ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

ผลของสารสกัดจากใบกัดลิ้นต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย
ไมโครซิสทิส *(Microcystis sp.)* และคลอเรลลา *(Chlorella sp.)*

Effect of crude extract from *Walsura trichostemon* Miq. on growth of microalge;
Microcystis sp. and *Chlorella sp.*

โดย
นางสาวกมลทิพย์ วงษ์สุนทร
นางสาวจิรวรรณ กุณะ

ได้รับรองการพิจารณาเห็นชอบโดย

.....
(ผศ.ดร. จำรูญ เล้าสินวัฒนา)
อาจารย์ที่ปรึกษา
วันที่ 3 เดือน ม.ค. พ.ศ. 60

.....
(ดร. อัจฉรี เรืองเดช)
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
วันที่ 3 เดือน ม.ค. พ.ศ. 60

ภาควิชารับรองแล้ว

.....
(ร.ศ. ดร. สมชาย กล้าหาญ)
หัวหน้าภาควิชาพืชสวน
วันที่ 3 เดือน ก.พ. พ.ศ. 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของสารสกัดจากใบกัดลิ้นต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย
ไมโครซิสทิส *(Microcystis sp.)* และคลอเรลลา *(Chlorella sp.)*

Effect of crude extract from *Walsura trichostemon* Miq. on growth of microalge;
Microcystis sp. and *Chlorella sp.*

โดย

นางสาวกมลทิพย์ วงษ์สุนทร
นางสาวจิรวรรณ กุณะ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....73595
วัน,เดือน,ปี.....20 ก.ค. 2550

เสนอ

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชสวน)
พุทธศักราช 2549

b.11249381
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

ผลของกรดกำมะถันร่วมกับการลดความดันต่อการงอกของเมล็ดตาลม่วง

Effect of Sulfuric Acid with Infiltration on Germination of *Livistona mariae* F.v. Mueller Seeds

โดย

นางสาววราลี ชุมพาลี

เสนอ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....73553
วัน,เดือน,ปี.....20 ก.ค. 2550

b.11795941
i.....

ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พุทธศักราช 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาพืชสวน

เรื่อง

ผลของกรดกำมะถันร่วมกับการลดความดันต่อการงอกของเมล็ดตาลม่วง

Effect of Sulfuric Acid with Infiltration on Germination of

***Livistona mariae* F.v. Mueller Seeds**

โดย

นางสาววราลี ชุมพาลี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

.....

(ผศ. หัตถ์ชัย กสิโอฬาร)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

วันที่ 9 **เดือน** ธันวาคม **พ.ศ** 2550

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร.สมชาย กล้าหาญ)

หัวหน้าภาควิชาพืชสวน

วันที่ 19 **เดือน** ธ.ค. **พ.ศ** 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ในการทำปัญหาพิเศษเรื่อง ผลของกรดกำมะถันร่วมกับการลดความดันต่อการงอกของเมล็ดตาลม่วงในครั้งนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบคุณบิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนการศึกษาและแรงใจให้ทำงานนี้สำเร็จ และขอบคุณเพื่อนๆและคนงานทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจโดยเฉพาะอาจารย์หัตถ์ชัย กสิโอพาร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ท่านได้แนะนำเกี่ยวกับการปฏิบัติงาน ตลอดจนความคิดเห็นต่างๆในการทดลอง จนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จ

นางสาววราลี ชุมพาลี

5 เมษายน 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ในปัจจุบันโลกมีการเปลี่ยนแปลงทางเทคโนโลยีที่ทันสมัยมากขึ้นทั้งทางด้านการค้นคว้าวิจัยต่างๆ ทางด้านระบบสาระสนเทศคอมพิวเตอร์ การผลิตเครื่องอุปโภค บริโภคหรือการแพทย์ การใช้เครื่องมือที่ทันสมัยและรวดเร็วกว่าในอดีตส่งผลให้วิถีการดำรงชีวิตของมนุษย์เปลี่ยนไปในทางที่จะได้รับความสะดวกสบายมากยิ่งขึ้น ขณะที่เทคโนโลยีมีการพัฒนาล้ำหน้าไปแล้วนั้น ในทางตรงกันข้ามมนุษย์เริ่มให้ความสนใจผลิตภัณฑ์ธรรมชาติซึ่งเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะสังเกตได้จากการแพทย์แผนโบราณที่ได้รับความนิยมขึ้นสูง เช่น สุคนธบำบัด การนวดประคบด้วยสมุนไพร เป็นต้น หรือความสนใจศึกษาวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น เครื่องสำอาง ยารักษาโรคและพัฒนาใช้ในด้านการเกษตร เนื่องจากผลการวิจัยพบว่าสารมีประสิทธิภาพในการรักษาบำบัดและมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมต่ำ ซึ่งจากภาพรวมการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่กล่าวถึงส่วนใหญ่จะได้มาจากภูมิปัญญาชาวบ้านด้านพื้นฐานการใช้สมุนไพร นอกจากนั้นยังพบว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นแหล่งสำคัญที่จะใช้พัฒนาในด้านเภสัชวิทยา กีฏวิทยา และพยาธิวิทยาต่อไป

การศึกษาถึงแนวทางการนำสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้ในการเกษตรด้านการควบคุมศัตรูพืชชนิดต่างๆ ทั้งด้านโรคพืช แมลงศัตรูพืช และวัชพืช เป็นแนวทางใหม่ที่กำลังพัฒนาโดยวัตถุประสงค์หลักคือการนำสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้แทนสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้กันอยู่ เพื่อลดสาเหตุของสารเคมีตกค้างและปนเปื้อนของสารเคมีสังเคราะห์ในผลผลิตทางการเกษตร และยังช่วยลดปริมาณการนำเข้าของสารเคมีสังเคราะห์ซึ่งทำให้ประเทศเกษตรกรรม เช่น ประเทศไทยลดการเสียดุลการค้าได้อีกแนวทางหนึ่งและข้อดีอีกอย่างของการนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาเป็นสารควบคุมศัตรูพืชโดยเน้นลักษณะโครงสร้างที่แตกต่างไปจากสารสังเคราะห์แต่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพเหมือนกันให้ผลในการตกค้างและความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมต่ำกว่า

พืชในวงศ์ Meliaceae เป็นพืชที่นักวิทยาศาสตร์หลายสาขาให้ความสนใจมากจากการศึกษาพบว่ามีสาระสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถพัฒนานำไปใช้ด้านเภสัชวิทยา กีฏวิทยา และพยาธิวิทยา ด้วยมูลเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงได้สนใจที่จะศึกษาพืชในวงศ์ Meliaceae โดยเลือกศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นกัดลิ้น หรือ *Walsura trichostemon* Miq . ลักษณะเป็นพืชยืนต้นขนาดเล็ก พบมากในป่าดิบแล้งทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จากรายงานการใช้สมุนไพรพบว่ามีการนำส่วนรากมาใช้ต้มเป็นยาบำรุงเส้นเอ็น(นันทวัน ,2539; สมจิตร และ สุภาพ ,2534) แก้ปวดเมื่อย ส่วนเปลือกต้นนำมาใช้ห้ามเลือด สมานแผล ล้างบาดแผลเรื้อรัง ส่วนแก่นนำมาบำรุงเส้นเอ็น และเพื่อเป็นการสอดคล้องและยืนยันผลกับงานวิจัยในกลุ่มของผู้วิจัย โดยเฉพาะในเรื่องฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ พบว่าใบประยงค์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(*Aglaia odorata* Lour .) ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับกัดลิ้น ให้ผลการทดสอบดีมาก ทั้งในชั้นสารสกัดด้วยน้ำ และตัวละลายอินทรีย์ (บุญรอด และคณะ ,2544) รวมทั้งสารบริสุทธิ์ที่แยกได้นั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบเป็นที่น่าพอใจเป็นอย่างมาก และนอกจากนี้เพื่อให้งานวิจัยครอบคลุมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพทางด้านอื่นผู้วิจัยยังได้ศึกษาผลของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่อการต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อจุลินทรีย์เพื่อมุ่งหาโครงสร้างของการสำคัญที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาศักยภาพของสารสกัดด้วยน้ำและตัวทำละลายสารอินทรีย์จากใบกัดลิ้นต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย ไมโครซิสทิส*(Microcystis sp.)* และคลอเรลลา *(Chlorella sp.)*

2. เพื่อนำทรัพยากรที่มีอยู่ในธรรมชาติมาพัฒนาและใช้ประโยชน์ในการผลิตทาการเกษตรแบบยั่งยืนลดการใช้และการนำเข้าสารเคมีสำหรับยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายไมโครซิสทิส *(Microcystis sp.)* และคลอเรลลา *(Chlorella sp.)* จากต่างประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง	:	ผลของสารสกัดจากใบกัดลิ้นต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) และคลอเรลลา (*Chlorella sp.*)
โดย	:	นางสาวกมลทิพย์ วงษ์สุนทร
		นางสาวจิรวรรณ กุณะ
รหัส	:	46040281
		46040288
สาขา	:	พืชสวน
ภาควิชา	:	พืชสวน
คณะ	:	เทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	ผศ.ดร. จำรูญ เล้าสินวัฒนา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	:	ดร. อัจฉรี เรืองเดช

