การสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

โดย

นางสาวสิตา ไชยช่วย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

โดย

นางสาวสิตา ไชยช่วย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

BIOACCUMULATION OF OXYTETRACYCLINE IN *Chlorella vulgaris*

By

Miss Sita Chaichauy

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

Master of Science Program in Environmental Science

Department of Environmental Science

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2015

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*” เสนอโดย นางสาวสิตา ไชยช่วย เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ บุญเสนอ

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ดาวรุ่ง สังข์ทอง)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภางค์ จุฬาลักษณานุกูล)

...../...../.....

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ บุญเสนอ)

...../...../.....

55311319 : สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คำสำคัญ : *Chlorella vulgaris*/ ออกซีเตตราซัยคลิน/ การสะสม

สิตา ไชยช่วย : การสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*.
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร.มลิวรรณ บุญเสนอ. 72 หน้า.

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของออกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* รวมทั้งการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ผลการทดลองออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นของ 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร พบว่าออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร ทำให้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* มีการเจริญเติบโตสูงสุด ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และการเจริญเติบโตของสาหร่ายสูงขึ้นตามความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่เพิ่มขึ้น สำหรับการใช้จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นที่ 5, 10 และ 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย พบว่า จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 10% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินทำให้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* มีการเจริญเติบโตสูงสุด

ส่วนการทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยใช้ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./กรัม และจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10 % ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน พบว่า เซลล์สาหร่ายสามารถสะสมออกซีเตตราซัยคลินได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการทดลอง และสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 ของการทดลอง เท่ากับ 191.23 มก./กก.น้ำหนักเปียก จากนั้นการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่ายค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าการสะสม (BCF) เท่ากับ 0.59 ลิตร/กก. โดยที่การสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำไม่ส่งผลต่อการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย

ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ลายมือชื่อนักศึกษา..... ปีการศึกษา 2558
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ .....

55311319 : MAJOR : ENVIRONMENTAL SCIENCE
KEY WORD : CHLORELLA VULGARIS/ OXYTETRACYCLINE/ BIOACCUMULATION
SITA CHAICHAUY : BIOACCUMULATION OF OXYTETRACYCLINE IN *Chlorella vulgaris*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MALIWAN BOONSANER. 72 pp.

The objectives of this study were to investigate the effect of oxytetracycline concentrations on the *Chlorella vulgaris* growth and its accumulation in the *Chlorella vulgaris*. The effect of oxytetracycline concentrations at 80, 120, 200 and 400 mg/L showed that the *Chlorella vulgaris* had the highest specific growth rate when exposed to 400 mg/L of oxytetracycline solution. In addition, the growths of *Chlorella vulgaris* were increase with the increasing oxytetracycline concentrations. For the experiment on the inoculum concentrations on the *Chlorella vulgaris* growth, the result showed that effect of the 10% of the inoculum in oxytetracycline solution had the highest specific growth rate. In the accumulation experiment, the accumulation of oxytetracycline in *Chlorella vulgaris* occurred very fast and reach the highest accumulation concentration on the 6^{th} day of the experiment at 191.23 mg/Kg wet weight. The concentrations of oxytetracycline in *Chlorella vulgaris* were quite constant and gave the BCF value at 0.59 L/Kg. Besides, the degradation of oxytetracycline in water did not affect the accumulation of oxytetracycline in *Chlorella vulgaris*.

Department of Environmental Science Graduate School, Silpakorn University
Student's signature ..... Academic Year 2015
Thesis Advisor's signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มลิวรรณ บุญเสนอ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์จารุวรรณ หวะสุวรรณ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และให้ความช่วยเหลือในทุกด้านตลอดระยะเวลาในการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร.สุภางค์ จุฬาลักษณานุกูล และอาจารย์ ดร. ดาวรุ่ง สังข์ทอง ที่ให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่กรุณาให้คำปรึกษา แก้ไขปัญหา ช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย ให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้คุณค่าและคุณประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเพื่อตอบแทนคุณแด่ บิดา มารดา พี่ชาย และญาติพี่น้องทุกท่านที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจตลอดมา และขอมอบแด่คณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัย จนทำให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในที่สุด และขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่มีส่วนร่วมในความสำเร็จครั้งนี้

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูป ..... ญ

บทที่

1 บทนำ 1

ที่มาและความสำคัญ 1

วัตถุประสงค์ 2

สมมติฐาน 2

ขอบเขตการศึกษา 2

ผลที่คาดว่าจะได้รับ 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

ออกซีเตตราซัยคลิน 4

แหล่งที่มาของออกซีเตตราซัยคลิน 9

การสะสมออกซีเตราซัยคลินในสิ่งมีชีวิต 10

สาหร่าย (algae) 12

การเจริญเติบโตของสาหร่าย 15

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย 16

การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย 17

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย 18

ประโยชน์และความสำคัญของสาหร่าย *Chlorella* sp. 19

กระบวนการสะสมและกำจัดมลสารโดยสาหร่าย 19

3 วิธีดำเนินการวิจัย 21

สถานที่ทำการทดลอง 21

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง 21

สารเคมี 21

บทที่		หน้าที่
3	การเตรียมการทดลอง	22
	วิธีสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างจากเซลล์สาหร่ายและน้ำ	23
	วิธีการทดลอง	24
	การหาค่า Method detection limit และ % Recovery	29
	การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง	29
	การนับจำนวนเซลล์	30
	การวิเคราะห์ผลการทดลอง	30
4	ผลการศึกษา วิเคราะห์ข้อมูล และอภิปรายผล	32
	ผลการทดลองความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลิน ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*	32
	ผลการทดลองการหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เหมาะสมต่อการสะสมออกซีเตตราซัยคลิน	39
	ผลการทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลิน ในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*	42
	ผลการทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลิน	47
5	สรุป และข้อเสนอแนะ	48
	สรุปผลการศึกษา	48
	ข้อเสนอแนะ	49
รายการอ้างอิง		50
ภาคผนวก		55
	ภาคผนวก ก	56
	ภาคผนวก ข	59
	ภาคผนวก ค	63
ประวัติผู้วิจัย		72

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สรุปสมบัติทางกายภาพและเคมีของออกซีเตตราซัยคลิน	5
2.2	สรุปการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินที่สภาวะต่างๆ	8
2.3	ปริมาณออกซีเตตราซัยคลินที่ตรวจพบในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ	11
4.1	จำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เปลี่ยนแปลงตามเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200, 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม	33
4.2	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงใน ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200, 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม	35
4.3	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในการทดลองที่ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200, 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม	37
4.4	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุม กับชุดทดลองที่จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 5, 10, 20% ของสารละลาย ออกซีเตตราซัยคลินในระยะเวลา 7 วัน	42
4.5	จำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับ ชุดทดลองที่มีการเปลี่ยนแปลงตามเวลาในช่วง 72 ชั่วโมง	43
4.6	ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และในน้ำที่ใช้ทดลองภายในเวลา 72 ชั่วโมง	45

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของออกซีเตตราซัยคลิน	4
2.2	สาหร่ายที่พบในแหล่งน้ำ	12
2.3	ลักษณะทางชีววิทยาของสาหร่าย *Chlorella* sp	13
2.4	การเจริญเติบโตของสาหร่าย	16
3.1	พื้นที่ตารางสำหรับการนับเซลล์สาหร่าย	30
4.1	จำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาเมื่อเพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200, 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม	34
4.2	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาเมื่อเพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200, 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม	36
4.3	ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง ln (จำนวนเซลล์/มล.) $x10^4$ กับ เวลา (วัน) ในการทดลองที่ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200, 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม	38
4.4	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 5% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน	39
4.5	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 10% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน	40
4.6	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน	40
4.7	ลักษณะเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นความเข้มข้นต่างๆ	41
4.8	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่มีการเปลี่ยนแปลงตามเวลาในช่วง 72 ชั่วโมง	43

รูปที่ หน้า

4.9 เปรียบเทียบลักษณะเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลอง 44

4.10 ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และในน้ำที่ใช้ทดลองภายในเวลา 72 ชั่วโมง 45

4.11 ค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในเวลา 72 ชั่วโมง 46

4.12 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง ln (ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ) กับ เวลา 47

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันสภาพแหล่งน้ำที่เสื่อมโทรมเป็นปัญหาสำคัญ และมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มสูงขึ้นตามการพัฒนาของประเทศ โดยเฉพาะในพื้นที่ภูมิภาคตะวันตกของประเทศไทย เช่น จังหวัดนครปฐม ราชบุรี และสุพรรณบุรี ที่มีการทำฟาร์มเลี้ยงสัตว์อย่างแพร่หลาย เช่น ฟาร์มไก่ ฟาร์มกุ้ง และฟาร์มสุกร ซึ่งน้ำทิ้งจากฟาร์มเหล่านี้มักมีค่าความสกปรกค่อนข้างสูง และมีการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะรวมทั้งสารเคมีต่างๆ ที่เกษตรกรนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากภายในฟาร์มมีการเลี้ยงสัตว์อย่างแออัดจนทำให้สัตว์อ่อนแอ ป่วย และตายได้ง่าย จึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลาย

ออกซีเตตราซัยคลินเป็นยาปฏิชีวนะชนิดแรกที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหาร และยาแห่งสหรัฐอเมริกา (US. food and drug administration) (นพดล และคณะ, 2557) และประเทศไทยอนุญาตให้ใช้ในการควบคุม และรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำที่เป็นอาหารได้ (ชลอ, 2534) เนื่องจากออกซีเตตราซัยคลินเป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (คนาวรรณ, 2551) แต่หากมีการใช้ยาอย่างไม่ถูกต้องทั้งในด้านระยะเวลาและปริมาณที่กำหนดจะส่งผลทำให้จุลินทรีย์ และเชื้อโรคเกิดการดื้อยา รวมทั้งการปล่อยน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนออกซีเตตราซัยคลินออกสู่สิ่งแวดล้อม จะทำให้จุลินทรีย์ในธรรมชาติถูกทำลาย และเกิดการตกค้างในธรรมชาติ ทำให้ออกซีเตตราซัยคลินเข้าสู่ระบบห่วงโซ่อาหารและส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคในที่สุด

สาหร่ายเป็นแพลงก์ตอนพืชที่สำคัญในระบบนิเวศทางน้ำ โดยมีบทบาทเป็นผู้ผลิตในระบบห่วงโซ่อาหาร ช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนในแหล่งน้ำด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง นอกจากนั้นผิวหรือผนังเซลล์ของสาหร่ายยังช่วยดูดซับหรือสะสมสารต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Aksu and Tezer, 2005) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* เป็นกรณีตัวอย่างเพื่อศึกษาการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่าย เนื่องจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว ขนาดเล็กทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสมาก สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย และพบได้ในแหล่งน้ำทั่วไป นอกจากนี้ผนังเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ยังมีคุณสมบัติที่สามารถรับไอออนของสารต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังถูกนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์อย่างแพร่หลาย

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

1.2.2 เพื่อศึกษาจำนวนเซลล์เริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* เพื่อใช้ในการศึกษาการสะสมออกซีเตตราซัยคลิน

1.2.3 เพื่อศึกษาการรับ (uptake) และการสะสมของออกซีเตตราซัยคลินภายในเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris*

1.3 สมมติฐาน

เนื่องจากโมเลกุลของออกซีเตตราซัยคลินมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยไนโตรเจนจัดเป็นธาตุอาหารหลักที่สาหร่ายนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และมีผลต่อส่วนประกอบที่สำคัญของสารหลายชนิดภายในเซลล์ (สุนีรัตน์, 2459) การศึกษาที่ผ่านมา พบว่า สาหร่าย *Chlorella vulgaris* สามารถลดไนโตรเจนในน้ำเสียได้ดีถึง 71-79% (Megharaj *et al.*, 1992) ดังนั้นเมื่อสาหร่ายได้รับออกซีเตตราซัยคลินในปริมาณที่เหมาะสม อาจทำให้สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ แต่ถ้าได้รับในปริมาณที่มากเกินไป ก็อาจมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลงหรือเซลล์ถูกทำลาย

1.4 ขอบเขตการศึกษา

ในการทดลองทั้งหมดใช้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (exponential phase) เพื่อให้เซลล์แข็งแรงสามารถทนความเป็นพิษของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่มีความเข้มข้นสูง รวมทั้งสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ สำหรับขอบเขตการศึกษาของแต่ละการทดลองมีเพิ่มเติม ดังนี้

1.4.1 การทดลองผลของออกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ใช้ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลิน 4 ความเข้มข้น คือ 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร และใช้ความเข้มข้นของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น คือ 20% ของปริมาตรสารละลายทั้งหมด ส่วนการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ทำโดยการนับจำนวนเซลล์และหาน้ำหนักเซลล์แห้งที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้นต่างๆ ในเวลาทดลอง 7 วัน

1.4.2 การทดลองเพื่อหาจำนวนเซลล์เริ่มต้น สำหรับทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่าย ใช้ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร และจำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นความเข้มข้น 5, 10 และ 20% ของปริมาตรสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน โดยศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ ในเวลาทดลอง 7 วัน

1.4.3 การศึกษาการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ใช้ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร และความเข้มข้นของเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นที่ 10% ของปริมาตรสารละลายทั้งหมด โดยศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ ในเวลาทดลอง 72 ชั่วโมง ส่วนการศึกษาการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่าย ทำโดยวิเคราะห์ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่ายและในน้ำเพื่อคำนวณค่าการสะสม (bioconcentration factor)

1.4.5 การทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินภายใต้สภาวะเดียวกับการทดลองการสะสม (ไม่มีแสงและควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส) ใช้เวลาทดลองทั้งหมด 72 ชั่วโมง

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อเป็นแนวทางในการประเมินผลกระทบของออกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ซึ่งผลที่ได้อาจนำไปสู่การใช้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* เพื่อดูดซับออกซีเตตราซัยคลินที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ออกซีเตตราซัยคลิน

2.1.1 ความหมายและความสำคัญของยาปฏิชีวนะ

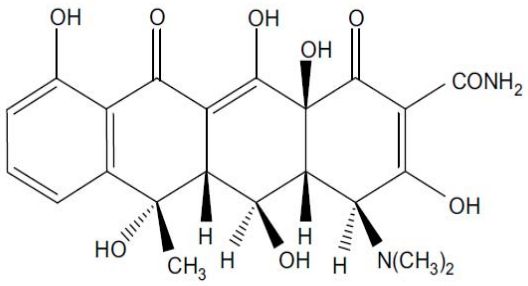
ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) หมายถึง สารประกอบเคมีที่ได้จากธรรมชาติหรือสังเคราะห์ขึ้นจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีผลในการต่อต้านหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งและขัดขวางการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

ปัจจุบันยาปฏิชีวนะถูกนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย และได้มีการพัฒนาตัวยาให้มีความเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปเพื่อให้ยามีประสิทธิภาพดีขึ้นออกซีเตตราซัยคลินเป็นยาปฏิชีวนะที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในการควบคุม และรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำที่เป็นอาหารได้ (ชลอ, 2534) แต่การใช้ยาอย่างไม่ถูกต้องทั้งระยะเวลา และปริมาณที่กำหนดจะมีผลทำให้จุลินทรีย์และเชื้อโรคเกิดการดื้อยาได้ (Levy *et al.*, 1976)

2.1.2 สมบัติทางกายภาพและเคมีของออกซีเตตราซัยคลิน

ออกซีเตตราซัยคลิน (oxytetracycline) เป็นสารประกอบธรรมชาติในกลุ่มเตตราซัยคลิน และเป็นยาที่ผลิตจากเชื้อรา *Streptomyces rimosus* โครงสร้างของออกซีเตตราซัยคลินเป็นวงแหวน ดังรูปที่ 2.1 มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{22}H_{24}N_2O_9$

ลักษณะทางกายภาพของออกซีเตตราซัยคลิน คือ เป็นผลึกสีเหลือง รสขม ไม่มีกลิ่น มีความไวต่อแสง ค่อนข้างเสถียรภายใต้อุณหภูมิ และความดันปกติ สามารถละลายน้ำได้ง่าย



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของออกซีเตตราซัยคลิน

ที่มา: Halling-Sørensen *et al*. (2002)

สมบัติทางเคมีของออกซีเตตราซัยคลิน คือ มีค่าการละลายน้ำ 230 – 52,000 มก./ลิตร และเมื่ออยู่ในรูป hydrochlorides จะละลายน้ำได้ดีกว่ารูปอื่น มีค่าการแตกตัวของสาร (pKa) อยู่ระหว่าง 3.3 – 9.9 สามารถดูดกลืนแสงยูวีได้สูงสุดในช่วง 270 – 360 นาโนเมตร สำหรับการออกฤทธิ์ของออกซีเตตราซัยคลิน พบว่า ออกซีเตตราซัยคลินสามารถออกฤทธิ์ได้ดีที่พีเอช (pH) ระหว่าง 5.5 - 6 แต่ระยะเวลาการออกฤทธิ์จัดอยู่ในกลุ่มที่ออกฤทธิ์สั้น คือ มีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 6 – 9 ชั่วโมงเท่านั้น และในสภาพแวดล้อมทั่วไป คือ ในแหล่งน้ำ และดิน ออกซีเตตราซัยคลินมีค่าครึ่งชีวิตอยู่ในช่วง 2-270 วัน (Halling-Sørensen *et al*., 2003) (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 สรุปสมบัติทางกายภาพและเคมีของออกซีเตตราซัยคลิน

สมบัติทางกายภาพและเคมี	
สูตรโมเลกุล	$C_{22}H_{24}N_2O_9$
ลักษณะทั่วไป	ลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อนจนถึงสีน้ำตาล ไม่มีกลิ่นหรือ มีกลิ่นเล็กน้อย เสถียรภายใต้อุณหภูมิและความดันปกติ ไวต่อแสง สลายตัวได้ง่ายในสภาวะที่เป็นกรดและเบสแก่
รูปแบบยา	ยารับประทาน ยาฉีด ยาขี้ผึ้ง
ชื่อทางการค้า	Terramycin
จุดหลอมเหลว	183 องศาเซลเซียส
น้ำหนักโมเลกุล	496.9
ค่าการแตกตัวของสาร (pKa)	3.3 – 9.9

2.1.3 กลไกการออกฤทธิ์ของออกซีเตตราซัยคลิน

ออกซีเตตราซัยคลินเป็นยาที่สามารถออกฤทธิ์ได้กว้างครอบคลุมแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด ซึ่งพบว่าสามารถออกฤทธิ์ได้ดีในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในปลาหลายชนิด โดยมีความไว (sensitive) ต่อเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Steptococcus, Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Anthracoides*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Corynebacteris*, *Salmonella* และกลุ่ม Coliforms อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรตัวโซบางชนิดได้อีกด้วย แต่จะมีความไวต่ำต่อแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Pseudomonas, Proteus* และ *Klebsiella* โดยออกซีเตตราซัยคลินจะไม่มีผลต่อจุลชีพพวกยีสต์ ราเมือก และเชื้อราอื่นๆ จากการศึกษาประสิทธิภาพ

ในการรักษาโรค และผลข้างเคียง พบว่า ออกซีเตตราซัยคลินมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการรักษาโรคได้เป็นอย่างดี (Oka *et al*., 2000)

ออกซีเตตราซัยคลินเป็นยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์เพื่อยับยั้งขบวนการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ มีผลทำให้เซลล์มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนลดลงหรือไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ โดยออกซีเตตราซัยคลินจะเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย ด้วยวิธีการลำเลียงทั้งแบบไม่ใช้พลังงาน (passive diffusion) และแบบใช้พลังงาน (active transport) แล้วเข้าจับกับแมกนีเซียมซึ่งอยู่ในพลาสม่าเมมเบรน จากนั้นจะเข้าไปอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์แล้วรวมตัวกับส่วน 30s ของไรโบโซม เกิดกระบวนการขัดขวางการเกาะของ aminoacyl t-RNA กับ ไรโบโซม ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ผิดปกติ นอกจากนั้นออกซีเตตราซัยคลินยังสามารถจับกับไอออนโลหะที่มีประจุ 2 บวก และ 3 บวก เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความคงตัว และไม่ละลายน้ำ ทำให้ถูกดูดซึมได้น้อยลง

ความเป็นพิษของออกซีเตตราซัยคลิน คือ ทำให้เกิดความผิดปกติ และมีผลกระทบต่อระบบต่างๆ ภายในร่างกาย เช่น อาการระคายเคืองต่อกระเพาะอาหาร คลื่นไส้อาเจียน ท้องเดิน คนที่แพ้จะมีอาการผื่นคัน แพ้แดดง่ายกว่าปกติ ในเด็กที่อายุต่ำกว่า 8 ขวบ และเด็กทารกนั้นพบว่ายาสามารถจับกับฟันทำให้ฟันมีสีเหลืองหรือดำอย่างถาวร และยับยั้งการเจริญของกระดูก รวมทั้งทำให้การพัฒนาของสมองลดลงจนถึงขั้นปัญญาเสื่อม (คนาวรรณ, 2551) อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อการทำงานของตับ และไตได้อีกด้วย

