Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University
Volume 2 Number 2 July – December 2015 (ISSN 2408 – 1248)

การสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris.*[*]

Bioaccumulation Of Oxytetracycline In *Chlorella Vulgaris.*

สิตา ไชยช่วย (Sita Chaichauy)[**]
จารุวรรณ หวะสุวรรณ (Jaruwan Hawahsuwan)[***]
มลิวรรณ บุญเสนอ (Maliwan Boonsaner)[****]

บทคัดย่อ

ออกซีเตตราซัยคลินเป็นยาปฏิชีวนะที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย และพบการสะสมในแหล่งน้ำอยู่เสมอ งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของออกซีเตตราซัยคลินที่มีต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* รวมทั้งการสะสมสารนี้ในเซลล์สาหร่าย ผลการทดลองพบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์สาหร่ายสูงขึ้นตามความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่เพิ่มขึ้น คือ ที่ความเข้มข้น 400 มก./ลิตรออกซีเตตราซัยคลิทำให้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* เจริญเติบโตสูงกว่าที่ความเข้มข้น 80,120 และ 200 มก./ลิตร สำหรับการทดลองที่ใช้จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นที่ 5, 10 และ 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร พบว่า จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 10% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินทำให้สาหร่าย *Chlorella vulgaris* มีการเจริญเติบโตสูงสุด

เมื่อทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยใช้ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./กรัม และจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน พบว่าเซลล์สาหร่ายสามารถสะสมออกซีเตตราซัยคลินได้อย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการทดลอง และสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 ของการทดลอง โดยปริมาณที่พบ เท่ากับ 191.23 มก./กก.นน.เปียก และหลังจากนั้นการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่ายค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าการสะสม (BCF) เท่ากับ 0.59 ลิตร/กก.น้ำหนักเปียก ซึ่งระหว่างการทดลองการสะสมนี้ออกซีเตตราซัยคลินในน้ำมีการสลายตัวช้า และไม่ส่งผลต่อการทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย โดยอัตราคงที่การสลายตัว (degradation rate constant, k) เท่ากับ 0.003 ต่อชั่วโมง หรือ 0.072 ต่อวัน และมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) เท่ากับ 9.625 วัน

---

[*] เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัย

[**] นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากร e-mail : sita.chaichauy@gmail.com (Student of Master of Environment science, Faculty of science, Silpakorn University)

[***] อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (Lecturer, Department of Environment science, Faculty of science, Silpakorn University)

[****] รองศาสตราจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (Advisors : Associate Professor Doctor, Department of Environment science, Faculty of science, Silpakorn University)

คำสำคัญ: สาหร่าย *Chlorella vulgaris*/ ออกซีเตตราซัยคลิน/ การสะสม

Abstract

Oxytetracycline is an antibiotic that is widely used and often found in surface waters. The objectives of this study were to investigate the effect of oxytetracycline on the growth of *Chlorella vulgaris* and the accumulation in its cell. Results showed that growth increased with increasing oxytetracycline concentrations. *Chlorella vulgaris* exposed to 400 mg/L of oxytetracycline solution grew faster than those exposed to 80, 120 and 200 mg/L. In addition, the growth rate of 10% inoculum in 400 mg/L of oxytetracycline solution was higher than were found with 5% and 20% of the inoculum concentrations. Accumulation of oxytetracycline in *Chlorella vulgaris* was rapid and reached the highest concentration after 6 hours at 191.23 mg/Kg. wet weight. The concentration of oxytetracycline in *Chlorella vulgaris* was steady and gave the BCF value of 0.59 L/Kg. The degradation of oxytetracycline in the water was slow and did not affect the accumulation experiment. The degradation rate constant (k) is 0.003 per hour or 0.072 per day and half-life value of 9.625 day.

Keywords: *Chlorella vulgaris*/ oxytetracycline/ bioaccumulation

บทนำ

ในพื้นที่ที่มีการทำฟาร์มเลี้ยงสัตว์อย่างแพร่หลาย เช่น ฟาร์มเลี้ยงไก่ ฟาร์มกุ้ง และฟาร์มสุกร น้ำทิ้งจากฟาร์มเหล่านี้มักมีค่าความสกปรกค่อนข้างสูง และมีการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะรวมทั้งสารเคมีต่างๆ หลายชนิด ออกซีเตตราซัยคลินเป็นยาปฏิชีวนะที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในการควบคุมและ รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำที่เป็นอาหารได้ (ชลอ, 2534) เนื่องจากสามารถออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (คนาวรรณ, 2551) แต่การใช้ยาอย่างไม่ถูกต้องทั้งในด้านระยะเวลาและปริมาณที่กำหนดสามารถส่งผลทำให้จุลินทรีย์ และเชื้อโรคเกิดการดื้อยาได้ (Levy *et al.,* 1976)นอกจากนี้การปล่อยน้ำเสียที่มีออกซีเตตราซัยคลินปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อม จะทำให้จุลินทรีย์ในธรรมชาติถูกทำลาย การตกค้างของยาในธรรมชาติอาจเข้าสู่ระบบห่วงโซ่อาหารส่งผลต่อผู้บริโภคได้ในที่สุด