บทคัดย่อ

ปัจจุบันพบว่าแหล่งน้ำตามธรรมชาติหรือบ่อเก็บน้ำส่วนใหญ่กำลังประสบปัญหาน้ำเน่าเสียเนื่องจากสาหร่าย 2 ชนิด คือ ไมโครซิสทิส *(Microcystis sp.)* และคลอเรลลา *(Chlorella sp.)* ซึ่งการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการแก้ปัญหาน้ำเน่าเสียจากสาหร่าย 2 ชนิดนี้ ทำให้เกิดสารตกค้างซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงแนวทางการนำสารสกัดที่ได้มาจากธรรมชาติมาใช้แทนสารเคมี และเนื่องจากได้มีการศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนต่างๆของต้นกัดลิ้นในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดได้ จึงได้นำมาเป็นแนวทางในการศึกษาสารสกัดจากใบกัดลิ้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย 2 ชนิด ที่อัตราความเข้มข้น 0, 10, 100, 500, 1000 ppm โดยนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่เวลา 0 นาที, 12 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมง พบว่าการเติมสารสกัดจากใบกัดลิ้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายไมโครซิสทิส *(Microcyctis sp.)* และสาหร่ายคลอเรลลา *(Chlorella sp.)*ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	:	Effect of crude extract from *Walsura trichostemon* Miq. on growth of Microalgae; *Microcystis sp.* and *Chlorella sp.*.
By	:	Miss. Kamoltip Wongsoonthorn
		Miss. Jirawan Guna
Code	:	46040281
		46040288
Major	:	Horticulture
Department	:	Horticulture
Faculty	:	Agricultural Tecnology
Adviser	:	Dr.Chamroon Laosinwattana
Co Adviser	:	Dr.Uscharee Ruangdej

ABSTRACT

The natural water resource has been faced the problem of contaminated water because of the growth of two different spices of algae: *Mirocystis sp.* and *Chlorella sp.*. These algae cause some unfriendly chemical substances which is left in the water and destroy living organisms and the environment. For this reason, the consumption of the synthetic chemical has been used to solved this issue. Therefore, the researcher has done the research to use the natural treatment instead of chemical treatment. Moreover, the natural treatment has been discovered by extracting the different part of *Walsura trichostemon* Miq. in order to inhibit the growth of unwanted algae. The experiment is done by microscope to count the cells number with the ratio of concentration is 0, 10, 100, 500, 1000 ppm at the time of 0 min, 12, 24, 48 and 96 hours. As a result, the inhibition of the algal growth is achieved.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษเรื่อง ผลของสารสกัดจากใบกัดลิ้นต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายไมโครซิสทิส *(Microcystis sp.)* และ คลอเรลลา *(Chlorella sp.)* สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากท่านอาจารย์จำรูญ เล้าสินวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษา และท่านอาจารย์อัจฉรี เรืองเดช อาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประมง ที่กรุณาช่วยให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาจนกระทั่งทดลองสำเร็จได้ด้วยดี รวมทั้งขอขอบคุณนางสาวชลิดา ตีระพงษ์ศักดิ์ นักศึกษาภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง ที่ช่วยให้คำแนะนำในการทำการทดลอง และอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ในการทดลองอย่างดี

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดาที่เอื้อเฟื้อด้านทุนการศึกษา อาจารย์ทุกท่านและเพื่อนๆทุกคนที่ให้ความเอื้อเฟื้อมาโดยตลอด

นางสาวกมลทิพย์ วงษ์สุนทร

นางสาวจิรวรรณ กุณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	II
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	18
ผลการทดลองและวิจารณ์	20
สรุปผลการทดลอง	27
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. จำนวนเซลล์ของสาหร่ายหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้นผ่านไป 15 นาที 20
2. จำนวนเซลล์ของสาหร่ายหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้นผ่านไป 30 นาที 21
3. จำนวนเซลล์ของสาหร่ายหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้นผ่านไป 1 ชั่วโมง 21
4. จำนวนเซลล์ของสาหร่ายหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้นผ่านไป 6 ชั่วโมง 22
5. จำนวนเซลล์ของสาหร่ายหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้นผ่านไป 12 ชั่วโมง 22
6. จำนวนเซลล์ของสาหร่ายหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้นผ่านไป 24 ชั่วโมง 23
7. จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์หลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้น 25
8. จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์หลังจากผ่านไป 1 วัน 25
9. จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์หลังจากที่ผ่านไป 2 วัน 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural production) คือสารอินทรีย์ที่ได้จากพืชและสัตว์รวมทั้งสมุนไพร สารเคมีดังกล่าวอาจใช้เป็นยารักษาโรค น้ำหอม สีย้อมผ้าและอาหาร เช่น คาร์โบไฮเดรต ไวตามิน โปรตีน ไขมัน เป็นต้น

โดยทั่วไปนักเคมีหรือนักวิทยาศาสตร์สาขาอื่นๆมักจะสนใจพืชเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สมุนไพร เพื่อค้นหาผลิตภัณฑ์ที่ให้ผลทางชีวภาพ (Biologically active substances) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ ดังนั้นจึงมักเข้าใจกันว่า ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติคือสารอินทรีย์ที่ได้จากสมุนไพร แต่อันที่จริงแล้วพืชเหล่านี้ (สมุนไพร) เป็นเพียงส่วนหนึ่งของพืชนานาชนิดที่นักเคมีได้ทำการศึกษาวิจัยกันมาเป็นเวลานาน ซึ่งนักเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural product chemist) พยายามสกัดและแยกสารอินทรีย์ต่างๆออกมาโดยใช้เทคนิคทางวิทยาศาสตร์เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ซึ่งอาจอยู่ในสภาพของเหลวหรือของแข็ง แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) โดยร่วมมือกับนักวิทยาศาสตร์ในสาขาเภสัชวิทยา จุลชีววิทยา เป็นต้น อันอาจนำไปสู่การค้นพบตัวยาชนิดใหม่ ดังที่ปรากฏในประเทศอุตสาหกรรมทั้งหลายที่ได้ผลิตยาสังเคราะห์หลายชนิด โดยเลียนแบบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดจากพืชหรือดัดแปลงลักษณะโครงสร้างทำให้ได้ยาชนิดต่างๆมากมาย (วิชชุ, 2532)

2. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสมุนไพร

สมุนไพร หมายถึง ยาจากพืชหรือสัตว์ที่ผ่านการเก็บเกี่ยวและทำให้แห้งแล้ว ในพืชสมุนไพร ประกอบด้วยสารประกอบทางเคมีหลายชนิด ซึ่งเป็นตัวกำหนดสรรพคุณของสมุนไพรโดยที่ชนิดและปริมาณของสารจะแปรตามชนิดของพันธ์สมุนไพร สภาพแวดล้อมที่ปลูกและช่วงเวลาที่เก็บพืชสมุนไพร นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นคว้าวิจัยสารเคมีที่มีฤทธิ์ในพืชสมุนไพร ทำให้ทราบรายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้าง ลักษณะ วิธีการสกัด การจำแนกและการตรวจสอบสารด้านเภสัชวิทยา พิษวิทยา การพัฒนารูปแบบยา การทดสอบทางเภสัชจลน์ศาสตร์ และการวิจัยทางคลินิกเพื่อให้ได้ยาที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการรักษาโรค (ภาคภูมิ และ ทรงศรี, ม.ป.ป.)

3. สารธรรมชาติจากพืช (รังสิต, 2531)

สารธรรมชาติจากพืชหลากหลายชนิด ทั้งพืชปลูก วัชพืช และพันธุ์ไม้ในป่าธรรมชาติได้ถูกนำมาทดสอบและพบว่ามีสมบัติในการเป็นสารป้องกันและกำจัดวัชพืช สารที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 **กรดฟีนอลิก** (Phenolic acid)

กรดฟีนอลิกจำแนกได้อย่างกว้างๆคือเป็นอนุพันธ์ของกรดเบนโวอิกหรือกรดซินนามิกโดยกรดเบนโวอิกถูกสร้างขึ้นจากกรดอะมิโน แต่กรดซินนามิกถูกสร้างขึ้นมาจากกรดอะมิโนพวกอะโรมาติก การยับยั้งการผลิตกรดซินนามิกเป็นผลให้ปริมาณอนุพันธ์กรดเบนโซอิกเพิ่มขึ้นกรดฟีนอลิกทั้ง 2 ประเภท พบในพืชชั้นสูงและมีปริมาณมากพอที่จะยับยั้งการงอกของเมล็ดหรือการเจริญเติบโตของพืชเมื่อสารถูกชะล้างออกจากเนื้อเยื่อสารเหล่านี้มีผลกระทบต่อเอนไซม์รวมทั้งอวัยวะหรือเซลล์ พบว่าสารกลุ่มฟีนอลิกมีพิษต่อพืชค่อนข้างต่ำและไม่มีการเลือกทำลาย เช่น จากงานวิจัย 2 กลุ่มของ Alsaadawi และคณะ (1983) และNishimura และคณะ (1995) ได้แสดงว่า *Polygonum aviculare L.* เช่น Emodin และอนุพันธ์มีคุณสมบัติเป็นสารอัลลีโลพาที

3.2 **โคอูมาริน** (Coumarins)

โคอูมารินเป็นแลกโทน (Lactone) ของกรดออโทไฮดรอกซีซินนามิก (o-Hydroxy cinnamic acid) สารฟีนอลิกกลุ่มนี้ประกอบด้วยสารที่เป็นพิษที่สร้างขึ้นตามธรรมชาติในพืชชั้นสูงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดี กรดอะโรมาติกอื่นๆ รวมทั้งฟลาวอนอยด์ชนิดต่างๆ จากงานวิจัยสารจำพวกโคอูมารินที่สกัดจากเปลือกของ*Viburnum prunifolium L.* ในวงศ์จากงานวิจัยสารจำพวกโคอูมารินที่สกัดจากเปลือกของ *Viburnum prunifolium L.* ในวงศ์ Caprifoliaceae และ Yamamoto (1995) ได้พบโคอูมารินในกิ่งก้านของ Zoysia-glassland

3.3 **ฟลาวอนอยด์** (Flavonoids)

ตามโครงสร้างพื้นฐานของฟลาวอนอยด์ไม่มีน้ำตาลมีคาร์บอน 15 อะตอม จัดเรียงแบบ C_6-C_3-C_6 (มีวงอะโรมาติก 2 วงเชื่อมกับคาร์บอน 3 อะตอม) ในพืชนั้นฟลาวอนอยด์จะอยู่ในรูปที่คอนจูเกต (conjugate) กับน้ำตาล จากโครงสร้างมูลฐานนี้ได้มีอนุพันธ์เกิดขึ้นมากมายหลายกลุ่มขึ้นกับตำแหน่งของกลุ่มไฮดรอกซีในโมเลกุลของฟลาวอนอยด์ประเภท kaempferrol ในดินที่มีพืชในตระกูล *Quercus mongolica var.grosseserrata.* ที่เจริญปกคลุมอยู่