2.1.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลิน

ปัจจัยที่ทำให้ออกซีเตตราซัยคลินสลายตัวในสภาวะแวดล้อม คือ ค่าพีเอช (pH) ของตัวกลาง เช่น น้ำและดิน อุณหภูมิ และความเข้มแสง ส่วนปฏิกิริยาสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลิน ได้แก่ (คนาวรรณ และคณะ, 2547)

1) ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) คือ ปฏิกิริยาที่สารเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน (e^-) โดยการทำปฏิกิริยาของออกซีเตตราซัยคลินกับออกซิเจนในบรรยากาศ ซึ่งจะทำให้โมเลกุลของออกซีเตตราซัยคลินสูญเสียอิเล็กตรอน (e^-) จึงไม่เสถียร โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของสารอนุมูลออกซิเจนอิสระ และตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะทำให้เกิดการสลายตัวช้าลง

2) ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) คือ ปฏิกิริยาการสลายตัวของสารเมื่อมีน้ำเป็นตัวทำปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยาการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินเกิดขึ้นเมื่อสารอยู่ร่วมกับโมเลกุลของน้ำ โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และค่าพีเอช (pH) ร่วมด้วย ซึ่งจะทำให้เกิดไฮโดรเนียมไอออน (hydronium ion, H^+) หรือไฮดรอกไซด์ไอออน (hydroxide ion, OH^-)

3) ปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยแสง (photodissociation) คือ ปฏิกิริยาของยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตราซัยคลินที่มี Cl ตำแหน่งที่ 7 มีความสามารถในการดูดกลืนคลื่นแสงในช่วง visible region กลายเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดนั้นจะส่งผลทำให้ออกซีเตตราซัยคลินเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ง่าย

สำหรับการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินนั้นส่วนใหญ่เกิดจาก ปฏิกิริยาโฟโตไลซีสและไฮโดรไลซีส (Halling-Sørensen *et al*., 2003)

4) สภาวะค่าพีเอช (pH) ของตัวกลาง เช่น ค่าพีเอช (pH) ของน้ำหรือดินจะทำให้เกิด H^+ ที่เข้าทำปฏิกิริยากับ OH- ในโมเลกุลของออกซีเตตราซัยคลิน ส่งผลให้ออกซีเตตราซัยคลินไม่คงสภาพทางเคมี โดยออกซีเตตราซัยคลินจัดเป็นสารประกอบที่อยู่ในรูป zwitterions คือเป็นสารที่มีทั้งแคตไอออนและแอนไอออน ซึ่งการแตกตัวจะขึ้นอยู่กับค่าพีเอช (pH) ของสารละลายหรือสภาวะของตัวกลาง

2.1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลิน

การศึกษาของ Doi and Stoskopf (2000) ได้รายงานผลการทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินระดับห้องปฏิบัติการ โดยควบคุมสภาวะต่างๆ เช่น ค่าพีเอช (pH) อุณหภูมิ และความเข้มแสง ผลการทดลองพบว่า ออกซีเตตราซัยมีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และสลายตัวเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นที่ 43 องศาเซลเซียส เมื่อออกซีเตตราซัยคลินสัมผัสกับแสงโดยตรงจะทำให้อัตราการสลายตัวเพิ่มสูงขึ้นถึงสามเท่า เมื่อเทียบกับสภาวะไม่มีแสง

การศึกษาของ Pouliquen *et al*. (2007) ซึ่งทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ 3 ชนิด คือ น้ำปราศจากไอออน น้ำจืด และน้ำทะเล พบว่า ออกซีเตตราซัยคลินเกิดการสลายตัวด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และการสลายตัวด้วยแสง (photodissociation) ประมาณ 70% ในวันที่ 14 ของการทดลอง ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส

การศึกษาของ Choo (1994) ได้ทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำจืดภายใต้สภาวะที่มีแสงจากธรรมชาติ pH 7.3-7.9 และอุณหภูมิเฉลี่ย 27 องศาเซลเซียส พบว่า มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) เท่ากับ 58 ชั่วโมง

การศึกษาของ Samuelsen (1989) ได้ทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินภายใต้สภาวะที่มีแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่อุณหภูมิ 15 และ 4 องศาเซลเซียส พบว่า มีค่าครึ่งชีวิต (half- life) เท่ากับ 128 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อทำการทดลองภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงพบว่า ที่อุณหภูมิ 15 และ 4 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิต (half- life) สูงขึ้นเป็น 234 และ 390 ชั่วโมง ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าออกซีเตตราซัยคลินเกิดการสลายตัวได้ช้าลง เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีแสงและอุณหภูมิต่ำ

กล่าวคือ ออกซีเตตราซัยคลินเกิดการสลายตัวในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ด้วยปัจจัยที่สำคัญ เช่น อุณหภูมิและแสง จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง สรุปได้ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สรุปการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินที่สภาวะต่างๆ

สภาวะ	ค่าครึ่งชีวิต (half-life)	ที่มา
อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส	0.26±0.11 วัน	Doi and Stoskopf (2000)
อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่มีแสง	14.04±5.41วัน	
ค่าพีเอช (pH) 10.0	9.08±4.22 วัน	
ค่าพีเอช (pH) 3.0	46.36±4.92 วัน	
อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีแสง	128 ชั่วโมง	Samuelsen (1989)
อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ไม่มีแสง	234 ชั่วโมง	
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่มีแสง	360 ชั่วโมง	
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีแสง	168 ชั่วโมง	
อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ไม่มีแสง	5.5 วัน	Wassef (1983)

2.1.6 การใช้ประโยชน์ของออกซีเตตราซัยคลิน

ออกซีเตตราซัยคลินถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อต่างๆ เช่น โรคระบบทางเดินหายใจ และโรคทางเดินปัสสาวะ (คนาวรรณ, 2551) ในการเลี้ยงสัตว์ เช่น ไก่ และสุกร อีกทั้งในการทำฟาร์มเลี้ยงสัตว์ดังกล่าว มักมีการใช้ออกซีเตตราซัยคลินเพื่อเร่งการเจริญเติบโตหรือเป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ (feed additive) การที่ออกซีเตตราซัยคลินเป็นสารต้านจุลชีพที่ได้รับอนุญาตให้ใช้อย่างถูกกฎหมาย จึงมีการกำหนดค่ามาตรฐานของออกซีเตตราซัยคลินตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์ที่ปลอดภัย และนำมาบริโภคได้ (maximum residue limit, MRL) โดยประเทศญี่ปุ่น ได้กำหนดค่า MRL ไว้ที่ 0.05 มก./ลิตร และสหภาพยุโรปกำหนดค่า MRL เท่ากับ 0.01 มก./ลิตร ส่วนการรับรองมาตรฐานฟาร์มระดับ good agricultural practices (GAP) ได้กำหนดค่าออกซีเตตราซัยคลินที่ตกค้างในเนื้อสัตว์น้ำ เช่น ปลาและกุ้งกุลาดำ ไว้ต้องไม่เกิน 0.2 มก./ลิตร

2.2 แหล่งที่มาของออกซีเตตราซัยคลิน

ออกซีเตตราซัยคลินถูกพบว่ามีปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น น้ำเสีย น้ำผิวดิน น้ำใต้ดิน ตะกอนดิน และผิวดิน การที่เป็นเช่นนี้เพราะสิ่งมีชีวิตทั้งคน และสัตว์เลี้ยงต่างๆ เช่น ไก่ และสุกร สามารถดูดซึมออกซีเตตราซัยคลินได้น้อย และขับออกมาพร้อมกับของเสียในร่างกายได้สูงถึง 75% เมื่อของเสียถูกปล่อยออกมากับน้ำทิ้ง จึงทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของออกซีเตตราซัยคลินในสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีแหล่งที่มาที่สำคัญ ดังนี้

2.2.1 น้ำทิ้งชุมชนและสถานพยาบาล

แหล่งชุมชนและสถานพยาบาล เป็นแหล่งที่มีการใช้ออกซีเตตราซัยคลินค่อนข้างมาก ทำให้มีการปล่อยน้ำทิ้งที่มีออกซีเตตราซัยคลินปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อม Kümmerer (2004) รายงานว่าออกซีเตตราซัยคลินอาจมีผลทำให้จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ *Streptococus pneumoniae, Aeromonas* sp., *Acenitobacter* spp. และ *E.coli* เกิดการดื้อยา

2.2.2 การเกษตรและการเพาะเลี้ยงสัตว์

อัตราการเกิดโรคและการแพร่ระบาดของโรค ในสัตว์เลี้ยงทำให้เกษตรกรจำเป็นต้องใช้ออกซีเตตราซัยคลินเพื่อการรักษา และป้องกันโรค McEwen and Fedorka-Cray (2002) รายงานว่ามีการใช้เตตราซัยคลินรักษาโรคระบาดจากแบคทีเรีย เช่น โรคเรืองแสง และโรคตายเดือน Loke *et al.* (2002) รายงานว่า มูลสุกรมีการปนเปื้อนออกซีเตตราซัยคลินค่อนข้างสูงตั้งแต่ 33 – 2,000 มก./กรัม

งานวิจัยของ เพชรรัตน์ และคณะ (2549) ที่ศึกษาการตกค้างของคลอเตตราซัยคลิน และออกซีเตตราซัยคลิน ในอาหารสัตว์ของจังหวัดราชบุรี และนครปฐม พบว่า มีการปนเปื้อนออกซีเตตราซัยคลินในอาหารสุกรสูงถึง 337.29 และ 329.12 มก./ลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณยาที่ตรวจพบนี้อยู่ในระดับที่สูง จนก่อให้เกิดการตกค้างหรือสะสมในเนื้อสัตว์ และส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคได้

การศึกษาของ มณฑิรา และคณะ (2551) ได้ทำการตรวจติดตามการปนเปื้อนออกซีเตตราซัยคลิน จากตัวอย่าง กุ้ง ปู และปลา จำนวน 27 ชนิด ที่อาศัยในแหล่งน้ำบริเวณใกล้เคียงฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์ พบว่า มีการปนเปื้อนของออกซีเตตราซัยคลินในปริมาณ 0.01-0.1 ไมโครกรัม/กรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทำฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์ เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อม และสะสมในสิ่งมีชีวิตได้

2.3 การสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสิ่งมีชีวิต

ออกซีเตตราซัยคลินสามารถเข้าไปสะสม (accumulation) ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้เกือบทุกชนิด โดยการสะสมเกิดขึ้นจากกระบวนการดูดซึมสารเมื่อความเข้มข้นของสารที่รับเข้าไปในเซลล์สูงกว่าความเข้มข้นของสารที่ขับออกมาสู่ภายนอก การสะสมสารในสิ่งมีชีวิตเกิดได้หลายทาง เช่น สัตว์น้ำได้รับสารทางเหงือก เมมเบรนหรือเยื่อบุผิว (epithelial tissue) ส่วนพืชสามารถดูดซับสารผ่านทางรากลำต้น และใบ

การสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งสามารถส่งผลไปยังสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นหรือผู้บริโภคในระบบห่วงโซ่อาหารลำดับถัดไปได้ โดยขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม และสมบัติทางกายภาพและเคมีของสาร เนื่องจากออกซีเตตราซัยคลินมีค่าการแตกตัว และประจุที่เปลี่ยนแปลงตามค่าพีเอช (pH) ของสิ่งแวดล้อม การสะสมออกซีเตตราซัยคลินจึงเปลี่ยนแปลงได้จากสภาพแวดล้อม

การวัดการสะสมแสดงโดยค่าการสะสม (bioconcentration factor) ซึ่งคำนวณจากความเข้มข้นของสารภายในเซลล์หรือสิ่งมีชีวิต (C_B) ต่อ ความเข้มข้นของสารในสิ่งแวดล้อมภายนอก (C_M) เรียกว่า ค่าการสะสม (accumulation factor, BCF หรือ BAF) การสะสมเกิดได้ทั้งในเซลล์ของพืชชั้นสูงและสิ่งมีชีวิตทุกชนิด

สำหรับการศึกษาการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในพืช ได้แก่ การศึกษาของ Boxall *et al*. (2006) ที่ทดลองการสะสมยากลุ่มเตตราซัยคลินในกระหล่ำปลี และแครอท พบว่า ออกซีเตตราซัยคลินมีผลทำให้การเจริญเติบโตของกระหล่ำปลี และแครอทลดลง ส่วนงานวิจัยของ Kong *et al*. (2007) พบว่า ออกซีเตตราซัยคลินมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นอัลฟาฟ่า โดยทำให้ลำต้น และรากมีการเจริญเติบโตช้าลงถึง 61 และ 85% ตามลำดับ

นอกจากนี้การศึกษาของ Boonsaner and Hawker (2010) พบว่า การสะสมของออกซีเตตราซัยคลินในต้นถั่วเหลือง ต้นธูปฤาษี และต้นเหงือกปลาหมอ มีค่าการสะสม (bioconcentration factor, BCF) แตกต่างกันโดยพบว่า ต้นถั่วเหลือง มีค่า BCF สูงสุด คือ 41.55 ลิตร/กก.น้ำหนักแห้ง และสรุปว่าต้นถั่วเหลืองสามารถดูดซับออกซีเตตราซัยคลินได้ดีกว่าต้นธูปฤาษี และต้นเหงือกปลาหมอ

สำหรับตัวอย่างงานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในพืชน้ำ ได้แก่ งานวิจัยของ Ferreira *et al*. (2007) ที่ศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของออกซีเตตราซัยคลินต่อสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Tetraselmis chuii* ที่ระดับความเข้มข้น 3.6 ถึง 18 มก./ลิตร พบว่า ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินมีผลต่อการเจริญเติบโต และทำให้จำนวนเซลล์สาหร่ายลดลงเท่ากับ 11.18 มก./ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pro *et al*. (2003) ที่ศึกษาผลของออกซีเตตราซัยคลินต่อแหน *Lemna minor* และสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่ความเข้มข้น 0.01 ถึง 100 มก./ลิตร เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ผลการทดลอง พบว่า EC_{50} (effective concentration) คือ ความเข้มข้นที่ทำให้เกิด

การตอบสนองด้วยการตายหรือมีการเจริญเติบโตลดลง 50% ของออกซีเตตราซัยคลินในแหน *Lemna minor* และสาหร่าย *Chlorella vulgaris* เท่ากับ 4.92 และ 6.4 มล./ลิตร ตามลำดับ

ผลการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิด และคุณสมบัติของพืช อีกทั้งการตกค้างของออกซีเตตราซัยคลินในแหล่งน้ำจะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้นในระดับที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณออกซีเตตราซัยคลินที่ตรวจพบในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

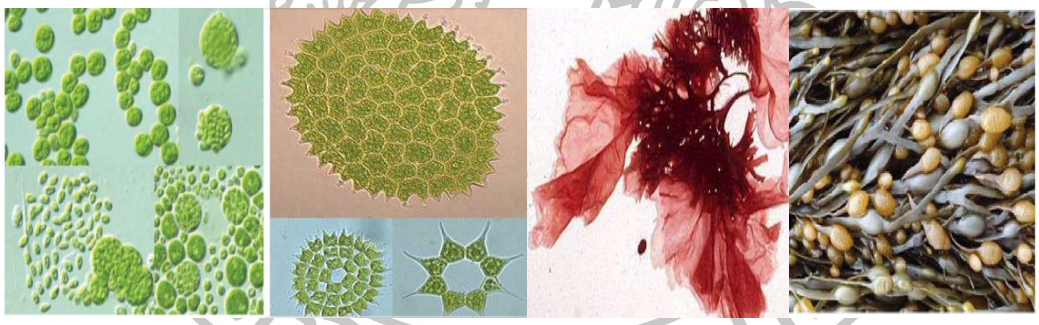
สิ่งมีชีวิต		ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลิน (มก./ลิตร)	ที่มา
กลุ่ม (group)	ชนิด (species)		
สาหร่าย	*Tetraselmis chuii*	11.18	Ferreira *et al*. (2007)
	Chlorella vulgaris	7.05	Eguchi *et al.* (2004)
		< 3.58	Eguchi *et al.* (2004)
		6.40	Pro *et al.* (2003)
	Microcystis aeruginosa	0.20	Lüzhøft *et al.* (1999)
โรติเฟอร์	*Brachionus calyciflorus*	1.87	Isidori *et al.* (2005)
แบคทีเรีย	*Vibrio fischeri*	64.50	Isidori *et al.* (2005)
แหน	*Lemna minor*	4.92	Pro *et al.* (2003)
	Lemna gibba	1.15	Brain *et al.* (2004)
ปลา	*Oryzias latipes*	215.4	Park and Choi (2008)
สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง	*Daphnia magna*	22.64	Isidori *et al.* (2005)
	Hydra attenuata	>100	Quinn *et al.* (2008)

2.4 สาหร่าย (algae)

สาหร่าย (algae) เป็นทรัพยากรทางชีวภาพที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อม เป็นผู้ผลิตขั้นปฐมภูมิ (primary producer) ที่มีความสำคัญต่อระบบห่วงโซ่อาหาร (food chain) สาหร่ายถูกจัดเป็นพืชชั้นต่ำเนื่องจากไม่มีส่วนของราก ลำต้น และใบที่แท้จริง มีตั้งแต่ขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จนถึงขนาดใหญ่ที่มีลักษณะคล้ายพืช (รูปที่ 2.2)

สาหร่ายเจริญเติบโตได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็มมีกระบวนการสังเคราะห์แสงคล้ายพืชชั้นสูง คือ ใช้คลอโรฟิลล์เอ รับพลังงานจากแสงแดด และปลดปล่อยออกซิเจนให้กับสิ่งแวดล้อม สาหร่ายไม่มีเนื้อเยื่อที่แท้จริง ไม่มีระบบท่อลำเลียง แต่มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ อวัยวะสืบพันธุ์ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว และไม่มีชั้นของเซลล์อื่นมาห่อหุ้ม

การจำแนกสาหร่ายออกเป็นหมวดหมู่ทำโดยใช้ลักษณะสำคัญเป็นเกณฑ์ เช่น รงควัตถุ ได้แก่ การแบ่งตามรูปร่างลักษณะภายนอกหรือสีที่ปรากฏ เช่น สาหร่ายสีเขียว สีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นต้น หรืออาจจำแนกสาหร่ายตามอาหารที่สะสมภายในเซลล์ จำนวน ชนิด ตำแหน่ง ขนาด และความยาวของ flagellum และโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์ เป็นต้น



(ก) (ข) (ค) (ง)

รูปที่ 2.2 สาหร่ายที่พบในแหล่งน้ำ (ก) *Chlorella* sp. (ข) *Pediastrum* sp. (ค) *Porphyra* sp. (ง) สาหร่ายทุ่น

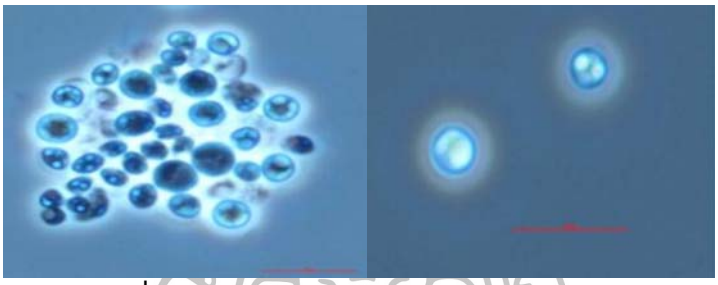
ที่มา: ปิยรัตน์ (2554)

2.4.1 สาหร่าย *Chlorella* sp.

2.4.1.1 ลักษณะทางชีววิทยา

คลอเรลลา (Chlorella) ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1890 โดยนักจุลชีววิทยาชาวดัตช์ เอ็ม ดับพลิว ไบเจอร์นิค และได้ทำการตั้งชื่อจากภาษากรีกกับภาษาลาตินรวมกันสองคำ คือ คลอโรส (chloros) แปลว่า สีเขียว และเอลล่า (ella) แปลว่า เล็ก (Kuhl and Lorenzen,

1963) สาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวขนาดเล็ก มีรูปร่างเซลล์หลากหลายรูปแบบ เช่น ทรงกลม กลมรี รูปไข่ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-10 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.3) มีกระบวนการสังเคราะห์แสงคล้ายพืชดอก สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างออโตสปอร์ (autospore) จากเซลล์แม่ (mother cell) (ลัดดา, 2542) สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายและรวดเร็วภายใต้ภาวะที่ไม่ต้องควบคุม



รูปที่ 2.3 ลักษณะทางชีววิทยาของสาหร่าย *Chlorella* sp.
ที่มา: Månsson (2012)

คลอเรลลา (Chlorella) จัดอยู่ในลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้ (Steenblock, 1987)

Kingdom: Flora
Division: Chlorophyta
Class: Trebouxiophyceae
Order: Chlorellales
Family: Chlorellaceae
Genus: *Chlorella*
Species: *Chlorella* sp.

