วารสาร เกษตรพระจอมเกล้า
KING MONGKUT'S AGRICULTURAL JOURNAL

ปีที่ 38 ฉบับที่ 4 VOLUME 38 NUMBER 4

ตุลาคม - ธันวาคม 2563 SSN 2651-2203 (Online) October - December 2020

บทความวิจัย

บทความวิชาการ

วารสารเกษตรพระจอมเกล้า

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเผยแพร่ความก้าวหน้าของวิชาการที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร
2. เพื่อส่งเสริมความร่วมมือและแลกเปลี่ยนความรู้ความคิดเห็นระหว่างผู้ที่อยู่ในวงการเกษตรหรือสถาบันต่าง ๆ

การส่งเรื่องลงพิมพ์

เรื่องที่ส่ง ได้แก่ บทความวิจัย บทความวิชาการที่เกี่ยวข้องกับทางการเกษตรหลักเกณฑ์และการเตรียมต้นฉบับได้ระบุไว้ตอนท้ายของวารสารพระจอมเกล้า

สำนักงาน

งานวารสารเกษตรพระจอมเกล้า
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เลขที่ 1 ซอยฉลองกรุง 1 แขวงลาดกระบัง
เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
โทรศัพท์/โทรสาร : 0-2329-8524
E-mail : ajournal@kmitl.ac.th
www.tci-thaijo.org/index.php/agritechjournal/index

กำหนดการตีพิมพ์ : วารสารเกษตรพระจอมเกล้า กำหนดตีพิมพ์ปีละ 4 ฉบับ

ฉบับที่ 1 มกราคม – มีนาคม
ฉบับที่ 2 เมษายน – มิถุนายน
ฉบับที่ 3 กรกฎาคม – กันยายน
ฉบับที่ 4 ตุลาคม – ธันวาคม

ติดต่อสอบถามรายละเอียดได้ที่

กองบรรณาธิการวารสารเกษตรพระจอมเกล้า
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520
โทรศัพท์ 096-176-3329
E-mail : ajournal@kmitl.ac.th

สำนักพิมพ์ : คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เลขที่ 1 ซอยฉลองกรุง 1 แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

บทบรรณาธิการ

กลับมาพบกันในฉบับสุดท้ายของปีที่ 38 แล้วนะคะ สถานการณ์โควิด-19 เริ่มกลับมาอีกครั้ง ขอให้ทุกท่านดูแลตัวเองและสวมหน้ากากอนามัยก่อนออกจากบ้านทุกครั้งนะคะ สำหรับวารสารของเราฉบับนี้นั้น ได้มีจำนวนบทความทั้งหมด 19 บทความ โดยเป็นบทความที่มาจากงานประชุมวิชาการเกษตรพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังครั้งที่ 7 จำนวน 15 บทความ ทางกองบรรณาธิการได้รวบรวมผลงานวิจัยที่มีคุณภาพหลากหลายด้าน อาทิเช่น พืชไร่ พืชสวน ผลิตสัตว์ประมง และพัฒนาการเกษตร อีกทั้งในฉบับนี้ยังมีบทความวิชาการอีก 1 เรื่องที่น่าสนใจทางด้านประมงคือ เพรียงทรายกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ กองบรรณาธิการหวังว่าวารสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อท่านผู้อ่าน และขอขอบคุณนักวิจัยทุกท่านที่ให้ความสนใจและสนับสนุนวารสารมาอย่างต่อเนื่อง ขอให้ทุกท่านมีความสุขกับวันสิ้นปี แล้วพบกันใหม่ในฉบับหน้าค่ะ "Happy New Year 2021"

กองบรรณาธิการ

อิทธิพลของอายุเก็บเกี่ยวต่อผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์คราม

Influence of Harvesting Date on Yield and Seed Quality of Indigo (*Indigofera tinctoria* L.)

ครองใจ โสมรักษ์[1*] พิจิกา ทิมสุกใส[1] และสุจินต์ เจนวีรวัฒน์[2]
Krongjai Somrug[1*], Pijika Timsuksai[1] and Sujin Jenweerawat[2]

บทคัดย่อ

ครามเป็นพืชตระกูลถั่ว ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการย้อมผ้า ให้สีที่สวยงามและคงทน การปลูกครามต้องใช้เมล็ดจำนวนมาก แต่การสุกแก่ของเมล็ดครามจะไม่พร้อมกัน ทำให้ต้องใช้ระยะเวลาที่ยาวนานในการเก็บเกี่ยว ได้เมล็ดพันธุ์น้อยและไม่มีคุณภาพ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ผลผลิต และคุณภาพเมล็ดพันธุ์ครามที่ดี ดำเนินการ ณ แปลงปฏิบัติการพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร เดือนมิถุนายน 2559 (ฤดูฝน) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ จำนวน 4 ซ้ำ และสิ่งทดลองประกอบด้วย 7 อายุการเก็บเกี่ยว ได้แก่ เก็บเกี่ยวที่อายุ 140, 150, 160, 170, 180, 190 และ 200 วันหลังปลูก ผลการทดลองพบว่าน้ำหนักฝักสดเฉลี่ยต่อต้น น้ำหนักฝักแห้งเฉลี่ยต่อต้น น้ำหนักเมล็ดเฉลี่ยต่อต้น ความชื้นของเมล็ด และเปอร์เซ็นต์ความงอกของทุกอายุเก็บเกี่ยวมีความแตกต่างกันในทางสถิติ โดยเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสูงที่สุด คือ เมื่อเก็บเกี่ยวครามที่อายุ 150 วันหลังปลูก (53.31 เปอร์เซ็นต์) แต่น้ำหนักเมล็ดเฉลี่ยต่อต้นน้อย ทำให้การงอกรวมของเมล็ดที่งอกได้ต่อต้นน้อย (1,270 เมล็ดต่อต้น) และอายุเก็บเกี่ยวที่มีจำนวนเมล็ดรวมที่งอกได้ต่อต้นสูงสุด คือ 180 วันหลังปลูก (2,673 เมล็ดต่อต้น) รองลงมาคือ อายุเก็บเกี่ยวที่ 200 และ 190 วันหลังปลูก ดังนั้นอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม คือ อายุ 180 วันหลังปลูกขึ้นไป ซึ่งจะทำให้ได้เมล็ดพันธุ์ครามที่มีผลผลิต และคุณภาพสูงสุด

คำสำคัญ: คราม อายุการเก็บเกี่ยว เมล็ดพันธุ์

Abstract

Indigo (*Indigofera tinctoria* L.) is a member of the family Leguminosae. Indigo has traditionally been used for fabric dyeing of local handicrafts because it imparts beautiful shades and highly stable colors. One problem with indigo seed planting and cultivation is that seed maturation is not simultaneous, and thus many seeds have to be planted to ensure an economic yield. Moreover, the fact that there is a lot of variation in the planted seeds' maturity times often produces a longer wait until harvest and a longer harvest time, factors which tend to negatively affect the quality and yield of the seeds. This research was therefore designed to determine the optimum harvesting date for the yield and seed quality of Indigo (*Indigofera tinctoria* L.). The research was conducted at the Plant Science Field, Sakon Nakhon Rajabhat University, during the rainy season of 2016. The experiment was of random complete block design (RCBD) with 4 replications and involved 7 harvesting dates: 140, 150, 160, 170, 180, 190 and 200 days after planting (DAP). The results showed that harvesting dates (DAP) had significant effects on pod fresh weight, pod dry weight, seed dry weight per plant, seed moisture and seed germination. The highest seed germination was found at 150 DAP (53.31%), but these plants harvested at 150 DAP had low seed dry weights per plant and lower total seed germinations per plant (1,270 seeds/plant) affected. The highest total seed germinations found were for 180 DAP (2,673 seeds/plant), followed by 200 and then 190 DAP. Therefore, it was concluded that the optimum harvesting dates were 180 DAP and higher, which were periods after planting that gave the highest yield and seed quality of Indigo.

Keywords: *Indigo tinctoria* L., harvesting date, seed

[1] สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร อ. เมือง จ. สกลนคร 47000
[1] Plant science, Faculty of Agricultural Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, Muang, Sakon Nakhon 47000
[2] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
[2] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Chatuchak, Bangkok 10900
*Corresponding author, E-mail: krongjai@snru.ac.th

คำนำ

ครามเป็นพืชตระกูลถั่ว (Family Leguminosae) ที่สามารถขึ้นได้ในสภาพทั่วไป และใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน โดยเฉพาะการนำครามมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมย้อมสีผ้า กระดาษ ยารักษาโรค (Aobchey et al., 2007; Saraswathi et al., 2012) และปุ๋ยพืชสด จากส่วนใบ กิ่งก้าน และลำต้น ซึ่งสีของครามจะมีคุณสมบัติพิเศษ คือ ความคงทน สีไม่ฉูดฉาด เป็นสีที่สวยงามที่มีลักษณะโดดเด่น ทำให้ได้รับสมญานามว่า "ราชินีแห่งสี" (อนุรัตน์ สายทอง, 2543) สำหรับประเทศไทยมีการปลูกคราม และผลิตเนื้อครามเพื่อการส่งออกมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (กมลพร ปานอ่อน และคณะ 2554) โดยเฉพาะจังหวัดสกลนครมีการปลูกคราม และการย้อมผ้าครามมาเป็นระยะเวลายาวนาน (อังคณา เทียนกล่ำ, 2555) ซึ่งจังหวัดได้มีการส่งเสริม และสนับสนุนให้แต่ละตำบลมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ตามภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อให้เป็นผลิตภัณฑ์ประจำตำบล การใช้ผ้าฝ้ายย้อมครามเป็นผลิตภัณฑ์ด้านสิ่งทอที่ได้รับเลือกให้เป็นผลิตภัณฑ์ประจำตำบลของจังหวัดสกลนคร ที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกร และสร้างชื่อเสียงให้กับจังหวัดสกลนคร จากการเก็บข้อมูลของสำนักงานพัฒนาชุมชนจังหวัดสกลนคร พบว่า ปี พ.ศ. 2558 ผลิตภัณฑ์จากผ้าย้อมครามสามารถสร้างรายได้ให้กับจังหวัดสกลนคร คิดเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 48 ล้านบาทต่อปี โดยช่องทางการจำหน่ายภายในประเทศ ร้อยละ 90 อีกร้อยละ 10 จำหน่ายออกนอกประเทศ คือ อังกฤษ และญี่ปุ่น เป็นตลาดหลัก (จุฑามาศ ศรีสำราญ และคณะ, 2558) จากความต้องการผ้าย้อมครามมีมากยิ่งขึ้น ทั้งภายในและภายนอกประเทศ ทำให้กลุ่มผู้ย้อมครามต้องมีการผลิตมากขึ้นตามไปด้วย แต่ปัจจุบันพบว่าการผลิตเนื้อครามยังไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาด เนื่องจากต้องใช้ครามสดเป็นจำนวนมากที่จะนำมาทำเนื้อคราม (อนุรัตน์ สายทอง, 2553; พุทธพร วิวาจารย์ และคณะ, 2558) จึงต้องมีการปลูกครามมากขึ้น จำนวนเมล็ดครามจึงต้องใช้ในปริมาณที่มากขึ้นตาม โดยครามเป็นพืชที่มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบ indeterminate คือ การทยอยออกดอก ทำให้การสุกแก่ของเมล็ดไม่เท่ากัน คือ จะสุกแก่จากทางด้านล่างขึ้นทางด้านบน ทำให้ไม่สามารถกำหนดวันเก็บเกี่ยวที่แน่นอนได้ เพราะการเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์ในระยะที่ไม่เหมาะสมจะทำให้ได้เมล็ดพันธุ์ที่อ่อนและแก่จนเกินไป ถ้ายังไม่ถึงระยะสุกแก่ของเมล็ดจะส่งผลต่อคุณภาพ และผลผลิตเมล็ดพันธุ์ (วันชัย จันทร์ประเสริฐ, 2542) และถ้าเมล็ดผ่านระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาไปแล้วเมล็ดจะเสื่อมคุณภาพได้เช่นกัน (ศิรินภา มีแก้ว และคณะ, 2552) ซึ่งอนุรัตน์ สายทอง (2553) ได้แนะนำให้เก็บเกี่ยวครามในระยะที่ฝักเป็นสีน้ำตาล และทยอยเก็บฝักไปเรื่อย ๆ เช่นเดียวกับพืชตระกูลถั่วอื่น ๆ เช่น ถั่วเขียว พบว่ามีการสุกแก่ของฝัก 2 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 ฝักจะสุกแก่จากวันที่ 53 หรือ 54 วันหลังปลูก ถึง 63 วันหลังปลูก ส่วนการติดฝักช่วงที่ 2 อยู่ในช่วง 69-71 วันหลังปลูก (พัฒนพงศ์ อินทร์คำ, 2547) ถั่วเหลืองควรเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์ระยะที่ฝักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 50% และระยะฝักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 95% (กัณฑิมา ทองศรี และคณะ, 2558) ถั่วลิสงเปลือกฝักด้านในจะแห้ง และเปลี่ยนสี เห็นลายชัดเจน (ธวัชชัย ทีฆชุณหเถียร, 2540) และ Catingueira (*Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queriroz) ที่เป็นพืชตระกูลถั่ว การเปลี่ยนสีของฝักเป็นสีน้ำตาลอ่อน บ่งบอกถึงระยะการสุกแก่ทางสรีรวิทยา (Lima et al., 2012) ส่วนปอเทืองควรเก็บเกี่ยวในระยะที่ฝักแห้งสีน้ำตาล (พิทยา พรหมสุข และคณะ, 2553) และการเก็บเกี่ยวถั่วพร้าเพื่อเก็บเมล็ดพันธุ์แบบเก็บหมดทั้งแปลง อายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมต่อคุณภาพ และผลผลิตของเมล็ดพันธุ์ คือ อายุ 160 วันหลังปลูก (วัชราภรณ์ จันทบุตร และสุดสงวน เทียมไธสงค์, 2554)

จากปัญหาดังกล่าว รวมทั้งจำนวนเมล็ดพันธุ์ครามไม่เพียงพอสำหรับปลูก ต้องหาซื้อจากที่อื่นที่มีราคาค่อนข้างสูง ทำให้เกษตรกรผู้ปลูกครามมีต้นทุนในการผลิตที่สูงขึ้น และยังไม่มีข้อมูลด้านอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมของครามเพื่อให้ได้ผลผลิต และคุณภาพที่ดี โดยเฉพาะคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เป็นเรื่องสำคัญในการปลูกพืช เนื่องจากเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโต และผลผลิต ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาถึงอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมสำหรับเก็บเกี่ยวผลผลิตเพียงครั้งเดียว เพื่อให้ได้ผลผลิต และเมล็ดพันธุ์ครามที่มีคุณภาพ

วิธีการศึกษา

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) ประกอบด้วย 7 สิ่งทดลอง จำนวน 4 ซ้ำ ได้แก่ การเก็บเกี่ยวครามที่อายุแตกต่างกัน ดังนี้ 140, 150, 160, 170, 180, 190 และ 200 วันหลังปลูก ตามลำดับ

การปลูกคราม

ปลูกคราม ณ แปลงปฏิบัติการพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร เริ่มจากการเพาะเมล็ดครามในถาดหลุม โดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุเพาะ รดน้ำทุกวัน เช้า-เย็น และวางไว้ในที่ร่มรำไร จากนั้นเตรียมแปลงปลูกโดยการไถดะ ทิ้งไว้นาน 1 สัปดาห์ เก็บวัชพืชออกจากแปลงให้หมด และไถพรวนดินเพื่อให้ดินละเอียดขึ้น แล้วทำเป็นแปลงปลูก

จำนวน 16 แปลง ขนาด 2.5 x 2.5 เมตร เมื่อครามอายุได้ 30 วัน ทำการย้ายปลูกลงแปลงปลูก โดยใส่มูลวัวรองพื้นก่อนปลูกในอัตรา 3 กิโลกรัมต่อแปลง (750 กิโลกรัมต่อไร่) แล้วนำต้นครามลงปลูกแปลงละ 4 แถว ๆ ละ 7 ต้น ในระยะ 30 x 60 เซนติเมตร หลังจากนั้นใส่มูลวัว ที่อายุ 30 วัน และ 60 วัน หลังย้ายปลูก อัตรา 3 กิโลกรัมต่อแปลง และรดน้ำทุกวัน พร้อมกำจัดวัชพืช

การเก็บข้อมูล และบันทึกข้อมูล

เก็บข้อมูล 3 ระยะ ได้แก่ 1) ระยะติดดอก: เก็บข้อมูลวันที่ดอกบาน 50 เปอร์เซ็นต์ และวัดความสูงของต้น 2) ระยะติดฝัก: เก็บข้อมูลวันที่ติดฝักแรก สีของฝัก วันที่ฝักแรกเริ่มเปลี่ยนสี สีของฝักและสีเมล็ดภายในฝัก และ 3) ระยะเก็บเกี่ยว: เก็บข้อมูลด้านผลผลิตจากการวัดความสูงของต้นทั้ง 7 สิ่งทดลอง จำนวน 10 ต้นต่อแปลง รวม 40 ต้นต่อสิ่งทดลอง แล้วแยกฝักออกเป็น 2 ส่วน คือฝักแห้ง และฝักสด พร้อมกับชั่งน้ำหนักฝักต่อต้น หลังจากนั้น นำฝักแห้งมาแกะเมล็ดออก แล้วนับจำนวนเมล็ดต่อฝัก ชั่งน้ำหนักเมล็ด/1,000 เมล็ด และชั่งน้ำหนักเมล็ดต่อต้น แล้วนำเมล็ดไปทดสอบด้านคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ ทดสอบเปอร์เซ็นต์ความชื้น เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด และการงอกรวมของเมล็ดที่งอกได้ต่อต้น ดังนี้

การทดสอบความชื้นของเมล็ด โดยนำเมล็ดจำนวน 5 กรัม จำนวน 2 ซ้ำ ไปชั่งหาน้ำหนักเมล็ดก่อนอบ และนำเมล็ดเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 17 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักน้ำที่หายไป และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ด (เปรมจิตต์ ใจหาญ, 2551)

การทดสอบความงอกของเมล็ด ทดสอบด้วยวิธีการเพาะแบบ Between Paper (BP) โดยการสุ่มเมล็ดมาจากทุกซ้ำของแต่ละสิ่งทดลอง จำนวน 100 เมล็ดต่อซ้ำ ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับความงอกของเมล็ดในวันที่ 4 และ 7 ภายหลังเพาะเมล็ด

การงอกรวมของเมล็ดที่งอกได้ต่อต้น นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานของเมล็ดมาเปลี่ยนเป็นข้อมูลจำนวนเมล็ดที่งอกได้จาก 1,000 เมล็ด แล้วนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการคำนวณหาการงอกรวมของเมล็ดที่งอกได้ต่อต้นกับน้ำหนักเมล็ด 1,000 เมล็ด และน้ำหนักเมล็ดต่อต้นในแต่ละอายุการเก็บเกี่ยว ดังนี้

$$\text{การงอกรวมของเมล็ดที่งอกได้ต่อต้น} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอกจาก 1,000 เมล็ด (เมล็ด)} \times \text{น้ำหนักเมล็ดต่อต้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเมล็ด 1,000 เมล็ด (กรัม)}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทุกลักษณะที่เก็บบันทึกไปวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ RCBD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยโปรแกรมทางสถิติ SAS version 9.1

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การออกดอก และการติดฝักของคราม

หลังย้ายต้นกล้าลงในแปลงปลูก บันทึกข้อมูลการออกดอกจนถึงการพัฒนาเป็นเมล็ด พบว่าดอกครามบาน 50 เปอร์เซ็นต์ที่อายุ 73 วันหลังปลูก และการออกดอกของครามเริ่มออกดอกที่ อายุ 56 วันหลังปลูก และดอกแรกบานหลังออกดอก 7 วัน คือ อายุ 63 วันหลังปลูก ซึ่งการออกดอกของครามจะออกที่ซอกใบและปลายกิ่ง โดยจะเริ่มออกดอกจากโคนต้นไปที่ด้านปลายยอด ดอกจะมีสีชมพู และดอกจะบานจากส่วนโคนของช่อดอกก่อน และหลังจากดอกบานแล้ว 7 วัน จะเปลี่ยนไปเป็นฝัก (อายุ 70 วันหลังปลูก) โดยฝักจะมีขนาดเล็กสีเขียว และสีของฝักจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง สีน้ำตาล และดำ ตามลำดับ รวมทั้งเมล็ดของครามจะเปลี่ยนตามสีของฝักเช่นกัน คือ จากสีเขียวเป็นเขียวอมสีเหลือง เหลืองอมน้ำตาล สีน้ำตาล และดำ ตามลำดับ ซึ่งการเปลี่ยนสีของฝักแรกจากสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล คือ อายุ 115 วันหลังปลูก หลังจากนั้นฝักครามจะเริ่มมีการเปลี่ยนสีของฝักเป็นสีน้ำตาลมากขึ้นเรื่อย ๆ คือ การสุกแก่เริ่มจากฝักส่วนโคนต้น และส่วนโคนของช่อดอกก่อน ซึ่งฝักจะมีลักษณะกลม งอ และสั้น

การเจริญเติบโต และการเก็บเกี่ยวคราม

เริ่มเก็บเกี่ยวที่อายุ 140 วันหลังปลูก โดยการตัดทั้งต้น และเก็บเกี่ยวครั้งต่อไปทุก ๆ 10 วัน คือ ครามอายุ 150 วัน 160 วัน 170 วัน 180 วัน 190 วัน และครามอายุ 200 วันหลังปลูก (Figure 1) หลังการตัดคราม ทำการแยกฝักออกเป็น 2 ส่วน คือ ฝักสด (ฝักสีเขียว) และฝักแห้ง (ฝักสีน้ำตาล) แล้วนำไปชั่งน้ำหนักฝักสด และน้ำหนักฝักแห้งต่อต้น ส่วนฝักแห้งนำไปหาปริมาณผลผลิต และคุณภาพของเมล็ดคราม

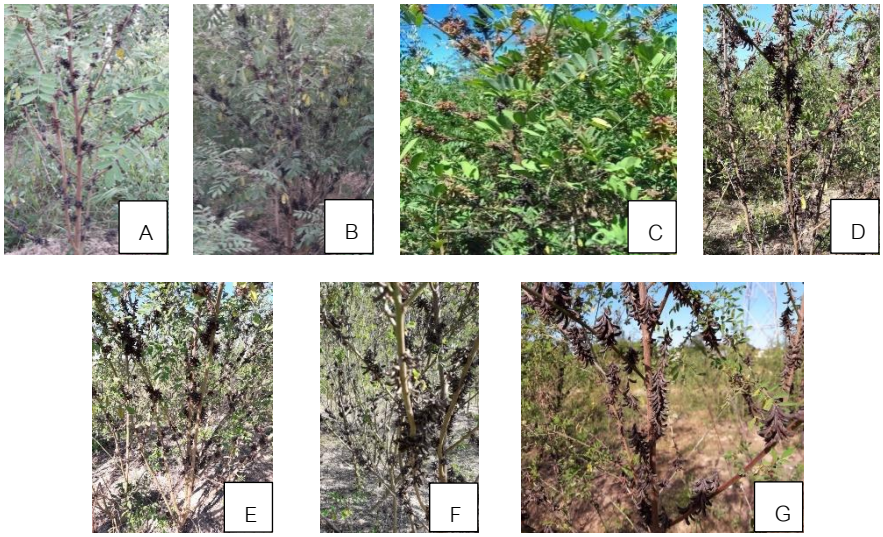

Figure 1 Different growth stages of Indigo at 140 (A), 150 (B), 160 (C), 170 (D), 180 (E), 190 (F) and 200 (G) days after planting.

ความสูงของต้นคราม

การเจริญเติบโตด้านความสูงของต้นที่อายุ 73 วันหลังปลูก ซึ่งเป็นระยะที่ดอกครามบาน 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าคราม มีความสูงเฉลี่ย 60.20 เซนติเมตร และจากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติลักษณะความสูงของต้นคราม พบว่า อายุการเก็บเกี่ยวไม่มีผลต่อความสูงของต้นคราม และพบว่าต้นครามมีการเจริญเติบโตด้านความสูงเพิ่มมากขึ้นแปรผันตามอายุของคราม โดยต้นครามมีความสูงมากที่สุดที่อายุ 200 วันหลังปลูก คือ 202.28 เซนติเมตร และต้นครามสูงน้อยที่สุด คือ ต้นครามอายุ 140 วันหลังปลูก มีความสูงของต้น 175.63 เซนติเมตร (Table 1)

น้ำหนักฝักสด และน้ำหนักฝักแห้ง

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของลักษณะน้ำหนักฝักสด และน้ำหนักฝักแห้ง พบว่า อายุเก็บเกี่ยวมีผลทำให้น้ำหนักฝักสด และน้ำหนักฝักแห้งมีความแตกต่างกันในทางสถิติ (Table 1) โดยที่อายุเก็บเกี่ยว 150 วันหลังปลูก มีน้ำหนักฝักสดสูงสุด 140.81 กรัมต่อต้น รองลงมาคืออายุ 160 และ 140 วันหลังปลูก มีน้ำหนักฝักสด 129.28 และ 112.08 กรัมต่อต้น ตามลำดับ ในขณะที่อายุเก็บเกี่ยว 200 วันหลังปลูก มีน้ำหนักฝักสดต่ำสุด 35.81 กรัมต่อต้น รองลงมาคือ อายุ 190 และ 180 วันหลังปลูก มีน้ำหนักฝักสด 56.44 และ 67.47 กรัมต่อต้น ตามลำดับ ส่วนน้ำหนักฝักแห้ง พบว่า อายุเก็บเกี่ยว 200 วันหลังปลูก มีน้ำหนักฝักแห้งสูงสุด 176.52 กรัมต่อต้น รองลงมาคือ อายุ 180 และ 190 วันหลังปลูก มีน้ำหนักฝักแห้ง 151.09 และ 143.42 กรัมต่อต้น ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักฝักแห้งจะแปรผันโดยตรงกับอายุของคราม โดยน้ำหนักฝักแห้งจะเพิ่มขึ้นตามอายุของคราม ส่วนน้ำหนักฝักสดจะแปรผกผันกับอายุของคราม น้ำหนักฝักสดจะลดลง เนื่องจากครามเป็นพืชที่ทยอยออกดอก การสุกแก่ของฝักจึงไม่พร้อมกัน เช่นเดียวกับถั่วพุ่ม ถั่วเหลือง ถั่วแดง และปอเทือง (พิทยา พรหมสุข และคณะ, 2553)

จำนวนเมล็ดต่อฝัก น้ำหนักเมล็ดต่อต้น และน้ำหนัก 1,000 เมล็ด

จากการวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนเมล็ดต่อฝัก และน้ำหนักเมล็ดต่อต้น พบว่า อายุเก็บเกี่ยวมีผลต่อจำนวนเมล็ดต่อฝัก และน้ำหนักเมล็ดต่อต้น มีความแตกต่างกันในทางสถิติ (Table 1) พบฝักครามมีจำนวนเมล็ด 4.6-5.3 เมล็ดต่อฝัก โดยครามที่อายุเก็บเกี่ยว 190 วันหลังปลูก มีจำนวนเมล็ดต่อฝักมากที่สุด คือ 5.3 เมล็ดต่อฝัก และครามที่อายุ 140, 150 และ 160 วันหลังปลูก มีจำนวนเมล็ดต่อฝักน้อยที่สุด คือ 4.6 เมล็ดต่อฝัก และพบว่าครามอายุ 200 วันหลังปลูก มีน้ำหนักเมล็ดมากที่สุด 64.00 กรัมต่อต้น รองลงมาคือ ครามอายุ 180, 190, 170, 160, 150 และ 140 วันหลังปลูก คือ 58.25, 53.33, 33.36, 29.60, 16.76 และ 9.73 กรัมต่อต้น ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเมล็ดแปรผันโดยตรงกับอายุการเก็บเกี่ยวที่มากขึ้น เนื่องจากครามเป็นพืชที่มีการสุกแก่ไม่พร้อมกัน ฝัก และเมล็ดจะทยอยสุกแก่ และเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จึงทำให้เมื่ออายุการเก็บเกี่ยวมากขึ้น ทำให้ครามอายุเก็บเกี่ยว 200 วันหลังปลูก มีน้ำหนักของเมล็ดต่อต้นมากที่สุด ส่วนน้ำหนัก 1,000 เมล็ดของคราม พบว่าอายุเก็บเกี่ยวครามที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อน้ำหนักเมล็ด 1,000 เมล็ด โดยเมล็ดครามมีน้ำหนัก 1,000 เมล็ด อยู่ระหว่าง 4.37-4.69 กรัม (Table 1) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับครามที่ได้จากแหล่งเก็บเมล็ดพันธุ์จังหวัดลำพูน และเชียงใหม่ โดยพบว่าน้ำหนักเมล็ด 1,000 เมล็ด มีน้ำหนักเฉลี่ย 5.11 กรัม โดยพันธุ์ CMICG 04002 จากแหล่งเมล็ดพันธุ์เชียงใหม่ มีน้ำหนัก 1,000 เมล็ด

เท่ากับ 4.26 กรัม (เปรมจิตต์ ใจหาญ, 2551) เช่นเดียวกันกับครามของประเทศบังกลาเทศ พบว่าน้ำหนัก 1,000 เมล็ด มีน้ำหนัก 5.43 กรัม (Jahan et al., 2013)

ความชื้นของเมล็ด

อายุการเก็บเกี่ยวครามมีผลต่อความชื้นของเมล็ด และมีความแตกต่างกันในทางสถิติ (Table 1) พบความชื้นของเมล็ดอยู่ระหว่าง 9.18-17.28 เปอร์เซ็นต์ โดยเมล็ดครามที่เก็บเกี่ยวอายุ 140 วันหลังปลูก มีความชื้นมากที่สุด คือ 17.28 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เมล็ดครามที่เก็บเกี่ยวอายุ 150, 160, 170, 180, 190 และ 200 วันหลังปลูก พบเมล็ดมีความชื้น 13.55, 9.85, 9.80, 9.85, 9.93 และ 9.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งความชื้นของเมล็ดมีค่าลดลง เนื่องจากมีการสุกแก่ของเมล็ดเพิ่มมากขึ้นตามอายุของครามที่มากขึ้น และเมล็ดครามมีการพักตัวจากการมีเมล็ดแข็งเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเมล็ดปอเทือง (พิทยา พรหมสุข และคณะ, 2553)

Table 1 Plant height, pod fresh weight, pod dry weight, and seed quality of Indigo at different harvesting stages.

Harvesting dates (day)	Plant height (cm)	Pod fresh weight (g/plant)	Pod dry weight (g/plant)	Number of seeds/pod	1,000 seed dry weight (g)	Seed dry weight (g/plant)	Moisture content (%)
140	175.63	112.08ab	24.28d	4.6b	4.54	9.73c	17.28a
150	179.90	140.81a	41.29d	4.6b	4.65	16.76c	13.55b
160	180.78	129.28a	55.65d	4.6b	4.53	29.60b	9.85c
170	186.60	98.27ab	86.90c	4.8b	4.62	33.36b	9.80c
180	191.43	67.47bc	151.09ab	5.0ab	4.69	58.25a	9.85c
190	194.48	56.44bc	143.42b	5.3a	4.37	53.33a	9.93c
200	202.28	35.81c	176.52a	4.8b	4.65	64.00a	9.18c
F-test	ns	**	**	*	ns	**	**
CV (%)	8.68	38.23	21.33	6.59	5.75	20.91	5.41

ns = not significantly different, * = significantly different at P<0.05, ** = significantly different at P<0.01.
Means within a column followed by the same letter are not significantly different by DMRT.

ความงอกมาตรฐานของเมล็ด และการงอกรวมของเมล็ดต่อต้น

เปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน เมล็ดสด บวม พร้อมงอก เมล็ดเน่า เสีย และเมล็ดแข็งของครามทุกอายุการเก็บเกี่ยวมีความแตกต่างกันในทางสถิติ (Table 2) เมล็ดครามมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด 53.31 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บเกี่ยวครามอายุ 150 วันหลังปลูก ส่วนครามที่เก็บเกี่ยวอายุ 200 วันหลังปลูก มีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำสุด 16.06 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดสด บวม พร้อมงอกจะลดลงตามอายุการเก็บเกี่ยวที่เพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกันกับเมล็ดที่เน่าเสีย พบมากที่สุดจากเมล็ดครามที่เก็บเกี่ยวที่อายุ 140 วันหลังปลูก ส่วนเมล็ดสด แข็ง แต่ไม่งอก ซึ่งเป็นลักษณะเมล็ดแข็ง และมีสีดำจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามอายุของคราม และสูงสุดที่อายุการเก็บเกี่ยว 200 วันหลังปลูก คือ 74.43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับคำแนะนำของอนุรัตน์ สายทอง (2553) กล่าวว่า การเก็บเกี่ยวเมล็ดคราม ควรเก็บเกี่ยวในระยะที่ฝักครามเป็นสีน้ำตาล ไม่ควรเก็บฝักครามสีดำคาต้น เพราะเมล็ดแข็งมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ทำให้เมล็ดงอกยาก เช่นเดียวกับงานวิจัยของเปรมจิตต์ ใจหาญ (2551) ซึ่งเก็บเกี่ยวเมล็ดครามจากการสังเกตสีของฝักที่เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล พบว่าเมล็ดครามที่เก็บเกี่ยวจากต้นที่สุกแก่ 50 เปอร์เซ็นต์ของต้น มีเปอร์เซ็นต์ความงอกมากกว่าเมล็ดครามที่เก็บเกี่ยวจากต้นที่สุกแก่ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 47.25 และ 30.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และถ้าเลยระยะนี้ไปจะทำให้มีการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดได้ (วัลลภ สันติประชา, 2538) ทั้งนี้เมื่อนำข้อมูลการงอกมาตรฐานมาพิจารณาร่วมกับข้อมูลการงอกของเมล็ดต่อต้น พบว่าการเก็บเกี่ยวครามอายุ 150 วันหลังปลูก มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง แต่ผลผลิตที่ได้น้อย รวมทั้งจำนวนเมล็ดที่งอกได้ต่อต้นมีค่าที่น้อยเช่นเดียวกัน (1,270 เมล็ดต่อต้น) และทุกอายุการเก็บเกี่ยวมีผลต่อการงอกรวมของเมล็ดที่งอกได้ต่อต้น และมีความแตกต่างกันในทางสถิติ (Table 2) โดยพบว่าจำนวนเมล็ดรวมที่งอกได้สูงสุดต่อต้น คือ ครามอายุ 180 วันหลังปลูก มีจำนวนเมล็ดรวมที่งอกได้ 2,673 เมล็ดต่อต้น รองลงมา คือ ครามอายุ 200 และ 190 วันหลังปลูก มีจำนวนเมล็ดรวมที่งอกได้ 2,273 และ 2,199 เมล็ดต่อต้น ตามลำดับ (Figure 2) แต่เมล็ดครามมีเมล็ดแข็งจำนวนมาก และแปรผันตามอายุการเก็บเกี่ยวที่มากขึ้น เมล็ดแข็งอาจมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอก

เนื่องจากเมล็ดแข็งอาจเป็นเมล็ดที่มีชีวิต และสามารถงอกได้ การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ควรทำลายการพักตัวของเมล็ดครามก่อนทำการทดสอบความงอกจะทำให้ได้ค่าที่แน่นอน และอาจเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดครามได้

Table 2 Standard germination, total seed germination, abnormal seedling, fresh seed, hard seed, and dead seed of indigo at different harvesting stages.

Harvesting dates (day)	Standard germination (%)	Total seed germination (seeds/plant)	Abnormal seeding[1/] (%)	Fresh seed[1/] (%)	Hard seed (%)	Dead seed (%)
140	26.75b	579d	0.00c	1.51a	9.18e	30.31a
150	53.31a	1,270c	0.63a	1.26b	35.50d	7.43cd
160	27.06b	1,780c	0.00c	0.43d	62.56bc	13.18bc
170	23.43bc	1,698c	0.00c	0.75c	55.43c	14.87b
180	21.37bc	2,673a	0.00c	0.72c	65.06abc	8.00cd
190	17.68c	2,199ab	0.32b	0.77c	68.93ab	7.31cd
200	16.06c	2,237ab	0.63a	0.41d	74.43a	4.75d
F-test	**	**	**	**	**	**
CV (%)	20.14	20.56	25.64	16.47	12.02	35.55

** = significantly different at P<0.01.

Means within a column followed by the same letter are not significantly different by DMRT.

[1/] Logarithmic transformation data; log (x+1).

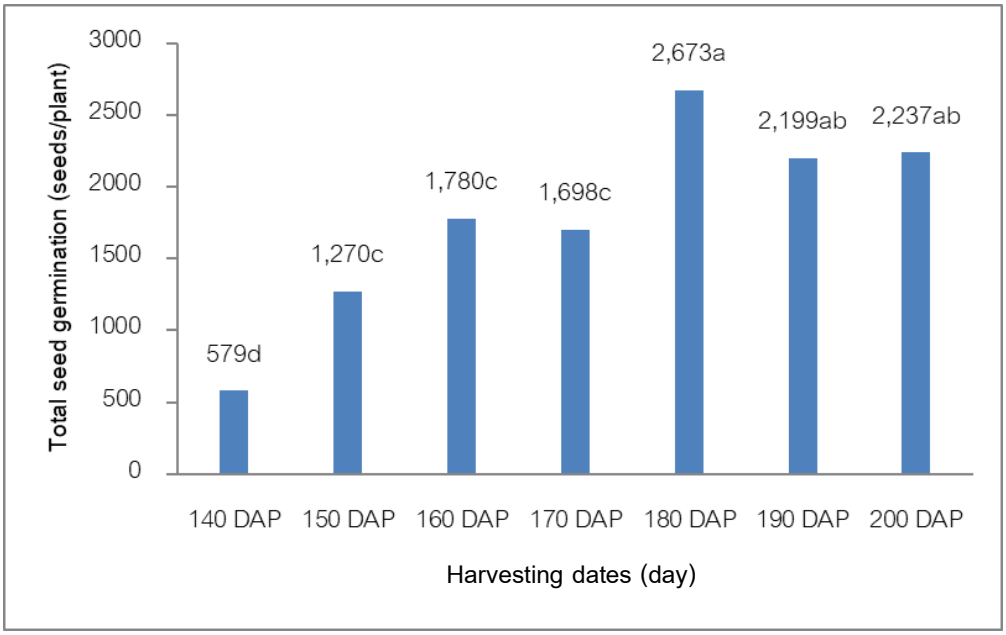

Figure 2 Total seed germination per plant of Indigo at different harvesting stages.

สรุปผลการศึกษา

การปลูกครามเพื่อเก็บเมล็ดพันธุ์แบบเก็บหมดทั้งแปลงเพื่อให้ได้ผลผลิต และคุณภาพสูงสุด คือ อายุการเก็บเกี่ยว 180 วันหลังปลูกขึ้นไป เนื่องจากมีจำนวนเมล็ดรวมทั้งอกได้ต่อต้นมากที่สุด คือ 2,673 เมล็ดต่อต้น และมีน้ำหนักเมล็ดต่อต้นจำนวนมาก รวมทั้งความชื้นของเมล็ดที่เป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา คือ 9.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นข้อมูลอายุการเก็บเกี่ยวครามที่เหมาะสม สามารถนำไปใช้ และแนะนำให้เกษตรกรได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 และขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย จันทร์ประเสริฐ ที่ให้คำปรึกษาในการเขียนและการทำวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กมลพร ปานง่อน, สุคนทิพย์ บุญวงค์ และกุลชนา เกศสุวรรณ์. 2554. *รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เรื่อง การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลครามด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล*. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

กัณฑิมา ทองศรี, นรีลักษณ์ วรรณสาย, นิภาภรณ์ พรรณรา และสนอง บัวเกตุ. 2558. การศึกษาช่วงอายุเก็บเกี่ยวและวิธีเก็บเกี่ยวที่มีผลต่อผลผลิตและคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง. ใน *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 53 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. 3-6 กุมภาพันธ์ 2558. น. 218-22. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

จุฑามาศ ศรีสำราญ, บุญเชิด วิมลสุจริต, ญาณิน สุปะมา, วัชราพร ศรีสว่างวงศ์, ปริยานุช สายสุพรรณ์ และณัฏฐ์ชยธร ขัตติยะพุฒิเมธ. 2558. *การวิจัยและพัฒนาการผลิตครามพื้นที่จังหวัดสกลนคร*. ใน *รายงานโครงการวิจัยและพัฒนาท้องถิ่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน*. กรมวิชาการเกษตร.

ธวัชชัย ทีฆชุณหเถียร. 2540. รายงานการวิจัย เรื่อง *การพักตัวของเมล็ดในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 60-1 ขอนแก่น 60-3 และไทนาน 9*. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

เปรมจิตต์ ใจหาญ. 2551. ผลของสายพันธุ์ แหล่งปลูก และอายุการเก็บเกี่ยวต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์คราม (*Indigofera tinctoria* L.) ในระหว่างการเก็บรักษา. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

พิทยา พรหมสุข, ขัวญจิตร สันติประชา และวัลลภ สันติประภา. 2553. การพัฒนาและการสุกแก่ของเมล็ดปอเทือง. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า* 28 (1): 107-117.

พุทธพร วิวาจารย์, สิทธิชัย บุญมั่น, เพ็ชรรัตน์ โยวะบุตร, ชลธิรา แสงศิริ และธนพร ขจรผล. 2558. การปลูกคราม (*Indigofera tinctoria* L.) แซมหม่อนเพื่อเพิ่มรายได้ของเกษตรกรผู้ปลูกหม่อนเลี้ยงไหมในพื้นที่จังหวัดสกลนคร. ใน *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 53 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. 3-6 กุมภาพันธ์ 2558. น. 83-90. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

พัฒนพงศ์ อินทร์คำ. 2547. ระยะเวลาการสุกแก่ของฝักและคุณสมบัติของเปลือกฝักและเปลือกหุ้ม เมล็ดที่มีผลต่อการเสื่อมคุณภาพในแปลงปลูกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวพันธุ์ต่าง ๆ ในสภาพฝนเทียม. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

วัชราภรณ์ จันทบุตร และสุดสงวน เทียมไธสงค์. 2554. การศึกษาระยะเก็บเกี่ยวที่มีผลต่อผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วพร้า. *แก่นเกษตร* 39 (ฉบับพิเศษ 3): 342-347.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2542. *เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืชไร่*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัลลภ สันติประชา. 2538. *เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์*. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิรินภา มีแก้ว, พรศิริ หลีวานิช, จุฑามาศ ร่มแก้ว, สมบัติ ชิณะวงศ์ และธงชัย มาลา. 2552. อิทธิพลของอายุเก็บเกี่ยวและสภาพการเก็บรักษาที่มีต่อคุณภาพเมล็ดและปริมาณน้ำมันสบู่ดำ. ใน *การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 6*. 8-9 ธันวาคม 2552. น. 101-109. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

อนุรัตน์ สายทอง. 2543. สารเคมีจากต้นครามและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร. http://kram.snru.ac.th/components/contents/view.php?id=147 (5 สิงหาคม 2557).

อนุรัตน์ สายทอง. 2553. รายงานวิจัยโครงการศึกษาและพัฒนาสีย้อมจากคราม ปี 2550. มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร. http://kram.snru.ac.th/components/contents/view.php?id=154 (5 สิงหาคม 2557).

อังคณา เทียนกล่ำ. 2555. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ การเพิ่มผลผลิตใบ ปริมาณสีคราม และความผงของครามงอ (*Indigofera tinctoria* L.). *วารสารแก่นเกษตร* 40: 47-52.

Aobchey, P., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., and Sheui-Tein, C. 2007. Simple purification of indirubin from *Indigofera tinctoria* Linn. and inhibitory effect on MCF-7 human breast cancer cell. *Chiang Mai Journal of Science* 34(3): 329-337.

Jahan, S., Golam Sarwar, A. K. M., Hossain, M. A., and Fakir, M. S. A. 2013. Floral morphology and seed yield in two Indigofera spp. as affected by shoot clipping. *Journal of Bangladesh Agricultural University* 11(1): 61-66.

Lima, C. R., Lucena Alcantara Bruno, R., Rosa, K., Silva, G., Pacheco, M. V., Alves E. U., and Andrade, A. P. 2012. Physiology maturity of fruit and seeds of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. *Queriroz*. *Revista Brasileira de Sementes* 34(2): 231-240.

Saraswathi, M. N., Karthikeyan, N., Rajsekar, S., and Gopal, V. 2012. *Indigofera tinctoria* Linn. – A phytopharmacological review. *International Journal of Research Phamarceutical and Biomedical Science* 3(1): 164-169.

วันรับบทความ (Received date) : 10 ก.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 24 ธ.ค. 62

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 8 มิ.ย. 63

การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำมันที่ได้จากพืชเป็นน้ำมันช่วยแปรรูป สำหรับการผลิตยางธรรมชาติคอมพาวด์

Feasibility Study of Using Vegetable Oils as Processing Oil for Natural Rubber Compound Production

สุนิสา หัวนา[1*] มัณฑนา สงไข[1] และวัชรินทร์ สายน้ำใส[1]
Sunisa Huana[1*], Mantana Songkhai[1] and Watcharin Sainumsai[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาน้ำมันจากพืช 3 ชนิด คือ น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันมะพร้าว เพื่อใช้เป็นน้ำมันช่วยแปรรูปทดแทนน้ำมันอะโรมาติก โดยวิเคราะห์ค่าความหนืดและการผ่อนคลายความเค้นด้วยเครื่องทดสอบความหนืดมูนนี่ ทดสอบลักษณะการวัลคาไนซ์ด้วยเครื่อง Moving Die Rheometer (MDR) พบว่ายางคอมพาวด์ที่ใช้น้ำมันปาล์มและน้ำมันถั่วเหลืองมีค่าความหนืดมูนนี่ ค่าแรงบิดต่ำสุด แรงบิดสูงสุด ผลต่างแรงบิด ระยะเวลาที่สามารถแปรรูปได้ ใกล้เคียงกับยางที่ใช้น้ำมันอะโรมาติก แต่จะมีดัชนีความเร็วในการวัลคาไนซ์ที่ต่ำกว่าเล็กน้อย ส่วนยางที่ใช้น้ำมันมะพร้าวมีค่าความหนืดสูงกว่ายางที่ใช้น้ำมันชนิดอื่น ๆ ซึ่งน้ำมันปาล์มและน้ำมันถั่วเหลืองจัดเป็นน้ำมันที่มีศักยภาพสูงสำหรับนำไปใช้เป็นน้ำมันช่วยแปรรูปทดแทนน้ำมันอะโรมาติก

คำสำคัญ: ยางธรรมชาติ น้ำมันช่วยแปรรูป น้ำมันจากพืช ความหนืดมูนนี่ ลักษณะการวัลคาไนซ์

Abstract

In this research, the feasibility of using 3 types of vegetable oils: palm oil, soybean oil and coconut oil as replacements for aromatic oils in processing of natural rubber were studied. The Mooney viscosity and stress relaxation were determined using a Mooney viscosity tester. Vulcanization characteristics were investigated using a moving die rheometer (MDR). It was found that the Mooney viscosity, minimum torque, maximum torque, torque difference, and scorch time of the rubber compounds produced with palm oil and soybean oil were not significantly different from those of rubber compounds incorporating aromatic oil. However, rubber compounds made with palm oil and soybean oil gave slightly lower cure rate indexes than did compounds made with aromatic oil. Coconut oil gave rubber compounds with the highest viscosity. The research strongly suggests that palm oil and soybean oil have great potential to be used as processing oils instead of aromatic oils.

Keywords: natural rubber, processing oil, vegetable oil, Mooney viscosity, vulcanization characteristics

คำนำ

ยางธรรมชาติที่ยังไม่ผ่านกระบวนการวัลคาไนซ์ จัดเป็นวัสดุประเภทหยุ่นหนืด (viscoelastic material) มีสมบัติเป็นทั้งพลาสติกและอิลาสติก (Ward and Hadley, 1993; Ngai et al., 2014) ซึ่งทำให้ยางยุบตัวหรือยืดเมื่อได้รับแรงกดหรือแรงดึง แต่เมื่อคลายแรงกระทำออก ยางจะคืนรูปกลับแต่ไม่เท่าเดิม ส่วนยางธรรมชาติที่ผ่านการวัลคาไนซ์แล้วสามารถยืดได้ถึงประมาณ 1000% หรือมากกว่านั้น (Roberts, 1988; Gent and Mars, 2014) สมบัติในการยืดได้สูงนี้ทำให้สามารถนำยางธรรมชาติไปใช้ได้อย่างหลากหลาย เนื่องจากยางธรรมชาติมีโครงสร้างโมเลกุลที่สม่ำเสมอ ทำให้สามารถตกผลึกได้เมื่อดึง (Tosaka et al., 2004; Toki et al., 2005; Sainumsai et al., 2017) ทำให้ยางธรรมชาติมีความต้านทานต่อแรงดึงและความต้านทานต่อการฉีกขาดสูง

การนำยางธรรมชาติมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ยางประเภทต่าง ๆ จะมีการผสมสารตัวเติมชนิดเสริมแรงบางชนิด เช่น เขม่าดำ (carbon black) หรือ ซิลิกา (silica) (Laube et al., 2001; Waddell and Evans, 2001) เพื่อเพิ่มความแข็งแรงและความทนทานให้กับยางธรรมชาติ โดยสารตัวเติมเหล่านี้จะยึดติดกับโมเลกุลยางด้วยอันตรกิริยาทางกายภาพและทางเคมี ซึ่งซิลิกาจัดเป็นสารเสริมแรงที่ไม่ใช่สีดำ ส่วนสารตัวเติมอื่น ๆ นอกจากเขม่าดำและซิลิกา ได้แก่ ดินขาวหรือเคลย์ (clay)

[1] โปรแกรมวิชาเทคโนโลยียางและพอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อ. เมือง จ. สงขลา 90000
[1] Program in Rubber and Polymer Technology, Faculty of Science and Technology, Songkhla Rajabhat University, Muang, Songkhla 90000
*Corresponding author, Email: 594236011@parichat.skru.ac.th

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ทัลคัม (talcum) ซึ่งสารเหล่านี้ไม่เสริมแรงจนถึงเสริมแรงได้ปานกลางขึ้นกับขนาดของอนุภาค (Brydson, 1988) แต่จะช่วยลดต้นทุนในการผลิต และช่วยให้กระบวนการผลิตเป็นไปได้โดยง่าย ซิลิกาเป็นสารตัวเติมที่นิยมใช้กันมากในอุตสาหกรรมยาง โดยเฉพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์ยางที่มีสีหรือผลิตภัณฑ์ที่ต้องการความโปร่งแสงในขณะที่ยังคงมีสมบัติเชิงกลที่ดี

การเตรียมยางคอมพาวด์ที่ใส่สารตัวเติมในปริมาณมากจำเป็นต้องมีการใช้น้ำมันช่วยแปรรูปเพื่อควบคุมความหนืดของยางให้สามารถแปรรูปได้ง่ายและทำให้สารตัวเติมกระจายตัวในยางได้ดี (Rodgers and Waddell, 2014) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วน้ำมันที่ใช้กันมากคือน้ำมันอะโรมาติกเพราะมีความเข้ากันกับยางได้ดี แต่จากผลการศึกษาด้านความเป็นพิษ พบว่าน้ำมันชนิดนี้มีองค์ประกอบของสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) ซึ่งถูกจัดเป็นสารในกลุ่มที่ก่อมะเร็ง (carcinogenic substances) ผลของความเป็นพิษดังกล่าวทำให้มีการประกาศข้อบังคับของสหภาพยุโรป (European Union regulation) ที่ IP/04/2008 ลงวันที่ 16 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547 เพื่อห้ามการนำเข้าผลิตภัณฑ์ยางรถยนต์ที่มีปริมาณ PAHs เกินร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก จากการสกัดด้วยสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์หรือ DMSO ตามวิธี IP346 ซึ่งเริ่มมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2553 เป็นต้นมา จากข้อบังคับนี้ทำให้ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ยางที่ต้องการส่งผลิตภัณฑ์ไปจำหน่ายในสหภาพยุโรป จำเป็นต้องใช้น้ำมันช่วยแปรรูปชนิดอื่นทดแทนน้ำมันอะโรมาติก ทำให้มีความจำเป็นต้องหาน้ำมันชนิดอื่นมาใช้ทดแทน น้ำมันชนิดที่มีปริมาณ PAHs ต่ำกว่าข้อกำหนดที่มีการศึกษาและทดลองใช้เพื่อทดแทนการใช้น้ำมันอะโรมาติก มีทั้งน้ำมันที่ได้จากแร่ (mineral oils) เช่น น้ำมัน treated distillate aromatic extract (TDAE) และน้ำมัน mild extraction solvate (MES) และน้ำมันที่ได้จากพืช (vegetable oils) ทั้งแบบที่ไม่ดัดแปรและดัดแปรโครงสร้างโมเลกุล การใช้น้ำมันจากพืชซึ่งสามารถปลูกทดแทนใหม่ได้มีข้อได้เปรียบทั้งในแง่เศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม

ในงานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำมันจากพืช 3 ชนิด คือ น้ำมันปาล์ม (palm oil, PO) น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil, SO) และน้ำมันมะพร้าว (coconut oil, CO) ทดแทนน้ำมันอะโรมาติก (aromatic oil, AO) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม เป็นน้ำมันช่วยแปรรูปยางธรรมชาติที่ผสมเขม่าดำเกรด N660 เป็นสารตัวเติม โดยศึกษาเปรียบเทียบความหนืดมูนนี่ การผ่อนคลายความเค้น และลักษณะการวัลคาไนซ์

วิธีการศึกษา

การเตรียมยางคอมพาวด์

ยางธรรมชาติที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นยางแท่งมาตรฐานเกรด 20 (STR 20) ผลิตโดยบริษัท ถาวรอุตสาหกรรมยางพารา (1982) จำกัด จังหวัดสงขลา ผสมยางคอมพาวด์ตามสูตรการทดลองใน Table 1 โดยนำยางแท่งมาตรฐานเกรด 20 มาบดผสมยางกับสารเคมีตามวิธีมาตรฐาน ISO 2393 (2014) ด้วยเครื่องบดผสมยางแบบสองลูกกลิ้งขนาด 10x20 นิ้ว ซึ่งมี friction ratio เท่ากับ 1:1.2 ผลิตโดยบริษัทชัยเจริญเอ็นจิเนียริ่ง ดังรายละเอียดขั้นตอนการผสมยางและสารเคมีใน Table 2 หลังจากนั้นนำยางคอมพาวด์มาทดสอบความสามารถในการแปรรูป ได้แก่ ความหนืดมูนนี่ การผ่อนคลายความเค้น และลักษณะการวัลคาไนซ์

Table 1 Compound rubber formulations.

Ingredients	Quantity (phr[a])			
	AO	PO	SO	CO
Natural rubber, STR 20	100	100	100	100
Stearic acid	2	2	2	2
Zinc oxide	5	5	5	5
Accelerator MBT[b]	1	1	1	1
Carbon black N660 grade	35	35	35	35
Aromatic oil	1	-	-	-
Palm oil	-	1	-	-
Soybean oil	-	-	1	-
Coconut oil	-	-	-	1
Sulfur	2	2	2	2

[a]phr: parts (by weight) per hundred parts of rubber, [b]MBT: 2-mercapto benzothiazole.

Table 2 Mixing procedure used in this study.

Step	Procedure	Duration (min)	Accumulative (min)
1	Set the mill opening at 0.20 mm and pass the rubber through the rolls twice without banding	1	1
2	Band the rubber on the front roll with the mill opening at 1.40 mm. Make two ¾ cuts from each side.	2	3
3	Set the mill opening at 1.70 mm. Add zinc oxide. Make one ¾ cut from each side.	2	5
4	Add the carbon black and oil evenly across the mill at a uniform rate. When about half the black is incorporated, add the stearic acid and open the mill to 1.90 mm. Make one ¾ cut from each side then add the remainder of the carbon black.	10	15
5	Add the accelerator, taking care to avoid any loss. Sweep the mill pan and add until all the pigment is in the batch. Make three ¾ cuts from each side.	2	17
6	Add the sulfur and that which falls into the mill pan. Make one ¾ cut from each side.	3	20
7	Cut the stock from the mill. Set the opening at 0.80 mm. and pass the rolled stock endwise through the mill six times.	2	22
8	Open the mill to give a minimum stock thickness of 6 mm and pass the stock through the rolls four times, folding it back on itself each time.	3	25

การทดสอบความหนืดมูนนี่และการผ่อนคลายความเค้น

นำยางคอมพาวด์มาทดสอบความหนืดมูนนี่และการผ่อนคลายความเค้นด้วยเครื่องทดสอบความหนืดมูนนี่ รุ่น MV-3000-VS (GOTECH Testing Machines Inc.) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้โรเตอร์ขนาดใหญ่ ตามวิธีการทดสอบมาตรฐาน ISO/TS 289-4 (2017) ซึ่งในการทดสอบจะมี 3 ขั้นตอนแสดงดัง Figure 1(A) โดยขั้นตอนแรกจะเป็นการอุ่นยางตัวอย่างเป็นเวลา 1 นาที ในขั้นตอนที่สอง โรเตอร์จะหมุนด้วยความเร็ว 2 รอบต่อนาทีและบันทึกค่าแรงบิดเป็นค่าความหนืดมูนนี่ของยางตัวอย่างที่เวลา 4 นาที และในขั้นตอนที่สาม เป็นการวัดการผ่อนคลายความเค้นของยางหลังจากโรเตอร์หยุดหมุน โดยจะบันทึกค่าแรงบิดเป็นเวลา 1 นาที

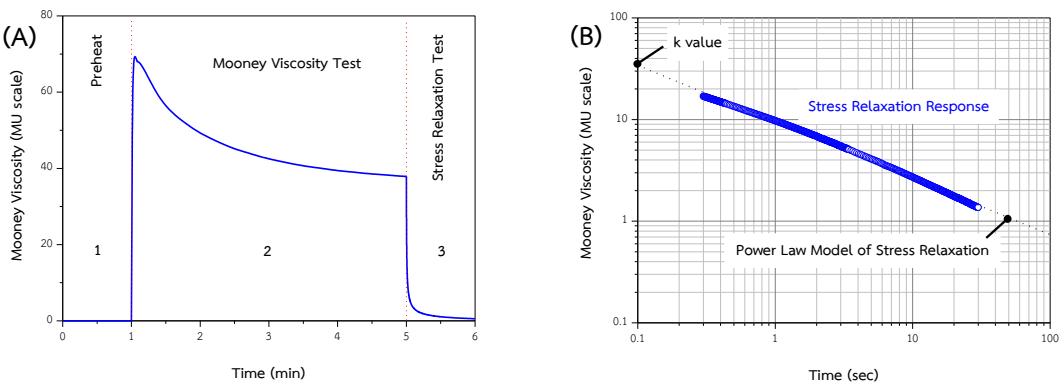

Figure 1 (A) Torque curve from a Mooney viscosity test plus a stress relaxation test and (B) Plot of log Mooney units versus log time from a stress relaxation test.

จากนั้นนำข้อมูลแรงบิด (Mooney viscosity value) มาวิเคราะห์หาอัตราการผ่อนคลายความเค้น (rate of stress relaxation) จากความสัมพันธ์ของแรงบิด (Mooney units) กับเวลา (วินาที) แสดงดัง Figure 1(B) ซึ่งสามารถคำนวณค่าคงที่และอัตราการผ่อนคลายความเค้นได้จากสมการยกกำลังแบบถดถอยดังสมการ (1) ทดสอบ 5 ชิ้นทดสอบ รายงานผลด้วยค่าเฉลี่ย

$$M = k(t)^a \quad (1)$$

โดยที่ M หมายถึง ค่าแรงบิดในหน่วย Mooney units

k หมายถึง ค่าคงที่ เป็นแรงบิดในหน่วย Mooney units ที่เวลา 1 วินาทีหลังจากโรเตอร์หยุดหมุน

a หมายถึง อัตราการผ่อนคลายความเค้น (s^{-1})

การทดสอบลักษณะการวัลคาไนซ์

นำยางคอมพาวด์มาทดสอบลักษณะการวัลคาไนซ์ด้วยเครื่อง Moving Die Rheometer (MDR) ตามวิธีมาตรฐาน ISO 6502-3 (2018) ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส บันทึกค่าแรงบิดต่ำสุด แรงบิดสูงสุด ระยะเวลาที่สามารถแปรรูปได้ และเวลาการวัลคาไนซ์ของยางคอมพาวด์ จากนั้นคำนวณดัชนีความเร็วการวัลคาไนซ์ (cure rate index, CRI) ดังสมการ (2) ทดสอบ 5 ชิ้นทดสอบ รายงานผลด้วยค่าเฉลี่ย

$$\text{Cure rate index, CRI } (\text{min}^{-1}) = \frac{100}{CureTime - ScorchTime} \quad (2)$$

โดยที่ Cure time (t_{c90}) เป็นระยะเวลาการวัลคาไนซ์ของยางคอมพาวด์ ในหน่วยนาที

Scorch time (t_{s1}) เป็นระยะเวลาที่สามารถแปรรูปได้ของยางคอมพาวด์ ในหน่วยนาที

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ยางธรรมชาติที่ผสมน้ำมันปาล์ม (PO) และน้ำมันถั่วเหลือง (SO) มีค่าความหนืดมูนนี่ใกล้เคียงกับยางธรรมชาติที่ใช้น้ำมันอะโรมาติก (AO) ดังแสดงใน Figure 2 แต่ยางธรรมชาติที่ผสมน้ำมันมะพร้าว (CO) มีค่าความหนืดมูนนี่สูงกว่าน้ำมันชนิดอื่น ๆ เล็กน้อย ซึ่งค่าความหนืดของยางคอมพาวด์ที่สูงกว่าจะแปรรูปได้ยากกว่า นั่นคือการไหลของยางในขณะแปรรูปเกิดขึ้นได้ยากกว่า ต้องใช้พลังงานในการแปรรูปสูงกว่า (บุญธรรม นิธิอุทัย, 2539; Ngai et al., 2014)

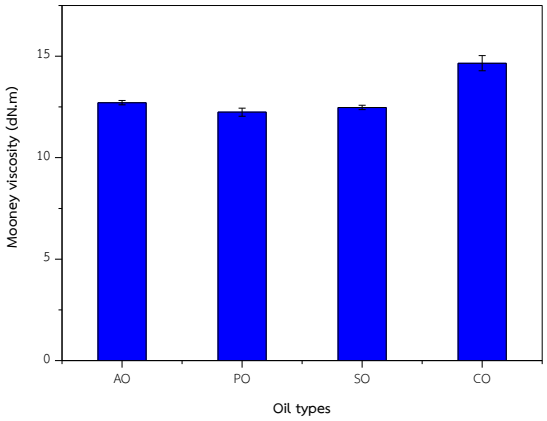

Figure 2 Mooney viscosity value of rubber compound with various types of processing oil.

ความสัมพันธ์ระหว่างแรงบิดหลังโรเตอร์หยุดหมุนกับเวลาของยางธรรมชาติที่ใช้น้ำมันชนิดต่าง ๆ แสดงดัง Figure 3 ซึ่งสามารถวิเคราะห์อัตราการผ่อนคลายความเค้นของยางคอมพาวด์โดยใช้สมการยกกำลังแบบถดถอย อัตราการผ่อนคลายความเค้นพิจารณาได้จากความชันของความสัมพันธ์ระหว่างแรงบิดกับเวลา ซึ่งอัตราการผ่อนคลายความเค้นของยางที่มีค่าน้อยจะบ่งชี้ว่ายางตัวอย่างนั้นมีพฤติกรรมของแข็งที่ยืดหยุ่น (elastic) สูง (Treloar, 2005; Gent, 2014) ในทางกลับกันยางตัวอย่างที่มีอัตราการผ่อนคลายความเค้นสูงจะแสดงพฤติกรรมของของเหลวหนืด (viscous) สูง จาก Table 3 พบว่าอัตราการผ่อนคลายความเค้นของยางคอมพาวด์ที่ใช้น้ำมันทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำมันอะโรมาติก น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันมะพร้าว มีค่าใกล้เคียงกัน ในช่วง 0.608-0.648 หน่วยต่อวินาที นั่นแสดงว่ายางคอมพาวด์ที่ใช้น้ำมันทั้ง 4 ชนิดมีพฤติกรรมเป็นวัสดุหยุ่นหนืด (viscoelastic behavior) ที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากทั้งส่วนประกอบของยางและขนาดน้ำหนักโมเลกุลรวมถึงโครงสร้างของโมเลกุลด้วย (Treloar, 2005) ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไปในอนาคต นอกจากนี้อาจส่งผลที่ใกล้เคียงกันต่อระยะเวลาการเก็บยางคอมพาวด์ (บุญธรรม นิธิอุทัย, 2539) ตลอดจนกระบวนการแปรรูปในขั้นตอนอื่น ๆ ต่อไปด้วย

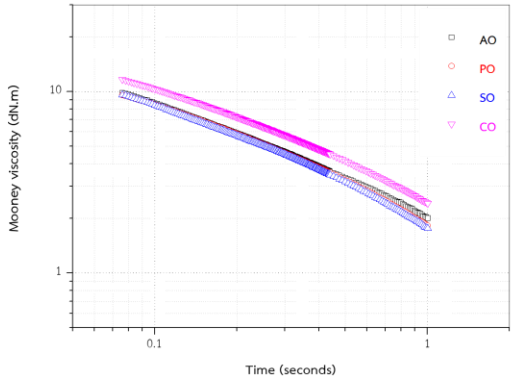

Figure 3 Torque curve from a stress relaxation test of rubber compound with various types of processing oil.

Table 3 Parameters and correlation of regression power equation.

Oil types	Parameters		Correlation, r
	k	*a*	
Aromatic oil (AO)	2.1685±0.0312	0.613±0.016	0.9960±0.0011
Palm oil (PO)	2.0591±0.1183	0.638±0.034	0.9896±0.0007
Soybean oil (SO)	1.9940±0.0129	0.648±0.013	0.9899±0.0015
Coconut oil (CO)	2.6823±0.0130	0.608±0.008	0.9913±0.0060

ยางคอมพาวด์ที่ใช้น้ำมันอะโรมาติกและน้ำมันที่ได้จากพืชชนิดต่าง ๆ มีกราฟการวัลคาไนซ์ที่คล้ายคลึงกัน ดังแสดงใน Figure 4 โดยยางที่ใช้น้ำมันอะโรมาติกมีอัตราการวัลคาไนซ์ที่สูงกว่าเล็กน้อยซึ่งจะได้พิจารณาต่อไป ส่วนค่าแรงบิดต่ำสุด และแรงบิดสูงสุดของยางคอมพาวด์ที่ใช้น้ำมันอะโรมาติกและน้ำมันจากพืชไม่แตกต่างกันมากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำมันซึ่งเป็นสารช่วยในการแปรรูป ไม่มีผลต่อปริมาณการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลยาง (crosslink) ผลต่างระหว่างค่าแรงบิดสูงสุดกับแรงบิดต่ำสุดของยางคอมพาวด์ใช้บ่งชี้ถึงปริมาณการเชื่อมระหว่างโมเลกุลยางได้ (Coran, 2014) โดยยางคอมพาวด์ที่ใช้น้ำมันอะโรมาติกและน้ำมันที่ได้จากพืชชนิดต่าง ๆ มีผลไม่แตกต่างกัน

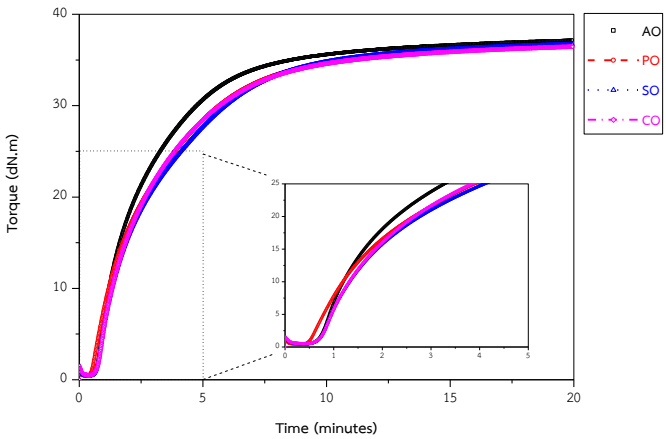

Figure 4 Cure curve of rubber compound with various types of processing oil at testing temperature 150°C.

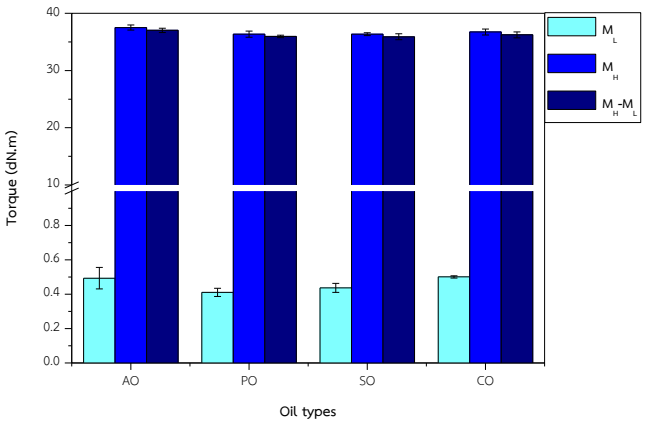

Figure 5 Minimum torque, maximum torque, and different torque of rubber compound with various types of processing oil.

เปรียบเทียบค่าแรงบิดต่ำสุด แรงบิดสูงสุด และผลต่างแรงบิดของยางคอมพาวด์ที่ใช้น้ำมันชนิดต่าง ๆ แสดงดัง Figure 5 พบว่ายางที่ใช้น้ำมันทั้ง 4 ชนิด มีค่าแรงบิดต่ำสุด แรงบิดสูงสุด และผลต่างแรงบิดไม่แตกต่างกัน นั่นคือน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันมะพร้าว ไม่มีผลทำให้ปริมาณการเชื่อมโยงของโมเลกุลยางเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากค่าผลต่างแรงบิดจะเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงปริมาณการเชื่อมโยงของโมเลกุลยาง (Coran, 2014) ซึ่งในการศึกษานี้พบว่า ยางที่ใช้น้ำมันทั้ง 4 ชนิด มีค่าใกล้เคียงกัน น้ำมันอะโรมาติกมีอัตราการวัลคาไนซ์ที่สูงกว่าเล็กน้อยซึ่งจะได้พิจารณาต่อไป ส่วนค่าแรงบิดต่ำสุด และแรงบิดสูงสุดของยางคอมพาวด์ที่ใช้น้ำมันอะโรมาติกและน้ำมันจากพืชไม่แตกต่างกันมากนัก

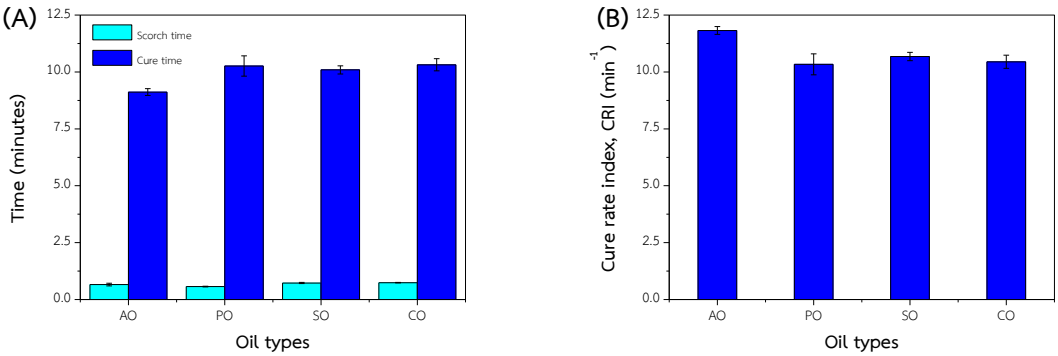

Figure 6 (A) Scorch time and cure time and (B) cure rate index of rubber compound with various types of processing oil.

จาก Figure 6(A) พบว่าระยะเวลาที่สามารถแปรรูปได้ของยางที่ใช้น้ำมันอะโรมาติกและน้ำมันจากพืชทั้ง 3 ชนิด มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งระยะเวลาที่สามารถแปรรูปได้เป็นช่วงเวลาที่โมเลกุลยังไม่เกิดปฏิกิริยาวัลคาไนซ์ ยังไม่เกิดการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลยาง (Coran, 2014) นั่นคือยางคอมพาวด์ยังสามารถไหล หรือเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ ส่วนเวลาวัลคาไนซ์ของยางคอมพาวด์ พบว่ายางที่ใช้น้ำมันจากพืชทั้ง 3 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน แต่มีค่าสูงกว่ายางที่ใช้น้ำมันอะโรมาติกอยู่เล็กน้อย เวลาวัลคาไนซ์เป็นเวลาที่จะใช้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมโยงของโมเลกุลยาง ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์ยางมีความยืดหยุ่นสูงขึ้น ยางที่ใช้น้ำมันพืชมีระยะเวลาวัลคาไนซ์ที่นานกว่าอยู่เล็กน้อย กล่าวคือจะต้องใช้เวลาในการทำผลิตภัณฑ์ยางนานกว่าเพียงเล็กน้อย ซึ่งดัชนีความเร็วการวัลคาไนซ์ของยางคอมพาวด์แสดงดัง Figure 6(B) พบว่ายางที่ใช้น้ำมันอะโรมาติกมีค่าดัชนีความเร็วการวัลคาไนซ์สูงกว่ายางที่ใช้น้ำมันพืชอยู่เล็กน้อย

สรุปผลการศึกษา

น้ำมันปาล์มและน้ำมันถั่วเหลืองมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้เป็นน้ำมันช่วยแปรรูปในยางธรรมชาติ ทดแทนน้ำมันอะโรมาติก ซึ่งยางคอมพาวด์ที่ใช้น้ำมันปาล์มและน้ำมันถั่วเหลืองมีค่าความหนืดมูนนี่ ค่าแรงบิดต่ำสุด แรงบิดสูงสุด ผลต่างแรงบิด ระยะเวลาที่สามารถแปรรูปได้ ใกล้เคียงกับยางที่ใช้น้ำมันอะโรมาติก แต่จะมีดัชนีความเร็วในการวัลคาไนซ์ที่ต่ำกว่าอยู่เล็กน้อย

ในการวิจัยนี้ศึกษาเขม่าดำเพียงเกรดเดียว (N660) ในปริมาณ 35 phr ร่วมกับน้ำมัน 1 phr การวิจัยครั้งต่อไป จะศึกษาโดยใช้เขม่าดำเกรดต่าง ๆ และสารตัวเติมชนิดอื่น ๆ โดยแปรปริมาณสารตัวเติมและปริมาณน้ำมัน รวมถึงการศึกษาเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพทั้งเชิงกล และพลวัติของยางวัลคาไนซ์ที่ใช้น้ำมันจากพืชและน้ำมันอะโรมาติก

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยียางและพอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลาที่อนุเคราะห์วัสดุและสารเคมี รวมทั้งเครื่องมือ เครื่องจักร เครื่องทดสอบ และขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลาที่สนับสนุนงบประมาณในการนำเสนอผลงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

บุญธรรม นิธิอุทัย. 2539. *กระบวนการแปรรูปยาง*. ภาควิชาเทคโนโลยียางและพอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปัตตานี. 317 หน้า.

Brydson, J. A. 1988. *Rubbery materials and their compounds*. Essex, U.K.: Elsevier Science Publishers Ltd. 469 pp.

Coran, A. Y. 2014. Vulcanization. In *The Science and Technology of Rubber,* J. E. Mark, B. Erman, and C. M. Roland. eds. pp. 383-416. 4th Ed. MA, USA: Elsevier Inc.

Gent, A. N. 2014. Rubber elasticity: basic concepts and behavior. In *The Science and Technology of Rubber,* J. E. Mark, B. Erman, and C. M. Roland. eds. pp. 1-26. 4th Ed. MA, USA: Elsevier Inc.

Gent, A. N., and Mars, W. V. 2014. Strength of elastomers. In *The Science and Technology of Rubber*, J. E. Mark, B. Erman, and C. M. Roland. eds. pp. 473-516. 4th Ed. MA, USA: Elsevier Inc.

ISO 2393. 2014. *Rubber test mixes - Preparation, mixing and vulcanization - Equipment and procedures*. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 24 pp.

ISO 6502-3. 2018. *Rubber - Measurement of vulcanization characteristics using curemeters - Part 3: Rotorless curemeter*. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 20 pp.

ISO/TS 289-4. 2017. *Rubber, unvulcanized - Determinations using a shearing-disc viscometer - Part 4: Determination of the Mooney stress-relaxation rate*. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 13 pp.

Laube, S., Monthey, S., and Wang, M. J. 2001. Compounding with carbon black and oil. In *Rubber Technology: Compounding and testing for performance,* J. S. Dick. ed. pp. 295-324. Ohio, USA: Hanser Gardner Publications, Inc.

Ngai, K. L., Capaccioli, S., and Plazek, D. J. 2014. The viscoelastic behavior of rubber and dynamics of blends. In *The Science and Technology of Rubber*, J. E. Mark, B. Erman, and C. M. Roland. eds. pp. 193-284. 4th Ed. MA, USA: Elsevier Inc.

Roberts, A. D. 1988. *Natural rubber science and technology*. Oxford, U.K.: Oxford University Press. 1136 pp.

Rodgers, B., and Waddell, W. 2014. The science of rubber compounding. In *The Science and Technology of Rubber,* J. E. Mark, B. Erman, and C. M. Roland. eds. pp. 417-471. 4th Ed. MA, USA: Elsevier Inc.

Sainumsai, W., Toki, S., Amnuaypornsri, S., Nimpaiboon, A., Sakdapapanich, J., Rong, L., Hsiao, B. S., and Suchiva, K. 2017. Dependence of the onset of strain-induced crystallization of natural rubber and its synthetic analogue on crosslink and entanglement by using synchrotron X-ray. *Rubber Chemistry and Technology* 90(4): 728-742.

Toki, S., Sics, I., Hsiao, B. S., Murakami, S., Tosaka, M., Poompradub, S., Kohjiya, S., and Ikeda, Y. 2005. Probing the nature of strain-induced crystallization in polyisoprene rubber by combined thermomechanical and in situ X-ray diffraction techniques. *Macromolecules* 38(16): 7064-7073.

Tosaka, M., Murakami, S., Poompradub, S., Kohjiya, S., Ikeda, S., Toki, Y., Sics, I., and Hsiao, B. S. 2004. Orientation and crystallization of natural rubber network as revealed by WAXD using synchrotron radiation. *Macromolecules* 37(9): 3299-3309.

Treloar, L. R. G. 2005. *The Physics of Rubber Elasticity*. 3rd ed. Oxford, USA: Oxford University Press. 322 pp.

Waddell, W. H., and Evans, L. R. 2001. Precipitated silica and non-black fillers. In *Rubber Technology: Compounding and Testing for Performance,* J. S. Dick. ed. pp. 325-343. Ohio, USA: Hanser Gardner Publications.

Ward, I. M., and Hadley, D. W. 1993. *An introduction to the mechanical properties of solid polymers*. West Essex, U.K.: John Wiley & Sons Ltd. 334 pp.

วันรับบทความ (Received date) : 13 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 12 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

ผลของไคโตซานและน้ำหมักชีวภาพในการเตรียมพร้อมเมล็ดพันธุ์ต่อความงอกและการเจริญของต้นกล้าพริกขี้หนูสวน

Effect of Chitosan and Bio-extract in Seed Priming Process on Germination and Seedling Growth of Bird Chili Pepper

บัวคำ แก้วบัว[1] ประนอม ยังคำมั่น[1*] อรพินธุ์ สฤษดิ์นำ[1] และสุเทพ วัชรเวชศฤงคาร[1]
Bouakham Keoboua[1], Pranom Yangkhamman[1*], Orapin Saritnum[1] and Suthep Watcharawetsaringkharn[1]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อประเมินผลของระยะเวลาการดูดน้ำของเมล็ดที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมพร้อมเมล็ดพันธุ์หรือการทำ seed priming โดยแช่เมล็ดในน้ำ RO เป็นเวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C และเพื่อศึกษาผลของการทำ seed priming ด้วยสารละลายไคโตซานและน้ำหมักชีวภาพจากพืชต่อการงอกและการเจริญของต้นกล้าพริกขี้หนูสวน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 8 กรรมวิธี โดยการแช่เมล็ดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 50, 100, 200 mg/l น้ำหมักชีวภาพอัตราส่วนของน้ำหมักชีวภาพ:น้ำ RO ที่ 1:500, 1:750, 1:1000 (v/v) เปรียบเทียบกับเมล็ดที่แช่ด้วยน้ำ RO และเมล็ดที่ไม่ผ่านการทำ seed priming โดยทำการทดสอบความงอกภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการเพาะบนกระดาษชื้น และสภาพโรงเรือนด้วยวิธีการเพาะในพีทมอส ผลที่ได้พบว่า เมล็ดพันธุ์พริกที่ผ่านการทำ seed priming โดยการแช่เมล็ดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เหมาะสำหรับการเตรียมพร้อมเมล็ดพันธุ์พริกขี้หนูสวน ทำให้เมล็ดมีการงอกในห้องปฏิบัติการสูงที่สุด (95%) และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับเมล็ดไม่ได้ผ่านการทำ seed priming ที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำกว่า (88%) และจากการศึกษาผลของการทำ seed priming ด้วยสารไคโตซานและน้ำหมักชีวภาพจากพืชต่อการงอกและการเจริญของต้นกล้า พบว่าการทำ seed priming ด้วยสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 50 mg/l มีผลให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดใช้เวลาเฉลี่ยในการงอกเร็วสุดและมีค่าความเร็วในการงอกสูงที่สุด ในขณะที่การทำ seed priming ด้วยไคโตซานความเข้มข้น 50-100 mg/l และน้ำหมักชีวภาพ:น้ำ RO ในอัตราส่วน 1:500 (v/v) มีผลให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้าสูงสุด โดยผลดังกล่าวที่ได้มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับเมล็ดที่ไม่ได้ผ่านการทำ seed priming เมื่อทำการทดสอบความงอกในสภาพโรงเรือน ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการทำ seed priming ด้วยไคโตซานเข้มข้น 50 mg/l มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการเตรียมพร้อมเมล็ดพันธุ์พริกขี้หนูสวน ก่อนนำไปเพาะในสภาพโรงเรือน เนื่องจากมีผลส่งเสริมทั้งต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าที่ดี

คำสำคัญ: การดูดน้ำ เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด เวลาเฉลี่ยในการงอก ความเร็วในการงอก พริกขี้หนูสวน

Abstract

One objective of this research was to evaluate the optimal duration of seed soaking as part of seed priming for bird chili pepper seeds. Seeds were soaked in RO water for 0, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 hours at 25°C. The other objective was to know the effect of seed priming with chitosan and bio-extract on the seed germination and seedling growth of bird chili pepper plants. The experimental design was of the completely randomized type. There were 8 treatments, which included seed priming for 12 hours in chitosan at 50, 100, 200 mg/l, and bio-extract:RO water ratio at 1:500, 1:750, 1:1000 (v/v). These treatments were compared with seed priming with RO water and non-primed seed. Seed germination was tested by the top of paper method in the laboratory and by using peat moss as material under greenhouse conditions. With respect to the first objective, the results showed that a soaking duration of 12 hours was optimal as it produced the highest seed germination (95%, a result that was significantly different to that found for non-primed seed, which showed the lowest seed germination rate (88%). With regard to the second objective, seed priming with chitosan at 50 mg/l stimulated the highest seed germination. It also produced the fastest mean germination time and speed of germination was highest. The highest fresh and dry weights of seedlings were obtained when seeds were primed with 50-100 mg/l chitosan and bio-extract:RO water ratio at 1:500 (v/v). These results were significantly different to those found for with non-primed seeds when they were germinated under greenhouse conditions. From these results, it can be concluded that seed priming with chitosan 50 mg/l was a suitable method for enhancing seed germination and seedling growth of bird chili pepper seeds.

Keywords: water imbibition, seed germination, mean germination time, speed of germination, bird chili pepper

[1] คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ 50290
[1] Faculty of Agricultural Production, Maejo University, San Sai, Chiang Mai 50290
*Corresponding author, Email: yangkhamman@yahoo.com

คำนำ

พริกเป็นพืชผักชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในหลายประเทศทั่วโลก ประเทศไทยมีการปลูกพริกอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ สำหรับเป็นพืชผักสวนครัวเพื่อบริโภคในครัวเรือนและการผลิตเพื่อจำหน่าย ซึ่งในการผลิตพริกจำเป็นต้องใช้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพดี คือ มีความงอกสูง มีความแข็งแรงสามารถงอกได้รวดเร็ว สม่ำเสมอ และเจริญเป็นต้นกล้าที่มีความสมบูรณ์ ในการนำเมล็ดพันธุ์ผสมเปิดมาใช้เพื่อปลูก เมล็ดส่วนมากจะมีความงอกและความแข็งแรงต่ำกว่าเมล็ดพันธุ์ที่เป็นลูกผสม F1 เนื่องจากพื้นฐานทางพันธุกรรม การจัดการแปลงผลิต การเก็บเกี่ยว การจัดการหลังการเก็บเกี่ยวที่ต่างกัน ซึ่งเป็นผลให้คุณภาพทางสรีรวิทยาของเมล็ดต่างกัน ถ้าหากว่าเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้มีความงอกและความแข็งแรงที่ต่ำจะมีผลกระทบต่อเนื่องในเรื่องของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดที่เร็วกว่าเมล็ดที่มีความแข็งแรงสูง และปัญหาที่จะเกิดขึ้นตามมาอีก ได้แก่ เมื่อนำเมล็ดมาเพาะและได้รับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในระหว่างการงอกจะมีผลกระทบทำให้การงอกของเมล็ดยิ่งลดลง เมล็ดงอกช้า งอกไม่สม่ำเสมอ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ต้นกล้าโตช้า ขนาดต้นไม่เท่ากัน และรวมทั้งอาจกระทบถึงปริมาณผลผลิตที่ได้ต่ำ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้มีการนำเทคนิคการเตรียมพร้อมเมล็ด (seed priming) มาใช้เพื่อเพิ่มคุณภาพทางสรีรวิทยาของเมล็ดพันธุ์ให้เมล็ดมีการงอกและมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น ได้ต้นกล้าที่แข็งแรงและเจริญเติบโตได้ดีกว่า จากเดิมที่ไม่ผ่านการเตรียมพร้อมเมล็ดก่อนการนำมาเพาะ แต่อย่างไรก็ตามการเตรียมพร้อมเมล็ดให้ประสบความสำเร็จตามที่ต้องการในพืชแต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์นั้น จะใช้เทคนิคการเตรียมความพร้อมที่ต่างกันไป ขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้าง องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดพืช และการตอบสนองที่ดีของพืชต่อสารที่นำมาใช้ในการเตรียมพร้อมเมล็ด หลักการเตรียมพร้อมเมล็ด เป็นการเพิ่มความชื้นให้กับเมล็ดโดยให้เมล็ดดูดน้ำหรือสารละลายต่าง ๆ เข้าไปเพื่อกระตุ้นให้เมล็ดเกิดกระบวนการงอกที่ดีและพร้อมเพรียงกัน แต่กระบวนการงอกจะถูกยับยั้งก่อนที่รากจะแทงออกมาจากเปลือกหุ้มเมล็ด โดยการนำเมล็ดมาลดความชื้นลงให้เท่ากับความชื้นเริ่มต้น หลังจากนั้นเมื่อนำเมล็ดที่ผ่านการเตรียมพร้อมเมล็ดมาเพาะในแปลง จะทำให้เมล็ดงอกได้ดีและงอกเร็วขึ้น (พจนา สีขาว และคณะ, 2551; กุลธิดา โชทนากูล และคณะ, 2558; บุญมี ศิริ, 2558; พิจิตรา แก้วสอน และคณะ, 2560; Bradford, 1986; McDonald, 2000)

กุลธิดา โชทนากูล และคณะ (2558) ได้ศึกษาถึงการทำ seed priming ด้วยวิธีแช่น้ำต่อคุณภาพของเมล็ดพริกพันธุ์บางช้างและพริกขี้หนูพันธุ์สามเดือน พบว่า การแช่เมล็ดพริกพันธุ์บางช้างในน้ำ RO+ให้อากาศ+บ่มเมล็ด ทำให้เมล็ดมีความงอกในห้องปฏิบัติการและในสภาพโรงเรือนสูงที่สุด เท่ากับ 73.00 และ 51.50% ตามลำดับ และมีเวลาเฉลี่ยในการงอกเร็วสุด เท่ากับ 9.83 วัน ส่วนการแช่เมล็ดพริกขี้หนูพันธุ์สามเดือนในน้ำ RO+ให้อากาศ+บ่มเมล็ด มีความงอกในห้องปฏิบัติการและในสภาพโรงเรือนสูงที่สุด เท่ากับ 90.50 และ 58.50% ตามลำดับ และการแช่เมล็ดในน้ำ RO+ไม่ให้อากาศ+บ่มเมล็ด มีเวลาเฉลี่ยในการงอกเร็วที่สุด เท่ากับ 10.11 วัน การทำ seed priming นอกจากทำได้ด้วยการใช้น้ำแล้วยังมีการนำสารละลายชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการส่งเสริมการงอกของเมล็ดมาใช้สำหรับการแช่เมล็ดด้วย เช่น KNO_3, KCl, NaCl, PEG (Polyethylene glycol) และ Vitamin C เป็นต้น (นภาพร เวชกามา และพีระยศ แข็งขัน, 2561) ซึ่งสารเคมีดังกล่าวจะช่วยควบคุมการดูดน้ำของเมล็ดและเพิ่มธาตุอาหารที่จำเป็นต่อกระบวนการงอก เช่น การสังเคราะห์โปรตีน (Copeland and McDonald, 1995) และส่งเสริมการเติบโตของยอดอ่อน ใบ และกิ่งก้าน (ยงยุทธ โอสถสภา และคณะ, 2541) ดังตัวอย่างงานวิจัยของ พจนา สีขาว และคณะ (2551) พบว่า การกระตุ้นความงอกของเมล็ดพริกหวานด้วย Vitamin C, Polyethylene glycol, KNO_3, NaCl, KH_2PO_4, KCl, KNO_3 ร่วมกับ KH_2PO_4 มีผลทำให้เมล็ดพันธุ์มีความงอกและความเร็วในการงอกของเมล็ดเพิ่มมากขึ้น 15-17% นอกจากนี้ Saleh et al. (1996) ได้ทดลองทำ seed priming กับเมล็ดพันธุ์พริกหวานลูกผสมพันธุ์ Gedeon ด้วย $CaCl_2$ และ KNO_3 พบว่า $CaCl_2$ มีผลทำให้เมล็ดพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสูงสุด จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นส่วนมากเป็นการเตรียมพร้อมเมล็ดโดยการใช้สารเคมีสำหรับการส่งเสริมการงอกของเมล็ด แต่ในปัจจุบันความนิยมในการปลูกพืชโดยลดการใช้สารเคมี หรือปลูกพืชในระบบอินทรีย์มีมากขึ้น ดังนั้นการนำสารชีวภาพมาใช้ในการเตรียมพร้อมเมล็ดจึงมีความสำคัญและควรต้องมีศึกษาและพัฒนาวิธีการให้เหมาะสมในแต่ละพืชให้ดียิ่งขึ้นไป เพื่อจะได้นำความรู้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์แก่เกษตรกรต่อไป

ปัจจุบันได้มีการนำไคโตซาน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ โดยสกัดมาจากเปลือกนอกของสัตว์พวก กุ้ง ปู แมลง หรือ ผนังเซลล์ของรา มาใช้ในการกระตุ้นการเจริญของพืช เนื่องจากไคโตซานมีองค์ประกอบของไนโตรเจนที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544) นอกจากนี้ไคโตซานยังชักนำให้พืชสร้างสารประกอบฟีนอลิก เช่น ลิกนิน (lignin) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ และ phytoalexin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (พีรพงษ์ แสงวนางค์กูล และคณะ, 2552) มีผลให้เซลล์พืชแข็งแรงและทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลงได้มากขึ้น (เยาวพา สุวัติถิ, 2555) ส่งผลให้เมล็ดงอกมากขึ้นและมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น (Reddy et al., 1999) เดือนเต็ม ลอยมา และคณะ (2552) รายงานว่า การกระตุ้นการงอกของเมล็ดฟักแฟงที่แช่ในสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.8% สามารถกระตุ้นให้

เมล็ดมีความงอกสูงสุด และการศึกษาของ ชณิตรา โพธิคเวชฐ์ และคณะ (2553) ที่ทำ seed priming ในเมล็ดพันธุ์แตงกวาพันธุ์บิงโกยาว บงกช บิงโก และ 103B พบว่า พันธุ์ 103B ที่แช่ในไคโตซานความเข้มข้น 0.5% ทำให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกและค่าดัชนีการงอกสูงสุด นอกจากนี้ พีรพงษ์ แสงวนางค์กูล และคณะ (2552) ได้ศึกษาผลของการแช่เมล็ดพริกมันพันธุ์บางช้างและพริกขี้หนูพันธุ์ซูเปอร์ฮอต ด้วยสารละลายไคโตซานเข้มข้น 0, 50, 100 และ 200 ppm ต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด พบว่า การแช่เมล็ดพันธุ์พริกในสารละลายไคโตซานเข้มข้น 100 ppm สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์พริกได้สูงสุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเท่ากับ 70.7% ในสัปดาห์ที่หนึ่ง และเพิ่มขึ้นเป็น 91.6% ในสัปดาห์ที่สองหลังเพาะเมล็ด

น้ำหมักชีวภาพเป็นสารชีวภาพที่มีธาตุอาหารพวกไนโตรเจนและโพแทสเซียมอยู่สูง (กรมพัฒนาที่ดิน, 2545) โดยน้ำหมักชีวภาพจากปลาจะมีปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และแคลเซียมมากกว่าน้ำหมักชีวภาพชนิดอื่น ๆ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2550) ส่วนน้ำหมักชีวภาพจากพืช เช่น จากผักและผลไม้ จะมีฮอร์โมนพืชในปริมาณสูง (กรมพัฒนาที่ดิน, 2550) โดยสารในน้ำหมักชีวภาพจะมีความเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของกรดอะมิโน โปรตีน คลอโรฟิลล์ กรดนิวคลีอิก และเอนไซม์ในพืช ช่วยส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตของยอดอ่อน ใบ กิ่งก้าน และให้ผลผลิตสูงขึ้น (ยงยุทธ โอสถสภา และคณะ, 2541) มีงานวิจัยการนำน้ำหมักชีวภาพมาใช้ในการส่งเสริมการงอกของเมล็ด ดังเช่น ศรันยา คุ้มปลี และสุรพงษ์ ดำรงกิตติกุล (2555) ได้ศึกษาผลของการใช้น้ำหมักชีวภาพผลไม้แช่เมล็ดพันธุ์ต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์พริกพันธุ์จินดาดำ พบว่าการใช้น้ำหมักชีวภาพผลไม้ต่อน้ำอัตราส่วน 1:750 ทำให้เมล็ดพันธุ์พริกจินดาดำมีความงอกและดัชนีการงอกสูงที่สุด (84.2 และ 7.86% ตามลำดับ) และ ปิยะรัตน์ วิจักขณ์สังสิทธิ์ และคณะ (2559) รายงานว่า การใช้น้ำหมักปลาและน้ำหมักผลไม้ต่อน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1,000 แช่เมล็ดถั่วเขียวส่งผลให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดสูงที่สุด

ในการทำการเกษตร ณ ปัจจุบันเป็นการทำเพื่อสุขภาพของผู้ผลิตและผู้บริโภคที่ดี โดยการลดการใช้สารเคมี และได้มีการศึกษาวิธีการและผลของการนำสารชีวภาพมาใช้แทนปุ๋ยเคมีและสารเคมี ซึ่งการวิจัยในครั้งนี้ก็คำนึงถึงความสำคัญดังกล่าว ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาถึงผลของสารไคโตซานและน้ำหมักชีวภาพต่อความงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดพันธุ์พริกขี้หนูสวน โดยวิธีการทำ seed priming ซึ่งคาดว่าผลที่ได้จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการนำสารชีวภาพที่หาได้ง่าย ปลอดภัย และสามารถทำได้เองในท้องถิ่นมาใช้ในการทำ seed priming เพื่อพัฒนาการผลิตกล้าพันธุ์พริกที่มีคุณภาพต่อไป

วิธีการศึกษา

การวิจัยในครั้งนี้ได้นำเมล็ดพริกขี้หนูสวน พันธุ์ผสมเปิด เบอร์ 1 จากร้านภูผาเมล็ดพันธุ์ มาทำการศึกษาผลการเตรียมพร้อมเมล็ด โดยได้แบ่งงานวิจัยออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่ การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของระยะเวลาการดูดน้ำของเมล็ดพริกขี้หนูสวนที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมพร้อมเมล็ดพันธุ์หรือการทำ seed priming สำหรับการนำไปใช้ต่อในการทดลองที่ 2 ที่ทำการศึกษาผลของการทำ seed priming ด้วยสารละลายไคโตซานและน้ำหมักชีวภาพต่อการงอกและการเจริญของต้นกล้าพริกขี้หนูสวน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาระยะเวลาในการดูดน้ำของเมล็ดสำหรับการทำ seed priming เมล็ดพันธุ์พริกขี้หนูสวน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มี 7 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด โดยสิ่งที่ศึกษาคือ ระยะเวลาการแช่เมล็ดในน้ำ RO เป็นเวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C ทำบันทึกการดูดน้ำของเมล็ดหลังการแช่แต่ละระยะเวลา จากนั้นนำเมล็ดมาลดความชื้นโดยเก็บไว้ในโถดูดความชื้นด้วยซิลิก้าเจลจนกระทั่งความชื้นเมล็ดลดลงเท่ากับค่าความชื้นเริ่มต้น (4.09%) หลังจากนั้นนำเมล็ดมาทำการทดสอบความงอกในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการเพาะบนกระดาษชื้น (top of paper) จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด ที่อุณหภูมิ 25°C ประเมินความงอกทุกวันจนกระทั่ง 14 วัน นำข้อมูลที่บันทึกได้มาคำนวณหาค่าการดูดน้ำของเมล็ด (พิจิตรา แก้วสอน และคณะ, 2557) ค่าเปอร์เซ็นต์การงอก (seed germination) เวลาเฉลี่ยในการงอก (mean germination time) และความเร็วในการงอก (speed of germination) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

สูตรคำนวณการดูดน้ำของเมล็ด; $W\ (\%) = \frac{(W_i - W_0)}{W_0} \times 100$

โดย W = ปริมาณน้ำที่เมล็ดดูดเข้าไปหลังจาก i ชั่วโมง (%)

W_i = น้ำหนักเมล็ดหลังจากดูดน้ำ i ชั่วโมง (กรัม)

W_0 = น้ำหนักเริ่มแรกของเมล็ดก่อนดูดน้ำ (กรัม)

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของการทำ seed priming ด้วยสารไคโตซานและน้ำหมักชีวภาพต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์พริกขี้หนูสวน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มี 8 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด สิ่งทดลองประกอบไปด้วย (T1) เมล็ดไม่ผ่านการทำ seed priming (control); (T2) แช่เมล็ดในน้ำ RO; (T3-T5) แช่เมล็ดในสารละลายไคโตซาน ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 200 mg/l และ (T6-T8) แช่เมล็ดในน้ำหมักชีวภาพจากพืชทางการค้าที่ผลิตโดยโครงการหลวง ในอัตราส่วนน้ำหมักชีวภาพ : น้ำ RO ที่ 1:500, 1:750 และ 1:1000 (v/v) ตามลำดับ ใช้ระยะเวลาการแช่เมล็ดพันธุ์นาน 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 หลังจากครบกำหนดการแช่เมล็ดแล้ว นำเมล็ดมาล้างด้วยน้ำสะอาด และซับให้แห้งก่อนนำเมล็ดไปลดความชื้นให้เท่ากับความชื้นเริ่มต้น โดยเก็บไว้ในโถดูดความชื้นด้วยซิลิก้าเจล จากนั้นนำเมล็ดมาทดสอบความงอกในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการเพาะบนกระดาษชื้น (top of paper) จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด ที่อุณหภูมิ 25°C และทดสอบความงอกในสภาพโรงเรือนโดยใช้พีทมอสเป็นวัสดุเพาะ โดยการหยอดเมล็ดในถาดเพาะขนาด 200 หลุม ประเมินความงอกทุกวันจนกระทั่ง 14 วัน ทำการบันทึกข้อมูล ความยาวยอด ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งต้นกล้า ที่ 14 วันหลังเพาะ ทั้งในห้องปฏิบัติการและสภาพโรงเรือน นำข้อมูลที่บันทึกได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การงอก (seed germination) เวลาเฉลี่ยในการงอก (mean germination time, MGT) และความเร็วในการงอก (speed of germination) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากผลของการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์พริกขี้หนูสวนที่ผ่านการแช่เมล็ดในน้ำ RO เป็นระยะเวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง พบว่าในช่วง 4 ชั่วโมงแรก เมล็ดจะมีการดูดน้ำอย่างรวดเร็วทำให้ปริมาณน้ำภายในเมล็ดเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด หลังจากนั้นเมล็ดจะดูดน้ำช้าลงและเริ่มคงที่หลังแช่เมล็ดในน้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการดูดน้ำที่เข้าสู่ระยะที่ 2 และเป็นระยะการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในเมล็ดพันธุ์ มีการสังเคราะห์ nucleic acid และเอนไซม์ต่าง ๆ มีการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่เป็นสารโมเลกุลเล็กและเคลื่อนย้ายสารไปยังจุดเจริญของต้นอ่อนสำหรับเตรียมการงอกและการเติบโต (วันชัย จันทร์ประเสริฐ, 2537) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้เมล็ดพริกขี้หนูสวนมีการดูดน้ำคงที่และเหมาะสมต่อการเกิดกระบวนการงอกสูงสุดที่ 95% (Table 1) เมื่อเมล็ดดูดน้ำเข้าไปในเมล็ดเท่ากับ 37.48% (Figure 1)

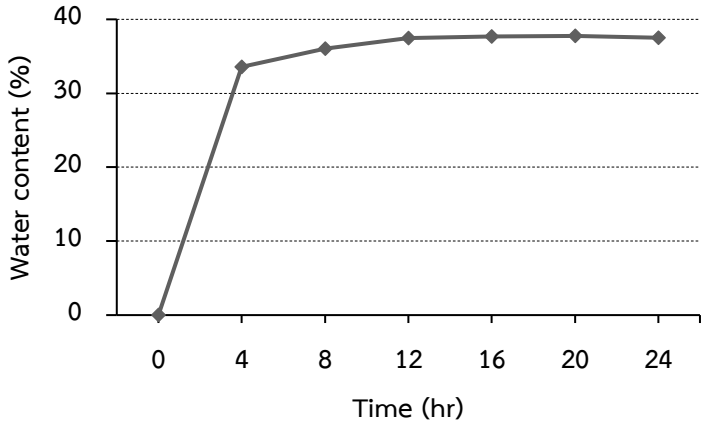

Figure 1 Effect of soaked duration on water imbibition of bird chili pepper seed.