3.4 **แทนนิน**(Tannins)

แทนนินเป็นสารพอลีฟีนอลิกซึ่งละลายน้ำได้ดีมีความสามารถทำให้โปรตีนตกตะกอนแทนนินถูกเปลี่ยนไปสู่รูปที่ถูกไฮโดนไลซ์ และแทนนินที่มารวมตัวอย่างหนาแน่นนั้นและกอบด้วยเอสเทอร์ของกรดฟีนอลิกและน้ำตาล มีรายงานว่าแทนนินยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชและการงอกของเมล็ด เช่น จากงานวิจัยของ Szabo และ kevey (1997) ได้พลสารแทนนินจากพืชกลุ่ม *Carpinus Species, Fagus* และ *Quercus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 **ควิโนน**(Quinones)

จูโกลน (Juglone) หรือ 5-ไฮดรอกซีแนนโธควิโนน (5-Hydroxynapthoquinone) เป็นควิโนนชนิดเดียวที่ผลิตขึ้นโดยพืชชั้นสูง ควิโนนหลายชนิดเป็นพิษและผลิตได้จากจุลินทรีย์ จูโกลนสร้างขึ้นโดยพืชที่อยู่ในวงศ์ *Juglandcdae* เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชไฮโดรควิโนน (Hydroquinones) และเบนโซควิโนน (Benzoquinones) เป็นอนุพันธ์ของกรดโฮโมเจนทิสิส (Homogentisis) ในพืชชั้นสูง ไฮโดรควิโนนและเบนโซควิโนนมีฤทธิ์เป็นพิษต่อพืชโดยทั่วไปจะพบในรูปของแอนทราควิโนน(Anthraquinone) และแอนโทรน(Anthrone)

3.6 **เทอร์พีนอยด์** (Terpenoids) **และสเทอรอยด์** (Steroids)

เทอร์ฟีนอยด์ (Terpenoids) และสเทอรอยด์ (Steroids) เกิดจากหน่วยย่อยของไอโซพรีน (Isoprene) ซึ่งมีการมาเชื่อมต่อกันในลักษณะต่างๆ เช่น มีระยะระหว่างโมเลกุลแตกต่างกันมีระดับขอบความอิ่มตัวแตกต่างกันและมีกลุ่มย่อยที่จะเกิดปฏิกิริยาในโมเลกุลแตกต่างกันเทอร์ฟีนอยด์ได้ถูกจำแนกออกเป็น เฮมิเทอร์ฟีนอยด์ (Hemiterpenoids) มีคาร์บอน 10 อะตอมต่อโมเลกุล เซสควิเทอร์ฟีนอยด์ (Sesquiterpenoids) มีคาร์บอน 15 อะตอมต่อโมเลกุล

ไดเทอร์ฟีนอยด์ (Diterpenoid) มีคาร์บอน 20 อะตอมต่อโมเลกุลไตรเทอร์ฟีนอยด์ (Triterpenoid) มีคาร์บอน 40 อะตอมต่อโมเลกุลสเทอรอยด์เป็นเททราไซคลิก ไตรเทอร์ฟีนอยด์และสเทอรอยด์เป็นแอลกอฮอล์สเทอรอยด์สารเคมีเหล่านี้มีธรรมชาติและโครงสร้างแตกต่างกันอย่างมากมาย มีเทอร์ฟีนอยด์ 2-3 ชนิดเป็นสารอัลลีโลพาทีหรือเป็นสารที่มีฤทธิ์ต่อการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ แคมเฟอร์ (Camphor) และ1,8-ซินีโอล (1,8-Cineole) ยับยั้งการเจริญเติบโตของรากกล้าพืชยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชหลายชนิด (Roshchina และคณะ, 1994 ; Roshchina and Roshchina, 1989)

4. **กัดลิ้น** (นันทวัน, 2539 ; สมจิตร และ สุภาพ, 2534)

กัดลิ้น (*Walsura trichostemon* Miq.) อยู่ในวงศ์ Meliaceae ที่ทำการศึกษาวิจัยนำมาจากอำเภอพล จังหวัดขอนแก่น เป็นพืชยืนต้นขนาดเล็กสูง 4-10 เมตร เปลือกต้นสีน้ำตาลลักษณะของใบเป็นใบประกอบ มีใบย่อย 3 ใบ รูปรี ปลายแหลม คล้ายใบลำใยป่า มีดอกช่อ ดอกย่อยมีขนาดเล็ก ลักษณะของผลมีขนาดเล็กประมาณ 1 เซนติเมตร ผลดิบใบสีเขียวอ่อน ผลสุกสีเหลืองอ่อน ผลจะสุกประมาณเดือน มิถุนายน-กรกฎาคม และเมล็ดคล้ายลำไยแต่มีรสหวานจืด กินมากจะรู้สึกสากๆลิ้น สามารถพบได้มากในที่ขึ้นป่าดิบแล้ง ป่าเต็งรัง ป่าเบญจพรรณ บนพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 500 เมตร ทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย และภาคตะวันออกเฉียงใต้ของไทยในต่างประเทศพบที่พม่าและกัมพูชา จากรายงานการใช้สมุนไพรเบื้องต้นพบว่าสามารถนำส่วนรากบำรุงเส้น แก้ปวดเมื่อย เปลือกต้น ห้ามเลือด สมานแผล ล้างบาดแผลเรื้อรัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจาก กัดลิ้น (*W. trichostemon*) เป็นพืชที่ยังไม่มีรายงานวิจัยมาก่อนหน้านี้ดังนั้นในการทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง จึงได้รวบรวมการพบสารหรือฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในวงศ์ *Meliaceae* ซึ่งคาดว่าจะให้ผลทางชีวภาพที่คล้ายคลึงกันได้แก่ ประยงค์ (*Aglaia odorata*), สะเดา (*Azadirachta indica*), ตาเสือ (*Aphanamixis polystachya*), เลี่ยน (*Melia azedarach*) *Toona sinensis*, กระดูกเขียด (*Aglaia elaeagnoidea*), กระท้อน (*Sandoricum koetjape*) *Turraea holstii Turraea floribunda* และ *Aglaia testicularis* ดังนี้

จากรายงานวิจัยของบุญรอดและคณะ (2544) พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากใบประยงค์ (*Aglaia odorata* Lour.) มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าถั่วพี (*Phaseolus lathyroides* Linn.) และจากรายงานวิจัยของวิรัตน์และคณะ (ม.ป.ป.) พบว่าผลของสารสกัดจากใบประยงค์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีผลต่อการยับยั้งการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าหญ้าขจรจบดอกเหลือง (*Pennisetum setosum* (Swatz.) L.C. Rich.) จากลักษณะของต้นกัดลิ้นที่อยู่ในตระกูลกลุ่มพืชเดียวกันกับต้นประยงค์ คาดว่าอาจจะมีสารอัลลีโลพาทีในใบกัดลิ้นเช่นเดียวกับใบประยงค์ เนื่องจากพบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากใบกัดลิ้นมีผลการทดลองที่สอดคล้องกันกับสารสกัดเบื้องจ้นด้วยน้ำจากใบประยงค์ นอกจากนั้นจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เบื้องต้นพบว่าสารสกัดส่วนใบกัดลิ้นในตัวทำละลายเมทานอล มีค่า EC_{50} 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากเฮกเซน และเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวก

อุดม (2512) ได้สกัดสารจากใบประยงค์ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และทำให้บริสุทธิ์สามารถวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างพบว่าที่สกัดได้ประกอบด้วย Wax, Oil, Myricyl alcohol ($C_{30}H_{62}O$), β-Sitosterrol (Steroid $C_{29}H_{50}O$), พบสารใหม่ 2 ชนิด คือ สารประเภท Hydroxyketone ($C_{30}H_{50}O_3$) และ Tricol ($C_{30}H_{52}O_3$) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างสัมพันธ์กันและสัมพันธ์กับ Aglaio CH_3-$(CH_2)_{28}$-CH_2-OH

พิพัฒน์ การเที่ยง (2516) ได้สกัดสารจากใบประยงค์แห้งด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์สามารถแยกสาระสำคัญที่ใช้ในการวิจัย 3 ตัวคือ Aglaio, Agiaiondiol และ Aglaitril ที่แยกได้จากธรรมชาติมี 2 ตัวเป็นไอโซเมอร์ คือ 24 (S)-Alaitriol , 24 (R)-Alaitriol

Dyatmiko และคณะ (1996) สกัดแยกสารจากเปลือกของต้นประยงค์ (*Aglaia elaeagnoidea*) และทำการศึกษาหาโครงสร้างของสารประกอบพบสาร 3 ชนิด ได้แก่ พบ Lignan 2 ชนิดคือ *trans*-3,4-bis (3,4,5-trimethoxybenzyl)tetrahydrofuran และ สารโครงสร้างใหม่ *trans*-2,3-bis(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,4-butanediol diacetate Dammarane trierpenoid 2 ชนิด ได้แก่ 20S,24S-Epoxy dammaran-3-one , 20S,24S-Epoxy-25hydromethldammaran-3-one , Limonoid คือ 6α,11β-Diacetoxygedunin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Cladosporium cucumerinum*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Brader และคณะ (1998) ได้พบสารประเภท Bisamides 2 สาร คือ Piriferinol และ Edulimind สารประเภท Lignan คือ Lariciresinol acetate สารประเภท Triterpene ได้แก่ 4-bis-norcycloartane-type triterpene สารประเภท Cyclopenta[*b*]benzofuran 3 สารคือ Pannellin , Pannellin 1-O-acetate , 3'-Methoxypannellin , และสารประกอบอะโรมาติก ที่พบในส่วนหัวและรากของประยงค์ (*Aglaia spp. Elaeagnoiddea, edulis, grandis, silvestris* และ *tomentosa*) ในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำพบสารที่ออกฤทธิ์ต่อหนอนกระทู้ผักอย่างรุนแรงได้แก่สารประเภท Cyclopenta[b]benzofurans (Flavaglines) ได้แก่ Pennellin , Penllin 1-O-acetate

Bacher และคณะ (1999) สกัดแยกสารอออกมาจากส่วนรากของประยงค์ (*Aglaia edulis*) ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วค้นพบสารประเภท Flavaglines 9 ชนิดได้แก่ Cyclopenta[*bc*]benzo-pyrans(Thapsakins) และ Benzo[b]oxepines (Thapoxepines) สารประเภท Cyclopenta[*b*]benzofuran ได้แก่ Algaroxin A และ Pannellin ซึ่งพบว่า Algaroxin A และ Pannelline มีฤทธิ์เป็นพิษอย่างรุนแรงต่อหนอนกระทู้

Biswas และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษารวบรวมฤทธิ์ทางชีวภาพของสะเดา (*Azadirahta indica*) และคุณสมบัติทางเภสัชพบว่าในส่วนเปลือกและน้ำมันเมล็ดสะเดามีฤทธิ์ทางเภสัชวิยา โดยพบว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ Nimboline, Mahmoodin, Margolone และ Margolonone ส่วน Nimbin มีฤทธิ์ Spermicidal , ส่วน Gedunin , Cyclic trisuphide และ Cyclic trtrasulphide มีฤทธิ์ต้านเชื้อราและต้านเชื้อมาเลเรีย , Azadirachtin มีฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารของตั๊กแตน (*Schistocerca gregaria*) , สารที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้แก่ Gallic acid , Epicatechin , Caterchin , Polysaccharides Gla , Polysaccharides Glla และ Polysaccharides Gllla

Mulul และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาต้นตาเสือ (*Aphanamixis polystachya*) พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอลมีผลเสียต่อตับหนูทดลอง

Hideji และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาเลี่ยน (*Melia azedarach*) โดยการนำส่วนเปลือก ราก ของเลี่ยนสกัดด้วยเอทานอลพบว่ามีฤทธิ์ต้าน cell มะเร็งชนิด lymphocytic leukemia P 388 ในหลอดทดลองสารที่มีฤทธิ์เป็น cytotoxic คือ Azadirachtin สารประเภท limonoids มี 2 ชนิด คือ I-Tigloyl-3-acetyl-ll-methoxymeliacarpi-nin(I) และ I-acetyl-3-Tigloyl-ll-methoxymeliacarpinin นอกจากนี้ยังพบ cytotoxic sendanin-type limonoids 3 ชนิด :29-Isobutylsendanin, 12-Hydroxyamoorastin(II) และ 29-Deacetylsendanin

Intan และคณะ (2003) ได้ทำการแยกสารบริสุทธิ์ในใบกระท้อน (*Sandoricum koetjape*) โดยตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลโดยเทคนิควิธีการแบ่งส่วนพบสาร Limonoide : Sandrapins A , Sandrapins B และ Sandrapins C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mulholland และคณะ (1998) ได้ทำการแยกสารบริสุทธิ์ในลำต้นเปลือกและรากของ *Turraea holstii* และ *Turraea floribunda* พบว่าเมื่อทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลจะได้สารจำพวก triterpenoids : และ 11-*epi*-toonacilin

Wang และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาส่วนใบต้น *Aglaia testicularis* ซึ่งพบในประเทศจีนพบว่ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายตัว ได้แก่ rocaglamides, bisamides : piriferine และ Odorinol และพบว่าอนุพันธ์ของ rocaglamide มีผลกระทบต่อแมลง (*Spodoptera littoralis*) สูง

Hsieh และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาผลของ Methyl gallate ที่สกัดจากส่วนรากของต้น *Toona sinensis* โดยตัวทำละลายเมทานอล พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยผลการทดลองจะช่วยป้องกันการทำลาย DNA ในเซลล์ MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) จากการออกซิเดทีฟของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Saifah และคณะ (1999) ได้ทำการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนใบของต้น *Aglaia edulis* ในตัวทำละลายเมทานอลพบสารโครงสร้างใหม่เป็นสารประเภท bisamide คือ Aglaiduline และสาร bisamide ที่มีซัลเฟอร์ในโครงสร้างมีฤทธิ์ป้องกันไวรัสโรคเริม งูสวัด ได้แก่ Aglithioduline และ Aglaidithioduline

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) และ คลอเรลลา (*Chlorella sp.*)

เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวที่พบมากตามแหล่งน้ำธรรมชาติและในดินซึ่งมักทำให้เกิดปัญหา เช่น สาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำโดยเฉพาะในบ่อบำบัดน้ำเสีย และจะสร้างสารพิษที่เป็นสารเร่งการเกิดมะเร็งตับทำให้เป็นอันตรายกับมนุษย์ ส่วนสาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) อาศัยอยู่ในดินซึ่งถ้ามีมากก็เป็นปัญหาให้กับเราได้ ในการทำทดลองครั้งนี้จึงได้เลือกสาหร่ายทั้งสองชนิดนี้มาทำการทดลองเพื่อที่จะได้ช่วยลดปัญหาที่จะเกิดขึ้นตามมา

ลักษณะทั่วไปของสาหร่าย ไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) และ คลอเรลลา(*Cholrella sp.*)

ไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*)

จัดอยู่ใน Division Cyanophyta เซลล์มีรูปร่างกลม หรือรูปไข่ ไม่มีเมือกหุ้ม อยู่รวมกันแน่นโดยมีเมือกหุ้มทั้งโคโลนี ไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์แบบ แนนโนไซท์ (nanocyte) โดยมีการแบ่งเซลล์ซ้ำกันหลายๆครั้ง จนกระทั่งได้เซลล์เล็กๆเป็นจำนวนมาก เซลล์เหล่านี้จะมีขนาดคงที่และไม่มีผนังหุ้ม เมื่อหลุดออกจากเซลล์แม่ก็สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

สาหร่ายชนิดนี้พบทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม เป็นแพลงก์ตอนพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของแหล่งน้ำจืด โดยเฉพาะในบ่อบำบัดน้ำเสียจะมีสาหร่ายชนิดนี้เจริญหนาแน่นอยู่เสมอ สาหร่ายชนิดนี้จะสร้างสารพิษที่ชื่อไมโครซิสติน (microcystins) ซึ่งเป็นสารเร่งการเกิดมะเร็งตับ (tumor promoter) และ สาหร่ายชนิดนี้ทำให้เกิดวอเตอร์บลูม (water bloom) ซึ่งทำให้เกิดมลพิษของน้ำบริเวณนั้น น้ำจะเน่าเสียเปลี่ยนสี เกิดกลิ่นเหม็น น้ำขาดออกซิเจน (ยุวดี, 2549)

คลอเรลลา (*Chlorella sp.*)

เซลล์ของคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) มีขนาดเล็กประมาณ 2-12 ไมโครเมตร รูปร่างทรงกลมหรือรูปไข่ คลอโรพลาสต์มักอยู่ด้านข้าง หรือเป็นรูปถ้วย มีไพรีนอยด์ ผนังเซลล์ค่อนข้างบาง ผนังเซลล์ของคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) ประกอบไปด้วยสารพวก sporopollenin การสืบพันธุ์ มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างออโตสปอร์ คือ สปอร์มีรูปร่างลักษณะเหมือนเซลล์แม่ทุกประการ ปกติจะมีจำนวน 4 ถึง 8 เซลล์บางครั้งอาจพบถึง 16 เซลล์ ซึ่งพบได้น้อยมาก

คลอเรลลา (*Chlorella sp.*) เป็นสาหร่ายที่พบได้ทั่วไป โดยเฉพาะในดิน และมักจะพบอาศัยอยู่ร่วมกันแบบซิมไบโอซิส (symbiosis) กับสัตว์ เช่น พารามีเซียม ไฮดรา ฟองน้ำ เป็นสาหร่ายที่มีโปรตีนสูงถึง 50-60 % น้ำหนักแห้ง จึงถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริมของคนถ้ามีคุณภาพสูง และยังพบว่าสร้างสารปฏิชีวนะสารชื่อ คลอเรลลิน (chlorellin) อีกด้วย (ยุวดี, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญเติบโตของสาหร่าย

สาหร่ายขนาดเล็กที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์แบบง่ายๆ โดยการแบ่งเซลล์ (cell division) จะมีช่วงการเจริญในการเลี้ยงแบบ batch culture อยู่ 6 ช่วง ดังนี้

1. Lag phase

เป็นระยะที่สาหร่ายมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ ระยะนี้จะไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ (ทิฆัมพร, 2527)

2. Acceleration phase

ระยะนี้มวลสาหร่ายจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นลำดับดังนี้ RNA เป็นองค์ประกอบแรกที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ต่อมาปริมาณโปรตีน และน้ำหนักแห้งมีการเพิ่มขึ้น จำนวนเซลล์มีการเพิ่มขึ้นเป็นอันดับสุดท้าย (Vonshak and Maske, 1982)

3. Exponential phase

เป็นช่วงที่สาหร่ายมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว มีเมตาบอลิซึมสูงสุด จึงมีอัตราการเจริญสูงสุดและเป็นอัตราการเจริญที่คงที่ (ทิฆัมพร, 2527 ; ทวี, 2529 ; Vonshak and Maske, 1982)

4. Deceleration phase

เป็นช่วงที่การเจริญของสาหร่าย เริ่มมีการเพิ่มขึ้นน้อยลง เนื่องจากมวลสาหร่ายมีความหนาแน่นมากขึ้น ทำให้เกิดการบังแสงกันเอง แต่ละเซลล์ได้รับแสงน้อยลง อัตราการสังเคราะห์แสงจึงลดลง ทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง (Richmond, 1983)

5. Stationry phase

เป็นช่วงที่มวล หรือ ปริมาณสาหร่ายมีปริมาณคงที่ แต่องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์บางอย่างอาจมีปริมาณเพิ่มขึ้น บางอย่างอาจมีปริมาณลดลง ช่วงการเจริญเติบโตนี้เกิดจากการขาดแคลนแร่ธาตุอาหารที่สำคัญ การขาดแคลนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ การยับยั้งการเจริญเติบโตที่สาหร่ายปล่อยออกมา การเปลี่ยนแปลง pH ในอาหาร การได้รับแสงน้อยไม่เพียงพอ เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย (Vonshak and Maske, 1982)

6. Death phase

มวลสาหร่ายเริ่มลดลงเนื่องจาก อัตราส่วนของการหายใจต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้น จนมีค่ามากกว่า 1 หรือ เนื่องจาก มีการตายของเซลล์สาหร่าย (Vonshak and Maske, 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

1. **ธาตุอาหาร**

ชนิดของธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายซึ่งเป็นพืชชั้นต่ำนั้นเป็นชนิดเดียวกับแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืชชั้นสูง (Smith, 1950 ; Prescott, 1968) Kaplan และคณะ (1986) ได้กล่าวถึงแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามปริมาณของแร่ธาตุอาหารที่สาหร่ายต้องการ ซึ่ง สัมพันธ์ (2529) กล่าวว่า แร่ธาตุแต่ละกลุ่มมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชเท่าๆกัน ในสาหร่ายก็น่าจะเป็นเช่นนั้น แร่ธาตุอาหารทั้ง 2 กลุ่ม ได้แก่

แร่ธาตุที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณมาก (macronutrients หรือ major element) เป็นแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุล ซึ่งเป็นโครงสร้างของสาหร่าย ดังนั้นจึงเป็นแร่ธาตุที่ต้องการเป็นปริมาณมาก ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน ไฮโดรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซี่ยม แมกนีเซี่ยม ซัลเฟอร์ และโปตัสเซี่ยม สัมพันธ์ (2529) รายงานว่า แหล่งของธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ได้มาจากคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และ ก๊าซออกซิเจน ตามลำดับ ทั้งคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารหลักภายในพืช ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน

แร่ธาตุที่สาหร่ายต้องการเป็นปริมาณน้อย (micronutrients หรือ minor element) คือ ต้องการเป็นมิลลิกรัมต่อลิตรหรือต่ำกว่านี้ แร่ธาตุเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของโมเลกุลที่สำคัญเช่น growth factors หรือ เอนไซม์ หรือเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ สัมพันธ์ (2529) กล่าวว่าแร่ธาตุเหล่านี้มีอยู่ 7 ชนิด ได้แก่ คลอรีน เหล็ก แมงกานีส โบรอน สังกะสี ทองแดง และโมลิบดินัม

ธาตุไนโตรเจน

เป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารสีของสาหร่าย (Smith และคณะ, 1999) ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโน โปรตีน โคเอนไซม์ กรดนิวคลีอิค คลอโรฟิลล์ (สัมพันธ์, 2529) ซึ่งการขาดไนโตเจนก่อให้เกิดผลกระทบต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Saha และคณะ, 2003) คือทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์แสงลดลง เพราะสูญเสีย Rubisco isoenzyme การลดลงของสารสีที่สำคัญที่เป็นส่วนประกอบในการสังเคราะห์แสง การสังเคราะห์ lipids และ fatty acids ลดลง การแก้ไขการสังเคราะห์ protein ที่สำคัญถึงการควบคุม three polypeptide และการสังเคราะห์ two polypeptide ใหม่ การเพิ่มการสังเคราะห์ glutamine และการลด nitrate reductase ในปฏิกิริยา

ธาตุฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับการเจริญเป็นปกติในเซลล์สาหร่ายโดยทั่วไป ฟอสฟอรัสมีบทบาทสำคัญในขบวนการหลายอย่างของเซลล์โดยเฉพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวกับการสร้างพลังงานและการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค โดยฟอสฟอรัสที่สาหร่ายใช้จะอยู่ในรูปของเกลือฟอสเฟต ปริมาณฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Dunialalla salina* และ *Dunaliella viridis* จะอยู่ในช่วง 0.002-0.50 กรัม/ลิตร และถ้าความเข้มข้นของฟอสฟอรัสเกิน 5 กรัม/ลิตร จะยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Borowitzka และคณะ, 1988)

ธาตุคาร์บอน

สาหร่ายต้องการสารอนินทรีย์คาร์บอนในการเจริญเติบโต ในแหล่งน้ำจืด ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายอยู่ในน้ำจะเพียงพอต่อความต้องการของพืช แต่ในแหล่งน้ำเค็มหรือบริเวณที่มีความเค็มสูง ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์จะละลายอยู่ในน้ำน้อย ดังนั้นคาร์บอนจะเป็นตัวจำกัดการเจริญเติบโต

ธาตุคลอไรด์และซัลเฟต

เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เพราะซัลเฟตเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นได้แก่ เมไทโอนีน , ซีสตีน และซีสเตอีน วิตามินต่างๆ และซัลโฟลิปิด

ธาตุโซเดียมและโพแทสเซี่ยม

โซเดียมเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสาหร่ายบางชนิดเท่านั้น แต่ถ้ามีปริมาณสูงอาจเป็นพิษต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้ นอกจากนี้โพแทสเซียมยังช่วยในการเปลี่ยนโมเลกุลไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียในการตรึงไนโตรเจนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้ด้วย โดยโพแทสเซี่ยมมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน จึงสามารถใช้แทนกันได้ สำหรับโพแทสเซี่ยมจำเป็นสำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสาหร่ายทุกชนิด เนื่องจากโพแทสเซี่ยมเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์หลายชนิด ภายใต้สภาพการขาดโพแทสเซี่ยมการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แสงลดลง แต่การหายใจสูงขึ้น

ธาตุแมกนีเซียมและแคลเซียม

แมกนีเซียมจำเป็นต่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายทุกชนิด เพราะเป็นองค์ประกอบของรงควัตถุที่ใช้สังเคราะห์แสง คือ คลอโรฟิลล์ มีบทบาทต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม บทบาทของแคลเซี่ยมต่อสรีรวิทยา และ การเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินยังไม่เป็นที่แน่ชัดนัก ซึ่งแคลเซี่ยมอาจใช้ในรูปสารประกอบร่วมกับตัวอื่นๆ

ธาตุเหล็ก

เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม เพราะเป็นองค์ประกอบของไซโตโครมต่างๆ และนอกจากยังมีบทบาทสำคัญต่อการดูดซึมไนโตรเจน และกระบวนการสังเคราะห์แสง เนื่องจากมีผลต่อการสังเคราะห์รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง ได้แก่ ซี – ไฟโคไซยานิน และคลอโลฟิลล์เอ (Oquist, 1971) และเฟอร์ริดอกซิน (ferredoxin) ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงระบบหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. **แสง**

ความเข้มของแสงเป็นปัจจัยที่ทำให้สีของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเปลี่ยนไป คือ ถ้าเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ความเข้มของแสงมากสีของเส้นสายจะเป็นสีน้ำเงิน แต่ถ้าความเข้มข้นของแสงน้อยจะเป็นสีแดง ซึ่งความต้องการปริมาณแสงของสาหร่ายแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน และการได้รับปริมาณแสงสูงหรือต่ำเกินไปจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

3. **อุณหภูมิ**

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมการเจริญเติบโตจะมีผลต่อขนาดของเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยการควบคุมอัตราปฏิกิริยาของเอนไซม์ภายในเซลล์ และกำหนดการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะเจริญเติบโตดีที่อุณหภูมิ 35 – 45 องศาเซลเซียส (Alam และคณะ, 2001)

4. **ความเค็ม**

เมื่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้รับความเข้มของ NaCl จะมีผลกระทบทำให้เกิดการลดลงของน้ำหนักแห้งที่สะสม และทำให้คลอโรฟิลล์ลดลง จึงทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการสังเคราะห์แสงน้อยลง ส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง (Rai and Rai, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง Cholrella **(สูตรปรับปรุง)**

สารเคมี	ปริมาณ (mg/l)	ปริมาณ Stock ละลายในน้ำ 1L
$NaNO_3$	117.0	11.7 g
KH_2PO_4	15.0	1.5 g
$MgSO_4$	8.75	0.875 g
$CaCl_2$	1.67	0.167 g
EDTA	5.0	0.5 g
$FeCl_3.6H_2O$	0.41	0.041 g
$CuSO_4.5H_2O$	0.16	0.016 g
$ZnSO_4.7H_2O$	0.88	0.088 g
$CoCl_2.6H_2O$	0.035	0.0035 g
$MnCl_2.4H_2O$	0.14	0.014 g
MoO_3	0.07	0.007 g
H_3BO_3	1.14	0.114 g
B12	0.005	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง บีจี 11 (BG-11 Medium) นิยมใช้เลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

	ความเข้มข้น
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	1.5 g/l
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต 7 ไฮเดรต ($K_2HPO_4.7H_2O$)	0.04 g/l
แมกนีเซียมซัลเฟต 7 ไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.075 g/l
แคลเซียมคลอไรด์ 2 ไฮเดรต ($CaCl_2.H_2O$)	0.036 g/l
กรดซิตริก ($C_6H_8O_{10}$)	0.006 g/l
เฟอริคแอมโมเนียมซิเตรต (Ferric ammonium citrate)	0.006 g/l
ไดโซเดียมแมกนีเซียม EDTA	0.001 g/l
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	0.02 g/l
Trace Metal Mix	1 ml

Stock solution เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

กรดบอริก	(H_3BO_3)	2.86 g/l
แมงกานีสคลอไรด์ 4 ไฮเดรต	($MnCl_2.4H_2O$)	1.81 g/l
ซิงค์ซัลเฟต 7 ไฮเดรต	($ZnSO_4.7H_2O$)	0.222 g/l
โซเดียมโมลิบเดรต 2 ไฮเดรต	($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.390 g/l
คอปเปอร์ซัลเฟต 5 ไฮเดรต	($CuSO_4.5H_2O$)	0.079 g/l
โคบอลไนเตรต 6 ไฮเดรต	[$Co(NO_3)_2.6H_2O$]	0.099 g/l

สูตรอาหารนี้หลังผ่านการนึ่งในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) เย็นแล้วปรับpH ให้เท่ากับ 7.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการเลี้ยงสาหร่าย

1. การเตรียมอาหารเพื่อใช้เลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลา (*Cholrella sp.*)

เตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่ายจากสารละลายผสมเข้มข้นที่เตรียมไว้ปริมาตรอย่างละ 10 มล. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล. แล้วคนสารให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.8 ถ่ายอาหารที่ได้ใส่ลงในฟลาสก์แก้วที่มีความจุ 250 มล. และเทลงในขวดน้ำเกลือที่มีความจุ 1000 มล. ปิดปากขวดด้วยสำลีและฟลอยด์อลูมิเนียม นำอาหารที่เตรียมแล้วไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave พร้อมอุปกรณ์ที่จะต้องใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งอาหารให้เย็นเพื่อที่จะนำไปเลี้ยงสาหร่าย

2. การเตรียมอาหารเพื่อใช้เลี้ยงสาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*)

เตรียมอาหารเลี้ยงสาหร่ายจากสารละลายผสมเข้มข้นที่เตรียมไว้ปริมาตรอย่างละ 12.5 มล. และเติม Trace Metal Mix ปริมาณ 1 มล. ลงไปคนให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล. แล้วคนสารให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.4 เทอาหารที่ได้ใส่ลงในฟลาสก์แก้วที่มีความจุ 250 มล. และเทลงในขวดน้ำเกลือที่มีความจุ 1000 มล. ปิดปากขวดด้วยสำลีและฟอยด์อลูมิเนียม นำอาหารที่เตรียมแล้วไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave พร้อมอุปกรณ์ที่จะต้องใช้ในการเลี้ยงสาหร่าย ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งอาหารให้เย็นเพื่อที่จะได้นำไปเลี้ยงสาหร่าย

3. การเตรียมวัสดุอุปกรณ์ในการเลี้ยงสาหร่าย

ทำความสะอาดภายในตู้ laminaflow โดยใช้ alcohol 75% ฉีดให้ทั่วเช็ดให้สะอาด พร้อมอุปกรณ์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วและอาหารที่เตรียมไว้สำหรับเลี้ยงสาหร่ายพร้อมทั้งสาหร่ายที่ต้องนำไปเลี้ยง ฉีดด้วย alcohol 75% ใส่ไว้ในตู้ ปิดตู้คลุมด้วยผ้าสีดำ เปิด UV ทิ้งไว้ 30 นาที

4. การเลี้ยงสาหร่าย

โดยทุกขั้นตอนจะต้องทำในสภาพปลอดเชื้อ

1. นำหัวเชื้อสาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) และ คลอเรลลา (*Chlorella sp.*) มาปริมาณ 2-10 มล. ใส่ลงในอาหารที่เตรียมไว้ โดยให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 3.4×10^5 เซลล์/มล. และ 5.1×10^5 เซลล์/มล. ตามลำดับ จากการนับจำนวนเซลล์และวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 680 nm ด้วย spectrophotometer เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปทำ standard curve เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการใช้เทียบการเจริญเติบโตของสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. นำสาหร่ายไปเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิห้อง ความเข้มแสงตามธรรมชาติประมาณ 50-70 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$

3. ทำการนับจำนวนเซลล์ร่วมกับการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยทุกวัน เพื่อดูการเจริญเติบโต เริ่มตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงจนถึงวันที่สาหร่ายหยุดการเจริญเติบโต

5. การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายหลังจากทำการเลี้ยง

1. ช่วงระยะ 1-2 วัน ของการนับจำนวนเซลล์ ระยะนี้จะไม่การเพิ่มจำนวนเซลล์ซึ่งเทียบได้กับระยะ Lag phase

2. สาหร่ายจะเริ่มเจริญเติบโตและมีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วง 3-5 วัน ซึ่งเทียบได้กับระยะ Acceleration phase

3. สาหร่ายมีการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วและเป็นอัตราคงที่ในช่วง 7-11 วัน ซึ่งเทียบได้กับระยะ Exponential phase

4. สาหร่ายเริ่มมีการเพิ่มปริมาณน้อยลง ในช่วง 12 วัน ซึ่งเทียบได้กับระยะ Deceleration phase

5. สาหร่ายมีปริมาณคงที่ในช่วง 12-13 วัน ซึ่งเทียบได้กับระยะ Stationary phase

6. สาหร่ายเริ่มลดลงในช่วงระยะเวลา 14 วัน ซึ่งเทียบได้กับระยะ Death phase

6. การเลี้ยงสาหร่ายเพื่อใช้ในการทดลอง

หลังจากที่เราได้ทำการเลี้ยงและได้วัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายแล้ว ทำให้เราทราบว่าระยะไหนของสาหร่ายที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดและเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการทดลอง เราจึงนำสาหร่ายอายุ 3-5 วัน ที่อยู่ในช่วงเริ่มต้นของ Exponential phase มาใช้เลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้ผลการทดลองประสบผลสำเร็จ

73595

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. **เครื่องมือ** เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง, เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง, กล้องจุลทรรศน์, counter, สไลด์นับเซลล์, หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave), ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow), pH meter

2. **เครื่องแก้ว** หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร, ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร, ขวดน้ำเกลือขนาด 1000 มิลลิลิตร, บีกเกอร์ขนาด 25, 50, 500, 1000 มิลลิลิตร, กระบอกตวงขนาด 10, 100 มิลลิลิตร, กรวย, ขวดเก็บสาร, แท่งแก้วคนสาร, แท่งแก้ว, Droppers, จุกยาง

3. **สารเคมี** $NaNO_3$, KH_2PO_4 $MgSO_4$, $CaCl_2$, EDTA, $FeCl_3.6H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, $CoCl_2.6H_2O$, $MnCl_2.4H_2O$, MoO_3, H_3BO_3, วิตามิน B12, $NaNO_3$, $K_2HPO_4.7H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.H_2O$, $C_6H_8O_{10}$, Ferric ammonium citrate, Na_2CO_3, Trace Metal Mix A5+Co, $Na_2MoO_4.2H_2O$, $Co(NO_3)_2.6H_2O$

4. **สาหร่าย** ไมโครซิสทิส *(Microcystis sp.)* คลอเรลลา *(Chlorella sp.)*

5. **อื่น ๆ** สำลี, ตะเกียงแอลกอฮอล์, กระดาษอลูมิเนียมฟอยด์, กระบอกน้ำกลั่น, ช้อนตักสาร

วิธีการ

การศึกษาผลของใบกัดลิ้นเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) และ คลอเรลลา (*Chlorella sp.*) โดยวิธีวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 680 nm และนับจำนวนเซลล์

เตรียมสารละลายใบกัดลิ้นโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้นดังนี้ สารละลายใบกัดลิ้น 0, 10, 100, 500, 1000 ppm

เตรียมสาหร่ายเพื่อใช้ทดสอบกับสารโดยการแยกสาหร่ายแต่ละชนิดจากขวดใหญ่ที่เลี้ยงเอาไว้แล้ว มาชนิดละ 135 มล. และแยกใส่ขวดเล็กที่เตรียมไว้เพื่อใช้ทดสอบกับสารดังนี้

- สารละลายใบกัดลิ้น 0 ppm สาหร่าย 9 ml น้ำ 1 ml จำนวน 3 ขวด
- สารละลายใบกัดลิ้น 10 ppm สาหร่าย 9 ml น้ำ 0.99 ml จำนวน 3 ขวด
- สารละลายใบกัดลิ้น 100 ppm สาหร่าย 9 ml น้ำ 0.9 ml จำนวน 3 ขวด
- สารละลายใบกัดลิ้น 500 ppm สาหร่าย 9 ml น้ำ 0.5 ml จำนวน 3 ขวด
- สารละลายใบกัดลิ้น 1000 ppm สาหร่าย 9 ml น้ำ 0 ml จำนวน 3 ขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงสาหร่ายไว้ในห้องที่มีแสงความเข้มเท่ากับ 50-70 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ และอุณหภูมิห้องปกติ ทำการวัดการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของสาหร่ายโดยการใช้เครื่อง Spectrophotometer วัดผลเวลา 0 นาที 15 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง ที่ทุกๆความเข้มข้นและทุกซ้ำของการทดลอง และนับจำนวนเซลล์

การวางแผนการทดลอง

แผนการทดลอง Randomize complete Block Design (RCBD) มี 5 ทรีทเมนต์ ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละทรีทเมนต์ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

ระยะเวลาทำการทดลอง

10 พฤศจิกายน 2549 ถึง 25 มกราคม 2550

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชา พืชสวน และ ห้องปฏิบัติการภาควิชา วิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย ไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) และ คลอเรลลา (*Chlorella sp.*) โดยวิธีวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 680 nm เปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์

เนื่องจากสาหร่ายเซลล์เดียวคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) และไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) มีขนาดเล็กมากและเกาะกันเป็นก้อน การตรวจวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีการตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์จึงเป็นวิธีการที่ใช้เวลานาน ซึ่งวิธีการที่นักวิจัยประยุกต์ใช้ในการประเมินการเจริญเติบโตวิธีหนึ่งคือ การวัดความเข้มของสีเขียวของคลอโรฟิลล์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 680 nm

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากใบกัดลิ้น ในแต่ละช่วงเวลาทดลองของสาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) ผลปรากฏว่าจำนวนเซลล์ของสาหร่ายมีความแตกต่างทางสถิติจากกลุ่มควบคุม ส่วนสาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) พบว่าจำนวนเซลล์ของสาหร่ายไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1-6)

ตารางที่ 1 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้นผ่านไป 15 นาที

เวลา	ทรีทเมนต์	จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่ประเมินจากการวัดค่าการดูดคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 680 nm (เซลล์×10^5/มล.)	
		Chlorella sp.	*Microcystis sp.*
15 นาที	0 ppm	$11.83^{a}\pm0.93^{sd}$	$9.70^{c}\pm1.08^{sd}$
	10 ppm	$11.465^{a}\pm0.43$	$10.50^{c}\pm1.8$
	100 ppm	$11.59^{a}\pm0.12$	$12.05^{c}\pm1.41$
	500 ppm	$11.73^{a}\pm0.32$	$15.20^{b}\pm0.45$
	1000 ppm	$11.75^{a}\pm0.22$	$26.975^{a}\pm3.12$
CV		8.3932%	11.9427%

^{sd} = Standard deviation

ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงว่ามีค่าความแตกต่างทางสถิติ ตามการเปรียบแบบ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้นผ่านไป 30 นาที

เวลา	ทรีทเมนต์	จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่ประเมินจากการวัดค่าการดูดคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 680 nm (เซลล์×10^5/มล.)	
		Chlorella sp.	*Microcystis sp.*
30 นาที	0 ppm	11.46^{a}±1.05^{sd}	8.15^{c}±0.55^{sd}
	10 ppm	10.27^{b}±0.77	9.625^{c}±0.64
	100 ppm	11.445^{a}±0.60	9.65^{c}±1.01
	500 ppm	11.595^{a}±0.38	13.375^{b}± 0.65
	1000 ppm	11.97^{a}±0.04	26.30^{a}±2.50
CV		7.3018%	13.8451%

^{sd} = Standard deviation

ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงว่ามีค่าความแตกต่างทางสถิติ ตามการเปรียบแบบ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้นผ่านไป 1 ชั่วโมง

เวลา	ทรีทเมนต์	จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่ประเมินจากการวัดค่าการดูดคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 680 nm (เซลล์×10^5/มล.)	
		Chlorella sp.	*Microcystis sp.*
1 ชม.	0 ppm	11.705^{ab}±0.50^{sd}	8.225^{c}±1.05^{sd}
	10 ppm	11.63^{b}±0.22	11.55^{c}±1.11
	100 ppm	11.96^{ab}±0.52	11.35^{c}±0.64
	500 ppm	12.645^{a}±0.44	16.15^{b}±8.84
	1000 ppm	12.655^{a}±0.18	25.30^{a}±1.52
CV		5.7612%	11.7506%

^{sd} = Standard deviation

ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงว่ามีค่าความแตกต่างทางสถิติ ตามการเปรียบแบบ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้นผ่านไป 6 ชั่วโมง

เวลา	ทรีทเมนต์	จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่ประเมินจากการวัดค่าการดูดคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 680 nm (เซลล์×10^5/มล.)	
		Chlorella sp.	*Microcystis sp.*
6ชม.	0 ppm	13.195^{a}±1.75^{sd}	57.53^{a}±1.17^{sd}
	10 ppm	12.44^{a}±0.28	11.775^{c}±1.11
	100 ppm	14.03^{a}±1.19	14.30^{c}±0.98
	500 ppm	13.81^{a}±1.65	25.30^{b}±2.5
	1000 ppm	13.96^{a}±0.63	27.30^{b}±1.13
CV		10.2216%	9.1515%

^{sd} = Standard deviation

ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงว่ามีค่าความแตกต่างทางสถิติ ตามการเปรียบแบบ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้นผ่านไป 12 ชั่วโมง

เวลา	ทรีทเมนต์	จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่ประเมินจากการวัดค่าการดูดคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 680 nm (เซลล์×10^5/มล.)	
		Chlorella sp.	*Microcystis sp.*
12 ชม.	0 ppm	11.9225^{ab}±0.53^{sd}	6.35^{d}±1.24^{sd}
	10 ppm	12.43^{a}±0.89	12.775^{c}±1.93
	100 ppm	11.34^{ab}±0.63	14.775^{c}±1.33
	500 ppm	9.865^{b}±2.68	21.80^{b}±1.52
	1000 ppm	10.855^{ab}±0.76	28.10^{a}±0.7
CV		13.4211%	11.3287%

^{sd} = Standard deviation

ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงว่ามีค่าความแตกต่างทางสถิติ ตามการเปรียบแบบ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้นผ่านไป 24 ชั่วโมง

เวลา	ทรีทเมนต์	จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่ประเมินจากการวัดค่าการดูดคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 680 nm (เซลล์×10^5/มล.)	
		Chlorella sp.	*Microcystis sp.*
24 ชม.	0 ppm	13.255^{a}±0.02^{sd}	9.90^{c}±0.03^{sd}
	10 ppm	13.365^{a}±0.27	11.875^{bc}±1.61
	100 ppm	14.655^{a}±1.52	13.425^{b}±1.27
	500 ppm	12.39^{a}±1.58	33.2^{a}±1.05
	1000 ppm	13.24^{a}±10.79	35.8^{a}±3.87
CV		16.8422%	12.0106%

^{sd} = Standard deviation

ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงว่ามีค่าความแตกต่างทางสถิติ ตามการเปรียบแบบ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองพบว่าในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการทดลอง จำนวนเซลล์ของสาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนสาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella sp.*)ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องจากการประเมินผลในครั้งนี้ ใช้วิธีการประเมินผลโดยการวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสง สีของสารสกัดจากใบกัดลิ้นซึ่งมีสีน้ำตาลเข้ม จึงรบกวนการวัดสีทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนจึงทำการทดลองซ้ำอีกครั้งโดยให้ครั้งนี้ใช้วิธีการตรวจนับเซลล์และดูรูปร่างลักษณะของเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของสารสกัดใบกัดลิ้นที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) และ ไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

จากการศึกษาผลของสารสกัดใบกัดลิ้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายคลอเรลลา *(Chlorella sp.)* และ ไมโครซิสทิส *(Microcystis sp.)* เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าในการนับจำนวนเซลล์ครั้งแรกหลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้น ผลปรากฏว่าจำนวนเซลล์ของสาหร่ายยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าทุกทรีทเมนต์ของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 7) หลังจากเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าจำนวนเซลล์ของสาหร่ายเริ่มลดลงเล็กน้อยในบาง ทรีทเมนต์เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัดใบกัดลิ้นของสาหร่าย คลอเรลลา *(Chlorella sp.)* มีค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบแตกต่างกับความเข้มข้นที่ 10 µl 100 µl และ 1000 µl และไม่แตกต่างจากความเข้มข้นที่ 500 µl ส่วน กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัดใบกัดลิ้น ของสาหร่ายไมโครซิสทิส *(Microcystis sp.)* มีค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบแตกต่างกับความเข้มข้นที่ 10 µl 100 µl 500 µl และไม่แตกต่างจากความเข้มข้น 1000 µl (ตารางที่ 8) และหลังจากผ่านไป 48 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าจำนวนเซลล์ของสาหร่ายลดลงเรื่อยๆในทุกทรีทเมนต์เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัดใบกัดลิ้นของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดมีค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบแตกต่างกับทุกๆทรีทเมนต์ (ตารางที่ 9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์หลังจากที่หยดสารสกัดใบกัดลิ้น

จำนวนวัน	ทรีทเมนต์	จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์ (เซลล์×10^5/มล.)	
		Chlorella sp.	*Microcystis sp.*
0 วัน	0 ppm	$105.00^{a} \pm 5.67^{sd}$	$69.17^{a} \pm 4.74^{sd}$
	10 ppm	$92.83^{a} \pm 12.31$	$86.33^{a} \pm 11.3$
	100 ppm	$93.67^{a} \pm 7.04$	$81.33^{a} \pm 18.44$
	500 ppm	$107.33^{a} \pm 8.86$	$81.17^{a} \pm 8.13$
	1000 ppm	$84.33^{a} \pm 8.14$	$86.33^{a} \pm 9.89$
CV		11.7718 %	16.8531 %

^{sd} = Standard deviation

ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงว่ามีค่าความแตกต่างทางสถิติ ตามการเปรียบแบบ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์หลังจากผ่านไป 1 วัน

จำนวนวัน	ทรีทเมนต์	จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์ (เซลล์×10^5/มล.)	
		Chlorella sp.	*Microcystis sp.*
1 วัน	0 ppm	$105.83^{a} \pm 5.39^{sd}$	$73.17^{a} \pm 9.24^{sd}$
	10 ppm	$70.67^{bc} \pm 13.60$	$44.00^{b} \pm 5.78$
	100 ppm	$54.67^{c} \pm 9.17$	$46.67^{b} \pm 2.2$
	500 ppm	$87.00^{ab} \pm 5.61$	$46.67^{b} \pm 8.84$
	1000 ppm	$76.50^{bc} \pm 6.75$	$61.50^{a} \pm 5.79$
CV		14.8480 %	13.8265 %

^{sd} = Standard deviation

ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงว่ามีค่าความแตกต่างทางสถิติ ตามการเปรียบแบบ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์หลังจากที่ผ่านไป 2 วัน

จำนวนวัน	ทรีทเมนต์	จำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่นับได้จากกล้องจุลทรรศน์ (เซลล์×10^5/มล.)	
		Chlorella sp.	*Microcystis sp.*
2 วัน	0 ppm	$113.67^{a} \pm 10.56^{sd}$	$84.50^{a} \pm 8.57^{sd}$
	10 ppm	$78.00^{bc} \pm 16.08$	$39.00^{b} \pm 4.55$
	100 ppm	$54.00^{c} \pm 1.07$	$38.83^{b} \pm 6.96$
	500 ppm	$84.17^{b} \pm 12.44$	$47.67^{b} \pm 2.74$
	1000 ppm	$75.00^{bc} \pm 12.13$	$43.00^{b} \pm 3.43$
CV		16.9525 %	12.7205 %