2.4.2 องค์ประกอบของเซลล์

สาหร่าย *Chlorella* sp. จัดเป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวขนาดเล็ก ภายในเซลล์ประกอบด้วยคลอโรพลาสต์ (chloroplast) และ องค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่

2.4.2.1 ผนังเซลล์

ผนังเซลล์ประกอบด้วยสารพวกคาร์โบไฮเดรต ลักษณะผนังเซลล์แบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ผนังชั้นใน (inner layer) ที่ประกอบด้วยสารพวกเซลลูโลส และผนังชั้นนอก (outer layer) เป็นสารประกอบโพลีเมอร์ที่สามารถจับกับโลหะหนักหรือสารพิษได้อย่างรวดเร็ว

2.4.2.2 คลอโรพลาสต์

คลอโรพลาสต์มีรูปร่างต่างๆ ในคลอโรพลาสต์มีไพรีนอยด์เป็นแหล่งสะสมอาหาร และภายในคลอโรพลาสต์มีรงควัตถุหลายชนิดเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสง ได้แก่

1) คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี เป็นรงควัตถุสังเคราะห์แสงขั้นต้น (primary photosynthetic pigment) สามารถดูดกลืนแสงได้เอง ส่วนคลอโรฟิลล์ บี เป็นรงควัตถุสังเคราะห์แสงขั้นสอง (secondary photosynthetic pigment) ทำหน้าที่ดูดกลืนพลังงานแสงแล้วส่งต่อไปยังคลอโรฟิลล์ เอ โดยปริมาณคลอโรฟิลล์ที่พบในสาหร่ายมีประมาณ 0.5-1.5 % น้ำหนักแห้ง

2) แคโรทีน มีลักษณะเป็นสารสีส้ม อยู่ในกลุ่มของสารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีออกซิเจน (oxygen free hydrocarbon)

3) แซนโทฟิลล์หรือออกซิแคโรทีน มีลักษณะเป็นสารสีเหลือง มีหลายชนิด โดยเฉพาะลูเทอีน ไวโอลาแซนติน และนีโอแซนติน

2.4.2.3 อาหารสะสม

สาหร่าย *Chlorella* sp. มีการสะสมอาหารไว้ภายในไพรีนอยด์ในรูปของแป้ง พวกอะไมโลส และอะไมโลเพกติน

2.4.2.4 ส่วนประกอบทางเคมีภายในเซลล์

ภายในเซลล์ของสาหร่ายประกอบด้วย ส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญ และมีคุณค่าทางอาหารสูงหลายชนิด ได้แก่ โปรตีน 51-58% ไขมัน 2-22% คาร์โบไฮเดรต 12-26% และกรดนิวคลีอิค 4-5 % ต่อน้ำหนักแห้ง (ลัดดา, 2543) นอกจากนั้นยังมี วิตามิน เกลือแร่ ไฟเบอร์ เอนไซม์และสารกระตุ้นการเจริญ (chlorella growth factor) (วิสัย, 2534)

2.4.3 แหล่งที่พบ

สาหร่าย *Chlorella* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ในแหล่งที่มีความเข้มข้นของสารอาหารในช่วงกว้าง พบได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย ทั้งในสภาพน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม (Richmond, 1986) รวมทั้งบริเวณพื้นดินที่เปียกและกำแพง บางชนิดอาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น พารามีเซียม และไลเคนส์

2.4.4 การสืบพันธุ์ของสาหร่าย

สาหร่ายมีการเจริญเติบโต (growth) และการเจริญพันธุ์ (reproduction) ด้วยกระบวนการแบ่งเซลล์โดยทั่วไปเซลล์สาหร่ายมีการเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งตัวจาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์ (binary fission) และเป็นการแบ่งเซลล์ตามขวาง (transverse fission) ผลของการแบ่งเซลล์ (cell division) จะได้เซลล์ลูกที่มีลักษณะเหมือนกับเซลล์แม่ทุกประการ

2.5 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

การเจริญเติบโตของสาหร่าย หมายถึง การเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์หรือมวลชีวภาพ (biomass) ของประชากรต่อหนึ่งหน่วยเวลา เรียกว่า อัตราการเจริญเติบโต (growth rate) จากการศึกษาของ Collet *et al*., (2011) พบว่า สาหร่าย *Chlorella vulgaris* มีอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) 25 กรัม/ตร.ม/วัน สำหรับเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนประชากรจากเดิมเป็นสองเท่า เรียกว่า generation time ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์

กราฟที่แสดงการเจริญเติบโตของสาหร่ายมีลักษณะโค้งคล้ายรูปตัว “S” (sigmoid curve) โดยการเจริญเติบโตแบ่งออกเป็น 5 ระยะ (รูปที่ 2.4) ได้แก่

2.5.1 ระยะปรับตัว (lag phase or induction phase)

เป็นเพียงระยะเวลาสั้นๆ ที่สาหร่ายจะมีการปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ ยังไม่มีการเพิ่มจำนวน โดยเซลล์จะมีการปรับทางสรีรวิทยาต่างๆให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม

2.5.2 ระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (exponential phase)

เป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มมากขึ้น จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นแบบ Exponential

2.5.3 ระยะเฉื่อย (phase of declining relative growth)

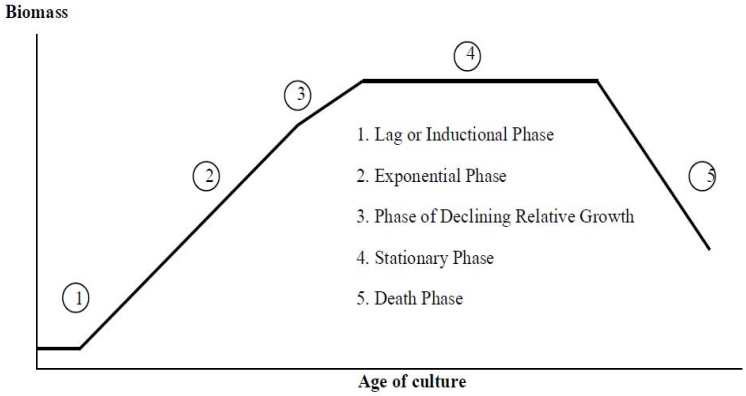
เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งเซลล์ช้าลง เนื่องจากปัจจัยทางกายภาพและเคมีที่ใช้ในการเจริญเติบโตลดลงหรือมีการเปลี่ยนแปลง เช่น สารอาหาร แสง และค่าพีเอช (pH) เป็นต้น

2.5.4 ระยะคงที่ (stationary phase)

เป็นระยะที่มีจำนวนเซลล์สูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อีก โดยมีอัตราการแบ่งเซลล์เท่ากับอัตราการตาย เนื่องจากเป็นช่วงที่สารอาหารถูกใช้ไปจนเกือบหมด ไม่เพียงพอต่อจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น

2.5.5 ระยะการตาย (death phase)

เป็นระยะที่เซลล์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ความหนาแน่นของเซลล์และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลง เนื่องจากสารอาหารหมดไปและสภาวะต่างๆขาดคลาดไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์



รูปที่ 2.4 การเจริญเติบโตของสาหร่าย

ที่มา: ลัดดา (2543)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย

2.6.1 สารอาหาร

สาหร่ายมีความต้องการสารอาหารในปริมาณค่อนข้างสูง เพื่อนำไปใช้เป็นโครงสร้างของเซลล์และกระบวนทางเคมีที่สำคัญ ธาตุอาหารหลักที่ต้องการ ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และโปตัสเซียม ส่วนธาตุอาหารรองจะมีส่วนช่วยในกระบวนการสังเคราะห์แสงและเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ภายในเซลล์ (Boyd, 1990)

2.6.1.1 คาร์บอน

คาร์บอนมีความสำคัญต่อกระบวนการสังค์เคราะห์แสง โดยสาหร่ายสามารถใช้คาร์บอนได้ทั้งในรูปสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ สาหร่ายแต่ละชนิดต้องการปริมาณสารคาร์บอนแตกต่างกัน โดยทั่วไปสาหร่ายมีความต้องการอินทรีย์คาร์บอนเมื่ออยู่ในสภาพไร้อากาศ (anaerobic condition) หรือในสภาวะที่ไม่มีแสง (ลัดดา, 2543)

2.6.1.2 ไนโตรเจน

ไนโตรเจนมีความสำคัญเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ โดยไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกรดอะมิโน โปรตีนและเอนไซม์ อีกทั้งยังมีผลต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่าย โดยสาหร่ายมีปริมาณไนโตรเจนประมาณ 1-10% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง หากขาดสารประกอบไนโตรเจนหรือมีปริมาณจำกัด จะมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง ปริมาณรงควัตถุของเซลล์และการทำงานของเอนไซม์บางชนิดลดลง โดยในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนสาหร่ายจะมีการสร้างสารประกอบคาร์บอนขึ้นมาทดแทน เช่น แป้งหรือน้ำมัน (Widjaja *et al*., 2009)

2.6.1.3 ฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสมีความสำคัญเกี่ยวกับกระบวนการเคลื่อนย้ายพลังงาน และการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก รวมทั้งทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ควบคุมค่าพีเอช (pH) ภายในเซลล์การขาดฟอสฟอรัสจะมีผลทำให้ปริมาณโปรตีน และคลอโรฟิลล์ลดลง

2.6.2 แสง

แสงเป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมภายนอกที่มีความสำคัญต่อการเจริญของสาหร่าย สภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่เหมาะสม คือ การให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนส์ เพราะมีอุณหภูมิไม่สูงเมื่อเทียบกับหลอดชนิดอื่น (ลัดดา, 2543) นอกจากนี้ควรมีการควบคุมความเข้มแสงและช่วงเวลาการให้แสงกับการหยุดให้แสงที่เหมาะสม โดยช่วงเวลาการให้แสงที่นิยม คือ 16 ชั่วโมง/วัน กระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย *Chlorella* sp. มักเกิดขึ้นในสภาวะความเข้มแสงต่ำประมาณ 3,000 ลักซ์ และความยาวคลื่นในช่วง visible (ชาญชัย, 2543) การได้รับแสงความเข้มข้นสูงเป็นเวลานานอาจยับยั้งกระบวนการหายใจของเซลล์ และทำให้เม็ดสีถูกทำลาย

2.6.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ และการทำงานของเอนไซม์ สาหร่ายแต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม และทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้ต่างกัน การศึกษาของธิดา (2542) พบว่า สาหร่าย *Chlorella* sp. ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิตั้งแต่ 35 องศาเซลเซียส ขึ้นไปจะทำให้เซลล์มีสีซีด และไม่สามารถเจริญเติบโตได้

2.6.4 ค่าพีเอช (pH)

การทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์สาหร่าย *Chlorella* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ที่ค่าพีเอช (pH) ในช่วงกว้าง และจะเจริญเติบโตได้ดีในช่วงที่มีค่าพีเอช (pH) เป็นกรดเล็กน้อยจนถึงกลาง

2.7 การวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย (growth measurement)

การวัดมวลชีวภาพหรืออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย วัดได้หลายวิธี ดังนี้

2.7.1 การนับเซลล์ (cell counting)

วิธีการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemacytometer เป็นการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยตรง มีความสะดวก รวดเร็ว และให้ผลการทดลองที่ค่อนข้างแม่นยำ เนื่องจากพื้นที่ของสไลด์จุน้ำได้ในปริมาตรที่แน่นอน สามารถใช้นับได้ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต วิธีนี้เหมาะสม และเป็นที่นิยมสำหรับการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็ก ตั้งแต่ 0.5 – 10 ไมครอน (ขจรเกียรติ์, 2552)

2.7.2 การวัดความขุ่น (optical density measurement)

เป็นการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่ายจากความหนาแน่นของเซลล์สาหร่าย โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer การวัดอาศัยหลักการการดูดกลืนคลื่นแสงโดยปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืน และกระจายออกจะเป็นสัดส่วนความหนาแน่นของเซลล์การวัดโดยวิธีนี้มีข้อดี คือ สะดวก และรวดเร็ว แต่มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถแยกเซลล์ที่มีชีวิตหรือไม่มีชีวิตได้

2.7.3 การวัดน้ำหนักแห้ง (dry weight determination)

วิธีนี้เป็นการวัดเพื่อหามวล (mass) ของเซลล์ ซึ่งจะแปรผันไปตามจำนวนเซลล์ วิธีนี้ต้องไม่มีสารอื่นปะปน และต้องทำให้เซลล์แห้งจนมีน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลานาน เหมาะสำหรับงานวิจัยเท่านั้น

2.8 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย (algal cultivation)

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมตามสายพันธุ์หรือชนิดของสาหร่าย การเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยทั่วไปแบ่งได้ดังนี้

2.8.1 แบ่งตามสภาวะแวดล้อม

การเพาะเลี้ยงโดยแบ่งตามสภาวะที่ใช้มี 3 สภาวะ ดังนี้

1) การเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิค (autotrophic) เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้การให้แสง (light) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งสาหร่ายจะมีการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างสารชีวเคมีต่างๆ

2) การเพาะเลี้ยงแบบเฮทเทอโรโทรฟิค (heterotrophic) เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้สารประกอบอินทรีย์ (organic compounds) เช่น กลูโคส ซูโครส ฟรุกโตส และอะซิเตท เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนในสภาวะมืด (Sansawa and Endo, 2004)

3) การเพาะเลี้ยงแบบมิกโซโทรฟิค (mixotrophic) เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้สารประกอบอินทรีย์คาร์บอน (organic carbon) ภายใต้สภาวะที่มีการให้แสง

2.8.2 แบ่งตามระบบน้ำ

การเพาะเลี้ยงโดยแบ่งตามระบบน้ำที่ใช้ได้เป็น 2 ระบบ ดังนี้

1) ระบบน้ำสะอาด เป็นระบบการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมธาตุอาหารลงไปในระบบการเพาะเลี้ยงวิธีนี้จะใช้เพื่อเป็นอาหารสำหรับมนุษย์

2) ระบบน้ำทิ้งจากบ้านเรือนหรือโรงงานอุตสาหกรรม เป็นระบบที่ไม่มีการเติมธาตุอาหารและแหล่งคาร์บอน แต่สาหร่ายจะใช้น้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำทิ้งเป็นอาหาร

2.9 ประโยชน์และความสำคัญของสาหร่าย *Chlorella* sp.

สาหร่าย *Chlorella* sp. สามารถสะสมสารอาหารในรูปแบบต่างๆ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และวิตามิน ทั้งยังสามารถเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย จึงมีการนำสาหร่าย *Chlorella* sp. ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น

1) ด้านระบบนิเวศ สาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นผู้ผลิตขั้นต้น (producer) ในห่วงโซ่อาหารของระบบนิเวศทางน้ำ และเป็นอาหารของตัวอ่อนแมลง กุ้ง และปลา เป็นต้น

2) ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม สาหร่าย *Chlorella* sp. มีสารที่มีคุณสมบัติที่สำคัญ ได้แก่ สารต้านเซลล์มะเร็ง และช่วยรักษาแผลในกระเพาะอาหาร เป็นต้น

3) ด้านอาหาร สาหร่าย *Chlorella* sp. ถูกนำมาบริโภคและเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าผักและธัญพืช รวมทั้งเบต้า-คาโรทีน ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

4) ด้านการจัดการสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันได้มีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากสาหร่ายสามารถใช้สารอาหารหรือแร่ธาตุที่ปนเปื้อนในน้ำเสียเพื่อการเจริญเติบโตได้ดี รวมทั้งเป็นผู้ผลิตออกซิเจนให้กับแหล่งน้ำทำให้น้ำมีคุณภาพดีขึ้น นอกจากนี้ผนังเซลล์ยังมีคุณสมบัติพิเศษสามารถดูดซับสารพิษได้

5) ด้านพลังงานทดแทน ปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาการผลิตน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก เนื่องจากมีข้อดี คือ ใช้พื้นที่น้อย ระยะเวลาสั้น ควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงได้ง่าย โดยเฉพาะสาหร่าย *Chlorella* sp. ที่มีองค์ประกอบของไลปิดสูงประมาณ 20-50% โดยน้ำหนักแห้ง (Spolaore *et al*., 2006) ซึ่งสามารถนำน้ำมันจากสาหร่าย (microalgae oil) ไปใช้ประโยชน์เพื่อผลิตเป็นพลังงานทดแทนหรือไบโอดีเซลได้ (Xu *et al*., 2006)

2.10 กระบวนการสะสมและกำจัดมลสารโดยสาหร่าย

การสะสมสารภายในเซลล์เกิดขึ้นเมื่อปริมาณการดูดซับหรือการสะสมสารเข้าสู่ภายในเซลล์มากกว่าการกำจัดออก เมื่อสารถูกนำเข้าสู่ภายในเซลล์จะถูกเก็บสะสมไว้ภายในไซโทพลาสซึมหรือออร์กาแนลล์ต่างๆ เช่น ไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ ออกซีเตตราซัยคลินบางส่วนจะถูกทำให้เสื่อมสภาพหรือเปลี่ยนแปลงรูปแล้วขับออกภายนอกเซลล์ ในขณะที่บางส่วนถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึม เช่น การสร้างคลอโรฟิลล์ การสังเคราะห์แสง และการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตหรือเพิ่มจำนวนมากขึ้น

2.10.1 กระบวนการกำจัดมลสารโดยสาหร่าย

สาหร่ายมีกลไกหลักที่สำคัญในการกำจัดมลสาร ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนแรก เป็นการดูดซับไว้ที่บริเวณผิวเซลล์ (adsorption) อย่างรวดเร็วการดูดซับสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว

ขั้นที่ 2 เป็นการสะสมเข้าสู่ภายในเซลล์ (absorption) ในขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และเกิดได้เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น (สุนีรัตน์, 2547)

การกำจัดมลสารของสาหร่ายแบ่งเป็น 2 แบบ คือ การกำจัดแบบใช้พลังงานและแบบไม่ใช้พลังงาน (จรูญ, 2551) การกำจัดมลสารแบบใช้พลังงาน ได้แก่ การสะสมมลสารไว้ภายในเซลล์ (intercellular bioaccumulation) หรือทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน เช่น การรีดิวซ์เฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ให้กลายเป็นเฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) ที่ไม่ละลายน้ำทำให้สารเกิดการตกตะกอน และย่อยสลายได้ ส่วนการกำจัดมลสารแบบไม่ใช้พลังงานเป็นการปล่อยเมทาบอไลท์ออกสู่ภายนอกเซลล์เพื่อไปจับกับมลสารได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน ทำให้มลสารมีความเข้มข้นหรือมีความเป็นพิษลดลง

2.10.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการการกำจัดมลสารของสาหร่าย

ความสามารถในการกำจัดมลสารของสาหร่ายขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ (สุนีรัตน์, 2549 ; จรูญ, 2551)

1) ค่าพีเอช (pH) มีผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับและกำจัดมลสารของสาหร่าย โดยถ้าสาหร่ายอยู่ในตัวกลางที่เป็นกรดหรือพีเอชต่ำ ไอออนของมลสารจะอยู่ในรูปของประจุอิสระเป็นรูปที่เซลล์สาหร่ายสามารถดูดซับได้ แต่ถ้าอยู่ในสภาวะที่เป็นเบสหรือมีพีเอชสูง มลสารจะจับตัวกับ OH^- ของตัวกลางและเกิดการตกตะกอน จนสาหร่ายไม่สามารถดูดซับมลสารได้

2) อุณหภูมิ มีผลต่อความเร็วในการเกิดปฏิกิริยากับมลสาร และถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปการทำงานของเซลล์จะผิดปกติทำให้การกำจัดมลสารของเซลล์ลดลง

3) ระยะเวลา มีผลต่อปริมาณมลสารที่กำจัดได้ ถ้าให้ระยะเวลาสั้น เซลล์สาหร่ายจะดูดซับหรือสัมผัสกับมลสารได้น้อย ทำให้การกำจัดมลสารไม่เต็มประสิทธิภาพ

4) ความเข้มข้นของมลสาร ถ้ามลสารมีความเข้มข้นสูง เซลล์สาหร่ายจะดูดซับสารได้ในปริมาณมากและรวดเร็ว แต่ก็ขึ้นกับความเข้มข้นของมลสารด้วยว่ามลสารสามารถทำลายเซลล์ได้หรือไม่

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์

3.2 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง คือ *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.3 สารเคมี

1) oxytetracycline HCl (commercial grade บริษัท Dafeng huasu pharmaceutical Co.,LTD ประเทศไทย)

2) methanol (HPLC grade ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.5% บริษัท Fisher scientific ประเทศอังกฤษ)

3) acetonitrile (HPLC grade ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.5% บริษัท Fisher scientific ประเทศอังกฤษ)

4) oxalic acid (analytical grade ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.5% บริษัท Ajax finechem ประเทศออสเตรเลีย)

5) citric acid monohydrate ($C_6H_8O_7.H_2O$) (analytical reagent grade ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.0% บริษัท Ajax finechem ประเทศออสเตรเลีย)

6) di-sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Na_2HPO_4) (analytical reagent grade ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.0% บริษัท Ajax finechem ประเทศออสเตรเลีย)

7) EDTA-di-sodium salt ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$) (analytical reagent grade ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.0% บริษัท Ajax finechem ประเทศออสเตรเลีย)

3.4 การเตรียมการทดลอง

3.4.1 การเตรียมสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน

1) เตรียม stock ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น 10,000 มก./ลิตร โดยชั่งสารออกซีเตตราซัยคลิน 5 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (deionized) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและปรับปริมาตรให้ได้ 500 มล. เก็บไว้ในขวดสีชา

2) เตรียมสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร เพื่อใช้สำหรับการทดลองโดยปิเปตสารละลายออกซีเตตราซัยคลินจาก stock เริ่มต้นปริมาตร 4, 6, 10, และ 20 มล. ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 มล. ด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3) ปรับค่าพีเอช (pH) ของสารละลายให้เท่ากับ 7 ด้วย 0.1 N NaOH

3.4.2 การเตรียมน้ำสำหรับชุดควบคุม

ฆ่าเชื้อน้ำปราศจากไอออนด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4.3 การเตรียมเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น

1) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยนำเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ปริมาตร 100 มล. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ปริมาตร 400 มล. (คิดเป็นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 20% ของปริมาตรทั้งหมด)

2) ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และให้อากาศตลอดเวลา ส่วนการให้แสงใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา12 ชั่วโมงต่อวัน (วัชระ, 2552)

3) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันจนสาหร่ายมีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่หรือเข้าสู่ระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (exponential phase)

4) เซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เตรียมได้นี้เป็น stock culture สำหรับใช้ในการทดลองทั้งหมด

5) เมื่อต้องการใช้สาหร่ายในการทดลองจึงนำเซลล์สาหร่ายจาก stock culture เข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วแยกตะกอนเซลล์ออกจากสารละลาย จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำปราศจากไอออน 2 ครั้ง เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ไอออนต่างๆ ที่ตกค้าง แล้วปั่นแยกเซลล์ออกอีกครั้ง จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนลง ในเซลล์แล้ววัดค่าความหนาแน่นของเซลล์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ด้วยเครื่องspectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ทำการปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.3 (วีนา, 2557) เพื่อใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นในการทดลอง ในการเตรียมเซลล์เริ่มต้นได้ทำการนับจำนวนเซลล์และวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งทุกครั้ง

3.5 วิธีสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างจากเซลล์สาหร่ายและน้ำ

การสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างจากเซลล์สาหร่ายและน้ำใช้วิธี solid phase extraction (AOAC, 1996) มีขั้นตอนดังนี้

3.5.1 เตรียมสารเคมี

1) เตรียมสารละลาย buffer (mcilvaine buffer EDTA) เพื่อใช้ในการสกัดโดยผสมสารละลาย anhydrous dibasic sodium phosphate กับสารละลาย citric acid mono. จากนั้นทำการปรับพีเอช (pH) ให้เท่ากับ 1 และเติม EDTA

2) เตรียมสารละลาย mobile phase โดยทำการละลาย oxalic acid ใน methanol HPLC grade ให้มีความเข้มข้น 0.01 M

3.5.2 วิธีสกัด

1) กรองแยกส่วนของสารละลายและเซลล์สาหร่ายออกจากกันจากนั้นนำเซลล์สาหร่ายที่ได้มาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 2 ครั้ง

2) นำตัวอย่างเซลล์สาหร่ายมาชั่งน้ำหนักใส่ในบีกเกอร์ เติมสารละลาย mcilvaine buffer EDTA ปริมาตร 20 มล.

