ใช้เป็นสารละลาย

- มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี เป็นของเหลวใส มีกลิ่นหอม น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 88.11 มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 77.2 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลวหรือจุดเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -83 องศาเซลเซียส มีค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.9018 ความหนาแน่นไอเท่ากับ 3 มีค่าความหนืดเท่ากับ 0.44 มีค่าความดันไอเท่ากับ 75 มิลลิเมตรปรอท มีค่าความสามารถในการละลายน้ำที่ 7.9 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีค่าความ เป็นกรดด่าง เท่ากับ 7.4 สารนี้ละลายในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ กลีเซอรีน ตัวทำละลายอินทรีย์

- มีความเป็นอันตรายเมื่อ

1. ถ้าหายใจเข้าไป ไอระเหยที่ความเข้มข้นสูง ๆ จะทำให้ปวดศีรษะ มึนงง หมดสติ

2. การสัมผัสทางผิวหนังทำให้เกิดการอักเสบของผิวหนังบริเวณที่สัมผัส และเกิดการทำลายชั้นไขมันของผิวหนังอย่างรุนแรง

3. การกลืนกินเข้าไปจะทำให้คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ ง่วงนอน หมดสติ

4. การสัมผัสถูกตาจะก่อให้เกิดการระคายเคือง

5. สารนี้มีผลทำลายดวงตา ผิวหนัง และระบบหายใจ แต่ไม่เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง ตามรายละเอียด IARC, NTP, OSHA

- การปฐมพยาบาล

1. ถ้าหายใจเข้าไปให้เคลื่อนย้ายผู้ป่วยออกไปที่ที่มีอากาศบริสุทธิ์ ผู้ป่วยไม่หายใจ ให้ช่วยผายปอด ผู้ป่วยหายใจลำบาก ให้ออกซิเจน

2. การกินหรือกลืนเข้าไป ถ้าผู้ป่วยยังมีสติให้ดื่มน้ำและกระตุ้นทำให้อาเจียนทันทีโดยเจ้าหน้าที่ทางการแพทย์ ถ้าผู้ป่วยหมดสติห้ามไม่ให้สิ่งใดเข้าปาก ถอดเสื้อผ้าที่เปรอะเปื้อนและทำความสะอาดก่อนใช้อีกครั้ง

3. ถ้าสัมผัสถูกผิวหนัง ให้ล้างออกด้วยน้ำและสบู่ปริมาณมาก ๆ อย่างน้อย 15 นาที

4. ถ้าถ้าสัมผัสถูกตา ให้ฉีดล้างตาโดยให้น้ำไหลผ่านอย่างน้อย 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สามารถเกิดปฏิกิริยารุนแรงกับ กรดคลอโรซัลโฟนิค นอกจากนี้ควรหลีกเลี่ยง กรด สารออกซิไดซ์ สารอัลคาไลท์ที่มีปฏิกิริยารุนแรง ไนเตรท ความร้อน การสัมผัสกับแหล่งจุดติดไฟ จะจุดติดไฟเมื่อสัมผัสกับโพแทสเซียม เตริกบิวทอกไซด์ สารนี้มีจุดวาบไฟที่อุณหภูมิ -4.44 องศาเซลเซียส สามารถจุดลุกติดไฟได้เองที่อุณหภูมิ 460 องศาเซลเซียส

- สารดับเพลิงที่เหมาะสมเมื่อเกิดอัคคีภัย คือ แอลกอฮอล์ โฟม คาร์บอนไดออกไซด์ ผงเคมีแห้ง ใช้น้ำฉีดเป็นฝอยเมื่อหล่อเย็นภาชนะบรรจุที่สัมผัสถูกเพลิงไหม้ ไอระเหยสามารถแพร่กระจายไปสู่แหล่งจุดติดไฟและเกิดไฟย้อนกลับมาได้ผสมกับอากาศ ประกายไฟอาจจะเกิดขึ้นได้ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า ประกายไฟทั่ว ๆไปที่เกิดขึ้นเอง หรืออุณหภูมิของประกายไฟ อุณหภูมิประกายไฟจะลดลงเมื่อปริมาณไอระเหยเพิ่มขึ้นและเวลาที่ไอระเหยสัมผัสกับอากาศและความดันที่เปลี่ยนแปลง ประกายไฟอาจจะเกิดที่อุณหภูมิสูงเฉพาะกับห้องปฏิบัติงานภายใต้สุญญากาศ ถ้าอากาศเข้าไปอย่างทันทีทันใดหรือการปฏิบัติงานภายใต้ความดันสูงถ้าไอระเหยออกมาทันใด หรือการเกิดขึ้นที่บริเวณแอทโมสเฟีย

- เก็บในภาชนะที่ปิดสนิท ที่มีอุณหภูมิเย็น แห้ง ในบริเวณที่มีการระบายอากาศ เก็บให้ห่างจากแหล่งที่เกิดประกายไฟ และสารออกซิไดซ์สารที่เหลืออยู่ในภาชนะอาจจะทำให้เกิดอันดรายได้ควรใช้อย่างระมัดระวัง

- ในกรณีรั่วไหลให้อพยพคนที่ไม่เกี่ยวข้องทั้งหมดออกจากพื้นที่ ขจัดแหล่งการจุดติดไฟใดๆ ออกไฟจนกระทั่งพื้นที่ดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดอันตรายจากการระเบิดหรืออันตรายไฟ ทำการบรรจุส่วนที่หกรั่วไหลและแยกออกจากแหล่งสารเคมีนั้น ถ้าสามารถทำได้โดยปราศจากความเสี่ยงอันตราย เก็บและบรรจุสารสำหรับการนำไปกำจัดให้เหมาะสม

- ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

1. มีความเป็นพิษต่อปลาและแพลงก์ตอน อาจเกิดการผสมกับอากาศเหนือผิวน้ำ ให้ไอของสารที่ระเบิดได้

2. สามารถเกิดการสลายตัวทางชีวภาพได้ดี

3. ไม่ส่งผลอันตรายต่อระบบบำบัดน้ำทิ้ง หากมีการใช้และจัดการสารเคมีอย่างเหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3. เฮกเซน (Hexane) (กรมควบคุมมลพิษ, 2544)**

- มีชื่อเคมีทั่วไปว่า Hexyl hydride ชื่อพ้องอื่นๆ Normal hexane, N-Hexane, Skellysolve B, Dipropyl, Gettysolve-b, Hex, N-Hexane มีสูตรโมเลกุลคือ $C_6H_{14}$ (รูปที่ ง-3)

**รูปที่ ง-3** โครงสร้างของสารเฮกเซน

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ, 2544

- การใช้ประโยชน์ ใช้เป็นสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ และตรวจสอบในห้องปฏิบัติการเคมี

- มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี เป็นของเหลวไม่มีสี มีกลิ่นเฉพาะตัว น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 86.18 มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 69 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลวหรือจุดเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -95 องศาเซลเซียส มีค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.66 ความหนาแน่นไอเท่ากับ 3 มีค่าความดันไอเท่ากับ 130 มิลลิเมตรปรอทที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถละลายน้ำโดยใช้สารน้อยกว่า 0.1 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร

- มีความเป็นอันตรายเมื่อ

1. การหายใจเข้าไป จะเกิดการระคายเคืองระบบทางเดินหายใจส่วนบน , เกิดอาการคลื่นไส้, อาเจียน, ปวดศีรษะ, ง่วงนอน, หมดสติ และอาจจะทำให้เกิดอาการสับสน

2. การสัมผัสถูกผิวหนัง จะก่อให้เกิดการระคายเคือง ผิวหนังอักเสบ หากดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังจะเป็นอันตราย

3. การกลืนหรือกินเข้าไป จะก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อระบบย่อยอาหาร ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน เวียนศีรษะ

4. การสัมผัสถูกตา จะก่อให้เกิดการระคายเคืองตา ผลเรื้อรังจะกดระบบประสาทส่วนกลาง สารนี้มีอวัยวะเป้าหมาย คือ ตา ผิวหนัง ระบบหายใจ ระบบประสาทส่วนกลาง และระบบประสาทส่วนปลาย

- การปฐมพยาบาล

1. ถ้าหายใจเข้าไป ให้นำส่งไปพบแพทย์ทันที เคลื่อนย้ายผู้ป่วยออกจากบริเวณที่สัมผัสถูกสารสู่ที่ที่มีอากาศบริสุทธิ์ ถ้าไม่หายใจให้ช่วยผายปอด ถ้าหายใจลำบากให้ออกซิเจนช่วย

2. ถ้ากลืนหรือกินเข้าไป ถ้าผู้ป่วยมีสติอย่ากระตุ้นให้ผู้ป่วยอาเจียน ให้ผู้ป่วยดื่มน้ำหรือนมปริมาณมาก ๆ ทันที นำส่งไปพบแพทย์

3. ถ้าสัมผัสถูกผิวหนัง ให้ฉีดล้างผิวหนังทันที ด้วยสบู่และน้ำปริมาณมาก ๆ อย่างน้อย 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ถ้าสัมผัสถูกตา ให้ฉีดล้างตาด้วยน้ำปริมาณมาก ๆ อย่างน้อย 15 นาที

- สารที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาหรือสารที่เข้ากันไม่ได้ คือ สารออกซิไดซ์อย่างแรง คลอรีน ฟลูออรีน แมกนีเซียมเปอร์คลอเรทและควรหลีกเลี่ยง ความร้อน เปลวไฟ แหล่งของการจุดติดไฟ สารนี้มีจุดวาบไฟที่อุณหภูมิ -23 องศาเซลเซียส สามารถจุดลุกติดไฟได้เองที่อุณหภูมิ 224 องศาเซลเซียส

- สารดับเพลิงในกรณีเกิดเพลิงไหม้ให้ใช้แอลกอฮอล์โฟม ผงเคมีดับเพลิง หรือคาร์บอนไดออกไซด์ ใช้น้ำดับเพลิงจะไม่ได้ผลแต่สามารถใช้น้ำฉีดหล่อเย็นภาชนะบรรจุที่ถูกเพลิงไหม้ การสัมผัสกับสารออกซิไดซ์อย่างรุนแรง จะทำให้เกิดเพลิงไหม้และเกิดก๊าซพิษคาร์บอนมอนนอกไซด์ และคาร์บอนไดออกไซด์

- กรณีเกิดเพลิงไหม้ให้สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตรายที่เหมาะสม และอุปกรณ์ช่วยหายใจชนิดมีถังอากาศในตัว (SCBA)

- เก็บในภาชนะบรรจุที่เก็บในภาชนะบรรจุที่มีฝาปิด เก็บในพื้นที่หรือตู้สำหรับเก็บสารไวไฟมีการระบายอากาศอย่างเพียงพอโดยเก็บห่างจากแหล่งความร้อน ประกายไฟ เปลวไฟ มีการต่อสารเชื่อม (BOND) และต่อสายดินของถังบรรจุเมื่อทำการถ่ายเทของสาร

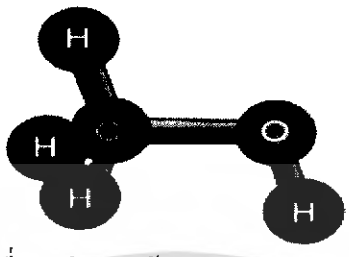
- ในกรณีรั่วไหลให้หยุดการรั่วไหลถ้าสามารถกระทำได้โดยปราศจากความเสี่ยงอันตราย โดยการปิดกั้นแหล่งจุดติดไฟ สูบบุหรี่ หรือทำให้เกิดเปลวไฟในบริเวณนี้ ใช้ทรายหรือสารดูดซับอื่นที่ไม่ติดไฟ และเก็บใส่ในภาชนะบรรจุสำหรับนำไปกำจัด ใช้น้ำฉีดเป็นละอองเพื่อลดไอของสาร ป้องกันการปนเปื้อนสารไม่ให้ไหลลงสู่ท่อระบายน้ำหรือลำน้ำ ฉีดล้างบริเวณที่หกรั่วไหลด้วยน้ำ

- ห้ามทิ้งลงสู่ระบบน้ำ น้ำเสีย หรือดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4. เมทานอล (Methanol) (กรมควบคุมมลพิษ, 2544)**

- มีชื่อเคมีทั่วไปว่า Methyl alcohol ชื่อพ้องอื่นๆ Wood alcohol, Carbinol, Methyl hydroxide มีสูตรโมเลกุลคือ $CH_4O$ (รูปที่ ง-4)




**รูปที่ ง-4** โครงสร้างของสารเมทานอล

ที่มา: Wikipedia the free encyclopedia, 2005d

- การใช้ประโยชน์ ใช้เป็นตัวทำละลาย

- มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี เป็นของเหลวใสไม่มีสี มีกลิ่นเฉพาะตัว น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 32 มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 64.6 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลวหรือจุดเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -97.8 องศาเซลเซียส มีค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.79 ความหนาแน่นไอเท่ากับ 1.1 มีค่า ความดันไอ เท่ากับ 96 มิลลิเมตรปรอทที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

- มีความเป็นอันตรายเมื่อ

1. การหายใจเข้าไปจะก่อให้เกิดการระคายเคือง ตา จมูก ลำคอ และทางเดินหายใจ กดระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้ปวดศีรษะ เวียนศีรษะ ง่วงนอน ถ้าสัมผัสปริมาณมากจะทำให้อาการโคม่าและตายได้ เนื่องจากระบบหายใจล้มเหลว

2. การสัมผัสถูกผิวหนัง ไอระเหย ของเหลวของสารนี้ จะทำให้เกิดการสูญเสียชั้นไขมันของผิวหนัง ทำให้ผิวหนังแห้ง แตก และเกิดผื่นแดง ถ้าสัมผัสสารนี้บ่อยๆ และเป็นเวลานาน จะทำให้ผิวหนังอักเสบ และสารนี้สามารถดูดซึมผ่านผิวหนังมีผลทำให้ระบบประสาทส่วนกลางถูกกด ทำให้ปวดศีรษะ ง่วงนอน เวียนศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และการสัมผัสปริมาณมาก อาจทำให้อาการโคม่าและตายได้ มีผลกระทบต่อการมองเห็น โดยปกติอาการจะรุนแรงขึ้นหลังจากการสัมผัส 12-18 ชั่วโมง

3. การกลืนหรือกินเข้าไปจะก่อให้เกิดการระคายเคือง เยื่อเมือกของปากและลำคอ ทำให้เกิดอาการไอ ท้องร่วง ปวดท้อง ปวดศีรษะ และง่วงซึม

4. การสัมผัสถูกตาจะก่อให้เกิดการระคายเคือง และทำให้เยื่อเมือกตาอักเสบ เกิดตาแดง และสายตาพร่ามัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การปฐมพยาบาล

1. ถ้าหายใจเข้าไป ให้เคลื่อนย้ายผู้ป่วยออกสู่บริเวณที่มีอากาศบริสุทธิ์ การปฐมพยาบาล ถ้าผู้ป่วยหยุดหายใจให้ช่วยผายปอด ถ้าหายใจติดขัดให้ออกซิเจนช่วย นำส่งไปพบแพทย์

2. ถ้ากลืนหรือกินเข้าไป ถ้าผู้ป่วยมีสติและรู้สึกตัวอยู่ให้ผู้ป่วยดื่มน้ำ 1/2-1 แก้ว เพื่อเจือจางสาร ถ้าผู้ป่วยอาเจียนให้ก้มศีรษะให้ต่ำลงเพื่อหลีกเลี่ยงการหายใจเอาอาเจียนเข้าไป ให้ผู้ป่วยบ้วนล้างปากด้วยน้ำ นำส่งไปพบแพทย์

3. ถ้าสัมผัสถูกผิวหนัง ให้ฉีดล้างผิวหนังทันทีด้วยน้ำปริมาณมากอย่างน้อย 15 นาที พร้อมถอดเสื้อผ้าและรองเท้าที่ปนเปื้อนสารเคมีออก ซักทำความสะอาดเสื้อผ้าและรองเท้าก่อนนำกลับมาใช้ใหม่ นำส่งไปพบแพทย์

4. ถ้าสัมผัสถูกตา ให้ฉีดล้างตาทันทีด้วยน้ำปริมาณมากอย่างน้อย 15 นาที โดยเปิดเปลือกตาให้กว้างขณะทำการล้าง นำส่งไปพบแพทย์

5. เอทานอลจะช่วยเผาผลาญเมทานอล ควรให้กิน 50% เอธานอล 1/2-1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทุกๆ 2-4 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน

- สารที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาหรือสารที่เข้ากันไม่ได้ คือ สารออกซิไดซ์อย่างแรง โลหะอัลคาไลท์ กรดซัลฟูริกและกรดไนตริกเข้มข้น แอลดีไฮด์ และแอซิลคลอไรด์ และควรหลีกเลี่ยง ความร้อน ประกายไฟ และแหล่งจุดติดไฟอื่นๆ สารนี้มีจุดวาบไฟที่อุณหภูมิ 12.2 องศาเซลเซียส สามารถจุดลุกติดไฟได้เองที่อุณหภูมิ 464องศาเซลเซียส ไอระเหยของสารสามารถแพร่กระจายออกไปถึงแหล่งจุดติดไฟและอาจเกิดการติดไฟย้อนกลับมา

- สารดับเพลิงในกรณีเกิดเพลิงไหม้ให้ใช้ผงเคมีแห้ง คาร์บอนไดออกไซด์ โฟม แอลกอฮอล์ หรือ น้ำฉีดเป็นฝอย ใช้น้ำฉีดเป็นฝอยเพื่อหล่อเย็นภาชนะบรรจุที่สัมผัสกับเปลวไฟ และลดการฟุ้งกระจายของไอระเหย อย่าใช้น้ำฉีดเป็นลำเพราะจะทำให้เปลวไฟแพร่กระจาย โดยสารอันตรายที่เกิดจากการเผาไหม้ คือ คาร์บอนมอนนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์

- กรณีเกิดเพลิงไหม้ให้สวมใส่อุปกรณ์ช่วยหายใจชนิดมีถังอากาศในตัว (SCBA)

- เก็บในภาชนะบรรจุที่ปิดมิดชิด ในบริเวณที่เย็นและแห้ง เก็บห่างจากสารออกซิไดซ์ และแหล่งจุดติดไฟ ภาชนะบรรจุของสารที่เป็นถังเปล่า แต่มีกากสารเคมีดกค้างอยู่ เช่น ไอระเหยของเหลว อาจเป็นอันตรายได้

- ในกรณีรั่วไหลให้ระบายอากาศในบริเวณที่สารหกรั่วไหล เคลื่อนย้ายแหล่งทั้งหมดของการจุดติดไฟออกไป ดูดซับสารที่หกรั่วไหลด้วยปูนขาวแห้ง ทราย หรือโซดาแอ๊ซ เก็บส่วนที่หกรั่วไหลในภาชนะบรรจุที่ปิดมิดชิดเพื่อนำไปกำจัด ให้สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันอันตรายที่เหมาะสม

- ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

1. สามารถเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพได้ง่าย

2. เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ เป็นพิษต่อปลา และแพลงตอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เมื่อรั่วไหลลงสู่แหล่งน้ำก่อให้เกิดสารผสมที่มีพิษ ไม่สามารถเจือจางได้ และอาจเกิดการผสมกับอากาศเหนือผิวน้ำ ให้ไอของสารที่ระเบิดได้

4. ไม่ส่งผลอันตรายต่อระบบบำบัดน้ำทิ้ง หากมีการใช้และจัดการสารเคมีอย่างเหมาะสม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก จ.

# ผลการยับยั้งจุลินทรีย์โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp.

**ตารางที่ จ-1** แสดงความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

| เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ | | ส่วนของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 3 มิลลิกรัม | | | | | Negative control | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | MC | HC | EB | HB | BB | Hexane | Methanol |
| *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | ซ้ำที่ 1 | 7.00 | 9.40 | 10.50 | - | - | - | - |
| | ซ้ำที่ 2 | - | - | 10.00 | - | - | - | - |
| | ซ้ำที่ 3 | 9.00 | 7.80 | - | - | - | - | - |
| *Escherichia coli* ATCC 25922 | ซ้ำที่ 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | ซ้ำที่ 2 | - | - | - | - | - | - | - |
| | ซ้ำที่ 3 | - | - | - | - | - | - | - |
| *Candida albicans* ATCC 10231 | ซ้ำที่ 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | ซ้ำที่ 2 | - | - | - | - | - | - | - |
| | ซ้ำที่ 3 | - | - | - | - | - | - | - |

หมายเหตุ MC = เมทานอลส่วนของเซลล์ EB = เอทิลอะซีเตตส่วนน้ำหมักเชื้อ
BB = บิวทานอลส่วนน้ำหมักเชื้อ HC = เฮกเซนส่วนของเซลล์
HB = เฮกเซนส่วนน้ำหมักเชื้อ - = ไม่ยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ จ-2** ความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต ที่ความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร

| สาหร่าย | | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | | *Escherichia coli* ATCC 25922 | | *Candida albicans* ATCC 10231 | |
| | | 1 มิลลิกรัม | 3 มิลลิกรัม | 1 มิลลิกรัม | 3 มิลลิกรัม | 1 มิลลิกรัม | 3 มิลลิกรัม |
| *Chlorella* sp. A0505 | ซ้ำที่ 1 | 13.00 | 12.00 | 7.00 | 10.00 | 10.00 | 15.00 |
| | ซ้ำที่ 2 | 7.00 | 12.00 | 8.25 | - | 9.50 | 13.10 |
| | ซ้ำที่ 3 | 10.00 | 13.00 | - | 8.50 | - | 14.00 |
| *Chlorella* sp. $B_2$ | ซ้ำที่ 1 | 6.50 | - | - | - | - | - |
| | ซ้ำที่ 2 | - | 7.00 | - | - | - | - |
| | ซ้ำที่ 3 | 8.00 | - | - | - | - | - |
| *Chlorella* sp. $C_2$ | ซ้ำที่ 1 | - | - | - | - | - | 7.00 |
| | ซ้ำที่ 2 | - | 7.00 | - | - | - | - |
| | ซ้ำที่ 3 | - | - | - | - | - | - |

หมายเหตุ - = ไม่ยับยั้ง

**ตารางที่ จ-3** แสดงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบโดยยาปฏิชีวนะ

| ชนิดของยาปฏิชีวนะ | | เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | | *Escherichia coli* ATCC 25922 | | *Candida albicans* ATCC 10231 | |
| | | 1 มิลลิกรัม | 3 มิลลิกรัม | 1 มิลลิกรัม | 3 มิลลิกรัม | 1 มิลลิกรัม | 3 มิลลิกรัม |
| Ampiciline | ซ้ำที่ 1 | 13.00 | 15.00 | 32.00 | 34.00 | / | / |
| | ซ้ำที่ 2 | 14.00 | 14.50 | 30.00 | 32.00 | / | / |
| | ซ้ำที่ 3 | 15.00 | 14.00 | 30.00 | 36.00 | / | / |
| Nystatin | ซ้ำที่ 1 | / | / | / | / | 14.00 | 18.00 |
| | ซ้ำที่ 2 | / | / | / | / | 10.00 | 15.00 |
| | ซ้ำที่ 3 | / | / | / | / | 12.00 | 21.00 |

หมายเหตุ / = ไม่ได้ทดสอบ

- Ampiciline เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อจำพวกแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ จึงไม่ทำการทดสอบกับเชื้อราหรือยีสต์
- Nystatin เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อราหรือยีสต์ จึงไม่ทดสอบการยับยั้งกับเชื้อแบคทีเรีย

**ตารางที่ จ-4** แสดงค่าเฉลี่ยความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบโดยยาปฏิชีวนะ

| ชนิดของยาปฏิชีวนะ | ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | | *Escherichia coli* ATCC 25922 | | *Candida albicans* ATCC 10231 | |
| | 1 มิลลิกรัม | 3 มิลลิกรัม | 1 มิลลิกรัม | 3 มิลลิกรัม | 1 มิลลิกรัม | 3 มิลลิกรัม |
| Ampiciline | 14.00 | 14.50 | 30.66 | 34.00 | / | / |
| Nystatin | / | / | / | / | 12.00 | 18.00 |

หมายเหตุ / – ไม่ได้ทดสอบ

- Ampiciline เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อจำพวกแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ จึงไม่ทำการทดสอบกับเชื้อราหรือยีสต์
- Nystatin เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อราหรือยีสต์ จึงไม่ทดสอบการยับยั้งกับเชื้อแบคทีเรีย

## ภาคผนวก ช.

# การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองนี้เป็นการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design = CRD) ซึ่งเป็นการนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

**ตารางที่ ช-1** แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลาย

| ชนิดของจุลินทรีย์ | ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม) | ขนาดบริเวณยับยั้งของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 (มิลลิเมตร) | | | ค่าเฉลี่ย (มิลลิกรัม) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ซ้ำที่ 1 | ซ้ำที่ 2 | ซ้ำที่ 3 | |
| *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | 1 | 13.00 | 7.00 | 10.00 | 10.00 |
| | 3 | 12.00 | 12.00 | 13.00 | 12.33 |
| *Escherichia coli* ATCC 25922 | 1 | 7.00 | 8.25 | - | 7.62 |
| | 3 | 10.00 | - | 8.50 | 9.25 |
| *Candida albicans* ATCC 10231 | 1 | 10.00 | 9.50 | - | 9.75 |
| | 3 | 15.00 | 13.00 | 14.00 | 14.00 |

หมายเหตุ - = ไม่ยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ช-2** การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร

**ANOVA**

ผล

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 38.431 | 2 | 19.215 | .952 | .437 |
| Within Groups | 121.042 | 6 | 20.174 | | |
| Total | 159.472 | 8 | | | |

**ตารางที่ ช-3** แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม

| ชนิดของจุลินทรีย์ | ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม) | ค่าเฉลี่ย (มิลลิกรัม) |
|---|---|---|
| *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | 1 | 10.00[a] |
| *Candida albicans* ATCC 10231 | 1 | 9.75[a] |
| *Escherichia coli* ATCC 25922 | 1 | 7.62[a] |

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่า สารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ นั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ให้ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ช-4** การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร

**ANOVA**

ผล

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 102.802 | 2 | 51.401 | 5.086 | .051 |
| Within Groups | 60.640 | 6 | 10.107 | | |
| Total | 163.442 | 8 | | | |

**ตารางที่ ช-5** แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม

| ชนิดของจุลินทรีย์ | ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัม) | ค่าเฉลี่ย (มิลลิกรัม) |
|---|---|---|
| *Candida albicans* ATCC 10231 | 3 | 14.00 [a] |
| *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | 3 | 12.33 [a] |
| *Escherichia coli* ATCC 25922 | 3 | 9.25 [a] |

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่า สารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ นั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร ให้ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้