สาหร่ายเป็นแพลงก์ตอนพืชที่สำคัญในระบบนิเวศทางน้ำ โดยมีบทบาทเป็นผู้ผลิตในระบบห่วงโซ่อาหาร ช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนในแหล่งน้ำด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง เป็นสิ่งมีชีวิตที่นิยมนำมาใช้ในการลดมลพิษหรือกระบวนการบำบัดฟื้นฟูทางชีวภาพ (สาวิกา และคณะ, 2557) นอกจากนั้นผิวหรือผนังเซลล์ของสาหร่ายยังช่วยดูดซับหรือสะสมสารต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Aksu and Tezer, 2005) *Chlorella vulgaris* เป็นสาหร่ายเซลล์เดียว ขนาดเล็กที่สามารถเจริญเติบโตได้ง่าย พบได้ในแหล่งน้ำทั่วไปรวมทั้งอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย สามารถรักษากลไกภายในเซลล์ให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ภายใต้ภาวะเครียดให้กลับมาทำงานได้เป็นปกติ เช่น การรักษาระดับคลอโรฟิลล์และเอนไซม์ (ทวิพร และนุชนาถ, 2557) นอกจากนี้

Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University
Volume 2 Number 2 July – December 2015 (ISSN 2408 – 1248)

ผนังเซลล์ของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ยังมีคุณสมบัติที่สามารถรับไอออนของสารต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ดวงรัตน์ และสรัญญา, 2550) และยังถูกนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์อย่างแพร่หลาย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของออกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมสารเข้าสู่ภายในเซลล์ เพื่อเป็นแนวทางในการประเมินผลกระทบของออกซีเตตราซัยคลินต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย และการใช้สาหร่ายในการกำจัดออกซีเตตราซัยคลินที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*
2. เพื่อศึกษาจำนวนเซลล์เริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* เพื่อใช้ในการศึกษาการสะสมออกซีเตตราซัยคลิน
3. เพื่อศึกษาการรับ (uptake)และการสะสมของออกซีเตตราซัยคลินภายในเซลล์สาหร่าย*Chlorella vulgaris*

วิธีการวิจัย

1. สารเคมี

ออกซีเตตราซัยคลิน (commercial grade) ของบริษัท DafengHuasu Phar MaceuticalCo.,LTD, ประเทศไทย ส่วนออกซีเตตราซัยคลิน (standard grade) ซื้อจาก Dr. Ehrenstorfer GmbH ประเทศเยอรมันนี สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ ได้แก่ Methanol (HPLC grade ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.5%) Acetonitrile (HPLC grade ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.5%) Oxalic acid (Analytical grade ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.5%) Citric acid Monohydrate ($C_6H_8O_7.H_2O$) (Analytical reagent grade ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.0%) Di-sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Na_2HPO_4) (Analytical reagent grade ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.0%) EDTA-di-sodium salt ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$) (Analytical reagent grade ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.0%) ของบริษัท Ajax ประเทศออสเตรเลีย และหลอด solid phase extraction (SPE) ชนิด polymeric reversed phase (StrataX 200 มก./6 มล.) เป็นของบริษัท Phenomenex ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่าย *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 ที่ใช้ทดลองได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย นำมาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในอาหารสูตร BG-11 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ออกซิเจนตลอดเวลา และให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ 12 ชั่วโมงต่อวัน

3. การเตรียมการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน

เตรียมสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้นต่างๆ คือ 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และปรับค่าพีเอช (pH) ของสารละลายให้เท่ากับ 7 ด้วย 0.1 N NaOH

3.2 การเตรียมเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น (stock culture)

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella vulgaris* เป็นเวลา 7 วัน จนสาหร่ายมีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่หรือเข้าสู่ระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล (exponential phase) จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีจุดศูนย์กลางที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำปราศจากไอออน 2 ครั้ง แล้วเติมน้ำปราศจากไอออน และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.3 ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เพื่อใช้เป็น stock culture ในการทดลอง (วีนา, 2557)

4. วิธีสกัดและวิเคราะห์ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่ายและน้ำ

การสกัดและวิเคราะห์ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่ายและน้ำใช้วิธี solid phase extraction (AOAC, 1996) โดยทำการกรองเพื่อแยกเซลล์สาหร่ายออกจากสารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่ใช้ทดลอง จากนั้นล้างเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำปราศจากไอออน 2 ครั้ง และชั่งน้ำหนักเซลล์สาหร่าย แล้วทำการสกัดโดยเติมสารละลาย McIlvaine buffer EDTA ลงในเซลล์สาหร่ายนำไปปั่นด้วยเครื่อง ultrasonic homogenizer ยี่ห้อ ultraturrex รุ่น T25 จากนั้นจึงกรองเพื่อแยกส่วนของสารละลายด้วยกระดาษ GF/C สำหรับสารละลายที่กรองได้นำไปสกัดต่อด้วย SPE และวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) ยี่ห้อ Waters 600 Photodiode Array คอลัมน์ที่ใช้ คือ HiQsil รุ่น C18HS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มม. ยาว 150 มม. เป็น stationary phase ส่วน mobile phase ใช้ acetonitrile และ 0.01 M oxalic in MeOH ด้วยอัตราส่วน 10:90 flow rate 1.0 มล./นาที สำหรับ detector ใช้ photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ปริมาตรสารละลายที่ฉีด คือ 20 ไมโครลิตร

สำหรับ MDL (method detection limit) ของการสกัดและวิเคราะห์ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในตัวอย่างสาหร่ายและน้ำ เท่ากับ 1.96 มก./กรัม และ 1.47มก./ลิตร ตามลำดับส่วนเปอร์เซ็นต์การนำกลับจากการสกัดและวิเคราะห์ของตัวอย่างสาหร่ายและน้ำ เท่ากับ 69% และ 92% ตามลำดับ

5. วิธีวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งใช้วิธี gravimetric method โดยกรองสารละลายตัวอย่างที่มีเซลล์สาหร่าย 50 มล. ด้วยกระดาษกรอง GF/C ที่ผ่านการอบให้มีน้ำหนักคงที่ด้วยตู้อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีเซลล์สาหร่ายไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นนาน 24 ชั่วโมง และคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย โดย

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

Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University
Volume 2 Number 2 July – December 2015 (ISSN 2408 – 1248)

6. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งเป็น 4 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1: การศึกษาความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

ปิเปตเซลล์สาหร่ายจาก stock culture ใส่ในขวดทดลอง ขวดละ 100 มล. แล้วเติมออกซีเตตราซัยคลินเพื่อทำให้สาหร่ายอยู่ในสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน ที่มีความเข้มข้น 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร และเตรียมชุดควบคุมโดยใช้น้ำปราศจากไอออน แทนสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน จากนั้นนำขวดทดลองทั้งหมดไปวางในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีแสง และเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 ของการทดลอง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemacytometer ผลจากการทดลอง พบว่า สาหร่าย *Chlorella vulgaris* มีอัตราการเจริญเติบโตในสารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น 400 มก./ลิตร ได้ดีที่สุด ในการทดลองที่ 2 จึงใช้สารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น 400 มก./ลิตร

การทดลองที่ 2 : ศึกษาจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการทดลองการสะสม ออกซีเตตราซัยคลิน

เตรียมเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 5%, 10% และ 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร และเตรียมชุดควบคุมโดยใช้น้ำปราศจากไอออนแทนสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน จากนั้นนำขวดทดลองทั้งหมดไปวางในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีแสง และเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 ของการทดลอง เพื่อนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemacytometer และศึกษาลักษณะเซลล์โดยกล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH-2 จากการทดลองพบว่า จำนวนเซลล์เริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในสารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่เหมาะสม คือ 10 %

การทดลองที่ 3 : การทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

เตรียมเซลล์สาหร่ายความเข้มข้นเริ่มต้น 10% ใส่ในขวดทดลองในสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร และเตรียมชุดควบคุมโดยใช้น้ำปราศจากไอออนแทนสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน จากนั้นนำขวดทดลองทั้งหมดวางในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีแสงและเก็บตัวอย่างในเวลาที่ 0, 1, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของการทดลอง โดยเก็บตัวอย่าง 20 มล. เพื่อนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemacytometer ส่วนอีก 200 มล.นำไปกรองแยกตัวอย่างน้ำและเซลล์สาหร่าย เพื่อทำการสกัดออกซีเตตราซัยคลินในน้ำและในสาหร่ายด้วยวิธี solid phase extraction และวิเคราะห์ปริมาณออกซีเตตราซัยคลินโดยใช้เครื่อง HPLC

คำนวณการสะสมออกซีเตตราซัยคลิน (bioconcentration factor, BCF) ได้จาก BCF = C_B/C_W

เมื่อ C_B คือ ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย (มก./กก.)

C_W คือ ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ (มก./ลิตร)

การทดลองที่ 4: การทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ

เตรียมการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 โดยไม่มีการเติมเซลล์สาหร่าย จากนั้นนำขวดทดลองวางในห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีแสง เก็บตัวอย่างโดยปิเปตสารละลายจากขวดทดลอง ปริมาตร 1 มล. ในเวลาที่ 0, 1, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำด้วยเครื่อง HPLC นำความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ในเวลาต่างๆ ไปคำนวณการสลายตัวและค่าครึ่งชีวิตโดย

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

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

และคำนวณค่าครึ่งชีวิตโดย ค่า k หาได้จากการ plot กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ln (C_t/C_o) กับ t ความชันจากความสัมพันธ์เชิงเส้นคือค่า k และค่าครึ่งชีวิต (ชั่วโมง) คำนวณโดย $t_{½} = \ln 2 / k$

7. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

7.1 การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(specific growth rate; μ)

คำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (วีระยุทธ และคณะ, 2555) โดย

$$\mu = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1}$$

เมื่อ N_2 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา t_2

N_1 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา t_1

t คือ เวลา (วัน)

7.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลด้วยวิธี one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลในการทดลอง

ผลการวิจัย

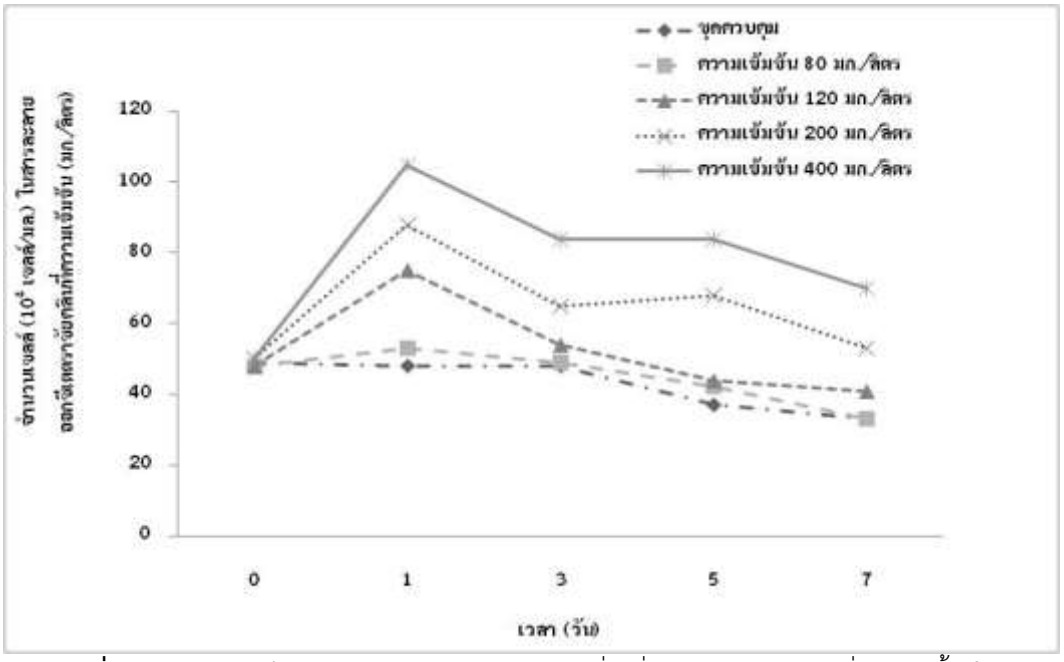
1. ผลของความเข้มข้นต่อการเจริญเติบโต

ผลการทดลองเมื่อสาหร่ายอยู่ในสารละลายออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้น 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร และชุดควบคุมที่ไม่มีออกซีเตตราซัยคลิน พบว่า จำนวนเซลล์ของสาหร่ายในชุดควบคุมค่อนข้างคงที่ในวันที่ 1 และ 3 ของการทดลอง แล้วลดลงอย่างรวดเร็วจนสิ้นสุดการทดลองซึ่งอาจเป็นผลจากการขาดสารอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโต (รูปที่ 1) ส่วนสาหร่ายที่อยู่ในสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร พบว่า มีจำนวนเซลล์สูงขึ้นตามความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่

Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University
Volume 2 Number 2 July – December 2015 (ISSN 2408 – 1248)

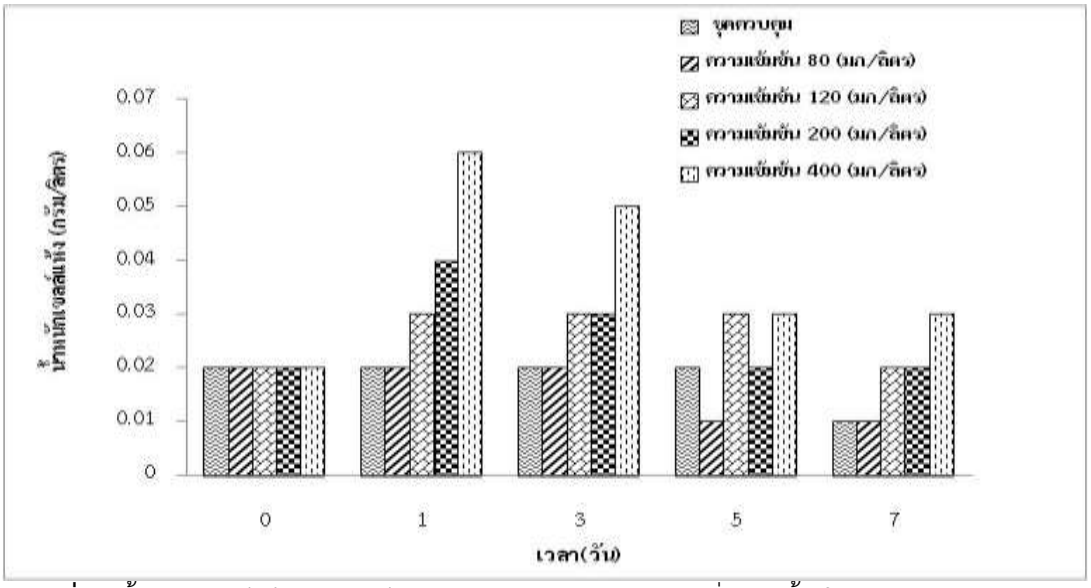
ใช้ทดลอง และจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจากการทดลองที่ความเข้มข้นต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 1 ของการทดลอง ที่ความเข้มข้น 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร เท่ากับ $53x10^4$, $75x10^4$, $88 x10^4$ และ $105 x10^4$ เซลล์/มล. ตามลำดับ นอกจากนี้ที่ความเข้มข้น 80 และ 120 มก./ลิตร มีจำนวนเซลล์ลดลงตั้งแต่วันที่ 3 จนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนที่ความเข้มข้น 200 และ 400 มก./ลิตร จำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่ในวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง แสดงว่าการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ลดลงในวันที่ 7 แสดงว่าการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะการตาย (death phase) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ภรณี และคณะ (2543) ซึ่งพบว่า สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วโดยใช้ไนโตรเจนในน้ำเสีย และมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในระยะเวลา 2-3 วันแรกของการทดลอง สำหรับการทดลองนี้อาจเป็นไปได้ว่าสาหร่ายสามารถใช้ไนโตรเจนที่อยู่ในโมเลกุลของออกซีเตตราซัยคลินเป็นสารอาหารในการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นสาหร่าย *Chlorella vulgaris* จึงมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าเมื่ออยู่ในตัวกลางที่มีออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้นสูง โดยรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่าจำนวนเซลล์สาหร่ายที่อยู่ในสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร >200 มก./ลิตร >120 มก./ลิตร > 80 มก./ลิตร

เมื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย (specific growth rate, μ) โดยเทียบจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นตามการเปลี่ยนแปลงของเวลา พบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(μ) ของสาหร่ายจากการทดลองที่ออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร (μ = -0.06 ต่อวัน) สูงกว่าที่ได้จากการทดลองที่ความเข้มข้น 200 (μ = -0.08 ต่อวัน), 120 (μ = -0.10 ต่อวัน) และ 80 มก./ลิตร (μ = -0.08 ต่อวัน) ตามลำดับ และยังสูงกว่าสาหร่ายในชุดควบคุมที่เพาะเลี้ยงในน้ำปราศจากไอออน (μ = -0.07 ต่อวัน)



รูปที่ 1. จำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาเมื่อเพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร

สำหรับการวัดการเจริญเติบโตโดยใช้น้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายสูงขึ้นตามความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่ทดลอง โดยที่ความเข้มข้น 120, 200 และ 400 มก./ลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* สูงกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งที่ความเข้มข้น 80 มก./ลิตร พบว่า ไม่ต่างกับชุดควบคุม (รูปที่ 2) เนื่องจากเซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็กมาก เมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตน้อยเนื่องจากขาดอาหารจึงทำให้ น้ำหนักเซลล์แห้งของสาหร่ายไม่สูงขึ้น



รูปที่ 2. น้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 80, 120, 200 และ 400 มก./ลิตร

2. ผลการหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นของสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

การใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5%, 10% และ 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร หรือ เท่ากับ 20 $x10^4$, 33 $x10^4$ และ 50$x10^4$ เซลล์/มล. ตามลำดับ เพื่อศึกษาผลของออกซีเตตราซัยคลินที่มีต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย พบว่า เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 5% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินนั้น สาหร่ายมีการเจริญเติบโตลดลงตามเวลา และไม่แตกต่างจากชุดควบคุม เมื่อศึกษาลักษณะเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์ พบว่า ผนังเซลล์ของสาหร่ายแตกหรือถูกทำลาย ทั้งนี้อาจเนื่องจากจำนวนเซลล์ที่ใช้มีน้อยจนทำให้ออกซีเตตราซัยคลินเป็นพิษต่อสาหร่ายได้ สำหรับจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 10% และ 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลิน พบว่า สาหร่ายChlorella vulgaris มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นและสูงสุดในวันแรกของการทดลอง จากนั้นจึงลดลงอย่างช้าๆ โดยจำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่ในวันที่ 1 และ 3 แสดงว่าการเจริญเติบโตของสาหร่ายอยู่ในระยะคงที่ (stationary phase) และเข้าสู่ระยะการตาย (death phase) ในวันที่ 7 ของการทดลอง เมื่อศึกษาลักษณะเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์ ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10% พบว่า สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้ดี มีการกระจายตัวของเซลล์ในลักษณะที่ไม่แน่นเกินไป ในขณะที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 20% ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายมีการจับตัวเป็นกลุ่มหรือซ้อนทับกัน และอาจมีผลต่อการเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ดี

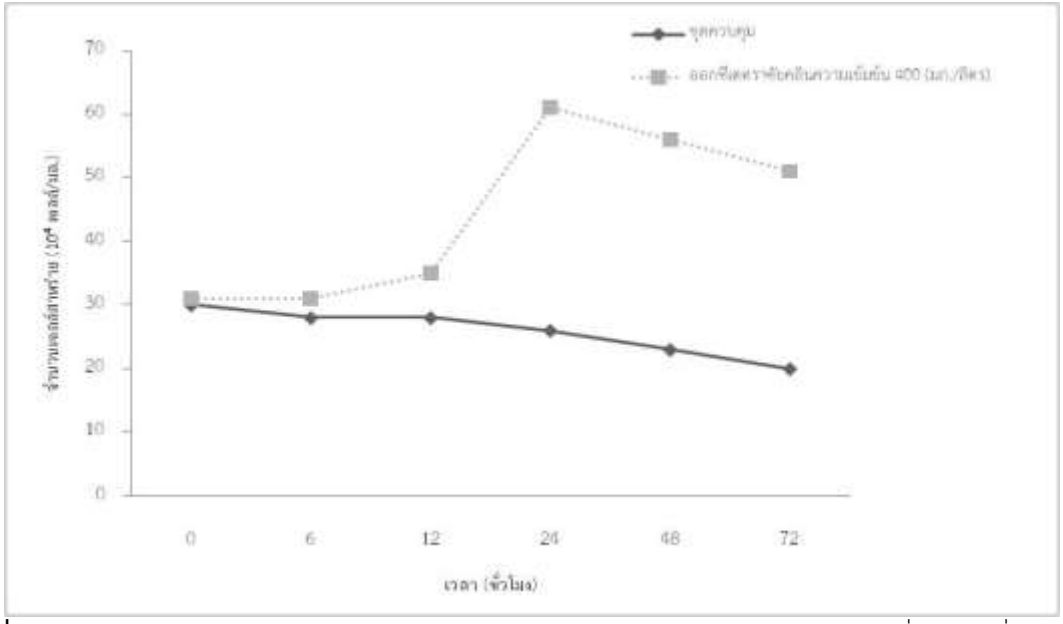
Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University
Volume 2 Number 2 July – December 2015 (ISSN 2408 – 1248)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ใช้จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นที่ต่างกัน พบว่า สาหร่ายมีการเจริญเติบโตหรือการเพิ่มจำนวนเซลล์ในแต่ละการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ อภิชาติ (2556) ซึ่งพบว่า การใช้เซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตเป็นตัวดูดซับไอออนโลหะทองแดงและสังกะสี ให้ผลการดูดซับสูงสุดในระบบที่ใช้เซลล์เริ่มต้น 10%

3. ผลการทดลองการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

3.1 จำนวนเซลล์และลักษณะเซลล์

จากผลการทดลองที่ผ่านมาจึงได้ทำการศึกษาการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* โดยใช้เซลล์เริ่มต้นเป็น 10% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร โดยผลการนับจำนวนเซลล์ พบว่า เซลล์สาหร่ายเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเป็น 1 เท่าในเวลาเพียง 1 วัน (เพิ่มจากประมาณ 30 $x10^4$ เซลล์/มล. เป็น 61 $x10^4$ เซลล์/มล.) จากนั้นลดลงอย่างช้าๆ (รูปที่ 3) และเมื่อศึกษาลักษณะเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า สีของเซลล์สาหร่ายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่มีลักษณะเซลล์เป็นสีเขียว รูปร่างทรงกลม ขนาดเล็ก และมีจำนวนเซลล์ลดลงตามเวลาตลอดการทดลอง สอดคล้องกับการศึกษาของ Wong J.P.K. *et al* (2000) ซึ่งพบว่า สาหร่าย*Chlorella* sp. ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายนิกเกิล สาหร่ายสามารถสะสมสารเข้าสู่ภายในเซลล์ได้สูงถึง 67% และ 25% เกาะอยู่ที่บริเวณผิวเซลล์ โดยสาหร่ายยังคงเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้



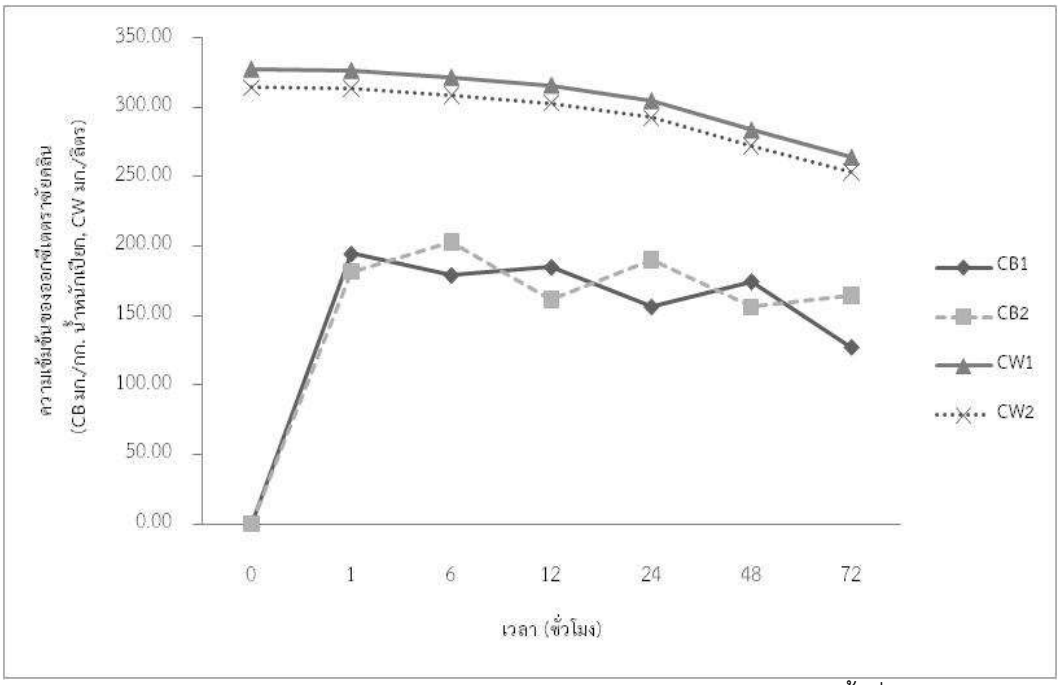
รูปที่ 3. เปรียบเทียบจำนวนเซลล์สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในชุดควบคุมกับชุดทดลองที่มีการเปลี่ยนแปลงตามเวลาในช่วง 72 ชั่วโมง

3.2 ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*

สาหร่าย *Chlorella vulgaris* สามารถสะสมออกซีเตตราซัยคลินได้อย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการทดลอง (รูปที่ 4) โดยความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่าย เท่ากับ188.15 ±

9.28 มก./กก. นน.เปียก ส่วนความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในเซลล์สาหร่ายเพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับ 191.23 ± 16.82 มก./กก. นน.เปียก หลังจากเริ่มทดลองได้ 6 ชั่วโมง และจากนั้นความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่ายค่อนข้างคงที่ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์สาหร่ายสะสมออกซีเตตราซัยคลินจนถึงจุด steady state แล้ว ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็ก และมีพื้นผิวสัมผัสกับสารละลายออกซีเตตราซัยคลินได้อย่างทั่วถึง จึงสามารถสะสมสารได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของสุนีรัตน์ และศักดิ์ชัย (2550) ซึ่งพบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria jasorvensis* และ *Microcysis aeruginosa* สามารถดูดซับตะกั่วได้อย่างรวดเร็วในวันแรกและมีการดูดซับอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการทดลอง โดยการดูดซับถึงจุดสมดุลที่ 30 และ 60 นาที ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำ (C_w) พบว่า ลดลงอย่างช้าๆ ตามเวลาตลอดการทดลอง (รูปที่ 4) โดยความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำลดลงจาก 320.80 ± 9.35 มก./ลิตร เป็น 258.48 ± 7.53 มก./ลิตร ซึ่งลดลงประมาณ 19% การที่เป็นเช่นนี้เพราะเซลล์สาหร่ายมีขนาดเล็กมาก จึงสะสมออกซีเตตราซัยคลินจากน้ำได้เพียงเล็กน้อย โดยความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำที่หายไป อาจเนื่องจากการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินจากสภาวะที่ใช้ทดลองมากกว่าการสะสมเข้าสู่ภายในเซลล์สาหร่าย



รูปที่ 4. ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* และในน้ำที่ใช้ทดลองภายในเวลา 72 ชั่วโมง

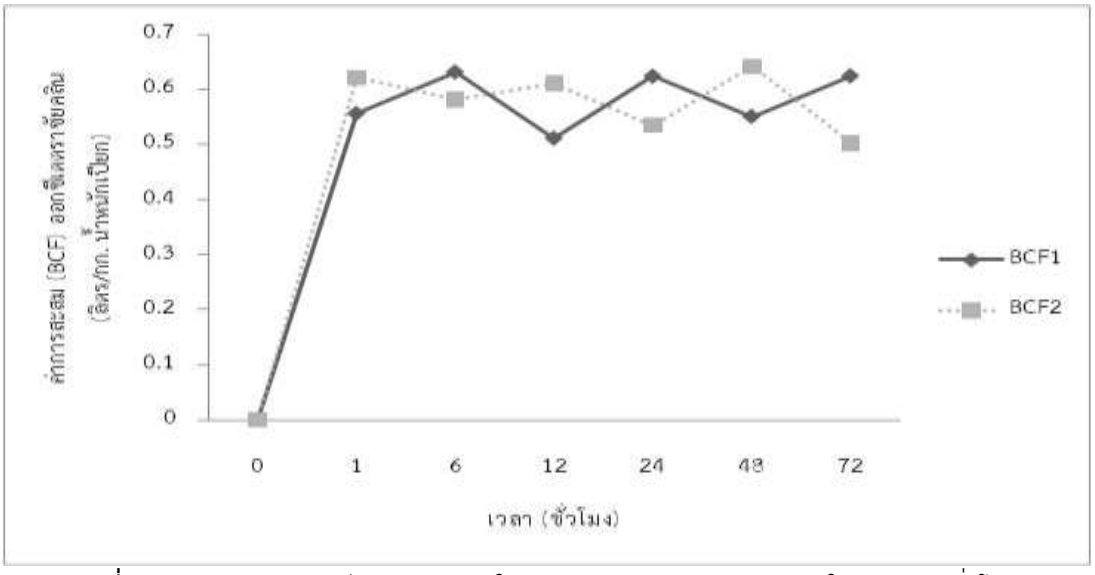
3.3 ค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* (bioconcentration factor, BCF)

ผลการคำนวณ พบว่า ค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* (BCF) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในชั่วโมงแรกของการทดลอง โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.59 ± 0.05 ลิตร/กก.น้ำหนัก

Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University
Volume 2 Number 2 July – December 2015 (ISSN 2408 – 1248)

เปียก หลังจากนั้น ค่า BCF ค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 5) ทั้งนี้เนื่องจากมวลของสารที่ถูกสะสมไว้ในเซลล์สาหร่ายมีน้อยในขณะที่มวลของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำสูงมาก จึงทำให้ค่า BCF ไม่เปลี่ยนแปลงในระยะหลังของการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* จากงานวิจัยนี้กับพืชน้ำชนิดอื่น พบว่า ค่าการสะสม (BCF) ในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* มีค่าค่อนข้างต่ำ โดยจากการศึกษาของ ชลธิชา (2556) ที่พบว่า ไข่น้ำมีค่า BCF สูงสุดประมาณ 600.56 ลิตร/กก.น้ำหนักเปียก ทั้งนี้เนื่องจากสาหร่ายมีขนาดเล็กมาก จึงอาจสะสมได้น้อยกว่า



รูปที่ 5. ค่าการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris*ในเวลา 72 ชั่วโมง

4. ผลการทดลองการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลิน

ผลการคำนวณอัตราคงที่การสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลิน (degradation rate constant, k) ในสภาวะเดียวกับที่ใช้ในการทดลองการสะสม พบว่า ค่า k เท่ากับ 0.003 ต่อชั่วโมง หรือ 0.072 ต่อวัน และมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) เท่ากับ 9.625 วัน แสดงว่าในสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ ไม่มีแสง และควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ทำให้ออกซีเตเตราซัยคลินสลายตัวช้า ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับผลการศึกษาของ (Samuelsen, 1989) ที่พบว่าการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในแหล่งน้ำธรรมชาติที่ pH 7 - 9 อุณหภูมิอยู่ในช่วง 25 – 30 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) อยู่ระหว่าง 10-12 วัน ดังนั้นในช่วงเวลาที่ทดลองจึงอาจกล่าวได้ว่าการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำที่สภาวะการทดลองนี้ไม่ส่งผลต่อการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย

สรุปผล

การศึกษาผลของออกซีเตตราซัยคลินที่ความเข้มข้นต่างๆคือ80, 120, 200 และ400 มก./ลิตร ภายใต้สภาวะที่ไม่เติมอากาศ ไม่ให้แสง และควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลิน 400 มก./ลิตร ทำให้สาหร่ายเจริญโตเติบได้สูงสุด โดยมีจำนวนเซลล์เฉลี่ยสูงขึ้นจาก 48 x 10^4 เป็น 105

x 10^4 เซลล์/มล. คิดเป็นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) เท่ากับ -0.06 ต่อวัน ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 0.02 กรัม/ลิตร เป็น 0.06 กรัม/ลิตร ในเวลา 1 วัน สำหรับการใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 5%, 10% และ 20% ของสารละลายออกซีเตตราซัยคลินความเข้มข้น 400 มก./ลิตร เพื่อศึกษาผลของออกซีเตตราซัยคลินที่มีต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย พบว่า การใช้จำนวนเซลล์สาหร่ายเริ่มต้น 10% สาหร่ายมีการเจริญเติบโตมากกว่า เมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 5% และ 20% เนื่องจากสาหร่ายมีการกระจายตัวอย่างเหมาะสม

สำหรับการศึกษาการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย *Chlorella vulgaris* พบว่า สาหร่ายสามารถสะสมออกซีเตตราซัยคลินได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการทดลอง และสะสมได้สูงสุด เท่ากับ 191.23 มก./กก. นน.เปียก ในชั่วโมงที่ 6 จากนั้นการสะสมค่อนข้างคงที่ อย่างไรก็ดีถึงแม้ว่าออกซีเตตราซัยคลินสามารถสลายตัวในน้ำได้ แต่การสลายตัวภายใต้สภาวะเดียวกับที่ทดลองการสะสมพบว่า ออกซีเตตราซัยคลินมีอัตราการสลายค่อนข้างช้า (k เท่ากับ 0.003 ต่อชั่วโมง) และเนื่องจากความเข้มข้นของออกซีเตตราซัยคลินที่ใช้ทดลองสูงมาก ในขณะที่สาหร่ายสามารถสะสมออกซีเตตราซัยคลินเข้าสู่ภายในเซลล์ได้เพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงอาจสรุปว่าการสลายตัวของออกซีเตตราซัยคลินในน้ำไม่ส่งผลต่อการสะสมออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย และค่าการสะสมของออกซีเตตราซัยคลินในสาหร่าย (BCF) โดยเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.59 (ลิตร/กก.)

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

คนาวรรณ พจนาคม. (2551). “ยาปฏิชีวนะต้านเชื้อแบคทีเรีย.” เอกสารประกอบรายวิชา 564212 เภสัชเคมี 3. ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ชลธิชา เทพรักษ์. (2556). “การสะสมยาปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลินจากน้ำของพืชน้ำ 3 ชนิด.” วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2534). **คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.** กรุงเทพฯ: ฐานเศรษฐกิจ.

ดวงรัตน์ อินทร และ สรัญญา พันธุ์พฤกษ์. (2550). **การประมวลองค์ความรู้การนำสาหร่ายมาใช้ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม.** ภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

ทวิพร แก้วเนรมิต และ นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล. (2557). “ผลของภาวะเค็มต่อการเจริญเติบโตและรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงในข้าวทรานสเจนิกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีการแสดงออกของยีน *OsCaM 1-1* เกินปกติ.” **Veridian E-Journal Science and Technology Silpakrorn University** 1, 5(กันยายน – ตุลาคม 2557) : 11-18.

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

วัชระ เวียงแก้ว. (2552). “การสกัดไขมันจากจุลสาหร่าย.” รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์คณะวิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, องครักษ์.

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

วีระยุทธ รักษาศักดิ์, ยศสรัล พิเชียรสุนทร, บุณยฤทธิ์ ปัญญาภิญโภผล, ปมทอง มาลากุล ณ อยุธยา และ ประเสริฐ ภวสัตน์. (2555). “การเร่งการเจริญเติบโตของสาหร่ายขนาดเล็กโดยการเปลี่ยนรูปคาร์บอนไดออกไซด์.” **วารสารวิศวกรรมศาสตร์ เล่ม 3 ฉบับที่ 4**: นวัฒกรรมเพื่ออุตสาหกรรม: ISSN 1906-3636: 15-26.

สาวิกา กัลปพฤกษ์, สิทธิ กุหลาบทอง และ ญาณนันท์ สุนทรกิจ. (2557). “การใช้สัตว์หน้าดินในการบำบัดฟื้นฟูทางชีวภาพของคุณภาพน้ำ และดินตะกอนในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.” **Veridian E-Journal Science and Technology Silpakrorn University** 1, 5(กันยายน – ตุลาคม 2557) : 41-51.

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์ และ ศักดิ์ชัย ชูโชติ. (2550). “การกำจัดตะกั่วจากน้ำเสียสังเคราะห์โดยใช้ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria jasorvensis* และ *Microcysis aeruginosa*.” **วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง** 14, 1(เมษายน 2550) : 46-54.

อภิชาต พานิชกุล. (2556). “การดูดซับโลหะทองแดงและสังกะสีในสารละลายน้ำด้วย *Rhodopseudomonas boonkerdii* sp. nov. strain NS20 และ Bradyrhizobium sp. strain DOA9.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมโลหการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ภาษาต่างประเทศ

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

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.

Samuelsen, O.B. (1989). “Degradation of Oxytetracycline in seawater at two difference temperatures and light intensitie, and the persistence of oxytetacycline in the sediment form a fish farm.” **Aquaculture** 70: 365-370.

Wong J.P.K., Y.S. Wong and N.F.Y. Tam. (2000). “Nickel Biosorption by Two Chlorella Species, *C. vulgaris* (a commercial species) and *C. miniate* (a local isolate).” **Bioresource Technology** 73 : 133-137.