เมื่อนำเมล็ดพริกที่ผ่านการทำ seed priming มาทดสอบความงอก พบว่า การแช่เมล็ดในน้ำระยะเวลาที่ต่างกันสามารถกระตุ้นให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกและเวลาเฉลี่ยในการงอกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการแช่เมล็ดในน้ำ 12 ชั่วโมง ส่งผลให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด 95% และมีเวลาเฉลี่ยในการงอกเร็วที่สุด 11.05 วัน ซึ่งผลเปอร์เซ็นต์การงอกที่ได้มีความแตกต่างทางสถิติกับเมล็ดที่ไม่ได้ผ่านการแช่เมล็ด (ชุดควบคุม) และเมล็ดที่ผ่านการแช่เมล็ดที่ 4, 20 และ 24 ชั่วโมง แต่ผลของความเร็วในการงอกของเมล็ดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกกรรมวิธี (Table 1)

Table 1 Effects of soaked duration on seed germination, mean germination time and speed of germination of bird chili pepper seed.

Soaked duration	Seed germination (%)	Mean germination time (days)	Speed of germination (plants/day)
0 h (control)	88[b]	11.12[bc]	4.16
4 h	91[b]	11.51[ab]	4.14
8 h	92[ab]	11.58[a]	4.18
12 h	95[a]	11.05[c]	4.53
16 h	91[ab]	11.59[a]	4.11
20 h	91[b]	11.24[abc]	4.25
24 h	90[b]	11.35[abc]	4.17
F-test	*	*	ns
CV (%)	3.04	2.30	4.91

ns, *: not significantly different, significantly different at P<0.05, respectively.
Means within the same column followed by the same letter are not significantly different by DMRT at P<0.05.

จากผลการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์พริกขี้หนูสวนในครั้งนี้มีการดูดน้ำคงที่และเพียงพอต่อการเกิดกระบวนการงอกของเมล็ดหลังการแช่เมล็ดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และปริมาณน้ำที่เมล็ดดูดเข้าไปภายในเมล็ดเท่ากับ 37.48% โดยเป็นการดูดน้ำในระยะที่ 2 ซึ่งระยะนี้เมล็ดจะมีการสร้างเอนไซม์และมีกิจกรรมต่าง ๆ เกิดขึ้น เช่น กระบวนการเมแทบอลิซึม มีการย่อยสารอาหารทั้งคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และสารอื่น ๆ ที่สะสมในเมล็ดให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ และจะถูกย้ายไปยังจุดเจริญเพื่อใช้ในการแบ่งเซลล์และขยายขนาดของเซลล์ภายในต้นอ่อน ดังนั้นเมื่อเมล็ดถูกกระตุ้นให้พร้อมที่จะงอกก่อนแล้วจึงทำให้เมล็ดงอกได้เร็วขึ้นหลังการนำไปเพาะ และเมล็ดจะมีความงอกที่สูงด้วย เนื่องจากช่วงเวลาการในการดูดน้ำเพื่อเข้าสู่ระยะที่ 3 สำหรับการเจริญของต้นอ่อนจะสั้นลง ทำให้เมล็ดงอกเร็ว ซึ่งเป็นการลดความเสี่ยงจากผลกระทบของสภาพแวดล้อมและการถูกทำลายโดยจุลินทรีย์ภายในดินระหว่างการงอกของเมล็ด

การแช่เมล็ดที่เหมาะสมสำหรับการงอกของเมล็ดในแต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์ จะใช้ระยะเวลาที่ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับขนาด ความหนาบางของเปลือกหุ้มเมล็ด ที่มีผลต่อความสามารถในการดูดซึมน้ำของเปลือกหุ้มเมล็ด หรือถึงแม้จะเป็นพันธุ์เดียวกันแต่อายุของเมล็ดพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวต่างกันก็มีผลต่ออัตราการดูดน้ำที่แตกต่างกันด้วยเช่นกัน (จวงจันทร์ ดวงพัตรา, 2529; วันชัย จันทร์ประเสริฐ, 2553) นอกจากนี้ยังขึ้นกับองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ด และการจัดการที่แตกต่างกันในระหว่างการเตรียมพร้อมเมล็ด ดังเช่น ผลการวิจัยครั้งนี้ต่างจากการศึกษาของ กุลธิดา โชทนากูล และคณะ (2558) ที่รายงานว่าเมล็ดพริกพันธุ์บางช้างและพริกขี้หนูพันธุ์สามเดือนจะใช้ระยะเวลา 8 ชั่วโมงในการแช่เมล็ดร่วมกับการให้อากาศเพียงพอต่อการงอกของเมล็ด ในขณะที่งานวิจัยของ วิลาสินี รามนัฏ (2547) ได้รายงานว่า เมล็ดพริกพันธุ์บางช้างดูดน้ำได้อย่างเพียงพอต่อการงอกใช้ระยะเวลาเพียง 5 ชั่วโมง เมื่อแช่เมล็ดในน้ำที่อุณหภูมิ 30°C ร่วมกับการให้อากาศเป็นเวลา 30 นาทีต่อชั่วโมง จากนั้นทำการบ่มเป็นระยะเวลา 2 วัน ก่อนลดความชื้น ทำให้เมล็ดงอกรากเร็วและมีดัชนีการงอกที่สูง ซึ่งจากการวิจัยดังกล่าวนี้ได้มีการจัดการปัจจัยระหว่างการแช่เมล็ดด้วยการให้อากาศทำให้เมล็ดดูดน้ำได้มากกว่าการไม่ให้อากาศ และการให้อุณหภูมิในระหว่างการแช่ต่างกันก็จะมีผลต่อการดูดน้ำช้าเร็วต่างกัน โดยการแช่ในน้ำที่อุณหภูมิสูงเมล็ดจะดูดน้ำได้เร็วและทำให้ใช้ระยะเวลาในการแช่สั้นกว่าการใช้อุณหภูมิต่ำกว่าในระหว่างการแช่เมล็ด นอกจากนี้การบ่มเมล็ดหลังการแช่เมล็ดยังช่วยทำให้กระบวนการสังเคราะห์สารต่าง ๆ เกิดสมบูรณ์มากขึ้น จึงทำให้การงอกเกิดขึ้นได้เร็ว ซึ่งการจัดการดังกล่าวเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดเช่นกัน ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้จะใช้เวลาการดูดน้ำของเมล็ดที่ 12 ชั่วโมง ซึ่งนานกว่าของทั้งกุลธิดา โชทนากูล และคณะ (2558) และวิลาสินี รามนัฏ (2557) เนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์ การจัดการระหว่างการแช่และหลังแช่เมล็ดต่างกัน ในกรณีการแช่เมล็ดที่นานเกิน 12 ชั่วโมง มีผลต่อการงอกที่ลดลงของการวิจัยในครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการแช่เมล็ดที่นานเกินไปมีผลต่อการได้รับออกซิเจนของเมล็ดลดลง และเกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อกิจกรรมในกระบวนการงอกของเมล็ดทำให้มีผลกระทบต่อการงอกที่ลดลง (กุลธิดา โชทนากูล และคณะ, 2558)

จากการศึกษาผลของการทำ seed priming ด้วยสารไคโตซานและน้ำหมักชีวภาพต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์พริกขี้หนูสวน พบว่า การทำ seed priming ด้วยสารไคโตซานไม่มีผลทำให้เกิดความแตกต่างกันทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การงอก เวลาเฉลี่ย

ในการงอก และความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์ในสภาพห้องปฏิบัติการ แต่เมื่อทดสอบในสภาพโรงเรือน พบว่า การทำ seed priming ด้วยไคโตซานเข้มข้น 50 mg/l มีผลต่อการใช้เวลาเฉลี่ยในการงอกน้อยที่สุด (8.2 วัน) และผลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่ได้ผ่านการทำ seed priming แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการทำ seed priming ด้วยสารไคโตซานเข้มข้น 100 mg/l และ น้ำหมักชีวภาพในอัตราส่วนน้ำหมักชีวภาพ : น้ำ RO ที่ 1:500 ซึ่งมีความเร็วในการงอก 8.7 วัน นอกจากนี้การทำ seed priming ด้วยไคโตซานเข้มข้น 50 mg/l ยังมีผลต่อความเร็วในการงอกสูงที่สุด (5.2 ต้น/วัน) และผลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่ได้ผ่านการทำ seed priming แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการทำ seed priming ด้วยน้ำ RO และสารไคโตซานเข้มข้น 100 mg/l เมื่อทำการทดสอบความงอกเมล็ดในสภาพโรงเรือน ส่วนการใช้น้ำหมักชีวภาพในการทำ seed priming ทุกระดับความเข้มข้นให้ผลที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในด้านเปอร์เซ็นต์การงอก ค่าเฉลี่ยในการงอก และความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์ ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและในสภาพโรงเรือนเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่ได้ทำ seed priming (Table 2)

Table 2 Effects of seed priming with chitosan and bio-extract on seed germination, mean germination time and speed of germination of bird chili pepper seed.

Treatments	Seed germination (%)		Mean germination time (days)		Speed of germination (plants/day)	
	Lab	Green house	Lab	Green house	Lab	Green house
Non-primed seed (control)	85	68	9.0	9.1^{bc}	4.9	3.9^{d}
Soaked in RO	86	80	9.1	8.9^{bc}	4.9	4.8^{ab}
Soaked in chitosan 50 mg/l	89	83	9.5	8.2^{d}	4.9	5.2^{a}
Soaked in chitosan 100 mg/l	86	77	9.1	8.7^{dc}	4.8	4.6^{abc}
Soaked in chitosan 200 mg/l	90	71	9.5	9.7^{a}	4.9	3.9^{d}
Soaked in Bio-extract 1:500	92	75	9.2	8.7^{dc}	5.1	4.4^{bcd}
Soaked in Bio-extract 1:750	92	69	9.6	9.0^{abc}	4.9	3.9^{cd}
Soaked in Bio-extract 1:1000	90	73	9.5	9.5^{ab}	4.9	4.0^{cd}
F-test	ns	ns	ns	**	ns	**
CV (%)	5.14	9.21	2.76	4.9	5.75	9.94

ns, **: not significantly different, significantly different at P<0.01, respectively.
Means within the same column followed by the same letter are not significantly different by DMRT at P<0.05.

จากผลการทำ seed priming ด้วยสารไคโตซานและน้ำหมักชีวภาพต่อความยาวต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นกล้าที่อายุ 14 วัน ในห้องปฏิบัติการพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่การทำ seed priming ด้วยสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 50-100 mg/l และในน้ำหมักชีวภาพ : น้ำ RO อัตราส่วน 1:500 (v/v) มีผลส่งเสริมให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงขึ้นในต้นกล้าที่อายุ 14 วัน และผลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ได้ทำ seed priming เมื่อทำการเพาะในสภาพโรงเรือน (Table 3)

จากผลการทำ seed priming ด้วยสารไคโตซานความเข้มข้น 50-100 mg/l ในครั้งนี้ช่วยส่งเสริมให้เมล็ดพันธุ์พริกขี้หนูสวนมีความเร็วในการงอกที่สูงและมีการเจริญของต้นกล้าที่ดีกว่าเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ได้ทำ seed priming ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Ya-jing et al. (2009) ที่รายงานว่า การกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดด้วยสารไคโตซานที่มีความเข้มข้น 0.25, 0.50 และ 0.75% (w/v) ทำให้เมล็ดพันธุ์มีความเร็วในการงอก ความยาวต้น ความยาวราก น้ำหนักแห้งต้น และรากเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับชุดควบคุม และการศึกษาของ วรรณิศา ปัทมะภูษิต และพรไพรินทร์ รุ่งเจริญทอง (2559) ที่รายงานว่า การฉีดพ่นสารไคโตซานเข้มข้น 1.2% ปริมาตร 5-20 ml/l ทุกสัปดาห์หลังย้ายปลูกสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตในพริกขี้หนูได้ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารไคโตซานมีผลต่อการงอกและการเจริญของต้นพืช นั้นอาจเนื่องมาจากผลของธาตุไนโตรเจนที่มีอยู่ในสารไคโตซาน (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544) โดยไนโตรเจนจะช่วยกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโต โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น ใบ และช่วยให้พืชตั้งตัวได้เร็วในระยะแรก

ของการเจริญเติบโต ทำให้พืชมีใบสีเขียว ซึ่งรายงานของ วีณารัตน์ มูลรัตน์ (2553) กล่าวว่าการให้ไคโตซานแก่พริกขี้หนูมีผลต่อปริมาณกรดซาลิไซลิกและคลอโรฟิลล์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งทั้งนี้คาดว่าผลดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงและการสร้างอาหารของต้นกล้าจากการสังเคราะห์แสง ทำให้เกิดการสะสมอาหารของต้นกล้าเพิ่มขึ้นเมื่อพืชอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ ดังเช่นเมื่อเพาะเมล็ดในสภาพโรงเรือนที่ต้นกล้าได้ธาตุอาหารจากวัสดุปลูกและได้แสงที่เพียงพอต่อการเจริญ จึงมีผลทำให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้าเพิ่มสูงขึ้น เมื่อนำเมล็ดที่ผ่านการทำ seed priming ด้วยสารไคโตซานความเข้มข้น 50-100 mg/l มาเพาะในสภาพโรงเรือน นอกจากนี้การทำ seed priming ด้วยน้ำหมักชีวภาพ : น้ำ RO อัตราส่วน 1:500 (v/v) ยังมีผลส่งเสริมให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงขึ้นในต้นกล้าได้เช่นกัน ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ วีณารัตน์ มูลรัตน์ (2553) ที่รายงานถึงประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพจากเศษปลาต่อการเจริญเติบโตของผักโขม ซึ่งผลที่ได้พบว่าน้ำหมักชีวภาพเศษปลาที่ระดับความเข้มข้น 1:500 ส่งผลทำให้ปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้ามากที่สุด ซึ่งจากการรายงานของกรมพัฒนาที่ดิน (2545) กล่าวว่าน้ำหมักชีวภาพเป็นสารชีวภาพที่มีธาตุอาหารพวกไนโตรเจนและโพแทสเซียมอยู่สูง แต่ปริมาณจะต่างกันไปขึ้นกับสิ่งที่นำมาทำน้ำหมัก ดังเช่น น้ำหมักชีวภาพจากปลาจะมีปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และแคลเซียมมากกว่าน้ำหมักชีวภาพชนิดอื่น ๆ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2550) ส่วนน้ำหมักชีวภาพจากพืช เช่น จากผักและผลไม้ จะมีฮอร์โมนพืชในปริมาณสูง (กรมพัฒนาที่ดิน, 2550) สารในน้ำหมักชีวภาพเหล่านี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของกรดอะมิโน โปรตีน คลอโรฟิลล์ กรดนิวคลีอิก และเอนไซม์ในพืช ช่วยส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตของยอดอ่อน ใบ กิ่งก้าน และให้ผลผลิตสูงขึ้น (ยงยุทธ โอสถสภา และคณะ, 2541)

Table 3 Effects of seed priming with chitosan and bio-extract on shoot length, root length, fresh weight, and dry weight of bird chili pepper seedling.

Treatments	Shoot length (cm)		Root length (cm)		Fresh weight (mg/plant)		Dry weight (mg/plant)	
	Lab	Green house	Lab	Green house	Lab	Green house	Lab	Green house
Non-primed seed (control)	1.0	2.1	3.1	4.1	9.58	62.42^{b}	0.78	5.08^{bc}
Soaked in RO	0.8	2.3	3.0	4.3	9.65	71.00^{a}	0.80	5.70^{ab}
Soaked in chitosan 50 mg/l	0.9	2.3	3.0	4.8	10.30	76.83^{a}	0.80	6.28^{a}
Soaked in chitosan 100 mg/l	1.0	2.1	3.3	4.7	10.70	72.10^{a}	0.80	6.43^{a}
Soaked in chitosan 200 mg/l	0.9	2.2	3.2	4.5	11.23	74.78^{a}	0.80	5.68^{ab}
Soaked in Bio-extract 1:500	0.9	2.1	3.1	4.3	10.80	72.10^{a}	0.80	5.95^{a}
Soaked in Bio-extract 1:750	0.9	2.0	3.0	4.0	10.18	61.60^{b}	0.80	4.78^{c}
Soaked in Bio-extract 1:1000	0.9	2.2	3.0	4.3	10.68	62.95^{b}	0.78	5.03^{bc}
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	**
CV (%)	9.75	3.83	5.54	6.9	7.93	7.45	8.72	8.77

ns, **: not significantly different, significantly different at P<0.01, respectively.

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different by DMRT at P<0.05.

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาผลของการทำ seed priming ด้วยสารไคโตซานและน้ำหมักชีวภาพต่อการงอกและการเจริญของต้นกล้าพริกขี้หนูสวน ในครั้งนี้พบว่าการทำ seed priming ด้วยไคโตซานเข้มข้น 50 mg/l ส่งเสริมทำให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอก เวลาเฉลี่ยในการงอก และความเร็วในการงอกดีที่สุด และการทำ seed priming ด้วยไคโตซาน 50-100 mg/l และน้ำหมักชีวภาพอัตราส่วน 1:500 ส่งผลให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้าเพิ่มขึ้นเมื่อนำเมล็ดที่ผ่านการทำ seed priming ด้วยวิธีดังกล่าวมาเพาะในสภาพโรงเรือน ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการทำ seed priming ด้วยไคโตซานเข้มข้น 50 mg/l มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการเตรียมพร้อมเมล็ดพันธุ์พริกขี้หนูสวน ก่อนนำไปเพาะในสภาพโรงเรือน เนื่องจากมีผลส่งเสริมทั้งต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าที่ดี

เอกสารอ้างอิง

กุลธิดา โชทนากูล, พิจิตรา แก้วสอน, ปริยานุช จุลกะ และวันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2558. ผลของการเตรียมพร้อมเมล็ดด้วยวิธี Hydropriming ต่อคุณภาพของเมล็ดพริก 2 พันธุ์. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 46(3): 617-620.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2545. คู่มือการผลิตและประโยชน์ของปุ๋ยอินทรีย์น้ำ. ใน *เอกสารวิชาการกรมพัฒนาที่ดินกระทรวงเกษตรและสหกรณ์*. กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2550. มีอะไรในปุ๋ยอินทรีย์น้ำ. ใน *เอกสารเพื่อการถ่ายทอดเทคโนโลยี ชุดความรู้และเทคโนโลยีการพัฒนาที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์*. กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. *เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืชไร่*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: กลุ่มหนังสือเกษตร.

ชณิตรา โพธิคเวษฐ์, ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย, อภิรดี อุทัยรัตนกิจ และภาณุมาศ ฤทธิไชย. 2553. ผลของการทำ priming ต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์แตงกวา. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 41(3/1): 405-408.

เดือนเต็ม ลอยมา, ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย, ภาณุมาศ ฤทธิไชย และศิริชัย กัลยณารัตน์. 2552. ผลของ Sorbitol และ Chitosan ต่อการคายการพักตัวของเมล็ดพันธุ์ฟักแฟง. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 40(1): 297-300.

นภาพร เวชกามา และพีระยศ แข็งขัน. 2561. การปรับปรุงคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ด้วยเทคนิค seed priming. *วารสารเกษตรพระวรุณ* 5(1): 17-30.

ปิยะรัตน์ วิจักขณ์สังสิทธิ์, อเนก สุขเจริญ, จันทร์จรัส วีรสาร, ลักขณา เบ็ญจวรรรณ์ และรัตนะ บุลประเสริฐ. 2559. ผลของระยะเวลาหมักน้ำหมักต่อการเจริญเติบโตของต้นพริก. *วารสารแก่นเกษตร* 44(1): 866-872.

บุญมี ศิริ. 2558. *การปรับปรุงสภาพและยกระดับคุณภาพเมล็ดพันธุ์*. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น: คลังนานาวิทยา.

พิจิตรา แก้วสอน, ปาริฉัตร บุญยืน และปริยานุช จุลกะ. 2557. การศึกษาเบื้องต้นของลักษณะทางกายภาพและการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์วงศ์แตงบางชนิด. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 45(2): 549-552.

พิจิตรา แก้วสอน, กุลธิดา โชทนากูล, ปริยานุช จุลกะ และวันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2560. ผลของการเตรียมพร้อมเมล็ดพันธุ์ต่อความงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าพริก. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 48(1): 70-79.

พีรพงษ์ แสงวนางค์กูล, นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง, อุดม ฟ้ารุ่งสาง, เจริญ ขุนพรม, สมนึก ทองบ่อ, ยุพิน อ่อนศิริ และชูศักดิ์ คุณุไทย. 2552. ผลของการใช้ไคโตซานต่อคุณภาพและการควบคุมโรคหลังเก็บเกี่ยวของพริก. ใน *รายงานฉบับสมบูรณ์ สนับสนุนโดยศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พจนา สีขาว, ชินานาตย์ ไกรนารถ และบุญมี ศิริ. 2551. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพเมล็ดพันธุ์พริกหวานหลังการกระตุ้นความงอกด้วยวิธี seed priming. *แก่นเกษตร* 36: 295-304.

ยงยุทธ โอสถสภา, ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, อรรถศิษฐ์ วงศ์มณีโรจน์ และชัยสิทธิ์ ทองจู. 2541. *ปฐพีวิทยาเบื้องต้น*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เยาวพา สุวัติถิ. 2555. ไคโตซานกับการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์. *วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม* 19(4): 4-5.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2537. *สรีรวิทยาเมล็ดพันธุ์*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2553. *สรีรวิทยาเมล็ดพันธุ์*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรรณิศา ปัทมะภูษิต และพรไพรินทร์ รุ่งเจริญทอง. 2559. ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต และปริมาณกรดซาลิไซลิกในพริกขี้หนู. *วารสารแก่นเกษตร* 44(1): 141-146.

วิลาสินี รามนัฏ. 2547. การกระตุ้นการงอกเมล็ดพันธุ์พริกโดยวิธี hydropriming. *วิทยานิพนธ์ปริญญาโท*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วีณารัตน์ มูลรัตน์. 2553. ประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพจากเศษปลาที่ใช้น้ำกากส่าเหล้าทดแทนกากน้ำตาล ต่อการเจริญเติบโตของผักโขม (*Amaranthus tricolor*) ผักกวางตุ้งฮ่องเต้ (*Brassica Campertris var.* chinensis) และผักบุ้งจีน (*Ipomoea aquatica var.* reptans). *วิทยานิพนธ์ปริญญาโท*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ศรันยา คุ้มปลี และสุรพงษ์ ดำรงกิตติกุล. 2555. ผลของการใช้น้ำหมักชีวภาพผลไม้ต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์พริก. ใน *การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9*. น. 2339-2346. นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

สุวลี จันทร์กระจ่าง. 2544. การประยุกต์ใช้ไคติน-ไคโตซาน. ใน *เอกสารประกอบการบรรยาย การประชุม เชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้*. น. 52-58. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Bradford, K. J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *Horticultural Science* 21: 1105-1112.

Copeland, L. O., and McDonald, M. B. 1995. *Seed Science and Technology*. New York: Chapman and Hill.

McDonald, M. B. 2000. Seed priming. In *Seed Technology and Its Biology Basis*, M. Black, and J. D. Bewley, eds. pp. 287-326. Sheffield, England: Sheffield Acad. Press.

Reddy, M. V. B., Arul, J., Angers, P., and Couture, L. 1999, Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1208-1212.

Saleh, M. M., Abou-hadid, A. F., and El-Beltag, A. S. 1996. Sweet pepper emergence and seedling growth after seed pre-germination. *ISHS Acta horticulturae* 434: 335-340.

Ya-jing, G., Jin, H., Xian-ju, W., and Chen-xia, S. 2009. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal of Zheijang University Science B* 10: 427-433.

วันรับบทความ (Received date) : 31 ต.ค. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 30 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

ผลของปริมาณฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระของต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of Phosphorus Concentration on Growth and Antioxidant Properties in *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Growing in *In Vitro* Cultures

ศศิธร พินภิรมย์[1] นงนุช เลาหะวิสุทธิ์[1*] และอัจฉรี เรืองเดช[1]
Sasithorn Pinpirom[1], Nongnuch Laohavisuti[1*] and Uscharee Ruangdej[1]

บทคัดย่อ

พรรณไม้น้ำพรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) เป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีสรรพคุณทางยาช่วยป้องกันโรคอัลไซเมอร์ จากการศึกษาผลของอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่มีความเข้มข้นของปริมาณฟอสฟอรัส (P) แตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ ¼ P, ½ P, P และ 2 P ต่อการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ความสูงของเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร ¼ P มีความสูงมากที่สุด ($P<0.05$) คือ 39.39 มิลลิเมตร ผลของจำนวนใบ และจำนวนข้อพบว่า สูตรอาหาร P มีค่ามากที่สุด ($P<0.05$) คือ 16.05 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ และ 7.50 ข้อ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ ผลของจำนวนรากไม่พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร ($P>0.05$) โดยมีจำนวนราก 4.10-4.60 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ และผลของจำนวนยอดไม่พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร ($P>0.05$) โดยมีจำนวนยอด 1.63-1.88 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ผลจากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งและสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อพรมมิ แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร 2 P ส่งผลให้มีปริมาณของ TPC และ TFC มากที่สุด (8.48 µg gallic/g, 16.44 mg luteolin/g ตามลำดับ) และพบว่าในสูตรอาหาร ½ P พบปริมาณ saponin สูงที่สุด เท่ากับ 4,921 mg saponin/g ส่วนสูตรอาหารที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มากที่สุด คือ สูตรอาหาร ½ P มีค่าเท่ากับ 79.66% และพบว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร ($P>0.05$)

คำสำคัญ: พรมมิ ฟอสฟอรัส สารต้านอนุมูลอิสระ สภาพปลอดเชื้อ การเจริญเติบโต

Abstract

Bacopa monnieri (L.) Wettst. is known as a medical plant that can be used to improve human memory. Furthermore, its plant tissues contain a range of compounds that display antioxidant activities. In this study, the growth and antioxidant activity of explants of *B. monnieri* (L.) Wettst. cultivated in Murashige and Skoog (MS) medium with different phosphorus concentrations, ¼ P, ½ P, P and 2 P, were investigated. Explants on the ¼ P treatment demonstrated the maximum plant height, which was 39.39 mm. The highest number of leaves and nodes were found on the explants grown in the control treatment (P), and these were 16.05 leaves/explant and 7.50 nodes/explant. Furthermore, there were no significant differences in the number of roots and shoots among the treatments ($P>0.05$), which ranged over the values of 4.10-4.60 roots/explant and 1.63-1.88 shoots/explant respectively. As for the antioxidant activity, the double P treatment (2 P) produced the highest concentrations of TPC and TFC, expressed as 8.48 µg gallic/g and 16.44 mg luteolin/g, respectively. Compared to other treatments, the half P treatment (½ P) was observed to have produced explants with the highest saponin concentration (4,921 mg saponin/g) and the highest content of antioxidant activity as measured by ABTS assay, which was 79.66%. Finally, the said treatments did not produce any statistically significant differences in the DPPH assay results ($P>0.05$).

Keywords: *Bacopa monnieri* (L.) Wettst., phosphorus, antioxidant, *in vitro*, growth

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: nongnuch.la@kmitl.ac.th

คำนำ

พรรณไม้น้ำพรมมิ (Brahmi) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. อยู่ในวงศ์ Plantaginaceae (Sosa et al., 2018) จัดเป็นสมุนไพรพื้นบ้านและยาอายุวัฒนะที่มีต้นกำเนิดมาจากประเทศเนปาลและอินเดียโดยสามารถพบได้ทั่วประเทศไทย ต้นพรมมิเป็นพืชล้มลุกขนาดเล็ก ลำต้นอวบน้ำ ไม่มีขน มีใบเป็นใบเลี้ยงเดี่ยวออกตรงกันข้าม ใบเป็นรูปไข่ค่อนข้างยาว ปลายใบกว้าง กลมและมน ส่วนของโคนใบแคบ มีขอบใบเรียบสีเขียวสด ดอกมีสีขาวหรือสีม่วงอ่อน สามารถเติบโตในพื้นที่ชื้นแฉะชุ่มน้ำ และสามารถเติบโตได้ในดินหรือทรายที่อยู่บริเวณใกล้แหล่งน้ำ (ชาญชัย สาดแสงจันทร์, 2556; Jain et al., 2017) ต้นพรมมิมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่มาจากสารประกอบของสารพฤกษเคมี (phytochemical) หลายกลุ่ม เช่น อัลคาลอยด์ (alkaloid) ไกลโคไซด์ (glycoside) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และซาโปนิน (saponin) (Mathew et al., 2010) ซึ่งสารสกัดที่ได้จากต้นพรมมิมีสรรพคุณทางยาช่วยป้องกันโรคอัลไซเมอร์หรือโรคความจำเสื่อม (Chaudhari et al., 2017) อีกทั้งสารสกัดที่ได้จากต้นพรมมิยังสามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อีกด้วย (Ghosh et al., 2008) โดยสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิจะไปช่วยทำให้ปริมาณของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) คะตะเลส (catalase) และกลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ในสมองมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเพื่อไปยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (Bhattacharya et al., 2000)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ คือการนำเอาเซลล์ เนื้อเยื่อ หรือส่วนต่าง ๆ ของพืชมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อมและสารอาหาร โดยเป็นเทคนิคที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อการเพิ่มจำนวนของพืชในปริมาณมาก ๆ รวมทั้งยังสามารถกำจัดโรคในพืช และยังสามารถเพิ่มผลผลิตของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิได้อีกด้วย อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องประกอบไปด้วยธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน กรดอะมิโน แหล่งคาร์บอน แหล่งออร์แกนิก สารควบคุมการเจริญเติบโต และสารที่ทำให้อาหารแข็งตัว ซึ่งอาหารที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ อาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) เนื่องจากเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ได้กับพืชหลายชนิด (Hussain et al., 2012; Saad and Elshahed, 2012)

ธาตุอาหารนับเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำ เช่น ธาตุไนโตรเจน (nitrogen) ธาตุฟอสฟอรัส (phosphorus) และธาตุโพแทสเซียม (potassium) (ดิเรก ทองอร่าม, 2546) โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุฟอสฟอรัสซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการถ่ายเทพลังงานที่เป็นกระบวนการทางสรีรวิทยาที่สำคัญที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของพืช และยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารประกอบฟอสเฟตหรืออะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate - ATP) สำหรับใช้ในการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของพืช นอกจากนี้ธาตุฟอสฟอรัสยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) และฟอสโฟลิพิด (phospholipids) มีงานวิจัยพบว่าฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช ช่วยทำให้การแบ่งเซลล์และการพัฒนาของส่วนประกอบต่าง ๆ ของพืชเป็นไปได้ดี อีกทั้งยังเป็นธาตุอาหารที่มีผลต่อการออกดอก การพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของพืช (Nell et al., 2009) รวมทั้งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites) และกระบวนการเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ของพืชอีกด้วย (Chrysargyris et al., 2019) สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อการปรับตัวและป้องกันตัวเองจากสภาพแวดล้อม และสามารถนำมาผลิตเป็นยา สารเติมแต่งในอาหารเพื่อเพิ่มรสชาติได้อีกด้วย (Akula and Ravishankar, 2011) สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมาสามารถแบ่งออกได้หลายกลุ่ม เช่น เทอร์ปีน (terpenes) ฟีนอลิก (phenolics) และอัลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นต้น (Murthy et al., 2014) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นการศึกษาปริมาณของธาตุอาหารฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิ จึงมีประโยชน์อย่างมากเพื่อใช้ในการเพิ่มผลผลิตและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้

วิธีการศึกษา

พรรณไม้น้ำที่ใช้ในการทดลอง

พรรณไม้น้ำพรมมิที่ได้มาจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรมมิในอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของปริมาณฟอสฟอรัส (P) แตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ ¼ P, ½ P, P (ชุดควบคุม) และ 2 P ชุดการทดลองละ 20 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ต้น (Table 1)

Table 1 Nutrient solution in the experiment.

Ingredients (mg/L)		Treatment			
		¼ P	½ P	P (Control)	2 P
1. Macroelements	NH_4NO_3	1,612	1,625	1,650	1,700
	KNO_3	1,995	1,963	1,900	1,774
	$CaCl_2{\cdot}2H_2O$	440	440	440	440
	$MgSO_4{\cdot}7H_2O$	370	370	370	370
	KH_2PO_4	42.5	85	170	340
2. Microelements	H_3BO_3	6.2	6.2	6.2	6.2
	$MnSO_4{\cdot}H_2O$	22.3	22.3	22.3	22.3
	$ZnSO_4{\cdot}7H_2O$	8.6	8.6	8.6	8.6
	KI	0.83	0.83	0.83	0.83
	$Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$	0.25	0.25	0.25	0.25
	$CuSO_4{\cdot}5H_2O$	0.025	0.025	0.025	0.025
	$CoCl_2{\cdot}6H_2O$	0.025	0.025	0.025	0.025
3. Irons	Na_2EDTA	37.25	37.25	37.25	37.25
	$FeSO_4{\cdot}7H_2O$	27.85	27.85	27.85	27.85
4. Vitamins	Glycine	2	2	2	2
	Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5	0.5
	Pyridoxine	0.5	0.5	0.5	0.5
	Thiamine	0.1	0.1	0.1	0.1
	Inositol	100	100	100	100
5. Sucrose		30,000	30,000	30,000	30,000

ขั้นตอนการทดลอง

เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 4 ระดับ ทำการปรับ pH ให้ได้ 5.62 โดยใช้ HCl 1 N และ KOH 1 N หลังจากนั้นเติมเจลไรต์ (gelrite) 1.6 กรัม ต้มจนเจลไรต์ละลายแล้วบรรจุลงใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 6 ออนซ์ จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เตรียมชิ้นเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษา โดยการนำต้นอ่อนของต้นพรมมิมาตัดเป็นชิ้นเนื้อเยื่อขนาด 1 เซนติเมตร ย้ายมาเลี้ยงลงอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณของฟอสฟอรัสแตกต่างกันตามแผนการทดลอง แล้วนำไปเลี้ยงไว้บนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยมีการให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

การเก็บข้อมูล

การเก็บผลการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ จะทำการบันทึกข้อมูลผลการเจริญเติบโตของความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิด้วยการวัดความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ (vernier caliper) ทำการวัดจากส่วนของชิ้นเนื้อเยื่อที่โผล่พ้นจากอาหารกึ่งแข็ง MS ไปจนถึงยอดที่สูงที่สุดของชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นบันทึกจำนวนใบ จำนวนข้อ จำนวนราก และจำนวนกิ่งที่เพิ่มขึ้น โดยบันทึกข้อมูลทั้งก่อนการทดลองและระหว่างการทดลองทุก ๆ สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นนำแต่ละชุดการทดลองมาชั่งปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

การศึกษาการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะนำเอาชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างแห้งปริมาณ 0.20 กรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1)

กรองสารสกัดที่ได้โดยเอาส่วนที่เป็นสารละลายแยกเก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำเอาสารสกัดที่ได้ไปใช้ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลทั้งหมด (total phenolic compounds, TPC) ด้วยวิธีโฟลินซิโอแคลตู (Folin-ciocalteu reagent) (ดัดแปลงจาก Lim and Mutijaya, 2007) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid content, TFC) (ดัดแปลงจาก Shirazi et al., 2014) และปริมาณซาโปนินรวม (total saponin content, TSC) (ดัดแปลงจาก Vador et al., 2012) รวมทั้งนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปฏิกิริยาในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ดัดแปลงจาก Lim and Mutijaya (2007) และการวิเคราะห์ 2, 2'-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic acid] (ABTS) radical scavenging assay ดัดแปลงจาก Nilsson et al. (2005)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลผลการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระของต้นพรมมิที่ปลูกในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสแตกต่างกันมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองตามวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) ตามวิธีของ Pearson correlation (two-tailed) test ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลของปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า ความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อในสัปดาห์ที่ 0-5 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างสูตรอาหาร และในสัปดาห์ที่ 6 พบว่า สูตรอาหาร ¼ P, ½ P, P และ 2 P มีความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อเท่ากับ 39.39, 34.88, 35.23 และ 39.14 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ โดยค่าที่สูงที่สุด (P<0.05) อยู่ในสูตรอาหาร ¼ P (Table 2)

Table 2 Effect of phosphorus on height (mm/explant) of *Bacopa monnieri monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
¼ P	10.00 ± 0.00	10.09 ± 0.10	19.67 ± 0.71	24.65 ± 0.87	30.15 ± 1.10	34.83 ± 1.25	39.39 ± 1.59[a]
½ P	10.00 ± 0.00	10.43 ± 0.13	20.03 ± 0.45	24.36 ± 0.58	28.23 ± 0.66	32.07 ± 0.64	34.88 ± 0.80[c]
P	10.00 ± 0.00	10.25 ± 0.10	18.01 ± 0.61	22.33 ± 0.73	27.14 ± 0.89	30.78 ± 0.81	35.23 ± 0.97[bc]
2 P	10.00 ± 0.00	10.16 ± 0.06	19.08 ± 0.59	23.93 ± 0.90	28.08 ± 1.12	33.56 ± 1.45	39.14 ± 1.91[ab]
P-value	ns	0.106	0.098	0.163	0.167	0.057	0.033

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

ผลของปริมาณฟอสฟอรัสต่อจำนวนใบของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า ในสัปดาห์ที่ 0 และ 5 ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร (P>0.05) แต่ในสัปดาห์ที่ 1-4 พบว่า จำนวนใบในสูตรอาหาร ½ P มีจำนวนใบมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 4.00, 6.28, 7.83 และ 10.35 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกับสูตรอาหารอื่น (P<0.05) และในสัปดาห์ที่ 6 พบว่า สูตรอาหาร ¼ P, ½ P, P และ 2 P มีจำนวนใบ เท่ากับ 14.25, 14.05, 16.05 และ 12.75 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ โดยสูตรอาหาร ¼ P, ½ P และ P มีจำนวนใบมากที่สุด แต่จะดีที่สุดในสูตรอาหาร P (P<0.05) (Table 3)

Table 3 Effect of phosphorus on leaf number (number/explant) of *Bacopa monnieri monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
¼ P	0.00 ± 0.00	3.43 ± 0.33[ab]	4.95 ± 0.23[b]	7.08 ± 0.37[ab]	9.40 ± 0.54[ab]	11.30 ± 0.66	14.25 ± 0.88[ab]
½ P	0.00 ± 0.00	4.00 ± 0.28[a]	6.28 ± 0.28[a]	7.83 ± 0.25[a]	10.35 ± 0.41[a]	11.73 ± 0.43	14.05 ± 0.52[ab]
P	0.00 ± 0.00	2.65 ± 0.19[c]	5.28 ± 0.28[b]	6.63 ± 0.22[b]	8.95 ± 0.39[bc]	12.48 ± 0.63	16.05 ± 0.83[a]
2 P	0.00 ± 0.00	3.20 ± 0.16[bc]	4.95 ± 0.18[b]	6.65 ± 0.22[b]	8.10 ± 0.25[c]	10.83 ± 0.43	12.75 ± 0.51[b]
P-value	ns	0.003	0.001	0.008	0.003	0.188	0.015

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

ผลของปริมาณฟอสฟอรัสต่อจำนวนข้อของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า ในสัปดาห์ที่ 0-3 และ 5 ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร (P>0.05) แต่ในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 พบว่าจำนวนข้อในสูตรอาหาร P มีจำนวนข้อมากกว่าสูตรอาหารอื่น (P<0.05) ในสัปดาห์ที่ 6 จำนวนข้อของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร ¼ P, ½ P, P และ 2 P มีจำนวนข้อ เท่ากับ 6.70, 6.65, 7.50 และ 6.13 ข้อ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ โดยจำนวนข้อของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร P มีจำนวนข้อมากที่สุด (P<0.05) (Table 4)

Table 4 Effect of phosphorus on node number (number/explant) of *Bacopa monnieri monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
¼ P	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.48 ± 0.11	3.15 ± 0.09	3.48 ± 0.12[b]	5.53 ± 0.33	6.70 ± 0.37[ab]
½ P	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.58 ± 0.11	3.28 ± 0.09	3.58 ± 0.08[b]	5.70 ± 0.21	6.65 ± 0.20[ab]
P	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.40 ± 0.10	3.28 ± 0.11	4.03 ± 0.09[a]	6.10 ± 0.26	7.50 ± 0.39[a]
2 P	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.38 ± 0.09	3.08 ± 0.07	3.63 ± 0.10[b]	5.28 ± 0.22	6.13 ± 0.26[b]
P-value	ns	ns	0.519	0.327	0.001	0.154	0.025

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

ผลของปริมาณฟอสฟอรัสต่อจำนวนรากของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า ในสัปดาห์ที่ 3 จำนวนรากในสูตรอาหาร ½ P มีจำนวนรากมากกว่าสูตรอาหารอื่น (P<0.05) ซึ่งมีจำนวนรากเท่ากับ 3.05 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างสูตรอาหาร (P>0.05) ในสัปดาห์อื่น โดยในสัปดาห์ที่ 6 จำนวนรากของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร ¼ P, ½ P, P และ 2 P มีค่าเท่ากับ 4.28, 4.60, 4.40 และ 4.10 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Table 5)

Table 5 Effect of phosphorus on root number (number/explant) of *Bacopa monnieri monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
¼ P	0.00 ± 0.00	0.95 ± 0.13	1.78 ± 0.19	2.73 ± 0.20[ab]	3.28 ± 0.22	3.73 ± 0.22	4.28 ± 0.26
½ P	0.00 ± 0.00	0.93 ± 0.15	1.95 ± 0.19	3.05 ± 0.17[a]	3.65 ± 0.16	4.03 ± 0.20	4.60 ± 0.24
P	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.11	1.25 ± 0.16	2.15 ± 0.16[b]	2.93 ± 0.19	3.75 ± 0.16	4.40 ± 0.15
2 P	0.00 ± 0.00	1.10 ± 0.19	1.68 ± 0.21	2.45 ± 0.18[b]	3.03 ± 0.21	3.55 ± 0.32	4.10 ± 0.32
P-value	ns	0.070	0.149	0.016	0.051	0.547	0.539

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

ผลของปริมาณฟอสฟอรัสต่อจำนวนยอดของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า ในสัปดาห์ที่ 2 จำนวนยอดในสูตรอาหาร ¼ P, ½ P และ 2 P มีจำนวนยอดมากที่สุด (P<0.05) แต่จะดีที่สุดในสูตรอาหาร ½ P ซึ่งมีจำนวนยอดเท่ากับ 1.40 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างสูตรอาหาร (P>0.05) ในสัปดาห์อื่น โดยในสัปดาห์ที่ 6 จำนวนยอดของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร ¼ P, ½ P, P และ 2 P มีค่าเท่ากับ 1.63, 1.88, 1.83 และ 1.68 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Table 6)

Table 6 Effect of phosphorus on shoot number (numbers/explant) of *Bacopa monnieri monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
¼ P	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.20 ± 0.08[ab]	1.25 ± 0.08	1.33 ± 0.09	1.53 ± 0.09	1.63 ± 0.11
½ P	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.40 ± 0.09[a]	1.43 ± 0.08	1.53 ± 0.09	1.58 ± 0.08	1.88 ± 0.09
P	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.10 ± 0.05[b]	1.20 ± 0.07	1.20 ± 0.07	1.58 ± 0.10	1.83 ± 0.10
2 P	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.20 ± 0.08[ab]	1.23 ± 0.08	1.35 ± 0.08	1.48 ± 0.11	1.68 ± 0.11
P-value	ns	ns	0.035	0.155	0.061	0.852	0.257

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

ผลของปริมาณฟอสฟอรัสต่อปริมาณน้ำหนักสด-แห้งของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ เมื่อเริ่มต้นการทดลองและสิ้นสุดการทดลองพบว่า น้ำหนักสด-แห้งเริ่มต้นของทุกสูตรอาหารไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสูตรอาหาร (P>0.05) แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า สูตรอาหาร 2 P มีน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งมากที่สุด (P<0.05) มีค่าเท่ากับ 0.2428 กรัมน้ำหนักสด/ชิ้นเนื้อเยื่อ และ 0=0.0366 กรัมน้ำหนักแห้ง/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (P<0.05) (Table 7)

Table 7 Effect of phosphorus on weight (g) of *Bacopa monnieri monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures.

Treatments	Initial weight		Final weight	
	Fresh weight	Dry weight	Fresh weight	Dry weight
¼ P	0.0123 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0000	0.1094 ± 0.0035[c]	0.0275 ± 0.0006[b]
½ P	0.0123 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0000	0.1372 ± 0.0013[b]	0.0272 ± 0.0003[b]
P	0.0123 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0000	0.0926 ± 0.0020[d]	0.0247 ± 0.0012[c]
2 P	0.0123 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0000	0.2428 ± 0.0019[a]	0.0366 ± 0.004[a]
P-value	1.000	1.000	<0.001	<0.001

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

จากการศึกษาผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อต้นพรมมิที่ปลูกในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 4 ระดับ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าความสูงของเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร ¼ P มีความสูงมากที่สุด คือ 39.39 มิลลิเมตร ส่วนของจำนวนใบ และจำนวนข้อพบว่า สูตรอาหาร P มีค่ามากที่สุด คือ 16.05 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ และ 7.50 ข้อ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ แต่ผลของจำนวนราก และจำนวนยอดไม่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างสูตรอาหาร โดยมีจำนวนรากอยู่ที่ 4.10-4.60 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ระหว่างสูตรอาหาร และจำนวนยอดอยู่ที่ 1.63-1.88 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ (Table 8) จากการศึกษาของ Figas et al. (2016) ที่ศึกษาผลของฟอสฟอรัสที่แตกต่างกัน 3 ระดับ (MS, MS+P และ MS-P) ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณเม็ดสี (pigment) ในการสังเคราะห์แสงของต้นเฮลิคริซัม (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) ในสภาพปลอดเชื้อพบว่า ต้นเฮลิคริซัมที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ไม่ได้เติมฟอสฟอรัสมีอัตราการเจริญเติบโตและความยาวของรากน้อยกว่าสูตรอาหารที่มีการเติมฟอสฟอรัสลงไป และปริมาณของฟอสฟอรัสที่เพิ่มขึ้นยังส่งผลต่อปริมาณของคลอโรฟิลล์ a และ b ให้เพิ่มขึ้นด้วย จากการศึกษาของ Ramezani et al. (2009) ที่ศึกษาผลของฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโต ปริมาณผลผลิต และปริมาณน้ำมันหอมระเหยในต้นโหระพา พบว่า ฟอสฟอรัสมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยจะส่งผลต่อความสูงต้น ความสูงของช่อดอก และปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ เนื่องจากฟอสฟอรัสทำให้เกิดโคเอนไซม์ (coenzyme) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งพลังงานซึ่งเป็นพลังงานที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง ซึ่งได้แก่

adenosine triphosphate (ATP) และ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) เป็นพลังงานที่ใช้สำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชเพื่อไปใช้ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ อีกทั้งใช้ในการสังเคราะห์ไขมัน และเป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ที่สำคัญในธรรมชาติ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Stewart and Lovett-Doust (2003) ซึ่งทำการศึกษาผลของปริมาณฟอสฟอรัสที่มีต่อผลผลิตของจำนวนดอก จำนวนใบ และความสูงของต้นดาวเรือง *Calendula officinalis* L. (Standard Pacific) พบว่า ปริมาณของฟอสฟอรัสที่มากขึ้นไม่ส่งผลทำให้ผลผลิตและการเจริญเติบโตของต้นดาวเรืองดีขึ้น โดยผลของการศึกษาดังกล่าวมีความสอดคล้องกันกับการศึกษาของ Chrysargyris et al. (2016) ที่ศึกษาผลของปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่อลักษณะการเจริญเติบโต การสะสมธาตุอาหาร และปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงปริมาณและคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยในต้นลาเวนเดอร์พบว่า ปริมาณของฟอสฟอรัสที่เพิ่มขึ้นในสารละลายธาตุอาหารไม่มีผลต่อความสูงต้น ความยาวใบ และความหนาของก้านในต้นลาเวนเดอร์ รวมทั้งผลจากการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วน และปริมาณของแร่ธาตุในสารละลายธาตุอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชด้วยเช่นกัน

Table 8 Effect of phosphorus on growth of six- week -old *Bacopa monnieri monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures.

Treatments	Height (mm/explant)	Leaf number (numbers/explant)	Node number (numbers/explant)	Root number (numbers/explant)	Shoot number (numbers/explant)
¼ P	39.39 ± 1.59[a]	14.25 ± 0.88[ab]	6.70 ± 0.37[ab]	4.28 ± 0.26	1.63 ± 0.11
½ P	34.88 ± 0.80[c]	14.05 ± 0.52[ab]	6.65 ± 0.20[ab]	4.60 ± 0.24	1.88 ± 0.09
P	35.23 ± 0.97[bc]	16.05 ± 0.83[a]	7.50 ± 0.39[a]	4.40 ± 0.15	1.83 ± 0.10
2 P	39.14 ± 1.91[ab]	12.75 ± 0.51[b]	6.13 ± 0.26[b]	4.10 ± 0.32	1.68 ± 0.11
P-value	0.033	0.015	0.025	0.539	0.257

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

ผลของปริมาณฟอสฟอรัสที่แตกต่างกันต่อความสามารถในการยับยั้งและต้านสารอนุมูลอิสระของเนื้อเยื่อต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ

ความสามารถในการยับยั้งและต้านสารต้านอนุมูลอิสระของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (Table 9) พบว่าปริมาณ TPC ในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยสูตรอาหารที่มีปริมาณ TPC มากที่สุด คือ สูตรอาหาร 2 P มีค่าเท่ากับ 8.48 µgGallic/g ชิ้นเนื้อเยื่อ ปริมาณ TFC พบว่าในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยสูตรอาหารที่มีปริมาณ TFC มากที่สุด คือ สูตรอาหาร 2 P มีค่าเท่ากับ 16.44 mg luteolin/g ชิ้นเนื้อเยื่อ และมีค่าไม่แตกต่างกันมากกับสูตรอาหาร ½ P ที่มีค่าเท่ากับ 15.07 mg luteolin/g ชิ้นเนื้อเยื่อ ปริมาณ saponin พบว่าในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยสูตรอาหารที่มีปริมาณ saponin มากที่สุด คือ สูตรอาหาร ½ P มีค่าเท่ากับ 4,921.14 mg saponin/g ชิ้นเนื้อเยื่อ แต่ไม่มีความแตกต่างกันมากกับสูตรอาหาร ¼ P ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4,634.40 mg saponin/g ชิ้นเนื้อเยื่อ

ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระในทุกสูตรอาหารไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) โดยในสูตรอาหาร ¼ P สูตร ½ P สูตร P และสูตร 2 P มีค่าเท่ากับ 88.96, 89.27, 86.65 และ 88.70% ตามลำดับ และการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยสูตรอาหารที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากที่สุด คือ สูตรอาหาร ½ P มีค่าเท่ากับ 79.66% แต่ไม่มีความแตกต่างกันมากกับสูตรอาหาร 2 P ซึ่งมีค่าเท่ากับ 68.33% (Table 9)

การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (correlation analysis) ของสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ

ผลจากการวิเคราะห์ค่า correlation พบว่าปริมาณของ TFC มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกกับปริมาณของ TPC และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของ ABTS มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกกับปริมาณของ TPC (Table 10)

Table 9 Effect of phosphorus on antioxidant activities of *Bacopa monnieri monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures after 6 weeks.

Treatments	TPC (µg gallic/g)	TFC (mg luteolin/g)	Saponin (mg saponin/g)	DPPH (%)	ABTS (%)
¼ P	6.18 ± 0.05[d]	12.68 ± 0.40[c]	4,634.40 ± 61.75[ab]	88.96 ± 0.80	52.83 ± 5.25[c]
½ P	7.85 ± 0.04[b]	15.07 ± 0.73[ab]	4,921.14 ± 77.23[a]	89.27 ± 0.08	79.66 ± 0.16[a]
P	6.49 ± 0.13[c]	13.93 ± 0.60[bc]	4,179.56 ± 147.65[c]	86.65 ± 2.37	57.85 ± 4.96[bc]
2 P	8.48 ± 0.08[a]	16.44 ± 0.35[a]	4,367.43 ± 61.75[bc]	88.70 ± 0.15	68.33 ± 5.24[ab]
P-value	<0.001	0.007	0.003	0.484	0.012

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

Table 10 Correlation between different antioxidant parameters of *Bacopa monnieri monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures after 6 weeks.

Parameters	TPC	TFC	Saponin	DPPH	ABTS
TPC	1				
TFC	0.864*	1			
Saponin	0.180	-0.056	1		
DPPH	0.184	0.173	0.153	1	
ABTS	0.659**	0.501	0.501	0.065	1

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed) and * correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed) (Pearson correlation).

ผลการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อต้นพรมมิที่ปลูกในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสแตกต่างกัน 4 ระดับ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า สูตรอาหารที่มีปริมาณ TPC มากที่สุด คือ สูตรอาหาร 2 P สูตรอาหารที่มีปริมาณ TFC มากที่สุด คือ สูตรอาหาร 2 P และมีค่าไม่แตกต่างกันมากกับสูตรอาหาร ½ P สูตรอาหารที่มีปริมาณ saponin มากที่สุด คือ สูตรอาหาร ½ P และมีค่าไม่แตกต่างกันมากกับสูตรอาหาร ¼ P การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่า สูตรอาหาร ½ P มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากที่สุด และมีค่าไม่แตกต่างกันมากกับสูตรอาหาร 2 P ส่วนการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า ในทุกสูตรอาหารมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (Table 9) โดยปกติแล้วฟอสฟอรัสเป็นธาตุประกอบที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชและเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของพืช (Murthy et al., 2014) จากการศึกษาของ Nagella and Murthy (2011) ที่ศึกษาผลของธาตุอาหารหลักและแหล่งไนโตรเจนต่อการสะสมมวลชีวภาพ และผลผลิตของ withanolide-A ในโสมอินเดีย (*Withania somnifera*) พบว่า การเพิ่มปริมาณของระดับฟอสเฟตเป็น 2 เท่าในสูตรอาหาร MS สามารถทำให้มีการสะสมของ withanolide-A ในโสมอินเดียเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แต่ในทางกลับกันมีงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่าการจำกัดปริมาณฟอสเฟตก็สามารถช่วยเพิ่มปริมาณการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิได้จากการศึกษาของ Bramble and Graves (1990) ที่ศึกษาผลของฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารอัลคาลอยด์ในต้นกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica*) พบว่าสูตรอาหาร MS ที่มีการลดปริมาณฟอสฟอรัสลงส่งผลทำให้การผลิตสารอัลคาลอยด์ในต้นกาแฟอาราบิก้าสูงขึ้น ปริมาณของธาตุอาหารหลักจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการสะสมของมวลชีวภาพและการผลิตสารทุติยภูมิในพืชที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (Wu and Zhong, 1999) และความต้องการธาตุอาหารของพืชแต่ละชนิดก็แตกต่างกัน

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาปริมาณของฟอสฟอรัสที่มีต่อการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าในสูตรอาหาร ¼ P มีค่าความสูงของเนื้อเยื่อต้นพรมมิมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 39.39 มิลลิเมตร ผลของจำนวนใบและจำนวนข้อพบว่าในสูตรอาหาร P มีจำนวนมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 16.05 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ และ 7.50 ข้อ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ และผลของสารต้านอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อต้นพรมมิที่พบว่า ปริมาณฟีนอลทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมีค่าสูงที่สุดในสูตรอาหาร 2 P มีค่าเท่ากับ 8.48 µg gallic/g และ 16.44 mg luteolin/g

ตามลำดับ ผลของซาโปนินรวมและ ABTS มีค่าสูงที่สุดในสูตรอาหาร ½ P มีค่าเท่ากับ 4,921.14 mg saponin/g และ 79.66% ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

ชาญชัย สาดแสงจันทร์. 2556. พรมมิสมุนไพรเพื่อสุขภาพสมอง. *ธรรมศาสตร์เวชสาร* 13(4): 554-560.

ดิเรก ทองอร่าม. 2546. *การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน*. ราชบุรี: ธรรมรักษ์การพิมพ์.

Akula, R., and Ravishankar, G. A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6(11): 1720-1731.

Bhattacharya, S. K., Bhattacharya, A., Kumar, A., and Ghosal, S. 2000. Antioxidant activity of *Bacopa monniera* in rat frontal cortex, striatum and hippocampus. *Phytotherapy Research* 14: 174-179.

Bramble, J. L., and Graves, D. J. 1990. Calcium and phosphate effects on growth and alkaloid production in *Coffea arabica*: experimental results and mathematical model. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 859-868.

Chaudhari, K. S., Tiwari, N. R., Tiwari, R. R., and Sharma, R. S. 2017. Neurocognitive effect of nootropic drug *Brahmi* (*Bacopa monnieri*) in Alzheimer's disease. *Annals of Neurosciences* 24: 111-122.

Chrysargyris, A., Panayiotou, C., and Tzortzakis, N. 2016. Nitrogen and phosphorus levels affected plant growth, essential oil composition and antioxidant status of lavender plant (*Lavandula angustifolia* Mill.). *Industrial Crops and Products* 83: 577-586.

Chrysargyris, A., Petropoulos, S. A., Fernandes, A., Barros, L., Tzortzakis, N., and Ferreira, I. C. F. R. 2019. Effect of phosphorus application rate on *Mentha spicata* L. grown in deep flow technique (DFT). *Food Chemistry* 276: 84-92.

Figas, A., Sowa, M. T., Sawilska, A., Bocian, K., and Figas, A. 2016. Effect of phosphorus on the growth and photosynthetic pigments content of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench plantlets in *in vitro* cultures. *Infrastructure and Ecology of Rural Areas* 3(1): 697–704.

Ghosh, T., Maity, T. K., Sengupta, P., Dash, D. K., and Bose, A. 2008. Antidiabetic and *In Vivo* antioxidant activity of ethanolic extract of *Bacopa monnieri* Linn. aerial parts: A possible mechanism of action. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 7(1): 61-68.

Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., and Ullah, I. 2012. Plant tissue culture: Current status and opportunities. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, A. Leva, and L. Rinaldi, eds. pp. 1-28. ISBN: 978-953-51-0787-3, DOI: 10.5772/52760.

Jain, P., Sharma, H., Basri, F., Priya, K., and Singh, P. 2017. Phytochemical analysis of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. and their anti-fungal activities. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 16(2): 310-318.

Lim, Y. Y., and Murtijaya, Y. 2007. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *LWT - Food Science and Technology* 40: 1664-1669.

Mathew, J., Paul, J., Nandhu, M. S., and Paulose, C. S. 2010. *Bacopa monnieri* and Bacoside-A for ameliorating epilepsy associated behavioral deficits. *Fitoterapia* 81: 315-322.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Murthy, H. N., Lee, E. J., and Paek, K. Y. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 118: 1-16.

Nagella, P., and Murthy, H. N. 2011. Effects of macroelements and nitrogen source on biomass accumulation and withanolide-A production from cell suspension cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 104: 119-124.

Nell, M., Voetsch, M., Vierheilig, H., Steinkellner, S., ZitterlEglseer, K., Franz, C., and Novak, J. 2009. Effect of phosphorus uptake on growth and secondary metabolites of garden sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(6): 1090-1096.

Nilsson, J., Pillai, D., Onning, G., Persson, C., Nilsson, A., and Akesson, B. 2005. Comparison of the 2,29-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research* 49: 239-246.

Ramezani, S., Rezaei, M. R., and Sotoudehnia, P. 2009. Improved growth, yield and essential oil content of basil grown under different levels of phosphorus sprays in the field. *Journal of Applied Biological Sciences* 3(2): 96-101.

Saad, A. I. M., and Elshahed, A. M. 2012. Plant tissue culture media. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, A. Leva, and L. Rinaldi, eds. pp. 29-40. ISBN: 978-953-51-0787-3, DOI: 10.5772/52760.

Shirazi, O. U., Khattak, M. M. A. K., Shukri, N. A. M., and Anuar, M. N. N. 2014. Determination of total Phenolic, flavonoid content and free radical scavenging activities of common herbs and spices. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3(3): 104-108.

Sosa, M. D. L. M., Moroni, P., and Leary, N. O. 2018. A taxonomic revision of the genus *Bacopa* (Gratioleae, Plantaginaceae) in Argentina. *Phytotaxa* 336(1): 1-27.

Stewart, C. L., and Lovett-Doust, L. 2003. Effect of phosphorus treatment on growth and yield in the medicinal herb *Calendula officinalis* L. (Standard Pacific) under hydroponic cultivation. *Canadian Journal of Plant Science* 83(3): 611-617.

Vador, N., Vador, B., and Hole, R. 2012. Simple spectrophotometric methods for standardizing Ayurvedic formulation. *Indian Journal of Phamaceutical Sciences* 74(2): 161-163.

Wu, J., and Zhong, J. J. 1999. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects. *Journal of Biotechnology* 67: 89-99.

วันรับบทความ (Received date) : 16 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 15 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

ผลของปริมาณธาตุอาหารในสูตรอาหารกึ่งแข็ง MS ต่อการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระของต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of Nutrient Concentration in MS Strength on Growth and Antioxidant Properties in *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Growing in *In Vitro* Cultures

ศศิธร พินภิรมย์[1] นงนุช เลาหะวิสุทธิ์[1*] และอัจฉรี เรืองเดช[1]
Sasithorn Pinpirom[1], Nongnuch Laohavisuti[1*] and Uscharee Ruangdej[1]

บทคัดย่อ

พรรณไม้น้ำพรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) เป็นพืชสมุนไพรที่สามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น อัลคาลอยด์ (alkaloid) ไกลโคไซด์ (glycoside) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และซาโปนิน (saponin) ซึ่งซาโปนินเป็นสารประกอบหลักที่พบได้ในต้นพรมมิ การศึกษาผลของอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่ปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS ต่อการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า สูตรอาหาร ¼ MS มีการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อดีที่สุด โดยมีความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อเท่ากับ 45.50 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนใบเท่ากับ 18.15 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนข้อเท่ากับ 8.73 ข้อ/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนรากเท่ากับ 6.53 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ และมีน้ำหนักสด-แห้งมากที่สุด ($P<0.05$) มีค่าเท่ากับ 0.1837 กรัมน้ำหนักสด/ชิ้นเนื้อเยื่อ และ 0.0358 กรัมน้ำหนักแห้ง/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ แต่จำนวนยอดของชิ้นเนื้อเยื่อไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร ($P>0.05$) ผลจากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อพรมมิ แสดงให้เห็นว่าในสูตรอาหาร ¼ MS ส่งผลให้มีปริมาณของ TPC, TFC และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีค่ามากที่สุด (19.32 µg gallic/g, 43.89 mg luteolin/g และ 88.28% ตามลำดับ) ส่วนปริมาณของซาโปนินพบว่า สูตรอาหารในกลุ่มควบคุม (MS) มีปริมาณของซาโปนินสูงที่สุด เท่ากับ 24,666.81 mg saponin/g ส่วนการยับยั้งด้วยวิธี DPPH พบว่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร ($P>0.05$)

คำสำคัญ: พรมมิ ธาตุอาหาร สารต้านอนุมูลอิสระ สภาพปลอดเชื้อ การเจริญเติบโต

Abstract

Bacopa monnieri (L.) Wettst. is a medical plant that contains a large number of metabolites including alkaloids, glycosides, flavonoids and saponins, which are compounds that have a wide range of therapeutic properties including antioxidant activities. Saponin is the main compound found in *B. monnieri* (L.) Wettst. This study was to do with the effects of Murashige and Skoog (MS) medium that contained 4 different nutrition concentrations, namely ¼ MS, ½ MS, MS and 2 MS, on the growth and antioxidant activity of *B. monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro*. The ¼ MS treatment emerged as the most effective promoter of growth and development as explants grown on it reached the experimental maximum height of 45.50 mm per explant, the highest number of leaves at 18.5 leaves per explant, the highest number of nodes at 8.73 nodes per explant, the highest number of roots at 6.53 roots per explant and the highest values of dry and fresh weight. However, across all treatments, namely ¼ MS, ½ MS, MS and 2 MS, there were no statistically significant differences in the number of shoots ($P>0.05$) produced. The study also demonstrated that the ¼ MS treatment led to the highest concentrations of TPC, TFC and antioxidant activity by ABTS assay (19.32 mg gallic/g, 43.89 mg luteolin/g and 88.28 % respectively). Significantly, the control treatment (MS) produced the highest saponin concentration, which was 24,666.81 mg saponin/g. Finally, no significant differences with respect to DPPH assay were found among the various treatments undertaken in this research ($P>0.05$).

Keywords: *Bacopa monnieri* (L.) Wettst., nutrient, antioxidant, *in vitro*, growth

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: nongnuch.la@kmitl.ac.th

คำนำ

พรรณไม้น้ำพรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) (Sosa et al., 2018) พบได้ในพื้นที่เขตร้อนชื้น สามารถเติบโตในพื้นที่ชุ่มน้ำ และในแหล่งน้ำตื้น ๆ ทั่วไป (Gohil and Patel, 2010) ต้นพรมมิเป็นพืชสมุนไพรที่เป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็ก แตกกิ่งก้านจำนวนมาก ลำต้นเลื้อยไปตามพื้น มีลำต้นอวบน้ำ ใบมีขนาดเล็กเป็นรูปไข่กลับ ปลายใบกว้างมน โคนใบแคบ และมีดอกขนาดเล็กสีม่วงอ่อนหรือสีขาว ออกดอกตามซอกใบ ดอกมี 4-5 กลีบ (ชาญชัย สาดแสงจันทร์, 2556; Pushkar et al., 2015) ต้นพรมมิสามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้หลายกลุ่ม เช่น อัลคาลอยด์ (alkaloid) ไกลโคไซด์ (glycoside) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และซาโปนิน (saponin) (Mathew et al., 2010) โดยซาโปนินเป็นสารประกอบหลักที่พบได้มากในต้นพรมมิ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการช่วยส่งกระแสประสาท และช่วยบำรุงสมอง ส่งเสริมความจำ การรับรู้ และช่วยรักษาอาการผิดปกติทางจิต (Devendra et al., 2018) ต้นพรมมิจึงเป็นพืชสมุนไพรที่ให้สรรพคุณทางยามากมาย ในปัจจุบันนี้พืชสมุนไพรและอาหารที่ส่งเสริมสุขภาพเป็นที่นิยมมากขึ้น สารสกัดจากต้นพรมมิจึงได้รับความนิยมอย่างสูงในเชิงพาณิชย์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชหรือการเพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อเป็นการนำส่วนต่าง ๆ ของพืชภายใต้การควบคุมธาตุอาหาร และสภาพแวดล้อมในห้องทดลอง (Thorpe, 2007) ด้วยเหตุนี้พืชที่เติบโตในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นพืชที่ปลอดเชื้อและยังสามารถเพิ่มผลผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิได้อีกด้วย ชิ้นเนื้อเยื่อเพียงหนึ่งชิ้นของพืชสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตได้อีกเป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และยังใช้พื้นที่เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงส่งผลทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกลายมาเป็นกระบวนการที่สำคัญในอุตสาหกรรมการขยายพันธุ์พืชเพื่อการพาณิชย์ (Hassain et al., 2012)

อาหารกึ่งแข็ง Murashige and Skoog (1962) (MS) เป็นอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชได้หลากหลายชนิด เนื่องจาก MS เป็นอาหารที่มีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน และกรดอะมิโนอย่างเพียงพอต่อความต้องการของพืช พืชต้องการธาตุอาหารที่จำเป็นเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต สร้างระบบสืบพันธุ์และใช้ในการทำหน้าที่ต่าง ๆ พืชที่ได้รับปริมาณธาตุอาหารอย่างเพียงพอต่อความต้องการจะทำให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดี ซึ่งจะขึ้นอยู่กับธาตุอาหารที่เฉพาะเจาะจงและชนิดของพืชด้วย ถ้าพืชได้รับปริมาณธาตุอาหารมากหรือน้อยเกินไปจะส่งผลให้การเจริญเติบโตหรือสุขภาพของพืชแย่ลง โดยในพืชบางชนิดการลดปริมาณของธาตุอาหารลงสามารถทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีกว่าเดิม (Thorpe, 2007; McCauley et al., 2011; Saad and Elshahed, 2012; DelCorso et al., 2014) จากการศึกษาของ Monfort et al. (2018) พบว่าการลดปริมาณธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง (½ MS) ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตดีไม่แตกต่างกับพืชที่ให้อาหารปกติ (MS) ส่วนการที่พืชได้รับธาตุอาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการ พืชจะแสดงอาการของการขาดธาตุอาหารออกมาให้เห็น (McCauley et al., 2011) จากการศึกษาของ Tewari et al. (2007) พบว่าพืชที่มีการขาดไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสส่งผลให้ใบแก่เร็วขึ้น ใบมีสีเขียวซีด ยอดดอกมีขนาดผอมและสั้น รวมทั้งยังไปยับยั้งการเติบโตของราก ความสูงของต้น และผลผลิตมวลแห้งลดลง หรือถ้าพืชได้รับสารอาหารมากเกินไปก็ส่งผลเสียต่อพืชได้เช่นกัน จากการศึกษาของ Monfort et al. (2018) พบว่าพืชที่ได้รับธาตุอาหารมากเกินไปส่งผลทำให้มีการเจริญเติบโตลดลงไม่แตกต่างกับพืชที่ได้รับธาตุอาหารไม่เพียงพอ และเป็นอันตรายต่อรากด้วย

สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นมาสะสมเอาไว้ภายในเซลล์ เพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่มารบกวนทั้งจากสิ่งมีชีวิต (เชื้อโรค หรือแมลง) สภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม น้ำ กัมมันตภาพรังสี โลหะหนัก และธาตุอาหาร รวมทั้งความเครียดต่าง ๆ ซึ่งเป็นกลไกของพืชเพื่อใช้ในการต่อต้านกับเชื้อโรคและความเครียดที่เกิดขึ้น การที่พืชได้รับการกระตุ้นจากสิ่งเร้าเหล่านี้ส่งผลให้พืชมีการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิเพิ่มมากขึ้น (Rao and Ravishankar, 2002; Murthy et al., 2014) เมแทบอไลต์ทุติยภูมิสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มหลัก ๆ ได้แก่ เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) สารประกอบฟีนอลิก (phenolics compounds) อัลคาลอยด์ (alkaloids) และ กลุ่มสารประกอบกำมะถัน (sulphur-containing compounds) (Guerriero et al., 2018)

ดังนั้นการศึกษาผลของปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโต และสารต้านอนุมูลอิสระของต้นพรมมิที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จึงเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิต และเพิ่มปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด และยังสามารถนำไปสกัดเป็นยาเพื่อใช้ในทางการแพทย์ได้อีกด้วย

วิธีการศึกษา

พรรณไม้น้ำที่ใช้ในการทดลอง

พรรณไม้น้ำพรมมิที่ได้มาจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) มีความเข้มข้นของปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ ¼ MS, ½ MS, MS (ชุดควบคุม) และ 2 MS ชุดทดลองละ 20 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ต้น

ขั้นตอนการทดลอง

เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ (Table 1) ทำการปรับ pH ให้ได้ 5.62 โดยใช้ HCl 1 N และ KOH 1 N หลังจากนั้นเติมเจลไรต์ (gelrite) 1.6 กรัม ต้มจนเจลไรต์ละลายแล้วจึงบรรจุใส่ลงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 6 ออนซ์ จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เตรียมชิ้นเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษาโดยการนำชิ้นเนื้อเยื่อของต้นพรมมิมาตัดเป็นชิ้นเนื้อเยื่อขนาด 1 เซนติเมตร ย้ายชิ้นเนื้อเยื่อดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน จากนั้นนำไปเลี้ยงไว้บนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยมีการให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

Table 1 Nutrients in MS solution.

Ingredients (mg/L)		MS concentration			
		¼ MS	½ MS	MS (Control)	2 MS
1. Macroelements	NH_4NO_3	412.5	825	1,650	3,300
	KNO_3	475	950	1,900	3,800
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	110	220	440	880
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	92.5	185	370	740
	KH_2PO_4	42.5	85	170	340
2. Microelements	H_3BO_3	1.55	3.10	6.2	12.4
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	5.575	11.15	22.3	44.6
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.15	4.3	8.6	17.2
	KI	0.2075	0.415	0.83	1.66
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.0625	0.125	0.25	0.5
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0063	0.0125	0.025	0.05
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0063	0.0125	0.025	0.05
3. Irons	Na_2EDTA	9.3125	18.625	37.25	74.5
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	6.9625	13.925	27.85	55.7
4. Vitamins	Glycine	0.5	1	2	4
	Nicotinic acid	0.125	0.25	0.5	1
	Pyridoxine	0.125	0.25	0.5	1
	Thiamine	0.025	0.05	0.1	0.2
	Inositol	25	50	100	200
5. Sucrose		7,500	15,000	30,000	60,000

การเก็บข้อมูล

การเก็บผลการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ จะทำการบันทึกข้อมูลผลการเจริญเติบโตของความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิด้วยการวัดความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ (vernier caliper) ทำการวัดจากส่วนของชิ้นเนื้อเยื่อที่โผล่พ้นจากอาหารกึ่งแข็ง MS ไปจนถึงยอดที่สูงที่สุดของชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นบันทึกจำนวนใบ จำนวนข้อ จำนวนราก และจำนวน

กิ่งที่เพิ่มขึ้น โดยบันทึกข้อมูลทั้งก่อนการทดลองและระหว่างการทดลองทุก ๆ สัปดาห์เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นนำแต่ละชุดการทดลองมาชั่งปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

การศึกษาการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะนำเอาชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปป่นละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างแห้งปริมาณ 0.20 กรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) กรองสารสกัดที่ได้โดยเอาส่วนที่เป็นสารละลายแยกเก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำเอาสารสกัดที่ได้ไปใช้ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลทั้งหมด (total phenolic compounds, TPC) ด้วยวิธีโฟลินซิโอแคลตู (Folin-ciocalteu reagent) (ดัดแปลงจาก Lim and Mutijaya, 2007) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid content, TFC) (ดัดแปลงจาก Shirazi et al., 2014) และปริมาณซาโปนินรวม (total saponin content, TSC) (ดัดแปลงจาก Vador et al., 2012) รวมทั้งนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปฏิกิริยาในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ดัดแปลงจาก Lim and Mutijaya (2007) และการวิเคราะห์ 2, 2'-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic acid] (ABTS) radical scavenging assay ดัดแปลงจาก Nilsson et al. (2005)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลผลการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระของต้นพรมมิที่ปลูกในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกันมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองตามวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) ตามวิธีของ Pearson correlation (two-tailed) test ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลของปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า ความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มมีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหารตั้งแต่ในสัปดาห์ที่ 1 โดยในสูตรอาหาร ¼ MS และ 2 MS มีความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อมากที่สุด (P<0.05) มีค่าเท่ากับ 10.42 และ 10.43 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 2 จนถึงสัปดาห์ที่ 5 พบว่า ความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร ¼ และ ½ MS มีความสูงมากกว่าอาหารสูตรอื่น (P<0.05) ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 17.7-37.74 และ 17.88-35.73 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ และในสัปดาห์ที่ 6 พบว่า สูตรอาหาร ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS มีความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อเท่ากับ 45.50, 41.03, 33.98 และ 30.74 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ โดยค่าที่สูงที่สุด (P<0.05) อยู่ในสูตรอาหาร ¼ MS และน้อยที่สุดในสูตรอาหาร MS และ 2 MS (Table 2)

Table 2 Explant height (mm) of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
¼ MS	10.00 ± 0.00	10.42 ± 0.15^{a}	17.17 ± 0.56^{a}	22.25 ± 1.02^{ab}	29.19 ± 1.41^{a}	37.74 ± 2.04^{a}	45.50 ± 2.51^{a}
½ MS	10.00 ± 0.00	9.92 ± 0.09^{b}	17.88 ± 0.37^{a}	22.99 ± 0.51^{a}	29.51 ± 0.63^{a}	35.73 ± 0.73^{a}	41.03 ± 0.77^{b}
MS	10.00 ± 0.00	9.96 ± 0.13^{b}	15.59 ± 0.48^{b}	19.85 ± 0.73^{c}	24.77 ± 0.76^{b}	29.80 ± 0.74^{b}	33.98 ± 1.14^{c}
2 MS	10.00 ± 0.00	10.43 ± 0.14^{a}	16.47 ± 0.52^{ab}	20.37 ± 0.81^{bc}	23.75 ± 0.84^{b}	26.82 ± 1.07^{b}	30.74 ± 1.27^{c}
P-value	ns	0.005	0.010	0.018	<0.001	<0.001	<0.001

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อจำนวนใบของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า ในสัปดาห์ที่ 0-2 จำนวนใบของชิ้นเนื้อเยื่อไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร (P>0.05) ในสัปดาห์ที่ 3-6 พบว่าจำนวนใบของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร ¼ MS มีจำนวนใบมากที่สุด และในสัปดาห์ที่ 6 จำนวนใบของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่ ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS มีค่าเท่ากับ 18.15, 12.50, 13.53 และ 13.40 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Table 3)

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อจำนวนข้อของเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า เริ่มมีความแตกต่างกันในสัปดาห์ที่ 3 โดยในสูตรอาหาร ½ MS มีจำนวนข้อมากที่สุด (P>0.05) มีค่าเท่ากับ 3.28 ข้อ/ชิ้นเนื้อเยื่อ และในสัปดาห์ที่ 4-6 พบว่า จำนวนข้อของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร ¼ MS มีจำนวนข้อมากที่สุด (P>0.05) โดยในสัปดาห์ที่ 6 จำนวนข้อของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่ ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS มีค่าเท่ากับ 8.73, 6.10, 6.68 และ 6.25 ข้อ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Table 4)

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อจำนวนรากของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ จำนวนรากเริ่มมีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหารในสัปดาห์ที่ 1 โดยพบว่าจำนวนรากของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร 2 MS มีจำนวนรากมากที่สุด (P<0.05) มีค่าเท่ากับ 0.98 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ต่อมาในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า จำนวนรากในสูตรอาหาร ¼ MS มีจำนวนรากมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 2.48 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ต่อเนื่องไปจนสิ้นสุดการทดลอง โดยในสัปดาห์ที่ 6 จำนวนรากของชิ้นเนื้อเยื่อในสูตรอาหารที่ ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS มีค่าเท่ากับ 6.53, 4.58, 4.53 และ 3.70 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Table 5)

Table 3 Explant leaf number (number/explant) of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
1/4 MS	0.00 ± 0.00	2.83 ± 0.20	5.60 ± 0.29	7.90 ± 0.35^{a}	11.00 ± 0.56^{a}	14.80 ± 0.80^{a}	18.15 ± 0.90^{a}
1/2 MS	0.00 ± 0.00	2.65 ± 0.20	5.20 ± 0.29	6.70 ± 0.30^{b}	8.20 ± 0.36^{b}	10.50 ± 0.45^{b}	12.50 ± 0.53^{b}
MS	0.00 ± 0.00	2.35 ± 0.19	4.65 ± 0.22	6.23 ± 0.20^{b}	8.83 ± 0.37^{b}	11.33 ± 0.50^{b}	13.53 ± 0.59^{b}
2 MS	0.00 ± 0.00	2.90 ± 0.22	5.10 ± 0.27	6.83 ± 0.33^{b}	8.65 ± 0.44^{b}	11.25 ± 0.59^{b}	13.40 ± 0.63^{b}
P-value	ns	0.231	0.106	0.002	<0.001	<0.001	<0.001

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

Table 4 Explant node number (number/explant) of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
1/4 MS	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.13 ± 0.06	2.88 ± 0.14^{b}	4.33 ± 0.14^{a}	6.85 ± 0.37^{a}	8.73 ± 0.39^{a}
1/2 MS	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.15 ± 0.05	3.28 ± 0.12^{a}	3.75 ± 0.09^{bc}	4.78 ± 0.24^{b}	6.10 ± 0.46^{b}
MS	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.05 ± 0.03	2.15 ± 0.11^{c}	3.95 ± 0.08^{b}	5.55 ± 0.23^{b}	6.68 ± 0.25^{b}
2 MS	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.05 ± 0.03	2.10 ± 0.07^{c}	3.48 ± 0.12^{c}	4.88 ± 0.25^{b}	6.25 ± 0.28^{b}
P-value	ns	ns	0.319	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

Table 5 Explant root number (number/explant) of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
1/4 MS	0.00 ± 0.00	0.45 ± 0.09^{b}	2.48 ± 0.27^{a}	3.55 ± 0.31^{a}	4.68 ± 0.35^{a}	5.78 ± 0.47^{a}	6.53 ± 0.46^{a}
1/2 MS	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.13^{b}	1.95 ± 0.17^{ab}	2.85 ± 0.18^{b}	3.43 ± 0.21^{b}	4.13 ± 0.18^{b}	4.58 ± 0.19^{b}
MS	0.00 ± 0.00	0.45 ± 0.10^{b}	1.33 ± 0.18^{b}	2.65 ± 0.14^{b}	3.28 ± 0.21^{b}	4.08 ± 0.28^{b}	4.53 ± 0.41^{b}
2 MS	0.00 ± 0.00	0.98 ± 0.12^{a}	1.73 ± 0.22^{b}	2.45 ± 0.15^{b}	2.75 ± 0.13^{b}	3.25 ± 0.16^{b}	3.70 ± 0.16^{b}
P-value	ns	0.003	0.003	0.002	<0.001	<0.001	<0.001

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อจำนวนยอดของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิพบว่า มีความแตกต่างกันในสัปดาห์ที่ 3 และ 5 สูตรอาหาร ¼ MS มีจำนวนยอดของชิ้นเนื้อเยื่อมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 1.38 และ 1.53 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ แต่ในสัปดาห์ที่ 0-2, 4 และ 6 ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร (P>0.05) โดยในสัปดาห์ที่ 6 ในแต่ละสูตรอาหาร ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS มีจำนวนยอดเท่ากับ 1.58, 1.35, 1.53 และ 1.58 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Table 6)

Table 6 Explant shoot number (number/explant) of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Experiment period (week)						
	0	1	2	3	4	5	6
1/4 MS	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.33 ± 0.08	1.38 ± 0.08[a]	1.38 ± 0.08	1.53 ± 0.10[a]	1.58 ± 0.10
1/2 MS	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.15 ± 0.05	1.15 ± 0.05[b]	1.18 ± 0.07	1.25 ± 0.08[b]	1.35 ± 0.12
MS	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.15 ± 0.05	1.15 ± 0.05[b]	1.15 ± 0.05	1.28 ± 0.09[ab]	1.53 ± 0.11
2 MS	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.25 ± 0.08	1.33 ± 0.08[ab]	1.35 ± 0.08	1.50 ± 0.08[ab]	1.58 ± 0.09
P-value	ns	ns	ns	0.040	0.053	0.050	0.363

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

ผลของปริมาณธาตุอาหารต่อปริมาณน้ำหนักสด-แห้งของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ ตอนเริ่มต้นการทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า น้ำหนักสด-แห้งแรกเริ่มของทุกสูตรอาหารไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า น้ำหนักสดในสูตรอาหาร ¼ MS และ ½ MS มีน้ำหนักสดมากที่สุด (P<0.05) มีค่าเท่ากับ 0.1837 และ 0.1904 กรัมน้ำหนักสด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ และน้ำหนักแห้งในสูตรอาหาร ¼ MS มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด (P<0.05) มีค่าเท่ากับ 0.0358 กรัมน้ำหนักแห้ง/ชิ้นเนื้อเยื่อ (Table 7)

Table 7 Explant weight (g) of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Initial weight		Final weight	
	Fresh weight	Dry weight	Fresh weight	Dry weight
1/4 MS	0.0123 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0000	0.1837 ± 0.0038[a]	0.0358 ± 0.0014[a]
1/2 MS	0.0123 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0000	0.1904 ± 0.003[a]	0.0284 ± 0.0004[b]
MS	0.0123 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0000	0.1658 ± 0.0026[b]	0.0273 ± 0.0004[b]
2 MS	0.0123 ± 0.0002	0.0014 ± 0.0000	0.0761 ± 0.0022[c]	0.0224 ± 0.0006[c]
P-value	ns	ns	<0.001	<0.001

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, ns is for non-significant.

จากการศึกษาผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 6 พบว่า สูตรอาหาร MS ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อต้นพรมมิ เมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่ลดปริมาณธาตุอาหารลง ¼ เท่า (¼ MS) ส่งผลทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตดีที่สุด (P<0.05) โดยผลของความสูง มีค่าเท่ากับ 45.50 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนใบเท่ากับ 18.15 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนข้อเท่ากับ 8.73 ข้อ/ชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนรากเท่ากับ 6.53 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ แต่จำนวนยอดของชิ้นเนื้อเยื่อไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร (P>0.05) (Table 8) และมีน้ำหนักสด-แห้งของเนื้อเยื่อต้นพรมมิดีที่สุด (P>0.05) จากการศึกษาของ Monfort et al. (2018) ซึ่งศึกษาผลของปริมาณธาตุอาหารที่ต่างกันในอาหารกึ่งแข็ง MS ต่อผลผลิตขององค์ประกอบสารสำคัญ (volatile fraction composition) ที่พบในต้นโหระพา (*Ocimum basilicum* L.) เมื่อเพาะเลี้ยงต้นโหระพาในอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน ได้แก่ ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS พบว่า ต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS และ ½ MS มีการเจริญเติบโตดีที่สุด และจากการศึกษาของ Assis et al. (2012) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นมะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium othonianum* Rizz) ในอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน ได้แก่ ¼ MS, ½ MS และ MS พบว่า เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร ¼ และ ½ MS มีความสูงของชิ้นเนื้อเยื่อ และความยาวใบดีกว่าในสูตรอาหาร MS และการศึกษาของ Baque et al. (2010) ที่ศึกษาผลของปริมาณ

ธาตุอาหารในอาหารกึ่งแข็ง MS ในต้นยอ (*Morinda citrifolia* L.) พบว่าสูตรอาหาร ¼ MS มีอัตราการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อ ราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของรากดีกว่าในสูตรอาหารที่มีปริมาณธาตุอาหารสูง 1.5 และ 2.0 เท่า (1.5 MS และ 2.0 MS ตามลำดับ) จากการศึกษาของ Saad and Elshahed (2012) กล่าวว่า เมื่อมีการลดปริมาณธาตุอาหารลงแต่กลับส่งผลทำให้การเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อดีขึ้น เนื่องจากอาหารกึ่งแข็ง MS เป็นอาหารที่มีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลักธาตุอาหารรองอยู่ค่อนข้างสูง รวมทั้งมีปริมาณของวิตามินและกรดอะมิโนอย่างเพียงพอต่อความต้องการของพืช (การที่พืชได้รับธาตุอาหารอย่างเพียงพอเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโต โครงสร้างของพืช การพัฒนาออร์แกนต่าง ๆ (organs) การสร้างระบบสืบพันธุ์ และการสะสมของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ซึ่งความต้องการธาตุอาหารของพืชก็จะแตกต่างกันตามแต่ชนิดของพืช (Sivakumar et al., 2005; DelCorso et al., 2014; Monfort et al., 2018)

Table 8 Explant growth of six- week -old *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths.

Treatments	Height (mm/explant)	Leaf number (numbers/explant)	Node number (numbers/explant)	Root number (numbers/explant)	Shoot number (numbers/explant)
1/4 MS	45.50 ± 2.51[a]	18.15 ± 0.90[a]	8.73 ± 0.39[a]	6.53 ± 0.46[a]	1.58 ± 0.10
1/2 MS	41.03 ± 0.77[b]	12.50 ± 0.53[b]	6.10 ± 0.46[b]	4.58 ± 0.19[b]	1.35 ± 0.12
MS	33.98 ± 1.14[c]	13.53 ± 0.59[b]	6.68 ± 0.25[b]	4.53 ± 0.41[b]	1.53 ± 0.11
2 MS	30.74 ± 1.27[c]	13.40 ± 0.63[b]	6.25 ± 0.28[b]	3.70 ± 0.16[b]	1.58 ± 0.09
P-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.363

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05.

ผลของปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันต่อความสามารถในการยับยั้งและต้านสารอนุมูลอิสระของเนื้อเยื่อต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ

ความสามารถในการยับยั้งและต้านสารต้านอนุมูลอิสระของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (Table 9) พบว่า ปริมาณ TPC ในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ (P<0.05) โดยสูตรอาหารที่มีปริมาณ TPC มากที่สุด คือ สูตรอาหาร ¼ MS มีค่าเท่ากับ 19.32 µg gallic/g ปริมาณ TFC พบว่าในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ (P<0.05) โดยสูตรอาหารที่มีปริมาณ TFC มากที่สุด คือ สูตรอาหาร ¼ MS มีค่าเท่ากับ 43.89 mg luteolin/g และพบว่าปริมาณ saponin ในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ (P<0.05) โดยสูตรอาหารที่มีปริมาณ saponin มากที่สุด คือ สูตรอาหาร MS มีค่าเท่ากับ 24,666.81 mg saponin/g

ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างสูตรอาหาร โดยในสูตรอาหาร ¼ MS, สูตร ½ MS, สูตร MS และสูตร 2 MS มีค่าเท่ากับ 88.93, 88.51, 88.62 และ 89.12% ตามลำดับ การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยสูตรอาหารที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากที่สุด คือ สูตรอาหาร ¼ MS มีค่าเท่ากับ 88.28% (Table 9)

การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (correlation analysis) ของสารต้านอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ

ผลจากการวิเคราะห์ค่า correlation พบว่าปริมาณของ TFC มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกกับปริมาณของ TPC ส่วนปริมาณของ TPC มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของ ABTS และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของ ABTS มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกกับปริมาณของ TFC และ TPC (Table 10)

ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งและต้านสารอนุมูลอิสระในชิ้นเนื้อเยื่อพรมมิ ในสูตรอาหาร ¼ MS ส่งผลให้มีปริมาณของ TPC, TFC และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีค่ามากที่สุด ส่วนปริมาณของซาโปนินพบว่า สูตรอาหารในกลุ่มควบคุม (MS) มีปริมาณของซาโปนินสูงที่สุด จากการศึกษาของ Monfort et al. (2018) ที่ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอาหารกึ่งแข็ง MS ต่อผลผลิตขององค์ประกอบ volatile fraction ที่พบในต้นโหระพา เมื่อเพาะเลี้ยงต้นโหระพาในอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มีปริมาณธาตุอาหารแตกต่างกัน ได้แก่ ¼ MS, ½ MS, MS และ 2 MS พบว่า ในสูตรอาหาร MS ที่มีการลดปริมาณธาตุอาหารลง ¼ เท่า, ½ เท่า และ MS มีผลผลิตขององค์ประกอบอยู่ 21-23 ชนิด แต่ต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เพิ่มปริมาณธาตุอาหารเป็น 2 เท่า (2 MS) มีผลผลิตของ

องค์ประกอบอยู่เพียง 15 ชนิด ซึ่งแตกต่างกับสูตรอาหารอื่น ๆ จากการศึกษาของ Wu et al. (2006) ที่ศึกษาสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงต้นเอ็กไคนาเซีย (*Echinacea angustifolia* DC.) ให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มผลผลิตทางมวลชีวภาพและปริมาณฟีนอลิกในราก พบว่า สูตรอาหาร ¼ MS และ ½ MS มีปริมาณผลผลิตของฟีนอลและฟลอโวนอยด์สูงกว่าในสูตรอาหารที่มีปริมาณมากกว่า และจากการศึกษาของ Baque et al. (2010) พบว่า ปริมาณของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิในต้นยอที่ปลูกในสูตรอาหาร ¼ MS และ 2 MS มีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น Monfort et al. (2018) กล่าวว่าปริมาณของธาตุอาหารที่พืชได้รับเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อปริมาณสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ เช่น ปริมาณของฟอสฟอรัส (phosphorus) ไนเตรต (nitrate) และคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เป็นต้น นอกจากนั้นแล้วปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างพืชกับสภาวะแวดล้อมในการเพาะปลูกเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ จากการศึกษาในข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารมากเกินไปไม่ได้ส่งผลดีต่อพืชเสมอไป และพืชแต่ละชนิดมีความต้องการธาตุอาหารในปริมาณที่แตกต่างกัน (Sivakumar et al., 2005)

Table 9 Antioxidant activities of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures with different MS strengths after 6 weeks.

Treatments	Total phenolic content (TPC) (µg gallic/g)	Total flavonoid content (TFC) (mg luteolin/g)	Total saponin content (TSC) (mg saponin/g)	DPPH (% inhibition)	ABTS (%inhibition)
1/4 MS	19.32 ± 0.32[a]	43.89 ± 0.53[a]	6,859.12 ± 459.85[b]	88.93 ± 0.77	88.28 ± 2.21[a]
1/2 MS	8.52 ± 0.04[c]	18.45 ± 0.09[b]	5,702.26 ± 88.99[b]	88.51 ± 0.17	60.89 ± 1.53[c]
MS	11.08 ± 0.29[b]	20.55 ± 2.33[b]	24,666.81 ± 720.99[a]	88.62 ± 0.20	74.81 ± 5.98[b]
2 MS	10.98 ± 0.23[b]	20.98 ± 0.73[b]	6,117.55 ± 231.68[b]	89.12 ± 0.04	69.40 ± 3.96[bc]
P-value	<0.001	<0.001	<0.001	0.712	0.006

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05.

Table 10 Correlation between different antioxidant parameters of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. grown in *in vitro* cultures after 6 weeks.

Parameter	TPC	TFC	Saponin	DPPH	ABTS
TPC	1				
TFC	0.974**	1			
Saponin	-0.145	-0.240	1		
DPPH	0.138	0.186	-0.111	1	
ABTS	0.870**	0.811**	0.133	0.132	1

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed) (Pearson correlation).

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาผลของปริมาณธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระของเนื้อเยื่อต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า สูตรอาหารที่มีการลดปริมาณธาตุอาหารลง ¼ เท่า ของสูตรอาหาร MS เป็นสูตรอาหารที่ทำให้การเจริญเติบโต ปริมาณของ TPC, TFC และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิดีที่สุด แต่ไม่พบว่าปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันส่งผลต่อจำนวนยอดของชิ้นเนื้อเยื่อต้นพรมมิ ในขณะที่ปริมาณของซาโปนินในชิ้นเนื้อเยื่อซึ่งเป็นสารประกอบหลักในต้นพรมมิในสูตรอาหารในกลุ่มควบคุม (MS) พบว่ามีปริมาณของซาโปนินสูงที่สุด

เอกสารอ้างอิง

ชาญชัย สาดแสงจันทร์. 2556. พรมมิสมุนไพรเพื่อสุขภาพสมอง. *ธรรมศาสตร์เวชสาร* 13(4): 554-560.

Assis, K. C. D., Pereira, F. D., Cabral, J. S. R., Silva, F. G., Silva, J. W., and Santos, S. C. D. 2012. *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. *Acta Scientiarum Agronomy* 34: 77-83.

Baque, M. A., Lee, E. J., and Paek, K. Y. 2010. Medium salt strength induced changes in growth, physiology and secondary metabolite content in adventitious roots of *Morinda citrifolia*: the role of antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia lyase. *Plant Cell Reports* 29: 685-694.

DalCorso G., Manara, A., Piasentin, S., and Furini, A. 2014. Nutrient metal elements in plants. *Metallomics* 10(6): 1770-1788.

Devendra, P. Shankar, S. Preeti, B., Santanu, B., Gajanan, D., and Rupesh, D. 2018. *Brahmi (Bacopa monnieri*) as functional food ingredient in food processing industry. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7(3): 189-194.

Gohil, K. J., and Patel, J. A. 2010. A review on *Bacopa monniera*: Current research and future prospects. *International Journal of Green Pharmacy* 4(1): 1-9.

Guerriero, G., Berni, R., Sanchez, J. A. M., Apone, F., Salam, E. M. A., Qahtan, A. A., Alatar, A. A., Cantini, C., Cai, G., Hausmanet, J. F., et al. 2018. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes* 9 (6): 1-22.

Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., and Ullah, I. 2012. Plant tissue culture: Current status and opportunities. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, A. Leva, and L. Rinaldi, eds. pp. 1-28. ISBN: 978-953-51-0787-3, DOI: 10.5772/52760.

Lim, Y. Y., and Murtijaya, Y. 2007. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. LWT - *Food Science and Technology* 40: 1664-1669.

Mathew, J., Paul, J., Nandhu, M. S., and Paulose, C. S. 2010. *Bacopa monnieri* and Bacoside-A for ameliorating epilepsy associated behavioral deficits. *Fitoterapia* 81: 315-322.

McCauley, A., Jones, C., and Jacobsen, J. 2011. Plant nutrient functions and deficiency and toxicity symptoms. *Nutrient Management Module* 9: 1-16.

Monfort, L. E. F., Bertolucci, S. K. V., Lima, A. F., Carvalho, A. A., Mohammed, A., Blank, A. F., and Pinto, J. E. B. P. 2018. Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. *Industrial Crops and Products* 116: 231-239.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Murthy, H. N., Lee, E. J., and Paek, K. Y. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 118: 1–16.

Nilsson, J., Pillai, D., Onning, G., Persson, C., Nilsson, A., and Akesson, B. 2005. Comparison of the 2,29-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research* 49: 239-246.

Pushkar, G., Pushkar, B., and Sivabalan, R. 2015. A review on major bioactivities of *Bacopa monnieri*. *Annals of Applied Bio-Sciences* 2(2): 1-11.

Rao, S. R., and Ravishankar, G. A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.

Saad, A. I. M., and Elshahed, A. M. 2012. Plant tissue culture media. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, A. Leva, and L. Rinaldi, eds. pp. 29-40. ISBN: 978-953-51-0787-3, DOI: 10.5772/52760.

Shirazi, O. U., Khattak, M. M. A. K., Shukri, N. A. M., and Anuar, M. N. N. 2014. Determination of total Phenolic, flavonoid content and free radical scavenging activities of common herbs and spices. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3(3): 104-108.

Sivakumar, G., Yu, K. W., and Paek, K. Y. 2005. Production of biomass and ginsenisides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. *Engineering in Life Sciences* 5(4): 333-342.

Sosa, M. D. L. M., Moroni, P., and Leary, N. O. A. 2018. Taxonomic revision of the genus *Bacopa* (Gratioleae, Plantaginaceae) in Argentina. *Phytotaxa* 336(1): 1-27.

Tewari, R. K., Kumar, P., and Sharma, P. N. 2007. Oxidative stress and antioxidant responses in young leaves of mulberry plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency. *Journal of Integrative Plant Biology* 49(3): 313-322.

Thorpe, T. A. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169-180.

Vador, N., Vador, B., and Hole, R. 2012. Simple spectrophotometric methods for standardizing Ayurvedic formulation. *Indian Journal of Phamaceutical Sciences* 74(2): 161-163.

Wu, C. H., Dewir, Y. H., Hahn, E. J., and Paek, K. Y. 2006. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Plant Biology* 49(3): 193-199.

วันรับบทความ (Received date) : 15 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 2 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

ประสิทธิผลของไทเดียซูรอน (TDZ) ต่อการเจริญเติบโตและสารสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิ

Effectiveness of Thidiazuron (TDZ) on Growth and Phytochemicals in *In vitro Bacopa monnieri* (L.) Wettst.