3) นำไปปั่นด้วยเครื่อง ultrasonic homogenizer ยี่ห้อ ultraturrex รุ่น T25

4) กรองเพื่อแยกส่วนของน้ำ และตะกอนเซลล์สาหร่ายด้วยกระดาษกรอง GF/C สำหรับเซลล์สาหร่ายที่ติดอยู่ในบีกเกอร์นำมาสกัดซ้ำด้วย mcilvaine buffer EDTA ปริมาตร 5 มล. และล้างกรวยกรองที่มีเซลล์สาหร่ายอีกครั้งด้วย mcilvaine buffer EDTA ปริมาตร 5 มล.

5) รวมสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดเพื่อนำไปสกัดด้วยวิธี solid phase extraction โดยใช้ strata-X33u ชนิด polymeric reversed phase (200 มก./6 มล.) ของ บริษัท Phenomenex ประเทศสหรัฐอเมริกา

6) กระตุ้น SPE โดยใช้ methanol (HPLC grade) ปริมาตร 2 มล. และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 2 มล.

7) นำสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดไปกรองผ่าน SPE ด้วยความเร็ว 10 มล./นาที

8) ล้างตัวอย่างด้วย 20% methanol (HPLC grade) ปริมาตร 1 มล.

9) elute ตัวอย่างด้วย acetronitrile : methanol (1:1) ปริมาตร 1 มล. จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่าน syringe filter nylon ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ยี่ห้อ agela technologies และนำไปวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) ยี่ห้อ waters 600 photodiode array คอลัมน์ที่ใช้ ยี่ห้อ HiQsil รุ่น C18HS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มม. ยาว 150 มม. เป็น stationary phase ส่วน mobile phase ใช้acetonitile และ 0.01 M oxalic in MeOH

ด้วยอัตราส่วน 10:90, flowrate 1.0 มล./นาที สำหรับ detector ใช้ photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ปริมาตรสารละลายที่ฉีด คือ 20 ไมโครลิตร

10) สำหรับตัวอย่างน้ำที่แยกออกจากสาหร่าย (จากข้อ 1) นำไปวิเคราะห์ โดยเครื่อง HPLC

3.6 วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งเป็น 4 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1: การศึกษาความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

1) นำเซลล์สาหร่ายจาก stock culture (ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.3) ที่เตรียมไว้ใส่ในขวดทดลอง จำนวน 15 ขวดๆ ละ 100 มล.

2) ปิเปตสารละลายออกซีเตตราซัยคลินจาก stock ความเข้มข้น 10,000 มก./ลิตร ลงในขวดทดลอง ปริมาตร 4 มล. จำนวน 3 ขวด, 6 มล. จำนวน 3 ขวด, 10 มล. จำนวน 3 ขวด และ 20 มล. จำนวน 3 ขวด แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้มีปริมาตรสุดท้าย 500 มล.จะได้สารละลายที่ใช้ในการทดลองที่มีเซลล์สาหร่าย 20% และความเข้มข้นสุดท้ายของออกซีเตตราซัยคลิน คือ 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร ตามลำดับ ทำการปรับค่าพีเอช (pH) ของสารละลาย เท่ากับ 7 ด้วย 0.1 N NaOH

3) เตรียมชุดควบคุม (ไม่มีสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน) โดยใช้เซลล์สาหร่ายเริ่มต้นปริมาตร 100 มล. (จากข้อ 1) แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มล. จำนวน 3 ขวด

4) นำขวดทดลองทั้งหมดไปไว้ใน ห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีแสง

5) เก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemacytometer ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 หลังจากเริ่มการทดลองเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย

6) ทดสอบความแปรปรวนของผลการทดลองแต่ละความเข้มข้น

7) สรุปผลการทดลองโดยใช้น้ำหนักเซลล์แห้งและจำนวนเซลล์ เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่าย รวมทั้งคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่ายเพื่อกำหนดความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่ใช้ในการทดลองต่อไป

หมายเหตุ: จากการทดลองนี้ พบว่า สาหร่าย *Chlorella vulgaris* มีการเจริญเติบโตในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร ได้ดีที่สุด ในการทดลองที่ 2 จึงใช้ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร

แผนผังการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 1: การศึกษาความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

1) นำเซลล์สาหร่ายปริมาตร 100 มล. ใส่ในขวดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้าย 500 มล.

↓

2) ทำการทดลองภายในห้องปฏิบัติการ ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีแสงเป็นเวลา 7 วัน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

↓

3) เก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและนับจำนวนเซลล์

↓

4) นำความเข้มข้นของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การทดลองที่ 2: ศึกษาจำนวนเซลล์เริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เหมาะสมต่อการสะสมออกซีเตตราซัยคลิน

1) เตรียมชุดทดลอง โดยนำเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น (stock culture) ปริมาตร 25, 50, และ 100 มล. ใส่ในขวดทดลองความเข้มข้นละ 3 ขวด

2) ปิเปตสารละลายออกซีเตตราซัยคลินจาก stock ความเข้มข้น 10,000 มก./ลิตร ลงในขวดทดลอง ขวดละ 20 มล. แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มล. ด้วยน้ำปราศจากไอออน

3) เตรียมชุดควบคุมโดยนำเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น (stock culture) ปริมาตร 25, 50, และ 100 มล. ใส่ในขวดทดลองความเข้มข้นละ 3 ขวด แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มล. ด้วยน้ำปราศจากไอออน

4) วางขวดทดลองและขวดควบคุมทั้งหมดไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีแสง

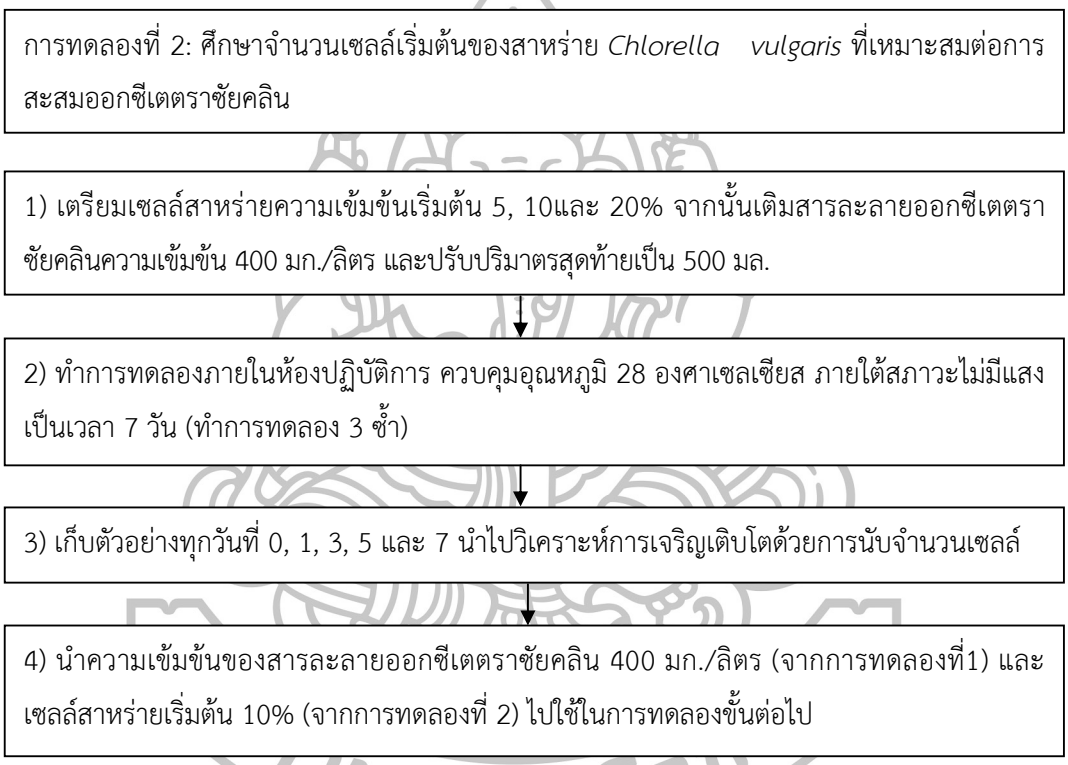
5) เก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายไปนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemacytometer ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 หลังจากเริ่มการทดลอง

6) ทดสอบความแปรปรวนของผลการทดลองที่ได้จากชุดทดลองและชุดควบคุม

7) สรุปผลการศึกษาเพื่อหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* สำหรับการศึกษาการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่าย

หมายเหตุ: จากการทดลองนี้พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในสารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่เหมาะสม คือ 10 %

แผนผังการทดลองที่ 2



การทดลองที่ 3: การทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

1) นำเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นจาก stock culture ใส่ในขวดทดลอง ขวดละ 50 มล. จำนวน 14 ขวด

2) ปิเปตสารละลายออกซีเตตราซัยคลินจาก stock ความเข้มข้น 10,000 มก./ลิตร ลงในขวดทดลอง ขวดละ 20 มล. และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มล. ด้วยน้ำปราศจากไอออน

3) เตรียมชุดควบคุม นำเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นจาก stock culture ใส่ในขวดทดลอง ขวดละ 50 มล. จำนวน 14 ขวด และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มล. ด้วยน้ำปราศจากไอออน

4) นำขวดทดลองวางในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีแสง

5) เก็บตัวอย่างในเวลาที่ 0, 1, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากเริ่มการทดลอง

6) นำตัวอย่างสารละลายที่มีเซลล์สาหร่ายไปนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemacytometer

7) นำตัวอย่างสารละลายที่มีเซลล์สาหร่ายปริมาตร 200 มล. ไปกรองแยกตัวอย่างน้ำและตัวอย่างสาหร่าย แล้วทำการสกัดเพื่อวิเคราะห์ปริมาณออกซีเตตราซัยคลินด้วยเครื่อง HPLC

8) คำนวณค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลิน (bioconcentration factor, BCF) ในเซลล์สาหร่ายในเวลาที่ 0, 1, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

แผนผังการทดลองที่ 3

การทดลองที่ 3: การทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

↓

1) เตรียมเซลล์สาหร่ายความเข้มข้นเริ่มต้น 10% จากนั้นเติมสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร และปรับปริมาตรสดท้ายเป็น 500 มล.

↓

2) ทำการทดลองภายในห้องปฏิบัติการ ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีแสงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

↓

3) เก็บตัวอย่างในเวลาที่ 0, 1, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตด้วยการนับจำนวนเซลล์ และนำไปสกัดเพื่อวิเคราะห์ปริมาณออกซีเตตราซัยคลินด้วยเครื่อง HPLC

↓

4) คำนวณการสะสมออกซีเตตราซัยคลิน (bioconcentration factor, BCF) ในรูปของน้ำหนักเปียกในเวลาที่ 0, 1, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ดังนี้

$$BCF = C_B/C_W$$

เมื่อ C_B คือ ความเข้มข้นของสารในสาหร่าย

C_W คือ ความเข้มข้นของสารในน้ำ

การทดลองที่ 4: การทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ

1) เตรียมการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 โดยไม่มีการเติมเซลล์สาหร่าย จากนั้นนำขวดทดลองวางในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีแสง

2) เก็บตัวอย่างโดยปิเปตสารละลายจากขวดทดลอง ปริมาตร 1 มล. ในเวลาที่ 0, 1, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

3) นำค่าที่ได้ไปคำนวณการสลายตัวและค่าครึ่งชีวิต

แผนผังการทดลองที่ 4

การทดลองที่ 4: การทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลิน

↓

1) เตรียมสารละลายออกซีเตตราซัยคลินเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 (ไม่มีการเติมเซลล์สาหร่าย)

↓

2) ทำการทดลองภายในห้องปฏิบัติการ ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีแสง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

↓

3) เก็บตัวอย่างในเวลาที่ 0, 1, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

↓

4) คำนวณการสลายตัว ดังนี้

$$C_t = C_o\, e^{-kt}$$

เมื่อ C_o คือ ความเข้มข้นของสารที่เวลาเริ่มต้น (มก./ลิตร)

C_t คือ ความเข้มข้นของสารเมื่อเวลา t (มก./ลิตร)

k คือ อัตราคงที่ของการสลายตัว (ต่อชั่วโมง)

t คือ เวลา

e คือ exponential ของ k และ t

3.7 การหาค่า Method detection limit และ % Recovery

การหาค่า Method detection limit (MDL) ทำโดยการ spike สารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น 400 มก./ลิตร ลงในตัวอย่างสาหร่ายและน้ำ ทำการสกัดโดยวิธีเดียวกับการสกัดตัวอย่าง นำสารละลายไปวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละชนิด 3 ซ้ำ เพื่อหาค่า SD (Standard division) โดย

การคำนวณค่า MDL คำนวณโดย

MDL = 3 SD ของการสกัด

การคำนวณ % Recovery คำนวณโดย

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (มก./ลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่เติมลงไปในตัวอย่าง (มก./ลิตร)}} \times 100$$

สำหรับ MDL ของตัวอย่างสาหร่ายและตัวอย่างน้ำ เท่ากับ 1.96 มก./กรัม และ 1.47 มก./ลิตร ตามลำดับ ส่วน % Recovery ของตัวอย่างสาหร่ายและตัวอย่างน้ำ เท่ากับ 69% และ 92% ตามลำดับ

3.8 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

1) วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธี gravimetric method โดยการอบกระดาษกรอง GF/C ด้วยตู้อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวางในโถดูดความชื้นนาน 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักกระดาษกรองคงที่ จากนั้นนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักกระดาษกรอง

2) นำสารละลายตัวอย่างที่มีเซลล์สาหร่าย ปริมาตร 50 มล. ไปกรองผ่านกระดาษกรอง GF/C ที่อบแห้งแล้ว โดยใช้ชุดกรองต่อกับเครื่อง vacuum pump เพื่อแยกส่วนของสารละลายและเซลล์สาหร่าย จากนั้นนำแผ่นกระดาษกรองที่มีเซลล์สาหร่ายไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นนาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำหนักคงที่ก่อนนำไปคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{(\text{น้ำหนักสาหร่ายและกระดาษกรอง} - \text{น้ำหนักกระดาษกรอง})}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มล.)}} \times 1000$$

3.9 การนับจำนวนเซลล์

1) หยดตัวอย่างสาหร่ายจำนวน 1 หยดในช่องใส่ตัวอย่าง (load port) ของสไลด์ haemacytometer ที่มีกระจกปิดสไลด์ปิดอยู่ตัวอย่างสาหร่ายจะกระจายไปทั่วตารางสี่เหลี่ยม

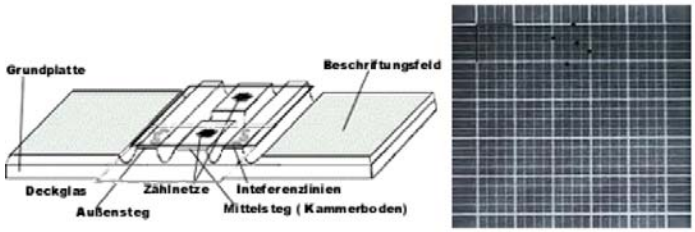
2) ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ยี่ห้อ olympus รุ่น CH-2 โดยปรับกำลังขยายจากต่ำไปสูง จากนั้นนับเซลล์สาหร่ายบนช่องสี่เหลี่ยมตรงกลาง (25 ช่องใหญ่ ซึ่งภายในมีตารางขนาดเล็กจำนวน 16 ช่อง) หากจำนวนเซลล์หนาแน่นมากอาจสุ่มนับ 5 ช่อง แต่ผลที่ได้ต้องคูณ 5 หรือสุ่มนับ 10 ช่อง ผลที่ได้ต้องคูณ 2.5 ถ้าเซลล์สาหร่ายทับเส้นให้เลือกนับแบบใดแบบหนึ่ง ดังนี้ ทับเส้นแนวบนและเส้นแนวขวาให้นับ (ซ้าย-ล่างไม่นับ) หรือ ทับเส้นแนวล่างและเส้นแนวซ้ายให้นับ (ขวา-บนไม่นับ)

3) คำนวณจำนวนเซลล์สาหร่ายต่อปริมาตรน้ำ ดังนี้

ปริมาตรของ haemacytometer counting chamber = กว้าง x ยาว x ลึก

(ภายในตารางสี่เหลี่ยม 1 ตาราง) = 1 มม. x 1 มม. x 0.1 มม.

$= 1/10^4$ มล.



รูปที่ 3.1 พื้นที่ตารางสำหรับการนับเซลล์สาหร่าย

ที่มา: ขจรเกียรติ์ (2552)

3.10 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.10.1 การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; μ)

คำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจากสูตร (สุดสายชล และ วชิราภรณ์, 2556) โดย

$$\mu = \frac{\ln (N_t) - \ln (N_0)}{t - t_0}$$

เมื่อ N_t คือ จำนวนเซลล์/มล. ที่เวลา t

N_0 คือ จำนวนเซลล์/มล. ที่เวลาเริ่มต้น

t คือ เวลา

หรือ สามารถหาได้จากการ plot กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ln N กับ เวลา โดยความชัน (slope) จากความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ได้ คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ)

3.10.2 การคำนวณค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลิน (bioconcentration factor, BCF) ในเซลล์สาหร่าย

ค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* คำนวณโดย

$BCF = C_B/C_W$

เมื่อ C_B คือ ความเข้มข้นของสารออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย (มก./กก. น้ำหนักเปียก)

C_W คือ ความเข้มข้นของสารออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ (มก./ลิตร)

3.10.3 การคำนวณการสลายตัว

คำนวณได้จากสูตร $C_t = C_o e^{-kt}$

เมื่อ C_o คือ ความเข้มข้นของสารที่เวลาเริ่มต้น (มก./ลิตร)

C_t คือ ความเข้มข้นของสารเมื่อเวลา t (มก./ลิตร)

k คือ อัตราคงที่ของการสลายตัว (ต่อชั่วโมง)

t คือ เวลา

e คือ exponential ของ k และ t

ค่า k ที่ได้จากการ plot กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ln (C_t/C_o) กับ t ความชันจากความสัมพันธ์เชิงเส้น คือ ค่า k และค่าครึ่งชีวิต คำนวณโดย

$t_{½} = \ln 2 / k$

3.12.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลด้วยวิธี one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลในการทดลอง

บทที่ 4
ผลการศึกษา วิเคราะห์ข้อมูล และอภิปรายผล

การศึกษาการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ประกอบด้วยการทดลองดังต่อไปนี้

1) การทดลองผลของความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

2) การทดลองเพื่อหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เหมาะสมต่อการสะสมออกซีเตตราซัยคลิน

3) การทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

4) การทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในสภาวะที่ใช้ในการทดลองการสะสม

ผลการทดลองต่างๆ เป็นดังนี้

4.1 ผลการทดลองความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

ออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นสูงๆอาจเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่ายหรือมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Caicedo, 2000) ในการทดลองได้ศึกษาผลของออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยวิธีการนับจำนวนเซลล์และวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการทดลองเป็นดังนี้

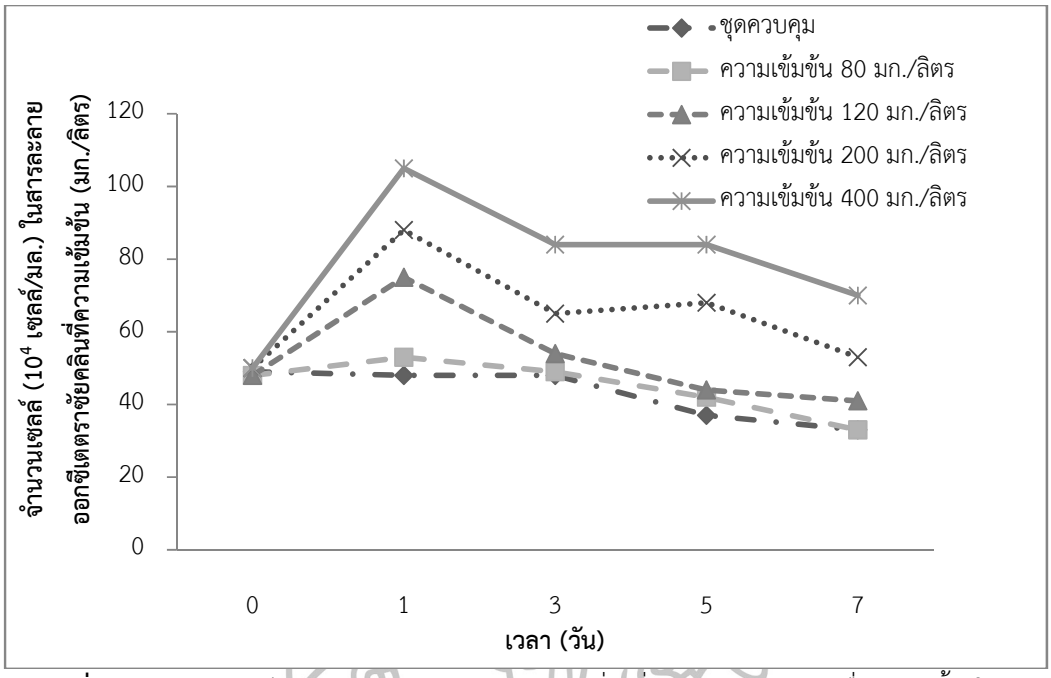
4.1.1 การวัดการเจริญเติบโตโดยวิธีนับจำนวนเซลล์

ผลการนับจำนวนเซลล์ของสาหร่ายในชุดควบคุม พบว่า จำนวนเซลล์สาหร่ายค่อนข้างคงที่ (49 x10^4 เซลล์/มล.) ในวันที่ 1 และ 3 ของการทดลอง จากนั้นจำนวนเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วจนสิ้นสุดการทดลอง (เหลือประมาณ 33 x10^4 เซลล์/มล.) (ตารางที่ 4.1) การที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะสาหร่ายถูกเพาะเลี้ยงในน้ำปราศจากไอออนจึงขาดสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโต และสาหร่ายที่นำมาใช้ในการทดลองยังได้มาจากเซลล์เริ่มต้นที่อยู่ในระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (exponential phase) ซึ่งเป็นระยะที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ แต่เมื่อสาหร่ายอยู่ในการทดลองที่ไม่มีสารอาหารจึงเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) โดยมีอัตราการแบ่งเซลล์เท่ากับอัตราการตายและเข้าสู่ระยะการตาย (death phase) จึงทำให้เห็นว่า growth curve มีลักษณะลดลง (รูปที่ 4.1)

สำหรับจำนวนเซลล์เริ่มต้นของสาหร่ายที่ใช้ในการทดลองกับออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้นต่างๆ พบว่า จำนวนเซลล์เริ่มต้นอยู่ระหว่าง 48 $x10^4$ - 50 $x10^4$ เซลล์/มล. ส่วนผลของจำนวนเซลล์สาหร่ายระหว่างการทดลอง พบว่า แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์สาหร่ายในออกซีเตตราซัยคลินทุกความเข้มข้น สาหร่ายมีลักษณะการเจริญเติบโตในทิศทางเดียวกัน คือ สาหร่าย *Chlorella vulgaris* มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 1 ของการทดลอง (ตารางที่ 4.1) แสดงว่าสาหร่ายที่อยู่ในระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (exponential phase) ตั้งแต่เริ่มทำการทดลอง และยังคงมีการเจริญเติบโตในสภาวะที่ใช้ทดลองต่อไปได้อีก ซึ่งต่างจากชุดควบคุมที่จำนวนเซลล์เริ่มลดลงตั้งแต่วันแรกของการทดลอง สำหรับการทดลองที่ความเข้มข้น 80 และ 120 มก./ลิตร มีจำนวนเซลล์ของสาหร่ายลดลง แสดงว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้เข้าสู่ระยะการตาย (death phase) ตั้งแต่วันที่ 3 จนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการทดลองที่ความเข้มข้น 200 และ 400 มก./ลิตร จำนวนเซลล์ของสาหร่ายค่อนข้างคงที่ในวันที่ 3 และ 5 ของการทดลองแสดงว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้เข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) และหลังจากนั้นจำนวนเซลล์ลดลงในวันที่ 7 แสดงว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้เข้าสู่ระยะการตาย (death phase) (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 จำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาเมื่อเพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200, 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม

วันที่	จำนวนเซลล์สาหร่าย (10^4 เซลล์/มล.) ในออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น (มก./ลิตร)				
	ชุดควบคุม	ความเข้มข้น 80 มก./ลิตร	ความเข้มข้น 120 มก./ลิตร	ความเข้มข้น 200 มก./ลิตร	ความเข้มข้น 400 มก./ลิตร
0	49	48	48	50	50
1	48	53	75	88	105
3	48	49	54	65	84
5	37	42	44	68	84
7	33	33	41	53	70



รูปที่ 4.1 จำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาเมื่อเพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200, 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม

ผลการทดลองโดยการนับจำนวนเซลล์ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่ใช้ทดลอง คือ 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร มีผลทำให้จำนวนเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* เพิ่มสูงขึ้นและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) นอกจากนั้นจำนวนเซลที่เพิ่มขึ้นยังสูงตามความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่ใช้ทดลอง โดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 1 ของการทดลองที่ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร เท่ากับ $53x10^4$, $75x10^4$, $88 x10^4$ และ $105 x10^4$ เซลล์/มล. ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะสาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนที่อยู่ในโมเลกุลของออกซีเตตราซัยคลินเป็นอาหารในการเจริญเติบโต

จากการศึกษาของ ภรณี และคณะ (2543) พบว่าสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วโดยใช้ไนโตรเจนในน้ำเสีย และมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในระยะเวลา 2-3 วันแรกของการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองนี้ นอกจากนั้นการศึกษาของดำรงและคณะ (2554) ยังพบว่าไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย ดังนั้นสาหร่าย *Chlorella vulgaris* จึงมีอัตราการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในตัวกลางที่มีไนโตรเจนความเข้มข้นสูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ที่พบว่าจำนวนเซลล์ของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในสารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มสูงจะมีจำนวนเซลล์สูงกว่าเมื่ออยู่ในสารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นต่ำ

นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงว่าความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่สูงถึง 400 มก./ลิตร ไม่เป็นพิษต่อสาหร่าย แต่กลับทำให้สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่สาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนในโมเลกุลของออกซีเตตราซัยคลินเป็นสารอาหารในการเจริญเติบโตได้

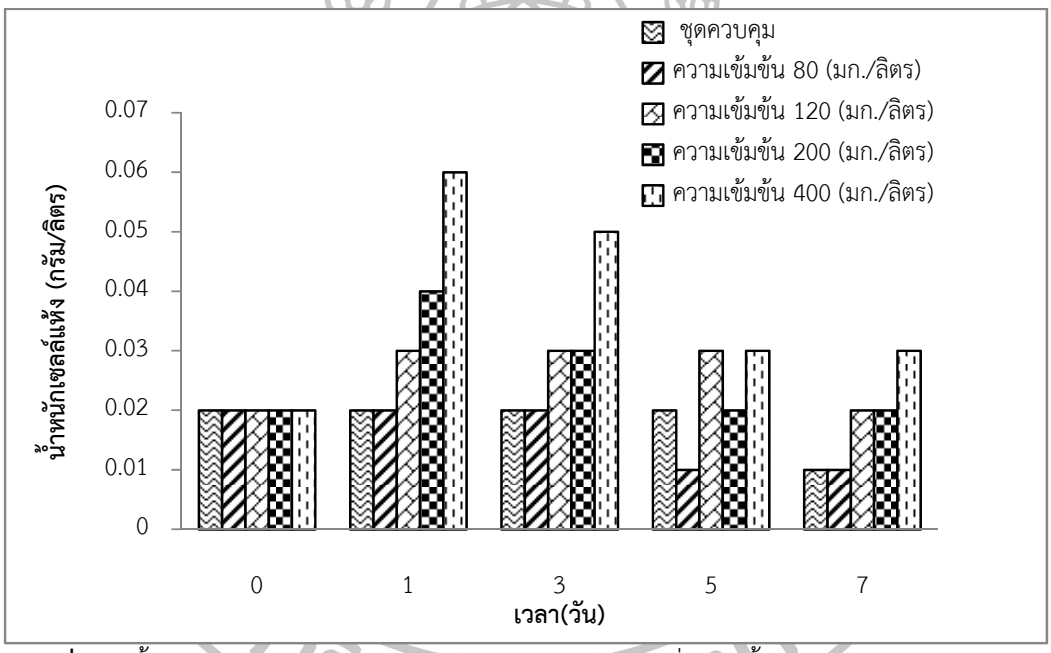
4.1.2 การวัดการเจริญเติบโตโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

การวัดการเจริญเติบโตโดยใช้น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในน้ำปราศจากไอออน (ชุดควบคุม) ในช่วง 5 วันแรกของการทดลอง มีน้ำหนักคงที่ เท่ากับ 0.02 กรัม/ลิตร และลดลงในวันที่ 7 เท่ากับ 0.01 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 4.2) ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลิน พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย จากการทดลองที่ความเข้มข้น 80 มก./ลิตร มีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการทดลองที่ความเข้มข้น 120, 200 และ 400 มก./ลิตร มีค่าสูงกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายในชุดควบคุม โดยเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้นต่างๆ และชุดควบคุม พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายมีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200, 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม

วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย (กรัม/ลิตร) ในออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น (มก./ลิตร)				
	ชุดควบคุม	ความเข้มข้น 80 (มก./ลิตร)	ความเข้มข้น 120 (มก./ลิตร)	ความเข้มข้น 200 (มก./ลิตร)	ความเข้มข้น 400 (มก./ลิตร)
0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
1	0.02	0.02	0.03	0.04	0.06
3	0.02	0.02	0.03	0.03	0.05
5	0.02	0.01	0.03	0.02	0.03
7	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่ใช้ทดลอง คือ 120, 200 และ 400 มก./ลิตร ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* สูงกว่าในชุดควบคุมที่ไม่มีออกซีเตตราซัยคลิน และน้ำหนักเซลล์แห้งยังสูงขึ้นตามความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่ใช้ทดลอง สอดคล้องกับผลการทดลองการวัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการทดลองที่ความเข้มข้น 80 มก./ลิตร ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม (รูปที่ 4.2) การที่น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายในชุดควบคุมและจากการทดลองที่ความเข้มข้น 80 มก./ลิตร ค่อนข้างคงที่เนื่องจากเซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็กมาก เมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตน้อยเนื่องจากขาดอาหารจึงทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายไม่สูงขึ้น



รูปที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200, 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการศึกษาการเจริญเติบโตโดยใช้น้ำหนักเซลล์แห้งให้ผลไม่ดีเท่าวิธีการนับจำนวนเซลล์ โดยการนับจำนวนเซลล์น่าจะเป็นวิธีการที่บ่งชี้การเจริญเติบโตที่แม่นยำกว่า เนื่องจากผู้วิเคราะห์สามารถศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ชัดเจน อีกทั้งวิธีนี้ยังให้ผลรวดเร็วและใช้ปริมาณตัวอย่างสาหร่ายเพื่อวิเคราะห์น้อย ส่วนการศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยใช้น้ำหนักเซลล์แห้งค่อนข้างมีปัญหาเนื่องจากเซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็ก จึงจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงให้มีปริมาณตัวอย่างมากพอเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ นอกจากนั้นการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีแสงและ

อากาศทำให้การเพิ่มจำนวนเซลล์น้อยและเห็นความแตกต่างของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นได้ยากถึงแม้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจะนานขึ้นก็ตาม

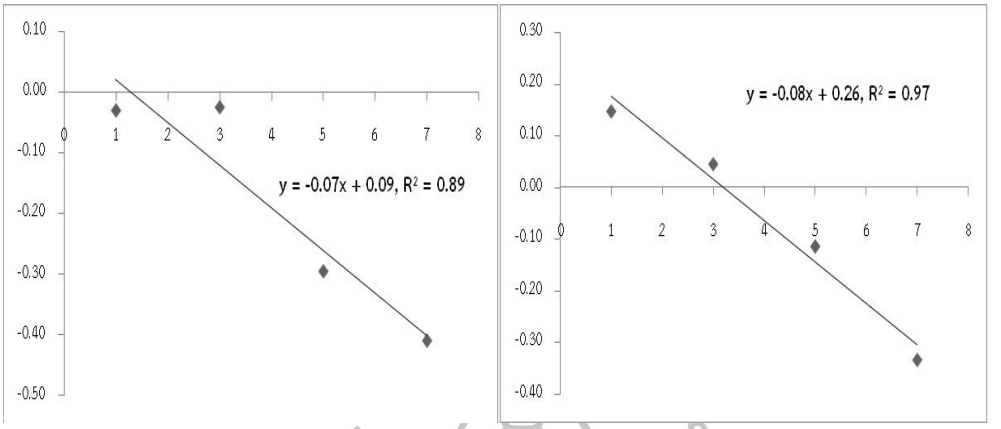
4.1.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ)ของสาหร่าย

การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย (specific growth rate, μ) สามารถคำนวณโดยเทียบจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นตามการเปลี่ยนแปลงของเวลาจากสูตร $[\mu = \ln (N_t - N_0)/(t - t_0)]$ (สุดสายชล และ วชิราภรณ์, 2556) หรือ จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ln (จำนวนเซลล์/มล.) x 10^4 กับ เวลา (วัน) โดยความชัน (slope) จากความสัมพันธ์เชิงเส้น คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) (รูปที่ 4.3) พบว่า ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(μ) ของสาหร่ายจากการทดลองที่ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร (μ = -0.06 ต่อวัน) สูงกว่าที่ได้จากการทดลองที่ความเข้มข้น 200 มก./ลิตร (μ = -0.08 ต่อวัน) 120 มก./ลิตร (μ = -0.10 ต่อวัน) และ 80 มก./ลิตร (μ = -0.08 ต่อวัน) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของสาหร่ายที่ได้รับออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร (μ = -0.06 ต่อวัน) ยังสูงกว่าสาหร่ายในชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงในน้ำปราศจากไอออน (μ = -0.07 ต่อวัน)

ผลการทดลองทั้งหมดนี้จึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลิน 400 มก./ลิตร ไม่เป็นพิษต่อสาหร่าย แต่กลับทำให้สาหร่ายมีจำนวนเซลล์สูงสุด โดยเพิ่มจาก 50 x10^4 เซลล์/มล. เป็น 105 x10^4 เซลล์/มล. ในเวลา 1 วัน ด้วยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะหรือ μ =-0.06 ต่อวัน และน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 0.02 กรัม/ลิตร เป็น 0.06 กรัม/ลิตร ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อไปจึงใช้ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินเท่ากับ 400 มก./ลิตร

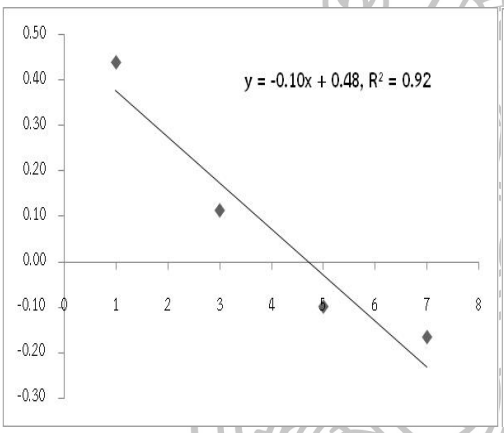
ตารางที่ 4.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในการทดลองที่ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200, 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม

ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลิน (มก./ลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) (เซลล์/วัน)
ชุดควบคุม	-0.07
80	-0.08
120	-0.10
200	-0.08
400	-0.06

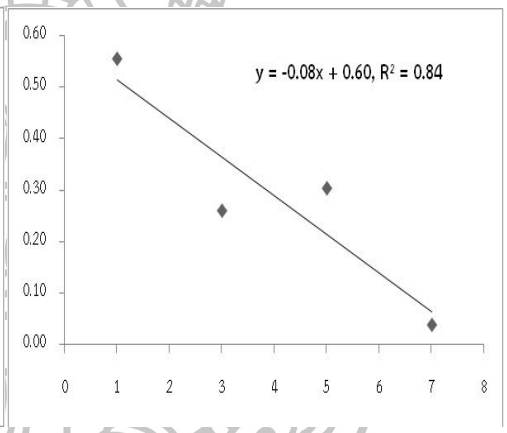


(ก)

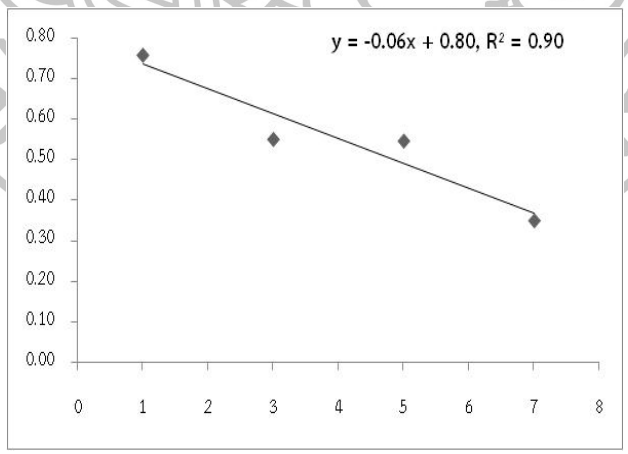
(ข)



(ค)



(ง)



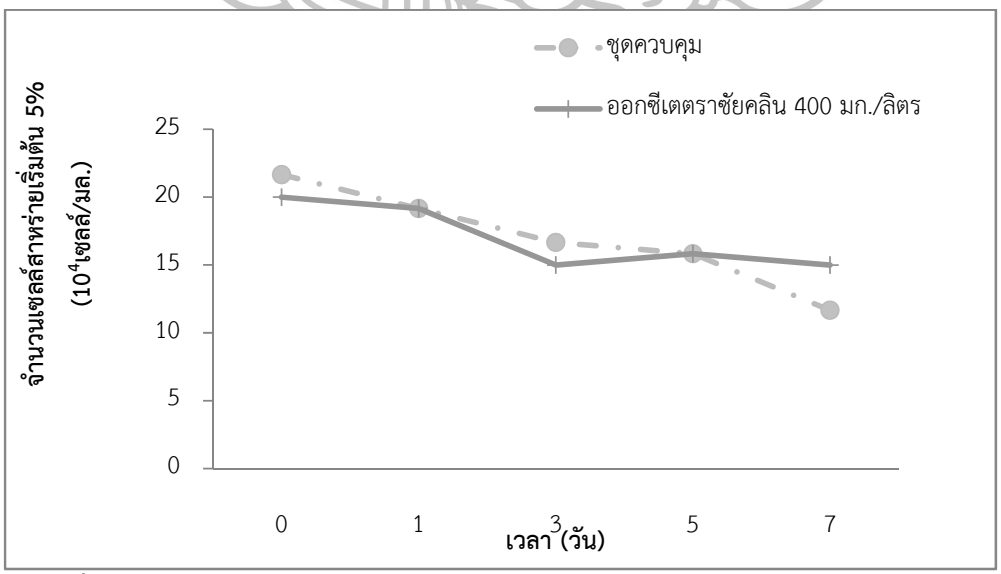
(จ)

รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง ln (จำนวนเซลล์/มล.) x10^4 กับ เวลา (วัน) ในการทดลองที่ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200, 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม (ก) ชุดควบคุม (ข) 80 มก./ลิตร (ค) 120 มก./ลิตร (ง) 200 มก./ลิตร (จ) 400 มก./ลิตร

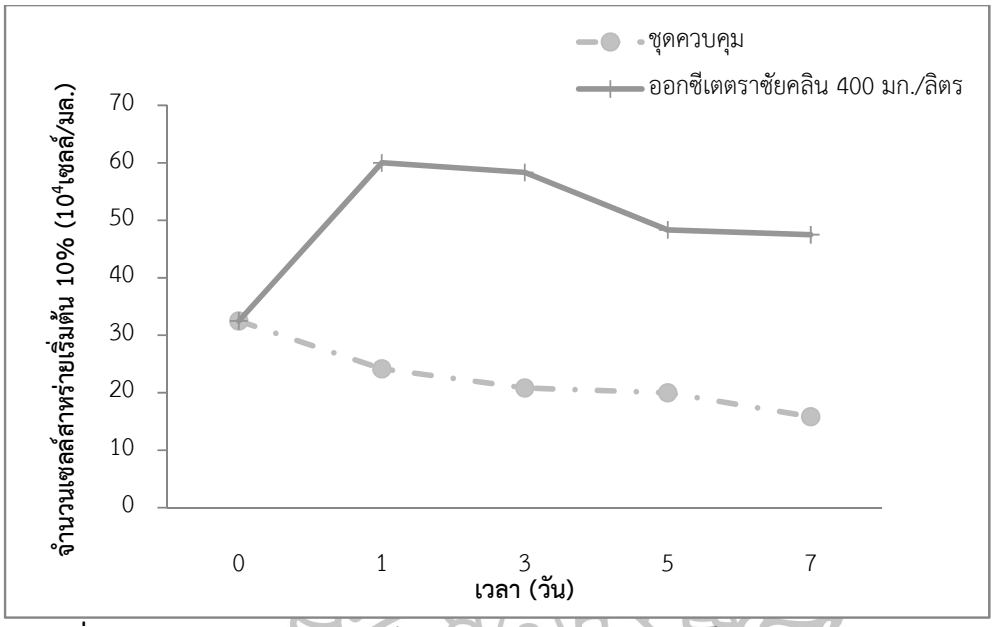
4.2 ผลการทดลองการหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เหมาะสมต่อการสะสมออกซีเตตราซัยคลิน

ผลการทดลองในข้อ 4.1 พบว่า ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร และจำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นความเข้มข้น 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตและทนต่อความเป็นพิษได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 3 ความเข้มข้น คือ 5, 10 และ 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินหรือมีจำนวนเซลล์เท่ากับ $20x10^4$, $33x10^4$ และ $50 x10^4$ เซลล์/มล. ตามลำดับ

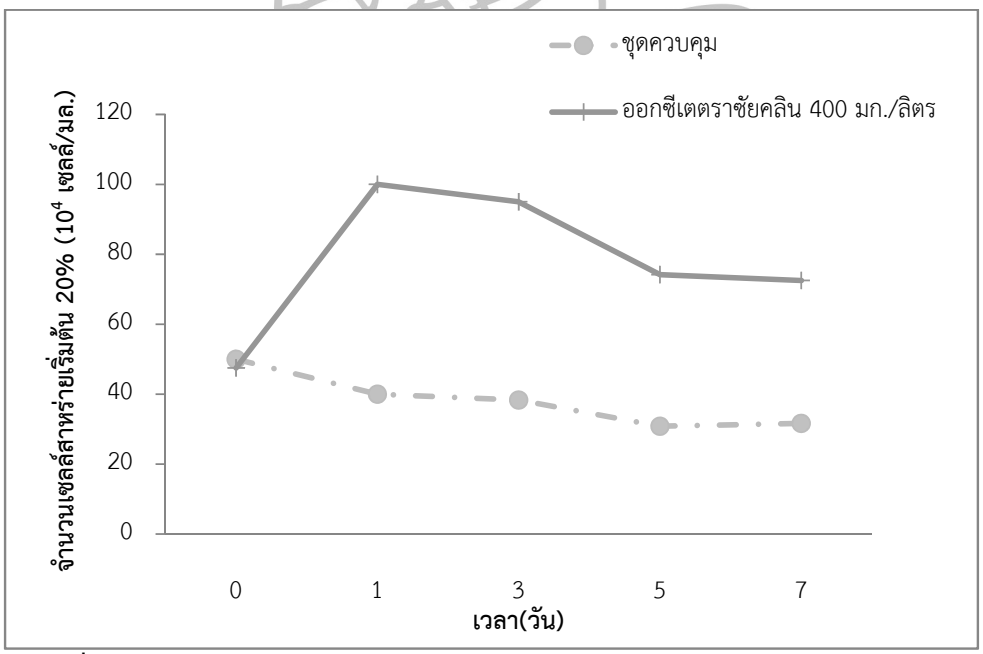
สำหรับผลการทดลองในชุดควบคุมทั้ง 3 ชุด (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 5, 10 และ 20% ของน้ำปราศจากไอออน) ที่ทำควบคู่ไปกับการทดลองโดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 5, 10 และ 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน พบว่า จำนวนเซลล์ของสาหร่ายในชุดควบคุมลดลงตามเวลาตลอดการทดลอง (รูปที่ 4.4, 4.5 และ 4.6) ส่วนผลการทดลองที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 5% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน พบว่า จำนวนเซลล์ที่ลดลงตามเวลาไม่ต่างจากชุดควบคุม (รูปที่ 4.4) ในขณะที่ผลการทดลองที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10 และ 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน พบว่า จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันแรกของการทดลอง และลดลงอย่างช้าๆ ในเวลาต่อมา (รูปที่ 4.5 และ 4.6) แสดงว่าออกซีเตตราซัยคลินไม่เป็นพิษต่อสาหร่าย จากนั้นจำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่ในวันที่ 1 และ 3 แสดงว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายอยู่ในระยะคงที่ (stationary phase) และจะเข้าสู่ระยะการตาย (Death phase) ในวันที่ 7 ของการทดลอง



รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 5% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน



รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 10% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน



รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน

สำหรับการเปรียบเทียบผลการทดลองเมื่อจำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) สำหรับการทดลองที่ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน พบว่า สาหร่ายมีจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นน้อยมาก การที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะจำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นที่น้อยเกินไป ทำให้ออกซีเตตราซัยคลินมีความเป็นพิษต่อสาหร่าย โดยจากรูปที่ 4.7 (ก) แสดงให้เห็นว่าผนังเซลล์ของสาหร่ายแตกหรือถูกทำลายระหว่างการทดลอง ส่วนผลการทดลองที่จำนวนเริ่มต้น 20% พบว่า จำนวนเซลล์สาหร่ายมีอัตราการเจริญลดลง เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ในวันเริ่มต้น สาเหตุอาจมาจากการที่มีจำนวนเซลล์ในการทดลองมากเกินไป จนทำให้มีเซลล์จับตัวเป็นกลุ่มหรือซ้อนทับกัน ดังรูปที่ 4.7 (ค) การซ้อนทับกันนั้นทำให้พื้นที่ผิวของสาหร่ายสามารถสัมผัสกับออกซีเตตราซัยคลินได้น้อยลง จนทำให้เซลล์บางส่วนไม่สามารถรับสารอาหารจากออกซีเตตราซัยคลินได้

สำหรับผลการทดลองเมื่อใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน พบว่า สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากเซลล์มีการกระจายตัวอย่างเหมาะสม ดังรูปที่ 4.7 (ข) จึงสัมผัสกับออกซีเตตราซัยคลินได้มาก และเกิดการสะสมสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้อัตราการเจริญเติบโตมีแนวโน้มสูงขึ้นสอดคล้องกับผลการทดลองที่ 4.1

(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 4.7 ลักษณะเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นความเข้มข้นต่างๆ กำลังขยาย 1,000 เท่า (ก) จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5%
(ข) จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10% (ค) จำนวนเซลล์เริ่มต้น 20%

ผลจากการนับจำนวนเซลล์ของทั้ง 3 การทดลองนำไปคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ได้ค่า μ ดังที่แสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งพบว่า ค่า μ ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* จากการทดลองที่ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10% สูงกว่าการทดลองที่ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5 และ 20% อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) การทดลองนี้แสดงว่าการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ ดังนั้นในการทดลองการสะสมของออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่ายของการ

ทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นที่มีความเข้มข้น 10% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินหรือมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 33 $x10^4$ เซลล์/มล. และใช้ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร

ตารางที่ 4.4 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 5, 10, 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินในระยะเวลา 7 วัน

จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น (%)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) (เซลล์/วัน)	
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
5	-0.08	-0.04
10	-0.06	-0.03
20	-0.05	-0.06

4.3 ผลการทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

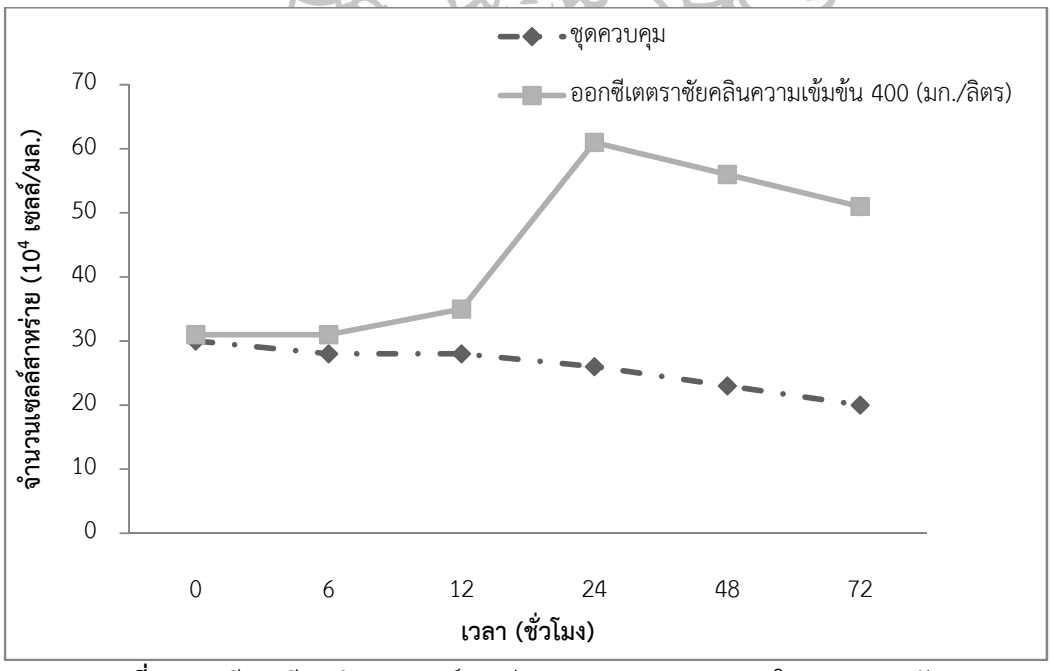
การทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ใช้เวลา 72 ชั่วโมง โดยระหว่างการทดลองมีการนับจำนวนเซลล์และศึกษาลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งการวิเคราะห์ปริมาณออกซีเตตราซัยคลินที่สะสมในเซลล์สาหร่าย ผลการทดลองเป็นดังนี้

4.3.1 ผลการนับจำนวนเซลล์

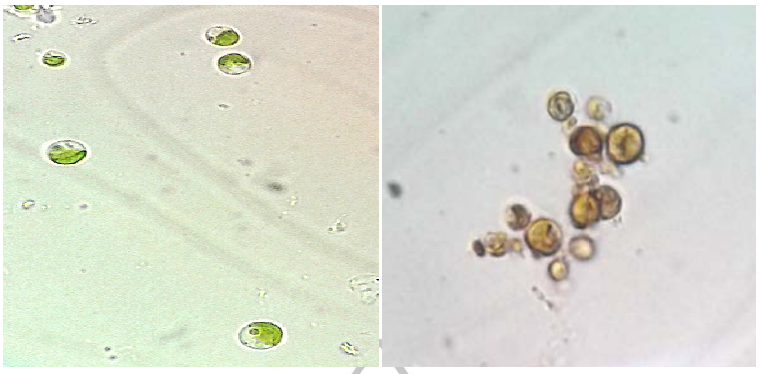
ผลการนับจำนวนเซลล์ในชุดทดลองนี้ ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมา คือ จำนวนเซลล์สาหร่ายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามเวลา และมีจำนวนเซลล์สูงกว่าการทดลองในชุดควบคุม (ตารางที่ 4.5) โดยสาหร่ายมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง จากนั้นจะเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ส่วนสาหร่ายในชุดควบคุมมีจำนวนเซลล์ลดลงตามเวลาตลอดการทดลอง (รูปที่ 4.8) และมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะการตาย (death phase) สำหรับชุดทดลองมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วโดยสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นอีก 1 เท่าในเวลาเพียง 1 วัน (เพิ่มจากประมาณ 30 $x10^4$ เซลล์/มล. เป็น 61 $x10^4$ เซลล์/มล.) และเมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ที่มีการสะสมออกซีเตตราซัยคลินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า สีของเซลล์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งต่างจากเซลล์สาหร่ายในชุดควบคุมที่มีลักษณะเป็นสีเขียว รูปร่างทรงกลม ขนาดเล็ก (รูปที่ 4.9)

ตารางที่ 4.5 จำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่มีการเปลี่ยนแปลงตามเวลาในช่วง 72 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	จำนวนเซลล์สาหร่าย (10^4 เซลล์/มล.)	
	ชุดควบคุม	ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 (มก./ลิตร)
0	30	31
6	28	31
12	28	35
24	26	61
48	23	56
72	20	51



รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่มีการเปลี่ยนแปลงตามเวลาในช่วง 72 ชั่วโมง



(ก) (ข)

รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบลักษณะเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ก) ลักษณะเซลล์ปกติ (ข) ลักษณะเซลล์ที่สะสมออกซีเตตราซัยคลิน

4.3.2 การสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

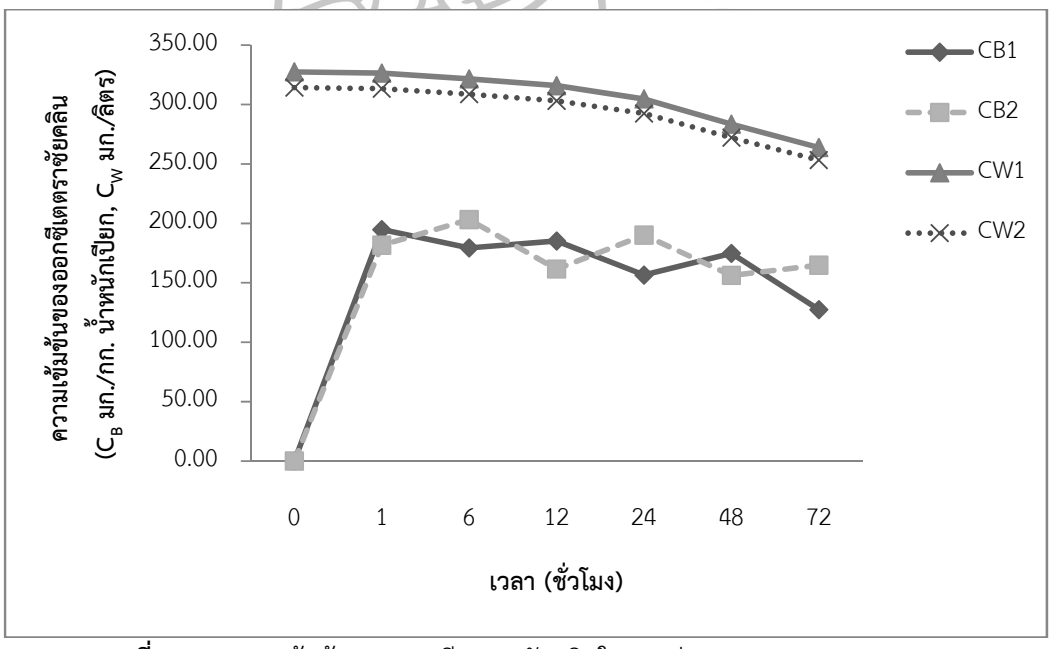
สาหร่าย *Chlorella vulgaris* สามารถสะสมออกซีเตตราซัยคลินได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการทดลอง (รูปที่ 4.10) โดยความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่ายเท่ากับ 181.58 และ 194.71มก./กก. น้ำหนักเปียก (188.15 ± 9.28) ส่วนความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่ายจะสูงสุดที่ 203.12 และ 179.33 มก./กก.น้ำหนักเปียก (191.23 ± 16.82) (ตารางที่ 4.6) หลังจากเริ่มทดลองได้ 6 ชั่วโมง และหลังจากนั้นการสะสมค่อนข้างคงที่ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์สาหร่ายมีการสะสมออกซีเตตราซัยคลินจนถึงจุด steady state แล้วเนื่องจากเซลล์มีขนาดเล็กและมีพื้นผิวสัมผัสกับสารละลายออกซีเตตราซัยคลินได้อย่างทั่วถึงจึงสามารถสะสมสารเข้าสู่ภายในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว

สำหรับผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ (C_w) พบว่า ลดลงอย่างช้าๆ ตามเวลา (รูปที่ 4.10) และตลอด 72 ชั่วโมงของการทดลองความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำลดลงจาก 327.41 และ 314.19 มก./ลิตร (320.80 ± 9.35) เป็น 263.81 และ 253.15 มก./ลิตร (258.48 ± 7.53) (ตารางที่ 4.6) ซึ่งลดลงประมาณ 19% การที่เป็นเช่นนี้เพราะเซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็กมากจึงสะสมออกซีเตตราซัยคลินจากน้ำได้เพียงเล็กน้อย โดยความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำที่หายไป อาจเนื่องจากการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินจากสภาวะที่ใช้ทดลองมากกว่าการสะสมเข้าสู่ภายในเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

ตารางที่ 4.6 ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และในน้ำที่ใช้ทดลองภายในเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในตัวอย่าง*		ค่า BCF*
	สาหร่าย (C_B) (มก./กก น้ำหนักเปียก)	น้ำ (C_w) (มก./ลิตร)	(ลิตร/กก.น้ำหนักเปียก)
0	0	320.80 ± 9.35	0
1	188.15 ± 9.28	319.84 ± 9.32	0.59 ± 0.05
6	191.23 ± 16.82	315.08 ± 9.18	0.61 ± 0.04
12	173.29 ± 16.69	309.46 ± 9.02	0.56 ± 0.07
24	173.27 ± 23.75	298.51 ± 8.70	0.58 ± 0.06
48	165.44 ± 13.11	277.78 ± 8.09	0.60 ± 0.06
72	146.06 ± 26.46	258.48 ± 7.53	0.56 ± 0.09

*ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)



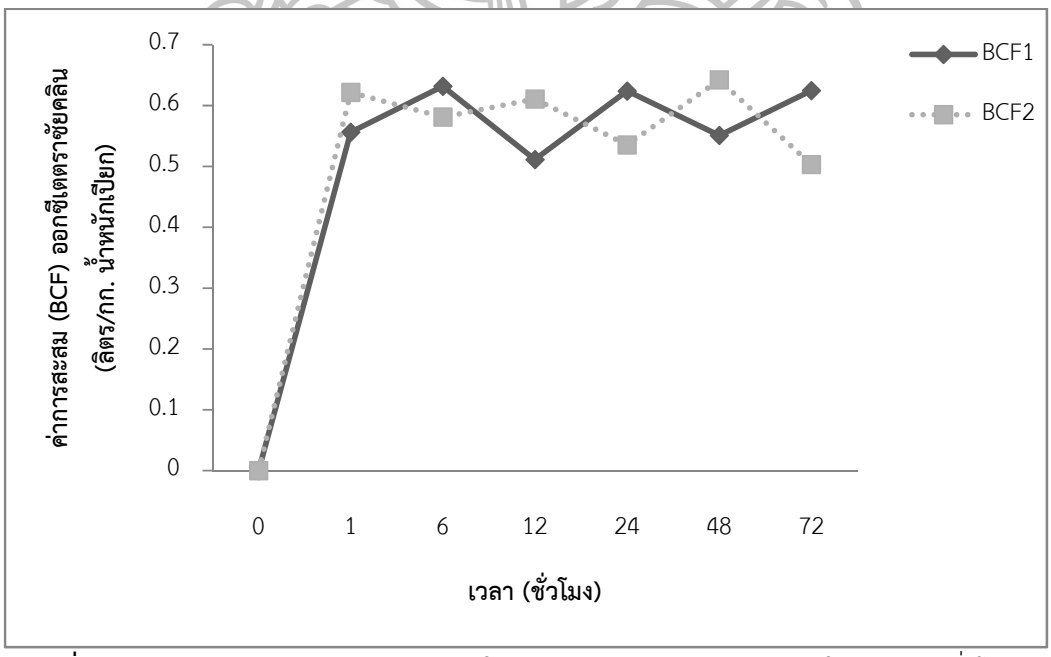
รูปที่ 4.10 ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และในน้ำที่ใช้ทดลองภายในเวลา 72 ชั่วโมง

4.3.4 ค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* (bioconcentration factor, BCF)

ค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* (BCF) คำนวณได้จากความเข้มข้นของสารในสาหร่าย (C_B) หารด้วยความเข้มข้นของสารในน้ำ (C_W) ผลการคำนวณพบว่า ค่าการสะสม (BCF) ออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในชั่วโมงแรกของการทดลอง โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.59 $\pm$ 0.05 ลิตร/กก.น้ำหนักเปียก

หลังจากนั้น ค่า BCF ค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4.11) ทั้งนี้เนื่องจากการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย (C_B) อาจถึงจุด steady state ในน้ำแล้ว เนื่องจากมวลของสารที่ถูกสะสมไว้ในเซลล์สาหร่ายมีเพียงเล็กน้อย ในขณะที่มวลของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำสูงมาก จึงทำให้ค่า BCF ไม่เปลี่ยนแปลงในระยะหลังของการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบผลจากการศึกษาค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* จากงานวิจัยนี้กับการศึกษาอื่นที่ผ่านมา พบว่า ค่าการสะสม (BCF) ในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* มีค่าค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับค่า BCF ในพืชน้ำชนิดอื่น เช่นการศึกษาของ ชลธิชา (2556) ที่พบว่า ไข่น้ำมีค่า BCF สูงสุดประมาณ 600.56 ลิตร/กก.น้ำหนักเปียก ทั้งนี้เนื่องจากสาหร่ายมีขนาดเล็กมาก จึงมีพื้นที่ผิวภายในเซลล์ที่ใช้ในการสะสมสารได้เพียงเล็กน้อย

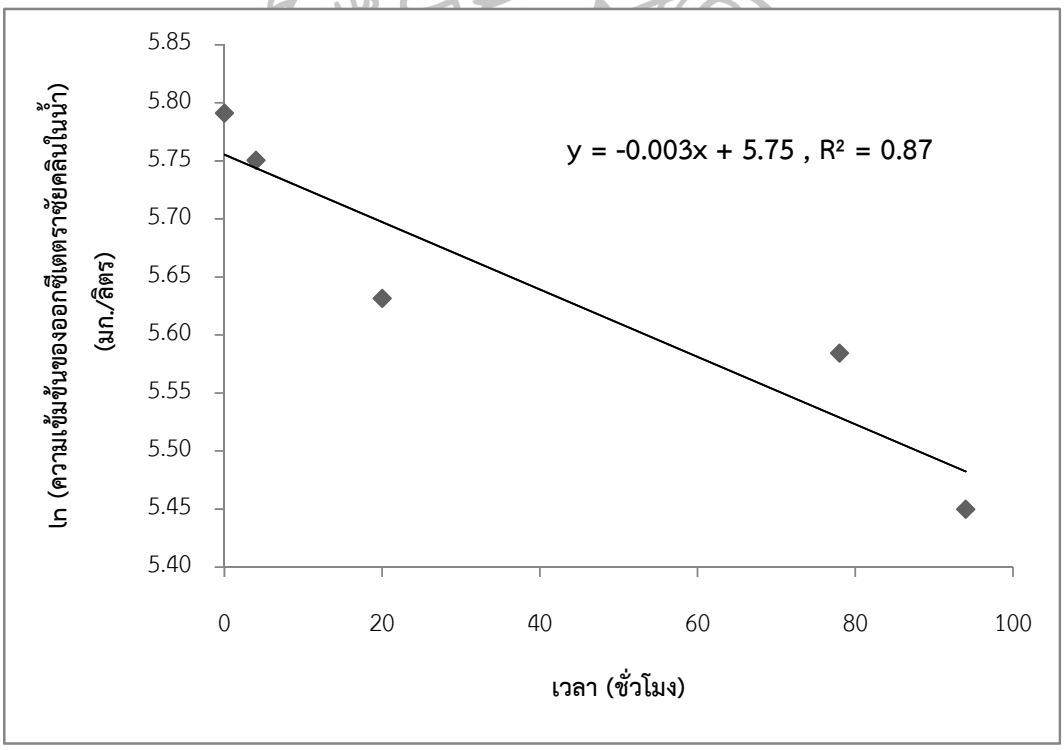


รูปที่ 4.11 ค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในเวลา 72 ชั่วโมง

4.4 ผลการทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลิน

เนื่องจากความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำลดลงได้ ทั้งจากการสลายตัวตามธรรมชาติในสภาวะที่ใช้การทดลอง และการดูดซับหรือสะสมสารโดยสาหร่าย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ โดยคำนวณอัตราคงที่การสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในสภาวะเดียวกับที่ใช้ในการทดลองการสะสม

สำหรับอัตราคงที่การสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ (degradation rate constant, k) ซึ่งได้จากความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง ln (ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลิน) กับเวลา พบว่า k มีค่า เท่ากับ 0.003 ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.12) หรือเท่ากับ 0.072 ต่อวัน และมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) เท่ากับ 9.625 วัน แสดงว่าในสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ ไม่มีแสง และควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำให้ออกซีเตเตราซัยคลินสลายตัวช้า ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับผลการศึกษาของ (Samuelsen, 1989) ที่พบว่า การสลายตัวของออกซีเตตาซัยคลินในแหล่งน้ำธรรมชาติที่ pH 7 - 9 อุณหภูมิอยู่ในช่วง 25 – 30 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) อยู่ระหว่าง 240-288 ชั่วโมงหรือ 10-12 วัน ดังนั้นจึงอาจกล่าวว่าการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำที่สภาวะการทดลองนี้ไม่น่าจะมีผลต่อการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย



รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง ln (ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ) กับ เวลา

บทที่ 5
สรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

การศึกษาผลของออกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร ภายใต้สภาวะที่ไม่เติมอากาศ ไม่ให้แสง และควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้นของ 400 มก./ลิตร ไม่เป็นพิษต่อสาหร่ายแต่กลับทำให้สาหร่ายเจริญโตเติบได้สูงสุด โดยมีจำนวนเซลล์เฉลี่ยสูงขึ้นจาก $48x10^4$ เป็น $105 x10^4$ เซลล์/มล. น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 0.02 กรัม/ลิตร เป็น 0.06 กรัม/ลิตร ในเวลา 1 วัน โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) เท่ากับ -0.06 ต่อวัน ผลการทดลองสรุปได้ว่า สาหร่ายมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่สูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนที่อยู่ในโมเลกุลของออกซีเตตราซัยคลินเป็นอาหารในการเจริญเติบโต

การศึกษาเพื่อหาจำนวนเซลล์สาหร่ายเพื่อใช้ในการทดลองการสะสม พบว่า จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 10% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร สาหร่ายมีการเจริญเติบโตมากกว่าการใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5 และ 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสาหร่ายมีการกระจายตัวอย่างเหมาะสม สามารถสัมผัสกับออกซีเตตราซัยคลินได้อย่างทั่วถึงและทำให้สะสมออกซีเตตราซัยคลินได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สำหรับการศึกษาการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยใช้ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./กรัม และจำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 10% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน ในการทดลองในสภาวะที่ไม่มีแสง ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เซลล์สาหร่ายสามารถสะสมออกซีเตตราซัยคลินได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการทดลอง และสูงสุด เท่ากับ 191.23 มก./กก.นน.เปียก ในชั่วโมงที่ 6 ของการทดลอง จากนั้นการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่ายค่อนข้างคงที่ ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่การสะสมถึงจุด steady state เมื่อคำนวณค่าการสะสม (BCF) ออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* พบว่า ค่า BCF มีค่าเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 0.59 (ลิตร/กก.) ส่วนการทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำในสภาวะที่ไม่มีแสง และควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่า อัตราคงที่การสลาย เท่ากับ 0.003 ต่อชั่วโมง หรือเท่ากับ 0.072 ต่อวัน ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) เท่ากับ 9.625 วัน ถึงแม้ว่าออกซีเตตราซัยคลินสามารถสลายตัวในน้ำได้ แต่เนื่องจากความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่ใช้ในการทดลอง

สูงมาก ในขณะที่การสะสมออกซีเตตราซัยคลินของเซลล์สาหร่ายมีเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำไม่ส่งผลต่อการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในการสะสมสารมลพิษอื่นๆ ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำหรือในสภาวะที่มีสารปนเปื้อนมากกว่าหนึ่งชนิด

2) ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในน้ำที่มีคุณสมบัติหรือสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกับธรรมชาติมากยิ่งขึ้น

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

1. การเตรียมสารเคมี

สารละลาย buffer (mcilvaine buffer EDTA)

1) ชั่ง Di-sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Na_2HPO_4) จำนวน 28.4 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.

2) ชั่ง citrate acid monohydrate ($C_6H_8O_7.H_2O$) จำนวน 21 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.

3) นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1 (anhydrous dibasic sodium phosphate) จำนวน 625 มล. ผสมกับสารละลายที่ได้จากข้อ 2 (citric acid mono.) จำนวน 1,000 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปปรับพีเอชให้เป็น 1 ด้วย HCL conc.

4) ชั่ง EDTA-di-sodium salt ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$) จำนวน 60.5 กรัม ผสมกับสารละลายในข้อ 3 ที่ปรับพีเอชแล้ว

สารละลาย mobile phase (สารละลาย oxalic acid 0.91 M ใน methanol)

1) ชั่ง oxalic acid จำนวน 1.26 กรัม นำมาละลายใน methanol HPLC grade ปรับปริมาตร ให้ได้ 1,000 มล.

2. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

สูตรอาหาร BG-11

สาร	ปริมาตร (กรัม/ลิตร)
$NaNO_3$	1.500
K_2HPO_4	0.040
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.075
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.036
citric acid	0.006
ferric ammonium citrate	0.006
EDTA (disodium salt)	0.001
$NaCO_3$	0.020
trace metal solution*	1.000

ละลายส่วนผสมทั้งหมดแล้วปรับพีเอช (pH) ให้ได้เท่ากับ 7 จากนั้นปรับปริมาตรน้ำให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ: *trace metal solution มีส่วนประกอบดังนี้

สาร	ปริมาตร (กรัม/ลิตร)
H_3BO_3	2.8600
$MnCl_2.4H_2O$	1.8100
$ZnSO_4.7H_2O$	0.2220
$NaMoO_4.5H_2O$	0.0390
$CuSO_4.5H_2O$	0.0790
$Co(NO3)_2.6H_2O$	0.0494

ภาคผนวก ข
การเตรียมเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นและการสกัดตัวอย่างจากเซลล์สาหร่าย

1.การเตรียมเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น

รูปภาคผนวกที่ ข.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในอาหารสูตร BG-11 ภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศและแสงที่มีความเข้ม 2,000 ลักซ์วันละ 12 ชั่วโมง

รูปภาคผนวกที่ ข.2 สาหร่าย *Chlorella vulgaris* หลังจากที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

2. การสกัดตัวอย่างจากเซลล์สาหร่าย

รูปภาคผนวกที่ ข.3 การกรองตัวอย่าง

รูปภาคผนวกที่ ข.4 ส่วนของสารละลายและเซลล์สาหร่ายที่กรองได้

รูปภาคผนวกที่ ข.5 เติมสารละลาย Mcilvaine buffer EDTA ลงในตัวอย่างสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

รูปภาคผนวกที่ ข.6 ตัวอย่างสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่ปั่นจนละเอียด

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลอง

1. การทดลองผลของความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

ตารางภาคผนวกที่ ค.1 จำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เปลี่ยนแปลงตามเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม

วันที่	จำนวนเซลล์สาหร่าย (10^4 เซลล์/มล.) ในออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น (มก./ลิตร)				
	ชุดควบคุม	ความเข้มข้น 80 มก./ลิตร	ความเข้มข้น 120มก./ลิตร	ความเข้มข้น 200มก./ลิตร	ความเข้มข้น 400มก./ลิตร
0	49	48	48	50	50
1	48	53	75	88	105
3	48	49	54	65	84
5	37	42	44	68	84
7	33	33	41	53	70

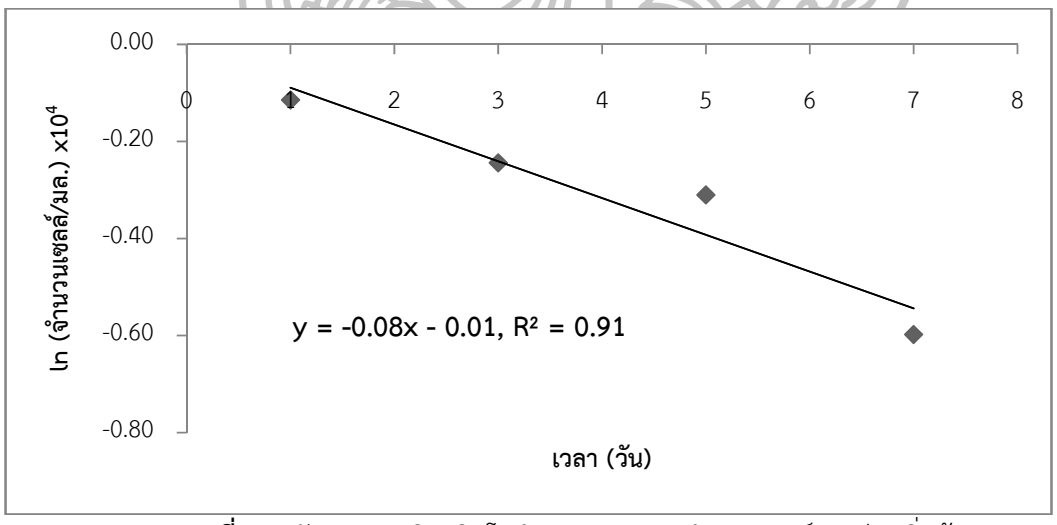
ตารางภาคผนวกที่ ค.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร และชุดควบคุม

วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย (กรัม/ลิตร) ในออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น (มก./ลิตร)				
	ชุดควบคุม	ความเข้มข้น 80 (มก./ลิตร)	ความเข้มข้น 120 (มก./ลิตร)	ความเข้มข้น 200 (มก./ลิตร)	ความเข้มข้น 400 (มก./ลิตร)
0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
1	0.02	0.02	0.03	0.04	0.06
3	0.02	0.02	0.03	0.03	0.05
5	0.02	0.01	0.03	0.02	0.03
7	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03

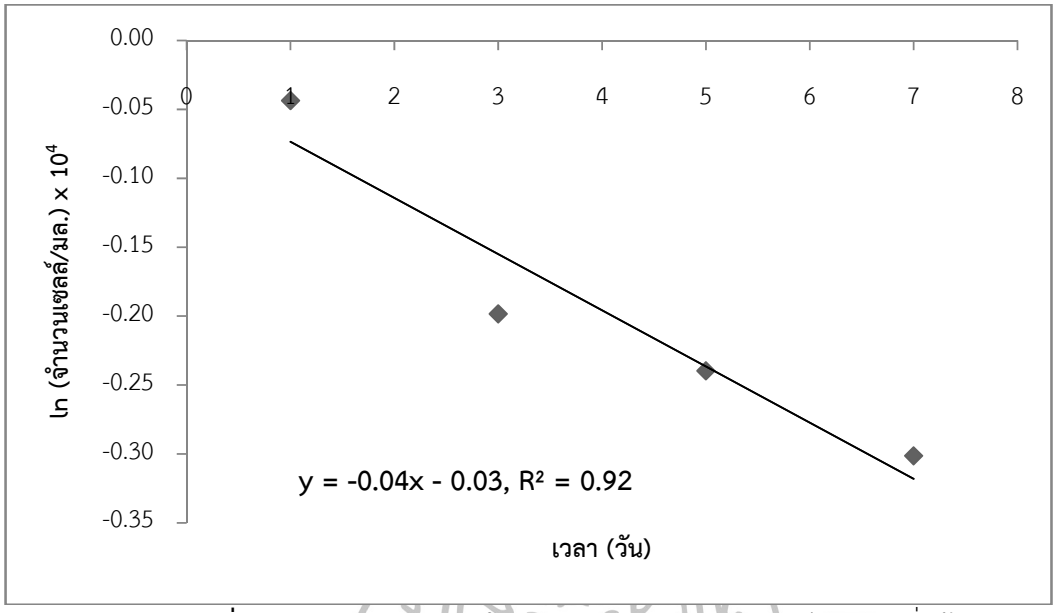
2.การทดลองเพื่อหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เหมาะสมต่อการสะสมออกซีเตตราซัยคลิน

ตารางภาคผนวกที่ ค.3 จำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5%, 10% และ 20% ของออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร

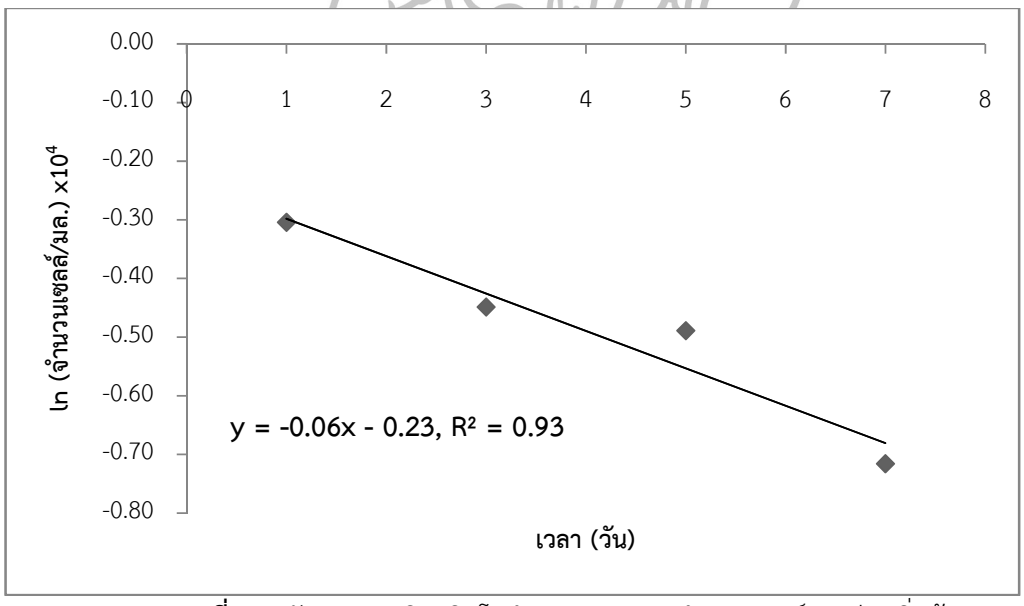
วันที่	จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร (10^4 เซลล์/มล.)					
	จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5%		จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10%		จำนวนเซลล์เริ่มต้น 20%	
	ชุดควบคุม	ออกซีเตตราซัยคลิน 400 มก./ลิตร	ชุดควบคุม	ออกซีเตตราซัยคลิน 400 มก./ลิตร	ชุดควบคุม	ออกซีเตตราซัยคลิน 400 มก./ลิตร
0	22	20	33	33	50	48
1	19	19	24	60	40	100
3	17	15	21	58	38	95
5	16	16	20	48	31	74
7	12	15	16	48	32	73



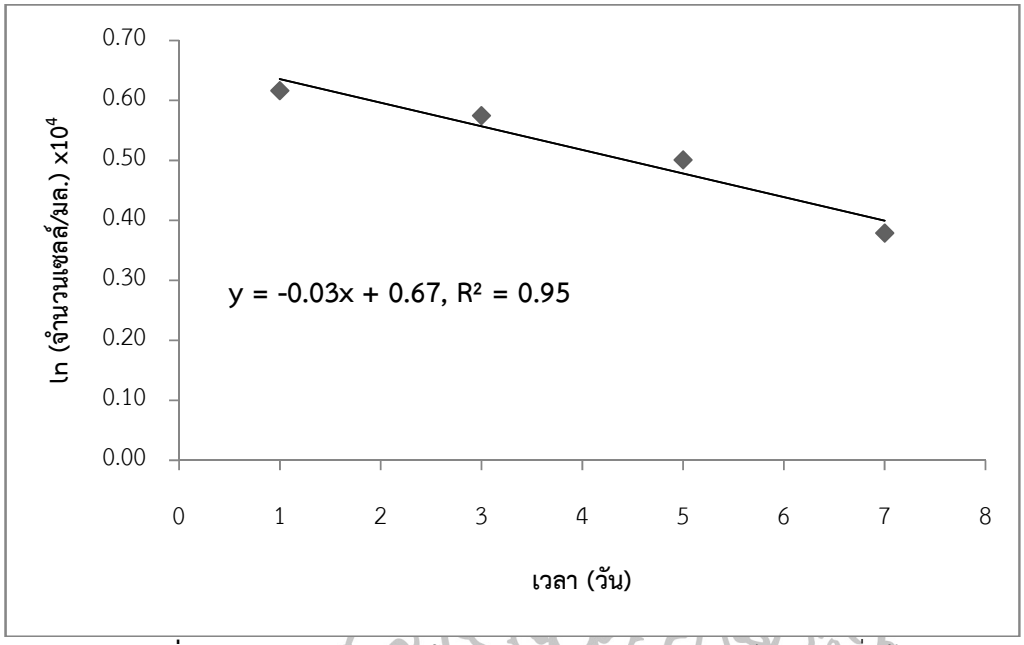
รูปภาคผนวกที่ ค.1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (u) ของจำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 5% ที่เพาะเลี้ยงในน้ำปราศจากไอออน(ชุดควบคุม)



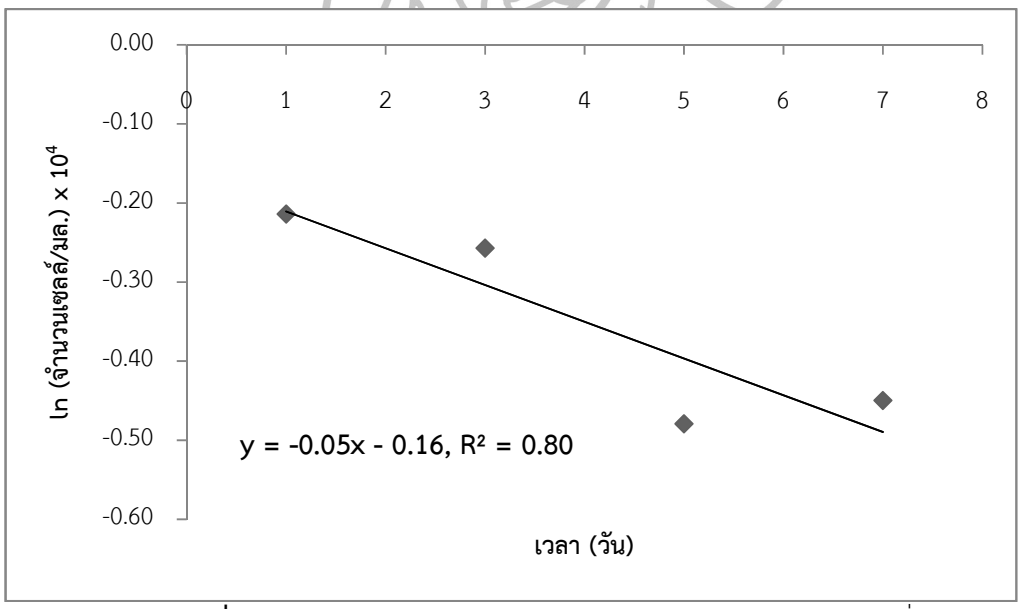
รูปภาคผนวกที่ ค.2 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (u) ของจำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 5% ที่เพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร



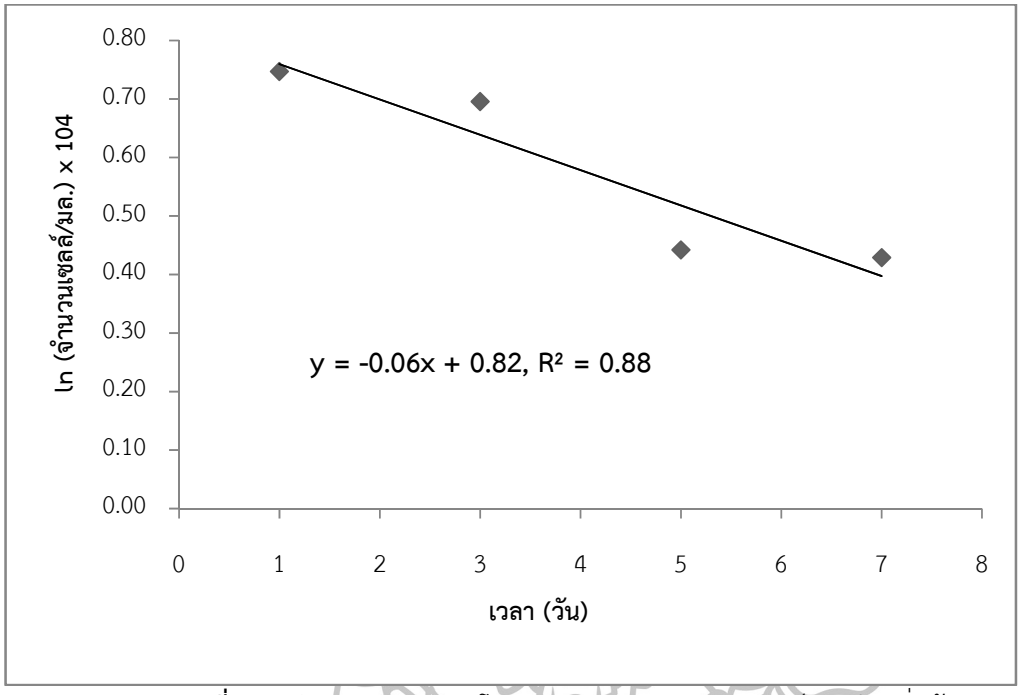
รูปภาคผนวกที่ ค.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (u) ของจำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 10% ที่เพาะเลี้ยงในน้ำปราศจากไอออน(ชุดควบคุม)



รูปภาคผนวกที่ ค.4 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (u) ของจำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 10% ที่เพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร



รูปภาคผนวกที่ ค.5 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (u) ของจำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 20% ที่เพาะเลี้ยงในน้ำปราศจากไอออน (ชุดควบคุม)



รูปภาคผนวกที่ ค.6 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (u) ของจำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 20% ที่เพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร

3. การทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

ตารางภาคผนวกที่ ค.4 จำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่มีการเปลี่ยนแปลงตามเวลาในช่วง 72 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	จำนวนเซลล์สาหร่าย (10^4 เซลล์/มล.)	
	ชุดควบคุม	ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 (มก./ลิตร)
0	30	31
6	28	31
12	28	35
24	26	61
48	23	56
72	20	51

ตารางภาคผนวกที่ ค.5 ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และในน้ำที่ใช้ทดลอง

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในตัวอย่าง			
	สาหร่าย *Chlorella vulgaris* (C_B) (มก./กก. นน.เปียก)		น้ำ (C_W) (มก./ลิตร)	
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่2	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2
0	0.00	0.00	327.41	314.19
1	181.58	194.71	326.43	313.25
6	203.12	179.33	321.57	308.59
12	161.50	185.09	315.83	303.08
24	190.07	156.48	304.67	292.36
48	156.17	174.71	283.50	272.05
72	164.77	127.35	263.81	253.15

ตารางภาคผนวกที่ ค.6 ค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลินจากน้ำในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* (bioconcentration factor, BCF) ในเวลาที่ 0, 1, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงของการทดลอง

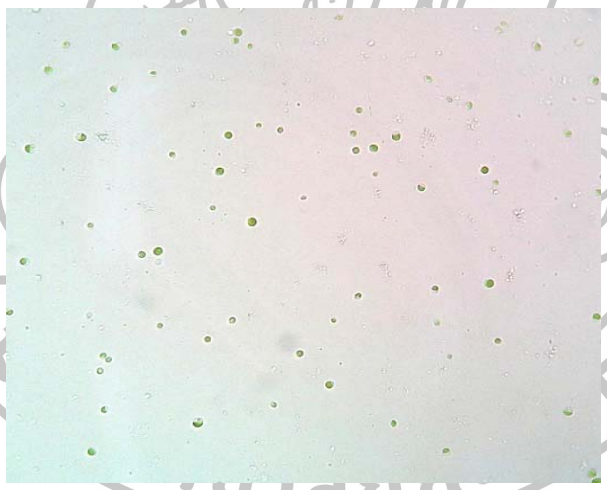
ชั่วโมงที่	ค่าการสะสม (BCF) ออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*		
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	เฉลี่ย
0	0.00	0.00	0.00
1	0.56	0.62	0.59
6	0.63	0.58	0.61
12	0.51	0.61	0.56
24	0.62	0.54	0.58
48	0.55	0.64	0.60
72	0.62	0.50	0.56

4.การทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลิน

ตารางภาคผนวกที่ ค.7 ผลการทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ

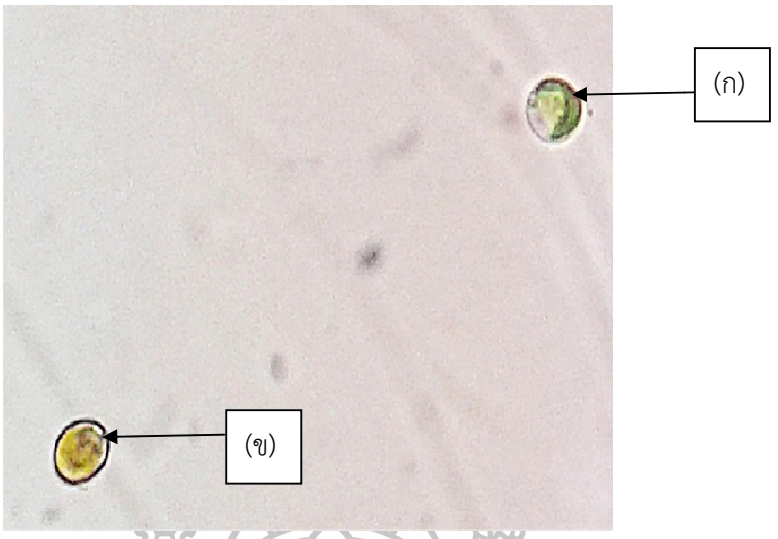
ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ (C_t) (มก./ลิตร)	
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2
0	310.84	325.11
4	308.17	320.26
20	292.85	300.48
78	257.95	266.67
94	247.20	213.92

5. การศึกษาลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์



(ก)

รูปภาคผนวกที่ ค.7 ลักษณะเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ระยะเวลา 7 วัน กำลังขยาย 400 เท่า



รูปภาคผนวกที่ ค.8 ลักษณะเซลล์สาหร่าย*Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน ระยะเวลา 7 วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า
(ก) ลักษณะเซลล์ปกติ (ข) ลักษณะเซลล์ที่สะสมสารออกซีเตตราซัยคลิน

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม. 2552. **การเพาะเลี้ยงสาหร่าย**. เอกสารประกอบการสอน. มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร, สกลนคร.

คนาวรรณ พจนาคม และ ปนัดดา ใยภักดี. 2547. โครงสร้างกับความคงสภาพทางเคมีของยา (structutrs and chemical stability of drugs). **วารสารศรีนครินทร์วิโรฒเภสัชสาร** 9 (1) : 81-92.

คนาวรรณ พจนาคม. 2551. **ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อแบคทีเรีย.** เอกสารประกอบรายวิชา 564 212 เภสัชเคมี 3. ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.

จรูญ สารินทร์. 2551. โครงการบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะหนักปนเปื้อนโดยใช้ระบบบำบัดน้ำเสียจำลองแบบ Immobilized cell reactor. **รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร**. 117 หน้า.

ชลธิชา เทพรักษ์. 2556. **การสะสมยาปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลินจากน้ำของพืชน้ำ 3 ชนิด.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2534. **คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.** ฐานเศรษฐกิจ, กรุงเทพฯ.

ชาญชัย อมรรัตนานุเคราะห์. 2543. **ผลของตัวแปรต่อการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์โดยสาหร่ายขนาดเล็กในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต,จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดวงมณี เดชเดชาชาญ. 2547. **การสะสมและกำจัดแมงกานีสของสาหร่ายเกลียวทอง *Spirulina platensis* ในน้ำเสียสังเคราะห์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดำรงค์ โลหะลักษณาเดช, ทัศนีย์ ชวนประชุม และ เอกพงศ์ แก้วสุทธิ์. 2554. การเปรียบเทียบสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยง *Chlorella ellipsoidea*. **วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง** 5 (2) : 48-54.

ธิดา เพชรมณี. 2542. **คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน.** กรมประมง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา, สงขลา.

นพดล ศุกระกาญจน์, สุภฎา คีรีรัฐนิคม, กฤษณะ เรืองคล้าย และ พันธสิทธิ์ โชคสวัสดิกร. 2557. เภสัชจลศาสตร์ การกระจายตัว และการกำจัดยาออกซีเตตราไซคลินในปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*). **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 : 14-22.

ปิยรัตน์ มูลศรี. 2554. การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากสาหร่ายในท้องถิ่นของจังหวัดเพชรบูรณ์. **รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.** 50 หน้า.

เพชรรัตน์ ศักดินันท์, ตระการศักดิ์ แพไธสง และ สิริลักษณ์ สายหงษ์. 2549. คลอเตตราซัยคลินและออกซีเตตราซัยคลินในอาหารสัตว์จาก 4 จังหวัดภาคตะวันตก. **รายงานวิจัยศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก**. 9 หน้า.

ภรณี หวังธำรงวงศ์ กฤษณ์ เทียรฆประสิทธิ์ และ สุรวดี นาคธน. 2543. ประสิทธิภาพของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* spp. ในการลดปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำเสียจากฟาร์มสุกร. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี(ภาษาไทย)** 8 : 1-5.

มณฑิรา ถาวรยุติการต์, จิราภร เกษรจันทร์ และ มานพ เห็นดีน. 2551. **การตรวจติดตามยาคลอแรมฟินิคอล ออกซีเตตราไซ คลินและออกโซลินิค แอซิด ปนเปื้อนในสัตว์น้ำจากธรรมชาติบริเวณโดยรอบทะเลสาบสงขลา.** กรมประมง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, กรุงเทพฯ.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. **แพลงก์ตอนพืช.** คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

_____ . 2543. **คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน.** คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วัชระ เวียงแก้ว. 2552. การสกัดไขมันจากจุลสาหร่าย. **รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.** 58 หน้า.

วิสัย วงศ์สายปิ่น. 2534. **สาหร่ายเซลล์เดียวสารอาหารจากแสงตะวัน.** รวมทรรศ์, กรุงเทพฯ.

วีณา ชูโชติ, กิตติคุณ สุคันโธวงศ์, ธนิยา แซ่โอ้ว และ สันติสุข ขวัญศิริวณิช. 2557. การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กที่มีปริมาณไขมันสูง**. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง** 8 (1) : 84-92.

สุดสายชล หอมทอง และ วชิราภรณ์ ก้องกังวาลย์. 2556. ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของ *Chaetoceros calcitrans* .**วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา** 18 (2) : 172-178.

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์. 2547. การกำจัดตะกั่วและแคดเมียมโดยใช้สาหร่ายขนาดเล็ก *Phormidium angustissimum* และ *Chlorella vulgaris*. **วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ (SectionT) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย** 3 (1) : 287-296.

Aksu, Z. and S. Tezer. 2005. Biosorption of reactive dyes on the green algae *Chlorella vulgaris***. Process Biochemistry** 40 (3-4) : 1347-1361.

Boonsaner, M. and D.W. Hawker. 2010. Accumulation of oxytetracycline and norfloxacin from saline soil by soybeans. **Science of the Total Environmental** 408 : 1731–1737.

Boxall, A.B., P. Johnson, E.J. Smith, C.J. Sinclair, E. Stutt and L.S. Levy. 2006. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54 : 2288-2297.

Boyd, C.E. 1990. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama.

Brain, R.A. , D.J. Johnson, S.M. Richards, H. Sanderson, P.K. Sibley and K.R. Solomon. 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemnagibba* using a seven-day static-renewal test. **Environmental Toxicology and Chemistry** 23 (2) : 371-382.

Caicedo, J.R., N. P. Van Der Steen, O. Aree and H. J. Gijzen. 2000**.** Effect of total ammonia nitrogen concentration and pH on growth rates of duckweed**. Water Research** 34 (15) : 3829-3835.

Choo, P.S. 1994. Degradation of oxytetracycline hydrochrolide in fresh and seawater. **Asian Fisheries Science** 7 : 195-200.

Collet, P., A. Hélias, L. Lardon, M. Ras, R.A. Goy and J.P. Steyer. 2011. Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. **Bioresource Technology** 102 : 207-214.

Doi, M. and K. Stoskope. 2000. The kinetics of oxytetracycline degradation in deionized water under varying temperature, pH, light, substrate, and organic matter**. Jounal of Aquatic Animal Health** 12 : 246–253.

Eguchi, K., H. Nagase, M. Ozawa, Y.S. Endoh, K. Goto, K. Hirata, K. Miyamoto and H. Yoshimusa. 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. **Chemosphere** 57 : 1733-1738.

Ferreira, C.S., C.B.A. Nunes, J. Henriques-Almeida and L. Guilhermino. 2007. Acute toxicity of oxtetracyclineand florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogetica***. Ecotoxicology and Environmental Safety** 67 : 452-458

Halling-Sørensen, B., A. Lykkeberg, F. Ingerslev and P. Blackwell. 2003. Characterizations of the antibiotic degradation pathways of the oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS**. Chemoshere** 50 : 1331-1342.

Halling-Sørensen, B., G. Sengeløv and J. Tjørnelund. 2002. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 42 : 263-271.

Isidori, M., M. Lavorgna, A. Nardelli, L. Pascarella and A. Parrella. 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms**. Science of the Total Environmental** 346 : 87-98.

Kong W. D., Y. G. Zhu, Y.C. Liang, J. Zhang, F.A. Smith and M. Yang. 2007. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (Medicago sativa L.). **Environmental Pollution** 147 : 187-193.

Kuhl, A. and H. Lorenzen. 1963. Handling and culturing of Chlorella. **Methods in cell physiology** 1 : 159-183.

Kümmerer, K. 2004. Resistance in the environment. **Antimicrobial Chemotherapy** 54 : 311–320.

Levy, S.B., G.B. FitzGerald and A.B. Macone. 1976. Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on farm. **The New England Journal of Medicine** 295 : 583-588.

Loke, M.L., J. Tjornelund. and B. Halling-Sørensen. 2002. Determination of the distribution coefficient (log K_b) of oxytetracycline, tylosin A, olaquindox and metronidazole in manure. **Chemosphere** 48 : 351-361.

Lüzhøft, H.H., B. Halling-Sørensen and S.E. Jørgensen. 1999. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming**. Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 36 : 1-6.

Månsson, S. 2012. **Cultivation of *Chlorella vulgaris* in nutrient solution from greenhouse tomato production.** Swedish University of Agricultural Sciences.

McEwen, S. and J. Fedorka-Cray. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical Infectious Diseases** 34 (3) : 93-106.

Megharaj, M., H.M. Pearson and K. Venkateswarhu. 1992. Removal of nitrogen and phosphorus by immobolized cells of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus biijugatus* isolated from soil. **Enzyme and Microbial Technology** 14 : 656 – 658.

Oka, H., H. Ito and H. Matsumto. 2000. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **Journal of Chromatography A** 882 : 109-133.

Park, S. and K. Choi. 2008. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. **Ecotoxicolgy** 17 : 526-538.

Pouliquen, H., R. Délépéé, M. Larhantec-Verdier and H. M. Lebris. 2007. Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline, oxolinic acid, flumequine and florsenicol) in deionised water**, Freshwater and Seawater Under Abiotic Condition Aquaculture** 262 : 23-28.

Pro, J., J.A. Ortiz, S. Boleas, C. Fernandez, G. Carbonell and J.V. Taraona. 2003. Effect assessment of antimicrobial pharmaceuticals on the aquatic plant *Lemna minor*. **Environmental Contamination and Toxicology** 70 : 290-295.

Quinn, B., F. Gagné and C. Blaise. 2008. An inverstigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarians, *Hydra attenuate*. **Science of the Total Environment** 389 : 306-314.

Samuelsen, O.B. 1989. Degradation of oxytetracycline in seawater at two difference temperatures and light intensity, and the persistence of oxytetacycline in the sediment from a fish farm. **Aquaculture** 70 : 365-370

Sansawa, H. and H. Endo. 2004. Production of intracellular phytochemicals in Chlorella under heterotrophic conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 98 (6) : 437-444.

Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering** 101 : 87-96.

Steenblock, D. 1987. ***Chlorella* natural medicinal medicinal algal**. Aging Research Institute. El Toro, California. pp. 50.

Wassef, M. K. 1983. **Environmental assessment: Finalization for oxytetracycline water soluble and premix formulations for food producing animals.** Environmental Impact Staff, Bureau of Veterinary Medicine. U.S. Food and Drug Administration. October 1983.

Widjaja, A., C-C. Chien and Y-H. Ju. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers** 40 (1) : 13-20.

Xu, H., X. Miao and Q. Wu. 2006. High quality biodiesel production from a microalgae *Chlorella protothecoides*by heterotropic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology** 126 : 499-507.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	นางสาวสิตา ไชยช่วย
ที่อยู่	33/1 ซอยองครักษ์ 13 นครไชยศรี ดุสิต กรุงเทพฯ
ที่ทำงาน	บริษัท พาธแล็บ (ประเทศไทย) จำกัด
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2553	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
พ.ศ. 2555	ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประวัติการทำงาน	
พ.ศ. 2553 – 2555	พนักงาน บริษัท ดี.เค.เอส.เอช (ประเทศไทย) จำกัด ตำแหน่ง Quotation and Tender
พ.ศ. 2555 – ปัจจุบัน	พนักงาน บริษัท พาธแล็บ (ประเทศไทย) จำกัด ตำแหน่ง Branch admin and Co-ordinator
ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่	สิตา ไชยช่วย, จารุวรรณ หวะสุวรรณ และ มลิวรรณ บุญเสนอ. 2558. การสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris.* วารสารวิชาการ Veridian E-Journal Science and Technology Silpakorn University ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 เดือนกรกฎาคม – ธันวาคม พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยศิลปากร