สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505

นางสาวกุลชาดา สง่าสินธุ
นางสาวภัทรา ธรรมาพิมล

วพ
ก๗๕๐
๒๕๔๙

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72591
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

b 11764786
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Antipathogenic microorganism activity from extracts of *Chlorella* sp. A0505

Miss Kunchada Sangasintu

Miss Pattra Thammapimol

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 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505
นักศึกษา	นางสาวกุลชาดา สง่าสินธุ รหัสนักศึกษา 46050448
	นางสาวภัทรา ธรรมาพิมล รหัสนักศึกษา 46050477
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.วีนา ชูโชติ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังอนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ดร.จิตดิ ท่าไว	
กรรมการ ผศ.วีนา ชูโชติ	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505

นักศึกษา นางสาวกุลชาดา สง่าสินธุ

นางสาวภัทรา ธรรมาพิมล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2549

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.วีนา ชูโชติ

บทคัดย่อ

สารสกัดจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่ได้จากการสกัดโดยวิธีลำดับขั้นของตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตด และบิวทานอล ตามลำดับ ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยใช้แผ่นทดสอบ จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากน้ำหมักของสาหร่ายที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ดีที่สุด มีขนาดของบริเวณยับยั้ง 12.16 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากน้ำหมักของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด เมื่อการเจริญอยู่ในช่วงปลาย Log phase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Antipathogenic microorganism activity from extracts of *Chlorella* sp. A0505
Name	Miss Kunchada Sangasintu
	Miss Pattra Thammapimol
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2006
Special Project Advisor	Asst. Prof. Weena Choochote

Abstract

The fermented broth of *Chlorella* sp. A0505 extracted by sequencial extraction with hexane, ethyl acetate and butanol respectively, were tested for antimicrobial activity against six genera : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 10231 by the agar disc diffusion. From the results, the crude extracts of broth in ethyl acetate have been found to effectively inhibit the growth *Bacillus subtilis* ATCC 6633, which produced the largest inhibition zone (diameters 12.16 mm.) at the concentration of 150 mg/ml. The crude extract from fermented broth of *Chlorella* sp. A0505 strongly inhibited the growth of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 when the growth of *Chlorella* sp. A0505 entered in the late log phase.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งโครงงานพิเศษนี้จะไม่สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดีหากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.วีนา ชูโชติ อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ประธานกรรมการ และ ดร.จิตดิ ท่าไว กรรมการ ที่ให้คำปรึกษา ความรู้ต่างๆ เกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ การตอบข้อซักถามของผู้จัดทำ ข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทดลอง และกรุณาช่วยตรวจแก้ไขรูปเล่มโครงงานพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้ใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติโครงงานพิเศษครั้งนี้จนโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่อบรมสั่งสอน อุปการะเลี้ยงดู และเป็นกำลังใจให้ผู้จัดทำตลอดมาจนโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งให้คำปรึกษา แก้ไขเครื่องมือที่บกพร่อง และอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่างๆ

ขอขอบคุณพี่พงศ์ธร เครือวณิชธรรม ที่ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือในทุกๆ เรื่องตั้งแต่เริ่มดำเนินงานด้วยดีตลอดมาพี่ชิตเวท พี่ทนงศักดิ์ พี่นพพลที่เอื้อเฟื้อข้อมูล เพื่อนๆ ชั้นปีที่ 4 ที่ให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจ และอำนวยความสะดวกต่างๆ จนโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้

นางสาวกุลชาดา สง่าสินธุ

นางสาวภัทรา ธรรมาพิมล

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 ที่มาของโครงงานพิเศษ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 3
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 หลักการและทฤษฎี
2.1 ประวัติของการผลิต *Chlorella* sp. 4
2.2 ลักษณะของสาหร่าย *Chlorella* sp. 5
2.3 คลอโรฟิลล์จาก *Chlorella* sp. 7
2.4 องค์ประกอบทางเคมีของ *Chlorella* sp. 8
2.5 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ในประเทศไทย 10
2.6 ประโยชน์ของสาหร่าย *Chlorella* sp. 10
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย 13
2.8 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายชนิดต่างๆ 14
2.9 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจาก *Chlorella* sp. 16
2.10 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 24
2.11 ลักษณะของสารปฏิชีวนะที่เหมาะในการใช้เป็นยารักษาโรค 25
2.12 คุณสมบัติของยาต้านจุลินทรีย์ที่ดี 26
2.13 ความไวต่อเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารปฏิชีวนะ 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 27

3.2 สารเคมี และเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ 27

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง 28

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 34

4.2 ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซีเตด และบิวทานอล ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 35

4.3 ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่ความเข้มข้นต่างกัน 38

4.4 เปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 43

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 47

เอกสารอ้างอิง 49

ภาคผนวก

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ 54

ข. การวิเคราะห์ทางสถิติ 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 แสดงปริมาณกรดอะมิโน (w/w%) 8

2.2 แสดงส่วนประกอบทางโภชนาการ 9

2.3 แสดงปริมาณวิตามิน 9

2.4 แสดงปริมาณแร่ธาตุ 9

4.1 แสดงปริมาณน้ำหนักของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 34

4.2 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 36

4.3 แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 39

4.4 แสดงการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยยาปฏิชีวนะ 41

4.5 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วันต่างๆ 44

ข-1 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลาย 56

ข-2 การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ข-3 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตด เป็นตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 57

ข-4 การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 58

ข-5 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตดเป็นตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 58

ข-6 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากสารสกัดที่ได้จากวันต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. A0505 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 บ่อเลี้ยง *Chlorella* sp. แบบเปิด 5

2.2 เซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. 6

2.3 เซลล์สาหร่าย *Chlorella* อัดเม็ด 12

2.4 เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* 16

2.5 เซลล์แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* 19

2.6 เซลล์แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* 20

2.7 เซลล์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* 21

2.8 เซลล์แบคทีเรีย *Micrococcus luteus* 22

2.9 ลักษณะสปอร์ของ *Candida* sp. 22

2.10 การเจริญของ *Candida* sp. บนอาหาร Sabouraud's Dextrose 23

2.11 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของเพนนิซิลิน จี 24

2.12 ลักษณะโครงสร้างของแอมโฟเทอริซิน บี 25

3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนเครื่องเขย่า 28

3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเพิ่มปริมาณในหลอดเพาะเลี้ยงขนาด 300 มิลลิลิตร 29

3.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ในกรวยแยก 30

3.4 การทำให้สารสกัดแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน 30

3.5 ขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย 31

4.1 ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 37

4.2 แสดงการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล 37

4.3 ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เอทิลอะซีเตตที่ความเข้มข้น 50 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.4 ผลของยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน จี ที่ระดับความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 41

4.5 ผลของยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน จี ที่ระดับความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 42

4.6 ผลของยาปฏิชีวนะแอมโฟเทอริซิน บี ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ATCC 10231 42

4.7 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ต่อการผลิตสาร ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 45

4.8 ผลของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่วันที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 46

4.9 ผลของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่วันที่ 12, 14, 16, 18 และ 20 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบันสาหร่ายกำลังเป็นที่สนใจของนักชีววิทยา เพราะสาหร่ายเซลล์เดียวจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสง และสร้างสารประกอบต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ได้ เนื่องจากสาหร่ายมี คลอโรฟิลล์ สามารถสังเคราะห์แสงเปลี่ยนสารอนินทรีย์ให้เป็นสารอินทรีย์ได้ ซึ่งจะไปเป็นอาหารของสิ่งมีชีวิต จึงเป็นจุดเริ่มต้นของห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศ ในแง่ที่เป็นผู้ผลิต (นง-ลักษณ์ และปรีชา, 2544) ดังนั้นสาหร่ายจึงถูกนำมาใช้เป็นประโยชน์มากมายหลายด้านเช่น ด้านระบบนิเวศ สามารถผลิตออกซิเจนให้แก่สิ่งแวดล้อม เป็นผู้ผลิตในห่วงโซ่อาหาร เป็นต้น ด้านอุตสาหกรรม การผลิตวุ้นจากสาหร่ายสีแดงพวก *Gelidium, Gracilaria, Pterocladia* และ *Acenthopeltis* คาร์ราจีแนนได้จากสาหร่ายสีแดง เช่น *Chondrus, Gigartina, Eucheuma* และ *Hypnea* เป็นต้น ด้านเกษตรกรรม สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิดช่วยเพิ่มไนโตรเจนในนาข้าว เช่น *Nostoc* ช่วยเพิ่มสารอินทรีย์และไนโตรเจนในดิน สาหร่ายทะเลพวกสาหร่ายสีแดงหรือสาหร่ายสีน้ำตาลที่มีขนาดใหญ่นำมาทำเป็นปุ๋ยอินทรีย์ เนื่องจากมีปริมาณโพแทสเซียมสูง ปุ๋ยที่ผลิตจากสาหร่ายทะเลเหล่านี้ช่วยให้ดินทรายรวมตัวกันได้ดี และช่วยให้ดินเหนียวแตกจากกัน ช่วยให้ดินเหมาะแก่การเพาะปลูก (ดวงรัตน์, 2542) เป็นต้น ด้านอาหาร นำมาเป็นอาหารสัตว์ เช่น สาหร่ายทะเลสีเขียว *Caulerpa , Ulva* หรือสาหร่ายสีน้ำตาล *Padina* ใช้เลี้ยงหมู สาหร่ายสีเขียวพวก *Chlorella* ใช้เลี้ยงไรแดง สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินพวก *Spirulina* ผสมกับเนื้อปลาใช้สำหรับอนุบาลลูกปลากะพง (ยุวดี,2546) อาหารมนุษย์ เช่น *Chlorella* เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวอีกชนิดหนึ่งที่มีโปรตีนสูง ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตและจำหน่ายในรูปแคปซูล สาหร่ายแห้งอัดเม็ด และเป็นอาหารเสริมสุขภาพ (วินัย, 2535) นอกจากนี้ยังมีการนำเอาสาหร่ายมาใช้เป็นยา เช่น สาหร่ายสีแดง *Digenia simplex* เป็นยาถ่ายพยาธิและรักษาโรคตาลขโมย สารโซเดียมลามินารินซัลเฟต และฟิว-คอยดินซึ่งสกัดมาจากสาหร่ายสีน้ำตาลเป็นยาให้เลือดแข็งตัว รักษาบาดแผลให้หายได้เร็วขึ้น สาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* รักษาโรคคอพอกและต้มรับประทานแก้ร้อนใน (ยุวดี,2546) ยาปฏิชีวนะ เช่น สาหร่ายคลอเรลลา ช่วยรักษาอาการจากการติดเชื้อ Epstein-Barr virus ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยมีอาการติดเชื้อง่าย เกิดอาการภูมิแพ้และเหนื่อยง่าย นอกจากนี้สารสกัดที่ได้จากคลอเรลลาที่เรียกว่า "Chlorellin" ก็ได้รับการพิสูจน์ว่าสามารถใช้ต่อต้านแบคทีเรียชนิด gram-positive และชนิด gram-negative ซึ่ง Chlorellin นี้ทำงานได้ผลเพราะว่าเกิดการรวมตัวกับออกซิเจน และแยกธาตุคาร์บอนของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวออก (Steenblock, 2530)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chlorella sp. เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวตัวแรกที่ใช้ในการวิจัย ตั้งแต่ปี ค.ศ.1950 (ตวงรัตน์, 2542) โดยดร.ฟูจีมากิ แห่งศูนย์ค้นคว้าทางวิทยาศาสตร์ของประชากรในนครโตเกียว ได้แยกสารออกมาจาก *Chlorella* ที่สกัดโดยน้ำร้อน (hot water extract of Chlorella) เขาใช้กรรมวิธี electrophoresis (คือการแยกหรือสกัดโดยใช้ไฟฟ้าไปทำให้ประจุไฟฟ้าแก่สารแขวนตะกอนในน้ำและสารที่มีประจุนั้นจะเคลื่อนไปสู่ขั้วไฟฟ้าที่ดึงดูดหรือผลักกัน) สารที่สกัดออกมาได้โดยกรรมวิธีนี้มีชื่อเรียกต่างๆ กัน เช่น "Chlorella extract solution, Chlorella Extract, Fujimaki material,F.S., และ Controlled Growth Factor" จากชื่อต่างๆ เหล่านี้คนส่วนมากนิยมเรียกว่า "Chlorella Growth Factor หรือ CGF" ซึ่ง CGF ประกอบด้วยสารมากมายหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ (เหมือนกลูตาไทโอน) โปรตีน วิตามิน น้ำตาล และกรดนิวคลีอิกซึ่งมีสารที่เกี่ยวข้อง เช่น อะดิโนซีนนิวคลีโอไทด์ และไซทิดีนนิวคลีโอไทด์ โปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรต (Glycoprotein) ซึ่งสกัดได้จากคลอเรลลา (Steenblock, 2530)

มีการศึกษาวิจัยพบว่า ในหนูที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Murine acquired immunodeficiency syndrome : MAIDS) และติดเชื้อ *Listeris monocytogenes* (เชื้อฉวยโอกาส) เมื่อให้สารสกัดจาก *Chlorella* (CGF) พบว่า มีประสิทธิภาพในการช่วยกำจัดเชื้อ *Listeris monocytogenes* ได้ดีที่สุด (Hasagawa, Okuda และ Makino,1995)

เนื่องจากเหตุผล และความสำคัญดังกล่าว จึงมุ่งทำการศึกษาสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยการใช้สารสกัดจาก *Chlorella* นับว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะพัฒนาให้เป็นประโยชน์ในด้านต่างๆ ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

2. เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดจาก *Chlorella* sp. A0505 ที่เหมาะสมเพื่อยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรค

3. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

4. เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เพื่อศึกษาความสามารถจากสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ชนิดใดมีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคมากที่สุด

2. ทราบความเข้มข้นของสารสกัดจาก *Chlorella* sp. A0505 ที่เหมาะสมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

3. ทราบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่มีผลต่อการใช้ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

4. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
หลักการและทฤษฎี

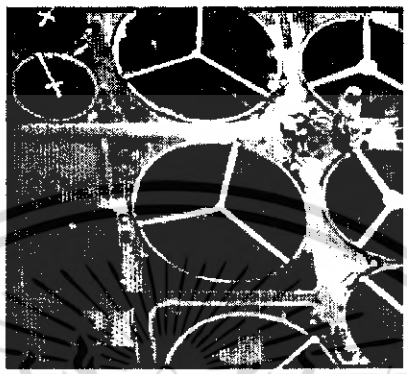
2.1 ประวัติของการผลิต *Chlorella* sp.

สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรกๆ ที่เกิดขึ้นบนโลก มีบทบาทสำคัญทางด้านนิเวศวิทยา และห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิต สาหร่ายเป็นผู้ผลิตเบื้องต้น (สิริรัตน์, 2525) สาหร่ายสีเขียวมีส่วนประกอบของรงควัตถุเหมือนกับพืชชั้นสูง ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ (กาญจนภาชน์, 2527) สาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย ในทะเล และบนพื้นดิน จะมีขนาดตั้งแต่เล็กมากซึ่งประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เซลล์เดียว (unicellular) ไปจนถึงขนาดใหญ่ที่มีลักษณะเป็นต้นหรือทัลลัส จากคุณสมบัติในการเจริญเติบโตที่รวดเร็วของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวจึงได้มีการนำมาศึกษาเพื่อเป็นการนำไปใช้ประโยชน์ได้สูงสุด ซึ่งสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวที่มีการศึกษากันได้แก่ สาหร่าย *Chlorella* sp. เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้ง่าย และให้ผลผลิตสูงภายในระยะเวลาอันสั้น และทนต่อสภาวะต่างๆ ได้ดีประกอบกับมีคุณค่าทางอาหารสูง ในช่วงระยะเวลาแรกๆนั้น นักวิทยาศาสตร์จะให้ความสนใจในเรื่องการผลิตเซลล์สาหร่าย เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหาร ได้เริ่มมีการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ที่มีขนาดใหญ่อย่างจริงจังในประเทศเยอรมัน ซึ่งอยู่ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 แต่ความไม่แน่นอนของสภาพภูมิอากาศทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่คงที่ (ปาจารีย์ และคณะ, 2539) นับเป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้เกิดการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ได้ผลผลิตเซลล์ต่อหน่วยพื้นที่มีค่าสูงสุด และได้มีการศึกษามาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีเพียงประเทศที่พัฒนาแล้วบางประเทศที่ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. ที่มีขนาดใหญ่ ในปี 1960 Taiwan Chlorella Company ได้เริ่มผลิตสาหร่าย *Chlorella* sp. ในระดับอุตสาหกรรม หลังจากนั้นจึงได้มีบริษัทต่างๆผลิต *Chlorella* sp. ออกสู่ตลาดอาหารเสริมสุขภาพอีกเป็นจำนวนมาก แต่ส่วนใหญ่จะเป็นบริษัทของญี่ปุ่น และไต้หวัน การผลิตสาหร่าย *Chlorella* sp. แบบอุตสาหกรรมเริ่มขึ้นประมาณปี 1965 จนถึงกลางทศวรรษ 1970 มีการสร้างบ่อเลี้ยงขนาด 100,000 ลิตรในประเทศไต้หวัน ผลผลิตที่ได้ประมาณ 800 ตันต่อปี ส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น

Chlorella sp. มีผนังเซลล์ที่แข็งจึงช่วยป้องกันไม่ให้ตัวมันเองถูกย่อยทำลาย ต่อมาในปี 1977 มีการค้นพบวิธีทำให้ผนังเซลล์แตก หรือที่เรียกว่า Dyno-mill (Steenblock, 2530) เป็นการทำให้ผนังเซลล์ของสาหร่ายแตกออกโดยไม่ได้ทำลายสารอาหารภายใน (วิสัย, 2534) ทำให้ในปีเดียวกันที่ประเทศไต้หวันมีโรงงานผลิต *Chlorella* sp. 30 โรงงาน ซึ่งผลิตได้มากกว่า 1,000 ตันต่อปี เพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ (Sasson, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบันกระบวนการผลิต *Chlorella* sp. จะใช้การเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิคหรือเฮเทอโร-โทรฟิค โดยใช้กรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เนื่องจากความ "เขียว" ของคลอโรฟิลล์เป็นคุณสมบัติสำคัญของผลิตภัณฑ์ จึงต้องมีขั้นตอนการผลิตในช่วงท้ายที่ให้สาหร่ายได้รับแสงในสภาพที่มีปริมาณสารอินทรีย์คาร์บอนต่ำ ซึ่งสาหร่ายจะมีปริมาณของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น (สรวิศ, 2543)



รูปที่ 2.1 บ่อเลี้ยง *Chlorella* sp. แบบเปิด
ที่มา : http://www.chlorella.co.jp

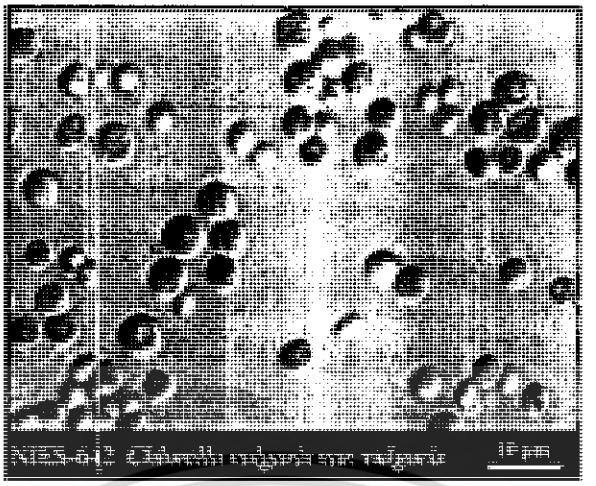
2.2 ลักษณะของสาหร่าย *Chlorella* sp.

สาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวมีขนาดประมาณ 2-12 ไมโครเมตร รูปร่างทรงกลมหรือรูปไข่ (ยุวดี, 2546) *Chlorella* sp. เป็นเซลล์เดี่ยวที่มีลักษณะของเซลล์ครบถ้วน มีโครงสร้างชัดเจน (รูปที่ 2.2) นิวเคลียสค่อนข้างใหญ่ (วินัย, 2535) คลอโรพลาสต์มักอยู่ด้านข้างหรือเป็นรูปถ้วย ภายในบริเวณคลอโรพลาสต์ จะพบไพรีนอยด์ (Pyrenoids) ซึ่งทำหน้าที่สะสมเม็ดแป้ง จำนวนไพรีนอยด์จะเป็นตัวกำหนดชนิด (Species) ของ *Chlorella* sp. (สิริรัตน์, 2525)

สำหรับการจัดเรียงตามหลักอนุกรมวิธานของ สาหร่าย *Chlorella* sp. คือ (ยุวดี, 2546)

Division	Chlorophyta
Class	Chlorophyceae
Order	Chlorococales
Family	Chlorellaceae
Genus	*Chlorella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 เซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp.

ที่มา : http://www.nies.go.jp/biology/mcc/class/Chlorella.html

สาหร่ายชนิดนี้มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างออโตสปอร์ มีจำนวน 4, 8 หรือ 16 เซลล์ โดยที่เซลล์เดิมจะแบ่งนิวเคลียสจนได้หลายๆ อันในเซลล์เดิม แล้วปล่อยออกสู่ภายนอก โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ออโตสปอร์จะมีขนาดรูปร่างเหมือนเซลล์เดิมทุกประการ (ยุวดี, 2546) *Chlorella* sp. แบ่งตัวขยายพันธุ์ได้รวดเร็วเช่นเดียวกับสัตว์ และพืชชั้นต่ำเซลล์เดียวชนิดอื่นๆโดยแบ่งตัวทวีคูณทุก 16-20 ชั่วโมง เมื่อมีอาหาร คาร์บอนไดออกไซด์ และแสงแดดเพียงพอ (วินัย, 2535) สามารถพบทั่วไป โดยเฉพาะในดิน แม้กระทั่งขวดน้ำ หรือถังบรรจุน้ำที่ไม่ค่อยได้ล้าง และมักจะพบอาศัยอยู่ร่วมกันแบบซิมไบโอซิส (Symbiosis) กับสัตว์ (ยุวดี, 2546) *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายตัวแรกที่นำไปใช้ในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการในเรื่องการสังเคราะห์ด้วยแสง (Lund และLund, 1995) *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวที่มีผนังเซลล์แตกต่างจากสาหร่ายชนิดอื่น คือ เป็นสปอโรโพลเลนนิน (sporopollenin) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไอโซพรีนประกอบด้วยผนังเซลล์แบบโพลเลน (pollen) (Sengbusch, 2003) ทำให้ *Chlorella* sp. มีผนังเซลล์ที่หนาและแข็ง ทำให้ไม่สามารถย่อยและดูดซึมได้ในกระเพาะอาหารและลำไส้ของคน

Chlorella sp. เท่าที่พบมี 11 ชนิด ได้แก่ *Chlorella vulgaris, Chlorella pyrenoidosa, Chlorella conglomerala, Chlorella simplex, Chlorella miniala, Chlorella ellipsoidea, Chlorella acuminate, Chlorella saccharophila, Chlorella protothecoides, Chlorella faginea* และ *Chlorella variegata* โดยมีลักษณะที่ใช้ในการจำแนกคือ รูปร่างเซลล์ ความหนาแน่นของผนังเซลล์ ขนาดของเซลล์ ลักษณะของเม็ดแป้ง (สกานต์, 2536) ชนิดที่นิยมนำมาใช้เป็นอาหารมากที่สุดคือ *Chlorella pyrenoidosa* ซึ่งมีสารอาหารที่ทรงคุณค่าอยู่มากมายภายในเซลล์ การเจริญเติบโตรวดเร็ว แต่มีผนังเซลล์หนากว่า *Chlorella* sp. สายพันธุ์อื่นๆ (วินัย, 2535) *Chlorella* เป็นอาหารเสริมที่จำหน่ายมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สุดในประเทศญี่ปุ่น ประมาณถึงปีละ 1,000 ตัน มีจำหน่ายในรูปของเม็ดขนาดเล็ก ชนิดผง หรือชนิดน้ำ ซึ่งเรียกว่า CGF (Chlorella Growth Factor)

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

Chlorella sp. นิยมใช้เป็นอาหารของโรติเฟอร์ *Brachionus plicatilis* โรติเฟอร์ดังกล่าวโดยเฉพาะที่เลี้ยงด้วยเป็น *Chlorella* sp. จัดเป็นอาหารที่ดีของลูกกุ้ง (ธิดา และมาวิทย์, 2538) *Chlorella* sp. บางชนิดพบอยู่ในสิ่งมีชีวิตไม่มีกระดูกสันหลังเรียกว่า *Zoochlorella* โดยในพวก Ciliate นั้นจะมี *Chlorella* sp. อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Symbiotic form) เพื่อใช้ประโยชน์จากผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสง (Lund และLund, 1995) โดยการอาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันนี้ *Chlorella* sp. จะอาศัยอยู่ในแวคิวโอล และสังเคราะห์ด้วยแสงพร้อมทั้งปลดปล่อยน้ำตาลมอลโตสให้แก่เซลล์เจ้าบ้าน (Host) โดย *Chlorella* sp. นั้นจะอาศัยอยู่ในแวคิว-โอล ที่มีสภาพความเป็นกรดด่างต่ำ (Lee, 1999)

2.3 คลอโรฟิลล์จาก *Chlorella* sp.

Steenblock (2530) ได้กล่าวไว้ว่า นอกจาก *Chlorella* sp. จะมี CGF แล้ว ยังพบว่ามีคลอโรฟิลล์จำนวนต่อกรัมสูงกว่าพืชชนิดอื่นๆ คลอโรฟิลล์เป็นสารที่น่าสนใจเพราะสามารถนำมาใช้ในงานอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การใส่สีในเทียนไข ขี้ผึ้ง ยางสน ไขมัน น้ำมัน ขนมหวาน หมากฝรั่ง และใช้ประกอบในอาหารอีกหลายชนิด นอกจากนี้คลอโรฟิลล์ยังมีโครงสร้างเหมือนกับสารสีแดงในเลือด (Hemoglobin) นักวิทยาศาสตร์หลายคนจึงแนะนำให้ใช้คลอโรฟิลล์รักษาโรคโลหิตจาง (anemia) ในปี ค.ศ. 1995 Kephar ได้รายงานว่า ในการรักษาโรคโลหิตจาง ถ้าผู้ป่วยไม่ขาดธาตุเหล็กและทองแดงแล้ว การเพิ่มคลอโรฟิลล์จะไปช่วยกระตุ้นการสร้างสารสีแดงในเลือดได้ และยังมีงานวิจัยหลายเรื่องพิสูจน์ว่าคลอโรฟิลล์ หรือสารสกัดจากคลอโรฟิลล์มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและสัตว์ Gruskin ได้พบประโยชน์ของคลอโรฟิลล์ในการรักษามะเร็งชนิดที่มีแผลเน่าเปื่อย และมีกลิ่น พร้อมกับเสนอว่า "คลอโรฟิลล์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการต่อต้านแบคทีเรียหรือสารพิษให้กับสารย่อยโปรตีนของเนื้อเยื่อ" และในปี ค.ศ. 1944 Smith พบว่าคลอโรฟิลล์ชนิดน้ำมีคุณสมบัติในการต่อต้านแบคทีเรีย เขาสรุปว่า คลอโรฟิลล์สร้างสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียไม่ชอบอยู่แทนที่จะทำลายแบคทีเรียโดยตรง ดังนั้นแบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนจึงหยุดการเจริญเติบโต การใช้คลอโรฟิลล์กำจัดกลิ่น รู้จักกันดีในกลุ่มคนทำงานในสถานพยาบาล การกำจัดกลิ่นให้ผลดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับสภาพความสมดุลของกรดด่าง (pH) ของสารสกัดนั้น พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอโรฟิลล์จะแสดงคุณสมบัติต่อด้านแบคทีเรียหรือกำจัดกลิ่นได้ดี เมื่อมีฤทธิ์เป็นกลางหรือมีฤทธิ์เป็นด่าง โดยมีค่าความเป็นกรดด่างสูงสุดระหว่าง 8-10.5

2.4 องค์ประกอบทางเคมีของ *Chlorella* sp.

โปรตีนในคลอเรลลาประกอบด้วยกรดอะมิโน (ตารางที่ 2.1) ซึ่งเป็นที่รู้กันดีว่ามีประโยชน์ทางโภชนาการซึ่งมีประมาณร้อยละ 60 (ตารางที่ 2.2) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ได้จากสัตว์จะพบว่า โปรตีนในคลอเรลลามีสาร methionine น้อยกว่า แต่ในผู้ป่วยบางราย (เช่น มะเร็ง) กลับเป็นผลดี เพราะมะเร็งจะเจริญเติบโตได้ดีด้วยสาร methionine นอกจากนี้ ในคลอเรลลายังพบวิตามินแร่ธาตุต่างๆ (ตารางที่ 2.3 และ 2.4) อีกมากมาย ดังนั้นคลอเรลลาจึงเหมาะสำหรับเป็นแหล่งอาหาร (Steenblock, 2530)

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณกรดอะมิโน (w/w %) (http://ind.ntou.edu.tw/~b0232/chlorella.htm)

กรดอะมิโน	เปอร์เซ็นต์	กรดอะมิโน	เปอร์เซ็นต์
Glutamic acid	5.8	Proline	2.5
Aspartic acid	4.7	Threonine*	2.4
Leucine*	4.7	Isoleucine*	2.3
Alanine	4.3	Serine	2.0
Arginine	3.3	Methionine*	1.3
Valine*	3.2	Histidine	1.1
Glycine	3.1	Tryptophan*	0.5
Phenylalanine*	2.8	Others	11.4

* กรดอะมิโนที่จำเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบทางโภชนาการ (วิสัย, 2534)

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

ตารางที่ 2.3 แสดงปริมาณวิตามิน (http://ind.ntou.edu.tw/~b0232/chlorella.htm)

วิตามิน	มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม	วิตามิน	มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม
เอ	51,300 ไอยู	อี	น้อยกว่า 1.5
อินโนซิทอล	132	บี6	1.4
ไนอะซิน	23.8	กรดเพนโททินิก	1.1
ซี	10.4	ไบโอติน	0.2
บี2	4.3	บี12	0.13
บี1	1.7	กรดโฟลิก	0.09

ตารางที่ 2.4 แสดงปริมาณแร่ธาตุ (http://ind.ntou.edu.tw/~b0232/chlorella.htm)

แหล่ง	มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม
ฟอสฟอรัส	895
แมกนีเซียม	315
แคลเซียม	221
เหล็ก	130
สังกะสี	71
ไอโอดีน	0.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ในประเทศไทย

ประเทศไทยมีสภาพอากาศอบอุ่นถึงร้อน มีแสงแดดสม่ำเสมอเหมาะแก่การขยายพันธุ์แพลงก์-ตอนพืชหลายชนิด แพลงก์ตอนพืชที่นิยมเพาะขยายพันธุ์ได้แก่ สาหร่าย *Chlorella* sp., *Tetraelmis* sp., *Chaetoceros* sp., *Sketelonema* sp., *Isochrysis* sp.ซึ่งการเลี้ยงส่วนใหญ่ มีจุดประสงค์เพื่อใช้เป็นอาหารของลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน เช่น ปลากะพงขาว กุ้งทะเล ปะการัง เป็นต้น การเพาะเลี้ยงแพลงก์-ตอนพืชมีขั้นตอนที่สำคัญต่างๆ เริ่มจากการรวบรวมพันธุ์จากธรรมชาตินำมาคัดแยกสายพันธุ์ และขยายพันธุ์ให้ได้มากๆ ในบ่อเพาะเลี้ยงกลางแจ้ง แพลงก์ตอนที่มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นอาหารกันมากคือ สาหร่าย *Chlorella* sp. แต่การเพาะเลี้ยงยังประสบปัญหาหลายประการ เช่น การปนเปื้อนของโปรโตซัว การใช้สูตรอาหารที่ไม่เหมาะสม ทำให้ปริมาณของ *Chlorella* sp. ที่เพาะเลี้ยงได้มีปริมาณที่ต่ำ

ภาณุ และคณะ (2530) ได้รายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. โดยใช้ปุ๋ยสูตรต่างๆ ที่สถานีพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลา จังหวัดปทุมธานี ว่าการใส่ปุ๋ยอนินทรีย์ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์จะให้ผลดีกว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์ หรือปุ๋ยอนินทรีย์เพียงอย่างเดียว และการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ควรทำการย่อยสลายปุ๋ย และฆ่าเชื้อเสียก่อนเพื่อทำให้สาหร่าย *Chlorella* sp. ใช้อาหารได้ดีขึ้น และเป็นการกำจัดสิ่งที่จะทำลายหรือกินสาหร่าย *Chlorella* sp. โดยตรง

2.6 ประโยชน์ของสาหร่าย *Chlorella* sp.

1. ใช้เป็นอาหารเสริมของมนุษย์และสัตว์

Chlorella sp. มีหลายชนิดมีทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม *Chlorella* น้ำจืดได้ถูกผลิตขึ้นเพื่อเป็นอาหารเสริมที่ช่วยให้สุขภาพของคน และสัตว์ดีขึ้น เพราะมีโปรตีนสูงเป็นแหล่งวิตามินที่ดีมีสารช่วยเร่งการเจริญเติบโต (กาญจนภาชน์, 2527) ประเทศเยอรมันตะวันตกใช้ *Chlorella* sp. เป็นอาหารคน และสัตว์ และพบว่ามีโปรตีนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งซึ่งน้อยกว่าโปรตีนในไข่ และนม แต่มากกว่าโปรตีนในข้าวโพด และข้าวสาลี (สิริรัตน์, 2525)

Hansakul (1991) พบว่า *Chlorella* sp. มีประโยชน์หลายอย่าง อาทิเช่น ช่วยทำให้การขับถ่ายดีขึ้นเป็นอาหารเสริมให้กับผู้หญิงตั้งครรภ์ ป้องกันการเป็นไข้หวัด ช่วยทำลายสารพิษกระตุ้นการเจริญเติบโตของเด็ก ช่วยให้ร่างกายฟื้นฟูได้รวดเร็วขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

การเลี้ยง *Chlorella* sp. ร่วมกับแบคทีเรียแบบพึ่งพา (symbiosis) ในน้ำโสโครก สามารถทำให้น้ำมีคุณภาพดีขึ้น และนำกลับมาใช้ได้อีก หรือสามารถปล่อยน้ำทิ้งลงแม่น้ำลำคลองได้โดยไม่ทำให้เกิดผลเสียต่อสภาวะแวดล้อม (วิภา, 2507)

ในปี พ.ศ.2525 มีรายงานว่า *Chlorella* ช่วยกำจัดสารประกอบแอมโมเนีย ซึ่งเป็นของเสียในบ่อปลาโดยทำการเพาะเลี้ยง *Chlorella* เพื่อถ่ายลงในบ่อเลี้ยงปลา เปรียบเทียบคุณภาพน้ำในบ่อที่ใส่ และไม่ใส่ พบว่าน้ำในบ่อที่ใส่ *Chlorella* มีสมบัติทั่วไปทางกายภาพดีกว่า จากนั้นเมื่อนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี พบว่าสารประกอบแอมโมเนียไนโตรเจนซึ่งเป็นของเสียในบ่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนเตรตโดยสมบูรณ์ และไม่พบว่ามีไนไตรต์เหลืออยู่ (สิริรัตน์, 2525)

3. ใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์

ในด้านการแพทย์ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella pyrenoidosa* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบได้คือ *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Bacillus subtilis, Bacterium coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Pratt และคณะ, 1944) จากการค้นคว้าของ Jergensen ในปี ค.ศ. 1962 พบว่าสารสกัดด้วยอีเทอร์ และเอทานอลจาก *Chlorella* สามารถยับยั้งขอบเขตของการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ได้ การค้นพบผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ (Natural product) ประเภท Peroxy ในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ซึ่งเป็นสาร Steroidal endoperoxides ที่พบว่ามีการยับยั้งของการชักนำให้เกิดการอักเสบ และส่งเสริมการเกิดเนื้องอกในหนูทดลอง (Casteel, 1999) มีการศึกษาวิจัยพบว่า ในหนูที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Murine acquired immunodeficiency syndrome : MAIDS) และติดเชื้อ *Listeria monocytogenes* (เชื้อฉวยโอกาส) เมื่อให้สารสกัดจาก *Chlorella* (CGF) พบว่า มีประสิทธิภาพในการช่วยกำจัดเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้ดีที่สุด (Hasagawa, Okuda และ Makino, 1995)

Steenblock (2530) กล่าวถึงประโยชน์ของ *Chlorella* sp. คือ *Chlorella* sp. ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโรคโดยการฉีดคลอเรลแลน (Chlorellan) แล้วพบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดสารคาร์บอนดีกว่าเม็ดเลือดขาวธรรมดา ส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาร์ไรด์จากผนังเซลล์ของ *Chlorella* sp. ทำปฏิกิริยากับมะเร็งโดยไปกระตุ้นการผลิต Interferon และลดจำนวนเซลล์กำจัด เพิ่มเซลล์ช่วยในผู้ป่วยโรคมะเร็ง *Chlorella* sp. ช่วยในการกำจัดสารพิษ เช่น แคดเมียม และการป้องกันการเมาค้าง โดยช่วยทำให้ดับขจัดแอลกอฮอล์ออกจากร่างกาย อีกทั้งยังช่วยปรับภาวะเป็นพิษของลำไส้ให้เป็นปกติ

Lee และ Rosenbaum (1987) กล่าวถึงประโยชน์ของ *Chlorella* sp. คือ เพิ่มความแข็งแรงให้กับระบบภูมิคุ้มกันโรค เร่งการหายของแผล ทั้งแผลที่เกิดจากการบาดเจ็บและแผลเรื้อรัง (Ulcers) ช่วยปกป้องเราจากสารพิษ และมลภาวะช่วยให้ระบบการย่อยอาหารเป็นปกติและช่วยใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การขับถ่ายอุจจาระกระตุ้นการเจริญเติบโตของร่างกาย และทดแทนซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสื่อมสลายชะลอความชรา และปกป้องเราจากกัมมันตภาพรังสีทั้งหลาย และได้รายงานว่ามีการศึกษาการใช้สาหร่าย *Chlorella* sp. เพื่อป้องกันโรคไข้หวัดในประเทศญี่ปุ่น ในปี 1971 โดยการทดลองกับกะลาสีเรือญี่ปุ่นจำนวน 1,000 คนซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกจะได้รับประทานสาหร่าย *Chlorella* sp. อัดเม็ด (รูปที่ 2.3) วันละ 2 กรัมต่อวัน (10 เม็ด) ส่วนกลุ่มที่สองไม่ได้รับประทานสาหร่าย *Chlorella* sp. อัดเม็ด เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน พบว่ากลุ่มกะลาสีเรือที่ไม่ได้รับประทานสาหร่าย *Chlorella* sp. อัดเม็ดจะเป็นไข้หวัดมากกว่ากะลาสีกลุ่มที่ได้รับสาหร่าย *Chlorella* sp. อัดเม็ดถึงร้อยละ 41 และในปี 1973 ประเทศญี่ปุ่นได้ศึกษาพบว่าเส้นใยจากผนังเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella* sp.มีประสิทธิภาพในการดูดซับโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว แคดเมียม เมื่อรับประทานสาหร่าย *Chlorella* sp.โลหะหนักที่มีอยู่ในร่างกายจะถูกกำจัดออกมาทางปัสสาวะ และอุจจาระ นอกจากนี้คลอโรฟิลล์ของ *Chlorella* sp. จะช่วยเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างวิตามินบีในลำไส้ซึ่งจะช่วยให้การเคลื่อนตัวของลำไส้ดีขึ้นจึงมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคท้องผูก

รูปที่ 2.3 เซลล์สาหร่าย *Chlorella* อัดเม็ด
ที่มา : http://www.chlorella-alg.com

4. ใช้ประโยชน์ในการผลิตเชื้อเพลิง

เนื่องจากปัญหาการประสบกับสภาวะขาดแคลนแหล่งเชื้อเพลิง จึงได้มีการศึกษาพัฒนานำไขมันที่มีอยู่ในสาหร่ายมาใช้ในรูปน้ำมันเชื้อเพลิง (fuel oil) เพื่อทดแทนการใช้น้ำมันปิโตรเลียมซึ่งนับวันจะหมดไป (ปาจารีย์ และคณะ, 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ใช้ในการศึกษาวิจัย

มีการใช้สาหร่ายน้ำจืดหลายชนิดมาใช้ในการศึกษา เช่น สาหร่าย *Chlorella* sp. ในการศึกษากระบวนการสังเคราะห์แสง และกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีภายในเซลล์ (metabolism) (ปาจารีย์ และคณะ, 2539)

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย

วิภา (2507) พบว่าการเลี้ยง *Chlorella* sp. ในห้องปฏิบัติการในสภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวชนิดนี้ให้เดิบโตได้ดี 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

การได้รับแสงในปริมาณมากเกินไปจะทำให้รงควัตถุถูกทำลาย สาหร่ายจะมีสีซีดจางและตายในที่สุด หลังจากกระบวนการโฟโตออกซิเดชัน (หรือโฟโตลิซิส) โฟโตออกซิเดชันจะเกิดขึ้นหลังจากมีระยะแล็กเฟส และมีการลดลงของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงซึ่งเรียกช่วงนี้ว่า โฟโตอินฮิบิชัน

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

2.3 การให้อากาศ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อ *Chlorella* sp. มีการเพิ่มจำนวนจะมีการตกตะกอนทำให้สาหร่ายได้รับแสงไม่ทั่วถึง ดังนั้นจึงต้องมีการให้อากาศเพื่อช่วยให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้รับแสงอย่างทั่วถึงและยังเป็นการกระจายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำด้วย รวมทั้งเป็นการทำให้ก๊าซออกซิเจนกลับสู่บรรยากาศได้เร็วขึ้น

2.4 ความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมีผลทั้งทางตรง และทางอ้อมต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของสาหร่าย 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) ซึ่งมีประโยชน์ คือ เป็นสาร Anti-human immunodeficiency virus (HIV) ซึ่งสามารถแยกได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Nostoc ellipsosporum* (O'Keefe, 2001) นอกจากนี้เอกสารของ Lima-Filho และคณะ (2002) ศึกษาวิจัยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสาหร่ายขนาดใหญ่ 6 ชนิด ที่เก็บจากชายฝั่งทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล พบว่าสารสกัดที่สกัดจาก *Amasia multifida* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่อยู่ในดิวิชั่นโรโดไฟร์ต้า ที่ใช้เฮกเซนเป็นตัวสกัดให้ผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi, Salmonella choleraesuis, Serratia marcescens, Vibrio cholerae* และแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*

พงศ์ธร และคณะ (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 เพื่อทำการทดสอบ พบว่า สารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus pyogenes* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 29.1 มิลลิเมตร

ชลธิชา และชัยสิทธิ์ (2545) สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ทำโดยวิธีสกัดแบบลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลายโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ตามลำดับ เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สกัดโดยวิธีทำให้เซลล์สาหร่ายแตก จากนั้นใช้ตัวทำละลายดังกล่าวและเซลล์สาหร่าย ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยเทียบเป็นมิลลิลิตรของสารละลายต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งมาสกัด ซึ่งจะใช้เวลา 48 ชั่วโมงในการสกัดแต่ละตัวทำละลาย แล้วนำแต่ละชั้นของตัวทำละลายมาทำให้แห้ง จากนั้นจึงนำสารสกัดแต่ละชั้นมาทำละลายในเมทานอล เพื่อทำการทดสอบ พบว่าสารสกัดจาก *Chlorella ellipsoidea* TISTR 8260 ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อแผ่นทดสอบ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 24.93 มิลลิเมตร

Xu และคณะ (2003) ทำการสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสาหร่ายสีแดง *Rhodomela confervoides* โดยนำมาผึ่งให้แห้งจากนั้นทำหมักด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน สารสกัดเมทาโนอิกที่ได้ นำมากรอง และระเหยแห้งภายใต้สภาวะลดความดันเมื่อแห้งนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ จากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต แล้วนำไปใส่ใน ซิลิกาเจลคอลัมน์แล้วฉีด สารผสมของคลอโรฟอร์ม-เมทานอลเพื่อเป็นตัวชะล้าง 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 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่จำแนกได้จากคลินิก คือ *Staphylococcus aureus* 02-60, *Staphylococcus epidermidis* 02-04, *Escherichia coli* 02-26, *Pseudomonas aeruginosa* 02-29

Bansemir 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*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจาก *Chlorella* sp.

แบคทีเรียแกรมลบ

Escherichia coli

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พวก Facultative รูปร่างท่อน (รูปที่ 2.4) บางครั้งเห็นแคปซูลบางๆ ลักษณะเป็นวงใสรอบตัว แต่อัตราที่พบแคปซูลน้อย และแตกต่างจาก *Klebsiella* ซึ่งมีแคปซูลหนาชัดเจน (โสภณ, 2524) ไม่สร้างสปอร์อาจเคลื่อนที่ได้หรือไม่เคลื่อนที่ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในลำไส้ใหญ่ หรือในอุจจาระของคน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด ทั้งยังเป็นแบคทีเรียที่อยู่ตามปกติในร่างกายส่วนนี้ด้วย ถ้ามีการตรวจพบเชื้อ *E. coli* ในที่อื่น เช่น น้ำใช้อาหาร เครื่องดื่ม เป็นต้น แสดงว่า มีอุจจาระปนเปื้อน

รูปที่ 2.4 เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli*

ที่มา : http://www.biocrawler.com/encyclopedia/Bacterium

การก่อให้เกิดโรคในคน แบ่งออกได้ตามระบบที่พบบ่อยดังนี้

1. โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะเชื้อ *E. coli* พบบ่อยที่สุดในโรคติดเชื้อของระบบนี้ เช่น กระเพาะปัสสาวะอักเสบ (Cystitis) กรวยไตอักเสบ (Pyelonephritis) กรวยไตและไตอักเสบ (Acute Glomerulonephritis) นิ่วในไตหรือในหลอดไต (Asymptomatic bacteriuria) ในหญิงมีครรภ์ รวมทั้งโรคติดเชื้อที่เกิดในโรงพยาบาลจากการสวนคาหลอดปัสสาวะ ทางที่เชื้อเข้าไปก่อโรคส่วนมากโดยการลามขึ้น (ascending route) โดยเฉพาะในสตรี ซึ่งบริเวณช่องคลอดตามปกติจะพบโคลิฟอร์มบาซิลลัสอยู่เป็นจำนวนมาก อีกทางหนึ่งเชื้อจากลำไส้เข้าสู่กระแสเลือด หรือหลอดน้ำเหลืองสู่ไต

2. การก่อโรคทั่วไป (นอกระบบทางเดินอาหาร-ปัสสาวะ) *E. coli* เมื่ออยู่ผิดที่ (นอกระบบทางเดินอาหาร) ถ้าเข้าสู่ส่วนอื่นของร่างกายก็สามารถก่อโรคได้ ที่ตำแหน่งหรืออวัยวะต่างๆ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บาดแผล แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก แผลผ่าตัด ทางน้ำดี ถุงน้ำดี ดับ ช่องท้อง มดลูก ปอด เยื่อหุ้มสมอง กระแสเลือด เป็นต้น

3. โรคท้องร่วง เป็นกลุ่มอาการ ที่มีสาเหตุกว้างขวาง โดยมีอาการถ่ายเป็นน้ำ หรือถ่ายเหลวบ่อยครั้ง และมักพบอาการเป็นไข้และอาเจียนร่วมด้วย อาการอุจจาระร่วงมักเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ไวรัสและปรสิต ที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้แก่ อหิวาตกโรค (Cholera), บิดไม่มีตัว (Shigellosis), Salmonellosis, Yersiniosis, บิดมีตัว (Amebiasis), Giardiasis, Campylobacteriosis และ Viral gastroenteropathy

นอกจากนี้กลุ่มอาการอุจจาระร่วงอาจเกิดจากการดิดเชื้อในกลุ่มเชื้อ non-01 *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus* รวมทั้งการเกิดอาการร่วมกับมาลาเรีย หัด และจากสารพิษ

เชื้อ *E. coli* หลายสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอุจจาระร่วงจำแนกได้ 5 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีลักษณะที่แตกต่างกันในด้านพยาธิสภาพการเกิดโรคคุณสมบัติเฉพาะด้านความรุนแรงของเชื้อ และลักษณะพิเศษตาม O : H Serotypes ในบางกรณีอาจมีความแตกต่างในกลุ่มอาการคลินิคและลักษณะทางระบาดวิทยา โดยแบ่งได้ดังนี้ (http://www.thailabonline.com/sec51ecoli.htm)

อุจจาระร่วงจากสายพันธุ์ Enterotoxigenic (ETEC)

ลักษณะโรค พบว่าเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดอุจจาระร่วง สายพันธุ์นี้ทำให้มีอาการอุจจาระร่วงเป็นน้ำ โดยไม่พบมูกเลือดเช่นเดียวกับ *Vibrio cholerae* อาจมีอาการ อาเจียน ปวดท้อง เหงื่อออกมาก และอาการขาดน้ำได้ แต่อาจไม่มีไข้ ทั้งนี้อาการต่างๆ ที่ปรากฏ จะเกิดอยู่ประมาณ 3-5 วัน โดย ETEC สามารถสร้างสารพิษได้ทั้งสองประเภทคือ heat labile และ heat-stable หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง ที่พบได้บ่อยๆ เป็น O serogroups ได้แก่ O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O114, O115, O128ac, O148, O153, O159, และ O167 การแพร่เชื้อเกิดจากอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ หรือจากน้ำแต่พบได้น้อยกว่า โดยเฉพาะอาหารสำหรับเด็ก ระยะฟักตัว อาจสั้นมากระหว่าง 10-20 ชั่วโมง ที่เกิดจากเชื้อเฉพาะที่สร้างพิษประเภทใดประเภทหนึ่ง ส่วนสายพันธุ์ที่สร้างพิษ 2 ประเภท มีระยะฟักตัวมากกว่าคือ ระหว่าง 24-72 ชั่วโมง การควบคุมโรค สามารถทำได้โดยการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและการล้างทำความสะอาด (สามารถลดปริมาณของเชื้อ *E. coli* และจุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆ ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ได้ทำลายเชื้อ) ถ้าล้างด้วยน้ำ Chorinated อาจขจัดเชื้อได้ถึง 90-99 เปอร์เซ็นต์

อุจจาระร่วงจากสายพันธุ์ Enteroinvasive (EIEC)

ลักษณะโรค พยาธิสภาพการเกิดโรคจากสายพันธุ์นี้ จะเกิดที่ลำไส้ชั้น mucosa และ submucosa มีลักษณะคล้ายคลึงกับที่เกิดจากเชื้อ *Shigella* โดยที่เชื้อนี้มีคุณสมบัติในการบุกเข้าไปในเซลล์เยื่อบุ พร้อมทั้งแบ่งตัวได้ อาการทางคลินิคมีลักษณะแบบโรคบิด (dysentery) และ O-antigen ของ EIEC จะสามารถทำปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ได้กับ O antigen ของเชื้อ *Shigella* อาการเจ็บป่วยจะเริ่มจากอาการปวดบิดในท้อง ถ่ายเป็นน้ำ ปวดเบ่ง ไข้ ต่อมาจะเริ่มถ่ายอุจจาระบ่อย มีลักษณะเป็นมูกปนเลือดครั้งละน้อยๆ EIEC อาจวินิจฉัยหรือสงสัยได้ในอุจจาระ ผู้ป่วยที่ถ่ายเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
72591

มูก และมีเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก สายพันธุ์ต่างๆ ของ *E. coli* ที่แสดงคุณสมบัติรุกล้ำเข้าเซลล์ ที่พบบ่อยๆ จาก O Serogroup ได้แก่ O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 และ O167 ระยะฟักตัว อาจมีระยะสั้นเพียง 10 ชั่วโมง ในกลุ่มอาสาสมัครหรือเพียง 18 ชั่วโมง เมื่อมีการระบาด การควบคุมโรค เช่นเดียวกับ ETEC สำหรับผู้ป่วยที่อาจพบว่ามีอาการอุจจาระร่วงรุนแรงด้วยเชื้อกลุ่มนี้ อาจพิจารณาให้ ampicillin (50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน) ชนิดกินหรือฉีด แล้วแต่กรณี

อุจจาระร่วงจากสายพันธุ์ Enteropathogenic (EPEC)

เป็นเชื้อกลุ่มที่เก่าแก่ที่สุดในกลุ่ม *E. coli* ส่วนใหญ่โรคอุจจาระร่วงกลุ่มนี้มักเกิดในเด็กอายุต่ำกว่า 1 ขวบ โดยมักมีอาการถ่ายเป็นน้ำ มีมูก ไข้ และเกิดอาการขาดน้ำ EPEC สามารถทำให้ microvilli หลุดลอกจากเซลล์ลำไส้ได้อาการท้องร่วงในเด็กเล็กอาจรุนแรง และเป็นได้นาน จนอาจชีวิตได้ง่าย เชื้อก่อโรคมีหลาย O serogroup แต่ที่สำคัญมักเป็น O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128ab และ O142 ระยะฟักตัว มีช่วงเวลาสั้นมากเพียง 9-12 ชั่วโมง

อุจจาระร่วงจากสายพันธุ์ Enterohemorrhagic (EHEC)

เชื้อ *E. coli* กลุ่มนี้พบว่าเป็นสาเหตุการระบาดของ hemorrhagic colitis ในหลายรัฐของอเมริกา อุจจาระมีลักษณะเป็นเลือดชัดเจนแต่ไม่พบเม็ดเลือดขาวในอุจจาระผู้ป่วย นอกจากนี้ยังเกิด hemorrhagic-uremic Syndrome ได้ ทั้งนี้เชื้อนี้สามารถสร้าง Shiga-like toxin ที่คล้ายคลึงกับ toxin ของ *S. dysenteriae* 1 เรียกว่า V erotoxin I และ II โดยที่คุณสมบัติในการสร้างสารพิษจำเป็นต้องมี Phages บางอย่างอยู่ด้วย นอกจากนั้น EHEC ยังมี plasmid ที่ช่วยกำหนดการสร้าง fimbria ใหม่ที่เกาะติดผนังลำไส้ได้ serotype ส่วนใหญ่ที่เป็นสาเหตุ ได้แก่ O157 : H7 และอาจมีบาง serotype ที่ตรวจพบได้เช่น O26 : H11 และ O111 : H8ระยะฟักตัว อยู่ในช่วงระหว่าง 12-60 ชั่วโมง

อุจจาระร่วงจากสายพันธุ์ Enteroaggregative (EaggEC)

อุจจาระร่วงจากเชื้อกลุ่มนี้ยังถือว่าไม่ค่อยชัดเจนนัก หลักฐานเบื้องต้นพบว่าบางสายพันธุ์ทำให้เกิดอุจจาระร่วงยืดเยื้อ (persistent diarrhea) อย่างไรก็ตาม เชื้อ EaggEc ถือได้ว่าเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคอุจจาระร่วงในเด็กขวบปีแรกในบางพื้นที่ของโลก รวมทั้งเป็นสาเหตุอุจจาระร่วงยืดเยื้อด้วย ส่วนระยะฟักตัวอยู่ในช่วงประมาณ 20-48 ชั่วโมง

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ สามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน แต่ที่นิยมที่สุดคือ การเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่าง เชื้อ *E. coli* ไม่หมักย่อยน้ำตาลซิบิทอลภายใน 18-24 ชั่วโมง แต่มากกว่าร้อยละ 80 ของ *E. coli* หมักย่อยน้ำตาลซอบิทอลจึงนิยมใช้ Sorbitol Mac-conkey agar (SMAC) Mac-conkey agar base เป็น differential medium สำหรับแยกเชื้อ *E. coli* หรืออาจใช้ SMAC ที่ผสม potassium tellurite และ cefixime (CT-SMAC) ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ย่อยสลายน้ำตาลซอบิทอลช่วยเพิ่มอัตราการพบเชื้อ *E. coli* (อรอนงค์, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pseudomonas aeruginosa

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน (รูปที่ 2.5) เป็นเชื้อที่ฉวยโอกาสในคน บางชนิดทำให้เกิดโรคกับพืช สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีอากาศ บางชนิดเลี้ยงแบบไม่ใช้อากาศโดยใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (นงลักษณ์ และปรีชา, 2544) ในอาหารที่มีน้ำตาลจะสร้างกรดได้น้อย และการสร้างกรดจากน้ำตาลไม่เป็นประโยชน์ในการแยกชนิด เช่น *P. aeruginosa* ให้รงควัตถุสีฟ้าไพโอไซแอนิน (pyocyanin) และไพโอเวอดิน (pyoverdin) ซึ่งเป็นรงควัตถุฟลูออเรสเซนต์ที่ละลายน้ำ พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ หรือที่ๆมีความชื้น การก่อให้เกิดโรคจะพบในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยจะติดเชื้อที่ทางเดินของปอด ทางเดินปัสสาวะ แผลไฟไหม้-น้ำร้อนลวก แผลผ่าตัด และยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด โรคพังพืดในปอด (cystic fibrosis) เกิดจาก *P. aeruginosa* ที่ติดเชื้อในปอด โรคผิวหนังอักเสบ (Dermatitis) ระยะฟักตัว ใช้เวลา 24-72 ชั่วโมง

รูปที่ 2.5 เซลล์แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*
ที่มา : http://de.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas

แบคทีเรียแกรมบวก

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน Familly Micrococcaceae แกรมบวก รูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 0.5-1.5 ไมโครเมตร ถ้าตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อาจพบอยู่เป็นคู่ สายสั้น หรือเกาะกลุ่มกันคล้ายพวงองุ่น (รูปที่ 2.6) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ สร้างแคปซูลในช่วงที่ยังอ่อนอยู่ แต่เมื่ออยู่ในระยะ stationary phase แคปซูลจะหายไป เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobe) หรือเจริญได้ทั้งสภาพที่มี และไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) มีเมแทบอลิซึมของการหมักและการหายใจ สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ บางสายพันธุ์ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกบน horse blood agar หมักแมนนิทอลได้ในสภาพไร้อากาศ ต้องการกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน ต้องการไทอะมีน (thiamine) และกรดนิโคตินิก (nicotinic acid) เมื่อเจริญในสภาพไร้อากาศต้องการยูราซิล (uracil) เชื้อชนิดนี้เจริญได้ที่อุณหภูมิในช่วง 7-47.8 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 4.5-9.3 ช่วงที่เหมาะสม

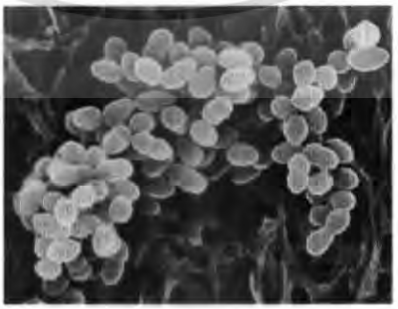
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็น 7.0-7.5 ลักษณะเด่นของพวก staphylococci คือ สามารถเจริญได้ในสภาพที่มี a_w (water activity) ต่ำกว่าสภาพ a_w ที่พวกแบคทีเรียไม่ชอบความเค็มจะเจริญได้ เชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่ทนเกลือและน้ำตาลได้สูง สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีค่า a_w เท่ากับ 0.83-มากกว่า 0.99 เชื้อ *S. aureus* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษที่ทนความร้อนสูง ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่รุนแรง (FDA, 2001)

เชื้อ *S. aureus* ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนและสารทำความสะอาดเกือบทุกชนิด ดังนั้นการตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ หรือสารพิษของแบคทีเรียชนิดนี้ในอาหารแปรรูปหรือบนอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารชี้ให้เห็นถึงสุขลักษณะการผลิตที่ไม่ดี (Bennett, 2001) เนื่องด้วย *Staphylococcus* บางสายพันธุ์สามารถเจริญและผลิตเอนเทอโรทอกซินในอาหาร ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ (ไพโรจน์, 2545) การปนเปื้อนของ *S. aureus* ในอาหารโดยทั่วไปมักมีสาเหตุมาจากการสัมผัสของคน (Bennett, 2001) โรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Staphylococcus* มีชื่อเรียก คือ Stapyhloenterotoxicosis ,Staphylorenterotoxemia (ศิวาพร, 2542) ลักษณะอาการที่บ่งบอกว่าติดเชื้อ *S. aureus* นั้นจะแสดงให้เห็นอย่างรวดเร็ว และรุนแรงในหลายๆกรณี โดยทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานสารพิษของร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร และปริมาณสารพิษที่สร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกายโดยทั่วไปของผู้ที่ได้รับเชื้อด้วย อาการทั่วไปที่พบคือ มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้อง และอ่อนเพลีย บางรายอาจมีอาการอื่นแทรกซ้อน หลายรายจะมีอาการปวดหัว เป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะๆ รวมทั้งอาจมีการเต้นของชีพจรผิดปกติซึ่งโดยทั่วไปอาการจะดีขึ้นภายใน 2-3 วัน (http://www.techno.msu.ac.th/fn/eccnter/pathogens/staphylococcus_aureus.htm)

การควบคุมป้องกัน (ศิวาพร, 2542)

1. รับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ๆ
2. นำอาหารที่ปรุงสำเร็จแล้วไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำเพียงพออย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อหากยังไม่รับประทานในทันที
3. อุ่นอาหารให้ร้อนก่อนรับประทานทุกครั้ง



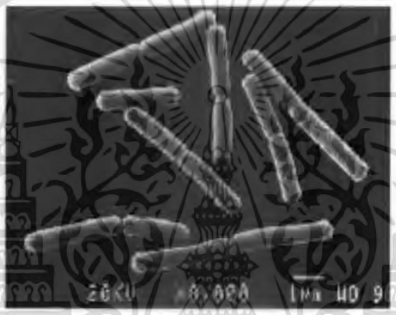
รูปที่ 2.6 เซลล์แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

ที่มา : http://www.zdravljeizivot.com/hrv/index.php?k=saznajte&s=kolostrum3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน (รูปที่ 2.7) มีการเจริญแบบใช้อากาศ (aerobe) สามารถเคลื่อนที่ได้คะตะเลสให้ผลบวก เป็นเชื้อที่สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ มีเอนโดสปอร์ที่ทนความร้อน พบในธรรมชาติทั่วไป สร้างเอกโซเอนไซม์ที่ย่อยแป้งและเคซีน (นงลักษณ์ และปรีชา, 2544) อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญอยู่ในช่วง 25-43 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5-8.5 สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth หรือ Nutrient agar ในการเจริญเติบโต *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อที่ไม่พบว่าก่อให้เกิดโรคกับคน แต่สามารถปนเปื้อนในอาหารและเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในผู้ป่วยบางรายสปอร์ของเชื้อนี้ยังสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิสูง (http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis#Pathogenesis)



รูปที่ 2.7 เซลล์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

ที่มา : http://www.foodnews.ch/faq/20_glossar/Begriffsglossar_B.html

Micrococcus luteus

Micrococcus luteus เป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน Family Micrococcaceae แกรมบวก รูปร่างกลม (รูปที่ 2.8) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-3.5 ไมโครเมตร มีการเจริญโดยใช้อากาศ (aerobe) สามารถรีดิวซ์ไนเตรท และออกซิไดส์คาร์โบไฮเดรตได้คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ไม่สามารถผลิตกรดจากกลูโคส อาร์จินีน หรือเบต้า-กาแลคโตซิเดส *Micrococcus* sp. บางชนิดผลิตเม็ดสีได้ เช่น *M. luteus* ทำให้โคโลนีมีสีเหลือง เป็นต้น (Smith, 1999) พบได้ทั่วไปในดิน ฝุ่นละออง น้ำและอากาศ และยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบในผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ยังพบที่บริเวณปาก ช่องปากและคอ และทางเดินหายใจส่วนบน แม้ว่า *M. luteus* จะไม่ทำให้เกิดโรคก็ตาม แต่มักจะพบในส่วนของการปนเปื้อน โดยพิจารณาจากการติดเชื้อในโรงพยาบาลของคนไข้ที่มีภูมิต้านทานเชื้อโรคของร่างกายผิดปกติ (http://en.wikipedia.org/wiki/ Micrococcus_luteus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

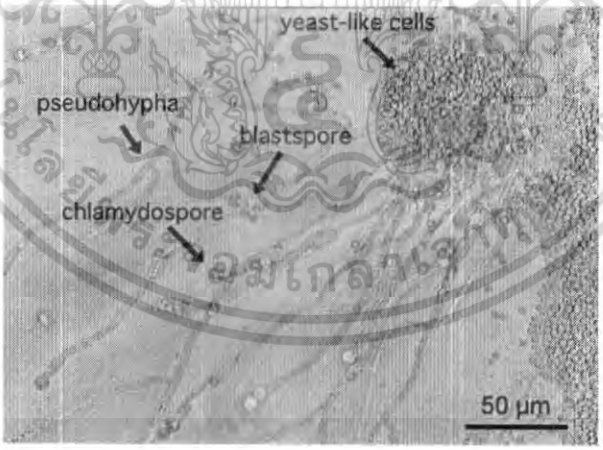
รูปที่ 2.8 เซลล์แบคทีเรีย *Micrococcus luteus*

ที่มา : http://biyolojiegitim.yyu.edu.tr/k/Microc/index.htm

เชื้อยีสต์

***Candida* sp.**

Candida sp. จัดอยู่ใน Division Deuteromycotina (Fungi Imperfecti) Class Blastomycetes Order Cryptococcales Family Cryptococcaceae Genus *Candida* มีระยะการเจริญเติบโตสร้างได้ทั้งแบบเส้นใยราแท้ (true mycelium) และเส้นใยราเทียม (pseudomycelium) และระยะที่มีการเจริญแบบเซลล์เดียวคล้ายยีสต์ เรียกว่า yeast-like phase บางครั้งยังพบการสร้าง Chlamydospore (รูปที่ 2.9) ด้วย (วิจัย, 2546)



รูปที่ 2.9 ลักษณะสปอร์ของ *Candida* sp.

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans

Candida sp. สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจนและที่มีออกซิเจนลดลง ถ้านำมาเลี้ยงในอาหาร Sabouraud's Dextrose โคโลนีที่ได้จะมีลักษณะกลมนูน ขาวขุ่นต่อไปจะมีสีครีมเมื่อมีอายุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากขึ้น ที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 2.10) (ศมนีย์, 2529) เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารพวก poor medium เช่น Corn meal agar (วิจัย, 2546) หรือ glutineous rice tween agar (ศมนีย์, 2529) ในระยะแรกจะมีการเจริญเป็นเส้นใย จากนั้นสร้าง blastospore bud ออกทางด้านข้างของเส้นใย (พรรณกร, 2535) สปอร์เหล่านี้สามารถแตกหน่อ (bud) ต่อไปเรื่อยๆ สร้างเส้นใยราเทียม ในอาหารที่มีการเลี้ยงเชื้อไว้หลายวัน จะเปลี่ยนเข้าสู่สภาพ yeast-like phase คือ มีการเจริญแบบ budding เท่านั้น ทั้งเส้นใย และ budding cell จะไม่มีสี (hyaline) (วิจัย, 2546) ซึ่งหน่อที่แตกออกมาจะมีรูปร่าง กลม รี หรือรูปร่างไข่ มีขนาดตั้งแต่ 2-5x3-14 ไมโครเมตร (ศมนีย์, 2529)

รูปที่ 2.10 การเจริญของ *Candida* sp. บนอาหาร Sabouraud's Dextrose
ที่มา : http://www.geocities.com/CapeCanaveral/3504/candida.htm

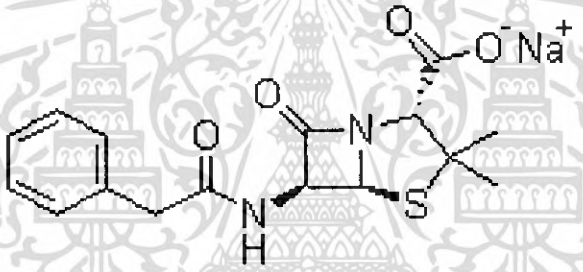
Candida albicans ที่แยกได้จากสัตว์เลือดอุ่น และคน เป็นเชื้อที่อยู่ตามเยื่อบุ (mucus membrane) บางครั้งเชื้อตัวนี้อาจทำให้เกิดโรค Candidiasis ในคน(นงลักษณ์ และปรีชา, 2544) มีอาการคัน ผื่นแดง ตุ่มนูน ตกสะเก็ด เป็นต้น (วิญญารัตน์, 2540) ซึ่งเกิดตามเยื่อบุในปาก ช่องคลอด ทางเดินอาหาร เชื้อที่ร้ายแรงขึ้นจะเกิดโรคในเยื่อบุหัวใจ ในเลือด และสมอง (นงลักษณ์ และปรีชา, 2544) เชื้อตัวนี้จะก่อโรคก็ต่อเมื่อมีปริมาณมากๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีความต้านทานต่ำ เช่น เด็กและคนชรา ผู้ป่วยมะเร็ง นอกจากนั้นการที่มีการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน เช่นในหญิงตั้งครรภ์ รวมทั้งผู้ป่วยที่ใช้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน โดยเชื้อ *Candida albicans* นั้นมี 2 ซีโรไทป์ คือ A และ B พบว่า ชนิด A สามารถก่อให้เกิดโรคในคนได้มากกว่าชนิด B (ศมนีย์, 2529)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

เพนนิซิลิน จี (Penicillin G)

เพนนิซิลิน จี (Penicillin G) หรือ Benzylpenicillin sodium salt เป็นเกลือโซเดียมของ (2*S*,5*R*,6*R*)-3,3-dimethyl-7-oxo-6-[(phenylacetyl)amino]-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid (BENPEN, 1999) (รูปที่ 2.11) โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 2 ส่วน คือ thiazolidine ring และ betalactam ring ทำปฏิกิริยารวมกันเป็นนิวเคลียสของเพนนิซิลิน เรียกว่า 6-aminopenicillanic acid (6-APA) ชนิดของ เพนนิซิลินจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับตำแหน่ง side chain ของ beta-lactam เช่น ถ้าตำแหน่ง side chain เป็น Benzyl group มีชื่อเรียกว่า penicillin G (สมใจ, 2547) มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$ น้ำหนักโมเลกุล 356.37 กรัมต่อโมล (Chemblink, 2007)



รูปที่ 2.11 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของเพนนิซิลิน จี

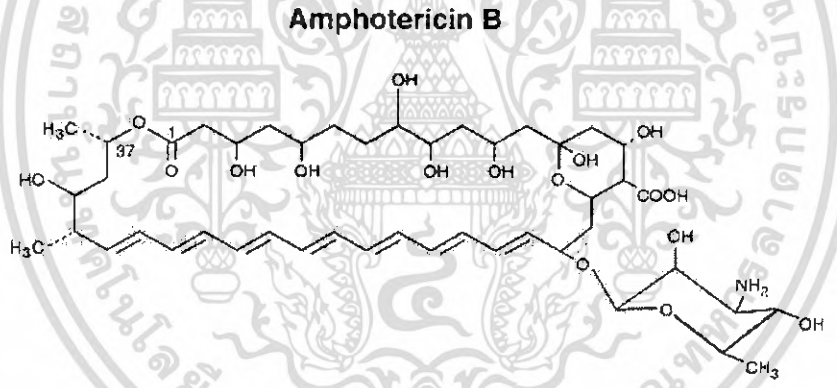
ที่มา : Chemblink, 2007

เพนนิซิลิน เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้กันมากที่สุดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยจะเปลี่ยนแปลงและขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ทำลายพวกเปปติโดกลัยแคน (Peptidoglycan) โดยเพนนิซิลินจะป้องกันการเกิด crosslink ของเปปติโดกลัยแคน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญ และทำให้ผนังเซลล์แข็งแรง ใช้ได้ผลดีกับในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เพราะแบคทีเรียแกรมลบจะมีพวกไลโปโพลีแซคคาไลด์ เป็นโครงสร้างผนังเซลล์ที่สำคัญ จึงทำให้ใช้รักษาการติดเชื้อที่เกิดจากแกรมบวกได้ผลดีกว่าแกรมลบ (สุรเกียรติ, 2544) นอกจากนี้ เพนนิซิลลินต่างๆยังทนต่อการดูดและย่อยสลายด้วยเอนไซม์บีต้า-แล็กแทมเมสต่างกันได้ จึงใช้ไม่ได้มีผลกับแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์นี้ (สุวณี และมาลัย, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B)

แอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B) (รูปที่ 2.12) เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มของ Polyene มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ผลิตได้จากเชื้อ *Streptomyces nodosus* มีกลไกการออกฤทธิ์ 2 อย่างคือ ยาจะแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา โดยจับกับ Ergosterol จากการใช้ส่วนที่เป็น lipophillic ของโมเลกุล ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนรูปร่าง มีผลต่อการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ยอมให้สาร และไอออนต่างๆ ผ่านเข้าเซลล์ได้มากกว่าปกติ ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ และทำให้เซลล์ดายในที่สุด อีกกลไกหนึ่งคือ ยาจับกับ Sterol เกิด auto-oxidation ทำให้เกิดอนุมูลอิสระมาทำลายเซลล์ โดยแอมโฟเทอริซิน บี มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น *Candida*, *Rhizopus*, *Aspergillus* และ *Coccidioides* อยู่ในช่วง 0.03-1 กรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ริกเกตเซีย และไวรัสได้ (Fluka, 2007) แอมโฟเทอริซิน บี จะไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหาร แต่พบว่ามีผลดีในการรักษาโรคติดเชื้อภายในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Candida* จึงมักใช้ในรูปยาฉีด แต่ต้องเพิ่มความระวังในการใช้เพราะว่ายาชนิดนี้มีพิษสูงมาก (มาลิน, 2540)



รูปที่ 2.12 ลักษณะโครงสร้างของแอมโฟเทอริซิน บี
ที่มา : Harold และ Thomas

2.11 ลักษณะของสารปฏิชีวนะที่เหมาะในการใช้เป็นยารักษาโรค

นงลักษณ์ และปรีชา (2544) ทำการแบ่งลักษณะของสารปฏิชีวนะออกเป็น ดังนี้

1. สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เรียกว่า มีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้าง (Broad-spectrum antibiotics)

2. ไม่ทำให้ปรสิตเกิดการต้านทานต่อยา หรือเกิดการผ่าเหล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์กับโฮสต์ เช่น ไม่ทำให้แพ้ยาหรือเกิดการระคายเคืองกับกระเพาะอาหาร หรือไต ไม่อันตรายต่อระบบประสาท เป็นต้น

4. ไม่ทำลายจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามปกติในร่างกายโฮสต์ เพราะจะทำให้เสียสมดุลธรรมชาติทำให้เกิดการดิดเชื้อจากจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ทำให้เกิดโรคหรือจากเชื้อโรคอื่นๆ

2.12 คุณสมบัติของยาต้านจุลินทรีย์ที่ดี

มาลิน (2540) กล่าวถึงยาต้านจุลินทรีย์ โดยหลักการนั้น ควรมีคุณสมบัติต่อไปนี้คือ

1. มีฤทธิ์ต้านเชื้อดี และมีผลต่อเชื้อมากชนิด
2. มีการดูดซึมและการกระจายตัวในร่างกายดี
3. ออกฤทธิ์ในส่วนต่างๆของร่างกายดี
4. มีพิษหรือมีฤทธิ์ข้างเคียงน้อยที่สุด
5. สามารถเข้าสู่ร่างกายด้วยวิธีการต่างๆ โดยเฉพาะทั้งฉีดและกิน
6. ผลิตได้ง่าย
7. ราคาถูก
8. ไม่ก่อหรือเหนี่ยวนำให้เชื้อดื้อยาในภายหลัง

2.13 ความไวต่อเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารปฏิชีวนะ

มาลิน (2540), นงลักษณ์ และปรีชา (2544) กล่าวไว้ว่า การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะอาจทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่ใช้กันมากที่สุดคือ วิธีทำในจานเพาะเชื้อ (disk-plate technique หรือ Single disk method) โดยนำกระดาษซับที่ตัดเป็นแผ่นกลมเล็กๆ ที่ชุบตัวยาที่ทราบปริมาณจะนำมาวางบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นแล้วจะเกิดบริเวณใส (Inhibition zone) รอบๆ กระดาษซับที่มีตัวยาซึ่งซึมหรือแพร่กระจายออกไปในอาหารที่มีเชื้อนั้น วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบยาเพียงความเข้มข้นเดียว แล้วดูขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น เพราะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้พบว่าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

1. กรวยแยก (Separatery funnel)
2. แผ่นทดสอบ (Filter paper disc) Schleicher & Schuell 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)
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) Cyberscan : EUTECH INSTRUMENTS
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) 6/300 : Falcon
9. เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (Rotary evaporator) Heidolph 4001 : Laborota

3.2 สารเคมี และเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ

3.2.1 ตัวทำละลาย (Solvent)

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 3 ชนิดเป็นแบบ Commercial grade ได้แก่

1. เฮกเซน (Hexane) มีชื่อเคมีทั่วไปว่า Hexyl hydride มีสูตรโมเลกุลคือ C_6H_{14}
2. เอทิลอะซีเตต (Ethyl acetate) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_4H_8O_2$
3. บิวทานอล (Butanol) มีชื่อเคมีทั่วไปว่า Hexyl hydride มีสูตรโมเลกุลคือ C_6H_{14}

3.2.2 ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic)

1. เพนนิซิลิน จี (Penicillin G)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B)

3.2.3 เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ (Tested microorganisms) มีดังนี้

1. แกรมลบ 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*

2. แกรมบวก 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Micrococcus luteus*

3. ยีสต์ 1 ชนิด คือ *Candida albicans*

3.2.4 สารเคมีสำหรับเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว

อาหารสูตร N-8 แสดงสูตรอาหารในภาคผนวก ก.

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย และการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505

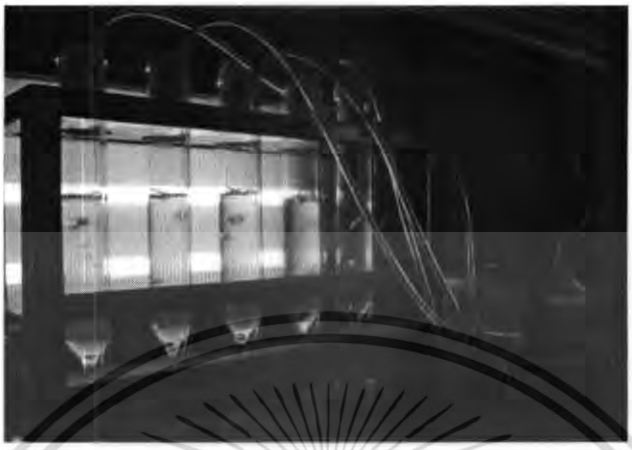
ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ในอาหารเหลวสูตร N-8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารเอียง 1 หลอดใส่ในแต่ละฟลาสก์ จากนั้นนำไปวางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 3.1) และให้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ที่ความเข้มแสง 2,400 ลักซ์ อย่างต่อเนื่องประมาณ 14 วัน (ชลธิชา, 2545)

รูปที่ 3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายบนเครื่องเขย่า

จากนั้น นำเชื้อสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในหลอดเพาะเลี้ยง (Culture tube) ขนาด 300 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.2) ที่มีอาหารเหลวสูตร N-8 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร อยู่โดยใช้หัวเชื้อสาหร่าย 20 มิลลิลิตร ที่ได้ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และได้ค่าการดูดกลืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสงเท่ากับ 0.3 ให้อากาศโดยเครื่องให้อากาศ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ที่ความเข้มแสง 2,400 ลักซ์ และบ่มไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องต่อเนื่องกันเป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเพิ่มปริมาณในหลอดเพาะเลี้ยงขนาด 300 มิลลิลิตร

3.3.2 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp.

นำตัวอย่างสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่เพาะเลี้ยงไว้จากข้อ 3.3.1 ทำการเก็บเกี่ยวน้ำหมักโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนที่เป็นตัวเซลล์ทิ้งไป และเก็บน้ำหมักเชื้อ (Fermentation Broth) ไว้ทำการทดลองในขั้นต่อไป

นำน้ำหมักเชื้อสาหร่าย มาสกัดในกรวยแยกโดยวิธีลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลาย ซึ่งใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล โดยนำน้ำหมักเชื้อสาหร่ายใส่ในกรวยลำดับส่วน แล้วเติมสารละลายเอทิลอะซีเตต ลงไปในอัตราส่วน เอทิลอะซีเตต : น้ำหมักเชื้อสาหร่าย เป็น 1 : 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้นจากกัน ทำการไขส่วนที่อยู่ชั้นล่างออกเก็บไว้ (ส่วนที่เตรียมไว้เพื่อนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายบิวทานอล) และนำสารสกัดที่อยู่ในสารละลายเอทิลอะซีเตต (ชั้นบน) (รูปที่ 3.3) ไปสกัดต่อโดยเติมตัวทำละลายเฮกเซนลงไปในอัตราส่วน 1 : 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้นส่วนที่ละลายได้ในตัวทำละลายเฮกเซนจะอยู่ชั้นบน และส่วนที่ละลายในชั้นเอทิลอะซีเตตจะอยู่ชั้นล่าง ไขส่วนที่อยู่ชั้นล่างออกเพื่อแยกสารออกจากกัน จากนั้นนำทั้งสองส่วนไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน (รูปที่ 3.4) จะได้สารสกัดหยาบจากสารละลายเฮกเซน และเอทิลอะซีเตต ต่อไปนำส่วนที่เตรียมไว้สำหรับนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายบิวทานอลที่เก็บไว้ใส่ลงในกรวยลำดับส่วนแล้วเติมตัวทำละลายบิวทานอลลงไปในอัตราส่วน 1 : 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น ไขส่วนที่อยู่ชั้นล่างออก ส่วนที่ละลายในบิวทานอลที่อยู่ชั้นบนให้นำไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้ง

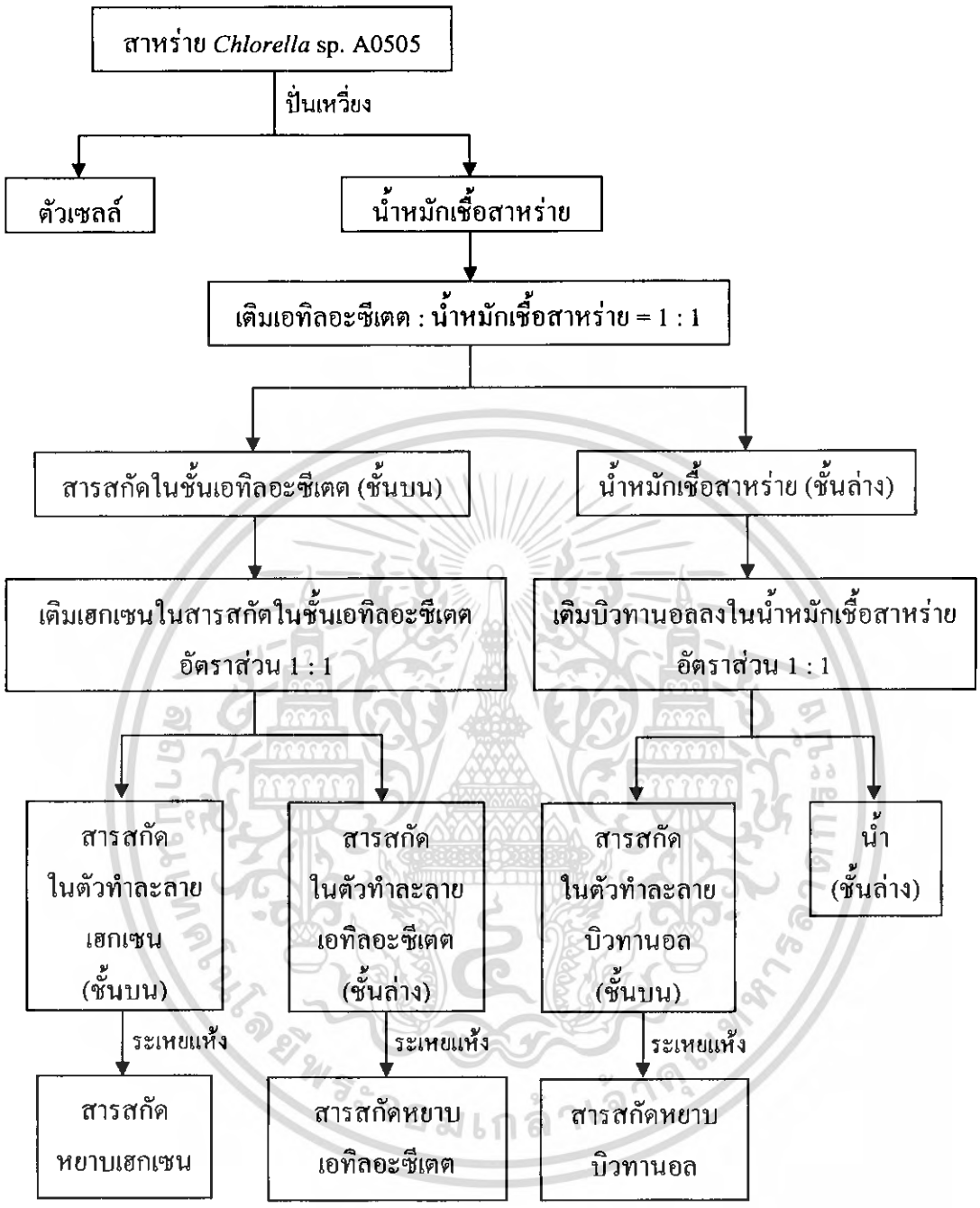
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบลดความดันจะได้ส่วนที่เป็นสารสกัดหยาบจากสารละลายบิวทานอล จากนั้นนำส่วนที่สกัดได้จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอลมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง และนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

รูปที่ 3.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. ในกรวยแยก

รูปที่ 3.4 การทำให้สารสกัดแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

3.3.3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่จะใช้ทดสอบ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์ก่อโรคที่จะใช้ทดสอบ โดยแบคทีเรียจะใช้อาหาร MHA (Mueller-Hinton Agar) และเชื้อยีสต์ใช้อาหาร SDA (Sabourand's dextrose agar) แล้วนำไปเข้าหม้อนึ่งความดันไอ ซึ่งตั้งอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเทอาหารใส่ในจานอาหารเพาะเชื้อ ทิ้งไว้จนอาหารแข็ง จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งได้แก่ แกรมลบ 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* แกรมบวก 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Micrococcus luteus* และเชื้อยีสต์ 1 ชนิด คือ *Candida albicans* โดยเจือจางในน้ำกลั่น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.3 จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร ที่เตรียมไว้โดยวิธี Spread plate

3.3.3.2 การเตรียมแผ่นทดสอบ

นำสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่ายที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิด มาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วนำมาเตรียมแผ่นทดสอบที่ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ โดยหยดสารสกัดลงบนแผ่นทดสอบปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อแผ่นทดสอบ และเตรียมแผ่นทดสอบที่เป็นตัวควบคุม (Control) โดยหยดตัวทำละลายลงบนแผ่นทดสอบปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อแผ่นทดสอบเช่นกัน

3.3.3.3 การทดสอบสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505

3.3.3.3.1 เพื่อหาชนิดของตัวทำละลายที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด

นำแผ่นทดสอบที่หยดสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วางบนผิวหน้าอาหารวุ้นที่ทำการ Spread plate ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ ตรวจดูผลโดยการวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง และเปรียบเทียบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายชนิดใดมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด

3.3.3.3.2 เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด

นำแผ่นทดสอบที่หยดสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่ได้จากตัวทำละลายที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลองในข้อ 3.3.3.3.1 มาทำการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ ตรวจดูผลโดยการวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง และเปรียบเทียบว่าสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นใดมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 เปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

เพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อศึกษาการเจริญด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 2 วัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง จะได้ส่วนที่เป็นตัวเซลล์ และน้ำหมักเชื้อสาหร่าย จากนั้นนำส่วนที่เป็นตัวเซลล์ออกไป นำส่วนน้ำหมักเชื้อสาหร่ายมาสกัดในกรวยแยกโดยวิธีลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล ตามวิธีในข้อ 3.3.2 แล้วเลือกเฉพาะส่วนของสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดที่จะทราบได้จากการทดลองขั้นที่ 3.3.3.3.1 ไปทำการระเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน เพื่อทดสอบการยับยั้งกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และระดับความเข้มข้นที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดที่จะทราบได้จากการทดลองขั้นที่ 3.3.3.3.2 ด้วยวิธี Agar disc diffusion ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาการเจริญ และประสิทธิภาพของสารสกัดที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทุกๆ 2 วัน

3.3.5 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 13.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505

เมื่อนำสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งจากผลการทดลองของ ชิตเวท และคณะ (2548) ได้ระบุว่าสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด มาทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย โดยใช้สารสกัด 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล จากการทดลองพบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล มีค่า 21.79, 16.56 และ 28.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ซึ่ง ชิตเวท และคณะ (2548) ได้ทำการทดลองสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย โดยใช้สารสกัด 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล พบว่าได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มีค่า 0.60, 2.40 และ 32.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้น้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการทดลองมีปริมาณมากกว่าการทดลองของ ชิตเวท และคณะ (2548) ซึ่งอาจเกิดจากขั้นตอนการเก็บสารสกัด เช่น ตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารสกัดหยาบ ระยะเวลาในการรอให้สารสกัดหยาบแห้งภายในเดซิเคเตอร์ก่อนทำการชั่งหาน้ำหนักซึ่งมีผลทำให้ความชื้นหลงเหลืออยู่ในสารสกัดหยาบในปริมาณที่ต่างกัน

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณน้ำหนักของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505

สายพันธุ์สาหร่าย	ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Chlorella sp. A0505	เฮกเซน	21.79
	เอทิลอะซีเตต	16.56
	บิวทานอล	28.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

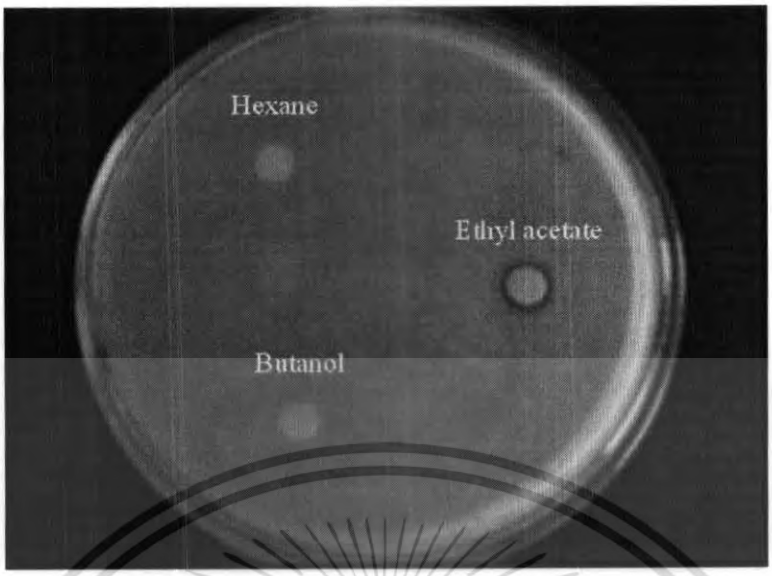
นำน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่วันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงสกัดด้วยวิธีลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค 6 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าน้ำหมักเชื้อสาหร่ายที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 10.33 มิลลิเมตร และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 9.66 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1, 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานผลของกุสุมา (2543) ที่พบว่าประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในส่วนของน้ำหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตมีประสิทธิภาพสูงสุด กฤษณ์ และคณะ(2548) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์มาสกัดตามลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลายเอทิลอะซีเตด เฮกเซน และเอ็น-บิวทานอล แล้วทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* และ *Candida albicans* พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตต สามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าตัวทำละลายเฮกเซน สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7 มิลลิเมตร ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการรายงานของ Lima-Filho และคณะ (2002) ที่ทำการสกัดสารจากสาหร่าย *Amasia multifida* ในดิวิชั่นโรโดไฟร์ต้า และพบว่าสารสกัดจากเซลล์สาหร่ายโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซนเป็นตัวสกัด ให้ผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi, Salmonella choleraesuis, Serratia marcescens, Vibrio cholerae* และแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcu aureus* จากการทดลองในขั้นตอนนี้ พบว่าสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตมีประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้นจึงได้นำตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตไปทำการสกัดหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่ความเข้มข้นอื่นๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505

ตัวทำละลาย	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	Bacillus subtilis ATCC 6633	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853	*Micrococcus luteus* ATCC 9341	*Escherichia coli* ATCC 25922	*Candida albicans* ATCC 10231
เฮกเซน	-	-	-	-	7	-
เอทิลอะซีเตต	10.33	-	-	-	9.66	-
บิวทานอล	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - คือ ไม่ยับยั้ง



รูปที่ 4.1 ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

รูปที่ 4.2 แสดงการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่ความเข้มข้นต่างกัน

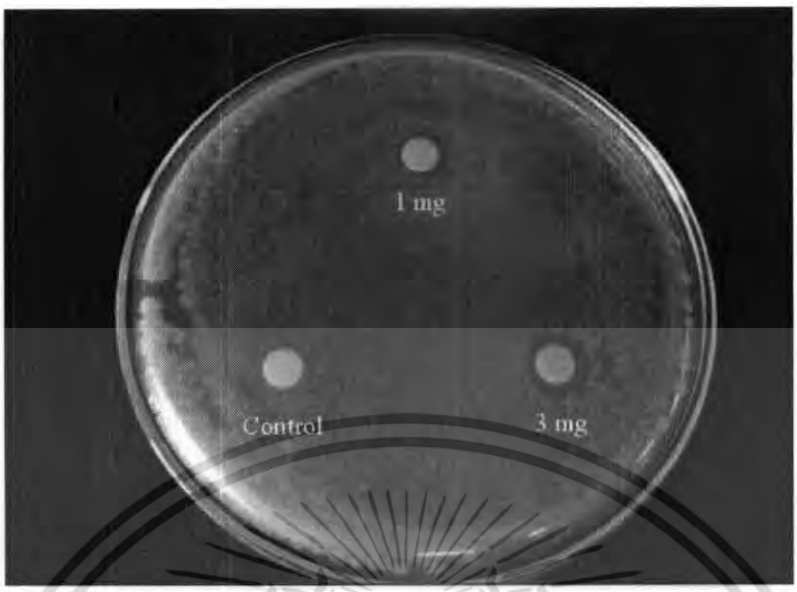
นำตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด มาทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ให้ได้ระดับความเข้มข้น 50 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ทั้งที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 8.66 และ 12.16 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3) เมื่อเปรียบเทียบกับการรายงานผลของ หยาดรุ้ง (2544) ซึ่งทำการทดลองหาประสิทธิภาพของสมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็ง พบว่า สมุนไพรบางชนิด เช่น ขิง สามารถทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 6.7 มิลลิเมตร และพริกไทยดำ สามารถทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกับเชื้อ *Escherichia coli* เท่ากับ 6 มิลลิเมตร ในขณะที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่นได้ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ซึ่งขัดแย้งกับผลการทดลองของ ชิตเวท และคณะ (2548) ที่ทำการทดสอบความสามารถของสารสกัดออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 โดยใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวสกัด และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Candida albicans* ได้ แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ยังคงสอดคล้องกับการรายงานผล ที่กล่าวว่า แบคทีเรียแกรมบวกจะถูกยับยั้งด้วยสารสกัดจากสาหร่ายได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบอย่าง *Escherichia coli* (Rao, 1981 อ้างถึงใน ชลธิชา, 2545) นอกจากนี้ มาลิน (2540) ยังกล่าวไว้ว่าเชื้อราเป็นเซลล์พวกยูคาริโอต เช่นเดียวกับเซลล์มนุษย์ ดังนั้น การค้นพบหรือพัฒนายาชนิดที่จะมีฤทธิ์ค่อนข้างจำเพาะต่อตัวเชื้อรา เช่น *Candida albicans* จึงทำได้ยาก หรือสาเหตุที่ทำให้การทดสอบไม่เกิดผลยับยั้งจุลินทรีย์ดังกล่าว อาจเกิดจากสายพันธุ์ของสาหร่าย วิธีการ และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน โดย Pratt และคณะ (1944) พบว่าสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และ *Chlorella pyrenoidosa* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เรียกว่า คลอเรลลิน (Chlorellin) ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Bacillus subtilis, Bacterium coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดย Pratt และคณะ ทำการสกัด Chlorellin โดยใช้คลอโรฟอร์ม หรือเบนซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505

ความเข้มข้นสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	Bacillus subtilis ATCC 6633	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853	*Micrococcus luteus* ATCC 9341	*Escherichia coli* ATCC 25922	*Candida albicans* ATCC 10231
Control	-	-	-	-	-	-
1	8.66	-	-	-	-	-
3	12.16	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - คือ ไม่ยับยั้ง



รูปที่ 4.3 ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต ที่ความเข้มข้น 50 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

และเมื่อนำผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจากสารสกัดน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 มาเปรียบเทียบกับผลการยับยั้งของยาปฏิชีวนะบริสุทธิ์ พบว่าที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของเพนนิซิลิน จี สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (รูปที่ 4.4), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (รูปที่ 4.5) และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 35, 14 และ 29 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้ (ตารางที่ 4.4) ซึ่งเป็นผลมาจากเพนนิซิลิน จี เป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ในวงแคบ (narrow spectrum) ซึ่งจะออกฤทธิ์ได้ดีต่อแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น (ณัฏฐา, 2549) ส่วนยาปฏิชีวนะแอมโฟเทอริซิน บี ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อรา พบว่าที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 16 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.4, รูปที่4.6) ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าของยาปฏิชีวนะ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีกว่าสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยยาปฏิชีวนะ

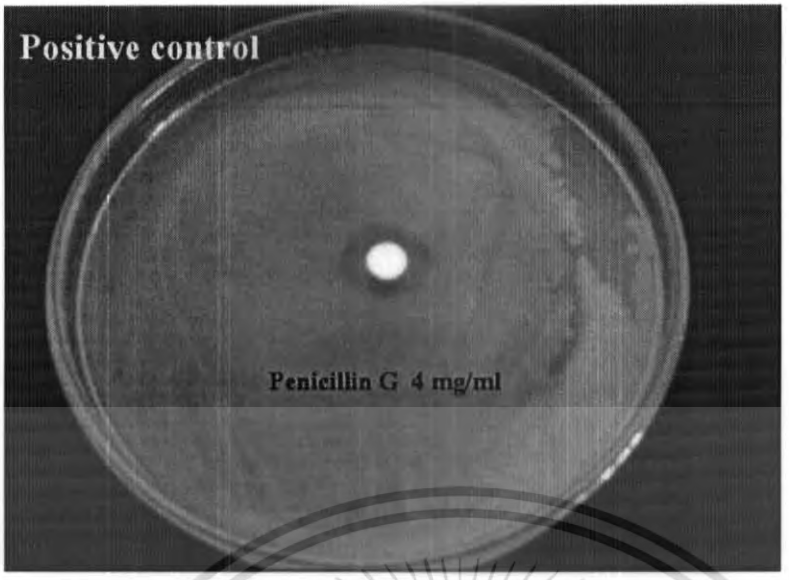
เชื้อที่ทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	เพนนิซิลิน จี (4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอมโฟเทอริซิน บี (0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
Bacillus subtilis ATCC 6633	14	/
Staphylococcus aureus ATCC 25923	35	/
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	-	/
Micrococcus luteus ATCC 9341	29	/
Escherichia coli ATCC 25922	-	/
Candida albicans ATCC 10231	/	16

หมายเหตุ - คือ ไม่ยับยั้ง

/ คือ ไม่ได้ทำการทดสอบ

รูปที่ 4.4 ผลของยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน จี ที่ระดับความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ผลของยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน จี ที่ระดับความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

รูปที่ 4.6 ผลของยาปฏิชีวนะแอมโฟเทอริซิน บี ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ATCC 10231

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 เปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

นำน้ำหมักของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดมาทำการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุกๆ 2 วัน เป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่าวันที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 , 14, 16, 18 และ 20 มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต คือ 0.0054, 0.0294, 0.0083, 0.0035, 0.0497, 0.0019, 0.0104, 0.0123, 0.0077, 0.0129 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณสารออกฤทธิ์มากที่สุด คือ 0.0497 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.5) และเมื่อนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้ มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 พบว่าในวันที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 , 14, 16, 18 และ 20 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 8.00, 8.33, 8.00, 8.33, 9.00, 9.66, 11.66, 8.66, 8.33, 8.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.8-4.9) ซึ่งเมื่อนำมาเขียนกราฟเปรียบเทียบระหว่างการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 กับประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (รูปที่ 4.7) พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งจะค่อนข้างคงที่ในช่วงแรกของการเจริญ และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงปลาย log phase โดยในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง พบว่า สารสกัดจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด คือ 11.66 มิลลิเมตร และเมื่อเข้าสู่ช่วง stationary phase ของการเจริญ ซึ่งอยู่ในช่วงวันที่ 16-20 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้น สารสกัดจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ลดลงเรื่อยๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Pratt (1944) รายงานการเพาะเลี้ยง *Chlorella vulgaris* ที่สภาวะปกติ สาหร่ายจะผลิตสารที่เรียกว่า Chlorellin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์สาหร่ายที่มีความหนาแน่นไม่เกิน 100,000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร จึงอาจเป็นไปได้ว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่ผลิตขึ้นจะเกิดการสะสม จนเมื่อมีจำนวนมากขึ้น จะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสาหร่ายเอง และผลจากการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อยับยั้งการเจริญของสาหร่ายนี้ทำให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นลดลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงด้วย มาลิน (2540) กล่าวว่า สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเป็นสารเมตาบอไลต์ขั้นที่สอง (secondary metabolite) ซึ่งไม่จำเป็นต่อการเจริญ แต่ถ้ามีอาจก่อให้เกิดประโยชน์ต่อเซลล์ที่ผลิต ส่วนใหญ่จะสร้างในช่วงปลาย log phase จนถึงช่วง stationary phase อันเป็นช่วงที่จุลินทรีย์เริ่มมีการเจริญคงที่ นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสภาวะที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นจะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างลงไปได้ และจากการทดลองของสุพจน์ และสุดฤดี (2545) ซึ่งทดลองผลิตสารเมตาบอไลต์ขั้นที่สองจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus firmus* เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดนูนของถั่วเหลือง พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลโดยตรงต่อการผลิตสารเมตาบอไลต์ขั้นที่สอง ซึ่งปริมาณสารจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

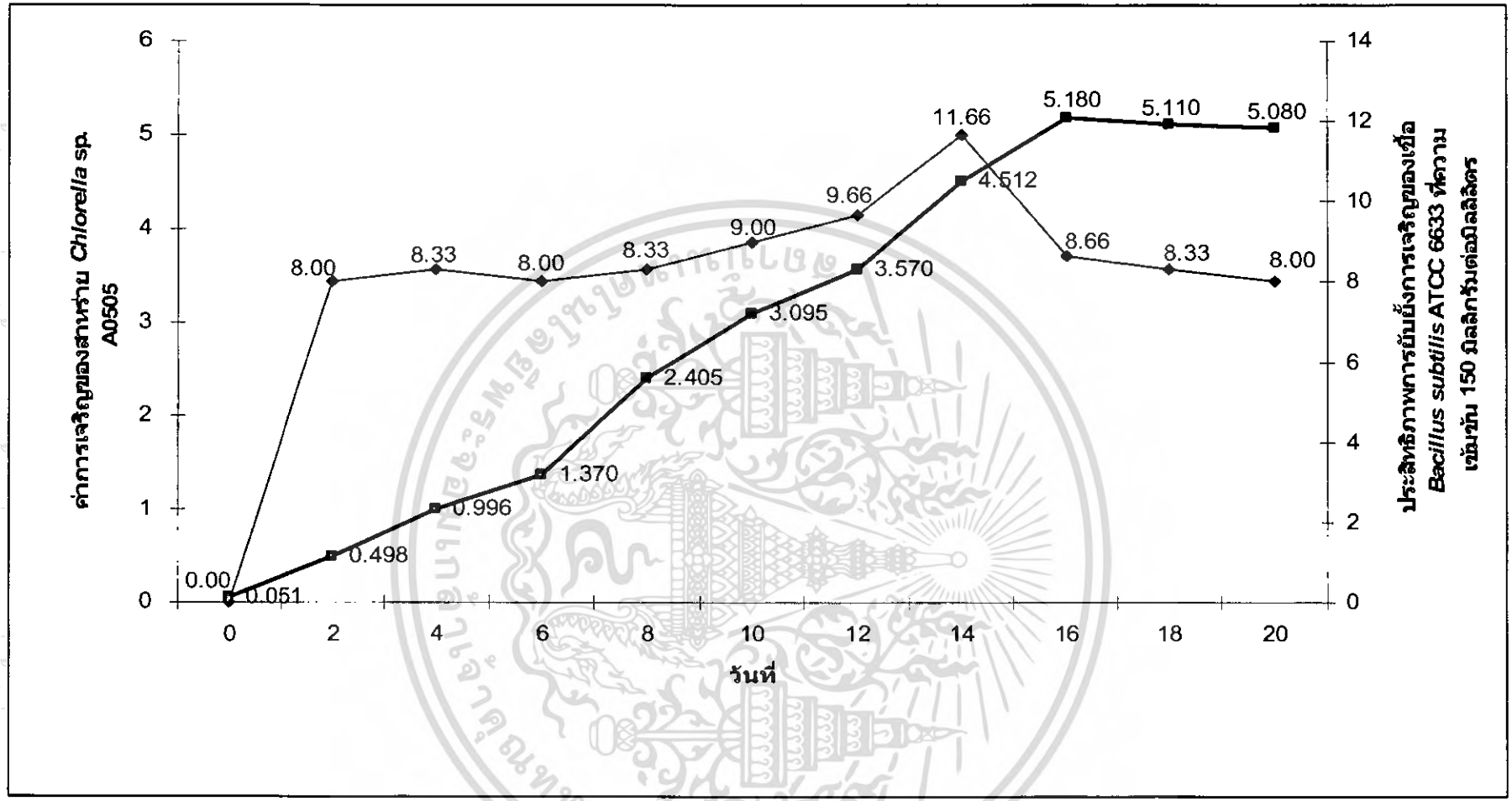
สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจนถึงระดับหนึ่ง และถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสมจะช่วยให้เชื้อมีประสิทธิภาพในการผลิตสารเป้าหมายดีขึ้น (สุรีลักษณ์, 2527) เช่นเดียวกับวีนา (2547) ที่ทำการศึกษาสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมในการผลิตสารมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจากสาหร่าย *Chlorella* B_2 พบว่า สาหร่าย *Chlorella* B_2 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร N-8 ที่ลดธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุดในวันที่ 6 ของการทดลอง ซึ่งอยู่ในช่วง log phase

จากการนำสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 มาทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้เพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่ำไป และเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความไวต่อสารสกัดได้ต่างกัน หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอาจยังไม่ใช่ตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ มีเพียงเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 เท่านั้นที่มีผลยับยั้งโดยสารสกัดจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505