ปิยธิดา อุณหคงคา[1] นงนุช เลาหะวิสุทธิ์[1*] และบุปผา จงพัฒน์[1]
Piyatida Ounnahakhongkha[1], Nongnuch Laohavisuti[1*] and Buppha Jongput[1]

บทคัดย่อ

ผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำพรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.4, 1.6 และ 6.4 mg/L ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระด้วยการเติมไทเดียซูรอน (Thidiazuron, TDZ) ในอาหารกึ่งแข็ง (MS) พบว่า เมื่อครบ 6 สัปดาห์ ต้นพรมมิที่ไม่เติม TDZ ในอาหาร MS มีการเจริญเติบโตมากกว่าชุดการทดลองที่เติม TDZ (P<0.05) ส่วนต้นพรมมิที่เติม TDZ 0.1 และ 0.4 mg/L ในอาหาร MS มีเส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุก (multiple shoots) มากกว่าชุดการทดลองอื่น (P<0.05) และต้นพรมมิที่เติม TDZ 0.4 mg/L มีน้ำหนักสดและแห้งมากที่สุดซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น (P<0.05) ส่วนการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ฟีนอลิกรวม ซาโปนินรวม DPPH และ ABTS มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง (P<0.05) แต่ฟลาโวนอยด์รวม ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง (P>0.05) ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิเพื่อนำไปเป็นต้นพันธุ์ โดยใช้อาหาร MS ที่ไม่เติม TDZ มีความเหมาะสมที่สุด และการเติม TDZ 0.4 mg/L ลงในอาหารเหมาะสำหรับการผลิตและสร้างสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดต่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

คำสำคัญ: พรมมิ ไทเดียซูรอน เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยอดกระจุก สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) is an aquatic plant. The aim of this research was to study the effects of Thidiazuron (TDZ) on the growth and antioxidant activities of *B. monnieri* (L.) Wettst. tissue culture. The explants were cultured on semi-solid MS basal medium supplemented with TDZ at 0, 0.1, 0.4, 1.6 and 6.4 mg/L. The results after 6 weeks indicated that explants grown on TDZ free MS medium exhibited significantly more growth than explants grown on media containing TDZ (P<0.05). In addition, MS medium with 0.1 and 0.4 mg/L TDZ was able to induce the diameter of multiple shoots more than other treatments (P<0.05). The fresh and dry weight of explants cultured with MS medium containing 0.4 mg/L TDZ were significantly different from all other treatments (P<0.05). The antioxidant activity was examined by five methods: total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), total saponin content (TSC), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and 2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) assay. TPC, TSC, DPPH and ABTS were significantly different in all treatments (P<0.05), but TFC did not differ significantly across the treatments (P>0.05). Consequently, TDZ free MS medium was the optimal agent to stimulate plantlet propagation and MS medium with 0.4 mg/L TDZ produced appropriate antioxidant activities for medical usefulness.

Keywords: *Bacopa monnieri* (L.) Wettst., Thidiazuron, tissue culture, multiple shoots, antioxidant

คำนำ

พรมมิ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. (Sosa et al., 2018) เป็นพืชสมุนไพรที่เป็นพรรณไม้น้ำ จัดอยู่ในวงศ์ Plantaginaceae ลักษณะลำต้นมีขนาดเล็ก มีกิ่งก้านจำนวนมาก ใบเรียวรูปไข่ขนาดเล็ก ดอกสีม่วงอ่อน มักพบบริเวณพื้นดินที่ชื้นแฉะหรือมีน้ำท่วมถึง เป็นพืชพื้นเมืองของประเทศอินเดียและประเทศอื่น ๆ ในเขตร้อน (Devendra et al., 2018) สารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิ ช่วยด้านความจำ ชะลอภาวะสมองเสื่อม (Simpson et al., 2015) โรคอัลไซเมอร์ พาร์กินสัน (Garg et al., 2009) และถูกจัดเป็นยาอายุรเวทที่ใช้ประโยชน์ในทางเภสัชวิทยา เช่น ลดอาการอักเสบ บรรเทาปวด

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: nongnuch.la@kmitl.ac.th

ลดไข้ (Rai et al., 2017) ยาต้านจุลชีพ ต้านมะเร็ง และต้านโรคซึมเศร้า (Bhardwaj et al., 2016) และยังพบสารซาโปนิน (saponin) ที่มีชื่อเฉพาะเรียกว่า บาโคไซด์ (bacoside) (Mohan et al., 2011) โดย Bhattacharya et al. (2000) ได้ทดสอบสารบาโคไซด์จากต้นพรมมิในหนูทดลอง พบว่า สารบาโคไซด์ช่วยดูแลระบบประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ในหนูทดลอง ที่ปริมาณ 5 และ 10 mg/kg และยังมีการรายงานว่าพบสารประกอบฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ รวมถึงวิตามินอื่น ๆ ซึ่งมีบทบาทในการป้องกันโรคที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย เช่น โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น โดยสารกลุ่มดังกล่าวเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ หรือ สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) จึงมีความปลอดภัยกว่าสารสังเคราะห์ (อเนก หาลี และบุณยกฤต รัตนพันธุ์, 2560) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (tissue culture) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพเพื่อสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ สามารถกำหนดได้ทั้งปริมาณและคุณภาพ (Murthy et al., 2014)

Plant growth regulators (PGRs) คือ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้กระตุ้นการเจริญเติบโตและสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ โดยสารนี้พืชสามารถสร้างขึ้นเองตามธรรมชาติหรือเป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นได้เช่นกัน (Basra, 2000) Dörnenburg and Knorr (1995) กล่าวว่า ไซโตไคนิน (cytokinin) เป็นสาร PGRs ชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยสารกลุ่มนี้มีหลากหลายชนิด หนึ่งในนั้น คือ สารไทเดียซูรอน (Thidiazuron, TDZ) มีชื่อเต็มว่า N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สังเคราะห์ขึ้น มีผลึกสีเหลืองอ่อน ละลายได้ดีในเอทานอล (Murthy et al., 1998) จัดเป็นอนุพันธ์ของฟีนิลยูเรีย (phenyl urea) TDZ ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ความเข้มข้นที่นิยมใช้ประมาณ 0.22-22 mg/L (Huetteman and Preece, 1993) ประโยชน์ของ TDZ คือ ช่วยกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพืชให้พัฒนาเป็นยอด ราก แคลลัส (Malik and Saxena, 1992) TDZ ถูกนำมาใช้ชักนำให้เกิดต้นอ่อนและเพิ่มจำนวนยอดของพืชสมุนไพร Prathanturarug et al. (2005) ได้ทำการทดลองในต้น *Curcuma longa* พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหาร MS ชนิดเหลว ร่วมกับ TDZ 16 mg/L ชักนำให้เกิดยอดกระจุก (multiple shoots)ได้ และ Siddique and Anis (2007) ได้ทำการทดลองในต้น *Ocimum basilicum* โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหาร MS ชนิดเหลว ร่วมกับ TDZ 11 mg/L พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดกระจุกได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ จากงานทดลองของ Rawat et al. (2013) ที่ใช้ PGRs กลุ่มไซโตไคนิน ร่วมกับอาหาร MS ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร *Aconitum violaceum* ผลที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าสารกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดและสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิได้ ดังนั้นงานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณของ TDZ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิ ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจากต้นพรมมิ เพื่อเป็นแนวทางการเพิ่มผลผลิตและสารสำคัญจากต้นพรมมิที่ปลอดภัยเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์

วิธีการศึกษา

พรรณไม้น้ำที่ใช้ในการทดลอง

พรรณไม้น้ำพรมมิ (*B. monnieri* (L.) Wettst.) ที่ปลอดเชื้อจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิ โดยใช้อาหารกึ่งแข็ง MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 0, 0.1, 0.4, 1.6 และ 6.4 mg/L ชุดการทดลองละ 15 ซ้ำ และทดลองเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ขั้นตอนดำเนินการ

วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิ

นำต้นพรมมิปลอดเชื้อมาตัดชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อ ความยาวประมาณ 10-15 มิลลิเมตร ปลูกลงในอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มีความเข้มข้นของ TDZ ต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 0, 0.1, 0.4, 1.6 และ 6.4 mg/L ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปวางบนชั้นเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ช่วงการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน และเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตทุกสัปดาห์ ได้แก่ ความสูงต้น จำนวนกิ่ง จำนวนใบ เส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุก และจำนวนราก เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ชั่งน้ำหนักสดและนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิหลังสิ้นสุดการทดลอง

นำต้นพรมมิที่อบแห้งแล้วจากข้อ 1 มาชั่งน้ำหนักหลังอบและนำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นสแตนเลสเพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ดัดแปลงจาก Shirazi et al. (2014) และนำไปวิเคราะห์การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ total phenolic content (TPC) วิเคราะห์โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน ตามวิธี

ดัดแปลงจาก Shirazi et al. (2014), total flavonoid content (TFC) วิเคราะห์โดยใช้เควอซิทิน (quercetin) เป็นสารมาตรฐาน ตามวิธี ดัดแปลงจาก Shirazi et al. (2014) และ total saponin content (TSC) วิเคราะห์โดยใช้ซาโปนิน (saponin equivalent) เป็นสารมาตรฐาน ตามวิธี ดัดแปลงจาก Vador et al. (2012) จากนั้นทดสอบด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (ดัดแปลงจาก Shirazi et al., 2014) และ ทดสอบด้วยวิธี 2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) (ดัดแปลงจาก Leite et al., 2018)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% รวมทั้งวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation analysis) และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของข้อมูลด้วยวิธี Pearson correlation ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลของ TDZ ต่อการเจริญเติบโตในต้นพรมมิ

จากการทดลองนำชิ้นส่วนข้อของต้นพรมมิมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่เติม TDZ ต่างกัน 5 ระดับ ต่อการเจริญเติบโตของต้นพรมมิ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ความสูงของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ มีความสูงมากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนสิ้นสุดการทดลอง โดยมีความสูงของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ 0, 0.1, 1.6, 0.4 และ 6.4 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 41.1, 28.1, 20.7, 18.6 และ 16.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Figure 1 และ Table 1)

ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จนสิ้นสุดการทดลอง พบว่าจำนวนใบของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ มีใบมากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ ($P<0.05$) โดยจำนวนใบของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 0, 0.1, 0.4, 1.6 และ 6.4 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 25.1, 12.1, 10.0, 0.9 และ 0 ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Figure 2 และ Table 1) จากการสังเกตจำนวนใบของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารไม่เติม TDZ แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับความสูงต้นซึ่งเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมือนกัน

จำนวนกิ่งของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ มีกิ่งมากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 แต่สังเกตได้ว่าในสัปดาห์ที่ 3 จนสิ้นสุดการทดลอง ต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ มีจำนวนกิ่งลดลง เนื่องจากอาจมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาไปเป็นยอดกระจุก โดยจำนวนกิ่งของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 0, 1.6, 0.1, 0.4 และ 6.4 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.9, 0.3, 0.2, 0 และ 0 กิ่งต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Figure 3 และ Table 1)

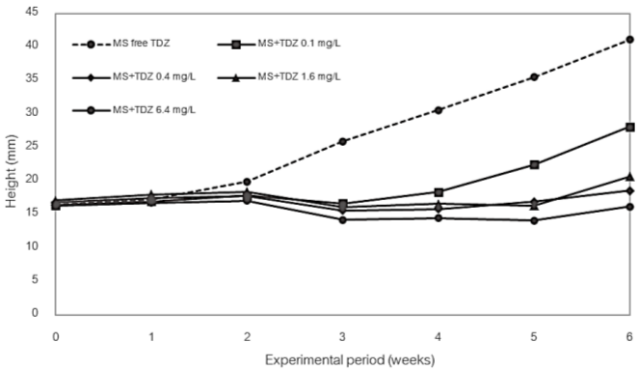

Figure 1 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. height (mm) cultured in MS added with different concentrations of TDZ.

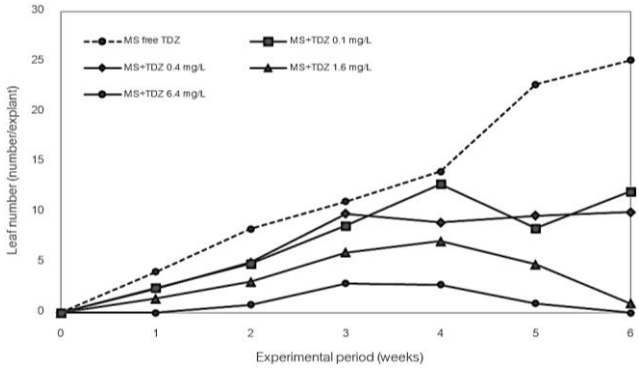

Figure 2 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. leaf number (number/explant) cultured in MS added with different concentrations of TDZ.

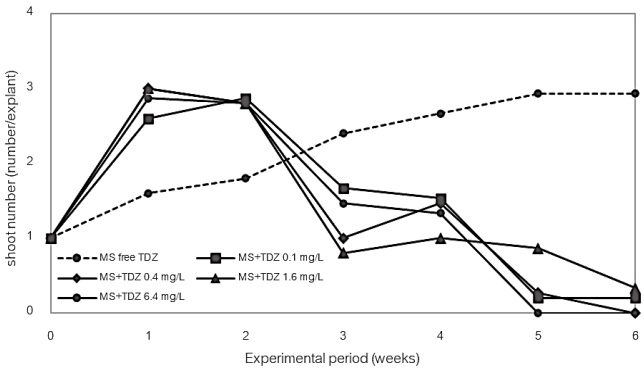

Figure 3 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. shoot number (number/explant) cultured in MS added with different concentrations of TDZ.

ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จนสิ้นสุดการทดลอง พบว่าจำนวนรากของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ มีรากมากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ ($P<0.05$) โดยจำนวนรากของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 0, 0.1, 0.4, 1.6 และ 6.4 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.6, 2.1, 0.6, 0.2 และ 0 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ จากการสังเกตจำนวนรากของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารไม่เติม TDZ สามารถเกิดรากได้มากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ ประมาณ 3 ถึง 6 เท่า (Figure 4 และ Table 1)

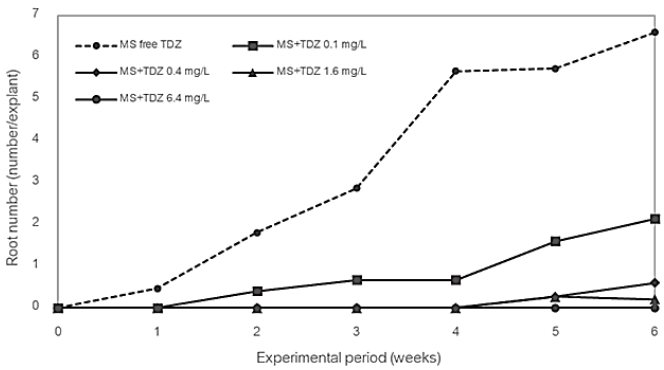

Figure 4 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. root number (number/explant) cultured in MS added with different concentrations of TDZ.

เส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุกของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ มีค่ามากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ (P<0.05) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ 0.4, 0.1, 1.6, 6.4 และ 0 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 21.5, 19.7, 15.6, 10.3 และ 0 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Figure 5 และ Table 1) ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงของยอดกระจุก ในสัปดาห์ที่ 3 มีความสัมพันธ์กับจำนวนกิ่งที่ลดลงจากการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา และเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ TDZ แต่ในขณะเดียวกันความเข้มข้นที่สูงกว่า 0.4 mg/L กลับมีเส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุกลดลง

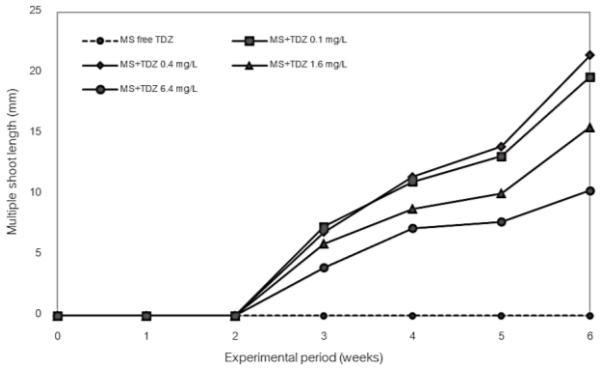

Figure 5 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. multiple shoot length (mm) cultured in MS added with different concentrations of TDZ.

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ มีความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนกิ่ง และจำนวนรากมากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ (P<0.05) แต่เส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุกของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ มากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารไม่เติม TDZ (P<0.05) ซึ่งผลของการเจริญเติบโตในสัปดาห์สิ้นสุดการทดลองเนื้อเยื่อทดลองมีเส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุกของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ 0.1 และ 0.4 mg/L มีความแตกต่างกันกับชุดการทดลองอื่น (Figure 6)

น้ำหนักภายหลังสิ้นสุดการทดลอง ได้แก่ น้ำหนักสดและแห้ง ของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ มากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารไม่เติม TDZ (P<0.05) โดยต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ 0.4 mg/L มีน้ำหนักสุดท้ายหลังสิ้นสุดการทดลองสูงที่สุด โดยน้ำหนักสดและแห้งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.3120 และ 0.0834 g (Table 2)

Figure 6 Proliferation of multiple shoots on MS medium (a) and MS medium with TDZ (0.1 mg/L) (b), TDZ (0.4 mg/L) (c), TDZ (1.6 mg/L) (d) and TDZ (6.4 mg/L) (e) after 6 weeks.

Table 1 Height, shoot number, leaf number, multiple shoot length and root number of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. cultured in MS added with different concentrations of TDZ after 6 weeks.

Concentrations (mg/L)	Height (mm)	Shoot number (number/explant)	Leaf number (number/explant)	Multiple shoot length (mm)	Root number (number/explant)
MS	41.1±2.3[a]	2.9±0.2[a]	25.1±1.5[a]	0.0±0.0[d]	6.6±0.4[a]
MS + TDZ 0.1	28.1±3.1[b]	0.2±0.1[bc]	12.1±1.8[b]	19.7±1.4[a]	2.1±0.6[b]
MS + TDZ 0.4	18.6±0.7[c]	0.0±0.0[c]	10.0±1.6[b]	21.5±0.7[a]	0.6±0.3[c]
MS + TDZ 1.6	20.7±0.4[c]	0.3±0.1[b]	0.9±0.4[c]	15.6±0.9[b]	0.2±0.2[c]
MS + TDZ 6.4	16.2±0.6[c]	0.0±0.0[c]	0.0±0.0[c]	10.3±1.0[c]	0.0±0.0[c]
F-test	*	*	*	*	*

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, * indicate whether this different is significant.

Table 2 Initial weight and final weight of *B. monnieri* (L.) Wettst. cultured in MS added with different concentrations of TDZ.

Concentrations (mg/L)	Initial weight		Final weight	
	Fresh weight (g/explant)	Dry weight (g/explant)	Fresh weight (g/explant)	Dry weight (g/explant)
MS	0.0130±0.0014	0.0013±0.0001	0.0896±0.0007[e]	0.0271±0.0002[e]
MS + TDZ 0.1	0.0130±0.0014	0.0013±0.0001	0.2824±0.0022[b]	0.0685±0.0005[b]
MS + TDZ 0.4	0.0130±0.0014	0.0013±0.0001	0.3120±0.0025[a]	0.0834±0.0007[a]
MS + TDZ 1.6	0.0130±0.0014	0.0013±0.0001	0.1673±0.0013[c]	0.0439±0.0004[d]
MS + TDZ 6.4	0.0130±0.0014	0.0013±0.0001	0.1099±0.0009[d]	0.0457±0.0004[c]
F-test	ns	ns	*	*

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, * indicate whether this different is significant, ns is for non-significant.

จากผลการทดลอง พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิในอาหาร MS ที่ไม่เติม TDZ มีความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนกิ่ง และจำนวนราก มากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ (P<0.05) ส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางยอดกระจุกในอาหารที่เติม TDZ 0.1 และ 0.4 mg/L มากกว่าชุดการทดลองอื่น (P<0.05) แสดงให้เห็นว่า การขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวนต้นพรมมิในการนำออกปลูกโรงเรือนแบบปิดโดยใช้อาหาร MS ที่ไม่เติม TDZ มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจาก TDZ คือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนิน มีฟีนิลยูเรียเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะช่วยกระตุ้นให้พืชเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์จนสามารถพัฒนาเป็นอวัยวะ เช่น ยอด ราก พัฒนาเป็นแคลลัส หรือกระตุ้นการเจริญของเซลล์ (Zhou et al., 1994) TDZ มีศักยภาพในการควบคุมเอนไซม์ cytokinin oxidase ที่มีหน้าที่ยับยั้งการสร้างสารไซโตไคนินในเซลล์เนื้อเยื่อพืช (Khan et al., 2014) ในธรรมชาติพืชจะสร้างไซโตไคนินเพื่อแบ่งเซลล์และแปรสภาพเซลล์ทำให้เกิดการเจริญเติบโต (Thomas and Katterman, 1986) เมื่อเอนไซม์ดังกล่าวถูกควบคุมด้วย TDZ จึงส่งผลให้การเกิดต้นอ่อนถูกกระตุ้นมากขึ้น (Ali et al., 2018) ในขณะที่การใช้ TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิจึงชักนำให้เกิดยอดกระจุก แต่จากการทดลอง พบว่า การใช้ TDZ ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.4 mg/L ส่งผลให้การเกิดยอดกระจุกลดลง สอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Ainsley et al. (2001) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Prunus dulcis* Mill ในอาหาร MS ร่วมกับ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโตไคนิน พบว่า ชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมดังกล่าวมีความสูงของยอดลดลง แต่ในขณะเดียวกันกลับมีการเจริญเติบโตในแนวระนาบ เรียกว่า multiple shoots และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารควบคุมให้สูงขึ้น ส่งผลให้การเกิดยอดถูกยับยั้งการเจริญเติบโตอีกด้วย

ผลของ TDZ ต่อการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิ

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำต้นพรมมิแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (Table 3) พบว่า TPC ของต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารเติม TDZ 0.4 mg/L มีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 23.3 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัม (mgGAE/g) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับชุดการทดลองอื่น การวิเคราะห์ TFC พบว่า ต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ และ เติม TDZ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) และพบว่า ต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ และเติม TDZ 0.4 mg/L มีค่าเฉลี่ย TSC เท่ากับ 60.7 และ 58.2 มิลลิกรัมซาโปนินต่อกรัม (mg saponin/g) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับชุดการทดลองอื่น

การทดสอบ DPPH เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระในต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ พบว่า DPPH ในอาหารที่เติม TDZ 0.1 และ 0.4 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 74.0 และ 81.8% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับชุดการทดลองอื่น สำหรับการทดสอบ ABTS เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระในต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่าต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ (P<0.05) โดยต้นพรมมิที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 0.1 ถึง 6.4 mg/L มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 98.8 ถึง 99.1%

Table 3 Evaluation of TDZ on TPC, TFC and TSC and efficiency of inhibition free radical on DPPH and ABTS assay in *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. after 6 weeks.

Concentrations (mg/L)	Total phenolic content (TPC) (mgGAE/g)	Total flavonoid content (TFC) (mgQE/g)	Total saponin content (TSC) (mg saponin/g)	DPPH (% Inhibition)	ABTS (% Inhibition)
MS	18.6±0.2^{b}	25.2±3.2	60.7±1.0^{a}	60.3±1.6^{b}	93.5±0.5^{b}
MS + TDZ 0.1	20.2±1.0^{b}	34.1±1.8	49.1±2.0^{b}	74.0±2.5^{a}	99.0±0.0^{a}
MS + TDZ 0.4	23.3±0.3^{a}	32.3±2.9	58.2±0.5^{a}	81.8±0.8^{a}	98.8±0.1^{a}
MS + TDZ 1.6	14.6±0.3^{c}	28.1±2.0	39.9±0.6^{c}	52.9±3.5^{bc}	99.1±0.1^{a}
MS + TDZ 6.4	13.2±1.1^{c}	34.4±1.4	44.1±2.5^{c}	47.8±5.0^{c}	99.1±0.0^{a}
F-test	*	ns	*	*	*

Mean±SE values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05, * indicate whether this different is significant, ns is for non-significant.

การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิ

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TPC กับ DPPH และ ค่า TPC กับ TSC เป็นความสัมพันธ์ในเชิงบวกซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TFC กับ ABTS เป็นความสัมพันธ์ในเชิงบวกซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และความสัมพันธ์ระหว่างค่า TSC กับ DPPH เป็นความสัมพันธ์ในเชิงบวกซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ในขณะที่ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TSC กับ ABTS เป็นความสัมพันธ์ในเชิงลบซึ่งเป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม (Table 4)

Table 4 Correlation analysis between TPC, TFC, TSC, DPPH and ABTS assay in tissue culture of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.

Parameters	TPC	TFC	TSC	DPPH	ABTS
TPC	1				
TFC	-0.043	1			
TSC	0.760**	-0.276	1		
DPPH	0.960**	0.062	0.614*	1	
ABTS	-0.118	0.532*	-0.663**	0.061	1

** Correlation is significant at P<0.01, * Correlation is significant at P<0.05.

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพรมมิในอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.1 หรือ 0.4 mg/L มีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ มากกว่าต้นพรมมิในชุดการทดลองอื่น ($P<0.05$) มีรายงานว่าการใช้พืชสมุนไพรในธรรมชาติพบสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากมีความปลอดภัยและมีผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อยมาก สารกลุ่มที่พบ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ทำลายเซลล์ร่างกายมนุษย์ได้ (Asgarirad et al., 2010) สารฟีนอลิก คือสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดย Ali et al. (2018) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพร *Ajuga bracteosa* ในอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มไซโตไคนิน เพื่อศึกษาสารประกอบทุติยภูมิ พบว่า เนื้อเยื่อสมุนไพรที่เลี้ยงในอาหารดังกล่าวถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดและมีการสร้างสารฟีนอลิกเพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์ฟีนอลิกถูกกระตุ้นให้เพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน สารต้านอนุมูลอิสระอีกประเภทก็คือ สารซาโปนิน จัดอยู่ในกลุ่มสเตียรอยด์เป็นสารประกอบประเภทเทอร์พีนอยด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ (mevalonate pathway) ซึ่งมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา (Georgiev et al., 2011) ซึ่ง Mahato (2000) ได้อธิบายถึงคุณสมบัติของสารซาโปนินที่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายมีขั้ว พบมากบริเวณใบของพืช และสารประกอบมีโครงสร้างที่ซับซ้อน โดยสารประกอบที่กล่าวมาข้างต้นล้วนมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ จากผลการทดลองครั้งนี้ยังสอดคล้องกับการรายงานของ Olszowy and Dawidowicz (2018) ที่ได้ทำการประเมินวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่า วิธี DPPH และ ABTS มีความเหมาะสมในการทดสอบเนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีความเสถียรสูง และใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ไม่นาน จึงนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่นเดียวกับ Mohan et al. (2011) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *B. monnieri* ในอาหาร MS ร่วมกับ TDZ เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์และเปรียบเทียบการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง อนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 71.17% ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานทดลองครั้งนี้ และ Ahmed et al. (2019) ได้อธิบายว่าฤทธิ์การยับยั้ง DPPH มีความสัมพันธ์กับปริมาณ TPC เนื่องจาก TPC เป็นกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่มีหน้าที่หลัก คือ ทำลายอนุมูลอิสระ (free radical) เมื่อ TPC มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะเพิ่มสูงตามไปเช่นกัน

สรุปผลการศึกษา

จากการทดลองประสิทธิผลของสาร TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสารต้านอนุมูลอิสระในต้นพรมมิ พบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อส่วนข้อของต้นพรมมิที่ไม่เติม TDZ เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนต้นในการนำไปขยายพันธุ์ และ การเติม TDZ ความเข้มข้น 0.4 mg/L ในอาหาร MS มีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เหมาะสมต่อการนำไปใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์

เอกสารอ้างอิง

อเนก หาลี และบุณยกฤต รัตนพันธุ์. 2560. การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชผักสมุนไพรพื้นบ้าน 15 ชนิด. *วารสารวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี* 2: 283-293.

Ahmed, A., Ahmed, S., Shuaib, M., Ahmed, R., Somani, N., and Sharma, A. 2019. Effect of auxin and cytokinin on regeneration, total phenolic and in vitro antioxidant activities of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. *Journal of Ayuravedic and Herbal Medicine* 5(2): 54-59.

Ainsley, P. J., Hammerschlag, F. A., Bertozzi, T., Collins, G. G., and Sedgley, M. 2001. Regeneration of almond from immature seed cotyledons. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 221-226.

Ali, H., Khan, M. A., Kayani, W. K., Khan, T., Mashwani, Z. R., Ullah, N., and Khan, R. S. 2018. Thidiazuron regulated growth, secondary metabolism and essential oil profile in shoot cultures of *Ajuga bracteosa*. *Industrial Crops & Products* 121: 418-427.

Asgarirad, H., Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., Saeidnia, S., Ebrahimzadeh, M. A., and Lotfi, F. 2010. *In vitro* antioxidant analysis of *Achillea tenuifolia*. *African Journal of Biotechnology* 9(24): 3536-3541.

Basra, A. S. 2000. *Plant Growth Regulators in Agriculture and Horticulture: Their role and Commercial Uses*. New York: Haworth Press.

Bhardwaj, P., Jain, C. K., and Mathur, A. 2016. Comparative qualitative and quantitative analysis of phytochemicals in five different herbal formulations of *Bacopa monnieri*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 8(4): 675-682.

Bhattacharya, S. K., Bhattacharya, A., Kumar, A., and Ghosal, S. 2000. Antioxidant activity of *Bacopa monniera* in rat frontal cortex, striatum and hippocampus. *Phytotherapy Research* 14: 174-179.

Devendra, P., Shankar, P. S., Preeti, B., Santanu, B., Gajanan, D., and Rupesh, D. 2018. Brahmi (*Bacopa monnieri*) as functional food ingredient in food processing industry. *Journal of Phamacognosy and Phytochemistry* 7(3): 189-194.

Dörnenburg, H., and Knorr, D. 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell culture. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 674-684.

Garg, A. N., Kumar, A., Nair, A. G. C., and Reddy, A. V. R. 2009. Elemental analysis of brahmi (*Bacopa monnieri*) extracts by neutron activation and its bioassay for antioxidant, radioprotective and anti-lipid peroxidation activity. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 281: 53-58.

Georgiev, G. I., Maslenkova, L., Ivanova, A., Lazarova, I., and Evstatieva, L. 2011. The effect of Thidiazuron (dropp) on the growth, photostnthetic activity and saponin content of Puncture vine (*Tribulus terrestris* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 25: 2362-2365.

Huetteman, C. A., and Preece, J. E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Tissue and Organ Culture* 33: 105-119.

Khan, T., Abbasi, B. H., Khan, M. A., and Shinwari, Z. K. 2016. Differental effects of Thidiazuron on production of anticancer phenolic compounds in callus cultures of *Fagonia indica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 179: 46-58.

Leite, K. C. D. S., Garcia, L. F., Lobón, G. S., Thomaz, D. V., Moreno, E. K. G., Carvalho, M. F. D., Rocha, M. L., Santos, W. T. P. D., and Gil, E. D. S. 2018. Antioxidant activity evaluation of dried herbal extracts: an electroanalytical approach. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 28(3): 325-332.

Mahato, S. B. 2000. Bioactive saponins from some plants used in Indian traditional medicine. In *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants*, W. Oleszek and A. Marston, ed. pp.13-23. Dordrecht: Springer.

Malik, K., and Saxena, P. 1992. Thidiazuron induces hight frequency shoot regeneration in intact seedlings of Pea (*Pisum sativum*), Chickpea (*Cicer arietinum*) and Lentil (*Lens culinaris*). *Australian Journal of Plant Physiology* 19(6): 731-740.

Mohan, N., Jassal, P. S., Kumar, V., and Singh, R. P. 2011. Comparative in vitro and in vivo study of antioxidants and phytochemical content in *Bacopa monnieri*. *Recent Research in Science and Technology* 3(9): 78-83.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Murthy, B. N. S., Murch, S. J., and Saxena, P. K. 1998. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 34(4): 267-275.

Murthy, H. N., Lee, E. J., and Paek, K. Y. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118: 1-16.

Olszowy, M., and Dawidowicz., A. L. 2017. It is possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compound?. *Chemical Paper* 72: 393-400.

Prathanturarug, S., Soonthornchareonnon, N., Chuakul, W., Phaidee, Y., and Saralamp, P. 2005. Rapid micropropogation of *Curcuma longa* using bud explants pre-cultured in thidiazuron-supplemented liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 347-351.

Rai, K., Gupta, N., Dharamdasani, L., Nair, P., and Bodhankar, P. 2017. *Bacopa monnieri*: a wonder drug changing fortune of people. *International Journal of Applied Science and Biotechnology* 5(2): 127-132.

Rawat, J. M., Rawat, B., Chandra, A., and Nautiyal, S. 2013. Influence of plant growth regulators on indirect shoot organogenesis and secondary metabolite production in *Aconitum violaceum* Jacq. *African Journal of Biotechnology* 12(44): 6287-6293.

Shirazi, O. U., Khattak, M. M. A. K., Shukri, N. A. M., and Nasyriq, M. N. 2014. Determination of total phenolic, flavonoid content and free radical scavenging activities of common herb and spices. *Journal of Phamacognosy and Phytochemistry* 3(3): 104-108.

Siddique, I., and Anis, M. 2007. Rapid micropropogation of *Ocimum basilicum* using shoot tip explants pre-cultured in thidiazuron supplemented liquid medium. *Biologia Plantarum* 51(4): 787-790.

Simpson, T., Pase, M., and Stough, C. 2015. *Bacopa monnieri* as an antioxidant therapy to reduce oxidative stress in the aging brain. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine Article* 2015: 1-10.

Sosa, D. L. M. M., Moroni, P., and O'Leary, N. 2018. A taxonomic revision of the genus *Bacopa* (Gratioleae, Plantaginaceae) in Argentina. *Phytotaxa* 336(1): 1-27.

Thomas, J. C., and Katterman, F. R. 1986. Cytokinin activity induced by Thidiazuron. *Plant Physiology* 81: 681-683.

Vador, N., Vador, B., and Hole, R. 2012. Simple spectrophotometric methods for standardizing ayurvedic formulation. *Indian Journal of Pharmaceutical Science* 74(2): 161-163.

Zhou, J., Ma, H., Guo F., and Luo, X. 1994. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36(1): 73-79.

วันรับบทความ (Received date) : 15 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 20 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินและการเจริญเติบโตของอ้อยโดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

Phosphorus Availability in Soil and Sugarcane Growth by Phosphate Solubilizing Bacteria

ณัฐนรี ไวมาตย์[1] เพชรดา ปินใจ[1*] และณัฐพล จิตมาตย์[1]
Natnaree Wimat[1], Pechrada Pinjai[1*] and Nattapol Jittamart[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *K. radicincitans* และ *B. subtilis* ร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมีและหินฟอสเฟตต่อความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดิน การเจริญเติบโตและผลผลิตของอ้อยในสภาพไร่ ทำการศึกษาในชุดดินทับพริก จ. สระแก้ว ผลการศึกษาพบว่า การใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตร่วมกับหินฟอสเฟตมีผลต่อการเพิ่มปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน โดยการใส่เชื้อร่วมกัน (2 ไอโซเลต) ร่วมกับการใส่หินฟอสเฟตส่งผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินสูงที่สุด การใส่เชื้อ *K. radicincitans* ส่งผลต่อการสะสมฟอสฟอรัสในอ้อยสูงที่สุด สอดคล้องกับการดูดใช้ฟอสฟอรัสของอ้อยพบว่าการใส่เชื้อ *K. radicincitans* ช่วยส่งเสริมการดูดใช้ฟอสฟอรัสในอ้อยได้สูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากตำรับควบคุมและตำรับการใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) และปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (0-0-60) การใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตส่งผลต่อน้ำหนักสดลำ แต่ไม่ส่งผลต่อความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำ และจำนวนปล้อง การใส่เชื้อแบบเดี่ยว *B. subtilis* ร่วมกับหินฟอสเฟต และการใส่เชื้อแบบร่วม 2 ไอโซเลต ทำให้อ้อยมีน้ำหนักสดลำสูงใกล้เคียงกันและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 880 และ 853 กรัมต่อลำ ตามลำดับ ส่งผลให้อ้อยมีผลผลิตเท่ากับ 12.48 และ 12.15 ตันต่อไร่ สำหรับผลต่อค่าความหวานของอ้อย พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตส่งผลดีต่อค่าความหวานของอ้อย โดยในตำรับการใส่ร่วมกันทั้ง 2 ไอโซเลต ร่วมกับหินฟอสเฟตมี %CCS สูงที่สุดคือ 14.55 %

คำสำคัญ: แบคทีเรียละลายฟอสเฟต สัดส่วนของฟอสฟอรัสในดิน การดูดใช้ฟอสฟอรัส

Abstract

This research was carried out in order to study the effects of the use of phosphate solubilizing bacteria (*K. radicincitans* and *B. subtilis*) combined with chemical fertilizers and rock phosphate on the P availability in soil, and the impact of phosphate solubilizing bacteria on the growth and yield of sugarcane under field conditions. The study was conducted in soils of the Thap Phrik soil series, in Sa Kaeo province. The results showed that the addition of bacterial isolate combined with rock phosphate resulted in the highest available P content. The application of *K. radicincitans* produced the highest accumulation of total phosphorus content and phosphorus uptake in sugarcane and these results were significantly different from the control and fertilizer applications of urea (46-0-0) and potassium chloride (0-0-60). The addition of the bacteria promoted the growth of sugarcane as measured by fresh cane weight but had no effect on height, cane diameter and no. of inter-nodes. The inoculation with a single isolate of *B. subtilis* combined with rock phosphate and combined isolates without rock phosphate resulted in the greatest cane weights of 880 g and 853 g, and led to sugarcane yields of 12.48 and 12.15 ton/rai, respectively. The inoculation of phosphate solubilizing bacteria together with rock phosphate gave higher CCS of 14.55%

Keywords: phosphorus-solubilizing-bacteria, phosphorus fraction in soil, phosphorus uptake

[1] ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
[1] Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900
*Corresponding author, Email: agrprj@ku.ac.th

คำนำ

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของอ้อย ซึ่งอ้อยต้องการธาตุฟอสฟอรัสแตกต่างกันตามระยะการเจริญเติบโต โดยต้องการมากในช่วงระยะการแตกกอและย่างปล้อง หลังจากนั้นความต้องการของฟอสฟอรัสจะน้อยลงจนกระทั่งเก็บผลผลิต แม้ว่าความต้องการธาตุฟอสฟอรัสจะน้อยลงแต่ธาตุฟอสฟอรัสก็ยังจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตตลอดระยะเวลาจนถึงช่วงเก็บผลผลิต (สมศรี บุญเรือง และคณะ, 2552) ดังนั้นฟอสฟอรัสในดินจึงควรมีในปริมาณที่เพียงพอต่อการดูดใช้ของอ้อยในระยะต่าง ๆ และอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์กับพืช หากอ้อยได้รับธาตุฟอสฟอรัสไม่เพียงพอจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของอ้อยได้ ซึ่งอ้อยที่ขาดฟอสฟอรัสจะเป็นโรคได้ง่าย แคระแกร็น โตช้า ปล้องสั้น การแตกหน่อลดลง ใบมีสีม่วง ขอบใบแห้ง การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในรูปปุ๋ยนั้นอาจเกิดปัญหาการทำปฏิกิริยากับแร่ในดินทำให้ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ยากขึ้น ส่งผลให้ฟอสฟอรัสไม่สามารถละลายออกมาเป็นประโยชน์ให้กับพืชได้ (Syers et al., 2008) โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของไอออนประจุบวกและไอออนประจุลบในปุ๋ย พีเอชในดิน และความชื้นในดิน (Bache, 1964) อย่างไรก็ตามฟอสฟอรัสในรูปที่ไม่ละลายเหล่านี้สามารถละลายออกมาเป็นประโยชน์ได้โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน ซึ่งจุลินทรีย์จะสร้างสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดไปละลายฟอสฟอรัสรูปที่ไม่ละลายให้ละลายออกมาเป็นประโยชน์แก่พืช ตัวอย่างเช่น การละลายอนินทรีย์ฟอสเฟตโดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตประสิทธิภาพสูงที่คัดแยกได้จากรอบรากข้าวโพด สามารถละลายฟอสเฟตได้โดยการผลิต Citric acid และ Oxalic acid (Sadia et al., 2002) กลไกในการละลายฟอสเฟตขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ ความเข้มข้น และชนิดของกรดที่จุลินทรีย์หลั่งออกมา ตัวอย่างจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต เช่น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas, Azospirillum, Burkholderia, Bacillus, Enterobacter, Rhizobium, Erwinia, Serratia, Alcaligenes, Arthrobacter, Acinetobacter, Flavobacterium* (Kloepper et al. 1988) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (phosphate solubilizing bacteria, PSB) ซึ่งมีบทบาทในการเปลี่ยนรูปฟอสฟอรัสที่ไม่เป็นประโยชน์ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ได้นั้น นอกจากแบคทีเรียเหล่านี้จะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวรากพืชในการดูดซับฟอสเฟตเพื่อให้พืชสามารถดูดฟอสเฟตไปใช้ประโยชน์ได้มากแล้ว (Sperberg, 1985) ยังเป็นการช่วยลดการสูญเสียฟอสฟอรัสจากการตรึงในดินได้อีกด้วย ทั้งนี้แบคทีเรียละลายฟอสเฟตมีกลไกในการละลายฟอสฟอรัสโดยอาศัยการผลิตสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดทั้งที่เป็นกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ (Illmer and Schinree, 1992) ซึ่งกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ต่าง ๆ เหล่านี้ที่หลั่งออกมาจะทำให้เกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุหรือกระบวนการคีเลชัน (chelation) ส่งผลให้ฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงในดินละลายออกมาเป็นประโยชน์ต่อพืช (Sharma et al., 2013) จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสามารถช่วยเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารและยังส่งผลทางอ้อมต่อการเจริญเติบโตของพืช ตัวอย่างเช่น Sundara et al. (2002) รายงานผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (*Bacillus megaterium* var. *Phosphaticum*) ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยในแปลงร่วมกับปุ๋ยฟอสฟอรัส single super phosphate (SSP) และหินฟอสเฟต พบว่าการใส่เชื้อร่วมกับปุ๋ยฟอสฟอรัส ทำให้อ้อยมีการแตกกอเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อจำนวนลำ น้ำหนักลำ และผลผลิตอ้อยเพิ่มขึ้น 12.6% สอดคล้องกับงานวิจัยของ ไตรธานี เยี่ยมอ่อน และคณะ (2555) พบว่าการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *B. aryabhattai* UT-KKU-26 ร่วมกับหินฟอสเฟตส่งผลต่อความสูง น้ำหนักสดลำและน้ำหนักแห้งของอ้อยเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Sadiq et al. (2013) รายงานว่าแบคทีเรีย *Enterobacter aerogenes* และ *Citrobacter freundii* เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย โดยพบว่าการใส่เชื้อช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของอ้อยสูงกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่งผลให้ความสูง จำนวนใบ ความยาวราก และน้ำหนักแห้งของอ้อยเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ Yadav et al. (2016) ได้ศึกษาผลของการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของอ้อยที่ปลูกร่วมกับการปลูกถั่ว พบการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตอัตรา 6 กิโลกรัมต่อแฮกตาร์ ส่งผลให้จำนวนหน่อ จำนวนปล้อง และผลผลิตของอ้อยสูงกว่าตำรับการทดลองที่ไม่ใส่เชื้ออีกด้วย และจากงานวิจัยของ ฉัตราภรณ์ ทองปนแก้ว (2559) ที่ศึกษาผลของการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *K. radicincitans* และ *B. subtilis* ต่อการเจริญเติบโตของอ้อยในสภาพกระถาง ผลการทดลองพบว่าการใส่เชื้อเดี่ยวและเชื้อร่วมร่วมกับการใส่หินฟอสเฟตสามารถเพิ่มความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินได้สูงกว่าตำรับควบคุม และตำรับที่ใส่เชื้อเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยด้านของความสูง น้ำหนักสดลำ จำนวนลำ ความยาวปล้อง ความยาวลำ เส้นผ่านศูนย์กลางลำ และการดูดใช้ธาตุฟอสฟอรัสของอ้อยเพิ่มขึ้นสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาต่อยอดการทดสอบในสภาพไร่เพื่อพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพต่อไป ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต *K. radicincitans* และ *B. subtilis* ต่อการละลายฟอสเฟตการเจริญเติบโตและผลผลิตของอ้อยในสภาพไร่ ทั้งนี้ก็เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์อย่างปลอดภัยและยั่งยืน

วิธีการศึกษา

การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียละลายฟอสเฟต (PSB) ที่ใช้ศึกษาจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ *Kosakonia radicincitans* (accession no. KR558720.1) และ *Bacillus subtills* (accession no. KT265078.1) ผ่านการตรวจสอบเกณฑ์การให้ระดับอันตรายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และไม่พบเป็นเชื้อสาเหตุโรคคน พืช และสัตว์ตามประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และฐานข้อมูลศูนย์ทรัพยากรชีวภาพ (ฉัตราภรณ์ ทองปนแก้ว, 2559) เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในอาหารเหลว NB ปริมาตร 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 ชม. ก่อนนำไปขยายเชื้อในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) 3,000 ml เพื่อเตรียมเซลล์ให้มีปริมาณจุลินทรีย์รับรองขั้นต่ำอย่างน้อย 10^8 CFU/ml ตามเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตของกรมวิชาการเกษตร (เพชรดา ปินใจ, 2560)

การผลิตกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ใช้ในการศึกษา

ทดสอบชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ใช้ในการศึกษา เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับประเมินรูปของฟอสฟอรัสที่สามารถละลายได้ในดิน โดยนำเซลล์เริ่มต้นของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ที่เลี้ยงในอาหาร NB ซึ่งปรับค่าความขุ่นของเซลล์แบคทีเรีย (OD_{600} = 1.0) ดูดสารละลายเซลล์เริ่มต้นปริมาณ 1 มล. ถ่ายใส่อาหารเหลว NB ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที บ่มอุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชม. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 xg เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงนำไปวิเคราะห์กรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง HPLC (Lopez and Gomez, 1996) โดยส่งวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร (IFRPD) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

การวางแผนการทดลอง

ศึกษาผลของการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดิน และการเจริญเติบโตของอ้อย ในชุดดินทัพพริก (Tpk) ณ ตำบลห้วยโจด อ. วัฒนานคร จ. สระแก้ว พิกัด 13°42'07.3"N และ 102°12'57.2"E โดยใช้อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 8 ตำรับการทดลอง 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 1) ตำรับการทดลองที่ไม่ใส่เชื้อและไม่ใส่ปุ๋ยทุกชนิด (ชุดควบคุม) 2) ตำรับทดลองที่ใส่ปุ๋ยยูเรีย 46-0-0 (N) และปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ 0-0-60 (K) 3) ตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *K. radicincitans* 4) ตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *B. subtilis* 5) ตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *K. radicincitans* ร่วมกับ *B. subtilis* 6) ตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *K. radicincitans* ร่วมกับการใส่หินฟอสเฟต 7) ตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *B. subtilis* ร่วมกับการใส่หินฟอสเฟต 8) ตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *K. radicincitans* กับ *B. subtilis* ร่วมกับการใส่หินฟอสเฟต โดยตำรับการทดลองที่ 3-8 ใส่ปุ๋ยยูเรียและปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ร่วมด้วย ฉีดพ่นเชื้อลงดินบริเวณรอบรากอ้อยหลังปลูก 10-15 วัน (ฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชก่อนปลูก) โดยฉีดพ่นในอัตรา 520 ลิตรต่อไร่ และฉีดพ่นในอัตราเดียวกันหลังอ้อยอายุครบ 1 เดือน ตามวิธีการของ ฉัตราภรณ์ ทองปนแก้ว (2559)

วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินก่อนปลูก ดัง Table 1 พบเนื้อดินเป็นดินเหนียวสีดำ มีปฏิกิริยาดินที่เป็นกรดเล็กน้อย (pH=6.40) ปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับปานกลาง (2.44%) ปริมาณไนโตรเจนต่ำ (0.12%) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในระดับสูง (23.1 mg/kg) และมีปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับสูงมาก (487 mg/kg) จากนั้นนำข้อมูลดินและทำการจำลองการปลูกพืชเพื่อคาดคะเนอัตราคำแนะนำปุ๋ยด้วย โปรแกรม DASSAT และ PDSS (เสาวนุช ถาวรพฤกษ์ และคณะ, 2557) ได้อัตราคำแนะนำปุ๋ย โดยตำรับการทดลองที่ 2-8 ใส่ปุ๋ยยูเรียและปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ โดยใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) ในอัตรา 1.74 กิโลกรัมต่อไร่ ปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (0-0-60) ในอัตรา 10.00 กิโลกรัมต่อไร่ และตำรับการทดลอง 6-8 ใส่หินฟอสเฟต (0-3-0) อัตรา 40.5 กิโลกรัมต่อไร่ การใส่ปุ๋ย ปุ๋ยยูเรียแบ่งใส่ 3 ครั้ง พร้อมปลูก เมื่ออ้อยอายุ 50-60 วัน และเมื่ออ้อยอายุ 90 วัน สำหรับปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ และหินฟอสเฟตใส่พร้อมปลูก ขนาดพื้นที่แปลงย่อยมีขนาด 7.5 × 6 ตร.ม. ปลูกอ้อย 5 แถว เก็บตัวอย่าง 3 แถวกลาง ระยะปลูกระหว่างแถว 1.5 ม. ระยะห่างระหว่างแปลงย่อย 2 ม. คิดเป็นพื้นที่รวมขนาด 30.5 × 87.5 ตร.ม. หรือ 1.66 ไร่ ปลูกอ้อยเป็นระยะเวลา 8 เดือน

Table 1 The soil chemical properties before sugarcane plantation.

Soil series	pH (1:1)	OM	Total N	Avai. P	Avai.K	Al-P	Fe-P	Ca-P
		(%)		(mg/kg)		(------- P fraction (%) ------)		
Tpk	6.40	2.44	0.12	23.1	487.1	34.08	52.52	13.41

การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ดินหลังปลูกโดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินลึก 15 เซนติเมตร นำตัวอย่างดินที่เก็บมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งตัวอย่างดินในแต่ละตำรับการทดลอง เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ได้แก่ ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน (available phosphorus) ตามวิธีของ Murphy and Riley (1962) สัดส่วนของฟอสฟอรัสในดิน ประกอบด้วย Al-P, Fe-P และ Ca-P ตามวิธีของ Kovar and Pierzynski (2009) และสุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากอ้อยสำหรับวิเคราะห์จุลินทรีย์ในดิน เพื่อนับจำนวนการอยู่รอดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดินเมื่ออ้อยอายุ 4, 6 และ 8 เดือน ตามระยะการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อย

การวิเคราะห์พืชวิเคราะห์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อพืช และการดูดใช้ฟอสฟอรัสของอ้อยที่ระยะเก็บเกี่ยว โดยเก็บตัวอย่างใบและลำต้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ บดตัวอย่างให้ละเอียดและย่อยตัวอย่างด้วยกรดไนตริกเพอร์คลอริก (HNO_3-$HClO_4$) และกรดซัลฟิวริก ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2SO_4-H_2O_2) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสด้วยวิธี Vanado-molybdate yellow color (Bray and Kurtz,1945)

การเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตเมื่ออ้อยอายุได้ 4, 6 และ 8 เดือน ได้แก่ ความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำ จำนวนปล้อง น้ำหนักสดลำ คำนวณผลผลิตต่อไร่และวิเคราะห์คุณภาพความหวานอ้อย (%CCS)

การศึกษาการอยู่รอดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดิน

ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในดินด้วยเทคนิค dilution and plating บนอาหารเฉพาะโดยนำตัวอย่างดินมาเจือจางใน 0.85% NaCl เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายดินตกตะกอน นำสารละลายดินด้านบนมาเจือจางที่ระดับการเจือจาง 10^{-1}-10^{-8} นำสารละลายดินที่ได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ โดยตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย *K. radicincitans* และ *B. subtilis* บนอาหาร NBRIP ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล (Chloramphenicol) ความเข้มข้น 20 ug/L และบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลานาน 7 วัน หลังจากนั้นสังเกตลักษณะโคโลนีและปรากฏโซนใสที่เกิดขึ้น โดยโคโลนีของเชื้อ *K. radicincitans* มีลักษณะโคโลนีมีรูปร่างกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบไม่มีรอยหักเว้า สีของโคโลนีเป็นสีเหลืองโปร่งแสงเล็กน้อย ในขณะที่ *B. subtilis* ลักษณะโคโลนีมีรูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ขอบไม่เรียบ สีของโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น ตรวจนับจำนวน และคำนวณเป็น CFU/ดินแห้ง 1 กรัม

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) เพื่อหาค่า F-test พร้อมทั้งเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT (Duncan's Multiple Range Tests) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ขึ้นไป

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การผลิตกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ใช้ในการศึกษา (*K. radicincitans* และ *B. subtilis*) พบแบคทีเรียทั้งสองสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ชนิดเดียวกัน โดยผลิตกรดอินทรีย์ได้ทั้งหมด 5 ชนิด คือ กรดแอซีติก กรดซิติก กรดแล็กติก กรดมาลิก และกรดทาร์ทาริก แต่ไม่สามารถผลิตกรดกูลโคนิกได้ ทั้งนี้แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ชนิดเดียวกันแต่มีปริมาณที่ต่างกัน ดัง Table 2 กล่าวคือ *K. radicincitans* สามารถผลิตกรดแอซีติกได้มากที่สุด รองลงมาคือ กรดซิติก และกรดแล็กติก เท่ากับ 211.0, 201.5 และ 171.5 mg/l ตามลำดับ สำหรับ *B. subtilis* สามารถผลิตกรดแอซีติกได้มากที่สุดเช่นเดียวกัน รองลงมาคือ กรดมาลิก และกรดทาร์ทาริก เท่ากับ 260.5, 200.5 และ 170.0 mg/l ตามลำดับ

Table 2 Type of organic acids produced by phosphate solubilizing bacteria.

PSB isolates	Organic acid (mg/l)					
	Acetic	Citric	Lactic	Malic	Tartaric	Gluconic
K. radicincitans	211.0	201.5	171.5	150.0	140.0	-
B. subtilis	260.5	154.0	159.0	200.5	170.0	-

การผลิตกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตนั้นมักเป็นกลไกหลักในการการละลายฟอสฟอรัสของจุลินทรีย์และรากพืช ซึ่งสามารถช่วยละลายฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงในดินในรูปต่าง ๆ ได้ เช่น Al-P, Fe-P, Ca-P เป็นต้น โดยกรดอินทรีย์ที่หลั่งออกมานั้นจะทำให้เกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุหรือปฏิกิริยาคีเลชัน (chelation) จับกับธาตุประจุบวก และทำให้ปลดปล่อยฟอสเฟตที่ถูกตรึงละลายออกมาในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้ (Poonguzhali et al., 2008; Khan et al., 2009) อย่างไรก็ตาม ปริมาณการละลายฟอสเฟตจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ปริมาณของแคลเซียม เหล็ก อะลูมินัมในดิน และยังขึ้นอยู่กับกลุ่มของกรดอินทรีย์ (กลุ่มที่ประกอบด้วย -COOH ที่มีอยู่ในกรดอินทรีย์ทุกชนิดหรือเรียกว่ากรดคาร์บอกซิลิก) ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น ซึ่งในกลุ่มของ tri-carboxylic มีประสิทธิภาพมากกว่ากรดอินทรีย์ในกลุ่ม di-carboxylic และกลุ่มของ monocarboxylic acid ตามลำดับ (Ryan et al., 2001; Adeleke et al., 2018) จากการทดลองของ Saeid et al. (2018) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 3 สายพันธุ์ (*B. megaterium B. cereus* และ *B. subtilis*) ที่บ่มในแหล่งฟอสเฟตที่ต่างกัน ได้แก่ กระดูกไก่บด (poultry bones) ขี้เถ้า (ash) ก้างปลาบด (fish bones) และหินฟอสเฟต (phosphate rock) และพบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้ชนิดเดียวกัน 5 ชนิด คือ กรดกลูโคนิก กรดแล็กติก กรดแอซีติก กรดซักซินิก และกรดโพรพิโอนิก ซึ่งแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกและกรดแอซีติกได้สูงที่สุดในทุกแหล่งฟอสเฟตที่ทดสอบ เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของปริมาณกรดทั้งหมดและปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาพบว่า *B. megaterium* ที่บ่มในก้างปลาบด (fish bones) สามารถละลายฟอสฟอรัสในรูป P_2O_5 ออกมาได้สูงที่สุดเท่ากับ 483.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นั่นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในสกุลเดียวกันสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน และมีความสามารถละลายฟอสฟอรัสจากแหล่งที่แตกต่างกันด้วย

ผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อสัดส่วนฟอสฟอรัสและความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดิน

ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเมื่ออ้อยอายุ 4, 6 และ 8 เดือน มีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละตำรับการทดลอง การใส่เชื้อและการใส่หินฟอสเฟตร่วมด้วยส่งผลต่อการละลายฟอสเฟตในดินเมื่ออ้อยอายุ 4 และ 6 เดือน (Table 3) จากตารางพบว่าปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในเดือนที่ 4 ตำรับการทดลองที่มีการใส่เชื้อร่วมกับการใส่หินฟอสเฟตมีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูงกว่าตำรับการทดลองที่ไม่ใส่หินฟอสเฟต และตำรับการทดลองที่ไม่ใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยตำรับที่มีการใส่เชื้อร่วม *K. radicincitans* + *B. subtilis* ร่วมกับการใส่หินฟอสเฟต มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูงที่สุดเท่ากับ 60.4 mg/kg รองลงมาคือ ตำรับการใส่เชื้อเดี่ยว *K. radicincitans* ร่วมกับหินฟอสเฟต และตำรับการใส่เชื้อเดี่ยว *B. subtilis* ร่วมกับหินฟอสเฟต เท่ากับ 56.0 และ 46.8 mg/kg ตามลำดับ

Table 3 Effects of phosphate solubilizing bacteria on available phosphorous in soil.

Treatment	Soil available P (mg/kg)		
	4 months	6 months	8 months
T1 Control	32.9c	25.3d	59.1
T2 N K	32.5c	26.4d	65.9
T3 *K. radicincitans*	15.5d	42.9b	46.2
T4 *B. subtilis*	16.5d	33.6c	44.3
T5 *K. radicincitans* + *B. subtilis*	28.1c	42.2b	68.2
T6 *K. radicincitans* + RP	56.0a	57.8a	82.2
T7 *B. subtilis* + RP	46.8b	44.5b	81.0
T8 *K. radicincitans* + *B. subtilis* + RP	60.4a	63.4a	99.1
F-test	**	**	ns
CV (%)	14.38	7.46	19.91

Mean in the same column of each treatments by common letter are not significantly different at 5% level by DMRT;
** = significant at 1%; ns = non-significant.

ทั้งนี้ในเดือนที่ 6 ยังคงพบว่าตำรับการทดลองที่ใส่หินฟอสเฟตมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูงกว่าตำรับที่ไม่ใส่หินฟอสเฟต โดยการใส่เชื้อร่วม *K. radicincitans* + *B. subtilis* ร่วมกับหินฟอสเฟต ส่งผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูงที่สุด สูงกว่าตำรับการใส่เชื้อเพียงอย่างเดียวและตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 63.4 mg/kg และมี

แนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพในการเกิดกิจกรรมการละลายฟอสเฟตได้สูงกว่าการใส่เชื้อเดี่ยวเพียงอย่างเดียว ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา (8 เดือน) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Vikram and Hamzeharghani (2008) รายงานว่าการเติมหินฟอสเฟตร่วมกับแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ส่งผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินสูงกว่าการเติมหินฟอสเฟตหรือปุ๋ยฟอสฟอรัสเพียงอย่างเดียว ชี้ให้เห็นว่าการเติมหินฟอสเฟตช่วยส่งเสริมกิจกรรมการละลายฟอสเฟตของแบคทีเรีย สอดคล้องกับการทดลองในกระถางหลายงานวิจัยที่พบว่าการใส่เชื้อเดี่ยวและการใส่เชื้อร่วมโดยมีการเติมหินฟอสเฟตลงไป จะส่งผลให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินสูงขึ้น และสูงกว่าในตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยการใส่เชื้อร่วมกันร่วมกับการใส่หินฟอสเฟตจะให้ผลดีกับอ้อยมากที่สุด (Walpola and Yoon, 2013) ทั้งนี้เป็นผลมาจากในดินที่มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ต่ำ เมื่อใส่เชื้อลงไปในดินจุลินทรีย์จะหลั่งกรดหรือเอนไซม์ออกมาเพื่อทำการละลายฟอสฟอรัสที่ละลายได้ง่ายก่อน ซึ่งหินฟอสเฟตเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสที่ง่ายต่อการละลายและจุลินทรีย์สามารถนำฟอสฟอรัสที่ละลายได้ไปใช้ในการสร้างพลังงาน เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการเติมหินฟอสเฟตลงไปจึงเป็นตัวกระตุ้นให้จุลินทรีย์สามารถรอดชีวิตและดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ ที่ต้องการในดิน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อพืชในเวลาต่อมา ซึ่งในเดือนที่ 8 ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเป็นไปในทิศทางเดียวกับเดือนที่ 4 และ 6 โดยตำรับการทดลองที่ใส่หินฟอสเฟตร่วมด้วยส่งผลให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินสูงกว่าในตำรับที่ไม่ใส่หินฟอสเฟตแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่าตำรับที่ใส่เชื้อร่วมส่งผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสในดินได้สูงกว่าตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อเดี่ยว ซึ่งการใส่เชื้อร่วมกันทั้ง 2 ไอโซเลตร่วมกับหินฟอสเฟต สามารถส่งเสริมการทำงานซึ่งกันและกันจึงทำให้ประสิทธิภาพการละลายฟอสฟอรัสได้สูงที่สุด เท่ากับ 99.1 mg/kg จากรายงานของ Walpola and Yoon (2013) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต 2 ไอโซเลต คือ *Pantoea agglomerans* และ *Burkholderia anthina* ร่วมกับหินฟอสเฟต พบตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อ 2 ไอโซเลต ทั้งที่มีการเติมหินฟอสเฟตและไม่เติมหินฟอสเฟต ส่งผลทำให้ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มสูงขึ้นกว่าตำรับควบคุม และตำรับที่ใส่เชื้อเดี่ยวและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Akhtar et al. (2013) พบว่าการใส่ *Rhizobium* ร่วมกับ *Bacillus* sp. ส่งผลให้ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มขึ้น 36.9% เมื่อเปรียบเทียบกับการใส่ *Bacillus* sp. เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ Kaur and Reddy (2015) ได้ศึกษาผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตร่วมกับการใส่หินฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของข้าวโพดและข้าวสาลี พบการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตร่วมกับหินฟอสเฟตส่งผลให้จำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตเพิ่มขึ้น แตกต่างจากตำรับควบคุมสอดคล้องกับความยาวราก ลำต้น และน้ำหนักแห้งของทั้งข้าวโพดและข้าวสาลีที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Sundara et al. (2002) ได้ศึกษาผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต (*Bacillus megaterium* var. *Phosphaticum*) ต่อการเจริญเติบโตของอ้อย พบว่าการใส่เชื้อร่วมกับหินฟอสเฟตและปุ๋ยฟอสฟอรัส ทำให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับที่ใส่หินฟอสเฟตและปุ๋ยฟอสฟอรัสเพียงอย่างเดียว โดยปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มสูงขึ้นทั้ง 3 ระยะการเจริญเติบโตของอ้อย (แตกกอ ยืดปล้อง สุกแก่)

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาสัดส่วนของฟอสฟอรัสในดินเปรียบเทียบดินก่อนปลูกและหลังปลูก จากการวิเคราะห์พบสัดส่วนของฟอสฟอรัสในดินก่อนปลูกซึ่งประกอบด้วย Al-P, Fe-P และ Ca-P มีปริมาณเท่ากับ 34.08, 52.52 และ 13.41% ของสัดส่วนฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน ตามลำดับ (Table 1) จะเห็นได้ว่าฟอสฟอรัสในดินส่วนใหญ่ถูกตรึงกับเหล็กและอะลูมินัมออกไซด์ ซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาดินที่เป็นกรดเล็กน้อย (pH 6.4) อาจจะมีเหล็กและอะลูมินัมออกไซด์จำนวนมากเนื่องมาจากธาตุทั้งสองเป็นองค์ประกอบของแร่พวก Goethite, Hematite หรือ Gibbsite (Parfitt, 1989) จึงเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกลายเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำยาก ซึ่งส่งผลให้แร่เหล่านี้มีความสามารถในการตรึงฟอสฟอรัสได้สูง เมื่อวิเคราะห์ดินหลังปลูกพบสัดส่วนฟอสฟอรัสในดินเปลี่ยนแปลงไป พิจารณาในตำรับการทดลองที่ 3-8 (ใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟต) จะพบสัดส่วนของ Al-P 1-2%, สัดส่วนของ Fe-P 34-58% และสัดส่วนของ Ca-P 41-64% ของสัดส่วนฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน (Figure 1) ตามลำดับ พบว่าสัดส่วนของ Ca-P เพิ่มขึ้นจากดินก่อนการทดลอง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของพีเอชดินหลังปลูก โดยตำรับที่มีการใส่และไม่ใส่หินฟอสเฟตมีสัดส่วนของ Ca-P เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันอาจเป็นผลมาจากการดูดใช้ของฟอสฟอรัสของพืชในปริมาณสูงทำให้ฟอสฟอรัสในดินที่เหลือมีน้อยลง และเมื่อพีเอชของดินเพิ่มขึ้นทำให้หลงเหลือสัดส่วนของ Ca-P ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน สำหรับสัดส่วนฟอสฟอรัสที่ถูกตรึงโดยเหล็ก (Fe-P) และอะลูมินัมออกไซด์ (Al-P) ซึ่งพบว่ามีปริมาณลดลง ชี้ให้เห็นว่าการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตมีแนวโน้มละลายฟอสเฟตในรูปอะลูมินัมฟอสเฟตและเหล็กฟอสเฟตจากการผลิตกรดอินทรีย์ทั้งหมด 5 ชนิดข้างต้น และบางส่วนจากอิทธิพลของสารเอกซูเดท (exudate) ที่พืชหลั่งออกมา ซึ่งกรดอินทรีย์หรือกรดคาร์บอกซิลิกส่วนใหญ่จะละลาย Al-P และ Fe-P (Khan et al., 2009) และประสิทธิภาพการละลายแตกต่างกันตามโครงสร้างโมเลกุลของกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก สามารถละลาย Fe/Al ได้สูงกว่า กรดออกซาลิก > กรดมาลิก > กรดทาร์ทาริก > กรดแล็กติก > กรดแอซีติก (Ryan et al., 2001) สอดคล้องกับ Henri et al. (2008) ได้ศึกษา

ประสิทธิภาพของ *Pseudomonas fluorescens* ต่อการละลายอนินทรีย์ฟอสเฟต พบแบคทีเรียสามารถละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4 \cdot H_2O$ และ $FePO_4 \cdot 2H_2O$ (ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ) และเมื่อทดสอบผลของกรดอินทรีย์ต่อการละลายฟอสเฟตพบว่ากรดซิตริกสามารถละลายอะลูมินัมฟอสเฟตและเหล็กฟอสเฟตได้สูงที่สุด รองลงมาคือ กรดมาลิก และ กรดทาร์ทาริก ตามลำดับ

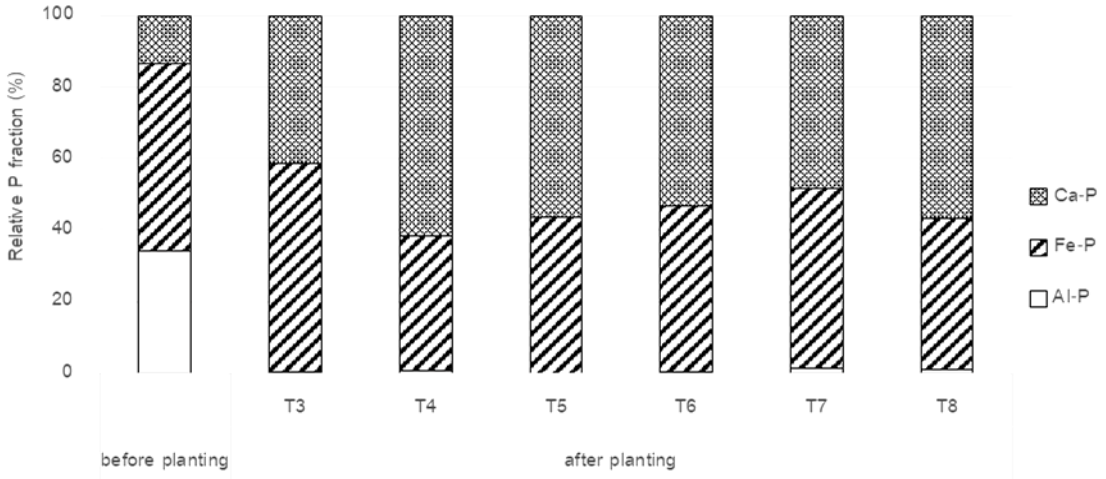

Figure 1 Percentage of fractionation phosphorus in Tpk soil series.
T1 Control, T2 N K, T3 *K. radicincitans,* T4 *B. subtilis,* T5 *K. radicincitans* + *B. subtilis,* T6 *K. radicincitans* + RP, T7 *B. subtilis* + RP, T8 *K. radicincitans* + *B. subtilis* + RP.

ผลของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการสะสมฟอสฟอรัสและการดูดใช้ฟอสฟอรัสของอ้อย

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในอ้อยและปริมาณการดูดฟอสฟอรัสของอ้อย ซึ่งประกอบด้วยส่วนของใบและลำต้น พบฟอสฟอรัสส่วนใหญ่ถูกสะสมในส่วนของใบสูงกว่าในลำต้น แต่กลับพบการดูดใช้ฟอสฟอรัสของอ้อยในส่วนของลำต้นมากกว่าใบ ดัง Table 4 โดยตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อเดี่ยว *K. radicincitans* มีปริมาณฟอสฟอรัสสะสมในใบสูงสุดเท่ากับ 455 mg/kg รองลงมาคือ ตำรับที่ใส่เชื้อเดี่ยว *B. subtilis* และตำรับที่ใส่เชื้อร่วม *K. radicincitans* + *B. subtilis* มีปริมาณฟอสฟอรัส 328 และ 303 mg/kg ตามลำดับ และการใส่เชื้อเดี่ยว *K. radicincitans* ยังสามารถช่วยสะสมปริมาณฟอสฟอรัสในลำต้นได้ ซึ่งการใส่เชื้อเดี่ยว *K. radicincitans* มีปริมาณฟอสฟอรัสสะสมในลำต้นสูงสุดเท่ากับ 280 mg/kg เมื่อพิจารณาปริมาณฟอสฟอรัสที่สะสมทั้งหมดในอ้อยพบว่า การใส่เชื้อ *K. radicincitans* ส่งผลต่อการสะสมฟอสฟอรัสในอ้อยสูงที่สุดเท่ากับ 735 mg/kg และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับผลของการใส่เชื้อต่อการดูดใช้ฟอสฟอรัสของอ้อย พบตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อส่งผลต่อการดูดใช้ฟอสฟอรัสในใบได้สูงกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างจากตำรับที่ใส่ปุ๋ยยูเรียและปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (N K) โดยตำรับที่ใส่เชื้อเพียงอย่างเดียวมีผลต่อการดูดใช้ฟอสฟอรัสในใบมากกว่าเชื้อร่วมกับหินฟอสเฟต พบตำรับที่ใส่เชื้อ *B. subtilis* และ *K. radicincitans* มีปริมาณการดูดใช้ฟอสฟอรัสในใบสูงที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 271 และ 229 มิลลิกรัมต่อต้น ตามลำดับ ในส่วนการดูดใช้ฟอสฟอรัสในลำต้น พบตำรับที่ใส่เชื้อ *K. radicincitans* ร่วมกับหินฟอสเฟต มีปริมาณการดูดใช้ฟอสฟอรัสในลำต้นสูงที่สุดเท่ากับ 703 มิลลิกรัมต่อต้น รองลงมาคือ ตำรับที่ใส่เชื้อ *K. radicincitans* เพียงอย่างเดียว เท่ากับ 670 มิลลิกรัมต่อต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใส่เชื้อ *K. radicincitans* ส่งผลต่อการดูดใช้ฟอสฟอรัสในลำต้นได้ดี พิจารณาการดูดใช้ฟอสฟอรัสทั้งหมดในอ้อยพบว่าการใส่เชื้อ *K. radicincitans* ทั้งที่ใส่และไม่ใส่หินฟอสเฟตร่วมด้วยช่วยส่งเสริมการดูดใช้ฟอสฟอรัสในอ้อยได้สูง และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากตำรับควบคุมและตำรับการใส่ปุ๋ยยูเรียและปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (N K) แสดงให้เห็นว่าการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตส่งเสริมการสะสมฟอสฟอรัสและการดูดใช้ของอ้อย ซึ่งสอดคล้องกับ ไตรธานี เยี่ยมอ่อน และคณะ (2555) ที่พบว่าการใส่แบคทีเรียละลายชนิดต่าง ๆ ทำให้อ้อยมีการสะสมฟอสฟอรัสสูงกว่าอ้อยตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ Safirzadeh et al. (2019) พบว่าการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตร่วมด้วยช่วยเพิ่มการดูดใช้ฟอสฟอรัสในอ้อยได้สูงขึ้น 161% เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับควบคุมที่ไม่ใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟต

Table 4 Effects of phosphorus solubilizing bacteria on total P accumulation and P uptake (leaves and stalk) of sugarcane for 8 months.

Treatment	Total P in plant (mg/kg)			P uptake (mg/plant)		
	Leaves	Stalk	Total	Leaves	Stalk	Total
T1 Control	248c	196cd	444c	82d	322d	404d
T2 N K	254c	187d	441c	177b	470cd	647c
T3 *K. radicincitans*	455a	280a	735a	229a	670ab	899a
T4 *B. subtilis*	328b	219bcd	548b	271a	511bc	782abc
T5 *K. radicincitans* + *B. subtilis*	303bc	248ab	551b	171bc	635abc	806ab
T6 *K. radicincitans* + RP	249c	276a	526b	123cd	703a	826a
T7 *B. subtilis* + RP	280bc	227bc	508b	151bc	598abc	749abc
T8 *K. radicincitans* + *B. subtilis* + RP	284bc	221bcd	505b	137bc	518bc	655bc
F-test	**	**	**	*	**	**
CV (%)	11.12	9.04	5.04	16.6	16.9	11.5

Mean in the same column of each treatments by common letter are not significantly different at 5% level by DMRT;
** = significant at 1%; * = significant at 5% level.

ผลของการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของอ้อย

จากการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยที่ 4, 6 และ 8 เดือน พบการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตไม่ส่งผลต่อความสูง เส้นผ่านศูนย์กลาง จำนวนปล้องของอ้อยให้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นความสูงของอ้อยในช่วงแรก (4-6 เดือน) กล่าวคือตำรับที่มีการใส่ปุ๋ยยูเรียและปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (N K) และตำรับที่ใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตมีแนวโน้มทำให้อ้อยมีความสูงมากกว่าตำรับควบคุมที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยและไม่ใส่เชื้อ เมื่อพิจารณาในแต่ละตำรับการทดลองจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าตำรับที่มีการใส่เชื้อร่วมกับหินฟอสเฟตกระตุ้นให้อ้อยมีความสูงมากกว่าการไม่ใส่หินฟอสเฟต โดยเฉพาะอย่างยิ่งตำรับที่มีการใส่เชื้อร่วมกัน 2 ไอโซเลตร่วมกับหินฟอสเฟต ทั้งนี้เมื่ออ้อยมีอายุมากขึ้น การยืดปล้องของอ้อยเริ่มลดลง เนื่องจากปัญหาการขาดน้ำของอ้อยทำให้ความสูงของอ้อยในแต่ละตำรับการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามตำรับการทดลองที่ใส่เชื้อร่วมกับหินฟอสเฟตยังคงเป็นตำรับการทดลองที่ให้ความสูงมากที่สุด (Table 5) สำหรับเส้นผ่าน-ศูนย์กลางลำ จำนวนปล้องก็เช่นเดียวกัน กล่าวคือจะมีค่าใกล้เคียงกันในทุกตำรับการทดลองและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางลำเฉลี่ยอยู่ที่ 27.1-26.2 mm และจำนวนปล้องอยู่ที่ 13.6-14.7 ปล้องต่อลำ สำหรับน้ำหนักสดลำพบการใส่เชื้อส่งผลให้น้ำหนักสดลำสูงขึ้นและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับตำรับควบคุม แต่ไม่แตกต่างกับตำรับที่มีการใส่ปุ๋ยยูเรียและปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (N K) ซึ่งสามารถให้น้ำหนักสดได้ราว 833 g นั่นแสดงให้เห็นว่าชุดดินทับพริกซึ่งเป็นชุดดินในพื้นที่ทดสอบ น่าจะมีปริมาณฟอสฟอรัสในดินที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของอ้อยในระดับหนึ่ง ทำให้อ้อยมีการตอบสนองต่อการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมที่เพียงพอจึงสามารถช่วยให้อ้อยเจริญเติบโตและมีน้ำหนักที่สูงขึ้นแม้ว่าจะไม่ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสก็ตาม อย่างไรก็ตามแม้การใส่เชื้อในทุกตำรับการทดลองจะไม่ส่งผลต่อน้ำหนักสดของอ้อยที่สูงกว่าการใส่ปุ๋ย แต่จะเห็นได้ว่าตำรับที่มีการใส่เชื้อในบางตำรับการทดลองจะให้น้ำหนักสดลำของอ้อยสูงที่สุดและสูงกว่าการใส่ปุ๋ย กล่าวคือ การใส่เชื้อ *B. subtilis* ร่วมกับหินฟอสเฟตส่งผลให้อ้อยมีน้ำหนักสดลำสูงที่สุด เท่ากับ 880 g ซึ่งสอดคล้องกับผลความสูงของอ้อย รองลงมาคือการใส่เชื้อร่วมกัน (*K. radicincitans* + *B. subtilis*) และการใส่เชื้อ *K. radicincitans* ร่วมกับหินฟอสเฟตให้น้ำหนักสดลำ เท่ากับ 853 g และ 840 g ตามลำดับ ทั้งนี้ด้านของการให้ผลผลิต (ตันต่อไร่) พบการใส่เชื้อไม่ส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิตของอ้อยเมื่อเทียบกับตำรับควบคุม โดยตำรับที่ใส่ปุ๋ยยูเรียและปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (N K) ส่งผลต่อผลผลิตตันต่อไร่สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามการใส่เชื้อเดี่ยว *K. radicincitans* ร่วมกับหินฟอสเฟตยังสามารถให้ผลผลิตสูงที่สุด คือ 12.6 ton/rai รองลงมาคือการใส่เชื้อร่วมกัน (*K. radicincitans* + *B. subtilis*) และ การใส่เชื้อเดี่ยว *B. subtilis* ร่วมกับหินฟอสเฟต ให้ผลผลิตเท่ากับ 12.5 และ 12.2 ton/rai ตามลำดับ สำหรับผลต่อค่าคุณภาพความหวานของอ้อย พบการใส่เชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตส่งผลดีต่อค่าความหวานของอ้อย โดยในตำรับการใส่เชื้อร่วมกัน (*K. radicincitans* + *B. subtilis*)

ร่วมกับหินฟอสเฟตมี %CCS สูงที่สุดคือ 14.6% และในตารางจะเห็นได้ว่าการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตส่งผลต่อความหวานของอ้อยที่สูงกว่าตำรับควบคุมและตำรับที่มีการใส่ปุ๋ย ยกเว้นการใส่เชื้อ *B. subtilis* ร่วมกับหินฟอสเฟต

Table 5 Effect of phosphate solubilizing bacteria on height, stalk weight, stalk diameter, no. of internode, yields (ton/rai) and %CCS.

Treatment	Height (cm)			Stalk weight (g)	Stalk Diameter (mm)	No. of internode	Yield (ton/rai)	% CCS
	4	6	8					
	(-------- months --------)							
T1 Control	91.4b	106.2c	153.5	547b	26.3	14.3	11.0	12.4
T2 N K	105.9ab	137.5ab	161.6	833a	26.8	15.8	13.2	12.4
T3 *K. radicincitans*	107.0a	150.2ab	160.8	793a	26.9	14.0	11.8	13.6
T4 *B. subtilis*	105.9ab	140.2ab	153.8	773a	25.9	14.7	10.4	13.2
T5 *K. radicincitans* + *B. subtilis*	110.0ab	155.0ab	164.5	853a	27.1	13.8	12.5	12.6
T6 *K. radicincitans* + RP	112.4a	153.0ab	162.0	840a	26.6	13.6	12.6	12.9
T7 *B. subtilis* + RP	112.3a	155.9a	164.6	880a	26.7	14.7	12.2	11.4
T8 *K. radicincitans* + *B. subtilis* + RP	106.0ab	157.0a	161.6	780a	26.6	14.3	11.5	14.6
F-test	*	*	ns	*	ns	ns	ns	ns
CV (%)	9.91	7.33	6.96	15.3	3.34	8.94	20.9	9.4

Mean in the same column of each treatments by common letter are not significantly different at 5% level by DMRT;
* = significant at 5% level; ns = non-significant.

การอยู่รอดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในสภาพไร่

แบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ใส่ลงไปมีจำนวนลดลงเมื่ออ้อยอายุมากขึ้น เมื่ออ้อยอายุ 4 เดือน พบว่าตำรับการใส่เชื้อแบบเดี่ยว *K. radicincitans* เมื่อเทียบกับการใส่เชื้อแบบเดี่ยว *B. subtilis* จะมีอัตราการอยู่รอดใกล้เคียงกัน การใส่หินฟอสเฟตร่วมด้วยจะมีจำนวนการอยู่รอดเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เช่นเดียวกับการใส่เชื้อร่วมกัน (*K. radicincitans* + *B. subtilis*) ซึ่งมีอัตราการอยู่รอดใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามพบว่าตำรับที่มีการใส่เชื้อร่วม (*K. radicincitans* + *B. subtilis*) ร่วมกับหินฟอสเฟตมีจำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตสูงที่สุด เท่ากับ 54.2×10^4 CFU/g dry soil เมื่ออายุ 6 เดือน พบแบคทีเรียละลายฟอสเฟตมีจำนวนลดลงต่ำลงมาถึง 10^4 CFU/g dry soil ทั้งนี้ตำรับการทดลองที่ใส่หินฟอสเฟตส่งผลดีต่อจำนวนการอยู่รอดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟต ทั้งการใส่เชื้อแบบเดี่ยวและการใส่เชื้อแบบร่วมกัน (Figure 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yu et al. (2011) รายงานว่า การเติมหินฟอสเฟตจะทำให้จำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตและฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตำรับที่ใส่มีการเชื้อแบบเดี่ยว *B. subtilis* ร่วมกับการใส่หินฟอสเฟต มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ใส่ลงไปสูงที่สุด เท่ากับ 17.1×10^4 CFU/g dry soil ทั้งนี้ เมื่ออ้อยอายุ 8 เดือน จำนวนแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่ใส่ลงไปในดินมีจำนวนน้อยกว่า 30 โคโลนี จึงไม่สามารถนำมาคำนวณจำนวนของแบคทีเรียได้ ถือได้ว่าแบคทีเรียไม่สามารถอยู่รอดได้นั่นเอง ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองในกระถางก่อนหน้านี้ ซึ่งฉัตราภรณ์ ทองปนแก้ว (2559) รายงานว่า แบคทีเรียละลายฟอสเฟตมีจำนวนลดลงในทุกตำรับการทดลองเหลือประมาณ 10^3 CFU/g day soil เมื่อเปรียบเทียบกับการใส่เชื้อพร้อมปลูก 10^8 CFU/g day soil เมื่ออ้อยอายุ 8 เดือน อย่างไรก็ตามตำรับที่มีการใส่หินฟอสเฟตร่วมด้วยพบการอยู่รอดของแบคทีเรียสูงกว่าตำรับการทดลองที่ไม่ใส่หินฟอสเฟต จะเห็นได้ว่ารูปแบบการใส่ปุ๋ยอาจมีผลต่อจำนวนการอยู่รอดของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตด้วย ทั้งนี้การลดลงของแบคทีเรียโดยทั่วไปมักเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อม สมบัติของดิน และตัวจุลินทรีย์เอง เนื่องจากในสภาพแวดล้อมจุลินทรีย์มีการแก่งแย่งอาหาร พลังงาน ที่อยู่อาศัย และปัจจัยในการดำรงชีวิตอื่น ๆ เพิ่มขึ้น ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียที่ใส่ลงไปจะสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้มากแค่ไหน

จุลินทรีย์ก็จะยิ่งแข่งขันกันมากขึ้นเพื่อให้ได้มาซึ่งปัจจัยการดำรงชีวิต ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงทั้งสมบัติดิน สภาพแวดล้อมบริเวณรอบรากพืชตามระยะการเจริญเติบโตของพืชย่อมส่งผลต่อแบคทีเรียที่ใส่ลงไป (Indi et al., 2014) ซึ่งเป็นไปได้ว่าในช่วงที่อ้อยอยู่ในช่วงสุดท้ายของการเจริญเติบโตและเก็บผลผลิตนั้นมีการเปลี่ยนแปลงของสรีรวิทยาของพืช ความต้องการธาตุอาหารรวมทั้งสารที่หลั่งออกมาจากรากพืช จึงส่งผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตน้อยลง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีในดินให้เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้

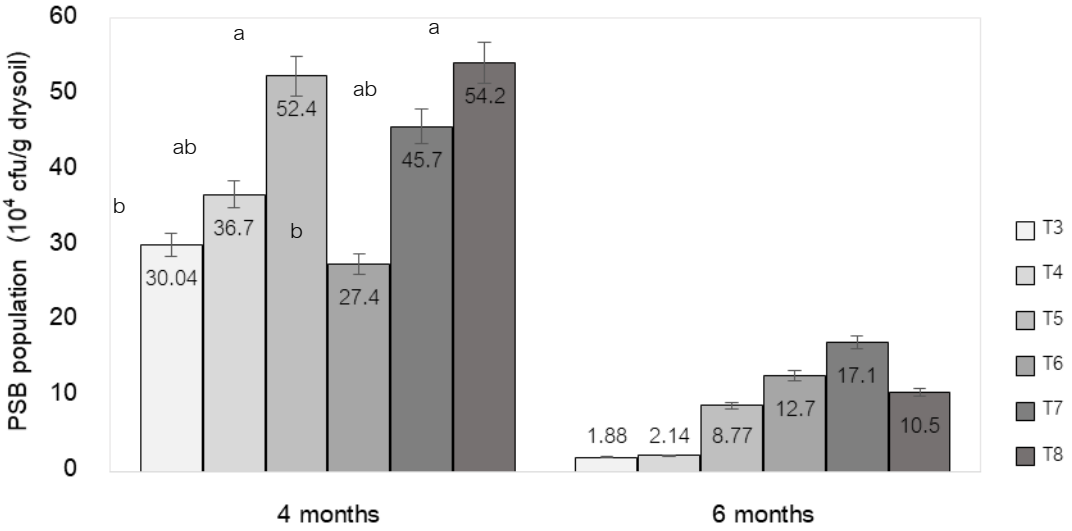

Figure 2 Number of phosphate solubilizing bacteria in soil (4 and 6 months).
T1 Control, T2 N K, T3 *K. radicincitans,* T4 *B. subtilis,* T5 *K. radicincitans* + *B. subtilis,*
T6 *K. radicincitans* + RP, T7 *B. subtilis* + RP, T8 *K. radicincitans* + *B. subtilis* + RP.

สรุปผลการศึกษา

แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *K. radicincitans* และ *B. subtilis* สามารถผลิตกรดอินทรีย์ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ กรดแอซีติก กรดซิติก กรดแล็กติก กรดมาลิก และกรดทาร์ทาริก ซึ่งทั้ง 2 ไอโซเลตผลิตกรดแอซีติกได้มากที่สุด และพบว่าการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตสามารถช่วยเพิ่มปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินได้ โดยการใส่เชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่มีการใส่หินฟอสเฟตร่วมด้วย มีผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินสูง และการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตยังสามารถส่งเสริมการสะสมฟอสฟอรัสทั้งหมดและการดูดใช้ของอ้อยได้ โดยการใส่เชื้อ *K. radicincitans* ส่งผลให้อ้อยสะสมฟอสฟอรัสและการดูดใช้ฟอสฟอรัสได้ดี สำหรับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยพบการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตส่งผลต่อน้ำหนักสดลำอ้อย แต่ไม่ส่งผลต่อความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำ จำนวนปล้อง ผลผลิต (ตันต่อไร่) โดยการใส่แบคทีเรียละลายฟอสเฟตแบบเชื้อเดี่ยว *B. subtilis* ร่วมกับการใส่หินฟอสเฟต จะส่งผลต่อความสูงของอ้อยมากที่สุด เช่นเดียวกับน้ำหนักสดลำ ทั้งนี้พบว่าการใส่หินฟอสเฟตร่วมด้วยส่งผลดีต่อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต โดยการใส่ *K. radicincitans* แบบเชื้อเดี่ยวหรือการใส่เชื้อร่วมกับ *B. subtilis* ให้ผลดีกับอ้อยและฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินมากขึ้น ในขณะที่ *B. subtilis* เหมาะสำหรับการใส่เชื้อเดี่ยวมากกว่าการใส่เชื้อร่วม

กิตติกรรมประกาศ

บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง “ศักยภาพของการใช้แบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการละลายฟอสเฟตในดินและการเพิ่มเจริญเติบโตและผลผลิตของอ้อยในจังหวัดสระแก้ว” ซึ่งได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปีงบประมาณ 2560 และขอขอบคุณโรงงานอ้อยและน้ำตาลตะวันออก (มหาชน) จำกัด อ. วัฒนานคร จ. สระแก้ว ที่ให้การสนับสนุนพื้นที่วิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ฉัตราภรณ์ ทองปนแก้ว. 2559. การคัดเลือกและศักยภาพของแบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการเจริญเติบโตของอ้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ไตรธานี เยี่ยมอ่อน, นันทวัน ฤทธิ์เดช, ประสิทธิ์ ใจศิล และโสภณ บุญลือ. 2555. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยด้วยแบคทีเรียละลายฟอสเฟตในสภาพเรือนทดลอง. *แก่นเกษตร* 3 (พิเศษ): 185-193.

เพชรดา ปินใจ, เสาวนุช ถาวรพฤกษ์, ณัฐพล จิตมาตย์, ทิมทอง ดรุณสนธยา, สุรเชษฎ์ อร่ามรักษ์, รัฐนนท์ เจริญชาศรี, มิตรา วัฒนา, กรรณิการ์ หอมยามเย็น, ดวงใจ วัยเจริญ และเบญจลักษณ์ วังไธสง. 2560. ศักยภาพของการใช้แบคทีเรียละลายฟอสเฟตต่อการละลายฟอสเฟตในดินและการเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตของอ้อยในจังหวัดสระแก้ว. ใน *รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ (โครงการย่อยที่ 2) การเพิ่มประสิทธิภาพการจัดการธาตุอาหารพืชตามดัชนีผลิตภาพดินเพื่อเพิ่มผลผลิตอ้อยในจังหวัดสระแก้ว*. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

สมศรี บุญเรือง, รังสิมันต์ สัมฤทธิ์ และคมณัฏฐ์ ธีระนุกูล. 2552. *การปลูกอ้อย: เอกสาร คำแนะนำ ที่ 159*. กรมส่งเสริมการเกษตร สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร, กรุงเทพฯ.

เสาวนุช ถาวรพฤกษ์, ณัฐพล จิตมาตย์, ทิมทอง ดรุณสนธยา, สุมิตรา วัฒนา, ดวงใจ วัยเจริญ, กรรณิการ์ หอมยามเย็น, รัฐนนท์ เจริญชาศรี และราชัน เลิศพยัคฆ์รัตน์. 2557. การจัดชั้นสมรรถนะความอุดมสมบูรณ์และศักย์ผลิตภาพของดินที่ใช้ปลูกอ้อยในภาคตะวันออกของประเทศไทย. ใน *รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ (โครงการย่อยที่ 1) ภายใต้แผนงานวิจัยการพัฒนาดัชนีคุณภาพและผลิตภาพของดินเพื่อการผลิตอ้อยในภาคตะวันออกของประเทศไทย*. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

Adeleke, R., Nwangburuka, C., and Oboirien, B. 2017. Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review. *South African Journal of Botany* 108: 393-406.

Akhtar, N. I., Arshad, M. A., Shakir, M. A., Qureshi, J., and Sehrish, A. L. 2013. Co-inoculation with Rhizobium and Bacillus sp. to improve the phosphorus availability and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Animal and Plant Sciences* 23: 190-197.

Bachchhav, S. 2005. Fertigation technology for increasing sugarcane production. *Indian Journal of Fertilisers* 1: 85-89.

Bache, B. W. 1964. Aluminum and iron phosphate studies related to soils. II Reaction between phosphates and hydrous oxides. *European Journal of Soil Science* 15: 110-116.

Bray, R. H., and Kurtz, L. T. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59: 39-45.

Henri, F., Laurette, N. N., Annette, D., John, Q., Wolfgang, M., François-Xavier, E., and Dieudonne, N. 2008. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of Pseudomonas fluorescens isolated from acidic soils of Cameroon. *African Journal of Microbiology Research* 2: 171-178.

Illmer, P. A., and Schiner, F. 1992. Solubilization of inorganic phosphate by microorganism isolate from forest soil. *Soil Biology Biochemistry Journal* 24: 389-395.

Indi, D., Nalawade, S. V., Deshmukh, S. U., and Pawar, S. M. 2014. Response of sugarcane varieties to nitrogen and phosphorus as inoculated by gluconacetobacter diazotrophicus and PSB. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 3: 260-269.

Kaur, G., and Reddy, M. S. 2015. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. *Pedosphere* 25: 428-437.

Kloepper, J. W., Lifshitz, K., and Schroth, M. N. 1988. Pseudomonas inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas of Science Animal and Plant Sciences* 1: 60-64.

Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, S. M., Navi, S. M. S., and Rasheed, M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Science* 1: 48-58.

Lopez, E. F., and Gomez, E. F. 1996. Simultaneous determination of the major organic acids, sugars, glycerol, and ethanol by HPLC in grape musts and white wines. *The Journal of Chromatographic Science* 34: 254-257.

Murphy, J., and Riley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36.

Parfitt, R. L. 1989. Phosphate reactions with natural allophane, ferrihydrite and goethite. *The European Journal of Soil Science* 40: 359-369.

Ryan, P. R., Delhaize, E., and Jones, D. L. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 527-560.

Poonguzhali, S., Madhaiyan, M., and Sa, T. 2008. Isolation and identification of phosphate solubilizing Bacteria from Chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 773-777.

Sadia, A., Samina, K., Najma, A., and Maliha, R. 2002. In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology* 4: 454-458.

Sadiq, H. M., Jahangir, G. Z., Nasir, I. A., Iqtidar, M., and Iqbal, M. 2013. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from rhizosphere soil. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 27: 4248-4255.

Saeid, A., Prochownik, E., and Dobrowolska-Iwanek, J. 2018. Phosphorus solubilization by bacillus species. *Molecules* 23: 2897.

Safirzadeh, S., Chorom, M., and Enayatizamir, N. 2019. Effect of phosphate solubilising bacteria (*Enterobacter cloacae*) on phosphorus uptake efficiency in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Soil Research* 57(4): 333-341.

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi M. H., and Gobi, T. A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2: 587-600.

Sperberg, J. I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research* 9: 778-781.

Sundara, B., Natarajan, V., and Hari, K. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yield. *Field Crop Research* 77: 43-49.

Syers, J. K., Johnston, A. E., and Curtin, D. 2008. *Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use*: *Reconciling changing concepts of soil phosphorus behaviour with agronomic information.* Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations.

Vikram, A., and Hamzeharghani, H. 2008. Effect of Phosphate solublizing bacteriaon nodulation and growth parameters of greengram (*Vigna Radiata* L. wilezek.). *Research Journal of Microbiology* 3: 62-72.

Walpola, B. C., and Yoon, M. H. 2013. Phosphate solubilizing bacteria: Assessment of their effect on growth promotion and phosphorous uptake of mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). *Chilean Journal of Agricultural Research* 73: 275-281.

Yadav, S. P., Kuma, A., Yadav, S., Singh, A. K., Tiwari, A. K., and Ram, B. 2016. Yield, quality and nutrient uptake in autumn sugarcane as influenced by phosphorus levels and inoculation of phosphate solubilizing bacteria in legume based intercropping systems. *Indian Journals* 5: 63-65.

Yu, X., Liu, X., Zhu, T., Liu, G., and Mao, C. 2011. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biology and Fertility of Soils* 47: 437-446.

วันรับบทความ (Received date) : 20 ก.พ. 63

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 1 พ.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 20 พ.ค. 63

คัดเลือกและจำแนกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการย่อยสารเคมีไซเพอร์เมทริน ที่ตกค้างในดินทางการเกษตร

Isolation and Identification of Beneficial Bacteria Degrading Cypermethrin in Agricultural Soil

ฟ้าไพลิน เกียรติชัยภา[1] ดุสิต อธินุวัฒน์[1] และวิลาวรรณ์ เชื้อบุญ[1*]
Faphailin Kiatchaipha[1], Dusit athinuwat[1] and Wilawan Chuaboon[1*]

บทคัดย่อ

แบคทีเรียที่มีประโยชน์ 2 ไอโซเลท จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลท จากดินที่ปนเปื้อนสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์ นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเคมีไซเพอร์เมทริน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทดสอบด้วยวิธีอาหารพิษ และประสิทธิภาพการย่อยสลายสารเคมีไซเพอร์เมทรินในสภาพดินจำลอง พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท SP-TU-C และไอโซเลท SP-TU-D สามารถเจริญได้ดีบนอาหารพิษ โดยมีขนาดความกว้างโคโลนีเท่ากับ 2.65 และ 2.15 เซนติเมตร ตามลำดับ รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเคมีในสภาพดินจำลอง โดยสามารถย่อยสลายสารเคมีให้อยู่ในระดับปลอดภัยได้ภายใน 7 วัน จำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการ พบว่าแบคทีเรีย ไอโซเลท SP-TU-C และ SP-TU-D มีความเหมือนกับ *Pseudomonas fluorescens* และ *Paenibacillus popilliae* ตามลำดับ

คำสำคัญ: สารเคมีตกค้าง ไพรีทรอยด์ แบคทีเรียที่มีประโยชน์

Abstract

Two of four isolates of beneficial bacteria were screened for their ability to degrade residues of the pyrethroid insecticide cypermethrin that was contaminating soil. The research was of a completely randomized design. The bacterial isolates of SP-TU-C and SP-TU-D were found to be able to grow well on cypermethrin contaminated media and formed colonies of diameter sizes 2.65 and 2.15 cm, respectively. Furthermore, it was found that isolates SP-TU-C and SP-TU-D were able to effectively degrade permethrin residues in simulated soil. They were able to reduce chemical residues in the soils to safe levels within 7 days of testing when compared to controls. The isolates SP-TU-C and SP-TU-D were classified by testing of their morphological, physiological, and biochemical characteristics, and they were found to be similar to *Pseudomonas fluorescens* and *Paenibacillus popilliae,* respectively.

Keywords: chemical residues, pyrethroid, beneficial bacteria

คำนำ

ปัจจุบันเกษตรกรในประเทศต่าง ๆ ได้ใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์กันอย่างแพร่หลายในปริมาณเพิ่มมากขึ้นทุกปี เป็นผลให้สารเหล่านี้นอกจากจะมีสะสมในผลผลิตทางเกษตรกรรมต่าง ๆ แล้ว ยังมีพบสะสมในสิ่งแวดล้อมเป็นจำนวนมากด้วย โดยทั่วไปสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์เป็นสารเคมีที่เป็นพิษ สลายตัวได้ยากหรือช้า ความสามารถในการเกิดพิษจึงมีอยู่ได้เป็นระยะเวลานานทำให้เกิดผลเสียหลายประการ โดยเฉพาะเกิดการเสื่อมคุณภาพของดินและยังอาจทำลายจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่อการรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดินอีกด้วย (สุธาสินี อั้งสูงเนิน, 2558) การที่ดินมีสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ สะสมในปริมาณมากและเป็นเวลานาน ทำให้ความสมบูรณ์ของดินลดน้อยลง เมื่อเป็นเช่นนี้นาน ๆ ส่งผลทำให้พื้นที่เหล่านี้ไม่เหมาะสมสำหรับการเพาะปลูกหรือเกิดการเสื่อมคุณภาพของดินในที่สุด (เปรมจิตร บุญสาย, 2556) สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มไพรีทรอยด์ เป็นสารที่ถูกนำมาใช้ในการทำเกษตร ไพรีทรอยด์เป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายสารไพรีทรินส์ที่สกัดมาจากดอกเบญจมาศ ตระกูล Chrysanthemum สารไพรีทรินส์เป็นสารกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงปลอดภัยในการใช้ มีพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำ แต่ด้วยคุณสมบัติที่ไม่ทนต่อแสงของสารนี้จึงมีการผลิตสารไพรีทรอยด์

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12121
[1] Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University Rangsit Campus, Khlong Luang, Pathumthani 12121
*Corresponding author, Email: wchuaboon@gmail.com

สังเคราะห์ขึ้นแทนเนื่องจากทนต่อแสงได้นานกว่า สารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ในการกำจัดแมลงโดยเกิดพิษที่ระบบประสาทของแมลง แต่สำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งมนุษย์พบว่าเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงและถูกขับถ่ายออกโดยไม่สะสมในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย สารในกลุ่มนี้ เช่น อัลเลทริน (allethrin) ไบโออัลเลทริน (bioallethrin) ไบโอเรสเมทริน (bioresmethrin) ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin) เพอร์เมทริน (permethrin) และไซฟลูทริน (cyfluthrin) เป็นต้น (ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2562)

ซึ่งจากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นทำให้การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและจำแนกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการย่อยสารเคมีไซเพอร์เมทรินที่ตกค้างในดินทางการเกษตร เพื่อประโยชน์ในการฟื้นฟูและรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน

วิธีการศึกษา

เก็บและแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการย่อยสลายสารเคมีไซเพอร์เมทรินตกค้างในดินทางการเกษตร

สุ่มเก็บผิวหน้าดิน 20 จุดกระจายทั่วแปลงปลูกพืช ในพื้นที่ อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี เลือกเก็บดินจากแปลงผลิตพืชที่มีประวัติการใช้สารเคมีต่อเนื่องยาวนานกว่า 15 ปี ทำการสัมภาษณ์เจ้าของแปลงเพื่อสอบถามประวัติการใช้สารเคมีก่อนเก็บตัวอย่างดิน โดยขุดลึกประมาณ 1-15 นิ้ว แล้วจึงนำตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บได้ในแต่ละจุดในแปลงเดียวกันคลุกเคล้าให้เข้ากัน โดยน้ำหนักรวมของดินเท่ากับ 1 กิโลกรัม (เปรมจิตร บุญสาย, 2556) ทำการสุ่มตัวอย่างดินทั้งหมด 6 แปลง จากนั้นสุ่มดินจากแต่ละตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ โดยสุ่มตัวอย่างมา 100 กรัม เติมสารเคมีในกลุ่มไพรีทอยด์ โดยการทดลองนี้ใช้ไซเพอร์เมทริน (ซุปเปอร์ทรอยด์ 35® ปริมาณสารออกฤทธิ์ไซเพอร์เมทริน 35%) เป็นตัวแทนลงไปในดิน (ตามอัตราแนะนำ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร) ปริมาตรที่เติมลงไปในดิน 100 กรัม เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีดัดแปลง Dilution plate method จากวิลาวรรณ์ เชื้อบุญ (2551) นำเชื้อที่ได้ไปกระจายให้ทั่วผิวหน้าอาหาร glucose nutrient agar (NGA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±3 องศาเซลเซียส) นาน 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร นำโคโลนีทั้งหมดที่เจริญ streak บนอาหาร NGA เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการย่อยสลายสารเคมีไซเพอร์เมทริน

การเตรียมแบคทีเรียที่มีประโยชน์

เลี้ยงเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1 ในอาหาร nutrient glucose broth (NGB) เขย่า 120 รอบ/นาที นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นปรับระดับความเข้มข้นประมาณ $1x10^8$ โคโลนี/มิลลิลิตรหรือที่ค่า O.D. 0.2 ด้วย spectrophotometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV18002.2

อาหารพิษ (poisoning medium)

ผสมสารเคมีไซเพอร์เมทริน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient glucose agar (NGA) ในอัตราแนะนำ (40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร) ความเข้มข้น 700 ppm จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะอาหาร หยดสารละลายแบคทีเรียที่มีประโยชน์ลงในหลุมทดสอบหลุมละ 10 ไมโครลิตร ประเมินประสิทธิภาพแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการย่อยสลายสารเคมีหรือเจริญคลุมทับผิวหน้าอาหารที่ผสมสารเคมีเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หลังบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารเคมีในดินจำลองการปนเปื้อนสารเคมี

เตรียมดินจำลองการปนเปื้อนสารเคมีไซเพอร์เมทริน โดยนำหน้าดินสำหรับปลูกพืชน้ำหนัก 1 กิโลกรัม นึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ผสมสารเคมีไซเพอร์เมทริน ความเข้มข้น 700 ppm ด้วยวิธีการพ่น จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากข้อ 2.1 แต่ละชนิดในอัตราส่วน ดินจำลอง 1 กิโลกรัม : เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ 10 มิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบประสิทธิภาพแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการย่อยสลายสารเคมีในดินจำลองกับกรรมวิธีควบคุมด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ หลังบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 และ 14 วัน โดยตรวจสอบสารเคมีตกค้างด้วยชุดตรวจ GT (กอบทอง ธูปหอม, 2540; 2541) กรรมวิธีประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 (T1) ดินจำลองการปนเปื้อนสารเคมีไซเพอร์เมทรินผสมแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ไอโซเลท SP-TU-C

กรรมวิธีที่ 2 (T2) ดินจำลองการปนเปื้อนสารเคมีไซเพอร์เมทรินผสมแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ไอโซเลท SP-TU-D

กรรมวิธีที่ 3 (T3) ดินจำลองการปนเปื้อนสารเคมีไซเพอร์เมทรินผสมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม)

การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์

จำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ oxygen relationship, gelatin hydrolysis, catalase production, levan formation, starch hydrolysis, citrate utilization, urease test และ salt tolerance (วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ, 2551; Schaad, 1988)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

แยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์

สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ได้ จำนวน 4 ไอโซเลท โดยแต่ละไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีบนอาหาร NGA คือ A) ไอโซเลท SP-TU-A โคโลนีสีเหลืองครีม มันวาว กลมนูน ขอบเรียบ B) ไอโซเลท SP-TU-B โคโลนีสีขาว มัน ขอบหยัก C) ไอโซเลท SP-TU-C โคโลนีสีเหลืองใสมันวาว กลมนูน ขอบเรียบ D) ไอโซเลท SP-TU-D โคโลนีสีขาว ด้าน ขอบหยัก (Figure 1)

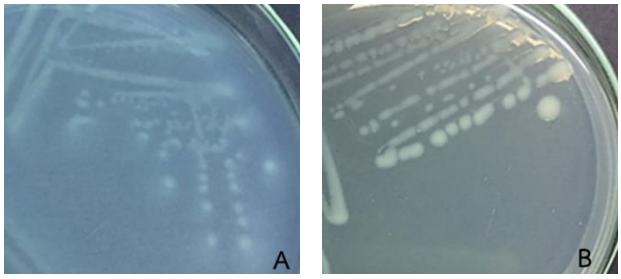

Figure 1 Characteristic bacterial colonies of isolate SP-TU-C (A) and SP-TU-D (B) on NGA incubated at room temperature with 24 hours.

ทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเคมีไซเพอร์เมทริน

การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารเคมีไซเพอร์เมทรินของแบคทีเรียที่มีประโยชน์จำนวน 4 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรียที่มีประโยชน์ไอโซเลท SP-TU-C และไอโซเลท SP-TU-D มีความสามารถในการย่อยสลายสารเคมีไซเพอร์เมทรินและเจริญได้เมื่อทดสอบบนอาหารพิษ โดยมีการเจริญคลุมทับผิวหน้าอาหารได้อย่างรวดเร็ว โดยมีขนาดความกว้างโคโลนีเท่ากับ 2.65 และ 2.15 เซนติเมตร ตามลำดับ และผลการทดสอบการย่อยสลายสารในสารเคมีไซเพอร์เมทรินในดินจำลองการปนเปื้อนสารเคมีโดยทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียที่มีประโยชน์สายพันธุ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายสารเคมีตกค้างให้ดิน โดยใช้เวลาในการย่อยสลายสารเคมีตกค้างให้อยู่ในระดับปลอดภัยได้โดยใช้เวลาเพียง 7 วันเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดทดสอบควบคุมและหลอดทดสอบตัดสินซึ่งมีระดับสีที่จางกว่าตามวิธีการของกอบทอง ธูปหอม (2541) (Figure 2) เช่นเดียวกับการรายงานของกองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2561) ซึ่งกล่าวว่า มีจุลินทรีย์ในธรรมชาติบางชนิดสามารถปรับตัวให้ทนต่อสารเคมีและสามารถใช้สารเคมีที่ตกค้างเพื่อเป็นแหล่งอาหารและพลังงานได้ เช่น จุลินทรีย์ย่อยสลายอาทราซีน ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืช ซึ่งมีทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas* sp. strain ADP ที่สามารถย่อยอาทราซีนให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับแอมโมเนีย (สุวรรณี แทนธานี, 2555) นอกจากนี้มีการรายงานการวิจัยแยกแบคทีเรียจากดินปลูกมันสำปะหลัง จังหวัดนครราชสีมา พบว่า *Aeromonas* spp. 2 สายพันธุ์ สามารถย่อยสลายพาราควอตได้ 24.36 และ 53.40% ตามลำดับ (Viriyawattana and Surachat, 2014) ยีสต์ *Lipomyces starkeyi* สามารถย่อยสลายพาราควอตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากไนโตรเจน โดยสามารถใช้พาราควอตเป็นแหล่งไนโตรเจน (Robert et al., 1985)

จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์

จำแนกชนิดแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายสารเคมีไซเพอร์เมทริน คือ ไอโซเลท SP-TU-C และไอโซเลท SP-TU-D เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ไอโซเลท C) ไอโซเลท SP-TU-C โคโลนีสีเหลืองใสมันวาว กลมนูน ขอบเรียบ D) ไอโซเลท SP-TU-D โคโลนีสีขาว ด้าน ขอบหยัก และศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยา พบว่าไอโซเลท SP-TU-C เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่ ไอโซเลท SP-TU-D เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จากนั้นนำมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการเปรียบเทียบกับตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition (Holt et al., 1994) พบว่า ไอโซเลท SP-TU-C และไอโซเลท SP-TU-D มีความเหมือนกับ *Pseudomonas fluorescens* และ *Paenibacillus popilliae*

ตามลำดับ (Table 1) เช่นเดียวกับการรายงานการใช้ในการกำจัดสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ตัวอย่างเช่น *Aerobacter aerogenes*, *Trichoderma viridae*, *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Arthrobacter* sp. และ *Bacillus* sp. สามารถกำจัดดีดีที นอกจากนี้ *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Achromobacterium* sp., *Sphingomonas* sp. และ *Arthrobacter* sp. ยังสามารถกำจัดคาร์โบฟูรานซึ่งเป็นสารกลุ่มคาร์บาเมตได้ (Porto et al., 2011) Singh and Walker (2006) ได้รวบรวมจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยออกาโนฟอสฟอรัส โดยพบว่าแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิดสามารถย่อยได้ เช่น *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* spp. สามารถย่อยได้ทั้งคลอร์ไพริฟอส พาราไธออน เมทธิลพาราไธออน และไกลโฟเซต

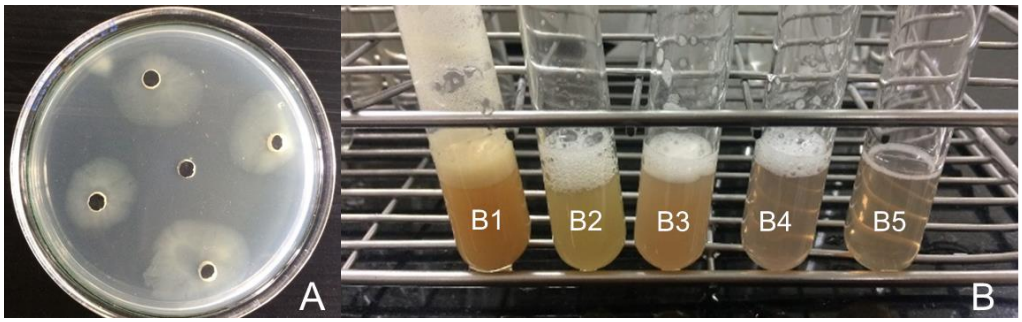

Figure 2 Efficacy of beneficial bacteria isolate SP-TU-C degraded chemical residues with poisoning medium test (A). Efficacy of beneficial bacteria to degrade of organophosphate chemical residues in soil by GT test kit (B): B1) decision marker, B2) control marker, B3) control treatment (sterilize water), B4) SP-TU-C, and B5) SP-TU-D.

Table 1 The biochemical characteristics test of beneficial strains SP-TU-C and SP-TU-D[1/].

Characteristics	Beneficial strains		Compared strains	
	SP-TU-C	SP-TU-D	*P. fluorescens*	*P. popilliae*
Starch hydrolysis	+	-	+	-
Catalase production	+	-	+	-
Oxygen relationship	+	+	+	+
Citrate utilization	+	-	+	-
Gelatin hydrolysis	+	-	+	-
Urease test	-	-	-	-
Indole test	-	-	-	+
Levan formation	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+
Salt tolerance				
5%	+	-	+	-
7%	+	-	+	-

[1/] + = positive, - = negative reaction.

การศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสารเคมีที่ใช้ในการเกษตรจำนวนมาก แต่ส่วนใหญ่มุ่งเน้นแต่การย่อยหรือการบำบัดความเป็นพิษ ซึ่งแท้จริงแล้วจุลินทรีย์ในธรรมชาติไม่เพียงแต่ย่อยสลายสารพิษ แต่บางชนิดยังสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้อีกด้วย เช่น *Acinetobacter calcoaceticus* MCm5, *Brevibacillus parabrevis* FCm9 และ *Sphingomonas* sp. RCm6 ที่สามารถย่อยสลายสารเคมีไซเพอร์เมทรินและสารกลุ่มไพรีทรอยด์ชนิดอื่นได้ดี นอกจากนี้ แบคทีเรียเหล่านี้ยังมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช จากความสามารถในการละลายฟอสเฟต การผลิต indole acetic acid (IAA) และการผลิตแอมโมเนีย (Akbar et al., 2015) ซึ่งความสามารถในการย่อยสลายสารเคมี และการส่งเสริมการเจริญของพืชดังกล่าวจะช่วยสนับสนุนการฟื้นฟูดินจากสารเคมีตกค้างโดยวิธีการทางชีวภาพ

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากดินได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลท และแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายสารเคมีไซเพอร์เมทริน 2 ไอโซเลท คือไอโซเลท SP-TU-C และไอโซเลท SP-TU-D ทั้งในการทดสอบบนอาหารพิษและการย่อยสลายสารเคมีในสภาพดินจำลอง โดยสามารถย่อยสลายสารเคมีให้อยู่ในระดับปลอดภัยได้ภายใน 7 วัน เมื่อทำการจำแนกชนิดพบว่าไอโซเลท SP-TU-C และไอโซเลท SP-TU-D มีแนวโน้มเป็นแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* และ *Paenibacillus popilliae* ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ กรมความร่วมมือระหว่างประเทศ (TICA) ที่สนับสนุนทุนการศึกษาแก่ผู้วิจัย ในการศึกษาวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2561. จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตร. http://www.ldd.go.th/WEB_WorldSoilDay/Data/Knowledge/SoilBiotechnology_TH.pdf (กันยายน 2562).

กอบทอง ธูปหอม. 2540. ชุดตรวจสอบยาฆ่าแมลง/สารพิษตกค้าง. ใน *เอกสารประกอบการฝึกอบรม ผลงานประดิษฐ์คิดค้นประเภททั่วไป รางวัลที่ 3 ในงานวันนักประดิษฐ์ปี 2540*. กรุงเทพ: สำนักงานวิจัยแห่งชาติ.

กอบทอง ธูปหอม. 2541. *คู่มือชุดตรวจหายาฆ่าแมลงจีที*. กรุงเทพฯ: กองอาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุข.

เปรมจิตร บุญสาย. 2556. *จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม*. ปทุมธานี: ศูนย์เรียนรู้การผลิตและจัดการธุรกิจ สิ่งพิมพ์ดิจิตอล.

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2562. สารกำจัดศัตรูพืช. 2562. http://www.pharmaco.vet.ku.ac.th/pdf_file/Pesticide_20161020.pdf (กันยายน 2562).

วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ. 2551. ลักษณะและการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ควบคุม เชื้อ *Erwinia crotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของกะหล่ำดอก. *วิทยานิพนธ์ปริญญาโท*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุธาสินี อั้งสูงเนิน. 2558. ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 9(1): 50-63.

สุวรรณี แทนธานี. 2555. จุลินทรีย์เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงบำรุงดิน. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ* 60(190): 36-39.

Akbar, N., Nanda, S., Belch, J., Cohen, P., and Khan, F. 2015. An important role for A20-binding inhibitor of nuclear factor-kB-1 (ABIN1) in inflammation-mediated endothelial dysfunction: an *in vivo* study in ABIN1 (D485N) mice. *Arthritis Research and Therapy* 17(22): 1-10.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.

Porto, A. M., Melgar, G. Z., Kasemodel, M. C., and Nitschke, M. 2011. Biodegradation of pesticides, pesticides in modern world-pesticides use and management. http://www.intechopen.com/books/ pesticides-in-the-modern-world-pesticidesuse-and-management/biodegradation-of-pesticides. (September 2019).

Robert, J. G. C., Bilton, R. F., and Atkinson, T. 1985. Mechanism of biodegradation of paraquat by *Lipomyces starkeyi*. *Applied and Environmental Microbiology* 49(5): 1290-1294.

Schaad, N. W. 1988. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Saint Paul, Minnesota: Bacteriology Committee of American Phytopathological Society.

Singh, B. K., and Walker, A. 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 428-471.

Viriyawattana, N., and Surachat, S. 2014. Biodegradation of paraquat by the novel bacteria strain, *Aeromonas veronii* NK67 from cassava fields in Thailand. *Asian Journal Microbiology, Biotechnology and Environmental sciences paper* 16(1): 35-40.

วันรับบทความ (Received date) : 30 ต.ค. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 15 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ

Efficacy of Endophytic Bacteria on Growth Inhibition of Important Plant Pathogenic Fungi

รัฐสิทธิ์ แซ่ลี้[1] และพรหมมาศ คูหากาญจน์[1*]
Rattasit Saelee[1] and Prommart Koohakan[1*]

บทคัดย่อ

แบคทีเรียเอนโดไฟต์เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ซึ่งสามารถใช้ควบคุมเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืชบางชนิดได้ อย่างไรก็ตาม การใช้จุลินทรีย์ดังกล่าวเพื่อการผลิตพืชยังมีข้อจำกัดในเรื่องของการมีชีวิตรอดและการคงประสิทธิภาพ จึงได้มีการนำแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่แยกได้จากมะเขือเทศ (SuRW02, SuRW01 และ LbRW03) และสายพันธุ์ที่แยกได้จากข้าว (Su2S217, SuR317, BaS417 และ BaR917) ซึ่งเคยมีรายงานว่าสามารถควบคุมเชื้อ *Fusarium* sp. และ *Pyricularia* sp. สาเหตุโรคพืชมาศึกษาความมีชีวิตรอด รวมถึงคุณสมบัติในการคงประสิทธิภาพเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลังการเก็บรักษาเป็นเวลานาน และนำไปทดสอบความเป็นปฏิปักษ์เพิ่มเติมด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม โดยเชื้อสาเหตุโรคพืชมีดังนี้ คือ *Furarium oxysporum, Colletotrichum capsici, Pythium* sp. และ *Pyriculraria* sp. ผลการทดลองพบว่าทุกไอโซเลทยังมีชีวิตรอด และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคอื่น ๆ ได้ เช่น ไอโซเลท LbRW03, SuRW01 และ SuRW02 ที่สามารถยับยั้ง *F. oxysporum*., *Pyricularia* sp. และ *C. capsici* ได้มากกว่า 50% ในขณะที่ไอโซเลทที่แยกได้จากข้าวมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชแบบจำเพาะเจาะจง ยกเว้น SuR317 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Pyricularia* sp., *C. capsici, Pythium* และ *F. oxysporum* จากนั้นศึกษาลำดับนิวคลิโอไทด์ยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลท BaR917 และ SuRw02 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคข้าวและมะเขือเทศตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด คือ *Bacillus* sp. และ *Sphingobacterium* sp. ตามลำดับ

คำสำคัญ: การควบคุมโรคโดยชีววิธี, endophytic bacteria, Fusarium, Pyricularia, Pythium, Colletotrichum

Abstract

Endophytic bacteria are one type of microorganism that can be used to effectively control plant-pathogenic fungi. However, the use of these microorganisms in plant production improvement is still limited because of problems with levels of efficacy and maintenance or stability of efficacy. In order to study efficacy, experiments were conducted to test the viability of endophytic bacteria isolated from tomato (SuRW02, SuRW01 and LbRW03) and rice (Su2S217, SuR317, BaS417 and BaR917), isolates which were previously reported to be able to control *Fusarium* sp. and *Pyricularia* sp. We also studied the ability of the bacterial isolates to maintain their efficiency as antagonist microorganisms after long-time storage. Included was a dual culture test with other plant pathogenic microorganisms, performed in order to observe additional antagonistic activity. The results showed that all isolates survived, and some isolates were able to inhibit the growth of other fungal pathogens. The isolates LbRW03, SuRW01 and SuRW02 isolated from tomato not only showed the ability to inhibit *Fusarium oxysporum* sp. growth; they also were able to inhibit *Pyricularia* sp. and *C. capsici*. With regard to rice endophytic bacteria, it was found that some isolates had inhibitory effects on specific hosts; however, SuR317 was able to inhibit *C. capsici*, *F. oxysporum* and *Pythium* sp. Two isolates, BaR917 and SuRW02, were selected for 16s rRNA gene sequence studies. The results indicated that the isolates belonged to *Bacillus* and *Sphingobacterium,* respectively.

Keywords: biological control, endophytic bacteria, Fusarium, Pyricularia, Pythium, Colletotrichum

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: prommart.ko@kmitl.ac.th

คำนำ

แบคทีเรียภายในเนื้อเยื่อพืช หรือแบคทีเรียเอนโดไฟต์ (endophytic bacteria) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของพืช และควบคุมโรคพืชได้ จึงมักมีการนำแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมาใช้งานร่วมกับการผลิตพืชหลายชนิด (Wang et al., 2009; Zhao et al., 2010) โดยในปัจจุบัน แนวโน้มการบริโภคอาหารนั้นเพิ่มสูงขึ้นจากในอดีต (FAO, 2009; Godfray et al., 2010) เพื่อให้เกิดการกระจายตัวของอาหารและเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของประชากรจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนากระบวนการผลิต รวมถึงค้นหาวิธีควบคุมโรคพืชเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยจากสารเคมีทางการเกษตร การใช้แบคทีเรียเอนโดไฟต์ จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่มีศักยภาพมากพอจะนำไปใช้ตอบสนองต่อความต้องการดังกล่าว ตัวอย่างเช่น รายงานของ Changmuang et al. (2017) ที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการกระตุ้นการเจริญของเมล็ดพันธุ์ข้าวและควบคุมเชื้อ *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ หรือรายงานของ Prasom et al. (2017) ที่ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อป้องกันโรคจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* เป็นต้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงได้ทำการศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลทที่เคยมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *Pyricularia* sp. และ *Fusarium* sp. (Changmuang et al., 2017; Prasom et al., 2017) มาประเมินความมีชีวิตรอด ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์อื่น และระบุบางสายพันธุ์ที่มีความสำคัญด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

วิธีการศึกษา

การศึกษาความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์เดิม

นำแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่เคยได้มีการศึกษาแล้ว ได้แก่ ไอโซเลทที่แยกได้จากข้าว (Changmuang et al., 2017) และไอโซเลทที่แยกได้จากมะเขือเทศ (Prasom et al., 2017) มาทำการต่อเชื้อหลังเก็บรักษาในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ -4°C โดยทำการต่อเชื้อบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการประเมินความมีชีวิตรอดและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้า

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์เดิมในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม

ทดสอบด้วยเทคนิคเลี้ยงเชื้อร่วม (Changmuang et al., 2017) สำหรับแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่เคยมีการรายงานว่าสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคข้าวให้ทดสอบเพิ่มเติมกับเชื้อ *Fusarium oxysporum*, *Pythium* sp. และ *Colletotrichum capsici* ในขณะที่ไอโซเลทที่เคยมีรายงานว่าสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในมะเขือเทศให้ทดสอบเพิ่มเติมกับเชื้อ *Pyricularia* sp., *Pythium* sp. และ *C. capsici* ทำได้โดยวัดระยะห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองข้าง 2.5 เซนติเมตร จากนั้นทำการเขี่ยเอาโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียไอโซเลทที่ต้องการขีดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDPA (Potato Dextrose Peptone Agar) วางชิ้นวุ้นของเชื้อสาเหตุโรคบริเวณกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีชุดควบคุมเป็นจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่าและจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองละ 4 ซ้ำ นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) เพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ

การระบุสายพันธุ์ไอโซเลทสำคัญ (BaR917 และ SuRw02) ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

สกัดเอาจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ของ 2 ไอโซเลทสำคัญที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดจากรายงานก่อนหน้า (Changmuang et al., 2017; Prasom et al., 2017) ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Wilson (modified Wilson, 1990) ดังนี้ เก็บเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NB นาน 24 ชั่วโมง ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม TE buffer ปริมาตร 567 µl, TE 10% SDS 3 µl และ protinase K 20 mg/ml 3 µl ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 5M NaCl 100 µl ผสมให้เข้ากัน ตามด้วยเติมสารละลาย CTAB/NaCl 80 µl (ละลาย 4.1 g NaCl และ 10 g CTAB ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 80 ml) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 65°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากบ่มเสร็จเติม chloroform/isoamyl alcohol ที่ปริมาตร equal volume ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที เมื่อเสร็จย้ายส่วนใสด้านบนลงหลอดใหม่ เติม equal volume ของ phenol/chloroform/isoamyl alcohol และปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนใสลงหลอดใหม่อีกครั้งและเติม 0.6 vol isopropanol จากนั้นปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อตกตะกอน DNA ทำการล้างตะกอนดังกล่าวด้วย 70% ethanol 1 ครั้ง และทิ้งให้แห้งข้ามคืน นำ DNA ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีนตำแหน่ง 16s rRNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (สารในปฏิกิริยาดังนี้: 10x Taq buffer 2 µl, 25 mM $MgCl_2$ 1 µl, dNTPs (2.5 mM each) 0.2 µl, forward และ reverse primer (5 uM) อย่างละ 0.5 µl, Taq DNA polymerase 0.2 µl (5 U), DNA template (10 ng) 5 µl และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10.6 µl รวมทั้งหมด 20 µl) คู่ primer ที่ใช้ คือ 27F และ 1492R (Aslam et al., 2013) เพื่อเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตำแหน่งยีน 16s rRNA มีสภาวะ

ในกระบวนการ คือ: initial denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 5 นาที denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 72°C เป็นเวลา 1 นาที และ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที ทำทั้งหมด 35 รอบปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้นำไปตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis ด้วย 0.5% agarose gel และส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับ ณ บริษัท Bionics จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์ในฐานข้อมูล EzBioCloud สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม Mega X (Neighbor-joining method, NJ) โดยมีค่า bootstrap ที่ 1000 replication

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการศึกษาความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์เดิม

จากการ subculture แบคทีเรียเอนโดไฟต์ ไอโซเลท LbRW03, SurW01, SurW02, Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317 ที่ได้เก็บรักษาในอาหาร NB ผสมกับกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ -4°C เป็นระยะเวลา 2 ปี ตั้งแต่ปี 2016-2018 พบว่าทุกไอโซเลทยังมีชีวิตอยู่ และมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ อีกทั้งยังคงสภาพและรูปร่างไว้ได้คล้ายเดิมหลังจากการแยกครั้งแรก (Table 1) สอดคล้องกับรายงานของ Feltham et al. (1978) ที่ทำการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ด้วยเม็ด bead และกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -76°C เป็นระยะเวลา 14 เดือน พบว่าเซลล์แบคทีเรียที่เก็บรักษาด้วยวิธีนี้ยังมีชีวิตอยู่จำนวนหนึ่งหลังจากนำมาต่อเชื้อ โดยไม่มีสภาวะใด ๆ เปลี่ยนแปลงไป

Table 1 Survival of endophytic bacteria after a long-time storage.

Isolate	Viability*	Colony characteristic				Cell shape
		Color	Shape	Margin	Surface	
LbRW03	+	White	Circular	Entire	Smooth	Bacilli
SuRW01	+	White	Circular	Entire	Mucoid	Bacilli
SuRW02	+	White	Circular	Entire	Mucoid	Bacilli
Su2S217	+	White	Circular	Entire	Mucoid	Bacilli
BaR917	+	White	Circular	Undulate	Smooth	Bacilli
BaS417	+	White	Circular	Entire	Mucoid	Bacilli
SuR317	+	White	Circular	Entire	Smooth	Bacilli

* + indicated the growth of bacterial colony on NA media; – indicated no growth of bacterial colony on NA media.

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์เดิมในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม

เมื่อนำไอโซเลททั้งหมด คือ LbRW03, SuRW01, SuRW02, Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317 ไปทดสอบกับเชื้อ *Pythium* sp. พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้ที่ 0.00, 0.00, 0.00, 46.11, 0.00, 38.89 และ 0.00% ตามลำดับ (Figure 1) ไอโซเลท Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317 สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* ได้ 47.63, 0.70, 2.45 และ 0.00% ตามลำดับ (Figure 2) เมื่อนำไอโซเลททั้งหมดทดสอบกับ *C. capsici* พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟต์สามารถยับยั้งการเจริญได้ที่ 66.60, 65.13, 68.70, 65.97, 65.97, 69.75 และ 23.32% ตามลำดับ (Figure 3) นอกจากนั้น เมื่อนำไอโซเลท LbRW03, SuRW01 และ SuRW02 ไปทดสอบกับเชื้อ *P. oryzae* สามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ 59.46, 63.29 และ 63.67% ตามลำดับ (Figure 4) โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้ง *Pythium* sp และ *F. oxysporum* คือ Su2S217 ส่วนไอโซเลทที่ยับยั้งเชื้อ *C. capsici* และ *P. oryzae* ได้ดีที่สุดคือ SuRW01 และ SuRW02 ตามลำดับ (Table 2) โดยจะเห็นได้ว่าไอโซเลทที่แยกได้จากทั้งมะเขือเทศและข้าว สามารถยับยั้งเชื้อ *Pyricularia* sp. สาเหตุโรคข้าว และ *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้มากกว่า 50% (ยกเว้น SuR317 ที่ไม่สามารถยับยั้ง *C. capsici* ได้) ทว่าไม่สามารถยับยั้ง *Pythium* sp. ได้เลย นอกจากนั้น กลุ่มไอโซเลทที่แยกได้จากข้าว (Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317) ก็ไม่สามารถยับยั้ง *F. oxysporum* ได้เช่นกัน (Table 3)

จากข้อมูลดังกล่าว จะเห็นได้ว่าในบางไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อสาเหตุได้ เหตุผลที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถยับยั้งโรคได้ หรือยับยั้งได้ในระดับปานกลางสามารถเกิดได้จากหลายกรณี อ้างอิงจากรายงานของ Rosenblueth and Martinez-Romero (2006) พบว่าการตอบสนองของพืชที่มีต่อแบคทีเรียเอนโดไฟต์นั้นต้องอยู่ในสภาพที่เหมาะสม นั่นก็คือขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ของพืช บางสายพันธุ์พืชนั้นสามารถได้รับประโยชน์จากการกระตุ้นการเจริญของเชื้อได้

แต่ยีนของพืชจะแสดงออกก็ต่อเมื่อถูกกระตุ้นโดยการมีอยู่ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่จำเพาะเจาะจงกับพืชนั้น ๆ ซึ่งความจำเพาะเจาะจงดังกล่าวอาจเกิดได้จากทั้งความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมหรือปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความจำเพาะต่อเมแทบอไลต์บางชนิดหรือองค์ประกอบทางด้านผนังเซลล์ เป็นต้น จากข้อมูลข้างต้น จึงอาจหมายความว่าความแตกต่างของพันธุ์พืชจะส่งผลให้มีแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แตกต่างกันไป และในทำนองเดียวกัน เชื้อสาเหตุโรคพืชก็อาจเข้าทำลายและอยู่อาศัยในพืชด้วยเหตุผลเดียวกัน จึงทำให้เกิดการแก่งแย่งแข่งขันภายในพืชชนิดนั้น ๆ เห็นได้จากการที่ไอโซเลทที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดหนึ่ง ๆ จะสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุที่ก่อโรคในพืชอาศัยเดียวกันได้ดีและอาจสามารถยับยั้งเชื้อราชนิดอื่น ๆ ได้ (Senthilkumar et al., 2008) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียอาจมีการสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราที่ส่วนใหญ่แล้วประกอบด้วยไคตินในขณะที่เกือบทุกไอโซเลทไม่สามารถยับยั้ง *Pythium* sp. ซึ่งผนังเซลล์ส่วนใหญ่ประกอบขึ้นจากเบตากลูแคนและเซลลูโลสได้ (Clavaud et al., 2009) อย่างไรก็ตาม จากการพิจารณาข้อมูลทั้งหมด ทั้งงานวิจัยก่อนหน้าและงานวิจัยปัจจุบัน พบว่าไอโซเลทที่แยกได้จากข้าวที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ BaR917 เนื่องจากเมื่อนำไปทดสอบกระตุ้นการเจริญเมล็ดพันธุ์ข้าว พบว่าไอโซเลทดังกล่าวให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดในขณะที่ไอโซเลทอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกันจะมีประสิทธิภาพน้อยกว่า แม้ผลการเลี้ยงเชื้อร่วมจะใกล้เคียงกันก็ตาม (Changmuang et al., 2017) รวมถึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. capsici* ที่ไม่แตกต่างกับสายพันธุ์อื่นถึงแม้จะยับยั้ง *Pythium* sp. และ *F. oxysporum* ได้ไม่เท่าไอไซเลทในกลุ่มเดียวกัน ในขณะที่ไอโซเลทที่แยกได้จากมะเขือเทศที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ SurW02 โดยเชื้อดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum* (Prasom et al., 2017), *C. capsici* และ *P. oryzae* ได้มากที่สุด เมื่อพิจารณาข้อมูลต่าง ๆ โดยรวม จึงอาจกล่าวได้ว่า BaR917 มีประสิทธิภาพสูงสุดในข้าวเนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้อย่างมีประสิทธิภาพไม่ต่างกับไอโซเลทอื่น ๆ และยังมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของข้าวมากที่สุด ในขณะที่เชื้อในกลุ่มเดียวกัน ทั้ง Su2S217, BaS417 และ SuR317 เอง มีประสิทธิภาพด้อยกว่าในด้านการกระตุ้นการเจริญ (Changmuang et al., 2017) ถึงแม้ว่าไอโซเลทดังกล่าวอาจจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้ออื่น ๆ แต่ในภาพรวมแล้วยังคงมีประสิทธิภาพต่ำ ในขณะที่ SuRW02 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Pyrucularia, F. oxysporum* และ *C. capsici* สูงสุด จึงได้นำทั้ง 2 ไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกไปประบุสายพันธุ์ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาต่อไป อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาไอโซเลทอื่น ๆ ที่เหลือเพิ่มเติมด้วยวิธีการใหม่เพื่อขยายขอบเขตความเข้าใจในประสิทธิภาพที่แท้จริง ตัวอย่างเช่นไอโซเลท Su2S217 ที่ยับยั้งเชื้อได้ทุกชนิด ถึงแม้จะยับยั้งเชื้อบางชนิดได้ไม่ถึง 50% แต่ก็อาจจะมีศักยภาพมากพอ ซึ่งอาจสามารถนำไปใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีความสามารถในการควบคุมโรคแบบ broad spectrum ได้

Table 2 Dual culture results of all isolates against plant pathogenic fungi.

Isolate	*Pythium* sp.		*F. oxysporum*		*C. capsica*		*P. oryzae*	
	CD (cm) *	%Inhibition*	CD (cm) *	Inhibition%*	CD (cm) *	Inhibition%*	CD (cm) *	Inhibition%*
Control	9.00a	ND **	7.14ab	ND**	5.95a	ND	6.52a	ND
LbRW03	9.00a	0.00c	68.19***		1.99c	66.60a	2.66b	59.46b
SuRW01	9.00a	0.00c	68.33***		2.07c	65.13a	2.40c	63.29a
SuRW02	9.00a	0.00c	71.94***		1.86c	68.70a	2.37c	63.67a
Su2S217	4.85c	46.11a	3.74c	47.63a	2.02c	65.97a	66.80****	
BaR917	9.00a	0.00c	7.09ab	0.70b	2.02c	65.97a	61.11****	
BaS417	5.50b	38.89b	6.96b	2.45b	1.80c	69.75a	64.86****	
SuR317	9.00a	0.00c	7.30a	0.00b	4.56b	23.32b	66.66****	

* Different letters in the same column represent statistical different; P=0.05, ** Not determined, *** Results of these isolates have already reported by Prasom et al. (2017), **** Results of these isolates have already reported by Changmuang et al. (2017), CD: Colony diameter.

Table 3 Conclusion of dual culture result.

Isolate	*Pythium* sp. inhibition	*F. oxysporum* inhibition	*C. capsici* inhibition	*P. oryzae* inhibition
LbRW03	-	+	+	+
SurW01	-	+	+	+
SurW02	-	+	+	+
SuS217	-	-	+	+
BaR917	-	-	+	+
BaS417	-	-	+	+
SuR317	-	-	-	+

* + indicated the inhibition of pathogen growth more than 50%; - indicated no inhibition or inhibition percent lower than 50%.

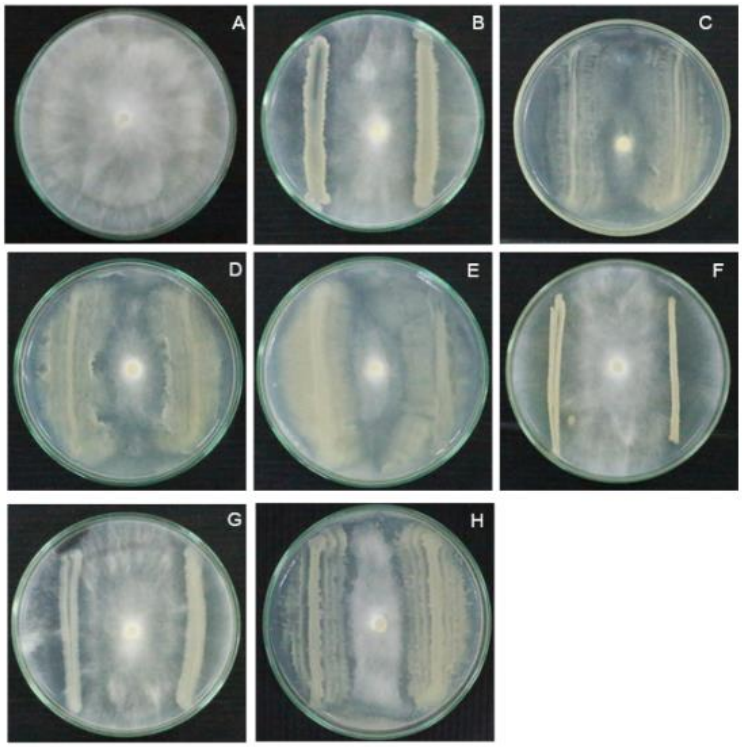

Figure 1 Effect of endophytic bacteria on *Pythium* sp. growth; A: Control; B: LbRW03; C: SuRW01; D: SuRW02; E: Su2S217; F: BaR917; G: SuR317 and H: BaS417.

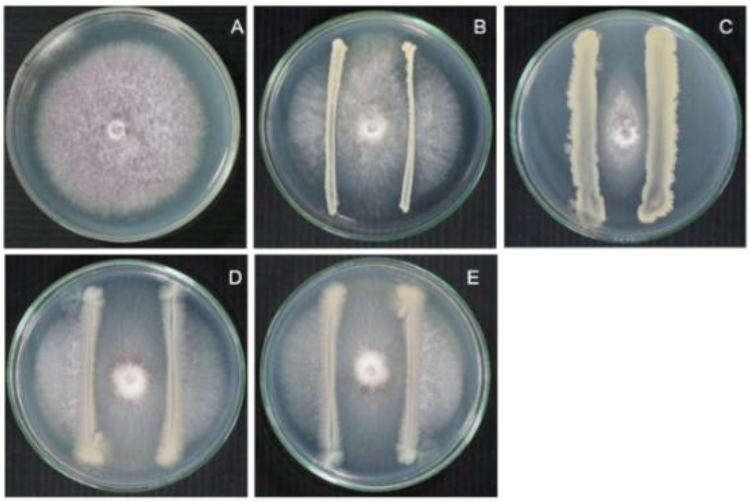

Figure 2 Effect of endophytic bacteria on *Fusarium* sp. growth. A: Control; B: BaR917; C: Su2S217; D: BaS417 and E: SuR317.

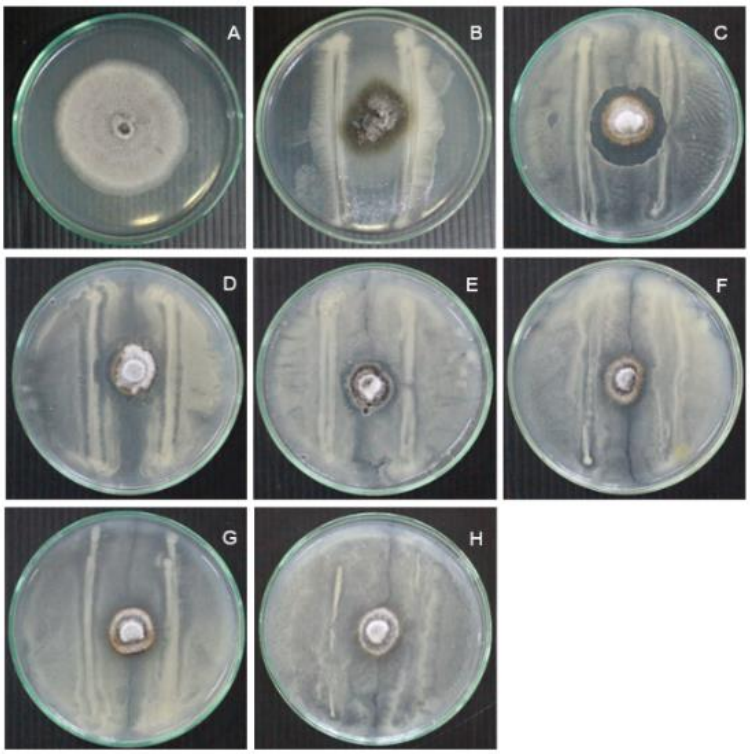

Figure 3 Effect of endophytic bacteria on *Colletotrichum capsici* growth. A: Control; B: SuR317; C: SuRW01; D: SuRW02; E: LbRW03; F: BaS417; G: Su2S217 and H: BaR917.

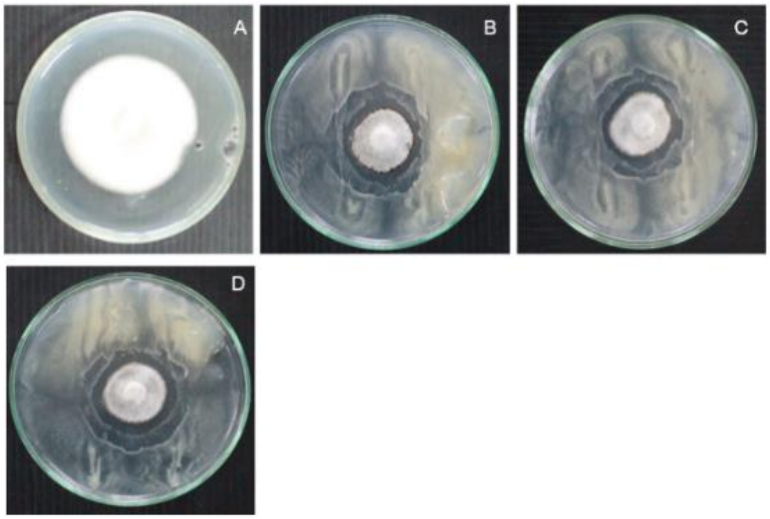

Figure 4 Effect of endophytic bacteria on *Pyricularia* oryzae growth. A: Control; B: LbRW03; C: SuRW01and D: SuRW02.

ผลการระบุสายพันธุ์ไอโซเลทสำคัญ (BaR917 และ SuRw02) ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

จากการตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บน 0.5% agarose gel จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทำให้บริสุทธิ์และตรวจสอบคุณภาพอีกครั้ง พบดีเอ็นเอขนาดประมาณ1500 bp (Figure 5) หลังจากนั้นส่งไปวิเคราะห์ลำดับที่บริษัท Bionics โดยหลังจากทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์บนตำแหน่ง 16s rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud และทำแผนภูมิแสดงสายวิวัฒนาการ พบว่า BaR917 มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. โดยมีความใกล้เคียงกับ *Bacillus altitudinis* อยู่ที่ 99.85% (Table 4, Figure 6) ในขณะที่ SuRw02 มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Sphingobacterium* โดยคล้ายคลึงกับ S. *thalpophilum* มากที่สุดที่ 99.88% (Table 4, Figure 7) ซึ่งเคยมีรายงานว่าทั้ง 2 สกุลเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ และมีความสามารถในการควบคุมโรคพืช (Figure 6) (Patel et al., 2018) ตัวอย่างในสกุล *Bacillus* spp. เช่น *B. stratosphericus* ที่สามารถควบคุมโรคเน่าในโสมที่เกิดจากเชื้อ *Cladosporium* และ *Fusarium* (Durairaj et al., 2018) *B. altitudinis* ที่สามารถควบคุมเชื้อ *Thanatephorus cucumeris* (teleomorph ของ *Rhizoctonia solani*) ในถั่วเขียว (Sunar et al., 2013) *B. aerius* ที่มีรายงานว่าสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Botrytis cinerea* (Shafi et al., 2017) เป็นต้น หรือสกุล *Sphingobacterium* เองก็เคยมีรายงานว่าสามารถควบคุมเชื้อราในสกุล *Fusarium* sp. ในระดับหนึ่งเช่นกัน (Sturz et al., 1999)

Table 4 Percent similarity of referenced species in this study.

Isolate	Ascension number	Species	Percent similarity
BaR917	ASJC01000029	*Bacillus altitudinis*	99.85
SuRW02	AJ438177	*Sphingobacterium thalpophilum*	99.88

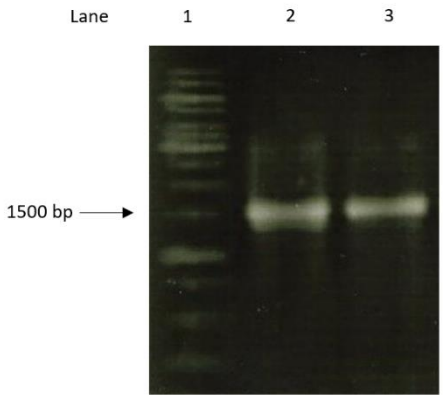

Figure 5 The primer pair 27F and 1492R were used to amplify a 1500 bp DNA product that is characteristic of bacterial 16s rRNA gene. Lane 1: 1 kb DNA ladder; Lane 2: PCR product from BaR917; Lane 3: PCR product from SuRW02.

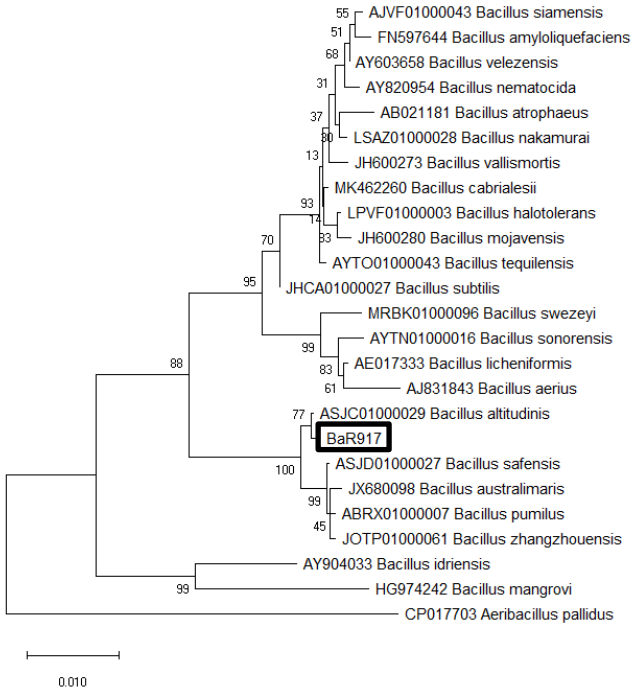

Figure 6 Phylogenetic tree of BaR917 using Neighbor-joining method based on 16s rRNA sequences with boostraps values at 1000. A number on each branch indicated bootstrap percentage. *Aeribacillus pallidus* was used as outgroup.

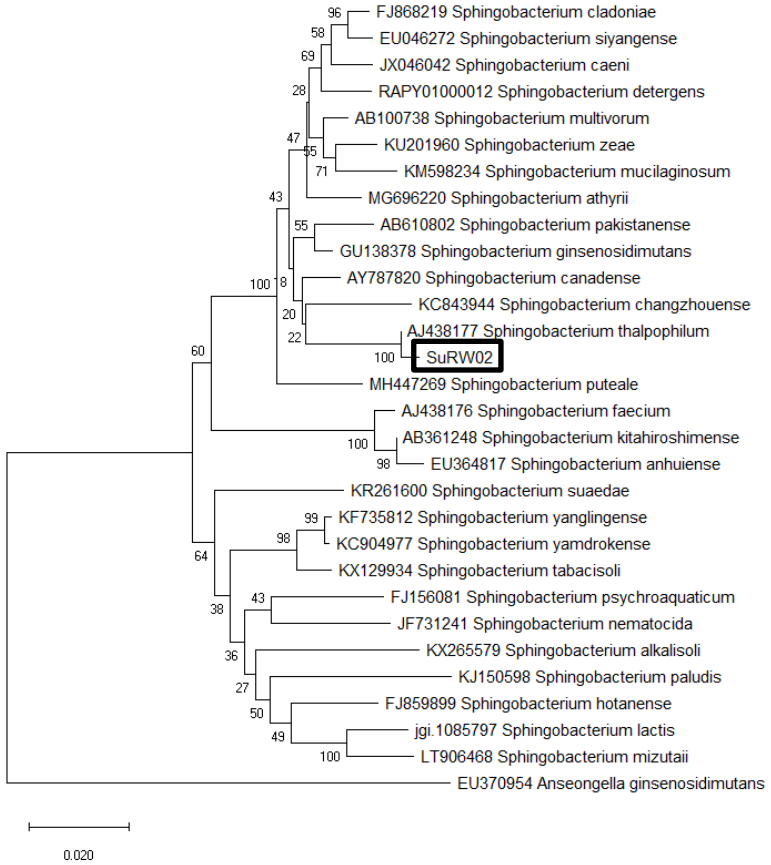

Figure 7 Phylogenetic tree of SuRW02 using Neighbor-joining method based on 16s rRNA sequences with boostraps values at 1000. A number on each branch indicated bootstrap percentage. *Anseongella ginsenosidimutans* was used as outgroup.

สรุปผลการศึกษา

แบคทีเรียเอนโดไฟต์ ไอโซเลท LbRW03, SuRW01, SuRW02, Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317 มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ เมื่อนำเชื้อไอโซเลท LbRW03, SuRW01 และ SuRW02 ไปทดสอบกับเชื้อ *P. oryzae* สามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ 59.46, 63.29 และ 63.67% ตามลำดับ ไอโซเลท SuRW02, Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317 สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* ได้ 47.63, 0.70, 2.45 และ 0.00% ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อนำไอโซเลททั้งหมด คือ LbRW03, SuRW01, SuRW02, Su2S217, BaR917, BaS417 และ SuR317 ไปทดสอบกับเชื้อ *Pythium* sp. พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้ที่ 0.00, 0.00, 0.00, 46.11, 0.00, 38.89 และ 0.00% ตามลำดับ และ *C. capsici* ที่ 66.60, 65.13, 68.70, 65.97, 65.97, 69.75 และ 23.32% ตามลำดับ เมื่อนำ 2 ไอโซเลทสำคัญ คือ BaR917 และ SuRW02 ไประบุสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา พบว่ามีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. และ *Sphingobacterium thalpophilum* ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

Aslam, Z., Yasir, M., Yoon, H. S., Jeon, C. O., and Chung, Y. R. 2013. Diversity of the bacterial community in the rice rhizosphere managed under conventional and no-tillage practices. *Journal of Microbiology* 51(6): 747-756.

Changmuang, T., Sikhao, P., and Koohakan, P. 2017. Isolation and screening of endophytic bacteria against rice blast pathogen. *International Journal of Agricultural Technology* 13(7.1): 1231-1244.

Clavaud, C., Aimanianda, V., and Latge, J. P. 2009. Organization of fungal, oomycete and lichen (1,3)-β-glucans. In *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides,* A, Bacic., G. Fincher, and B. Stone. eds. pp. 387-424. Australia: Academic Press.

Durairaj, K., Velmurugan, P., Park, J. H., Chang, W. S., Park, Y. J., Senthilkumar, P., Choi, K. M., Lee, J. H., and Oh, B. T. 2018. An investigation of biocontrol Activity *Pseudomonas* and *Bacillus* strains against *Panax ginseng* root rot fungal phytopathogens. *Biological Control* 125: 138-146.

Feltham, R. K. A., Power, A. K., Pell, P. A., and Sneath, P. H. A. 1978. A simple method for storage of bacteria at - 76°C. *Journal of Applied Bacteriology* 44(2): 313-316.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2009. How to feed the world in 2050. http://www.ricethailand.go.th/ rkb3/title-index.php-file=content.php&id=74.html (October 2019).

Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., and Toulmin, C. 2010. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327: 812-818.

Patel, P., Shah, R., Joshi, B., and Ramar, K. 2018. Molecular identification and biocontrol activity of sugarcane rhizosphere bacteria against red rot pathogen *Colletotrichum falcatum*. *Biotechnology Reports* (21): e00317.

Prasom, P., Sikhao, P., and Koohakan, P. 2017. *In vitro* study of endophytic bacteria isolated from tomato plant against *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Agricultural Technology* 13(7.1): 1217-1230.

Rosenblueth, M., and Martínez-Romero, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(8): 827-837.

Senthilkumar, M., Swarnalakshmi, K., Govindasamy, V., Lee, Y. K., and Annapurna, K. 2008. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus, *Rhizoctonia bataticola*. *Current Microbiology* 58(4): 288-293.

Shafi, J., Mingshan, J., Zhiqiu, Q., Xiuwei, L., Zumin, G., Xinghai, L., Yang, Z., Peiwen, Q., Hongzhe, T., Wunan, C., and Kai, W. 2017. Optimization of *Bacillus aerius* strain JS-786 cell dry mass and its antifungal activity against *Botrytis cinerea* using response surface methodology. *Archives of Biological Sciences* 69: 469-480.

Sturz, A. J., Christie, B. R., Matheson, B. G., Arsenault, W. J., and Buchanan, N. A. 1999. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathology* 48(3): 360-369.

Sunar, K., Dey, P., Chakraborty, U., and Chakraborty, B. 2013. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. *Journal of Basic Microbiology* 55(1): 91-104.

Wang, H., Wen, K., Zhao, X., Wang, X., Li, A., and Hong, H. 2009. The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. *Crop Protection* 28(8): 634-639.

Wilson, K. 1990. Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. eds. New York: John Wiley & Sons Incorporation.

Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C., and Gu, Y. 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology* 101(1): 292-297.

วันรับบทความ (Received date) : 15 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 30 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

การสำรวจเนื้ออกไก่กระทงที่พบตำหนิริ้วสีขาวและศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีกายภาพระหว่างการเก็บรักษา

Survey of Broiler Breast Meat with White Striping and Study the Physicochemical Changes during Storage

สุภาพรรณ ศฤงฆาร[1*] จันทร์เพ็ญ เอื้อสกุลรุ่งเรือง[1] และศุภลักษณ์ สรภักดี[1]
Supapun Saringkhan[1*], Chanpen Uesakulrungrueng[1] and Supaluk Sorapukdee[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจเนื้ออกไก่กระทงและศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้านเคมีกายภาพของเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาว แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 ทำการสุ่มสำรวจเนื้ออกไก่จาก 4 บริษัท คือ A, B, C และ D ที่วางจำหน่ายแบบแพ็กถาดในห้างสรรพสินค้า การทดลองที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีกายภาพของเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็นเป็นเวลา 3 วัน ผลการศึกษาพบว่าบริษัท A พบเปอร์เซ็นต์การเกิดตำหนิริ้วสีขาวมากกว่า บริษัท D บริษัท B และบริษัท C ตามลำดับ โดยบริษัท A พบการเกิดตำหนิริ้วสีขาวระดับปานกลาง 9% บริษัท D พบ 7% บริษัท B พบ 5% และบริษัท C พบ 2% ตามลำดับ และพบความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเนื้ออกไก่กับระดับการเกิดตำหนิริ้วสีขาว (r = 0.806, P<0.01) โดยพบว่าเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวส่วนใหญ่มีน้ำหนักมากกว่าเนื้ออกไก่ที่ไม่พบตำหนิริ้วสีขาว ส่วนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีกายภาพของเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาว ผลการศึกษาพบว่าเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวในระดับที่มากขึ้นส่งผลเพิ่มการสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บรักษา การออกซิเดชันของไขมัน ค่าแรงเฉือน และค่าความสว่าง (P<0.05) นอกจากนี้เนื้ออกไก่ที่มีระดับการเกิดตำหนิริ้วสีขาวในระดับปานกลางและผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน ก่อให้เกิดผลเสียต่อคุณภาพเนื้อในด้านเหล่านี้มากกว่ากลุ่มที่ไม่พบตำหนิริ้วสีขาว และกลุ่มที่เกิดตำหนิริ้วสีขาวในระดับเบาบาง ตามลำดับ ส่วนค่าสีแดง (a* value) และค่าสีเหลือง (b* value) มีค่าไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ: ตำหนิริ้วสีขาว เนื้ออกไก่ คุณภาพเนื้อ

Abstract

The objectives of this research were to survey broiler breast meat on the market and to study the physicochemical changes in broiler breast meat with white striping (WS). The first experiment was conducted to randomly survey broiler breast meat from 4 companies (A, B, C and D) that was sold as sealed tray packs in department stores. In the second experiment, the physicochemical changes in broiler breast meat with white striping that had been stored chilled for 3 days were studied. The results showed that most of the broiler breast meat had white striping (moderate white striping). In more details, it was most evident in the produce of company A (9%), followed in decreasing order of amount by company D (7%), B (5%) and C (2%). A significant correlation between weight of breast meat and white strip level was found (r = 0.806, P<0.01); chicken breasts with higher levels of white striping level were generally heavier than those with little or no white striping. The study of the physicochemical changes in breast meat during storage revealed that broiler breast meat with higher levels of white striping showed significantly higher levels of moisture loss, lipid oxidation, shear force and lightness value (P<0.05). Furthermore, when breast meat with moderate levels of white striping was stored for 3 days, it showed higher loss of quality than did breast meat with no or mild white striping. There were no significant differences in redness and yellowness between the white-striped chicken breast meat and unstriped meat.

Keywords: white striping, broiler breast meat, meat quality

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: supapun.sa@kmitl.ac.th

คำนำ

ปัจจุบันเนื้อสัตว์ปีกเป็นที่นิยมสำหรับผู้บริโภค เนื่องจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพ สะดวกในการปรุงอาหาร และราคาที่เหมาะสมไม่แพงมาก โดยชิ้นส่วนที่นิยมมากที่สุด คือ อกไก่ (chicken breast) เนื่องจากเป็นเนื้อที่ไม่ติดมัน มีปริมาณไขมันต่ำและคุณค่าทางโปรตีนสูง เนื่องจากเนื้อไก่เป็นที่นิยมมาก จึงทำให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่มีการใช้อาหารหรือยาเร่งที่มีผลทำให้ไก่เจริญเติบโตเร็วเกินกว่าปกติ โดยเฉลี่ยมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักไก่มีชีวิตเป็นสอง แต่อายุเฉลี่ยลดลง ซึ่งมีผลทำให้เกิดความผิดปกติบนกล้ามเนื้อเป็นตำหนิริ้วสีขาว (white striping, WS) ขนานไปกับทิศทางของเส้นใยกล้ามเนื้อทั้งเนื้อหน้าอก และสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า การเกิดตำหนิริ้วสีขาวพบได้บ่อยในไก่กระทงที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้าในปัจจุบัน โดยปรากฏเป็นเส้นสีขาวที่มีขนาดความกว้างน้อยกว่า 1 มิลลิเมตรไปจนถึง 2 มิลลิเมตร (Brambila et al., 2016; Bowker and Zhuang, 2016; Kuttappan et al., 2016; Yuwares et al., 2018) ตำหนิริ้วสีขาวไม่มีผลต่อความปลอดภัยในการบริโภค แต่ส่งผลต่อคุณภาพของเนื้อทางด้านการบริโภค (eating quality) ได้แก่ ความนุ่ม (tenderness) สี (color) กลิ่นรส (flavor) เป็นต้น รวมถึงคุณสมบัติทางด้านการนำไปแปรรูป (technological quality) นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวมีปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นและกล้ามเนื้อลดลงตามปริมาณความรุนแรงของตำหนิริ้วสีขาว โดยพบว่าเมื่อแถบริ้วสีขาวเพิ่มขึ้นจะพบไขมันเพิ่มขึ้นถึง 2.4 เท่า จากเนื้อไก่ปกติที่มีไขมันเพียง 0.2% จะเพิ่มเป็น 0.5% แต่เมื่อตรวจวิเคราะห์ค่าที่เกี่ยวกับคุณสมบัติด้านคุณภาพ เช่น การสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก ค่าแรงเฉือน การออกซิเดชันของไขมัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่ทำให้คุณภาพเนื้อลดลง (Kuttappan et al., 2012a; 2016)

การเพิ่มน้ำหนักมีชีวิตและน้ำหนักเนื้ออกไก่กระทง ส่งผลให้เกิดตำหนิริ้วสีขาวบนเนื้ออก ทำให้คุณภาพเนื้อทั้งในรูปแบบเนื้อสด และเนื้อสัตว์ปรุงสุกลดลง นอกจากนี้เนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวรุนแรงจะมีการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกที่สูงขึ้นและความนุ่มลดลง ซึ่งอาจเกิดจากความเสื่อมของเส้นใยกล้ามเนื้อส่งผลทำให้โปรตีนในกล้ามเนื้อลดลง การเกิดความผิดปกติดังกล่าวส่งผลกระทบด้านลบต่อคุณภาพเนื้อและการยอมรับได้ของผู้บริโภค และไม่มีนักวิจัยท่านใดบอกได้ชัดเจนว่าสาเหตุมาจากอะไร มีงานวิจัยหลายฉบับรายงานว่าอาจเป็นผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์จากการปรับปรุงพันธุกรรมสัตว์ (Petracci et al., 2013; Mudalal et al., 2015; Kuttappan et al., 2016; Tijare et al., 2016; Griffin et al., 2018) นอกจากนี้ National Chicken Council (2017) ทำการตรวจการเกิดตำหนิริ้วสีขาวในไก่เนื้อทั้งฝูง พบว่ามีไก่เพียงส่วนหนึ่งเท่านั้นที่พบตำหนิริ้วสีขาวบนกล้ามเนื้ออก ถึงแม้ว่าไก่จะมีสายพันธุ์เดียวกัน การจัดการอาหาร การจัดการสิ่งแวดล้อม และอื่น ๆ เหมือนกัน และไก่ทุกตัวในฝูงมีขนาดและอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน ไม่เพียงแค่นั้นไก่ที่เลี้ยงแบบปล่อยตามธรรมชาติก็ตรวจพบการเกิดแถบริ้วสีขาวได้เช่นกัน การจัดการการให้อาหารที่มีพลังงาน และโปรตีนสูง อายุ เพศ การจำกัดอาหาร และพันธุกรรม สิ่งเหล่านี้ถูกเชื่อมโยงเข้ากับสาเหตุการเกิดความรุนแรงที่เพิ่มขึ้นของตำหนิริ้วสีขาวของไก่เนื้อ (Bauermeister et al., 2009; Lorenzi et al., 2014; Trocino et al., 2015) งานวิจัยหลายฉบับชี้ชัดเจนว่าไก่เนื้อที่มีน้ำหนักมากมีอัตราการเกิดตำหนิริ้วสีขาวสูงกว่าไก่ที่มีน้ำหนักน้อย การเสื่อมของกล้ามเนื้อมิได้เกิดจากสาเหตุใดสาเหตุเดียว แม้ว่าจะมีปัจจัยโน้มนำให้เกิดโรคที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว และสัดส่วนของกล้ามเนื้อที่เพิ่มขึ้น อันเป็นผลมาจากการปรับปรุงพันธุกรรมสัตว์ (Kuttappan et al., 2012a; Lorenzi et al., 2014; Russo et al., 2015; Trocino et al., 2015)

ความต้องการของผู้บริโภคที่เพิ่มขึ้นทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ ดังนั้นจึงเป็นแรงกดดันในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต และในเวลาเดียวกันผู้บริโภคต้องได้เนื้อสัตว์ที่มีคุณภาพดี การเกิดตำหนิริ้วสีขาวในเนื้ออกไก่เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อการยอมรับและความต้องการของผู้บริโภคลดลง โดยลักษณะปรากฏมีผลต่อการตัดสินใจเลือกซื้อเนื้อสัตว์ของผู้บริโภคและบ่งบอกถึงคุณภาพของเนื้อสัตว์ โดยเฉพาะเนื้อสัตว์สดและเนื้อสัตว์ที่บรรจุในถาด ดังนั้นอุตสาหกรรมสัตว์ปีกต้องคำนึงและตระหนักถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ที่สำคัญในอนาคตความผิดปกติการเกิดแถบริ้วสีขาวนี้อาจทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ เนื้ออกไก่เป็นเนื้อส่วนที่ผู้บริโภคนิยมเนื่องจากเป็นเนื้อไม่ติดมัน หากเกิดแถบริ้วสีขาวที่รุนแรงจะมีผลกระทบด้านลบต่อลักษณะปรากฏและการตัดสินใจเลือกซื้อของผู้บริโภค (Kuttappan et al., 2012b; 2016)

อุบัติการณ์ของการเกิดตำหนิริ้วสีขาวรุนแรงเพิ่มขึ้นอย่างมากจาก 1.4 เป็น 8.7% (เฉลี่ย 5%) ในปี 2012 และ 25.7% เป็น 32.3% (เฉลี่ย 29%) ในปี 2015 นอกจากนี้ถูกรายงานในหลายประเทศ เช่น บราซิล อิตาลี ฟินแลนด์ สหรัฐอเมริกา และสหราชอาณาจักร (Ferreira et al., 2014; Russo et al., 2015; Kuttappan et al., 2016; Tijare et al., 2016) ขณะเดียวกันในแถบเอเชียตะวันออกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ยังไม่มีการรายงานหรือตระหนักถึงผลเสียที่เกิดขึ้น แม้แต่ในประเทศไทยผู้บริโภคยังไม่ทราบถึงลักษณะเหล่านี้ซึ่งผู้บริโภคส่วนใหญ่เข้าใจว่าตำหนิริ้วสีขาวที่ปรากฏนั้นคือไขมันแทรก ทำให้ไม่มีการตื่นตัว (Yuwares et al., 2018) จึงเกิดงานวิจัยชิ้นนี้ขึ้นมาโดยทำการสำรวจปริมาณการเกิดตำหนิริ้วสีขาวของเนื้ออกไก่ที่จำหน่ายบนห้างสรรพสินค้า ในเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร และทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมี - กายภาพของเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาว เพื่อให้ผู้บริโภคได้ตระหนักถึงการเปลี่ยนแปลงในระบบอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ในปัจจุบัน

วิธีการศึกษา

การทดลองที่ 1 การสำรวจเนื้ออกไก่กระทง

สำรวจเนื้ออกไก่จาก 4 บริษัท คือ บริษัท A, บริษัท B, บริษัท C และ บริษัท D ที่วางจำหน่ายแบบแพ็กถาดในห้างสรรพสินค้า เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ทำการสำรวจทั้งหมด 15 ครั้ง เริ่มตั้งแต่ วันที่ 7 พฤศจิกายน พ.ศ. 2561 - 20 มกราคม พ.ศ. 2562 โดยจะนับจำนวนเนื้ออกไก่ทั้งหมดที่วางจำหน่ายในแต่ละครั้ง ทำการจดบันทึกวันที่สำรวจ จำนวนชิ้นเนื้อทั้งหมด และทำการจัดระดับความรุนแรงของการเกิดตำหนิริ้วสีขาวออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ดังนี้ ชุดการทดลองที่ 1 เกิดตำหนิริ้วสีขาวระดับปกติ (Non-WS) คือ ไม่พบตำหนิริ้วสีขาว ชุดการทดลองที่ 2 เกิดตำหนิริ้วสีขาวระดับเบาบาง (Mild WS) คือ พบตำหนิริ้วสีขาวจำนวน 1-40 เส้น ที่มีความหนาขนาด ≤ 0.5 มิลลิเมตร และชุดการทดลองที่ 3 เกิดตำหนิริ้วสีขาวระดับปานกลาง (Moderate WS) คือ พบตำหนิริ้วสีขาวจำนวนมากกว่า 40 เส้น หรือมีตำหนิริ้วสีขาวจำนวน 1-5 เส้นมีความหนาของขนาด 1-1.9 มิลลิเมตร (Figure 1) แสดงผลการทดลองเป็นร้อยละของการเกิดตำหนิริ้วสีขาวในระดับต่าง ๆ

Figure 1 Classification of broiler breast meat according to severity of white striping. Non-WS (no white striation found on the meat surface), Mild WS (1 to 40 white lines with the thickness of ≤ 0.5 mm), Moderate WS (more than 40 white line or 1 to 5 lines with the thickness of 1 to 1.9 mm)

Source: Kuttappan et al. (2012b); Yuwares et al. (2018)

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงด้านเคมีกายภาพของเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาว

นำผลที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาทำการศึกษาผลของการเก็บรักษา เลือกผลของบริษัทที่ตรวจพบการเกิดตำหนิริ้วสีขาวสูงที่สุด ทำการเลือกซื้อเนื้ออกไก่กระทงแบบสุ่ม (ไม่ได้กำหนดอย่างชัดเจนว่าเป็นอกด้านซ้ายหรืออกด้านขวา) จำนวน 60 ชิ้น ที่วางจำหน่ายแบบแพ็กถาดบนห้างสรรพสินค้า ในเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร และทำการจัดระดับความรุนแรงของการเกิดตำหนิริ้วสีขาวเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และสุ่มชั่งน้ำหนักเนื้ออกไก่ในแต่ละชุดการทดลองเพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดตำหนิริ้วสีขาวและน้ำหนักเนื้ออกไก่ เก็บตัวอย่างเนื้ออกไก่ทั้ง 3 ชุดการทดลองแช่เย็นที่อุณหภูมิ 1-4°C เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน จากนั้นเนื้ออกไก่ทั้ง 3 ชุดการทดลองจะถูกนำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพเนื้อ

การวิเคราะห์คุณภาพเนื้อ นำตัวอย่างเนื้อไก่ทั้ง 3 ชุดการทดลองที่ได้จากการทดลองที่ 2 นำมาวิเคราะห์ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการเก็บรักษา (drip loss) วิเคราะห์ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการละลาย (thawing loss) และวิเคราะห์ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก (cooking loss) ตามวิธีการของ Honikel (1998) ตรวจวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH-meter (Mettler Toledo รุ่น SG-20) ตรวจวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี (Hunter Lab Miniscan EZ) ในรูปแบบ CIE (L*, a* และ b*) ตรวจวัดค่าแรงเฉือน (shear force) ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Instron model 1011) ด้วยหัววัด Warner-Bratzler Shear วิเคราะห์ค่าการออกซิเดชันของไขมันโดยวิธี Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) ตามวิธีการของ Buege and Aust (1978) และตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดตามวิธีการของ AOAC (2006)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองวิเคราะห์คุณภาพเนื้อมาวิเคราะห์ความแปรปรวนสองทาง (Two-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS for windows version 11.5: SPSS Inc.)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การสำรวจเนื้ออกไก่กระทง

จากการสำรวจเนื้ออกไก่กระทงในห้างสรรพสินค้า เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ พบว่าแต่ละบริษัทพบปริมาณเนื้ออกไก่ที่เกิดตำหนิริ้วสีขาวที่แตกต่างกัน โดยบริษัท A การพบตำหนิริ้วสีขาวระดับเบาบางมากถึง 80% รองลงมาคือไม่พบตำหนิริ้วสีขาว 11% และระดับปานกลาง 9% ตามลำดับ บริษัท B การพบตำหนิริ้วสีขาวระดับเบาบางและไม่พบตำหนิริ้วสีขาวใกล้เคียงกัน คือ 50% และ 45% ตามลำดับ ส่วนระดับปานกลางพบ 5% ส่วนบริษัท C พบระดับที่ไม่เกิดตำหนิริ้วสีขาวถึง 58% รองลงมาคือระดับเบาบาง 40% และระดับปานกลาง 2% และสุดท้ายบริษัท D พบตำหนิริ้วสีขาวระดับเบาบาง 70% รองลงมาคือไม่พบตำหนิริ้วสีขาว 23% และระดับปานกลาง 7% (Figure 2) นอกจากนี้เมื่อทำการสุ่มชั่งน้ำหนักชิ้นเนื้ออกไก่ พบว่าน้ำหนักของชิ้นเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักมากกว่าเนื้ออกไก่ที่ไม่พบตำหนิริ้วสีขาว โดยเนื้ออกไก่ที่ไม่พบตำหนิริ้วสีขาวมีน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 203.1 กรัม ส่วนเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวระดับเบาบางจะมีน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 219.2 กรัม และเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวระดับปานกลางมีน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 271.5 กรัม (Figure 3) และพบความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเนื้ออกไก่กับระดับการเกิดตำหนิริ้วสีขาว (r = 0.806, P<0.01) ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่าเนื้ออกไก่ที่ไม่พบตำหนิริ้วสีขาว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mudalal et al. (2014) ดังนั้นการตรวจวัดน้ำหนักเนื้ออกไก่สามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์การประเมินการเกิดตำหนิริ้วสีขาวของเนื้ออกไก่ (Bauermeister et al., 2009; Kuttappan et al., 2013)

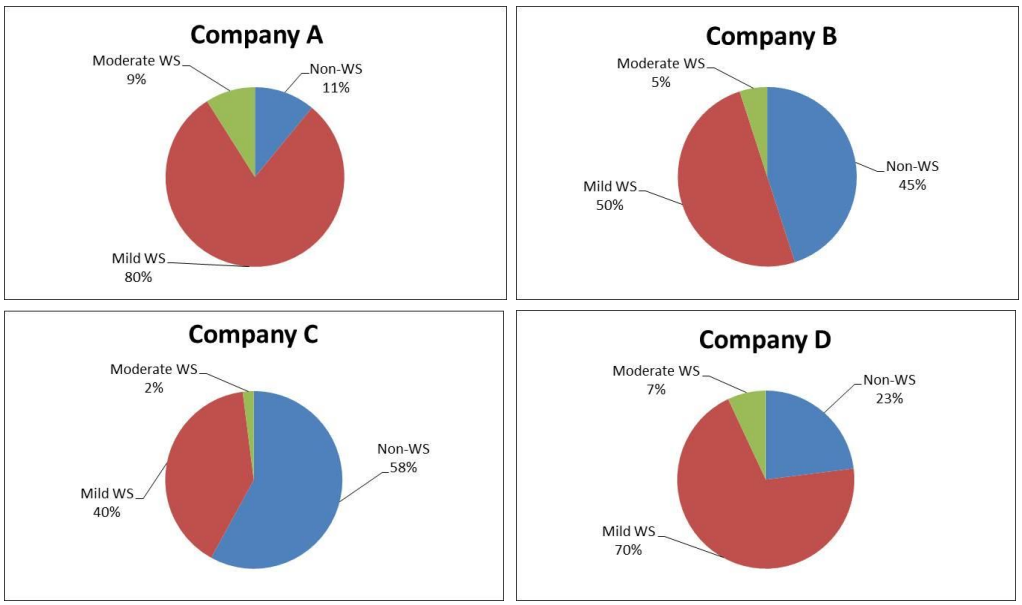

Figure 2 Percentage of broiler breast meat with white striping (% white stripe).

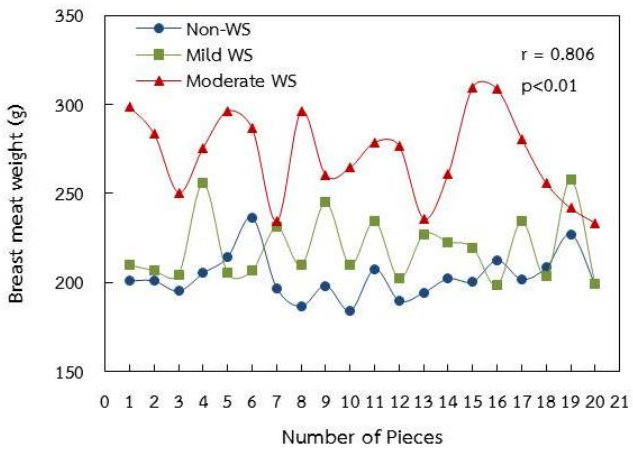

Figure 3 Broiler breast meat weight with white striping (g).

การวิเคราะห์คุณภาพเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาว

จากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของเนื้ออกไก่ ดังแสดงใน Table 1 พบว่าระดับการพบตำหนิริ้วสีขาวมีผลต่อค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก (cooking loss) ค่า pH และค่าการออกซิเดชันของไขมัน (TBARS) (P<0.05) โดยเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวระดับปานกลางมีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก ค่า pH และค่าการออกซิเดชันของไขมันสูงกว่ากลุ่มที่ไม่พบตำหนิริ้วสีขาวและพบตำหนิริ้วสีขาวระดับเบาบางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) นอกจากนี้เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น (3 วัน) เนื้ออกไก่เหล่านี้จะมีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก และค่าการเกิดออกซิเดชันของไขมันเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่พบตำหนิริ้วสีขาว (P<0.05) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mudalal et al. (2015) และ Tijare et al. (2016) พบว่าเนื้ออกไก่ที่เกิดตำหนิริ้วสีขาวมีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกสูงกว่าเนื้ออกไก่ที่ไม่เกิดตำหนิริ้วสีขาว นอกจากนี้ค่าการดูดซึมน้ำระหว่างการหมักต่ำ และค่าความนุ่มลดลงเช่นกัน มีงานวิจัยหลายฉบับกล่าวว่าเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวจะมีปริมาณไขมันเยอะกว่าเนื้ออกไก่ที่ไม่พบตำหนิริ้วสีขาว ซึ่งจากการทดลองพบว่าค่าการออกซิเดชันของไขมันเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่เกิดตำหนิริ้วสีขาว ก็อาจเป็นไปได้ว่าเนื้ออกไก่มีปริมาณไขมันเยอะ ทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมัน (Mudalal et al., 2015; Kuttappan et al., 2016; Tijare et al., 2016; Yuwares et al., 2018)

เมื่อพิจารณาถึงค่าแรงเฉือน (shear force) พบว่าระดับการเกิดตำหนิริ้วสีขาวและระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าแรงเฉือน โดยเนื้ออกไก่ที่เกิดตำหนิริ้วสีขาวระดับปานกลางมีค่าแรงเฉือนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Petracci et al. (2013) ที่พบว่าเนื้ออกไก่ที่เกิดตำหนิริ้วสีขาวต้องใช้แรงในการตัดผ่านมากเมื่อเทียบกับเนื้ออกไก่ที่ไม่พบตำหนิริ้วสีขาว และค่าจะเพิ่มสูงขึ้นหากพบความรุนแรงตำหนิริ้วสีขาวในระดับที่รุนแรง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเกิดการเสื่อมของเส้นใยกล้ามเนื้อจึงส่งผลให้โปรตีนใน myofibrillar และ sarcoplasmic ลดลง (Mudalal et al., 2014) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการทดลองที่กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ว่าเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวระดับปานกลาง มีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกสูงที่สุดจึงส่งผลให้เนื้ออกไก่มีเนื้อสัมผัสที่แข็งกว่ากลุ่มอื่น ๆ

สีจัดเป็นคุณภาพเนื้ออีกด้านหนึ่งที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญ ผลการทดลองพบว่าระดับการเกิดตำหนิริ้วสีขาวและระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความสว่าง (L* value) โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีระดับการเกิดตำหนิริ้วสีขาวปานกลางมีค่าความสว่างสูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่น (P<0.05) ส่วนค่าสีแดง (a* value) และค่าสีเหลือง (b* value) มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดังแสดงใน Table 1 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Brambila et al. (2016) พบว่าเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวระดับรุนแรงมีค่าความสว่างสูงกว่าระดับปานกลาง แต่ค่าสีแดง และค่าสีเหลือง ของเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาวมีค่าไม่แตกต่างกัน

ในส่วนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์รวม พบว่าทั้งระดับการเกิดตำหนิริ้วสีขาวและระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการเจริญของเชื้อ แต่ปริมาณการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างที่จะแปรปรวนอาจเนื่องมาจากการปนเปื้อนของปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ไม่เท่ากันและไม่ได้ควบคุมตั้งแต่เริ่มการทดลอง ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Physicochemical Properties of broiler breast meat with white striping from different storage time.

Parameters	White Striping Level				Storage Time (Days)				P-Value		
	Non-WS	Mild WS	Moderate WS	SE	1	2	3	SE	WS	S	WSxS
Drip loss (%)	2.14	2.25	2.13	0.09	2.03	2.25	2.23	0.09	ns	ns	ns
Thawing loss (%)	3.83	4.63	4.48	0.31	5.38^{a}	3.86^{b}	3.67^{b}	0.31	ns	0.05	ns
Cooking loss (%)	4.11^{c}	15.48^{b}	19.39^{a}	0.41	15.33^{b}	15.19^{b}	18.45^{a}	0.41	<0.001	<0.001	<0.001
pH	6.01^{b}	6.00^{b}	6.10^{a}	0.29	0.06	6.00	6.05	0.03	0.05	ns	ns
TBARS (mg MDA equivalent / kg meat)	1.37^{b}	1.48^{ab}	1.59^{a}	0.04	1.06^{b}	1.64^{a}	1.73^{a}	0.04	0.05	<0.001	ns
Shear force (N)	2.51^{b}	22.64^{b}	24.42^{a}	0.35	22.09^{b}	22.84^{b}	24.63^{a}	0.35	<0.001	<0.001	<0.001
Color											
- Lightness (L*)	2.85^{c}	44.63^{b}	49.3^{a}	0.33	42.63^{b}	47.07^{a}	47.07^{a}	0.33	<0.001	<0.001	<0.001
- Redness (a*)	1.85^{a}	1.63^{ab}	1.47^{b}	0.12	1.75	1.68	1.51	0.12	ns	ns	ns
- Yellowness (b*)	8.63	8.74	9.18	0.22	8.63	8.91	9.01	0.22	ns	ns	ns
Total microbial growth (log CFU/g)	3.98b	4.3a	4.01b	0.60	4.22a	3.88b	4.26a	0.60	0.05	0.05	<0.001

SE: standard error, WS: white striping, S: storage time, WSxS: interaction between white striping level and storage time, ns: non-significant (P>0.05), $^{a-c}$ different superscripts in the same column indicate significant differences (P<0.05), $^{A-C}$ different superscripts in the same row indicate significant differences (P<0.05).

สรุปผลการศึกษา

จากการทำวิจัยทำให้ทราบว่าเนื้ออกไก่กระทงบริษัท A เกิดตำหนิริ้วสีขาวมากกว่าบริษัทอื่น ๆ และการเกิดตำหนิริ้วสีขาวนี้ส่งผลทำให้คุณภาพเนื้ออกไก่ลดลงและยิ่งระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นคุณภาพเนื้อยิ่งเสื่อมลงเรื่อย ๆ โดยเฉพาะค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก ค่าแรงเฉือน และค่าความสว่างสูงกว่าเนื้ออกไก่ในระดับอื่น (P<0.05) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการเพิ่มการออกซิเดชันของไขมันในวันที่ 3 (P<0.05) สำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์รวมก็มีการปนเปื้อนในทุกระดับการพบตำหนิริ้วสีขาว แสดงให้เห็นถึงการด้อยคุณภาพของเนื้ออกไก่ลงอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้สำหรับผู้ที่สนใจนักวิจัยแนะนำว่าควรทำการศึกษาเพิ่มเติมทางด้านองค์ประกอบทางเคมีของเนื้ออกไก่ที่พบตำหนิริ้วสีขาว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2006. *Official methods of analysis of AOAC international.* Maryland: AOAC international.

Buege, J. A., and Aust, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-304.

Brambila, G. S., Bowker, B. C., and Zhuang, H. 2016. Comparison of sensory texture attributes of broiler breast fillets with different degree of white striping. *Poultry Science* 95: 2472-2476.

Bauermeister, L. J., Morey, A. U., Moran, E. T., Singh, M., Owens, C. M., and McKee, S. R. 2009. Occurrence of WS in chicken breast fillets in relation to broiler size. *Poultry Science* 88: 104 (Abstract).

Bowker, B., and Zhuang, H. 2016. Impact of white striping on functionality attributes of broiler breast meat. *Poultry Science* 95: 1957-1965.

Ferreira, T. Z., Casagrande, R. A., Vieira, S. L., Driemeier, D., and Kindlein, L. 2014. An investigation of a reported case of white striping in broilers. *Journal of Applied Poultry Research* 23: 748-753.

Griffin, J. R., Moraes, L., Wick, M., and Lilburn, M. S. 2018. Onset of white striping and progression into wooden breast as defined by myopathic changes underlying Pectoralis major growth. Estimation of growth parameters as predictors for stage of myopathy progression. *Avian Pathology* 47: 2-13.

Honikel, K. O. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science* 49: 447-457.

Kuttappan, V. A., Brewer, V. B., Waldroup, P. W., and Owens, C. M. 2012a. Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poultry Science* 91: 2677-2685.

Kuttappan, V. A., Lee, Y. S., Erf, G. F., Meullenet, J. F. C., McKee, S. R., and Owens, C. M. 2012b. Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degrees of white striping. *Poultry Science* 91: 1240-1247.

Kuttappan, V. A., Brewer, V. B., Mauromoustakos, A., McKee, S. R., Emmert, J. L., Meullenet, J. F., and Owens, C. M. 2013. Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poultry Science* 92: 811-819.

Kuttappan, V. A., Hargis, B. M., and Owens, C. M. 2016. White striping and woody breast myopathies in the modern poultry industry: a review. *Poultry Science* 95: 2724-2733.

Lorenzi, M., Mudalal, S., Cavani, C., and Petracci, M. 2014. Incidence of white striping under commercial conditions in medium and heavy broiler chickens Italy. *Journal of Applied Poultry Research* 23: 754-758.

Mudalal, S., Babini, E., Cavani, C., and Petracci, M. 2014. Quantity and functionality of protein fractions in chicken breast fillets affected by WS. *Poultry Science* 93: 1-9.

Mudalal, S., Lorenzi, M., Soglia, F., Cavani, C., and Petracci, M. 2015. Implications of white striping and wooden breast abnormalities on quality traits of raw and marinated chicken meat. *Animal Consortium* 9: 728-734.

National Chicken Council. 2017. *White striping: what is white striping in chicken? Does white striping affect the nutritional value of chicken meat?*. https://www.chickencheck.in/faq/white-striping-in-chicken/. (25 October 2019).

Petracci, M., Sirri, F., Mazzzoni, M., and Meluzzi, A. 2013. Comparison of breast muscle traits and meat quality characteristics in 2 commercial chicken hybrids. *Poultry Science* 92: 2438-2447.

Russo, E., Drigo, M., Longoni, C., Pezzotti, R., Fasoli, P., and Recordati, C. 2015. Evaluation of white striping prevalence and predisposing factors in broilers at slaughter. *Poultry Science* 94: 1843-1848.

Tijare, V., Yang, F., Kuttappan, V., Alvarado, C., Coon, C., and Owens, C. 2016. Meat quality of broiler breast fillets with white striping and woody breast muscle myopathies. *Poultry Science* 95: 2167-2173.

Trocino, A., Piccirillo, A., Birolo, M., Radaelli, G., Bertotto, D., Filiou, E., Petracci, M., and Xiccato, G. 2015. Effect of genotype, gender and feed restriction on growth, meat quality and the occurrence of white striping and wooden breast in broiler chickens. *Poultry Science* 94: 2996-3004.

Yuwares, M., U-chupaj, J., Srimarut, Y., Chaiwiwattrakul, P., Uengwetwanit, T., Arayamethakorn, S., Punyapornwithaya, V., Sansamur, C., Kirschke, C. P., Huang, L., et al. 2018. Monitoring of white striping and wooden breast cases and impacts on quality of breast meat collected from commercial broilers (*Gallus gallus*). *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 31: 1807-1817.

วันรับบทความ (Received date) : 15 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 15 ธ.ค. 62

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

ผลของความเป็นกรด-ด่างของน้ำจากใบหูกวางแห้งต่อการเพิ่มอัตราส่วนเพศผู้ และการเติบโตในปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก

Effect of Water pH from Dried *Terminalia catappa* Leaves on Increasing Male Ratio and Growth Performance of Halfmoon Fancy Betta Fish (*Betta splendens*)

สุกสกาว รอดปั้น[1] นงนุช เลาหะวิสุทธิ์[1*] และอัจฉรี เรืองเดช[1]
Sooksakaow Rodpan[1], Nongnuch Laohavisuti[1*] and Uscharee Ruangdej[1]

บทคัดย่อ

ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้ง (*T. catappa* leaves, TCL) ต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตรารอดของพ่อแม่ปลากัด และอัตราส่วนเพศผู้ การเติบโตในลูกปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก พบว่า pH จากน้ำแช่ TCL ที่ 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม/ลิตร มีค่า pH เฉลี่ย 7.90, 6.67, 6.48, 6.33 และ 5.91 ตามลำดับ ทำให้การผสมพันธุ์วางไข่และอัตรารอดของพ่อแม่พันธุ์และลูกปลากัดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยน้ำแช่ TCL 2.5 กรัม/ลิตร pH 6.67 มีการวางไข่มากที่สุด เท่ากับ 80.0% แต่น้ำแช่ TCL 10 กรัม/ลิตร pH 5.91 ทำให้พ่อแม่พันธุ์และลูกปลากัดตายทั้งหมด การแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิใน pH จากน้ำแช่ TCL ที่ปริมาณต่างกัน ส่งผลให้ลูกปลาเพศผู้จากน้ำแช่ TCL 5 กรัม/ลิตร pH 6.71 มีลูกปลาเพศผู้มากที่สุด (74.13%) การเติบโตของลูกปลากัดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ดังนั้น ปลากัดมีการผสมพันธุ์วางไข่ในน้ำแช่ TCL 2.5-7.5 กรัม/ลิตร pH 6.33-6.67 และน้ำแช่ TCL 5 กรัม/ลิตร pH 6.71 สามารถเพิ่มลูกปลากัดเพศผู้ได้ 35.27% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (pH 7.50)

คำสำคัญ: ปลากัด ใบหูกวาง ความเป็นกรด-ด่าง

Abstract

The effects of pH from the different quantities of dried *Terminalia catappa* leaves (TCL) on breeder spawning rate, survival rate, larvae sex ratio and growth performance of halfmoon fancy betta fish were studied. The mean pH that resulted from soaking TCL in water at the concentrations of 0, 2.5, 5, 7.5 and 10 g/l were 7.90, 6.67, 6.48, 6.33 and 5.91, respectively. As a result, spawning rate and survival rate of the breeders and survival rate of larvae were significantly different (P<0.05). The pH from the soaking of dried TCL in water at 2.5 g/l was pH 6.67, and this pH produced the highest spawning rate, which was 80.0%. However, the pH that resulted from soaking dried TCL at 10 mg/l was pH 5.91, and at this pH all breeders and larvae died. The immersion of fertilized eggs in various pH that resulted from soaking of different amounts of TCL affected the ratio of males and the growth performance of the *B. splendens* larvae. It was found that the soaking of dried TCL leaves at 5 g/l, which produced a pH of 6.71, resulted in the highest numbers of male larvae (74.13%). However, the growth of the fighting fish larvae was not significantly different at the various pH (P>0.05). These studies indicate that 1) TCL concentrations of 2.5-7.5 g/l (pH 6.33-6.67) should be used for *B. splendens* breeding and, 2) a TCL concentration of 5.0 g/l (pH 6.71) increased the number of male larvae by 35.27% compared to the control (pH 7.50).

Keywords: *Betta splendens, Terminalia catappa*, pH

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Department of Animal Production Technology and Fishery, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: nongnuch.la@kmitl.ac.th

คำนำ

ปลากัด (*Betta splendens*) เป็นปลาสวยงามขนาดเล็กที่ได้รับการยกย่องเป็นสัตว์น้ำประจำชาติในปี พ.ศ. 2562 มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จัดเป็นสัตว์น้ำท้องถิ่นพบได้บริเวณลุ่มแม่น้ำแม่กลอง และแม่น้ำเจ้าพระยา มีลักษณะลำตัวเรียวยาวแบนด้านข้าง ความยาวลำตัว 5-7 เซนติเมตร ครีบก้นยาวจรดครีบหาง ครีบอกยาว ริมฝีปากหนา รูปร่างและสีสันของปลาเพศผู้สวยงามกว่าเพศเมีย (การุณ ทองประจุแก้ว, 2556) ในปัจจุบันปลากัดได้ถูกพัฒนาสายพันธุ์ให้มีสีสันสวยงามสะดุดตา ขนาดลำตัว และครีบต่าง ๆ มีขนาดใหญ่ เช่น ปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก (halfmoon fancy), double tail, crown tail เป็นต้น ปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก ได้รับความนิยมจากตลาดในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งมีปริมาณการส่งออกในปี 2559 ประมาณ 1.3-4.7 ล้านตัว คิดเป็นมูลค่า 11-45 ล้านบาท (กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ, 2559) แหล่งเพาะเลี้ยงปลากัดเพื่อการค้าของประเทศไทยมีมากที่กรุงเทพมหานคร นครปฐม ราชบุรี อ่างทอง กาญจนบุรี และสุพรรณบุรี เนื่องจากเป็นปลาที่เพาะและขยายพันธุ์ได้ง่าย ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงน้อย แต่ในช่วงฤดูหนาวระหว่างปลายเดือนตุลาคม-มกราคม เป็นช่วงอากาศหนาวเย็น อุณหภูมิลดต่ำลง ส่งผลให้เกษตรกรเพาะพันธุ์ปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีกได้น้อยลง อัตรารอดและอัตราส่วนปลาเพศผู้ลดลง ทำให้ประสบปัญหาปลากัดเพศผู้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ซึ่งการเพิ่มจำนวนปลาเพศผู้ด้วยการใช้ฮอร์โมนในการแปลงเพศทำให้ลักษณะของครีบต่าง ๆ ของปลามีขนาดสั้นกว่าปลาเพศผู้ปกติและมีสีสันไม่สวยงามตามความต้องการของตลาด และจากการสอบถามข้อมูลการเพาะพันธุ์และอนุบาลปลากัดจากเกษตรกรนิยมใช้ใบหูกวางแห้งแช่ในน้ำที่ใช้เพาะพันธุ์ ซึ่งมีความเชื่อว่าสามารถช่วยให้ลูกปลามีอัตรารอดและอัตราส่วนเพศผู้เพิ่มขึ้น ประกอบกับการศึกษาของ Rajesh et al. (2016) กล่าวว่า ต้นหูกวาง (*Terminalia catappa*) เป็นไม้ยืนต้นที่พบได้ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย และไทย คุณสมบัติของลำต้น ลูก และใบหูกวางสามารถสกัดเป็นยาสมุนไพร นอกจากนี้ใบหูกวาง ยังส่งผลต่อความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH) จากการศึกษาของ Nugroho et al. (2016) พบว่า ระดับความเข้มข้นของน้ำแช่ใบหูกวาง 625 ppm มีค่า pH ที่ 5.05 โดยการลดลงของ pH นั้นขึ้นอยู่กับสารพฤกษเคมีในใบหูกวาง คือ สารแทนนิน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรดจึงสามารถลดค่า pH ในน้ำได้ จากรายงานของ Reddon and Hurd (2013) กล่าวว่า การกำหนดเพศจากสิ่งแวดล้อม (environmental sex determination, ESD) โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละสายพันธุ์ที่มีการกำหนดเพศจากสิ่งแวดล้อมจะสามารถพัฒนาเป็นได้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่ในช่วงของการพัฒนาระยะแรก (phenotypic plasticity) โดย pH เป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่สามารถส่งผลต่อการกำหนดเพศในปลาได้ และจากการทดลองของ Rubin (1985) ศึกษาเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาหมอสีใน pH ที่แตกต่างกันคือ pH 5.05-6.20 และ pH 6.90-7.80 พบว่า pH ต่ำ (5.05-6.20) มีลูกปลาเพศผู้เพิ่มขึ้น 87-100% Baroiler and Cotta (2001) เปรียบเทียบระดับ pH 2 ระดับคือ 4.5 และ 6.5 พบว่าความเป็นกรด-ด่างส่งผลต่อสัดส่วนเพศผู้ในปลาหมอแคระ (*Apistogramma* sp.) ทำให้มีปลาเพศผู้สูงขึ้นในสภาวะเป็นกรด pH 4.5 และ Reddon and Peter (2013) ศึกษาความเป็นกรด-ด่างของน้ำ 2 ระดับ คือ pH 6.5 และ pH 5.5 ที่ส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในปลาหมอสี (*Pelvicachromis pulcher*) พบว่า ระดับ pH 5.5 มีจำนวนเพศผู้มากกว่าที่ระดับ pH 6.5

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคการเพาะพันธุ์ปลากัดด้วยการปรับ pH โดยการแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกัน และระยะเวลาการแช่ที่ส่งผลต่อ pH ในน้ำ ปริมาณใบหูกวางแห้งที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์วางไข่ และอัตราส่วนเพศผู้ อัตราการรอดของลูกปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก

วิธีการศึกษา

การทดลองที่ 1 ศึกษาค่า pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของพ่อแม่พันธุ์ปลากัดและอัตราการรอดในลูกปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design แบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ใช้พ่อแม่พันธุ์ปลากัด halfmoon fancy อายุ 12 สัปดาห์ จำนวน 25 คู่ น้ำหนักเฉลี่ยปลาเพศผู้ 1.39±0.13 กรัม ปลาเพศเมีย 1.12±0.04 กรัม จาก แชมป์ฟาร์ม จังหวัดนครปฐม ใช้ภาชนะเพาะพันธุ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร (ขันพลาสติกทรงกลม) บรรจุน้ำ 1 ลิตร ทำการวัดค่า pH ในน้ำและใส่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกัน คือ 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม โดยมีการเตรียมใบหูกวาง ดังนี้ นำใบหูกวางที่ลักษณะใบสีน้ำตาลแดงร่วงจากต้นล้าง ทำความสะอาด ตากแดดให้แห้งสนิท ตัดให้มีขนาด 3x4 เซนติเมตร และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตาข่ายไนลอนห่อใบหูกวางแห้งเป็นลักษณะคล้ายลูกประคบ (Figure 1) และแช่ใบหูกวางแห้ง นาน 15 ชั่วโมง ซึ่งจากการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่า ระยะเวลาการแช่ใบหูกวางแห้ง 15 ชั่วโมง ส่งผลให้ค่า pH มีความแตกต่างกันในแต่ละปริมาณใบหูกวางแห้งที่กำหนด เมื่อครบระยะเวลาแช่

นำใบหูกวางแห้งออก วัดค่า pH และเก็บตัวอย่างน้ำแช่ใบหูกวางปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาค่าความเป็นด่างและความกระด้างของน้ำตามวิธีการของ Mount (1972) จากนั้นนำปลาเพศผู้ใส่ลงในภาชนะเพาะพันธุ์และนำแผ่นกระเบื้องปิดภาชนะเพาะพันธุ์ให้มืดสนิทนาน 3-4 ชั่วโมง เพื่อให้ปลากัดเพศผู้สร้างหวอดและพร้อมในการผสมพันธุ์ หลังจากนั้นนำปลาเพศเมียลงในภาชนะเพาะพันธุ์ ปิดให้มืดสนิทอีก 3 วัน เพื่อให้ปลาผสมพันธุ์ เมื่อครบ 3 วัน นำปลาเพศเมียออก และวัดค่า pH อีกครั้ง จากนั้นปิดทิ้งไว้ 5 วัน เพื่อให้ปลาเพศผู้อนุบาลลูกปลา เมื่อครบ 5 วัน นำปลาเพศผู้ออก และนำลูกปลาอนุบาลในอ่างปูนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร เติมน้ำปริมาตร 100 ลิตร อนุบาลลูกปลาด้วยไรแดงที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยด่างทับทิม 100 ppm นาน 4-5 นาที ให้อาหารวันละ 2 มื้อ ช่วงเวลา 9.00 และ 18.00 น. จดบันทึกข้อมูลค่า pH ความเป็นด่าง ความกระด้างในน้ำ และเก็บข้อมูลการวางไข่และอัตราการรอดของพ่อแม่พันธุ์และลูกปลาเมื่ออายุครบ 2 สัปดาห์ โดยคำนวณจากวิธีดังนี้

$$\text{อัตราการวางไข่ (\%)} = \frac{\text{จำนวนแม่ปลาที่วางไข่ของแต่ละชุดการทดลอง}}{\text{จำนวนแม่ปลาทั้งหมดของแต่ละชุดการทดลอง}} \times 100$$

$$\text{อัตราการรอด (\%)} = \frac{\text{จำนวนลูกปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนลูกปลาเริ่มต้นการทดลอง}} \times 100$$

และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป โดยใช้การวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA

Figure 1 The preparation of *T. catappa* leaves for *B. splendens* breeding.

การทดลองที่ 2 ศึกษาค่า pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอดและการเติบโตของลูกปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design แบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ใช้พ่อแม่พันธุ์ปลากัด halfmoon fancy อายุ 12 สัปดาห์ จำนวน 25 คู่ น้ำหนักเฉลี่ยปลาเพศผู้ 1.45±0.13 กรัม ปลาเพศเมีย 1.05±0.21 กรัม จาก แชมป์ฟาร์ม จังหวัดนครปฐม นำปลาเพศผู้ใส่ลงในภาชนะเพาะพันธุ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 1 ลิตร ใส่ใบหูกวางแห้ง 1 ใบ ขนาด 3x4 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.4 กรัม และนำแผ่นกระเบื้องปิดภาชนะเพาะพันธุ์มืดสนิท นาน 3-4 ชั่วโมง เพื่อให้ปลากัดเพศผู้สร้างหวอดและพร้อมในการผสมพันธุ์ หลังจากนั้นนำปลาเพศเมียลงในภาชนะเพาะพันธุ์ ทำการวัดค่า pH ในน้ำ และปิดภาชนะเพาะพันธุ์ให้มืดสนิทอีก 3 วัน เพื่อให้ปลาผสมพันธุ์ เมื่อครบ 3 วัน นำปลาเพศเมียออกจากภาชนะเพาะพันธุ์ สังเกตบริเวณหวอดพบไข่ปลามีลักษณะกลม สีขาวขุ่น และวัดค่า pH อีกครั้งก่อนการแช่ใบหูกวางแห้งในไข่ปลาที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว โดยนำตาข่ายไนลอนห่อใบหูกวางแห้งปริมาณ 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม เป็นลักษณะคล้ายลูกประคบ (Figure 1) แช่ลงในภาชนะเพาะพันธุ์ที่มีไข่ปลากัดระยะเวลา 15 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแช่นำใบหูกวางออกและวัดค่า pH จากนั้นปิดภาชนะเพาะพันธุ์ทิ้งไว้ 5 วัน เพื่อให้ปลาเพศผู้อนุบาลลูกปลา หลังจากนั้นนำลูกปลาอนุบาลในอ่างปูนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร เติมน้ำปริมาตร 100 ลิตร อนุบาลลูกปลาด้วยไรแดงที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยด่างทับทิม 100 mg/l นาน 4-5 นาที ให้อาหารวันละ 2 มื้อ ช่วงเวลา 9.00 และ 18.00 น. มีการดูดตะกอนของเสียและปรับปริมาตรน้ำให้เท่ากับ 100 ลิตร ทุก ๆ สัปดาห์

ทำการนับจำนวนลูกปลาเพื่อคำนวณหาอัตราการรอด อัตราส่วนเพศและการเติบโต เมื่ออนุบาลครบ 4 สัปดาห์ ทำการแยกเพศจากลักษณะภายนอกสามารถสังเกตลักษณะปลากัดเพศผู้และปลากัดเพศเมียได้จากปลากัดเพศผู้มีลำตัวเรียวยาว สีสันสวยงาม ลักษณะครีบหาง ครีบก้น มีความยาวมากกว่าปลากัดเพศเมีย และในปลากัดเพศเมียมีจุดไข่นำบริเวณใต้ท้องระหว่างครีบอก (Figure 2) บันทึกข้อมูลอัตราการรอดและอัตราส่วนเพศดังสมการด้านล่าง และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป โดยใช้การวิเคราะห์แบบ One-way ANOVA

$$\text{อัตราการรอด (\%)} = \frac{\text{จำนวนลูกปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนลูกปลาเริ่มต้นการทดลอง}} \times 100$$

$$\text{อัตราส่วนเพศ (\%)} = \frac{\text{จำนวนเพศลูกปลา}}{\text{จำนวนลูกปลาทั้งหมด}} \times 100$$

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว) = น้ำหนักเฉลี่ยปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง - น้ำหนักเฉลี่ยปลาเมื่อเริ่มต้น
ความยาวที่เพิ่มขึ้น (เซนติเมตร/ตัว) = ความยาวเฉลี่ยปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง – ความยาวเฉลี่ยปลาเมื่อเริ่มต้น

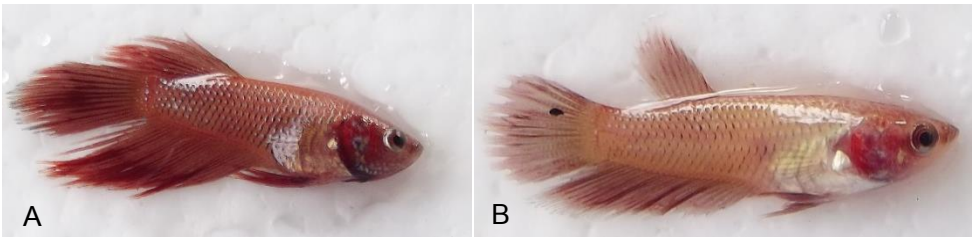

Figure 2 Difference between (A) male *B. splendens* and (B) female *B. splendens*.

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ศึกษาค่า pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของพ่อแม่พันธุ์ปลากัดและอัตราการรอดในลูกปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก

จาก Table 1 ศึกษาความสัมพันธ์ของ 3 ปัจจัยทางคุณภาพน้ำที่ส่งผลต่อปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีกในน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันระยะเวลา 15 ชั่วโมง พบว่า pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกัน (0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม/ลิตร) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกชุดการทดลอง ($P<0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย pH 7.65±0.33, 6.89±0.33, 6.67±0.33, 6.51±0.33 และ 5.67±0.00 ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Nugroho et al. (2016) ศึกษาผลของสารสกัดจากใบหูกวางส่งผลต่อคุณภาพน้ำในการเลี้ยงปลากัด พบว่า เมื่อปริมาณใบหูกวางเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่า pH ในน้ำลดลง เนื่องจากสารพฤกษเคมีในใบหูกวางคือ สารแทนนิน มีคุณสมบัติเป็นกรดจึงสามารถลด pH ในน้ำได้ และค่าความเป็นด่างของน้ำมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) มีค่าสูงสุดที่ปริมาณใบหูกวางแห้ง 2.5 กรัม/ลิตร 156.0±12.01 mg/l as $CaCO_3$ ค่าเฉลี่ย pH 6.89 ซึ่งค่าความกระด้างของน้ำไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 160-189 mg/l as $CaCO_3$ ส่งผลให้คุณภาพน้ำเป็นน้ำกระด้าง โดยจากการศึกษาของ วุฒิพล เล้าอรุณ (2538) กล่าวว่า ค่าความกระด้างของน้ำประปามีค่าอยู่ที่ 150-300 mg/l as $CaCO_3$ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Mount (1972) พบว่าเมื่อ pH ลดลงค่า alkalinity จะลดลงตามไปด้วย pH 7.5 มีค่า alkalinity 155.6 mg/l^{-1} as $CaCO_3$ และ pH 6.6 มีค่า alkalinity 102 mg/l^{-1} as $CaCO_3$ ซึ่งค่า pH และค่าความเป็นด่างของน้ำมีความสัมพันธ์กัน คือ ค่าความเป็นด่างของน้ำแสดงความเป็นด่างในน้ำ หากมีค่าสูงขึ้น ส่งผลให้ค่า pH สูงขึ้น เนื่องจากในน้ำมีปริมาณไฮดรอกไซด์ไอออนเพิ่มขึ้น

Table 1 Water quality parameters of different amount of dried *T. catappa* leaves after 15 hrs.

T. catappa (g/l)	Alkalinity (mg/l as $CaCO_3$)	Hardness (mg/l as $CaCO_3$)	pH
0	101.0±2.86[b]	189.0±2.90	7.65±0.33[a]
2.5	156.0±12.01[a]	160.0±20.13	6.89±0.33[b]
5.0	121.3±11.62[b]	155.3±2.66	6.67±0.33[c]
7.5	116.0±2.08[b]	163.3±0.88	6.51±0.33[d]
10	102.0±6.11[b]	167.3±1.33	5.67±0.00[e]

Mean±SE with the different superscript in column are significantly different (P<0.05).

หลังจากการแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันในน้ำ 1 ลิตร เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ก่อนนำน้ำแช่ใบหูกวางแห้งมาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลากัด pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยมีค่าเฉลี่ย pH 7.90±0.07, 6.67±0.04, 6.48±0.04, 6.33±0.07 และ 5.91±0.17 ตามลำดับ ส่งผลต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตราการรอดของพ่อแม่พันธุ์ปลากัด พบว่า การผสมพันธุ์วางไข่ของพ่อแม่พันธุ์ปลากัดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดย pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งที่ 2.5 กรัม/ลิตร ค่าเฉลี่ย pH 6.67±0.04 มีการผสมพันธุ์วางไข่มากที่สุด คือ 80.0±44.72% ซึ่งมีความแตกต่างกับชุดการทดลองที่ไม่มีการแช่ใบหูกวางแห้ง ค่าเฉลี่ย pH 7.90±0.07 และชุดการทดลอง pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณ 10 กรัม/ลิตร ค่าเฉลี่ย pH 5.91±0.17 โดยมีการผสมพันธุ์วางไข่ 20.00±44.72% และ 0.00±0.00% ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับชุดการทดลอง pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งที่ 5 และ 7.5 กรัม/ลิตร มีการวางไข่ 60.00±54.77% ซึ่ง pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณ 10 กรัม/ลิตร (pH 5.91±0.17) มีความเป็นกรดส่งผลให้ไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ และอัตราการรอดของพ่อแม่พันธุ์ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับชุดการทดลอง pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งที่ 0, 2.5, 5 และ 7.5 กรัม/ลิตร เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลง pH ในน้ำจากการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากัดที่ pH 7.33±0.12 แต่เมื่อทำการจับคู่ผสมพันธุ์ปลาค่า pH มีการลดต่ำลงเข้าสู่สภาวะเป็นกรดส่งผลต่อกระบวนการผสมพันธุ์และอัตราการรอดของพ่อแม่พันธุ์ (Table 2) Ikuta et al. (2000) ระบุว่าระดับ pH ที่มีความเป็นกรดสูงส่งผลต่อสรีรวิทยาในปลาทำให้ระดับ cortisol ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นทำให้เกิดความเครียดและภูมิคุ้มกันลดต่ำลงและส่งผลต่อระดับ plasma ใน sex steroids และฮอร์โมน gonadotropin มีระดับสูงกว่าปกติเป็นผลทำให้กระบวนการสืบพันธุ์หยุดชะงักลง เช่นเดียวกับ Vuorinen et al. (1990) ศึกษาเลี้ยงปลาใบขนุน ที่ pH 5.75 และ 4.75 พบว่า pH ทั้งสองระดับส่งผลให้ระบบสืบพันธุ์ในเพศเมียอ่อนแอและไม่มีการวางไข่ และ Baldisserotto (2011) กล่าวว่า ปลาน้ำจืดสามารถอาศัยอยู่ได้ที่ระดับ pH 6-8 หาก pH มีค่าความเป็นกรดมากส่งผลให้ระบบหมุนเวียนเลือดล้มเหลว เนื่องจาก ปริมาณเม็ดเลือดและของเหลวในร่างกายมีการเพิ่มขึ้นส่งผลต่ออัตราการรอดในปลาน้ำจืด ในส่วนของอัตราการรอดของลูกปลากัดอายุ 2 สัปดาห์ พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดย pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณ 0, 2.5, 5 และ 7.5 กรัม/ลิตร มีค่าเฉลี่ย pH 7.90±0.07, 6.67±0.04, 6.48±0.04 และ 6.33±0.07 ตามลำดับ มีอัตราการรอดเฉลี่ยของลูกปลา 9.16±4.53, 43.68±11.55, 43.72±18.15 และ 40.40±16.61% มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับชุดการทดลอง pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณ 10 กรัม/ลิตร ค่าเฉลี่ย pH 5.91±0.17 มีอัตราการรอดเฉลี่ย 0.00±0.00% Baldisserotto (2011) กล่าวว่า pH ที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของลูกปลาน้ำจืด คือ pH 6-8 และจากการศึกษาของ Craig and Baksi (1977) ทำการศึกษาค่า pH ที่ลดต่ำลงส่งผลต่อการสืบพันธุ์ การเจริญเติบโต และอัตราการรอดในปลา flagfish (*Jordanella floridae*) พบว่า เมื่อค่า pH มีการลดต่ำลงส่งผลให้มีอัตราการตายของลูกปลาเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระดับ pH 5.5-4.5

Table 2 Effect of the amount of dried *T. catappa* leaves on pH values, spawning rate in 2 week and survival rates in *B. splendens*.

Parameters	*T. catappa* (g/l)				
	0	2.5	5	7.5	10
pH 0 hr	7.27±0.11[a]	7.25±0.01[ab]	7.43±0.14[bc]	7.34±0.04[bc]	7.33±0.12[c]
pH 15 hrs	7.90±0.07[c]	6.67±0.04[a]	6.48±0.04[b]	6.33±0.07[d]	5.91±0.17[e]
pH 1 day	7.52±0.08[a]	6.96±0.08[b]	6.90±0.03[bc]	6.75±0.04[c]	6.39±0.19[d]
pH 3 day	6.92±0.11[b]	7.19±0.07[a]	7.28±0.03[a]	7.30±0.05[a]	6.43±0.21[c]
Spawning (%)	20.00±44.72[b]	80.00±44.72[a]	60.00±54.77[ab]	60.00±54.77[ab]	0.00±0.00[c]
Survival rate of breeder (%)	100±0.00[a]	100±0.00[a]	100±0.00[a]	100±0.00[a]	0.00±0.00[b]
Survival rate of larvae (%)	9.16±4.53[ab]	43.68±11.55[a]	43.72±18.15[a]	40.40±16.61[a]	0.00±0.00[b]

Mean±SE with the different superscripts in row are significantly different (P<0.05).

การทดลองที่ 2 ศึกษาค่า pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอดและการเติบโตของลูกปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก

หลังจากการแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกัน (0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 กรัม/ลิตร) ในไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิเป็นเวลา 15 ชั่วโมง พบว่า ค่า pH จากการแช่ใบหูกวางแห้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยมีค่าเฉลี่ย pH ดังนี้ 7.50±0.02, 7.31±0.06, 6.71±0.02, 6.51±0.04 และ 5.42±0.10 ตามลำดับ จาก Table 3 พบว่า อัตราการรอดของลูกปลากัดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) โดย pH ที่ได้จากการแช่ใบหูกวางแห้ง 10 กรัม/ลิตร มีค่าเฉลี่ย pH 5.42±0.10 หลังจากแช่ในไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว ส่งผลให้ไข่ปลาไม่มีการฟักและพ่อพันธุ์ปลากัดตาย แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับชุดการทดลอง pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้ง 0, 2.5, 5.0 และ 7.5 กรัม/ลิตร โดยมีอัตราการรอดเฉลี่ยสูงสุดร้อยละ 95.62±2.08 ค่าเฉลี่ย pH 7.50±0.02 ในชุดการทดลองที่ไม่มีการแช่ใบหูกวางแห้ง Baldisserotto (2011) ทำการศึกษาผลของ pH และความกระด้างในน้ำต่อการเจริญเติบโตของปลาน้ำจืด พบว่า เมื่อ pH มีค่าต่ำกว่า pH 6 หรือมีค่าสูงกว่า pH 9 ส่งผลให้ไข่ปลา grumatã (*Prochilodus lineatus*) ไม่เกิดการฟัก ซึ่งมีการอธิบายว่าลูกปลาน้ำจืดทั่วไปจะมีการฟักและมีอัตราการรอดที่ pH 6-8 โดย Mount (1972) ศึกษาการลดลงของ pH ในการเลี้ยงปลา fathead minnows (*Pimephales promelas*) พบว่าเมื่อ pH ลดต่ำลงถึง pH 5.2 และ 4.5 ส่งผลให้มีอัตราการฟักลดลง และไข่ปลาที่ได้มีความผิดปกติ เนื่องจากปลาวางไข่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมส่งผลให้การพัฒนาเซลล์ไข่ผิดปกติ และ Sung and Munafi (2019) ทำการศึกษาสารสกัดจากใบหูกวางส่งผลต่ออัตราการรอดและการเจริญเติบโตในลูกปลา pearl gourami (*Trichopodus leerii*) พบว่า น้ำผสมสารสกัดจากใบหูกวางใช้ในการเลี้ยงปลา pearl gourami มีค่าความเป็นกรดเล็กน้อย มีค่า pH 5.8-6.5 ซึ่งเหมาะสมสำหรับการเลี้ยง ทำให้อัตราการรอดเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของการเลี้ยงด้วยน้ำประปา โดยมีอัตราการรอด 90% และในส่วนของอัตราส่วนเพศผู้ พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดย pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้ง 5 กรัม/ลิตร ค่าเฉลี่ย pH 6.71±0.02 มีอัตราส่วนเพศผู้เฉลี่ยสูงสุดคือ 74.13±9.08% ซึ่งมีลูกปลากัดเพศผู้เพิ่มขึ้นจากชุดการทดลองควบคุม 35.27±22.97% เนื่องจาก pH เป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมอย่างหนึ่งที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการกำหนดเพศในปลาได้ Reddon and Peter (2013) ทำการศึกษาความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่างกัน 2 ระดับ คือ pH 5.5 และ pH 6.5 ที่มีผลต่ออัตราส่วนเพศในปลาหมอสี (*Pelvicachromis pulcher*) พบว่า pH ทั้ง 2 ระดับ มีอัตราส่วนลูกปลาหมอสีเพิ่มขึ้น แต่ pH 5.5 มีจำนวนเพศผู้มากกว่าที่ระดับ pH 6.5 โดย pH 5.5 มีจำนวนเพศผู้ 13 ตัวจาก 18 ตัว เนื่องจาก pH ของน้ำเป็นปัจจัยในการกระตุ้นให้เกิดการกำหนดเพศในปลาซึ่งมีผลต่อการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของปลาหมอสี และจากรายงานวิจัยของ Baroiler and Cotta (2001) ศึกษาเปรียบเทียบระดับ pH 2 ระดับคือ 4.5 และ 6.5 พบว่าปลาในกลุ่มปลาหมอแคระมีความไวต่อสิ่งกระตุ้นนั้นคือ pH ของน้ำและมีสัดส่วนของเพศผู้สูงในสภาวะเป็นกรด คือ pH 4.5 ซึ่งจากงานวิจัยต่าง ๆ พบว่าปลาแต่ละชนิดมีความสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างได้ต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งกำเนิดของปลานั้น ๆ จากการทดลองในปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก ครั้งนี้พบว่า เมื่อค่า pH ระหว่าง 5.42-6.50 ส่งผลต่อการผสมพันธุ์และอัตราการรอดใน

พ่อแม่พันธุ์ปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก ในส่วนของลูกปลากัดหากมีการลดลงของค่า pH ต่ำกว่า 6.5 ส่งผลต่ออัตราการรอดของลูกปลากัด Romer and Beissenherz (1996) กล่าวว่า จีโนไทป์สามารถกำหนดเพศปลาหลาย ๆ ชนิดได้ แต่การกำหนดเพศปลาโดยสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นได้ในปลาบางชนิดซึ่งปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลมากที่สุดคือ อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง จาก Table 3 ผลของการเติบโตของลูกปลาเมื่อครบ 4 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) โดยมีค่าน้ำหนักของลูกปลากัดเฉลี่ย 0.25-0.65 กรัม และมีความยาวของลูกปลากัดเฉลี่ย 2.80-3.61 เซนติเมตร จากการศึกษาของ Sung and Munafi (2019) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเลี้ยงลูกปลา pearl gourami (*Trichopodus leerii*) ในน้ำผสมสารสกัดจากใบหูกวางและน้ำประปา พบว่า ลูกปลาที่มีการฟักในน้ำผสมสารสกัดจากใบหูกวางมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงขึ้น 1.5%/วัน มีการอธิบายว่า การเจริญเติบโตของลูกปลานั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สภาพอากาศ อาหาร และอื่น ๆ ซึ่งลูกปลาจะเจริญเติบโตได้ดีในระดับ pH เป็นกลาง จากการศึกษาของ Baldisserotto (2011) กล่าวว่า ลูกปลาน้ำจืดจะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในระดับ pH 6-8

Table 3 Effect of the amount of dried *T. catappa* leaves in pH values on survival rate in 4 week, sex ratio and growth rate in *B. splendens* larvae.

Parameters	*T. catappa* (g/l)				
	0	2.5	5.0	7.5	10
pH 15 hrs	7.50±0.02[a]	7.31±0.06[b]	6.71±0.02[c]	6.51±0.04[d]	5.42±0.10[e]
Male (%)	41.13±6.40[b]	42.66±7.11[b]	74.13±9.08[a]	37.92±11.76[b]	0.00±0.00[c]
Female (%)	58.86±5.83[a]	57.34±9.25[a]	25.85±1.16[b]	62.07±15.32[a]	0.00±0.00[b]
Survival rate (%)	95.62±2.08[a]	94.09±17.89[a]	83.73±12.62[a]	64.34±17.35[a]	0.00±0.00[b]
Final weight (g)	0.29±0.21	0.65±0.46	0.25±0.11	0.38±0.23	0.00±0.00
Final length (cm)	2.80±0.26	3.61±0.45	2.88±0.30	2.94±0.32	0.00±0.00

Mean±SE with the different superscripts in row are significantly different (P<0.05).

สรุปผลการศึกษา

การใช้ pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้ง ปริมาณ 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม/ลิตร ต่อการผสมพันธุ์วางไข่ในพ่อแม่พันธุ์ปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก พบว่า มีการผสมพันธุ์วางไข่ใน pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณ 2.5-7.5 กรัม/ลิตร ค่าเฉลี่ย pH เท่ากับ 6.33-6.67 และการแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในน้ำแช่ใบหูกวางแห้งทำให้อัตราส่วนเพศผู้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดย pH จากน้ำแช่ใบหูกวางแห้ง 5 กรัม/ลิตร มีค่าเฉลี่ย pH 6.71±0.02 สามารถเพิ่มผลผลิตปลากัดเพศผู้ได้ 35.27±22.97% จากชุดควบคุม (pH 7.50±0.02) ดังนั้นการเพาะพันธุ์ปลากัดเพื่อเพิ่มอัตราส่วนเพศผู้ในลูกปลากัด ควรใช้ใบหูกวางแห้งที่ 5 กรัม/ลิตร แช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วในภาชนะเพาะพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ. 2559. สถิติการส่งออกสัตว์น้ำมีชีวิต. http://www.aahri.in.th (9 กันยายน 2562).

การุณ ทองประจุแก้ว. 2556. ชีววิทยาของปลากัดไทย. น. 1-6 *ใน* วารสารวิทยาศาสตร์ มข. ฉบับที่ 1. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วุฒิพล เล้าอรุณ. 2538. ความกระด้างของน้ำ (Water Hardness). คุณภาพน้ำ. https://www.mwa.co.th/ewt_dl_link.php?nid=506 (5 กันยายน 2562).

Baldisserotto, B. 2011. Water pH and hardness affect growth of freshwater teleosts. *Revista Brasileira de Zootecnic* 40: 621-626.

Baroiller, J. F., and Cotta, H. D. 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part* 130: 399-409.

Craig, G. R., and Baksi, W. F. 1977. The effects of depressed pH on flagfish reproduction, growth and survival. *Water Research* 11: 621-626.

Ikuta, K., Yada, T., and Kitamuna, S. 2000. Effects of acidification on fish reproduction. *Nikko Branch National Research Institute of Aquaculture* 28: 39-44.

Mount, D. I. 1972. Chronic effects of low pH on fathead minnow survival, growth and reproduction. *Water Research* 7: 987-993.

Nugroho, R. A., Manurung, H., Saraswati, D., Ladyescha, D., and Nur, F. N. 2016. The effects of *Terminallia catappa* L. leaves extract on the water quality properties, survival and blood profile of ornamental fish (*Betta* sp.) cultured. *Biosaintifika* 8(2): 240-247.

Rajesh, B. R., Potty, V. P., and Sreelekshmy, S. G. 2016. Study of total phenol, flavonoids, tannin contents and phytochemical screening of various crude extracts of *Terminalia catappa* leaf, stem bark and fruit. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture* 2(6): 291-296.

Reddon, A. R., and Peter, L. H. 2013. Water pH during early development influences sex ratio and male morph in a west African fish (*Pelvicachromis pulcher*). *Zoology* 116: 139-143.

Romer, U., and Beisenherz, W. 1996. Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology* 48: 714-725.

Rubin, D. A. 1985. Effect of pH on sex ratio in *Cichlids* and *Poeciliid* (Teleostei). *Copeia* 1985(1): 233-235.

Sung, Y. Y., and Abol-Munafi, A. B. 2019. *Terminalia catappa* leaf extract is an effective rearing medium for larviculture of gouramis. *Journal of applied Aquaculture* 24: 1-12.

Vuorinen, P. J., Vuorinen, N., and Peuranen, S. 1990. Long-term exposure of adult whitefish (*Coregonus wartmanni*) to low pH/aluminum effects on reproduction, growth, blood composition and gill. *Acidification in Finland* 46: 941-961.

วันรับบทความ (Received date) : 16 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 15 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และขนาดแรกสืบพันธุ์ของหอยฝาเดียว *Stenothyra* sp.

Gonadal Development and Size at First Maturity of *Stenothyra* sp.

วรเชษฐ์ ท้วมสุวรรณ์[1] อิซาโอะ ซูซุยอิ[2*] ดุสิต เอื้ออำนวย[1] และปวีณา ทวีกิจการ[1]
Worachet Thuamsuwan[1], Isao Tsutsui[2*], Dusit Aue-umneoy[1] and Praveena Taveekijakarn[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา อัตราส่วนเพศ การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และขนาดแรกสืบพันธุ์ ของหอยฝาเดียว *Stenothyra* sp. ทำการเก็บตัวอย่างในแหล่งน้ำนิ่งซึ่งเป็นน้ำกร่อย ที่จังหวัดสมุทรสงคราม ตั้งแต่เดือนมกราคม 2561 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2562 พบว่าหอยชนิดนี้มีขนาดตั้งแต่ 0.80-3.00 มิลลิเมตร เปลือกมีรูปทรงรีลักษณะบางผิวเรียบ มีสีน้ำตาลเข้ม ขดวนขวาเป็นเกลียว 5 รอบ สามารถแยกเพศผู้และเพศเมียได้จากอวัยวะสืบพันธุ์ที่พบในเพศผู้เท่านั้น โดยสังเกตได้อย่างชัดเจนในหอยที่มีขนาดตั้งแต่ 1.60 มิลลิเมตรขึ้นไป อัตราส่วนระหว่างเพศผู้และเพศเมีย มีค่าเท่ากับ 0.71:1.00 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระยะการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอย *Stenothyra* sp. ทั้งเพศผู้และเพศเมีย สามารถแบ่งได้เป็น 5 ระยะ คือ ระยะเซลล์สืบพันธุ์พักตัว ระยะพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ ระยะเซลล์สืบพันธุ์เจริญเต็มที่ ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ และระยะหลังปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ หอยชนิดนี้มีค่าขนาดแรกสืบพันธุ์ในแต่ละฤดู (ฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว) เท่ากับ 1.71, 1.71 และ 1.63 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ ช่วงของการเปลี่ยนแปลงประชากร ของหอย *Stenothyra* sp. ในรอบปี และการนำหอยชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงร่วมกับสัตว์น้ำ

คำสำคัญ: อัตราส่วนเพศ การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ขนาดแรกสืบพันธุ์ *Stenothyra* sp.

Abstract

The morphology, sex ratio, gonadal development, and size at first maturity were studied for *Stenothyra* sp. collected from a stagnant brackish water pond at Samut Songkhram province from January 2018 to February 2019. The size range of *Stenothyra* sp. were 0.80-3.00 mm in shell length (SL). The shells were of ovate shape, thin, smooth surfaced and dark brown in color. Each shell had 5 dextral whorls. The males, which were longer than 1.60 mm SL, were identifiable due to their conspicuous sex organs. The sex ratio between males and females of *Stenothyra* sp. was about 0.71:1.00, which was a significant difference ($P<0.05$). The gonadal development stage of *Stenothyra* sp. in males and female was classified into 5 stages: resting stage, developing stage, maturing stage, spawning stage, and spent stage. The sizes of individuals at first maturity in each season (summer, rainy, and winter) were studied, and the results were approximately 1.71, 1.71, and 1.63 mm SL, respectively. This study is unique in that it is the first in-depth study of the maturation of the snail. The researchers believe that their methods and results can be applied to the further study of the *Stenothyra* sp. reproductive cycle, seasonal population dynamics, and to the utilization of this snail in aquaculture.

Keywords: sex ratio, gonadal development, size at first maturity, *Stenothyra* sp.

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
[2] ฝ่ายประมง ศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์การเกษตรนานาชาติแห่งประเทศญี่ปุ่น สึกุบะ อิบารากิ 305-8686 ประเทศญี่ปุ่น
[2] Fisheries Division, Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), 1-1 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japan
*Corresponding author, Email: cong@affrc.go.jp

คำนำ

หอยฝาเดียวที่อาศัยอยู่ตามแนวป่าชายเลนหรือบริเวณน้ำกร่อย มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศเนื่องจากเป็นผู้บริโภคอันดับต้น ๆ ของห่วงโซ่อาหาร เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของสัตว์น้ำชนิดอื่น หอยฝาเดียวเป็นหนึ่งสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มสัตว์หน้าดินที่มีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนธาตุอาหารในระบบนิเวศ จำนวนและชนิดของหอยฝาเดียวยังใช้เป็นตัวบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศป่าชายเลน มลพิษในแหล่งน้ำ รวมทั้งใช้ในการติดตามและประเมินผลการฟื้นตัวกลับคืนสู่สภาวะสมดุลของป่าชายเลนได้ หอยฝาเดียวเป็นสิ่งมีชีวิตหน้าดินที่มีจำนวนมากที่สุดในระบบนิเวศป่าชายเลน (ณัฐกิตติ์ โตอ่อน, 2560) โดยชนิดของหอยฝาเดียวที่พบในระบบนิเวศป่าชายเลนมีหลายชนิดตัวอย่างที่พบได้แก่ *Planaxis* sp., *Stenothyra* sp. และ *Assiminea* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานพบหอยฝาเดียวในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำซึ่งหอยฝาเดียวเหล่านี้มีความสำคัญในการหมุนเวียนธาตุอาหารภายในบ่อเลี้ยง และหอยฝาเดียวยังสามารถเป็นอาหารเสริมให้สัตว์น้ำที่เลี้ยงอีกด้วย (Fujioka et al., 2007)

Stenothyra sp. จัดอยู่ใน Family Stenothyridae จัดเป็นหอยฝาเดียวขนาดเล็ก มีขนาดตั้งแต่ 1-10 มิลลิเมตร พบการกระจายทั่วไปในทวีปเอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และยังพบการกระจายในประเทศจีน ประเทศญี่ปุ่น รวมไปถึงทางตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย สามารถแบ่งกลุ่มตามที่อยู่อาศัยได้เป็น 2 กลุ่ม คือหอยที่อาศัยอยู่ในบริเวณแม่น้ำ บึง คลอง เช่น *Stenothytra koratensis* (รุจิรา จำปาปน และคณะ, 2556) และหอยที่อาศัยอยู่ในบริเวณน้ำกร่อยในเขตน้ำขึ้น-น้ำลง เช่น *Stenothyra polita, Stenothyra prasongi* (Hena et al., 2004) ในประเทศไทยพบการกระจายจำนวนมากของ *Stenothyra* sp. ในบริเวณน้ำกร่อย มีพบเพียง 2-3 สายพันธุ์ที่พบในน้ำจืด แต่การศึกษาเกี่ยวกับหอยชนิดนี้ยังมีไม่มากนัก และยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์และการสืบพันธุ์ ทำให้ข้อมูลพื้นฐานของหอยชนิดนี้มีน้อย

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา อัตราส่วนเพศ การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และขนาดแรกสืบพันธุ์ของหอย *Stenothyra* sp. เป็นข้อมูลที่ยังไม่มีการศึกษามาก่อน โดยข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ ช่วงของการเปลี่ยนแปลงประชากรของหอย *Stenothyra* sp. ในรอบปี และการนำหอยชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงร่วมกับสัตว์น้ำ

วิธีการศึกษา

พื้นที่การศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างในแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณพื้นที่ใกล้คลองลาดใหญ่ ตำบลบางแก้ว อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม ตั้งอยู่ที่ละติจูด 13 องศา 21 ลิปดา 01.2 ฟิลิปดาเหนือ ลองติจูด 100 องศา 02 ลิปดา 55 ฟิลิปดาตะวันออก มีทางเข้าออกของน้ำจากคลองส่งน้ำบางแก้ว (Figure 1) เก็บตัวอย่างหอยทุกเดือน ตั้งแต่เดือนมกราคม 2561 - กุมภาพันธ์ 2562 เป็นระยะเวลา 14 เดือน โดยทำการสุ่มวาง quadrat ขนาด 10x10 เซนติเมตร จำนวน 3 ซ้ำในพื้นที่ทำการสำรวจ ทำการเก็บตัวอย่างหอยทั้งหมดใน quadrat และเก็บตัวอย่างน้ำ เพื่อนำกลับไปศึกษาที่ห้องปฏิบัติการ

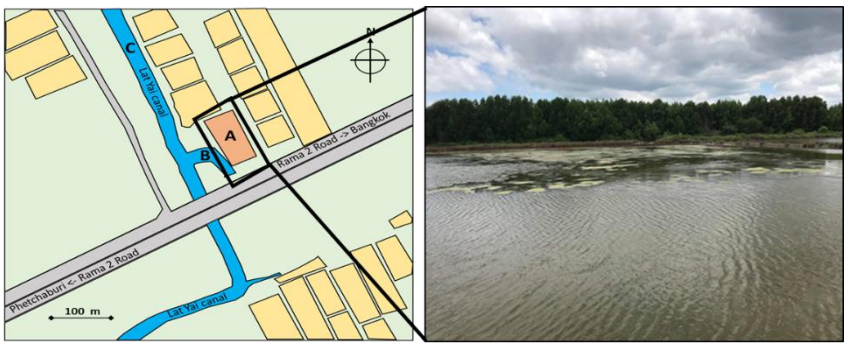

Figure 1 Location and characteristics of the sample area A: sample area, B: water inlet, C: canal.

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานและอัตราส่วนเพศ

ทำการศึกษาลักษณะภายนอกและทำการวัดขนาดของหอย *Stenothyra* sp. จากตัวอย่างที่เก็บมา หลังจากนั้นนำหอยมาคัดแยกขนาดผ่านตะแกรงร่อน ขนาด 2.00, 1.60, 1.00 และ 0.50 มิลลิเมตร ทำการสังเกตอวัยวะสืบพันธุ์ (conspicuous penis) ของหอยเพศผู้ด้วยวิธีการส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อหอยเปิดปากเปลือกและยื่นส่วนหัวออกมาหอยเพศผู้จะพบอวัยวะที่ใช้ในการสืบพันธุ์ (conspicuous penis) อยู่หลังส่วนหัว พบว่าสามารถสังเกตอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเพศผู้ได้ชัดเจนในหอยที่มีขนาด 1.60 มิลลิเมตรขึ้นไป จึงทำการเลือกหอยที่ไม่ผ่านตะแกรงร่อนขนาด 1.60 และ 2.00 มิลลิเมตร มาหาอัตราส่วนระหว่างหอยเพศผู้และเพศเมีย ทำการบันทึกข้อมูลและวิเคราะห์หาความแตกต่างของสัดส่วนเพศของประชากรหอย *Stenothyra* sp. ด้วยโปรแกรม SPSS, Chi-square ($P<0.05$)

ศึกษาระยะของการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

หลังจากทำการแยกเพศของหอย *Stenothyra* sp. นำหอยเหล่านั้นมาผ่านกระบวนการตามวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา (histological technique) เพื่อทำ paraffin section และย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย Harris's Hematoxylin และ Eosin ตามวิธีการของ Bancroft and Gamble (2002) เพื่อตรวจสอบการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ โดยจำแนกจากจำนวนและระยะการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ภายในอวัยวะสืบพันธุ์ โดยแบ่งระยะการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งในเพศผู้และเพศเมียเป็น 5 ระยะ ซึ่งดัดแปลงจากการจำแนกของ จินตมาส สุวรรณจรัส และคณะ (2551) ดังนี้

ระยะที่ 1 ระยะเซลล์สืบพันธุ์พักตัว (resting stage) เป็นระยะที่อวัยวะสืบพันธุ์พักตัว หรือเตรียมเริ่มวงจรใหม่ระยะนี้เซลล์สืบพันธุ์มีจำนวนน้อย

ระยะที่ 2 ระยะพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ (developing stage) เป็นระยะที่อวัยวะสืบพันธุ์มีการฟื้นตัว เพื่อเข้าสู่วงจรใหม่ มีพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เกิดขึ้นต่อเนื่อง

ระยะที่ 3 ระยะเซลล์สืบพันธุ์เจริญเต็มที่ (maturing stage) เป็นระยะที่อวัยวะสืบพันธุ์สมบูรณ์ มีเซลล์ สืบพันธุ์เจริญเต็มที่

ระยะที่ 4 ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawning stage) เป็นระยะที่อวัยวะสืบพันธุ์ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกสู่ภายนอกเพื่อการปฏิสนธิ

ระยะที่ 5 ระยะหลังปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spent stage) เป็นระยะที่เซลล์สืบพันธุ์ถูกขับออกจากร่างกาย อวัยวะ เซลล์สืบพันธุ์ที่พบเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนาไม่สมบูรณ์

ขนาดแรกสืบพันธุ์

ตรวจสอบขนาดแรกสืบพันธุ์ของหอย *Stenothyra* sp. ในแต่ละฤดู โดยในฤดูร้อนจะสุ่มตัวอย่างหอยที่เก็บในช่วงเดือนมีนาคม - พฤษภาคม ฤดูฝน เดือน มิถุนายน - ตุลาคม ฤดูหนาว เดือนพฤศจิกายน - กุมภาพันธ์ ทำการแบ่งขนาดหอยออกเป็น 6 ขนาด คือ 0.70-1.00, 1.10-1.40, 1.50-1.80, 1.90-2.20, 2.30-2.60 และ 2.70-3.00 มิลลิเมตร ขนาดละ 10 ตัว มาผ่านกระบวนการตามวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา (histological technique) เพื่อทำ paraffin section และย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย Harris's Hematoxylin และ Eosin ตามวิธีการของ Bancroft and Gamble (2002) โดยหอยที่ตรวจพบเซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนาอยู่ในระยะ 2-5 จะถือว่าถึงวัยเจริญพันธุ์แล้ว หลังจากนั้นจะทำการบันทึกผล และทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของหอยกับสัดส่วนของสัตว์น้ำในวัยเจริญพันธุ์ต่อสัตว์น้ำทั้งหมดด้วยวิธีการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก (logistic model) ตามวิธีการของ Pauly (1984) และคำนวณหาขนาดแรกสืบพันธุ์ที่สัดส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ จากสูตรซึ่งดัดแปลงจากการคำนวณของ เสรี นิยมเดชา (2558)

$$P(L) = 1/1+e^{a+bL}$$

โดย P(L) = สัดส่วนสัตว์น้ำวัยเจริญพันธุ์ต่อสัตว์น้ำทั้งหมด

L = ความยาว

a, b = ค่าคงที่

แทนค่าสมการเพื่อคำนวณหาความยาวของหอย *Stenothyra* sp. ที่เจริญพันธุ์ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งหมายความว่าจำนวนของหอยในขนาดที่คำนวณได้จะพบว่าเป็นวัยเจริญพันธุ์แล้ว 50 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาลักษณะทางสัณฐาน

ลักษณะทางชีววิทยาของหอยชนิดนี้จะมีเปลือกที่เป็นทรงรีสีน้ำตาลเข้มและขดขวาเป็นเกลียว 5 เกลียว เปลือกบางและผิวเรียบ ส่วนบอร์ดีเวิร์ล (body whorl) มีขนาดใหญ่กว่าสไปร์ (spires) มีขนาด 3 ใน 4 ของความยาวเปลือก ขนาดของหอย *Stenothyra* sp. ในบริเวณที่ทำเก็บตัวอย่างมีขนาดตั้งแต่ 0.80-3.00 มิลลิเมตร เมื่อโตเต็มวัยปากเปลือกมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 0.50-0.90 มิลลิเมตร และเป็นรูปรี โดยใช้ลักษณะของปากเปลือกในการแยกชนิดของหอย *Stenothyra* sp. (Figure 2A) ในบริเวณส่วนหัวจะมีดวงตาสีดำหนึ่งคู่ที่โคนของหนวด หนวดมักมีความยาวมากกว่าส่วนของจงอยปาก และพบจุดสีดำและเหลืองกระจายอยู่ทั่วตามหัว หนวดและเท้า โดยหอยชนิดนี้มีลักษณะภายนอกของเปลือก และลำตัวไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แต่จะสามารถแยกเพศของหอยเพื่อทำการหาอัตราส่วนของหอยเพศผู้และเพศเมีย ด้วยวิธีการส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากหอยเปิดเปลือกและยื่นส่วนหัวออกมาหอยเพศผู้จะพบอวัยวะที่ใช้ในการสืบพันธุ์ (conspicuous penis) (Figure 2B) เมื่อนำหอย *Stenothyra* sp. มาผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา บริเวณปากเปลือกจะพบเท้า (foot) อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) อยู่ตรงตำแหน่งสไปร์ของหอย อยู่ติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) และต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) เหมือนกันทั้งเพศผู้และเพศเมีย ขนาดของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะเปลี่ยนไปตามวงจรการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ (Figure 2C)

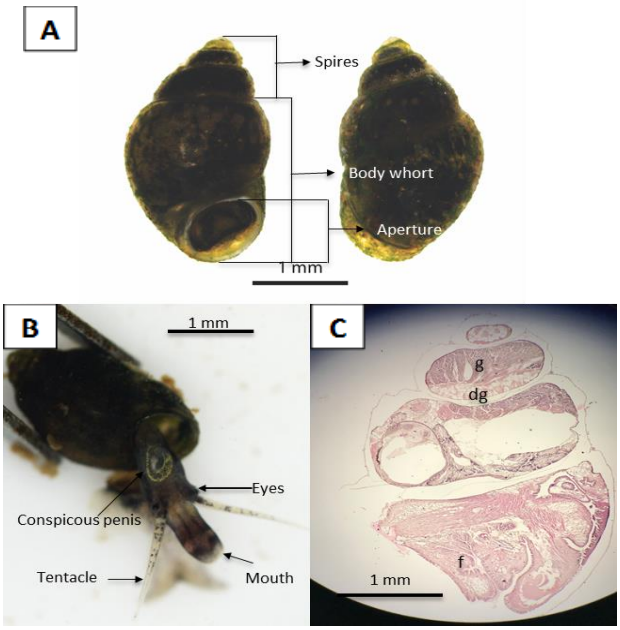

Figure 2 *Stenothyra* sp., A: external morphology, B: position of head, C: Histological characteristics of *Stenothyra* sp.; g = gonad, dg = digestive gland and f = foot.

อัตราส่วนเพศ

จากการศึกษาอัตราส่วนเพศของหอย *Stenothyra* sp. ตั้งแต่เดือนมกราคม 2561 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2562 ติดต่อกันเป็นเวลา 14 เดือน ได้ทำการคัดเลือกหอยที่ไม่ผ่านตะแกรงร่อนขนาด 1.60 มิลลิเมตรขึ้นไป พบว่ามีจำนวนตัวอย่างหอยทั้งหมด 1,130 ตัว พบว่าเป็นเพศผู้ 469 ตัว และเพศเมีย 661 ตัว จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่าอัตราส่วนระหว่างหอยเพศผู้และหอยเพศเมีย มีค่าเท่ากับ 0.71:1.00 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อแยกวิเคราะห์อัตราส่วนเพศของหอยในแต่ละเดือนพบว่าหอย *Stenothyra* sp. มีอัตราส่วนระหว่างหอยเพศผู้และหอยเพศเมียแตกต่างกันคือ เดือนมกราคม กุมภาพันธ์ มีนาคม พฤษภาคม และธันวาคม 2561 จะพบหอยเพศเมียมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Figure 3) การศึกษาอัตราส่วนเพศมีความสำคัญในการคาดการณ์ขนาดของประชากรและผลต่อสิ่งแวดล้อม รายงานศึกษาอัตราส่วนเพศของหอยฝาเดียวมีทั้งอัตราส่วนระหว่างหอยเพศผู้และเพศเมียไม่แตกต่างกัน และอัตราส่วนระหว่างหอยเพศผู้และหอยเพศเมียแตกต่างกัน โดยพบหอยเพศเมียมากกว่า อย่างเช่น หอย *Babylonia areolate* (จินตมาศ สุวรรณจรัส และคณะ, 2551) และหอย *Helicon pruinosus* (Henninger and Hodgson, 2001) สัดส่วนเพศของหอยฝาเดียวยังขึ้นอยู่กับ

ช่วงของการสืบพันธุ์ โดยพบว่าหอยฝาเดียวเพศผู้จะกินอาหารน้อยลงและเริ่มจับคู่จึงทำให้เคลื่อนที่น้อยลง ในขณะที่หอยเพศเมียเคลื่อนที่มากขึ้นเพื่อหาที่วางไข่ที่เหมาะสม จึงทำให้หอยเพศเมียถูกสุ่มได้มากกว่าในฤดูสืบพันธุ์ ตัวอย่างเช่น หอย *Nepunea antique* (Power and Keegun, 2001) โดยผลอัตราส่วนเพศของหอยฝาเดียว *Stenothyra* sp. พบว่ามีความแตกต่างกันในเดือนที่มีอุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยตั้งแต่ 27.9-31.2 องศาเซลเซียส ซึ่งอยู่ในช่วงที่ฤดูหนาว ในขณะที่ช่วงเดือนที่ไม่พบความแตกต่างของอัตราส่วนเพศจะมีอุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยตั้งแต่ 32.2-37.9 องศาเซลเซียส (Figure 4) ซึ่งอยู่ในช่วงฤดูฝนและฤดูร้อน ช่วงของการสืบพันธุ์ของหอยฝาเดียวแต่ละชนิดก็มีความแตกต่างกัน โดยทั่วไปหอยฝาเดียวมีช่วงของการสืบพันธุ์และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในฤดูร้อน เมื่ออุณหภูมิเริ่มสูงขึ้น เช่น ในหอย *Strombus gigas* (Aranda et al., 2003), *Adelomelon brasilana* (Cledon et al., 2005), *Littoraria ardouiniana* (Gimenez and Penchaszadeh, 2002), *Iravadia sakaguchii* (Kobayashii and Wada, 2004), *Zidona dufresnei* (Ng and Williams, 2012) และ *Adelomelon ancilla* (Penchazadeh et al., 2009) แต่การศึกษาในหอยฝาเดียวเหล่านี้เป็นการศึกษาในประเทศเขตอบอุ่นซึ่งมีความแตกต่างกันของอุณหภูมิในแต่ละฤดูค่อนข้างมาก ในขณะที่ประเทศไทยมีความแตกต่างของอุณหภูมิในแต่ละฤดูไม่มากนัก จากการศึกษาอัตราส่วนของหอยเพศผู้และเพศเมียของหอย *Stenothyra* sp. พบความแตกต่างกันในช่วงเดือนที่มีอุณหภูมิต่ำ ซึ่งอาจจะเป็นช่วงที่หอยชนิดนี้สืบพันธุ์และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์จึงทำให้พบหอยเพศเมียมากกว่าเพศผู้ แต่ทั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าช่วงของการสืบพันธุ์และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยฝาเดียว *Stenothyra* sp. อยู่ในช่วงใด แต่จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าหอยชนิดนี้มีการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ตลอดทั้งปี ดังนั้นจึงเป็นข้อมูลที่ผู้ทำการศึกษาจะทำการศึกษาวงจรของการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยฝาเดียว *Stenothyra* sp. ในรอบปี เพื่อที่จะได้ข้อมูลช่วงของการสืบพันธุ์และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยฝาเดียวชนิดนี้ต่อไป

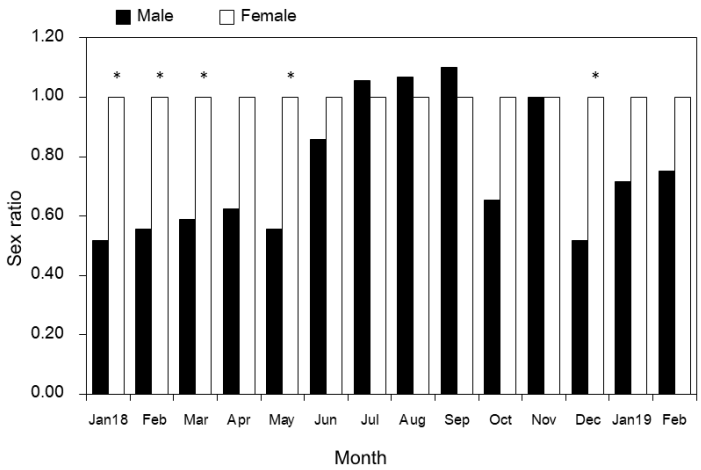

Figure 3 Sex ratio of *Stenothyra* sp. from January 2018 to February 2019.

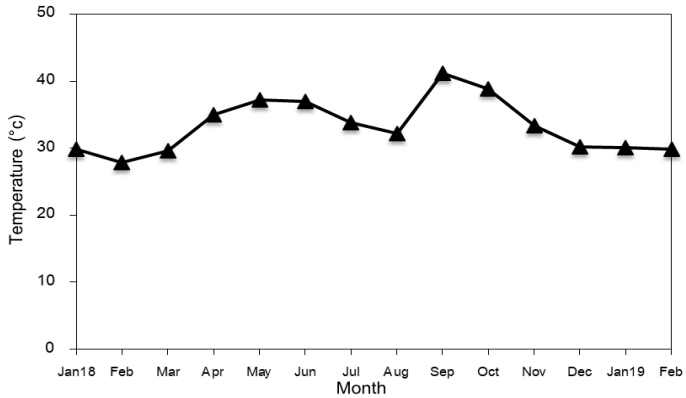

Figure 4 Water temperature at sample area from January 2018 to February 2019.

ระยะของการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

จากการตรวจสอบการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของตัวอย่างหอยที่ย้อมด้วยสี H&E ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หอยทั้งเพศผู้และเพศเมียสามารถแบ่งระยะของการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ออกเป็น 5 ระยะ ตามพัฒนาการและปริมาณของเซลล์สืบพันธุ์ที่แตกต่างกันในแต่ละระยะการพัฒนาซึ่งมีลักษณะดังนี้

ระยะที่ 1 ระยะเซลล์สืบพันธุ์พักตัว (resting stage) เป็นระยะพักตัวและเตรียมเริ่มวงจรการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ใหม่ ในระยะนี้ขนาดของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีขนาดเล็ก ภายในพบเยื่อบุผนังฟอลลิคัล (follicle) ที่หนา เซลล์สืบพันธุ์ที่พบในระยะนี้มีจำนวนไม่มากนัก ในเพศผู้จะพบเพียง spermatogonia และ spermatocytes ตามขอบของเยื่อบุผนังฟอลลิคัลเท่านั้น (Figure 5A) ส่วนในหอยเพศเมียพบเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ oogonia เพียงระยะเดียว (Figure 6A)

ระยะที่ 2 ระยะพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ (developing stage) ในระยะนี้จะเริ่มพบการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ ขนาดของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นจากการขยายตัวของเยื่อบุผนังฟอลลิคัล ในหอยเพศผู้จะเริ่มมีจำนวนของ spermatogonia และ spermatocytes มากขึ้น และยังสามารถพบ spermatid และเริ่มพบหางของ spermatozoa บ้างเล็กน้อยอยู่ตรงกลางของเยื่อบุผนังฟอลลิคัล (Figure 5B) ในหอยเพศเมียพบเซลล์ไข่ที่มีขนาดเล็กติดอยู่กับเยื่อบุผนังฟอลลิคัล ซึ่งเป็นเซลล์ไข่ในระยะ previtellogenic oocytes ในระยะนี้พบนิวเคลียสที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึม มีขนาดประมาณ 10 μm (Figure 6B)

ระยะที่ 3 ระยะเซลล์สืบพันธุ์เจริญเต็มที่ (maturing stage) ระยะนี้เป็นระยะที่เซลล์สืบพันธุ์อยู่ในระยะที่สมบูรณ์พร้อมปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ในหอยเพศผู้พบเยื่อบุผนังฟอลลิคัลมีลักษณะที่ขยายใหญ่ขึ้นมีผนังที่บางลงสามารถแยกขอบของผนังได้อย่างชัดเจน พบ spermatozoa ซึ่งเป็นเซลล์สืบพันธ์ที่อยู่ในระยะสมบูรณ์ เป็นจำนวนมากรวมตัวอยู่ส่วนกลางของเยื่อบุผนังฟอลลิคัล และยังสามารถพบเซลล์สืบพันธุ์ระยะอื่นอยู่บ้างตามขอบของเยื่อบุผนังฟอลลิคัล (Figure 5C) ในหอยเพศเมียเยื่อบุผนังฟอลลิคัลขยายติดกับเนื้อเยื่อของอวัยวะที่อยู่ใกล้เคียงจนไม่สามารถเห็นขอบผนังได้อย่างชัดเจน ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไข่พบ yolk granul จำนวนมาก (vitellogenic oocytes) ซึ่งเป็นเซลล์ไข่ในระยะสมบูรณ์ มีขนาดประมาณ 25 μm (Figure 6C)

ระยะที่ 4 ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawning stage) ในระยะนี้เป็นช่วงที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เกิดขึ้น เยื่อบุผนังฟอลลิคัลบางส่วนจะเริ่มสลาย ในหอยเพศผู้พบ spermatozoa ที่มีปริมาณลดน้อยลง และพบช่องว่างเนื่องจาก spermatozoa บางส่วนได้ถูกปล่อยไปแล้ว โดยบริเวณขอบของผนังฟอลลิคัลยังสามารถพบ spermatocytes อยู่บ้างเพียงเล็กน้อย (Figure 5D) ในหอยเพศเมียพบว่าเซลล์ไข่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด และปรากฏช่องว่างจากเซลล์ไข่ที่ถูกปล่อยไปแล้ว yolk ที่อยู่ภายในเยื่อบุผนังฟอลลิคัลก็จะหายไป โดยจะพบ vitellogenic oocytes หลงเหลืออยู่บ้างเล็กน้อย (Figure 6D)

ระยะที่ 5 ระยะหลังปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spent stage) หลังจากมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ขนาดของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะมีขนาดที่เล็กลง เยื่อบุผนังฟอลลิคัลที่อยู่ภายในเริ่มสลายเพื่อนำสารอาหารกลับไปใช้ใหม่ในการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์รอบต่อไป ในระยะนี้จะพบเซลล์สืบพันธ์หลงเหลืออยู่ไม่มากนัก ในหอยเพศผู้จะพบ spermatozoa อยู่บ้างเล็กน้อย (Figure 5E) ในหอยเพศเมียปรากฏช่องว่างอย่างชัดเจนจากการที่เยื่อบุผนังฟอลลิคัลเริ่มสลาย เซลล์ไข่ที่พบเหลืออยู่จะเป็นเซลล์ไข่ที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ (Figure 6E)

การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยฝาเดียวส่วนใหญ่สามารถแบ่งได้ออก เป็น 5 ระยะ ซึ่งตรงกับการศึกษาในหอย *Babylonia areolate* (จินตมาส สุวรรณจรัส และคณะ, 2551), *Strombus gigas* (Aranda et al., 2003), *Adelomelon brasilana* (Cledon et al., 2005) และ *Adelomelon ancilla* (Penchazadeh et al., 2009) โดยหอยฝาเดียวมีการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์อยู่ตลอด ทำให้บางครั้งในระยะหลังปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ในหอยเพศผู้และเพศเมียสามารถพบ spermatogonia และ oogonia ซึ่งเป็นเซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้นที่เกิดขึ้นใหม่เพื่อการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในรอบต่อไป ทำให้สังเกตระยะการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ในระยะหลังปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ และ ระยะเซลล์สืบพันธุ์พักตัว ได้ค่อนข้างยาก โดยทำให้ในหอยฝาเดียวบางชนิด เช่น *Hexaplex trunculus* (Elhasni et al., 2010) สามารถแบ่งระยะของการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้เพียง 4 ระยะ และจากการที่หอยฝาเดียวมีการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์อยู่ตลอดทำให้ ในหอยฝาเดียวเพศผู้บางชนิดพบว่าอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์อยู่ในระยะเซลล์สืบพันธุ์พัฒนาสมบูรณ์ตลอดทั้งปี เช่น ในหอย *Adelomelon ancilla* (Penchazadeh et al., 2009) ข้อมูลการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เป็นข้อมูลที่สำคัญเมื่อศึกษาอย่างต่อเนื่องทำให้สามารถรู้ช่วงของการสืบพันธุ์และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ และทราบแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรในรอบปี

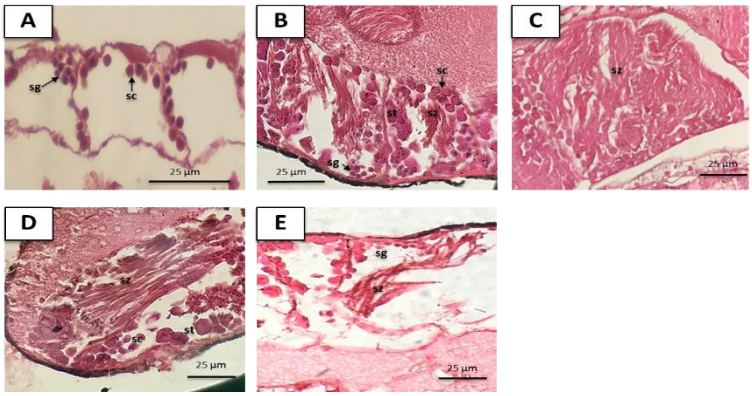

Figure 5 Histological section of testis, A: resting stage, B: developing stage, C: maturing stage, D: spawning stage and E: spent stage; sg = spermatogonia, sc = spermatocytes, st = spermatid, and sz = spermatozoa.

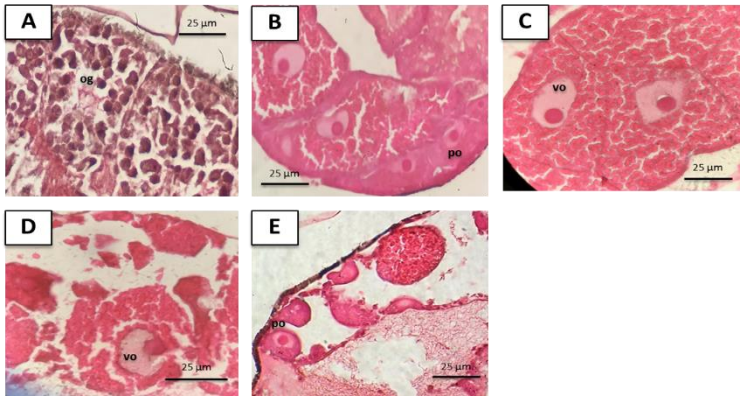

Figure 6 Histological section of ovary A: resting stage, B: developing stage, C: maturing stage, D: spawning stage and E: spent stage; og = oogonia, po = previtellogenic oocytes, and vo = vitellogenic oocytes.

ขนาดแรกสืบพันธุ์

หอยฝาเดียว *Stenothyra* sp. ที่ทำการสุ่มตัวอย่างตั้งแต่เดือนมกราคม 2561 - เดือนกุมภาพันธ์ 2562 มีขนาดตั้งแต่ 0.80-3.00 มิลลิเมตร หลังจากสุ่มตัวอย่างหอยของแต่ละฤดู จึงทำการแบ่งขนาดหอยแต่ละฤดูออกเป็น 6 ขนาด ขนาดละ 10 ตัว โดยความยาวเฉลี่ยของแต่ละขนาดคือ 0.95, 1.35, 1.75, 2.15, 2.35 และ 2.75 มิลลิเมตร เมื่อนำตัวอย่างหอยมาผ่านกระบวนการตามวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา (histological technique) และไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบการพบเซลล์สืบพันธุ์ภายในอวัยวะสืบพันธุ์ พบว่าในฤดูร้อน และฤดูฝน หอยในขนาดที่ 1 และ 2 ไม่พบการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ และหอยในขนาดที่ 3 พบว่ามีการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนหอยในขนาดที่ 4, 5 และ 6 พบการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ทั้งหมด ส่วนในฤดูหนาว หอยในขนาดที่ 1 ไม่พบ การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ หอยในขนาดที่ 2 และ 3 พบว่ามีการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ 20 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนหอยในขนาดที่ 4, 5 และ 6 พบการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ทั้งหมด เมื่อนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของหอยกับสัดส่วนของสัตว์น้ำในวัยเจริญพันธุ์ต่อสัตว์น้ำทั้งหมด ด้วยวิธีการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก (logistic model) ตามวิธีการของ Pauly (1984) เพื่อหาขนาดแรกสืบพันธุ์ที่สัดส่วน 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าขนาดแรกสืบพันธุ์ของตัวแทนประชากรหอยในฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว มีค่าเท่ากับ 1.71, 1.71 และ 1.63 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่าจำนวนของหอยฝาเดียว *Stenothyra* sp. ในขนาดเหล่านี้จะเป็นวัยเจริญพันธุ์ 50 เปอร์เซ็นต์ (Figure 7) เมื่อเทียบกับความยาวเปลือกสูงสุดของหอย *Stenothyra* sp. ที่พบในบริเวณที่ทำการศึกษา ซึ่งเท่ากับ 3.00 มิลลิเมตร พบว่าหอย *Stenothyra* sp. จะถึงวัยเจริญพันธุ์เมื่อความยาวเปลือกมีสัดส่วนเป็น 54 เปอร์เซ็นต์ ของความยาวเปลือกสูงสุด ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Elhasni et al. (2010) ในหอย *Hexaplex trunculus* มีขนาดความยาวเปลือกสูงสุดเท่ากับ 68.70 มิลลิเมตร โดยพบว่าหอยชนิดนี้มีขนาดแรกสืบพันธุ์เมื่อมีความยาวเปลือก 36.90 มิลลิเมตร ซึ่งคิดเป็น 54 เปอร์เซ็นต์ของความยาวเปลือกสูงสุด สัดส่วนของขนาดแรกสืบพันธุ์ต่อความยาวสูงสุดยิ่งมีค่าน้อย แสดงถึงโอกาสที่มากขึ้นของการได้ผสมพันธุ์ของสัตว์น้ำเหล่านั้น

โดยพบว่า ในหอย *Iravadia sakaguchii* เป็นหอยที่ใกล้จะสูญพันธุ์ มีสัดส่วนของขนาดแรกสืบพันธุ์ต่อขนาดสูงสุดถึง 78 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์และขนาดแรกสืบพันธุ์ของหอยฝาเดียว *Stenothyra* sp. โดยข้อมูลของขนาดแรกเริ่มสืบพันธุ์มีความสำคัญต่อการรักษาประชากรของสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ โดยการเก็บเกี่ยวสัตว์น้ำหรือการนำสัตว์น้ำมาใช้ประโยชน์ ควรที่จะมีขนาดมากกว่าขนาดแรกสืบพันธุ์เพื่อเป็นการยืนยันว่าสัตว์น้ำเหล่านั้นจะมีการสืบพันธุ์อย่างน้อยหนึ่งครั้งก่อนที่จะถูกนำไปใช้ประโยชน์ เพื่อที่จะให้ประชากรของสัตว์น้ำเหล่านั้นคงอยู่ต่อไปได้ (Marian et al., 2012)

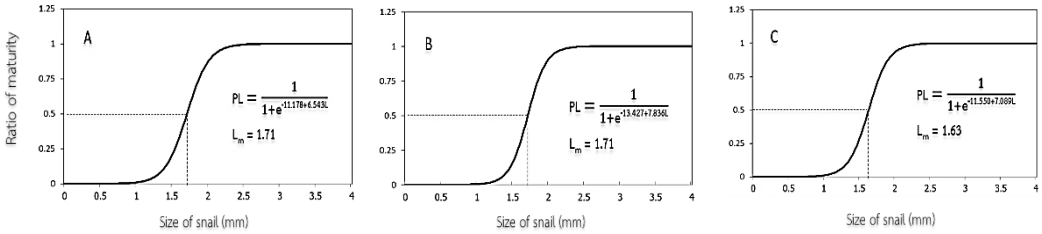

Figure 7 Ratio of maturity and size of *Stenothyra* sp. A: summer season, B: rainy season and C: winter season, L_m = size at first maturity.

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าอัตราส่วนระหว่างเพศผู้และเพศเมียของหอย *Stenothyra* sp. แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยชนิดนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ระยะ และจากการศึกษาขนาดแรกสืบพันธุ์ของหอยชนิดนี้จากกลุ่มตัวอย่างจากฤดูร้อน ฤดูฝน และฤดูหนาว พบว่ามีขนาดแรกสืบพันธุ์เท่ากับ 1.71, 1.71 และ 1.63 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการศึกษานี้ทำให้ได้ทราบถึงข้อมูลทางสัณฐานวิทยา อัตราส่วนเพศ การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และขนาดแรกสืบพันธุ์ของหอย *Stenothyra* sp. ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นดังกล่าวสามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวงจรการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ช่วงของการเปลี่ยนแปลงประชากรของหอย *Stenothyra* sp. ในรอบปี และการนำหอยชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงร่วมกับสัตว์น้ำในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

จินตมาศ สุวรรณจรัส, ชัชวาล หมื่นโพธิ์ และละม้าย ทองบุญ. 2551. วงจรการสืบพันธุ์ของหอยหวานในอ่าวไทย. *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ* 11(2): 71-86.

ณัฐกิตติ์ โตอ่อน. 2560. สัตว์ทะเลหน้าดินขนาดกลางในพื้นที่ป่าชายเลนปลูกปากแม่น้ำท่าจีน จังหวัดสมุทรสงคราม. *วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ* 9(11): 13-23.

รุจิรา จำปาปน, ชนวัฒน์ ตันติวารุรักษ์ และพงษ์รัตน์ ดำรงโรจน์วัฒนา. 2556. ความหลากหลายชนิดของหอยน้ำจืดในพื้นที่เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา* 18(2): 124-131.

เสรี นิยมเดชา. 2558. *การเปรียบเทียบวงจรการสืบพันธุ์ และขนาดแรกสืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่ (Nerna viridis) ระหว่างบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามัน*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยามหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

Aranda, D. A., Cardenas, E. B., Morales, I. M., Baez, R. I. O., and Brule, T. 2003. Gonad behavior during peak reproduction period of *Strombus gigas* from Banco chinchorro. *Bulletin of Marine Science* 73(1): 241-248.

Bancroft, J. D., and Gamble, M. 2002. *Theory and Practical of Histological Techniques*. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone. 796 p.

Cledon, M., Arntz, W., and Panchazadeh, P. E. 2005. Gonadal cycle in an *Adelomelon brasiliana* (Neogastropoda: Volutidae) population of Buenos Aires province, Argentina. *Marine Biology* 147: 439-445.

Elhasni, K., Ghorbel, M., Vasconcelos, P., and Jarboui, O. 2010. Reproductive cycle and size at first sexual maturity of *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae) in the Gulf of Gabès (southern Tunisia). *Invertebrate Reproduction and Develop Dent* 54: 213-225.

Fujioka, Y., Shimada, T., and Srithong, C. 2007. Diversity and community structure of microbenthic fauna in shrimp aquaculture pond of the gulf of Thailand. *Japan Agricultural Research Quarterly* 41(2): 163-172.

Gimenez, J., and Penchaszadeh, P. E. 2002. Reproductive cycle of *Zidona dufresnei* (Caenogastropoda: Volutidae) from the southwestern Atlantic Ocean. *Marine Biology* 140: 755-761.

Hena, M. K., Hshamuddin, O., Misri, O., Abdullah, F., and Loo, K. K. 2004. Benthic faunal composition of Penaeus monodon fabricius culture pond in west coast of Peninsular Malaysia. *Journal of Biological Sciences* 4(5): 631-636.

Henninger, T. O., and Hodgson, A. L. 2001. The reproductive cycle of *Helicon pruinosus* (Patellogastropoda) on two South African boulder shores. *Journal of molluscan studies* 67: 385-394.

Kobayashi, Y., and Wada, K. 2004. Growth, reproduction and recruitment of the endangered brackish water snail *Iravadia* (Fairbankia) *sakaguchii* (Gastropoda:Iravadiidae). *Mollucan Research* 24: 33-42.

Marian, A. C., Marcial, A. M., and Benthe, P. V. C. 2012. Particular features of gonadal maturation and size at first maturity in *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae). *Scientia marina* 16(3): 539-548.

Ng, T. P. T., and Williams, G. A. 2012. Contrasting reproduction traits in two species of mangrove welling littorinid snails in a seasonal tropical habitat. *Invertebrate biology* 131(3): 177-186.

Pauly, D. 1984. *Fish Population Dynamic in Tropical Water a Manual for Use with Programmable Calculator*. Manila, Philippines: The international center for living aquatic resources management. 325 p.

Panchaszadeh, P. E., Antelo, C. S., Zabala, S., and Bigatt, G. 2009. Reproduction and imposex in the edible snail *Adelomelon ancilla* from northern Patagonia, Argentina. *Marine Biotechnology* 156: 1929-1939.

Power, A. J., and Keegan, B. F. 2001. The significance of imposex levels and TBT contamination in the red whelk, *Neptunea antiqua* (L.) from the offshore Irish Sea. *Marine Pollution Bulletin* 42(9): 761-772.

วันรับบทความ (Received date) : 15 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 15 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

ความดกไข่ คุณภาพของไข่ และการถดถอยของเนื้อเยื่อรังไข่ของปลาม้าลายแม่พันธุ์ ในช่วงเวลาที่มีการวางไข่อย่างต่อเนื่อง

Fecundity, Egg Quality and Ovarian Regression of Female Zebrafish in the Continuous Spawning Period

สุทธิรัตน์ ปัญจขันธ์[1] มณฑกานต์ ฉัตรชฤทธิ์มงคล[1] และวัลย์ลดา กลางนุรักษ์[1*]
Sutthirat Panchakhan[1], Monthakarn Chatcharitmongkol[1] and Wanlada Klangnurak[1*]

บทคัดย่อ

ปลาม้าลายนับว่าเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอย่างหนึ่ง ซึ่งนิยมนำมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม ทำให้เกษตรกรต้องผสมปลาม้าลายเป็นจำนวนมากเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด การผสมพันธุ์ปลาอย่างต่อเนื่องอาจทำให้แม่พันธุ์มีความเสื่อมโทรม นำไปสู่การผลิตลูกปลาที่มีคุณภาพและปริมาณที่ลดลงได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ตรวจสอบความถดถอยของรังไข่จากแม่พันธุ์ปลาม้าลายที่มีการปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง โดยเปรียบเทียบความดกไข่ อัตราการผสมติด อัตราการฟักตัวออกจากไข่ของตัวอ่อน และความผิดปกติของตัวอ่อน รวมถึงตรวจสอบลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อรังไข่ ระหว่างปลาม้าลายเพศเมียที่ปล่อยไข่ครั้งแรก (กลุ่มควบคุม) กับปลาม้าลายเพศเมียที่ปล่อยไข่อย่างต่อเนื่องเป็นจำนวน 5 ครั้ง ผลการศึกษาพบว่าเมื่อปลาแม่พันธุ์ปล่อยไข่อย่างต่อเนื่องจะทำให้ความดกไข่ อัตราการผสมติด และอัตราการฟักตัวของไข่ที่ผลิตได้มีแนวโน้มลดลง จำนวนตัวอ่อนที่ผิดปกติจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น อีกทั้งผลการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพ ยังพบว่าเซลล์ไข่ในรังไข่มีการพัฒนาช้าลง ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าเมื่อแม่พันธุ์ปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง จะทำให้เกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อรังไข่ ส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของไข่และตัวอ่อนที่ผลิตได้ ดังนั้นหลังการผสมพันธุ์แต่ละครั้งควรมีการพักปลาแม่พันธุ์ในระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้รังไข่ได้มีการฟื้นฟูสภาพก่อนการผสมพันธุ์ในครั้งต่อไป

คำสำคัญ: อัตราการผสมติด ความผิดปกติของตัวอ่อนปลา อัตราการฟักตัวออกจากไข่ เนื้อเยื่อรังไข่

Abstract

The zebrafish is one of the most important fish species in economic terms as it is an extremely popular aquarium fish. Farmers produce zebrafish stock continuously in order to supply the huge demand for the fish in the ornamental fish market. However, continuous breeding can lead to the deterioration in quality of the female fish. In this study, we focus on the regression of ovary after continuously spawning several times. Fecundity, fertilization rate, hatchability rate, number of abnormal larvae, and histology of the ovarian tissue were compared between females that spawn for the first time (control group) and females that had spawned continuously five times. The results showed that fecundity, fertilization rate and hatchability rate of eggs produced from female zebrafish that spawned continuously decreased, whereas the number of abnormal larvae produced increased. Moreover, histological studies of ovarian tissue revealed that female fish that had spawned continuously showed delayed development of oocytes in their in ovarian tissues. Therefore, it can be concluded that continuous spawning of females potentially causes abnormalities of ovarian tissue and affects the quality and quantity of zebrafish eggs and larvae. Farmers should set an inter-spawning interval for female zebrafish that allows for good recovery of ovarian structure and function between spawning.

Keywords: fertilization rate, abnormal fish larvae, hatchability rate, ovarian tissue

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: wanlada.kl@kmitl.ac.th

คำนำ

ปลาม้าลายเป็นปลาน้ำจืดขนาดเล็ก จัดอยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน (Cyprinidae) มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียใต้ ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ นิยมเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม เนื่องจากมีสีสันสวยงาม และเลี้ยงดูได้ง่าย อีกทั้งมีความได้เปรียบทางด้านชีววิทยา เช่น มีความดกไข่สูง และมีการพัฒนาตัวอ่อนอย่างสมบูรณ์ภายใน 48-72 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ ซึ่งจัดว่าเป็นข้อดีสำหรับการลงทุนลงแรงของผู้เพาะเลี้ยงปลาม้าลายเป็นอย่างมาก อีกทั้งในปัจจุบันมีการนำปลาม้าลายมาใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบในงานทางด้านวิทยาศาสตร์อย่างกว้างขวาง เพื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับสัตว์ทดลองตามแผนกลยุทธ์ว่าด้วยการพัฒนางานเลี้ยงและใช้สัตว์น้ำเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (Briggs, 2002) โดยปกติปลาม้าลายสามารถออกไข่ได้ประมาณ 200 ฟองต่อครั้ง (Silva et al., 2012) อีกทั้งในการเพาะพันธุ์ปลาเพื่อการส่งออกนั้นจะต้องเน้นทั้งคุณภาพและปริมาณของลูกปลาเพื่อให้คุ้มกับการลงทุนและเป็นที่ยอมรับของลูกค้าในเชิงธุรกิจระยะยาว ทำให้ต้องมีการใช้พ่อแม่พันธุ์ซ้ำ ทำให้ปลาม้าลายเพศเมียต้องมีการปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของไข่ที่ได้รับในแต่ละครอก โดยปกติปลาม้าลายจะวางไข่ก่อนฤดูมรสุม แต่ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมแสงและอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการ ปลาม้าลายจะสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปีทุก 1-6 วัน เมื่อเลี้ยงในสภาพที่มีจำนวนตัวผู้มากกว่าในถังเลี้ยงเดียวกัน หรือทุก 4-7 วันเมื่อเลี้ยงในสภาพปกติที่มีจำนวนทั้งสองเพศไม่แตกต่างกัน (Clelland and Peng, 2009) ระยะห่างระหว่างการปล่อยไข่ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการฟื้นฟูเนื้อเยื่อรังไข่ของตัวเมียหลังจากการปล่อยไข่ในแต่ละครั้ง ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อรังไข่ในปลาม้าลายจากการศึกษาของ Koç et al. (2008) ทำให้ทราบลักษณะของเซลล์ไข่ใน 4 ระยะตั้งแต่กระบวนการสร้างเซลล์ไข่ (oogenesis) ไปจนถึงช่วงที่ไข่สมบูรณ์ (mature stage) ในสภาวะปกติ แต่ยังไม่มีรายงานถึงปริมาณ คุณภาพของไข่ หรือลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อรังไข่จากแม่พันธุ์ซึ่งมีการเว้นระยะสืบพันธุ์เป็นช่วงเวลาหนึ่งแล้วถูกนำมาผสมพันธุ์อย่างต่อเนื่อง

โดยการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการถดถอยของระบบสืบพันธุ์ในปลาม้าลาย หลังผ่านการผสมพันธุ์เป็นจำนวนหลายครั้งติดต่อกัน โดยประเมินจาก ความดกไข่ อัตราการผสมติด ความผิดปกติของตัวอ่อน และอัตราการฟักตัวออกจากไข่ของตัวอ่อน รวมถึงตรวจสอบระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่ในเนื้อเยื่อรังไข่ด้วยการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพ เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาระบบฟาร์มที่มีการเพาะเลี้ยงปลาม้าลาย

วิธีการศึกษา

การเลี้ยงดูสัตว์ทดลองและการผสมปลาม้าลาย

เลี้ยงปลาม้าลาย (*Danio rerio*) ตามวิธีการของ Westerfield (1995) โดยมีการกำหนดให้มีช่วงสว่าง 14 ชั่วโมงสลับกับช่วงมืด 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสในระบบเลี้ยงปลาม้าลาย และให้อาหารแผ่นบดในช่วงเช้า (9:00 นาฬิกา) และช่วงเย็น (16:00 นาฬิกา)

การจับคู่ผสมพันธุ์ปลาม้าลายจะเริ่ม ณ เวลา 17:00 นาฬิกา โดยนำปลาม้าลายเพศผู้และเพศเมีย ใส่ในกล่องจับคู่ผสมพันธุ์อัตราส่วนเพศ 1:1 ซึ่งก่อนการจับคู่ปลาจะอยู่ในสภาวะอดอาหาร โดยจะไม่มีการให้อาหารในช่วงเย็นวันนั้น เมื่อถึงเวลา 8:00 นาฬิกาของวันถัดไป เป็นช่วงเวลาที่ปลาม้าลายเริ่มมีการตกไข่ โดยจะสังเกตได้จากการบวมบริเวณช่องท้องของปลาเพศเมีย ซึ่งบ่งบอกถึงความพร้อมในการวางไข่ หลังจากนั้นจะปล่อยเพศผู้และเพศเมียให้เกิดการเกี้ยวพาราสีเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที เพื่อให้ตัวเมียปล่อยไข่ จากนั้นบันทึกข้อมูลเพื่อหาความผิดปกติในช่วงตกไข่ดังจะกล่าวต่อไป เว้นระยะห่าง 5 วันก่อนทำการผสมพันธุ์ครั้งใหม่ ทำการผสมพันธุ์โดยใช้ปลาม้าลายตัวเดิม 5 ครั้ง เป็นจำนวน 10 ตัว

การประเมินความผิดปกติในช่วงตกไข่

ทำการประเมินความผิดปกติในช่วงตกไข่ โดยตรวจสอบจากความดกไข่ อัตราการผสมติด อัตราการฟักตัว และความผิดปกติของตัวอ่อน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งหลังจากปลาม้าลายวางไข่ในทุก ๆ ครั้ง ทำการเก็บไข่ทั้งหมดใส่ในจานเพาะเชื้อแล้วนับจำนวน จากนั้นหาความดกไข่ โดยนำจำนวนไข่ที่นับได้ ไปหาร้อยละตามสมการที่ (1) โดยกำหนดให้จำนวนไข่ทั้งหมดที่ปลาตัวเมียปล่อยในการผสมครั้งแรกเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

$$\text{ความดกไข่ (\%)} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ได้รับ}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100 \quad \text{.....} (1)$$

เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงทำการนับจำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ ซึ่งสังเกตได้จากเซลล์ไข่จะพัฒนาเข้าสู่ระยะ cleavage โดยมีจำนวนเซลล์ไข่มากกว่า 4 เซลล์ (Figure 1a) แล้วนำไปหาร้อยละของอัตราการผสมติด ตามสมการที่ (2)

$$\text{อัตราการผสมติด (\%)} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100 \quad \text{..... (2)}$$

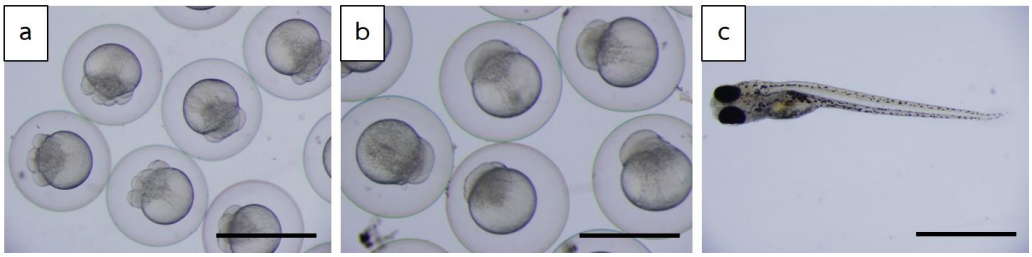

Figure 1 External morphology of eggs and an abnormal larva, (a) fertilized eggs possess characteristic of over the 4 cell stages, (b) unfertilized eggs remaining in the 1st cell stage at 2 hours post fertilization and (c) a morphological abnormality of larva displaying the dorsal curvature (scale bar represents 1 mm).

เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 3-4 วัน ตัวอ่อนจะเริ่มมีการฟักตัวออกจากไข่ ซึ่งจะทำการนับจำนวนลูกปลาทั้งหมดที่สามารถฟักตัวออกมา แล้วหาร้อยละของอัตราการฟักตัวตามสมการที่ (3) ในขณะเดียวกันจะทำการบันทึกจำนวนของตัวอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติ แล้วทำการหาร้อยละความผิดปกติของตัวอ่อน ตามสมการที่ (4)

$$\text{อัตราการฟักตัว (\%)} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่สามารถฟักตัวได้}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100 \quad \text{..... (3)}$$

$$\text{ความผิดปกติของตัวอ่อน (\%)} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่ผิดปกติ}}{\text{จำนวนตัวอ่อนที่สามารถฟักตัวได้ทั้งหมด}} \times 100 \quad \text{..... (4)}$$

ความผิดปกติของเนื้อเยื่อรังไข่ที่มีการสืบพันธุ์อย่างต่อเนื่อง

เพื่อศึกษาความผิดปกติของระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่ ทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อรังไข่ของปลาม้าลายเพศเมียด้วยวิธีการทางพยาธิสภาพ โดยจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มตัวเมียที่มีการปล่อยไข่ครั้งเดียว (the 1st spawning group) จำนวน 5 ตัว และกลุ่มตัวเมียที่ปล่อยไข่ติดต่อกันมาทั้งหมด 5 ครั้ง (the 5th spawning group) จำนวน 5 ตัว หลังจากทำการทดลองจับคู่ปลาครบจำนวนครั้งที่กำหนดไว้ เก็บรวบรวมผลในช่วง 8:00 นาฬิกา ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ปลาพร้อมปล่อยไข่ ทำการุณยฆาตโดยการตัด spinal cord จากนั้นใช้เครื่องมือผ่าตัดเปิดช่องท้องและเก็บตัวอย่างใน buffer formalin ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อประกอบไปด้วย การตัดแต่งชิ้นเนื้อก่อนนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำด้วย Tissue processing (Microtome รุ่น HM 335E) จากนั้นนำไปฝังในพาราฟิน โดยจะตัดเนื้อเยื่อความหนา 5 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Rotary microtome) และตรึงให้เนื้อเยื่อติดกับสไลด์ด้วยความร้อน 55 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องอุ่นสไลด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน (H&E) จากนั้นนำไปสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พร้อมบันทึกสัดส่วนของระยะเซลล์ไข่ในเนื้อเยื่อรังไข่ทั้งหมด แบ่งการพัฒนาของไข่ออกเป็น 4 กลุ่มคือ immature (ระยะไข่ไม่สุก), maturation (ระยะไข่ที่สมบูรณ์แล้ว), ovulation (ระยะตกไข่) และ regression (ระยะที่มีการเสื่อมสภาพของรังไข่) ดัดแปลงจาก Brown-Peterson et al. (2011) โดยลักษณะของไข่ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ immature ได้แก่ oogonia (OO) และ primary growth (PG) ซึ่งเซลล์ไข่ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้จะไม่มีการฝ่อของเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ (Figure 2) ระยะ maturation ในระยะนี้เซลล์ไข่จะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับระยะ immature โดยระยะของเซลล์ไข่ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ maturation คือ cortical alveolar (CA) และ vitellogenin (VTG) ส่วนระยะ ovulation เซลล์ไข่จะมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งในระยะนี้เซลล์ไข่จะพร้อมปล่อยออกมาภายนอกตัวปลาเพื่อรับการปฏิสนธิ ซึ่งลักษณะของเซลล์ไข่จะเกิดการเคลื่อนตัวของ

germinal vesicle หรือ germinal vesical movement (GVM) และการแตกออกของเยื่อหุ้ม germinal (germinal vesicle breakdown, GVBD) และระยะ regression ในระยะนี้จะเกิด postovulatory follicle complex (POF) ขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งชี้ถึงการเสื่อมสภาพของรังไข่ จากนั้นประเมินร้อยละของเซลล์ไข่ในแต่ละระยะ ตามสมการที่ (5)

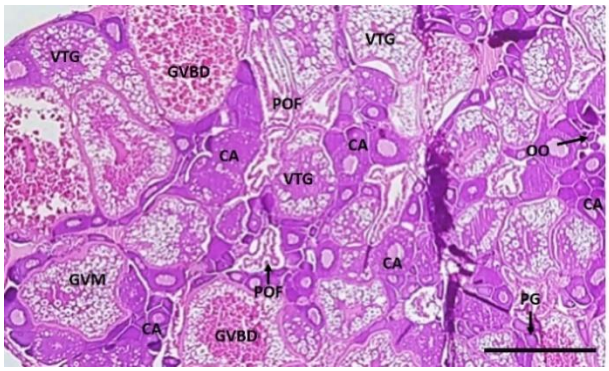

Figure 2 Histological assessment of ovarian tissue indicating 4 developmental stages including immature stage represented by oogonia (OO) and primary growth (PG), maturation stage represented by cortical alveolar (CA) and vitellogenin (VTG), ovulation stage represented by germinal vesical movement (GVM) and germinal vesicle breakdown. (GVBD), and regression stage represented by postovulatory follicle complex (POF) (scale bar represents 1 mm).

$$\text{ร้อยละของเซลล์ไข่แต่ละระยะ} = \frac{\text{จำนวนของเซลล์ไข่ในระยะนั้น ๆ ที่พบในรังไข่}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100 \quad \text{... (5)}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การนำเสนอข้อมูลทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของร้อยละ ± SE แล้วหาความแตกต่างทางสถิติ ของความดกของไข่ ร้อยละของอัตราการผสมติด ร้อยละอัตราการฟักออกจากไข่ และร้อยละจำนวนตัวอ่อนที่ผิดปกติ ที่ผลิตได้จากม้าลายเพศเมียซึ่งปล่อยไข่อย่างต่อเนื่องเป็นจำนวน 5 ครั้ง โดยใช้ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แล้ว และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองโดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนการเปรียบเทียบสัดส่วนของระยะเซลล์ไข่ในกลุ่มตัวอย่าง ระหว่างปลาม้าลายเพศเมียที่ปล่อยไข่ครั้งแรก (กลุ่มควบคุม) กับปลาม้าลายเพศเมียที่ปล่อยไข่เป็นครั้งที่ 5 จะเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติในแต่ละระยะด้วย T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ความผิดปกติในช่วงการตกไข่

จากการศึกษาความดกไข่ อัตราการผสมติด อัตราการฟัก และร้อยละความผิดปกติของตัวอ่อน ในปลาม้าลายที่ปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง พบว่าเมื่อปลาปล่อยไข่ติดต่อกันหลายครั้งจะทำให้ความดกไข่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) โดยมีความดกไข่ลดลงถึง 63.71 เปอร์เซ็นต์ในการปล่อยไข่ครั้งที่ 5 เมื่อเทียบกับครั้งแรก (Figure 3a) ร้อยละของไข่ที่ผสมติดมีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละครั้งของการปล่อยไข่ ($P<0.001$) โดยลดลงจาก 97.90±0.96 เปอร์เซ็นต์ในการปล่อยไข่ครั้งแรกจนเหลือ 87.83±3.30 เปอร์เซ็นต์ในการปล่อยไข่ครั้งที่ 3 เมื่อปลาปล่อยไข่ต่อไปในครั้งที่ 4 และ 5 พบว่าร้อยละของการผสมติดจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการผสมในครั้งแรก และครั้งที่ 2 (Figure 3b) อัตราการฟักของไข่ปลาที่ปล่อยออกมาแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.001$) โดยพบว่าเมื่อปลาม้าลายปล่อยไข่ต่อเนื่องกัน จะทำให้จำนวนตัวอ่อนที่ฟักตัวออกจากไข่มีแนวโน้มลดลง ในครั้งแรกตัวอ่อนสามารถฟักตัวออกจากไข่ได้มากถึง 97.82±13.94 เปอร์เซ็นต์ และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับไข่ที่ถูกปล่อยมาในครั้งที่ 4 และ 5 ($P\leq0.05$) ซึ่งมีอัตราการฟักตัวออกจากไข่เหลือเพียง 86.56±24.58 และ 75.16±10.44 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Figure 3c) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงความผิดปกติของตัวอ่อนที่ได้จากปลาม้าลายเพศเมียซึ่งได้ปล่อยไข่อย่างต่อเนื่องพบว่า ในการปล่อยไข่ครั้งแรกมีความผิดปกติของตัวอ่อนน้อยมากเพียง 0.23 ± 0.22 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการผสมต่อไปในครั้งที่ 4 และ 5 พบว่าความผิดปกติของตัวอ่อนที่ได้จะเพิ่มขึ้นอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05) โดยเพิ่มเป็น 3.76±2.91 และ 5.57±2.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Figure 3d) ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่า เมื่อใช้ปลาเพศเมียที่ปล่อยไข่ติดต่อกันหลายครั้งจะทำให้ปริมาณและคุณภาพของไข่และตัวอ่อนที่ได้มีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด

ปริมาณและคุณภาพไข่และตัวอ่อนที่ลดลง อาจแสดงถึงความผิดปกติของกระบวนการตกไข่หรือ ovulation ซึ่งกระบวนการนี้เป็นขั้นตอนทางชีววิทยาที่สำคัญในการเตรียมไข่ให้พร้อมสำหรับกระบวนการปฏิสนธิ (Clelland and Peng, 2009) การมีอัตราการผสมติดที่ลดลงเมื่อปลาปล่อยไข่แล้วหลายครั้ง แสดงว่ามีสัดส่วนของไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิเป็นจำนวนมาก สังเกตได้จากเซลล์ในระยะ Cleavage ไม่สามารถแบ่งตัวเป็น 4 เซลล์ เซลล์ไข่ส่วนใหญ่จะหยุดพัฒนาตั้งแต่เซลล์แรก (Figure 1b) แล้วไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิจะตายในระยะเวลาต่อมา (Klangnurak et al., 2018) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดของการผิดปกติในช่วงกระบวนการตกไข่ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่จะมีความผิดปกติสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยตัวอ่อนจะมีลำตัวโค้งงอ (Figure 1c) และเมื่อพิจารณาความดกไข่ที่ลดลง ชี้ให้เห็นว่ามีความถดถอยของวัฏจักรการสืบพันธุ์อย่างชัดเจนในปลาตัวเมียที่ปล่อยไข่อย่างต่อเนื่องกันตั้งแต่ครั้งที่ 4 ขึ้นไป

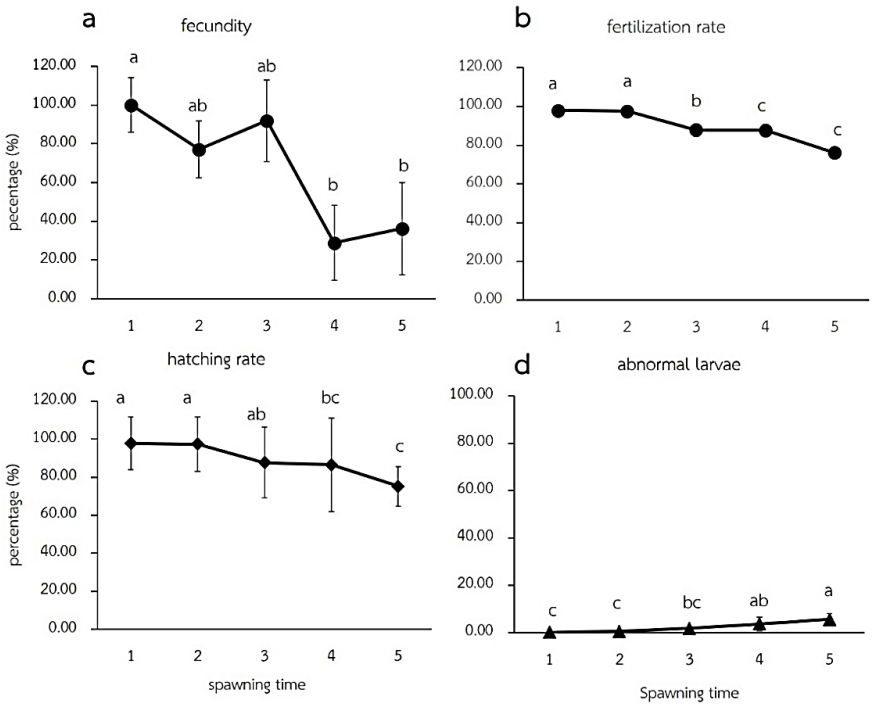

Figure 3 Fecundity (a), fertilization rate (b), hatching rate (c) and number of abnormal larvae (d) produced continuously by zebrafish females from the first to the 5th of spawning times. Different letters represent significant differences among the data (P≤0.05). Values are mean ± SE.

การพัฒนาของระยะในรังไข่ปลาม้าลายเพศเมีย

การตรวจสอบลักษณะทางพยาธิสภาพบริเวณรังไข่ด้วยการย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน โดยทำการวิเคราะห์ระยะการพัฒนาของไข่ ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่ immature, maturation, ovulation และ regression พบว่าเซลล์ไข่ในระยะ immature, ovulation และ regression ในกลุ่มปลาเพศเมียที่มีการปล่อยไข่ครั้งแรก และกลุ่มที่มีการปล่อยไข่ไปแล้วจำนวน 5 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปลาม้าลายที่ผ่านการปล่อยไข่แล้ว 5 ครั้ง จะมีเซลล์ไข่ในระยะ maturation มากกว่าปลาม้าลายที่มีการปล่อยไข่เป็นครั้งแรกอย่างมีนัยสำคัญสำคัญทางสถิติ (P≤0.05) โดยคิดเป็น 19.17 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4) ทั้งนี้ตามการทดลองของ Klangnurak and Tokumoto (2017) ได้ระบุไว้ว่าเวลา 08:00 นาฬิกา ไข่จะมีการพัฒนาสู่ระยะ ovulation แต่ในปลาเพศเมียที่มีการปล่อยไข่ติดต่อกัน 5 ครั้ง ยังพบเซลล์ไข่ในระยะ maturation เป็นจำนวนมาก แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาที่ช้าลงของเซลล์ไข่ภายในรังไข่เมื่อปลาม้าลายมีการปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งสอดคล้องกับความดกไข่ที่ลดลงในการปล่อยครั้งที่ 5 เนื่องจากเซลล์ไข่ที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ ovulation ซึ่งเป็นระยะก่อนปล่อยไข่มีจำนวนน้อย จึงส่งผลให้มีจำนวนไข่ที่ถูกปล่อยออกมาหลังการจับคู่ผสมพันธุ์ หรือความดกไข่ลดลงด้วยเช่นกัน

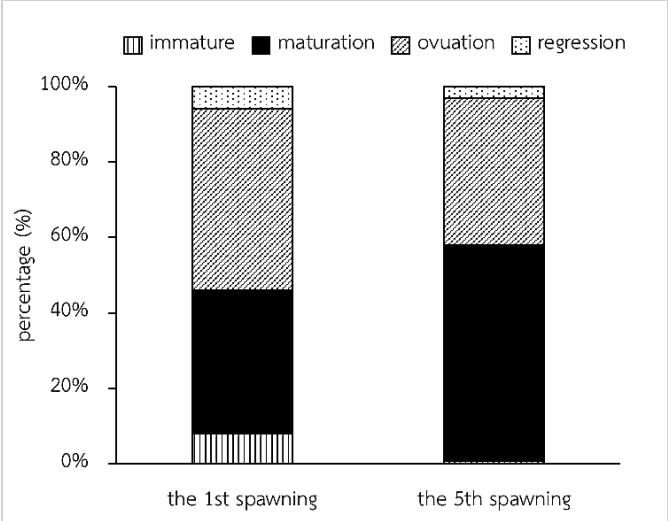

Figure 4 Percentage of oocytes stages in the ovarian tissue in average (n=10) from the first spawning females and the 5th spawning females.

ความผิดปกติของปริมาณ และคุณภาพไข่และตัวอ่อนที่เกิดขึ้นจากปลาม้าลายเพศเมียที่ปล่อยไข่ติดต่อกันหลายครั้ง แสดงให้เห็นว่า แม้จะมีช่วงพักระหว่างรอบสืบพันธุ์ถึง 5 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาพักที่เพียงพอแล้วในการปล่อยไข่รอบใหม่ ตามการศึกษาก่อนหน้า (Clelland and Peng, 2009) แต่ระยะเวลาพักดังกล่าวนั้นยังไม่เพียงพอหากต้องผสมพันธุ์ปลาตัวเดิมต่อเนื่องกันเป็นจำนวนหลายครั้ง การผสมพันธุ์ปลาอย่างต่อเนื่องอาจทำให้ปลาเกิดสภาวะเครียด ซึ่งมักจะส่งผลกระทบต่อความดกไข่ และการผสมติดได้ (Wafer et al., 2016) ระยะเวลาในการฟื้นฟูของกระบวนการพัฒนารังไขขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม (Agarwal et al., 2014; Kucharczyk et al., 2018) และเงื่อนไขทางสรีระ ซึ่งปลาม้าลายจะมีการทำงานของระบบสืบพันธุ์ที่แตกต่างกันไปตามขนาด อายุ รวมถึงสายพันธุ์ของปลาม้าลาย (Agarwal et al., 2014) นอกจากต้องมีการพักช่วงของระยะการปล่อยไข่ที่เหมาะสมแล้ว ยังจำเป็นต้องมีการเลี้ยงดูในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น การให้อาหาร ให้แสง และ ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม นั้นคือ 28.5 องศาเซลเซียส (Westerfield, 1995) เป็นต้น เพื่อทำให้ปลาม้าลายเพศเมียสามารถผลิตไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าปลาม้าลายเพศเมียที่ปล่อยไข่หลายครั้งอย่างต่อเนื่องจะผลิตไข่ที่มีความดกไข่ อัตราการผสมติด และอัตราการฟักตัวลดลง 63.71, 10.07 และ 22.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความผิดปกติของตัวอ่อนหลังจากฟักตัวแล้วเพิ่มขึ้น 5.34 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังมีการพัฒนาของเซลล์ไข่ในรังไข่ช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ปล่อยไข่ครั้งแรก แสดงให้เห็นถึงความถดถอยของรังไข่ ดังนั้นเพื่อให้ได้ไข่ปลาที่มีจำนวนมาก คุณภาพดี และได้ตัวอ่อนที่เป็นปกติ ควรเว้นระยะเวลาระหว่างการปล่อยไข่ให้มากกว่า 5 วันสำหรับตัวเมียที่ต้องปล่อยไข่อย่างต่อเนื่องเพื่อให้รังไข่ของปลาเพศเมียได้มีการฟื้นฟู

เอกสารอ้างอิง

Agarwal, A., Damayanthi, D., and Stefan, S. P. 2014. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12(112): 1-9.