^{sd} = Standard deviation

ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงว่ามีค่าความแตกต่างทางสถิติ ตามการเปรียบแบบ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองโดยการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าจำนวนเซลล์ของสาหร่ายเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของสาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) มีจำนวนเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับสาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) เนื่องจากว่าสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด มีผนังเซลล์ซึ่งประกอบด้วยแป้งแต่สาหร่ายคลอเรลลา(*Chlorella sp.*) จะมีโครงสร้างโมเลกุลของแป้งที่สามารถสร้างสารพวกเซลลูโลสและเพคตินได้ ผนังชั้นในของสาหร่ายคลอเรลลา(*Chlorella sp.*) เป็นเซลลูโลสส่วนผนังชั้นนอกเป็นเพคติน จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้สารสกัดจากใบกัดลิ้นสามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์ของสาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) ได้ยาก จึงเป็นผลให้จำนวนเซลล์ของสาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) ลดลงช้ากว่าจำนวนเซลล์ของสาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) และคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) ในขวดแก้วที่เติมสารสกัดจากใบกัดลิ้นที่ความเข้มข้น 0, 10, 100, 500 และ 1,000 ppm. โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากใบกัดลิ้นที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ppm. เป็นต้นไปสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) และคลอเรลลา (*Chlorella sp.*)ได้ เนื่องจากเซลล์ของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากการนำสารสกัดจากใบกัดลิ้นมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายไมโครซิสทิส (*Microcystis sp.*) และคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) ซึ่งสามารถทำการยับยั้งสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดได้ จึงเป็นการนำทรัพยากรที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ประโยชน์เพื่อลดปัญหาการใช้สารเคมีในการกำจัดสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด ที่นำเข้าจากต่างประเทศ และยังเป็นการส่งเสริมผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella sp.*) ที่เปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาต่าง ๆโดยวิธีวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 680 nm

เวลา / ทรีทเมนต์	15 นาที	30 นาที	1 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0 ppm	2325000	1820000	2065000	3555000	2215000	3615000
10 ppm	1825000	630000	1990000	2800000	2790000	3725000
100 ppm	1950000	1805000	2320000	4390000	1700000	5015000
500 ppm	2110000	1950000	3005000	4170000	225000	2750000
1000 ppm	2110000	2080000	3015000	4320000	1215000	2100000

ตารางผนวกที่ 2 จำนวนเซลล์ของสาหร่ายไมโครซิสทิส(*Microcystis sp.*)ที่เปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาต่าง ๆโดยวิธีวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 680 nm

เวลา / ทรีทเมนต์	15 นาที	30 นาที	1 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0 ppm	145000	1071250	1997500	1097500	631250	165000
10 ppm	225000	137500	330000	352500	452500	362500
100 ppm	380000	132500	310000	605000	652500	517500
500 ppm	695000	512500	790000	1025000	1352500	2495000
1000 ppm	1872500	1805000	1705000	1905000	1985000	2755000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ทวี จิตไมตรี. 2529 แบคทีเรียทั่วไป และ ปฏิบัติการสำหรับวิศวกรสิ่งแวดล้อม. โรงพิมพ์ เอส.ดี.เพลส., กรุงเทพฯ. 401 น.

ทิฆัมพร กุยยานนท์. 2527. Nutrition,growth and reproduction. 55-69. ในทิฆัมพร กุยยานนท์

นันทวัน บุณยะประภัศร. 2539. สมุนไพร..ไม้พื้นบ้าน(1). บริษัท ประชาชน จำกัด. กรุงเทพฯ.

บุญรอด ชาติยานนท์ วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ พัชนี เจริญยิ่ง และ เฉลิมชัย วงศ์วัฒนะ. 2544. ศักยภาพ ของสารสกัดด้วยน้ำจากใบประยงค์ในการยับยั้งการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของ ต้นถั่วผี. วารสารวิทยาการวัชพืช. 19(1):26-32.

พิพัฒน์ การเที่ยง. 2516. สูตรโครงสร้างของสารเตตระไซคลิกเทอร์ลีนที่มีอยู่ในใบประยงค์ วิทยานิพนธ์ แผนกเคมี บัณฑิตวิทยาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาคภูมิ พาณิชยุปการนันท์ และทรงศรี แก้วสุวรรณ. แนวทางการพัฒนาสมุนไพรของประเทศ กรุงเทพฯ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. โชตนาพริ้นท์. เชียงใหม่.

รังสิต สุวรรณเขตนิคม. 2531. สารกำจัดวัชพืชกับหนทางสรีระวิทยาพืชเล่ม2 กลไกการทำลาย หน้า 394-418.

วิชชุ โลจนาภิวัฒน์. 2532. ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ชีวสังเคราะห์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ บุญรอด ชาติยานนท์ เฉลิมชัย วงศ์วัฒนะ และ พัชนี เจริญยิ่ง. ผลของสารสกัดจากใบประยงค์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการยับยั้งการงอกของเมล็ดและการเจริญ วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 19(3):1-6.

สมจิตร พงศ์พงันและสุภาพ ภู่ประเสริฐ. 2534. พืชกินได้และพืชมีพิษในป่าเมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่2. โอเอสพรินติ้งเฮ้าส์. กรุงเทพฯ.

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์. 2529. สรีรวิทยาของพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 330 น.

โสภา ภูกาธร. 2549. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของใบกัดลิ้น. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อุดม ก๊กผล. 2512. การหาสูตรโครงสร้างของไดโอลและไฮดรอกซีคีโตนจากต้นประยงค์. วิทยานิพนธ์ แผนกเคมี บัณฑิตวิทยาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัญชลี ตัตตะวะศาสตร์ และวีระพงศ์ ลุลิตานนท์ (บรรณาธิการ). แบคทีเรียวิทยา ตอนที่ 1. คณะแพทย์ศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alam, M. G. M., N. Jahan, L. Thalib, B. Wei and T. Maekawa. 2001. Effect of environmental factors on the seasonally change of phytoplankton population in a closeed freshwater pond. Environment International. 27:363-371.

Alsaadawi, I.S.E.L. Rice and T.K.B. Karns, 1983. Allelochemicals in soil from no-tillage versus conventional-tillage Wheat (*Triticum aestivum*) fields. J chem.Ecol. 9:761-774.

Bacher M., O. Hofer, G. Brader, S. Vajirodaya and H. Greger, 1999. Phytochemistry,52:253.

Borowitzka L., J. and L. J. Borowitzka. 1988. Dunaliella, pp. 27-53. In M. A. Borowizka,L. J. amd L. J. Borowizka.(eds.). Micro-AlgaeBiotecnology. Cambridge university. Press, Cambridge.

Brader G., S. Vajrodaya, H. Greger, M. Bacher, H. Kalchhauser and O. Hofer, 1998. Bisamides, lignans, triterpenes and insecticidal Cyclopentabenzofurans from Aglaia species. Journal of Natural Products. 61:1482.

Dyatmiku W., N. Fuzzati, A. Rahman, F. Achmed and K. Hostettmann, 1996. Phytochemistry. 96:1395-1398.

Hideji E., 1995. *Pharm. Bull.* 43(7):1171-1175.

Hsieh T., T. Liu, Y. Chia, F. Lu, M. Chuang, S. Mau, S. Chen, Y.Syu, C. Chen, 2004. Food and Chemical Toxcology. 42:843-850

Ismail I.S., H. Ito, T. Hatano, S. Taniguchi, T. Yoshida. 2003. *Phytochemmistry.* 64: 1345-1349.

Kaplan D., A. E. Richmond, Z. Dubinsky and S. Aaronson. 1986. Algal nutrition, pp. 147-198. In A. Richmond(ed.). CRC Handbook of Microagae Mass Culture. CRC Press, Inc., Boca Raton, florida.

Laosinwattana C., K. Yoneyama, Y. Takeuchi, M. Ogasawa and M. Konnai, 1999. Center for Research on wild Plants. 28:27-36.

Mulholland D.A. , T.V. Monkhe, P.H. CoomBes and M.S. Rajab, 1998. Phytochemistry. 49:2585-2590.

Nishimura H., and J. Mizutani, 1995. American chemical society. 582:74-85.

Oquist G., 1971. Change in pigment composition and photosynthesis induce by ironde-ficiency in the blue-green alga Anacystic nidulans. Phycol. Plant. 25:188.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Prescott G.W., 1968. The algae. Houghton Mifflin Company, Boston. 436 p.

Rai A.K. and V. Rai. 2003. Effect of NaCl on growth, nitrate uptake and reduction and nitrogenase activity of Azolla pinnata-Anabaena azolla. Plant Science. 164:61-69.

Richmond A., 1983. C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. Arch. Microbial. 125:143-147.

Roshchina V.D. and V.V. Roshchina, 1989. The Excretory Function o Higher Plants. 314.

Roshchina V.V., E.V. Melnikova, L.V. Kovaleva, and N.A Spiridonov, 1994. Doklady Biological Sciences. 337:424-427.

Saha S.K., L. Uma and G. Subramanian. 2003. Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. FEMS Microbiology Ecology. 45:263-272.

Smith G.M., 1950. The fresh-water algae of the united states. 2d ed., McGraw-Hill Book Company, New York. 719 p.

Szabo L. and B. kevey, 1997. Janus Pannonius University. 101-105.

Vonshak A. and H. Maske. 1982. Algae : Growth techiniques and biomass production, 66-67. In J. coombs and D. O. Hall(eds.). Technique in Bioproductively and Photoysthesis. Pergramond Press, Oxford.S

Wang B., H. Huang, X. Li, G. Eck, X. Gong and P. Proksch, 2004. Rocaglamide, aglain, and other related derivatives from Aglaia testicularis (Meliaceae). Biochemical systemmatics and ecology. 32:1223-1226

Yamamoto Y., 1995. Allelopathic potential of Anthoxanthum odoratum for invading Zoysia – grassland in Japan. Journal of chemical Ecology. 21:1365-1373.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้