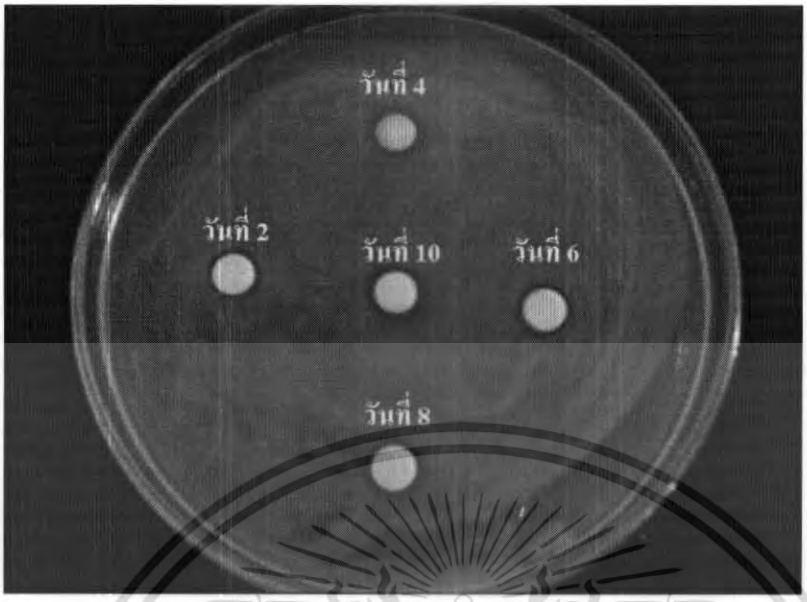
ตารางที่ 4.5 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วันต่างๆ

สาหร่าย	วันที่	ค่าการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 (560 นาโนเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)
Chlorella sp. A0505	2	0.051	8.00
	4	0.498	8.33
	6	0.996	8.00
	8	1.370	8.33
	10	2.405	9.00
	12	3.095	9.66
	14	4.512	11.66
	16	5.180	8.66
	18	5.110	8.33
	20	5.080	8.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (—■—) ค่าการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 (—◆—) ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.8 ผลของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่วันที่ 2, 4, 6, 8 และ 10

รูปที่ 4.9 ผลของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่วันที่ 12, 14, 16, 18 และ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่า

1. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล พบว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายบิวทานอล ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุด คือ 28.50 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมา คือ เฮกเซน และเอทิลอะซีเตต ซึ่งได้ปริมาณสารสกัด 21.79 และ 16.56 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2. จากการทดลองสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซีเตต และบิวทานอล พบว่า สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 10.33 มิลลิเมตร รองลงมาคือ เชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 9.66 มิลลิเมตร

3. ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่สกัดได้จากตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 12.16 มิลลิเมตร

4. ผลของการเปรียบเทียบการเจริญของสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นเวลา 20 วัน พบว่า วันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุด คือ 0.0479 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากสาหร่ายในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งการเจริญอยู่ในช่วงปลาย log phase มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 11.66 มิลลิเมตร และเมื่อการเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase พบว่า สารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสาหร่ายมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 มีแนวโน้มลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาหาสารละลายที่เหมาะสมในการสกัดน้ำหมักเชื้อสาหร่าย เพื่อส่งผลทำให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

2. ควรศึกษาหาสภาวะในการเลี้ยง เช่น อัตราการให้อากาศ ความเข้มแสง ที่จะส่งผลทำให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีขึ้น

3. ควรทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ความเข้มข้นหลายๆ ค่าในช่วงระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ เนื่องจากทำให้ทราบถึงค่าต่ำสุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

4. ควรทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์น้ำ เพื่อจะได้นำสาหร่ายไปใช้ประโยชน์ได้จริง เช่น ผสมในอาหาร หรือนำสาหร่ายไปเพาะเลี้ยงร่วมกับสัตว์น้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ สุทธิเสถียรทอง ชมพูนุช จงสมจิตต และวลีพร เหลืองอร่ามกุล. 2548. ฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์. โครงงานพิเศษ. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. สาหร่าย. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 269 หน้า.

กุสุมา แจ่มดี. 2543. การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทส์ ที่สร้างสารปฏิชีวนะจากดินในป่าชายเลน. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต. สาขาชีววิทยา. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ชลธิชา เรืองเอกพจน์ และชัยสิทธิ์ ธีระพงศ์รามกุล. 2545. ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. โครงงานพิเศษ. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชิตเวท แสงสวัสดิ์ ทนงศักดิ์ บุญขันธ์ และนพพล ดีภัก. 2548.ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp.โครงงานพิเศษ. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร. 2549. ยาต้านจุลชีพกับการป้องกันรักษาโรคสัตว์น้ำ. สาขาประมง สายวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีวารสารศูนย์บริการวิชาการ. วิทยาเขตหนองคาย. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ปีที่ 14 ฉบับที่ 1. ประจำเดือนมกราคม-มีนาคม 2549. หน้า 46.

ดวงรัตน์ อินทร.2542. การนำสาหร่ายมาใช้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม. คณะสาธารณสุขศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.

ธิดา เพชรมณี และมาวิทย์ อัศวอารีย์. 2538. *การตกตะกอนคลอเรลลาน้ำเค็มเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ*. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 10/2538. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. หน้า 2.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 735 น.

ปาจารีย์ อินทรทองคำ วนิดา พนายิ่งไพศาล และพงศ์อนันต์ คงดารา. 2539. การศึกษาสภาวะในการเพิ่มปริมาณสาหร่าย *Chlorella* sp. โครงงานพิเศษ. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พงศ์ธร เครือวณิชธรรม พรรษ พุ่มเจริญ และวิทวัส เจนเวชศักดา. 2544. ผลของการสกัดจาก *Chlorella* sp. ต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด. โครงงานพิเศษ. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรรณกร อิ่มวิทยา. 2535. เชื้อราก่อโรคในคน Fungi pathogenic for humans. กรุงเทพฯ: บริษัทสารมวลชน จำกัด.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2545. หลักการวิเคราะห์จุลินทรีย์. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 232 น.

ภาณุ เนาวรัตน์มณีกุล อติศร อำนวยสิทธิ์ วิชัย เกียรติจินตารัตน์ และกฤษณี กลัดสวัสดิ์. 2530. การเพาะเลี้ยงไรแดงเพื่อการค้า. รายงานประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 25. สาขาประมง: 297-309.

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

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2546. สาหร่ายวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 497 น.

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

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 351 น.

วิญญารัตน์ ตันศิริ. 2540. *โรคผิวหนังติดเชื้อในเด็กทารก*. คัดลอกจากนิตยสารใกล้หมอ ปีที่ 21 ฉบับที่ 1 มกราคม 2540. [Online]. Avaliable: http://www.elib-online.com/doctors/ped_skin1.html.

วินัย ดะห์ลัน. 2535. *สารอาหารที่นิยมใช้เพื่อเสริมสุขภาพและต้านโรค*. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. หน้า 168-169.

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

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

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

ศิวาพร ศิวเวชช. 2542. การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีการอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

สมใจ ศิริโภค. 2547. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

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

สิริรัตน์ วงศ์ไพโรจน์พานิช. 2525. *การเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาน้ำจืด*. ซีเนียร์ โปรเจ็ค. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 3-7.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุพจน์ กาเซ็ม และสุตฤดี ประเทืองวงศ์. 2545. ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรคใบจุดนูนของถั่วเหลือง. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.หน้า 364.

สุรเกียรติ อาชานานุภาพ.2544. ตำราการตรวจโรคทั่วไป.สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน. กรุงเทพฯ.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2527. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีผลต่อบักเตรีศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต และคุณสมบัติบางประการที่ผลิตได้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. อ้างถึงใน สุพจน์ กาเซ็ม และสุตฤดี ประเทืองวงศ์. 2545. ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรคใบจุดนูนของถั่วเหลือง. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 364.

สุวณี สุภเวชย์ และมาลัย วรจิตร. 2540. แบคทีเรียพื้นฐาน. กรุงเทพฯ.

โสภณ คงสำราญ. 2524. แบคทีเรียทางการแพทย์ (โครงการตำรา-ศิริราช รายการที่ 74 9-2524). กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์พิฆเณศ. 100-104, 309-321.

หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์. 2544. ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์. ปริญญาโท. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 96 น.

อรอนงค์ รัชตราเชนชัย. 2549. โรคติดเชื้ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ : คู่มือการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ศาสตร์สาธารณสุข. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

อิทธิพร จันทร์เพ็ญ. 2532. อาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน อาหาร และการให้อาหารปลา กุ้ง. สำนักพิมพ์ช่อนนทรี. กรุงเทพฯ. หน้า 41-62.

Bansemir, A., Blume, M., Schroder, S., and Lindequist, U. 2005. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*. 252: 79-84.

Bennett, R. W. 2001. *Staphylococcus aureus*, pp 201-220. In R. G. Labbé, García. Guide to Foodborne Pathogens, A John Wiley & Sons, Inc., New York.

BENPEN™. 1999. Benzylpenicillin (as benzylpenicillin sodium) Powder for Injection.

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.

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

Chemblink Online informational Databases of Chemicals from China. 2007. Penicillin G sodium salt. [Online]. Avaliable: http://www.chemblink.com/products/69-57-8.htm.

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

FDA, 2001. *Staphylococcus aureus*. In Baceriological Analytical Manual Online. U.S.Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. [Online]. Available: http://www.cfsan.fda.gov~ebam/bam-12.html.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fluka. 2007. [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail? ProdNo= 10042&Brand=FLUKA.

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.

Harold C. Neu and Thomas D. Gootz. Antimicrobial Chemotherap. [Online]. Available: http://www.gsbs. utmb.edu/microbook/ch011.htm.

Hasagawa, T.Okuda, M.Makino, M.1995. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduce opportunistic infection with *Listeria monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses.17(6),505-512.

Lee, R.E. 1999. *Phycology.* 3rd ed. Cambridge university press. New York, USA. 255.

Lee, W.H. and Rosenbaum, M. 1987. *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 p.

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.

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

Pratt, R. 1944. Studies on Chlorella vulgaris. IX. Influence on Growth of Chlorella of Continuous Removal of Chlorellin from the Culture Solution. American Journal of Botany, Vol. 31, No. 7 (Jul., 1944), pp. 418-421.

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.

Rao, P.S. and Parekh, K.S.. 1981. Antibacterial activity of Indian seawced extracts. Botanica marina. 24 : 577-582. อ้างถึงในชลธิชา เรืองเอกพจน์ และชัยสิทธิ์ ธีระพงศ์รามกุล. 2545. *ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากสาหร่าย Chlorella* sp. โครงงานพิเศษ. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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

Smith, K. J., R. Neafie, J. Yeager, and H. G. Skelton. 1999. "*Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease." British Journal of Dermatology, vol. 141, no. 3. British Association of Dermatologists. 558-561.

Steenblock, D. 2530. *คลอเรลลา (CHLORELLA) พืชธรรมชาติที่ทรงคุณค่าทางยา.* แปลจากเรื่อง *Chlorella : Natural medicinal algae* โดย กิดานันท์ มลิทอง. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 20-34.

Wikipedia the frce encyclopedia . 2006. *Bacillus subtilis* . [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis#Pathogenesis.

Wikipedia the free encyclopedia . 2006. *Candida albicans.* [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans.

Wikipedia the free encyclopedia. 2006. *Pseudomonas aeruginosa.* [Online].Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa.

Wikipedia the free encyclopedia. 2007.*Micrococcus luteus.* [Online].Available:http://en.wikipedia.org/wiki/Micrococcus_lutcus.

Wikipedia die freie enzyklopädie. 2006. *Pseudomonas aeruginosa.* [Online].Available: http://de.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas.

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.

http://biyolojiegitim.yyu.edu.tr/k/Microc/index.htm

http://ind.ntou.edu.tw/~b0232/chlorella.htm

http://www.biocrawler.com/encyclopedia/Bacterium

http://www.chlorclla.co.jp

http://www.chlorella-alg.com

http://www.foodnews.ch/faq/20_glossar/Begriffsglossar_B.html

http://www.geocities.com/CapeCanaveral/3504/candida.htm

http://www.nies.go.jp/biology/mcc/class/Chlorella.html

http://www.techno.msu.ac.th/fn/ecenter/pathogens/staphylococcus_aureus.htm

http://www.thailabonline.com/sec51ecoli.htm

http://www.zdravljeizivot.com/hrv/index.php?k=saznajte&s· ·kolostrum3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย *Chlorella* sp.

สูตรอาหาร N-8

$Na_2HPO_4.2H_2O$	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	1000.0	มิลลิลิตร

***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	1000.0	มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

สูตรอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) (EMD Inc., 2005) ประกอบด้วย (หน่วย กรัมต่อลิตร)

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

การเตรียมอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) โดยใช้อาหารสำเร็จรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตักสารมา 38 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นนำไปเข้าหม้อนึ่งความดันไอ ซึ่งตั้งอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารที่ได้จะมีลักษณะใส สีเหลืองค่อนข้างน้ำตาล

3. 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 ข.

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองนี้เป็นการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design = CRD) ซึ่งเป็นการนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตารางที่ ข-1 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลาย

ชนิดของจุลินทรีย์	ความเข้มข้นสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ขนาดบริเวณยับยั้งของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
Bacillus subtilis	50	9.00	8.00	9.00	8.66
ATCC 6633	150	12.00	12.00	12.50	12.16
Staphylococcus aureus	50	-	-	-	-
ATCC 25923	150	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	50	-	-	-	-
ATCC 27853	150	-	-	-	-
Micrococcus luteus	50	-	-	-	-
ATCC 9341	150	-	-	-	-
Escherichia coli	50	-	-	-	-
ATCC 25922	150	-	-	-	-
Candida albicans	50	-	-	-	-
ATCC 10231	150	-	-	-	-

หมายเหตุ - = ไม่ยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-2 การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ANOVA

Inhibit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	187.778	5	37.556	676.000	.000
Within Groups	.667	12	.056		
Total	188.444	17			

ตารางที่ ข-3 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชนิดของจุลินทรีย์	ความเข้มข้นสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
Bacillus subtilis ATCC 6633	50	8.66[a]
Staphylococcus aureus ATCC 25923	50	0.00[b]
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	50	0.00[b]
Micrococcus luteus ATCC 9341	50	0.00[b]
Escherichia coli ATCC 25922	50	0.00[b]
Candida albicans ATCC 10231	50	0.00[b]

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกัน แสดงว่าสารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ นั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 6 ชนิด โดยยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231

ตารางที่ ข-4 การวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 , *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ANOVA

Inhibit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	370.069	5	74.014	5329.000	.000
Within Groups	.167	12	.014		
Total	370.236	17			

ตารางที่ ข-5 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชนิดของจุลินทรีย์	ความเข้มข้นสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร)
Bacillus subtilis ATCC 6633	150	12.16[a]
Staphylococcus aureus ATCC 25923	150	0.00[b]
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	150	0.00[b]
Micrococcus luteus ATCC 9341	150	0.00[b]
Escherichia coli ATCC 25922	150	0.00[b]
Candida albicans ATCC 10231	150	0.00[b]

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันแสดงว่าสารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ นั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ซึ่งใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 6 ชนิด โดยยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231

ตารางที่ ข-6 แสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากสารสกัดที่ได้จากวันต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง *Chlorella* sp. A0505

Inhibit

			Subset for alpha = .05				
	Day	N	1	2	3	4	5
Duncan[a]	.00	3	.0000				
	2.00	3		8.0000			
	6.00	3		8.0000			
	20.00	3		8.0000			
	4.00	3		8.3333	8.3333		
	8.00	3		8.3333	8.3333		
	18.00	3		8.3333	8.3333		
	16.00	3		8.6667	8.6667		
	10.00	3			9.0000	9.0000	
	12.00	3				9.6667	
	14.00	3					11.6667
	Sig.		1.000	.107	.098	.069	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่อยู่ในช่องหมายเลขเดียวกัน แสดงว่า สารสกัดจากสาหร่ายให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ค่าทางสถิติที่ได้จากตารางสามารถสรุปได้ว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ นั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่าย *Chlorella* sp. A0505 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน สารสกัดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงสามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด คือ 11.67 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในวันอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้