Briggs, J. P. 2002. The zebrafish: A new model organism for integrative physiology. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 282(1): 3-9.

Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. F., and Lowerre-Barbieri, S. K. 2011. A Standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science* 3: 52-70.

Clelland, E., and Peng, C. 2009. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 312(1-2): 42-52.

Klangnurak, W., Fukuyo, T., Rezanujjaman, M. D., Seki, M., Sugano, S., Suzuki, Y., and Tokumoto, T. 2018. Candidate gene identification of ovulation-inducing genes by RNA sequencing with an in vivo assay in zebrafish. *Plos One* 13(5): 1-19.

Klangnurak, W., and Tokumoto, T. 2017. Fine selection of up-regulated genes during ovulation by in vivo induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish. *Zoological Letters* 3: 1-10.

Koç, N. C., Aytekin, Y., and Yüce, R. 2008. Ovary maturatıon stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (Danio rerio). *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal* 51: 512-522.

Kucharczyk, D., Stępień, P., Nowosad, J., Kupren, K., Targońska, K., and Kujawa, R. 2018. The optimization of wide-type zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) reproduction in low temperatures under controlled conditions. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 18: 49-55.

Silva, P, Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Malhãoa, F., Reis, B., Urbatzka, R., Monteiro, R. A. F., and Rocha, E. 2012. Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads — A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model. *Aquatic Toxicology* 124-125: 1-10.

Wafer, L. N., Jensen, B., Whitney, J. C., Gomez, B. H., Flores, R., and Goodwin, B. S. 2016. Effects of environmental enrichment on the fertility and fecundity of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 55(3): 291-294.

Westerfield, M. 1995. *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio rerio)*. Eugene: University of Oregon press.

วันรับบทความ (Received date) : 15 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 15 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มผลผลิตชีวมวลและการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ของ *Scenedesmus dimorphus* KMITL

Optimum Carbon Dioxide Concentrations for Enhancing Biomass and Carbon Dioxide Biofixation of *Scenedesmus dimorphus* KMITL

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์[1] และจันทรา ดีมาก[1*]
Suneerat Ruangsomboon[1] and Jantra Dimak[1*]

บทคัดย่อ

การศึกษาระดับที่เหมาะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในการเพิ่มผลผลิตชีวมวล องค์ประกอบทางชีวเคมี และการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ของสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus dimorphus* KMITL โดยผันแปรระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 0.03, 2.50, 5.00 และ 7.50 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร *Chlorella* ปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 18 วัน ผลการศึกษาพบว่าที่ระดับการเสริมคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหาร 5.00 เปอร์เซ็นต์ สาหร่ายมีชีวมวล คลอโรฟิลล์-เอ โปรตีน และ คาร์บอนในเซลล์ สูงสุดเท่ากับ 1.15±0.03 กรัมต่อลิตร 2.48±0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร 305.73±28.65 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 33.83±0.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์พบสูงสุด 2.33±0.35 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตพบสูงสุด 206.31±18.82 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 7.50 เปอร์เซ็นต์ สาหร่ายที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 5.00 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้สูงที่สุด โดยมีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ 1.24±0.03 กรัมต่อกรัม หรือ 1.43±0.03 กรัมต่อลิตร, อัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ 50.95±3.98 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อปี สาหร่ายชนิดนี้มีกรดไขมัน C16:0 เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีค่าอยู่ในช่วง 19.85-57.91 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ C18:0 มีค่าอยู่ในช่วง 11.33-20.53 เปอร์เซ็นต์ และ C18:3n3 มีค่าอยู่ในช่วง 9.45-22.44 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5.00 เปอร์เซ็นต์ คือระดับที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มผลผลิตของสาหร่ายสายพันธุ์นี้ และสาหร่ายนี้ยังมีความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้สูง ดังนั้น *S. dimorphus* KMITL จึงเป็นทางเลือกในการนำไปใช้เป็นตัวดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมได้

คำสำคัญ: *Scenedesmus dimorphus* KMITL คาร์บอนไดออกไซด์ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต

Abstract

The aim of this study was to investigate the optimum CO_2 concentrations for growth, chemical composition and carbon dioxide biofixation of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* KMITL. A range of carbon dioxide concentrations, 0.03, 2.50, 5.00 and 7.50%, were supplied to the alga samples, which were cultivated in axenic *Chlorella* medium in the laboratory for 18 days. Cultivating the alga with 5% CO_2 produced alga with the highest biomass, chlorophyll-a, protein and carbon contents, which were 1.15±0.03 g/l, 2.48±0.05 mg/l, 305.73±28.65 mg/g and 33.83±0.56%, respectively. The maximum carotenoid (2.33±0.35 μg/l) and carbohydrate (206.31±18.82 mg/g) levels were observed in alga cultivated with 0.03 and 7.50% CO_2 concentrations, respectively. Cultivation of this alga supplied with 5% CO_2 gave the highest CO_2 fixations (1.24±0.03 g/g, 1.43±0.03 g/l) and CO_2 fixation rate (50.95±3.98 kg/m^3/year). The most abundant fatty acid component found in this alga was C16:0 (19.85-57.91%), followed by C18:0 (11.33-20.53%) and C18:3n3 (9.45-22.44%). The results of this study indicated that 5% CO_2 was optimal for enhancing the biomass of the algal strain. Moreover, this alga showed a high capability for CO_2 fixation. Thus, *S. dimorphus* KMITL can be used as an alternative strain for industrial flue gas fixation.

Keywords: *Scenedesmus dimorphus* KMITL, carbon dioxide, protein, lipid, carbohydrate

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: jantra.di@kmitl.ac.th

คำนำ

ปัจจุบันมีการนำสาหร่ายขนาดเล็กหลายชนิดมาใช้ประโยชน์ในหลายรูปแบบ ทั้งใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมนุษย์ อาหารสัตว์น้ำ เครื่องสำอาง บำบัดน้ำเสีย และใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบเพื่อผลิตพลังงาน เป็นต้น โดยพบว่าสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus* spp. เป็นสาหร่ายน้ำจืดที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ประโยชน์ในหลายรูปแบบ เนื่องจากมีองค์ประกอบทางชีวเคมีที่เหมาะสม คือมีปริมาณโปรตีน 185.84 มิลลิกรัมต่อกรัม หรือ 11.2-56 เปอร์เซ็นต์ มีคาร์โบไฮเดรต 28-63.4 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 15-55.7 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ 52.91 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแคโรทีนอยด์-แอสตาแซนทิน 59.48 เปอร์เซ็นต์ (Qin et al., 2008; Toledo-Cervantes et al., 2013) สาหร่ายชนิดนี้มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว พบมีผลผลิตในการเพาะเลี้ยง 0.85-6.5 กรัมต่อลิตร (Morais and Costa., 2007; Toledo-Cervantes et al., 2013) นอกจากนี้ยังทนต่อการปนเปื้อนของเชื้อหรือสาหร่ายชนิดอื่นที่มาปนเปื้อนได้ดี จึงเหมาะต่อการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณมากนอกห้องปฏิบัติการ และพบว่ามีการนำไปใช้ประโยชน์ เป็นสารต้านมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (เนื่องจากมีแอสตาแซนทินและคลอโรฟิลล์) ใช้เป็นอาหารแพลงก์ตอนสัตว์ และสัตว์น้ำวัยอ่อน (Qin et al., 2008) ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงเพื่อจำหน่ายและเพาะเลี้ยงเป็นแหล่งผลิตแคโรทีนอยด์ โดยการพิจารณานำมาใช้ประโยชน์ด้านใด ต้องพิจารณาองค์ประกอบทางชีวเคมีที่พบในการเพาะเลี้ยงนั้น ๆ แล้วจึงวางแผนนำไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในสารอาหารหรือภาวะแวดล้อมที่ต่างกัน ส่งผลให้มีองค์ประกอบทางชีวเคมีที่ต่างกัน

การเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตสาหร่ายมีหลายวิธี ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้เพิ่มผลผลิตได้คือปริมาณคาร์บอน-ไดออกไซด์ (CO_2) ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย เพราะสาหร่ายต้องการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเจริญเติบโต โดยระดับที่เหมาะสมสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายได้ สาหร่ายแต่ละชนิดต้องการปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกัน (Pooja and Himabindu, 2012; Yoshimura et al., 2013) จึงมีแนวความคิดในการนำคาร์บอนไดออกไซด์มาเสริมในระบบเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเพิ่มผลผลิต ซึ่งพบว่าการเผาไหม้เชื้อเพลิงของโรงงานอุตสาหกรรมนั้นมีการระบายปล่อยแก๊สที่เกิดขึ้นออกจากระบบ (flue gas) โดยในแก๊สนั้นมีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นหากนำแก๊สที่ปล่อยทิ้งเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ย่อมสามารถลดต้นทุนในการซื้อคาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์จากแหล่งจำหน่ายต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้การเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) นั้น เป็นต้นเหตุให้มีการเพิ่มของแก๊สเรือนกระจก เกิดปัญหาภาวะโลกร้อนมากที่สุด โดยแก๊สเรือนกระจกประกอบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 68 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นหากใช้แก๊สที่ปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นแหล่งคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อเพิ่มผลผลิตสาหร่าย ย่อมสามารถช่วยลดแก๊สเรือนกระจกและช่วยแก้ปัญหาภาวะโลกร้อนได้ นั่นคือการใช้สาหร่ายเป็นตัวตรึงคาร์บอนไดออกไซด์นั่นเอง (carbon dioxide biofixation) โดยมีรายงานว่าการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์โดยสาหร่าย *Scenedesmus* spp. พบว่ามี C-content 51.57 เปอร์เซ็นต์ CO_2 assimilation 13.56-28.08 เปอร์เซ็นต์ และ 131-1420 กรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน (Morais and Costa, 2007; Toledo-Cervantes et al., 2013)

โรงไฟฟ้าบางปะกงเป็นแหล่งผลิตไฟฟ้าที่มีการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลปริมาณมาก และมีการปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาตลอดเวลา การที่จะนำแก๊สที่ปล่อยจากโรงไฟฟ้าบางปะกงมาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายได้นั้น เกณฑ์แรกคือสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงต้องสามารถเจริญเติบโตได้ในระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยออกมาได้ เพราะสาหร่ายทั่วไปตามธรรมชาติ เจริญเติบโตโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่มีในอากาศปกติ ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 0.036 เปอร์เซ็นต์ (National Oceanic and Atmospheric Administration, 2018) จากการศึกษาขั้นต้นโรงไฟฟ้าบางปะกงปล่อยแก๊สที่มีองค์ประกอบของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นหากต้องการนำแก๊สที่ปล่อยนี้มาใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย จะต้องคัดเลือกสาหร่ายที่เติบโตที่ระดับความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์นี้ได้ เพราะสาหร่ายแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนต่อระดับคาร์บอนไดออกไซด์และต้องการระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมแตกต่างกัน

สาหร่าย *Scenedesmus dimorphus* สายพันธุ์ KMITL เป็นสาหร่ายที่มีปริมาณโปรตีนและไขมันที่สูงเหมาะต่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ทั้งด้านเป็นแหล่งโปรตีน แหล่งพลังงาน หรือใช้บำบัดน้ำเสีย (สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์, 2558; สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์ และจันทรา ดีมาก, 2561; Ruangsomboon et al., 2012; 2013) หากพิจารณาด้านแหล่งพลังงาน มีรายงานว่าสาหร่าย *Scenedesmus* spp. มีองค์ประกอบทางชีวเคมีทั้งคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์เป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตพลังงานชีวภาพ เช่น ไบโอไฮโดรเจน ไบโอเอทานอล ไบโอแก๊ส ไบโอดีเซล (Ostgaard et al., 1993, Farias Silva and Bertucco, 2016) นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุ คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ (Borowitzka, 2010; 2013) ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ด้านอาหาร ยา และเครื่องสำอางได้ (Dufosse et al., 2005)

ด้วยองค์ประกอบทางชีวเคมีและแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ดังนั้นจึงควรเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้เพื่อเพิ่มปริมาณมากโดยการเสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป โดยขั้นตอนแรกคือต้องทำการทดสอบความสามารถในการทนต่อความเป็นกรดของคาร์บอนไดออกไซด์ ว่าสามารถเจริญเติบโตได้ในระดับคาร์บอน-ไดออกไซด์ที่ใกล้เคียงกับที่ปล่อยจากโรงไฟฟ้าบางปะกงหรือไม่ และมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่ระดับใด การทราบระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมกับสายพันธุ์สาหร่ายที่เราต้องการเพาะเลี้ยงย่อมเป็นวิธีที่ดีที่สุดที่จะทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตที่เร็ว มีชีวมวลสูง และอีกสิ่งหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือความสามารถของสาหร่ายในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อประยุกต์ใช้ประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อมต่อไป

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมกับสาหร่าย *Scenedesmus dimorphus* KMITL ที่ทำให้สาหร่ายมีผลผลิตชีวมวลสูงที่สุด และศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ต่าง ๆ เพื่อวางแผนการนำไปใช้ประโยชน์ให้เหมาะสม และเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้ flue gas ที่ปล่อยจากโรงไฟฟ้าบางปะกง เพื่อช่วยในการลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย

สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *S. dimorphus* strain KMITL เป็นสาหร่ายที่คัดแยกโคโลนีเดี่ยวมาจากบ่อเลี้ยงปลา เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร *Chlorella* (Vonshak and Maske, 1982) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±1.0 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 24 ชั่วโมง ความเข้มแสง 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้อากาศตลอดเวลาโดยผ่านตัวกรองแบคทีเรีย เพาะเลี้ยงสาหร่ายให้เพิ่มปริมาณมากเพื่อใช้สาหร่ายเป็นหัวเชื้อในการทดลองขั้นต่อไป

การศึกษาผลของระดับคาร์บอนไดออกไซด์ต่อผลผลิตชีวมวลและองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่าย

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์แก้วขนาด 1 ลิตร ด้วยอาหารสูตร *Chlorella* ปริมาตร 1 ลิตร ในห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 25±1.0 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสงที่ระดับ 60 ไมโครโมลโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน คือที่เวลา 07.00-19.00 น. โดยใช้เครื่องตั้งเวลาอัตโนมัติ และให้คาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ระดับ 0.03 (ชุดควบคุม), 2.50, 5.00 และ 7.50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) (เนื่องจากระดับคาร์บอนไดออกไซด์ของโรงไฟฟ้าบางปะกงอยู่ที่ประมาณ 4.3-4.6 เปอร์เซ็นต์ จึงวางแผนการทดลองให้ความเข้มข้นครอบคลุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ของโรงไฟฟ้าและเผื่อให้ความเข้มข้นสูงขึ้นอีกหนึ่งระดับในกรณีที่มีการเพิ่มของคาร์บอนไดออกไซด์ในอนาคต) ซื้อคาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์จาก United Industrial Gases Co., Ltd., Thailand โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 100 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับอากาศปกติ ให้ได้ระดับที่กำหนด โดยใช้วาล์วควบคุมเปอร์เซ็นต์ของแก๊สและปริมาณของแก๊ส (Nitto model DK800S-6, K-1013, Japan) ให้ที่อัตรา 0.4 ลิตรต่อลิตรต่อนาที (vvm) ตลอดการเพาะเลี้ยง โดยมีแผ่นกรองแบคทีเรียในอากาศก่อนเข้าฟลาสก์เพาะเลี้ยงทุกฟลาสก์ ชุดควบคุมคือชุดที่ให้อากาศปกติผ่านตัวกรองแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยง ฟลาสก์เพาะเลี้ยงสาหร่ายทุกฟลาสก์ต้องทำการปิดปาก ฟลาสก์ด้วยสำลีและพันทับด้วย parafilm และปิดฟอยล์ เพื่อป้องกันการรั่วซึมของแก๊สออกนอกฟลาสก์เพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงสาหร่ายจนเข้าสู่ปลายระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ (late exponential phase 18 วัน) ทำการวิเคราะห์ชีวมวล คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ ตามวิธีของ Becker (1994) คาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี phenol sulfuric acid method (DuBois et al., 1956) โปรตีนด้วยวิธี Lowry method (Lowry et al., 1951) พีเอชด้วยเครื่องวัดดิจิตอล (HANNA HI 8424, Japan) ทุก 3 วัน การสกัดไขมันด้วยวิธีของ Bligh and Dyer (1959) และวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่อง gas chromatography (FID, Agilent Technologies 6890 N USA) โดยมีรายละเอียดสภาวะในการฉีดตัวอย่างตามรายงานของ Ruangsomboon et al. (2013) ของสาหร่ายทุก 6 วัน วิเคราะห์คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจนในเซลล์สาหร่ายที่สิ้นสุดการทดลอง (CHNS Analyzer - PerkinElmer 2400 Series II, USA) และคำนวณอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ของสาหร่าย (Jacob-Lopes et al., 2009) การรายงานผลรายงานเป็นค่าต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่าย และต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงสาหร่าย 1 ลิตร

การเก็บตัวอย่างทุกครั้งจะเก็บสาหร่ายและวัดพีเอชที่เวลา 9.00 น. คือหลังจากการได้รับแสง 2 ชั่วโมง โดยสาหร่ายในทุกชุดการทดลองจะทำการเพาะเลี้ยง 24 ฟลาสก์ เพื่อให้มีปริมาณสาหร่ายพอเพียงต่อการวิเคราะห์ไขมัน วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธีของ Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อพีเอชของอาหารเลี้ยงสาหร่าย ชีวมวล และองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่าย

การเสริมคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย โดยเสริมแตกต่างกัน 4 ระดับ 0.03, 2.50, 5.00 และ 7.50 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 18 วัน พบว่าค่าพีเอช (pH) ของอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีความสัมพันธ์ในทางลบกับระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่เสริมในระบบ โดยค่าพีเอชของอาหารสาหร่ายมีค่าลดลง เมื่อได้รับระดับคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์รวมกับน้ำทำให้เกิดกรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) จึงส่งผลให้อาหารมีความเป็นกรดมากขึ้น โดยที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์สูงสุด 7.50 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายตลอดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 5.52 (วันที่ 3) ถึง 6.03 (เริ่มทดลอง) (Figure 1A) และพบว่าตลอดการทดลอง สาหร่ายที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์มีการเจริญเติบโตที่ปกติ ไม่พบการตายในชุดการทดลองใด (Figure 1B) แสดงให้ทราบว่าสาหร่าย *S. dimorphus* KMITL สามารถเจริญเติบโตได้ทุกระดับคาร์บอนไดออกไซด์ในการทดลองนี้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำสาหร่ายชนิดนี้ไปเพาะเลี้ยงโดยใช้ flue gas จากโรงไฟฟ้าบางปะกงได้ ซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์ไม่เกิน 5.00 เปอร์เซ็นต์

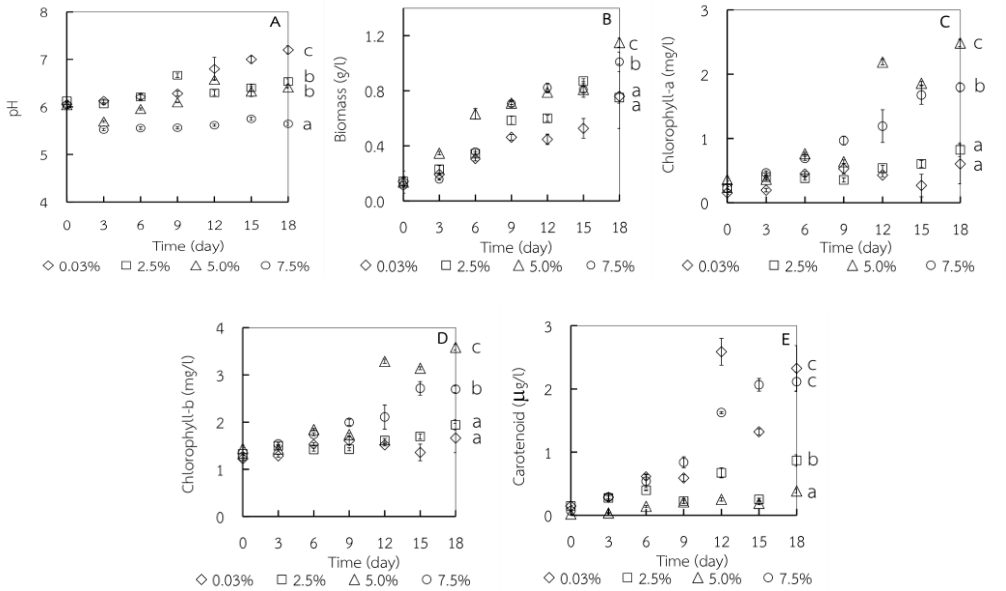

Figure 1 Medium pH (A), biomass yield (B) and pigments (C-E) of *S. dimorphus* KMITL cultivated under CO_2 at different concentrations (0.03-7.50%). Different small letters on the lines indicate significant difference at 95% confidence level (P<0.05). Error bars represent ± S.D. of four replicates.

ผลผลิตชีวมวล (biomass) ของสาหร่ายในอาหารที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์มีผลผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นจาก 0.03-5.00 เปอร์เซ็นต์ และลดลงที่คาร์บอนไดออกไซด์ 7.50 เปอร์เซ็นต์ โดยสาหร่ายมีผลผลิตชีวมวลสูงที่สุดเท่ากับ 1.15±0.03 กรัมต่อลิตร ที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5.00 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1B) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสาหร่ายที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03 และ 2.50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการเพิ่มผลผลิตชีวมวลของสาหร่ายชนิดนี้มากที่สุดคือ 5.00 เปอร์เซ็นต์ ไม่จำเป็นต้องเสริมคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่าระดับนี้ แต่หากจำเป็นต้องนำไปเลี้ยงในที่ที่มีระดับคาร์บอนไดออกไซด์สูงถึง 7.50 เปอร์เซ็นต์ ก็ยังคงได้รับผลผลิตชีวมวลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นหากต้องมีค่าใช้จ่ายในการซื้อคาร์บอนไดออกไซด์ การเสริมที่ 5.00 เปอร์เซ็นต์ ก็เพียงพอแล้ว

ปริมาณคลอโรฟิลล์-เอ และ บี (chlorophyll-a, b) ของสาหร่ายที่ได้รับการเสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5.00 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสูงที่สุดคือ 2.48±0.05 และ 3.58±0.07 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลอง (Figure 1C-D) โดยพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์มีความสอดคล้องกับชีวมวลของสาหร่าย ชุดการทดลองที่มีชีวมวลสูงทำให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูง นอกจากนี้อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้คลอโรฟิลล์ของสาหร่ายที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 7.50 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่า 5.00 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นเพราะระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูงเริ่มยับยั้งการสังเคราะห์ polyketides ในสาหร่าย จึงทำให้คลอโรฟิลล์ลดลง (Dufosse et al., 2005)

ปริมาณแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ที่พบในสาหร่าย พบว่าชุดที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำที่สุด มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงที่สุด คือ 2.33±0.35 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 2.50 และ 5.00 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1E) โดยปกติแล้วแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายจะพบมีปริมาณสูงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างแคโรทีนอยด์ ซึ่งจากการทดลองนี้คือชุดควบคุม และอีกสภาวะที่สร้างแคโรทีนอยด์ได้สูงคือสาหร่ายที่อยู่ในสภาวะเครียด โดยแคโรทีนอยด์จะถูกสร้างขึ้นมาเพื่อป้องกันอันตรายให้กับเซลล์สาหร่าย (Aburai et al., 2015) โดยจากการทดลองนี้พบว่าที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 7.50 เปอร์เซ็นต์ สาหร่ายมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงเป็นอันดับสองรองจากชุดควบคุม แสดงว่าที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์นี้สาหร่ายเริ่มได้รับความเครียดจากค่าพีเอชของอาหารที่ลดลง (แต่ไม่ถึงกับทำให้สาหร่ายตาย)

ปริมาณโปรตีน (protein) ต่อลิตรของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย สอดคล้องกับปริมาณชีวมวลของสาหร่าย โดยมีค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 5.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีโปรตีนเท่ากับ 313.99±28.54 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03 และ 2.50 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2A) ส่วนปริมาณโปรตีนที่พบในเซลล์สาหร่าย (มิลลิกรัมต่อกรัม) พบว่าชุดการทดลองของสาหร่ายที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03 และ 2.50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกัน โดยสูงกว่าชุดการทดลองอื่น โดยการสะสมโปรตีนในเซลล์สาหร่ายของสองชุดการทดลองนี้เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น จนถึงวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 488.08±81.84 และ 466.82±26.05 มิลลิกรัมต่อกรัม ในชุดที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03 และ 2.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณโปรตีนจึงลดลง ที่สิ้นสุดการเพาะเลี้ยงทุกชุดการทดลองมีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าที่สิ้นสุดการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 5.00 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณโปรตีนที่สุดคือ 305.73±28.65 มิลลิกรัมต่อกรัม สูงกว่าชุดควบคุม 1.3 เท่า (Figure 2B) ปริมาณเปอร์เซ็นต์โปรตีน (มิลลิกรัมต่อกรัม) ในสาหร่ายมีแนวโน้มตรงข้ามกับผลผลิตชีวมวล ทั้งนี้เป็นเพราะสาหร่ายที่มีผลผลิตชีวมวลมาก มีการใช้อาหารสะสมไปในการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์มากนั่นเอง ส่วนสาหร่ายที่เจริญเติบโตช้าจึงมีการสะสมโปรตีนในเซลล์ได้มากกว่า

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ของสาหร่าย (มิลลิกรัมต่อลิตร) มีความสอดคล้องกับผลผลิตชีวมวลของสาหร่าย คือมีปริมาณสูงสุดในชุดการทดลองที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 5.00 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 143.94±10.07 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลองที่เหลือ (Figure 2C) ซึ่งปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่อลิตรมีความสอดคล้องกับปริมาณของชีวมวลของสาหร่าย ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต (มิลลิกรัมต่อกรัม) ในสาหร่าย พบสูงที่สุดในชุดการทดลองที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 7.50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 206.31±18.82 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลอง และมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม 3.76 เท่า (Figure 2D) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเซลล์สาหร่ายสอดคล้องกับระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่สาหร่ายได้รับ เมื่อระดับคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (มิลลิกรัมต่อกรัม) ก็เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะมีคาร์บอนไดออกไซด์สำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพิ่มมากขึ้น จึงได้คาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นผลผลิตของกระบวนการนี้ปริมาณมากขึ้นนั่นเอง

ปริมาณไขมัน (lipid) ของสาหร่ายเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อสาหร่ายเข้าสู่ปลายระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ (late exponential phase) สาหร่ายที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์เสริมระหว่างการเพาะเลี้ยงที่ระดับ 7.50 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไขมันสูงที่สุดคือ 35.50±1.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลอง (Figure 2E) โดยมีปริมาณไขมันสูงกว่าชุดควบคุม 1.76 เท่า และสูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยระดับคาร์บอนไดออกไซด์เดียวกันที่เวลา 6 วัน อยู่ที่ 1.8 เท่า ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น สามารถเพิ่มปริมาณไขมันในสาหร่าย *S. dimorphus* KMITL ได้ ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Ge et al. (2011) ซึ่งทำการทดลองในสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Botryococcus braunii* strain 765 โดยได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 2-20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ทุกระดับคาร์บอนไดออกไซด์สาหร่ายมีปริมาณไขมันไม่แตกต่างกัน

ปริมาณไขมันของสาหร่าย *S. dimorphus* KMITL ที่พบสูงสุดในการศึกษาครั้งนี้ มีค่าสูงกว่าสาหร่ายสกุลเดียวกันที่มีรายงานไว้ เช่น สาหร่าย *S. dimorphus* EPS-5 มีไขมัน 8 เปอร์เซ็นต์ (Ho et al., 2012), *S. dimorphus* SJTE-3 มีไขมัน 15-24 เปอร์เซ็นต์ (Tang et al., 2011), *S. dimorphus* CNW-N มีไขมัน 22 เปอร์เซ็นต์ (Ho et al., 2012), *Scenedemus* sp. LX1 มีไขมัน 31-33 เปอร์เซ็นต์ (Xin et al., 2010a) แต่ต่ำกว่าของ *Scenedemus* sp. LX1 ซึ่งมีไขมัน 53 เปอร์เซ็นต์ (Xin et al., 2010b)

จากการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และไนโตรเจน (N) ในสาหร่าย ที่เพาะเลี้ยงโดยได้รับระดับคาร์บอนไดออกไซด์แตกต่างกัน พบว่าสาหร่ายมีระดับคาร์บอนในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น แต่ที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5.00 และ 7.50 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณคาร์บอนในเซลล์ไม่แตกต่างกัน นั่นแสดงให้เห็นว่าระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5.00 เปอร์เซ็นต์ เพียงพอแล้วสำหรับสาหร่ายสายพันธุ์นี้ในการเจริญเติบโตในครั้งนี้ แต่หากนำไปเพาะเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการหรือในสภาวะที่ได้รับแสงมากกว่านี้ ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 7.50 เปอร์เซ็นต์ อาจกระตุ้นให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้มากกว่านี้

และสาหร่ายสามารถสะสมคาร์บอนในเซลล์ได้มากกว่านี้ เพราะแสงมีผลต่อปริมาณการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ของสาหร่าย โดยจากการทดลองนี้สาหร่ายที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 5.00 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณคาร์บอนในเซลล์สูงสุด 33.83±0.56 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03 และ 2.50 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) ส่วนปริมาณไฮโดรเจนและไนโตรเจน พบสูงสุดในสาหร่ายที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 5.00 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 5.87±0.08 และ 5.69±0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (CN ratio) ของสาหร่ายชนิดนี้มีค่าอยู่ในช่วง 4.77-6.70

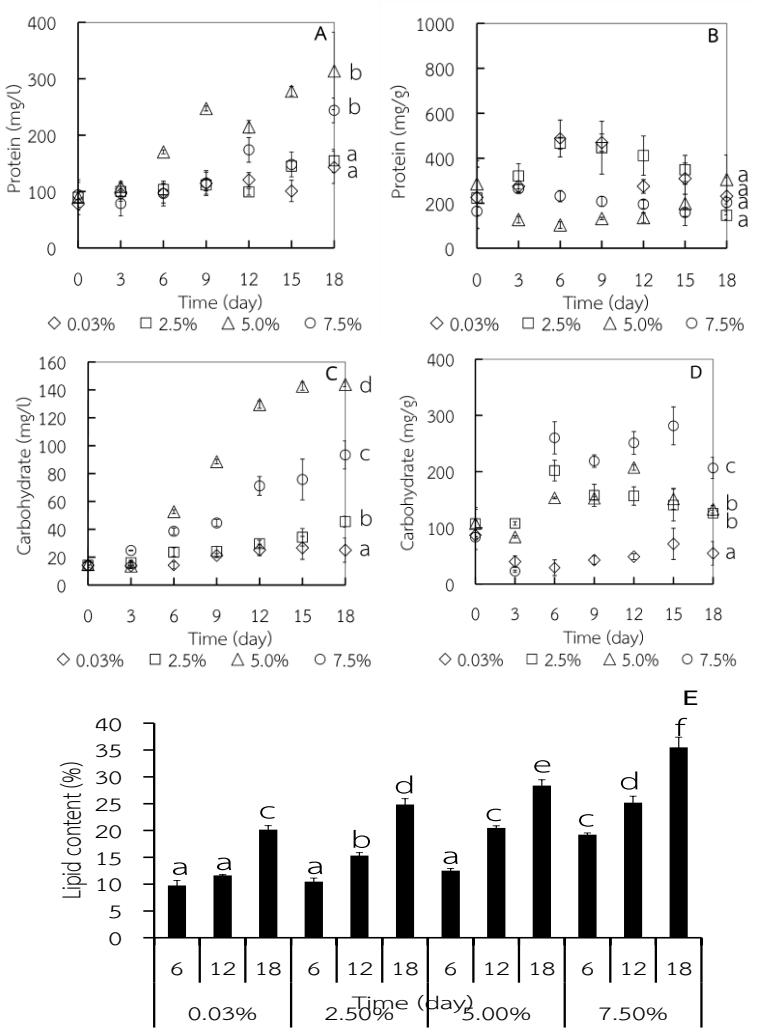

Figure 2 Protein (A-B), carbohydrate (C-D) and lipid content (E) of *S. dimorphus* KMITL cultivated under CO_2 at different concentrations (0.03-7.50%). Different small letters on the lines indicate significant difference at 95 % confidence level (P<0.05). Error bars represent±S.D. of four replicates.

Table 1 Carbon, hydrogen and nitrogen contents (% DW) of *S. dimorphus* KMITL cultivated under CO_2 at different concentrations (0.03-7.50%) for 18 days.

CO_2 (%)	C-content (%)	H-content (%)	N-content (%)	CN ratio
0.03	16.93±0.28[a]	4.37±0.04[a]	3.55±0.00[a]	4.77±0.00[a]
2.50	24.09±0.33[b]	5.23±0.06[b]	4.55±0.01[b]	5.29±0.02[b]
5.00	33.83±0.56[c]	5.87±0.08[b]	5.69±0.02[c]	5.95±0.02[c]
7.50	33.62±0.49[c]	5.31±0.08[b]	5.02±0.02[bd]	6.70±0.03[d]

Different small letters in each column indicates significant difference (P<0.05). Average±S.D., n=4.

สาหร่ายที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 5.00 เปอร์เซ็นต์ เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง มีความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้สูงที่สุด โดยความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 fixed) ของสาหร่ายสูงสุดเท่ากับ 1.24±0.03 กรัมต่อกรัม ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์รวม (total CO_2 fixed in biomass) ที่ถูกตรึงโดยสาหร่ายหนึ่งลิตร มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 1.43±0.03 กรัมต่อลิตร อัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 fixation rate) มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 0.14±0.00 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 50.95±3.98 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อปี (Table 2)

โดยมีรายงานการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์โดยสาหร่ายชนิดอื่นไว้เช่น สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* มีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้ 0.251 และ 0.624 กรัมต่อลิตรต่อวัน (Sydney et al., 2010) สาหร่ายสีเขียว *Botryococcus braunii* มีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้ 1 กรัมต่อลิตรต่อวัน (Marakumi and Ikenouchi, 1997) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina platensis* มีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้ 0.413 กรัมต่อลิตรต่อวัน (Morais and Costa, 2007) และสาหร่ายสีเขียว *Dunaliella tertiolecta* มีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้ 0.313 กรัมต่อลิตรต่อวัน (Kishimoto et al., 1994) ซึ่งจากการศึกษานี้สาหร่าย *S. dimorphus* KMITL มีอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำกว่าสาหร่ายชนิดอื่นที่มีรายงานไว้ ซึ่งค่านี้ขึ้นกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะหรืออัตราเร็วในการแบ่งตัว สาเหตุที่ในการศึกษานี้มีค่าต่ำอาจเป็นเพราะการทดลองนี้ทำการเพาะเลี้ยงโดยการควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมิสูงกว่านี้หรือหากนำมาเพาะเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการ สาหร่ายย่อมมีการแบ่งเซลล์ที่เร็วขึ้นและจะเพิ่มค่าอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้สูงขึ้น ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการต่อไป

Table 2 Carbon dioxide fixation of *S. dimorphus* KMITL cultivated under CO_2 at different concentrations (0.03-7.50%) for 18 days.

CO_2 (%)	Biomass (g/l)	CO_2 fixed/biomass (g/g)	Total CO_2 fixed in biomass (g/l)	biomass productivity (g/l/d)	CO_2 fixation rate (g/l/d)	CO_2 fixation rate (kg/m^3/y)
0.03	0.75±0.02^a	0.62±0.01^a	0.47±0.00^a	0.068±0.000^a	0.04±0.00^a	15.30±1.28^a
2.50	0.76±0.04^a	0.88±0.01^b	0.67±0.00^b	0.069±0.000^a	0.06±0.00^a	22.13±1.32^b
5.00	1.15±0.03^b	1.24±0.03^c	1.43±0.03^c	0.113±0.001^b	0.14±0.00^b	50.95±3.98^c
7.50	1.01±0.03^b	1.23±0.02^c	1.25±0.02^c	0.100±0.002^b	0.12±0.00^b	44.88±4.46^c

Different small letters in each column indicates significant difference (P<0.05). Average±S.D., n=4.

องค์ประกอบกรดไขมันของสาหร่ายสามารถเป็นดัชนีบ่งบอกถึงความเหมาะสมในการนำสาหร่ายไปใช้ประโยชน์ เช่น เป็นอาหารเสริมของมนุษย์ ของสัตว์ หรือนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อผลิตไบโอดีเซล ซึ่งผลจากการทดลองครั้งนี้พบว่าสาหร่ายที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์เกือบทุกระดับมีกรดไขมัน C16:0 หรือ palmitic acid เป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีค่าของทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 19.85-57.91 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาในชุดการทดลองที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03-2.50 เปอร์เซ็นต์ คือกรดไขมัน C18:0 หรือ stearic acid โดยมีค่าอยู่ในช่วง 11.33-20.53 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดการทดลองที่ได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 5.00-7.50 เปอร์เซ็นต์ คือกรดไขมัน C18:3n3 หรือ linolenic acid 9.45-22.44 เปอร์เซ็นต์ (Table 3)

กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) มีค่าอยู่ในช่วง 39.96-83.88 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าต่ำสุดและสูงสุดพบในสาหร่ายที่ได้รับ คาร์บอนไดออกไซด์ 7.50 และ 2.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีค่าอยู่ในช่วง 16.12-60.04 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid) อยู่ในช่วง 12.05-28.63 เปอร์เซ็นต์ และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid) 4.07-43.41เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาครั้งนี้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อได้รับคาร์บอนไดออกไซด์ 5.00 เปอร์เซ็นต์ การศึกษานี้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ใช้ไม่มีการปนเปื้อนของแก๊สอื่น แต่หากนำไปเพาะเลี้ยงโดยเสริมด้วย flue gas จากโรงไฟฟ้า ซึ่งมีองค์ประกอบแก๊สชนิดอื่นด้วยนอกจากคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น ไนตรัสออกไซด์ ซัลเฟอร์ออกไซด์ ซึ่งมีบทบาททั้งช่วยเสริมและยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ ขึ้นกับความเข้มข้นของแก๊สดังกล่าว ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาถึงการอยู่รอดการเจริญเติบโตและองค์ประกอบทางชีวเคมีอีกครั้งหนึ่ง เพราะผลที่ได้ย่อมส่งผลต่างจากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

Table 3 Fatty acid profiles of *S. dimorphus* KMITL under CO_2 at different concentrations (0.03-7.50%) on day 0th, 6th, 12th, and 18th.

FA (%)	CO_2 0.03%				CO_2 2.50%			CO_2 5.00%			CO_2 7.50%		
	0	6th	12th	18th	6th	12th	18th	6th	12th	18th	6th	12th	18th
C4:0	0.32	0.98	0.12	0.31	0.46	0.22	3.37	0.19	0.08	0.07	2.11	1.11	1.55
C6:0	0.02	0.23	0.09	0.10	0.43	0.05	2.60	0.01	0.08	0.03	3.70	1.05	0.52
C8:0	0.03	0.50	0.02	0.05	0.49	0.34	4.91	0.26	0.08	0.07	0.59	0.33	0.23
C10:0	0.89	0.39	0.01	0.18	0.39	0.02	4.12	0.22	0.16	0.10	0.09	0.17	0.11
C11:0	0.26	0.34	0.10	0.69	0.44	0.16	1.48	0.42	0.59	0.03	1.94	0.52	1.39
C12:0	2.53	1.24	0.35	1.14	0.97	0.69	2.88	0.80	9.07	4.71	2.20	1.77	2.95
C13:0	1.31	1.23	0.52	0.70	0.61	0.16	4.85	3.12	4.82	4.32	3.25	0.82	1.44
C14:0	5.48	6.02	6.18	6.75	7.30	5.16	7.24	2.62	0.95	1.36	1.66	2.21	0.63
C14:1	2.58	0.40	0.44	0.47	0.73	0.57	0.97	0.32	0.27	0.37	0.14	0.18	0.64
C15:0	0.95	0.97	0.42	0.53	1.13	0.94	2.85	0.95	0.83	0.83	0.95	0.74	0.45
C15:1	0.26	0.31	1.33	0.50	0.39	0.58	0.15	0.19	0.10	0.10	1.01	1.87	0.73
C16:0	31.10	30.46	32.49	28.14	27.00	26.86	36.38	57.91	26.56	35.76	19.85	24.98	22.05
C16:1	4.72	1.51	1.18	2.06	1.89	1.76	0.00	4.15	4.57	7.00	2.20	5.37	3.97
C17:0	1.55	2.68	0.13	1.49	3.17	3.22	0.03	1.13	2.72	2.94	1.99	3.11	2.53
C17:1	0.27	0.02	0.06	0.11	0.06	0.16	0.36	0.19	0.48	0.60	0.24	2.24	0.03
C18:0	11.66	20.53	11.33	13.15	17.06	19.93	12.71	2.63	2.93	4.02	0.62	0.54	5.84
C18:1n9t	2.05	4.94	1.15	4.71	5.92	6.26	0.42	1.81	0.01	0.21	5.47	5.60	4.75
C18:1n9c	8.82	14.17	0.32	10.94	15.98	11.44	9.37	3.88	9.38	10.81	3.24	3.76	2.53
C18:2n6t	0.41	0.23	0.11	0.34	0.39	0.27	0.03	0.39	0.01	0.08	0.17	2.47	0.76
C18:2n6c	6.92	3.38	1.01	2.49	2.26	2.22	0.02	2.23	11.13	10.51	8.75	4.79	8.09
C18:3n3	6.49	5.37	2.92	15.36	4.34	3.31	0.01	9.45	11.12	12.41	11.19	16.81	22.44
C18:3n6	0.59	0.36	0.21	0.33	0.07	0.12	0.01	0.28	0.57	0.46	0.60	2.38	0.45
C20:0	1.49	0.02	0.02	0.10	0.04	0.05	0.03	0.22	10.46	0.02	0.14	0.08	0.42
C20:1	0.27	0.02	0.02	0.58	0.01	0.02	0.03	0.81	0.90	1.03	0.84	0.71	0.15
C20:2	0.20	0.08	0.16	0.18	0.01	0.42	0.02	0.70	0.04	0.08	0.48	0.10	0.25
C20:3n3	0.05	0.08	0.00	1.55	0.17	1.32	0.48	0.27	0.04	0.18	1.38	0.55	2.93
C20:3n6	0.11	0.20	2.71	0.41	0.16	2.04	2.60	0.18	0.05	0.19	8.11	2.76	2.03
C20:4n6	0.10	0.70	5.54	1.60	1.29	2.13	0.79	0.36	0.09	0.24	1.56	0.70	2.55
C:20:5n3	0.11	0.01	3.59	0.05	0.02	1.00	0.05	0.05	0.03	0.04	4.34	1.70	0.03
C21:0	0.34	0.04	0.37	0.25	0.08	0.50	0.01	0.57	0.06	0.07	0.24	0.04	0.14
C22:0	0.86	0.20	2.21	0.49	0.25	0.72	0.05	0.93	0.43	0.46	1.72	0.14	0.45
C22:1n9	1.74	0.30	4.25	0.80	2.67	1.19	0.41	0.65	0.23	0.36	1.82	0.31	0.38
C22:2	0.67	0.06	2.37	1.33	0.14	0.00	0.05	0.39	0.30	0.03	2.38	6.73	3.07
C22:6n3	0.60	0.00	0.00	0.05	0.00	0.93	0.01	0.22	0.18	0.05	0.02	0.32	0.81
C23:0	0.88	0.54	1.51	0.89	1.16	1.17	0.35	0.23	0.33	0.10	0.75	0.47	1.16
C24:0	2.05	0.85	3.42	0.78	1.55	2.47	0.01	0.94	0.30	0.35	2.50	1.86	0.62
C24:1	1.31	0.63	13.34	0.42	0.99	1.59	0.35	0.34	0.05	0.06	1.75	0.70	0.92
SFA	61.72	67.22	59.29	55.73	62.52	62.67	83.88	73.15	60.45	55.22	44.32	39.96	42.47
UFA	38.28	32.78	40.71	44.27	37.48	37.33	16.12	26.85	39.55	44.78	55.68	60.04	57.53
MUFA	22.02	22.30	22.09	20.59	28.63	23.58	12.05	12.33	15.98	20.53	16.71	20.74	14.11
PUFA	16.25	10.48	18.61	23.68	8.85	13.75	4.07	14.52	23.56	24.25	38.97	39.31	43.41

FA: Fatty acid, SFA: Saturated fatty acid, UFA: Unsaturated fatty acid, MUFA: Monounsaturated fatty acid, PUFA: Polyunsaturated fatty acid.

สรุปผลการศึกษา

การเสริมคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหาร 5.00 เปอร์เซ็นต์ คือระดับที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มผลผลิตของสาหร่าย *S. dimorphus* KMITL โดยทำให้สาหร่ายมีชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 1.15±0.03 กรัมต่อลิตร และมีความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้สูงที่สุดเท่ากับ 1.43±0.03 กรัมต่อลิตร มีอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ 50.95±3.98 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อปี แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายนี้มีความเหมาะสมในการใช้เป็นตัวตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (A118-0260-013)

เอกสารอ้างอิง

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์. 2558. การดูดซับสีย้อมแอซิด เบเนวอล เรด โดยใช้สาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก *Scenedesmus dimorphus* ที่มีชีวิตแบบตรึงเซลล์. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า* 33: 82-92.

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์ และจันทรา ดีมาก. 2561. ผลของอัตราส่วนไนโตรเจนต่อเหล็ก ต่อการเจริญและการผลิตไขมันของสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus dimorphus*. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า* 36: 77-86.

Aburail, N., Sumida, D., and Abe, K. 2015. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae). *Algal Research* 8: 30-36.

Becker, E. W. 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Great Britain: Cambridge University Press.

Bligh, E. G., and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.

Borowitzka, M. A. 2010. Carotenoid production using microorganisms, pp. 225-240. In *Single cell oils. Microbial and Algal Oils,* Z. Cohen, and C. Ratledge, eds. Urbana: AOCS Press.

Borowitzka, M. A. 2013. High-value products from microalgae-their development and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 25: 743-756.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

Dufosse, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N., and Pavishankar, G. A. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or and industrial reality?. *Trends in Food Science and Technology* 16: 389-406.

Farias Silva, C. E., and Bertucco, A. 2016. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. *Process Biochemistry* 51: 1833-1842.

Ge, Y., Liu, J., and Tian, G. 2011. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO_2 concentration in photobioreactor. *Bioresource Technology* 102: 130-134.

Ho, S. H., Chen, C. Y., and Chang, J. S. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO_2 fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology* 113: 244-252.

Jacob-Lopes, E., Scoparo, C. H. G., Lacerda, L. M. C. F., and Franco, T. T. 2009. Effect of light cycles (night/day) on CO_2 fixation and biomass production by micro-algae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing* 48: 306-310.

Kishimoto, M., Okakura, T., Nagashima, H., Minowa, T., Yokoyama, S., and Yamabe, K. 1994. CO_2 fixation and oil production using micro-algae. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 78: 479-482.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement which the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

Morais, M. G., and Costa, J. A. V. 2007. Carbon dioxide fiation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris, Scenedesmus obliquus and Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnology Letters* 29: 1349-1352.

Murakami, M., and Ikenouchi, M. 1997. The biological CO_2 fixation and utilization project by RITE-Screening and breeding of microalgae with high capability in fixing CO_2. *Energy Conversion Management* 38: S493-S497.

National Oceanic and Atmospheric Administration. 2018. Trends in atmospheric carbon dioxide. Source: https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/global.html#global (15 May 2019).

Ostgaard, K., Indergaard, M., Markussen, S., Knutsen, S. H., and Jensen, A. 1993. Carbohydrate degradation and methane production during fermentation of *Laminaria saccharina* (Laminariales, Phaeophyceae). *Journal of Applied Phycology* 5: 333-342.

Pooja, K., and Himabindu, V. 2012. CO_2 removal from industrial flue gas using *Botrycoccus branii* for simultaneous lipid production. *International Journal of Science and Research* 3: 366-373.

Qin, S., Liu, G. X., and Hu, Z. Y. 2008. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Process Biochemistry* 43: 795-802.

Ruangsomboon, S., Ganmanee, M., and Choochote, S. 2013. Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, *Scenedesmus dimorphus* KMITL. *Journal of Applied Phycology* 25: 867-874.

Ruangsomboon, S., Choochote, S., Thaweekijakarn, P., and Aue-umneoy, D. 2012. Nitrogen and Phosphorus removal from wastewater by green microalga, *Scenedesmus dimorphus*. In *Proceeding of the 2nd Asia-Oceania algae innovation summit: algae for sustainable development*. 3-5 September 2012. Bangkok. Thailand.

Sydney, E. B., Sturm, W., Carvalho, J. C., Thomax-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A., and Soccol, C. R. 2010. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource technology* 101: 5892-5896.

Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., and Zhong, J. 2011. CO_2 biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO_2 levels. *Bioresource Technology* 102: 3071–3076.

Toledo-Cervantes, A., Morales, M., Novelo, E., and Revah, S. 2013. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresource Technology* 130: 652-658.

Vonshak, A., and Maske, H. 1982. Algae: growth techniques and biomass production. In *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*, J. Coombs, and D.O. Hall, eds. pp. 66-77. Oxford: Pergamon Press.

Xin, L., Hong-Ying, H., and Jia, Y. 2010a. Lipid accumulation and nutrients removal properties in secondary effluent of a newly-isolated freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1. *New Biotechnology* 27: 59-63.

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., and Ying-Xue, S. 2010b. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101: 5494-5500.

Yoshimura, T., Okada, S., and Honda, M. 2013. Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: optimal CO_2, salinity, temperature, and irradiance conditions. *Bioresource Technology* 133: 232-239.

วันรับบทความ (Received date) : 12 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 2 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

อิทธิพลร่วมกันของวิตามินไบโอตินและโคบาลามีนต่อชีวมวล อาหารสะสม (โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไฮโดรคาร์บอน) และ คุณสมบัติไบโอดีเซลของสาหร่าย *Botryococcus braunii* KMITL 2

Interaction of Biotin and Cobalamin on Biomass, Storage Products (Protein, Carbohydrate, Hydrocarbon Content) and Biodiesel Properties of *Botryococcus braunii* KMITL 2

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์[1*] จันทรา ดีมาก[1] และบุปผา จงพัฒน์[1]
Suneerat Ruangsomboon[1*], Jantra Dimak[1] and Buppha Jongput[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาสัดส่วนของวิตามิน biotin (B) ต่อ cobalamin (C) ที่เหมาะสม และอิทธิพลร่วมกันของวิตามินทั้งสองชนิดต่อผลผลิตชีวมวล และอาหารสะสม (โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไฮโดรคาร์บอน) ของสาหร่าย *Botryococcus braunii* KMITL 2 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรคลอเรลล่าปลอดเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการ โดยผันแปร biotin ที่ 4 ระดับ 0, 1, 2 และ 3 µg/l (B0, B1, B2, B3) ร่วมกับ cobalamin 4 ระดับ 0, 2, 4 และ 6 µg/l (C0, C2, C4, C6) (แฟกทอเรียล 4x4) โดยมีชุดควบคุมคือชุดที่ไม่มีการเสริมวิตามิน ผลการศึกษาพบว่าสาหร่ายมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ชีวมวล โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไฮโดรคาร์บอนสูงที่สุด เท่ากับ 0.39±0.10 /d, 1.89±0.23 g/l, 23.29±1.15, 31.48±1.68 และ 62.17±1.31% ในชุดการทดลอง B1C0, B1C6, B3C6, B1C4 และ B3C0 ตามลำดับ โดยพบว่า biotin และ cobalamin มีอิทธิพลร่วมกันต่อ ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไฮโดรคาร์บอน ของสาหร่าย น้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากสาหร่ายจากเกือบทุกชุดการทดลองมีค่าซีเทนผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด โดยอยู่ในช่วง 45.75-60.37 น้ำมันไบโอดีเซลที่มีคุณภาพดีที่สุดคือจากสาหร่ายในชุดการทดลอง B0C2 โดยมีค่า iodine value (IV) และ degree of unsaturation (DU) ต่ำที่สุด เท่ากับ 30.09 g I_2/100 g และ 32.78°C และค่า cetane สูงที่สุดคือ 60.37 จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามิน biotin ต่อ cobalamin ระดับที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงสาหร่าย เป็นอีกทางเลือกที่ดีในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย และเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์นี้เพื่อเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล

คำสำคัญ: *Botryococcus braunii* KMITL 2 ไฮโดรคาร์บอน ไบโอติน โคบาลามีน ไบโอดีเซล

Abstract

The optimal ratio of biotin (B) and cobalamin (C) and the interaction of both vitamins on the biomass and stored feed product content (protein, carbohydrate, hydrocarbon) of *Botryococcus braunii* KMITL 2 in laboratory were investigated. The vitamins were supplied to the alga in axenic Chlorella medium in a factorial 4x4 experimental setup of combinations at the following concentrations of biotin: 0, 1, 2 and 3 µg/l (B0, B1, B2, B3) and cobalamin: 0, 2, 4 and 6 µg/l (C0, C2, C4, C6). The control group was not supplemented with any vitamins. Among the various vitamin ratios tested, B1C6 produced the highest biomass (1.89±0.23 g/l). The highest specific growth rate (0.39±0.10 /d), protein content (23.29±1.15 %), carbohydrate content (31.48±1.68%), and hydrocarbon content (62.17±1.31%) were produced by use of the supplements B1C0, B3C6, B1C4, and B3C0, respectively. The resulted indicated that biotin and cobalamin had synergistic effects on the specific growth rate, and the protein, carbohydrate and hydrocarbon contents of the KMITL 2 strain. The cetane values (45.75-60.37) of the alga from most treatments was higher than the standard. The alga that was cultivated in B0C2 treatment showed better biodiesel properties, with the lowest iodine values (30.09 g I_2/100) and degrees of unsaturation (32.78°C), and the highest cetane numbers (60.37). The results show that combinations of the optimized levels of biotin and cobalamin are promising medium supplements for this strain. They are able to increase the alga's specific growth rate and can facilitate its use as a feedstock in biodiesel production.

Keywords: *Botryococcus braunii* KMITL 2, hydrocarbon, biotin, cobalamin, biodiesel

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520
*Corresponding author, Email: suneerat.ru@kmitl.ac.th

คำนำ

ปัญหาพลังงานจากแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) ที่มีปริมาณจำกัด มีราคาที่สูงขึ้น และที่สำคัญคือมีผลต่อการสะสมของแก๊สเรือนกระจก (greenhouse gases) มากขึ้น ทำให้เกิดปัญหาภาวะโลกร้อนและมีแนวโน้มทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ นักวิจัยจึงได้พยายามหาแหล่งพลังงานแหล่งใหม่เพื่อมาทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิล โดยต้องเป็นแหล่งพลังงานที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุดและสามารถผลิตได้รวดเร็ว ในช่วงแรกพืชบก เช่น สบู่ดำ ปาล์มน้ำมัน มันสำปะหลัง ฯลฯ ได้รับความนิยมมาก เพราะมีปริมาณน้ำมันมาก สกัดน้ำมันได้ง่าย แต่มีปัญหาตามมาคือพืชบางชนิดเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารสำหรับมนุษย์ เมื่อนำไปเป็นวัตถุดิบผลิตพลังงานจึงส่งผลกระทบทำให้วัตถุดิบอาหารมนุษย์ขาดแคลนและมีราคาสูงขึ้น นอกจากนี้พืชเหล่านี้ยังต้องการพื้นดินที่อุดมสมบูรณ์จึงจะทำการเพาะปลูกได้ผลผลิตดีซึ่งทำให้เกิดปัญหาบุกรุกพื้นที่ป่าตามมา แนวทางแก้ไขในปัจจุบัน นักวิจัยได้เน้นวิจัยในแหล่งพลังงานแหล่งใหม่ที่ไม่ใช่วัตถุดิบอาหารมนุษย์ นั่นคือสาหร่ายโดยเฉพาะสาหร่ายขนาดเล็กซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มผลผลิตจนสามารถเก็บเกี่ยวได้ภายในระยะเวลา 2-3 สัปดาห์ ไม่ต้องใช้พื้นดินที่อุดมสมบูรณ์และการเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน ไม่จำเป็นต้องใช้น้ำที่สะอาดปลอดเชื้อ สามารถใช้น้ำทิ้งหรือแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์มาประยุกต์ใช้ในการผลิตสาหร่ายได้ จึงมีความเป็นไปได้ที่สามารถใช้สาหร่ายขนาดเล็กเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกในอนาคต (Chisti, 2007)

สาหร่ายขนาดเล็กหลายชนิดมีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพได้ โดยพบว่าสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิด *Botryococcus braunii* มีศักยภาพในการเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพได้ดี สาหร่ายชนิดนี้มีองค์ประกอบทางชีวเคมีหลัก ๆ คือคาร์โบไฮเดรต ไขมัน/ไฮโดรคาร์บอน และโปรตีน ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งไบโอเอทานอล ไบโอไฮโดรเจน ไบโอดีเซล และไบโอแก๊สได้ (Quinn et al., 2014; Farias Silva and Bertucco, 2016) โดยแหล่งพลังงานที่มีความต้องการใช้มากที่สุดคือไบโอดีเซล ซึ่ง *B. braunii* มีความเหมาะสมในการเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซลมากที่สุด เนื่องจากมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการนำไปผลิตไบโอดีเซลสูงที่สุด (Chisti, 2007) โดยพบว่าไบโอดีเซลที่ผลิตจากสาหร่ายชนิดนี้มีคุณสมบัติไบโอดีเซลที่ดี โดยเฉพาะค่า Iodine value และ cetane number ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดโดย European EN 14214 และ American ASTM D6751 (Ashokkumar et al., 2014; Nascimento et al., 2015) และนอกเหนือจากใช้สาหร่ายชนิดนี้เป็นแหล่งพลังงานแล้วยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ ปุ๋ยชีวภาพ ใช้ผลิตพอลิเมอร์ และใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้อีกด้วย (Dufosse et al., 2005; Cabanelas et al., 2013) ซึ่งแสดงให้ทราบได้ว่าสาหร่ายชนิดนี้สามารถใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบ โดยการนำไปใช้ประโยชน์ด้านใดดีที่สุดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายนั้น ๆ ว่ามีชนิดใดเด่นที่สุดในการเพาะเลี้ยงครั้งนั้น ๆ

ถึงแม้ *B. braunii* จะได้รับการยอมรับว่าเป็นวัตถุดิบที่ดีที่สุดในกลุ่มสาหร่ายขนาดเล็กในการผลิตไบโอดีเซล แต่ปัญหาที่พบคือสาหร่ายชนิดนี้มีอัตราการเจริญเติบโตช้าเมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่น ดังนั้นจึงได้มีความพยายามในการหาวิธีเพาะเลี้ยงที่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มผลผลิตให้สาหร่ายนี้ โดยเฉพาะหากสามารถกระตุ้นให้เจริญเติบโตเร็วขึ้น ผลผลิตสูงขึ้นได้ด้วยสารอาหารหรืออาหารเสริม ย่อมทำให้มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้จริงในการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายปริมาณมากนอกห้องปฏิบัติการมากกว่าการใช้ปัจจัยทางกายภาพ เช่น แสง อุณหภูมิ หรือพีเอช ในการกระตุ้น โดยนอกจากการเจริญเติบโตแล้วองค์ประกอบทางชีวเคมีของสาหร่ายขึ้นกับสารอาหาร ระยะเวลา และสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงด้วย (Dayananda et al., 2005; Ruangsomboon et al., 2017; 2018; Ruangsomboon, 2018)

สาหร่ายขนาดเล็กส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถผลิตวิตามินได้ด้วยตนเอง หรือผลิตได้แต่ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต โดยทั่วไปวิตามินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้แก่ วิตามิน B_1, B_7 และ B_{12} วิตามิน B_1 หรือ thiamine เป็นตัวกลางของกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์บอน ทำงานร่วมกับเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Croft et al., 2006) วิตามิน B_7 หรือ biotin หรือ vitamin H ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ carboxylase และ acetyl coenzyme A (CoA) carboxylase เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดไขมัน ซึ่งสาหร่ายทุกชนิดต้องการวิตามินนี้ในการช่วยสังเคราะห์กรดไขมันทางอ้อม ช่วยกระตุ้นให้สาหร่ายทุกชนิดเจริญเติบโตได้ดีขึ้น เซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น (Helliwell et al., 2011) วิตามิน B_{12} หรือ cobalamin ช่วยในการขนส่งไนโตรเจนที่ละลายในน้ำเข้าสู่เซลล์สาหร่าย เป็นโคแฟกเตอร์ของการสังเคราะห์กรดอะมิโน DNA และกรดไขมัน ช่วยในการขนส่งคาร์บอน cobalamin เป็น tetrapyrole ที่มี cobalt เป็นองค์ประกอบจึงช่วยในการเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่าย (Croft et al., 2006)

จากการศึกษาขั้นต้นของ *B. braunii* พบว่าสามารถสร้างวิตามิน B_1, B_7, B_{12} ได้ แต่ในปริมาณน้อย เมื่อเสริมวิตามินเหล่านี้ลงในอาหารพบว่าสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตชีวมวลได้ (Ruangsomboon et al., 2018) และเมื่อพิจารณาแล้วพบว่าหากต้องการใช้สาหร่ายชนิดนี้เป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล biotin และ cobalamin ส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มของไขมัน ไฮโดรคาร์บอน

และผลผลิตชีวมวลได้ (Tanabe et al., 2014; Ruangsomboon et al., 2018) จึงควรมีการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของวิตามินทั้งสองชนิดนี้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* โดยนอกจากนี้ต้องคำนึงถึงคุณสมบัติไบโอดีเซลของน้ำมันที่ผลิตได้จากสาหร่ายด้วย (Knothe, 2008) เพื่อพิจารณาความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงไบโอดีเซลต่อไป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบระดับที่เหมาะสมและอิทธิพลร่วมกันของวิตามิน biotin และ cobalamin ต่ออัตราการเจริญเติบโต ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไฮโดรคาร์บอน และคุณสมบัติไบโอดีเซล ของสาหร่าย *B. braunii* KMITL2 เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตสาหร่ายเพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตพลังงานชีวภาพต่อไป

วิธีการศึกษา

แยกสาหร่าย *B. braunii* สายพันธุ์ KMITL 2 จากอ่างเก็บน้ำคลองโบด ตำบลเขาพระ จังหวัดนครนายก ด้วยวิธี microcapillary pipetted ล้างเซลล์ด้วยอาหารสะอาดฆ่าเชื้ออย่างน้อย 12 รอบ และเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร *Chlorella* medium ที่ปลอดเชื้อ (Vonshak and Maske, 1982) ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหาร lysogeny broth (LB), yeast-dextrose agar และ proteose peptone agar เมื่อพบว่าไม่มีการปนเปื้อนจึงทำการยืนยันชนิดสาหร่ายด้วยลักษณะทางกายภาพ (Philipose, 1967) และ 18S rDNA ซึ่งยืนยันว่าเป็น *B. braunii* จากนั้นขยาย *B. braunii* KMITL2 GenBank accession no. KX470608 ในห้องปฏิบัติการสำหรับเป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป โดยเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 25±1°C ให้แสงต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง ความเข้มแสง 60 μmol photons/m^2/s ให้อากาศต่อเนื่องผ่านตัวกรองแบคทีเรีย เพาะเลี้ยงหัวเชื้อเป็นเวลา 14 วัน จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองการใช้วิตามินของสาหร่ายต้องทำในอาหารและสภาวะปลอดเชื้อ เพราะส่งผลต่อปริมาณวิตามินที่มีในอาหาร โดยก่อนการนำหัวเชื้อไปทดลองผลของวิตามินต้องทำการทดสอบ และกำจัดแบคทีเรียปนเปื้อนโดยการเลี้ยงในอาหารที่ผสม penicillin, kanamycin และ neomycin ที่ 1, 25 และ 20 mg/ml ตามลำดับ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (Helliwell et al., 2011) นำสาหร่ายมาทดสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ถ้าปลอดเชื้อแล้วจึงนำไปทดลองเรื่องความต้องการใช้วิตามินต่อไป โดยเพาะเลี้ยง *B. braunii* ในอาหาร *Chlorella* medium ผันแปรความเข้มข้นของวิตามิน ด้วยชุดการทดลองแฟกทอเรียล 4×4 โดยมี biotin (B) 4 ระดับ คือ 0, 1, 2 และ 3 μg/l และวิตามิน cobalamin (C) 4 ระดับ คือ 0, 2, 4 และ 6 μg/l ทุกชุดการทดลองทำการศึกษา 4 ซ้ำ เพาะเลี้ยงสาหร่ายในฟลาสก์แก้วขนาด 1 ลิตร เป็นระยะเวลา 24 วัน ในสภาวะปลอดเชื้อ ควบคุมแสง อากาศ และอุณหภูมิ เช่นเดียวกับการเตรียมหัวเชื้อ

วิเคราะห์ชีวมวลตามวิธีของ Becker (1994) ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry et al. (1951) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธีของ DuBois et al. (1956) สกัดไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีดัดแปลงจาก Bligh and Dyer (1959) โดยใช้เฮกเซน และนำสารที่สกัดได้กรองผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ silica gel (Silica gel 60, 230-400 mesh, Merck) เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ก่อนถึงส่วนแคโรทีนซึ่งเป็นสีเหลือง และนำไปประเหยแห้ง ชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณปริมาณไฮโดรคาร์บอน ทำการเปลี่ยนไฮโดรคาร์บอนเป็นไบโอดีเซลตามวิธีของ 965.49 AOAC official method (AOAC, 2005) และศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซล โดยวิเคราะห์ Fatty Acid Methyl Esters (FAME) ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (Agilent Technologies 6890 N, USA) พร้อมเครื่องตรวจวัดชนิด flame ionization detector (FID)

คำนวณและรายงานข้อมูลทุกค่าเป็นร้อยละต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่าย คำนวณค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ) ตามสูตรของ Garcia et al. (2005) ประเมินค่าคุณสมบัติไบโอดีเซลได้แก่ saponification value (SV), iodine value (IV), cetane number (CN), degree of unsaturation (DU), long-chain saturated factor (LCSF) และ cold filter plugging point (CFPP) ตามวิธีของ Francisco et al. (2010) และ Wu and Miao (2014) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างคู่ด้วยวิธี Tukey-Kramer HSD test และวิเคราะห์อิทธิพลร่วมกัน (interaction) ของวิตามินต่อค่าต่าง ๆ ของสาหร่ายที่ทำการศึกษา ด้วย Anova: Two factor with replication ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลของวิตามินต่อชีวมวล อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ของสาหร่าย

พบว่า biotin กับ cobalamin ไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อชีวมวลของสาหร่าย *B. braunii* (P=0.394) โดยสาหร่ายทุกชุดการทดลองมีชีวมวลเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น พบว่าที่สิ้นสุดการทดลองชุดการทดลองที่ได้รับ biotin สูงสุดคือ 3 μg/l (Figure 1D) สาหร่ายมีวัฏจักรชีวิตสั้นกว่าชุดการทดลองอื่น (Figure 1 A-C) โดยเข้าสู่วัฏจักรระยะการตาย (death phase) เร็วกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าชุดการทดลองที่ได้รับ biotin สูงสุด มีชีวมวลต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น และชุดทดลองที่มีชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 1.89±0.23 g/l (Table 1) คือชุดที่ได้รับ biotin 1 μg/l ร่วมกับ cobalamin 6 μg/l (B1C6)

โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดที่ไม่ได้รับวิตามิน โดยมีค่าสูงกว่าถึง 1.31 เท่า และได้ผลผลิตเท่ากับการเพาะเลี้ยงด้วยบ่อ raceway (Ashokkumar and Rengasamy, 2012) จากการที่สาหร่ายที่ได้รับ biotin สูงสุด กลับมีชีวมวลต่ำที่สุด เมื่อพิจารณาจาก biotin ซึ่งมีหน้าที่ช่วยในการสร้างกรดไขมัน (Helliwell et al., 2011) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าเมื่อมี biotin มากเกินไป จึงทำให้สาหร่ายเน้นการสะสมไขมันมากกว่าเน้นการนำพลังงานไปใช้ในการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์หรือเจริญเติบโต จึงได้ผลผลิตชีวมวลที่ต่ำลง

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ) ของสาหร่ายที่ได้รับ biotin 1 μg/l และไม่ได้รับ cobalamin (B1C0) มีค่าสูงที่สุด คือ 0.39±0.10 ต่อวัน (Table 1) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ ยกเว้นชุดทดลอง B0C0, B0C6, B2C0, B2C2, B2C4 และ B2C6 ซึ่งพบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่มีความสอดคล้องกับผลผลิตชีวมวล แสดงให้เห็นว่าวิตามินมีการกระตุ้นให้สาหร่ายแบ่งเซลล์ได้เร็วในช่วงสั้น ๆ ในระยะการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว (exponential phase) แต่วิตามินที่ทำหน้าที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ ไม่ส่งผลอย่างเด่นชัดต่อการเพิ่มชีวมวลที่สิ้นสุดการทดลอง โดยอาจเป็นการกระตุ้นให้แบ่งอย่างรวดเร็วในช่วงสั้น ๆ แล้วหยุดการกระตุ้น สาหร่ายจึงแบ่งเซลล์เร็วแต่มีผลผลิตชีวมวลที่ไม่สูง ซึ่งอาจเป็นเพราะวิตามินและสารอาหารของสาหร่ายในอาหารหมด จึงไม่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ต่อได้ และพบว่า biotin กับ cobalamin มีอิทธิพลร่วมกันของต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่าย (P=0.030)

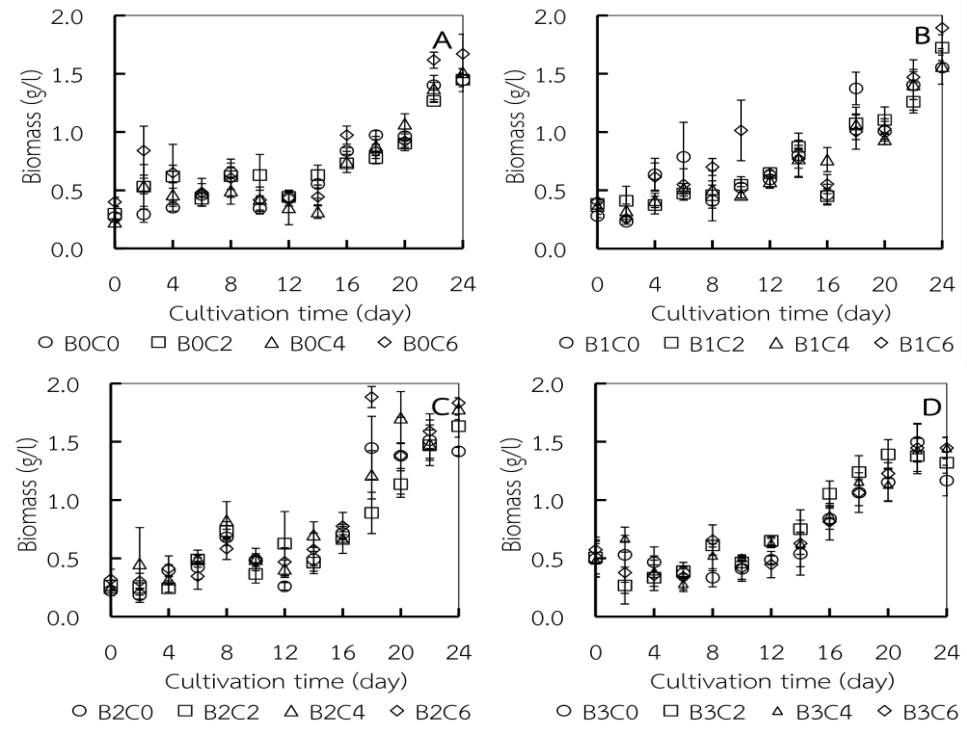

Figure 1 Biomass (g/l) of *Botryococcus braunii* KMITL 2 cultivated in media supplemented with different biotin (B 0-3 μg/l) and cobalamin (C 0-6 μg/l) concentrations. Values are means±SE (n=4).

ปริมาณโปรตีนที่พบในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในเกือบทุกชุดการทดลอง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงและลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง (Figure 2B-D) ยกเว้นชุดการทดลองที่ได้รับเฉพาะ cobalamin แต่ไม่ได้รับ biotin (Figure 2A) ซึ่งมีปริมาณโปรตีนลดลงตลอดการทดลอง โดยพบว่าที่สิ้นสุดการทดลอง ปริมาณโปรตีนในชุดที่ได้รับ biotin 3 μg/l ร่วมกับ cobalamin 6 μg/l (B3C6) มีค่าสูงที่สุด คือ 23.29±1.15% โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ ยกเว้นชุด B0C6, B1C4, B1C6, B2C2, B2C4 และ B2C6 และพบว่า biotin กับ cobalamin มีอิทธิพลร่วมกันของต่อปริมาณโปรตีนของสาหร่าย (P=0.000) พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์นี้มีปริมาณโปรตีนที่สิ้นสุดการทดลองซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 วัน อยู่ในช่วง 15.91-23.29% ซึ่งต่ำกว่าปริมาณโปรตีนของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงเพียง 2 วัน ซึ่งมีโปรตีนอยู่ในช่วง 19.18-42.89% หากพิจารณาการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ แม้การเพาะเลี้ยงช่วงต้นมีโปรตีนสูงสุด แต่มีชีวมวลต่ำกว่าที่สิ้นสุดการทดลองมาก ดังนั้นการนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจนสิ้นสุดการทดลองไปใช้ประโยชน์ย่อมได้ผลผลิตโปรตีนสูงกว่า (protein yield) โดยพบว่าปริมาณโปรตีนมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ cobalamin เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะ cobalamin มีหน้าที่ช่วยในการสร้างกรดอะมิโนนั่นเอง (Croft et al., 2006)

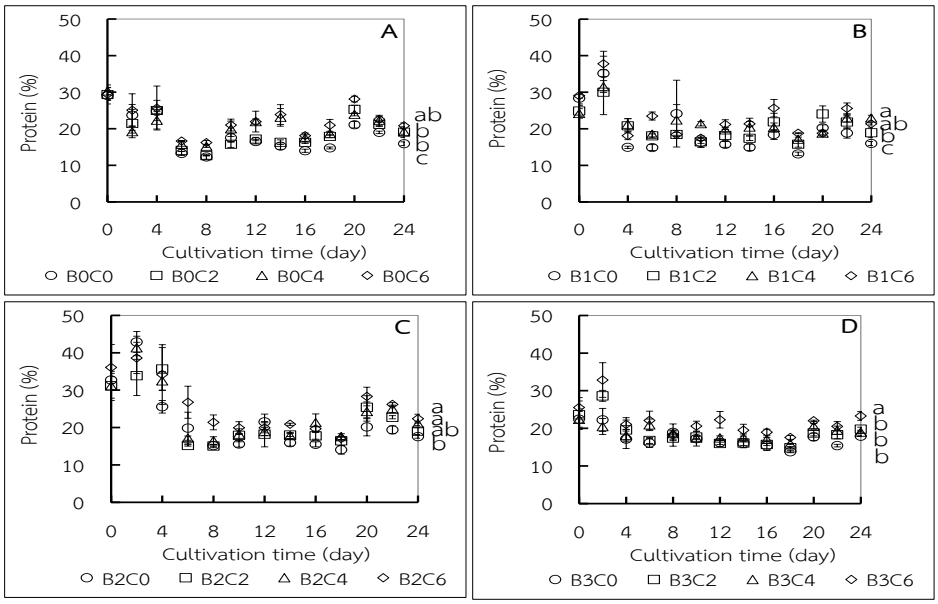

Figure 2 Protein (%) of *Botryococcus braunii* KMITL 2 cultivated in media supplemented with different biotin (B 0-3 μg/l) and cobalamin (C 0-6 μg/l) concentrations. Different small letters on the lines indicate significant difference at 95 % confidence level (compare fig 2. A-D). Values are means±SE (n=4).

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายมีแนวโน้มลดลงในช่วง 4 วัน แรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นจนถึงประมาณวันที่ 12-16 ของการเพาะเลี้ยง และลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง (Figure 3A-D) ที่สิ้นสุดการทดลองปริมาณคาร์โบไฮเดรตในชุดที่ได้รับ biotin 1 μg/l ร่วมกับ cobalamin 4 μg/l (B1C4) มีค่าสูงที่สุด คือ 31.48±1.68% โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลอง B3C4 โดยพบว่า biotin กับ cobalamin มีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่าย (P=0.008) หากพิจารณาจากปริมาณคาร์โบไฮเดรต พบว่าสามารถนำสาหร่ายชนิดนี้ไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลได้เช่นกัน โดยในช่วงการเพาะเลี้ยงที่พบว่าคาร์โบไฮเดรตมีปริมาณสูงคือการเพาะเลี้ยงประมาณ 12-16 วัน แต่เมื่อพิจารณาผลผลิตคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate yield) ซึ่งต้องพิจารณาร่วมกับชีวมวล พบได้ว่าที่สิ้นสุดการทดลองให้ผลผลิตคาร์โบไฮเดรตสูงกว่า

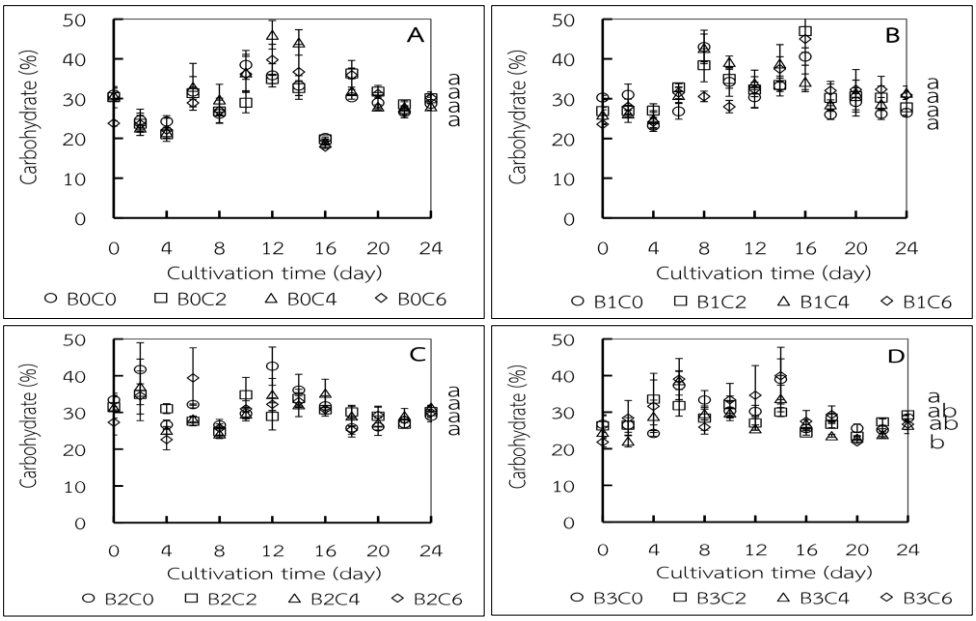

Figure 3 Carbohydrate (%) of *Botryococcus braunii* KMITL 2 cultivated in media supplemented with different biotin (B 0-3 μg/l) and cobalamin (C 0-6 μg/l) concentrations. Different small letters on the lines indicate significant difference at 95 % confidence level (compare fig 3. A-D). Values are means±SE (n=4).

ผลของวิตามินต่อปริมาณไฮโดรคาร์บอน ผลผลิตไฮโดรคาร์บอน และกำลังผลิตไฮโดรคาร์บอน ของสาหร่าย

ที่สิ้นสุดการทดลองสาหร่ายที่ได้รับ biotin 3 μg/l ไม่ได้รับ cobalamin (B3C0) มีปริมาณไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon content) สูงที่สุด คือ 62.17±1.31% ส่วนชุดการทดลองที่มีค่าผลผลิตไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon yield) และกำลังผลิตไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon productivity) สูงที่สุดคือชุดที่ได้รับ biotin 2 μg/l ร่วมกับ cobalamin 6 μg/l (B2C6) และชุดที่ได้รับ biotin 2 μg/l ร่วมกับ cobalamin 2 μg/l (B2C2) โดยมีค่าเท่ากับ 0.90±0.06 g/l และ 160.20±19.42 mg/l/d ตามลำดับ (Table 1) โดยพบว่า biotin กับ cobalamin มีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย (P=0.030) แต่ไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อผลผลิตไฮโดรคาร์บอน (P=0.198) และกำลังผลิตไฮโดรคาร์บอน (P=0.241)

ทั้ง biotin และ cobalamin มีหน้าที่ช่วยในการสังเคราะห์กรดไขมัน โดย biotin จะมีหน้าที่ตรงมากกว่า cobalamin โดยช่วยในการทำงานของ acetyl coenzyme A (CoA) (Croft et al., 2006; Helliwell et al., 2011) และจากผลการทดลองนี้พบว่าสาหร่ายมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ biotin เพิ่มขึ้น และสูงที่สุดเมื่อได้รับ biotin สูงที่สุด โดยไม่ต้องมี cobalamin

Table 1 Biomass, specific growth rate (μ), hydrocarbon content, hydrocarbon yield and hydrocarbon productivity of *B. braunii* KMITL 2 cultivated under different biotin (B 0-3 μg/l) and cobalamin (C 0-6 μg/l) concentrations.

Treatments	Biomass (g/l)	μ (/day)	Hydrocarbon content (%)	Hydrocarbon yield (g/l)	Hydrocarbon productivity (mg/l/d)
B0C0	1.44±0.10^{abc}	0.21±0.01^{abcd}	37.18±1.04^{abc}	0.54±0.06^{ab}	77.22±9.35^{ab}
B0C2	1.45±0.06^{abc}	0.12±0.02^{a}	31.77±1.35^{a}	0.46±0.06^{a}	38.95±8.22^{a}
B0C4	1.51±0.04^{abcd}	0.13±0.02^{ab}	33.96±1.16^{ab}	0.51±0.05^{a}	46.27±11.52^{a}
B0C6	1.67±0.17^{bcd}	0.20±0.03^{abcd}	41.29±1.07^{abc}	0.69±0.09^{abc}	81.56±7.93^{ab}
B1C0	1.55±0.14^{abcd}	0.39±0.10^{d}	36.15±1.53^{abc}	0.55±0.04^{ab}	148.38±51.87^{ab}
B1C2	1.72±0.11^{bcd}	0.12±0.02^{ab}	40.04±1.69^{a}	0.69±0.09^{a}	47.17±6.84^{a}
B1C4	1.56±0.15^{abcd}	0.17±0.02^{abc}	50.65±2.22^{ab}	0.77±0.06^{a}	85.49±14.30^{a}
B1C6	1.89±0.23^{d}	0.17±0.02^{abc}	39.38±0.79^{abc}	0.76±0.11^{abc}	69.43±13.20^{ab}
B2C0	1.42±0.03^{abc}	0.34±0.03^{cd}	44.14±0.52^{abc}	0.63±0.03^{abc}	150.89±16.40^{b}
B2C2	1.63±0.09^{bcd}	0.31±0.03^{bcd}	50.58±0.57^{cd}	0.82±0.03^{bc}	160.20±19.42^{b}
B2C4	1.78±0.04^{cd}	0.23±0.04^{abcd}	48.78±0.69^{bcd}	0.87±0.03^{c}	115.24±27.53^{ab}
B2C6	1.83±0.04^{cd}	0.22±0.07^{abcd}	48.97±0.67^{bcd}	0.90±0.06^{c}	112.92±39.72^{ab}
B3C0	1.17±0.13^{a}	0.19±0.02^{abc}	62.17±1.31^{d}	0.72±0.04^{abc}	116.45±16.36^{ab}
B3C2	1.32±0.09^{ab}	0.14±0.01^{ab}	49.34±0.74^{bcd}	0.65±0.07^{abc}	66.32±2.67^{a}
B3C4	1.45±0.09^{abc}	0.12±0.00^{a}	47.08±0.55^{abcd}	0.68±0.04^{abc}	55.94±2.39^{a}
B3C6	1.45±0.09^{abc}	0.19±0.03^{abc}	52.67±0.21^{cd}	0.76±0.03^{abc}	100.38±16.19^{ab}

Mean±SE (n=4) with the different superscript in column are significantly different (P<0.05).

มีรายงานว่าการเสริม cobalamin ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและปริมาณไขมันของสาหร่ายสายพันธุ์ *B. braunii* BOT-22 ซึ่งมีไขมัน 42% (Tanabe et al., 2014) ซึ่งต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า cobalamin ที่เพิ่มขึ้น มีแนวโน้มทำให้ผลผลิตชีวมวลเพิ่มขึ้น และยังมีอิทธิพลต่อไฮโดรคาร์บอนของ *B. braunii* KMITL 2 ด้วย และผลจากการศึกษานี้พบว่าสาหร่ายสายพันธุ์ KMITL 2 มีไฮโดรคาร์บอนสูงกว่าสายพันธุ์ BOT-22 ผลจากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในทุกชุดการทดลองของการเพาะเลี้ยง *B. braunii* KMITL 2 สาหร่ายมีปริมาณไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบมากที่สุด รองลงมาคือคาร์โบไฮเดรต และโปรตีน ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อพิจารณาในฐานะของการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ สาหร่ายนี้จึงมีความเหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลมากที่สุด รองลงมาคือไบโอเอทานอล และไบโอแก๊สเป็นลำดับสุดท้าย ดังนั้นการทดลองนี้จึงนำสาหร่ายนี้ไปเป็นวัตถุดิบผลิตไบโอดีเซลและศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้ต่อไป

ผลของวิตามินต่อกรดไขมันและคุณสมบัติทางไบโอดีเซลของน้ำมันที่ผลิตจากสาหร่าย

การศึกษาค่ากรดไขมันที่ประกอบในน้ำมันไบโอดีเซลของสาหร่าย พบว่าชนิดกรดไขมันที่พบสูงคือ C16:0 หรือ palmitic acid รองลงมาคือ C18:2n6c หรือ linoleic acid (Table 2) ซึ่งคล้ายกับองค์ประกอบไขมันของพืชชั้นสูงที่ใช้เป็นวัตถุดิบผลิตน้ำมันไบโอดีเซลเช่นกัน คือมี C16 และ C18 เป็นองค์ประกอบหลัก (Ramos et al., 2009) เมื่อพิจารณาปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว

และไม่อิ่มตัวพบว่าสอดคล้องกับ ค่า SV, DU และ LCSF (Table 3) นอกจากนี้ยังพบว่ามีปริมาณ C18:3n3 รวมกับ C18:3n6 ไม่เกิน 12% (ยกเว้น B3C6 มี 12.9%) และสาหร่ายในทุกชุดการทดลองมีกรดไขมันซึ่งมีพันธะคู่ ≥ 4 ไม่เกิน 1% ซึ่งผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานน้ำมันดีเซลของ European standard (EN 14214) (Bacha et al., 2007)

Table 2 Fatty acid profiles of *B. braunii* KMITL 2 cultivated in media supplemented with different biotin (B 0-3 µg/l) and cobalamin (C 0-6 µg/l) concentrations.

FA	B0C0	B0C2	B0C4	B0C6	B1C0	B1C2	B1C4	B1C6	B2C0	B2C2	B2C4	B2C6	B3C0	B3C2	B3C4	B3C6
C4:0	0.8	1.0	1.3	1.0	2.2	0.1	0.9	0.4	0.5	0.7	0.4	0.6	0.4	0.5	0.1	0.1
C6:0	1.8	1.8	1.0	1.8	1.7	0.3	0.9	0.9	2.0	1.8	1.5	1.2	3.0	1.1	0.9	0.3
C8:0	5.1	5.6	5.3	5.0	21.6	9.7	5.9	8.3	4.5	3.7	4.5	2.6	10.6	13.8	2.4	1.3
C10:0	13.2	16.9	14.0	13.0	4.5	3.9	4.1	4.3	0.0	1.0	0.0	0.6	3.4	15.7	1.7	1.0
C11:0	6.6	12.0	7.1	9.8	6.4	4.8	1.8	0.0	1.1	1.8	1.3	1.3	1.9	6.9	0.5	0.7
C12:0	8.9	12.1	4.3	10.0	6.9	4.5	8.1	8.1	7.4	7.6	7.0	4.2	8.9	6.3	3.5	5.5
C13:0	6.9	4.0	5.3	3.9	3.0	2.2	1.9	1.9	0.7	0.0	0.8	0.3	1.4	2.8	5.8	7.9
C14:0	2.2	1.9	0.8	1.1	1.6	1.6	1.6	1.8	0.8	1.6	1.3	1.2	0.9	0.3	0.5	1.0
C14:1	1.0	1.5	0.9	0.9	0.5	0.6	0.3	0.4	0.0	0.6	0.7	0.9	0.6	0.5	0.9	0.7
C15:0	1.2	1.5	0.7	1.6	0.2	0.8	0.7	0.7	0.0	0.3	0.2	0.2	0.9	0.4	1.3	1.2
C15:1	0.6	1.1	0.3	0.4	0.2	0.1	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0	0.1	0.4	0.1	0.5	0.2
C16:0	14.7	11.7	14.0	12.4	14.2	18.6	22.8	18.8	27.4	26.3	26.1	23.1	22.8	15.8	21.5	18.8
C16:1	2.3	2.0	2.2	2.3	3.0	3.0	0.1	2.2	1.7	1.8	2.4	4.1	3.5	1.9	3.8	3.7
C17:0	2.5	2.5	3.5	3.4	2.8	2.5	2.8	3.2	8.2	10.6	11.5	12.3	3.9	2.4	5.0	3.8
C17:1	2.8	3.2	4.8	4.5	3.8	5.9	5.4	5.9	0.0	0.0	0.4	0.5	3.0	4.2	6.0	7.0
C18:0	1.3	1.4	0.6	0.9	1.6	0.5	0.4	4.7	3.9	4.0	3.6	5.6	1.6	0.7	0.9	0.4
C18:1n9t	1.0	1.6	2.9	2.7	2.0	4.6	9.3	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.9	2.1	3.5
C18:1n9c	6.2	5.0	6.6	5.8	2.4	0.0	0.0	4.7	11.1	10.8	10.8	10.2	2.3	6.9	11.2	5.2
C18:2n6t	0.3	0.2	0.3	10.7	4.5	9.7	11.3	5.1	0.0	0.0	0.6	0.0	7.9	0.0	0.0	4.7
C18:2n6c	9.4	6.9	11.3	2.1	9.3	13.1	10.9	12.7	17.9	18.1	16.1	18.4	12.1	11.7	18.0	18.5
C18:3n3	4.2	0.1	0.1	0.0	0.5	7.7	6.6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.2	0.3	9.0
C18:3n6	1.7	1.4	2.2	6.3	1.8	2.9	2.4	2.8	3.4	2.4	3.0	3.3	2.0	1.6	3.5	4.0
C20:0	4.2	3.6	6.1	0.3	5.1	0.0	0.0	7.0	8.7	6.3	7.4	8.3	4.5	4.0	7.8	0.0
C20:1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.4	0.5	0.6	0.5	0.4	0.4	0.4	0.6	0.3	0.2	0.5	0.6
C20:2	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.2	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1	0.2	0.1
C20:3n3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
C20:3n6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0
C20:4n6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C:20:5n3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.1
C21:0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
C22:0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:1n9	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
C22:2	0.4	0.2	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	0.1	0.2	0.2	0.3	0.3
C22:6n3	0.0	0.1	0.6	0.1	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
C23:0	0.3	0.1	0.4	0.1	0.0	0.3	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0
C24:0	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1	0.4	0.2	0.5	0.2
C24:1	0.2	0.0	0.6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
SFA	69.7	76.2	66.2	64.3	71.7	50.4	29.8	60.7	65.3	65.8	65.6	61.7	65.1	71.1	52.6	42.3
UFA	30.3	23.8	33.8	35.7	28.3	49.6	70.2	39.3	34.7	34.2	34.4	38.3	34.9	28.9	47.4	57.7
MUFA	14.4	14.7	18.6	16.6	12.4	14.9	38.6	18.1	13.2	13.5	14.7	16.4	11.7	14.6	25.0	20.9
PUFA	16.0	9.0	15.2	19.1	16.0	34.7	31.6	21.2	21.5	20.6	19.7	21.8	23.3	14.3	22.3	36.8

FA = Fatty acid, SFA= Saturated fatty acid, UFA= Unsaturated fatty acid, MUFA= Monounsaturated fatty acid, PUFA= Polyunsaturated fatty acid.

Table 3 Biodiesel properties of *B. braunii* KMITL 2 cultivated in media supplemented with different biotin (B 0-3 μg/l) and cobalamin (C 0-6 μg/l) concentrations.

Treatments	SV (mg KOH/g)	IV (g I_2/100 g)	CN	DU (wt.%)	LCSF (wt.%)	CFPP (°C)
B0C0	240.21	45.50	57.42	46.31	6.32	3.37
B0C2	251.06	30.09	60.37	32.78	5.67	1.35
B0C4	235.32	43.47	58.41	49.00	11.08	18.33
B0C6	243.04	53.18	55.20	54.78	2.03	-10.10
B1C0	257.87	40.61	57.11	44.29	7.32	6.51
B1C2	225.07	82.08	49.62	84.37	2.48	-8.67
B1C4	223.60	97.88	45.75	101.75	0.63	-14.51
B1C6	222.39	55.19	56.77	60.41	11.57	19.88
B2C0	214.76	51.45	58.60	56.20	13.36	25.50
B2C2	216.09	49.55	58.92	54.81	11.32	19.08
B2C4	219.38	45.95	59.46	50.05	12.76	23.62
B2C6	209.06	55.21	58.33	60.12	13.60	26.26
B3C0	233.18	52.82	56.24	58.18	8.49	10.19
B3C2	249.37	39.64	58.08	43.19	6.41	3.67
B3C4	208.99	63.95	56.11	69.67	11.43	19.43
B3C6	208.91	93.47	48.59	94.41	2.52	-8.58

จากการนำไฮโดรคาร์บอนที่สกัดได้ไปผลิตเป็นไบโอดีเซล และศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันดังกล่าว พบว่าน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากสาหร่ายทุกชุดการทดลองมีค่าซีเทน (Cetane number, CN) อยู่ในช่วง 45.75-60.37 (Table 3) ค่า CN เป็นค่าที่ต้องพิจารณาเป็นอันดับแรกในการผลิตน้ำมัน โดยเป็นค่าที่แสดงคุณสมบัติการจุดติด การเผาไหม้ของน้ำมัน หากมีค่า CN สูง คือมีการจุดติดที่ดี คือจุดติดแล้วคงอยู่ได้ระยะเวลานาน จึงให้พลังงานได้นานกว่า มากกว่า เครื่องยนต์จึงทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเต็มที่มากกว่า โดยค่า CN ของน้ำมันไบโอดีเซลที่กำหนดไว้ตามมาตรฐานคือต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 47 หรือ 51 ตามมาตรฐานของ ASTM D6751 (2012) และ Fuel Standard (Biodiesel) Determination (2003) ตามลำดับ ซึ่งพบว่าน้ำมันของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงจากการศึกษานี้มีค่า CN อยู่ในช่วง 45.75-60.37 ซึ่งในเกือบทุกชุดการทดลองมีค่า CN สูงกว่ามาตรฐานทั้งสองเกณฑ์ ยกเว้นชุดทดลอง B1C2 และ B3C6 ที่ผ่านเพียงเกณฑ์ของ ASTM D6751 และ B1C4 ที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานทั้งสองเกณฑ์ ซึ่งหากต้องการนำสาหร่ายในชุดการทดลองเหล่านี้ไปผลิตไบโอดีเซล จำเป็นต้องมีขั้นตอนการลดชนิดกรดไขมันที่มีพันธะคู่ลงอีก เพื่อเพิ่มค่า CN ของน้ำมันให้สูงขึ้นให้ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ค่า CN ของ *B. braunii* สายพันธุ์อื่นที่เคยมีรายงานไว้ เช่น มีค่าเท่ากับ 52.67 (Nascimento et al., 2015) และ 55.4 (Ashokkumar et al., 2014) และสูงกว่า *Chlorella sosokiniana* and *C. vulgaris* ซึ่งมีค่าซีเทน 42.40 และ 40.24 (Sergeeva et al., 2017)

ค่า Saponification value (SV) เป็นค่าที่แสดงถึงน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (ความยาวของพันธะ) ของกรดไขมันทั้งหมดที่ประกอบอยู่ในน้ำมัน หากค่า SV สูงแสดงว่ามีกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีส่วนประกอบของ triglycerides อยู่มาก เหมาะสมในการทำเครื่องสำอาง สบู่ หรือแชมพู มากกว่าทำน้ำมันไบโอดีเซล เพราะเมื่อนำมาผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจะทำให้มีผลผลิตน้ำมันต่ำ ดังนั้นค่า SV ที่ต่ำจึงส่งผลดีต่อน้ำมันไบโอดีเซล ซึ่งปกติแล้วน้ำมันไบโอดีเซล B100 และ B10 มีค่า SV เท่ากับ 244 และ 218 mg KOH/g (US Department of Energy, 2004) น้ำมันของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในการทดลองนี้มีค่า SV อยู่ในช่วง 208.91-257.87 mg KOH/g

ค่า Iodine value (IV) เป็นค่าที่ระบุถึงปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งหมดในไบโอดีเซล ซึ่งหากมีค่า IV ที่สูง ย่อมทำให้น้ำมันไม่คงตัว ซึ่งเกณฑ์มาตรฐานที่ยุโรปกำหนดไว้คือค่า IV ต้องไม่เกิน 120 g I_2/100 g โดยค่า IV ของน้ำมันที่ผลิตได้จากทุกชุดการทดลองนี้มีค่าอยู่ในช่วง 30.09-97.88 g I_2/100 g ซึ่งผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด และใกล้เคียงกับค่า IV ของสาหร่ายหลายชนิดที่มีรายงานไว้ในงานวิจัยของ Francisco et al. (2010)

ค่า Degree of unsaturation (DU) เป็นค่าที่แสดงถึงความคงตัวของน้ำมันไบโอดีเซล หรือระยะเวลาที่สามารถเก็บน้ำมันไว้ได้ หากสาหร่ายมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวพันธะคู่มากจะทำให้มีค่า DU สูง โดยค่า DU ที่ต่ำ หมายถึงน้ำมันไบโอดีเซลนั้นมีค่าความคงตัวที่ดี เก็บรักษาได้นานกว่าค่า DU ที่สูง โดยค่า DU ของน้ำมันจากสาหร่ายของการทดลองนี้มีค่าอยู่ในช่วง 32.78-101.75% โดยชุดการทดลอง B0C2 คือชุดที่มีค่า DU ต่ำที่สุด โดยมีรายงานค่า DU ของสาหร่ายสีเขียว

ขนาดเล็กชนิดอื่นไว้ด้วยเช่นกัน เช่น DU ของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* และ *Chlorella pyrenoidosa* ซึ่งอยู่ในช่วง 76.53–132.08% (Wu and Miao, 2014)

อีกสองปัจจัยที่แสดงคุณภาพของน้ำมันไบโอดีเซลคือค่ากรดไขมันอิ่มตัวสายยาว long chain saturated factor (LCSF) และค่าการอุดตัน Cold filter plugging point (CFPP) ซึ่งทั้งสองค่าเป็นค่าที่แสดงความสามารถในการไหลหรือการฉีดของน้ำมันไบโอดีเซลในเครื่องยนต์ที่อุณหภูมิต่ำ ค่า LCSF และ CFPP ที่ต่ำ แสดงว่าน้ำมันมีการไหล สูบฉีดได้ดี หากมีค่า LCSF และ CFPP ที่สูง ย่อมหมายถึงน้ำมันไบโอดีเซลนั้นจะตกตะกอนและอุดตันไส้กรองของเครื่องยนต์ได้ง่ายที่อุณหภูมิต่ำ ย่อมทำให้น้ำมันมีคุณภาพต่ำไปด้วย (Mittelbach and Remschmidt, 2004) ซึ่งผลจากการทดลองนี้พบว่าน้ำมันของสาหร่ายจากชุดการทดลอง B1C4 มีค่า LCSF และ CFPP ที่ดีที่สุดคือ 0.63% และ -14.51°C และในหลายชุดการทดลองมีค่า CFPP สูงเกินกว่า 20°C ซึ่งหากจะมีการนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซลจริงจะไม่เหมาะสมกับประเทศในเขตเมืองหนาว ต้องมีการปรับปรุงคุณสมบัติก่อนนำไปใช้จริง โดยเมื่อพิจารณาเทียบกับสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็กชนิดอื่นพบมีรายงานไว้ว่าค่า LCSF ของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* และ *Chlorella pyrenoidosa* ซึ่งอยู่ในช่วง 3.01-5.73% (Wu and Miao, 2014)

สรุปผลการศึกษา

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *B. braunii* KMITL 2 โดยเสริมด้วยวิตามิน biotin (B) และ cobalamin (C) ที่เหมาะสมส่งผลให้มีผลผลิตชีวมวลสูงสุดคือ 1.89±0.23 g/l ในชุดการทดลอง B1C6 ส่วนชุดการทดลอง B3C0 ให้ปริมาณไฮโดรคาร์บอนสูงสุดคือ 62.17±1.31% และพบว่า biotin และ cobalamin มีอิทธิพลร่วมกันต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไฮโดรคาร์บอน ของสาหร่ายสายพันธุ์นี้ น้ำมันไบโอดีเซลที่มีคุณภาพดีที่สุดคือจากสาหร่ายในชุดการทดลอง B0C2 โดยมีค่า IV และ DU ต่ำที่สุด เท่ากับ 30.09 g I_2/100 g และ 32.78°C และค่า cetane สูงที่สุดคือ 60.37 แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามิน biotin และ cobalamin เป็นอีกทางเลือกที่ดีในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์นี้เพื่อเป็นแหล่งผลิตไบโอดีเซล

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับได้รับทุนสนับสนุนจากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2561-01-04-004)

เอกสารอ้างอิง

AOAC Official Method 965.49. 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th ed. Gaithersburg: AOAC International, Gaithersburg.

Ashokkumar, V., and Rengasamy, R. 2012. Mass culture of *Botryococcus braunii* Kutz. under open raceway pond for biofuel production. *Bioresource Technology* 104: 394-399.

Ashokkumar, V., Agila, E., Sivakumar, P., Salam, Z., Rengasamy R., and Ani, F. N. 2014. Optimization and characterization of biodiesel production from microalgae *Botryococcus* grown at semi-continuous system. *Energy Conversion and Management* 88: 936-946.

ASTM D6751. 2012. Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Middle Distillate Fuels. https://www.dieselnet.com/tech/fuel_biodiesel_std.php. (5 November 2019).

Bacha, J., Freel, J., Gibbs, A., Gibbs, L., Hemighaus, G., Hoekman, K., Horn, J., Gibbs, A., Ingham, M., Jossens, L., et al. 2007. *Diesel Fuels Technical Review*. San Ramon, CA: Chevron Corporation. 116 p.

Becker, E. W. 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Great Britain: Cambridge University Press.

Bligh, E. G., and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.

Cabanelas, I. T. D., Arbib, Z., Chinalia, F. A., Souza, C. O., Perales, J. A., Almeida, P. F., Druzian J. I., and Nascimento, I. A. 2013. From waste to energy: Microalgae production in wastewater and glycerol. *Applied Energy* 109: 283-290.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294-306.

Croft, M. T., Warren, M. J., and Smith, A. G. 2006. Algae need their vitamins. *Eukaryotic Cell* 5: 1175-1183.

Dayananda, C., Sarada, R., Bhattacharya, S., and Ravishankar, G. A. 2005. Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. *Process Biochemistry* 40: 3125-3131.

DuBois, D. M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

Dufosse, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N., and Pavishankar, G. A. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or and industrial reality?. *Trends in Food Science and Technology* 16: 389-406.

Farias Silva, C. E., and Bertucco, A. 2016. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. *Process Biochemistry* 51: 1833-1842.

Francisco, E. C., Neves, D. B., Lopes, E. J., and Franco, T. T. 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85: 395-403.

Fuel Standard (Biodiesel) Determination. 2003. Approved Under section 21 of the Fuel Quality Standard Act 2002 by the Australian Minister for the Environment and Heritage. https://www.comlaw.gov.au/Details/F2006B01373. (5 November 2019).

Garcia, M. C. C., Sanchez, M. A., Fernandez, S. J. M., Molina, G. E., and Garcia, C. F. 2005. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*, influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry* 40: 297-305.

Helliwell, K. E., Wheeler, G. L., Leptos, K. C., Goldstein, R. E., and Smith, A. G. 2011. Insights into the evolution of vitamin B_{12} auxotrophy from sequenced algal genomes. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2921-2933.

Knothe, G. 2008. “Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy Fuels* 22: 1358-1364.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement which the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

Mittelbach, M., and Remschmidt, C. 2004. *Biodiesel: The Comprehensive Handbook*. Vienna, Austria: Boersedruck Ges. M.B.H.

Nascimento, I. A., Cabanelas, I. T. D., Santos, J. N., Nascimento, M. A., Sousa, L., and Sasone, G. 2015. Biodiesel yields and fuel quality as criteria for algal-feedstock selection: effects of CO_2-supplementation and nutrient levels in cultures. *Algal Research* 8: 53-60.

Philipose, M. T. 1967. *Chlorococcales*. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research.

Quinn, J. C., Hanif, A., Sharvelle, S., and Bradley, T. H. 2014. Microalgae to biofuels: Life cycle impacts of methane production of anaerobically digested lipid extracted algae. *Bioresource Technology* 171: 37-43.

Ramos, M. J., Fernandez, C. M., Casas, A., and Rodriguez, L. A. 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology* 100:261-268.

Ruangsomboon, S. 2018. Hydrocarbon production and biodiesel properties of a green microalga *Botryococcus braunii* KMITL 2 cultivated outdoor in open pond and closed photobioreactor. *Chiang Mai Journal of Science* 45(2): 668-679.

Ruangsomboon, S., Prachom, N., and Sornchai, P. 2017. Enhanced growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* KMITL 2 by optimum carbon dioxide concentration and concentration-dependent effects on its biochemical composition and biodiesel properties. *Bioresource Technology* 244: 1358-1366.

Ruangsomboon, S., Sornchai, P., and Prachom, N. 2018. Enhanced hydrocarbon production and improved biodiesel qualities of *Botryococcus braunii* KMITL 5 by vitamins thiamine, biotin and cobalamin supplementation. *Algal Research* 29: 159-169.

Sergeeva, Y. E., Mostova, E. B., Gorin, K. V., Komova, A. V., Konova, I. A., Pojidaev, V. M., Gotovtsev, P. M., Vasilov, R. G., and Sineoky, S. P. 2017. Calculation of biodiesel fuel characteristics based on the fatty acid composition of the lipids of some biotechnologically important microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology* 53: 807-813.

Tanabe, Y., Loki, M., and Watanabe, M. M. 2014. The fast-growing strain of hydrocarbon-rich green alga *Botryococcus braunii*, BOT-22, is a vitamin B_{12} autotroph. *Journal of Applied Phycology* 126:9-13.

US Department of Energy. 2004. *Biodiesel: Handling and use guidelines*. Energy Efficiency and Renewable Energy, United States Department of Energy.

Vonshak, A., and Maske, H. 1982. Algae: growth techniques and biomass production. In *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis,* J. Coombs, and D. O. Hall, eds. pp. 66-77. Oxford: Pergamon Press.

Wu, H., and Miao, X. 2014. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. *Bioresource Technology* 170: 421-427.

วันรับบทความ (Received date) : 12 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 20 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

ความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตรของเกษตรกรผู้ปลูกมังคุด โครงการระบบส่งเสริมการเกษตรแบบแปลงใหญ่ในอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร

Needs for Agricultural Extension Services of Large Agricultural Land Plot Mangosteen Growers in Langsuan District, Chumphon Province

กนกพร ทองรอด[1] พิชัย ทองดีเลิศ[1*] และพัชราวดี ศรีบุญเรือง[1]
Kanokporn Thongrod[1], Pichai Tongdeelert[1*] and Patcharavadee Sriboonruang[1]

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยพื้นฐานส่วนบุคคล เศรษฐกิจและสังคม การส่งเสริมการเกษตร และความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตร เปรียบเทียบความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตร จำแนกตามปัจจัยพื้นฐานส่วนบุคคล เศรษฐกิจและสังคม และการส่งเสริมการเกษตร ผลการวิจัยพบว่า เกษตรกรมีอายุเฉลี่ย 56 ปี ระดับการศึกษาอยู่ในระดับมัธยมศึกษา/ปวช. ประสบการณ์ในการปลูกมังคุดเฉลี่ย 27.75 ปี จำนวนแรงงานในครัวเรือนที่ใช้ในการผลิตมังคุดมี 2 คน ปริมาณผลผลิตมังคุดเฉลี่ยในปี พ.ศ. 2558-2561 คือ 1,223.09 กิโลกรัม/ไร่ รายได้เฉลี่ยจากการจำหน่ายมังคุด คือ 41,666.67 บาท/ไร่/ปี ส่วนใหญ่เป็นสมาชิกกลุ่มท่ามะพลา เคยได้รับข้อมูลข่าวสาร รับการส่งเสริม และเข้าร่วมกิจกรรมการส่งเสริมการเกษตรในพื้นที่เป็นประจำ ระดับความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตรในภาพรวมอยู่ในระดับปานกลาง ผลการทดสอบสมมติฐาน พบว่า เกษตรกรที่มีประสบการณ์ในการปลูกมังคุดแตกต่างกัน มีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.01 สำหรับเกษตรกรที่มีปริมาณผลผลิตมังคุดเฉลี่ย รายได้จากการจำหน่ายมังคุด และการเข้าร่วมกิจกรรมการส่งเสริมการเกษตรในพื้นที่แตกต่างกัน มีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ขณะที่จำนวนแรงงานในครัวเรือนที่ใช้ในการผลิตมังคุด การเป็นสมาชิกกลุ่มตามพื้นที่ การรับข้อมูลข่าวสาร และการได้รับการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน จะมีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 และ 0.01

คำสำคัญ: ความต้องการ การส่งเสริมการเกษตร มังคุด แปลงใหญ่ จังหวัดชุมพร

Abstract

The objectives of this research were: 1) to study the basic demographic characteristics, socio-economics and current product promotional activities of mangosteen farmers with large plots in Langsuan district, Chumphon province and then: 2) to analyze their needs for further promotional activities in terms of their demographics, socio-economics and existing promotional activities. With respect to the first objective, the results revealed that farmers had an average age of 56 years. The majority of them had secondary school/vocational certificate level educations, and they had been growing mangosteens for an average of 27.75 years. There were usually two household laborers employed on a plot. The average amount of mangosteen production was 1,223.09 kilograms/rai. The average income from selling mangosteens was 41,666.67 Baht/rai/ year. Most of the farmers were Tha Maphla growers' group members. They had received information and support and regularly participated in agricultural promotional activities in the area. In general, the farmers' level of need for further agricultural promotional services was at the moderate level. Hypothesis testing showed that farmers who had different levels of experience in growing mangosteens had different levels of demand for further promotional services at a statistical significance level of 0.01. As for farmers who produced different amounts of mangosteen products, had different incomes from selling mangosteens, and who participated in agricultural activities in different areas, they too had different needs for further promotional services and these results were statistically significant at 0.05. Moreover, farmers who had different number of household laborers, who were members of groups in different areas, got their information from different sources, and who had different levels of existing promotional activities, had different levels of demand for extra agricultural promotional services at the statistical significance levels of 0.05 and 0.01.

Keywords: needs, agricultural extension, mangosteen, land plot, Chumphon province

[1] ภาควิชาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
[1] Department of Agricultural Extension and Communication, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900
*Corresponding author, Email: agrpct@ku.ac.th

คำนำ

ไม้ผลนับเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทย โดยสามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายพันล้านบาท และยังเป็นที่นิยมบริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ นอกจากนี้ความต้องการบริโภคเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากจำนวนประชากรที่เพิ่มมากขึ้นและความใส่ใจในสุขภาพที่มากขึ้นด้วย สำหรับไม้ผลที่ปลูกในไทยเกือบทั้งหมดเป็นไม้ผลเขตร้อน ได้แก่ สับปะรด มะม่วง กล้วยน้ำว้า ทุเรียน เงาะ ลำไย กล้วยหอม และมังคุด เป็นต้น (เดชรัต สุขกำเนิด, 2558) มังคุดได้เป็นราชินีแห่งไม้ผลเขตร้อน เจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้ดีในประเทศไทย ปัจจุบันมังคุดเป็นไม้ผลที่ตลาดมีความต้องการสูงมากทั้งตลาดภายในและภายนอกประเทศ จากข้อมูลสถานการณ์การผลิตมังคุดในปี 2559 พบว่าไทยมีเนื้อที่ปลูกมังคุดที่ให้ผลผลิตแล้ว 508,904 ไร่ จำนวนครัวเรือนผู้ปลูกมังคุดทั้งหมด 152,641 ครัวเรือน พื้นที่ปลูก 45 จังหวัด ผลผลิตทั้งหมด 190,900 ตัน ผลผลิตต่อไร่ 433 กิโลกรัม ราคาขายได้ต่อกิโลกรัม 51.36 บาท พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ในภาคใต้ร้อยละ 70 และภาคตะวันออกร้อยละ 30 ผลผลิตทั้งหมดนั้น แบ่งเป็นบริโภคภายในประเทศร้อยละ 46.25 ของผลผลิต และส่งออกต่างประเทศร้อยละ 53.75 ของผลผลิตทั้งหมด (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2560)

อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร มีพื้นที่ปลูกมังคุดขนาดใหญ่มาเป็นเวลานาน เกษตรกรมีความสำเร็จในการรวมกลุ่มเพื่อการผลิต จนได้รับขนานนามว่าเป็นแหล่งปลูกมังคุดคุณภาพดี โดยมีรางวัลการันตีคุณภาพผลผลิตมากมาย อาทิ วิสาหกิจชุมชน (มังคุด) ดีเด่นระดับประเทศ กลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกมังคุดแปลงใหญ่ที่อยู่ในอันดับหนึ่งในสามระดับประเทศ เกษตรกรผู้ปลูกมังคุดดีเด่น ปราชญ์ชาวบ้าน (มังคุด) ดีเด่น เป็นต้น แต่ราคาขายออกจากสวนที่ตกต่ำยังเป็นปัญหา นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค สวนมังคุดที่ให้ผลผลิตแล้วส่วนใหญ่ขาดการดูแล ผลผลิตที่ได้จึงด้อยคุณภาพ ส่งออกไม่ได้ รวมทั้งปัญหาภัยธรรมชาติ เพราะมีแนวโน้มว่าสภาพแวดล้อมมีการแปรเปลี่ยนไปจากเดิม ทำให้การจัดการโรคและแมลงยากขึ้น มังคุดออกดอก ติดผลยากขึ้น และการขาดความรู้ เทคโนโลยีหรือนวัตกรรมใหม่ ๆ ที่ใช้ในการผลิต (วิทยา ศรีมาลา และวสันต์พรรษ จำเริญนุสิต, 2561)

จากนโยบายของรัฐบาล เรื่องโครงการระบบส่งเสริมการเกษตรแบบแปลงใหญ่ ในปี พ.ศ. 2558 เป็นการส่งเสริมให้เกษตรกรที่ปลูกพืชชนิดเดียวกันในพื้นที่ใกล้เคียงกันมาร่วมกันผลิตและขายสินค้าเพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิต และสร้างอำนาจต่อรองให้กับเกษตรกร รวมไปถึงเสริมสร้างความร่วมมือระหว่างหน่วยงานภาครัฐ ภาคเอกชน และเกษตรกรอย่างเป็นรูปธรรม (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2559) โครงการนี้ได้ถูกส่งเสริมให้กับเกษตรกรในพื้นที่นำร่องจำนวน 600 แปลง โดยมีการส่งเสริมในพืชหลัก 9 ชนิด หนึ่งในนั้น คือ มังคุดของอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2559) แต่เมื่อเกษตรกรมีการรวมกลุ่มกันในพื้นที่จริง พบว่าเกษตรกรยังขาดความรู้ความเข้าใจในโครงการเกษตรแปลงใหญ่ที่ถูกต้อง แม้ว่าต้นทุนในการผลิตจะลดลง แต่ผลผลิตมังคุดที่ได้ยังไม่มีคุณภาพดีเท่าที่ควร ทำให้ราคาผลผลิตตกต่ำไม่คุ้มค่าในการผลิต จะเห็นได้ว่าการส่งเสริมเกษตรกรในพื้นที่อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร ตามโครงการระบบส่งเสริมการเกษตรแบบแปลงใหญ่ยังไม่สอดคล้องกับความต้องการที่แท้จริงของเกษตรกร (วิริยะ คล้ายแดง, 2561)

ดังนั้น เพื่อยกระดับความรู้ในการผลิตมังคุด ช่วยให้เกษตรกรสามารถรับบริการส่งเสริมการเกษตรได้ตรงตามความต้องการในด้านช่องทางและวิธีการส่งเสริมการเกษตร และเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชให้ประสบความสำเร็จอย่างยั่งยืน ซึ่งสอดคล้องกับนโยบายของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และรัฐบาลคณะรักษาความสงบแห่งชาติ ในโครงการระบบส่งเสริมการเกษตรแบบแปลงใหญ่ นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยให้หน่วยงานภาครัฐและเอกชนสามารถให้บริการส่งเสริมการเกษตรได้ตรงตามความต้องการที่แท้จริงของเกษตรกร จึงเห็นควรดำเนินการวิจัยความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตรของเกษตรกรผู้ปลูกมังคุดโครงการระบบส่งเสริมการเกษตรแบบแปลงใหญ่ ในอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร

วิธีการศึกษา

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา คือ เกษตรกรผู้ปลูกมังคุดกลุ่มโครงการระบบส่งเสริมการเกษตรแบบแปลงใหญ่ในพื้นที่อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร จำนวน 296 ครัวเรือน (สำนักงานเกษตรอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร, 2560) คำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size) โดยใช้การคำนวณสูตรของ Krejcie & Morgan (สุรินทร์ นิยมางกูร, 2561) จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่คำนวณได้ คือ 168 ครัวเรือน แบ่งกลุ่มตัวอย่างแบบชั้นภูมิตามสัดส่วน (proportional stratified sampling) แต่ละกลุ่มโครงการระบบส่งเสริมการเกษตรแบบแปลงใหญ่ตามพื้นที่ก่อน แล้วจึงเลือกตัวอย่างจากแต่ละกลุ่มโครงการระบบส่งเสริมการเกษตรแบบแปลงใหญ่โดยวิธีการสุ่มอย่างง่าย (simple random sampling) จนครบ 168 ครัวเรือน

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ใช้แบบสอบถามที่มีทั้งปลายปิดและปลายเปิด โดยนำแบบสอบถามให้ผู้เชี่ยวชาญจำนวน 3 ท่าน ตรวจสอบความเที่ยงตรง (validity) ของเครื่องมือและปรับปรุงแก้ไข จากนั้นนำแบบสอบถามไปทดลองใช้กับเกษตรกรที่ไม่ใช่กลุ่มตัวอย่าง (try out) จำนวน 30 ชุด แล้วนำผลข้อมูลมาหาค่าความเชื่อมั่น (reliability) โดยการหาค่าสัมประสิทธิ์ตามวิธีของ Cronbach (Cronbach's Alpha Coefficient) กับตัวแปรความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตรได้ค่าความเชื่อมั่น 0.960 ซึ่งเป็นค่าที่สามารถนำไปใช้เก็บข้อมูลในการวิจัยครั้งนี้ ทั้งนี้ได้เก็บรวบรวมข้อมูลในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึง เดือนมีนาคม 2562

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตรของเกษตรกร ทำการวัดแบบอันตรภาคชั้น (interval scale) วัดจากความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตรของเกษตรกร ได้แก่ 1) ความต้องการความรู้ในการผลิตมังคุด จำนวน 49 ข้อ 2) ความต้องการช่องทางการส่งเสริมการเกษตร จำนวน 17 ข้อ 3) ความต้องการวิธีการส่งเสริมการเกษตร จำนวน 14 ข้อ โดยให้คะแนนระดับความต้องการ ดังนี้

คะแนนความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตรของเกษตรกร ซึ่งผู้วิจัยได้แบ่งเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ความต้องการมาก ความต้องการปานกลาง ความต้องการน้อย โดยแบ่งคะแนนชั้นตามวิธีมาตราส่วนประมาณค่า (rating scale) จำนวน 3 ระดับ และอันตรภาคชั้น (class interval) (สุรินทร์ นิยมางกูร, 2561) ซึ่งมีเกณฑ์การแบ่งคะแนนระดับความคิดเห็น ดังนี้

ระดับความต้องการการส่งเสริมการเกษตร	เกณฑ์การให้คะแนน
ความต้องการมาก	3
ความต้องการปานกลาง	2
ความต้องการน้อย	1

คะแนนเฉลี่ยระดับความต้องการการส่งเสริมการเกษตร	การแปลความหมายระดับความต้องการรับบริการ
2.34 - 3.00	ความต้องการมาก
1.67 - 2.33	ความต้องการปานกลาง
1.00 - 1.66	ความต้องการน้อย

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ประกอบด้วย ค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าร้อยละ (Percentage) และ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) และค่าสูงสุด (Maximum) ค่าต่ำสุด (Minimum) และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ค่า t-test และ F-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 และ 0.01

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ปัจจัยพื้นฐานส่วนบุคคล

เกษตรกรมากกว่าร้อยละ 50 เป็นเพศหญิง มีอายุเฉลี่ย 56 ปี ส่วนใหญ่มีระดับการศึกษาอยู่ในระดับมัธยมศึกษา/ปวช. มีจำนวนสมาชิกในครัวเรือน 1-10 คน ส่วนใหญ่จำนวนสมาชิกในครัวเรือนน้อยกว่า 4 คน และประสบการณ์ในการปลูกมังคุดของเกษตรกรเฉลี่ย คือ 27.75 ปี

ปัจจัยพื้นฐานทางเศรษฐกิจและสังคมของเกษตรกร

เกษตรกรมีจำนวนแรงงานทั้งหมดที่ใช้ในการผลิตมังคุด 2-3 คน จำนวนแรงงานในครัวเรือนที่ใช้ในการผลิตมังคุดมี 2 คน มีจำนวนแรงงานจ้างที่ใช้ในการผลิตมังคุดตั้งแต่ 2-3 คน ขนาดพื้นที่ทำการเกษตรทั้งหมด 1- 6 ไร่ โดยเกษตรกรส่วนมากมีขนาดพื้นที่ปลูกมังคุดทั้งหมด 1-4 ไร่ และมีขนาดพื้นที่ให้ผลผลิตมังคุดได้ทั้งหมด 1.5-4 ไร่ ปริมาณผลผลิตมังคุดเฉลี่ยในปี พ.ศ. 2558-2561 คือ 1,223.09 กิโลกรัม/ไร่ ค่าใช้จ่ายเฉลี่ยจากการผลิตมังคุด คือ 3,863.10 บาท/ไร่/ปี รายได้เฉลี่ยจากการจำหน่ายมังคุด คือ 41,666.67 บาท/ไร่/ปี การเป็นสมาชิกกลุ่มตามพื้นที่ของเกษตรกรส่วนใหญ่เป็นสมาชิกกลุ่มท่ามะพลา ตำแหน่งของสมาชิกภายในกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นสมาชิกกลุ่ม และแหล่งเงินทุนในการผลิตมังคุดเกษตรกรใช้เงินทุนตนเองเพื่อทำการผลิตมังคุด

ปัจจัยด้านการส่งเสริมการเกษตร

เกษตรกรส่วนใหญ่เคยได้รับข้อมูลข่าวสารการส่งเสริมการเกษตรเป็นประจำ (ร้อยละ 66.1) เคยได้รับการส่งเสริมการเกษตรเป็นประจำ (ร้อยละ 59.5) และเข้าร่วมกิจกรรมการส่งเสริมการเกษตรในพื้นที่เป็นประจำ (ร้อยละ 65.5) จากผลการวิจัยสามารถพิจารณาได้ว่าเกษตรกรส่วนใหญ่เกินกว่าร้อยละ 50 จะได้รับข้อมูลข่าวสารการเกษตร และได้รับการส่งเสริมการเกษตรในรูปแบบต่าง ๆ อยู่เป็นประจำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ ประกายตา หลีกภัย และคณะ (2554) เรื่องการประเมินผลโครงการส่งเสริมการปลูกปาล์มน้ำมันเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนปี 2552 จังหวัดตรัง ที่แสดงผลการวิจัยว่า เกษตรกรส่วนใหญ่มีความ

ต้องการที่จะได้รับข้อมูลข่าวสารทางการเกษตรอยู่สม่ำเสมอ เพื่อที่จะศึกษาหาความรู้เพิ่มเติมให้กับตัวเองและเป็นการแลกเปลี่ยนข้อมูลข่าวสารและประสบการณ์ซึ่งกันและกัน

ความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตร

ระดับความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตรโดยรวม มีค่าเฉลี่ย 2.34 ด้านอยู่ในระดับปานกลาง เมื่อพิจารณาเป็นรายด้าน พบว่าด้านความต้องการความรู้ในการผลิตมังคุด มีค่าเฉลี่ย 2.37 อยู่ในระดับปานกลาง พบว่าเกษตรกรมีความต้องการความรู้ในการผลิตมังคุดมากที่สุด คือ การกำหนดมาตรฐานการผลิต และเข้าสู่กระบวนการตรวจสอบ รับรองสินค้าที่สามารถทำได้หรือเป็นที่ต้องการของตลาด โดยเฉพาะความรู้ที่ถูกต้องในการผลิตมังคุดของเกษตรกรตามมาตรฐาน GAP ด้านความต้องการช่องทางการส่งเสริมการเกษตร มีค่าเฉลี่ย 2.32 อยู่ในระดับปานกลาง พบว่ามีความต้องการมากที่สุด คือ สื่อบุคคล โดยเฉพาะผู้นำชุมชน และด้านความต้องการวิธีการส่งเสริมการเกษตร มีค่าเฉลี่ย 2.29 อยู่ในระดับปานกลาง พบว่ามีความต้องการมากที่สุด คือ วิธีการส่งเสริมแบบกลุ่ม โดยการจัดฝึกอบรมให้ความรู้ทางการเกษตร ดัง Table 1 สอดคล้องกับงานวิจัยของ เหมือนฝัน รามเทพ และคณะ (2559) เรื่องความต้องการความรู้เกี่ยวกับการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับปาล์มน้ำมันของเกษตรกร อำเภอห้วยยอด จังหวัดตรัง ซึ่งรายงานว่าการเปิดรับข่าวสารของเกษตรกรส่วนใหญ่ คือ การอบรม เนื่องจากการเข้าอบรมแต่ละครั้งเกษตรกรจะได้รับความรู้มากขึ้น เจ้าหน้าที่ส่งเสริมสามารถให้คำแนะนำและการตอบข้อสงสัยของเกษตรกรได้โดยตรง และทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนความรู้ระหว่างเกษตรกรด้วยกันเอง (Table 1)

Table 1 Needs for agricultural extension services (n=168).

Summary of farmers' needs for agricultural extension services of large agricultural land plot mangosteen growers in Langsuan district, Chumphon province	$\bar{x}$	SD	Level of needs
Knowledge of mangosteen production	2.37	0.345	Moderate
Agricultural extension channels	2.32	0.376	Moderate
Agricultural extension methods	2.29	0.401	Moderate
Total	2.34	0.311	Moderate

เปรียบเทียบความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตรของเกษตรกรผู้ปลูกมังคุด โครงการระบบส่งเสริมการเกษตรแบบแปลงใหญ่ ในอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร จำแนกตามปัจจัยพื้นฐานส่วนบุคคล ปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคม และปัจจัยด้านการรับรู้ข่าวสารการส่งเสริมการเกษตร

จากผลการทดสอบสมมติฐาน พบว่าเกษตรกรที่มีประสบการณ์ในการปลูกมังคุดแตกต่างกัน มีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.01) โดยเกษตรกรที่มีประสบการณ์ในการปลูกมังคุดมากกว่ามีความรักผูกพันในการทำสวนมังคุดเป็นเวลานานอย่างชำนาญมากอยู่พอสมควร เกษตรกรกลุ่มนี้จะมีความกระตือรือร้นที่จะหาความรู้ใหม่ ๆ หรือแลกเปลี่ยนประสบการณ์กับผู้อื่น จึงมีความต้องการวิธีการส่งเสริมการเกษตรที่สูงกว่ากลุ่มอื่น สอดคล้องกับงานวิจัยของ นิตยา รักศีล และสุพัตรา ศรีสุวรรณ (2550) เรื่องสภาพการผลิตยางพาราและความต้องการส่งเสริมของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราใน อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งรายงานว่าเกษตรกรที่มีประสบการณ์การปลูกยางพารา 21-35 ปีและ 36 ปีขึ้นไปนั้นมีประสบการณ์ในการปลูกยางพารามาก ได้เจอและประสบกับปัญหาอุปสรรคต่าง ๆ มามาก จึงทำให้เกษตรกรมีความต้องการบริการและสนับสนุนปัจจัยการผลิตและการตลาดเพราะสามารถนำไปแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ ที่ได้เกิดขึ้นจากประสบการณ์การปลูกยางพาราของเกษตรกรเองให้ดีขึ้น

จำนวนแรงงานในครัวเรือนที่ใช้ในการผลิตมังคุดที่แตกต่างกัน จะมีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรด้านความต้องการความรู้ในการผลิตมังคุดแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.01) และด้านความต้องการช่องทางการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05) โดยพบว่า เกษตรกรที่มีจำนวนแรงงานในครัวเรือนที่ใช้ในการผลิตมังคุด 2 คน และมากกว่า 2 คนขึ้นไป มีพื้นที่ขนาดใหญ่ในการทำสวนมังคุด มีความจำเป็นที่จะต้องใช้แรงงานในครัวเรือนจำนวนมากเนื่องจากปัญหาแรงงานในการเก็บเกี่ยวผลผลิตมีน้อย และหายาก ทำให้เกษตรกรในสองกลุ่มนี้จึงมีความต้องการรับความรู้ในการผลิตมังคุดและช่องทางการส่งเสริมการเกษตรมาก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของแรงงานในครัวเรือน สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธนกาญจน์ สุวรรณรัตน์ และคณะ (2556) เรื่องความต้องการพัฒนาอาชีพของเกษตรกร อำเภอเมือง ระยอง จังหวัดระยอง ซึ่งรายงานว่า เกษตรกรที่มีแรงงานในครัวเรือนมาก จะมีความต้องการพัฒนาอาชีพมาก การมีแรงงาน

ในครัวเรือนมากทำให้เกิดการพูดคุย แลกเปลี่ยนความรู้ มีกำลังการผลิตมาก ทำให้มีความต้องการการพัฒนาอาชีพเพื่อเพิ่มโอกาสในการแสวงหาความรู้ และนำไปทดลองปฏิบัติ

ปริมาณผลผลิตมังคุดเฉลี่ยในปี พ.ศ. 2558-2561 ที่แตกต่างกัน มีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05) โดยเกษตรกรที่มีปริมาณผลผลิตมังคุดเฉลี่ยในปี พ.ศ. 2558-2561 ในช่วง 500-1,000 กิโลกรัม/ไร่ ยังขาดการเข้าถึงความรู้ในการดูแลรักษาผลผลิต และบริหารจัดการระบบการผลิตให้ผลผลิตที่ได้มีปริมาณสูงอยู่พอสมควรแล้ว จึงต้องการช่องทางการส่งเสริมการเกษตรที่เข้าถึงได้ง่าย รวดเร็ว โดยเฉพาะผู้นำชุมชน สอดคล้องกับงานวิจัยของ โสภณ ยอดพรหม (2456) เรื่องความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรของเกษตรกรผู้ร่วมโครงการศูนย์ส่งเสริมและผลิตพันธุ์ข้าวชุมชน ในจังหวัดสุรินทร์ ซึ่งรายงานว่า เกษตรกรที่มีผลผลิตต่อไร่น้อยกว่า 350 กิโลกรัม (ค่าเฉลี่ย 0.78) มีความต้องการมากกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเกษตรกรที่มีผลผลิตต่อไร่ต่ำอาจจะมีปัญหาในการปลูกข้าวที่ผ่านมาแต่การติดต่อสื่อสารกับเจ้าหน้าที่ส่งเสริมช้าทำให้แก้ปัญหาไม่ทัน จึงมีความต้องการส่งเสริมการเกษตรมากกว่า เพื่อทราบถึงข้อมูลข่าวสารได้ง่ายและสะดวกรวดเร็วสามารถแก้ไขปัญหาได้ทัน

เกษตรกรที่มีรายได้จากการจำหน่ายมังคุดที่แตกต่างกัน มีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05) พบว่าเกษตรกรที่มีรายได้จากการจำหน่ายมังคุด 43,601-85,000 บาท/ไร่/ปี มีเงินทุน ความรู้ความสามารถในการดูแลรักษาผลผลิต และการบริหารจัดการระบบการผลิตให้ผลผลิตมังคุดมีคุณภาพดีอยู่พอสมควรแล้ว จึงมีเงินลงทุนและความต้องการรับความรู้ในการผลิตมังคุดสูง เพื่อพัฒนาศักยภาพและระบบการผลิตมังคุดให้มีคุณภาพในระดับที่ดีกว่าเดิม เช่น ความรู้ที่ถูกต้องในการผลิตมังคุดของเกษตรกรตามมาตรฐาน GAP สอดคล้องกับงานวิจัยของ อารยา ภูโททิพย์ และคณะ (2556) เรื่องความต้องการของเกษตรกรในการเข้าร่วมโครงการส่งเสริมการปลูกยางพารา อำเภอหนองวัวซอ จังหวัดอุดรธานี ซึ่งรายงานว่า เกษตรกรที่มีรายได้ต่ำ (1,800-6,300 บาท/เดือน) มีระดับความต้องการในการเข้าร่วมโครงการส่งเสริมการปลูกยางพาราด้านการฝึกอบรมน้อยกว่าเกษตรกรที่มีรายได้สูง (13,001-250,000 บาท/เดือน) และเกษตรกรที่มีรายได้จากการจำหน่ายมังคุด 20,000-37,000 บาท/ไร่/ปี ยังขาดการเข้าถึงวิธีการส่งเสริมการเกษตรที่เหมาะสม ทำให้ขาดความรู้ความสามารถในการดูแลรักษาผลผลิต และบริหารจัดการระบบการผลิตให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพตรงตามความต้องการของตลาดอยู่มาก จึงมีความต้องการวิธีการส่งเสริมการเกษตรของเกษตรกรสูง เช่น บริการวิธีการฝึกอบรม เพื่อเพิ่มรายได้ ความรู้ความสามารถในการดูแลรักษาผลผลิต และบริหารจัดการระบบการผลิตมังคุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ ประทีป สีหานาม (2550) เรื่องความต้องการการส่งเสริมของสมาชิกกลุ่มผู้ผลิตสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ประเภทผ้าและเครื่องแต่งกายในจังหวัดขอนแก่น ซึ่งรายงานว่าสมาชิกกลุ่มผู้ผลิตสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ ที่มีรายได้จากการจำหน่ายผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 2,500 บาท มีความต้องการส่งเสริมและสนับสนุนมาก เพื่อให้การดำเนินงานกลุ่มมีความต่อเนื่องและพัฒนาผลิตภัณฑ์สู่มาตรฐานที่สูงขึ้นซึ่งจะส่งผลให้กลุ่มมีรายได้ที่สูงขึ้นและสมาชิกก็จะมีรายได้เพิ่มขึ้นด้วย

การเป็นสมาชิกกลุ่มตามพื้นที่แตกต่างกัน จะมีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรด้านความต้องการความรู้ในการผลิตมังคุดแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.01) และด้านความต้องการช่องทางการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05) โดยเกษตรกรที่มีการเป็นสมาชิกกลุ่มท่ามะพลา และกลุ่มบ้านควน มีระบบการดูแลจัดการกลุ่มที่ดี มีกฎระเบียบของกลุ่มที่ชัดเจน ถึงแม้จะมีจำนวนสมาชิกมากกว่ากลุ่มอื่น ๆ ทำให้สมาชิกภายในกลุ่มเข้ามามีบทบาทมากยิ่งขึ้น นำไปสู่การประสบความสำเร็จตามจุดมุ่งหมายที่ตั้งไว้ โดยกลุ่มที่ประสบความสำเร็จแล้ว จะมีการตั้งเป้าหมายต่อไปที่สูงขึ้นเพื่อประโยชน์ของสมาชิก การคงอยู่ของกลุ่ม และก่อให้เกิดการพัฒนา สมาชิกในกลุ่มนี้จึงมีความต้องการความรู้ในการผลิตมังคุดและช่องทางการส่งเสริมการเกษตรมาก เพื่อนำกลุ่มไปสู่การพัฒนาและประสบความสำเร็จไปอีกขั้นที่เหนือกว่าเดิม สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธนกาญจน์ สุวรรณรัตน์ และคณะ (2556) เรื่องความต้องการพัฒนาอาชีพของเกษตรกร อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง ซึ่งรายงานว่าการเข้าเป็นสมาชิกกลุ่ม/สถาบันเกษตรกรมาก มีความสัมพันธ์กับความต้องการการพัฒนาอาชีพของเกษตรกรผู้ปลูกพืชทุกชนิด แสดงให้เห็นว่าเกษตรกรที่มีการวางแผนร่วมกันทำให้มั่นใจว่าเมื่อเกิดการเข้าร่วมกลุ่มสามารถช่วยแก้ปัญหาของตนได้ ทำให้เกษตรกรมีอำนาจต่อรองมากขึ้นส่งผลให้เกิดความต้องการที่จะพัฒนามากขึ้น

เกษตรกรที่มีการรับข้อมูลข่าวสารการเกษตรที่แตกต่างกัน จะมีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรด้านความต้องการความรู้ในการผลิตมังคุดแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.01) และด้านความต้องการช่องทางการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05) พบว่า เกษตรกรที่เคยได้รับข้อมูลข่าวสารการเกษตรเป็นประจำมีความรู้ทางการเกษตรที่ทันสมัยทำให้สามารถปรับตัวและจัดการการเกษตรที่เหมาะสม ทันต่อสถานการณ์และสภาพเศรษฐกิจปัจจุบัน เกษตรกรกลุ่มนี้จึงมีการตื่นตัวต่อความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรสูง สอดคล้องกับงานวิจัยของ พุฒิสรรค์ เครือคำ และคณะ (2561) เรื่องปัจจัยที่มีผลต่อความต้องการในการส่งเสริมการปลูกไม้ผลในระบบอินทรีย์ของเกษตรกรในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว ซึ่งรายงานว่าเกษตรกรผู้ปลูกไม้ผลที่มีการได้รับรู้ข้อมูลข่าวสารจากสื่อต่าง ๆ มาก จะทำให้

เกษตรกรมีความต้องการในการส่งเสริมการปลูกไม้ผลในระบบอินทรีย์มากกว่าเกษตรกรที่มีการรับรู้ข่าวสารจากสื่อต่าง ๆ น้อยกว่าหรือไม่เคยได้รับข่าวสารจากสื่อต่าง ๆ เลย

เกษตรกรที่ได้รับการส่งเสริมการเกษตรที่แตกต่างกัน จะมีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรด้านความต้องการความรู้ในการผลิตมังคุดแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.01) และด้านความต้องการช่องทางการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05) พบว่า เกษตรกรที่เคยได้รับการส่งเสริมการเกษตรเป็นประจำ จะได้รับประโยชน์จากการรับบริการส่งเสริมการเกษตรที่เห็นได้ชัดเจนมากกว่า โดยเฉพาะการฝึกอบรม ทำให้เกษตรกรสามารถปรับปรุงการผลิตทางการเกษตร มีความชำนาญทั้งด้านวิชาการและการปฏิบัติ เป็นผลให้มีการพัฒนาคุณภาพชีวิตเกษตรกรที่ดีขึ้น เกษตรกรกลุ่มนี้จึงต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตรที่สูงกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ นิติธร วงศ์เชษฐา (2550) เรื่องความต้องการของเกษตรกรเพื่อเข้ารับการฝึกอบรมหลักสูตรการจัดการธุรกิจ: กรณีศึกษา ตำบลเวียงยอด อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ซึ่งรายงานว่าคะแนนความต้องการการฝึกอบรมในเนื้อหาต่าง ๆ ทุกเนื้อหาของผู้ที่เคยและไม่เคยผ่านการฝึกอบรมด้านการจัดการธุรกิจการเกษตรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 หมายความว่าเกษตรกรที่เคยเข้ารับการฝึกอบรมแล้วต้องการรับการฝึกอบรมอีก

เกษตรกรที่มีการเข้าร่วมกิจกรรมการส่งเสริมการเกษตรในพื้นที่แตกต่างกัน มีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05) พบว่า เกษตรกรที่เข้าร่วมกิจกรรมการส่งเสริมการเกษตรเป็นประจำ จะมีความรู้ด้านการเกษตร มีทักษะ และได้รับข่าวสารด้านการเกษตรที่มากกว่า เป็นผลให้ประสบความสำเร็จในการทำการเกษตรที่สูงกว่า จึงเล็งเห็นประโยชน์ที่ชัดเจน ทำให้มีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรที่สูงกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุพัตรา คณานิตย์ และคณะ (2560) เรื่องความต้องการของเกษตรกรต่อการได้รับการพัฒนาการเกษตร จากองค์การบริหารส่วนตำบลหว้าทอง อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งรายงานว่า เกษตรกรที่เคยเข้าร่วมกิจกรรมด้านการเกษตรกับ อบต. หว้าทอง มีความต้องการได้รับการพัฒนาการเกษตร จาก อบต. หว้าทอง มากกว่าเกษตรกรที่ไม่เคยเข้าร่วมกิจกรรมด้านการเกษตรกับ อบต. หว้าทอง เนื่องจากเกษตรกรที่เคยเข้าร่วมกิจกรรมกับ อบต. หว้าทอง ได้รับความรู้ด้านการเกษตร การศึกษาดูงานและปัจจัยการผลิต ทำให้เกษตรกรมีความรู้ความเข้าใจในการทำการเกษตรมากขึ้น (Table 2)

Table 2 Comparison of needs for agricultural extension services of large agricultural land plot mangosteen growers in Langsuan district, Chumphon province (n=168).

Independent variable	Knowledge of mangosteen production		Agricultural extension channels		Agricultural extension methods		F-test/ t-test
	F-test/ t-test	P-value	F-test/ t-test	P-value	F-test/ t-test	P-value	
Basic demographic factors							
- Gender	0.122^{ns}	0.903	-0.136^{ns}	0.892	0.164^{ns}	0.870	t-test
- Age	0.070^{ns}	0.932	0.132^{ns}	0.877	0.708^{ns}	0.494	F-test
- Educational attainment	0.561^{ns}	0.572	0.215^{ns}	0.807	0.592^{ns}	0.554	F-test
- Number of household members	1.214^{ns}	0.300	0.088^{ns}	0.916	0.034^{ns}	0.967	F-test
- Experience in growing mangosteen	0.621^{ns}	0.539	1.581^{ns}	0.209	4.954**	0.008	F-test
Socio-economic factors							
- Total labor used to produce mangosteen	0.177^{ns}	0.838	0.842^{ns}	0.433	0.373^{ns}	0.689	F-test
- Number of labor in households that use mangosteen production	5.040**	0.008	4.109*	0.018	0.254^{ns}	0.776	F-test
- Number of labor employed in mangosteen production	0.741^{ns}	0.478	1.905^{ns}	0.152	0.675^{ns}	0.511	F-test
- Total area of agricultural land	0.611^{ns}	0.544	0.593^{ns}	0.544	0.584^{ns}	0.559	F-test
- Total area of mangosteen plantation	0.475^{ns}	0.623	1.071^{ns}	0.345	1.712^{ns}	0.184	F-test
- The area that can yield all mangosteen fruits	0.361^{ns}	0.697	1.079^{ns}	0.342	1.807^{ns}	0.167	F-test
- Average amount of mangosteen products in 2015 - 2018	0.853^{ns}	0.428	3.253*	0.041	0.946^{ns}	0.390	F-test

Note: ns = non-significant level, * = significant at the level 0.05, ** = significant at the level 0.01.

Table 2 (Continued).

Independent variable	Knowledge of mangosteen production		Agricultural extension channels		Agricultural extension methods		F-test/ t-test
	F-test/ t-test	P-value	F-test/ t-test	P-value	F-test/ t-test	P-value	
Socio-economic factors (Continued)							
- Expenses from the production of mangosteen	2.704^{ns}	0.070	0.659^{ns}	0.519	0.086^{ns}	0.918	F-test
- Income from the sale of mangosteen	3.171*	0.045	2.550^{ns}	0.081	3.947*	0.021	F-test
- Group membership by area	16.454**	0.000	3.185*	0.025	1.382^{ns}	0.250	F-test
- Position of members within the group	-2.115^{ns}	0.056	-1.207^{ns}	0.229	0.229	0.737	t-test
- Funding sources for the production of mangosteen	0.603^{ns}	0.547	0.867^{ns}	0.583	-0.149^{ns}	0.882	t-test
Agricultural extension factors							
- Receiving information on agricultural extension	-3.071**	0.002	-2.052*	0.042	-1.831^{ns}	0.069	t-test
- Received agricultural extension	-3.288**	0.001	-2.266*	0.025	-1.262^{ns}	0.209	t-test
- Participation in agricultural extension activities in the area	-2.306*	0.022	-2.064*	0.041	-1.886^{ns}	0.061	t-test

Note: ns= non-significant level, * = significant at the level 0.05, ** = significant at the level 0.01.

สรุปผลการศึกษา

ผลการศึกษา พบว่า เกษตรกรมากกว่าร้อยละ 50 เป็นเพศหญิง มีอายุเฉลี่ย 56 ปี ส่วนใหญ่มีระดับการศึกษาอยู่ในระดับมัธยมศึกษา/ปวช. มีจำนวนสมาชิกในครัวเรือน 1-10 คน ส่วนใหญ่มีจำนวนสมาชิกในครัวเรือนน้อยกว่า 4 คน และประสบการณ์ในการปลูกมังคุดของเกษตรกรเฉลี่ย คือ 27.75 ปี มีจำนวนแรงงานทั้งหมดที่ใช้ในการผลิตมังคุด 2-3 คน จำนวนแรงงานในครัวเรือนที่ใช้ในการผลิตมังคุดมี 2 คน มีจำนวนแรงงานจ้างที่ใช้ในการผลิตมังคุดตั้งแต่ 2-3 คน ขนาดพื้นที่ทำการเกษตรทั้งหมด 1-6 ไร่ โดยเกษตรกรส่วนมากมีขนาดพื้นที่ปลูกมังคุดทั้งหมด 1-4 ไร่ และมีขนาดพื้นที่ให้ผลผลิตมังคุดได้ทั้งหมด 1.5-4 ไร่ ปริมาณผลผลิตมังคุดเฉลี่ยในปี พ.ศ. 2558-2561 คือ 1,223.09 กิโลกรัม/ไร่ ค่าใช้จ่ายเฉลี่ยจากการผลิตมังคุด 3,863.10 บาท/ไร่/ปี รายได้เฉลี่ยจากการจำหน่ายมังคุด 41,666.67 บาท/ไร่/ปี การเป็นสมาชิกกลุ่มตามพื้นที่ของเกษตรกรส่วนใหญ่เป็นสมาชิกกลุ่มท่ามะพลา ตำแหน่งของสมาชิกภายในกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นสมาชิกกลุ่ม และแหล่งเงินทุนในการผลิตมังคุดเกษตรกรใช้เงินทุนตนเองเพื่อทำการผลิตมังคุด เกษตรกรส่วนใหญ่เคยได้รับข้อมูลข่าวสารการส่งเสริมการเกษตร เคยได้รับการส่งเสริมการเกษตร และเข้าร่วมกิจกรรมการส่งเสริมการเกษตรในพื้นที่เป็นประจำ

ระดับความต้องการรับบริการส่งเสริมการเกษตรทั้ง 3 ด้านอยู่ในระดับปานกลาง ในด้านความต้องการความรู้ในการผลิตมังคุด พบว่าความรู้ในการผลิตมังคุดที่เกษตรกรมีความต้องการมากที่สุด คือ การกำหนดมาตรฐานการผลิต และเข้าสู่กระบวนการตรวจสอบรับรองสินค้าที่เกษตรกรสามารถทำได้หรือเป็นที่ต้องการของตลาด โดยเฉพาะความรู้ที่ถูกต้องในการผลิตมังคุดของเกษตรกรตามมาตรฐาน GAP ด้านความต้องการช่องทางการส่งเสริมการเกษตร พบว่า เกษตรกรมีความต้องการให้ใช้สื่อบุคคล โดยเฉพาะผู้นำชุมชน เป็นช่องทางในการส่งเสริมการเกษตรมากที่สุด และด้านความต้องการวิธีการส่งเสริมการเกษตร พบว่า เกษตรกรมีความต้องการวิธีการส่งเสริมแบบกลุ่ม โดยการจัดฝึกอบรมให้ความรู้ทางการเกษตรมากที่สุด

จากการทดสอบสมมติฐาน พบว่า เกษตรกรที่มีประสบการณ์ในการปลูกมังคุดแตกต่างกัน มีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.01) สำหรับเกษตรกรที่มีปริมาณผลผลิตมังคุดเฉลี่ยในปี พ.ศ. 2558-2561 รายได้จากการจำหน่ายมังคุด และการเข้าร่วมกิจกรรมการส่งเสริมการเกษตรในพื้นที่แตกต่างกัน มีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05) ขณะที่จำนวนแรงงานในครัวเรือนที่ใช้ในการผลิตมังคุด การเป็นสมาชิกกลุ่มตามพื้นที่ การรับข้อมูลข่าวสารการเกษตร และการได้รับการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน จะมีความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรแตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 และ 0.01)

ข้อเสนอแนะ

1. ปัจจุบันปัญหาด้านแรงงาน ประสบการณ์ และความชำนาญเป็นปัญหาหลักของเกษตรกรผู้ปลูกมังคุด ดังนั้น ภาครัฐควรเข้ามาดูแลพัฒนาทั้งฝีมือแรงงาน ความชำนาญและเทคโนโลยีหรือเครื่องมือที่ช่วยในการผลิตมังคุดเพื่อเพิ่มความสะดวกให้เกษตรกรมากยิ่งขึ้น เช่น ระบบเกษตรอัจฉริยะ (Smart Farm) ในการจัดการแปลงปลูกมังคุด โดรน (Drone) ในการให้ปุ๋ยและสำรวจผลผลิตมังคุด เป็นต้น

2. การบริหารจัดการกลุ่มตามพื้นที่ การรับข้อมูลข่าวสาร การรับการส่งเสริมการเกษตร และการเข้าร่วมกิจกรรมการส่งเสริมการเกษตรในพื้นที่ ควรมีระบบบริหารจัดการกระบวนการกลุ่มที่เข้มแข็งเพื่อให้สมาชิกทุกคนภายในกลุ่มสามารถรับข้อมูลข่าวสาร รับการส่งเสริม และเข้าร่วมกิจกรรมการส่งเสริมการเกษตรได้อย่างทั่วถึง เพื่อให้เกษตรกรเข้าถึงแหล่งความรู้ สารสนเทศ และนวัตกรรมที่ทันสมัย ส่งผลให้เกษตรกรสามารถผลิตมังคุดที่มีคุณภาพสูง

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2559. ระบบส่งเสริมการเกษตรแปลงใหญ่. http://www.oic.go.th (15 ตุลาคม 2561).

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2560. ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านเกษตร. กรมส่งเสริมการเกษตร. http://production.doae.go.th (15 ตุลาคม 2561).

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2559. คู่มือการดำเนินงานระบบส่งเสริมการเกษตรแบบแปลงใหญ่. http://www.agriman.doae.go.th (30 ตุลาคม 2561).

เดชรัต สุขกำเนิด. 2558. *เศรษฐศาสตร์เกษตรเบื้องต้น เรื่อง การเกษตรและเศรษฐกิจไทย*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเศรษฐศาสตร์เกษตรและทรัพยากร.

ธนกาญจน์ สุวรรณรัตน์, พนามาศ ตรีวรรณกุล และสุพัตรา ศรีสุวรรณ. 2556. ความต้องการพัฒนาอาชีพของเกษตรกร อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาส่งเสริมการเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

นิตยา รักศีล และสุพัตรา ศรีสุวรรณ. 2550. สภาพการผลิตยางพาราและความต้องการส่งเสริมของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในอำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาส่งเสริมการเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

นิติธร วงศ์เชษฐา. 2550. ความต้องการของเกษตรกรเพื่อเข้ารับการฝึกอบรมหลักสูตรการจัดการธุรกิจ: กรณีศึกษา ตำบลเวียงยอด อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน. ปัญหาพิเศษปริญญาบริหารธุรกิจมหาบัณฑิต สาขาวิชาบริหารธุรกิจ โครงการบัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่.

ประกายตา หลีกภัย, สุวิสา พัฒนเกียรติ และพัฒนา สุขประเสริฐ. 2554. การประเมินผลโครงการส่งเสริมการปลูกปาล์มน้ำมันเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนปี 2552 จังหวัดตรัง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาส่งเสริมการเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ประทีป สีหานาม. 2550. ความต้องการการส่งเสริมของสมาชิกกลุ่มผู้ผลิตสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ประเภทผ้าและเครื่องแต่งกายในจังหวัดขอนแก่น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

พุฒิสรรค์ เครือคำ, พหล ศักดิ์คะทัศน์, ปภพ จี้รัตน์ และนภารัศม์ เวชสิทธิ์นิรภัย. 2561. ปัจจัยที่มีผลต่อความต้องการในการส่งเสริมการปลูกไม้ผลในระบบอินทรีย์ของเกษตรกรในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว. *วารสารเกษตรพระวรุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม* 15(1): 85-93.

วิทยา ศรีมาลา และวสันต์พรรษ จำเริญนุสิต. 2561. เอกสารเพื่อการเผยแพร่และประชาสัมพันธ์ สำนักงานประชาสัมพันธ์จังหวัดชุมพร. http://thainews.prd.go.th (30 กันยายน 2561).

วิริยะ คล้ายแดง. 2561. *เกษตรแปลงใหญ่*. กรุงเทพฯ: สำนักวิชาการ สำนักเลขาธิการสภาผู้แทนราษฎร. 8 หน้า.

สำนักงานเกษตรอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร. 2560. ข้อมูลทะเบียนเกษตรกรกลุ่มโครงการระบบส่งเสริมการเกษตรแบบแปลงใหญ่. http://www.chumphon.doae.go.th (30 พฤษภาคม 2561).

สุพัตรา คณานิตย์, ภาณุพันธุ์ ประภาติกุล และชัยชาญ วงษ์สามัญ. 2560. ความต้องการของเกษตรกรต่อการได้รับการพัฒนาการเกษตรจากองค์การบริหารส่วนตำบลหว้าทอง อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น. *วารสารแก่นเกษตร* 45(1): 1515-1521.

สุรินทร์ นิยมางกูร. 2561. *การวิเคราะห์ข้อมูลตัวอย่าง: ความพึงพอใจในสภาพความเป็นอยู่ของเกษตรกรในชนบทแห่งหนึ่ง*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาจุฬาลงกรณราชวิทยาลัย. 182 หน้า.

โสภณ ยอดพรหม. 2456. ความต้องการบริการส่งเสริมการเกษตรของเกษตรกรผู้ร่วมโครงการศูนย์ส่งเสริมและผลิตพันธุ์ข้าวชุมชน ในจังหวัดสุรินทร์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

เหมือนฝัน รามเทพ, พัชราวดี ศรีบุญเรือง และพิชัย ทองดีเลิศ. 2559. ความต้องการความรู้เกี่ยวกับการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับปาล์มน้ำมันของเกษตรกร อำเภอห้วยยอด จังหวัดตรัง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาส่งเสริมการเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อารยา ภูโททิพย์, พิชัย ทองดีเลิศ และสาวิตรี รังสิภัทร์. 2556. ความต้องการของเกษตรกรในการเข้าร่วมโครงการส่งเสริมการปลูกยางพารา อำเภอหนองวัวซอ จังหวัดอุดรธานี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาส่งเสริมการเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วันรับบทความ (Received date) : 14 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 15 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมของผู้เลี้ยงโคนมในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

Good Agricultural Practice for Dairy Cattle Farm of Dairy Farmer in Prachuap Khiri Khan Province

ชไมพร ใจภิภักดิ์[1*] วรินธร มณีรัตน์[1] และวนิดา มากศิริ[2]

Chamaiporn Jaipipak[1*], Warinthorn Maneerat[1] and Wanida Maksiri[2]

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา 1) ข้อมูลพื้นฐานทางสังคมและเศรษฐกิจของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม 2) การจัดการฟาร์มโคนมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม 3) ความรู้ของเกษตรกรในการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 และ 4) ปัญหาและข้อเสนอแนะในการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 กลุ่มตัวอย่างคือเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมที่เป็นสมาชิกสหกรณ์โคนม-ไทยเดนมาร์ค บ้านเนินดินแดง จำกัด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 66 ราย ทำการเก็บข้อมูลโดยใช้แบบสัมภาษณ์ สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล คือ สถิติเชิงพรรณา ผลการวิจัย พบว่า การจัดการฟาร์มโคนมของเกษตรกรในด้านพันธุ์โคนม ด้านอาหารโคนม และด้านการจัดการฟาร์มโคนมมีความสอดคล้องกับการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 (มกษ. 6402-2552) และเกษตรกรมีความรู้ด้านการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนม ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 (มกษ. 6402-2552) ใน 9 องค์ประกอบอยู่ในระดับดี (ร้อยละ 94.12) อย่างไรก็ตาม เกษตรกรส่วนใหญ่ยังไม่ได้รับการรับรองมาตรฐานฟาร์มและต้องการได้รับการรับรองมาตรฐานฟาร์ม ดังนั้น หน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรมีการให้ความรู้ความเข้าใจ รวมถึงสร้างแรงจูงใจเพื่อให้เกษตรกรเห็นความสำคัญของการจัดการฟาร์มตามมาตรฐานฟาร์มโคนมมากขึ้น

คำสำคัญ: การจัดการฟาร์มโคนม การผลิตน้ำนม เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี

Abstract

The objectives of this research were to study: 1) the socio-economics of dairy farmers; 2) the management practices of dairy farmers; 3) the knowledge of dairy farmers concerned with Good Agricultural Practice (GAP) for dairy cattle farms; and 4) the problems faced by, and suggestions for, dairy farm management for GAP on dairy cattle farms. The sample were 66 dairy farmers who were members of the Ban Din Daeng Thai-Denmark Dairy Cooperatives within the Prachuap Khiri Khan province. The data were collected via interview forms, and the responses were analyzed with descriptive statistics. The results showed that: 1) Most of the dairy farmers (62.10% of them) were male, and had an average age of 49.32±10.16 years. They had mostly graduated from primary school. Seventy-four percent of the dairy farmers had 15.35±9.75 years of experience working on dairy farms; 2) With regard to dairy farm management in the areas of dairy breed, feed and general management, the dairy farmers generally acted in compliance with GAP for dairy cattle farms (TAS 6402-2009); 3) The level of knowledge of the farmers about GAP for dairy cattle farming concerned with 9 key items was at the good level (94.12 percent). However, 4) most of the dairy farmers are not yet certified to the standards of the GAP for dairy cattle farming (TAS 6402-2009), although they say they want to achieve certification. Therefore, the relevant agencies should better try to understand and educate the farmers and help them to recognize the importance of farm management as per the standards.

Keywords: dairy farm management, milk production, dairy farmer, good agricultural practice

[1] สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช อ. ปากเกร็ด จ. นนทบุรี 11120

[1] School of Agriculture and Cooperatives, Sukhothai Thammathirat Open University, Pak Kret, Nonthaburi 11120

[2] คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี อ. เมือง จ. เพชรบุรี 76000

[2] Faculty of Agricultural Technology, Phetchaburi Rajabhat University, Muang, Phetchaburi 76000

*Corresponding author, Email: chamaipornnp1718@gmail.com

คำนำ

จากสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศและการแข่งขันทางการค้าที่สูงขึ้น ส่งผลให้ผู้ผลิตสินค้าปศุสัตว์จำเป็นต้องปรับตัวเพื่อปรับกระบวนการผลิตและยกระดับการผลิตสินค้าให้ได้คุณภาพและมาตรฐานมากขึ้น โดยหน่วยงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องได้มีการวางนโยบายและแนวทางในการยกระดับการผลิตสินค้าปศุสัตว์ รวมทั้งกำหนดมาตรฐานการผลิตสินค้า เพื่อเป็นแนวทางให้ผู้ผลิตสินค้าเกษตร รวมทั้งเกษตรกรสามารถใช้เป็นแนวทางในการจัดการการผลิตของตนเอง เพื่อทำให้กระบวนการผลิตและสินค้าเกษตรมีคุณภาพและมาตรฐานที่สูงขึ้น รวมทั้งยังส่งผลให้ผลผลิตสินค้าเกษตรมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคด้วย ทั้งนี้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนม (Good Agricultural Practice for dairy cattle farm, GAP) เป็นมาตรฐานทั่วไปตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 ลงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2552 (มกษ. 6402-2552) ครอบคลุมตั้งแต่การเลี้ยงที่ฟาร์มจนถึงการขนส่งน้ำนมดิบไปยังศูนย์รวบรวมน้ำนมดิบหรือโรงงานแปรรูป ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้โคนมที่มีสุขภาพดี ผลิตน้ำนมโคที่ปลอดภัยและเหมาะสมสำหรับผู้บริโภคหรือการนำไปแปรรูป พร้อมทั้งไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยพิจารณาจาก 9 องค์ประกอบ ได้แก่ 1) องค์ประกอบฟาร์ม 2) อาหารสำหรับโคนม 3) น้ำ 4) การจัดการฟาร์ม 5) สุขภาพสัตว์ 6) สวัสดิภาพสัตว์ 7) สิ่งแวดล้อม 8) การผลิตน้ำนมดิบ และ 9) การบันทึกข้อมูล (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552)

จังหวัดประจวบคีรีขันธ์นับว่าเป็นจังหวัดที่มีการผลิตโคนมมากที่สุดในภาคตะวันตก จากข้อมูลของศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสารกรมปศุสัตว์ (2562) รายงานว่า มีจำนวนเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม 979 ราย จำนวนโครวมทั้งหมด 36,880 ตัว โครีดนม จำนวน 17,213 ตัว และสามารถผลิตน้ำนมดิบได้ 195 ตันต่อวัน ทั้งนี้ ผลผลิตน้ำนมดิบจะถูกส่งไปแปรรูปในโรงงานผลิตผลิตภัณฑ์นมภายในจังหวัด ซึ่งมีโรงงานขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อสค.) และโรงงานที่ผลิตผลิตภัณฑ์นมโรงเรียนอีก 2 แห่ง สำหรับผลผลิตที่เหลือจะถูกส่งไปจำหน่ายให้แก่โรงงานผลิตภัณฑ์นมของภาคเอกชน อย่างไรก็ตาม สภาพการผลิตน้ำนมดิบของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบว่า จากจำนวนฟาร์มโคนมทั้งหมด 923 ฟาร์ม มีฟาร์มที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน GAP เพียง 198 ฟาร์ม หรือคิดเป็น ร้อยละ 22 ของฟาร์มโคนมทั้งจังหวัด (สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดประจวบคีรีขันธ์, 2561) จะเห็นได้ว่า จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ยังมีจำนวนฟาร์มโคนมที่ได้รับการรับรองมาตรฐานฟาร์มอยู่จำนวนน้อย เช่นเดียวกับรายงานของ ประเสริฐ โพธิ์กาด และคณะ (2554) ศึกษาการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี กรณีศึกษาจังหวัดสุโขทัย พบว่า การจัดการฟาร์มโคนมของเกษตรกรไม่ผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย พ.ศ. 2542 เนื่องจากปัญหาการขาดผู้สืบทอดอาชีพในการเลี้ยงโคนม เกษตรกรขาดความรู้ความเข้าใจ และหน่วยงานภาครัฐยังขาดความต่อเนื่องเกี่ยวกับการจัดการฟาร์มโคนมตามมาตรฐานฟาร์มโคนมและการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย รวมทั้งขาดเงินทุนในการพัฒนาปรับปรุงฟาร์ม

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานทางสังคมและเศรษฐกิจของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม การจัดการฟาร์มโคนมและความรู้ของเกษตรกรในการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี สำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 รวมถึงปัญหาและข้อเสนอแนะในการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการผลิตโคนมให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมได้ดำเนินการผลิตตามมาตรฐานการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมต่อไป

วิธีการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงสำรวจ ประชากรที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คือ เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมที่เป็นสมาชิกสหกรณ์โคนม-ไทยเดนมาร์ค บ้านเนินดินแดง อำเภอทับสะแก จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 190 ราย กำหนดขนาดของกลุ่มตัวอย่างโดยใช้สูตรคำนวณของทาโร่ยามาเน่ ที่ความคลาดเคลื่อน ร้อยละ 0.10 ได้ขนาดกลุ่มตัวอย่าง 66 ราย โดยใช้วิธีการสุ่มอย่างง่าย เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย คือ แบบสัมภาษณ์ โดยมีลักษณะคำถามแบบปลายปิด และคำถามแบบปลายเปิด แบ่งคำถามออกเป็น 4 ตอน ได้แก่ ตอนที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานทางสังคมและเศรษฐกิจของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม ตอนที่ 2 การจัดการฟาร์มโคนมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม ตอนที่ 3 ความรู้ของเกษตรกรในการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 ตอนที่ 4 ปัญหาและข้อเสนอแนะในการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551

สำหรับแบบคำถามในตอนที่ 3 เป็นแบบคำถามวัดความรู้แบบถูกผิด จำนวน 34 ข้อ เกี่ยวกับการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 โดยแบ่งตามประเด็น 9 องค์ประกอบ ได้แก่ องค์ประกอบฟาร์ม อาหารสำหรับโคนม น้ำสำหรับโคนม การจัดการฟาร์ม สุขภาพสัตว์ สวัสดิภาพสัตว์

สิ่งแวดล้อม การผลิตน้ำนมดิบ และการบันทึกข้อมูล เกณฑ์การให้คะแนน คือ ตอบถูกได้ 1 คะแนน ตอบผิดได้ 0 คะแนน การแปลความหมายค่าคะแนนความรู้ใช้ตามเกณฑ์การประเมินของ Bloom (1971) มีเกณฑ์การแบ่งคะแนนเป็น 3 ระดับ ดังนี้

ระดับดี	คะแนนความรู้ร้อยละ 100-80 (ช่วงคะแนน 34-27 คะแนน)
ระดับปานกลาง	คะแนนความรู้ร้อยละ 79-60 (ช่วงคะแนน 26-20 คะแนน)
ระดับน้อย	คะแนนความรู้ร้อยละ 59-0 (ช่วงคะแนน 19-0 คะแนน)

สถิติที่ใช้วิจัยครั้งนี้ คือ สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ข้อมูลพื้นฐานทางสังคมและเศรษฐกิจของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม

ผลการศึกษาข้อมูลพื้นฐานทางสังคมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม พบว่า เกษตรกรส่วนใหญ่เป็นเพศชาย ร้อยละ 62.10 มีอายุเฉลี่ยของเกษตรกรเท่ากับ 49.32±10.16 ปี เกษตรกรจบการศึกษาระดับชั้นประถมศึกษา มัธยมศึกษาตอนต้น มัธยมศึกษาตอนปลาย ปริญญาตรี และปริญญาโท คิดเป็นร้อยละ 74.20, 9.10, 12.10, 3.00 และ 1.50 ตามลำดับ เกษตรกรมีจำนวนสมาชิกในครัวเรือนเฉลี่ย 4.14±1.29 คน และเกษตรกรมีประสบการณ์ในการเลี้ยงโคนมเฉลี่ย 15.35±9.75 ปี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ประเสริฐ โพธิ์กาด และคณะ (2554) รายงานว่าเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมส่วนใหญ่เป็นเพศชาย ร้อยละ 86.40 มีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 47.41 ปี และจบการศึกษาระดับชั้นประถมศึกษา ร้อยละ 69.70 ซึ่งอายุและการศึกษาของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมมีผลต่อการทำงาน การสร้างแนวความคิด เพื่อนำมาปรับปรุงการดำเนินการจัดการฟาร์ม และพร้อมที่จะเรียนรู้หรือมีความคิดในการยอมรับเทคโนโลยีใหม่ ๆ สำหรับนำมาปรับปรุงฟาร์มโคนมของตนเองให้เป็นฟาร์มที่มีมาตรฐาน และสอดคล้องกับการศึกษาของ สมศักดิ์ รุ้งแก้ว (2557) ได้ศึกษาการจัดการมาตรฐานฟาร์มที่เหมาะสมสำหรับเกษตรกรของสหกรณ์โคนมแม่ออน อำเภอแม่ออน จังหวัดเชียงใหม่ พบว่า เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมเป็นเพศชาย เพราะเป็นหัวหน้าครอบครัว ระดับการศึกษาจบระดับชั้นประถมศึกษา และมีการเลี้ยงโคนมสืบทอดมารุ่นสู่รุ่น

สำหรับข้อมูลพื้นฐานทางเศรษฐกิจของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม พบว่าเกษตรกรร้อยละ 98.50 เลี้ยงโคนมเป็นอาชีพหลัก และเกษตรกรร้อยละ 1.50 ประกอบอาชีพค้าขายเป็นอาชีพหลัก สำหรับอาชีพรอง พบว่า เกษตรกรร้อยละ 25.80 ประกอบอาชีพรับจ้างทั่วไป รองลงมาได้แก่ ทำไร่และทำสวน ทำนา และเลี้ยงโคนม คิดเป็นร้อยละ 4.50, 3.00 และ 1.50 ตามลำดับ สำหรับพื้นที่ถือครองของเกษตรกร พบว่า เกษตรกรร้อยละ 63.30 มีพื้นที่ถือครอง 1-10 ไร่ โดยมีพื้นที่เฉลี่ย 14.12±17.04 ไร่ต่อราย จำนวนแรงงานที่เลี้ยงโคนม พบว่า เกษตรกรส่วนใหญ่ร้อยละ 65.20 มีจำนวนแรงงานที่เลี้ยงโคนม 2 คน หรือคิดเป็นจำนวนแรงงานเฉลี่ยเท่ากับ 2.08±0.67 คนต่อฟาร์ม แหล่งเงินทุนในการเลี้ยงโคนม พบว่าเกษตรกรร้อยละ 75.80 ใช้เงินทุนของตนเองและกู้เงินจากธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตรเพื่อเลี้ยงโคนม และเกษตรกรร้อยละ 24.20 ใช้เงินทุนของตัวเองในการเลี้ยงโคนม สำหรับปริมาณผลผลิตน้ำนมโคดิบเฉลี่ยต่อเดือน พบว่า เกษตรกรร้อยละ 47.00 มีผลผลิตน้ำนมดิบเฉลี่ยต่อเดือนเท่ากับ 1,001-5,000 กิโลกรัม เกษตรกรร้อยละ 30.30 มีผลผลิตน้ำนมดิบเฉลี่ยต่อเดือนเท่ากับ 5,001-10,000 กิโลกรัม เกษตรกรร้อยละ 21.20 มีผลผลิตน้ำนมดิบเฉลี่ยต่อเดือนมากกว่า 10,000 กิโลกรัม และเกษตรกรร้อยละ 1.50 มีผลผลิตน้ำนมดิบเฉลี่ยต่อเดือนน้อยกว่า 1,000 กิโลกรัม โดยคิดค่าเฉลี่ยผลผลิตน้ำนมโคดิบจากฟาร์มเกษตรกร พบว่ามีค่าเท่ากับ 6,429.73±4,777.93 กิโลกรัมต่อเดือน

สำหรับการได้รับความรู้เกี่ยวกับการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมของเกษตรกร พบว่าเกษตรกรร้อยละ 97.00 เคยได้รับความรู้เกี่ยวกับการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนม และเกษตรกรร้อยละ 3.00 ไม่เคยได้รับความรู้เกี่ยวกับการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติการทางเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมมาก่อน จำนวนของเกษตรกรที่ได้รับการรับรองมาตรฐานฟาร์มโคนม พบว่าเกษตรกรร้อยละ 37.90 ได้รับการรับรองมาตรฐานฟาร์มโคนมเรียบร้อยแล้ว เกษตรกรร้อยละ 18.20 อยู่ระหว่างดำเนินการขอรับรองมาตรฐานฟาร์มโคนม และเกษตรกรร้อยละ 43.90 ยังไม่ได้รับการรับรองมาตรฐานฟาร์มโคนม ทั้งนี้ จากการสำรวจด้านความต้องการได้รับการรับรองมาตรฐานฟาร์มโคนม พบว่าเกษตรกรร้อยละ 60.60 มีความต้องการได้รับการรับรองมาตรฐานฟาร์มโคนม ขณะที่เกษตรกรร้อยละ 39.40 ไม่ต้องการได้การรับรองมาตรฐานฟาร์มโคนม ทั้งนี้เพราะเกษตรกรมีความคิดเห็นว่า จะต้องมีการปรับเปลี่ยนฟาร์มหรือการเปลี่ยนแปลงในการผลิตโคนมที่ตนเองได้ดำเนินการมานานแล้ว หากต้องปรับเปลี่ยนจะเป็นเรื่องยุ่งยาก และไม่มีแรงจูงในการที่จะขอรับรองมาตรฐานฟาร์ม

การจัดการฟาร์มโคนมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม

จากผลการศึกษาการจัดการฟาร์มโคนมของเกษตรกร โดยแบ่งเป็น 4 ด้าน ได้แก่ ด้านพันธุ์โคนม ด้านอาหารโคนม ด้านการจัดการฟาร์มโคนม และด้านโรคและสุขาภิบาลโคนม ได้ผลการศึกษาดังนี้

ด้านพันธุ์โคนม พบว่าเกษตรกรร้อยละ 100 เลี้ยงโคนมพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน เกษตรกรมีการคัดเลือกแม่พันธุ์โคนม ร้อยละ 90.90 โดยคัดเลือกแม่พันธุ์โคนมภายในฟาร์มของตนเอง และมีการคัดเลือกพ่อพันธุ์ ร้อยละ 39.40 โดยคัดเลือกจากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคที่สั่งซื้อจากบริษัทต่าง ๆ และจากคำแนะนำของเจ้าหน้าที่ส่งเสริม หมออาสา และผู้เลี้ยงโคนมฟาร์มอื่น ๆ โดยให้สัตวแพทย์เป็นผู้ผสมเทียม สำหรับจำนวนโคนมในฟาร์ม พบว่าเกษตรกรร้อยละ 31.00 มีจำนวนโคนม 21-40 ตัว รองลงมามีจำนวนโคนมมากกว่า 40 ตัว คิดเป็นร้อยละ 19 และมีจำนวนโคนมน้อยกว่า 20 ตัว คิดเป็นร้อยละ 24.29 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนโคนมในฟาร์ม เท่ากับ 34.83±20.22 ตัว สำหรับจำนวนพ่อพันธุ์โคนมในฟาร์ม พบว่าเกษตรกรร้อยละ 53.00 ไม่มีการเลี้ยงพ่อพันธุ์โคนมในฟาร์ม สำหรับฟาร์มที่มีการเลี้ยงพ่อพันธุ์โคนมในฟาร์มคิดเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนพ่อพันธุ์โคนมในฟาร์ม เท่ากับ 1.86±2.96 ตัว เนื่องจากต้องใช้พ่อพันธุ์โคนมในการตรวจสัดเป็นหลัก

สำหรับจำนวนแม่โครีดนมในฟาร์ม พบว่าจำนวนเกษตรกรที่มีจำนวนแม่โครีดนมมากกว่า 10 ตัว จำนวนโครีดนม 6-10 ตัว และจำนวนโครีดนม 1-5 ตัว คิดเป็นร้อยละ 60.60, 27.30 และ 12.10 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนโครีดนมต่อเกษตรกรเท่ากับ 14.85±9.17 ตัวต่อฟาร์ม สำหรับเกษตรกรที่มีจำนวนโครุ่น-โคสาว 1-5 ตัว 6-10 ตัว 11-15 ตัว 16-20 ตัว และมากกว่า 20 ตัว คิดเป็นร้อยละ 22.70, 33.30, 16.70, 16.70 และ 9.10 ตามลำดับ ขณะที่เกษตรกรร้อยละ 1.50 ไม่มีโครุ่นและโคสาวในฟาร์ม ค่าเฉลี่ยจำนวนโครุ่นและโคสาวในฟาร์มของเกษตรกรมีค่าเท่ากับ 12.05±12.20 ตัว สำหรับเกษตรกรที่มีจำนวนแม่โคแห้งนม 1-5 ตัว 6-10 ตัว และมากกว่า 10 ตัว คิดเป็นร้อยละ 75.80, 10.60 และ 3.00 ตามลำดับ ขณะที่มีเกษตรกรร้อยละ 10.60 ไม่มีแม่โคระยะแห้งนม โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนแม่โคระยะแห้งนมมีค่าเท่ากับ 3.22±2.81 ตัว สำหรับวิธีการผสมพันธุ์โคนม พบว่าเกษตรกรร้อยละ 95.50 ใช้วิธีการผสมเทียม ซึ่งสัตวแพทย์เป็นผู้ผสมเทียม ขณะที่เกษตรกรร้อยละ 4.50 ใช้วิธีการจูงพ่อแม่พันธุ์ไปผสม ทั้งนี้จะเห็นได้ว่า ฟาร์มโคนมส่วนใหญ่จัดเป็นฟาร์มโคนมขนาดกลางที่มีจำนวน โคนม 21-100 ตัว (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552)

ด้านอาหารโคนม พบว่าเกษตรกรใช้ทุ่งหญ้าธรรมชาติเป็นแหล่งพืชอาหารสัตว์ ร้อยละ 84.80 และเกษตรกรบางส่วนใช้ทุ่งหญ้าธรรมชาติร่วมกับการปลูกพืชอาหารสัตว์เอง ร้อยละ 33.30 โดยเกษตรกรร้อยละ 97.00 มีความเห็นว่า ตนเองมีปริมาณอาหารหยาบสำหรับเลี้ยงโคนมเพียงพอ สำหรับปัญหาในการจัดการอาหารหยาบที่พบมากที่สุด คือ ปัญหาอาหารหยาบมีราคาแพง ร้อยละ 48.40 รองลงมาคือ ปริมาณและชนิดอาหารไม่แน่นอน ร้อยละ 41.10 และเกษตรกรไม่มีพื้นที่ปลูกพืชอาหารสัตว์ร้อยละ 10.50 สำหรับผลพลอยได้ทางการเกษตรที่เกษตรกรใช้สำหรับเลี้ยงโคนม ได้แก่ ฟางข้าว ร้อยละ 93.90 กากปาล์ม ร้อยละ 53.00 เปลือกข้าวโพดสด ร้อยละ 40.90 และเปลือกสับปะรด ร้อยละ 30.30 โดยเกษตรกรร้อยละ 61.30 จะนำผลพลอยได้ทางการเกษตรมาใช้เมื่อพืชอาหารสัตว์ในทุ่งหญ้าธรรมชาติ และที่ปลูกเองมีไม่เพียงพอ สำหรับอาหารข้นที่ใช้เลี้ยงโคนม พบว่าเกษตรกรร้อยละ 100 ซื้ออาหารข้นมากจากสหกรณ์โคนม โดยเกษตรกรร้อยละ 97.00 พิจารณาการให้อาหารข้นตามอัตราส่วนการให้ผลผลิตน้ำนมดิบของโคนม และเกษตรกรร้อยละ 18.20 พิจารณาจากสภาพร่างกายของโคนม นอกจากนี้ เกษตรกรร้อยละ 30.30 ใช้อาหารผสมเสร็จหรือทีเอ็มอาร์ (total mixed ration, TMR) ในการเลี้ยงโคนม ขณะที่เกษตรกรร้อยละ 69.70 ไม่ใช้อาหารทีเอ็มอาร์ และเกษตรกรร้อยละ 100 มีการเสริมแร่ธาตุก้อนให้แก่โคนม จะเห็นได้ว่าเกษตรกรมีการใช้อาหารหยาบจากทุ่งหญ้าธรรมชาติร่วมกับผลพลอยได้ทางการเกษตรที่สามารถหาได้ในพื้นที่ ได้แก่ ฟางข้าว กากปาล์ม เปลือกข้าวโพดสด และเปลือกสับปะรด โดยจะนำผลพลอยได้ทางการเกษตรมาใช้เมื่ออาหารหยาบจากทุ่งหญ้าธรรมชาติมีไม่เพียงพอ อย่างไรก็ตาม อาหารหยาบจากทุ่งหญ้าธรรมชาตินั้นจะมีผลผลิตตามฤดูกาล ส่งผลให้คุณภาพและองค์ประกอบทางโภชนาการไม่คงที่เท่ากับพืชอาหารสัตว์ที่ปลูกในแปลง เช่น หญ้าเนเปียร์ เป็นต้น ดังนั้น เกษตรกรจึงต้องนำผลพลอยได้ทางการเกษตรมาใช้เสริมเพื่อเลี้ยงโคนม โดยเฉพาะฟางข้าว ซึ่งนับว่าเป็นอาหารหยาบที่มีองค์ประกอบของโปรตีนน้อยหรือร้อยละ 2.20-3.60 (กรมปศุสัตว์, 2552; Khejornsart and Wanapat, 2011) และมีระดับพลังงานที่ย่อยได้ทั้งหมดร้อยละ 47 และมีค่าความสามารถในการย่อยได้ร้อยละ 46 (เมธา วรรณพัฒน์, 2533) ในส่วนของอาหารข้นสำเร็จรูป เกษตรกรจะซื้อจากสหกรณ์ที่ตนเองเป็นสมาชิก โดยสหกรณ์จัดหาอาหารข้นสำเร็จรูปหลาย ๆ ยี่ห้อมาจำหน่ายให้แก่สมาชิก

ด้านการจัดการฟาร์มโคนม พบว่าเกษตรกรเลี้ยงโคนมแบบปล่อยอิสระ ร้อยละ 90.90 ลักษณะพื้นภายในโรงเรือนเป็นแบบคอนกรีตและพื้นดิน ร้อยละ 97.00 เกษตรกรมีการปลูกต้นไม้ให้ร่มเงา ร้อยละ 87.90 และเกษตรกรมีการทำความสะอาดพื้นคอกและโรงเรือนทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) ร้อยละ 93.90 ทั้งนี้ เกษตรกรร้อยละ 100 มีการจัดรางน้ำ และรางอาหารภายในโรงเรือนให้แก่โคนม สำหรับการรีดนม เกษตรกรร้อยละ 100 รีดนมแบบระบบรีดแบบลงถังเดี่ยวรองรับน้ำนม

(bucket type) และก่อนการรีดนมเกษตรกรจะเตรียมแม่โคก่อนรีดนมโดยทำความสะอาดเฉพาะเต้านม ร้อยละ 88.60 และอาบน้ำโคทุกครั้งก่อนรีดนม ร้อยละ 11.40 ทั้งนี้ เกษตรกรร้อยละ 95.50 ใช้ผ้าชุบน้ำเปล่าเช็ดเต้านม และเกษตรกรร้อยละ 28.80 ใช้น้ำยาฆ่าเชื้อโรคเช็ดเต้านม เกษตรกรมีการตรวจสอบน้ำนมก่อนรีดโดย Strip cup และน้ำยาซีเอ็มที (C.M.T) ร้อยละ 6.10 และ 97.00 ตามลำดับ โดยเกษตรกรร้อยละ 80.30 จะทำการตรวจสอบน้ำนมเมื่อสงสัยและตรวจทุกเต้าก่อนรีด ขณะที่เกษตรกรร้อยละ 16.70 จะทำการตรวจเต้านมทุกเต้า และเกษตรกรร้อยละ 9.10 จะทำการตรวจเฉพาะเต้านมที่สงสัย ทั้งนี้จากรายงานของ ฤทัยรัตน์ ผจญไพรี (2557) ที่ศึกษาการใช้จำนวนเซลล์โซมาติกในการประเมินการรีดนมและการจัดการฟาร์มต่อเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการในฟาร์มโคนมของสหกรณ์โคนมท่าม่วง จำกัด พบว่าการอาบน้ำโคก่อนรีดนมเป็นปัจจัยที่สัมพันธ์กับจำนวนเซลล์โซมาติกของถังนมรวมของฟาร์มลดลง การอาบน้ำโคก่อนการรีดนมเป็นการลดโอกาสการติดเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกเข้าสู่เต้านม อีกทั้งยังกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนออกซิโตซิน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการหลั่งน้ำนมของโค และการใช้น้ำยาซีเอ็มทีตรวจความผิดปกติน้ำนมก่อนรีดนมเป็นประจำ เป็นปัจจัยหนึ่งที่สัมพันธ์กับจำนวนเซลล์โซมาติกของถังนมรวมของฟาร์มที่ลดลงเช่นกัน ซึ่งน้ำยาซีเอ็มทีเป็นเครื่องมือที่ช่วยในการตรวจโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการในแม่โคนม การใช้น้ำยาซีเอ็มทีตรวจสอบน้ำนมก่อนรีดจะช่วยเฝ้าระวัง และป้องกันไม่ให้มีอาการมากขึ้น และป้องกันการแพร่ระบาดของเต้านมอักเสบได้ เช่นเดียวกับการงานวิจัยของ นาม บัวทอง (2551) รายงานว่าการใช้น้ำยาซีเอ็มที ตรวจหาความผิดปกติของน้ำนมก่อนรีดนมทุกครั้งที่รีดนม จะช่วยให้ทราบสภาวะการติดเชื้อโรคเต้านมอักเสบของแม่โครีดนม และสามารถแยกแยะเต้านมที่เริ่มมีการติดเชื้อนำไปสู่การป้องกันทำให้การติดเชื้อลดลง มีผลทำให้จำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนมลดลง และลดการสูญเสียผลผลิตน้ำนมลงได้

สำหรับน้ำที่นำมาใช้ในการเลี้ยงโคนม พบว่าเกษตรกรร้อยละ 70.50 ใช้น้ำจากน้ำบาดาลหรือน้ำบ่อ รองลงมาคือใช้น้ำประปา และน้ำจากแม่น้ำ/ลำคลอง ร้อยละ 23.10 และ 6.40 ตามลำดับ การจัดการน้ำเสียที่มาจากน้ำล้างคอกโค และน้ำล้างภาชนะอุปกรณ์การเกษตรจะใช้วิธีการปล่อยลงแปลงหญ้า ร้อยละ 81.80 สำหรับการจัดการมูลและของเสีย เกษตรกรร้อยละ 75.80 มีการจัดเก็บมูลโคและของเสียในฟาร์มนาน ๆ ครั้ง รองลงมาคือ มีการจัดเก็บมูลโคและของเสียในฟาร์มทุกวัน ร้อยละ 21.20 โดยมูลโคจะถูกนำไปใช้ประโยชน์ คือ ตากแห้งเพื่อขายเป็นปุ๋ยคอก ร้อยละ 100 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ จารุวรรณ วงค์ทะเนตร และลักขณา มุ่งวัฒนา (2557) รายงานว่าการจัดการมูลโคโดยการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เป็นรายได้อีกทางหนึ่งของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม เพราะหากปล่อยมูลโคให้มีปริมาณมากจะทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้

ด้านโรคและสุขาภิบาลโคนม พบว่าเกษตรกรร้อยละ 100 มีการจัดการโปรแกรมการฉีดวัคซีนป้องกันโรคตามคำแนะนำของสัตวแพทย์ เช่น โรคปากเท้าเปื่อย มีการถ่ายพยาธิภายใน ร้อยละ 83.30 และมีการถ่ายพยาธิภายนอก ร้อยละ 87.90 สำหรับการทดสอบโรคประจำปี เช่น โรคแท้งติดต่อ วัณโรค พบว่าเกษตรร้อยละ 71.20 ไม่เคยทำ รองลงมาคือ ทำทุกปี ร้อยละ 22.70 เกษตรกรมีการตรวจสุขภาพโคนม ร้อยละ 93.90 เกษตรกรทราบถึงสาเหตุการเกิดโรคเต้านมอักเสบ ร้อยละ 95.50 และเกษตรกรทราบถึงสาเหตุการเกิดโรคปากเท้าเปื่อย ร้อยละ 95.50 จะเห็นได้ว่า เกษตรกรทุกคนมีการจัดโปรแกรมวัคซีนป้องกันโรคตามคำแนะนำของสัตวแพทย์ แต่พบว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ร้อยละ 71.20 ไม่เคยทำการทดสอบโรคประจำปี เช่น โรคแท้งติดต่อ และวัณโรค เป็นต้น อย่างไรก็ตาม พบว่าเกษตรกรทุกรายไม่เคยมีปัญหาโรคระบาดในฟาร์มโคนม จึงอาจทำให้เกษตรกรไม่ได้ทำการทดสอบโรคประจำปี รวมทั้งพบว่าเกษตรกรทราบสาเหตุของการเกิดโรคเต้านมอักเสบและโรคปากและเท้าเปื่อย จึงทำให้เกษตรกรมีการจัดการรีดนมและโปรแกรมวัคซีนที่ถูกต้อง

สำหรับการจดบันทึกสุขภาพของโคนมในฟาร์ม พบว่าเกษตรกรมีการจดบันทึกสุขภาพโคนมทุกครั้ง ร้อยละ 66.70 จดบันทึกเป็นครั้งคราวร้อยละ 22.70 และไม่มีการจดบันทึกร้อยละ 10.60 จะเห็นได้ว่า เกษตรกรมีการจดบันทึกข้อมูลสุขภาพของโคในฟาร์ม ซึ่งจะช่วยทำให้มีข้อมูลด้านสุขภาพของโคนมในฟาร์มไว้ใช้ในการจัดการฟาร์มด้านการสุขาภิบาลและป้องกันโรคต่อไป ขณะที่รายงานของ ประเสริฐ โพธิ์กาด และคณะ (2554) ที่ศึกษาการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีกรณีศึกษาจังหวัดสุโขทัย พบว่าเกษตรกรมีปัญหาด้านการจดบันทึกข้อมูลการใช้ยาสำหรับโคนมในฟาร์มและข้อมูลด้านสุขภาพ เพราะเกษตรกรส่วนใหญ่ไม่มีเวลาและมีความยุ่งยากในการบันทึกข้อมูล เช่นเดียวกับ นาม บัวทอง (2551) รายงานว่าเกษตรกรยังขาดคู่มือการจัดการฟาร์มที่มีรายละเอียดของการจัดการเลี้ยงโคนมในระยะต่าง ๆ การให้อาหาร การป้องกันและควบคุมโรค รวมถึงการจดบันทึกสุขภาพโคนมที่ปฏิบัติบ้างไม่ปฏิบัติบ้าง เช่น อายุ น้ำหนัก เพศ พันธุ์ประวัติสายเลือด เป็นต้น

ความรู้ของเกษตรกรในการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551

จากผลการศึกษาความรู้ของเกษตรกร ในการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 โดยพิจารณาจาก 9 องค์ประกอบ ได้แก่ ด้านองค์ประกอบฟาร์ม ด้านอาหารสำหรับโคนม ด้านน้ำสำหรับโคนม ด้านการจัดการฟาร์ม ด้านสุขภาพสัตว์ ด้านสวัสดิภาพสัตว์ ด้านสิ่งแวดล้อม ด้านการผลิตน้ำนมดิบ และด้านการบันทึกข้อมูล พบว่าจากคะแนนเต็ม 34 คะแนน เกษตรกรได้คะแนนสูงสุด 34 คะแนน และคะแนนต่ำสุด 24 คะแนน คะแนนเฉลี่ย 29.48±1.85 คะแนน เมื่อพิจารณาร้อยละของเกษตรกรที่ตอบคำถามในแต่ละประเด็นความรู้ถูกต้อง พบว่าองค์ประกอบที่เกษตรกรตอบถูกมากที่สุดคือ ด้านองค์ประกอบฟาร์ม คิดเป็นร้อยละ 99.75 รองลงมา ได้แก่ ด้านการผลิตน้ำนมดิบ คิดเป็นร้อยละ 99.43 ด้านสวัสดิภาพสัตว์ คิดเป็นร้อยละ 98.48 ด้านสิ่งแวดล้อม คิดเป็นร้อยละ 98.48 ด้านน้ำสำหรับโคนม คิดเป็นร้อยละ 93.94 ด้านการบันทึกข้อมูล คิดเป็นร้อยละ 84.09 ด้านอาหารสำหรับโคนม คิดเป็นร้อยละ 83.94 ด้านการจัดการฟาร์ม คิดเป็นร้อยละ 72.98 และด้านสุขภาพสัตว์ คิดเป็นร้อยละ 59.47 (Figure 1)

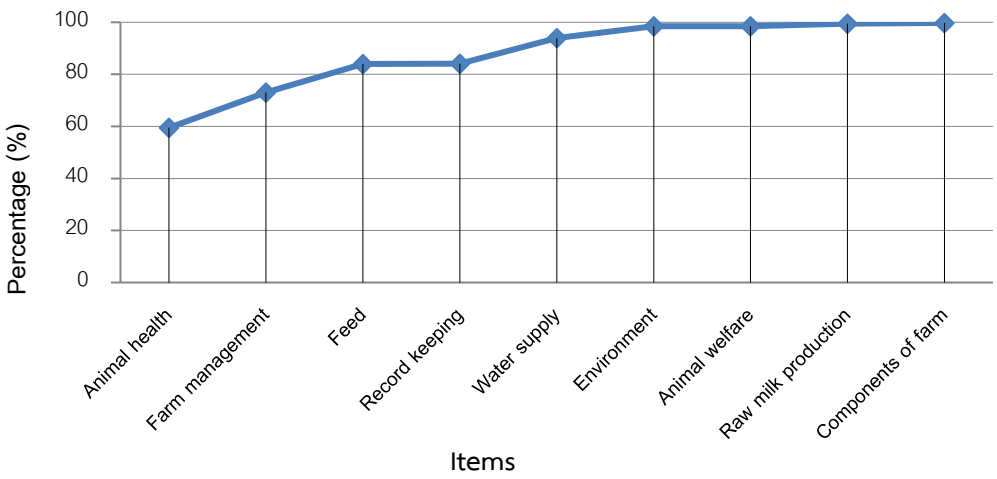

Figure 1 The percentage of knowledge on Good Agricultural Practice for dairy cattle farm of dairy farmer.

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาเป็นคะแนนแล้วสามารถแบ่งระดับความรู้ดังแสดงใน Table 1 พบว่า เกษตรกรร้อยละ 94.12 มีระดับความรู้ด้านการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 อยู่ในระดับดี โดยได้คะแนนระหว่าง 34-27 คะแนน รองลงมาเกษตรกรร้อยละ 5.88 มีความรู้อยู่ในระดับปานกลาง โดยได้คะแนนระหว่าง 26-20 คะแนน ซึ่งเมื่อพิจารณาร่วมกับการจัดการฟาร์มโคนมของเกษตรกรทั้งในด้านพันธุ์โค ด้านอาหารโคนม ด้านการจัดการฟาร์มโคนม และด้านโรคและสุขาภิบาลโคนม จะเห็นได้ว่าการจัดการที่เกษตรกรปฏิบัติอยู่นั้นมีความสอดคล้องกับแนวปฏิบัติของการจัดการฟาร์ม โคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 และจากคะแนนความรู้ของเกษตรกรเอง ทำให้พบว่าเกษตรกรมีความรู้ในเรื่องการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 อยู่ในระดับดี อย่างไรก็ตาม จากผลการวิจัย พบว่าการที่เกษตรกรยังไม่ได้รับการรับรองมาตรฐานฟาร์มและเกษตรกรที่ไม่ต้องการการรับรองมาตรฐานฟาร์มนั้น เนื่องจากปัญหาด้านอื่น ๆ ได้แก่ เกษตรกรมีอายุมาก (เฉลี่ย 49.32±10.16 ปี) ซึ่งไม่ต้องการปรับเปลี่ยนหรือดำเนินการปรับกระบวนการผลิต และขาดแรงจูงใจในการขอรับรองมาตรฐานฟาร์ม เนื่องจากการปฏิบัติที่เกษตรกรดำเนินการอยู่นั้น ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อการทำฟาร์ม เช่น ปัญหาคุณภาพน้ำนม และปัญหาด้านโรคและการสุขาภิบาล เช่นเดียวกับรายงานของ ประเสริฐ โพธิ์กาด และคณะ (2554) พบว่าปัญหาการเข้าสู่ระบบมาตรฐานฟาร์มโคนมของเกษตรกรจังหวัดสุโขทัย คือ เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมที่มีอายุมาก และไม่มีลูกหลานสืบทอดอาชีพในการเลี้ยงโคนมต่อ จึงมีผลต่อการปรับปรุงพัฒนาฟาร์มโคนม และอาจจะเลิกอาชีพการเลี้ยงโคนม

Table 1 The level of knowledge on Good Agricultural Practice for dairy cattle farm of dairy farmer (n=66).

Level of knowledge	Number of dairy farmers	Percentage
High	64	94.12
Medium (26 to 20)	2	5.88
Low (<20)	0	0.00
Total	66	100.00

ปัญหาและข้อเสนอแนะในการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551

จากผลการวิจัย พบว่า ปัญหาในการจัดการฟาร์มโคนมของเกษตรกร ได้แก่ โคนมมีอัตราการผสมติดต่ำ วัตถุดิบอาหารสัตว์มีราคาแพง ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง รวมทั้งคุณภาพของอาหารหยาบไม่แน่นอนส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของน้ำนมดิบ นอกจากนี้ ยังมีปัญหาโรคปากและเท้าเปื่อย และโรคเต้านมอักเสบ ซึ่งปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ส่งผลต่อการจัดการฟาร์มเพื่อเข้าสู่มาตรฐานฟาร์ม สำหรับข้อเสนอแนะในการจัดการฟาร์มโคนมนั้น เกษตรกรต้องการให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องเข้ามาดูแล และให้ความรู้อย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับการจัดการฟาร์มโคนม ตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 รวมทั้งควรมีมาตรการสร้างแรงจูงใจเพื่อให้ปรับเปลี่ยนการจากการเลี้ยงโคนมแบบเดิมมาเข้าสู่ระบบมาตรฐานฟาร์ม

สรุปผลการศึกษา

ผลการวิจัย พบว่าการจัดการฟาร์มโคนมของเกษตรกร โดยแบ่งเป็น 4 ด้าน ได้แก่ ด้านพันธุ์โคนม ด้านอาหารโคนม ด้านการจัดการฟาร์มโคนม และด้านโรคและสุขาภิบาลโคนม พบว่า มีการจัดการฟาร์มที่ดี และเกษตรกรมีความรู้ในเรื่องการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 อยู่ในระดับดี ซึ่งหากพิจารณาร่วมกับการจัดการฟาร์มโคนมของเกษตรกรทั้งในด้านพันธุ์โค ด้านอาหารโคนม ด้านการจัดการฟาร์มโคนม และด้านโรคและสุขาภิบาลโคนม จะเห็นได้ว่า การจัดการที่เกษตรกรปฏิบัติอยู่นั้นมีความสอดคล้องกับแนวปฏิบัติของการจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนมตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 แต่ทั้งนี้ เกษตรกรส่วนใหญ่ยังไม่ได้ให้ความสำคัญต่อการขอรับรองมาตรฐานฟาร์มโคนมมากนัก ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรมีการให้ความรู้ ความเข้าใจ การจัดแลกเปลี่ยนเรียนรู้ หรือศึกษาดูงาน รวมถึงสร้างแรงจูงใจเพื่อให้เกษตรกรเห็นความสำคัญของการจัดการฟาร์มตามมาตรฐานฟาร์มโคนมมากขึ้น เช่น การเพิ่มราคารับซื้อน้ำนมให้แก่ฟาร์มโคนมที่ได้รับการรับรองมาตรฐานฟาร์ม เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2552. องค์ความรู้ด้านปศุสัตว์ ตารางคุณค่าทางโภชนะของวัตถุดิบ. http://km.dld.go.th/th/ index.php/th/research-system/knowledge-office/149-kmproduction-cat/159-2009-12-24-03-18-19 (22 ตุลาคม 2562).

จารุวรรณ วงค์ทะเนตร และลักขณา มุ่งวัฒนา. 2557. เทคโนโลยีสะอาดของการจัดการของเสียในฟาร์มโคนม จังหวัดราชบุรี. *วารสารวิชาการเทคโนโลยีอุตสาหกรรม* 10(1): 38-49.

นาม บัวทอง. 2551. ผลของความถี่ในการใช้น้ำยาซีเอ็มที การอาบน้ำและการใช้ไลเนอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อต่อคุณภาพน้ำนมดิบ: กรณีศึกษาสหกรณ์โคนมกำแพงแสน จำกัด. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2552. กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับฟาร์มโคนม ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนพิเศษ 186 ง 28 ธันวาคม 2552. https://www.acfs.go.th/standard/download/GAP_dairy_cattle_farm.pdf (27 พฤศจิกายน 2561).

ประเสริฐ โพธิ์กาด, จิตติมา กันตนามัลลกุล และมณฑิชา พุทซาคำ. 2554. การจัดการฟาร์มโคนมตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี: กรณีศึกษาจังหวัดสุโขทัย. ปริญญาเกษตรศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, นนทบุรี.

เมธา วรรณพัฒน์. 2533. *โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง*. กรุงเทพฯ: ฟันนี่พลับบลิชชิ่ง จำกัด.

ฤทัยรัตน์ ผจญไพรี. 2557. *การใช้จำนวนเซลล์โซมาติกในการประเมินการรีดนมและการจัดการฟาร์มต่อเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาหารในฟาร์มโคนมของสหกรณ์โคนมท่าม่วง จำกัด*. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสารกรมปศุสัตว์. 2562. *ข้อมูลเกษตรกรและปศุสัตว์ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562*. http://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report/323-report-thailand-livestock/reportservey2562 (2 ตุลาคม 2562).

สมศักดิ์ รุ้งแก้ว. 2557. ศึกษาการบริหารจัดการมาตรฐานฟาร์มที่เหมาะสมของเกษตรกรสมาชิกสหกรณ์โคนมแม่ออน.ปริญญารัฐศาสนศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่.

สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดประจวบคีรีขันธ์. 2561. ส่งเสริมการพัฒนาฟาร์มโคนมอินทรีย์และพัฒนาระบบน้ำนมดิบ. http://pvlo-pkk.dld.go.th/webnew/index.php/th/organization-menu/planning-menu/organic-cattle-cat/473-2561 (2 ตุลาคม 2562).

Bloom, B. S. 1971. *Handbook on formative and summative evaluation of student learning*. New York: McGraw-Hill.

Khejornsart, P., and Wanapat, M. 2011. Effect of various chemical treated-rice straws on rumen fermentation characteristic using *in vitro* gas production technique. *Livestock Research for Rural Development* 9: 3070-3076.

วันรับบทความ (Received date) : 28 ต.ค. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 18 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

การตัดสินใจในการเลือกระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางพารา อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา

Decision Making in Selection of Rubber Tapping Systems of Rubber Farmers in Na Thawi District, Songkhla Province

พรวิกา มากวิจิต[1*] และบัญชา สมบูรณ์สุข[1]
Pornwika Makwijit[1*] and Buncha Somboonsuke[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระบบกรีดและเงื่อนไขในการตัดสินใจในการเลือกระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางพารา โดยทำการศึกษาจากครัวเรือนเกษตรกรชาวสวนยางพาราในพื้นที่อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา จำนวน 382 ครัวเรือน เก็บรวบรวมข้อมูลโดยใช้แบบสัมภาษณ์แบบมีโครงสร้าง สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ การกระจายความถี่ ค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่า ระบบกรีดยางพาราที่เกษตรกรเลือกใช้ในพื้นที่แบ่งเป็น 2 ระบบกรีดหลัก ระบบแรก คือ ระบบกรีดตามที่สถาบันวิจัยยางแนะนำ คิดเป็นร้อยละ 29.32 และระบบที่สองคือ ระบบกรีดที่เกิดจากเกษตรกรเป็นผู้กำหนดขึ้นเอง คิดเป็นร้อยละ 70.68 ซึ่งระบบกรีดที่เกษตรกรนิยมใช้ในพื้นที่ส่วนใหญ่ ได้แก่ ระบบกรีด 1/3S 3d/4, 1/2S 3d/4, 1/2S 2d/3, 1/2S d/2, 1/3S d/1 และ 1/3S 2d/3 คิดเป็นร้อยละ 30.37, 30.10, 16.75, 7.07, 4.97 และ 2.88 ตามลำดับ เกษตรกรชาวสวนยางพาราจะเลือกใช้ระบบกรีดที่มีความถี่กรีดสูง (วัดกรีด) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการตัดสินใจเลือกระบบกรีดที่สำคัญระดับมาก 3 อันดับแรก ได้แก่ ราคายางที่ต่ำลง ($\bar{x}$ = 4.08, SD = 0.84) รายได้จากการทำสวนยาง ($\bar{x}$ = 4.04, SD = 1.45) และอายุต้นยางที่กรีด ($\bar{x}$ = 4.02, SD = 0.92) เกษตรกรส่วนใหญ่ ร้อยละ 70.94 เมื่อเปิดกรีดแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงระบบกรีด สาเหตุหลักที่ทำให้เกษตรกรเปลี่ยนแปลงระบบกรีด คือ ต้องการรายได้เพิ่ม การเปลี่ยนแปลงฤดูกาล และอายุยางที่เพิ่มขึ้น คิดเป็นร้อยละ 38.22, 35.34 และ 21.99 ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงระบบกรีดของเกษตรกรจะใช้ลักษณะการเปลี่ยนแปลงความถี่ (วันกรีด) และการเปลี่ยนแปลงความยาวของหน้ากรีด

คำสำคัญ: ระบบกรีดยางพารา การตัดสินใจเลือกระบบกรีดยางพารา เงื่อนไขการตัดสินใจ ปัจจัยที่มีผลต่อการตัดสินใจ

Abstract

The aim of this study was to examine the rubber tapping systems and the factors affecting the decision making of rubber farmers in the selection of rubber tapping systems. 382 households in Na Thawi district, Songkhla province, were selected to be involved in this study. Structured-interview questionnaires were used for data collection. Frequency distribution, percentage, mean, and standard deviation were the statistics used for data analysis. The results of the study indicated that the rubber tapping systems that farmers chose to use in the area could be classified into 2 main tapping systems. The first tapping system was the one suggested by the Rubber Research Institute, and 29.32% of farmers opted for it. The second system, which was the one commonly used by rubber farmers, had been adopted by 70.68% of farmers. However, the study found that the tapping systems that farmers preferred for general use were the 1/3S 3d/4, 1/2S 3d/4, 1/2S 2d/3, 1/2S d/2, 1/3S d/1, and 1/3S 2d/3 systems, which they endorsed at the percentage levels of 30.37, 30.10, 16.75, 7.07, 4.97, and 2.88, respectively. Rubber farmers tended to choose the tapping system that had a high tapping frequency (tapping days.) Three factors affected the farmers' decisions when choosing a tapping system. Those were the decrease in rubber prices ($\bar{x}$ = 4.08, SD = 0.84), incomes from rubber plantations ($\bar{x}$ = 4.04, SD = 1.45), and the age of rubber trees ($\bar{x}$ = 4.02, SD = 0.92). Most of the farmers (70.94%) had changed their tapping system at some point after opening their tapping businesses. Farmers who had changed their tapping systems in the past reported that they had done so for three main reasons. Firstly, they made changes because they wanted to increase their incomes (38.22% of farmers). Secondly, they changed the way they tapped because of changes in the season or climate (35.34%). Thirdly, farmers tried to compensate for the increasing age of their trees by modifying their tapping methods (21.99%). When changing tapping systems, rubber farmers changed the frequency of tapping (tapping days) and the tapping mark lengths.

Keywords: rubber tapping system, decision making in the selection of rubber tapping systems, decision conditions, factors affecting decision making

[1] คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90110
[1] Faculty of Natural Resources, Prince of Songkhla University, Hat Yai, Songkhla 90110
*Corresponding author, Email: pornwika.pm@gmail.com

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีการผลิตและการส่งออกสินค้าเกษตรหลากหลายชนิด ซึ่งสร้างรายได้ให้แก่ประเทศเป็นจำนวนมาก ยางพาราถือเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทยที่มีการเพาะปลูกทั่วทุกภูมิภาค (กรมวิชาการเกษตร, 2552) ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมาประเทศไทยมีเนื้อที่กรีดเพิ่มขึ้นร้อยละ 6.00 ต่อปี โดยเพิ่มขึ้นจาก 15.60 ล้านไร่ ในปี พ.ศ. 2555 เป็น 19.55 ล้านไร่ ในปี พ.ศ. 2559 ในขณะที่ผลผลิตเพิ่มขึ้นจาก 3.89 ล้านตัน ในปี พ.ศ. 2555 เป็น 4.16 ล้านตัน ในปี พ.ศ. 2559 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.14 ต่อปี ในขณะที่ผลผลิตต่อไร่ลดลงจาก 263 กิโลกรัมต่อไร่ ในปี พ.ศ. 2555 เหลือ 224 กิโลกรัมต่อไร่ ในปี พ.ศ. 2559 หรือลดลงร้อยละ 4.32 ต่อปี เนื้อที่กรีดได้และผลผลิตเพิ่มขึ้นเนื่องจากนโยบายสนับสนุนการขยายเนื้อที่ปลูกยางพาราของรัฐบาล ประกอบกับในช่วงปี พ.ศ. 2553-2554 ราคายางพาราอยู่ในระดับสูงจูงใจให้เกษตรกรขยายเนื้อที่ปลูกโดยเฉพาะในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนผลผลิตต่อไร่ที่มีแนวโน้มลดลงเนื่องจากมีพื้นที่เปิดกรีดใหม่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ได้ผลผลิตต่อไร่ต่ำ โดยปัจจุบันประเทศไทยมีเนื้อที่ปลูกยางพารามากเป็นอันดับ 2 ของโลก 19.55 ล้านไร่ รองจากอินโดนีเซีย แต่ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีผลผลิตยางพารามากที่สุดของโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) ซึ่งผลผลิตยางพาราส่วนใหญ่ร้อยละ 95 มาจากสวนยางพาราขนาดเล็กที่มีเกษตรกรชาวสวนยางพารารายย่อยเป็นเจ้าของกว่า 1.1 ล้านครัวเรือน (ปิยากร นวลแก้ว, 2559) โดยภาคใต้มีพื้นที่ปลูกยางพารามากที่สุดจำนวน 14.57 ล้านไร่ มีเนื้อที่กรีดยางได้ 12.96 ล้านไร่ จังหวัดที่มีพื้นที่กรีดยางพารามากที่สุด 3 อันดับแรก คือ สุราษฎร์ธานี พื้นที่กรีด 2.58 ล้านไร่ มีผลผลิตต่อไร่ 259 กิโลกรัม สงขลา พื้นที่กรีด 1.83 ล้านไร่ มีผลผลิตต่อไร่ 263 กิโลกรัม และนครศรีธรรมราช พื้นที่กรีด 1.67 ล้านไร่ มีผลผลิตต่อไร่ 242 กิโลกรัม (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) ยางพาราถือได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของอำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา เกษตรกรส่วนใหญ่มีการประกอบอาชีพการทำสวนยางพาราคิดเป็นร้อยละ 57.97 ของจำนวนครัวเรือนทั้งหมด (การยางแห่งประเทศไทย, 2559) ซึ่งอำเภอนาทวีมีพื้นที่ปลูกยางพาราทั้งหมด 281,015 ไร่ (สำนักงานเกษตรอำเภอนาทวี, 2556) โดยมีวิธีการเก็บเกี่ยวผลผลิตยางพารา ได้แก่ การกรีดยางพาราและสารเคมีเร่งน้ำยาง

ในปัจจุบันสถานการณ์ราคายางพาราตกต่ำ ส่งผลกระทบต่อรายได้ทำให้เกษตรกรชาวสวนยางพาราต้องการเร่งเพิ่มผลผลิตของตนเองให้สูงขึ้นนำไปสู่การเพิ่มรายได้ของครัวเรือน ซึ่งในการเพิ่มผลผลิตยางพาราเกษตรกรจะปรับเปลี่ยนการใช้ระบบกรีดที่มีความถี่มากกว่าระบบกรีดที่สถาบันวิจัยยางแนะนำ จากการศึกษาของ บัญชา สมบูรณ์สุข และคณะ (2554) เรื่องผลของการปรับปรุงระบบกรีดต่อเศรษฐกิจและสังคมของเกษตรกรชาวสวนยางขนาดเล็ก พบว่าเกษตรกรชาวสวนยางพาราในจังหวัดสงขลาเลือกใช้ระบบกรีดแตกต่างกันถึง 10 ระบบกรีด เกษตรกรชาวสวนยางพาราร้อยละ 20.7 เลือกระบบกรีดครึ่งลำต้น กรีดวันเว้นวัน (1/2S d/2), ระบบกรีดครึ่งลำต้น กรีดสองวันเว้นวัน (1/2S 2d/3) และระบบกรีดครึ่งลำต้น กรีดสามวันเว้นวัน (1/2S 3d/4) ร้อยละ 15.2 เลือกระบบกรีดหนึ่งในสามของลำต้น กรีดสองวันเว้นวัน (1/3S 2d/3) ร้อยละ 33.7 เลือกระบบกรีดหนึ่งในสามของลำต้น กรีดสามวันเว้นวัน (1/3S 3d/4) ร้อยละ 6.5 เลือกระบบกรีดหนึ่งในสามของลำต้น กรีดสี่วันเว้นวัน (1/3S 4d/5) และร้อยละ 4.3 เลือกระบบกรีดครึ่งลำต้น กรีดสี่วันเว้นวัน (1/2S 4d/5), ระบบกรีดหนึ่งในสามของลำต้น กรีดห้าวันเว้นวัน (1/3S 5d/6) ระบบกรีดหนึ่งในสามของลำต้น กรีดหกวันเว้นวัน (1/3S 6d/7) และระบบกรีดหนึ่งในสามของลำต้น กรีดทุกวัน (1/3S d/1) ซึ่งระบบกรีดที่ถูกต้องตามหลักวิชาการที่สถาบันวิจัยยางแนะนำ คือระบบกรีดที่มีความถี่กรีดไม่เกิน 2 วันหยุด 1 วัน แต่ยังมีการใช้ระบบกรีดที่มีจำนวนวันกรีดมากกว่า 2 วันขึ้นไป และหยุด 1 วันอยู่ แม้ว่าระบบกรีดที่มีความถี่สูงจะได้ผลผลิตสะสมต่อปีสูงจากจำนวนวันกรีดที่มาก แต่ผลผลิตต่อครั้งกรีดค่อนข้างต่ำ อัตราการเจริญเติบโตของลำต้นลดลง ต้นยางพาราเกิดอาการเปลือกแห้งได้ง่าย เปลือกหมดเร็วไม่สามารถกรีดซ้ำเปลือกที่งอกใหม่ได้ ส่งผลให้ต้นยางมีอายุการกรีดสั้นลง และต้องโค่นเพื่อปลูกใหม่เร็วขึ้น ทำให้รายได้ต่อรอบการปลูกของเกษตรกรชาวสวนยางพาราที่ควรจะได้ลดลงไปด้วย (ปัทมา ชนะสงคราม และพเยาว์ ร่มรื่นสุขารมย์, 2549)

จากการศึกษาในเรื่องของระบบกรีดของ บัญชา สมบูรณ์สุข และคณะ (2554) พบว่าเกษตรกรยังนิยมใช้ระบบกรีดถี่สูงเป็นจำนวนมาก ซึ่งไม่ได้เป็นไปตามคำแนะนำของสถาบันวิจัยยาง และเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้ผลผลิตต่อไร่และรายได้เฉลี่ยตกต่ำ รวมถึงการเกิดโรคระบาดจำนวนมากที่เกิดจากการใช้ระบบกรีดที่ถี่หรือการกรีดที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะศึกษาเรื่องการตัดสินใจในการเลือกระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางพารา อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา เพื่อศึกษาสาเหตุที่เกษตรกรตัดสินใจเลือกใช้ระบบกรีดต่าง ๆ รวมทั้งเหตุผลที่เกษตรกรยังใช้ระบบกรีดที่มีความถี่สูงซึ่งไม่เป็นไปตามคำแนะนำของสถาบันวิจัยยาง เพื่อที่จะเสนอแนะแนวทางปรับปรุงการใช้ระบบกรีดที่ถูกต้องเหมาะสมตามหลักวิชาการกับเกษตรกรในพื้นที่ วัตถุประสงค์ของการวิจัย: เพื่อศึกษาระบบกรีดและเงื่อนไขในการตัดสินใจในการเลือกระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางพารา อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา

วิธีการศึกษา

ประชากร

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ ครัวเรือนเกษตรกรชาวสวนยางที่มีสวนยางพาราแบบเปิดกรีดแล้วในอำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา 10 ตำบล ได้แก่ ตำบลนาทวี ตำบลคลองทราย ตำบลคลองกวาง ตำบลสะท้อน ตำบลทับช้าง ตำบลประกอบ ตำบลปลักหนู ตำบลท่าประดู่ ตำบลฉาง และตำบลนาหมอศรี จำนวนทั้งสิ้น 10,636 ครัวเรือน

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทำการสุ่มตำบลโดยการสุ่มตัวอย่างแบบวิธีการสุ่มอย่างง่าย (Sample Random Sampling) จากจำนวนครัวเรือนเกษตรกรชาวสวนยางที่มีสวนยางพาราแบบเปิดกรีดแล้ว โดยทำการสุ่มตัวอย่างโดยใช้สูตร Taro Yamane (Yamane, 1973) กำหนดระดับค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 จะได้จำนวนกลุ่มตัวอย่างครัวเรือนเกษตรกรชาวสวนยางพาราที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 382 ครัวเรือน

เครื่องมือในการวิจัย

ผู้วิจัยใช้แบบสัมภาษณ์แบบมีโครงสร้างเพื่อสัมภาษณ์เกษตรกรชาวสวนยางพารา เกี่ยวกับระบบกรีดและเงื่อนไขในการตัดสินใจในการเลือกระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางในอำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา ประกอบด้วย ระบบกรีดยาง ลักษณะการกรีดยาง แหล่งเรียนรู้ระบบกรีดยาง ซึ่งลักษณะคำตอบเป็นแบบเลือกตอบได้เพียง 1 คำตอบ (Checklist) และลักษณะข้อคำถามเป็นแบบปลายเปิด (Open-ended Question) ส่วนเงื่อนไขที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระบบกรีดยางพาราโดยมีการเปลี่ยนแปลงความถี่ (วันกรีด) ในการกรีด และการเปลี่ยนแปลงความยาวของหน้ากรีด ซึ่งลักษณะคำตอบเป็นแบบตอบได้มากกว่า 1 ข้อ และระดับการตัดสินใจเลือกระบบกรีดยางพารา จำนวน 16 ข้อ โดยอ้างอิงและอาศัยแนวคิดของนันทิกา โพธิ์ทอง (2553) ซึ่งมีลักษณะเป็นแบบมาตรส่วนค่า (Rating Scale) ตามแบบของลิเคริท์ กำหนดเป็น 5 ระดับ โดยมีการกำหนดเกณฑ์ในการกำหนดค่าน้ำหนักการประเมินระดับการตัดสินใจใช้ระบบกรีดยางพาราของเกษตรกร

เกณฑ์การแปลความหมายเพื่อจัดระดับคะแนนเฉลี่ยระดับการตัดสินใจของเกษตรกรชาวสวนยางพารา กำหนดเป็นช่วงคะแนนจากค่าเฉลี่ยระดับการตัดสินใจโดยอาศัยแนวคิดของเบสท์และคาห์น (Best and Kahn, 1993) ดังนี้

คะแนนเฉลี่ย	ความหมาย
4.51 - 5.00	มีผลต่อระดับการตัดสินใจเลือกระบบกรีดมากที่สุด
3.51 – 4.50	มีผลต่อระดับการตัดสินใจเลือกระบบกรีดมาก
2.51 – 3.50	มีผลต่อระดับการตัดสินใจเลือกระบบกรีดปานกลาง
1.51 - 2.50	มีผลต่อระดับการตัดสินใจเลือกระบบกรีดน้อย
1.00 – 1.50	มีผลต่อระดับการตัดสินใจเลือกระบบกรีดน้อยที่สุด

การเก็บรวบรวมข้อมูล

มีวิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล ดังนี้ (1) ข้อมูลทุติยภูมิ (Secondary Data) เป็นการศึกษาข้อมูลที่มีการเก็บรวบรวมไว้แล้วในเรื่องของข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับระบบกรีดยางพารา การตัดสินใจ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เพื่อสร้างองค์ความรู้ความเข้าใจให้แก่ผู้วิจัยและใช้เป็นฐานวิชาการในการวิจัย (2) ข้อมูลปฐมภูมิ (Primary Data) เป็นข้อมูลที่ผู้วิจัยทำการเก็บรวบรวมข้อมูลจากภาคสนามเพื่อให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการวิจัย ในพื้นที่อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา โดยมีการสุ่มตัวอย่าง คือ ครัวเรือนเกษตรกรชาวสวนยางพาราที่เปิดกรีดแล้วในอำเภอนาทวี รวมทั้งสิ้น 382 ครัวเรือน โดยแบบสัมภาษณ์ผ่านการวัดความถูกต้องโดยใช้ IOC ให้ผู้ทรงคุณวุฒิ 3 ท่าน ทำการประเมินข้อคำถาม

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) ด้วยเครื่องมือคอมพิวเตอร์โปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูลทางสังคมศาสตร์เลือกใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive Statistics) ได้แก่ การกระจายความถี่ (Frequency Distribution) ค่าร้อยละ (Percentage) ค่าเฉลี่ย (Average) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ระบบกรีดยางพารา

ระบบกรีดยางพาราที่เกษตรกรเลือกใช้ในพื้นที่ แบ่งออกเป็น 2 ระบบกรีดหลัก คือ ระบบกรีดตามที่สถาบันวิจัยยางแนะนำ คิดเป็นร้อยละ 29.32 (ระบบกรีดที่มีความถี่กรีด ไม่เกิน 2 วันหยุด 1 วัน เช่น กรีดครึ่งลำต้นวันเว้นวัน กรีดครึ่งลำต้น

สองวันเว้นวัน กรีดหนึ่งในสามของลำต้นวันเว้นวัน กรีดหนึ่งในสามของลำต้นสองวันเว้นวัน) และระบบกรีดที่เกิดจากเกษตรกรเป็นผู้กำหนดขึ้นเอง คิดเป็นร้อยละ 70.68 (ระบบกรีดที่มีจำนวนวันกรีดมากกว่า 3 วันขึ้นไป และหยุด 1 วัน รวมถึงระบบกรีดที่มีการกรีดทุกวันหรือหยุดกรีดบางวัน เช่น กรีดครึ่งลำต้นสามวันเว้นวัน กรีดครึ่งลำต้นสี่วันเว้นวัน กรีดหนึ่งในสามของลำต้นสามวันเว้นวัน กรีดหนึ่งในสามของลำต้นสี่วันเว้นวัน กรีดหนึ่งในสามของลำต้นห้าวันเว้นวัน กรีดหนึ่งในสามของลำต้นกรีดทุกวัน) (Table 1)

Table 1 Types of rubber tapping systems.

Rubber tapping system	Percentage	Tapping system with normal frequencies	High-frequency tapping system
Slit system according to the Rubber Research Institute suggests	29.32	1. (1/2S d/3) 2. (1/2S d/2) 3. (1/2S 2d/3) 4. (1/3S 2d/3) 5. (1/3S d/2+ET2.5%)	none
Scanning system found in the area	70.68	1. (1/2S d/2) 2. (1/2S 2d/3) 3. (1/3S d/2) 4. (1/3S 2d/3)	1. (1/2S 3d/4) 2. (1/2S 4d/5) 3. (1/3S 3d/4) 4. (1/3S 4d/5) 5. (1/3S 5d/6) 6. (1/3S d/1)

*Tapping system with normal frequencies Include (1/2S d/3) tapping half of the trunk-day cease two days, (1/2S d/2) tapping half of the trunk-day cease days, (1/2S 2d/3) tapping half the trunk-Two every other day, (1/3S 2d/3) tapping a third of the trunk-Two every other day, and (1/3S d/2+ET2.5%) tapping a third of the trunk-day cease days.+ ET2.5%.

**High-frequency tapping system Include (1/2S 3d/4) tapping half of the trunk-Three every other day, (1/2S 4d/5) tapping half of the trunk-Four every other day, (1/3S 3d/4) tapping a third of the trunk-Three every other day, (1/3S 4d/5) tapping a third of the trunk-Four every other day, (1/3S 5d/6) tapping a third of the trunk- Five every other day, and (1/3S d/1) tapping a third of the trunk- tapping every day.

ระบบกรีดยางพาราที่เกษตรกรเลือกใช้ที่พบในพื้นที่อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา มี 10 ระบบกรีด ได้แก่ ระบบกรีด 1/3S 3d/4, 1/2S 3d/4, 1/2S 2d/3, 1/2S d/2, 1/3S d/1, 1/3S 2d/3, 1/3S d/2, 1/3S 5d/6, 1/2S 4d/5 และ 1/3S 4d/5 ซึ่งระบบกรีดยางพาราที่นิยมใช้ส่วนใหญ่ที่พบในพื้นที่มี 6 ระบบกรีด ได้แก่ ระบบกรีด 1/3S 3d/4 คิดเป็นร้อยละ 30.37 ระบบกรีด 1/2S 3d/4 คิดเป็นร้อยละ 30.10 ระบบกรีด 1/2S 2d/3 คิดเป็นร้อยละ 16.75 ระบบกรีด 1/2S d/2 คิดเป็นร้อยละ 7.07 ระบบกรีด 1/3S d/1 คิดเป็นร้อยละ 4.97 และระบบกรีด 1/3S 2d/3 คิดเป็นร้อยละ 2.88 (Figure 1) จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าระบบกรีดยางพาราที่เกษตรกรชาวสวนยางพาราในพื้นที่อำเภอนาทวีนิยมใช้เป็นระบบกรีดที่มีความถี่กรีดสูง และเป็นระบบกรีดที่ไม่ใช่ระบบกรีดตามที่สถาบันวิจัยยางแนะนำ

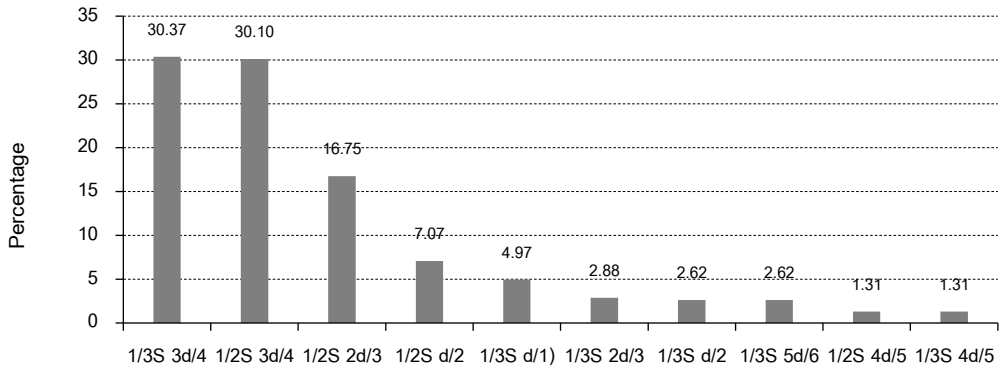

Figure 1 Rubber tapping system in Na Thawi district Songkhla province.

ลักษณะการกรีดยางพารา

จาก Table 2 พบว่าเกษตรกรชาวสวนยางพาราส่วนใหญ่มีลักษณะการกรีดยางพาราในสวนยางพาราแบบเปิดกรีดเองทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 60.73 รองลงมามีการจ้างกรีดทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 19.37 กรีดเองบางส่วน คิดเป็นร้อยละ 10.73 และกรีดในสวนตนเองและรับจ้างกรีดในสวนยางอื่น คิดเป็นร้อยละ 9.17 ซึ่งระบบกรีดยางพาราที่เกษตรกรตัดสินใจใช้ส่วนใหญ่ เจ้าของสวนยางพาราจะเป็นผู้เลือกใช้ระบบกรีดเอง คิดเป็นร้อยละ 89.01 ในขณะที่ผู้รับจ้างกรีดจะเป็นผู้เลือกใช้ระบบกรีดเอง คิดเป็นร้อยละ 10.99 และมีแหล่งเรียนรู้ระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางพาราส่วนใหญ่จะเรียนรู้ด้วยตัวเอง คิดเป็นร้อยละ 60.99 รองลงมาจะเรียนรู้จากคนในครอบครัว คิดเป็นร้อยละ 25.92 เรียนรู้จากเจ้าหน้าที่การยางแห่งประเทศไทย (กยท.) คิดเป็นร้อยละ 10.47 และเรียนรู้จากผู้จ้างกรีด (นายจ้าง) คิดเป็นร้อยละ 2.62 ตามลำดับ

Table 2 Percentage of rubber tapping characteristics (n=382).

Information	Frequency Distribution	Percentage
Characteristics of rubber tapping in rubber plantations of farmers		
All by yourself	232	60.73
Cut yourself some	41	10.73
Hire all the slits	74	19.37
Tapping in one's own garden and contracting to cut in other rubber plantations	35	9.17
Decision to use rubber tapping system		
Rubber plantation owner	340	89.01
Labor hire	42	10.99
Learning sources of rubber tapping systems		
The farmer himself	233	60.99
Family member	99	25.92
Employer tapping (employer)	10	2.62
Rubber Authority of Thailand	40	10.47

ปัจจัยที่มีผลต่อการตัดสินใจเลือกระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรสวนยางพารา

ปัจจัยที่มีผลต่อการตัดสินใจเลือกระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางพาราในพื้นที่ทั้ง 6 ระบบกรีดที่สำคัญระดับมาก 3 อันดับแรก ได้แก่ ปัจจัยด้านราคายางที่ต่ำลง ($\bar{x}$ = 4.08, SD = 0.84) พบว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการตัดสินใจเลือกระบบกรีดยางพารา เกษตรกรจะเลือกระบบกรีดที่มีความถี่กรีดสูงโดยเพิ่มจำนวนวันกรีดเพื่อเพิ่มรายได้ เนื่องจากราคายางที่ต่ำลงทำให้เกษตรกรมีรายได้ในแต่ละวันไม่เพียงพอจึงจำเป็นต้องเลือกใช้ระบบกรีดที่มีความถี่กรีดสูง ส่วนปัจจัยด้านรายได้จากการทำสวนยาง ($\bar{x}$ = 4.04, SD = 1.45) พบว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญในการตัดสินใจเลือกระบบกรีดยางพารารองลงมาจากปัจจัยด้านราคายางที่ต่ำลง เกษตรกรจะเลือกระบบกรีดที่มีความถี่กรีดสูงเพื่อต้องการรายได้ที่เพิ่มขึ้น โดยไม่คำนึงถึงผลกระทบที่จะตามมาจากการเพิ่มจำนวนวันกรีด และด้านอายุต้นยางที่กรีด ($\bar{x}$ = 4.02, SD = 0.92) พบว่ายางพาราที่เพิ่งเปิดกรีดอายุยังน้อย เกษตรกรจะเลือกใช้ระบบกรีดที่มีความถี่ต่ำเนื่องจากต้นยางพารายังอยู่ในระยะการเจริญเติบโตค่อนข้างสูง การกรีดยางมากเกินไปจะทำให้ต้นยางพาราชะงักการเจริญเติบโตได้ และเมื่อยางพารามีอายุมากขึ้นถึงใกล้โค่นเกษตรกรจะเลือกใช้ระบบกรีดที่มีความถี่กรีดสูงตลอดจนกรีดติดต่อกันทุกวัน (Table 3)

Table 3 The level of decision to choose the rubber tapping system of the rubber planters (n=382).

Factors affecting the decision to choose the rubber tapping system	Mean	SD	The level of decision to choose the rubber tapping system
1. Rubber prices that are lower	4.08	0.84	Much
2. Income from rubber plantation	4.04	1.45	Much
3. The age of the rubber tree	4.02	0.92	Much
4. Debt	3.97	1.06	Much
5. Proficiency in tapping	3.69	0.94	Much
6. Age of farmers	3.58	1.04	Much
7. Size of rubber planting areas	3.48	0.84	Moderate
8. The tapping system you decide to use result in a shorter cut time wasting a lot of rubber bark.	3.47	0.96	Moderate
9. Scaling system recommended by the research institute	3.45	0.94	Moderate
10. Number of labor tapping in the household	3.37	1.02	Moderate
11. Area condition	3.26	0.75	Moderate
12. Number of household members	3.13	0.99	Moderate
13. The education level of farmer	3.04	1.12	Moderate
14. Income from supplementary careers	3.03	1.20	Moderate
15. Information received	2.94	0.93	Moderate
16. The slit system that the neighbors choose	2.86	1.05	Moderate

เงื่อนไขที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการใช้ระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรสวนยางพารา

จากการศึกษาพบว่าเกษตรกรชาวสวนยางพาราเลือกใช้ระบบกรีดที่มีความถี่กรีดสูง เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิต และรายได้ ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่ ร้อยละ 70.94 มีการเปลี่ยนแปลงระบบกรีดเมื่อเปิดกรีดแล้ว โดยมีสาเหตุหลักที่ทำให้เกษตรกรเปลี่ยนแปลงระบบกรีด คือ ต้องการรายได้เพิ่ม คิดเป็นร้อยละ 38.22 รองลงมาคือ ฤดูกาล คิดเป็นร้อยละ 35.34 อายุยางที่มากขึ้น คิดเป็นร้อยละ 21.99 และสาเหตุอื่น ๆ คิดเป็นร้อยละ 4.45 (Table 4) ซึ่งเงื่อนไขที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางพาราในพื้นที่ แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ เงื่อนไขที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ (วันกรีด) และเงื่อนไขที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความยาวหน้ากรีด

Table 4 Percentage of the decision to change the rubber tapping system of white rubber farmers when opening the tapping (n=382).

Information	Frequency Distribution	Percentage
Changes in the rubber tree tapping system		
Change	271	70.94
Not change	111	29.06
Reasons to change the rubber tapping system		
More old tires	84	21.99
Need more income	146	38.22
Season	135	35.34
Other	17	4.45

เงื่อนไขที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ (วันกรีด)

การเปลี่ยนแปลงระบบกรีดยางพาราโดยการเปลี่ยนแปลงความถี่หรือจำแนกวันกรีด เป็นรูปแบบที่พบได้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 71.99 ของเกษตรกรที่เปลี่ยนแปลงระบบกรีดยางพารา จำแนกตามระบบกรีด พบว่า ระบบกรีด 1/3S 3d/4 เกษตรกรส่วนใหญ่พิจารณาเงื่อนไขในด้านให้น้ำยางปริมาณมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 36.10 รองลงมาคือ ราคายางที่ต่ำลง คิดเป็นร้อยละ 34.60 และหน้ากรีดเกิดโรค คิดเป็นร้อยละ 31.60 ตามลำดับ ระบบกรีด 1/2S 3d/4 เกษตรกรส่วนใหญ่พิจารณาเงื่อนไขในด้านเป็นระบบที่เพื่อนบ้านเลือกใช้เป็นส่วนใหญ่ คิดเป็นร้อยละ 47.60 รองลงมาคือฝีมือการกรีดยางดีขึ้น คิดเป็นร้อยละ 44.10 และความสมบูรณ์ของเปลือกงอกดี คิดเป็นร้อยละ 37.50 ตามลำดับ ระบบกรีด 1/2S 2d/3 เกษตรกรส่วนใหญ่พิจารณาเงื่อนไขในด้านความง่ายต่อการกรีดหน้าซ้ำ คิดเป็นร้อยละ 31.10 รองลงมาคือเป็นระบบที่เพื่อนบ้านเลือกใช้เป็นส่วนใหญ่ คิดเป็นร้อยละ 23.80 และให้น้ำยางปริมาณมาก คิดเป็นร้อยละ 21.30 ตามลำดับ ระบบกรีด 1/2S d/2 เกษตรกรส่วนใหญ่พิจารณาเงื่อนไขในด้านความสมบูรณ์ของเปลือกงอกดี คิดเป็นร้อยละ 10.40 รองลงมาคือฝีมือการกรีดยางดีขึ้น คิดเป็นร้อยละ 9.00 และต้นยางมีอายุมากขึ้น ประหยัดเวลาในการกรีด คิดเป็นร้อยละ 7.10 ตามลำดับ ระบบกรีด 1/3S d/1 เกษตรกรส่วนใหญ่พิจารณาเงื่อนไขในด้านหน้ากรีดเกิดโรค คิดเป็นร้อยละ 13.20 รองลงมาคือต้นยางมีอายุมากขึ้น คิดเป็นร้อยละ 6.70 และฝีมือการกรีดยางดีขึ้น คิดเป็นร้อยละ 6.30 ตามลำดับ และระบบกรีด 1/3S 2d/3 เกษตรกรส่วนใหญ่พิจารณาเงื่อนไขในด้านเป็นระบบที่เพื่อนบ้านเลือกใช้เป็นส่วนใหญ่ คิดเป็นร้อยละ 28.60 รองลงมาคือประหยัดเวลาในการกรีด คิดเป็นร้อยละ 3.60 และความสมบูรณ์ของเปลือกงอกดี คิดเป็นร้อยละ 3.50 ตามลำดับ (Table 5)

ซึ่งเงื่อนไขที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระบบกรีดยางพาราโดยการเปลี่ยนแปลงความถี่ (วันกรีด) มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงความถี่โดยการเพิ่มจำนวนวันกรีด หรือลดจำนวนวันกรีดซึ่งพบได้น้อยในพื้นที่ จากระบบกรีด 6 ระบบที่เกี่ยวข้องกับเงื่อนไขที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระบบกรีดยางพาราโดยการเปลี่ยนแปลงความถี่ (วันกรีด) พบว่า เกษตรกรพิจารณาถึงเงื่อนไขที่พบในทุกระบบกรีด คือ 1) เงื่อนไขในด้านราคายางที่ต่ำลง คิดเป็นร้อยละ 92.50 เนื่องจากราคายางที่ต่ำลงทำให้เกษตรกรได้รับรายได้ในแต่ละครั้งกรีดไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้จ่ายในแต่ละวัน จึงเป็นเงื่อนไขที่ทำให้เกษตรกรเปลี่ยนแปลงระบบกรีดโดยการเปลี่ยนแปลงความถี่ (วันกรีด) เพิ่มขึ้น เพื่อต้องการเพิ่มรายได้โดยไม่คำนึงถึงผลกระทบต่าง ๆ ที่ตามมา 2) เงื่อนไขในด้านต้นยางมีอายุมากขึ้น คิดเป็นร้อยละ 89.40 เมื่อต้นยางพารามีอายุ 10-20 ปี ตลอดจนถึงต้นยางพาราที่โตเต็มที่แล้วหรือต้นยางพาราที่มีอายุมากใกล้โค่นเกษตรกรจะปรับเปลี่ยนเพิ่มจำนวนวันกรีดที่มากขึ้นหรือมีความถี่กรีดสูง กรีดทุกวัน เช่น เลือกใช้ระบบกรีด 1/3S 3d/4 ระบบกรีด 1/2S 3d/4 ระบบกรีด 1/3S d/1 และระบบกรีด 1/3S 2d/3 และ 3) เงื่อนไขในด้านประหยัดเวลาในการกรีด คิดเป็นร้อยละ 89.30 พบว่าเกษตรกรชาวสวนยางพาราในพื้นที่นิยมใช้ความยาวรอยกรีดแบบกรีดหนึ่งในสามของลำต้น (1/3S) มากกว่ากรีดครึ่งลำต้น (1/2S) เนื่องจากเกษตรกรต้องการระบบกรีดยางพาราที่ทำงานง่ายสะดวก สามารถใช้กับหน้ากรีดที่ไม่สม่ำเสมอซึ่งไม่เป็นอุปสรรคต่อการกรีด และเป็นความยาวหน้ากรีดที่ไม่ยาวมากเกินไป

Table 5 Percentage of conditions that affect the change of the rubber tree tapping system by changing the frequency (tapping day) (n=382).

Change frequency (day tapping)*	Rubber tapping system					
	1/3S 3d/4	1/2S 3d/4	1/2S 2d/3	1/2S d/2	1/3S d/1	1/3S 2d/3
1. Save time on tapping	24.3	32.90	16.40	7.10	5.00	3.60
2. Give a lot of latex	36.10	31.80	21.30	3.60	-	-
3. Rubber trees are older.	24.40	30.00	19.10	7.10	6.70	2.10
4. Ease of tapping repeatedly	18.90	27.80	31.10	-	-	-
5. Rubber prices that are lower.	34. 60	30.40	14.00	6.00	5.70	1.80
6. Face slits to the disease.	31.60	13.20	15.80		13.20	-
7. Good seed germination	20.80	37.50	20.80	10.40	-	3.50
8. Improved workmanship in rubber tapping	13.50	44.10	18.00	9.00	6.30	-
9. It is the system that most neighbors choose	-	47.60	23.80	-	-	28.60
10. Other	-	-	-	-	-	-

* Can answer more than 1 item.

เงื่อนไขที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความยาวหน้ากรีด

การเปลี่ยนระบบกรีดยางพาราโดยการเปลี่ยนแปลงความยาวหน้ากรีด เป็นรูปแบบที่พบค่อนข้างน้อย คิดเป็นร้อยละ 28.01 จำแนกตามระบบกรีด พบว่า ระบบกรีด 1/3S 3d/4 เกษตรกรส่วนใหญ่พิจารณาเงื่อนไขในด้านเป็นระบบที่เพื่อนบ้านเลือกใช้เป็นส่วนใหญ่ คิดเป็นร้อยละ 68.80 รองลงมาคือประหยัดเวลาในการกรีด คิดเป็นร้อยละ 37.00 และความง่ายต่อการกรีดหน้าซ้ำ คิดเป็นร้อยละ 35.50 ตามลำดับ ระบบกรีด 1/2S 3d/4 เกษตรกรส่วนใหญ่พิจารณาเงื่อนไขในด้านหน้ากรีดเกิดโรค คิดเป็นร้อยละ 60.00 รองลงมาคือความสมบูรณ์ของเปลือกงอกดี คิดเป็นร้อยละ 38.80 และฝีมือการกรีดยางดีขึ้น คิดเป็นร้อยละ 35.50 ตามลำดับ ระบบกรีด 1/2S 2d/3 เกษตรกรส่วนใหญ่พิจารณาเงื่อนไขในด้าน ฝีมือการกรีดยางดีขึ้น คิดเป็นร้อยละ 21.50 รองลงมาคือให้น้ำยางปริมาณมาก คิดเป็นร้อยละ 19.80 และความสมบูรณ์ของเปลือกงอกดี คิดเป็นร้อยละ 17.60 ตามลำดับ ระบบกรีด 1/2S d/2 เกษตรกรส่วนใหญ่พิจารณาเงื่อนไขในด้านฝีมือการกรีดยางดีขึ้น คิดเป็นร้อยละ 16.50 รองลงมาคือ ประหยัดเวลาในการกรีด คิดเป็นร้อยละ 10.00 และความสมบูรณ์ของเปลือกงอกดี คิดเป็นร้อยละ 8.80 ตามลำดับ ระบบกรีด 1/3S d/1 เกษตรกรส่วนใหญ่พิจารณาเงื่อนไขในด้านประหยัดเวลาในการกรีด คิดเป็นร้อยละ 7.00 รองลงมาคือต้นยางมีอายุมากขึ้น คิดเป็นร้อยละ 6.70 และความง่ายต่อการกรีดหน้าซ้ำ คิดเป็นร้อยละ 6.50 ตามลำดับ และระบบกรีด 1/3S 2d/3 เกษตรกรส่วนใหญ่พิจารณาเงื่อนไขในด้านความสมบูรณ์ของเปลือกงอกดี คิดเป็นร้อยละ 2.90 รองลงมาคือราคายางที่ต่ำลง คิดเป็นร้อยละ 2.20 และต้นยางมีอายุมากขึ้น คิดเป็นร้อยละ 2.10 ตามลำดับ (Table 6)

ทั้งนี้ เงื่อนไขที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระบบกรีดยางพาราโดยการเปลี่ยนแปลงความยาวหน้ากรีด จากระบบกรีด 6 ระบบ พบว่า เกษตรกรชาวสวนยางพาราในพื้นที่นิยมใช้ความยาวรอยกรีด 2 รูปแบบ คือ แบบกรีดหนึ่งในสามของลำต้น (1/3S) และแบบกรีดครึ่งลำต้น (1/2S) ซึ่งรูปแบบการเปลี่ยนแปลงความยาวหน้ากรีดที่พบในพื้นที่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงจากความยาวหน้ากรีดแบบกรีดครึ่งลำต้น (1/2S) ไปเป็นแบบกรีดหนึ่งในสามของลำต้น (1/3S) เนื่องจากทำงานได้ง่าย รวดเร็ว เป็นความยาวหน้ากรีดที่ไม่ยาวมากเกินไป โดยเกษตรกรจะพิจารณาเงื่อนไขที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระบบกรีดยางพาราโดยการเปลี่ยนแปลงความยาวหน้ากรีด คือ ราคายางที่ต่ำลง คิดเป็นร้อยละ 91.00 และเงื่อนไขในด้านต้นยางมีอายุมากขึ้น คิดเป็นร้อยละ 89.40

Table 6 Percentage of conditions that affect the change of the rubber slitting system by changing the length of the slit (n=382).

Changing the length of the slit page*	Rubber tapping system					
	1/3S 3d/4	1/2S 3d/4	1/2S 2d/3	1/2S d/2	1/3S d/1	1/3S 2d/3
1. Save time on tapping	37.00	25.00	6.00	10.00	7.00	-
2. Give a lot of latex	33.20	29.50	19.80	5.00	2.30	-
3. Rubber trees are older.	26.80	29.90	16.90	7.00	6.70	2.10
4. Ease of tapping repeatedly	35.50	29.90	9.30	4.70	6.50	-
5. Rubber prices that are lower.	30.50	31.30	17.10	5.50	4.40	2.20
6. Face slits to the disease.	20.00	60.00	-	-	-	-
7. Good seed germination	22.90	38.80	17.60	8.80	-	2.90
8. Improved workmanship in rubber tapping	12.40	35.50	21.50	16.50	5.80	-
9. It is the system that most neighbors choose	68.80	31.30	-	-	-	-
10. Other	-	-	-	-	-	-

* Can answer more than 1 item

ผลการศึกษาระบบกรีดและเงื่อนไขในการตัดสินใจในการเลือกระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางพารา อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา พบว่าระบบกรีดที่นิยมใช้ในพื้นที่ ได้แก่ ระบบกรีด 1/3S 3d/4, 1/2S 3d/4, 1/2S 2d/3, 1/2S d/2, 1/3S d/1 และ 1/3S 2d/3 จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสถานการณ์ในปัจจุบันยางพารามีราคาตกต่ำ ส่งผลกระทบต่อรายได้ทำให้เกษตรกรชาวสวนยางพาราต้องการเพิ่มผลผลิตของตนเองให้สูงขึ้นนำไปสู่การเพิ่มรายได้ของครัวเรือน โดยการเพิ่มผลผลิตยางพาราเกษตรกรจะปรับเปลี่ยนการใช้ระบบกรีดที่มีความถี่กรีดสูงเป็นจำนวนมาก ไม่ได้เป็นไปตามคำแนะนำของสถาบันวิจัยยาง ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการตัดสินใจเลือกระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางพาราในพื้นที่ที่สำคัญระดับมาก 3 อันดับแรก

ได้แก่ ปัจจัยด้านราคายางพาราตกต่ำ ทำให้เกษตรกรมีรายได้ในแต่ละวันไม่เพียงพอจึงจำเป็นต้องเลือกใช้ระบบกรีดที่มีความถี่กรีดสูงเพื่อต้องการเพิ่มรายได้ รายได้จากการทำสวน เนื่องจากราคายางที่ต่ำลงทำให้เกษตรกรยิ่งต้องการรายได้ที่เพิ่มขึ้น และอายุต้นยางที่กรีด ซึ่งยางพาราที่เพิ่งเปิดกรีดอายุยังน้อยเกษตรกรจะเลือกใช้ระบบกรีดที่มีความถี่ต่ำเนื่องจากต้นยางพารายังอยู่ในระยะการเจริญเติบโตค่อนข้างสูง และเมื่อยางพารามีอายุมากขึ้นถึงใกล้โค่นเกษตรกรจะเลือกใช้ระบบกรีดที่มีความถี่กรีดสูงตลอดจนกรีดติดต่อกันทุกวัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ บัญชา สมบูรณ์สุข และคณะ (2554) ได้ทำการศึกษาเรื่องผลของการปรับปรุงระบบกรีดต่อเศรษฐกิจและสังคมของเกษตรกรชาวสวนยางขนาดเล็ก นอกจากนี้เกษตรกรส่วนใหญ่เมื่อเปิดกรีดแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงระบบกรีด มีสาเหตุหลักที่ทำให้เกษตรกรเปลี่ยนแปลงระบบกรีด คือ ต้องการรายได้เพิ่ม เนื่องจากมีรายได้ในแต่ละวันไม่เพียงพอ การเปลี่ยนแปลงฤดูกาล เกษตรกรจะพยายามกรีดชดเชย โดยใช้ระบบกรีดที่มีความถี่สูงมากหรือบางช่วงกรีดทุกวัน เพื่อให้ได้รายได้มาชดเชยในช่วงที่เกิดการเปลี่ยนแปลงฤดูกาล และอายุยางที่เพิ่มขึ้น โดยสวนยางพาราที่มีอายุเพิ่มขึ้น สามารถเพิ่มจำนวนวันกรีดได้มากขึ้น ซึ่งมีความแตกต่างไปจากงานวิจัยของ มัทนา ยุสุวพันธ์ และมาโนช รุ่งกิจประเสริฐ (2550) ได้ทำการศึกษาเรื่องปัจจัยที่มีผลต่อการเลือกระบบกรีดของชาวสวนยางในจังหวัดสงขลา ที่เกษตรกรส่วนใหญ่ไม่คิดจะเปลี่ยนแปลงระบบกรีด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงระบบกรีดของเกษตรกรชาวสวนยางพารามีลักษณะการเปลี่ยนแปลงความถี่ (วันกรีด) มากกว่าการเปลี่ยนแปลงความยาวของหน้ากรีด โดยมีเงื่อนไขสำคัญที่ทำให้เกษตรกรเปลี่ยนแปลงระบบกรีดยางพารา คือ เงื่อนไขในด้านราคายางที่ต่ำลง ทำให้เกษตรกรได้รับรายได้ในแต่ละครั้งกรีดไม่เพียงพอ เงื่อนไขในด้านต้นยางมีอายุมากขึ้น เมื่อยางพารามีอายุมากขึ้นถึงใกล้โค่นจะให้ปริมาณน้ำยางต่ำลง เกษตรกรจะปรับเปลี่ยนเพิ่มจำนวนวันกรีดที่มากขึ้นตลอดจนกรีดติดต่อกันทุกวัน และเงื่อนไขในด้านประหยัดเวลาในการกรีด เนื่องจากเกษตรกรต้องการระบบกรีดยางพาราที่มีความชำนาญ ทำงานง่าย สามารถทำงานได้เร็ว สะดวกต่อการทำงาน สามารถใช้กับหน้ากรีดไม่สม่ำเสมอซึ่งไม่เป็นอุปสรรคต่อการกรีด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ นันทิกา โพธิ์ทอง (2553) เรื่องการตัดสินใจและเงื่อนไขในการใช้ระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางพารา อำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา เงื่อนไขเหล่านี้จึงส่งผลทำให้เกษตรกรชาวสวนยางพาราเปลี่ยนแปลงระบบกรีดหนึ่งไปสู่อีกระบบกรีดหนึ่งได้โดยภายใต้เงื่อนไขต่าง ๆ

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่า เกษตรกรชาวสวนยางพาราในพื้นที่อำเภอนาทวีนิยมใช้เป็นระบบกรีดที่มีความถี่กรีดสูง โดยไม่คำนึงถึงผลกระทบจากการเพิ่มจำนวนวันกรีด และเป็นระบบกรีดที่ไม่ใช่ระบบกรีดตามที่สถาบันวิจัยยางแนะนำ โดยมีปัจจัยที่มีผลต่อการตัดสินใจเลือกระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรในพื้นที่ ได้แก่ ปัจจัยด้านราคายางที่ต่ำลง ($\bar{x}$ = 4.08, SD = 0.84) ปัจจัยด้านรายได้จากการทำสวนยาง ($\bar{x}$ = 4.04, SD = 1.45) และปัจจัยด้านอายุต้นยางที่กรีด ($\bar{x}$ = 4.02, SD = 0.92) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีความสัมพันธ์ส่งผลซึ่งกันและกันในการตัดสินใจเลือกระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางพารา และเกษตรกรจะมีการปรับเปลี่ยนระบบกรีดลักษณะการเปลี่ยนแปลงความถี่ (วันกรีด) มากกว่าการเปลี่ยนแปลงความยาวของหน้ากรีด โดยมีเงื่อนไขที่ทำให้เกษตรกรเปลี่ยนแปลงระบบกรีดยางพารา คือ เงื่อนไขในด้านราคายางที่ต่ำลง คิดเป็นร้อยละ 92.50 ด้านต้นยางมีอายุมากขึ้น คิดเป็นร้อยละ 92.50 และด้านประหยัดเวลาในการกรีด คิดเป็นร้อยละ 89.30 เงื่อนไขเหล่านี้ส่งผลทำให้เกษตรกรเปลี่ยนแปลงระบบกรีดหนึ่งไปสู่อีกระบบกรีดหนึ่งได้โดยภายใต้เงื่อนไขต่าง ๆ ดังกล่าว จากการศึกษาพบว่าเกษตรกรยังใช้ระบบกรีดที่มีความถี่กรีดสูง เนื่องจากให้ปริมาณผลผลิตสะสมต่อปีสูงจากจำนวนวันกรีดที่มากซึ่งสอดคล้องกับความต้องการรายได้ที่เพิ่มขึ้นของเกษตรกร แต่ต้นยางพาราเกิดอาการเปลือกแห้งได้ง่าย เปลือกหมดเร็ว อายุใช้งานหน้าสั้น อัตราการเกิดโรคสูง ส่งผลให้ต้นยางมีอายุการกรีดสั้นลง และต้องโค่นเพื่อปลูกใหม่เร็วขึ้น ทำให้รายได้ต่อรอบการปลูกของเกษตรกรที่ควรจะได้ลดลง ดังนั้นจึงมีข้อเสนอแนะว่าหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับด้านวิจัยยางพาราให้มีการศึกษาวิจัยเปรียบเทียบระบบกรีดแต่ละระบบกรีดอย่างชัดเจน และวิเคราะห์หาระบบกรีดที่เหมาะสมที่สุดให้กับเกษตรกรในพื้นที่ เพื่อให้เกิดผลที่ดียิ่งขึ้นในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

การยางแห่งประเทศไทย. 2559. *การปลูกยางพารา*. กรุงเทพฯ: หจก.งานพิมพ์.

กรมวิชาการเกษตร. 2552. *รายงานผลการวิจัยและพัฒนาปี 2547*. กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นันทิกา โพธิ์ทอง. 2553. การตัดสินใจและเงื่อนไขในการใช้ระบบกรีดยางพาราของเกษตรกรชาวสวนยางพารา อำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

บัญชา สมบูรณ์สุข, สมยศ ทุ่งหว้า, กนกพร ภาชีรัตน์, ไชยยะ คงมณี และ Benedict Chambon. 2554. ใน *รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ผลของการปรับปรุงระบบกรีดต่อเศรษฐกิจและสังคมของเกษตรกรชาวสวนยางขนาดเล็ก*. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

ปิยากร นวลแก้ว. 2559. การกรีดยางพาราของเกษตรกร ตำบลคลองพลู อำเภอหนองใหญ่ จังหวัดชลบุรี. *วารสารสังคมศาสตร์* 5: 70-80.

ปัทมา ชนะสงคราม และพเยาว์ ร่มรื่นสุขารมย์. 2549. อาการเปลือกแห้งของต้นยาง. ใน *เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรความรู้ด้าน ยางพารา แก่นักศึกษาผู้ช่วยนักวิชาการทำหน้าที่มัคคุเทศก์ โครงการพืชสวนใต้ร่วมยาง เสริมสร้างสิ่งแวดล้อม พร้อมพึ่งพาตนเอง*. หน้า 101-109. โรงแรมเชียงใหม่ออคิด จังหวัดเชียงใหม่, วันที่ 17-20 ตุลาคม 2549.

มัทนา ยุสุวพันธ์ และมาโนช รุ่งกิจประเสริฐ. 2550. ปัจจัยที่มีผลต่อการเลือกระบบกรีดของชาวสวนยางในจังหวัดสงขลา. ปัญหาพิเศษ สาขาวิชาเศรษฐศาสตร์ คณะเศรษฐศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

สำนักงานเกษตรอำเภอนาทวี. 2556. ข้อมูลการปลูกพืชเศรษฐกิจ ปี 2556. http://nathawi.songkhla.doae.go.th (26 กันยายน 2560).

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. *สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2559*. กรุงเทพฯ: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. *สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2560*. กรุงเทพฯ: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.

Best, J. W., and Kahn, J. V. 1993. *Research in education*. 7th ed. New Delhi: Prentice Hall.

Yamane, T. 1973. *Statistics: An Introductory Analysis*. 3rd ed. New York: Harper and Row Publication.

วันรับบทความ (Received date) : 8 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 20 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63

เพรียงทรายกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Sandworm and Aquaculture

กฤษฎา สุขเจริญ[1,2*]
Krisada Sukjarern[1,2*]

คำนำ

สำหรับประเทศไทยผลผลิตของกุ้งทะเลส่วนใหญ่มาจากการเพาะเลี้ยง (78%) มากกว่าการจับจากธรรมชาติ (22%) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) และกระแสการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในปัจจุบันเป็นที่สนใจของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทยมาอย่างต่อเนื่อง แต่ถ้าหากจะให้การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลพัฒนาไปอย่างยั่งยืนจะต้องมีการเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลได้เอง เพื่อลดการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลจากต่างประเทศและลดการจับพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติ และเป็นไปในลักษณะของการพัฒนาสายพันธุ์ให้มีความเหมาะสมกับระบบการเพาะเลี้ยงของเกษตรกรไทย สำหรับการเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลนั้น อาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญพันธุ์และการพัฒนารังไข่ที่นิยมใช้กันมากที่สุดได้แก่ เพรียงทรายมีชีวิต จากการประมาณการใช้พ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวในปัจจุบัน พบว่าจากปริมาณผลผลิตกุ้งขาวที่ประมาณ 350,000 ตัน (สถาบันทรัพยากรทางน้ำ, 2550) จะต้องใช้แม่พันธุ์กุ้งขาวเป็นจำนวน 2,000,000 ตัว เพื่อผลิตลูกกุ้ง พ่อแม่พันธุ์กุ้งเหล่านี้มีความจำเป็นที่จะต้องกินเพรียงทรายเป็นอาหารเพื่อให้มีความสมบูรณ์พันธุ์ที่จะผลิตลูกกุ้งที่มีคุณภาพ โดยจะใช้เพรียงทรายประมาณ 100,000 กิโลกรัม/ปี ถ้าเพรียงทรายปลอดเชื้อราคากิโลกรัมละ 600 บาท จะคิดเป็นมูลค่าเพรียงทรายประมาณ 60,000,000 บาท/ปี การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งไม่ว่าจะเป็นกุ้งกุลาดำ หรือกุ้งขาว จึงต้องการเพรียงทรายเป็นจำนวนมากซึ่งอาจจะเป็นเพรียงทรายที่ได้จากการจับจากธรรมชาติมาจำหน่าย ซึ่งวิธีนี้อาจจะเป็นการทำลายสายพันธุ์เพรียงทรายในธรรมชาติและเป็นการประกอบกิจการทางการเกษตรที่ไม่ยั่งยืน อีกทั้งเพรียงทรายจากธรรมชาติสามารถนำเชื้อไวรัสก่อโรค และแบคทีเรียมาสู่พ่อแม่พันธุ์กุ้งซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อลูกกุ้งทะเลได้ ถ้าสามารถเพาะเลี้ยงเพรียงทรายได้ก็จะทำให้สามารถผลิตพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลจากการเพาะเลี้ยงในระบบแบบครบวงจรได้ เป็นการเพิ่มศักยภาพในการผลิตพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลที่มีคุณภาพและปลอดเชื้อ ทำให้ต้นทุนในการผลิตพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลต่ำลง และต้นทุนอุตสาหกรรมการผลิตกุ้งทะเลเพื่อการส่งออก ตั้งแต่การผลิตลูกกุ้งไปจนถึงกุ้งขนาดที่ตลาดต้องการต่ำลง สามารถที่จะแข่งขันทางการค้าในตลาดโลกได้ อีกทั้งยังทำให้ไม่ถูกกีดกันทางการค้าอันเนื่องมาจากการใช้ทรัพยากรพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลแบบไม่ยั่งยืน

ปัจจุบันผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมทำให้ที่อยู่อาศัยของเพรียงทรายเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้จำนวนของเพรียงทรายในธรรมชาติลดน้อยลงมาก ประกอบกับความสำคัญของเพรียงทรายที่มีต่อกิจกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในแง่ของสารอาหารที่มีคุณภาพที่ดีสำหรับพ่อแม่พันธุ์กุ้ง จึงทำให้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเพรียงทรายมากขึ้น การเพาะเลี้ยงเพรียงทรายเป็นอาชีพที่ทำให้เกิดรายได้ในระดับชาวบ้าน รวมทั้งเป็นอาชีพเสริมสำหรับเกษตรกรรายย่อย อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเพรียงทรายยังต้องอาศัยพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติมาทำการเพาะฟักเพื่อให้ได้ตัวอ่อนแล้วจึงเลี้ยงจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 6-8 เดือน เพื่อที่จะใช้เป็นอาหารสำหรับพ่อแม่พันธุ์กุ้ง

ลักษณะทั่วไปของเพรียงทราย

เพรียงทรายจัดอยู่ใน Class Polychaeta ซึ่งประกอบด้วย 17 Order (Fauchald, 1977) Class Polychaete เป็นคลาสที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดของ Phylum Annelida พบว่ามีประมาณ 8,000 ชนิด (Harrison and Gardiner, 1992) สมาชิกใน Class Polychaeta ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตอยู่ในทะเล (Alexander, 1979) มีเพียงประมาณ 50 ชนิด ที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด (Pennak, 1989) ลำตัวของเพรียงทราย มีลักษณะเป็นปล้อง (จิตติมา อายุตตะกะ, 2544) มีอวัยวะที่ยื่นออกมาจากทุกปล้องด้านข้างของลำตัวทั้ง 2 ด้าน เรียกว่า parapodium (Alexander, 1979) เพรียงทรายมีระบบหมุนเวียนโลหิตเป็นระบบปิด (Castro and Huber, 1992) มีระบบทางเดินอาหารแบบสมบูรณ์ ระบบขับถ่ายของเพรียงทรายมีอยู่ในทุกปล้องของร่างกายยกเว้นที่ prostomium (Figure 1) (Barth, 1982) อวัยวะขับถ่าย (nephridium) มีอยู่เป็นคู่บริเวณด้านล่างของลำตัว แต่ละอันเป็นท่อที่มีปลายเปิดที่บริเวณด้านท้อง ของเสียในร่างกายจะถูกขับออกมาจากเลือดผ่านอวัยวะขับถ่ายแล้วส่งไปยังท่อเปิดภายในร่างกายและจากนั้นจะไปรวมที่ส่วนท้ายของร่างกาย (Buchsbaum, 1938) เพรียงทรายเกือบทุกชนิดมีเพศแยก (Barnes, 1968) โดยที่เซลล์สืบพันธุ์

[1] ศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง อ. ไชยา จ. สุราษฎร์ธานี 84110
[1] Shrimp Genetic Improvement Center, Chaiya, Suratthani 84110
[2] ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120
[2] National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Khlong Luang, Pathum Thani 12120
*Corresponding author, Email: Krisada.suk@biotec.or.th

จะถูกปล่อยออกมาผสมกันในน้ำทะเล และฟักออกมาเป็นตัวอ่อนที่เรียกว่า trochophore larvae (Alexander, 1979) พบว่ามีเพรียงทรายบางชนิดสามารถสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้โดยการแบ่งตัว หรือแตกหน่อ (Russell-Hunter, 1969; ชุติมา ขมวิลัย, 2540) เพรียงทรายมีการปรับตัวให้อาศัยอยู่ได้ในทุกพื้นที่ ตั้งแต่บริเวณที่เป็นตะกอนดินไปจนถึงบริเวณพื้นผิวที่เป็นหิน และมีพฤติกรรมการกินอาหารบริเวณผิวหน้าทราย เพรียงทรายกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดพบว่าเป็นพวกที่มีการสร้างรูที่อยู่อาศัยในตะกอนดินที่อ่อนนุ่ม (Harrison and Gardiner, 1992) เพรียงทรายมีการกินอาหารหลายแบบ และมีบางชนิดสามารถเปลี่ยนรูปแบบการกินอาหารให้สัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมได้ (Pinedo et al., 1997) เพรียงทรายมีรูปแบบของการสืบพันธุ์วางไข่ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ แบบแรกคือ monotelic species เป็นเพรียงทรายชนิดที่มีการวางไข่ได้เพียงครั้งเดียวในช่วงชีวิต เมื่อวางไข่แล้วจะตาย และแบบที่สองคือ polytelic species เป็นเพรียงทรายชนิดที่มีการวางไข่ได้หลายครั้งในช่วงชีวิต (Giangrande, 1997) เพรียงทรายในวงศ์ Nereididae จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในช่วงที่เข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ (Hegner and Engermann, 1968) โดยแบ่งส่วนของร่างกายออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหน้าคือส่วนที่ไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เรียกว่า atoke และส่วนท้ายซึ่งเต็มไปด้วยเซลล์สืบพันธุ์เรียกว่า epitoke และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ parapodia และ chaetae เพื่อช่วยในการว่ายน้ำ (Wilmoth, 1967) ในช่วงระยะดังกล่าวตาของเพรียงทรายจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีความไวต่อแสง และมีรูปแบบของการสืบพันธุ์เป็นแบบ monotelic species (Giangrande, 1997; Olive et al., 1997) คือเมื่อวางไข่แล้วจะตาย เช่น *Perinereis cultrifera* และ *P. rullieri* (Prevedelli and Simonini, 2003)

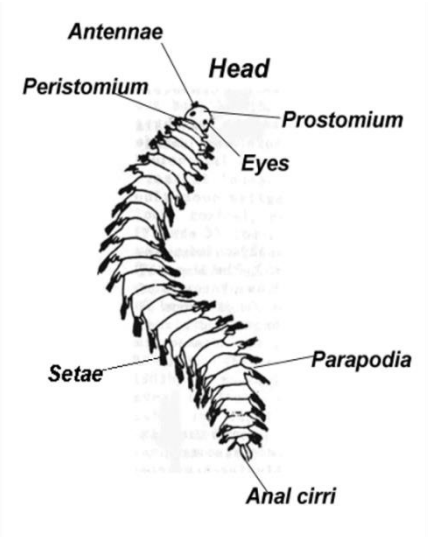

Figure 1 Polychaete body parts.
Source: Waikato Regional Council (2019).

ความสำคัญของเพรียงทราย

เพรียงทรายเป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังอาศัยอยู่ตามหาดทรายบริเวณแนวน้ำขึ้น-น้ำลง กินซากพืชและซากสัตว์เป็นอาหารทำหน้าที่เหมือนผู้กำจัดขยะตามชายหาด นอกจากจะเป็นประโยชน์ในฐานะผู้รักษาสิ่งแวดล้อมแล้วเพรียงทรายยังเป็นอาหารที่สำคัญของสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น กุ้งทะเล ปูทะเล ปลาทะเลหน้าดิน และปลาสวยงาม (ถนอม พิมลจินดา, 2542) จากการศึกษาของ สุรพล ชุณหบัณฑิต (มปป.) พบว่าเพรียงทรายมีคุณค่าทางโภชนาการที่จำเป็นสำหรับสัตว์น้ำสูง เช่น มีโปรตีน 51.24% ไขมัน 17.80% ด้วยเหตุนี้จึงนิยมนำไปใช้เป็นอาหารพ่อแม่พันธุ์กุ้ง ซึ่งจะช่วยเร่งการผสมพันธุ์การวางไข่ของกุ้ง และทำให้แม่กุ้งติดไข่เป็นจำนวนมากลูกที่ได้ก็จะแข็งแรงตามไปด้วย การใช้ประโยชน์ของเพรียงทรายไม่ได้จำกัดอยู่แต่การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเท่านั้นแต่ยังสามารถนำไปใช้เป็นเหยื่อตกปลา และยังมีศักยภาพในการที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อีกด้วยเนื่องจากมีรายงานว่าสามารถสกัดสารบางอย่างจากเลือดของเพรียงทรายรวมทั้งฮอร์โมนอีกหลายชนิด เช่น พรอสตา-แกลนดิน (prostaglandins) ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์กับมนุษย์ได้ (Pan et al., 2004 อ้างโดย พอจำ อรัยกานนท์ และสุรพล ชุณหบัณฑิต, 2550)

ในธรรมชาติเพรียงทรายหลายชนิดเป็นอาหารที่สำคัญของสัตว์น้ำ จากการศึกษาของ Aarnio and Bonsdorff (1993 อ้างโดย สันติสุข ไทยปาล, 2544) พบเพรียงทรายในกระเพาะอาหารของปลาบู่ (*Pomatoschistus minutes*) ที่อาศัยใน

บริเวณหมู่เกาะบาลติคทางตอนเหนือ รวมถึงกุ้งทะเล ปู และปลาทะเลบางชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจซึ่งส่วนใหญ่เป็นสัตว์น้ำที่หากินตามพื้นทะเล สัตว์น้ำเหล่านี้จะขุดคุ้ยพื้นทะเลเพื่อหาอาหาร จากการศึกษากระเพาะอาหารของปลาเหล่านั้นพบเพรียงทรายในปริมาณที่สูงมากถึง 50-80% ของปริมาณอาหารทั้งหมดที่พบในกระเพาะอาหาร (สุรพล ชุณหบัณฑิต, 2544) นอกจากนั้นเพรียงทรายในวงศ์ Nereididae ยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูงเหมาะสำหรับเป็นอาหารของพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลเป็นเหยื่อที่ต้องการของนักตกปลาในวงการกีฬาตกปลา (Olive, 1994) ไม่เฉพาะประโยชน์ที่กล่าวมาแล้วเท่านั้น หากมองในด้านนิเวศวิทยาเพรียงทรายบางชนิดสามารถช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ในธรรมชาติ และใช้เป็นตัวชี้วัดความสมบูรณ์ของธรรมชาติได้อีกด้วย (Meksumpun and Meksumpun, 1999; Chareonpanich, 1999; Black, 2001)

พ่อแม่พันธุ์เพรียงทราย

สำหรับเพรียงทรายชนิด *Perinereis nuntia* มักจะพบอาศัยอยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย และทะเลอันดามัน จึงทำให้มีการนำเพรียงทรายชนิดนี้มาใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยในธรรมชาติเพรียงทรายจะฝังตัวลึกลงไปในชั้นทรายเมื่อน้ำลง และจะขึ้นมากินอาหารเมื่อน้ำขึ้นซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ในช่วงชีวิตจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะ 3 ครั้ง คือ ช่วงวัยอ่อน ช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์ และช่วงการผสมพันธุ์ สำหรับเพรียงทรายเมื่อแรกฟักออกจากไข่จะล่องลอย และเคลื่อนที่ตามกระแสน้ำพัดพา ต่อมาเมื่อมีการพัฒนาเพิ่มจำนวนข้อปล้องได้ 3 ปล้องจะเรียกตัวอ่อนในระยะนี้ว่า Nectochaete ซึ่งเป็นช่วงที่เพรียงทรายสามารถที่จะลงเกาะผิวทราย และจะเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์จะเป็นช่วงที่ยาวที่สุดของชีวิตมีรูปร่างและอวัยวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการดำรงชีพและหาอาหารตามพื้นทรายโดยในระยะนี้จะเรียกว่า atokous เมื่อเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ขาที่ใช้สำหรับการคืบคลานจะเปลี่ยนหน้าที่เป็นอวัยวะที่ใช้ในการว่ายน้ำในขณะผสมพันธุ์เรียกระยะนี้ว่า epitokous ซึ่งจะเป็นช่วงชีวิตสั้น ๆ ใช้เวลาเพียงไม่กี่วัน ระยะการพัฒนาของเพรียงทรายจะเริ่มตั้งแต่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งจะมีการสร้างขึ้นในทุกปล้องของร่างกาย ภายในช่องว่างของลำตัวจะเต็มไปด้วยไข่หรือน้ำเชื้อ ในเพรียงทรายที่มีการแบ่งส่วนของลำตัวออกเป็น 2 ส่วนที่ชัดเจนคือ ส่วนอก และส่วนท้อง อีกทั้งยังพบว่าส่วนใหญ่อวัยวะสืบพันธุ์จะอยู่ในส่วนของท้อง โดยปกติเซลล์สืบพันธุ์จะถูกปล่อยออกมาสู่ช่องว่างของลำตัว (coelom) เมื่อเพรียงทรายเข้าสู่ช่วงเจริญพันธุ์ ภายในช่องว่างของลำตัวจะเต็มไปด้วยไข่หรือน้ำเชื้อ ในเพรียงทรายบางชนิดที่ลำตัวค่อนข้างบางหรือโปร่งใสจะสามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน (Ruppert and Barnes, 1994) เช่นในเพรียงทรายชนิด *Perinereis nuntia* brevicirris เพศผู้จะมีสีข้างลำตัวเป็นสีแดงและสีขาวนวลตรงกลางลำตัวตลอดความยาวของลำตัว ส่วนเพศเมียจะมีขาว่ายน้ำเป็นสีแดงเช่นเดียวกัน แต่สีของลำตัวจะเป็นสีน้ำเงินอมเขียวทั้งตัว ในเพรียงทรายสกุล *Hediste* ตัวผู้จะมีสีขาว ส่วนตัวเมียจะมีสีเขียวในช่วงที่พร้อมจะผสมพันธุ์ (Sato, 1999) และเพรียงทรายในสกุล *Pomatoceros* จะเห็นเป็นสีขาวในเพศผู้ และเห็นเป็นสีชมพูอ่อนหรือสีส้มในเพศเมีย เนื่องจากสีของน้ำเชื้อและไข่ตามลำดับ (Ruppert and Barnes, 1994) เมื่อเพรียงทรายมีความพร้อมในการผสมพันธุ์ทั้งตัวผู้และตัวเมียจะมีพฤติกรรมขึ้นมาว่ายน้ำที่บริเวณผิวหน้าทรายซึ่งพฤติกรรมเช่นนี้เรียกว่า nuptial dance หรือระบำวิวาห์ (Figure 2) โดยมักจะเกิดขึ้นในช่วงของข้างแรม 8 ค่ำ จนถึงช่วงข้างขึ้น 15 ค่ำ โดยที่ตัวผู้และตัวเมียจะปล่อยน้ำเชื้อและไข่ออกมาผสมกัน ดังนั้นควรแยกพ่อแม่พันธุ์ออกจากบ่อเลี้ยงไปเพาะพันธุ์ในถังเพาะฟักเพื่อผลิตตัวอ่อนเพรียงทรายเพื่อป้องกันพ่อแม่พันธุ์ผสมกันในบ่อเลี้ยง

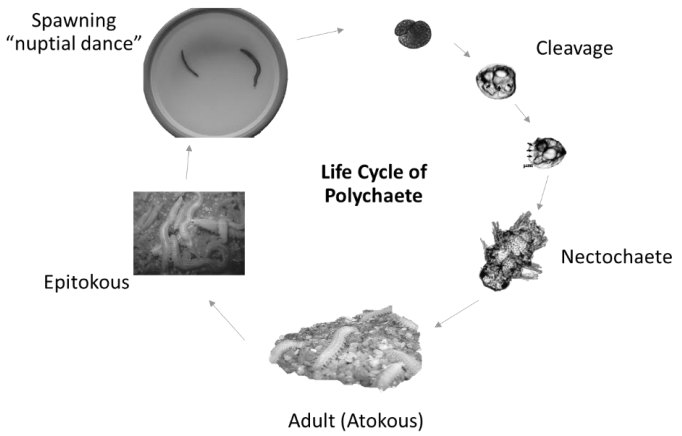

Figure 2 Life cycle of Polychaete.

Source: Modified from Poltana et al. (2005).

การเพาะขยายพันธุ์เพรียงทราย

ตัวผู้และตัวเมียที่พร้อมจะสืบพันธุ์จะถูกแยกออกมาเลี้ยงในถังเพาะฟัก โดยในถังเพาะฟักจะมีการเตรียมน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ที่ผ่านการกรองด้วยถุงกรองน้ำและมีการให้อากาศในถังเพาะฟักตลอดเวลา โดยปล่อยในอัตราส่วน 1:1 หรือ 2:1 (ตัวผู้:ตัวเมีย) ในการปล่อยเชื้อสืบพันธุ์ของเพรียงทรายทั้งตัวผู้และตัวเมียจะว่ายน้ำปล่อยเชื้อสืบพันธุ์ในช่วงเวลากลางคืนจนถึงรุ่งเช้า ผนังลำตัวบริเวณขาเดินทั้งข้างซ้ายและข้างขวาจะปริแตกออกเชื้อตัวผู้และไข่จะถูกสลัดออกจากลำตัวในขณะที่ว่ายน้ำ ตัวผู้จะว่ายน้ำเป็นวงกลมวนขวารอบ ๆ ตัวเมีย (Hardege and Bartels-Hardege, 1995) เชื้อตัวผู้สีขาวขุ่นจะถูกสลัดออกมา หลังจากนั้นตัวเมียจะว่ายน้ำปล่อยไข่ออกมา ไข่ที่ตัวเมียปล่อยในแต่ละครั้งจะมีจำนวน 50,000 ถึง 80,000 ฟอง (น้ำหนักเพรียงทรายประมาณ 1 กรัม) ไข่ของเพรียงทรายจะมีเม็ดไขมันสะสมอยู่ในไข่แดงสูง (สุรพล ชุณหบัณฑิต, มปป.) เพื่อใช้เป็นอาหารของตัวอ่อนในขณะที่กำลังพัฒนา หลังจากที่สืบพันธุ์เสร็จแล้วทำการแยกซากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ตายออกเพื่อปล่อยให้ไข่ที่ได้รับการผสมได้พัฒนาในระยะต่อไป ไข่ที่ได้รับการผสมจะเริ่มพัฒนาภายในเวลา 35-40 นาที ตัวอ่อนจะเจาะผ่านถุงหุ้มออกมาว่ายน้ำภายในเวลา 21-27 ชั่วโมง และจะพัฒนาไปจนถึงระยะที่มีขาเดิน 3 คู่แรกเรียกว่าระยะ nectochaete ภายในระยะเวลา 33-48 ชั่วโมงหลังจากปฏิสนธิ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเพรียงทราย

มีการพยายามศึกษาเพรียงทรายในหลาย ๆ ด้านเพื่อนำข้อมูลที่ได้มาพัฒนาการเพาะเลี้ยง เช่น ข้อมูลพื้นฐานด้านชีววิทยาของเพรียงทราย ข้อมูลทางด้านการเพาะเลี้ยงเพรียงทรายตลอดจนการนำเทคโนโลยีด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเพรียงทรายมาใช้ประโยชน์เพื่อทำให้การเพาะเลี้ยงเพรียงทรายมีประสิทธิภาพสูงสุด ยกตัวอย่าง เช่น Simon and Olive (2000) ได้ทดลองเรื่องอิทธิพลของแสงที่มีต่อการพัฒนาการของไข่เพรียงทรายที่ได้รับการผสมพบว่า ในช่วงกลางวันไข่จะมีการพัฒนาจนถึงระยะตัวอ่อนได้ดีกว่าในช่วงกลางคืน Hardege and Bartels-Hardege (1995) ได้มีศึกษาการพัฒนาตัวอ่อนเพรียงทราย *Perinereis nuntia* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 21-23 องศาเซลเซียส ไข่จะฟักออกเป็นตัวจนถึงระยะ nectochaete ภายใน 7-8 วัน ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ไข่จะฟักออกเป็นตัวจนถึงระยะ nectochaete ภายใน 9-10 วัน และที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ไข่จะฟักออกเป็นตัวจนถึงระยะ nectochaete ภายใน 2-3 สัปดาห์ และจะได้เพรียงทรายตัวเต็มวัยขนาด 2-3 เซนติเมตรในระยะเวลา 2 เดือน Akesson (1970 อ้างโดย สุรพล ชุณหบัณฑิต, มปป.) ได้ทดลองเลี้ยงตัวอ่อนเพรียงทราย *Ophryotrocha labronica* ในน้ำทะเลที่มีความเค็มต่าง ๆ กันพบว่า ไข่จะพัฒนาได้ดีในน้ำที่มีความเค็ม 23-35 ppt การพัฒนาของไข่จะลดลงในน้ำที่มีความเค็ม 44 ppt นอกจากความเค็มแล้วอุณหภูมิก็มีส่วนในการพัฒนาของไข่โดยที่ไข่จะพัฒนาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ในแง่ของการกินอาหาร Grave (1937, อ้างโดย สุรพล ชุณหบัณฑิต, มปป.) ทำการทดลองกับเพรียงทราย *Nereis limbata* พบว่าภายใน 7 วัน ตัวอ่อนยังไม่กินอาหารใด ๆ เมื่อเลยวันที่ 7 ไปแล้วจะเริ่มลงเกาะวัสดุที่ใช้ในการเลี้ยง และเริ่มกินอาหารประเภทสาหร่ายเซลล์เดียว (ไดอะตอม) สุรพล ชุณหบัณฑิต และพอจำ อรัณยกานนท์ (2549) ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาการใช้ทรายเทียมเป็นวัสดุในการเลี้ยงเพรียงทรายพบว่า เมื่อเพรียงทรายมีอายุครบ 5 เดือน กลุ่มที่เลี้ยงด้วยทรายธรรมชาติมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 1.08±0.39 กรัม อัตรารอด 17.03% และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยทรายเทียมน้ำหนักตัวเฉลี่ย 1.52±0.44 กรัม อัตรารอด 12.30% วิลาสินี คงเล่ง และคณะ (2546) ได้ทดลองเลี้ยงเพรียงทรายในกระบะพลาสติกเป็นระยะเวลา 4 เดือน ให้อาหารสำเร็จรูปกุ้งกุลาดำวัยอ่อนจำนวน 2 มื้อ/วัน พบว่าสามารถที่จะเลี้ยงเพรียงทรายในกระบะพลาสติกได้ซึ่งจะให้ผลผลิตเฉลี่ย 1,110.44 กรัม/ตารางเมตร นอกจากนี้ อิสราภรณ์ จิตรหลัง และคณะ (2550) ได้ทดลองเลี้ยงเพรียงทรายอายุ 2 เดือน ด้วยอาหารสำเร็จรูปที่มีการเสริมไขมัน และวิตามินอี โดยใช้น้ำมันปลาเป็นแหล่งไขมัน เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่เพรียงทรายที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณไขมัน และวิตามินอี มีการเจริญเติบโตและอัตรารอดดีที่สุด แต่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับเพรียงทรายทดลองกลุ่มอื่น การเสริมไขมันและวิตามินอีในอาหารมีผลต่อการสะสมของปริมาณไขมัน และวิตามินอีสูงในเพรียงทราย ซึ่งมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ไม่เสริมไขมันและวิตามินอีอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) อีกทั้งอาหารทดลองที่ใช้เลี้ยงเพรียงทรายมีสารอาหารที่เร่งการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ทำให้มีความสมบูรณ์พันธุ์เร็วขึ้น เป็นต้น

การใช้ประโยชน์จากเพรียงทรายในประเทศไทย

เพรียงทรายเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหลายชนิดเนื่องจากเป็นอาหารของกุ้ง ปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพรียงทราย *Perineries sp.* ซึ่งพบว่านำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ในตัวของเพรียงทรายมีสารอาหารบางอย่างที่ช่วยในการเจริญของรังไข่ในแม่พันธุ์สัตว์น้ำ ตลอดจนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในพ่อพันธุ์สัตว์น้ำ

และได้มีการศึกษาการนำเพรียงทรายไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น อัตรา ไชยมงคล และคณะ (2542) ได้ศึกษาเกี่ยวกับความสมบูรณ์พันธุ์ของแม่กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยหมึกร่วมกับเพรียงทราย พบว่าแม่กุ้งกุลาดำที่ได้รับหมึกร่วมกับเพรียงทรายเป็นอาหารจะมีจำนวนครั้งของการวางไข่ จำนวนไข่ จำนวนนอเพลียสเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแม่กุ้งกุลาดำที่ได้รับหมึกเป็นอาหารเพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับวิทยา รัตนะ และคณะ (2548) ได้ศึกษาผลของเพรียงทรายที่มีต่อการสร้างไข่และผลผลิตลูกกุ้งของพ่อแม่กุ้งกุลาดำ พบว่าแม่กุ้งกุลาดำ (จากบ่อดินอายุ 519 วัน) ที่ขุนเลี้ยงด้วยอาหาร 3 ชุด คือ เพรียงทราย เพรียงทรายกับหอยกะพง และหอยกะพง จะให้ปริมาณไข่ต่อแม่ $(74.28\pm12.85)\times10^4$, $(36.48\pm5.37)\times10^4$ และ $(28.22\pm13.53)\times10^4$ ฟองตามลำดับ มีผลผลิตลูกกุ้ง $(64.15\pm40.46)\times10^3$, $(34.89\pm38.25)\times10^3$ และ $(31.23\pm7.27)\times10^3$ ตัวตามลำดับ ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณไข่ของแม่กุ้งที่ได้รับเพรียงทรายมีความแตกต่างกับแม่กุ้งที่ได้รับเพรียงทรายกับหอยกะพง และหอยกะพงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) ส่วนอัตราการวางไข่ อัตราการฟักไข่ และผลผลิตลูกกุ้งที่ได้ของแม่กุ้งที่ได้รับเพรียงทรายแตกต่างกับแม่กุ้งที่ได้รับเพรียงทรายกับหอยกะพง และหอยกะพงเพียงอย่างเดียว ($P<0.05$) สำหรับ Leelatawit et al. (2014) ได้ศึกษาถึงผลของเพรียงทรายต่อความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยง พบว่าจำนวนน้ำเชื้อและความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่กินเพรียงทรายจะสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่กินอาหารเม็ดสำเร็จรูป ซึ่งก็สอดคล้องกับ Sittikankaew et al. (2016) ได้ศึกษาถึงชนิดของอาหารที่มีผลต่อน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเพรียงทรายปลาหมึก และเพรียงทรายผสมกับปลาหมึก จะมีน้ำหนักตัว ขนาดของถุงน้ำเชื้อ และปริมาณน้ำเชื้อมากกว่ากุ้งกุลาดำที่กินอาหารเม็ดสำเร็จรูปและอาหารเม็ดสำหรับพ่อแม่พันธุ์กุ้ง

สำหรับการศึกษาสารที่มีอยู่ในเพรียงทราย Meunpol et al. (2005) ได้ศึกษาปริมาณของ พรอสตาแกลนดินอี 2 (prostaglandin E_2) ในเพรียงทรายและผลของพรอสตาแกลนดินอี 2 ที่มีต่อการพัฒนารังไข่ของแม่กุ้งกุลาดำ พบว่าเพรียงทรายจะมีปริมาณพรอสตาแกลนดินอี 2 สูงกว่าอาหารมีชีวิตชนิดอื่น โดยที่เพรียงทรายอายุ 8 เดือนจะให้ปริมาณของพรอสตาแกลน-ดินอี 2 สูงกว่าเพรียงทรายที่มีอายุ 2, 4 และ 6 เดือน และ Poltana et al. (2005) ได้ศึกษาปริมาณของ พรอสตาแกลนดินเอฟ 2 (prostaglandin F_2) ในเพรียงทราย (*Perinereis nuntia brevicirris*) พบว่าปริมาณของพรอสตาแกลนดินเอฟ 2 ในเพรียงทรายที่มีการเพาะเลี้ยงเลียนแบบธรรมชาติจะมีความเข้มข้นประมาณ 0.66 นาโนกรัมต่อน้ำหนักเปียกของเพรียงทราย 1 กรัม และมีผลต่อการกระตุ้นการสร้างรังไข่ของแม่กุ้งกุลาดำ โดยพบว่าแม่กุ้งมีการพัฒนาการสร้างรังไข่ที่ดีขึ้น ตลอดจน ศรินทิพ สุกใส (2552) ได้รายงานการใช้ประโยชน์จากเพรียงทรายในด้านการแพทย์ว่าสามารถสกัดสารที่มีคุณสมบัติเหมือนยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากน้ำเลือดของเพรียงทราย และยังพบฮอร์โมนอีกหลายชนิด เช่น ออกซิโตซิน (oxytocin) วาโซเพรสซิน (vasopressin) โปรเจสเตอโรน (progesterone) โพรสตาแกลนดิน (prostaglandin) และวิเทลลิน (vitellin) เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ พิศิษฐ์ พลธนะ และคณะ (2552) ที่พบว่าสารสกัดจากเพรียงทราย (prostaglandin) สามารถช่วยทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบขององคชาต และทำให้ความดันในองคชาตเพิ่มขึ้น (ทำการทดลองในหนูแรท Sprague-Dawley) แสดงว่าสารสกัดจากเพรียงทรายมีผลต่อการทำให้เกิดการแข็งตัวขององคชาตได้ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปพัฒนารักษาโรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศในอนาคต และเป็นแนวทางที่จะช่วยจะส่งเสริมอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงเพรียงทรายให้ดำเนินไปอย่างยั่งยืนได้อีกแนวทางหนึ่ง

สรุป

บทความนี้กล่าวถึงเพรียงทรายที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหลายชนิด เนื่องจากเป็นอาหารของกุ้งและปลา ซึ่งเพรียงทรายมีสารอาหารบางอย่างที่สามารถช่วยพัฒนาการเจริญของรังไข่ในแม่พันธุ์กุ้งได้อย่างรวดเร็ว ตลอดจนพัฒนาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในกุ้ง อีกทั้งการใช้ประโยชน์ของเพรียงทรายไม่ได้จำกัดอยู่แต่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเท่านั้น แต่ยังสามารถนำไปใช้เป็นเหยื่อตกปลา และยังมีศักยภาพในการที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อีกด้วย ตลอดจนเพรียงทรายยังสามารถช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์และใช้เป็นตัวชี้วัดความสมบูรณ์ของธรรมชาติได้อีกด้วย ในปัจจุบันผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมทำให้ที่อยู่อาศัยของเพรียงทรายเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้จำนวนของเพรียงทรายในธรรมชาติลดน้อยลงมาก ประกอบกับความสำคัญของเพรียงทรายที่มีต่อกิจกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในแง่ของสารอาหารที่มีคุณภาพที่ดีสำหรับพ่อแม่พันธุ์กุ้ง จึงทำให้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเพรียงทรายมากขึ้น การเพาะเลี้ยงเพรียงทรายจึงเป็นอาชีพที่ทำให้เกิดรายได้ในระดับชาวบ้าน รวมทั้งเป็นอาชีพเสริมสำหรับเกษตรกรรายย่อย แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเพรียงทรายยังคงต้องอาศัยงานวิจัยเชิงบูรณาการอย่างต่อเนื่อง ทั้งในด้านการเพาะเลี้ยงเพรียงทราย เช่น การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเพรียงทรายโดยเฉพาะ รวมถึงสูตรอาหารที่สามารถกระตุ้นให้เพรียงทรายมีความพร้อมในการเป็นพ่อแม่พันธุ์ ตลอดจนระบบบริหารการจัดการน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพรียงทรายให้เป็นระบบปิด เพื่อลดต้นทุนการผลิต และเพิ่มปริมาณผลผลิตต่อพื้นที่ให้สูงยิ่งขึ้น หรืองานวิจัยในด้าน

การนำเพรียงทรายไปใช้ประโยชน์ให้ได้เต็มศักยภาพ เช่น อุตสาหกรรมการแปรรูปเพรียงทราย ซึ่งถ้าหากทำได้ก็จะสามารถสร้างศักยภาพในการส่งออกผลิตภัณฑ์แปรรูปนี้ไปขายยังตลาดต่างประเทศ ซึ่งจะเป็นการปรับปรุงระบบการผลิตสินค้าสัตว์น้ำเกษตรกรรม มาเป็นการผลิตสินค้าในระบบอุตสาหกรรม ที่สามารถควบคุมการผลิตได้ทั้งปริมาณและคุณภาพ ซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถในการแข่งขันของอุตสาหกรรมเพรียงทรายให้ยั่งยืนได้

เอกสารอ้างอิง

จิตติมา อายุตตะกะ. 2544. *การศึกษาเบื้องต้นประชาคมสิ่งมีชีวิตพื้นทะเล*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชุติมา ขมวิลัย. 2540. การแพร่กระจายและศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงคุณภาพดินโดยไส้เดือนทะเลบางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ถนอม พิมลจินดา. 2542. ชีววิทยาหนอนปล้อง (Annelida) บางชนิดเพื่อนำมาใช้เลี้ยงกุ้งทะเล ใน *รายงานสัมมนาวิชาการประมง ประจำปี 2542*. น. 6. กรุงเทพฯ. กรมประมง.

พอจำ อรัณยกานนท์ และสุรพล ชุณหบัณฑิต. 2550. บทสรุปเรื่องการวิจัยและเพาะเลี้ยงเพรียงทรายปลอดเชื้อระหว่างปี พ.ศ. 2547-2549. ใน *การอบรมการถ่ายทอดเทคโนโลยีเรื่องการทำฟาร์มเพาะเลี้ยงเพรียงทรายปลอดเชื้อเชิงพาณิชย์*. น. 1-21. กรุงเทพฯ. สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิศิษฐ์ พลธนะ, ชัยณรงค์ โตจรัส, สมลักษณ์ อสุวพงศ์พัฒนา, กนกพร วงศ์ประเสริฐ และบุญเสริม วิทยชำนาญกุล. 2552. แม่เพรียงกับการเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ ความเชื่อที่พิสูจน์ได้ด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์. ใน *การสัมมนาเรื่อง วช.กับการวิจัยและพัฒนาเพรียงทรายสู่การใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรม*. น. 13-14. โรงแรมเมโทรโพล, ภูเก็ต.

วิทยา รัตนะ, นันทวัน ศานติสาธิตกุล, จิรานุวัฒน์ ชูเพชร และลัดดาวัลย์ สถาพร. 2548. ผลของเพรียงทรายที่มีต่อการสร้างรังไข่และผลผลิตลูกกุ้งของพ่อแม่กุ้งกุลาดำ. ใน *การสัมมนาวิชาการด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจำปี 2548*. น. 35. กรุงเทพฯ. กรมประมง.

วิลาสินี คงเล่ง, กอบศักดิ์ เกตุเหมือน และสุจินต์ บุญช่วย. 2546. การทดลองเลี้ยงเพรียงทราย (*Perinereis* sp.) ในกระบะพลาสติก. ใน *รายงานการสัมมนาวิชาการประมง ประจำปี 2546*, น. 79. กรุงเทพฯ. กรมประมง.

ศรินทิพ สุกใส. 2552. ประโยชน์และคุณค่าของเพรียงทราย. ใน *การสัมมนาเรื่อง วช.กับการวิจัยและพัฒนาเพรียงทรายสู่การใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรม*. น. 9-12. โรงแรมเมโทรโพล, ภูเก็ต.

สถาบันทรัพยากรทางน้ำ. 2550. การทำฟาร์มเลี้ยงเพรียงทรายปลอดเชื้อเชิงพาณิชย์. ใน *เอกสารประกอบการอบรมการถ่ายทอดเทคโนโลยี*. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สันติสุข ไทยปาล. 2544. สัณฐานวิทยา ชีววิทยาการสืบพันธุ์บางประการและองค์ประกอบของอาหารในกระเพาะอาหารของปลาบู่ทอง (*Glossogobius aureus* Akihito and Meguro, 1975) ในทะเลสาบสงขลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2554. ใน *สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2553*. น. 122-126. กรุงเทพฯ: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุรพล ชุณหบัณฑิต. 2544. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนทะเลเพื่อเป็นอาหารสำหรับพ่อแม่กุ้งทะเล. ใน *คู่มือธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและอุตสาหกรรมอาหารทะเลส่งออก*. กรุงเทพฯ: เมจิก ซีเลคไลท์ จำกัด.

สุรพล ชุณหบัณฑิต. มปป. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนทะเล *Perinereis nuntia* var brevicirris (Grub) เพื่อประโยชน์ในการใช้เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรพล ชุณหบัณฑิต และพอจำ อรัณยกานนท์. 2549. การใช้ทรายเทียมเป็นวัสดุเลี้ยงเพรียงทราย *Perinereis nuntia*, Savigny แทนทรายธรรมชาติ. ใน *รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44*. น. 229-236. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัตรา ไชยมงคล, มะลิ บุณยรัตผลิน และสุพิศ ทองรอด. 2542. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความสมบูรณ์พันธุ์ของแม่กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยหมึกและหมึกร่วมกับแม่เพรียง ใน *รายงานการสัมมนาวิชาการประมง ประจำปี 2542*. น. 72. กรุงเทพฯ. กรมประมง.

อิสราภรณ์ จิตรหลัง, ปณต กลิ่นเชิดชู, นงลักษณ์ สำราญราษฎร์ และสุพิศ ทองรอด. 2550. ไขมันและวิตามินอีในเพรียงทราย (*Perinereis nuntia*, Savigny). ใน *รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45*. น. 786. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Alexander, R. M. 1979. *The invertebrates*. Leeds: Cambridge University Press.

Barnes, R. D. 1968. *Invertebrate zoology*. Tokyo: Japan Printing Company Limited.

Barth, R. H. 1982. *The invertebrate world*. Tokyo: CBS College Publishing.

Black, K. D. 2001. *Environmental impacts of aquaculture*. Sheffield: Sheffield Academic Press Ltd.

Buchsbaum, R. 1938. *Without backbones*. Chicago: The University of Chicago Press.

Castro, P., and Huber, M. E. 1992. *Marine biology*. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers.

Chareonpanich, C. 1999. The control and modification of organically polluted sediment by marine worm. Department of Fishery Biology, Faculty of Fisheries. Bangkok: Kasetsart University.

Fauchald, K. 1977. *The polychaete worms*. Los Angeles: Chapman.

Giangrande, A. 1997. Polychaete reproductive patterns, life cycles and life histories: An overview. *Oceanography and Marine Biology* 35: 323-385.

Hardege, J. D., and Bartels-Hardege, H. D. 1995. Spawning behaviour and development of *Perinereis nuntia* var *brevicirris* (Annelida: Polychaete). *Invertebrate Biology* 114: 39-45.

Harrison, F. W., and Gardiner, S. L. 1992. Microscopic anatomy of invertebrates (Volume 7 Annelida). New York: Wiley-Liss.

Hegner, R. W., and Engermann, J. G. 1968. *Invertebrate zoology*. New York: Macmillan Publishing Co.,Inc.

Leelatawit, R., Uawisetwathana, U., Khudet, J., Klanchui, A., Phomklad, S., Wongtripop, S., Angthoung, P., Jiravanichpaisal, P., and Karoonuthaisiri, N. 2014. Effects of polychaetes (*Perineries nuntia*) on sperm performance of the domesticated black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 433: 266-275.

Meksumpun, C., and Meksumpun, S. 1999. Polychaete-sediment relation in Rayong, Thailand. *Environmental Pollution* 105: 447-456.

Meunpol, O., Duangjai, E., and Yoonpun, R. 2005. Determination of prostaglandin E_2 (PGE_2) in polychaetes (*Perinereis* sp.) and its effect on *Penaeus monodon* oocyte development in Vitro. In *Proceedings of Larvi'05-Fish & Shellfish Larviculture Symposium European Aquaculture Society*. Special Publication, Belgium.

Olive, P. 1994. Polychaeta as a world resource: A review of patterns of exploitation as sea angling baits and the potential for aquaculture based production. *Memoris du Museum National d'Histoire Naturelle* 162: 603-610.

Olive, P., Fletcher, J., Rees, S., and Desrosiers, G. 1997. Interaction of environmental temperature with photoperiod in determining age at maturity in semelparous polychaete *Nereis (Neanthes) virens* Sars. *Thermal Biology* 22: 489-497.

Pennak, R. W. 1989. *Fresh-water invertebrates of the United States*, Third edition. New York: Jonh Wiley & Sons, Inc.

Pinedo, S., Sarda, R., and Martin, D. 1997. Comparative study of the trophic structure of soft-bottom assemblages in the Bay of Blanes (Western Mediterranean Sea). *Bulletin of Marine Science* 60: 529-542.

Poltana, P., Lerkitkul, T., Anantasomboon, G., Wannapapho, W., Wongprasert, K., Olive, P., and Withyachumnarnkul, B. 2005. Prostaglandin in the polychaete *Perinereis nuntia* and their receptors in the ovary of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. In *Proceeding of the World Aquaculture Society conference:* pp.18-26. Bali.

Prevedelli, D., and Simonini, R. 2003. Life cycles in brackish habitats: Adaptive strategies of some polychaetes from the Venich lagoon. *Oceanologica Acta* 26: 77-84.

Ruppert, E. E., and Barnes, R. D. 1994. *Invertebrate zoology*, Sixth edition. Florida: Harcourt, Inc.

Russell-Hunter, W. D. 1969. *A biology of higher invertebrates*. London: The Macmillan Company.

Sato, M. 1999. Divergence of reproductive and developmental characteristics in *Hediste* (Polychaeta: Nereidae). *Hydrobiologia* 402: 129-143.

Simon, W. R., and Olive, P. J. W. 2000. Manipulating the timing of maturation and competence for fertilization and development of oocytes from the semelparous polychaete *Nereis* (*Neanthes*) *virens* Sars. *Invertebrate Reproduction and Development* 38: 81-84.

Sittikankaew, K., Leelatanawit, R., Phuengwas, S., Kudej, J., Phomklad, S., Sukjarern, K., Wongtripop, S., and Karoonnuthaisiri, N. 2016. Effect of feed combination on sperm quality of domesticated male black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In: *The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotecnology and International Conference. 28-30 November 2016*. Chiang Mai, Thailand.

Waikato Regional Council. 2019. Polychaete features. Polychaetes. https://www.waikatoregion.govt.nz/environment/natural-resources/coast/coastal-monitoring/regional-estuary-monitoring-programme/organisms/polychaetes/features/ (5 September 2019).

Wilmoth, J. H. 1967. *Biology of invertebrates*. New Jersey: Prentice Hall Inc.

วันรับบทความ (Received date) : 6 ก.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 17 เม.ย. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 25 มิ.ย. 63

KING MONGKUT'S AGRICULTURAL JOURNAL

Research Articles:

Academic Articles: