



# วารสารเกษตร

## JOURNAL OF AGRICULTURE

วารสารวิชาการของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปีที่ 40 ฉบับที่ 1 มกราคม - เมษายน 2567

ผลของปุ๋ยหมักถ่านชีวภาพมูลแพะต่อกิจกรรมจุลินทรีย์ในดินที่สัมพันธ์กับการกักเก็บคาร์บอนในดิน ภาณุเดชา กมลมานิตย์ ศิวพร แพงคำ และ ณัฏฐกิตติยา ไพบุญย์.....	1
ผลของฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพของป๊อปเปิ้ล ภูมิพงษ์ แบ่งใจ และ สายชล สุขญาณกิจ.....	17
ความเข้มข้นของโลหะหนักในพื้นที่ปลูกฟ้าทะลายโจร จังหวัดนครปฐม เกวลิน ศรีจันทร์ ธวัชชัย อินทร์บุญช่วย ศิริสุดา บุตรเพชร และ ธรรมธวัช แสงงาม.....	29
ผลของแสงแอลอีดีและการกระตุ้นตาดอกด้วยอุณหภูมิต่ำต่อการเจริญเติบโตและ การเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนในสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 ยศธร เพ็ชรทอง และ ดุณี นภาพรม.....	47
สารสกัดด้วยน้ำจากพืชเถาเลื้อยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกิจกรรม ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงและภาวะอ้วน จำเนียร ชมภู บุญขวัญ คัดสม วราภรณ์ ทิพย์โกศลวงศ์ และ มนสิชา คำกองแก้ว.....	61
ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของพืชพรรณและความชอบต่อพื้นที่ดูดซับน้ำฝน: บทบาทของความรู้เชิงธรรมชาติและความปลอดภัยในสหรัฐอเมริกา พงศกร ศุภกิจไพศาล เอกชัย ไยพมิล จุฬาลักษณ์ วัฒนชาไพสิฐ วิภาวี สุรินทร์แข็ง และ ณัฏฐชวัล เจริญเลิศธนกิจ.....	75
การตรวจพบไวรัสสาเหตุโรคใบจุดและใบย่นในสตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80 ที่ปลูกในพื้นที่อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ นพดล ปนระรังษี ศิริรินภา ไชยพล ประไพพิศ สุวิทย์ชยานนท์ เกวลิน คุณาศักดากุล และ นิวัฒน์ ชันโท.....	85
ปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคมที่มีผลต่อการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี ของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพรในจังหวัดบุรีรัมย์ ปาริชาติ บัวแก้ว และ ไชยธีระ พันธุ์ภักดี.....	101
การรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวของเกษตรกรผู้ปลูกข้าวอำเภออมลาคะสิย จังหวัดกาฬสินธุ์ วีรณัฐ กุดแดง และ สุกัลยา เขียวขวัญ.....	113
การประเมินศักยภาพของเชื้อราก่อโรคแมลงครั้งแรกในห้องปฏิบัติการต่อการควบคุม หนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู <i>Sesamia inferens</i> (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) ในประเทศไทย สิริญา คัมภีโร และ ไสภณ อุไรชื่น.....	127
ผลของการเสริมสารสกัดกัญชงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่อุณหภูมิเย็น กัญญาณัฐ ไชยวรรณ วาที คงบรรทัด พชรพร ตาดี ตะวัน ฉัตรสูงเนิน วรรณลักษณ์ ดาวร พัทรี พรหมตัน และ วิวัฒน์ พัฒนาวงศ์.....	139
องค์ประกอบทางโภชนาและพลังงานใช้ประโยชน์ได้ของเศษเหลือเครื่องใน สัตว์ปีกในไก่ประดู่หางดำและไก่กระดุกดำโครงการหลวง ธีรเจต พิงคะสัน วรันทรรุ สิริธิสอน บุญล้อม ชีวะอิสระกุล และ สุชน ตั้งทวีวัฒน์.....	153
ผลของการเสริมกรดแกมมาเอมิโนบิวทีริกในอาหารต่อความเครียด จากการขนส่งและการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) ยุพรัตน์ อินทร์บุรี อรพินท์ จินตสถาพร ศรีน้อย ชุ่มคำ และ ศุภวิทย์ ไตรวุฒานนท์.....	169
ผลของการเสริมอีสต์โอโตไลเซทในอาหารต่อการเติบโตและระบบภูมิคุ้มกัน ภายใต้สภาวะความเครียดภายหลังการเหนี่ยวนำด้วยโรคไวรัสในกุ้งขาวแวนนาไม ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) พัชรพร จันทร์รอด อรพินท์ จินตสถาพร ศรีน้อย ชุ่มคำ และ ศุภวิทย์ ไตรวุฒานนท์.....	185
การเอนแคปซูเลชันสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายเกลียวทองด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย สุภาวดี พลโยธา และ สุทัศน์ สุระวัง.....	199

# คำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ

## เรื่องที่ต้องพิมพ์

1. เป็นบทความวิจัย บทความปริทัศน์ หรือบทความวิชาการทางด้านเกษตรศาสตร์ และสาขาที่เกี่ยวข้อง
2. ต้องไม่เคยได้รับตีพิมพ์มาก่อน (ต้นฉบับ หรือส่วนหนึ่งส่วนใดของต้นฉบับ) และต้นฉบับต้องไม่เคยอยู่ระหว่างกระบวนการพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารหรือสิ่งตีพิมพ์อื่นใด

## การเตรียมต้นฉบับ

1. ภาษา เป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ  
ต้นฉบับบทความภาษาอังกฤษโปรดแนบเอกสารรับรองการพิสูจน์อักษรโดยเจ้าของภาษาหรือสถาบันภาษา (Proofreading by Native English Speaker or English Institute)

## 2. การพิมพ์

- 1) พิมพ์หน้าเดียวบนกระดาษขนาด A4 พิมพ์แนวตั้ง (portrait orientation) ด้วยโปรแกรมไมโครซอฟต์ เวิร์ด (Microsoft Word for Windows) ตัวอักษรใช้ Cordia New โดยทั่วไปใช้ระยะบรรทัดปกติคือ 1 เท่า หรือ Single กำหนดระยะขอบทั้ง 4 ด้าน 1 นิ้ว (2.5 เซนติเมตร) ความยาวต้นฉบับไม่เกิน 10 - 12 หน้า (รวมเอกสารอ้างอิง)
- 2) ชื่อเรื่องให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 18 points พิมพ์ตัวหนา (bold) และจัดกึ่งกลางหน้ากระดาษ สำหรับชื่อเรื่องภาษาอังกฤษ กำหนดให้อักษรตัวแรกของคำให้พิมพ์ด้วยอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ (capital letter)
- 3) ชื่อผู้เขียนให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 15 points พิมพ์ตัวหนา และจัดกึ่งกลางหน้ากระดาษ
- 4) ที่อยู่และที่อยู่อีเมลของผู้เขียนให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 12 points พิมพ์ตัวเอียงธรรมดา (normal italic) และจัดกึ่งกลางหน้ากระดาษ
- 5) บทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 points พิมพ์ตัวธรรมดา (normal) ยกเว้นเฉพาะคำ บทคัดย่อ และ Abstract ให้พิมพ์ตัวหนา และจัดชิดซ้าย
- 6) เนื้อหาให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 points พิมพ์ตัวธรรมดา (normal)
- 7) หัวข้อหลัก ได้แก่ คำนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผลการทดลองและวิจารณ์ สรุป เอกสารอ้างอิง ให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 16 points พิมพ์ตัวหนา และจัดกึ่งกลางหน้ากระดาษ
- 8) หัวข้อย่อย ให้พิมพ์ตัวหนาและจัดชิดซ้าย
- 9) คำอธิบายตารางและภาพให้พิมพ์ด้วยตัวอักษร Cordia New ขนาด 14 points พิมพ์ตัวหนา โดยคำอธิบายตารางให้พิมพ์เหนือตารางและจัดชิดซ้าย ส่วนคำอธิบายภาพให้พิมพ์ใต้ภาพและจัดกึ่งกลางหน้า และคำอธิบายตารางและภาพถ้ามีมากกว่าหนึ่งบรรทัด ให้เริ่มต้นพิมพ์บรรทัดถัดมาตรงกับข้อความของบรรทัดแรก
- 10) หากมีชื่อวิทยาศาสตร์ปรากฏในบทความ ให้เขียนตามหลักเกณฑ์การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ ในครั้งแรกที่ปรากฏชื่อนี้ให้สะกดเต็ม เช่น *Meloidogyne incognita* และหลังจากนั้นถ้ามีการระบุชื่อนี้ซ้ำให้ย่อชื่อสกุล โดยเขียนเป็น *M. incognita*
- 11) คำว่า *et al.* และ *P* (*P*-value) ให้พิมพ์เอน

## ข้อแนะนำการใช้ภาษา

- 1) ใช้คำศัพท์ตามพจนานุกรม ฉบับราชบัณฑิตยสถาน และประกาศของราชบัณฑิตยสถาน
- 2) การเขียนชื่อเฉพาะหรือคำแปลจากภาษาต่างประเทศ ควรพิมพ์ภาษาเดิมของชื่อนั้น ๆ ไว้ในวงเล็บในครั้งแรกที่ปรากฏในบทความ โดยพิมพ์เป็นอักษรตัวพิมพ์เล็กทั้งหมด ยกเว้นชื่อเฉพาะให้พิมพ์เฉพาะอักษรตัวแรกเป็นตัวพิมพ์ใหญ่
- 3) ไม่ควรใช้ภาษาต่างประเทศถ้ามีภาษาไทยอยู่แล้ว
- 4) รักษาความสม่ำเสมอในการใช้คำ คำศัพท์ และตัวอย่าง โดยตลอดทั้งบทความ

## การเรียงลำดับหัวข้อ ให้เรียงตามลำดับดังนี้

1. **ชื่อเรื่อง (Title)** ควรสั้น ชัดเจน และต้องสื่อเป้าหมายหลักของงานศึกษาวิจัย ระบุชื่อเรื่องทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ต้นฉบับที่เป็นภาษาไทยให้พิมพ์ชื่อเรื่องเป็นภาษาไทยก่อน แล้วตามด้วยชื่อเรื่องภาษาอังกฤษ ต้นฉบับที่เป็นภาษาอังกฤษให้พิมพ์ชื่อเรื่องเป็นภาษาอังกฤษก่อน แล้วตามด้วยชื่อเรื่องภาษาไทย
2. **ชื่อผู้เขียน** ใช้ชื่อผู้เขียนเต็มและระบุชื่อผู้เขียนทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ใช้เครื่องหมายดอกจัน (\*) กำกับไว้ที่ท้ายนามสกุลของผู้เขียนที่ติดต่อ (corresponding author)
3. **ที่อยู่ หรือสังกัด** ระบุที่อยู่หรือสังกัดทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ หากที่อยู่หรือสังกัดมีหลายแห่ง ให้พิมพ์ภาษาไทยของที่อยู่หรือสังกัดแห่งแรกก่อนแล้วตามด้วย

ภาษาอังกฤษ จากนั้นพิมพ์ภาษาไทยของที่อยู่หรือสังกัดแห่งที่สองแล้วตามด้วยภาษาอังกฤษ ผู้เขียนมีหลายคนและมีที่อยู่หรือสังกัดแตกต่างกัน ให้ใช้เลขตัวยก (superscript) ที่ต่างกัน กำกับไว้ที่ท้ายนามสกุลของผู้เขียนทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ผู้เขียนคนเดียว หรือหลายคนแต่มีที่อยู่หรือสังกัดเดียวกัน ไม่ต้องใช้เลขตัวยก (superscript) กำกับไว้ที่ท้ายนามสกุลของผู้เขียน ผู้เขียนเป็นนักศึกษา ให้ระบุที่อยู่หรือสังกัดตามหลักสูตรของนักศึกษา บรรทัดถัดจากที่อยู่ ให้พิมพ์ที่อยู่อีเมล (email address) ของผู้เขียนที่ติดต่อ (corresponding author)

4. **บทคัดย่อ (Abstract)** ควรเป็นเนื้อหาที่สั้น ชัดเจนและเข้าใจง่าย รวมเหตุผลในการศึกษาวิจัย อุปกรณ์ วิธีการ ตลอดจนผลการศึกษาและสรุป ระบุบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ควรเกิน 250 คำ ต้นฉบับที่เป็นภาษาไทยให้พิมพ์บทคัดย่อภาษาอังกฤษก่อน แล้วตามด้วยบทคัดย่อภาษาไทย ต้นฉบับที่เป็นภาษาอังกฤษให้พิมพ์บทคัดย่อภาษาไทยก่อน แล้วตามด้วยบทคัดย่อภาษาอังกฤษ ระบุคำสำคัญ (Keywords) ไว้ท้ายบทคัดย่อแต่ละภาษาด้วย คำสำคัญไม่ควรเกิน 5 คำ

## 5. เนื้อหา (Text) ประกอบด้วย

- 5.1 **คำนำ (Introduction)** แสดงความเป็นมาและเหตุผลที่นำไปสู่การศึกษาวิจัย อาจรวมการทบทวนเอกสาร (review of literature) และวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยไว้ด้วย
- 5.2 **อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)** ให้บอกรายละเอียดของวัสดุ เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ ในการทดลอง ตลอดจนวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ และแบบจำลองการศึกษาวิจัยที่ชัดเจนและสมบูรณ์
- 5.3 **ผลการทดลองและวิจารณ์ หรือ ผลการศึกษาและวิจารณ์ (Results and Discussion)** ให้บรรยายผลการศึกษาวิจัย พร้อมเสนอข้อมูลในรูปแบบตารางหรือภาพประกอบได้ โดยตารางหรือภาพ รวมทั้งคำอธิบายให้จัดทำเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด ถ้ามีตารางหรือภาพในบทความ ให้อ้างตารางหรือภาพนั้นในเนื้อหาด้วยโดยใช้เป็นภาษาอังกฤษ เช่น Table หรือ Figure สำหรับการวิจารณ์ ควรเชื่อมโยงกับผลการศึกษาว่า สอดคล้องกับสมมุติฐาน หรือแตกต่างไปจากผลงานวิจัยที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหรือไม่อย่างไรและด้วยเหตุใด โดยมีพื้นฐานการอ้างอิงที่เชื่อถือได้
- 5.4 **สรุป (Conclusion)** เป็นการสรุปผลที่ได้รับจากการศึกษาวิจัย อาจมีข้อเสนอแนะ หรือระบุอุปสรรคและแผนงานวิจัยที่จะดำเนินการต่อไป
- 5.5 **กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)** อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ให้ทุนวิจัย หรือผู้ที่ช่วยเหลือในงานวิจัย แต่ไม่ได้เป็นผู้ร่วมงานวิจัย
- 5.6 **เอกสารอ้างอิง (References)** ให้เรียงเอกสารตามตัวอักษรอังกฤษ

## หลักการอ้างอิงและการเขียนเอกสารอ้างอิง

สืบเนื่องจากวารสารเกษตรมีความประสงค์ที่จะพัฒนาคุณภาพวารสารเพื่อปรับเข้าสู่ฐานข้อมูล ACI (ASEAN Citation Index) ซึ่งมีข้อกำหนดในการจัดทำเอกสารอ้างอิง (reference) โดยต้องจัดทำเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด ทั้งในเนื้อเรื่องและท้ายบทความ โดยหลักการอ้างอิงและการเขียนเอกสารอ้างอิง มีดังนี้

1. **การอ้างอิงในเนื้อเรื่อง** ระบบที่ใช้ในการอ้างอิงคือ ระบบชื่อ และปี (Name-and-year System) ให้ใช้ ชื่อสกุล และปี ค.ศ ดังนี้
  - 1.1 ผู้เขียนมี 1 คน ตัวอย่าง Kubo (2003) รายงานว่า.....หรือ.....(Kubo, 2003)
  - 1.2 ผู้เขียนมี 2 คน ให้ใช้คำว่า and คั่นกลาง ตัวอย่าง Muthita and Kuanprasert (2004) รายงานว่า.....หรือ.....(Muthita and Kuanprasert, 2004)
  - 1.3 ผู้เขียนมีมากกว่า 3 คน ให้ใช้ชื่อคนแรกและตามด้วยคำว่า *et al.* ตัวอย่าง Bukhari *et al.* (2011) รายงานว่า.....หรือ.....(Bukhari *et al.*, 2015)
  - 1.4 กรณีมีหลายรายงานอ้างอิงในเรื่องเดียวกัน ให้เรียงลำดับตามตัวอักษรภาษาอังกฤษ และใช้เครื่องหมายอัฒภาค (;) คั่นกลาง ตัวอย่าง (Bukhari *et al.* (2011); Kubo (2003); Muthita and Kuanprasert (2004))
  - 1.5 กรณีผู้แต่งเดียวกัน และปีพิมพ์เดียวกัน ให้เพิ่มตัวอักษร a b c ต่อท้ายปี ตัวอย่าง Tangtaweewipat *et al.* (2011a).....Tangtaweewipat *et al.* (2011b).....
  - 1.6 กรณีผู้แต่งเดียวกัน แต่ปีพิมพ์ต่างกัน ให้เรียงลำดับตามปีพิมพ์ ตัวอย่าง (Tangtaweewipat *et al.* 2009; Tangtaweewipat *et al.* 2018)

(ดูคำแนะนำการเขียนเอกสารอ้างอิง การส่งต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์ และการพิจารณาบทความได้ที่ปกหลังด้านใน)

# วารสารเกษตร

## JOURNAL OF AGRICULTURE

ผู้จัดพิมพ์	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Publisher	Faculty of Agriculture, Chiang Mai University
กำหนดการพิมพ์	วารสารราย 4 เดือน (3 ฉบับ/ปี) คือ ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน ฉบับที่ 2 พฤษภาคม-สิงหาคม ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม	Publication	Tri-annually Issue 1 January-April Issue 2 May-August Issue 3 September-December
วัตถุประสงค์	เพื่อเผยแพร่วิทยาการด้านการเกษตร และสาขาที่เกี่ยวข้อง	Objective	To disseminate academic knowledge in agriculture and related fields
ที่ปรึกษา	คณบดีคณะเกษตรศาสตร์ รองคณบดีฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ	Consultants	Dean, Faculty of Agriculture; Associate Dean for Research and Academic Services
บรรณาธิการ	รศ.ดร. ณัฐา โพธาภรณ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Editor	Nuttha Potapohn, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University
รองบรรณาธิการ	ผศ.ดร. ชูชาติ สันทรทรัพย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Vice Editor	Choochad Santasup, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University
กองบรรณาธิการ ฝ่ายวิชาการ	ผศ.ดร. บุศรา ลิ้มนิรันดรกุล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. จีรวรรณ กิจชัยเจริญ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศ.ดร. ชนากานต์ เทโบลด์ พรหมอุทัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รศ.ดร. ต่อนภา ผุสดี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. ฉันทลักษณ์ ดิยายอน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. พิมพ์ใจ สีหะนาม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. อรุณา เรืองวงษ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. เสาวลักษณ์ แยมหมื่นอาจ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผศ.ดร. มินตรา ศीलุดม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.ดร. มนต์รี แสนวงศ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Editorial Board (Academic)	Budsara Limnirankul, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Jirawan Kitchaicharoen, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Chanakan Thebault Prom-u-thai, Ph.D., Assoc. Prof. Chiang Mai University Tonapa Pusadee, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Chantalak Tiyyon, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Pimjai Seehanam, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Yaowaluk Chanbang, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University On-Uma Ruangwong, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Saowaluck Yammuen-art, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Mintra Seel-audom, Ph.D., Assist. Prof. Chiang Mai University Montri Sanwangsri, Ph.D. Chiang Mai University

รศ.ดร. พิชญา พูลลาภ  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
รศ.ดร. รุจ ศิริสัจญ์ลักษณ์  
ข้าราชการเกษียณอายุ  
รศ.ดร. ไสว บุรณพานิชพันธุ์  
ข้าราชการเกษียณอายุ  
ศ. ญาณวิทย์ ดร. เมธาวรรณพัฒน์  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น  
ศ.ดร. อังศุมาลย์ จันทราปัติย์  
ข้าราชการเกษียณอายุ  
ศ.ดร. สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร  
ข้าราชการเกษียณอายุ  
ศ.ดร. ธวัชชัย ศุภดิษฐ์  
สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์  
รศ.ดร. เสวียน เปรมประสิทธิ์  
มหาวิทยาลัยนเรศวร  
รศ.ดร. วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ  
ข้าราชการเกษียณอายุ  
รศ.ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น  
รศ. บำเพ็ญ เขียวหวาน  
มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมิกราช  
รศ.ดร. เกரியศักดิ์ เม่งอำพัน  
ข้าราชการเกษียณอายุ  
รศ.ดร. ธีรนุช เจริญกิจ  
มหาวิทยาลัยแม่โจ้  
ผศ.ดร. ปฎิภาณ สุทธิกุลบุตร  
มหาวิทยาลัยแม่โจ้  
ผศ.ดร. เพ็ญพร เจนการกิจ  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
ผศ.ดร. ไชยวรรณ วัฒนจันทร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
ผศ.ดร. เสาวคนธ์ วัฒนจันทร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
กองบรรณาธิการ  
ฝ่ายการจัดการ  
นางลาลิตยา นุ่มมีศรี  
นายมานพ เปี้ยพรรณ  
นางสาวศิริลักษณ์ ใจเหล็ก

Pichaya Poonlarp, Ph.D., Assoc. Prof.  
Chiang Mai University  
Ruth Sirisunyaluck, Ph.D., Assoc. Prof.  
Retired government official  
Sawai Buranapanichpan, Ph.D., Assoc. Prof.  
Retired government official  
Metha Wanapat, Ph.D., Prof.  
Khon Kaen University  
Angsumarn Chandrapaty, Ph.D., Prof.  
Khon Kaen University  
Suchila Techawongstien, D.Agr., Prof.  
Retired government official  
Tawadchai Suppadit, Ph.D., Prof.  
National Institute of Development Administration  
Savent Pampasit, Ph.D., Assoc. Prof.  
Naresuan University  
Weerathep Pongprasert, Ph.D., Assoc. Prof.  
Retired government official  
Petcharat Thummabenjapone, Ph.D., Assoc. Prof.  
Khon Kaen University  
Bumpen Keowan, M.S., Assoc. Prof.  
Sukhothai Thammathirat Open University  
Kriangsak Mengumphan, Ph.D., Assoc. Prof.  
Retired government official  
Theeranuch Jaroenkit, Ph.D., Assoc. Prof.  
Maejo University  
Pathipan Sutigoolabud, Ph.D., Assist. Prof.  
Maejo University  
Penporn Janekarkij, Ph.D., Assist. Prof.  
Kasetsart University  
Chaiyawan Wattanachant, Ph.D., Assist. Prof.  
Prince of Songkla University  
Saowakon Wattanachant, Ph.D., Assist. Prof.  
Prince of Songkla University  
Editorial Board  
(Management)  
Lalitaya Nummisri  
Manop Pearpun  
Sirilak Chailek

## บทบรรณาธิการ

สวัสดิ์ปี 2567 วารสารเกษตรฉบับนี้เป็นปีที่ 40 ฉบับที่ 1 ประจำเดือนมกราคม - เมษายน พ.ศ. 2567 ในฉบับนี้ประกอบด้วยบทความทางวิชาการที่มีต้นฉบับเป็นภาษาไทย จำนวน 13 เรื่อง ภาษาอังกฤษ จำนวน 2 เรื่อง ประกอบด้วย สาขาปฐพีศาสตร์ 3 เรื่อง สาขาพืชสวน 3 เรื่อง สาขาโรคพืช 1 เรื่อง สาขาส่งเสริมและเผยแพร่การเกษตร 2 เรื่อง สาขาวิชากีฏวิทยา 1 เรื่อง สาขาสัตวศาสตร์ 2 เรื่อง สาขาสัตวน้ำ 2 เรื่อง สาขาการผลิตและนวัตกรรมอาหาร 1 เรื่อง

ทางวารสารเกษตร เปิดรับบทความวิชาการทางเกษตร วิทยาศาสตร์เกษตร และสาขาที่เกี่ยวข้อง ผู้ที่สนใจส่งบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารเกษตร สามารถหาข้อมูลเพิ่มเติมได้จากเว็บไซต์วารสาร <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/joacmu/index> หรือสามารถติดต่อมายังกองบรรณาธิการได้ที่ E-mail : [agjournal22@gmail.com](mailto:agjournal22@gmail.com) ขอให้ทุกท่านมีความสุข สุขภาพแข็งแรง ส่งผลงานวิจัยมาตีพิมพ์กันนะคะ และพบกันฉบับต่อไปค่ะ

รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐา โพธารมณ์  
บรรณาธิการวารสารเกษตร



Effects of Goat Manure-Biochar Compost on  
Soil Microbial Activities Relating Soil Carbon Sequestration

ผลของปุ๋ยหมักถ่านชีวภาพมูลแพะต่อกิจกรรมจุลินทรีย์  
ในดินที่สัมพันธ์กับการกักเก็บคาร์บอนในดิน

Bhanudacha Kamolmanit<sup>1\*</sup>, Siwaporn Paengkom<sup>1</sup> and Natthakittiya Paiboon<sup>2</sup>  
ภาณุเดชา กมลมานิต<sup>1\*</sup> ศิวพร แพงคำ<sup>1</sup> และ ณัฐกิตติยา ไพบูลย์<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Agriculture, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University,  
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

<sup>1</sup>สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา จ. นครราชสีมา 30000

<sup>2</sup>Institute of Interdisciplinary Study, Rajamangala University of Technology Isan, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

<sup>2</sup>สถาบันสหบรรพชาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน จ. นครราชสีมา 30000

\*Corresponding author: Email: bhanudacha@yahoo.com

(Received: 30 March 2023; Accepted: 22 September 2023)

**บทคัดย่อ:** การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตอบสนองของจุลินทรีย์ในดินที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์  
หมุนเวียนคาร์บอนต่อการใช้ปุ๋ยเคมีหรือวัสดุอินทรีย์ที่สัมพันธ์กับการสะสมคาร์บอนอินทรีย์ในดิน กรรมวิธีทดลอง  
ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี ดังนี้ 1) ควบคุม (ไม่มีการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยเคมี) 2) ปุ๋ยเคมี (CF) (N-P-K = 15-15-15)  
3) มูลแพะ (GM) และ 4) ปุ๋ยหมักถ่านมูลแพะ (GMBC) ผลการศึกษาพบว่า ภายหลังจากการใส่วัสดุอินทรีย์  
ค่าการหายใจของจุลินทรีย์ต่อมวลชีวภาพจุลินทรีย์คาร์บอน ( $qCO_2$ ) สูงสุดในกรรมวิธี GM ตามด้วยกรรมวิธี GMBC  
มีค่าเท่ากับ 0.3617 และ 0.26 mg  $CO_2$ -C/g MBC/day ตามลำดับ การปลดปล่อย  $CO_2$ -C สะสมมีค่าสูงสุดในกรรมวิธี  
GM ภายหลังจาก 112 วันหลังการใส่ (2,578 mg  $CO_2$ -C/m<sup>2</sup>/day) ตามด้วยกรรมวิธี GMBC CF และกรรมวิธีควบคุม  
มีค่าเท่ากับ 1,481 685 และ 613 mg  $CO_2$ -C/m<sup>2</sup>/day ตามลำดับ ทั้งนี้ภายหลังจาก 21 วันหลังการใส่พบกิจกรรมจำเพาะ  
ของเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสเพิ่มขึ้นสูงภายใต้กรรมวิธี GM มีค่าเท่ากับ 878  $\mu$ g p-nitrophenol/g MBC/h ขณะเดียวกัน  
พบว่า กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีค่าสูงสุดในวันที่ 21 และ 77 (0.044 และ 0.036  $\mu$ mol dicq/g  
MBC/h) ทั้งนี้พบสหสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างกิจกรรมของบีตา-กลูโคซิเดส และการปลดปล่อย  $CO_2$  ( $r = 0.6648^{***}$ )  
รวมถึงมวลชีวภาพจุลินทรีย์คาร์บอน ( $r = 0.6438^{***}$ ) การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ารูปของคาร์บอนจากวัสดุอินทรีย์ส่งผลต่อ  
กิจกรรมของเอนไซม์หมุนเวียนคาร์บอนในดินมากกว่าไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบ ปุ๋ยหมักถ่านมูลแพะเหมาะสมใช้  
การปรับปรุงดินทรายจากการมีคาร์บอนทั้งรูปที่ง่ายและยากต่อการย่อยสลาย และมีค่า C/N ที่เหมาะสมต่อการ  
นำไปใช้โดยจุลินทรีย์

**คำสำคัญ:** คาร์บอนอินทรีย์ในดิน เอนไซม์ในดิน ปุ๋ยหมักถ่านมูลแพะ บีตา-กลูโคซิเดส ฟีนอลออกซิเดส

**Abstract:** This research aimed to study the responses of soil microorganisms associated with carbon cycling enzyme activity to the application of chemical fertilizers or organic materials concerning soil organic carbon accumulation. The experiment consisted of four treatments: 1) control (unamended soil); 2) chemical fertilizer (N-P-K = 15-15-15) (CF); 3) goat manure (GM); and 4) GM-biochar compost (GMBC). The study found that after 3 hours of organic input incorporation, the soil metabolic quotient ( $qCO_2$ ) was the highest in the GM treatment, followed by GMBC treatments (0.3617 and 0.26 mg  $CO_2$ -C/g MBC/day, respectively). The cumulative  $CO_2$ -C evolution was the highest in the GM treatment after 112 days of incorporation (2,578 mg  $CO_2$ -C/m<sup>2</sup>/day), followed by the GMBC, CF, and control treatment (1,481, 685, and 613 mg  $CO_2$ -C/m<sup>2</sup>/day, respectively). The specific  $\beta$ -glucosidase activity increased sharply with the GM treatment (878  $\mu$ g p-nitrophenol/g MBC/h) after 21 days of organic inputs. Therefore, the specific phenoloxidase activity in the GMBC treatment had the highest enzyme activity of 0.044 and 0.036  $\mu$ mol dicq/g MBC/h on days 21 and 77 ( $P < 0.05$ ). Absolute  $\beta$ -glucosidase was positively correlated with  $CO_2$  emissions ( $r = 0.6648^{***}$ ), while microbial biomass C was also governed by the activity of this enzyme ( $r = 0.6438^{***}$ ). Our study indicated that the C form of organic inputs had a stronger influence on C-cycling enzyme activities than the influence of nitrogen. The goat manure biochar composts were the best suited for improving soil the organic C content in sandy soil, as it contains both easily and resistant C compounds coupled with an appropriate C/N ratio for microbial use.

**Keywords:** Soil organic carbon, soil enzymes, goat manure-biochar compost,  $\beta$ -glucosidase, phenoloxidase

## Introduction

Soil microorganism activity is the key factor determining soil fertility and carbon (C) sequestration in soil. Therefore, it is crucial to investigate how the metabolic activity of soil microorganisms responds to the differentiation of C sources (e.g., easily and resistant C compounds), particularly in highly weathered sandy soil where original nitrogen (N) concentrations are low. The activity of soil C-cycling enzymes has received increasing attention as an indicator of soil fertility, particularly as influenced by the C availability of organic inputs (Kamolmanit *et al.*, 2013). Although it has been reported that the application of contrasting quality organic inputs can influence soil microbial activities concerning enzyme activities in soil, the pattern of changes in specific enzyme

activities is still unclear. Generally, the activities of easily decomposable C compound-degrading enzymes are positively related to C and also N concentrations in organic inputs or soils (Mazzon *et al.*, 2018). Studies have shown that adding N has a potent influence on the inhibition of phenoloxidase activity, but the opposite is true for the labile C compounds (Carreiro *et al.*, 2000). However, the positive effects of N on phenoloxidase activity resulted in the depletion of soil organic matter (SOM), leading to the decline of indigenous soil organic carbon (SOC) (Kuzyakov, 2010; Sinsabaugh, 2010). Since C-cycling enzyme activity plays a crucial role in residue decomposition, we chose both labile- and resistant-C compound degrading enzymes as a comparative factor, as it is a significant component of soil function, particularly in highly weathered soil.

Recycling animal manure into low-cost organic fertilizers has a beneficial effect on the growth and productivity of various crops and promotes the restoration of the ecological and economic functions of the soil. Another approach to improve some properties of goat manure is to create biochar. The resulting manure-biochar created yields with a high percentage of fixed C (Kamolmanit *et al.*, 2018). Many herbivore manures have been investigated as materials for biochar production (Situmeang *et al.*, 2019; Tsai *et al.*, 2012). However, compared to goat manure, other types of manure such as poultry and pig manure contain high levels of plant macronutrients and high C/N ratios, so farmers prefer to incorporate them directly into the soil or make compost. Fresh goat manure reportedly has a fixed carbon content of 129 g/kg, which can be used as feedstock for the production of biochar (Kamolmanite and Lawongsa. 2021). In 2022, the Department of Livestock Development in Thailand published data on goat husbandry, which revealed over 1,500,000 goat heads (Department of Livestock Development, 2022). According to Osuhor *et al.* (2002), the mean manure production per head per day was 0.38 kg. It's possible to use goat manure for biochar production since it can yield around 570,000 per head per day Animal manure biochar can also increase C stabilizers and plant nutrients more than fresh manure (Kanouo *et al.*, 2018; Kiran *et al.*, 2017; Sarfaraz *et al.*, 2020; Zwetsloot *et al.*, 2016). Biochar is a C-rich material with a more stable structure than natural materials and leads to soil stability compared with other organic C materials when applied to the soil approach for soil C sequestration (Kuzyakov *et al.*, 2009; Skjemstad *et al.*, 2002; Zimmerman *et al.*, 2011). However, insight into the decomposition process during

biochar product decomposition and how C availability exerts an influence on the activities of C-cycling enzymes are lacking. There is limited information on how the use of goat manure biochar composts as organic fertilizer is involved in the microbial decomposition process related to the pattern of soil C storage. Thus, in this study, we hypothesized that C sequestration in form of microbial biomass was controlled by C availability and concentrations of N compounds in organic inputs, particularly in goat manure-biochar compost. This study aimed to investigate the responses of soil microorganisms to fertilizer or organic inputs through the expression of microbial activities, particularly the relationship between C-cycling enzyme activities and microbiological properties involved in C dynamics and its accumulation.

## Materials and Methods

### Soil and organic materials

The soil was taken from a field experiment at the Agricultural Training and Research Center, Nakhon Ratchasima Rajabhat University, Thailand. The soil texture was sandy loam comprising sand, silt, and clay particles at 73.4, 13.6, and 13 %, respectively. At 0-15 cm depth, the initial topsoil characteristics were soil density 1.58 g/cm<sup>3</sup>, pH 5.3, soil organic C 2.2 g/kg, total N 0.18 g/kg with a soil C/N ratio of 12.22, available P 10.3 mg/kg, and exchangeable K 20.79 mg/kg. Sunflowers (*Helianthus annuus* L.) have dominated the plants grown at the site each year since late October 2015. This year will be the 7<sup>th</sup> sunflower planting in which chemical fertilizer was applied, as well as the first year with organic input incorporation. The organic input treatments of the experiment for the first year was applied in late October, 2021.

The goat manure (GM) biochar production was pyrolyzed by modern kiln sizes [3.5 m (width) x 5 m (length) x 2 m (height)]. In a preliminary study, the pyrolysis temperature of the kilns tested ranged from 350 - 450 °C. We prepared compost from rice straw, goat manure, and GM biochar at an initial C/N ratio of 30 : 1. Some properties of the rice straw used in the composting process were: pH (materials: water = 1 : 10) 5.85, organic C 520 (g/kg), total N 4.2 (g/kg) with a C/N ratio of 123.8. The mixed ratio was calculated based on the percentage of total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), and the moisture content of the material. The rice straw, goat manure, and GM biochar amount were 150, 650, and 200 kg (wet weight), respectively, by mixing 1,000 kg of composting material with a microbial activator. Mix the organic material homogeneously and take a sample to calculate the amount of water to be added up to 60% of the dry weight. Turn the compost pile an average of twice a week. Adjust the moisture control when the temperature is at maturity for 2 weeks. Continue composting until 49 days. Both goat manure and goat manure biochar compost were added directly to the plot without sifting, but had to sort out branches, stones, and other contaminants.

#### Field experiment set-up and maintenance

The experiment was carried out along with the sunflower planting. The experiment had four treatments organized in a randomized complete block design (RCBD) with three replications, consisting of 1) control (unamended soil), 2) chemical fertilizer (CF), 3) goat manure (GM), and 4) GM-biochar compost (GMBC). In this study, seedlings of sunflower were transplanted into plots with a plant spacing of 45 cm and a

row spacing of 70 cm, then rows were divided for treatment and fertilizer was applied along the planting row. For the fertilized plots, chemical fertilizer (N - P - K) (15 - 15 - 15) was applied to the soil at the rate of 312.5 kg/ha by dividing the chemical fertilizer twice, the first time before transplanting and the second time when the sunflower has an average of 5 - 7 leaves. Organic inputs were used in treatments 3 and 4 at a rate of 3,125 kg/ha, 20 days after transplanting, with only single sprinkle along the planting row. All materials were evenly distributed on the soil surface in a 0.16 ha plot and subsequently ploughed into the soil to a 15 cm depth. Soil samples were randomly collected between rows within each treatment at 0 (3 h), 7, 21, 49, 63, 77 and 112 days after incorporation of all inputs.

#### Soil and plant analyses

The soil pH (1 : 2.5, soil: water) was determined using a pH meter. Organic C was oxidized using dichromate ( $K_2Cr_2O_7$ ), followed by titration with ferrous sulfate ( $FeSO_4$ ) (Black, 1965). Total N was determined using the Kjeldahl method (Alef and Nannipieri, 1995). Mineral N ( $NH_4^+$ -N and  $NO_3^-$ -N) was measured by extracting the fresh soil samples and calorimetrically determined via a flow injection analyzer according to the Tecator Application Notes ASN 65-31/84 and ASN 65-32/84 (Emteryd, 1989). Microbial biomass C was measured through the chloroform fumigation-extraction method (Amato and Ladd, 1988). The soil was extracted with 0.5 M  $K_2SO_4$  and then oxidized with  $K_2Cr_2O_7$ . The C content in the microbial biomass significantly differed in the fumigated and unfumigated soil samples, using a *k*EC factor of 0.33 (Sparling and West, 1988). A brief description and the calculation of  $CO_2$ -C

evolution were conducted as follows: Carbon dioxide was determined using the alkaline trapped method in which a glass bottle containing 1 N NaOH was placed in a polyethylene glycol container ( $\phi = 20$  cm). Trapped  $\text{CO}_2$  was determined by titration with 0.5 M HCl (Rowell, 1994). The evolution rate of  $\text{CO}_2$ -C was expressed in mg/kg soil/day or  $\text{mg/m}^2/\text{day}$ . The activity of  $\beta$ -glucosidase was measured, as described by Alef and Nannipieri (1995) using 25 mM *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside as a substrate. The specific activity was expressed as  $\mu\text{g p-nitrophenol/g MBC/h}$ . The activity of phenoloxidase was measured, as described by Hendel *et al.* (2005); using 5 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) as substrate. The specific activity was expressed as  $\mu\text{mol 2,3-dihydroindole-2-carboxylate (dicq)/g MBC/h}$ . Total P and total K were digested by nitric-perchloric acids. Phosphorus concentration was developed with a vanadomolybdate solution and measured at a wavelength of 420 nm with spectrophotometer (Olsen and Sommers, 1982). Potassium concentration was analyzed by an atomic absorption spectrophotometer. Biochar analyses for proximate valuation were carried out according to ASTM D 1762-84 (ASTM International, 2007) in which moisture analysis was determined in the samples at  $105^\circ\text{C}$  until constant weight. Volatile matter (VM) was achieved by calcining each treatment at  $950^\circ\text{C}$  for 6 min. Ash content was measured by burning the sample at  $750^\circ\text{C}$  for 6 hours, during which the carbon was constant (fixed C).

### Statistical analysis

One factor analysis of variance (ANOVA) along with least significant differences (LSD) was used to analyze the treatment effects on the soil

and microbial parameters ( $P < 0.05$ ) (Statistix 8.0). Pearson's correlation analysis was conducted to evaluate the relationships between enzyme activities and the other parameters.

## Results

For biochar production, the pyrolysis temperature of the incinerator was observed to change with a slight increase in temperature in the late production lot. Goat manure biochar produced approximately 36.2 % less volatile matter than the fresh one, but increased ash and fixed C by 47.2 and 2.32 %, respectively. About 215 kg of GM-biochar (GMB) with a turnover percentage of 33 % was obtained from a total of 650 kg of dried goat manure. The pH of GM-biochar compost indicated that it was slightly basic (8.17). This manure-derived biochar was also high in P and K compared with the fresh manure, notably, the N contents decreased (Table 1). After 112 days after transplanting, the highest pH was found by the GMBC treatment at 6.91, followed by the GM and control treatment at 6.67 and 6.60, respectively. The chemical fertilizer treatment resulted in the lowest soil pH at 6.21. The addition of organic inputs resulted in the highest SOC content in the GM treatment (3.04 g/kg), followed by the GMBC treatment (2.88 g/kg), while the chemical fertilizer treatment had the lowest SOC content (1.65 g/kg) compared to the organic input-treated treatments ( $P < 0.05$ ). Although the soil treated with chemical fertilizer had lower SOC than the control soil on day 112 of the investigation, no statistically significant difference was observed. (Table 2).

Table 1. Organic material properties used in the experiment

Parameter	Goat manure (GM)	GM-biochar (GMB)	GM-biochar compost (GMBC)
pH (materials: water = 1: 10)	7.79	8.68	8.17
Organic C (g/kg)	316.5	372.4	195
Total N (g/kg)	13.6	9.8	8.5
C/N ratio	23.30	38	22.94
Total P (g/kg)	1.8	2.5	2.1
Total K (g/kg)	26	103.6	54
Volatile matter (%)	79.12	50.48	nd
Ash (%)	20.03	47.2	nd
Fixed C (%)	0.85	2.32	nd

nd: not determined

Table 2. Soil chemical properties (&lt;1 mm) after 112 days of organic inputs incorporation

Parameter	Treatment								P	SED
	Control		CF		GM		GMBC			
pH (soil : water = 1: 2.5)	6.59	ab	6.21	b	6.67	a	6.91	a	*	0.19
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/kg)	0.71	b	36.12	a	0.87	b	2.8	b	***	1.83
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/kg)	1.58	c	20.35	a	6.25	b	0.05	c	***	1.77
SOC (g/kg)	1.89	bc	1.65	c	3.04	a	2.88	ab	*	0.52
total N (g/kg)	0.14	b	0.24	a	0.19	ab	0.18	b	*	0.03
Soil C/N ratio	13.56	a	6.92	b	15.93	a	16.2	a	*	3.01

\*, \*\*\* Standard error of the difference (SED) at  $P < 0.05$ , and  $P < 0.001$ , respectively

Means for the same character within the row with the same letter are not significantly different by LSD at 0.05

After 3 h of organic inputs, the highest and second highest metabolic quotient ( $q\text{CO}_2$ ) of soil was found in the treatments GM and GMBC (0.3617 and 0.26 mg CO<sub>2</sub>-C/g MBC/day, respectively) ( $P < 0.001$ ). However, all treatments had no statistical difference after day 77 of the organic inputs incorporation. It was found that the  $q\text{CO}_2$  of the CF treatment was lower than that of the GM treatment during days 0 - 63 (Figure 1), while the control treatment had a microbial biomass carbon of about 49 - 94 mg C/kg, which was the lowest value (data not shown).

The cumulative CO<sub>2</sub>-C evolution was highest in the GM treatment within 112 days after incorporation (2,578 mg CO<sub>2</sub>-C/m<sup>2</sup>/day), followed by the GMBC, CF, and control treatment (1,481, 685, and 613 mg CO<sub>2</sub>-C/m<sup>2</sup>/day, respectively). The study found that the GM treatment had the highest cumulative CO<sub>2</sub> emissions over all periods, with the GMBC treatment scoring second ( $P < 0.001$ ), whereas the CF treatment did not disrupt the CO<sub>2</sub> emissions differently from that of the control treatment (Figure 2). Activities of  $\beta$ -glucosidase and phenoloxidase showed different

short-term responses to the chemical fertilizer and organic inputs. The absolute  $\beta$ -glucosidase was positively correlated with  $\text{CO}_2$  emissions ( $r = 0.6648^{***}$ ). Microbial biomass C was also governed

by the activity of this enzyme ( $r = 0.6438^{***}$ ). Therefore, the absolute activity of phenoloxidase was positively correlated with soil pH ( $r = 0.5334^{***}$ ) (Table 3).

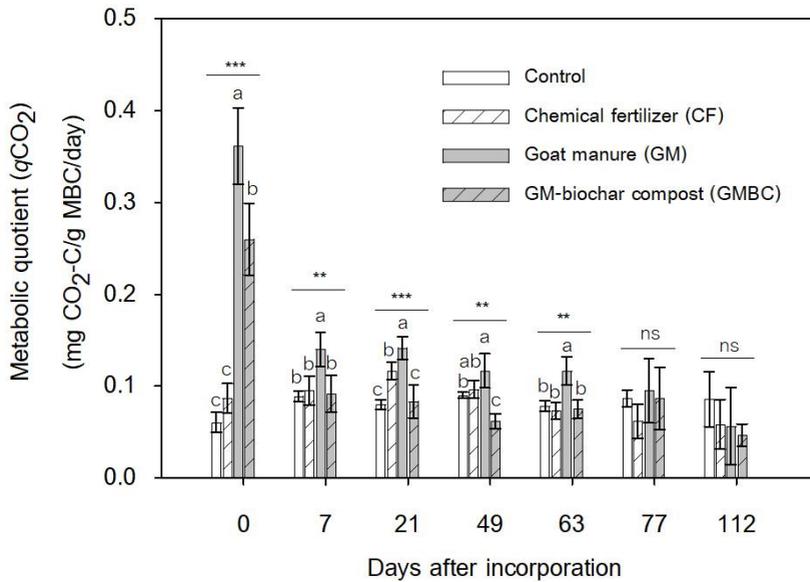


Figure 1. Metabolic quotient ( $q\text{CO}_2$ ) in soil after chemical fertilizer and organic inputs

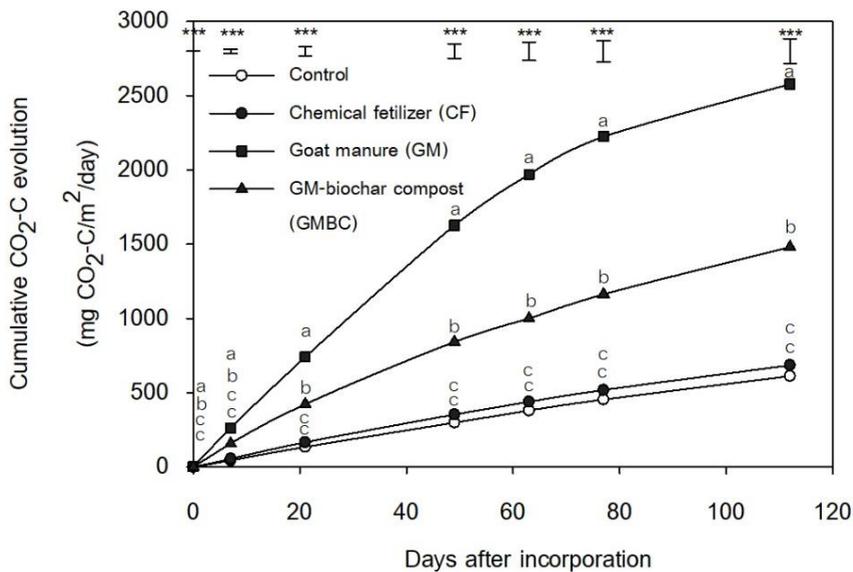


Figure 2. Cumulative  $\text{CO}_2\text{-C}$  emissions as affected by chemical fertilizer and organic inputs

Table 3. Pearson correlation coefficients (*r*) between enzyme activities and microbial parameters after 112 days of organic material incorporation

Parameters	$\beta$ -glucosidase activity	Phenoloxidase activity
Microbial biomass C	0.6438 ***	0.5676 ***
CO <sub>2</sub> emissions	0.6648 ***	0.3687
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	0.1412	-0.2110
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0.1250	-0.3308
pH	0.2618	0.5334 ***

The specific  $\beta$ -glucosidase activity increased sharply in the GM treatment during the first 21 days of organic inputs (0.143-0.878  $\mu$ g *p*-nitrophenol/g MBC/h). Meanwhile, the specific activity of this enzyme in the GMBC treatment was lower than that in the soil treated with the fresh one, except for days 77 and 112 (Figure 3a). The specific phenoloxidase activity in the GMBC treatment had the highest enzyme activity of 0.044 and 0.036  $\mu$ mol dicq/g MBC/h on days 21 and 77 ( $P < 0.05$ ) (Figure 3b). The GM treatment indicated an increase in the activity of this enzyme after 21 days of organic inputs. The specific phenoloxidase activity of the soil amended with fresh goat manure demonstrated a significantly higher activity, but only on day 49 (0.042  $\mu$ mol dicq/g MBC/h).

## Discussion

### Organic inputs properties

The temperature used for the biochar production was measured between 350 - 450 °C, which may affect the uniformity of the charcoal produced. In this study, we found that GM-biochar compost (GMBC) with an initial practical C/N ratio of 31.9 (data not shown) and an added microbial activator required a shorter time to reach maturity (around day 42) than previously reported by

Kamolmanit *et al.* (2018), as shown by ambient temperature coupled with a final C/N ratio close to 20 : 1 (22.94). A previous lab-scale study by Kamolmanit *et al.* (2018); used hardwood biochar, which has a higher structural resistance to degradation than manure biochar. Therefore, our results showed that using manure biochar as an ingredient in compost instead of wood biochar has several advantages, such as increasing the nutrients and reducing the decomposition time. Although the C/N ratio between GM and GMBC was quite close, GMBC was found to increase plant nutrients, which could be due to biochar has a higher percentage of fixed carbon (2.32 %) than fresh manure (0.85 %). Meanwhile, GMBC had 37.5 % less total N than fresh goat manure (Table 1). This is because N concentrations found in the biochar were reported to be negatively associated with pyrolysis temperature (Ippolito *et al.*, 2020). Generally, biochar production at temperatures below 350 °C is often found in pyrolysis by traditional methods using a traditional kiln (Butnan *et al.*, 2016). Therefore, biochar produced at temperatures below 350 °C will result in higher soil cation exchange capacity (CEC), and create a porous surface area, thereby improving the soil for cultivation (Jiang *et al.*, 2021).

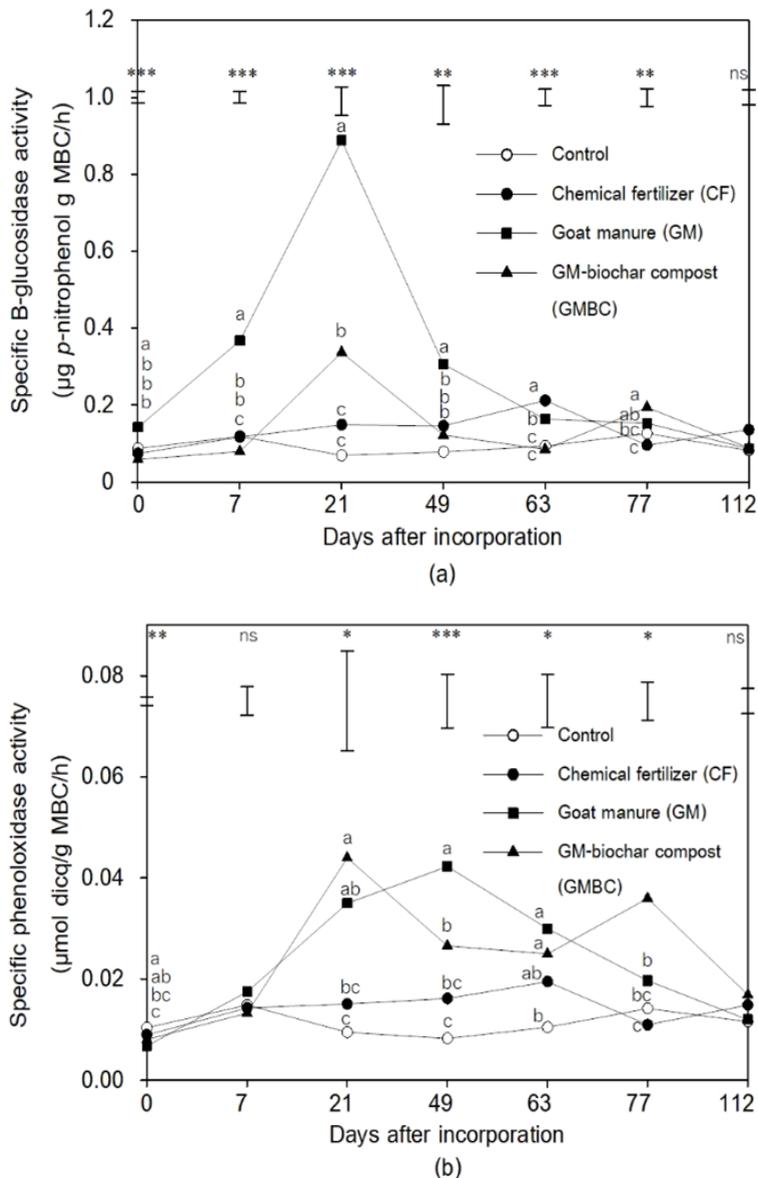


Figure 3. Specific activities of  $\beta$ -glucosidase (a) and phenoloxidase (b) in the soil

### Soil properties and SOC accumulation

The significant rise in pH in the soil treated with GMBC (6.91) and GM (6.67), compared to CF soil (6.21) (Table 2), may be due to the reduction capacity of some volatile matter (VM) compounds; including catechol, gallic acid, and tannic acid (Hue *et al.*, 2001). Both ash concentrations and the reduction potential of VM, which occurs when

$\text{Mn}^{4+}$  or  $\text{Mn}^{3+}$  is reduced to  $\text{Mn}^{2+}$  may have contributed to the pH increase brought on by the addition of biochar (Butnan *et al.*, 2016). Compared to the GMBC soil, therefore, the lower pH found in the soil after applying fresh goat manure may have resulted from easily decomposable organic C being degraded to organic acid by the acid-forming bacteria observed in the fresh manure. The pH drop in the GM treatment

may also be caused by the mineralization of organic acids that occurred through the decomposition process in the soil, as well as the large quantities of CO<sub>2</sub> released within this treatment. The GMBC is different from any other organic material, as it consists of easily decomposable C, which can be immediately used as an energy source for microorganisms. The compost that contains GM-biochar (GMB) also has high resistance C compounds that increase the accumulation of organic matter in the soil, and result in a yield with a high microbial biomass carbon.

SOC analysis on day 112 indicated that C concentrations in the soil increased through by adding organic inputs in both fresh manure and compost forms (Table 2). Notably, adding inorganic fertilizer to the soil did not increase the C content of the soil. As seen in Table 2, fresh goat manure contained a high concentration of total organic C (316.5 g/kg), increasing the SOC content up to 1.65 g/kg when added to the soil. This is further substantiated by observing the lowest SOC accumulation under long-term fertilizer applications in the field since 2015, demonstrating the complete decomposition of easily decomposable C substrates. Schulz and Glaser (2012) found that, in the first cycle of oat (*Avena sativa*) cultivation, crop growth was best in soil treated with compost, followed by biochar-compost, biochar-chemical fertilizer, and chemical fertilizer. In the second cycle, they found that the soil treated with a biochar-chemical fertilizer resulted in the highest increases in SOC, CEC, and soil pH. The above studies have shown that compost contains the significant nutrients needed for plant growth, compared to that of pure biochar. As a result, the crops in the compost-treated soil produced higher yields than those of other organic materials in the first cycle. The second crop,

considered as long-term production, demonstrated that biochar compost promotes an increase in SOM accumulation and the release of plant nutrients.

#### Microbiological parameters and microbial activities

A high metabolic quotient ( $q\text{CO}_2$ ) will indicate the ratio of CO<sub>2</sub> to the carbon used to make microbial cells. Higher values suggest that microorganisms' potential for C use in organic materials is low (Figure 1). Similar to  $q\text{CO}_2$ , high values of  $q\text{CO}_2$  in the GM treatment reflect the greater reductions in SOC than those in microbial activities when the soil was amended with labile C compounds. Consequently, GMBC-containing biochar proved to be a better source of C substrate for soil microorganisms. There was significant cumulative CO<sub>2</sub>-C evolution in soil amended with goat manure compared to the more resistant materials e.g., GMBC at all stages of decomposition, indicating that the labile C compound was the main factor regulating microbial activities. This was found in positive correlations between CO<sub>2</sub>-C emissions and absolute  $\beta$ -glucosidase activity ( $r = 0.6648^{***}$ ). The activity of this enzyme has been reported to be related to the C dynamics in soil and can indicate the degradation of labile C in soil (Kang *et al.*, 1998). Our findings confirm the ecological importance of the chemical properties of organic inputs in highly weathered sandy soil expressed in three months of data. Our study also indicates that organic inputs with high fixed C content, like GMBC, were most effective among treatments in accumulating soil microbial biomass C by reducing microbial CO<sub>2</sub>-C emissions.

The activities of extracellular enzymes provide insights into the biochemical controls of soil C storage because this enzyme catalyzes rate-limiting steps in organic matter degradation and

the correlations between the rates of plant litter decomposition and microbial production (Sinsabaugh, 2010; Sinsabaugh *et al.*, 2005; Waldrop and Harden, 2008). In soil studies, enzyme activity is generally presented in absolute terms but does not reflect the microbial part of its production (Acosta-Martínez *et al.*, 2003). Consequently, some studies have shown the importance of enzyme assessment activities related to soil microbial biomass or soil organic carbon, also referred to as a specific enzyme activity (Medeiros *et al.*, 2015). A rapid increase in specific enzyme activities in soil treated with organic inputs indicated that physiologically capable C exists in biomass. This is because these specific activities involving living microbial communities (Waldrop *et al.*, 2000) were more metabolic (Lagomarsino *et al.*, 2011) compared to soil suffering from land use changes that were previously fed with chemical fertilizers over a long period.

Soil treated with fresh goat manure showed higher specific  $\beta$ -glucosidase activities than those of the biochar compost indicating that the critical role of C availability from the substrate, e.g., cellulose, in manure stimulates the activity of this enzyme. The high cumulative CO<sub>2</sub> emissions indicated that fresh manure was used for biomass, and microbes utilized the carbon, and released a significant amount of CO<sub>2</sub> into the atmosphere (Figure 2). Support for this assumption was provided in the soil treated with goat manure, in which  $\beta$ -glucosidase activity indicated a positive correlation between MBC and CO<sub>2</sub>-C emissions. Interestingly, although GMBC had the second highest readily available C (195 g/kg) compared to the fresh manure (316.5 g/kg), it did not translate into the stimulation of specific  $\beta$ -glucosidase activities, except on day 21 (Figure 3a). Activity stimulation occurred on day 21, which arose from the availability of the previously protected

cellulose in the biochar. One hypothesis referred to the pyrolysis temperature, the most important factor affecting the characteristics of the biochar used in this study. Another possible mechanism; there may also be internal holes in this low-temperature pyrolysis of biochar (< 350 °C) containing incomplete combustion cellulose (Kuo *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2017). This implies that the activity of  $\beta$ -glucosidase is influenced by the availability of carbon, as well as the defenses against cellulose degradation. This was observed in the unique patterns of microbial activities between the two types of enzymes; phenoloxidase and  $\beta$ -glucosidase (Figures 3a, b). The specific activity of phenoloxidase in the GMBC treatment increased rapidly, as the biochar in the compost had undergone microbial degradation from the previous decomposition process. It was observed that after 63 days there was an increase in phenoloxidase activity, which could be attributed to the enzymes in the biochar pores or on the surface that were previously protected. Verheijen *et al.* (2009) reported that cellulose decomposes in the temperature range of 250 - 350 °C, while lignin decomposes in the temperature range of 280-500 °C. This may also be caused by the incomplete combustion of biochar that resulted in degradation by microorganisms. Similar to  $\beta$ -glucosidase, the sharp increase in specific phenoloxidase activity was observed after day 7 (Figure 3b), indicating the adjustment of soil microorganisms to the complex C substrates of the inputs (Hadas *et al.*, 2004; Rubin, 2008). We expected that not only lignin but also fixed C would become another important factor/parameter regulating phenoloxidase activity. Furthermore, we did not observe the suppressive effects of N inputs on specific phenoloxidase activities, as shown by the increased specific phenoloxidase activities in both biochar and control soil. However, the effects

of N on both C-cycling enzyme activities were not observed in this study.

We may deduce phenoloxidase activity which has a more significant effect on C stimulation than the N source. This assumption was supported by Keeler *et al.* (2009) who studied the non-effectual effects of organic N inputs on resistant C compound-degrading enzymes in forest and grassland soil. Interestingly, our findings do not support the ongoing discussion of the inhibitory effects of N on the activity of resistant C compound-degrading enzymes, as previously reported by Berg and Matzner (1997). It has been reported that the concentration of N has negative effects on enzyme activities (Liu *et al.*, 2021). Our study revealed no significant negative effects of N on phenoloxidase activity, as seen in Table 3. Lastly, the global cycling of C through biochar production showed that more than 50 % of the existing C was converted to stable form (Venkatesh *et al.*, 2013). For this reason, amended biochar compost has the potential to increase soil C better than fresh manure.

### Conclusion

Goat manure has the potential for biochar production, resulting in a biochar with an increased pH, a stable form of carbon, and soil macronutrients, including an increase in phosphorus and potassium. However, the use of fresh goat manure to produce biochar resulted in a significant reduction in total nitrogen, so appropriate pyrolysis processes should be considered. Biochar compost materials that contain carbon-resistant organic materials allow microbes to retain carbon in their cells instead of releasing it into the atmosphere as carbon dioxide, as indicated by C-cycling enzyme activities and lower cumulative CO<sub>2</sub> emissions. The substrate within

certain phenoloxidase enzymes had a stronger effect on the usefulness of carbon than on the influence of N during microbial degradation. It is necessary to conduct a more in-depth study on the impact of nitrogen form, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, on the activity of soil microorganisms. This factor is crucial and requires further examination. Like labile carbon compound degrading enzymes, phenoloxidase was not affected by the nitrogen inputs in the soil samples. Our study investigated the significant role of biochemical interactions between different compounds, as shown in the case of labile carbon and the resistant-organic inputs regulating microbial decomposition, manifested in β-glucosidase and phenoloxidase activities. To achieve a sustainable practice of soil SOC accumulation, the low carbon inputs in the control soil and the soil treated with chemical fertilizer led to a low SOC environment, which lowers the stimulation of microbial enzyme activities. Although the enzymes studied were specific to the quality of the substrate, the soil environment induced microorganisms to increase enzyme production. While the activity of enzymes in soil indicated the metabolic activity of soil microorganisms, they can also predict the level of soil organic carbon accumulation. Lastly, we showed that goat manure-biochar compost was the most suited to improving soil organic carbon content in highly weathered, sandy soil; it contains both easily decomposable- and resistant carbon compounds paralleled with a suitable C/N ratio for microbial consumption. The long-term addition of a biochar compost mixture can be expected to achieve an increase in soil organic carbon, as microbial biomass carbon parallels plant nutrients.

## Acknowledgements

The researchers received a research grant for the personnel of Nakhon Ratchasima Rajabhat University in 2021. The research team wants to thank the Agricultural Training and Research Center, Nakhon Ratchasima Rajabhat University for providing courtesy of the experimental area and research tools.

## References

- Acosta-Martínez, V., T.M. Zobeck, T.E. Gill and A.C. Kennedy. 2003. Enzyme activities and microbial community structure of semiarid agricultural soils. *Biology and Fertility of Soils* 38(4): 216-227.
- Alef, K. and P. Nannipieri. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London. 576 p.
- Amato, M. and J.N. Ladd. 1988. Assay for microbial biomass based on ninhydrin-reactive nitrogen in extracts of fumigated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 20(1): 107-114.
- ASTM International. 2007. Standard Test Method for Chemical Analysis of Wood Charcoal ASTM D1762-84. ASTM International, West Conshohocken. 2 p.
- Berg, B. and E. Matzner. 1997. Effect of N deposition on decomposition of plant litter and soil organic matter in forest systems. *Environmental Reviews* 5(1): 1-25.
- Black, C.A. 1965. *Methods of Soil Analysis Part 2: Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Madison. 926 p.
- Butnan, S., J.L. Deenik, B. Toomsan, M.J. Antal and P. Vityakon. 2016. Biochar properties influencing greenhouse gas emissions in tropical soils differing in texture and mineralogy. *Journal of Environmental Quality* 45(5): 1509-1519.
- Carreiro, M.M., R.L. Sinsabaugh, D.A. Repert and D.F. Parkhurst. 2000. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. *Ecology* 81(9): 2359-2365.
- Department of Livestock Development. 2022. Information of goat farmers by province. (Online). Available: [https://ict.dld.go.th/webnew/images/stories/stat\\_web/yearly/2565/country/8-goat.pdf](https://ict.dld.go.th/webnew/images/stories/stat_web/yearly/2565/country/8-goat.pdf). (June 15, 2023). (in Thai)
- Emteryd, O. 1989. *Chemical and Physical Analysis of Inorganic Nutrients in Plant, Soil, Water and Air*. Swedish University of Agricultural Sciences, Umea. 181 p.
- Hadas, A., L. Kautsky, M. Goek and E.E. Kara. 2004. Rates of decomposition of plant residues and available nitrogen in soil, related to residue composition through simulation of carbon and nitrogen turnover. *Soil Biology and Biochemistry* 36(2): 255-266.
- Hendel, B., R.L. Sinsabaugh and J. Marxsen. 2005. Lignin-degrading enzymes: phenoloxidase and peroxidase. pp. 273-277. *In*: M.A.S. Graca, F. Barlocher and M.O. Gessner (eds.). *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*. Springer, Dordrecht.
- Hue, N.V., S. Vega and J.A. Silva. 2001. Manganese toxicity in a Hawaiian Oxisol affected by soil pH and organic amendments. *Soil Science Society of America Journal* 65(1): 153-160.
- Ippolito, J.A., L. Cui, C. Kammann, N. Wrage-Monnig, J.M. Estavillo, T. Fuertes-Mendizabal, M.L. Cayuela, G. Sigua, J. Novak, K. Spokas and N. Borchard. 2020. Feedstock choice, pyrolysis temperature and type influence biochar

- characteristics: a comprehensive meta-data analysis review. *Biochar* 2(4): 421-438.
- Jiang, Y., X. Wang, Y. Zhao, C. Zhang, Z. Jin, S. Shan and L. Ping. 2021. Effects of biochar application on enzyme activities in tea garden soil. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9: 728530, doi: 10.3389/fbioe.2021.728530.
- Kamolmanit, B. and P. Lawongsa. 2021. Influence of goat manure biochar compost on soil organic carbon accumulation and aggregate formation. *Khon Kaen Agriculture Journal* 49(5): 1194-1204. (in Thai)
- Kamolmanit, B., N. Panwong and P. Lawongsa. 2018. Influence of biochar to rice straw combined with goat manure on physico-chemical and biological characteristics of compost. *Khon Kaen Agriculture Journal* 46(5): 843-856. (in Thai)
- Kamolmanit, B., P. Vityakon, W. Kaewpradit, G. Cadisch and F. Rasche. 2013. Soil fungal communities and enzyme activities in a sandy, highly weathered tropical soil treated with biochemically contrasting organic inputs. *Biology and Fertility of Soils* 49(7): 905-917.
- Kang, H., C. Freeman, D. Lee and W.J. Mitsch. 1998. Enzyme activities in constructed wetlands: Implications for water quality amelioration. *Hydrobiologia* 368: 231-235.
- Kanouo, B.M.D., S.E. Allaire and A.D. Munson. 2018. Quality of biochars made from eucalyptus tree bark and corncob using a pilot-scale retort kiln. *Waste and Biomass Valorization* 9: 899-909.
- Keeler, B.L., S.E. Hobbie and L.E. Kellogg. 2009. Effects of long-term nitrogen addition on microbial enzyme activity in eight forested and grassland sites: Implications for litter and soil organic matter decomposition. *Ecosystems* 12: 1-15.
- Kiran, Y.K., A. Barkat, X. Cui, Y. Feng, F. Pan, L. Tang and X. Yang. 2017. Cow manure and cow manure derived biochar application as a soil amendment for reducing cadmium availability and accumulation by *Brassica chinensis* L. in acidic red soil. *Journal of Integrative Agriculture* 16(3): 725-734.
- Kuo, L., B.E. Herbert and P. Louchouart. 2008. Can levoglucosan be used to characterize and quantify char/charcoal black carbon in environmental media?. *Organic Geochemistry* 39(10): 1466-1478.
- Kuzyakov, Y. 2010. Priming effects: Interaction between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 42(9): 1363-1371.
- Kuzyakov, Y., I. Subbotina, H. Chen, I. Bogomolova and X. Xu. 2009. Black carbon decomposition and incorporation into soil microbial biomass estimated by <sup>14</sup>C labeling. *Soil Biology and Biochemistry* 41(2): 210-219.
- Lagomarsino, A., A. Benedetti, S. Marinari, L. Pompili, M.C. Moscatelli, P.P. Roggero, R. Lai, L. Ledda and S. Grego. 2011. Soil organic C variability and microbial functions in a Mediterranean agro-forest ecosystem. *Biology and Fertility of Soils* 47: 283-291.
- Liu, C., Y. Song, X. Dong, X. Wang, X. Ma, G. Zhao and S. Zang. 2021. Soil enzyme activities and their relationships with soil C, N, and P in peatlands from different types of permafrost regions, northeast China. *Frontiers in Environmental Science* 9: 670769, doi: 10.3389/fenvs.2021.670769.

- Mazzon, M., L. Cavani, A. Margon, G. Sorrenti, C. Ciavatta and C. Marzadori. 2018. Changes in soil phenol oxidase activities due to long-term application of compost and mineral N in a walnut orchard. *Geoderma* 316: 70-77.
- Medeiros, E.V., K.A. Notaro, J.A. Barros, W.S. Moraes, A.O. Silva and K. A. Moreira. 2015. Absolute and specific enzymatic activities of sandy entisol from tropical dry forest, monoculture and intercropping areas. *Soil and Tillage Research* 145: 208-215.
- Olsen, S.R. and L.E. Sommers. 1982. Phosphorus. pp. 403-427. *In*: A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. (eds.). *Methods of Soil Analyses. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2<sup>nd</sup> ed. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI.
- Osuhor, C.U., J.P. Alawa and G.N. Akpa. 2002. Research note: Manure production by goats grazing native pasture in Nigeria. *Tropical Grasslands* 36: 123-125.
- Rowell, D.L. 1994. *Soil Science: Methods and Applications*. Longman Scientific and Technical, Harlow. 350 p.
- Rubin, E.M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454: 841-845.
- Sarfaraz, Q., L.S. da Silva, G.L. Drescher, M. Zafar, F.F. Severo, A. Kokkonen, G.D. Molin, M.I. Shafi, Q. Shafique and Z.M. Solaiman. 2020. Characterization and carbon mineralization of biochars produced from different animal manures and plant residues. *Scientific Reports* 10(1): 955, doi: 10.1038/s41598-020-57987-8.
- Schulz, H. and B. Glaser. 2012. Effects of biochar compared to organic and inorganic fertilizers on soil quality and plant growth in a greenhouse experiment. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175(3): 410-422.
- Sinsabaugh, R.L. 2010. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42(3): 391-404.
- Sinsabaugh, R.L., M.E Gallo, C. Lauber, M.P. Waldrop and D.R. Zak. 2005. Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. *Biogeochemistry* 75: 201-215.
- Situmeang, Y.P., I.D.N. Sudita and M. Suarta. 2019. Manure utilization from cows, goats, and chickens as compost, biochar, and poschar in increasing the red chili yield. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology* 9(6): 2088-2095.
- Skjemstad, J.O., D.C. Reicosky, A.R. Wilts and J.A. McGowan. 2002. Charcoal carbon in U.S. agricultural soils. *Soil Science Society of America Journal* 66(4): 1249-1255.
- Smith, M.W., G. Helms, J.-S. McEwen and M. Garcia-Perez. 2017. Effect of pyrolysis temperature on aromatic cluster size of cellulose char by quantitative multi cross-polarization <sup>13</sup>C NMR with long range dipolar dephasing. *Carbon* 116: 210-222.
- Sparling, G.P. and A.W. West. 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration *in situ* using microbial respiration and <sup>14</sup>C labeled cells. *Soil Biology and Biochemistry* 20(3): 337-343.
- Tsai, W., S. Liu, H. Chen, Y. Chang and Y. Tsai. 2012. Textural and chemical properties of swine-manure-derived biochar pertinent to its potential use as a soil amendment. *Chemosphere* 89(2): 198-203.

- Venkatesh, G., B. Venkateswarlu, K.A. Gopinath, C. Srinivasrao, G.R. Korwar, B. Sanjeeva Reddy, J.N.V.S. Prasad, M. Grover, B.M.K. Raju, C. Sasikala and K. Venkanna. 2013. Biochar production technology for conversion of cotton stalk bioresidue. *Indian Journal of Dryland Agricultural Research and Development* 28(1): 48-57.
- Verheijen, F.G.A., S. Jeffery, A.C. Bastos, M. van der Velde and I. Diafas. 2009. *Biochar Application to Soils: A Critical Scientific Review of Effects on Soil Properties, Processes and Functions*. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. 166 p.
- Waldrop, M.P. and J.W. Harden. 2008. Interactive effects of wildfire and permafrost on microbial communities and soil processes in an Alaskan black spruce forest. *Global Change Biology* 14(11): 2591-2602.
- Waldrop, M.P., T.C. Balser and M.K. Firestone. 2000. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32(13): 1837-1846.
- Zimmerman, A.R., B. Gao and M.-Y. Ahn. 2011. Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. *Soil Biology and Biochemistry* 43(6): 1169-1179.
- Zwetsloot, M.J., J. Lehmann, T. Bauerle, S. Vanek, R. Hestrin and A. Nigussie. 2016. Phosphorus availability from bone char in a P-fixing soil influenced by root-mycorrhizae-biochar interactions. *Plant and Soil* 408(1-2): 95-105.
-

# ผลของฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพของโป๊ยเซียน

## Effects of Phosphorus on Growth and Development, and Quality of Crown of Thorns (*Euphorbia milii*)

วุฒิพงษ์ แปงใจ และ สายชล สุขญาณกิจ\*  
Wutthipong Pangjai and Saychol Sukyankij\*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา จ. พระนครศรีอยุธยา 13000

Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University, Phra Nakhon Si Ayutthaya 13000, Thailand

\*Corresponding author: Email: saychol.agri@gmail.com

(Received: 23 May 2023; Accepted: 15 September 2023)

**Abstract:** Phosphorus (P) is an important nutrient for the growth and quality of ornamental plants. The aim of this study was to investigate the effects of phosphorus on the growth and flower quality of crown of thorns. The experimental design was conducted in a completely randomized design (CRD) with three replications and six treatments. Treatments were T1 as control (no P fertilizer); T2 to T6 consisted of P fertilizer at the rates of 25, 50, 100, 200 and 400 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> per kg (growing media), respectively. The results showed that the application of P fertilizer at different rates resulted in significant differences in chlorophyll a and total chlorophyll ( $P < 0.05$ ). Plant height and total phosphorus concentration were not significantly different ( $P > 0.05$ ). The increase in P fertilization clearly affected the number of flowers per plant. Application of P fertilizer at the rate of 400 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> per kg (growing media) resulted in the highest number of flowers per plant ( $8.67 \pm 2.31$  flowers per plant). On the other hand, an increase in P fertilizer decreased the flower diameter of the crown of thorns. The application of P fertilizer at a rate of 100 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> per kg of growing media yielded comparable outcomes in terms of flower diameter, number of inflorescences, and number of flowers per plant as the treatment that generated the most favorable results. Therefore, the application of P fertilizer at the rate of 100 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> per kg (material) was appropriate for planting crown of thorns.

**Keywords:** Phosphorus, chlorophyll content, flower quality, crown of thorns

**บทคัดย่อ:** ฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพของไม้ประดับ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปุ๋ยฟอสฟอรัสต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพดอกของโป๊ยเซียน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ 6 ตำรับทดลอง ดังนี้ ตำรับทดลองที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส ตำรับทดลองที่ 2 ถึง 6 ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตรา 25, 50, 100, 200 ละ 400 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตราที่แตกต่างกันมีผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์รวมในโป๊ยเซียนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ขณะที่ความสูงและความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในใบพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) การให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตราที่สูงขึ้นส่งผลให้จำนวนดอกต่อต้นเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 400 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) ให้จำนวนดอกต่อต้นมากที่สุด ( $8.67 \pm 2.31$  ดอกต่อต้น) ในทางตรงข้ามอัตราการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่เพิ่มสูงขึ้นกลับมีผลให้ดอกโป๊ยเซียนมีขนาดเล็กลง ทั้งนี้การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 100 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) ให้ค่าความกว้างดอก จำนวนช่อดอก และจำนวนดอกต่อต้นไม่แตกต่างจากตำรับทดลองที่ให้ค่าดังกล่าวสูงที่สุด ดังนั้นการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 100 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) จึงเป็นอัตราการใส่ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการปลูกโป๊ยเซียน

**คำสำคัญ:** ฟอสฟอรัส ปริมาณคลอโรฟิลล์ คุณภาพดอก โป๊ยเซียน

## บทนำ

โป๊ยเซียนเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Euphorbia milii* และชื่อสามัญ crown of thorns หรือ Christ thorn ซึ่งแปลว่ามงกุฎหนาม มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปแอฟริกา มาดากัสการ์ ออสเตรเลีย และแถบทวีปอเมริกา ซึ่งสามารถพบได้ในหลายประเทศ ลักษณะสำคัญของพืชชนิดนี้คือ ลำต้นมีลักษณะอวบหนา มีหนามแหลม มียางสีขาว ซึ่งเป็นพิษหากถูกผิวหนัง และเป็นพืชที่ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี (Poruksa and Krasaechai, 1997) ในประเทศไทยมีแหล่งปลูกโป๊ยเซียนเพื่อการค้าจำหน่าย เช่น ในพื้นที่จังหวัดอ่างทอง และจังหวัดปทุมธานี (Department of Agricultural Extension, 2023) ส่วนสายพันธุ์ของโป๊ยเซียนนั้นมีค่อนข้างหลากหลาย หนึ่งในนั้นคือพันธุ์เศรษฐิสยาม เป็นพันธุ์ที่ดอกมีลักษณะสีแดงสด ดอกใหญ่ ปลูกเลี้ยงง่าย และเป็นพันธุ์ที่ได้รับความนิยมจากกลุ่มผู้เลี้ยงโป๊ยเซียน นอกจากนี้ ยังมีพันธุ์อื่น ๆ เช่น พันธุ์เศรษฐิใหม่ ดอกสีชมพูแต้มเขียว พันธุ์ศรีเบญจวรรณ ดอกมีสีเหลืองนวล เป็นต้น (Jakkawanchai, 1996) โดยปกติการปลูกโป๊ยเซียนเพื่อจำหน่ายเป็นไม้กระถางนั้นนิยมใช้การขยายพันธุ์โดยวิธีปักชำแล้วเสียบยอดด้วยกิ่งพันธุ์ดี และจากการสัมภาษณ์

เกษตรกรผู้ปลูกโป๊ยเซียนในจังหวัดอ่างทอง พบว่าใช้วิธีเสียบยอดเป็นส่วนใหญ่ โดยใช้ต้นตอเป็นพันธุ์แดงอุดม เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่แข็งแรง ทนทานต่อการเกิดโรค และระบบรากดี เมื่อได้ต้นตอแล้วจึงเสียบยอดด้วยพันธุ์ตามที่ต้องการ สำหรับการปลูกจะปลูกในดินผสมที่ทำขึ้นจากดินร่วน ปุ๋ยคอก ขุยมะพร้าว และเกลบด้าในอัตราส่วน 1:1:1:1 ภายหลังจากการเสียบยอดแล้วอย่างน้อยสามเดือนจึงนำออกจำหน่าย การให้ปุ๋ยสำหรับโป๊ยเซียนนั้นไม่มีรายงานที่ชัดเจนว่าอัตราการใส่ธาตุอาหารแต่ละชนิดที่เหมาะสมควรเป็นเท่าใด มีเพียงการให้ปุ๋ยในภาพรวมซึ่งส่วนใหญ่มักเป็นปุ๋ยเคมีเกรดเสมอ เช่น เกรด 15-15-15 หรือเกรดอื่น ๆ ที่มีอัตราส่วนของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมเป็น 1:1:1 เท่านั้น (Jakkawanchai, 1996) ธาตุอาหารหลักในปุ๋ยเคมี ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม มีบทบาทจำเพาะต่อการเจริญเติบโตของพืชแตกต่างกัน ซึ่งพืชแต่ละชนิดมีความต้องการธาตุอาหารหลักในอัตราส่วนที่แตกต่างกันออกไป สำหรับการปลูกโป๊ยเซียนเพื่อให้ออกดอกอาจเน้นการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตราที่สูงกว่าธาตุอาหารหลักชนิดอื่น ๆ เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับเมแทบอลิซึมของเซลล์พืชเกี่ยวข้องกับกระบวนการออกดอก การติดผล รวมทั้งการพัฒนาของรากพืช (Sukyankij et al., 2023) อย่างไรก็ตาม

ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับธาตุฟอสฟอรัสในพืชกลุ่มไม้ประดับ โดยเฉพาะป๊วยเขียนพบว่ายังมีจำกัด และจากรายงานของ Caspersen and Bergstrand (2020) ซึ่งศึกษาการให้ธาตุฟอสฟอรัสอย่างจำกัดต่อประสิทธิภาพการ-ใช้ฟอสฟอรัสและคุณภาพในเบญจมาศและคริสต์มาส ซึ่งเป็นพืชในสกุลใกล้เคียงกับป๊วยเขียนกล่าวว่า ในพืชทั้งสองชนิดนี้เมื่อเข้าสู่ระยะกำเนิดช่อดอก ฟอสฟอรัสมีการเคลื่อนย้ายจากส่วนเหนือดินไปสู่ส่วนที่มีความสำคัญในการสืบพันธุ์ และอัตราการ-เจริญเติบโต รวมทั้งอัตราการดูดใช้ฟอสฟอรัสลดลง เมื่อพืชทั้งสองชนิดมีอายุมากขึ้น ซึ่งบ่งบอกว่าการให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสควรให้ในช่วงที่พืชมีการเจริญเติบโตทางลำต้นซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโต และการดูดใช้ฟอสฟอรัส รวมทั้งยังอาจส่งผลให้คุณภาพดอกและจำนวนดอกดีกว่าการให้ในช่วงที่พืชเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ และจากการทดลองนี้พบว่า การให้ปุ๋ยฟอสฟอรัส อัตรา 24 - 48 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้พืชทดสอบมีจำนวนดอกต่อต้นสูงกว่าการให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตรา 6 - 18 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ ปริมาณการให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยอัตราการให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่สูงเกินไปอาจเป็นพิษและมีผลให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง ทั้งนี้อาการเป็นพิษที่เกิดขึ้นเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ของพืชด้วย (Whipker and Hammer, 1994) ปริมาณรงควัตถุเป็นหนึ่งในตัวบ่งชี้ที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดประสิทธิภาพการให้ปุ๋ยได้ มีรายงานหลายฉบับกล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างฟอสฟอรัสกับรงควัตถุในพืช เช่น ปริมาณคลอโรฟิลล์ (Poudyal *et al.*, 2021) และการขาดฟอสฟอรัสส่งผลให้ระบบการสังเคราะห์แสงแปรปรวนไปโดยเฉพาะระบบ PS II (Xu *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าฟอสฟอรัสมีส่วนสำคัญในการเพิ่มปริมาณแคโรทีนอยด์ในพืชด้วย (El-Sawy *et al.*, 2015; Wongsansilp *et al.*, 2016) ดังนั้น การศึกษาอัตราการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตทางลำต้น และคุณภาพของดอกในป๊วยเขียนจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญประการหนึ่งที่จะช่วยชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของปุ๋ยฟอสฟอรัสที่มีต่อพืชชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลให้เกษตรกรที่ปลูก

ป๊วยเขียนเพื่อจำหน่ายสามารถนำไปใช้เพื่อพัฒนาคุณภาพของป๊วยเขียนต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การวางแผนการทดลองและเก็บข้อมูล

การทดลองนี้เริ่มดำเนินการในระหว่างเดือนตุลาคม 2565 ถึงเดือนเมษายน 2566 ภายใต้สภาพโรงเรือนคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ใช้ป๊วยเขียนพันธุ์เศรษฐีสยาม ที่ผ่านการเสียบยอดมาแล้วเป็นเวลา 3 เดือน ซึ่งมีความสูงต้นเฉลี่ย 5.6 เซนติเมตร นำมาย้ายลงกระถางใหม่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร (กระถางทรงกรวยตัด ปริมาตรประมาณ 3.43 ลิตร) ซึ่งมีวัสดุปลูกเป็น ดินร่วน ปุ๋ยหมัก ขุยมะพร้าว และแกลบดำอัตรา 1:1:1:1 (อัตราส่วนโดยปริมาตร) โดยใส่วัสดุปลูกในปริมาณ 1 กิโลกรัมต่อกระถาง วิเคราะห์สมบัติของวัสดุปลูกตามวิธีการของ Land Development Department (2010) ประกอบด้วย พีเอช ค่าการนำไฟฟ้า ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด โพแทสเซียมทั้งหมด ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ สมบัติของวัสดุปลูกที่ใช้ในการทดลองแสดงใน Table 1 ภายหลังจากย้ายปลูกแล้ว 1 เดือนจึงนำมาทดสอบการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตราต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ 6 ตำรับการทดลอง ดังนี้ ตำรับทดลองที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส ตำรับทดลองที่ 2 ถึง 6 ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตรา 25, 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) ตามลำดับ โดยใช้ปุ๋ยหริบเปิดซูเปอร์ฟอสเฟต (0-46-0) เป็นแหล่งให้ธาตุฟอสฟอรัส ด้านการจัดการธาตุอาหารหลักอื่น ๆ ได้แก่ ไนโตรเจนและโพแทสเซียมใส่ในอัตรา 100 มิลลิกรัม (N-K<sub>2</sub>O) ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) โดยใช้ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) และปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (0-0-60) เป็นแหล่งในการให้ธาตุไนโตรเจนและโพแทสเซียม ในการใส่ปุ๋ยทดสอบนั้นใส่เพียงครั้งเดียวที่ระยะเริ่มต้นการทดลอง (ภายหลังจากย้ายปลูกแล้ว 1 เดือน) รดน้ำทุก ๆ 3 วันในอัตรา

Table 1 Properties of growing media used in the experiment (mean  $\pm$ SD, n=3)

Properties	Unit	Values
pH (1:5)	-	6.52 $\pm$ 0.12 (N) <sup>†</sup>
Electrical conductivity	dS/m	1.21 $\pm$ 0.03 (VL)
Organic matter	g/kg	165 $\pm$ 7.50 (VH)
Total nitrogen	g/kg	4.62 $\pm$ 0.24 (VH)
Total phosphorus	g/kg	2.25 $\pm$ 0.18 (NR)
Total potassium	g/kg	4.86 $\pm$ 0.25 (NR)
Available phosphorus	mg/kg	81.0 $\pm$ 2.50 (VH)
Exchangeable potassium	mg/kg	195 $\pm$ 35.0 (VH)

<sup>†</sup> The letters in bracket are interpreted according to Land Classification Division and FAO Project Staff (1973): N = neutral; VL = very low; VH = very high; NR = no required.

100 มิลลิลิตรต่อกระถาง ด้านการป้องกันและกำจัดโรค และแมลงดำเนินการโดยวิธีกลเมื่อพบการระบาดเท่านั้น การเก็บข้อมูลต่าง ๆ ที่ระยะ 60 วันหลังจากให้ปุ๋ยฟอสฟอรัส ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความสูงต้นโดยคำนวณจากสูตร [(ความสูงต้นสิ้นสุดการทดลอง - ความสูงต้นเริ่มทดลอง) / ความสูงต้นเริ่มทดลอง] x 100]] ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี ผลรวมของคลอโรฟิลล์ เอ และบี และปริมาณแคโรทีนอยด์ในใบ ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในใบ เส้นผ่านศูนย์กลางดอก จำนวนช่อดอกต่อต้น และจำนวนดอกต่อต้น

### การวิเคราะห์ทางเคมี

การวิเคราะห์ทางเคมีประกอบด้วย (1) การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ในใบปืเปียเขียน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Dharmanitivedya (2019) ดังนี้ นำตัวอย่างใบพืชที่สมบูรณ์อยู่ในช่วงขยายแผ่นใบเต็มที่ (ใบที่ 4 นับจากยอด) นำมาเจาะด้วยเครื่องเจาะรูเป็นวงกลม จำนวน 3 ตำแหน่งในแผ่นใบ นำใส่ในหลอดแก้ว เต็มสาร N,N-dimethylformamide (DMF) จำนวน 10 มิลลิลิตรนำไปเก็บในที่มืด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายสีเขียวที่สกัดได้ไปวัดความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 480, 647, 664 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ ดังนี้

$$\text{Chlorophyll a} = (12A_{664} - 3.11A_{647}) \times V / (\text{dilution} \times \text{area} \times 100)$$

$$\text{Chlorophyll b} = (20.78A_{647} - 4.88A_{664}) \times V / (\text{dilution} \times \text{area} \times 100)$$

$$\text{Total chlorophyll} = \text{Chlorophyll a} + \text{Chlorophyll b}$$

$$\text{Total carotenoids (CX+C)} = (100A_{480} - 1.12\text{Chl a} - 34.07\text{Chl b}) / 245$$

(2) วิเคราะห์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในรูปของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (total P) ในส่วนใบ โดยย่อยสลายตัวอย่างพืชด้วยกรดผสมสองชนิด (acid mixture: HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub> ในอัตราส่วน 2 : 1 v/v.) (Attanandana and Chanchareonsook, 1999) สารละลายที่ได้จากการย่อยสลายนำไปกรองโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 5 จากนั้นนำสารละลายสีที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสโดยวิธีพัฒนาสีด้วยกรดวานาโดมอลิบเดท (vanadomolybdo-phosphoric acid method) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Kuo, 1996)

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

## การเจริญเติบโตของป๊วยเขียน

ปัจจัยด้านการเจริญเติบโตพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์ความสูงของต้นป๊วยเขียน (Figure 1) โดยพบว่า การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตราที่แตกต่างกัน 6 ระดับ (0-400 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก)) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ความสูงต้นป๊วยเขียนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) โดยค่าเปอร์เซ็นต์ความสูงมีค่าพิสัยระหว่าง 18.6-23.8 เปอร์เซ็นต์ Khandan-Mirkohi *et al.* (2015) ศึกษาการจัดการธาตุฟอสฟอรัสในต้นคริสต์มาสที่ใช้พีทเป็นวัสดุปลูกรายงานว่าปริมาณฟอสฟอรัสที่เหมาะสมสำหรับการปลูกต้นคริสต์มาสเท่ากับ 35 มิลลิกรัมต่อลิตร (วัสดุปลูก) โดยการใส่ในปริมาณที่สูงกว่านี้ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตทางลำต้นของต้นคริสต์มาส และควรมีการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสให้บ่อยครั้งขึ้นในช่วงก่อนที่ต้นคริสต์มาสจะเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ ขณะที่ Caspersen and Bergstrand (2020) รายงานว่า การให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 24 มิลลิกรัมต่อลิตร (วัสดุปลูก) ทำให้ต้นคริสต์มาสมีน้ำหนักแห้งต่อต้น จำนวนกิ่ง และความกว้างทรงพุ่มสูงสุด ทั้งนี้ การเจริญเติบโตของพืชทางลำต้นส่วนใหญ่แล้วได้รับอิทธิพลจากธาตุไนโตรเจนเป็นหลัก (Osotsapar, 2015) แต่ก็มีบางงานวิจัยที่พบว่า การให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสมีบทบาทต่อความสูงของพืชเช่นกัน

เช่นจากรายงานของ Ruamrungsri *et al.* (2009) ทำการศึกษาผลของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมต่อการเจริญเติบโตของแกลดิโอลัส พบว่าการเพิ่มระดับของฟอสฟอรัสจาก 50 เป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ความสูงของแกลดิโอลัสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ ฟอสฟอรัสและไนโตรเจนมีอันตรกิริยาในเชิงส่งเสริมกัน เนื่องจากพืชดูดใช้ฟอสฟอรัสในรูปของแอนไอออน ( $H_2PO_4^-$  หรือ  $HPO_4^{2-}$ ) ส่วนไนโตรเจนพืชสามารถดูดใช้ในรูปของแคตไอออน ( $NH_4^+$ ) ซึ่งไอออนทั้งสองมีขั้วที่ต่างกันทำให้สามารถดูดยึดกันได้ ดังนั้น ในขั้นตอนของการดูดใช้ธาตุอาหารโดยพืชไอออนของธาตุทั้งสองชนิดนี้ถูกดูดเข้าสู่ระบบท่อลำเลียงของพืชได้ง่ายกว่าไอออนที่มีขั้วเหมือนกัน (Sukyankij *et al.*, 2018) ดังนั้นการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตราที่สูงขึ้นจึงมีผลให้การดูดใช้ไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้ความสูงของพืชเพิ่มขึ้นนั่นเอง (Osotsapa, 2015)

## ปริมาณคลอโรฟิลล์

ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์พิจารณาจากปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม และแคโรทีนอยด์ในใบที่ระยะ 60 วัน หลังจากให้ปุ๋ยฟอสฟอรัส (Table 2) จากผลการทดลองพบว่า การให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 0 - 400 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ

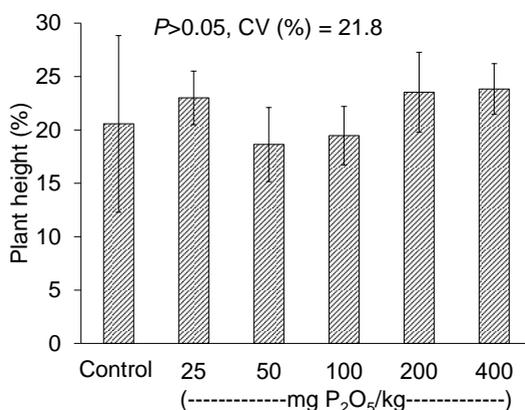


Figure 1 Effect of different phosphorus levels on plant height of crown of thorns. The vertical bars represented standard deviation ( $n = 3$ ).

Table 2. Effects of phosphorus on chlorophyll and carotenoids in leaves of crown of thorns (mean  $\pm$ SD, n=3)

Treatments	Chlorophyll a <sup>†</sup>	Chlorophyll b <sup>†</sup>	Total chlorophyll <sup>†</sup>	Total carotenoids <sup>†</sup>
	(------ mg/m <sup>2</sup> -----)			
Control	758 $\pm$ 159 <sup>b</sup>	377 $\pm$ 70	1,135 $\pm$ 113 <sup>b</sup>	233 $\pm$ 35
25 mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /kg	1,000 $\pm$ 153 <sup>a</sup>	406 $\pm$ 32	1,407 $\pm$ 184 <sup>a</sup>	284 $\pm$ 38
50 mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /kg	989 $\pm$ 183 <sup>a</sup>	436 $\pm$ 53	1,426 $\pm$ 233 <sup>a</sup>	278 $\pm$ 48
100 mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /kg	996 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	366 $\pm$ 81	1,362 $\pm$ 71 <sup>a</sup>	276 $\pm$ 2
200 mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /kg	871 $\pm$ 75 <sup>ab</sup>	359 $\pm$ 32	1,230 $\pm$ 106 <sup>ab</sup>	241 $\pm$ 10
400 mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /kg	1,021 $\pm$ 184 <sup>a</sup>	383 $\pm$ 87	1,395 $\pm$ 271 <sup>a</sup>	284 $\pm$ 48
F-test	*	ns	*	ns
CV (%)	12.8	17.7	12.8	10.6

<sup>†</sup> Means within the same column followed by the same letters indicate no significantly different among treatments using DMRT at  $P < 0.05$ , \* = significant difference at 0.05 probability levels, ns = no significant

และปริมาณคลอโรฟิลล์รวมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) การให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 400 และ 50 มิลลิกรัม P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) ส่งผลให้ปืเยียนมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์รวมสูงที่สุด (1,021  $\pm$  184 และ 1,426  $\pm$  233 มิลลิกรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ) ทั้งนี้พบว่า ค่าดังกล่าวไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับค่ารับทดลองอื่น ๆ ที่ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์บีและแคโรทีนอยด์พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่ารับทดลอง ( $P > 0.05$ ) โดยมีค่าพิสัยอยู่ระหว่าง 359  $\pm$  32 – 436  $\pm$  81 และ 233  $\pm$  35 – 284  $\pm$  48 มิลลิกรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ

ปริมาณคลอโรฟิลล์ในพืชนั้นมีความสัมพันธ์กับธาตุไนโตรเจนและแมกนีเซียม เนื่องจากทั้งสองธาตุนี้เป็นองค์ประกอบในระดับโมเลกุลของคลอโรฟิลล์จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นในประเด็นการเจริญเติบโตของต้นปืเยียนนั้น การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสมีผลในเชิงส่งเสริมให้พืชมารถดูดใช้ในโตรเจนได้เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับธาตุแมกนีเซียมซึ่งมีอันตรกิริยาเชิงบวกกับฟอสฟอรัสเช่นกัน (Osotsapar, 2015) ซึ่งอาจเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้ทั้งปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในปืเยียนมีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับค่ารับที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส ทั้งนี้ พืชที่ได้รับฟอสฟอรัสไม่เพียงพอก็จะมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง

โดยส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด เช่น ATP synthesis, phosphoglycerate kinase และมีผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ในพืชลดลง (Poudyal *et al.*, 2021) และจากรายงานของ Poudyal *et al.* (2021) ซึ่งศึกษาความต้องการฟอสฟอรัสของไม้ประดับสามชนิดในการสะสมชีวมวลและประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงพบว่า การเพิ่มระดับของฟอสฟอรัสส่งผลให้ปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงมีค่าสูงขึ้น ขณะที่ประสิทธิภาพการใช้แสงของพืช (Fv/Fm') มีการตอบสนองต่อฟอสฟอรัสที่ใส่ในปริมาณต่ำ (0.7-1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร) มากกว่าฟอสฟอรัสที่ใส่ในปริมาณสูงกว่า (2.5 - 6.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าในระบบการสังเคราะห์แสง PS II การได้รับฟอสฟอรัสในอัตราต่ำช่วยให้พืชสามารถใช้แสงได้เกิดประสิทธิภาพสูงกว่า ทั้งนี้ มีรายงานบางฉบับกล่าวว่าพืชที่ได้รับฟอสฟอรัสในอัตราต่ำไม่มีผลต่อการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์และประสิทธิภาพในการใช้แสงของพืช (Campbell and Sage, 2006) ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์นั้น ถึงแม้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่ารับทดลองแต่มีรายงานว่า การให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นมีส่วนช่วยเพิ่มปริมาณแคโรทีนอยด์ในพืชรวมทั้งสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรงควัตถุนีตินได้ (El-Sawy *et al.*, 2015; Wongsansilp *et al.*, 2016)

## ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส

ในส่วนของคุณภาพฟอสฟอรัสในใบบึงเขียนแสดงใน Figure 2 จากผลการทดลองพบว่า การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตราที่แตกต่างกัน (0 - 400 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก)) ไม่มีผลให้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในใบบึงเขียนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) โดยค่าพิสัยความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในใบมีค่าระหว่าง 7.79 - 9.13 กรัมต่อกิโลกรัม จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่สูงขึ้นไม่ได้มีผลให้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในพืชเพิ่มขึ้นเสมอไป ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Caspersen and Bergstrand (2020) และ Poudyal *et al.* (2021) ที่พบว่า การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตราที่สูงขึ้นมีผลให้ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในต้นคริสต์มาสและไม่ดอกอื่น ๆ เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ทั้งนี้การดูใช้ธาตุอาหารในพืชนอกจากปริมาณธาตุอาหารที่เติมลงไปยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ด้วย สำหรับในกรณีของการทดลองในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าจากการวิเคราะห์สมบัติของวัสดุปลูกที่นำมาใช้ในการทดลอง (Table 1) พบว่า วัสดุปลูกที่ใช้มีค่าพีเอชและปริมาณธาตุอาหาร (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม) อยู่ในเกณฑ์เหมาะสม (Land Classification Division and FAO Project Staff, 1973)

โดยเฉพาะฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับสูงมาก ( $81.0 \pm 2.50$  มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ซึ่งอาจเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างตำรับทดลองที่มีการใส่และไม่ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส นอกจากนี้วัสดุปลูกที่เขี่ยยังมีปริมาณอินทรีย์วัตถุอยู่ในระดับสูงมาก ( $165 \pm 7.50$  กรัมต่อกิโลกรัม) อินทรีย์วัตถุในวัสดุปลูกถือว่าเป็นบทบาทในการควบคุมระดับความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารต่อพืช เนื่องจากโครงสร้างของอินทรีย์วัตถุที่มีพื้นที่ผิวมากทำให้สามารถดูดซับธาตุอาหารได้ดี (Sukyankij *et al.*, 2023) และเมื่ออินทรีย์วัตถุถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ดินจะปลดปล่อยธาตุอาหารที่ดูดซับไว้ให้พืชสามารถนำไปใช้ได้ ดังนั้นในดินหรือวัสดุปลูกที่มีอินทรีย์วัตถุสูงจึงมีโอกาสน้อยที่พืชจะแสดงอาการขาดธาตุอาหาร ซึ่งอาจเป็นเหตุผลอีกอย่างหนึ่งที่ทำให้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างตำรับทดลองที่ใส่และไม่ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส

## คุณภาพดอกใบบึงเขียน

จากผลการทดลองพบว่า การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตราที่แตกต่างกันส่งผลให้ความกว้างดอก จำนวนช่อดอกต่อต้น และจำนวนดอกต่อต้น มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$  และ  $P < 0.05$  ตามลำดับ) ในส่วนของความกว้างดอก การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา

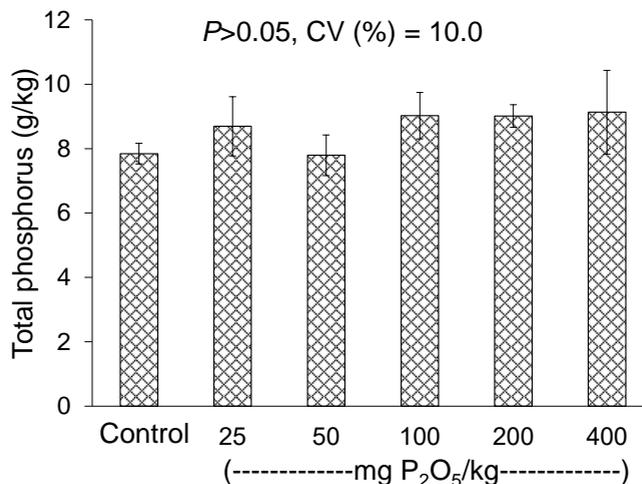


Figure 2 Effect of different phosphorus levels on phosphorus concentration in leaves of crown of thorns.

The vertical bars represented standard deviation (n=3)

25 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) ให้ค่าความกว้างดอกสูงที่สุด ( $4.50 \pm 0.20$  เซนติเมตร) (Table 3 และ Figure 3) ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส และใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 100 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) ในส่วนจำนวนช่อดอกต่อต้น การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 100 และ 200 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) มีจำนวนช่อดอกต่อต้นสูงที่สุดเท่ากัน ( $2.67 \pm 0.57$  ช่อดอกต่อต้น) ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับตำรับทดลองอื่น ๆ ที่มีการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส (Table 3) และสุดท้ายคือจำนวนดอกต่อต้น การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตราสูงขึ้นส่งผลให้จำนวนดอกต่อต้นของเป็ยเซียนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 400 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) ให้ปริมาณจำนวนดอกต่อต้นสูงที่สุด ( $8.67 \pm 2.31$  ดอกต่อต้น) (Table 3)

การให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในปริมาณสูงขึ้นส่งผลให้จำนวนดอกเป็ยเซียนต่อต้นเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (Table 3) ทั้งนี้ ฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีบทบาทสำคัญต่อการติดดอกออกผลในพืช (Osotsapar, 2015; Sukyankij *et al.*, 2023) ดังนั้น ปริมาณฟอสฟอรัสที่สูงขึ้นจึงอาจมีผลให้จำนวนดอกต่อต้นเพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับจำนวนช่อดอกต่อต้นที่เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะตำรับทดลองที่ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 100 และ 200 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) เมื่อเทียบกับตำรับควบคุม สอดคล้องกับงานทดลองของ Ruamrungsri *et al.* (2009) ที่พบว่า การให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตราสูงขึ้นจาก 50 เป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรส่งผลให้จำนวนดอกย่อยของแกลดิโอลัสมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ขนาดของดอกซึ่งพิจารณาจากเส้นผ่านศูนย์กลางดอกนั้น (Table 3, Figure 3) พบว่า อัตราการให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่เพิ่มสูงขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดของดอกเป็ยเซียนเล็กลง จากรายงานของ Bumphenyoo and Ruamrungsri (2003) และ Kidsadawanich and Ruamrungsri (2005) ระบุว่าไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพดอก ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ในตำรับที่มีการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตราสูงขึ้น (50 - 400 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก)) ส่งผลให้จำนวนดอก

เป็ยเซียนมีมากขึ้น แต่ขนาดของดอกลดลงอย่างชัดเจน โดยเฉพาะการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 200 - 400 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) ทั้งนี้โดยปกติแล้วธาตุอาหารที่พืชดูดได้ถูกลำเลียงและแบ่งปันไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและพัฒนาอวัยวะ ซึ่งในที่นี้ฟอสฟอรัสส่งผลอย่างชัดเจนต่อจำนวนดอกของพืชที่เพิ่มขึ้น แต่ถึงกระนั้นคุณภาพของดอก เช่น ขนาดของดอกอาจถูกควบคุมด้วยปัจจัยอื่น เช่น ธาตุไนโตรเจน (Bumphenyoo and Ruamrungsri, 2003; Kidsadawanich and Ruamrungsri 2005) ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้เกิดการแก่งแย่งธาตุ ไนโตรเจนที่มีอยู่อย่างจำกัด เนื่องจากปริมาณที่ใส่เท่ากันทุกตำรับทดลอง ทำให้ตำรับทดลองที่มีจำนวนดอกมากมีการแก่งแย่งธาตุดังกล่าวสูง ส่งผลให้ขนาดของดอกเล็กกว่าตำรับที่มีจำนวนดอกน้อยกว่านั่นเอง สำหรับคุณภาพดอกนั้นพิจารณาจากขนาดดอกเป็นสำคัญ โดยเป็ยเซียนพันธุ์เศรษฐีสยามที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้อยู่ในกลุ่มของเป็ยเซียนดอกใหญ่ และตามหลักเกณฑ์ของการประกวดเป็ยเซียนกำหนดไว้ว่าดอกที่บานเต็มที่ต้องมีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 3 เซนติเมตร (Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, 2011) โดยทุกตำรับทดลองเป็นไปตามมาตรฐานดังกล่าว ทั้งนี้อาจต้องพิจารณาจากจำนวนช่อดอกและจำนวนดอกต่อต้นด้วย ผลจากข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 100 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางดอก จำนวนช่อดอก และจำนวนดอกต่อต้นไม่แตกต่างทางสถิติจากตำรับที่ให้ค่าผลการทดลองสูงที่สุด ดังนั้นการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 100 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) จึงเป็นอัตราการใส่ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการปลูกเป็ยเซียน

Table 3 Effects of phosphorus on chlorophyll and carotenoids in leaves of crown of thorns (mean  $\pm$ SD, n=3)

Treatments	Flower diameter (cm) <sup>†</sup>	Number of inflorescences (No./ plant) <sup>†</sup>	Number of flowers (No./plant) <sup>†</sup>
Control	4.33 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	2.67 $\pm$ 1.15 <sup>c</sup>
25 mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /kg	4.50 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.67 $\pm$ 0.57 <sup>ab</sup>	4.67 $\pm$ 1.15 <sup>bc</sup>
50 mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /kg	3.87 $\pm$ 0.12 <sup>bc</sup>	2.33 $\pm$ 0.57 <sup>ab</sup>	6.33 $\pm$ 1.52 <sup>ab</sup>
100 mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /kg	4.10 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	2.67 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	7.67 $\pm$ 0.57 <sup>ab</sup>
200 mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /kg	3.67 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>	2.67 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	7.67 $\pm$ 2.08 <sup>ab</sup>
400 mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /kg	3.53 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>	2.33 $\pm$ 0.57 <sup>ab</sup>	8.67 $\pm$ 2.31 <sup>a</sup>
F-test	**	*	*
CV (%)	5.6	23.8	27.2

<sup>†</sup> Means within the same column followed by the same letters indicate no significantly different among treatments using DMRT at  $P < 0.05$ , \*, \*\* = significant difference at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

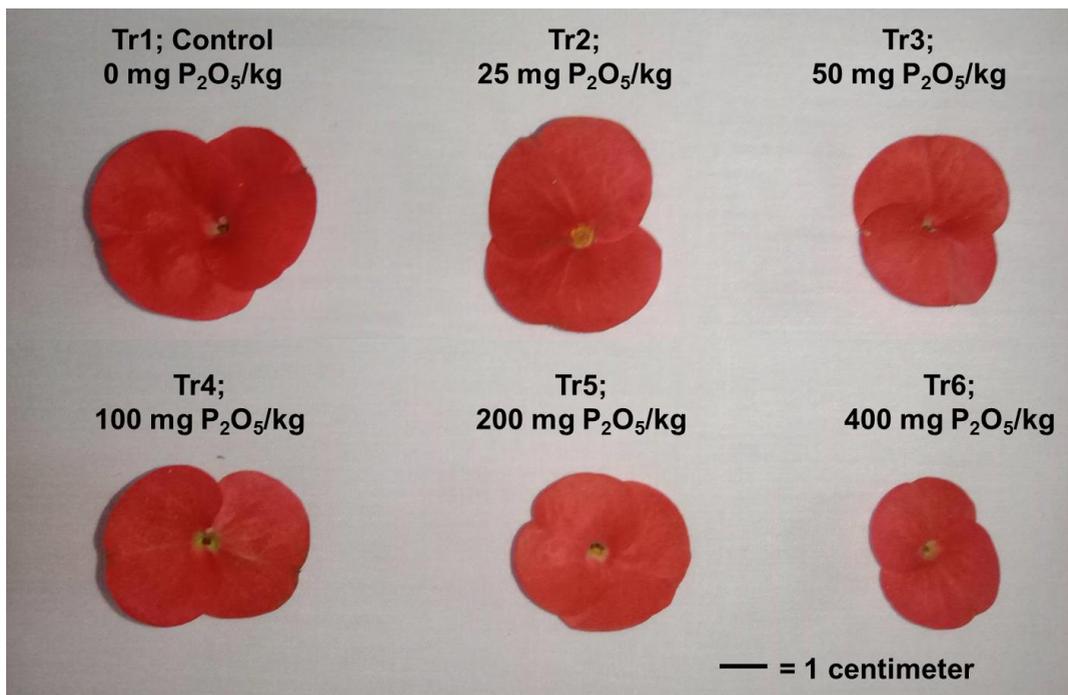


Figure 3 Effects of different phosphorus levels on flower width of the crown of thorns

## สรุป

อัตราการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่เพิ่มขึ้น (25 - 400 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก)) มีผลอย่างชัดเจนต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ โดยเฉพาะคลอโรฟิลล์ เอ และปริมาณคลอโรฟิลล์รวม นอกจากนี้ยังส่งผลให้จำนวนดอกต่อต้นเพิ่มขึ้น ในทางตรงข้ามการให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในปริมาณที่สูงขึ้นส่งผลให้ขนาดของดอกเล็กลง โดยการให้ปุ๋ยฟอสฟอรัสในอัตราต่ำ (25 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก)) ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางดอกสูงที่สุดแต่กลับมีจำนวนช่อดอก และจำนวนดอกต่อต้นต่ำกว่าที่รับการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอื่นๆ ขณะที่การใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 100 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางดอก และจำนวนดอกต่อต้นไม่แตกต่างทางสถิติจากที่รับที่ให้ค่าผลการทดลองสูงที่สุด ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสอัตรา 100 มิลลิกรัม  $P_2O_5$  ต่อกิโลกรัม (วัสดุปลูก) เป็นอัตราที่เหมาะสมสำหรับการปลูกโป๊ยเซียน

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กองทุน ววน.): งบประมาณด้านวิจัยและนวัตกรรม ประเภท Fundamental Fund ของมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ประจำปีงบประมาณ 2565 รหัสโครงการ 165440

## เอกสารอ้างอิง

Attanandana, T. and J. Chanchareonsook. 1999. Practice and Manual of Soil and Plant Analysis. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 108 p. (in Thai)

Bumphenyoo, W. and S. Ruamrungsri. 2003. Deficiency of mineral nutrients in *Globba* spp. Journal

of Agriculture 19(2): 116-124. (in Thai)

Caspersen, S. and K.J. Bergstrand. 2020. Phosphorus restriction influences P efficiency and ornamental quality of poinsettia and chrysanthemum. Scientia Horticulturae 267: 109316, doi: 10.1016/j.scienta.2020.109316.

Department of Agricultural Extension. 2023. Ornamental Plants: Crown of thorns. (Online). Available: <http://www.agriinfo.doae.go.th/year60/plant/rortor/ornament/poysian.pdf> (March 15, 2023). (in Thai)

Dharmanivedya, S. 2019. Pigment extraction from plant leaves for physiology studies. Naresuan Agriculture Journal 16(1): 73-81. (in Thai)

El-Sawy, M.M., I.A. El-Garhi, A.S. Metwally and A.S. Elrys. 2015. Phosphorus nutrition of wheat plant grown on a calcareous soil as affected by application of nitrogen and humate fertilizers. Middle East Journal of Applied Sciences 5(4): 975-983.

Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. 2011. The Manual for the Competition of Ornamental Plants, Garden, Adenium and Crown of Thorns. (Online). Available: <https://www.agri.cmu.ac.th/2017/files/Download/50010055.pdf> (December 10, 2011). (in Thai)

Jakkawanchai, P. 1996. Crown of Thorns. Pat Book Co.Ltd., Nonthaburi. 128 p. (in Thai)

Khandan-Mirkohi, A., M.K. Schenk and M. Fereshtian. 2015. Study on phosphorus supply management of poinsettia grown in peat-based substrate. Journal of Agricultural Science and Technology 17(1): 179-188.

Kidsadawanich, H. and S. Ruamrungsri. 2005. Nitrogen, phosphorus and potassium

- deficiency in *Freesia* spp. Journal of Agriculture 21(3): 197-204. (in Thai)
- Kuo, S. 1996. Phosphorus. pp. 869-919. In: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston and M.E. Sumner (eds.). Methods of Soil Analysis Part 3: Chemical Methods. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- Land Classification Division and FAO Project Staff. 1973. Soil Interpretation Handbook for Thailand. Land Classification Division, Land Development Department, Bangkok. 169 p.
- Land Development Department. 2010. Operating Manual: Analysis Process of Plant, Fertilizer and Soil Amendment. (Online). Available: <https://www.ldd.go.th/PMQA/2553/Manual/OSD-07.pdf> (November 16, 2020). (in Thai)
- Osotsapar, Y. 2015. Plant Nutrition. Kasetsart University Press, Bangkok. 548 p. (in Thai)
- Poruksa, R. and A. Krasaechai. 1997. Genetic inheritance of crown of thorns (*Euphobia splendens* Bojer ex Hook.f.). Journal of Agriculture 13(1): 1-8. (in Thai)
- Poudyal, S., J.S. Owen Jr., T.D. Sharkey, R.T. Fernandez and B. Cregg. 2021. Phosphorus requirement for biomass accumulation is higher compared to photosynthetic biochemistry for three ornamental shrubs. Scientia Horticulturae 275: 109719, doi: 10.1016/j.scienta.2020.109719.
- Ruamrungsri, S., H. Kidsadawanich, R. Kijkar, P. Kansan and T. Phornsawatchai. 2009. Effects of nitrogen, phosphorus and potassium on growth and development of *Gladiolus hybrida*. Journal of Agriculture 25(1): 31-39. (in Thai)
- Sukyankij, S., C. Khongsud and T. Panich-pat . 2023. Responses of phosphorus applications in two cultivars of Thailand's dwarf yard-long beans. Current Applied Science and Technology 23(4), doi: 10.55003/cast.2023.04.23.012.
- Sukyankij, S., S. Samithiarporn, T. Pluemphuak and T. Panich-pat. 2018. Effects of biochar and Fe-EDTA on yield, nutrient uptake and iron translocation in Lettuce (*Lactuca sativa* var.crispa). KKU Science Journal 46(4): 732-743. (in Thai)
- Whipker, B.E. and P.A. Hammer. 1994. Determination of injurious phosphorus levels in poinsettias. Hort Science 29(2): 85-87.
- Wongsansilp, T., N. Juntawong and Z. Wu. 2016. Effects of phosphorus on the growth and chlorophyll fluorescence of a *Dunaliella salina* strain isolated from saline soil under nitrate limitation. Journal of Biological Research 89: 5866, doi: 10.4081/jbr.2016.5866.
- Xu, H.X., X.Y. Weng and Y. Yang. 2007. Effect of phosphorus deficiency on the photosynthetic characteristics of rice plants. Russian Journal of Plant Physiology 54: 741-748.



# ความเข้มข้นของโลหะหนักในพื้นที่ปลูกฟ้าทะลายโจร จังหวัดนครปฐม

Concentration of Heavy Metals in *Andrographis paniculata* (Burm. f.)

Wall. ex Nees Growing Area, Nakhon Pathom Province

เกวลิน ศรีจันทร์<sup>1</sup> ธวัชชัย อินทร์บุญช่วย<sup>1\*</sup> ศิริสุดา บุตรเพชร<sup>1</sup> และ ธรรมธวัช แสงงาม<sup>2</sup>  
Kavalin Srichan<sup>1</sup>, Tawatchai Inboonchuy<sup>1\*</sup>, Sirisuda Bootpetch<sup>1</sup> and Thamthawat Saenggam<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>1</sup>Department of Soil Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen. Kasetsart University,  
Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>2</sup>ศูนย์วิจัยและบริการวิชาการ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>2</sup>Research and Academic Center, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen. Kasetsart University,  
Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

\*Corresponding author: Email: fagrtci@ku.ac.th

(Received: 10 July 2023; Accepted: 29 September 2023)

**Abstract:** Soil contamination with heavy metals has become a serious threat in the cultivation of medicinal herbs in recent years. The cultivation of the plant in arsenic (As), lead (Pb) and cadmium (Cd) contaminated soil not only has adverse effects on their growth but it also harmful to human health after consumption. *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees is one of the important medicinal plants used in preventing and treating respiratory illness and is known for its anti-viral activity. The purpose of this research was to study the concentration of heavy metals (Arsenic, Cadmium, Lead) in the *A. paniculata* growing area, Nakhon Pathom, at 10 locations. Results of the study revealed that the concentrations of As (7.74 - 18.94 mg/kg), Cd (0.55 - 1.67 mg/kg) and Pb (3.67 - 72.42 mg/kg) in all soils were lower than the critical value of soil quality standard for habitat and agriculture according to announcement of the National Environment Board 2021 and the critical concentration for plant growth. However, the concentration of Pb (6 sites) and Cd (9 sites) in plant were higher than permissible limits of Announcement of the Ministry of Public Health 2021 and WHO, while the As concentration in plant was within acceptable level. When considering the proportions of all heavy metals, it was found that Pb concentrations in soil and plants were the highest in all areas, followed by arsenic and cadmium, respectively. Moreover, the relationships between heavy metals and soil properties revealed that concentration of Cd ( $r = -0.835$ ) and Pb ( $r = -0.547$ ) in soil have moderate negative relationship with clay content and CEC. Soils with high clay content contained low cadmium and lead concentration. Additionally, Pb concentration shows a significantly positive correlation with Cd ( $r = 0.546$ ). When considering the relationship between heavy metals in soil and plants, it was observed that concentration of As ( $r = 0.573$ ) and Cd ( $r = 0.361$ ) in plant have significant relationships with soil except Pb.

This information can be used for planning and developing agricultural management practices for this medicinal plant cultivation to ensure food safety and to reduce human and environmental health risks.

**Keywords:** Heavy metals, *Andrographis paniculata*, medicinal plant, Kamphaeng Saen soil series

**บทคัดย่อ:** การปนเปื้อนด้วยโลหะหนักในดินเป็นภัยคุกคามร้ายแรงในการเพาะปลูกสมุนไพรในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา การปลูกพืชในดินที่มีสารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) ปนเปื้อนนั้น ไม่เพียงแต่มีผลกระทบต่ออาการเจริญเติบโตของพืช แต่ยังเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์หลังจากการบริโภคอีกด้วย พืชหลายชนิดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญใช้ในการป้องกันและรักษาโรคระบบทางเดินหายใจและมีฤทธิ์ในการต้านไวรัส วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาความเข้มข้นของโลหะหนัก (สารหนู แคดเมียม ตะกั่ว) ในดินที่ปลูกฟ้าทะลายโจร จังหวัดนครปฐม จำนวน 10 แหล่ง ผลการศึกษา พบว่า ความเข้มข้นของสารหนู (7.74-18.94 มก./กก.) แคดเมียม (0.55-1.67 มก./กก.) และตะกั่ว (3.67-72.42 มก./กก.) ในดินทุกบริเวณไม่เกินค่ามาตรฐานคุณภาพดินเพื่อการอยู่อาศัยและเกษตรกรรม ตามประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ 2564 และค่าความเข้มข้นวิกฤตที่มีผลต่อพืช อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นตะกั่ว (6 บริเวณ) และแคดเมียม (9 บริเวณ) ในฟ้าทะลายโจร มีค่าเกินมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2564 และองค์การอนามัยโลก ในขณะที่ความเข้มข้นของสารหนูอยู่ในระดับมาตรฐานที่กำหนดไว้ เมื่อพิจารณาสัดส่วนของโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด พบว่า ความเข้มข้นของตะกั่วในดินและพืชมีความเข้มข้นสูงสุดในทุกพื้นที่ รองลงมาเป็นสารหนู และแคดเมียม ตามลำดับ นอกจากนี้ ความสัมพันธ์ของโลหะหนักกับสมบัติทางเคมีของดินพบว่า แคดเมียม ( $r = -0.835$ ) และตะกั่วในดิน ( $r = -0.547$ ) มีความสัมพันธ์เชิงลบปานกลางกับปริมาณดินเหนียวและค่าความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน กล่าวคือ ดินที่มีปริมาณดินเหนียวสูง มีปริมาณแคดเมียมและตะกั่ว น้อยกว่าดินชนิดอื่น ในขณะที่ ตะกั่วและแคดเมียมในดิน ( $r = 0.456$ ) มีความสัมพันธ์เชิงบวกปานกลางต่อกัน เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างโลหะหนักในดินและพืช สังเกตได้ว่า สารหนู ( $r = 0.573$ ) และแคดเมียมในพืช ( $r = 0.361$ ) มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับดิน ยกเว้นตะกั่ว ข้อมูลนี้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนและพัฒนาแนวทางการจัดการทางการเกษตรสำหรับการเพาะปลูกพืชสมุนไพรเพื่อให้มั่นใจในความปลอดภัยและเพื่อลดความเสี่ยงด้านสุขภาพของมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

**คำสำคัญ:** โลหะหนัก ฟ้าทะลายโจร พืชสมุนไพร ชูดินกำแพงแสน

## คำนำ

มลพิษจากโลหะหนักในดินมาจากหลายแหล่ง ทั้งที่มาจากธรรมชาติและแหล่งที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น โรงงานอุตสาหกรรม การใส่ปุ๋ย สารกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น ซึ่งมีผลกระทบต่อระบบนิเวศ พืชวิทยา และสุขภาพ ปริมาณโลหะหนักที่เพิ่มขึ้นในดินอาจเป็นสาเหตุของการสะสมในพืช อย่างไรก็ตาม การดูดซึมของโลหะหนักขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและทางสรีรวิทยาของพืช (Khan *et al.*, 2015) การปนเปื้อนในดินด้วยโลหะหนัก ได้กลายเป็นภัยคุกคามร้ายแรงในการเพาะปลูก

สมุนไพรในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา โดยมีรายงานการปนเปื้อนของโลหะหนักในยาแผนโบราณและสมุนไพรที่มีขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Yang *et al.*, 2004) ในขณะนี้ พืชสมุนไพรมีบทบาทสำคัญมากขึ้นในอุตสาหกรรมยา อาหารเพื่อสุขภาพ และอุตสาหกรรมเครื่องสำอางจากธรรมชาติ (Kim *et al.*, 2016) ความกังวลเพิ่มขึ้นเกี่ยวกับความปลอดภัยของยาสมุนไพรหลังจากการศึกษาพบว่า มีโลหะหนักระดับสูงในยาสมุนไพรบางชนิด ซึ่งเป็นปัญหาที่พบในการบำบัดทางการแพทย์แบบดั้งเดิมซึ่งถือเป็นสาเหตุของความผิดปกติทางสุขภาพหลายอย่าง (Maiga *et al.*, 2005) เป็นที่ทราบกันดีว่ายาแผนโบราณ

จำนวนมากสามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพของไตอย่างรุนแรง และมีความเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของโลหะหนัก (Awodele *et al.*, 2013) การดูดซึมโลหะหนักโดยพืชและการสะสมในห่วงโซ่อาหารเป็นภัยคุกคามต่อสุขภาพสัตว์และมนุษย์ (Singh and Kalamdhad, 2011) ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงในมนุษย์แม้ในระดับความเข้มข้นต่ำมาก (Dghaim *et al.*, 2015) ในบรรดาโลหะหนักชนิดต่าง ๆ สารหนู (As) ตะกั่ว (Pb) และแคดเมียม (Cd) ถูกจัดระดับความสำคัญอยู่ในอันดับที่หนึ่ง สอง และเจ็ดของสารมลพิษที่มีอันตรายสูง (ATSDR, 2022) ตามลำดับ ปัญหาสุขภาพเชื่อมโยงกับการดูดซึมโลหะหนักในอาหารมากเกินไปรวมถึงภูมิคุ้มกันลดลง ความผิดปกติของหัวใจ ความผิดปกติของทารกในครรภ์ พฤติกรรมทางจิตสังคม และระบบประสาทที่บกพร่อง (Harris *et al.*, 2011) ตะกั่ว และแคดเมียม ไม่ใช่องค์ประกอบที่จำเป็นทั้งในร่างกายมนุษย์หรือในพืชและทำให้เกิดผลเสียแม้ได้รับในปริมาณที่ต่ำ (Maiga *et al.*, 2005) ในขณะที่ สารหนูสามารถทำลายระบบปอด ประสาท ไต และระบบทางเดินหายใจ รวมทั้งทำให้เกิดพยาธิสภาพทางผิวหนัง (Järup, 2003) นอกจากนี้ยังอาจก่อให้เกิดความผิดปกติในระบบประสาทส่วนกลาง, ตับ ปอด หัวใจ ไตและสมอง นำไปสู่ความดันโลหิตสูง, ปวดท้อง, การปะทุของผิวหนัง, แผลในลำไส้ และเกี่ยวข้องกับมะเร็งชนิดต่าง ๆ (Maobe *et al.*, 2012)

ฟ้าทะลายโจร [*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. ex Nees] เป็นสมุนไพรที่จัดอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2558 มีสรรพคุณบรรเทาอาการเจ็บคอและบรรเทาอาการโรคหวัด (common cold) เช่น เจ็บคอ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ (Jarukamjorn and Nemoto, 2008) เป็นหนึ่งในยาที่สำคัญที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคทางเดินหายใจและเป็นที่ทราบกันดี สำหรับฤทธิ์ต้านไวรัส (Jiang *et al.*, 2021) แม้ว่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อนโลหะหนักในพืชสมุนไพรอยู่บ้างสำหรับฟ้าทะลายโจรยังมีข้อมูลค่อนข้างน้อย จากการตรวจเอกสารงานวิจัยโลหะหนักในพืชสมุนไพร Limmatvapirat *et al.* (2010) ศึกษาปริมาณโลหะหนักในเหง้าหรือรากของพืชสมุนไพรไทยในวงศ์ Zingiberaceae

จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ ชিং ข่า โพล ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ขมิ้นขาว กระชาย กระชายดำ ว่านชักมดลูก ว่านนางคา ว่านเอ็นเหลือง และว่านมหาเมฆ พบว่า เหง้าของข่า ชিং และกระชายดำ มีปริมาณของสารหนู แคดเมียม ปรอท และตะกั่ว สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานกำหนดคือ 4, 0.3, 0.5 และ 10 มก./กก. ตามลำดับ ปริมาณตะกั่วและสังกะสีในใบและก้านใบของตัวอย่างพืชส่วนใหญ่ในวงศ์ Zingiberaceae มีค่าสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน คือ 10 และ 100 มก./กก. ตามลำดับ ระดับของแคดเมียมและปรอทที่พบในการสกัดชาทุกสภาวะมีค่าสูงถึง 4.30 และ 3.77 มก./กก. ตามลำดับ ปริมาณโลหะหนักเป็นพิษที่สูงเกินเกณฑ์กำหนดในพืชบางชนิดในวงศ์ Zingiberaceae คาดว่าแหล่งของการปนเปื้อนของโลหะหนักอาจมาจากการใช้ปุ๋ยเคมี ยาฆ่าแมลง มลพิษในดินหรือน้ำ

อย่างไรก็ตาม ผลผลิตของฟ้าทะลายโจร และคุณภาพดินที่ใช้ปลูกไม่เคยมีการตรวจสอบการปนเปื้อนของโลหะหนักดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่เป็นแหล่งปลูกฟ้าทะลายโจรมาอย่างยาวนานมากกว่า 30 ปี ถือเป็นแหล่งปลูกที่ใหญ่ที่สุดในประเทศ จากข้อมูลจากการสัมภาษณ์ประธานกลุ่มผู้ปลูกและส่งเสริมการปลูกสมุนไพร อำเภอกำแพงแสน พบว่า มีกำลังการผลิตปีละ 150 ตัน พื้นที่ปลูกรวมกว่า 150 ไร่ พื้นที่ปลูกกระจายตัวหนาแน่นในตำบลสระพัฒนา ตำบลกระต๊อบ อำเภอกำแพงแสน รองลงมาเป็นตำบลบ้านยาง อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ซึ่งมีการรวมกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกฟ้าทะลายโจรมีสมาชิกมากกว่า 44 ราย ดังนั้น การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของโลหะหนักในพื้นที่ปลูกฟ้าทะลายโจรจังหวัดนครปฐม ซึ่งเป็นแหล่งปลูกหลักในพื้นที่ภาคกลางฝั่งตะวันตกภายใต้สภาพแวดล้อมและการเกษตรกรรมที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นข้อมูลสำคัญในการจัดการดินและปัจจัยการผลิตที่เหมาะสมและปลอดภัย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อความปลอดภัยคุณภาพการผลิตของฟ้าทะลายโจรให้ได้มาตรฐานและเพิ่มศักยภาพการผลิตของสมุนไพรไทยในการแข่งขันในตลาดโลกอีกด้วย

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การสำรวจพื้นที่ การเก็บตัวอย่าง การวิเคราะห์สมบัติดินและโลหะหนัก

ทำการศึกษาดังแต่เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565 ถึง มกราคม พ.ศ. 2566 ณ แปลงของเกษตรกรผู้ปลูกพื้ชชะลวยจังหวัดนครปฐม ศึกษาข้อมูลพื้นที่ปลูกพื้ชชะลวยจากสำนักงานเกษตรจังหวัดนครปฐม ร่วมกับแผนที่ดินมาตราส่วน 1: 100000 (Soil Survey Division, 2011) และการใช้ประโยชน์ที่ดิน มาตราส่วน 1: 25,000 จากกรมพัฒนาที่ดิน(Land Development Department, 2019) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดจุดเก็บตัวอย่างของดินและพื้ชให้ครอบคลุมจังหวัดนครปฐม จากนั้นเก็บตัวอย่างดินแบบรบกวน โครงสร้างบริเวณละ 4 จุด แต่ละจุดเก็บดิน 2 ระดับ ความลึก ได้แก่ 0-15 และ 15-30 ซม. และเก็บตัวอย่างต้นพื้ชชะลวยจำนวน 4 ต้นในแต่ละบริเวณ ซึ่งมีอายุใกล้เคียงกันในแต่ละพื้นที่ (>2 เดือน) โดยตัดต้นเหนือดิน 5 ซม. ในตำแหน่งเดียวกันกับที่เก็บตัวอย่างดิน พร้อมทั้งบันทึกข้อมูลสภาพแวดล้อมและข้อมูลการจัดการแปลงปลูกพื้ชจากการสัมภาษณ์เกษตรกร โดยเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 10 บริเวณ ประกอบด้วย 2 ชุดดินได้แก่ ชุดดินกำแพงแสน 9 บริเวณ(P1, P2, P3, P4, P5, , P6, P7, P9, P10)

และชุดดินสระบุรี 1 บริเวณ (P8) (Figure 1) เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน โดยใช้วิธีมาตรฐาน (National Soil Survey Center, 1996) ประกอบด้วย เนื้อดิน โดยการตักตะกอนแล้วอ่านค่าปริมาณสารแขวนลอยด้วยไฮโดรมิเตอร์ (hydrometer method) พีเอชดินโดยใช้อัตราส่วนดินต่อน้ำ 1: 1 ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินโดยวิธี Walkley and Black ไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl method ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสโดยวิธี Bray II และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินโดยสกัดด้วย 1 M NH<sub>4</sub>OAc pH 7.0 และค่าความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออนโดยวิธี leaching โดยใช้สารละลาย 1 N NH<sub>4</sub>OAc pH 7.0 วิเคราะห์โลหะหนักทั้งหมดในดินและพื้ช ได้แก่ สารหนู แคดเมียม และตะกั่ว โดยย่อยตัวอย่างดินด้วย กรดเปอร์คลอริก (HClO<sub>4</sub>) และกรดไนตริก (HNO<sub>3</sub>) ในอัตราส่วน 2: 1 (Amacher, 1996) และเตรียมตัวอย่างพื้ชโดยนำพื้ชชะลวยจรวงทั้งต้นมาทำความสะอาดด้วยแปรง ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก และอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้งและนำไปบดละเอียด และย่อยด้วยกรด HNO<sub>3</sub> เข้มข้น (Zarcinas *et al.*, 1987) วิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักทั้งหมด (As, Cd, Pb) ในดินและพื้ช ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer (AAS) รุ่น 200 Series AA ยี่ห้อ Agilent Technologies

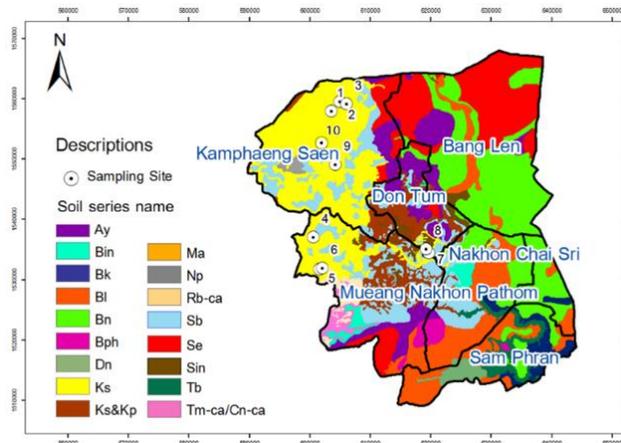


Figure 1. Sampling site and soil series name in Nakhon Pathom province

## การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสมบัติดินและโลหะหนักในดินและพืชโดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient) วิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principle component analysis) โดยการจัดกลุ่มตัวอย่างดินบนพื้นฐานของความสัมพันธ์ทางธรณีเคมี (Bellehumeur *et al.*, 1994) และสร้าง chart symbology ของโลหะหนักโดยใช้โปรแกรม Quantum GIS และประเมินศักยภาพความพิษของโลหะหนักเทียบกับดัชนีความเป็นพิษของโลหะหนัก

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

### สมบัติทางเคมีดินและความเข้มข้นของโลหะหนักในดินที่ปลูกฟ้าทะลายโจร

การปลูกฟ้าทะลายโจรในจังหวัดนครปฐมกระจายตัวในพื้นที่เชื่อมต่อระหว่างตำบลกระต๊อบและตำบลสะพาน อำเภอกำแพงแสน และบางส่วนของตำบลบ้านยาง อำเภอเมืองนครปฐม เป็นวิธีการปลูกแบบธรรมชาติที่มีการใช้ปุ๋ยเคมีและสารเคมี จัดเป็นแหล่งผลิตฟ้าทะลายโจรที่ใหญ่ที่สุดในประเทศไทยที่ทำต่อเนื่องมาไม่น้อยกว่า 20 ปี โดยมีใช้ปุ๋ยคอกและปุ๋ยอินทรีย์รองพื้นก่อนเตรียมแปลงปลูก ทำการปลูกด้วยการหว่านเมล็ดและให้น้ำด้วยระบบสปริงเกอร์เกษตรกรปลูกได้ 2 รอบต่อปี เริ่มปลูกรอบแรกปลายเดือนกุมภาพันธ์ และรอบสองเดือนสิงหาคม ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา > 100 กก./ไร่/ปี ใส่ปุ๋ยยูเรียครั้งแรกที่อายุ 1 เดือนและให้อีก 7 ครั้ง แต่ละครึ่งห่างกัน 1-2 สัปดาห์ เริ่มเก็บเกี่ยวฟ้าทะลายโจรได้เมื่ออายุ 120-150 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เริ่มออกดอกและมีสารสำคัญสูงสุด ดินที่ปลูกฟ้าทะลายโจรจังหวัดนครปฐมเป็นดินที่มีวัตถุต้นกำเนิดพัฒนามาจากตะกอนน้ำพา พื้นที่ปลูกฟ้าทะลายโจรส่วนใหญ่แจกกระจายอยู่ริมถนนสายย่อย (local roads) ผลวิเคราะห์ดินพบว่า เนื้อดินผืนแปรอยู่ในช่วงระหว่างดินร่วน (loam) ถึงดินร่วนเหนียว (clay loam) ดินมีอินทรีย์วัตถุค่อนข้างต่ำ มีไนโตรเจนรวมต่ำมาก ความจุ

แลกเปลี่ยนแคตไอออนค่อนข้างสูง ดินมีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูงมาก และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ต่ำถึงสูงมากอย่างไรก็ตาม ดินส่วนใหญ่มีค่าพีเอชเป็นกรดเล็กน้อยซึ่งเป็นช่วงที่ธาตุอาหารพืชในดินเป็นประโยชน์สูง (Table 1) จากการสัมภาษณ์เกษตรกรในพื้นที่ปลูกฟ้าทะลายโจร พบว่า เกษตรกรส่วนใหญ่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ได้แก่ มูลวัว มูลไก่ และมูลแพะเพื่อปรับปรุงกายภาพของดิน และมีการใส่ปุ๋ยเคมีในพื้นที่ปลูกฟ้าทะลายโจรนอกจากปุ๋ยยูเรียแล้ว ยังมีปุ๋ยเคมีอื่นซึ่งมีเกรดปุ๋ยแตกต่างกันไป เช่น 15-15-15, 25-7-7 และ 30-5-5 โดยใส่ในอัตราแตกต่างกัน ซึ่งในพื้นที่ที่ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราสูงก็จะมีปริมาณโพแทสเซียม และฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูงกว่าบริเวณอื่น เช่น ในบริเวณที่ 3 (P3), 4 (P4) และบริเวณที่ 5 (P5) ของพื้นที่ปลูกฟ้าทะลายโจร เป็นต้น

ความเข้มข้นของสารหนู แคดเมียม และตะกั่วในดินบนที่ระดับความลึก 0-15 ซม. มีค่าอยู่ในช่วง 7.7-15.17, 0.55-1.37 และ 3.67-72.42 มก./กก. ตามลำดับ ขณะที่ ความเข้มข้นในดินล่างที่ระดับความลึก 15-30 ซม. มีค่าอยู่ในช่วง 8.37-18.94, 0.72-1.67 และ 27.16-63.52 มก./กก. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารหนูในดินที่ปลูกฟ้าทะลายโจรกับค่ามาตรฐานคุณภาพดินตามประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ 2564 ข้อ 3.2 ซึ่งเป็นคุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการค้าขาย เกษตรกรรม และกิจการอื่น ๆ (National Environment Board, 2021) พบว่า ความเข้มข้นของสารหนูในดินที่ปลูกฟ้าทะลายโจรทุกพื้นที่มีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพดิน แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของสารหนูมีค่าต่ำกว่าค่าความเข้มข้นวิกฤตของดินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช (Alloway, 1995; Kabata-Pendias, 2010) ในขณะที่ความเข้มข้นของแคดเมียม และตะกั่วในดินที่ปลูกฟ้าทะลายโจรอยู่ในระดับไม่เกินเกณฑ์คุณภาพดินและค่าความเข้มข้นวิกฤตที่มีผลต่อพืช (Table 1) จากข้อมูลของกรมพัฒนาที่ดินซึ่งเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่เกษตรกรรมทั่วประเทศจำนวน 3,186 ตัวอย่าง และประเมินโดยใช้วิธีทางสถิติทำให้ได้ค่าพื้นฐาน (background concentration) ของโลหะหนักต่างๆ ได้แก่ สารหนู 26 มก./กก. แคดเมียม 1.7 มก./กก.

Table 1. Chemical properties and concentration of heavy metals in soils and *Andrographis paniculata* at Nakhon Pathom province

Site	Depth (cm)	pH	Sand	Silt	Clay (%)	OM <sup>a</sup>	TN <sup>b</sup>	AP <sup>c</sup>		CEC <sup>e</sup> (cmol/kg)	As <sup>f</sup>	Cd <sup>g</sup>	Pb <sup>h</sup>
								(mg/kg)					
P1	0-15	6.4	28.8	38.8	32.4	1.79	0.089	183.1	146.3	20.36	15.17	0.55	3.67
	15-30	6.7	25.4	43.0	31.6	1.54	0.078	171.7	96.23	19.76	15.68	0.72	46.02
P2	0-15	6.4	49.1	20.0	30.9	1.57	0.048	167.7	93.86	18.90	7.74	0.99	55.37
	15-30	6.4	49.9	20.0	30.1	1.55	0.043	169.7	95.05	18.43	8.37	0.97	27.16
P3	0-15	6.5	28.8	41.8	29.4	0.93	0.073	261.2	46.61	18.44	14.71	0.87	29.84
	15-30	6.5	26.8	44.4	28.8	0.97	0.062	257.1	46.39	17.93	14.54	0.98	45.93
P4	0-15	6.2	49.5	22.4	28.1	0.95	0.092	259.1	46.50	17.98	14.60	1.09	48.40
	15-30	6.2	36.6	36.0	27.5	0.90	0.069	259.7	35.36	17.29	11.52	1.09	59.45
P5	0-15	5.2	31.1	42.0	26.9	0.83	0.080	255.6	35.80	17.12	9.88	0.99	38.80
	15-30	4.1	38.1	35.6	26.3	0.87	0.086	257.6	35.58	16.87	11.14	0.76	46.34
P6	0-15	6.4	50.7	23.6	25.7	1.50	0.035	117.8	86.67	15.80	10.00	1.00	32.97
	15-30	6.3	50.1	24.8	25.1	1.44	0.037	113.7	87.91	15.48	12.09	1.19	30.70
P7	0-15	6.2	14.7	60.8	24.5	1.47	0.091	115.8	87.29	15.94	12.06	1.19	72.42
	15-30	6.4	15.1	61.0	23.9	1.24	0.087	135.3	90.79	15.54	12.05	1.14	63.52
P8	0-15	6.5	26.8	49.8	23.4	1.24	0.090	131.2	91.96	15.33	13.92	1.19	58.42
	15-30	6.7	26.9	50.2	22.9	1.24	0.088	133.3	91.37	15.00	11.41	1.25	63.23
P9	0-15	6.8	36.1	41.6	22.3	1.84	0.093	301.5	183.1	14.74	14.63	1.37	47.91
	15-30	6.9	34.1	44.2	21.7	1.84	0.040	297.4	181.7	13.61	18.94	1.67	51.17
P10	0-15	6.3	35.1	37.8	27.1	1.35	0.080	199.2	90.91	17.18	12.52	1.03	43.09
	15-30	6.2	33.6	39.9	26.4	1.29	0.070	199.5	84.50	16.66	12.86	1.08	48.16
<sup>1</sup> Soil quality for agriculture (mg/kg)											25	762	800
<sup>2</sup> Critical soil concentration											20-50	3-8	100-400

<sup>1</sup>National Environment Board (2021)

<sup>2</sup>Higher concentrations may be toxic to plants depending on speciation (Alloway, 1995)

<sup>a</sup>organic matter, <sup>b</sup>total nitrogen, <sup>c</sup>available phosphorus, <sup>d</sup>exchangeable potassium, <sup>e</sup>cation exchange capacity, <sup>f</sup>arsenic,

<sup>g</sup>cadmium, <sup>h</sup>lead

และตะกั่ว 55 มก./กก. มีข้อสังเกตว่า ค่าพื้นฐานของสารหนักจากพื้นที่เกษตรกรรมทั่วประเทศ (Land Development Department, 2015) สูงกว่ามาตรฐานคุณภาพดินฯ เนื่องจากหลายพื้นที่ของประเทศไทยเป็นแหล่งสายแร่โลหะ จากการสำรวจของกรมทรัพยากรธรณี ได้รายงานว่ามีพื้นที่ประมาณ 1 ใน 3 ของประเทศไทย (Department of Mineral Resources, 2018) อาจมีสารหนักเกินมาตรฐาน

คุณภาพดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการอยู่อาศัยและเกษตรกรรมซึ่งเกิดจากธรณีเคมีของพื้นที่ โดยสารหนักพบมากที่สุดในรูปแบบของอาซีโนไฟไรต์ (FeAsS) นอกจากนี้ ออกไซด์ของสารหนักในรูปแบบ arsenic trioxide ส่วนใหญ่เกิดจากการใช้ทางการเกษตร เช่น ยาฆ่าแมลง ปุ๋ยเคมี และมูลสัตว์ที่มีสารหนักเป็นองค์ประกอบ และการใช้สารเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ ทำให้มีโลหะหนักในมูลของ

สัตว์ปีกหรือปุ๋ยคอก เมื่อนำปุ๋ยคอกไปใช้จากก่อให้เกิดการปนเปื้อนในดินได้ (Boonamnuayvitaya and Khummalai, 2015) นอกจากนี้ Liu *et al.* (2005) รายงานว่า มูลจากฟาร์มปศุสัตว์และสัตว์ปีกแบบหนาแน่นเป็นหนึ่งในแหล่งที่มาหลักของโลหะหนักในดินที่ใช้ทำการเกษตร ความเข้มข้นของสารหนู (0 - 14.1 มก./กก.) และ แคดเมียม (2.0 to 256.0 มก./กก.) มีค่าสูงเกินไปในปุ๋ยอินทรีย์เชิงพาณิชย์ จำนวน 162 ตัวอย่าง Ren *et al.* (2019) และ Rostami *et al.* (2021) รายงานว่า ความเข้มข้นของสารหนูและตะกั่วในดินที่ทำการเกษตรเพิ่มขึ้นจาก 4.81 เป็น 12.94 และ 26.65 เป็น 37.30 มก./กก. ตามลำดับหลังใช้ปุ๋ยฟอสเฟต และการใช้สารกำจัดศัตรูพืชเป็นระยะเวลานาน ทำให้ความเข้มข้นของสารหนู แคดเมียม และตะกั่ว เพิ่มขึ้นจาก 4.81 เป็น 14.15, 0.18 เป็น 0.45 และ 26.65 เป็น 38.08 มก./กก. ตามลำดับ ถึงแม้ว่าปุ๋ยและยาฆ่าแมลงมีความจำเป็นต่อการรักษาผลผลิต แต่การใช้ปุ๋ยและยาฆ่าแมลงชนิดเดียวกันในระยะยาวสามารถสะสมโลหะหนักในดินได้ (Marrugo-Negrete *et al.*, 2017)

**การวิเคราะห์องค์ประกอบ (factor analysis)**

การวิเคราะห์องค์ประกอบของดินเพื่อชี้บ่งพฤติกรรมของสมบัติทางธรณีเคมีที่คล้ายกันกับกลุ่ม

ตัวอย่างดิน (Bellehumeur *et al.*, 1994) พบว่า ความแปรปรวนของข้อมูลดินที่ใช้อธิบายปัจจัยหลัก สองปัจจัยที่ส่งผลต่อเนื้อดินมีค่าอยู่ที่ 68.99 % (Figure 2) โดยแบ่งสมบัติของดินออกเป็นสามกลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยอนุภาคทรายแป้ง อินทรีย์วัตถุ สารหนู แคดเมียม และตะกั่ว ซึ่งธาตุเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณอินทรีย์วัตถุ โดยพื้นที่ศึกษามีการใช้ปุ๋ยคอกชนิดต่าง ๆ ได้แก่ มูลไก่ มูลแพะ มูลโค เป็นระยะเวลาเนิ่นนานมากกว่า 20 ปี เพื่อปรับปรุงสมบัติทางกายภาพดินและเพิ่มอินทรีย์วัตถุให้แก่ดิน หากมีการวิเคราะห์โลหะหนักในปุ๋ยคอกแต่ละพื้นที่จะทำให้งานวิจัยมีความชัดเจนในแหล่งที่มาของโลหะหนักมากขึ้น อย่างไรก็ตาม He *et al.* (2009) และ Shi *et al.* (2011) รายงานว่าโลหะหนักที่ตกค้างในมูลสัตว์สามารถสะสมอยู่ที่ผิวดินเป็นผลจากการใช้ปุ๋ยคอกทางการเกษตรในระยะยาว และเนื้อดินอยู่ในกลุ่มเนื้อดินปานกลาง ดินร่วนปนทรายแป้ง และดินร่วน กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยอนุภาคทรายมีความสัมพันธ์กับดินในกลุ่มดินร่วนเหนียวปนทราย และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน กับอนุภาคดินเหนียว สัมพันธ์กับกลุ่มดินร่วนเหนียว อย่างไรก็ตาม ปริมาณของสารหนู แคดเมียม และตะกั่วในดิน ยังสะท้อนให้เห็นถึงความแตกต่างขององค์ประกอบของวัตถุต้นกำเนิด เนื้อดิน เวิร์ทยาของดิน และมีความผันแปรตามการใส่ปุ๋ย และสารกำจัดศัตรูพืช (Chandrajith *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2002)

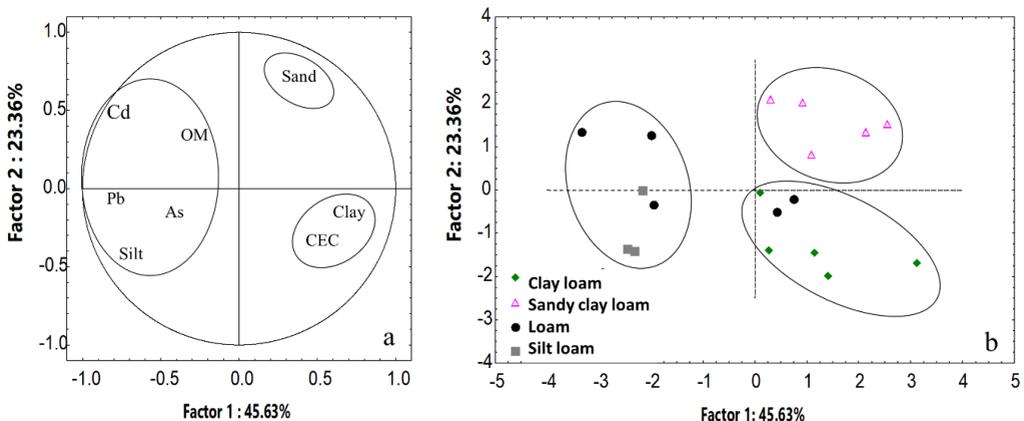


Figure 2. Factor analysis for the soil properties of whole soil materials (a) distribution of chemical properties (variables) (b) distribution of soil texture (cases)

## ความเข้มข้นของโลหะหนักในฟ้าทะลายโจร

ความเข้มข้นของโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดในฟ้าทะลายโจร มีปริมาณแตกต่างกัน โดยความเข้มข้นของตะกั่วในฟ้าทะลายโจรมีปริมาณสูงที่สุด มีค่าอยู่ในช่วง 8.9 - 19.96 มก./กก. รองลงมาเป็นสารหนูมีค่าอยู่ในช่วง 0.1 - 1.89 มก./กก. และแคดเมียมมีค่าอยู่ในช่วง 0.3 - 1.28 มก./กก. ตามลำดับ (Table 2) เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของตะกั่วกับค่ามาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2564 และองค์การอนามัยโลก (WHO, 2007) ซึ่งกำหนดให้มีตะกั่วได้ไม่เกิน 10 มก./กก. พบว่า ความเข้มข้นตะกั่วในฟ้าทะลายโจรมีค่าเกินมาตรฐาน 6 บริเวณ Bolan *et al.* (2016) รายงานว่า ตะกั่วเป็นธาตุพิษที่พบมากที่สุดในพืชสมุนไพร โดยส่วนที่ละลายน้ำน้อยกว่า 10 % ของปริมาณทั้งหมด ในขณะที่ความเข้มข้นของสารหนูอยู่ในระดับมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2564 ที่กำหนดไว้ แต่มีค่าสูงกว่ามาตรฐานขององค์การอนามัยโลก นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของแคดเมียมในฟ้าทะลายโจรมีค่าสูงเกินค่ามาตรฐาน 9 บริเวณ (P1, P2, P3, P5, P6, P7, P8, P9 และ P10) อาจเนื่องจากการใช้ปุ๋ยเกรด 15-15-15, 46-0-0, 25-7-7 และ 30-5-5 อย่างต่อเนื่องและใช้ในอัตราสูง เป็นระยะเวลานานมากกว่า 10 ปี สอดคล้องกับ Brigden *et al.* (2002) พบว่า การปนเปื้อนของแคดเมียมในปุ๋ยสัมพันธ์ทิศทางเดียวกันกับร้อยละของ  $P_2O_5$  ที่เป็นองค์ประกอบในปุ๋ย เนื่องจากกระบวนการเกิดหินฟอสเฟตในธรรมชาติมักพบแคดเมียมเกิดร่วมอยู่ด้วย แคดเมียมจึงเป็นสารปนเปื้อนที่สำคัญในปุ๋ยที่มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ ซึ่ง Pan *et al.* (2016) รายงานว่า การใช้ปุ๋ยฟอสเฟตถือเป็นแหล่งที่สำคัญของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ปุ๋ยอินทรีย์ เช่น ไนโตรเจน หรือโพแทสเซียมมีความเข้มข้นของแคดเมียมที่น้อยสำคัญ ซึ่งเป็นแหล่งของแคดเมียมในดิน (Cai *et al.*, 2012) มีเพียง 1 บริเวณที่มีค่าไม่เกินมาตรฐาน (P4) เนื่องจากพื้นที่ดังกล่าวเป็นแปลงปลูกขนาดเล็ก ไม่ได้ใส่ปุ๋ยคอกและปุ๋ยเคมี ผลผลิตที่ได้เพื่อการบริโภคในครัวเรือน อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นตะกั่วในฟ้าทะลายโจรมี

ค่าเกินมาตรฐาน 6 แห่ง ซึ่ง Chizzola *et al.* (2003) ตั้งข้อสังเกตไว้ว่าการสะสมของตะกั่วที่ใบของสมุนไพรเป็นผลมาจากปลูกใกล้แหล่งชุมชน โรงงานอุตสาหกรรมหรือริมถนนทางหลวง ทั้งนี้ เนื่องจากพื้นที่ปลูกฟ้าทะลายโจรส่วนใหญ่อยู่ริมถนน อิทธิพลของเขม่าควันจากรถจากถนน เนื่องจากทิศทางลมที่อาจพัดพาอนุภาคขนาดเล็กของโลหะหนักจากถนนสายหลักมายังแปลงปลูกฟ้าทะลายโจร สอดคล้องกับรายงานของ Parkpian *et al.* (2003) พบว่า อนุภาคตะกั่วและแคดเมียมสามารถแขวนลอยและตกสะสมในดินและพืชได้ไกลจากแหล่งกำเนิดมากกว่า 2 กิโลเมตร ซึ่งมีลมเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลในการกำหนดทิศทางของการแพร่กระจาย และระยะทางในการเคลื่อนที่ของอนุภาคตะกั่วและแคดเมียมจากเขม่าควันจากรถ นอกจากนี้ความสามารถในการดูดใช้และสะสมโลหะหนักยังขึ้นกับลักษณะทางพันธุกรรม ระยะพัฒนาการ อัตราการเจริญเติบโตของพืช ความลึก และการกระจายตัวของรากพืช สัมประสิทธิ์การเคลื่อนย้าย ความต้องการธาตุอาหาร รวมถึงสัณฐานภายนอกที่มีผลต่อพื้นที่ในการตกสะสม และปริมาณการตกสะสมของอนุภาคโลหะหนักจากบรรยากาศลงสู่พืชอีกด้วย (Naszradi *et al.*, 2004) นอกจากนี้ Walker *et al.* (2004) พบว่า การใส่ปุ๋ยหมักและปุ๋ยคอกที่ไม่ปนเปื้อน ช่วยลดปริมาณโลหะหนักที่สกัดได้ในดิน ปริมาณการดูดใช้และสะสมในส่วนเหนือดินของพืช เนื่องจากสารชีวมีกซึ่งเป็นส่วนสำคัญของอินทรีย์วัตถุที่อยู่ในปุ๋ยหมักสามารถลดความสามารถในการละลายของโลหะได้โดยการสร้างคีเลตโลหะที่เสถียร (Ross, 1994) ซึ่งสอดคล้องกับ Zhang *et al.* (2016) พบว่า การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ช่วยปรับปรุงความปลอดภัยของสินค้าเกษตรที่ผลิตในพื้นที่เพาะปลูกที่ปนเปื้อนด้วย ตะกั่ว และ แคดเมียม เนื่องจากปุ๋ยอินทรีย์และชีวมีกมีความสามารถในการดูดซับโลหะหนักและลดโลหะอิสระให้ออนในสารละลายดิน

Table 2. Concentration of heavy metals in *Andrographis paniculata* plants

Location	As	Cd	Pb
	(mg/kg)		
P1	0.73	0.80	19.96
P2	0.10	0.79	8.91
P3	0.86	0.80	9.96
P4	1.07	0.30	16.78
P5	0.41	1.19	8.90
P6	0.30	1.19	17.81
P7	0.81	1.10	19.94
P8	1.89	1.10	14.93
P9	0.34	1.28	9.86
P10	0.72	0.95	14.12
Ministry of Public Health (2021)	5.0	0.3	10.0
WHO (2007)	0.4	0.3	10.0

### การกระจายเชิงพื้นที่ของโลหะหนักในดินและฟ้าทะลายโจร

เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด พบว่า การแจกกระจายของตะกั่วในดิน มีความเข้มข้นสูงสุดในทุกพื้นที่ รองลงมาเป็น สารหนู และ แคดเมียม ขณะที่ ความเข้มข้นของตะกั่วในฟ้าทะลายโจรสูงสุดเช่นเดียวกันกับในดิน รองลงมาเป็นแคดเมียม และสารหนู อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของสารหนู และแคดเมียมในดินบน มีความสัมพันธ์เชิงพื้นที่กับ สารหนูและแคดเมียมในฟ้าทะลายโจร โดยเฉพาะ บริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่างในอำเภอดอนตูม มีความเข้มข้นของโลหะหนัก (As, Cd, Pb) อยู่ในระดับสูง (Figure 3) อาจเนื่องมาจากกิจกรรมทางการเกษตรในพื้นที่ที่มีการใช้ปุ๋ยเคมีเกรด 15-15-15, 46-0-0, 25-7-7, 30-5-5 และปุ๋ยคอก ได้แก่ มูลไก่ มูลแพะ มูลโคอัตรสูงต่อเนื้อเป็นระยะเวลาอันอาจส่งผลให้โลหะหนักสะสมในดินมากขึ้น

### ความสัมพันธ์ระหว่างโลหะหนักในดิน ฟ้าทะลายโจร และสมบัติดินบางประการ

ความสัมพันธ์ของโลหะหนักกับสมบัติทางเคมีของดินบางประการ ได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ปริมาณธาตุอาหารหลัก (NPK) ค่าความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน และสมบัติทางกายภาพ (ปริมาณทราย ทรายแป้ง และดินเหนียว) พบว่า แคดเมียม ( $r = -0.835$ ) และตะกั่วในดิน ( $r = -0.547$ ) มีความสัมพันธ์เชิงลบปานกลาง (moderate negative correlation) กับปริมาณดินเหนียวและค่าความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน นอกจากนี้ยังพบว่า สารหนู ( $r = 0.429$ ) และแคดเมียมในดิน ( $r = 0.421$ ) มีความสัมพันธ์เชิงบวกน้อย (weak correlation) กับปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน ในขณะที่ ตะกั่วและแคดเมียมในดิน ( $r = 0.546$ ) มีความสัมพันธ์เชิงบวกปานกลาง (moderate positive) ต่อกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang *et al.* (2019) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างโลหะหนักในดิน และ

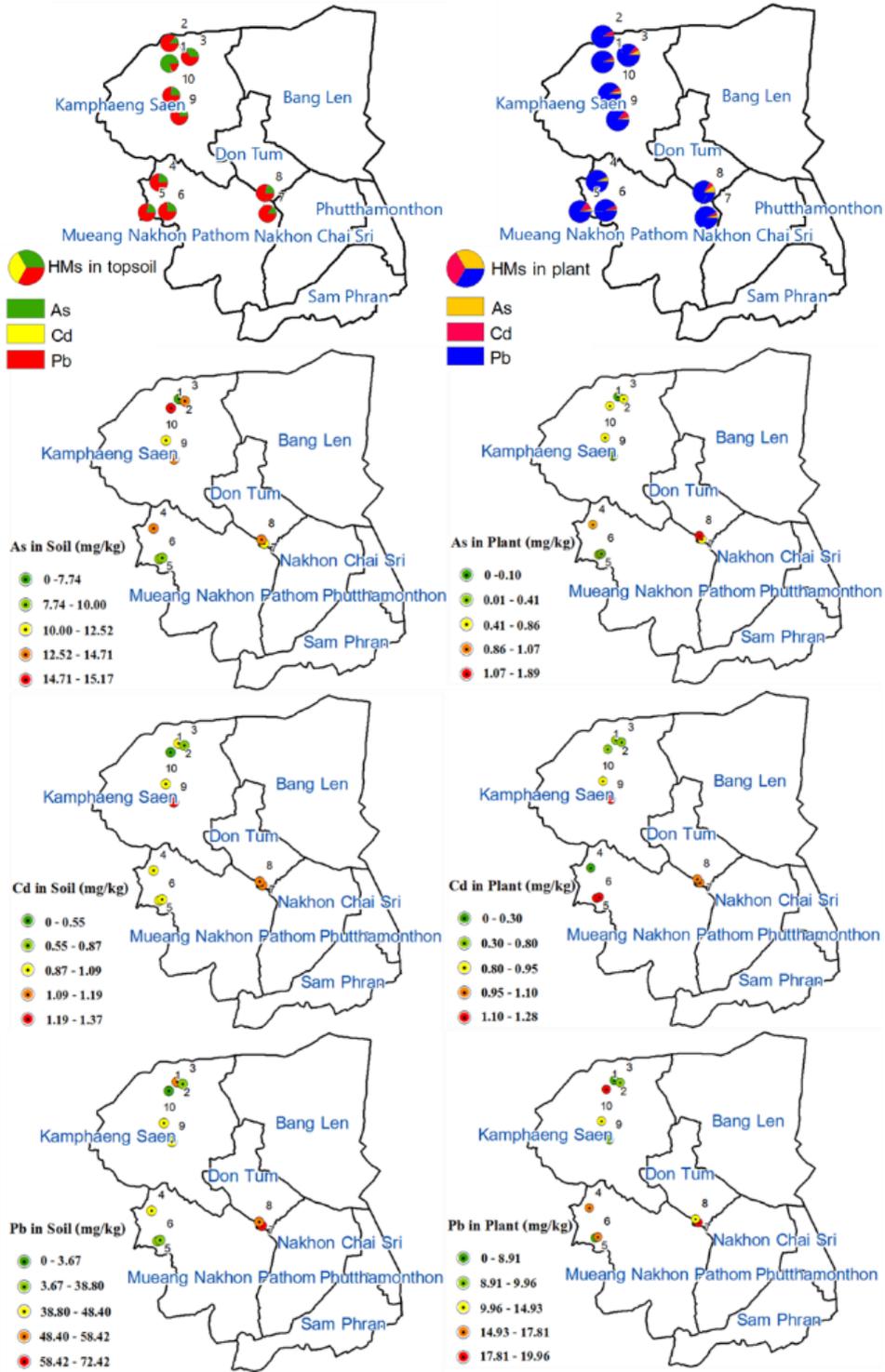


Figure 3. Proportion of heavy metals in topsoil (a) and plant (b) and distribution of As, Cd and Pb in topsoil (c, e, g) and plant (d, f, h) of Nakhon Pathom province

พืชทะเลทราย สังเกตได้ว่า ทั้งสารหนู ( $r=0.573$ ) และ แคดเมียมในดิน ( $r=0.361$ ) มีความสัมพันธ์เชิงบวกปานกลางกับพืช ยกเว้นตะกั่วที่มีความสัมพันธ์เชิงลบ (Table 3, Figure 4) จากข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างโลหะหนักในดินและพืช หรือโลหะหนักในดินกับสมบัติดิน ที่กล่าวมาข้างต้น จำเป็นต้องพิจารณารูปที่อยู่ในดินในสภาวะต่างๆ ซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถในการละลายของโลหะหนัก และการเคลื่อนย้ายเข้าสู่พืช โดยสารหนูในดินโดยปกติอยู่สภาวะออกซิเดชัน ได้แก่  $As^{3+}$ ,  $As^{5+}$ ,  $As^0$  และ  $As^{3-}$  ในดินที่อากาศถ่ายเทดี สารหนูอยู่ในรูปอาร์เซนเนต ( $As^{5+}$ )

ซึ่งดูดซับกับอนุภาคดินเหนียวในดินที่มีพีเอชเป็นกลางได้อย่างรวดเร็ว ในสภาพดินกรดสารหนูอยู่ในรูปออกไซด์ของเหล็ก ( $FeAsO_4$ ) และอะลูมินัม ( $AlAsO_4$ ) ในขณะที่ดินในสภาพน้ำขัง สารหนูอยู่ในรูปอาร์เซนไนต์ ( $As^{3-}$ ) สามารถเคลื่อนย้ายได้ดี และมีความเป็นพิษสูง (Kamal and Miah, 2022) สำหรับรูปของแคดเมียมในดินที่มีความเป็นกรดโดยทั่วไปอยู่ในรูป  $Cd^{2+}$ ,  $CdSO_4^0$  และ  $CdCl^+$  สามารถเคลื่อนย้ายได้สูงสุดในช่วง pH 4.5 -5.5 ในดินต่างอยู่ในรูป  $CdHCO_3^+$  ดินที่มี pH สูงกว่า 7.5 แคดเมียมมีความสามารถในการเคลื่อนย้ายต่ำ

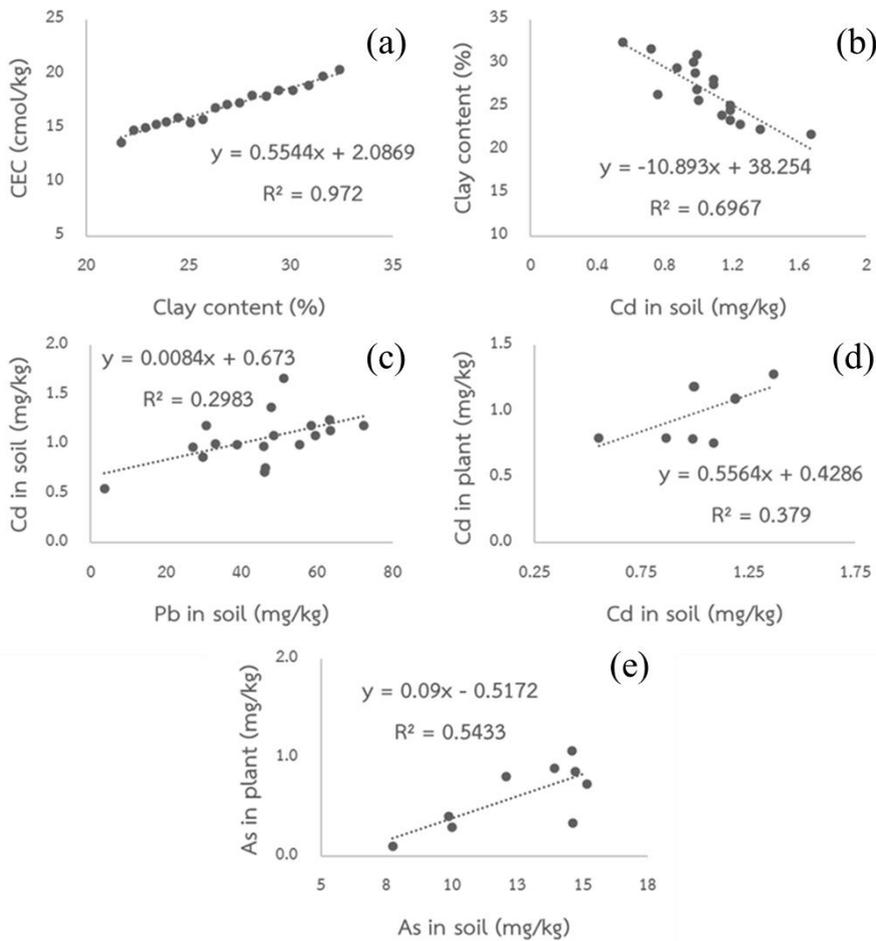


Figure 3. Proportion of heavy metals in topsoil (a) and plant (b) and distribution of As, Cd and Pb in topsoil (c, e, g) and plant (d, f, h) of Nakhon Pathom province

Table 3. The correlation coefficients for relationships between heavy metals concentrations in plant and topsoil

	Sand	Silt	Clay	pH	OM <sup>a</sup>	TN <sup>b</sup>	AP <sup>c</sup>	EK <sup>d</sup>	CEC <sup>e</sup>	As <sub>s</sub> <sup>f</sup>	Cd <sub>s</sub> <sup>g</sup>	Pb <sub>s</sub> <sup>h</sup>	As <sub>p</sub> <sup>i</sup>	Cd <sub>p</sub> <sup>j</sup>	Pb <sub>p</sub> <sup>k</sup>	
Sand	1															
Silt	-0.967**	1														
Clay	0.201	-0.444*	1													
pH	-0.095	0.107	-0.077	1												
OM	0.091	-0.06	-0.091	0.565**	1											
TN	-0.613**	0.586**	-0.094	-0.202	-0.273	1										
AP	0.079	-0.076	0.017	-0.178	-0.229	0.128	1									
AK	-0.045	0.121	-0.308	0.565**	0.924**	-0.095	0.005	1								
CEC	0.099	-0.346	0.986**	-0.109	-0.134	0.074	0.036	-0.323	1							
As <sub>s</sub>	-0.363	0.377	-0.175	0.382	0.221	0.222	0.420*	0.429*	-0.138	1						
Cd <sub>s</sub>	-0.006	0.223	-0.835**	0.387	0.245	-0.179	0.124	0.421*	-0.866**	0.237	1					
Pb <sub>s</sub>	-0.389	0.498*	-0.547**	0.045	-0.196	0.283	0.091	-0.119	-0.502*	-0.061	0.546**	1				
As <sub>p</sub>	-0.409	0.436	-0.251	0.175	0.546	0.554	0.289	0.124	-0.165	0.573	0.116	0.333	1			
Cd <sub>p</sub>	-0.356	0.483	-0.626	-0.073	-0.121	-0.121	-0.047	0.033	-0.664	-0.256	0.361	0.149	-0.197	1		
Pb <sub>p</sub>	-0.206	0.183	0.019	0.181	0.166	0.163	0.524	0.113	0.048	0.299	-0.234	-0.103	0.333	-0.165	1	

\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

<sup>a</sup>OM = organic matter, <sup>b</sup>TN = total nitrogen, <sup>c</sup>AP = available phosphorus, <sup>d</sup>EK = exchangeable potassium, <sup>e</sup>CEC = cation exchange capacity, <sup>f</sup>As = arsenic in soil, <sup>g</sup>Cd<sub>s</sub>= cadmium in soil,

<sup>h</sup>Pb<sub>s</sub> = lead in soil, <sup>i</sup>As<sub>p</sub>= arsenic in plant, <sup>j</sup>Cd<sub>p</sub>= cadmium in plant, <sup>k</sup>Pb<sub>p</sub> = lead in plant

โดยการสะสมแคดเมียมในดินมีสาเหตุหลักมาจากการตกสะสมจากบรรยากาศจากถลุงโลหะ ( $> 1000$  กรัม/เฮกตาร์/ปี) และปุ๋ยฟอสฟอรัส ( $> 150$  กรัม/เฮกตาร์/ปี) (Alloway and Steinnes, 1999) Sipos *et al.* (2005) พบว่า อินทรีย์วัตถุในดินมีบทบาทสำคัญในการดูดซับตะกั่ว แต่การตรึงด้วยแร่ดินเหนียวแข็งแรงมากกว่า การเคลื่อนย้ายของตะกั่วในดินมักช้า ดินที่เป็นกรดทำให้เกิดสารเชิงซ้อน Pb-OM ความสามารถในการละลายได้ของตะกั่วเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม การปนเปื้อนตะกั่วในดินริมถนนเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมมาระยะหนึ่งแล้ว แม้ว่าสารเติมแต่งตะกั่ว ในน้ำมันเบนซินถูกห้ามใช้ในประเทศส่วนใหญ่ แต่ระดับตะกั่วในดินก็ยิ่งเพิ่มสูงขึ้น ( $> 7,000$  มก./กก.) ตะกั่วในสารละลายดินมีทั้งรูปแบบประจุบวก ( $Pb^{2+}$ ,  $PbCl^+$ ,  $PbOH^+$ ) และประจุลบ ( $PbCl_3^-$  และ  $Pb(CO_3)_2^{2-}$ ) (Kabata-Pendias and Sadurski, 2004) ความสามารถในการละลายของตะกั่วสามารถลดลงได้โดยการใช้น้ำ ค่า pH ของดินที่สูงอาจทำให้ตะกั่วตกตะกอนได้ในรูปไฮดรอกไซด์ ฟอสเฟต หรือคาร์บอเนต รวมทั้งส่งเสริมการก่อตัวของสารเชิงซ้อนตะกั่วอินทรีย์ที่ค่อนข้างมีเสถียรภาพ Jin *et al.* (2005) กล่าวว่าอินทรีย์วัตถุในดินเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการเพิ่มการดูดซึมของตะกั่ว ในพืชยังขึ้นกับสมบัติดิน ได้แก่ CEC และ pH รวมถึงปัจจัยทางพันธุกรรมของพืช พื้นที่ผิวดิน และสารหลั่งของราก (Davies, 1995) นอกจากนี้ ตะกั่วในอากาศซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดมลพิษหลักของตะกั่ว ก็ถูกพืชดูดซึมผ่านใบพืชได้อย่างง่ายดายเช่นกัน งานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าตะกั่วที่ตกสะสมอยู่บนผิวใบถูกเซลล์เหล่านี้ดูดซับไว้ แม้ว่าตะกั่วส่วนใหญ่สามารถกำจัดออกจากพื้นผิวใบได้โดยการล้างด้วยสารทำความสะอาด แต่ก็มีแนวโน้มว่าจะมีการเคลื่อนย้ายตะกั่วไปยังเนื้อเยื่อพืชอย่างมีนัยสำคัญ (Isermann, 1970) โดยมีการคำนวณว่ามากถึง 95 % ของตะกั่วทั้งหมดของพืชอาจเกิดจากการสะสมทางอากาศบนพืชที่มีใบ (Dalenberg and van Driel, 1990) อย่างไรก็ตาม Keshavarzi *et al.* (2015) รายงานว่าปริมาณธาตุทั้งหมดในดินไม่ได้เป็นตัวกำหนดความเข้มข้นของธาตุในพืชเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการที่ซับซ้อนในพืช รวมทั้งปัจจัยสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ซึ่งส่งผลต่อการเคลื่อนย้าย

ธาตุจากดินสู่พืช เช่น ความเข้มข้นของธาตุทั้งหมดในดิน และชนิดพันธุ์พืช

## สรุป

ดินที่ปลูกพืชทะเลทรายในจังหวัดนครปฐมมีเนื้อดินส่วนใหญ่เป็นดินร่วนเหนียว ความอุดมสมบูรณ์ดินอยู่ในระดับปานกลาง และมีค่าพีเอชเป็นกรดเล็กน้อย ซึ่งเป็นช่วงที่ธาตุอาหารพืชในดินเป็นประโยชน์สูง ความเข้มข้นของสารหนู (7.74 - 18.94 มก./กก.) แคดเมียม (0.55 - 1.67 มก./กก.) และตะกั่ว (3.67 - 72.42 มก./กก.) ในดินอยู่ในระดับไม่เกินค่ามาตรฐานคุณภาพดินเพื่อการอยู่อาศัยและเกษตรกรรม (25, 762 และ 800 มก./กก.) ตามประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ 2564 ความเข้มข้นของแคดเมียม (0.3 - 1.28 มก./กก.) และตะกั่ว (8.90 - 19.96 มก./กก.) ในพืชทะเลทรายบางบริเวณมีค่าเกินมาตรฐานของยาสมุนไพรรักษาโรค (0.3 และ 10 มก./กก.) และองค์การอนามัยโลก (0.3 และ 10 มก./กก.) ในขณะที่ความเข้มข้นของสารหนูอยู่ในระดับมาตรฐานที่กำหนดไว้ การแจกกระจายของตะกั่วในดิน มีความเข้มข้นสูงสุดในทุกพื้นที่ รองลงมาเป็นสารหนู และแคดเมียม ขณะที่ความเข้มข้นของตะกั่วในพืชทะเลทรายมีปริมาณสูงสุด เช่นเดียวกับกับในดิน รองลงมาเป็นแคดเมียม และสารหนู ความสัมพันธ์ของโลหะหนักกับสมบัติทางเคมีของดิน พบว่า บริเวณที่มีปริมาณดินเหนียวสูง มีปริมาณแคดเมียมและตะกั่วต่ำ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างโลหะหนักในดิน และพืชทะเลทราย สังเกตได้ว่าความเข้มข้นของสารหนู และแคดเมียมในดินสูงขึ้นมีแนวโน้มให้ความเข้มข้นในการสะสมโลหะหนักในพืชสูงขึ้นอีกด้วย ยกเว้นตะกั่ว การวิจัยครั้งนี้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเบื้องต้นในการวางแผนการจัดการดินในการปลูกพืชสมุนไพรเพื่อให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และมีมาตรฐานตามข้อกำหนดของยาสมุนไพรรักษาโรค

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ปีงบประมาณ 2565

## เอกสารอ้างอิง

- Alloway, B.J. 1995. The origin of heavy metals in soils. pp.38 - 57. *In*: B.J. Alloway (ed.). Heavy Metals in Soils. Blackie Academic and Professional, London. 368 p.
- Alloway, B.J. and E. Steinnes. 1999. Anthropogenic additions of cadmium to soils. pp. 97-123. *In*: M.J. McLaughlin, B.R. Singh (eds.). Cadmium in Soils and Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Amacher, C.M. 1996. Nickel, Cadmium and Lead. pp. 739-768. *In*: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert (ed.). Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods. SSSA Book Series no.5. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- ATSDR. 2022. The ATSDR 2022 substance priority list. (Online). Available: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2022spl> (July 7, 2023).
- Awodele, O., T.D. Popoola, K.C. Amadi, H.A.B Coker and A. Akintonwa. 2013. Traditional medicinal plants in Nigeria -Remedies or risks. *Journal of Ethnopharmacology* 150(2): 614-618.
- Bellehumeur, C., D. Marcotte and M. Jébrak. 1994. Multi-element relationships and spatial structures of regional geochemical data from stream sediments, Southwestern Quebec. Canada. *Journal of Geochemical Exploration* 51(1): 11-35.
- Bolan, S., R. Naidu, A. Kunhikrishnan, B. Seshadri, Y.S. Ok, T. Palanisami, M. Dong and I. Clark. 2016. Speciation and bioavailability of lead in complementary medicines. *Science of the Total Environment* 539: 304-312.
- Boonamnuayvitaya, V. and N. Khummalai. 2015. Arsenic and Environment. (Online). Available: <https://digital.lib.kmutt.ac.th/magazine/issue2/articles/art2.html> ( June 16, 2023). (in Thai)
- Brigden, K., R. Stringer and D. Santillo. 2002. Heavy metal and radionuclide contamination of fertilizer products and phosphogypsum waste produced by the Lebanese Chemical Company, Lebanon, 2002. Technical Note 13/2002, Greenpeace Research Laboratories, University of Exeter, Exeter. 15 p.
- Cai, L., Z. Xu, M. Ren, Q. Guo, X. Hu, G. Hu, H. Wan and P. Peng. 2012. Source identification of eight hazardous heavy metals in agricultural soils of Huizhou, Guangdong province, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78: 2-8.
- Chandrajith, R., C.B. Dissanayake and H.J. Tobschall. 2005. The abundances of rarer trace elements in paddy (rice) soil of Sri Lanka. *Chemosphere* 58(10): 1415-1420.
- Chizzola, R., H. Michitsch and C. Franz. 2003. Monitoring of metallic micronutrients and heavy metals in herbs, spices and medicinal plants from Austria. *European Food Research and Technology* 216: 407-411.
- Dalenberg, J.W. and W. van Driel. 1990 Contribution of atmospheric deposition to heavy metal concentrations in field crops. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 38: 369-379.

- Davies, B.E. 1995. Lead. pp. 206-223. *In*: B.J. Alloway (ed.). Heavy Metals in Soils. Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability. 3<sup>rd</sup> ed. Blackie Academic and Professional, London. 368 p.
- Department of Mineral Resources. 2018. Arsenic map. (Online). Available: [http://www.dmr.go.th/download/poster/acrobat/as\\_a4.pdf](http://www.dmr.go.th/download/poster/acrobat/as_a4.pdf) (June 23, 2023). (in Thai)
- Dghaim, R., S. Al. Khatib, H. Rasool and M. Ali. Khan. 2015. Determination of heavy metals concentration in traditional herbs commonly consumed in the United Arab Emirates. *Journal of Environmental Public Health* 2015: 973878, doi: 10.1155/2015/973878.
- Harris, E.S.J., S. Cao, B.A. Littlefield, J.A. Craycroft, R. Scholten, T. Kaptchuk, Y. Fu, W. Wang, Y. Liu, H. Chen, Z. Zhao, J. Clardy, A.D. Woolf and D.M. Eisenberg. 2011. Heavy metal and pesticide content in commonly prescribed individual raw Chinese herbal medicines. *Science of the Total Environment* 409(20): 4297-4305.
- Isermann, K. 1970. A method to reduce contamination and uptake of lead by plants from car exhaust gases. *Environmental Pollution* 12(3): 199-203.
- He, Z.Q., D.M. Endale, H.H. Schomberg and M.B. Jenkins. 2009. Total phosphorus, zinc, copper, and manganese concentrations in Cecil soil through 10 years of poultry litter application. *Soil Science* 174(12) :687- 695.
- Jarukamjorn, K. and N. Nemoto. 2008. Pharmacological aspects of *Andrographis paniculata* on health and its major diterpenoid constituent andrographolide. *Journal of Health Sciences* 54(4): 370-381.
- Järup, L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68(1):167-182.
- Jiang, M., F. Sheng, Z. Zhang, X. Ma, T. Gao, C. Fu and P. Li. 2021. *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees and its major constituent andrographolide as potential antiviral agents. *Journal of Ethnopharmacology* 272: 113954, doi:10.1016/j.jep.2021.113954
- Jin, C.W., S.J. Zheng, Y.F. He, G.D. Zhou and Z.X. Zhou. 2005. Lead contamination in the garden soils and factors affecting its bioavailability. *Chemosphere* 59(8): 1151-1159.
- Kabata-Pendias, A. and W. Sadurski. 2004. Trace elements and compounds in soil. pp. 79-99. *In*: E. Merian, M. Anke, M. Ihnat and M. Stoepler (2 eds.). *Elements and their Compounds in the Environment*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Kabata-Pendias, A. 2010. *Trace Elements in Soils and Plants* 4<sup>th</sup> ed. CRC Press, Boca Raton. 548 p.
- Kamal, M.Z.U. and M.Y. Miah. 2022. Arsenic speciation techniques in soil water and plant: an overview. pp. 1 - 32. *In*: M. Stoytcheva and R. Zlatev (eds.). *Arsenic Monitoring, Removal and Remediation*. IntechOpen, London.
- Keshavarzi, B., F. Moore, M. Ansari, M.R. Mehr, H. Kaabi and M. Kermani. 2015. Macronutrients and trace metals in soil and food crops of Isfahan province, Iran. *Environmental Monitoring and Assessment* 187(1): 4113, doi: 10.1007/s10661-014-4113-y.
- Khan, A, S. Khan, M.A. Khan, Z. Qamar and M. Waqas. 2015. The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and

- associated health risk: A review. *Environmental Science and Pollution Research* 22(18): 13772-13799.
- Kim, H.S., B.-H. Seo, J.-S. Bae, W.-I. Kim, G. Owens and K.-R. Kim. 2016. An integrated approach to safer plant production on metal contaminated soils using species selection and chemical immobilization. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 131: 89-95.
- Land Development Department. 2015. State of soil and land resources of Thailand. Research and Development for Land Management Division. Land Development Department, Bangkok. 304 p. (in Thai).
- Land Development Department. 2019. Land use map. (Online). Available: [http://www1.ldd.go.th/web\\_OLP/Lu\\_62/Lu62\\_C/NPT2562.htm](http://www1.ldd.go.th/web_OLP/Lu_62/Lu62_C/NPT2562.htm) (Feb 24, 2022). (in Thai)
- Limmatvapirat, C.T. Phaechamud and J. Charoenteeraboon. 2010. Determination the concentration of heavy metals in Thai herbal plants in family Zingiberaceae using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Final Report. Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom. 86 p. (in Thai)
- Liu, R., S. Li, X. Wang and M. Wang. 2005. Contents of heavy metal in commercial organic fertilizer and organic wastes. *Journal of Agro-environmental Science* 24: 392-397.
- Maiga, A., D. Diallo, R. Bye and B.S. Paulsen. 2005. Determination of some toxic and essential metal ions in medicinal and edible plants from Mali. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6): 2316-2321.
- Maobe, M.A.G, E. Gatebe, L. Gitu and H. Rotich. 2012. Profile of heavy metals in selected medicinal plants used for the treatment of diabetes, malaria and pneumonia in Kisii region, Southwest Kenya. *Global Journal of Pharmacology* 6(3): 245-251.
- Marrugo-Negrete, J., J. Pinedo-Hernández and S. Díez. 2017. Assessment of heavy metal pollution, spatial distribution and origin in agricultural soils along the Sinú River Basin, Colombia. *Environmental Research* 54: 380-388.
- Ministry of Public Health. 2021. Standard criteria, purity or other characteristics that are important to quality for registration of herbal products, inform details or notify. (Online). Available: [https://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2564/E/294/T\\_0006.PDF](https://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2564/E/294/T_0006.PDF) (June 10, 2023). (in Thai).
- Nasradi, T., A. Badacsonyi, N. Nemeth, Z. Tuba and F. Batic. 2004. Zinc, lead and cadmium content in meadow plants and mosses along the M13 motorway (Hungary). *Journal of Atmospheric Chemistry* 49: 593-603.
- National Environment Board. 2021. Notification of the National Environmental Board: Soil quality standard. *The Royal Gazette* 138 (54 d): 20-24. (in Thai)
- National Soil Survey Center. 1996. Soil Survey Laboratory Methods Manual. Soil Survey Investigation No. 42, Version 3. National Soil Survey Center, USDA, Washington, D.C. 735 p.
- Pan, L., J. Ma, Y. Hu, B. Su, G. Fang, Y. Wang, Z. Wang, L. Wang and B. Xiang. 2016. Assessments of levels, potential ecological risk, and human health risk of heavy metals in the soils from a typical county in Shanxi province, China. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 19330-19340.

- Parkpian, P., S.T. Leong, P. Laortanakul and N. Thunthaisong. 2003. Regional monitoring of lead and cadmium contamination in a tropical grazing land site, Thailand. *Environmental Monitoring and Assessment* 85(2): 157-173.
- Ren, Z., R. Xiao, Z. Zhang, X. Lv and X. Fei. 2019. Risk assessment and source identification of heavy metals in agricultural soil: A case study in the coastal city of Zhejiang province, China. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment* 33: 2109-2118.
- Ross, S.M. 1994. *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*. John Wiley & Sons, Chichester. 469 p.
- Rostami, S., H. Kamani, S. Shahsavani and M. Hoseini. 2021. Environmental monitoring and ecological risk assessment of heavy metals in farmland soils. *Human and Ecological Risk Assessment* 27(2): 392-404.
- Sipos, P., T. Nemeth and I. Mohai. 2005. Distribution and possible immobilization of lead in a forest soil (Luvisol) profile. *Environmental Geochemistry and Health* 27(1): 1-10.
- Shi J., X. Yu, M. Zhang, S. Lu, W. Wu, J. Wu and J. Xu. 2011. Potential risks of copper, zinc, and cadmium pollution due to pig manure application in a soil-rice system under intensive farming: A case study of Nanhu, China. *Journal of Environmental Quality* 40(6):1695-1704.
- Singh, J. and A.S. Kalamdhad. 2011. Effects of heavy metals on soil, plants, human health and aquatic life. *International Journal of Research in Chemistry and Environment* 1(2): 15-21.
- Soil Survey Division. 2011. Detailed reconnaissance soil map of provinces in Thailand (scale 1: 100,000). (Online). Available: [http://oss101.idd.go.th/web\\_th\\_soilseries/01\\_central/73\\_NakhonPathom/73\\_prov.htm](http://oss101.idd.go.th/web_th_soilseries/01_central/73_NakhonPathom/73_prov.htm) (Feb 24, 2022). (in Thai)
- Walker, D.J., R. Clemente and M.P. Bernal. 2004. Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. *Chemosphere* 57(3): 215-224.
- WHO. 2007. *WHO Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines with Reference to Contaminants and Residues*. WHO Press, Geneva.
- Wong, S.C., X.D. Li, G. Zhang, S.H. Qi and Y.S. Min. 2002. Heavy metals in agricultural soils of the Pearl River Delta, South China. *Environmental Pollution* 119(1): 33-44.
- Yang, Y., Y. Guangyu and Q. Lin. 2004. Determination of heavy metal ions in Chinese herbal medicine by microwave digestion and RP-HPLC with UV-Vis detection. *Microchimica Acta* 144: 297-302.
- Zarcinas, B.A., B. Cartwright and L.R. Spouncer. 1987. Nitric acid digestion and multi-element analysis of plant material by inductively coupled plasma spectrometry. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 18(1): 131-146.
- Zhang, J., Y. Xu and Y. Wu. 2016. Factors affecting the levels of Pb and Cd heavy metals in contaminated farmland soils. *Advances in Biological Sciences Research* 3: 379-387.
- Zhang, Q., R. Yu, S. Fu, Z. Wu, H.Y.H. Chen and H. Liu. 2019. Spatial heterogeneity of heavy metal contamination in soils and plants in Hefei, China. *Scientific Reports* 9(1): 1049, doi:10.1038/s41598-018-36582-y.



# ผลของแสงแอลอีดีและการกระตุ้นตาดอกด้วยอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนในสตรอว์เบอร์รี่พันธุ์พระราชทาน 80

## Effects of LED Light and Vernalization on Growth and Development, and Hormonal Changes in Strawberry cv. Praratchatan 80

ยศธร เพ็ชรทอง และ ดร.ณิ นภาพรหม\*  
Yossatorn Pechthong and Daruni Naphrom\*

ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

\*Corresponding author: Email: daruni.n@cmu.ac.th

(Received: 3 January 2023; Accepted: 27 June 2023)

**Abstract:** Nowadays, plant factory systems under LED lighting are widely used to grow strawberry due to climate changes, which can lead to decreased productivity. This study aimed to investigate the effects of LED lighting and vernalization on growth, development and hormonal changes in the 'Praratchatan 80' strawberry. Two experiments were conducted. Experiment 1 examined, the effects of LED lighting on runner production, using a completely randomized designed (CRD) with five treatments, including a natural light control and four LED lighting periods (9, 12, 15 and 18 hours per day). The results indicated that the LED lighting periods had no effect on the days to produce runners and leaf width, but 15 and 18 hours LED lighting periods increased the number of runners, daughter plants, petioles, and chlorophyll content compared to other treatments. Meanwhile, a 9 hours LED lighting period resulted in the highest daughter plant height. Experiment 2 investigated the effects of LED lighting and vernalization on flowering and hormonal changes in the strawberry. The experiment design was factorial in completely randomized design of 3 lighting periods (6, 9 and 12 hours per day) and 2 temperature conditions (non vernalization and vernalization at 4 °C for 2 weeks) compared to natural environment (control). The results showed no interaction between the two factors, and a 9 hour LED lighting period and vernalization led faster flowering and greater number of flowers significantly. These treatments also decrease auxin accumulation in the shoot while promoting cytokinins (zeatin and zeatin riboside) biosynthesis and accumulation, ultimately promoting flower induction and development in the strawberry.

**Keywords:** Auxin, cytokinin, flower induction, growth, LED, photoperiodism

**บทคัดย่อ:** ปัจจุบันระบบโรงงานผลิตพืชภายใต้แสงแอลอีดีได้ถูกนำมาใช้ในการปลูกสตรอว์เบอร์รี เนื่องจากประสบปัญหาความแปรปรวนของภูมิอากาศ ซึ่งทำให้ผลผลิตของต้นสตรอว์เบอร์รีลดลง ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาให้แสงแอลอีดีและการกระตุ้นตาออกด้วยอุณหภูมิต่ำต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนในสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 โดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ผลของระยะเวลาให้แสงแอลอีดีต่อการผลิตไหลของสตรอว์เบอร์รี วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 5 กรรมวิธี คือ แสงจากสภาพแวดล้อมธรรมชาติ (กรรมวิธีควบคุม) และการให้แอลอีดีที่จำนวนชั่วโมงต่างกัน 4 กรรมวิธี (9, 12, 15 และ 18 ชั่วโมงต่อวัน) พบว่า ทุกระยะเวลาการให้แสงแอลอีดีไม่มีผลต่อระยะเวลาเกิดไหล และความกว้างใบ แต่กรรมวิธีที่ให้แสงแอลอีดี 15 และ 18 ชั่วโมง ทำให้จำนวนเส้นไหล ต้นไหล ก้านใบ และค่าคลอโรฟิลล์ในใบสูงกว่าทุกกรรมวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เดียวกันการให้แสงแอลอีดี 9 ชั่วโมง ทำให้ต้นไหลมีความสูงมากที่สุด ส่วนการทดลองที่ 2 ผลของระยะเวลาให้แสงแอลอีดีและการชักนำตาออกด้วยอุณหภูมิต่ำต่อการออกดอกและการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนของสตรอว์เบอร์รี วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ คือ ระยะเวลาให้แสงแอลอีดี 3 วิธี (6, 9 และ 12 ชั่วโมงต่อวัน) และการให้สภาพอุณหภูมิต่างกัน 2 วิธี (ไม่กระตุ้นตาออกด้วยอุณหภูมิต่ำและกระตุ้นตาออกด้วยอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์) เปรียบเทียบกับสภาพแวดล้อมธรรมชาติ (กรรมวิธีควบคุม) ผลการทดลองพบว่าทั้งสองปัจจัยไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน กรรมวิธีที่ให้แสงแอลอีดี 9 ชั่วโมง และการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิต่ำ ทำให้ต้นสตรอว์เบอร์รีออกดอกเร็ว และมีจำนวนดอกมากกว่าทุกกรรมวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีดังกล่าวลดการสังเคราะห์และสะสมออกซิน (IAA) ในขณะที่ส่งเสริมการสร้างและสะสมไซโตไคนิน (zeatin และ zeatin riboside) ซึ่งสามารถชักนำการออกดอกและการพัฒนาของต้นสตรอว์เบอร์รีได้

**คำสำคัญ:** ออกซิน ไซโตไคนิน การชักนำการออกดอก การเติบโต แอลอีดี การตอบสนองต่อช่วงแสง

## บทนำ

สตรอว์เบอร์รี (*Fragaria x ananassa* Duch.) เป็นผลไม้เขตร้อนที่สำคัญของประเทศไทย ความต้องการเพื่อบริโภคผลของสตรอว์เบอร์รีทั้งการรับประทานสดและเชิงอุตสาหกรรมการแปรรูปทั้งภายในประเทศและต่างประเทศมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (Boonyakiat and Smitamana, 2003) ซึ่งปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมเป็นองค์ประกอบสำคัญในการผลิตสตรอว์เบอร์รีให้มีคุณภาพสูง ปัจจุบันพื้นที่ปลูกสตรอว์เบอร์รีในประเทศไทยประสบปัญหาความแปรปรวนของภูมิอากาศจากภาวะโลกร้อน ส่งผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะการออกดอกของสตรอว์เบอร์รีที่ต้องการอากาศเย็นในการกระตุ้นตาออก (vernalization) (Ikram *et al.*, 2016) รวมถึงการระบาดของและการเข้าทำลายของโรคและแมลง ส่งผลกระทบต่อการปลูกและการผลิตสตรอว์เบอร์รี ทำให้ผลผลิตลดลงและมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชมากขึ้น (Pipattanawong *et al.*, 2011)

เพื่อป้องกันความเสียหายจากสภาพภูมิอากาศที่แปรปรวน รวมถึงความต้องการในการผลิตสตรอว์เบอร์รีปลอดโรคที่สามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี จึงเริ่มมีความสนใจการปลูกพืชโดยใช้ระบบโรงงานผลิตพืช (plant factory) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีการผลิตพืชในระบบปิดหรือกึ่งปิดที่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยใช้หลอดไฟ light-emitting diode (LED) เป็นแหล่งกำเนิดแสงสำหรับการสังเคราะห์แสง (National Science and Technology Development Agency, 2018) ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา เทคโนโลยีหลอดแอลอีดีได้ถูกเริ่มนำมาเป็นแหล่งกำเนิดแสงสำหรับการเพาะปลูกพืชเพิ่มมากขึ้น โดยความยาวคลื่นแสงสีแดงและสีน้ำเงินของไฟแอลอีดีมักถูกเลือกใช้เพื่อส่งเสริมการสังเคราะห์แสงของพืช (Samuoliené *et al.*, 2010) จากการศึกษาการปลูกสตรอว์เบอร์รีในโรงเรือนพลาสติกโดยใช้แสงแอลอีดีสีแดงร่วมกับสีน้ำเงินเป็นแหล่งกำเนิดแสง พบว่า อัตราส่วนแสงแอลอีดีสีแดงมากกว่าแสงสีน้ำเงิน เช่น อัตราส่วน 7:3 ทำให้มีการ

เจริญเติบโตของต้นและผลผลิตสูงขึ้น (Choi *et al.*, 2015; Hung *et al.*, 2015)

อย่างไรก็ตามลักษณะทางสรีรวิทยาของสตรอว์เบอร์รีในการผลิตไหล และการชักนำการออกดอกอาจต้องการช่วงเวลาที่ได้รับแสง (photoperiod) ที่แตกต่างกัน โดยช่วงแสงที่เป็นสภาพวันยาวทำให้เกิดไหลและมีการเจริญทางกิ่งก้านสูงขึ้น ในทางกลับกันช่วงแสงที่เป็นสภาพวันสั้นสามารถกระตุ้นการออกดอกของต้นสตรอว์เบอร์รีได้ (Sonstebey *et al.*, 2016) การชักนำการออกดอกของพืชถูกควบคุมโดยสมดุลของฮอร์โมนพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน (indole-3-acetic acid, IAA) และกลุ่มไซโตไคนิน (zeatin/zeatin riboside, Z/Zr) ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้ทำงานแตกต่างกันในการชักนำการออกดอก โดยสามารถทำงานร่วมกัน หรือเป็นปฏิปักษ์กัน (Campos-Rivero *et al.*, 2017; Hanke *et al.*, 2007) ในพืชกลุ่มวันสั้นเกิดการออกดอกได้ดีเมื่อบริเวณยอดมีการสะสมฮอร์โมนไซโตไคนิน คือ Z/Zr ปริมาณมาก ในขณะที่กลุ่มออกซิน คือ IAA หากมีปริมาณสูงมีผลยับยั้งการออกดอก (Kang *et al.*, 2017)

การทดลองนี้ จึงศึกษาจำนวนชั่วโมงการให้แสงแอลอีดีที่เหมาะสมต่อการผลิตต้นไหล การกระตุ้นการออกดอก และการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนของต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 ซึ่งองค์ความรู้ทางสรีรวิทยานี้จะมีประโยชน์อย่างมากในการใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน และเป็นแนวทางการพัฒนาในการผลิตสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 โดยใช้ระบบการผลิตแบบโรงงานผลิตพืชต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

การวิจัยครั้งนี้แบ่งเป็นสองการทดลอง ตามระยะของการเจริญเติบโตของสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 ได้แก่ ระยะการผลิตไหล และระยะการออกดอก โดยทดลองปลูกในโรงเรือนปลูกพืชแบบเปิด คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยใช้ตาข่ายสีดำ (สแลนกันแสง 100 เปอร์เซ็นต์) กันเป็นห้องปลูกขนาดความกว้าง 150 เซนติเมตร ความยาว 400

เซนติเมตร ติดตั้งระบบไฟแอลอีดีขนาดความยาว 120 เซนติเมตร จำนวน 4 หลอด ซึ่งให้แสงสีแดงร่วมกับแสงสีน้ำเงิน อัตราส่วน 60 เปอร์เซ็นต์ และ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความยาวคลื่นแสง 638 และ 450 นาโนเมตร ตามลำดับ ติดตั้งหลอดแอลอีดีอยู่สูงขึ้นไปจากปลายยอดพืชประมาณ 35 เซนติเมตร ความเข้มแสงที่ 22,000 ลักซ์ มีค่า photosynthetic photon flux density (PPFD) ที่ 428  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  เริ่มให้แสงแอลอีดีในเวลา 06.00 นาฬิกา ส่วนกรรมวิธีควบคุมได้รับแสงจากสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ ความเข้มแสงที่ 15,000 ลักซ์ มีค่า PPFD ที่ 29  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  ซึ่งมีความยาววันเฉลี่ยเท่ากับ 10.49 ชั่วโมง อุณหภูมิกลางวันเฉลี่ยที่ 35.25 องศาเซลเซียส กลางคืนเฉลี่ยที่ 27.63 องศาเซลเซียส

## การทดลองที่ 1 ผลของระยะเวลาให้แสงแอลอีดีต่อการเกิดไหลและการเติบโตของไหลสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80

คัดเลือกต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุ 16 สัปดาห์ ที่มีความสมบูรณ์ ทำการทดลองปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว โดยใช้ดินผสมขุยมะพร้าวและแกลบดำ ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 โดยปริมาตร เป็นวัสดุปลูก โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 สภาพแวดล้อมจากธรรมชาติในโรงเรือน (กรรมวิธีควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ให้แสงแอลอีดีระยะเวลา 9 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 3 ให้แสงแอลอีดีระยะเวลา 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 4 ให้แสงแอลอีดีระยะเวลา 15 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 5 ให้แสงแอลอีดีระยะเวลา 18 ชั่วโมง

บันทึกการเจริญเติบโตของต้นสตรอว์เบอร์รีทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 40 วัน ได้แก่ ระยะเวลาในการเกิดไหล จำนวนเส้นไหล จำนวนต้นไหล ความสูงต้น จำนวนใบ และขนาดใบของต้นไหล

บันทึกข้อมูลค่าคลอโรฟิลล์ในใบของต้นไหลในวันที่ 40 ด้วยเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์ SPAD-502 มี

หน่วยเป็น SPAD chlorophyll meter reading (SCMR) ซึ่งค่าความเขียวใบเป็นหน่วยใช้เปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์โดยไม่ต้องทำลายตัวอย่างพืช

## การทดลองที่ 2 ผลของระยะเวลาให้แสงแอลอีดีและการชักนำตาตอกด้วยอุณหภูมิต่ำต่อการออกดอกและการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนของสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80

คัดเลือกต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุ 12 สัปดาห์ ที่มีความสมบูรณ์ ทำการทดลองปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว โดยใช้ดินผสมขุยมะพร้าวและแกลบดำในอัตราส่วน 2: 1: 1 โดยปริมาตร เป็นวัสดุปลูก โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design (factorial in CRD)  $(3 \times 2) + 1$  ปัจจัยแรก คือ จำนวนชั่วโมงการให้แสงต่างกัน 3 วิธี และปัจจัยที่ 2 คือ ชักนำตาตอกด้วยอุณหภูมิต่ำก่อนทำการทดลอง มี 2 วิธี ได้แก่ 1) ไม่ได้ชักนำด้วยอุณหภูมิต่ำ (non vernalized) และ 2) ได้รับชักนำด้วยอุณหภูมิต่ำ (vernalized) เปรียบเทียบกับสภาพแวดล้อมธรรมชาติในโรงเรือน ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 สภาพแวดล้อมจากธรรมชาติในโรงเรือน (กรรมวิธีควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ให้แสงแอลอีดีระยะเวลา 6 ชั่วโมงและไม่ได้รับอุณหภูมิต่ำ

กรรมวิธีที่ 3 ให้แสงแอลอีดีระยะเวลา 9 ชั่วโมงและไม่ได้รับอุณหภูมิต่ำ

กรรมวิธีที่ 4 ให้แสงแอลอีดีระยะเวลา 12 ชั่วโมงและไม่ได้รับอุณหภูมิต่ำ

กรรมวิธีที่ 5 ให้แสงแอลอีดีระยะเวลา 6 ชั่วโมงและได้รับอุณหภูมิต่ำ

กรรมวิธีที่ 6 ให้แสงแอลอีดีระยะเวลา 9 ชั่วโมงและได้รับอุณหภูมิต่ำ

กรรมวิธีที่ 7 ให้แสงแอลอีดีระยะเวลา 12 ชั่วโมงและได้รับอุณหภูมิต่ำ

โดยกรรมวิธีที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ (vernalized treatment) นำต้นสตรอว์เบอร์รีเข้าตู้ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (growth chamber) ที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำออกมาปลูกในโรงเรือน

บันทึกการออกดอกของสตรอว์เบอร์รีในวันที่ 0, 14, 21 และ 28 หลังกรรมวิธี ได้แก่ ระยะเวลาในการออกดอก และจำนวนดอก

## การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืช

1. การเก็บตัวอย่าง (plant sampling) โดยเก็บตัวอย่างพืชบริเวณยอดของต้นสตรอว์เบอร์รีในแต่ละกรรมวิธีในวันที่ 0, 14, 21 และ 28 หลังกรรมวิธี จุ่มตัวอย่างพืชในไนโตรเจนเหลวทันทีเพื่อหยุดกระบวนการเมแทบอลิซึมในเนื้อเยื่อพืช จากนั้นทำตัวอย่างให้แห้งโดยใช้ freeze dryer และเก็บรักษาตัวอย่างพืชแห้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

2. การสกัดฮอร์โมนจากเนื้อเยื่อพืชและการทำให้บริสุทธิ์ (extraction and purification) โดยใช้ตัวอย่างพืช 100 มิลลิกรัม เติมนิโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียดเป็นผง และสกัดด้วย 1 มิลลิลิตร 0.5 % formic acid ใน  $H_2O : MeOH (3 : 7, v/v)$  ที่ 4 องศาเซลเซียส สารสกัดถูกแยกโดยการหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเอาของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) สกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง นำ supernatant มารวมกัน จากนั้นระเหยแห้งในเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบสุญญากาศจน MeOH แห้ง เติมน้ำ  $H_2O + 0.5 \% formic acid$  อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สารสกัดถูกแยกโดยการ centrifuge จากนั้นถ่ายเอา supernatant และระเหยแห้ง เตรียม extraction cartridges (Oasis<sup>®</sup> HLB 1 cc [30 mg]) clean up โดยปรับสภาพด้วย 1 มิลลิลิตร 100 % MeOH + 0.1 % formic acid 2 ครั้ง แล้วโหลดสารสกัดผ่าน extraction cartridges ล้างตามด้วย  $H_2O + 0.5 \% formic acid$  ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และชะฮอร์โมนโดยใช้สารละลาย 100 % MeOH + 0.1 % formic acid ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตามด้วย 100 % acetonitrile + 5 % ammonium 600 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้แห้ง สารสกัดถูกละลายซ้ำใน 10 ไมโครลิตร 100 % MeOH + 1 % formic acid และถูกแยกส่วนโดย centrifuge ถ่ายเอา

supernatant เพื่อเข้ากระบวนการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนต่อไป ด้วยเทคนิค LC/MS (liquid chromatography / mass spectrometry) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Agar *et al.* (2006)

3. การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนพืช ได้แก่ zeatin, zeatin riboside และ IAA โดย LC/MS ด้วยเครื่อง Agilent 1260 infinity II แมสสเปกโตรมิเตอร์ ระบบ Agilent Technology 6645 Q-TOF LC/MS การแยก LC ดำเนินการโดยคอลัมน์ Poroshell 120 SB C18 ( 2.1 มิลลิเมตร x 100 มิลลิเมตร 2.7 ไมครอน) การชะใช้ตัวทำละลาย A (0.1 % acetic acid ใน MeOH) และตัวทำละลาย B (0.1 % acetic acid ใน H<sub>2</sub>O) ด้วยโปรแกรมเกรเดียนต์ A/B เชิงเส้นที่ 0 นาที: 10 % A; 4 นาที : 30 % A; 34 นาที : 60 % A; 40 นาที: 100 % A; และคงที่ไว้ 10 นาที อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้หัวฉีด 5 ไมครอลิตร การวิเคราะห์ MS ด้วยแรง Capillary 4500 V และแรงดันแฟกเตอร์ที่ 120 V แรงดันก๊าซแบบฝอยละออง (nebulizer) อยู่ที่ 25 psi อุณหภูมิก๊าซ 300 องศาเซลเซียส อัตราการไหล drying gas ที่ 10 ลิตรต่อนาที โดยดัดแปลงจากวิธีของ Susawaengsup *et al.* (2011)

ทั้งสองการทดลองวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ IBM SPSS Statistics 22 เพื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน และ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกรรมวิธี โดยวิธี least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. การทดลองที่ 1 ผลของระยะเวลาให้แสงแอลอีดีต่อการเกิดไหลและการเติบโตของไหลสตรอว์เบอร์รี่

#### 1.1 ระยะเวลาเกิดไหล จำนวนเส้นไหล และจำนวนต้นไหล

ระยะเวลาเกิดไหลจากการได้รับแสงแอลอีดีที่จำนวนชั่วโมงแตกต่างกัน พบว่า ทุกกรรมวิธีมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยจำนวนวันในการเกิดไหลมีค่าระหว่าง 8.93 ถึง 9.80 วัน (Table 1) การให้แสงแอลอีดีทุกกรรมวิธีในระยะเวลา 20 วัน ทำให้เส้นไหลและต้นไหลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในระยะ 30 และ 40 วัน พบว่าการให้แสงแอลอีดี 15 และ 18 ชั่วโมง ทำให้เกิดจำนวนเส้นไหลและต้นไหลสูงกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ โดยมีจำนวนเส้นไหลเฉลี่ยที่ 7.00 และ 7.27 เส้น จำนวนต้นไหลเฉลี่ยที่ 12.27 และ 12.53 ต้น ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับการให้แสงแอลอีดี 9 และ 12 ชั่วโมง และกรรมวิธีควบคุม ซึ่งให้จำนวนเส้นไหลเฉลี่ยเพียง 4.67, 5.47 และ 4.80 เส้น

Table 1. Days to produce runners after the treatments and chlorophyll contents at 40 days after the treatments

Treatments	Days to produce runners	Chlorophyll contents (SCMR)
1) Natural light (Control)	9.80	38.08c
2) LED 9 hours	9.47	38.89c
3) LED 12 hours	9.26	40.64b
4) LED 15 hours	8.93	42.12a
5) LED 18 hours	9.20	42.32a
CV (%)	8.71	1.63
LSD0.05	ns	*

ns = non significant, \* = means with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ )

SCMR = SPAD Chlorophyll meter reading

(Figure 1A) และจำนวนต้นไหลเฉลี่ยเพียง 8.67, 10.20 และ 8.87 ต้น ตามลำดับ (Figure 1B) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sonstebly *et al.* (2021) ที่พบว่า การผลิตไหลของต้นสตรอว์เบอร์รีเกิดขึ้นตลอดฤดูร้อน ซึ่งมีอุณหภูมิสูง และมีช่วงแสงเป็นสภาพวันยาว ไหลเกิดจากตาที่อยู่โคนใบใหม่ และมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ส่วนการทดลองของ Durner (2015) ได้ให้สภาพวันสั้นกับสตรอว์เบอร์รีสองกลุ่ม คือ กลุ่มพันธุ์ที่ออกดอกในสภาพวันสั้นและกลุ่มพันธุ์ที่ออกดอกในสภาพวันยาว พบว่า สตรอว์เบอร์รีทั้งสองกลุ่ม มีอัตราการเกิดต้นไหลน้อยลงเมื่อได้สภาพวันสั้นที่มากขึ้น แต่จะมีการเกิดต้นไหลและจำนวนใบต่อต้นไหลมากขึ้นเมื่อฟื้นสภาพวันสั้น

## 1.2 ความสูง จำนวนก้านใบ และความกว้างใบของต้นไหล

ความสูงต้นไหลที่ได้รับแสงแอลอีดีระยะเวลา 20 วัน ทุกกรรมวิธีทำให้ต้นสูงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งต่อมาในระยะเวลา 30 ถึง 40 วัน พบว่า กรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่ให้แสงแอลอีดี 9 ชั่วโมง ทำให้ต้นไหลมีความสูงเพิ่มขึ้นโดยมีความสูงเฉลี่ย 12.73 และ 12.92 เซนติเมตร ตามลำดับ มากกว่ากรรมวิธีที่ให้แสงแอลอีดี 12, 15 และ 18 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีความสูงเฉลี่ย 9.95, 10.05 และ 9.87 เซนติเมตร ตามลำดับ (Figure 1C) สอดคล้องกับ Boonyakiat (2020) ที่รายงานว่า ความสูงของต้นพืชเพิ่มมากขึ้นและพยายามโน้มเข้าหาที่มีแสง หากปลูกในสภาพแสงที่ไม่เหมาะสมหรือมีปริมาณแสงไม่เพียงพอต่อการสังเคราะห์แสง ทำให้ต้นพืชมีลักษณะที่ยืดยาว เนื่องจากอิทธิพลของฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซินมีผลผลิตมากที่ปลายยอดพืช ซึ่งด้านที่ได้รับแสงมีปริมาณออกซินน้อยกว่าด้านที่ไม่ได้รับแสง จึงทำให้อัตรการยืดเซลล์ของบริเวณที่ได้รับแสงน้อยกว่าด้านที่ไม่ได้รับแสง ปลายยอดพืชจึงเบนหรือยืดยาวเข้าหาแสง ซึ่งการที่ต้นสตรอว์เบอร์รีมีความสูงมากเกินไปอาจส่งผลทำให้ก้านใบของพืชเกิดการหักหรือเสียหายได้ง่าย (Pipattanawong, 2000) ต้นไหลที่ได้รับแสงแอลอีดีทุกกรรมวิธีในระยะเวลา 20 วัน มีจำนวนก้านใบเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งต่อมา

ในระยะเวลา 30 ถึง 40 วัน พบว่า กรรมวิธีที่ให้แสงแอลอีดี 15 และ 18 ชั่วโมง ทำให้จำนวนก้านใบเพิ่มขึ้นโดยมีจำนวนเฉลี่ย 8.93 และ 9.07 ก้านใบต่อต้นตามลำดับ และยังมี ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ให้แสงแอลอีดี 9, 12 ชั่วโมง และกรรมวิธีควบคุม ซึ่งให้ก้านใบเฉลี่ยเพียง 6.33, 7.60 และ 6.60 ก้านใบต่อต้น ตามลำดับ (Figure 1D) ความกว้างใบของต้นไหลสตรอว์เบอร์รีที่เกิดจากผลของแสงแอลอีดีที่ระยะเวลาต่างกัน ในระยะเวลา 40 วันหลังให้แสง พบว่า ต้นไหลทุกกรรมวิธีมีความกว้างใบเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 4.17 ถึง 4.26 เซนติเมตร (Figure 1E) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Hung *et al.* (2015) ที่พบว่า การให้แสงแอลอีดีสีแดงร่วมกับสีน้ำเงิน อัตราส่วน 7 : 3 เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ส่งเสริมการพัฒนารากและก้านใบของต้นสตรอว์เบอร์รีเพิ่มขึ้น โดยลักษณะทางสรีรวิทยาของสตรอว์เบอร์รีจำเป็นต้องมีสภาพวันยาวเพื่อการเจริญทางลำต้น (vegetative growth) เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Guttridge (1959) พบว่า แสงช่วงวันยาวทำให้ต้นไหลสตรอว์เบอร์รีเจริญเติบโตได้ดี เพิ่มจำนวนก้านใบของต้นไหลและใบใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้รับแสงช่วงวันสั้น

## 1.3 ค่าคลอโรฟิลล์ในใบของต้นไหล

ค่าคลอโรฟิลล์ในใบของต้นไหลหลังจากที่ได้รับแสงแอลอีดีที่ระยะเวลา 40 วัน พบว่า กรรมวิธีที่ให้แสงแอลอีดี 15 และ 18 ชั่วโมง ทำให้ค่าคลอโรฟิลล์ในใบของต้นไหลสูงเฉลี่ย 42.12 และ 42.32 SCMR ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ให้แสงแอลอีดี 9, 12 ชั่วโมง และกรรมวิธีควบคุม ซึ่งมีค่าคลอโรฟิลล์ในใบเฉลี่ยเพียง 38.89, 40.64 และ 38.08 SCMR ตามลำดับ (Table 1) โดยคลอโรฟิลล์ในพืชรับแสงได้ดีที่ความยาวคลื่นประมาณ 420 ถึง 460 นาโนเมตร (ช่วงแสงสีน้ำเงิน) และ 630 ถึง 660 นาโนเมตร (ช่วงแสงสีแดง) (Fan *et al.*, 2013) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Choi *et al.* (2015) พบว่าการใช้แสงแอลอีดีสีแดงร่วมกับสีน้ำเงินที่ระยะเวลา 16 ชั่วโมง ช่วยส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของปริมาณคลอโรฟิลล์

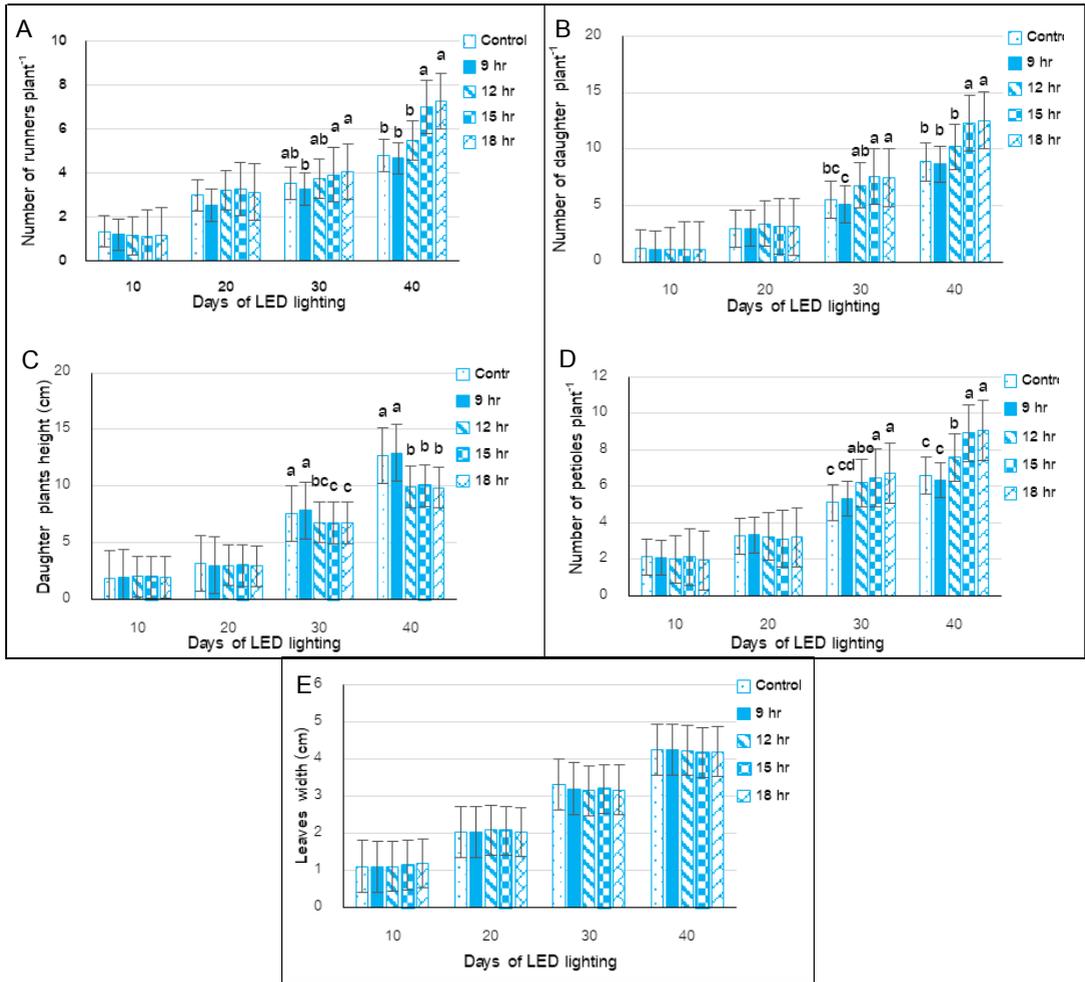


Figure 1. Number of runners (A), number of daughter plants (B), daughter plant height (C), number of petioles (D), and leaf width (E) at different LED lighting periods over 40 days

ในใบสตรอว์เบอร์รี เนื่องจากแสงสีน้ำเงินเป็นช่วงแสงที่มีความยาวคลื่นที่จำเป็นในการพัฒนาของคลอโรพลาสต์ และการสร้างคลอโรฟิลล์ใน thylakoids ในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของพืช (Senger, 1982)

## 2. การทดลองที่ 2 ผลของจำนวนชั่วโมงแสงแอลอีดี และการให้อุณหภูมิต่อการออกดอกและการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนของสตรอว์เบอร์รี

### 2.1 จำนวนวันที่เกิดดอก

จำนวนวันที่เกิดดอกของต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้รับทั้ง 2 ปัจจัย ไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

พบว่า กรรมวิธีที่ให้แสงแอลอีดี 6 ชั่วโมง และ 9 ชั่วโมง ทำให้ต้นสตรอว์เบอร์รีเกิดดอกในจำนวนวันเฉลี่ย 9.97 และ 10.67 วัน ตามลำดับ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ให้แสงตามธรรมชาติ (กรรมวิธีควบคุม) และกรรมวิธีที่ให้แสงแอลอีดี 12 ชั่วโมง โดยทำให้พืชเกิดดอกในจำนวนวันเฉลี่ย 13.13 วัน และ 11.90 วัน ตามลำดับ (Figure 2A) ส่วนกรรมวิธีที่ต้นสตรอว์เบอร์รีได้รับการชักนำตาออกด้วยอุณหภูมิต่ำกว่าก่อนปลูก ทำให้ต้นสตรอว์เบอร์รีเกิดดอกในจำนวนวันเฉลี่ย 9.80 วัน ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ไม่ได้ชักนำตาออกด้วยอุณหภูมิต่ำ

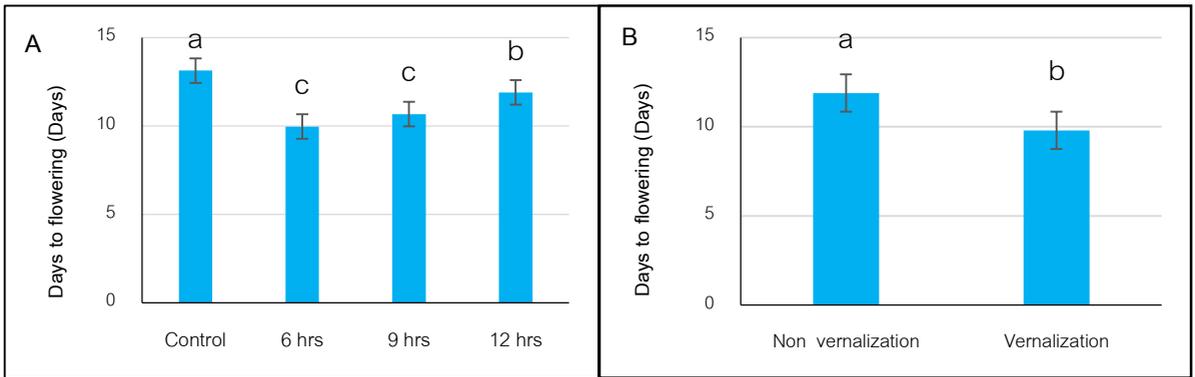


Figure 2. Days to flowering of strawberry as affected by LED lighting periods (A) and temperature conditions (B) after the treatments

โดยทำให้พืชเกิดดอกในจำนวนวันเฉลี่ย 11.89 วัน (Figure 2B) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Gallace and Lieten (2021) และ Rivero *et al.* (2021) ที่พบว่า ลักษณะทางสรีรวิทยาของสตรอว์เบอร์รี่ในการสร้างตา-ดอกจำเป็นต้องมีผลมาจากทั้งช่วงแสงของสภาพวันสั้น และการสะสมอุณหภูมิต่ำเพื่อชักนำการออกดอก (vernalization) ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ (vernalized state) มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ-สังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) แป้ง และน้ำตาล ตลอดจนการส่งสัญญาณของฮอร์โมนพืช (plant hormone signal transduction) ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดดอกและการพัฒนาของดอก (Shen *et al.* 2016) การวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า สามารถชักนำให้สตรอว์เบอร์รี่เกิดดอกเร็วขึ้นได้ภายใต้ทั้งในช่วงแสงวันสั้นและได้รับการสะสมอุณหภูมิต่ำ โดยทั่วไปแล้วต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส (Bradford *et al.*, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ikram *et al.* (2016) ที่พบว่า การนำต้นสตรอว์เบอร์รี่ไปไว้ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส เพื่อสะสมจำนวนชั่วโมงที่ได้รับอุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 15 วัน สามารถทำให้ต้นสตรอว์เบอร์รี่เกิดการออกดอกได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการให้แสงวันสั้นที่ 10 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลา 30 วัน สามารถกระตุ้นการออกดอกของต้นสตรอว์เบอร์รี่ได้เช่นกัน (Sonstebly *et al.*, 2016)

## 2.2 จำนวนการเกิดดอก

จำนวนการเกิดดอกของต้นสตรอว์เบอร์รี่ที่

ได้รับทั้ง 2 ปัจจัย ไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) โดยพบว่า ในระยะ 28 วัน กรรมวิธีที่ให้แสงแอลอีดี 9 ชั่วโมง ทำให้พืชเกิดจำนวนดอกต่อต้นเฉลี่ย 9.1 ดอก ซึ่งมีแนวโน้มจำนวนการเกิดดอกมากกว่าทุกกรรมวิธี โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (Figure 3A) ส่วนกรรมวิธีที่ได้รับอุณหภูมิต่ำทำให้ต้นสตรอว์เบอร์รี่มีจำนวนดอกต่อต้นเฉลี่ย 9.22 ดอก ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ได้รับสภาพอุณหภูมิตามธรรมชาติ โดยทำให้พืชมีจำนวนดอกต่อต้นเฉลี่ยเพียง 5.53 ดอก (Figure 3B) เนื่องจากการได้รับอุณหภูมิต่ำหรือสภาพวันสั้นทำให้ต้นสตรอว์เบอร์รี่เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อบริเวณ vegetative primordia ไปเป็น floral primordia มากขึ้น ซึ่งส่งผลช่วยเพิ่มการออกดอกของต้นสตรอว์เบอร์รี่ (Butare, 2020) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ledesma *et al.* (2008) ที่พบว่าในสภาพวันสั้นต้นสตรอว์เบอร์รี่ที่ได้รับอุณหภูมิต่ำมีจำนวนการดอกต่อต้นมากกว่าต้นสตรอว์เบอร์รี่ที่ได้รับอุณหภูมิสูง

## 3. ปริมาณฮอร์โมนภายในพืช

### 3.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ zeatin และ zeatin riboside

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ zeatin และ zeatin riboside เป็นไปในทิศทางเดียวกัน และสอดคล้องกับการเกิดดอกของต้นสตรอว์เบอร์รี่ โดยพบว่า ในวันที่ 0

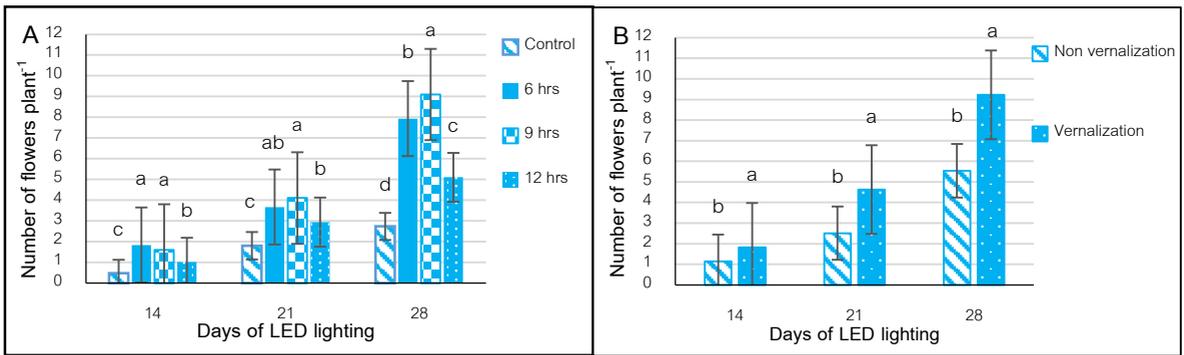


Figure 3. Number of flowers of strawberry as affected by LED lighting period (A) and temperature conditions (B)

ของทุกกรรมวิธี ปริมาณ zeatin อยู่ในระดับต่ำมากและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากนั้นช่วงเวลาระหว่างวันที่ 14 ถึง 28 พบว่า การให้แสงแอลอีดี 6 ชั่วโมง และ 9 ชั่วโมง ทำให้พืชมีปริมาณ zeatin เพิ่มขึ้นมากกว่าทุกกรรมวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เริ่มตั้งแต่วันที่ 14 และเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 28 โดยทั้งสองกรรมวิธีทำให้พืชมีปริมาณ zeatin สูงเฉลี่ย 4.21 และ 4.16 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Figure 4A) การชักนำตาดอกด้วยอุณหภูมิต่ำทำให้ปริมาณ zeatin เพิ่มขึ้นในวันที่ 21 ถึง 28 ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับการไม่ได้ชักนำตาดอกด้วยอุณหภูมิต่ำ (Figure 4B) เช่นเดียวกับกับปริมาณ zeatin riboside พบว่า ในวันที่ 0 ของทุกกรรมวิธีอยู่ในระดับต่ำมากและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากนั้นช่วงเวลาระหว่างวันที่ 14 ถึง 28 พบว่า การให้แสงแอลอีดี 6 ชั่วโมง และ 9 ชั่วโมง ทำให้พืชมีปริมาณ zeatin riboside เพิ่มขึ้นมากกว่าทุกกรรมวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจากการให้แสง 28 วัน ทั้งสองกรรมวิธีทำให้พืชมีปริมาณ zeatin riboside สูงเฉลี่ย 3.53 และ 3.50 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Figure 4C)

ส่วนกรรมวิธีชักนำตาดอกด้วยอุณหภูมิต่ำทำให้ปริมาณ zeatin riboside เพิ่มขึ้นในวันที่ 21 ถึง 28 ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ไม่ได้ชักนำตาดอกก่อน (Figure 4D) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hegele *et al.* (2004) ที่พบว่า ไฮโดโคติน

มีปริมาณต่ำในระยะที่พืชมีการเจริญทางกิ่งก้านเมื่อเทียบกับระยะการเกิดดอก โดยสารในกลุ่มไซโตโคตินมีผลในการกระตุ้นการสร้างตาดอกและชักนำการเกิดดอก เทียบกับระยะการเกิดดอก โดยสารในกลุ่มไซโตโคตินมีผลในการกระตุ้นการสร้างตาดอกและชักนำการเกิดดอก อีกทั้งมีรายงานในลำไย พบว่า การให้อุณหภูมิต่ำเพื่อชักนำตาดอกทำให้ไซโตโคตินในรูปไอโซเพนทีนิลอะดีนีนและไอโซเพนทีนิลอะดีโนซีน ( $N^6(\Delta^2$  - isopentenyl) adenine/  $N^6(\Delta^2$  - isopentenyl) adenosine; iP/iPA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ Z/Zr ส่งจากใบผ่านทางท่อลำเลียงอาหาร (phloem) ไปยังยอดเพื่อกระตุ้นการสร้างตาดอก (Sringsarm *et al.*, 2009)

### 3.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิน (IAA)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ IAA มีการลดลงต่อเนื่องในทุกกรรมวิธี ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 28 จากการให้แสง โดยพบว่า ในวันที่ 0 ปริมาณ IAA ของทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากนั้นในวันที่ 14 ถึงวันที่ 28 จากการให้แสง พบว่า กรรมวิธีการให้แสงธรรมชาติ (กรรมวิธีควบคุม) และกรรมวิธีที่ให้แสงแอลอีดี 12 ชั่วโมง มีแนวโน้มทำให้พืชมีปริมาณ IAA มากกว่าทุกกรรมวิธี โดยในวันที่ 28 จากการให้แสงทั้งสองกรรมวิธีทำให้พืชมีปริมาณ IAA เท่ากับ 16.29 และ 15.22 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Figure 4E) ซึ่งมากกว่าทุกกรรมวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนปัจจัยการชักนำตาดอกด้วยอุณหภูมิต่ำตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 28 พืชมีปริมาณ IAA ลดลงต่อเนื่องในทุกกรรมวิธี โดยในวันที่ 14 ถึงวันที่ 28 พบว่า กรรมวิธี

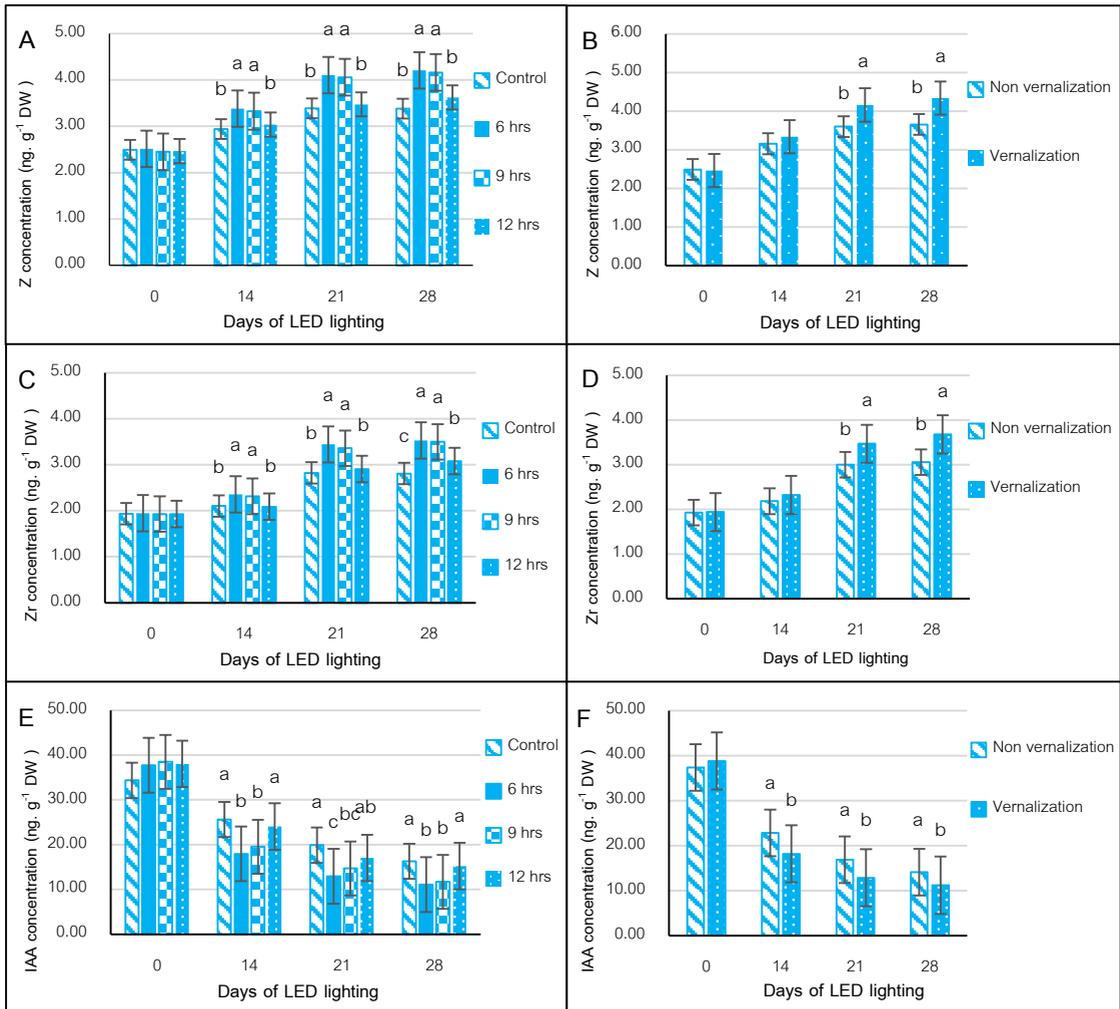


Figure 4. Changes of zeatin, zeatin riboside and IAA concentration in shoot as affected by LED lighting period (A, C, E) and temperature conditions (B, D, F)

ที่ได้รับสภาพอุณหภูมิตามธรรมชาติมีแนวโน้มทำให้พืชมีปริมาณ IAA มากกว่าพืชที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ ในวันที่ 28 พืชที่ได้รับสภาพอุณหภูมิตามธรรมชาติมีปริมาณ IAA เท่ากับ 14.11 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีที่พืชได้รับอุณหภูมิต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่มีปริมาณ IAA เพียง 11.22 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากการรายงานของ Potchanasin *et al.* (2009) พบว่า การให้อุณหภูมิต่ำทำให้ระดับ IAA ลดลงอย่างต่อเนื่องในยอดของต้นลำไย นอกจากนี้ในพืชกลุ่มวันสั้นพบว่า เกิดการออกดอกได้ดีเมื่อบริเวณยอด-

สะสมฮอร์โมนไซโตไคนิน คือ สารกลุ่ม zeatin และ zeatin riboside จำนวนมาก ในขณะที่กลุ่มออกซินหากมีปริมาณสูงมีผลยับยั้งการออกดอกได้ดีเมื่อบริเวณยอดสะสมฮอร์โมนไซโตไคนิน คือ สารกลุ่ม zeatin และ zeatin riboside จำนวนมาก ในขณะที่กลุ่มออกซินหากมีปริมาณสูงมีผลยับยั้งการออกดอก (Kang *et al.*, 2017) เนื่องจากในช่วงตาดอกกำลังพัฒนาไซโตไคนินมีปริมาณสูงขึ้นส่วนออกซินและระดับ DNA methylation ลดลง ส่งผลให้การทำงานของ miR 167 เพิ่มขึ้น มีผลไปควบคุมการแสดงออกของปัจจัยการตอบสนองของออกซิน

(auxin response factors) ARF 6 และ ARF 8 ลดลง (Campos-Rivero *et al.*, 2017)

## สรุป

การให้แสงแอลอีดีที่ระยะเวลาต่าง ๆ ไม่มีผลต่อระยะเวลาเกิดไหลและความกว้างใบของต้นไหลสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 แต่การให้แสงแอลอีดีระยะเวลา 15 ชั่วโมง และ 18 ชั่วโมง ทำให้จำนวนเส้นไหล จำนวนต้นไหล จำนวนก้านใบ และค่าคลอโรฟิลล์ในใบของต้นไหลมากกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ นอกจากนี้ การให้แสงแอลอีดี 9 ชั่วโมง และการกระตุ้นตาอดอกด้วยอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส (vernalization) เป็นเวลา 2 สัปดาห์สามารถชักนำการออกดอกและการพัฒนาของดอกของต้นสตรอว์เบอร์รีได้ โดยกรรมวิธีดังกล่าวสามารถลดการสังเคราะห์และสะสมออกซิน (IAA) ในขณะที่ส่งเสริมการสร้างและสะสมไซโตไคนิน (zeatin และ zeatin riboside) ในยอด ซึ่งสามารถชักนำการออกดอกและการพัฒนาของต้นสตรอว์เบอร์รีให้เกิดขึ้นและมีจำนวนดอกมากที่สุด

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 สำหรับใช้ในงานทดลอง ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

Agar, G., M. Turker, P. Battal and M.E. Erez. 2006. Phytohormone levels in germinating seeds of *Zea mays* L. exposed to selenium and aflatoxins. *Ecotoxicology* 15(5): 443-450.

Boonyakiat, D. 2020. Plant Physiology. Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai. 292 p. (in Thai)

Boonyakiat, D. and P. Smitamana. 2003. Strawberry. Final Report. National Science and Technology Development Agency, Bangkok. 48 p. (in Thai)

Bradford, E., J.F. Hancock and R.M. Warner. 2010. Interactions of temperature and photoperiod determine expression of repeat flowering in strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135(2): 102-107.

Butare, D. 2020. Effect of temperature on plant growth and yield in ever-bearing strawberry *Fragaria x ananassa*, cv. Florentina. M.S. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. 34 p.

Campos-Rivero, G., P. Osorio-Montalvo, R. Sánchez-Borges, R. Us-Camas, F. Duarte-Aké and C. De-la-Peña. 2017. Plant hormone signaling in flowering: An epigenetic point of view. *Journal of Plant Physiology* 214: 16-27.

Choi, H.G., B.Y. Moon and N.J. Kang. 2015. Effects of LED light on the production of strawberry during cultivation in a plastic greenhouse and in a growth chamber. *Scientia Horticulturae* 189: 22-31.

Durner, E.F. 2015. Photoperiod affects floral ontogeny in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plug plants. *Scientia Horticulturae* 194: 154-159.

Fan, X., J. Zang, Z. Xu, S. Guo, X. Jiao, X. Liu and Y. Gao. 2013. Effects of different light quality on growth, chlorophyll concentration and chlorophyll biosynthesis precursors of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 35(9): 2721-2726.

- Gallace, N. and P. Lieten. 2021. Winter manipulation of photoperiod and chill to enhance the perpetual flowering nature of 'Soprano'. *Acta Horticulturae* 1309: 333-340.
- Guttridge, C.G. 1959. Evidence for a flower inhibitor and vegetative growth promoter in the strawberry. *Annals of Botany* 23(90): 351-360.
- Hanke, M.V., H. Flachowsky, A. Peil and C. Hattasch. 2007. No flower no fruit-Genetic potentials to trigger flowering in fruit trees. *Genes, Genomes and Genomics* 1(1): 1-20.
- Hegele, M., D. Naphrom, P. Manochai, A. Chattrakul, P. Srumsiri and F. Bangerth. 2004. Effect of leaf age on the response of flower induction and related hormonal changes in longan trees after  $KClO_3$  treatment. *Acta Horticulturae* 653: 41-49.
- Hung, C.D., C.-H. Hong, H.-B. Jung, S.-K. Kim, N.V. Ket, M.-W. Nam, D.-H. Choi and H.-I. Lee. 2015. Growth and morphogenesis of encapsulated strawberry shoot tips under mixed LEDs. *Scientia Horticulturae* 194: 194-200.
- Ikram, S., K.M. Qureshi and N. Khalid. 2016. Flowering and fruiting responses of strawberry to growth hormone and chilling grown under tunnel conditions. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 53(4): 911-916.
- Kang, J., Y. Lee, H. Sakakibara and E. Martinoia. 2017. Opinion cytokinin transporters: Go and stop in signaling. *Trends in Plant Science* 22(6): 455-461.
- Ledesma, N.A., M. Nakata and N. Sugiyama. 2008. Effect of high temperature stress on the reproductive growth of strawberry cvs. 'Nyoho' and 'Toyonoka'. *Scientia Horticulturae* 116: 186-193.
- National Science and Technology Development Agency. 2018. Plant factory. (Online). Available: [https://www.nstda.or.th/home/performance\\_post/plant-factory](https://www.nstda.or.th/home/performance_post/plant-factory) (March 15, 2022). (in Thai)
- Pipattanawong, N. 2000. Strawberry: New Economic Crops. Kasetsart University Press, Bangkok. 158 p. (in Thai)
- Pipattanawong, N., W. Tacha, B. Thongyeon and S. Tiwong. 2011. Strawberry cv. Phrachatan 80. *Kasetsart Extension Journal* 56(1): 22-28. (in Thai)
- Potchanasin, P., K. Sringarm, P. Srumsiri and K.F. Bangerth. 2009. Floral induction (FI) in longan (*Dimocarpus longan*, Lour.) trees: Part I. Low temperature and potassium chlorate effects on FI and hormonal changes exerted in terminal buds and sub-apical tissue. *Scientia Horticulturae* 122: 288-294.
- Rivero, R., S.F. Remberg, O.M. Heide and A. Sønsteby. 2021. Environmental regulation of dormancy, flowering and runnering in two genetically distant everbearing strawberry cultivars. *Scientia Horticulturae* 290: 110515, doi: 10.1016/j.scienta.2021.110515.
- Samuolienė, G., A. Brazaitytė, A. Urbonavičiūtė, G. Šabajevienė and P. Duchovskis. 2010. The effect of red and blue light component on the growth and development of frigo strawberries. *Zemdirbyste-Agriculture* 97(2): 99-104.
- Senger, H. 1982. The effect of blue light on plants and microorganisms. *Photochemistry and Photobiology* 35(6): 911-920.

- Shen, J., Q. Xiao, H. Qiu, C. Chen and H. Chen. 2016. Integrative effect of drought and low temperature on litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) floral initiation revealed by dynamic genome-wide transcriptome analysis. *Scientific Reports* 6: 32005, doi: 10.1038/srep32005.
- Sønsteby, A., K.A. Solhaug and O.M. Heide. 2016. Functional growth analysis of 'Sonata' strawberry plants grown under controlled temperature and daylength conditions. *Scientia Horticulturae* 211: 26-33.
- Sønsteby, A., T.L. Woznicki and O.M. Heide. 2021. Effects of runner removal and partial defoliation on the growth and yield performance of 'Favori' everbearing strawberry plants. *Horticulturae* 7(8): 215, doi: 10.3390/horticulturae7080215.
- Sringarm, K., P. Potchanasin, D. Naphrom and K.F. Bangerth. 2009. Floral induction (FI) in longan (*Dimocarpus longan*, Lour.) trees – The possible participation of endogenous hormones: II. Low temperature and potassium chlorate effects on hormone concentrations in and their export out of leaves. *Scientia Horticulturae* 122: 295-300.
- Susawaengsup, C., M. Rayanakorn, S. Wongpornchai and S. Wangkam. 2011. Investigation of plant hormone level changes in shoot tips of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) treated with potassium chlorate by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta* 85(2): 897-905.
-



# สารสกัดด้วยน้ำจากวัชพืชเถาเลื้อยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงและภาวะอ้วน

## Aqueous Extracts from Climbing Weeds with Antioxidants and Inhibitory Activities of Enzymes Related to Hyperglycemia and Obesity

จำเนียร ชมภู\* บุญขวัญ คิตสม วราภรณ์ ทิพย์โกศลวงศ์ และ มนสิชา คำทองแก้ว  
Jamnian Chompo\*, Boonkhwan Kidsom, Waraporn Tipkasonwong and Monsicha Kumkongkeaw

ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,

Kamphaeng Campus,

Nakhon Pathom 73140, Thailand

\*Corresponding author: Email: agrjnc@ku.ac.th

(Received: 9 January 2023; Accepted: 27 July 2023)

**Abstract:** Nowadays, some weeds are used as medicinal plants, because they contain phytochemicals that have been reported to have therapeutic effects on the human body. The aim of this study was to investigate the effects of water extracts from leaves of 9 climbing weeds including *Passiflora foetida* L., *Oxystelma esculentum* (L.f.) Sm., *Ipomoea pes-tigridis* L., *Cardiospermum halicacabum* L., *Coccinia grandis* (L.) Voigt, *Centrosema pubescens* Benth., *Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urban, *Momordica charantia* L. and *Ipomoea gracilis* R.Br. on antioxidant properties (viz. DPPH, ABTS, NO radical scavenging and ox-LDL) and to determine the inhibitory activities on hyperglycemia- (viz.  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase) and obesity-related enzymes (viz. pancreatic lipase and 15-lipoxygenase). The results showed that the water extract from leaves of *P. foetida*, *C. pubescens*, *M. charantia* and *C. halicacabum* had the best antioxidant efficacy on DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, NO<sup>•</sup> and ox-LDL, respectively. Moreover, the extracts of all weeds showed a high ABTS<sup>•+</sup> inhibitory effect of more than 79 %. In the case of inhibiting hyperglycemia- and obesity-related enzymatic activities, the water extract from leaves of *C. grandis* presented a high effect on inhibiting  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase activities, while the water extract of *C. halicacabum* had a strong inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase. These results suggested that local weeds such as *C. grandis*, *C. halicacabum*, *P. foetida*, *C. pubescens* and *M. charantia* can be processed into food or herbal drinks. The identification of phytochemicals in the water extracts from leaves of these weeds need to be further conducted.

**Keywords:** *Passiflora foetida*, *Cardiospermum halicacabum*, *Coccinia grandis*, *Momordica charantia*

**บทคัดย่อ:** ปัจจุบันวิถีชีวิตบางชนิดได้รับความสนใจนำมาใช้ประโยชน์เป็นพืชสมุนไพร เนื่องจากมีสารพฤกษเคมีที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์รักษาความผิดปกติของร่างกายมนุษย์ได้ การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยน้ำจากใบพืชพืชเถาเลื้อย จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ กะทกรก กระพังกะหม ขยี้มตีนหมา โคนกระอ่อม ตำลึง ถั่วเซนโตร ถั่วเซอร่าใต้ มะระขี้นก และสะอึก ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา DPPH, ABTS, NO radical scavenging และ LDL oxidation และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (ได้แก่  $\alpha$ -amylase และ  $\alpha$ -glucosidase) และภาวะอ้วน (ได้แก่ pancreatic lipase และ 15-lipoxygenase) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากใบกะทกรก ถั่วเซนโตร มะระขี้นก และโคนกระอ่อมมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, NO<sup>•</sup> และ ox-LDL ได้สูงที่สุด ตามลำดับ นอกจากนี้ สารสกัดด้วยน้ำจากใบพืชพืชเถาชนิดยังแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระของ ABTS<sup>•+</sup> ได้มากกว่า 79 เปอร์เซ็นต์ ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะน้ำตาลในเลือดสูงและภาวะอ้วนนั้น สารสกัดด้วยน้ำจากใบของตำลึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase และ pancreatic lipase ได้สูง ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำจากใบโคนกระอ่อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ได้สูง จากผลการทดลองวิถีพืชท้องถิ่น เช่น ตำลึง โคนกระอ่อม กะทกรก ถั่วเซนโตร และมะระขี้นก สามารถนำมาแปรรูปเพื่อประกอบอาหารหรือเครื่องดื่มสมุนไพรได้ ทั้งนี้จะทำการศึกษารวบรวมชนิดของสารพฤกษเคมีในสารสกัดด้วยน้ำจากพืชดังกล่าวต่อไป

**คำสำคัญ:** กะทกรก โคนกระอ่อม ตำลึง มะระขี้นก

## บทนำ

โรคอ้วน (obesity) เกิดขึ้นเมื่อร่างกายมีการสะสมไขมันมากเกินไปกว่าปกติ เป็นผลมาจากร่างกายได้รับอาหารเกินกว่าที่จะเผาผลาญได้ จึงสะสมไว้ในรูปไขมันในอวัยวะต่าง ๆ เป็นปัญหาสุขภาพของมนุษย์มาช้านาน โดยที่ Finkelstein *et al.* (2012) ได้ทำการรวบรวมข้อมูลและคาดการณ์ว่า ในปี พ.ศ. 2573 ประชากรโลกจะประสบปัญหาจากภาวะโรคอ้วน คิดเป็น 51 เปอร์เซ็นต์ของประชากรโลก ซึ่งอาจเป็นโรคอ้วนที่ไม่รุนแรงประมาณ 42 เปอร์เซ็นต์ และมีอาการรุนแรง 11 เปอร์เซ็นต์ ความอ้วนไม่เพียงแต่ส่งผลให้เกิดปัญหาด้านความงามเท่านั้น ยังเป็นสาเหตุปัญหาทางจิตใจและสังคม นอกจากนี้ โรคอ้วนยังเป็นปัจจัยเสี่ยงสำหรับโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคหัวใจ ความดันโลหิตสูง ไขมันในเลือดสูง เบาหวาน และมะเร็ง (Bjerregaard *et al.*, 2018) ความอ้วนเกิดที่เซลล์ไขมัน (adipocytes) พร้อมกับเซลล์อื่น ๆ เนื่องจากความไม่สมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาร่วมระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชันและปฏิกิริยารีดักชันที่มีการให้และรับอิเล็กตรอน มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดและสะสมอนุมูลอิสระ reactive oxygen

species (ROS) นอกจากนี้ low-density lipoprotein (LDL) ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วยอนุมูลอิสระเกิดเป็น oxidized-LDL (ox-LDL) ก็เป็นสาเหตุของความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับโรคอ้วน โดยในร่างกายของคนอ้วนมักเกิด ox-LDL สูง ดังนั้นการกำจัดอนุมูลอิสระจึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยต้านโรคอ้วนได้ ส่วนการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยและการดูดซึมคาร์โบไฮเดรตและไขมันในอาหาร สามารถช่วยให้น้ำหนักตัวลดลง (Garza *et al.*, 2011) นอกจากนี้ เอนไซม์ 15-lipoxygenase (15-LOX) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวพบมากในเนื้อเยื่อไขมันได้ผิวหนังช่องท้อง การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้จึงเป็นอีกช่องทางหนึ่งที่เหมาะสมในการรักษาโรคอ้วน (Sadeghian and Jabbari, 2016) ส่วนเอนไซม์ pancreatic lipase เป็นเอนไซม์หลักในระบบทางเดินอาหาร ทำหน้าที่ย่อยอาหารและดูดซึมไขมันในอาหาร มีรายงานเกี่ยวข้องกับภาวะที่เกิดจากการเผาผลาญอาหารของร่างกายที่ผิดปกติ (metabolic syndrome) ทำให้เกิดภาวะอ้วนลงพุง ความดันโลหิตสูง ไขมันในเลือดสูง และเบาหวาน (Yakaiah *et al.*, 2021) สำหรับเอนไซม์  $\alpha$ -amylase

และ  $\alpha$ -glucosidase เกี่ยวข้องกับภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) โดยที่เอนไซม์  $\alpha$ -amylase ในน้ำลายและตับอ่อนเป็นเอนไซม์เริ่มแรกในกระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรต ด้วยการไฮโดรไลซิส 1,4-glycosidic linkages ของ polysaccharides (แป้ง และไกลโคเจน) ได้เป็น disaccharides หลังจากนั้นถูกย่อยด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ได้เป็น monosaccharides นำไปสู่ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hara and Honda, 1990; Matsui *et al.*, 2007) การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase และ  $\alpha$ -glucosidase ส่งผลให้การดูดซึมคาร์โบไฮเดรตจากลำไส้เล็กถูกยับยั้ง ซึ่งการชะลอการดูดซึมคาร์โบไฮเดรตช่วยลดการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดภายหลังรับประทานอาหารในเวลากลางวัน (Kajaria *et al.*, 2013)

แนวคิดในการนำส่วนประกอบหรือส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพรไทยมาใช้เป็นยารักษาโรคต่าง ๆ หรือบำรุงร่างกาย จากการศึกษาของ Phumthum *et al.* (2019) ได้รวบรวมข้อมูลชนิดของพืชที่มีรายงานนำมาใช้เป็นสมุนไพรในประเทศไทย จากผลงานตีพิมพ์ในช่วงปี พ.ศ. 2534 - 2557 จำนวน 64 บทความ พบว่า มีพืชทั้งหมด 2,187 ชนิด จาก 19 วงศ์ ที่มีสรรพคุณทางยาและถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพร โดยพืชสมุนไพรที่สำคัญอยู่ในวงศ์ Asteraceae, Leguminosae, Rutaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Solanaceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae, Araliaceae และ Anacardiaceae โดยทั่วไปพืชผักมักถูกมองว่าเป็นพืชที่เจริญเติบโตรบกวนพืชปลูก ดังนั้น พืชซึ่งถูกละเลยและถูกกำจัดออกจากระบบนิเวศเกษตร เนื่องจากมีผลกระทบต่อผลผลิตพืชทำให้ปริมาณและคุณภาพผลผลิตพืชปลูกลดลง แต่ในปัจจุบันพบว่า พืชบางชนิดเป็นแหล่งยาสมุนไพรที่ได้รับการยอมรับ เนื่องจากมีสารพฤกษเคมีทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ alkaloids, flavonoids, phenols, terpenes และ saponin ที่มีฤทธิ์ในการรักษาความผิดปกติของร่างกาย และได้รับความพึงพอใจสูง เนื่องจากเข้าถึงได้ง่าย และราคาถูก (Hassan, 2020) การรับประทานอาหารเป็นยาเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ส่งเสริมภูมิคุ้มกันในร่างกายและช่วยลดความเสี่ยงหรือป้องกันการเกิดโรคได้ โดยทั่วไปการประกอบอาหารอาจใช้เป็นผักสด ลวก

ดอง ต้ม ผัด หรือใช้เป็นเครื่องปรุงอาหาร การนำพืชสมุนไพรมาต้มเป็นวิธีที่ใช้ได้ทั้งสมุนไพรแห้งและสด ซึ่งสารสกัดจากการต้มสามารถนำมาใช้ได้ทันที เหมาะสำหรับพืชที่มีสารสำคัญที่สามารถละลายน้ำและทนต่อความร้อนได้เป็นอย่างดี สำหรับข้อเสียของการสกัดด้วยการต้ม คือ สารสำคัญไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน และมักเกิดการเน่าเสีย (Neelapong *et al.*, 2019)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมี ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะน้ำตาลในเลือดสูงและภาวะอ้วนของสารสกัดด้วยน้ำจากใบพืชเถาเลื้อย เพื่อเป็นข้อมูลในการนำพืชมาใช้ประโยชน์พัฒนาเป็นยาสมุนไพรป้องกันโรคในอนาคต และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชจากเดิมที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายหรือต้นทุนในการกำจัดออกจากพื้นที่เพาะปลูกพืช

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดด้วยน้ำจากใบของพืช

เก็บตัวอย่างใบของพืชเถาเลื้อยบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ กะทกรก (*Passiflora foetida* L.) กระพังก ( *Oxystelma esculentum* (L.f.) Sm.) ขยุมตีนหมา (*Ipomoea pes-tigris* L.) โคนกระออม (*Cardiospermum halicacabum* L.) ตำลึง (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) ถั่วเซนโตร (*Centrosema pubescens* Benth.) ถั่วเซอวาใต้ (*Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urban) มะระขี้นก (*Momordica charantia* L.) และ สะอึก (*Ipomoea gracilis* R.Br.) (Figure 1) นำพืชตัวอย่างมาตรวจพิสูจน์ชนิดพืชเปรียบเทียบกับหนังสือพืชในประเทศไทย (Suwanagul and Suwanketnikom, 2002) และ Major Weeds in Thailand (Noda *et al.*, 1994) ล้างให้สะอาด ใส่ตะกร้าไปผึ่งในที่ร่มให้แห้งผัด นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กและบดให้ละเอียดด้วยโกรบดยา แล้วนำตัวอย่างที่บดละเอียดไปต้มในน้ำให้เดือดอัตราส่วนพืชต่อน้ำ 1 : 20 กรัมต่อมิลลิลิตร (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษ

ก

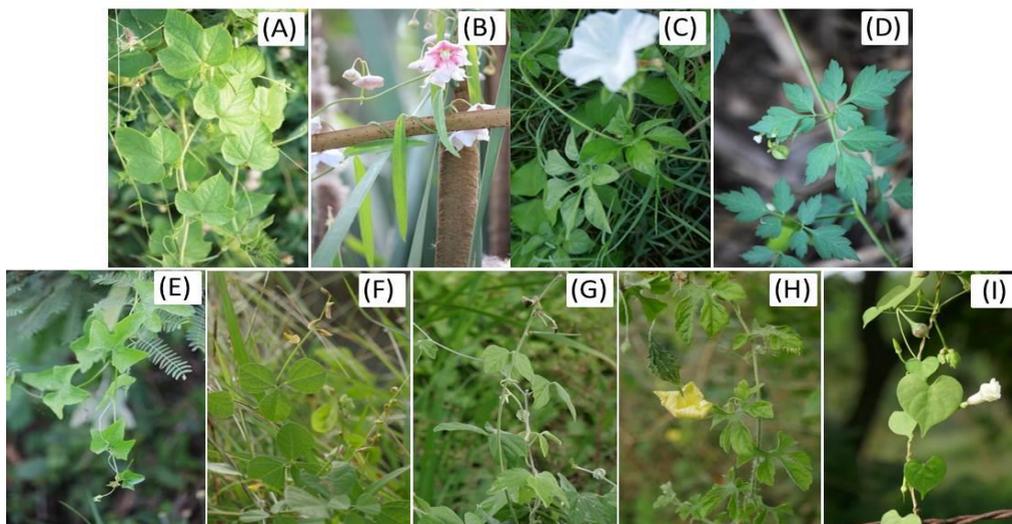


Figure 1. Characteristics of weeds in this study including *Passiflora foetida* L. (A), *Oxystelma esculentum* (L.f.) Sm. (B), *Ipomoea pes-tigridis* L. (C), *Cardiospermum halicacabum* L. (D), *Coccinia grandis* (L.) Voigt (E), *Centrosema pubescens* Benth. (F), *Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urban (G), *Momordica charantia* L. (H) and *Ipomoea gracilis* R.Br. (I).

Whatman No. 1 ได้เป็นสารสกัดด้วยน้ำจากใบของ  
วัชพืช แล้วเจือจางสารสกัดด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น  
500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## 2. วิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมี

### 2.1 ปริมาณ total flavonoids

วิเคราะห์ตามวิธีการของ Zhishen *et al.* (1999) นำสารสกัดด้วยน้ำจากใบวัชพืช ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate หลังจากนั้นเติมสารละลาย aluminium chloride (ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (รุ่น Multiskan Go บริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา) คำนวณปริมาณ total flavonoids จากกราฟมาตรฐานของ rutin equivalent (RUE) (บริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา) เมื่อ  $Y = 0.0316X + 0.078$  ( $R^2 = 0.998$ ) มีหน่วยเป็น mg RUE/g fresh sample (FW)

### 2.2 ปริมาณ total phenolics

วิเคราะห์ตามวิธีของ Siddhuraju and Becker (2003) นำสารสกัดด้วยน้ำจากใบวัชพืช ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate เติมน้ำ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม Folin-Ciocalteu's reagent (บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี) (อัตราส่วน 1:1; reagent: water) และสารละลาย sodium carbonate (ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 50 และ 80 ไมโครลิตร ตามลำดับ เขย่าสารละลายให้เข้ากัน นำไปบ่มไว้ในที่มืด นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณปริมาณ total phenolic จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid equivalent (GAE) (บริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา) เมื่อ  $Y = 0.0014X + 0.067$  ( $R^2 = 0.996$ ) มีหน่วยเป็น mg GAE/g fresh sample (FW)

### 3. ทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

#### 3.1 ปฏิกริยา DPPH radical scavenging

วิเคราะห์ตามวิธีของ Boskou *et al.* (2006) นำสารสกัดด้วยน้ำจากใบวชิช หรือชุดควบคุม (น้ำกลั่น) หรือ positive control (butylated hydroxyl toluene; BHT) (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงใน 96-well plate เติมน้ำกลั่นละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) (ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และสารละลาย sodium acetate (pH 5.5, ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระตามสมการ (1)

#### 3.2 ปฏิกริยา ABTS radical scavenging

วิเคราะห์ตามวิธีของ Hsu *et al.* (2011) เตรียมสารละลาย 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) กับ potassium persulfate (ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์) ด้วย phosphate buffer (0.1 โมลาร์, pH 7.4) นำไปไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 16 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกริยา oxidation อย่างสมบูรณ์ ได้เป็น  $ABTS^{\bullet+}$  เจือจางสารละลายด้วย phosphate buffer และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง  $0.700 \pm 0.050$  ใส่สารสกัดตัวอย่าง หรือน้ำกลั่น หรือ BHT ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในสารผสม  $ABTS^{\bullet+}$  ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระตามสมการ (1)

#### 3.3 ปฏิกริยา nitric oxide radical scavenging

วิเคราะห์ตามวิธีของ Pandey *et al.* (2005) นำสารละลายผสมของ sodium nitroprusside (ความ-

เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กับ phosphate-buffered saline ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารสกัดจากตัวอย่างวชิช หรือน้ำกลั่น หรือ BHT ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นละลาย sulfanilic acid (ความเข้มข้น 0.33 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน 20 เปอร์เซ็นต์ ของ glacial acetic acid) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เติมน้ำกลั่นละลาย *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระตามสมการ (1)

#### 3.4 ปฏิกริยา LDL oxidation

วิเคราะห์ตามวิธีการของ Rattan and Arad (1998) และ Steinbrecher *et al.* (1984) นำตัวอย่างสารสกัดของวชิช หรือน้ำกลั่น หรือ positive control (quercetin) (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) ผสมกับสารละลาย low density lipoprotein (LDL) (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) (ความเข้มข้น 222 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลาย copper (II) sulfate (ความเข้มข้น 55 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มสารผสมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกริยาด้วย ethylenediaminetetraacetic acid (ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์) 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจาก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปฏิกริยา oxidation ของ LDL ด้วยการเติมน้ำกลั่นผสมของ thiobarbituric acid (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) (ความเข้มข้น 0.67 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับ trichloroacetic acid (บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี) (ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ

25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายใส่ส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร เปรียบเทียบปฏิกิริยากับกราฟมาตรฐานของ malonyldialdehyde (MDA) (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) เมื่อ  $Y = 0.0425X + 0.1201$  ( $R^2 = 0.998$ ) มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมของ MDA หลังจากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระตามสมการ (1)

#### 4. ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะน้ำตาลในเลือดสูง

##### 4.1 กิจกรรมของเอนไซม์ $\alpha$ -amylase

วิเคราะห์ตามวิธีการของ Kwon *et al.* (2006) เติมน้ำตาลละลาย sodium phosphate buffer (pH 6.9 ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่มีส่วนผสมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase จาก *Bacillus sp.* (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) (ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในสารสกัดด้วยน้ำจากวัชพืชหรือน้ำกลั่นหรือ positive control (catechin) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำสารละลายตัวอย่างไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 10 นาที ใส่สารละลายแป้ง (ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์) วางไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย dinitrosalicylic acid ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ต้มเดือดสารละลายตัวอย่างใน water bath นาน 5 นาที แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ตามสมการ (1)

##### 4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ $\alpha$ -glucosidase

วิเคราะห์ตามวิธีการของ Ahmad *et al.* (2011) นำสารสกัดด้วยน้ำจากวัชพืช หรือน้ำกลั่น หรือ positive control (catechin) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลายเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase จาก *Saccharomyces cerevisiae* (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

(ความเข้มข้น 0.0073 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ใน sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่มีส่วนผสมของ NaCl) วางสารผสมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำตาลละลาย *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucoside (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) (pH 6.8 ความเข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ตามสมการ (1)

#### 5. ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะอ้วน

##### 5.1 กิจกรรมของเอนไซม์ pancreatic lipase

วิเคราะห์ตามวิธีการของ Kim *et al.* (2007) นำสารละลายผสมเอนไซม์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ porcine pancreatic lipase (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) 10 ยูนิต ในสารละลายผสม MOPS 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1.0 มิลลิโมลาร์ ปรับค่า pH ให้ได้ 6.8) เติมน้ำใน Tris buffer (ที่มีส่วนผสมของ Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ และ  $CaCl_2$  5 มิลลิโมลาร์ ปรับค่า pH ให้ได้ 7.0) ปริมาตร 850 ไมโครลิตร หลังจากนั้นใส่สารสกัดด้วยน้ำจากวัชพืช หรือน้ำกลั่น หรือ positive control (curcumin) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำสารผสมไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมน้ำตาลละลาย substrate (*p*-nitrophenyl butyrate (บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) 10 มิลลิโมลาร์ ใน dimethyl formamide) หลังจากนั้นนำสารผสมไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อีกครั้ง นาน 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร และคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ตามสมการ (1)

##### 5.2 กิจกรรมของเอนไซม์ 15-lipoxygenase (15-LOX)

วิเคราะห์ตามวิธีการของ Lyckander and Malterud (1996) นำสารสกัดด้วยน้ำจากวัชพืช หรือน้ำกลั่น หรือ positive control (caffeic acid) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมน้ำในสารละลายเอนไซม์ 15-

lipoxigenase จากถั่วเหลือง (บริษัท Cayman Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา) ความเข้มข้น 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ที่ละลายใน borate buffer (pH 9.0) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์) ปริมาตร 480 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลาย linoleic acid ความเข้มข้น 134 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำสารผสมบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร และคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ตามสมการ (1)

คำนวณประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ จากสูตรดังนี้

การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระหรือกิจกรรมของเอนไซม์ (เปอร์เซ็นต์) =  $\frac{(A_{\text{ชุดควบคุม}} - A_{\text{ตัวอย่าง}})}{A_{\text{ชุดควบคุม}}} \times 100$  ...สมการ (1)

เมื่อ  $A_{\text{ชุดควบคุม}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล (80 เปอร์เซ็นต์)

$A_{\text{ตัวอย่าง}}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง หรือ positive control

## 6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) จำนวน 8 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan's new multiple rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P < 0.05$ ) โดยใช้โปรแกรม SPSS for window version 15.0 (บริษัท SPSS Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา)

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

### ปริมาณสารพฤกษเคมี

จากการวิเคราะห์ปริมาณ total flavonoids ในสารสกัดด้วยน้ำจากใบพืชเถาเลื้อย 9 ชนิด (Table 1) พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากถั่วเซอราโตมีปริมาณของสารนี้มากที่สุด เท่ากับ  $395.72 \pm 16.47$  mg RUE/g FW แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น

รองลงมาคือ สารสกัดจากมะระขี้นก ชุ่มตีนหมา และกระพังโหม เท่ากับ  $317.94 \pm 13.69$ ,  $299.59 \pm 17.45$  และ  $286.02 \pm 18.66$  mg RUE/ g FW ตามลำดับ ส่วนปริมาณ total phenolics ในสารสกัดด้วยน้ำจากใบของพืชเถาเลื้อย 9 ชนิด (Table 1) พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากถั่วเซอราโตและชุ่มตีนหมา มีปริมาณ total phenolics สูงที่สุด แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ  $325.03 \pm 9.78$  และ  $323.56 \pm 9.31$  mg GAE/ g FW ตามลำดับ รองลงมา คือ สารสกัดด้วยน้ำจากกระพังโหม กะทกรก และสะอึก มีปริมาณเท่ากับ  $256.72 \pm 25.58$ ,  $240.25 \pm 4.99$  และ  $238.53 \pm 18.39$  mg GAE/ g FW ตามลำดับ ฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่สุดในพืช มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี พบได้ในผักและผลไม้ เป็นสารที่ได้รับความสนใจในการศึกษาสรรพคุณทางด้านเภสัชวิทยามากมาย มีรายงานว่า สารกลุ่มนี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ป้องกันการเกิดการกลายพันธุ์ และต้านมะเร็ง (Kumar and Goel, 2019) ส่วน flavonoids เป็นสารประกอบ phenolics ประเภท polyphenol มีโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนแอโรมาติก (aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) รวมอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สามารถละลายในน้ำได้ มักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบ glycosides เป็นสารธรรมชาติซึ่งเป็นที่รู้จักและนิยมนำมาใช้รักษาสุขภาพ มีความสำคัญมากทางด้านการศึกษา เป็นยารักษาโรคและนำมาทำเป็นเครื่องสำอางหลากหลาย โดยมีรายงานว่าสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านโรคเบาหวาน ต้านการก่อมะเร็ง และยับยั้งการกลายพันธุ์ด้วยการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (Panche *et al.*, 2016)

### ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยน้ำจากใบของพืชเถาเลื้อย 9 ชนิด ด้วยปฏิกิริยา DPPH radical scavenging (Figure 2A) พบว่า สารสกัดจากใบกะทกรก สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> ได้สูงที่สุด เท่ากับ  $66.34 \pm 1.09$  เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติเมื่อ

Table 1. The amounts of phytochemicals in water extracts from leaves of 9 climbing weeds

Weed species	Total flavonoids	Total phenolics
	(mg RUE/ g FW) <sup>1</sup>	(mg GAE/ g FW) <sup>1</sup>
<i>Passiflora foetida</i> L.	107.17 ± 6.94 <sup>d</sup>	240.25 ± 4.99 <sup>b</sup>
<i>Oxystelma esculentum</i> (L.f.) Sm.	286.02 ± 18.66 <sup>b</sup>	256.72 ± 25.58 <sup>b</sup>
<i>Ipomoea pes-tigridis</i> L.	299.59 ± 17.45 <sup>b</sup>	323.56 ± 9.31 <sup>a</sup>
<i>Cardiospermum halicacabum</i> L.	208.47 ± 8.12 <sup>c</sup>	100.69 ± 6.44 <sup>d</sup>
<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt	96.56 ± 2.69 <sup>d</sup>	105.34 ± 4.98 <sup>d</sup>
<i>Centrosema pubescens</i> Benth.	196.16 ± 10.9 <sup>c</sup>	325.03 ± 9.78 <sup>a</sup>
<i>Macroptilium atropurpureum</i> (DC.) Urban	395.72 ± 16.47 <sup>a</sup>	148.00 ± 4.75 <sup>c</sup>
<i>Momordica charantia</i> L.	317.94 ± 13.69 <sup>b</sup>	174.78 ± 17.89 <sup>bc</sup>
<i>Ipomoea gracilis</i> R.Br.	138.27 ± 8.02 <sup>cd</sup>	238.53 ± 18.39 <sup>b</sup>
C.V. (%)	40.05	45.62

The data represent mean ± standard deviation of eight replication. Values followed by the same letters within each column are not significantly different according to DMRT ( $P < 0.05$ )

เปรียบเทียบกับสารสกัดจากพืชอื่น รองลงมาคือ สารสกัดจากใบโคกกระออม กระพังโหม และถั่วเซอราใต้ เท่ากับ  $57.24 \pm 3.01$ ,  $54.60 \pm 3.38$  และ  $50.00 \pm 0.75$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยา ABTS radical scavenging (Figure 2B) พบว่า สารสกัดจากใบของพืชเถาเลื้อยทั้ง 9 ชนิด มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> สูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ในช่วง 79 - 90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา NO radical scavenging (Figure 2C) พบว่า สารสกัดจากมะระขี้นกมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ NO ได้สูงที่สุด เท่ากับ  $43.21 \pm 2.05$  เปอร์เซ็นต์ โดยที่สารสกัดจากใบพืชเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> และ NO<sup>•</sup> ต่ำกว่า positive control คือ BHT ซึ่งสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้  $86.35 \pm 6.35$ ,  $93.96 \pm 3.96$  และ  $79.25 \pm 4.24$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยา oxidation ของ LDL (ox-LDL) (Figure 2D) พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากโคกกระออม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา ox-LDL

ได้สูงที่สุด โดยสามารถยับยั้งปฏิกิริยา ox-LDL ได้  $30.5 \pm 5.14$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำกว่า quercetin ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยานี้ได้  $90.25 \pm 1.25$  เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาของ Asir *et al.* (2014) พบว่า สารสกัดจากกะทกรกมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงและมีความสัมพันธ์กับปริมาณ o-diphenol และ catechin ที่พบในสารสกัด ส่วน Bendini *et al.* (2006) รายงานว่า การบริโภคใบกะทกรกสดสามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระและป้องกันการเกิดออกซิเจนเป็นพิษในคนที่ เป็นโรคเบาหวาน ส่วน Kubola and Siriamornpun (2008) พบว่า สารสกัดจากใบมะระขี้นกมีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา DPPH<sup>•</sup> radical scavenging และ ferric reducing power โดยมีสารประกอบ phenolics ได้แก่ caffeic acid และ catechin เป็นส่วนประกอบทางเคมี สำหรับ Sudharameshwari *et al.* (2018) รายงานว่า สารสกัดด้วยน้ำจากใบโคกกระออมมีองค์ประกอบของสาร alkaloids, tannins, terpenoids, flavonoids, phenol และ ascorbic acid ดังนั้นสารสกัดจากใบโคกกระออมจึงสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ดี

สารสกัดด้วยน้ำจากวัชพืชเถาเลื้อยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงและภาวะอ้วน

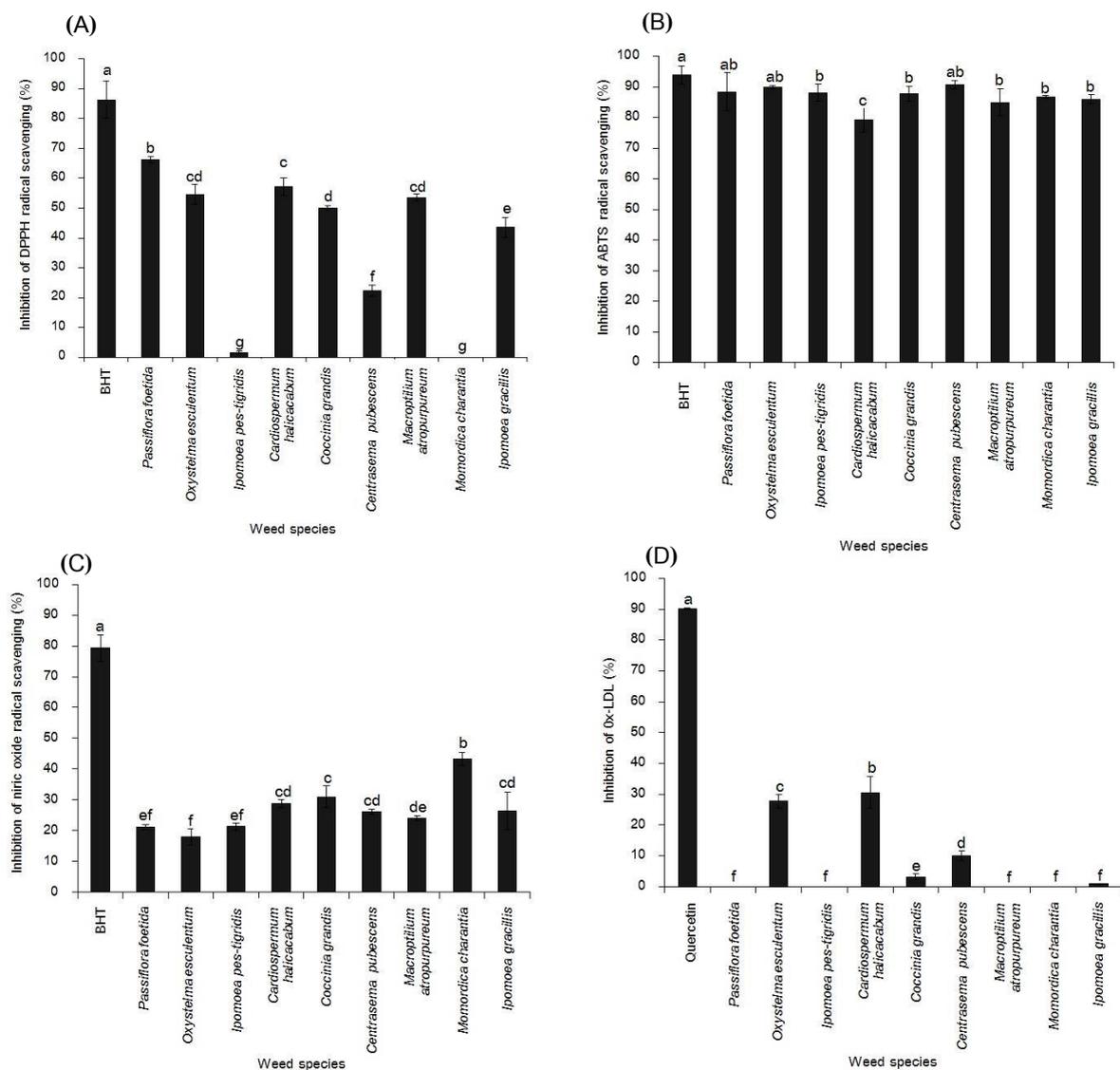


Figure 2. Inhibitory effects of water extract from leaves of 9 climbing weeds and positive controls at concentration of 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on DPPH (A), ABTS (B), NO (C) radical scavenging and oxidation of LDL (D). Values followed by different letters are significantly different with DMRT,  $n=8$ ,  $P < 0.05$ .

ฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงและภาวะอ้วน

จากการทดสอบผลของสารสกัดด้วยน้ำจากใบของวัชพืชเถาเลื้อยต่อกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase (Figure 3A) พบว่า สารสกัดจากใบของวัชพืชส่วนใหญ่

ที่ใช้ในการทดลองไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ยกเว้นสารสกัดจากใบของถั่วเซนไดร ถั่วเซอราใต้ และโคกกระออม ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ได้ในระดับต่ำ เท่ากับ  $7.38 \pm 1.13$ ,  $9.43 \pm 0.87$  และ  $14.75 \pm 2.40$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ส่วนผลของสารสกัดจากวัชพืชเถาเลื้อยในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase (Figure 3B) พบว่า สารสกัดจากวัชพืชเถาเลื้อยทั้งหมดในการทดลองนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ได้ โดยที่สารสกัดจากใบของตำลึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ได้สูงที่สุด เท่ากับ  $62.14 \pm 9.78$  เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบของวัชพืชชนิดอื่น รองลงมาคือ สารสกัดจากใบขมิ้นดินหมาและสะอึก เท่ากับ  $50.77 \pm 5.41$  และ  $45.80 \pm 2.45$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสารสกัดจากใบของวัชพืชดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase และ  $\alpha$ -glucosidase ต่ำกว่า catechin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง  $78.52 \pm 3.52$  และ  $92.10 \pm 2.10$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับ 9 ชนิด ต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ pancreatic lipase (Figure 3C) พบว่า สารสกัดจากใบของวัชพืชเถาเลื้อยสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ pancreatic lipase ได้ดีที่สุด เท่ากับ  $19.93 \pm 1.68$  เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบถั่วเซนโตร

โคกกระออม และถั่วเซอราดา ซึ่งสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นี้ได้เพียง  $9.46 \pm 0.79$ ,  $6.49 \pm 1.23$  และ  $4.46 \pm 0.90$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่สารสกัดจากใบวัชพืชมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่า curcumin ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ pancreatic lipase ได้  $92.53 \pm 2.53$  เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารสกัดจากใบกะทกรก กระพังโหม ขี้กาแดง ขมิ้นดินหมา มะระขี้นก และสะอึก ไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบวัชพืชเถาเลื้อย 9 ชนิด ต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ 15 - lipoxygenase พบว่า สารสกัดจากใบของวัชพืชที่นำมาศึกษาครั้งนี้ไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว (ไม่แสดงข้อมูล)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นได้ว่า สารสกัดจากใบโคกกระออมสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ได้สูง ส่วนสารสกัดจากใบตำลึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase และ pancreatic lipase ได้สูง ซึ่งจากรายงานของ Menichini *et al.* (2014) พบว่า น้ำคั้นสดจากใบโคกกระออมสามารถรักษาอาการหอบหืดและ

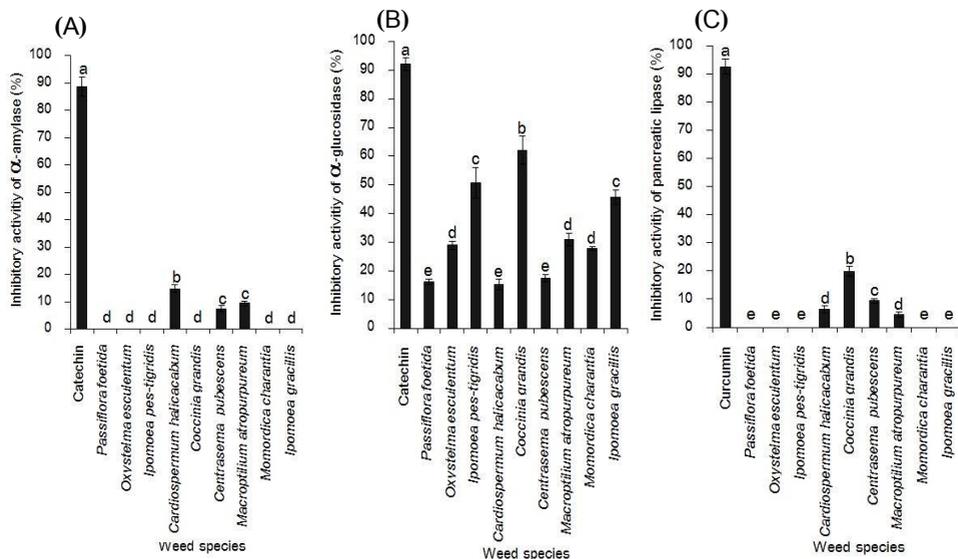


Figure 3. Inhibitory activities of water extract from leaves of 9 climbing weeds and positive controls at concentration of 500  $\mu$ g/ mL on  $\alpha$ -amylase (A),  $\alpha$ -glucosidase (B) and pancreatic lipase (C). Values followed by different letters are significantly different with DMRT, n=8,  $P < 0.05$ .

ยังมีประสิทธิภาพลดความอ้วนได้อีกด้วย โดยสารพฤกษเคมีที่พบในใบโคกกระออม ได้แก่ flavones, aglycones, triterpenoids และ glycosides นอกจากนี้ Annadurai *et al.* (2013) รายงานว่า สารสกัดด้วยน้ำจากใบโคกกระอ้อมมีสารประกอบ tannins, flavonoids, terpenoids และ cardiac glycoside ซึ่ง Vinodhini *et al.* (2015) พบว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ของ *Tragia involucrate* น่าจะเกิดจากสารพฤกษเคมีที่สำคัญ คือ steroids และ terpenoids ส่วน Khan *et al.* (2014) รายงานว่า *Melia azedarach* มีฤทธิ์ในการต้านโรคเบาหวาน เนื่องจากมีสาร tannins และ terpenoids เป็นองค์ประกอบหลัก โดยที่สาร tannins ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ด้วยการจับกับคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน สำหรับ Capasso *et al.* (1992) พบว่า สาร cardiac glycoside สามารถป้องกันระดับน้ำตาลในเลือดสูงได้ สำหรับสารสำคัญที่พบในสารสกัดด้วยน้ำจากใบของตำลึง มักพบสาร caffeic acid และ *p*-coumaric acid ซึ่งมีรายงานว่า สารที่พบในใบตำลึงและมีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ได้แก่  $\beta$ -sitosterol, botulin, saponins, flavonoids และ caffeic acid โดย Pulbutr *et al.* (2017) พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากใบตำลึงมีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase และ  $\alpha$ -glucosidase มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $8.08 \pm 0.72$  และ  $77.66 \pm 9.16$   $\mu$ g/mL ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดจากใบตำลึงยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ pancreatic lipase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการไฮโดรไลซิส triacylglycerols เปลี่ยนเป็น fatty acid และ diacylglycerols ทำให้เกิดการสะสมไขมันส่วนเกินในหลอดเลือด จากรายงานของ Likitdacharote and Chaicharoenpong (2015) พบว่า สาร  $\beta$ -sitosterol มีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ pancreatic lipase มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 82.56 mg/mL ส่วน Martinez-Gonzalez *et al.* (2017) พบว่า สาร caffeic acid สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ pancreatic lipase โดยเข้าจับกับพันธะไฮโดรเจนและเกิดแรงดึงระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำในโครงสร้างทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้

## สรุป

ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยน้ำจากใบของพืชเถาเลื้อยที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าแตกต่างกันโดยสารสกัดจากใบกระทกรก ถั่วเซนโตร มะระขี้นก และโคกกระอ้อมมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา DPPH, ABTS, NO radical scavenging และ ox-LDL ตามลำดับ นอกจากนี้ สารสกัดจากใบของพืชทุกชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา ABTS ได้สูงกว่าปฏิกิริยาอื่น ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วนนั้น สารสกัดจากใบตำลึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase และ pancreatic lipase ได้สูงที่สุด และสารสกัดจากใบโคกกระอ้อมมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ได้สูงที่สุด

## เอกสารอ้างอิง

- Ahmad, R., H.M. Hashim, Z.M. Noor, N.H. Ismail, F. Salim, N.H. Lajis and K. Shaari. 2011. Antioxidant and antidiabetic potential of Malaysian *Uncaria*. Research Journal of Medicinal Plant 5: 587-595.
- Annadurai, A., V. Elangovan, S. Velmurugan and R. Ravikumar. 2013. Preliminary phytochemical screening and antibacterial of *Cardiospermum halicacabum* L. Advances in Applied Science Research 4(5): 302-308.
- Asir, P.J., S. Priyanga, S. Hemmalakshmi and K. Devaki. 2014. *In vitro* free radical scavenging activity and secondary metabolites in *Passiflora foetida* L. Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care 6(2): 3-11.
- Bendini, A., L. Cerretani, L. Pizzolante, T.G. Toschi, F. Guzzo, S. Ceoldo, A.M. Marconi, F. Andretta and M. Levi. 2006. Phenolcontent related to antioxidant and antimicrobial activities of

- Passiflora* spp. extracts. European Food Research and Technology 223(1): 102-109.
- Bjerregaard, L.G, B.W Jensen, L. Ängquist, M. Osler, T.I.A. Sørensen and J.L. Baker. 2018. Change in overweight from childhood to early adulthood and risk of type 2 diabetes. The New England Journal of Medicine 378: 1302-1312.
- Boskou, G., F.N. Salta, S. Chrysostomou, A. Mylona, A. Chiou and N.K. Andrikopoulos. 2006. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. Food Chemistry 94(4): 558-564.
- Capasso, J.M., E.M. Puntillo, B.R. Halpryn, G.I. Olivetti, P.E. Li and P.I. Anversa. 1992. Amelioration of effects of hypertension and diabetes on myocardium by cardiac glycoside. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 262(3): 734-742.
- Finkelstein, E.A., O.A. Khavjou, H. Thompson, J.G. Trogon, L. Pan, B. Sherry and W. Dietz. 2012. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. American Journal of Preventive Medicine 42(6): 563-570.
- Garza, A.L., F.I. Milagro, N. Boque, J. Campión and J.A. Martínez. 2011. Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment. Planta Medica 77(8): 773-785.
- Hara, Y. and M. Honda. 1990. The inhibition of  $\alpha$ -amylase by tea polyphenol. Agricultural and Biological Chemistry 54(8): 1939-1945.
- Hassan, S. 2020. Positive aspects of weeds as herbal remedies and medicinal plants. Journal of Research in Weed Science 3(1): 57-70.
- Hsu, C.F., H. Peng, C. Basle, J. Travas-Sejdic and P.A. Kilmartin. 2011. ABTS<sup>+</sup> scavenging activity of polypyrrole, polyaniline and poly (3,4- ethylenedioxythiophene) . Polymer International 60(1): 69-77.
- Kajaria, D.R., J. Tripathi, Y.B. Tripathi and S. Tiwari. 2013. *In-vitro*  $\alpha$  amylase and glucosidase inhibitory effect of ethanolic extract of antiasthmatic drug-*Shirishadi*. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research 4(4): 206-210.
- Khan, M.F., A.K. Rawat, B. Pawar, S. Gautam, A.K. Srivastava and D.S. Negi. 2014. Bioactivity-guided chemical analysis of *Melia azedarach* L. (Meliaceae), displaying antidiabetic activity. Fitoterapia 98: 98-103.
- Kim, J.H., H.J. Kim, H.W. Park, S.H. Youn, D-Y. Choi and C.S. Shin. 2007. Development of inhibitors against lipase and alpha- glucosidase from derivatives of monascus pigment. FEMS Microbiology Letters 276(1): 93-98.
- Kubola, J. and S. Siriamornpun. 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. Food Chemistry 110(4): 881-890.
- Kumar, N. and N. Goel. 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. Biotechnology Reports 24: e00370, doi: 10.1016/j.btre. 2019.e00370.
- Kwon, Y.-I., H.-D. Jang and K. Shetty. 2006. Evaluation of *Rhodiola crenulata* and *Rhodiola rosea* for management of type II diabetes and hypertension. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 15(3): 425-432.
- Likitdacharote, P. and C. Chaicharoenpong. 2015. Chemical constituents and lipase

- inhibitory activity of *Solanum torvum* fruit. pp. 1035-1042. *In: Proceeding of the Burapha University International Conference, Bangsaen, Chonburi, Thailand.*
- Lyckander, I.M. and K.E. Malterud. 1996. Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 54(4): 239-246.
- Martinez-Gonzalez, A.I., E. Alvarez-Parrilla, Á.G. Díaz-Sánchez, L.A. de la Rosa, J.A. Núñez-Gastélum, A.A. Vazquez-Flores and G.A. Gonzalez-Aguilar. 2017. *In vitro* inhibition of pancreatic lipase by polyphenols: A kinetic, fluorescence spectroscopy and molecular docking study. *Food Technology and Biotechnology* 55(4): 519-530.
- Matsui, T., T. Tanaka, S. Tamura, A. Toshima, K. Tamaya, Y. Miyata, K. Tanaka and K. Matsumoto. 2007.  $\alpha$ -glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(1): 99-105.
- Menichini, F., L. Losi, M. Bonesi, A. Pugliese, M.R. Loizzo and R. Tundis. 2014. Chemical profiling and *in vitro* biological effects of *Cardiospermum halicacabum* L. (Sapindaceae) aerial parts and seeds for applications in neurodegenerative disorders. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 29(5): 677-685.
- Neelapong, W., B. Phonyotin and W. Sittikijyothin. 2019. Extraction of active compounds from Thai herb: Power and extract. *The Journal of King Mongkut's University of Technology North Bangkok* 29(1): 157-166. (in Thai)
- Noda, K., M. Teerawatsakul, C. Prakongvongs and L. Chaiwiratnukul. 1994. Major Weeds in Thailand. 3<sup>rd</sup> ed. Mass & Medias Co., LTD., Bangkok. 164 p.
- Panche, A.N., A.D. Diwan and S.R. Chandra. 2016. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science* 5: e47, doi: 10.1017/jns.2016.41.
- Pandey, M.M., R. Govindarajan, A.K.S. Rawat and P. Pushpangadan. 2005. Free radical scavenging potential of *Saussurea costus*. *Acta Pharmaceutica* 55(3): 297-304.
- Phumthum, M., H. Balslev and A.S. Barfod. 2019. Important medicinal plant families in Thailand. *Frontiers in Pharmacology* 10: 1125, doi: 10.3389/fphar.2019.01125.
- Pulbutr, P., N. Saweeram, T. Ittisan, H. Intrama, A. Jaruchotikamol and B. Cushnie. 2017. *In vitro*  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of *Coccinia grandis* aqueous leaf and stem extract. *Journal of Biological Sciences* 17(2): 61-69.
- Rattan, A.K. and Y. Arad. 1998. Inhibition of LDL oxidation by new estradiol receptor modulator compound LY- 139478, comparative effect with other steroids. *Atherosclerosis* 136(2): 305-314.
- Sadeghian, H. and A. Jabbari. 2016. 15-Lipoxygenase inhibitors: A patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 26(1): 65-88.
- Siddhuraju, P. and K. Becker. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(8): 2144-2155.
- Steinbrecher, U.P., S. Parthasarathy, D.S. Leake, J.L. Witztum and D. Steinberg. 1984.

- Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81(12): 3883-3887.
- Sudharameshwari, K., I. Rekha and R. Salini. 2018. Bioactive potential of *Cardiospermum halicacabum* and *Butea monosperma* leaf extract in combination. The Pharma Innovation Journal 7(11): 252-256.
- Suwanagul, D. and R. Suwanketnikom. 2002. Weeds in Thailand. 1<sup>st</sup> ed. Kasetsart University Press, Bangkok. 440 p. (in Thai)
- Vinodhini, V., M. Himaja, V.S. Saraswathi and D. Poppy. 2015. *In vitro* antidiabetic activity of *Tragia involucrate* Linn. leaf extracts. International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy 6(1): 1-3.
- Yakaiah, V., A. Dakshinamoorthi and T.Y.S. Sudha. 2021. Novel aspects in inhibiting pancreatic lipase with potential new compound from nutmeg in connection with obesity-*in vitro*, *in silico*, *in vivo* and *ex vivo* studies. Maedica-a Journal of Clinical Medicine 16(3): 445-452.
- Zhishen, J., T. Mengcheng and W. Jianming. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry 64(4): 555-559.
-

Relationships Between Vegetation Density and Preference of Bioretention Landscapes:  
The Roles of Perceived Naturalness and Safety in the United States

ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของพืชพรรณและความชอบต่อพื้นที่ดูดซับน้ำฝน:  
บทบาทของความรับรู้เชิงธรรมชาติและความปลอดภัยในสหรัฐอเมริกา

Pongsakorn Suppakittpaisarn<sup>\*</sup>, Ekachai Yaipimol, Chulalux Wanitchayapaisit,

Vipavee Surinseng and Nadchawan Charoenlerthanakit

พงศกร ศุภกิจไพศาล<sup>\*</sup> เอกชัย ไยพิมล จุฬาลักษณ์ วนิชยาไพสิฐ  
วิภาวี สุรินทร์เซ็ง และ ณัฏฐวัล เจริญเลิศธนกิจ

Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

<sup>\*</sup>Corresponding author: Email: pongsakorn.sup@cmu.ac.th

(Received: 2 May 2023; Accepted: 10 July 2023)

**บทคัดย่อ:** ในปัจจุบัน กลยุทธ์ในการจัดการสภาพแวดล้อมคือการแนะนำให้ใช้พืชและกระบวนการทางธรรมชาติในการจัดการน้ำท่วมขังและน้ำฝนที่ไหลบ่ามากยิ่งขึ้น หนึ่งในกลยุทธ์นั้นคือ การใช้พื้นที่ซับน้ำฝนทางชีวภาพ (bioretention) ซึ่งเริ่มมีการนำมาใช้ประโยชน์ในหลายประเทศแล้ว ในประเทศไทย เรื่องนี้เป็นเรื่องใหม่ ความเข้าใจในเรื่องของการรับรู้และการใช้ประโยชน์ของพื้นที่ซับน้ำฝนทางชีวภาพ ของผู้ออกแบบภูมิทัศน์ นักวางผัง และวิศวกร ยังมีอยู่น้อย ส่งผลต่อการยอมรับและการทำให้เกิดความยั่งยืนของการใช้พื้นที่ในลักษณะนี้ ได้มีรายงานถึงพื้นที่ภูมิทัศน์ที่มีจำนวนพืชพรรณในปริมาณที่มาก เป็นที่ยอมรับและชื่นชอบในทางบวก ในขณะที่กลไกที่จะอธิบายว่าทำไมมนุษย์ชอบพื้นที่ที่มีความหนาแน่นของพืชพรรณมากกว่าพื้นที่ที่มีความหนาแน่นของพืชพรรณน้อยกว่า ยังไม่ชัดเจน ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบสอบถามความคิดเห็นกับบุคคลทั่วไป โดยใช้ภาพจำนวน 54 ภาพ หาความสัมพันธ์เปลี่ยนถ่าย (mediation) ระหว่างความหนาแน่นของพืชพรรณ การรับรู้ในความเป็นธรรมชาติและความปลอดภัย และความชอบในรูปแบบของพื้นที่ซับน้ำฝนทางชีวภาพ ผลการศึกษาพบว่า การรับรู้ในความเป็นธรรมชาติเป็นตัวแปรเปลี่ยนถ่ายที่มีอิทธิพลสูงระหว่างความหนาแน่นของพืชพรรณและความชอบ ในขณะที่การรับรู้ในความปลอดภัยเป็นตัวแปรเปลี่ยนถ่ายที่มีอิทธิพลต่ำ ผู้ออกแบบภูมิทัศน์ นักวางผัง และวิศวกร ควรใช้ความรู้นี้เป็นเครื่องมือในการประเมินการออกแบบพื้นที่ซับน้ำฝนชีวภาพ ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นเรื่องใหม่ ที่ช่วยทำให้เข้าใจถึงการรับรู้ของมนุษย์ต่อการออกแบบภูมิทัศน์และสิ่งแวดล้อมในเชิงลึกมากยิ่งขึ้นในอนาคต ควรวิจัยความสัมพันธ์ของความหลากหลายของพื้นที่ซับน้ำฝนชีวภาพ ความแตกต่างของวัฒนธรรมและเอกลักษณ์ของพื้นที่แต่ละแห่งต่อไป

**คำสำคัญ:** การจัดการสภาพแวดล้อม การออกแบบภูมิทัศน์ การรับรู้ภูมิทัศน์ น้ำฝน การออกแบบที่ตอบสนองต่อหน้า

**Abstract:** Recently, environmental management strategies suggest the implementation of plants and natural processes for flood and stormwater management. Among those strategies, bioretention is growing in popularity across nations. However, the understanding of perceptions and preferences of bioretention landscapes are lacking among landscape designers, planners, and engineers. This lack of knowledge risks the acceptance and sustainability of such projects. While research suggest landscapes with higher vegetation density increase positive landscape perceptions and preference, the mechanism of why denser landscapes are preferred is still missing. Thus, this research aims to understand how some landscape perceptions mediate the relationships between vegetation density and preference of bioretention landscapes. The researchers deployed 54 item photo-questionnaires and analyzed the relationships between vegetation density, landscape perceptions, and landscape preference. We found that perceived naturalness strongly mediated the relationships between vegetation and preference of bioretention landscapes while perceived safety had a weak mediative effect. Designers, planners, and engineers can use this information as a tool to assess how they can implement bioretention designs towards landscapes. This research is new because it helps us understand humans' perception of landscapes and environments more deeply. Future research may explore more diverse variety of bioretention landscapes and differences among cultural and place identities.

**Keywords:** Environmental management, landscape design, landscape perception, stormwater, water sensitive design

## Introduction

Growing evidence suggests strong positive relationships between natural elements and human well-being (Suppakittpaisarn *et al.*, 2017; Suppakittpaisarn *et al.*, 2020a). That is, natural elements, such as trees, parks, open spaces, and forests, played important roles in reducing risks of cardiovascular based mortality, stress-related morbidity, and mental health disorders. They also supported positive social interaction and increase cognitive performances (Sullivan *et al.*, 2014). These relationships can be explained by the biophilia hypothesis, which posits that humans prefer certain elements of nature that are important to our survivals (Kellert and Wilson, 1993); stress reduction theory, which posits that exposure to natural elements helps lower acute stress thus prevent negative

effects from chronic stress (Ulrich, 1999); and attention restoration theory, which posits that humans cognitive functioning can be improved by spending time, undistracted, experiencing natural elements with certain characteristics (Kaplan, 1995).

One of the remaining questions in the relationship of nature and well-being is 'how much nature' or what the environmental psychologists call 'dose.' Dose refers to the amount of nature a person can experience, including intensity, duration, and frequency of exposure to nature (Jiang, 2013; Yaipimol *et al.*, 2022). We have limited information about the dose-responses relationships between nature elements and human well-being, including stress, attention, and preference (Jiang *et al.*, 2014a; Jiang *et al.*, 2014b; Sullivan *et al.*, 2014). This limits our understanding towards how to design natural elements into every day landscapes.

In term of dose of nature and preference, a study examined the relationship between vegetation density and preference, and found that it was in a power relationship (Suppakittpaisarn *et al.*, 2019b). That is, when there are little natural elements and some more is added, the preference increased rapidly; however, if the natural elements amount past a certain point, the increase in these elements is not increasing preference as much as before. However, questions about what constitute landscape preference remain, especially for bioretention landscapes.

Bioretention landscapes are the landscapes that are designed for stormwater management. These landscapes, such as rain gardens and bioswales, are gardens or patches of trees and herbaceous plants that slow and absorb stormwater before it hits conventional sewer system (USEPA, 2008). In the past decades, they have become a popular strategy in stormwater management, but due to the characteristics of the plants, which are likely to be high-stemmed grasses and native plants than the traditional flowering landscapes, their preference, perception, and acceptance still need further understanding (Suppakittpaisarn *et al.*, 2020b; Suppakittpaisarn *et al.*, 2019b).

In a study attempting to understand people's preference and acceptance of bioretention landscapes, three dimensions of perceptions were identified as related preference: perceived naturalness, safety, and messiness (Suppakittpaisarn, 2017). These characteristics may be keys to understanding how landscape and perceptions are linked towards bioretention landscapes, especially for perceived naturalness and safety, which predicted landscape preference (Suppakittpaisarn *et al.*, 2020b).

The researchers suspect that there are mediative relationships between vegetation density, landscape perceptions, and landscape preferences. Specifically, landscape perceptions may act as mediating variables in such relationships. Mediating variable is a variable that is explained by the independent variable and explain the dependent variable of a relationship (Baron and Kenny, 1986; Dassopoulos and Monnat, 2011).

Thus, these gaps of knowledge established the research question: do landscape perception (safety and naturalness) mediate the relationship between vegetation density and preference?

## Materials and Methods

### Photo-questionnaires preparation

In this study, the researchers took 6 eye-level photographs of an urban environment based on Midwestern United States. Photographs selections were made and confirmed by landscape architectural researchers to reflect typical streetscapes with wide sidewalks, enough to add plants and street trees, and buildings or other structures on the side. Each image then was added 3 levels of trees (none, few, many) and 3 levels of bioretention planting based on the amount (none, little, a lot), providing 9 conditions of each case and 54 images in total. The images were tested in previous studies. These images were then made into 4 separate questionnaires, asking the following questions for each image.

- How much do you like this landscape ?
- In your opinion, how natural is this landscape ?
- In your opinion, how safe is this landscape ?
- In your opinion, how messy is this landscape ?

The participants rated the images in 5 Likert scale from not at all (0), a little (1), somewhat (2), a lot (3) to very much (4). The examples of images could be found in Figure 1.

The questionnaires were deployed via Amazon Turk crowdsourcing system in July 2017, limiting the participants to those living in the United States between the age of 18-65-year-old. The age group was chosen because they were adults and were the majority of those who spend time outdoors. The relevant ethical screening was sought and approved before the deployment of the questionnaires. The survey was also deployed and tested successfully in a previous study (Suppakittpaisarn *et al.*, 2020b).

**Vegetation Density**

Eye-level vegetation density was calculated by Brown Dog Green Index Extractor, a machine-based tool that used color detection to identify the percentage

This tool has been used in previous studies tested to provide similar results with human perception of vegetation in each image (Padhy *et al.*, 2015). (Suppakittpaisarn *et al.*, 2020a; Suppakittpaisarn *et al.*, 2019b). The vegetation density numbers were provided in continuous variables based on the calculation.

**Statistical analyses**

The researchers used Baron & Kenny Mediation Analysis in this study, similar to a previous landscape and well-being study (Kuo and Sullivan, 2001). The analysis first analyzed the correlations between the independent variable (the predictor) and the dependent variables that were hypothesized as outcome variable (the outcome) and mediating variable (the mediator). Typically, the test's assumption was that independent variables should predict significant correlations between both the outcome and the mediator (Baron and Kenny, 1986).

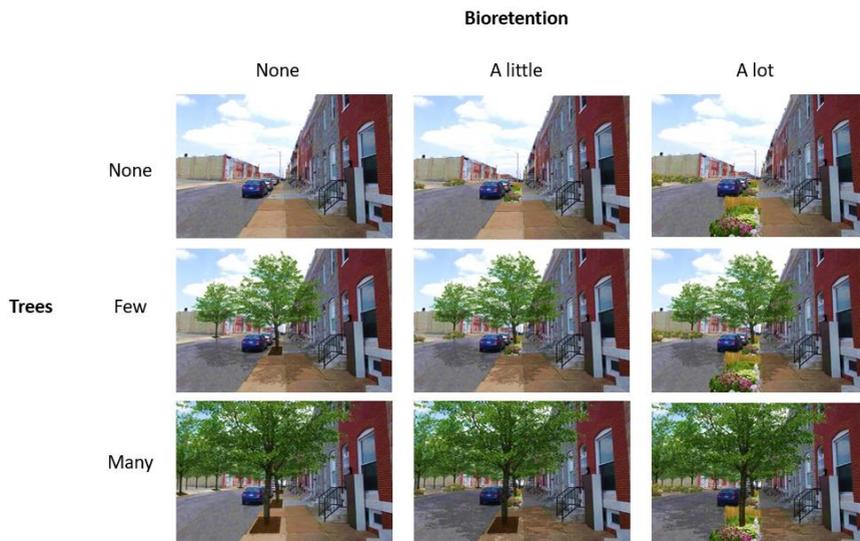


Figure 1. Example images used in the questionnaire with varying levels of trees and bioretentions

For the mediator to be proven as mediating variable, when running the multi-variable correlation test, the beta coefficient of the predictor would drop greatly or the predictor would lose the significance altogether (Baron and Kenny, 1986).

## Results

### Descriptive Statistics

A total of 427 participants answered the questionnaires. Of these, 249 were male (58 %) 175 were female (41 %), and 3 did not identify their gender (1 %). There were 390 people (92 %) from US and Canada, 5 people (1 %) from Western Europe, 1 person from Australia and New Zealand (0 %) and 31 people (7 %) who did not specify their locations in the past five years. Gender and geographical locations did not significantly predict differences in landscape preference and perceptions in these studies.

Vegetation density among the images (n = 54) had the mean of 22.6 %, S.D. of 0.2, with maximum of 46.4 % and minimum of 0.0 %. Landscape preference had the mean of 1.7 and S.D. of 0.6, meaning that most people find the landscapes 'a little bit' preferable moving towards

'somewhat' preferable. Perceived naturalness had the mean of 1.5 and S.D. of 0.4, meaning that people find the landscapes 'a little bit' natural. Perceived safety had the mean of 2.3 and S.D. of 0.4, meaning that overall, people find the landscapes 'somewhat' safe.

### Vegetation Density from trees and bioretention, Perceived Naturalness, and Preference

In this test, vegetation density from trees and bioretention acted as the predictor, perceived naturalness as the mediator, and preference as the outcome. The Pearson's correlation test between vegetation density and perceived naturalness resulted as  $r(1,52) = 0.96$ ,  $p = 0.00$ , beta coefficient = 1.0. The Pearson's correlation test between vegetation density and preference resulted as  $r(1,52) = 0.89$ ,  $p = 0.00$ , beta coefficient = 0.9.

The Pearson's correlation test between vegetation density, perceived naturalness, and preference resulted as  $r(2,51) = 0.96$ ,  $p = 0.00$ , beta coefficient for vegetation density = -0.1,  $p$  for vegetation density = 0.37, beta coefficient for perceived naturalness = 1.1,  $p = 0.00$ . (Table 1)

This suggested that perceived naturalness acted as a strong mediator for the relationships between vegetation density and preference.

**Table 1. Vegetation density from trees and bioretention, perceived naturalness, and preference**

Model	Variable	df	r	p	Beta coefficient
1: vegetation density and perceived naturalness	Model	(1,52)	0.96	0.000	
	Vegetation density			0.000	1.0
2: vegetation density and preference	Model	(1,52)	0.89	0.000	
	Vegetation density			0.000	0.9
3:vegetation density, perceived naturalness, and preference	Model	(2,51)	0.96	0.000	
	Vegetation density			0.370	-0.1
	Perceived naturalness			0.000	1.1

**Vegetation Density from trees and bioretention, Perceived Safety, and Preference**

In this test, vegetation density from trees and bioretention acted as the predictor, perceived safety as the mediator, and preference as the outcome. The Pearson's correlation test between vegetation density and perceived safety resulted as  $r(1,52) = 0.95, p = 0.00, \text{beta coefficient} = 1.0$ . The Pearson's correlation test between vegetation density and preference resulted as  $r(1,52) = 0.89, p = 0.00, \text{beta coefficient} = 0.9$ .

The Pearson's correlation test between vegetation density, perceived safety, and preference resulted as  $r(2,51) = 0.97, p = 0.00, \text{beta coefficient for vegetation density} = 0.4, p = 0.00, \text{and beta coefficient for perceived safety} = 0.7, p = 0.00$ . (Table 2)

This suggested that perceived safety acted as a weaker mediator for the relationships between vegetation density and preference

**Discussion**

**Key findings**

In this study, the researchers aimed to answer the mediating roles of perceived landscape

naturalness and safety towards the relationship between vegetation density and preference of bioretention landscapes. We found that perceived naturalness strongly mediated the relationship, while perceived safety did in a smaller degree.

**Contributions**

The results of this study were congruent with previous studies in that vegetation density predicted perceived naturalness and safety of bioretention landscapes, and these landscape perceptions predicted preference of such landscapes (Jiang *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2017; Suppakittpaisarn *et al.*, 2020b; Suppakittpaisarn, *et al.*, 2019b). While denser bioretention plants might, in previous discussions, provide discomfort due to the possibility of its unkempt appearance and habitation of unwanted wildlife species based on the biophilia hypothesis, the current studies suggested a different direction (Kellert and Wilson, 1993). This might be because the existing vegetation density levels did not exceed the comfort zone, and because other unkempt factors, such as cracked sidewalks or broken windows, were not included in the study (O'Brien *et al.*, 2019).

**Table 2. Vegetation density from trees and bioretention, perceived safety, and preference**

Model	Variable	df	r	p	Beta coefficient
1: vegetation density and perceived safety	Model	(1,52)	0.95	0.000	
	Vegetation density			0.000	1.0
2: vegetation density and preference	Model	(1,52)	0.89	0.000	
	Vegetation density			0.000	0.9
3: vegetation density, perceived safety, and preference	Model	(2,51)	0.97	0.000	
	Vegetation density			0.000	0.4
	Perceived safety			0.000	0.7

The incongruent could be discussed in term of 'messy ecosystem, orderly frames' concept provided by Nassauer (Nassauer, 1995). This study is novel as the first few studies that explored the mediating relationships between vegetation density, landscape perceptions, and landscape preferences in urban bioretention landscapes.

### Implications

The results of the study may bridge the gaps about dimensions of landscape perceptions which can help predict landscape preference. Researchers and designers may use these perceived naturalness and safety to engage laypeople as more specific design parameters for further understanding for public streetscape designs, including bioretention design, thus bridging the gaps between laypeople and designers (Suppakittpaisarn *et al.*, 2019a). This would also refine the understanding of what constitute landscape preference, which could inform future design guidelines and instructions. However, the results of the study would need to consider the contexts of the design locations and understand how well-known the elements such as bioretention are, local vegetation, and the stakeholders' perception towards native plants and rainwater.

### Limitations and Future Studies

While novel and exploratory, the study is not without limitations. First, this study engaged with perceptions and preference of landscape. While these measures across populations are widely used to determine landscape preference, researchers must admit to their subjective nature. Decision makers should only use this information within context and along with other factors.

Secondly, this study focused on wide range of participants. There might be demographic factors, such as genders, cultures, and socio-economic statuses, that influenced the differences in their perceptions and preferences. Thirdly, this is a study about landscape perception, thus, it did not consider the performance of the bioretention landscapes. Future studies should include wider range of landscapes, not just streetscapes. They should include potential performances, different population groups, and seasonal variations. Other factors that predict perceived naturalness and safety, such as vegetation health and numbers of people in the images, should be included in the future study designs. These research gaps were mentioned in previous studies. (Saengngern *et al.*, 2012; Suppakittpaisarn *et al.*, 2019a; Thompson and Travlou, 2007).

### Acknowledgements

This research is partially supported by Chiang Mai University. The research was conducted under the collaboration between the Department of Landscape Architecture, University of Illinois at Urbana-Champaign and the Landscape Design and Environmental Management Studio, Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University.

### References

- Baron, R.M. and D.A. Kenny. 1986. The moderator–mediator variable distinction in social psychological research: Conceptual, strategic, and statistical considerations. *Journal of Personality and Social Psychology* 51(6): 1173-1182.

- Dassopoulos, A. and S.M. Monnat. 2011. Do perceptions of social cohesion, social support, and social control mediate the effects of local community participation on neighborhood satisfaction? *Environment and Behavior* 43(4): 546-565.
- Jiang, B. 2013. Establishing dose-response curves for the impact of urban forests on recovery from acute stress and landscape preference. Ph.D. Dissertation. University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois. 182 p.
- Jiang, B., C.-Y. Chang and W.C. Sullivan. 2014a. A dose of nature: Tree cover, stress reduction, and gender differences. *Landscape and Urban Planning* 132: 26-36.
- Jiang, B., D. Li, L. Larsen and W.C. Sullivan. 2014b. A dose-response curve describing the relationship between urban tree cover density and self-reported stress recovery. *Environment and Behavior* 48(4): 607-629.
- Jiang, B., L. Larsen, B. Deal and W.C. Sullivan. 2015. A dose-response curve describing the relationship between tree cover density and landscape preference. *Landscape and Urban Planning* 139: 16-25.
- Jiang, B., C.N.S. Mak, L. Larsen and H. Zhong. 2017. Minimizing the gender difference in perceived safety: Comparing the effects of urban back alley interventions. *Journal of Environmental Psychology* 51: 117-131.
- Kaplan, S. 1995. The restorative benefits of nature: Toward an integrative framework. *Journal of Environmental Psychology* 15(3): 169-182.
- Kellert, S.R. and E.O. Wilson. 1993. *The Biophilia Hypothesis*. Island Press, Washington, D.C. 484 p.
- Kuo, F.E. and W.C. Sullivan. 2001. Environment and crime in the inner city: Does vegetation reduce crime? *Environment and Behavior* 33(3): 343-367.
- Nassauer, J.I. 1995. Messy ecosystems, orderly frames. *Landscape Journal* 14(2): 161-170.
- O'Brien, D.T., C. Farrell and B.C. Welsh. 2019. Broken (windows) theory: A meta-analysis of the evidence for the pathways from neighborhood disorder to resident health outcomes and behaviors. *Social Science & Medicine* 228: 272-292.
- Padhy, S., G. Jansen, J. Alameda, E.F. Black, L. Diesendruck, M. Dietze, P. Kumar, R. Kooper, J. Lee, R. Liu., R. Marciano, L. Marini, D. Mattson, B. Minsker, C. Navarro, M. Slavenas, W. Sullivan, J. Votava, I. Zhamitsky, and K. McHenry. 2015. Brown Dog: Leveraging everything towards autocuration. pp. 493-500. *In: Proceedings of 2015 IEEE International Conference on Big Data*. IEEE, Santa Clara, CA.
- Saengngern, S., N. Noosorn, T. Maton and C. Wanaratwichit. 2012. Factors predicting individual health promoting behaviors in older people living alone. *Journal of Public Health* 42(2): 68-81. (in Thai)
- Sullivan, W.C., H. Frumkin, R.J. Jackson and C.-Y. Chang. 2014. Gaia meets Asclepius: Creating healthy places. *Landscape and Urban Planning* 127: 182-184.
- Suppakittpaisarn, P. 2017. Green stormwater infrastructure, preference, and human well-being. Ph.D. Dissertation. University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois. 150 p.

- Suppakittpaisarn, P., L. Larsen and W.C. Sullivan. 2019a. Preferences for green infrastructure and green stormwater infrastructure in urban landscapes: Differences between designers and laypeople. *Urban Forestry & Urban Greening* 43: 126378, doi: 10.1016/j.ufug.2019.126378.
- Suppakittpaisarn, P., X. Jiang and W.C. Sullivan. 2017. Green infrastructure, green stormwater infrastructure, and human health: A review. *Current Landscape Ecology Reports* 2(4): 96-110.
- Suppakittpaisarn, P., B. Jiang, M. Slavenas and W.C. Sullivan. 2019b. Does density of green infrastructure predict preference? *Urban Forestry & Urban Greening* 40: 236-244.
- Suppakittpaisarn, P., V. Surinseng, C. Wanitchayapaisit and E. Yaipimol. 2020a. Healthy ecosystem services and healthy human settlements: Opportunities and challenges in northern Thailand. *Landscape Architecture* 2020(9): 77-88.
- Suppakittpaisarn, P., C.-Y. Chang, B. Deal, L. Larsen and W.C. Sullivan. 2020b. Does vegetation density and perceptions predict green stormwater infrastructure preference? *Urban Forestry & Urban Greening* 55: 126842, doi.10.1016/j.ufug.2020.126842.
- Thompson, C.W. and P. Travlou. 2007. *Open Space: People Space*. Taylor and Francis, London. 199 p.
- Ulrich, R.S. 1999. Effects of gardens on health outcomes: Theory and research. pp. 27-79. *In*: C.C. Marcus and M. Barnes (eds.). *Healing Gardens: Therapeutic Benefits and Design Recommendations*. John Wiley & Sons, New York.
- USEPA. 2008. *Managing Wet Weather with Green Infrastructure: Action Strategy*. USEPA, Washington, D.C. 29 p.
- Yaipimol, E., P. Suppakittpaisarn, C. Wanitchayapaisit, N. Charoenlerthanakit and V. Surinseng. 2022. Is 1-Minute of nature enough? Presence and durations of nature view during walking and attention restoration. *BUILT* 19: 51-61.
-



การตรวจพบไวรัสสาเหตุโรคใบจุดและใบย่นในสตรอว์เบอร์รี  
พันธุ์พระราชทาน 80 ที่ปลูกในพื้นที่อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

Detection of Viruses Caused Leaf Spot and Crinkle Leaf in Strawberry  
cv. Praratchatan 80 Growing in Fang District, Chiang Mai Province

นพดล ปนธรรังษี<sup>1\*</sup> ศิริินภา ไชยพล<sup>1</sup> ประไพพิศ สุวิทย์ชยานนท์<sup>2</sup>  
เกวาลิน คุณาศักดากุล<sup>3</sup> และ นิวัฒน์ ชันโท<sup>1</sup>  
Nopphadon Pontharangsee<sup>1\*</sup>, Sirinapa Chaipon<sup>1</sup>, Prapaipit Suwitchayanon<sup>2</sup>,  
Kaewalin Kunasakdakul<sup>3</sup> and Niwat Khantho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ฝ่ายนวัตกรรมเกษตร บริษัท ดอยคำผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด กรุงเทพฯ 10400

<sup>1</sup>Department of Agricultural Innovation, Doi Kham Food Products Co., Ltd., Bangkok 10400, Thailand

<sup>2</sup>สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี จ. กาญจนบุรี 71150

<sup>2</sup>Division of Agricultural Science, Mahidol University, Kanchanaburi Campus, Kanchanaburi 71150, Thailand

<sup>3</sup>ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

<sup>3</sup>Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

\*Corresponding author: Email: n.pontharangsee@gmail.com

(Received: 17 February 2023; Accepted: 10 August 2023)

**Abstract:** Strawberry cultivation using stolon from repeatedly long-term mother plant is possibly accumulated with various viruses and affected to plant growth, flowering, fresh fruit yield, and qualities. The purpose of this research was to explore the infection of virus in strawberry cv. Praratchatan 80 in Ban Nong Tao and Ban Khop Dong (Mon Pin sub-district) and Ban Mae Ngon Khi Lek (Mae Ngon sub-district), Fang district, Chiang Mai province. A total of 175 strawberry leaf samples were collected from 43 symptomatic samples and 132 non-symptomatic samples. Virus detection was conducted by using a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. The result showed that there were 134 samples (76.57%) of virus-infected strawberry. Of the detection number, 92 samples (52.57%) were identified as a single infection, including 80 samples (45.71%) of strawberry latent ringspot virus (SLRSV) and 12 samples (6.86%) of strawberry crinkle virus (SCV). Mixed infection of SLRSV and SCV was also detected at 42 samples (24.0%). Detected samples in each area were found 58 samples (77.33%) in Ban Nong Tao, 59 samples (78.67%) in Ban Khop Dong and 17 samples (68%) in Ban Mae Ngon Khi Lek. The nucleotide sequences of DNA synthesis for the CP gene – RNA 2 (SLRSV) and L protein gene (SCV) regions were obtained from PCR products with sizes of 497 bp and 345 bp, respectively. They were then analyzed and compared to the GenBank database. Results showed that the nucleotide sequence of 497 bp was similar to 5 isolates of SLRSV (Mint 454, NCGR MEN, Eg, Mint-CP2 and W16) at 89.21 - 99.8% identity and the sequence of 345 bp was similar to 4 isolates of SCV (1554, KG, H2399 and H2395) at 94.4 - 100% identity.

To the best of our knowledge, this is the first report of SLRSV and SCV virus infecting strawberry in Thailand.

**Keywords:** Strawberry virus disease, Praratchatan 80, RT-PCR, strawberry latent ringspot virus, strawberry crinkle virus

**บทคัดย่อ:** การปลูกสตรอว์เบอร์รีด้วยการใช้ต้นพันธุ์ที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการต่อไหลอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานทำให้เกิดการสะสมของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช ส่งผลต่อการเจริญเติบโต การติดดอก ปริมาณและคุณภาพของผลสตรอว์เบอร์รี งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและตรวจหาการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 ที่เพาะปลูกใน 3 พื้นที่ ได้แก่ บ้านหนองเต่า บ้านขอบด้ง ตำบลม่อนปิ่น และบ้านแม่อนขี้เหล็ก ตำบลแม่อน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รี จำนวน 175 ตัวอย่าง จากต้นที่แสดงอาการของโรค จำนวน 43 ตัวอย่าง และไม่แสดงอาการของโรคจำนวน 132 ตัวอย่าง นำมาศึกษาและตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) ผลการวินิจฉัยพบไวรัสรวมจำนวน 134 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 76.57 ของตัวอย่างทั้งหมด แบ่งเป็น การเข้าทำลายแบบเดี่ยว ร้อยละ 52.57 จากไวรัส strawberry latent ringspot virus (SLRSV) จำนวน 80 ตัวอย่าง และไวรัส strawberry crinkle virus (SCV) จำนวน 12 ตัวอย่าง และพบการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ช่วงต้น จำนวน 42 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24 โดยแบ่งการตรวจพบในแต่ละพื้นที่ ได้แก่ บ้านหนองเต่า จำนวน 58 ตัวอย่าง (77.33%) บ้านขอบด้ง จำนวน 59 ตัวอย่าง (78.67%) และบ้านแม่อนขี้เหล็ก จำนวน 17 ตัวอย่าง (68%) ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ตำแหน่ง CP gene – RNA 2 (SLRSV) และ L protein gene (SCV) จากผลผลิตดีเอ็นเอของปฏิกิริยา PCR ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 497 คู่เบส และ 345 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ 497 คู่เบส มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส SLRSV จำนวน 5 ไอโซเลท (Mint 454, NCGR MEN, Eg, Mint-CP2 และ W16) ที่ระดับความเหมือน 89.21 - 99.8% และลำดับนิวคลีโอไทด์ 345 คู่เบส มีความคล้ายกับเชื้อไวรัส SCV จำนวน 4 ไอโซเลท (1554, KG, H2399 และ H2395) ที่ระดับความเหมือน 94.4 - 100% งานวิจัยนี้จึงนับเป็นการตรวจพบเชื้อไวรัส SLRSV และ SCV ในสตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80 เป็นครั้งแรกของประเทศไทย

**คำสำคัญ:** โรคไวรัสสตรอว์เบอร์รี พระราชทาน 80 RT-PCR โรคใบจุดในสตรอว์เบอร์รี โรคใบย่นในสตรอว์เบอร์รี

## คำนำ

สตรอว์เบอร์รี (*Fragaria x ananassa* Duch.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมในการบริโภคสูง และมีการปลูกอย่างแพร่หลายในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย เช่น อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ อำเภอสะเมิง อำเภอกัลยาณิวัฒนา และอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ เป็นต้น โดยสายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกในปัจจุบันคือ พันธุ์พระราชทาน 80 (Praratchatan 80) เนื่องจากผลสุกมีกลิ่นหอม รสชาติหวาน ทรงผลสวย เป็นที่นิยมของผู้บริโภค นอกจากนี้

ยังเป็นพืชที่เกษตรกรในระบบส่งเสริมของบริษัท โดยค่าผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด เพาะปลูกและส่งผลผลิตให้แก่โรงงานหลวงอาหารสำเร็จรูปที่ 1 (ฝาง) ใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ และจำหน่ายในรูปแบบรับประทานสด (สตรอว์เบอร์รีคัตพิเศษดอยคำ) ภายหลังพบว่า ผลผลิตสตรอว์เบอร์รีประสบปัญหาปริมาณและคุณภาพผลผลิตลดลง โดยในปี พ.ศ. 2564 เกษตรกรในระบบส่งเสริมของบริษัทฯ ผลิตสตรอว์เบอร์รีผลสดได้เพียง 27.23 ตันต่อพื้นที่ปลูก 45 ไร่ ลดลงจากปี พ.ศ. 2561 ถึง 13.98 ตัน (41.21 ตันต่อพื้นที่ปลูก 45 ไร่) (ข้อมูลปริมาณผลผลิตสตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80

ตำบลม่อนปิ่นและตำบลแม่งอน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2561 - 2564, ส่งเสริมและพัฒนาเกษตรโรงงานหลวงอาหารสำเร็จรูปที่ 1 (ฝาง) ซึ่งเป็นผลมาจากปัญหาการเข้าทำลายของโรคและแมลงศัตรูพืช สภาพอากาศที่แปรปรวน โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากไวรัสที่สะสมอยู่ในต้นพันธุ์ ทำให้พืชแสดงอาการ ใบด่าง ม้วนงอ และแคระแกร็น เป็นอุปสรรคสำคัญต่อการเจริญเติบโต ปริมาณผลผลิต ขนาดผล ส่งผลกระทบต่อมูลค่าทางการตลาดลดลง

ไวรัส strawberry latent ringspot virus (SLRSV) และ strawberry crinkle virus (SCV) เป็นสาเหตุโรคที่มีการเข้าทำลายในลักษณะแฝงอยู่ในต้นพืช สังเกตอาการได้ยาก การตรวจวินิจฉัยโรคจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเป็นหลัก เทคนิค RT-PCR สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสชนิดที่เป็น RNA โดย ไวรัส SLRSV ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Secoviridae สกุล *Nepovirus* มีสารพันธุกรรมแบบ bipartite positive-sense ssRNA ประกอบด้วย RNA 1 และ RNA 2 (Borodynko *et al.*, 2007) ที่มีรายงานการเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจอย่างแพร่หลายทั่วโลก เช่น สตรอว์เบอร์รี (*Fragaria* spp.), ราสป์เบอร์รี (*Rubus idaeus*), ท้อ (*Prunus* spp.), ลิลลี่ (*Lilium* spp.), กุหลาบ (*Rosa* spp.) และมะกอก (*Olea* spp.) โดยพบว่า พืชที่ถูกเข้าทำลายส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจน (Dullemans *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2013) ส่วนไวรัส SCV จัดอยู่ในวงศ์ Rhabdoviridae สกุล *Cytorhabdovirus* มีสารพันธุกรรมแบบ negative-sense ssRNA เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงชนิดหนึ่งที่ทำให้ทำลายสตรอว์เบอร์รี (Fránová *et al.*, 2019) เมื่อเกิดการเข้าทำลายแบบเดี่ยว (single infections) ส่งผลให้ผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตลดลง 20 - 30% หากเกิดการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสชนิดอื่น (mixed infections) ทำให้ผลผลิตลดลงสูงถึง 80% อีกทั้งมีผลกระทบต่อการสร้างไหลของต้นแม่พันธุ์ลดลงอีกด้วย (Rao and Reddy, 2020; Thompson *et al.*, 2003)

จากปัญหาที่กล่าวมาผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญเรื่องการตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 ในพื้นที่ที่ได้รับการส่งเสริมการเพาะปลูกสตรอว์เบอร์รีจากโรงงานหลวงฯ โดยใช้

เทคนิคที่มีความแม่นยำสูงในการตรวจสอบ เพื่อทราบถึงเชื้อสาเหตุที่ทำให้ผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตลดลง และเป็นแนวทางในการศึกษาเชื้อสาเหตุโรคไวรัสของสตรอว์เบอร์รี ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสกับพืชอาศัย และเป็นแนวทางในการพัฒนาต้นพันธุ์สตรอว์เบอร์รีปลอดโรค รวมถึงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ในการเพาะปลูกและผลิตสตรอว์เบอร์รีในประเทศไทยต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเก็บตัวอย่างโรค

เก็บตัวอย่างใบจากต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 อายุประมาณ 100 - 120 วัน ที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัส เช่น ใบด่าง (mosaic) จุดขีดต่าง (mosaic streak) จุดต่างวงแหวน (ringspot) ม้วนงอ (curling) ใบตุ่มนูน (crinkle) ต้นแคระแกร็น (stunting) และต้นสตรอว์เบอร์รีที่ไม่แสดงอาการของโรค (non-symptomatic) จากแปลงเกษตรกรผู้ปลูกสตรอว์เบอร์รีบ้านหนองเต่า (19°56'52.1"N 99°05'03.1"E) บ้านขอบด้ง (19°55'35.2"N 99°03'18.7"E) ตำบลม่อนปิ่น และบ้านแม่งอนขี้เหล็ก (19°47'46.6"N 99°07'55.8"E) ตำบลแม่งอน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 - มกราคม พ.ศ. 2565 จำนวน 175 ตัวอย่าง บันทึกอาการที่ปรากฏบนใบและพื้นที่เก็บตัวอย่าง แล้วเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาสกัดอาร์เอ็นเอและตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR)

### 2. การสกัดอาร์เอ็นเอ

นำตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รีมาสกัดอาร์เอ็นเอ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Barman *et al.* (2017) บดใบสตรอว์เบอร์รีสด 100 มิลลิกรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด เติม 2X CTAB buffer (2% CTAB, 2% PVP, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0 และ 2M NaCl) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปปั่น

ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำคลอโรฟอร์ม: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บั่นผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 12,000x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที บั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 12,000x g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol ปริมาตร 1,400 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 7,500x g เป็นเวลา 5 นาที ตากตะกอนอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วย DEPC water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วัดค่าความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วย Nanodrop™ One UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) ก่อนการตรวจหาเชื้อไวรัส

### 3. การตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR

สังเคราะห์ cDNA โดยมีส่วนผสมของสารละลายของปฏิกิริยา ได้แก่ อาร์เอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, reverse primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 5x reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP Mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, RiboLock RNase inhibitor (20 U/μL) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, M-MuLV reverse transcriptase (200 U/μL) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (RevertAid first strand cDNA synthesis kit, Thermo Scientific, USA) ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (nuclease-free water) ให้มีปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR โดยมีส่วนผสมของสารละลายของปฏิกิริยา ดังนี้ DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร, cDNA ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร, specific SCV และ SLRSV forward primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, specific

SCV และ SLRSV reverse primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (Table 1) ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ให้มีปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร จีโนมของเชื้อไวรัส SLRSV ที่เลือกมาตรวจทดสอบเป็นส่วนหนึ่งที่อยู่บน movement protein (MP) gene และ coat protein (CP) gene บน RNA2 ระหว่างนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 1,144 - 1,641 โดยมีขนาดประมาณ 497 คู่เบส (bp) จีโนมของเชื้อไวรัส SCV บนบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ที่เลือกมาตรวจทดสอบอยู่บน L protein gene ระหว่างนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 14,545 - 14,559 โดยมีขนาดประมาณ 345 คู่เบส (bp) โดยใช้ลำดับไพรเมอร์เทียบกับข้อมูลใน GenBank database (Klerks *et al.*, 2004; Koloniuk *et al.*, 2018; Tzanetakis *et al.*, 2006) จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR ภายใต้สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงต่างกันตาม specific primer (Table 2) (Mastercycler® nexusX2, Eppendorf, Germany) ตรวจทดสอบผลผลิตปฏิกิริยา PCR (PCR products) โดยเตรียม 1.5% agarose gel ในสารละลาย 1X TBE buffer ผสมสีย้อมเจล RedSafe™ dye (iNTRON Biotechnology, USA) ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค gel electrophoresis ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และส่องภายใต้แสง UV ช่วงแสง 302 นาโนเมตร เตรียมชิ้นส่วนเจลที่ผ่านการตรวจสอบแล้วและมีผลเป็นบวก โดยส่งตัวอย่างผลผลิตดีเอ็นเอของปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่ได้ ไปทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามกรรมวิธีของบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ ด้วยเครื่อง ABI3730x1 automated sequencer (Applied Biosystems, USA) นำผลการตรวจหาเชื้อไวรัสมาคำนวณหาร้อยละการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส (% infection rate) ตามวิธีการของ Rodrigues *et al.* (2019) โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

1. ร้อยละการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างทั้งหมด

$$\text{Infection rate (\%)} = \frac{\sum(PS) \times 100}{TNS}$$

2. ร้อยละการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสแต่ละรูปแบบ (การเข้าทำลายแบบเดี่ยวและการเข้าทำลายร่วม)

$$\text{Infection type (\%)} = \frac{\sum(SPS \text{ or } MPS) \times 100}{TNS}$$

Positive sample (PS) คือ ตัวอย่างที่มีการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปรากฏผลบวกที่ 497 bp หรือ 345 bp

Single positive sample (SPS) คือ ตัวอย่างที่มีการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปรากฏผลบวกที่ 497 bp หรือ 345 bp เพียงตำแหน่งเดียว

Mixed positive sample (MPS) คือ ตัวอย่างที่มีการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปรากฏผลบวกที่ 497 bp หรือ 345 bp

Total number of samples (TNS) คือ จำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบทั้งหมด

#### 4. การทดสอบการก่อโรค

ทดสอบการก่อโรคของเชื้อไวรัส SLRSV โดยดัดแปลงจากวิธีของ Tang *et al.* (2013) นำใบสตรอว์เบอร์รีจากต้นที่ตรวจพบเชื้อไวรัส SLRSV ด้วยวิธี RT-PCR มาบดใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.5 ก่อนปลูกเชื้อบ่มพืชทดสอบ (สตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80)

ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ โรยผง silicon carbide (400 mesh) บนใบพืชทดสอบ จำนวน 3 ใบ ทาด้วยน้ำคั้น (sap inoculum) ให้ทั่วใบ ทั้งไว้ 10-20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ชุดควบคุมใช้ 0.05 M phosphate buffer pH 7.5 นำพืชทดสอบบ่มไว้ในโรงเรือนควบคุมสภาพแวดล้อม 25 - 28 องศาเซลเซียส สังเกตอาการบนใบพืชเป็นเวลา 2 - 3 สัปดาห์

ทดสอบการก่อโรคของเชื้อไวรัส SCV โดยการต่อกิ่ง (grafting) ตามวิธีการของ Fránová *et al.* (2019) โดยใช้ก้านใบ จากต้นกล้าสตรอว์เบอร์รีปลอดโรคเสียบเข้ากับก้านใบของต้นตอสตรอว์เบอร์รีที่ตรวจพบเชื้อไวรัส SCV สังเกตลักษณะอาการที่ปรากฏเป็นเวลา 2 - 3 สัปดาห์

ตรวจหาเชื้อไวรัส SLRSV และ SCV ด้วยวิธี RT-PCR ในพืชทดสอบหลังจากพืชแสดงอาการของโรค เพื่อยืนยันผลการทดสอบการก่อโรคของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด

Table 1. Sequence of specific primers and forward reverse specific primers used in RT-PCR and positions within the viral genome.

Primer name	Sequencing (5' -3')	Amplification product	Target gene	Reference
SCV F	CATTGGTGGCAGACCCATCA	345 bp	L protein gene	Klerks <i>et al.</i> (2004)
SCV R	TTCAGG ACCTATTTGATGACA			
SLRSV F	CCTCTCCAACCTGCTAGACT	497 bp	Coat protein (CP) gene - RNA 2	Postman <i>et al.</i> (2004)
SLRSV R	AAGCGCATGAAGGTGTAAC			

Table 2. Amplification steps of RT-PCR assays

Primer	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	Cycle
SCV F, R	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C	39*
	10 min	15 S	30 S	1 min	10 min	
SLRSV F, R	94 °C	94 °C	50 °C	72 °C	72 °C	30*
	5 min	1 min	1 min	1 min	10 min	

\*The quantity of cycles in the RT-PCR process, specifically for the denaturation, annealing, and extension steps exclusively, was assessed.

## 5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blast (National Center for Biotechnology Information: NCBI)([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=Blast Search](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=Blast Search)) เปรียบเทียบกับข้อมูลจีโนมของเชื้อไวรัส SLRSV และ SCV ที่ได้รายงานใน GenBank database จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตำแหน่งมาวิเคราะห์เปรียบเทียบการจัดเรียงตำแหน่ง (multiple sequence alignment) โดยใช้คำสั่ง ClustalW และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มจากวิธี Maximum Likelihood และ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยใช้ Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993; Tamura *et al.* 2021) ในโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. การเก็บตัวอย่างโรคและลักษณะอาการ

จากการเก็บตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รี่พันธุ์พระราชทาน 80 อายุประมาณ 100 - 120 วัน จำนวน

175 ตัวอย่าง ในพื้นที่บ้านหนองเต่าและบ้านขอบด้ง (ตำบลม่อนปิ่น อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่) จำนวนพื้นที่ละ 75 ตัวอย่าง และบ้านแม่อนชี้เหล็ก (ตำบลแม่องอน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่) จำนวน 25 ตัวอย่าง พบตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รี่ที่ไม่แสดงอาการของโรคไวรัส จำนวน 132 ตัวอย่าง และตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รี่ที่แสดงอาการของโรคไวรัส จำนวน 43 ตัวอย่าง ได้แก่ อาการใบด่าง ใบด่างวงแหวน จุดขีดดำง ตุ่มนูน เนื้อใบย่น ขอบใบม้วนงอ และใบมีขนาดเล็ก (ลดรูป) (Figure 1, 2) และอาการแคะแกร็น ต้นชะงักการเจริญเติบโต (Figure 2)

### 2. การตรวจหาเชื้อไวรัส SLRSV และ SCV ด้วยเทคนิค RT-PCR

การตรวจหาเชื้อไวรัส SLRSV และ SCV จากตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รี่พันธุ์พระราชทาน 80 ในพื้นที่บ้านหนองเต่า บ้านขอบด้ง และบ้านแม่อนชี้เหล็ก จำนวน 175 ตัวอย่าง ด้วย specific primer (SLRSV F,R และ SCV F,R) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นสตรอว์เบอร์รี่พันธุ์พระราชทาน 80 ปลอดเชื้อ (healthy plant) พบว่า ปฏิกริยา PCR ของคู่มือ SLRSV พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 497 คู่เบส (bp) (ผลเป็นบวก) จำนวน 122 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 69.71 ของ

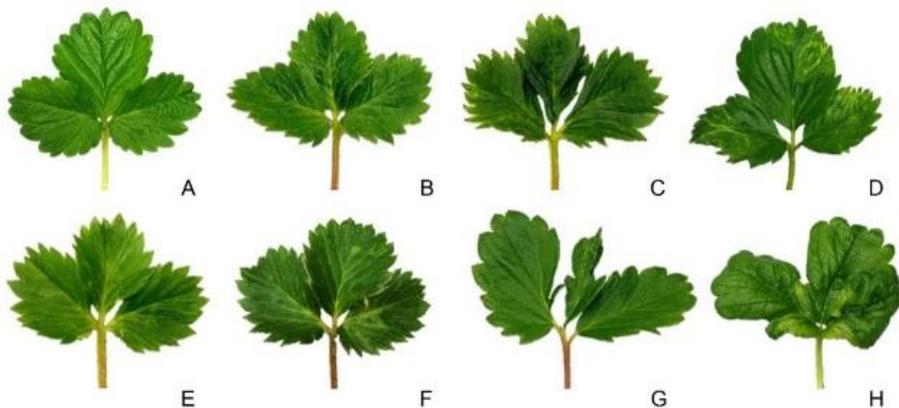


Figure 1. Virus-like symptoms on naturally infected strawberry Praratchatan 80 cultivar leaves showing non-symptomatic (A), crinkle (B), crinkle and malformation (C), ringspot (D), mosaic streak (E), mosaic and ringspot (F), malformation (G) and crinkle, leaf curling and malformation (H).



Figure 2. Virus-like symptoms found on leaves and strawberry plants in the field are as follows: non-symptomatic (A), leaf crinkle (B), tillering dwarf and leaf curling (C), ringspot and crinkle (D), and crinkle and dwarf (F), These symptoms were compared with those of a non-symptomatic plant (E).

ตัวอย่างทั้งหมด แบ่งออกเป็น พื้นที่บ้านหนองเต่า จำนวน 56 ตัวอย่าง บ้านขอบดิ่งจำนวน 50 ตัวอย่าง และบ้านแม่-งอนซีเหล็ก จำนวน 16 ตัวอย่าง (Figure 3) และคู่มือเมอร์ SCV พบแถบดีเอ็นเอปรากฏ 345 คู่เบส (bp) (ผลเป็นบวก) จำนวน 54 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 30.86 ของตัวอย่างทั้งหมด แบ่งออกเป็น พื้นที่บ้านหนองเต่า จำนวน 23 ตัวอย่าง บ้านขอบดิ่ง จำนวน 25 ตัวอย่าง และบ้านแม่-งอนซีเหล็ก จำนวน 6 ตัวอย่าง (Table 3) ทั้งนี้คู่มือเมอร์ ทั้งสองชนิดข้างต้น ไม่เกิดปฏิกิริยากับตัวอย่างสตรอว์-เบอร์รีปลอดเชื้อ

ผลการตรวจเชื้อพบตัวอย่างไบสตรอว์เบอร์รีที่มีการเข้าทำลายแบบเดี่ยว จำนวน 92 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 52.57 การเข้าทำลายของเชื้อไวรัส SLRSV จำนวน 80 ตัวอย่าง

(45.71 %) และการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส SCV จำนวน 12 ตัวอย่าง (6.86 %) นอกจากนี้ยังพบการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ SLRSV และ SCV จำนวน 42 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24.0 ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างไบสตรอว์เบอร์รีที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ผลเป็นลบ) จำนวน 41 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 23.43 ของตัวอย่างทั้งหมด (Table 3) ซึ่งไม่แสดงอาการของโรคไวรัส

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์เชื้อไวรัสรวมกับการแสดงอาการบนใบและต้นสตรอว์เบอร์รี พบว่าไบสตรอว์เบอร์รีที่ไม่แสดงอาการของโรคมีการเข้าทำลายแบบเดี่ยวของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด โดยตรวจพบเชื้อ SLRSV มากกว่า SCV ทั้งนี้มีเพียง 1 ตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ SCV ผลการวิเคราะห์

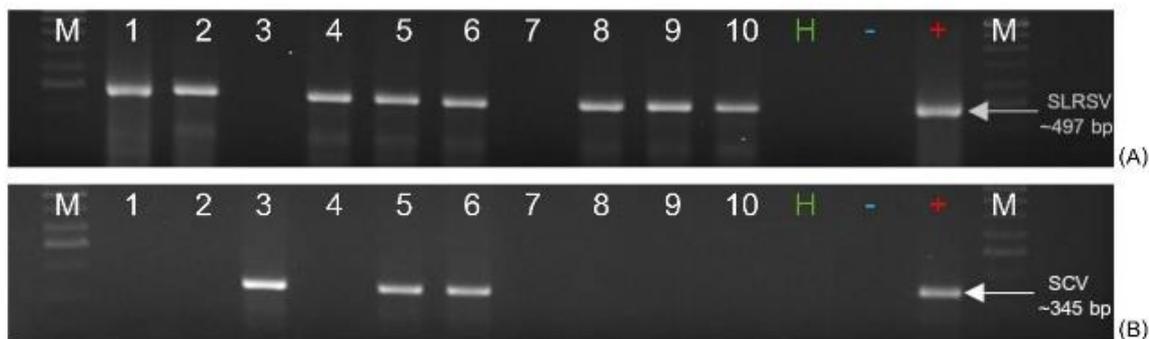


Figure 3. RT-PCR detection of strawberry latent ringspot virus (SLRSV) (A) and strawberry crinkle virus (SCV) (B) from strawberry Praratchatan 80 cultivar. Lane 1-10: strawberry leaves sample collected in Mon Pin and Mae Ngon sub-district, Fang district, Chiang Mai province. (A) Lane 1, 2, 4-6 and 8-10 (top) showed 497 bp SLRSV-specific amplicons. and (B) Lane 3, 5 and 6 (bottom) showed 345 bp SCV-specific amplicons. H: healthy plant; (-): negative (nuclease-free water); (+): positive SLRSV infected and M: 100 bp molecular weight marker.

Table 3. Result of SLRSV and SCV detection by RT-PCR from strawberry Praratchatan 80 cultivar.

Location	Detected (samples)			Not detected (samples)	Total (samples)
	SLRSV	SCV	SLRSV+SCV		
1. Ban Nong Tao, Mon Pin	35	2	21	17	75
2. Ban Khop Dong, Mon Pin	34	9	16	16	75
3. Ban Mae Ngon Khi Lek, Mae Ngon	11	1	5	8	25
Total (sample)	80	12	42	41	175
% Infection	45.71	6.86	24.00	23.43	100.00

สอดคล้องกับรายงานของ Borodynko *et al.* (2007) และ Frazier *et al.* (1987) ที่กล่าวว่าในพืชส่วนใหญ่ที่พบการเข้าทำลายแบบเดี่ยวของเชื้อไวรัส SLRSV หรือ SCV มักไม่ทำให้พืชแสดงการพัฒนาของโรคและอาการของโรคอย่างชัดเจน แต่หากเกิดจากการเข้าทำลายแบบร่วมกัน (mixed infection) ของเชื้อไวรัส SLRSV และ SCV ทำให้พืชแสดงอาการใบตุ่มนูน ใบต่าง ใบต่างวงแหวน เนื้อใบย่น ขอบใบม้วนงอ ใบมีขนาดเล็กและแคระแกร็น (Figure 2, Table 4) เช่นเดียวกับรายงานของ Fránová *et al.* (2019) และ EL- Morsy *et al.* (2017) ที่พบว่า

ต้นสตอร์วเบอร์รี่ที่ถูกเชื้อไวรัส SCV เข้าทำลายร่วมกับเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), strawberry mottle virus (SMoV), strawberry vein banding virus (SVBV) และ strawberry latent ringspot virus (SLRSV) แสดงอาการ ใบต่างเขียว ใบขีด ขนาดใบเล็ก มีตุ่มนูน และแคระแกร็น ทั้งนี้การเข้าทำลายของเชื้อไวรัสเพียงชนิดเดียวหรือมีการเข้าทำลายแบบเดี่ยวอาจไม่เป็นอันตรายแก่พืช แต่การเข้าทำลายแบบร่วมกันจะทำให้พืชแสดงอาการของโรคได้อย่างรุนแรงและสร้างความ

Table 4. The characteristics of symptoms on strawberry Praratchatan 80 cultivar associated with virus detection by using RT-PCR technique

Detected virus	Symptoms
1. SLRSV	Non-symptomatic
2. SCV	Non-symptomatic and crinkle
3. SLRSV and SCV (Mixed infected)	Ringspot, crinkle, mosaic, mosaic streak, leaf curling, deformation, dwarf and stunning

เสียหายต่อผลผลิต (Martin and Tzanetakis, 2006; Moyer *et al.*, 2021)

### 3. การทดสอบการก่อโรค

จากการปลูกเชื้อไวรัส SLRSV บนต้นกล้าสตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80 พบว่า ต้นกล้าแสดงอาการใบจุดต่าง กระจายทั่วทั้งใบ (Figure 4) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR เกิดปฏิกิริยาผลบวก และชุดควบคุมไม่เกิดปฏิกิริยา (ให้ผลเป็นลบ) สอดคล้องกับรายงานการปลูกเชื้อไวรัส SLRSV บนสตรอว์เบอร์รี *F. ananassa* แสดงอาการใบเหลือง (yellowing) ใบจุดต่าง (mottling) (Kheder, 2021) เมื่อนำใบพืชทดสอบมาตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR พบแถบดีเอ็นเอ (ผลเป็นบวก) ในพืชทดสอบที่ปลูกเชื้อ และชุดควบคุมไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ผลเป็นลบ) ทั้งนี้ ความรุนแรงของอาการที่ปรากฏมีความแตกต่างกันตามพืชอาศัยที่เชื้อไวรัสเข้าทำลาย เชื้อไวรัส SLRSV สามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีกลแต่ยังไม่แสดงอาการในพืชหลายชนิด จึงเป็นไปได้ว่ามีการติดเชื้อแฝงได้ (Martin *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2013)

ต้นกล้าสตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80 ที่ปลูกเชื้อไวรัส SCV ด้วยการต่อกิ่ง (grafting) โดยใช้ก้านใบสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 ปลอดโรค พบว่าหลังต่อกิ่งเป็นเวลา 2 - 3 สัปดาห์ ใบสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการใบจุดต่าง เป็นปุ่มปม (Figure 5) และชุดควบคุมไม่แสดงอาการ เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR พบแถบดีเอ็นเอ (ผลเป็นบวก) ในพืชทดสอบที่ปลูกเชื้อ และชุดควบคุมไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ผลเป็นลบ) เช่นเดียวกับรายงานของ Fránová *et al.* (2019) ได้ต่อ

กึ่ง *F. vesca* ปลอดโรค เข้ากับต้นตอที่มีเชื้อไวรัสไอโซเลท StrV-1 พบว่า แสดงอาการใบต่างเขียว (light green) เส้นใบใส (vein clearing) หลังเลี้ยงกิ่งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี RT-qPCR พบปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ผลเป็นบวก) ของเชื้อไวรัสไอโซเลท StrV-1 นอกจากนี้ Frazier *et al.* (1987) รายงานว่าเชื้อไวรัส SCV สามารถถ่ายทอดโรคด้วยการต่อกิ่งได้ง่ายกว่าวิธีการถ่ายทอดโรคด้วยวิธีอื่น

### 4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis พบผลเป็นบวกทั้งหมด 134 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 175 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำนวน 30 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น ผลบวกของ SLRSV จำนวน 15 ตัวอย่าง และผลบวกของ SCV 15 ตัวอย่าง จาก 3 พื้นที่เก็บตัวอย่าง มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างสตรอว์เบอร์รีที่ตรวจพบ เชื้อไวรัส SLRSV มีความเหมือนกับเชื้อไวรัส SLRSV ไอโซเลท Mint 454 (HQ456535.1) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) สูงสุดของแต่ละตัวอย่างระหว่าง 99.3 - 99.8%, ไอโซเลท NCGR MEN 454.001 (AY461735.1) 99.3 - 99.6%, ไอโซเลท Eg (MT648777.1) 97.7 - 97.8%, ไอโซเลท Mint-CP2 (AY438666.1) 98.7 - 99.0% และไอโซเลท W16 (DQ324375.1) 88.49 - 89.21% ผลลัพธ์ที่ได้ สอดคล้องกับ Postman *et al.* (2004) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า specific primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ CP gene - RNA 2 ของเชื้อไวรัส SLRSV สามารถสังเคราะห์

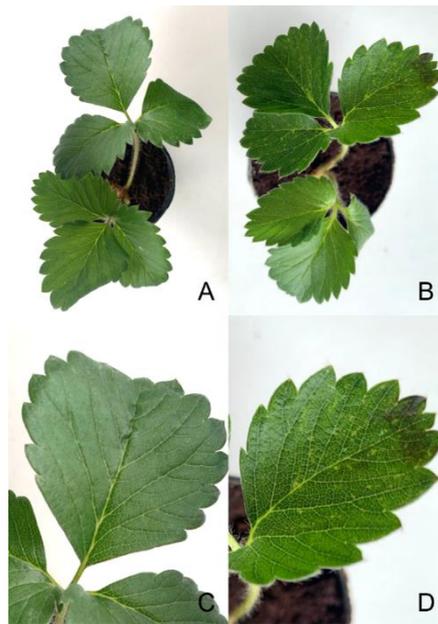


Figure 4. Symptoms on strawberry mechanically inoculated with SLRSV on cv. Praratchatan 80 showing mosaic leaf streak symptoms (B and D). The control (A and C) did not show any symptoms of the disease.

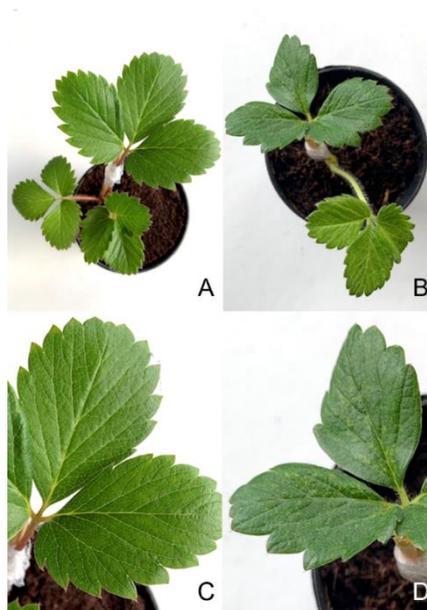


Figure 5. Symptoms on strawberry grafted with SCV-infected clones on cv. Praratchatan 80 showing mosaic and crinkle symptoms after grafting (B and D). The control (A and C) did not show any symptoms of the disease.

ผลผลิตดีเอ็นเอของปฏิกิริยา PCR ที่มีขนาดประมาณ 497 คู่เบส และใช้ตรวจสอบตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รีในพื้นที่อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ได้

ตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รีที่ตรวจพบเชื้อไวรัส SCV มีความเหมือนกับเชื้อไวรัส SCV ไอโซเลท 1554 (AY331385.1) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงสุดของแต่ละตัวอย่างระหว่าง 99.3 - 100 %, ไอโซเลท KG (AY331386.1) 99.3 %, ไอโซเลท H2399 (MZ326669.1) 98.7 - 98.8 % และไอโซเลท H2395 (MZ326668.1) 94.7 - 94.9 % สามารถสังเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอ ที่มีขนาดประมาณ 345 คู่เบส และใช้ตรวจสอบ L protein gene ของเชื้อไวรัส SCV ไอโซเลทต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแปรผันน้อยกว่า 10 % สามารถบ่งชี้ได้ว่าตำแหน่งของยีนที่ใช้ในการตรวจสอบเหมาะสมสำหรับใช้เป็นเป้าหมายในการตรวจวินิจฉัยโรค (Posthuma *et al.*, 2002)

## 5. การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

เชื้อไวรัส SLRSV ตำแหน่ง CP gene - RNA 2 (497 bp) ไอโซเลทที่แยกจากสตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80 พื้นที่ตำบลม่อนปิ่น ตำบลแม่งอน อำเภอฝาง ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ CM01-CM05 (AG05640531 - AG05640535) วิเคราะห์เปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ SLRSV ไอโซเลทต่างๆ ที่รายงานใน GenBank สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษาครั้งนี้ (CM01-CM05) จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งมีความใกล้ชิดกับ ไอโซเลท Eg (MT648777.1), 454 (HQ456535.1), MEN 454.001 (AY461735.1), Mint - CP2 (AY438666.1), 6 - 6 (KF695119.1), Clematis 14-021 (MF796994), DSMZ PV - 0247 (MZ405641.1), W 16 (DQ324375.1) และ N31 (DQ324374.1) (Group 1, Figure 6) และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท DSMZ PV - 1314 (MW854292.1), Mint 515 (HQ456537.1), Gorz 2 (DQ324376.2), Rosa 14 - 025 (MF797002.1), Lilium 13 - 023 (MF796976.1), Lilium 14 - 007 (MF796984.1), EA4 (JN859089.1), Lilium

13 - 024 (MF796978.1), Lilium 14 - 010 - 2 (MF796988.1) และ Golden peach - NZ (MN082041.1) (Group 2, Figure 6) เชื้อไวรัส SCV ตำแหน่ง L protein gene (345 bp) ไอโซเลทที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ CM01-CM05 (AG05640631 - AG05640635) เปรียบเทียบกับ ข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ SCV ไอโซเลทต่างๆ พบว่า ไอโซเลทที่นำมาศึกษา CM01-CM05 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลท 1554 (AY331385.1), KG (AY331386.1) และ H2339 (MZ326669.1) (Group 1, Figure 7) และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท H2395 (MZ326668.1), SAR1 (MG251308.1), SS26 (MG251309.1), F3 (MG251306.1), SAR15 (MG251310.1), SAR6 (MG251307.1), SS23 (MG251312.1) และ SS21 (MG251311.1) (Group 2, Figure 7) เชื้อไวรัสที่นำมาศึกษามีความสัมพันธ์กับเชื้อไวรัสที่รายงานการพบเชื้อในหลายภูมิภาคทั่วโลก ซึ่งให้เห็นว่า การตรวจพบในแปลงปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งไม่มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทยมาก่อนนั้น อาจติดมากับต้นแม่พันธุ์ เมล็ดพันธุ์ แมลงพาหะ และวัสดุปลูกที่นำเข้ามา เนื่องจากเชื้อไวรัส SCV สามารถถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน และเชื้อไวรัส SLRSV สามารถถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ ละอองเรณู (pollen) และไส้เดือน ฝอยได้ (Allen *et al.*, 1970; Martin and Tzanetakis, 2006)

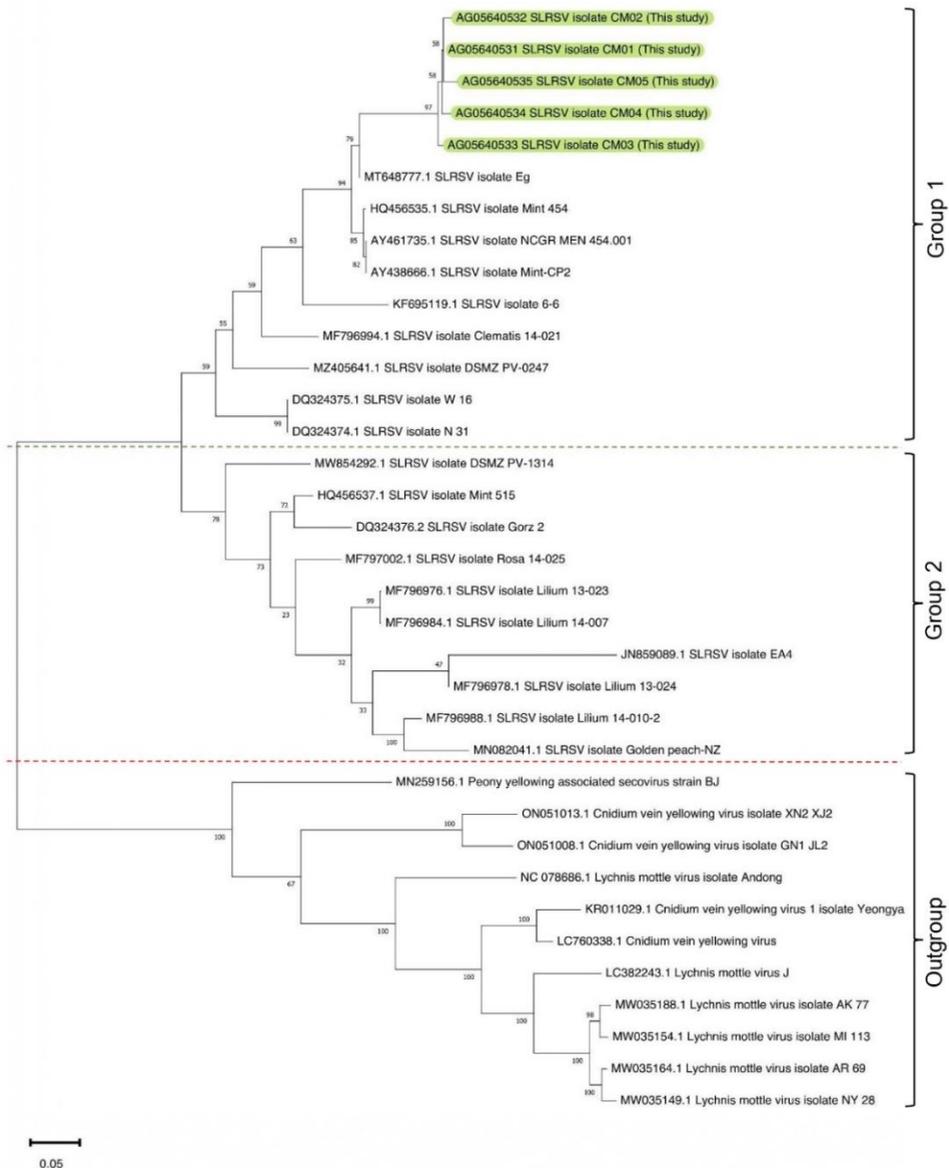


Figure 6. Phylogenetic tree analysis of *CP* gene-RNA 2 sequences of SLRSV showed that the 5 isolates of SLRSV in this study were closely grouped with isolate Eg (MT648777.1), Mint 454 (HQ456535.1), NCGR MEN 454.001 (AY461735.1), Mint-CP2 (AY438666.1), 6-6 (KF695119.1), Clematis 14-021 (MF796994), DSMZ PV-0247 (MZ405641.1), W 16 (DQ324375.1) and N 31 (DQ324374.1) (Group 1). The phylogenetic tree was constructed using MEGA version 11 based on the Maximum Likelihood method and Tamura-Nei model with 1000 bootstrap replicates. The numbers at internal nodes indicate bootstrap percentages, and the scale bar represents 0.05 substitutions per site.

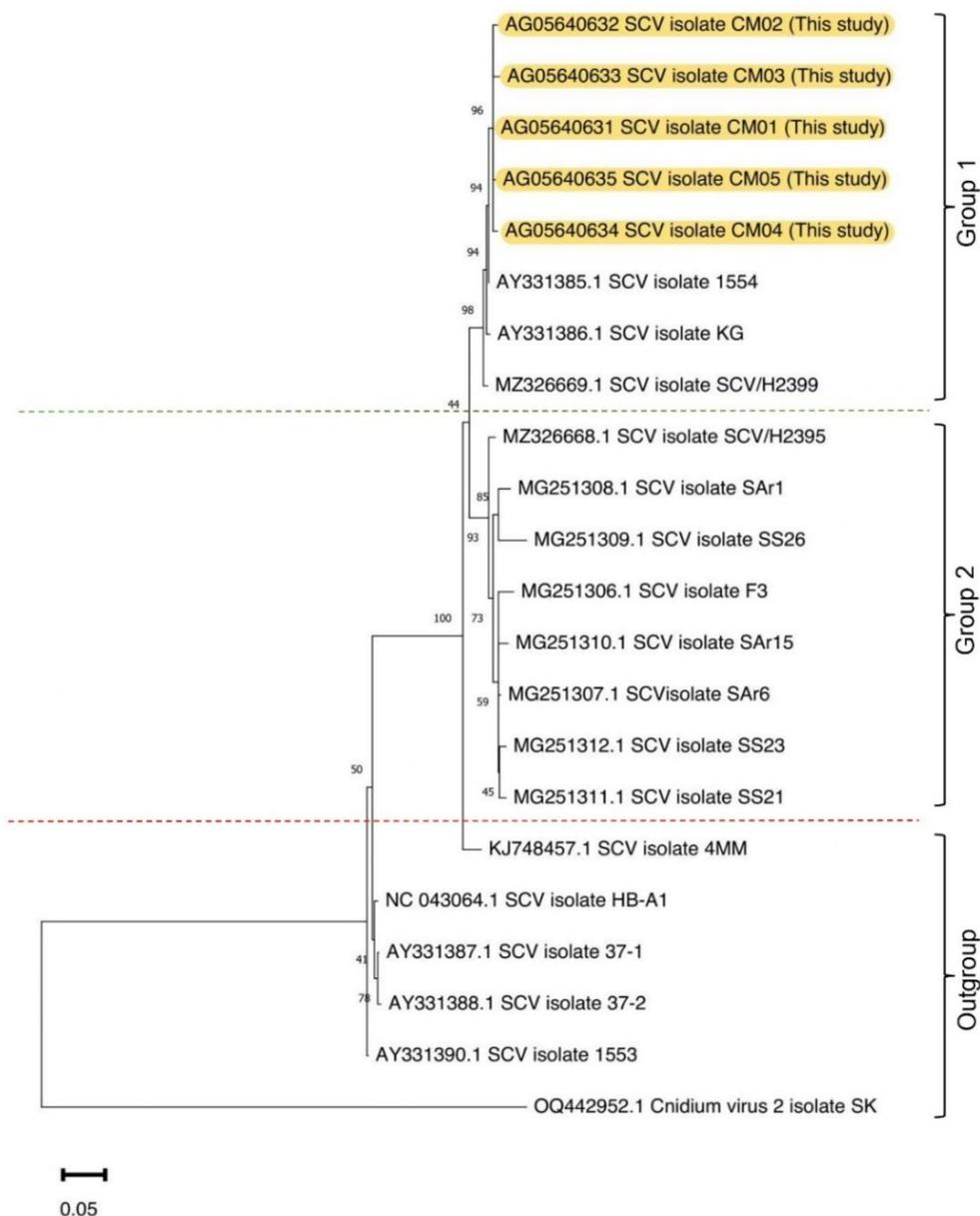


Figure 7. Phylogenetic tree analysis of *L* protein gene sequences of SCV showed that the 5 isolates of SCV in this study were closely grouped with isolate 1554 (AY331385.1), KG (AY331386.1) and H2399 (MZ326669.1) (Group 1). The phylogenetic tree was constructed using MEGA version 11 based on the Maximum Likelihood method and Tamura-Nei model with 1000 bootstrap replicates. The numbers at internal nodes indicate bootstrap percentages, and the scale bar represents 0.05 substitutions per site.

## สรุป

จากการตรวจหาเชื้อไวรัสในสตรอว์เบอร์รี่พันธุ์พระราชทาน 80 จากแปลงเกษตรกรที่บ้านหนองเต่าและบ้านขอบด้ง ตำบลม่อนปิ่น และบ้านแม่อนขี้เหล็ก ตำบลแม่อน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ รวมทั้งหมด 175 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค RT-PCR และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ยืนยันการเข้าทำลายซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส 2 ชนิด ได้แก่ strawberry latent ringspot virus (SLRSV) และ strawberry crinkle virus (SCV) ในตัวอย่างใบที่ไม่แสดงอาการของโรคเป็นส่วนใหญ่ และพบการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัสทั้งสองในตัวอย่างใบที่แสดงอาการของโรค งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธีดังกล่าวมีความแม่นยำสูงเหมาะสมในการนำมาใช้สุ่มตรวจเชื้อไวรัสในสตรอว์เบอร์รี่ที่ปลูกในพื้นที่กว้าง เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรค และลดความเสียหายด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิต

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ดำเนินการภายใต้โครงการตรวจสอบต้นพันธุ์พืชปลอดโรคด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยได้รับการสนับสนุนงบประมาณวิจัยจาก บริษัท ดอยคำผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด

## เอกสารอ้างอิง

Allen, W.R., T.R. Davidson and M.R., Briscoe. 1970. Properties of a strain of Strawberry latent ringspot virus isolated from Sweet Cherry growing in Ontario. *Phytopathology* 60(8): 1262-1265

Barman, P., A.K. Choudhary and R. Geeta. 2017. A modified protocol yields high-quality RNA from highly mucilaginous *Dioscorea* tubers. *3 Biotech* 7(2): 150, doi: 10.1007/s13205-017-0775-9.

Borodynko, N., B. Hasiów, M. Figlerowicz and H. Pospieszny. 2007. Identification of the new strain of *Strawberry latent ringspot virus* isolated from black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Journal of Phytopathology* 155(11-12): 738-742.

Dullemans, A.M., M. Botermans, M.J.D. de Kock, C.E. de Krom, T.A.J. van der Lee, J.W. Roenhorst, I.J.E. Stulemeijer, M. Verbeek, M. Westenberg and R.A.A. van der Vlugt. 2020. Creation of a new genus in the family *Secoviridae* substantiated by sequence variation of newly identified *Strawberry latent ringspot virus* isolates. *Archives of Virology* 165(1): 21-31.

EL- Morsy, Sh.I., M.A. EL-Sheikh, R.A. Abd El-Razik, S.A. Youssef and A.A. Shalaby. 2017. Molecular identification of *Strawberry latent ring spot virus* (SLRSV) in Egypt. *Journal of Basic and Environmental Sciences* 4: 24-33.

Fránová, J., J. Pribylová and I. Koloniuk. 2019. Molecular and biological characterization of a new strawberry *Cytorhabdovirus*. *Viruses* 11(11): 982, doi: 10.3390/v11110982.

Frazier, N.W., E.S. Sylvester and J. Richardson. 1987. Strawberry crinkle. pp. 20-25. *In*: R.H. Converse (ed.). *Virus Disease of Small Fruits*. Agricultural Handbook No.631. USDA, Washington, DC.

Kheder, A.A. 2021. Developed one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (Rt-Lamp) assay for detection of *Strawberry latent ring spot virus*. *Journal of Virological Sciences* 9(1): 1-13.

Klerks, M.M., J.L. Lindner, D. Vaskova, J. Spak, J.R. Thompson, W. Jelkmann and C.D. Schoen. 2004. Detection and tentative

- grouping of *Strawberry crinkle virus* isolates. *European Journal of Plant Pathology* 110: 45-52.
- Koloniuk, I., J. Fránová, T. Sarkisova and J. Pribylová. 2018. Complete genome sequences of two divergent isolates of *strawberry crinkle virus* coinfecting a single strawberry plant. *Archives of Virology* 163(9): 2539-2542.
- Martin, R.R. and I.E. Tzanetakis. 2006. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant Disease* 90(4): 384-396.
- Moyer, C., V.M. Whitaker and N.A. Peres. 2021. Viral diseases of strawberry. *EDIS* 2021(6), doi: 10.32473/edis-pp273-2021.
- Postman, J.D., I.E. Tzanetakis and R.R. Martin. 2004. First report of *Strawberry latent ringspot virus* in a *Mentha* sp. from North America. *Plant Disease* 88(8): 907, doi: 10.1094/PDIS.2004.88.8.907B.
- Posthuma, K. I., A.N. Adams, Y. Hong and M.J. Kirb. 2002. Detection of *Strawberry crinkle virus* in plants and aphids by RT-PCR using conserved L gene sequences. *Plant Pathology* 51(3): 266-274.
- Rao, G.P. and M.G. Reddy. 2020. Overview of yield losses due to plant viruses. pp. 531 - 562. *In*: L.P. Awasthi (ed.). *Applied Plant Virology. Advances, Detection, and Antiviral Strategies*. Academic Press, London.
- Rodrigues, G.B., G.G. Rocha Sobrinho, T. Mituti, A. Bergamin Filho, L. Amorim, J.A. M. Rezende and Q.S. de Novaes, 2019. Etiology, occurrence and epidemiology of a begomovirus disease in passionflower in the southwest of Bahia. *Scientia Agricola* 76(4): 337-343.
- Tamura K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. *MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11*. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022-3027.
- Tamura K. and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10(3): 512-526.
- Tang, J., L.I. Ward and G.R.G. Clover. 2013. The diversity of *Strawberry latent ringspot virus* in New Zealand. *Plant Disease* 97(5): 662-667.
- Thompson, J.R., S. Wetzel, M.M. Klerks, D. Vašková, C.D. Schoen, J. Špak and W. Jelkmann. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *Journal of Virological Methods* 111(2): 85-93.
- Tzanetakis, I.E., J.D. Postman, R.C. Gergerich and R.R. Martin. 2006. A virus between families: Nucleotide sequence and evolution of *Strawberry latent ringspot virus*. *Virus Research* 121(2): 199-204.
-



# ปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคมที่มีผลต่อการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี ของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพรในจังหวัดบุรีรัมย์

## Socio-economic Factors Influencing Good Agricultural Practices of Herbal Farmers in Buriram Province

ปาริชาติ บัวแก้ว และ ไชยธีระ พันธุ์ภักดี\*  
Parichat Buakaew and Chaiteera Panpakdee\*

สาขาวิชาการส่งเสริมและพัฒนาการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

Department of Agricultural Extension and Development, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

\*Corresponding author: E-mail: chaiteera.p@gmail.com; chaitpa@kku.ac.th

(Received: 8 May 2023; Accepted: 6 October 2023)

**Abstract:** The main objective of this study was studied the impact of socio-economic factors on herbal farmers in Buriram Province in their adoption of Good Agricultural Practices (GAP). A total of seventy-six out of ninety-four herbal farmers from Nong Hong, Nong Ki, and Lam Plai Mat Districts, who were officially certified by the Department of Agriculture for herb cultivation in according to the 2022 database, were selected as informants using the Krejcie and Morgan sampling method. Data were collected through a questionnaire which passed the reliability test with a confidence level of 0.86 during March and April 2023. Statistical analyses, including descriptive statistics such as mean, percentages, and standard deviations, as well as inferential statistics of multiple regression analysis, were conducted. The results revealed that herbal farmers had the highest level of adoption of GAP principles in all aspects. The multiple regression analysis also indicated that two socio-economic factors, namely contact with agricultural extension officers and receiving information through various channels, significantly influenced the adoption of GAP at the 0.01 and 0.05 significant levels, respectively. The findings of this study provide empirical data that can assist relevant agencies in planning, promoting, and enhancing the efficiency and effectiveness of herb production.

**Keywords:** Herbal, Good Agricultural Practices, Buriram province

**บทคัดย่อ:** การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคมที่มีผลต่อการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพร ในจังหวัดบุรีรัมย์ กลุ่มตัวอย่างคือเกษตรกรในพื้นที่อำเภอหนองหงส์ อำเภอหนองกี่ และอำเภอลำปลายมาศ จำนวน 76 คน จากจำนวน 94 คน ที่ได้ใบรับรองระบบการผลิตตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับพืชสมุนไพรจากกรมวิชาการเกษตร ตามฐานข้อมูลปี พ.ศ. 2565 กำหนดขนาดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธีของ Krejcie and Morgan เก็บรวบรวมข้อมูลโดยใช้แบบสอบถาม ที่ผ่านการทดสอบคุณภาพด้วยการทดสอบความเชื่อมั่น (reliability) ได้ค่าระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.86 ระหว่างเดือนมีนาคม - เมษายน พ.ศ. 2566 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ คะแนนเฉลี่ย ค่าร้อยละ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเชิงอนุมานด้วยการวิเคราะห์ถดถอยพหุด้วยวิธีปกติ (enter) ผลการวิเคราะห์พบว่า เกษตรกรมีการปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับพืชสมุนไพรอยู่ในระดับมากที่สุด ผลการวิเคราะห์ถดถอยพหุ พบว่า ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.01 และ 0.05 ได้แก่ การติดต่อกับเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตร และความหลากหลายของช่องทางในการได้รับข้อมูลข่าวสาร ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลเชิงประจักษ์จะนำไปสู่การเสนอแนะแนวทางให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องใช้ในการวางแผน ส่งเสริมและพัฒนาการผลิตพืชสมุนไพรให้เกิดประสิทธิภาพและประสิทธิผลต่อไป

**คำสำคัญ:** พืชสมุนไพร การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี จังหวัดบุรีรัมย์

## คำนำ

ปัจจุบันพืชสมุนไพรได้กลายมาเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2564 ประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกของกลุ่มสินค้าเกษตรประเภทเครื่องเทศและสมุนไพรอยู่ที่ 9,004.57 ล้านบาท โดยมีอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2563 ถึงร้อยละ 49.73 (Office of Permanent Secretary Ministry of Commerce, 2022) และมีมูลค่าตลาดผลิตภัณฑ์สมุนไพรภายในประเทศสูงถึง 45,646 พันล้านบาท (Department of International Trade Promotion, 2022) กระแสความต้องการใช้พืชสมุนไพรที่เพิ่มขึ้นเป็นผลสืบเนื่องมาจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคไวรัสโคโรนา 2019 ที่ทำให้ผู้บริโภคหันมาสนใจดูแลสุขภาพมากขึ้น ประกอบกับการเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ (aged society) (Bhoyen, 2019) ที่มาพร้อมการเจ็บป่วยจากโรคเรื้อรังนานาชนิด เพื่อให้เกิดความมั่นคงและลดภาระค่าใช้จ่ายด้านสุขภาพ พืชสมุนไพรจึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา เพื่อทดแทนการใช้สารสังเคราะห์ทางเคมีซึ่งมีราคาแพงและมีผลข้างเคียงสูง (Saggar *et al.*, 2022)

อย่างไรก็ดี การปลูกพืชสมุนไพรเพื่อสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจ ขึ้นอยู่กับคุณภาพของผลผลิตเป็นสำคัญ (Bansal *et al.*, 2016) ซึ่งการรักษาคุณภาพของผลผลิตให้มีคุณภาพคงที่ในทุกกรอบการเพาะปลูก ยังคงเป็นอุปสรรคสำคัญอย่างหนึ่งของการผลิตพืชสมุนไพรในประเทศไทย เนื่องจากมีปัจจัยทางชีวภาพและปัจจัยอื่นที่มีอิทธิพลต่อคุณภาพของพืชสมุนไพร (Bansal *et al.*, 2014) หนึ่งในแนวทางพื้นฐานเพื่อให้ได้มาซึ่งคุณภาพของการผลิตพืชสมุนไพร คือ การนำเอาหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (Good Agricultural Practices: GAP) มาใช้กำกับกับการเพาะปลูก (Chen *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2018) โดยยึดหลักการวิเคราะห์ความเสี่ยงและการป้องกันความเสี่ยง ตั้งแต่ก่อนการเพาะปลูกไปจนถึงหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ นำไปสู่การสร้างมาตรฐานความปลอดภัยให้กับตลาดทั้งในและต่างประเทศ ควบคู่กับการลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมให้น้อยที่สุด (Akkaya *et al.*, 2006; Laosutsan *et al.*, 2019) เพื่อนำไปสู่ความยั่งยืนของสังคม เศรษฐกิจ และสิ่งแวดล้อม (Tilman *et al.*, 2002)

การพัฒนาสมุนไพรไทยภายใต้แผนแม่บทว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรแห่งชาติฉบับที่ 1 (พ.ศ. 2560 - 2564)

ได้มีการนำหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีมาใช้ในการขับเคลื่อนการพัฒนาผลผลิตพืชสมุนไพรเพื่อตอบสนองต่อความต้องการที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน ศึกษาระดับด้านเศรษฐกิจและคุณภาพชีวิตของเกษตรกรได้ (Department of Traditional and Alternative Medicine, 2016) อย่างไรก็ตาม การตัดสินใจเพื่อปรับเปลี่ยนระบบการผลิตของเกษตรกรเข้าสู่ระบบเกษตรปลอดภัย ไม่ได้ถูกขับเคลื่อนเพียงเพราะแรงจูงใจจากผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจเท่านั้น (Laosutsan *et al.*, 2019) แต่ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอีกหลายประการ โดยเฉพาะปัจจัยทางสังคม (social factors) เช่น การได้รับข้อมูลข่าวสารจากเจ้าหน้าที่รัฐหรือเอกชนโดยตรง หรือผ่านช่องทางอื่น ๆ ล้วนมีผลต่อการทำเกษตรแบบปลอดภัยได้อย่างถูกต้อง (Sookplung *et al.*, 2022) หรือแม้แต่การได้รับการสนับสนุนจากคนในครอบครัว และผู้คนในชุมชนทั้งในด้านกำลังใจ และข้อมูลข่าวสาร ล้วนเป็นแรงผลักดันที่ทำให้การทำเกษตรแบบปลอดภัยประสบผลสำเร็จ (Maneechoti and Athinuwat, 2019) เพราะปัจจัยทางสังคมเหล่านี้สามารถสร้างภูมิคุ้มกันที่ดีให้กับเกษตรกร อันจะนำไปสู่การปรับเปลี่ยนแนวคิดสู่ระบบเกษตรปลอดภัยได้อย่างมั่นคง (Sookplung *et al.*, 2022)

จังหวัดบุรีรัมย์ เป็นหนึ่งในจังหวัดที่มีการเพาะปลูกและใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคควบคู่กับแพทย์แผนปัจจุบันในปริมาณมาก และกลายเป็นพื้นที่เป้าหมายของการดำเนินงานภายใต้โครงการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชสมุนไพรของกรมส่งเสริมการเกษตร ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 อีกทั้งมีแผนยุทธศาสตร์ในการพัฒนาจังหวัดที่มุ่งเน้นให้เกิดการพัฒนาเศรษฐกิจภายใต้พื้นฐานของการผลิตสินค้าเกษตรปลอดภัย (Buriram Provincial Agriculture and Cooperatives Office, 2020; Department of Agricultural Extension, 2023) อย่างไรก็ตาม พบว่า จังหวัดบุรีรัมย์มีแหล่งเพาะปลูกพืชสมุนไพรปลอดภัยมากที่สุดกระจุกตัวอยู่ในพื้นที่อำเภอหนองหงส์ อำเภอหนองกี่ และอำเภอลำปลายมาศ และจากข้อมูลของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรบุรีรัมย์ ปี พ.ศ. 2565 ระบุว่าทั้ง 3 อำเภอมีพื้นที่เพาะปลูกพืชสมุนไพรที่ได้รับการรับรองมาตรฐานการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีรวม 163 ไร่ (79%) จาก

พื้นที่ที่ได้รับการรับรองมาตรฐานฯ ทั้งหมดของจังหวัดจำนวน 206.33 ไร่ (Department of Agriculture, 2022) แม้ว่าช่วงที่ผ่านมาจังหวัดบุรีรัมย์ได้มีการส่งเสริมและพัฒนาการผลิตพืชสมุนไพรให้ได้คุณภาพและมาตรฐานต่อเนื่องมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2561 (Buriram Provincial Office, 2020) แต่เกษตรกรในพื้นที่จังหวัดบุรีรัมย์ส่วนใหญ่ยังคงมีข้อจำกัดต่อการปฏิบัติเพื่อเข้าสู่ระบบการรับรองตามมาตรฐานฯ

จากข้อมูลดังกล่าวมา จะเห็นได้ว่าการปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของผู้ปลูกพืชสมุนไพรในพื้นที่อำเภอหนองหงส์ อำเภอหนองกี่ และอำเภอลำปลายมาศ จังหวัดบุรีรัมย์ เป็นประเด็นการวิจัยที่น่าสนใจ เพราะจะทำให้ทราบถึงปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคมที่ส่งผลให้เกษตรกรเกิดการปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี เพื่อใช้เป็นข้อมูลให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกำหนดแนวทางในการส่งเสริมและพัฒนาการผลิตพืชสมุนไพรในพื้นที่จังหวัดบุรีรัมย์ให้เกิดประสิทธิภาพและประสิทธิผลต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่นตามหมายเลขสำคัญโครงการ HE663026

## ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ เกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพรที่ได้ใบรับรองระบบการผลิตตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับพืชสมุนไพรจากกรมวิชาการเกษตร ตามฐานข้อมูล ปี พ.ศ. 2565 ในพื้นที่อำเภอหนองหงส์ อำเภอหนองกี่ และอำเภอลำปลายมาศ จังหวัดบุรีรัมย์ จำนวน 94 คน โดยกำหนดขนาดกลุ่มตัวอย่างตามวิธีของ Krejcie and Morgan (1970) ซึ่งยอมรับให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการสุ่มตัวอย่างที่ระดับ 0.05 ได้กลุ่มตัวอย่างจำนวน 76 คน และใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย (simple random sampling) โดยการจับสลากรายชื่อเกษตรกรผู้ปลูกพืช

สมมุติฐานตามมาตรฐานการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (กลุ่มพืชสมุนไพร) จากฐานข้อมูลของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรบุรีรัมย์

### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ใช้ระเบียบวิธีการวิจัยแบบผสม (mixed method) ด้วยวิธีการวิจัยเชิงสำรวจ (survey research) โดยใช้แบบสอบถาม (questionnaire) ซึ่งประกอบด้วยคำถามปลายปิด (close-ended question) และคำถามปลายเปิด (open-ended question) และใช้วิธีการวิเคราะห์เนื้อหา (content analysis) ในคำถามปลายเปิดเพื่อจัดหมวดหมู่ข้อมูล และค้นหาว่ามีข้อมูลใดบ้างที่เกี่ยวข้องกับแบบสอบถาม ซึ่งสามารถนำมาใช้อธิบายและสนับสนุนผลทางสถิติได้ ทั้งนี้ แบบสอบถามได้ผ่านการทดสอบคุณภาพด้วยการทดสอบความเชื่อมั่น (reliability) กับกลุ่มตัวอย่างซึ่งมีลักษณะใกล้เคียง แต่ไม่ใช่กลุ่มตัวอย่างจริงในการวิจัยจำนวน 30 คน ได้ค่าระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.86 ซึ่งถือว่ามีความน่าเชื่อถือต่อการนำไปใช้กับกลุ่มตัวอย่างของการวิจัย (Wongsa, 2021) เก็บรวบรวมข้อมูลในช่วงเดือนมีนาคม - เมษายน พ.ศ. 2566 ใช้กลุ่มตัวอย่างกลุ่มเดียวกัน จำนวน 76 คน เพื่อตอบแบบสอบถามสำหรับข้อมูลเชิงปริมาณและข้อมูลเชิงคุณภาพ และทุกคนได้ตอบแบบสอบถามที่ประกอบด้วยคำถามปลายปิดและปลายเปิด ซึ่งอยู่ในฉบับเดียวกันทุกคน เพื่อรวบรวมข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคล ข้อมูลด้านปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคมซึ่งได้จากการทบทวนวรรณกรรม และพบว่าปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคมสำคัญ ๆ ที่มีผลต่อการปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี มีอยู่ 6 ปัจจัย ได้แก่ 1) การติดต่อกับเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตร 2) การเป็นสมาชิกกลุ่มหรือสถาบันทางการเกษตร 3) การมีตำแหน่งทางสังคม 4) การได้รับความช่วยเหลือจากภาครัฐหรือภาคเอกชน 5) การได้รับการยอมรับทางสังคมจากการเป็นเจ้าของที่ดินทำกินอย่างถูกต้องกฎหมาย และ 6) ความหลากหลายของช่องทางการได้รับข้อมูลข่าวสาร (Laosutsan *et al.*, 2019; Maneechoti and Athinuwat, 2019; Sookplung *et al.*, 2022)

### การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลเชิงคุณภาพที่รวบรวมได้จะใช้การวิเคราะห์เนื้อหา (content analysis) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูปเพื่อการวิจัยทางสังคมศาสตร์ โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ค่าร้อยละ (percentage) ค่าต่ำสุด (minimum) ค่าสูงสุด (maximum) และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation : S.D.) เพื่ออธิบายข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคล ข้อมูลด้านเศรษฐกิจและสังคมบางประการของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพร และคำนวณค่าคะแนนเฉลี่ย ค่าร้อยละ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์และอธิบายข้อมูลถึงระดับการปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพร จากการให้ข้อมูลเกี่ยวกับการปฏิบัติ ของกลุ่มตัวอย่างตามมาตรวัด 5 ระดับ ตามหลักของ Likert scale กำหนดการวัดค่าระดับการปฏิบัติ มีคะแนนต่ำสุด คือ 1 และคะแนนสูงสุด คือ 5 (5 = มากที่สุด 4 = มาก 3 = ปานกลาง 2 = น้อย 1 = น้อยที่สุด) และกำหนดเกณฑ์การแปลความหมายโดยการแบ่งสรุปออกเป็น 5 อันตรภาคชั้นคำนวณจากสูตร (ค่าสูงสุด - ค่าต่ำสุด)/จำนวนอันตรภาคชั้น ได้เกณฑ์ คือ ค่าคะแนนเฉลี่ย 4.21 - 5.00 หมายถึง ปฏิบัติมากที่สุด 3.41 - 4.20 หมายถึง ปฏิบัติมาก 2.61 - 3.40 หมายถึง ปฏิบัติปานกลาง 1.81 - 2.60 หมายถึง ปฏิบัติน้อย 1.00 - 1.80 หมายถึง ปฏิบัติน้อยที่สุด (Senanayake and Rathnayaka, 2017) และใช้สถิติเชิงอนุมาน การวิเคราะห์การถดถอยพหุด้วยวิธีปกติ (enter multiple regression analysis) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคมที่มีผลต่อการปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพรในจังหวัดบุรีรัมย์ ตามสมการพยากรณ์ ดังนี้

$$Y = a + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5 + b_6X_6$$

โดยกำหนดให้ Y คือ ตัวแปรตาม (Y = ระดับการปฏิบัติ), a คือ ค่าคงที่ (constant), b1-6 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระตัวที่ 1 ถึงตัวที่ 6, X คือ ตัวแปรอิสระ ซึ่งตัวแปรตามและตัวแปรอิสระที่ใช้ในสมการมีรายละเอียดดังแสดงไว้ใน Table 1

Table 1. Details of the dependent and independent variables used in the multiple regression equation

Variables	Detail
Good agricultural practices level (Y)	mean of practice level
Contact with agricultural extension officers (X <sub>1</sub> )	times/year
Membership in an agricultural group or institution (X <sub>2</sub> )	number
Social status (X <sub>3</sub> )	1 = yes, 0 = no
Access to public or private sector assistance (X <sub>4</sub> )	1 = received, 0 = not received
Gaining social acceptance from being ownership of legally cultivated land (X <sub>5</sub> )	1 = owner, 0 = hire
Receiving information through various channels (X <sub>6</sub> )	number

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

### ข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคล ของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพร

ผลการศึกษาพบว่า เกษตรกรส่วนใหญ่เป็นเพศหญิง (64.50 %) ที่กำลังเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ โดยมีอายุเฉลี่ย 53.43 ปี มีอายุน้อยที่สุด คือ 26 ปี และอายุมากที่สุด คือ 72 ปี (S.D. = 8.04) มีสถานภาพสมรส (85.30 %) จบการศึกษาในระดับประถมศึกษา (53.30 %) มีจำนวนสมาชิกในครัวเรือนเฉลี่ย 4.92 คน ต่ำสุด 2 คน สูงสุด 9 คน (S.D. = 1.48) มีจำนวนแรงงานในการปลูกพืชสมุนไพร เฉลี่ย 3.87 คน โดยมีจำนวนแรงงานน้อยที่สุด คือ 1 คน และจำนวนแรงงานมากที่สุด คือ 13 คน (S.D. = 2.33) ทั้งนี้เป็นแรงงานในครัวเรือนเฉลี่ย 2.59 คน ต่ำสุด 1 คน สูงสุด 6 คน (S.D. = 1.20) และในบางครัวเรือนมีการใช้แรงงานจ้าง (นอกครัวเรือน) เฉลี่ย 2.97 คน ต่ำสุด 1 คน สูงสุด 10 คน (S.D. = 2.35)

### ข้อมูลทางด้านเศรษฐกิจและสังคม ของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพร

ผลการศึกษาพบว่า เกษตรกรมีการติดต่อกับเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตรโดยเฉลี่ยที่ 3.99 ครั้งต่อปี ต่ำสุด 1 ครั้งต่อปี สูงสุด 20 ครั้งต่อปี (S.D. = 3.72) ซึ่งประเด็นหลักที่มีการติดต่อกับเจ้าหน้าที่ฯ เป็นเรื่อง

เกี่ยวกับพื้นที่ปลูก (18.90 %) อีกทั้งมีการเข้าร่วมเป็นสมาชิกกลุ่มเฉลี่ย 1.68 กลุ่ม ต่ำสุด 1 กลุ่ม สูงสุด 4 กลุ่ม (S.D. = 0.86) ส่วนใหญ่เป็นสมาชิกของวิสาหกิจชุมชน/เครือข่ายวิสาหกิจชุมชนเพาะปลูกหรือแปรรูปพืชสมุนไพร (35.50 %) และไม่ได้มีตำแหน่งทางสังคม (78.90 %) ในช่วง 1 ปีที่ผ่านมา (ปี พ.ศ. 2565) เคยได้รับความช่วยเหลือจากภาครัฐ หรือภาคเอกชนเกี่ยวกับการเพาะปลูกพืชสมุนไพร (80.30 %) โดยได้รับความช่วยเหลือในด้านองค์ความรู้ (41.60 %) และด้านปัจจัยการผลิต เช่น ปุ๋ย และเมล็ดพันธุ์ (32.80 %) เป็นหลัก มีพื้นที่เพาะปลูกพืชสมุนไพรปลอดภัยเกือบทั้งหมดถูกต้อง ครองอย่างถูกต้องตามกฎหมายโดยของครัวเรือน (98.70%) ซึ่งถือเป็นข้อกำหนดหลักที่สำคัญในด้านพื้นที่ปลูก และในช่วง 1 ปีที่ผ่านมา (ปี พ.ศ. 2565) เกษตรกรได้รับข้อมูลข่าวสารเกี่ยวกับการผลิตพืชสมุนไพร ปลอดภัย ผ่านช่องทางสื่อที่มีความหลากหลาย เฉลี่ย 2.61 ช่องทางสื่อ ต่ำสุด 1 ช่องทางสื่อ สูงสุด 3 ช่องทางสื่อ (S.D. = 0.66) ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่ได้รับข้อมูลข่าวสารผ่านสื่อ 3 ช่องทางสื่อ ได้แก่ สื่อแบบบุคคล (เจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตร ญาติพี่น้องที่ปลูกพืชสมุนไพรปลอดภัย และเพื่อนบ้าน/หมู่บ้านใกล้เคียง) สื่อแบบกลุ่ม (การจัดการฝึกอบรม/สาธิต การเยี่ยมเยียนเกษตรกรคนอื่น และการไปทัศนศึกษาดูงาน) และสื่อแบบมวลชน (เผยแพร่ทางอินเทอร์เน็ต เผยแพร่ทางโทรทัศน์ และเผยแพร่ผ่านแผ่นพับหรือโปสเตอร์) พร้อม

กันสูงถึงร้อยละ 69.70 และมีประเด็นเนื้อหาเกี่ยวกับการผลิตพืชสมุนไพรปลอดภัย ที่เกษตรกรได้รับข้อมูลข่าวสารมากที่สุด คือ ด้านพื้นที่ปลูก (31.10%)

### การปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพร

การปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพร ดัง Table 2 คะแนนเฉลี่ยแสดงให้เห็นว่า เกษตรกรปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีรวมทุกด้านอยู่ในระดับมากที่สุด ค่าเฉลี่ยรวม 4.49 (S.D.=0.41) เมื่อพิจารณาเป็นรายด้านพบว่า เกษตรกรมีค่าเฉลี่ยการปฏิบัติสูงสุดอยู่ในด้านการเก็บรักษาและการขนย้าย ค่าเฉลี่ย 4.78 (S.D.=0.38) ซึ่งมีประเด็นย่อยการปฏิบัติเรียงตามลำดับ คือ มีการใช้ภาชนะและพาหนะในการขนย้ายที่สะอาดปราศจากสิ่งที่เป็นอันตรายและกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ มีการใช้ภาชนะบรรจุที่สะอาด สามารถป้องกันแสงหรือพรางแสงได้ และมีความเหมาะสมต่อชนิดของวัตถุดิบสมุนไพร มีการเก็บรักษาพืชสมุนไพรไว้ในสถานที่ถูกสุขลักษณะ อากาศถ่ายเทสะดวก มีวิธีการป้องกันไม่ให้พืชสมุนไพรมีความชื้นเพิ่มขึ้นระหว่างการขนย้าย และมีวัสดุรองพื้นก่อนวางภาชนะบรรจุวัตถุดิบสมุนไพร ส่วนในประเด็นการปฏิบัติรองลงมา ได้แก่ ด้านการเก็บเกี่ยวและการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว ค่าเฉลี่ย 4.73 (S.D.=0.42) ซึ่งมีประเด็นย่อยการปฏิบัติเรียงตามลำดับ คือ มีการใช้อุปกรณ์ ภาชนะบรรจุ รวมทั้งวัสดุที่สัมผัสกับพืชสมุนไพรโดยตรงที่สะอาดและไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อน มีการขนย้ายผลิตภัณฑ์ในแปลงปลูกด้วยความระมัดระวัง และมีการป้องกันการปนเปื้อนที่เป็นอันตรายต่อพืชสมุนไพร มีการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว และ/หรือลดความชื้นที่เหมาะสม มีการป้องกันสัตว์เลื้อยคลานไม่ให้อยู่ในบริเวณปฏิบัติงานและสถานที่เก็บรักษา และเก็บเกี่ยวพืชสมุนไพรแต่ละชนิดในระยะเวลาที่เหมาะสม ถูกสุขลักษณะ โดยคำนึงถึงปริมาณสารสำคัญเป็นหลัก และด้านวัตถุดิบทางการเกษตร ค่าเฉลี่ย 4.72 (S.D.=0.51) ซึ่งมีประเด็นย่อยการปฏิบัติเรียงตามลำดับ คือ อาบน้ำ สระผม เปลี่ยนเสื้อผ้าทันทีหลังการพ่นยาหรือสารเคมี และซักเสื้อผ้าที่สวมใส่ขณะฉีดพ่นโดยซักแยกจากเสื้อผ้าปกติทุกครั้ง มีการใช้ระบบ

การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานที่เหมาะสม เพื่อช่วยลดการใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตร ใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตร และหยุดใช้ก่อนการเก็บเกี่ยว ตามคำแนะนำหรืออ้างอิงจากเอกสารราชการหรือบนฉลาก เลือกใช้เครื่องพ่น อุปกรณ์ วิธีการพ่นสารเคมีที่ถูกต้อง และล้างทำความสะอาดเครื่องพ่นสารเคมีรวมถึงอุปกรณ์ภายหลังการใช้ทุกครั้ง และกำจัดน้ำล้างด้วยวิธีที่ไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนสูดดม โดยมียางพื้นพื้นที่ปลูกเท่านั้นที่มีการปฏิบัติอยู่ในระดับมาก มีค่าเฉลี่ย 4.12 (S.D.=0.78) ซึ่งมีประเด็นย่อยการปฏิบัติเรียงตามลำดับ คือ มีการดูแลรักษาพื้นที่ปลูกพืชสมุนไพร เพื่อป้องกันการเสื่อมโทรมของดิน มีการวางผังแปลง จัดทำแปลง หรือปรับปรุงผังแปลง โดยคำนึงถึงผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ สิ่งแวดล้อม สุขภาพ ความปลอดภัย และสวัสดิภาพของผู้ปฏิบัติงาน ก่อนการเพาะปลูกได้เก็บตัวอย่างดินเพื่อส่งตรวจอย่างน้อย 1 ครั้ง และเก็บตัวอย่างดินเพิ่มทุกครั้งในช่วงเวลาที่มีสภาพแวดล้อมเสี่ยงต่อการปนเปื้อน มีการจัดทำรหัสแปลงปลูก ข้อมูลประจำแปลงปลูก ทั้งชื่อ ข้อมูลการติดต่อ ข้อมูลแปลงปลูก รวมถึงข้อมูลพืชที่ปลูก และมีการจัดทำประวัติการใช้ที่ดินย้อนหลังอย่างน้อย 2 ปี

จากผลการศึกษาชี้ว่า ในหลักการปฏิบัติทั้ง 8 ด้าน เกษตรกรมีการปฏิบัติในระดับมากที่สุด 7 ด้าน โดยเกษตรกรให้ความสำคัญต่อการปฏิบัติตามค่าเฉลี่ยที่สูงที่สุด คือ ด้านการเก็บรักษาและการขนย้าย ด้านการเก็บเกี่ยวและการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว และด้านวัตถุดิบทางการเกษตร ซึ่งเป็นการปฏิบัติที่มีความเกี่ยวข้องกับการจัดการกับผลผลิตพืชสมุนไพรโดยตรง อาจเนื่องมาจากเกษตรกรได้รับความรู้จากเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตร และมีประสบการณ์ในการปฏิบัติเพื่อส่งจำหน่ายผลผลิตให้กับบริษัทรับซื้อ จึงสามารถจัดการสุขลักษณะของสถานที่เพื่อเก็บรักษาผลผลิตพืชสมุนไพรได้อย่างถูกสุขลักษณะ และเกษตรกรมองว่าการเตรียมผลผลิตพืชสมุนไพรเพื่อจะส่งจำหน่ายนั้น ต้องเตรียมให้มีความพร้อมสำหรับการอยู่ระหว่างการขนส่งเป็นเวลานาน แม้จะมีการขนส่งบนรถตู้เย็นที่สามารถรักษาความสดใหม่และป้องกันการปนเปื้อนของผลผลิตไว้ได้

Table 2. The understanding level towards herbal growing methods under the standards of good agricultural practices

Good agricultural practices	Mean	S.D.	Practice level
1. Water	4.46	0.57	Highest
2. Planting area	4.12	0.78	High
3. Pesticides	4.72	0.51	Highest
4. Pre-harvest quality management	4.41	0.60	Highest
5. Harvest and post-harvest handlings	4.73	0.42	Highest
6. Storage and Transportation	4.78	0.38	Highest
7. Personal hygiene	4.49	0.57	Highest
8. Record keeping and traceability	4.21	0.87	Highest
Mean	4.49	0.41	Highest

แต่เกษตรกรมองว่าการป้องกันผลผลิตไม่ให้เสียหายตั้งแต่ระดับการปฏิบัติจะช่วยลดปัญหาที่จะเกิดขึ้นตามมาภายหลังได้

นอกจากนี้ ในกระบวนการเก็บเกี่ยวและการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว เกษตรกรมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตพืชสมุนไพรตามอายุการเก็บเกี่ยวเท่านั้น ไม่ได้เร่งเก็บเกี่ยวผลผลิตตามความต้องการของตลาด เนื่องจากมองว่าผลผลิตพืชสมุนไพรมีคุณภาพและใช้ประโยชน์ได้มากที่สุดเมื่อมีปริมาณสารสำคัญที่สูง และการคำนึงถึงอายุการเก็บเกี่ยวทำให้ไม่สูญเสียผลผลิตไปโดยเปล่าประโยชน์ ซึ่ง Kanokhong *et al.* (2019) พบเช่นเดียวกันว่า เกษตรกรมีการยอมรับการปลูกพืชตามหลักการปฏิบัติตามแนวทางเกษตรที่ดี โดยมีการยอมรับไปปฏิบัติมากที่สุดในด้านกรเก็บเกี่ยวและการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว และด้านการเก็บรักษาและการขนย้าย

ส่วนในด้านวัตถุดิบตรงทางการเกษตร อาจเนื่องมาจากการที่เกษตรกรได้รับข้อมูลข่าวสารเกี่ยวกับสารเคมีต้องห้ามให้มีในผลผลิตจากเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตรของบริษัทรับซื้อ ซึ่งไม่อาจจะเลิกต่อการปฏิบัติได้ เนื่องจากผลของการปฏิบัติจะไปแสดงเมื่อมีการสุ่มตรวจผลผลิตของบริษัทในแต่ละรอบจำหน่าย หากพบการปนเปื้อนของสารเคมีเกิดขึ้น ก็ทำให้ผลผลิตในรอบจำหน่ายนั้นถูกปฏิเสธการรับซื้อทั้งหมด

ส่วนการปฏิบัติในด้านพื้นที่ปลูก ที่มีการปฏิบัติในระดับมาก ซึ่งประเด็นการปฏิบัติในด้านนี้ยังมีบางประเด็นที่ไม่ได้เน้นการปฏิบัติมากเท่าที่ควร โดยเฉพาะในประเด็นของการจัดทำประวัติการใช้ที่ดินย้อนหลังอย่างน้อย 2 ปี เนื่องจากเกษตรกรยังขาดข้อมูลที่ชัดเจนในการปฏิบัติ จึงถือว่าไม่ใช่ประเด็นที่มีความสำคัญส่งผลให้เกษตรกรยังละเลยต่อการปฏิบัติ ขณะที่ Phromkiang *et al.* (2020) พบเช่นเดียวกันในการปฏิบัติตามแนวทางการเกษตรที่ดีของเกษตรกรผู้ปลูกหม่อนในด้านพื้นที่ปลูก เกษตรกรยังมีการปฏิบัติที่ไม่มากนัก และยังไม่มีความรู้พอที่จะรู้ว่าปลูกหม่อนแบบใดให้เหมาะสมกับดินแบบไหน จึงจะถูกต้องตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี

### ปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคมที่มีผลต่อการยอมรับการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี ของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพร

ผลการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระด้วยตนเอง (multicollinearity) พบว่า ไม่มีตัวแปรอิสระคู่ใดมีค่าสหสัมพันธ์สูงกว่า 0.70 และไม่มีตัวแปรอิสระตัวใดมีค่าองค์ประกอบความแปรปรวนที่สูงเกินกว่าความเป็นจริง (Variance inflation factor : VIF) เกินกว่า 10 ( $X_1 = 1.12, X_2 = 1.26, X_3 = 1.10, X_4 = 1.85,$

X5 = 1.13, X6 = 1.81) ที่ทำให้เกิดปัญหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระด้วยตัวเอง ซึ่งเป็นการละเมิดข้อสมมติฐานการวิเคราะห์ถดถอยพหุ (Phuseeorn, 2018)

ผลการวิเคราะห์ถดถอยพหุ โดยการนำเอาตัวแปรอิสระทั้ง 6 ตัวแปร ได้แก่ การติดต่อกับเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตร การเป็นสมาชิกกลุ่มหรือสถาบันทางการเกษตร การมีตำแหน่งทางสังคม การได้รับความช่วยเหลือจากภาครัฐหรือภาคเอกชน การได้รับการยอมรับทางสังคมจากการเป็นเจ้าของที่ดินทำกินอย่างถูกกฎหมาย และความหลากหลายของช่องทางการได้รับข้อมูลข่าวสาร เข้าไปในสมการแล้วคำนวณด้วยวิธีปกติ (enter) พบว่า ค่า  $F = 3.314$  Sig of  $F = 0.009$  แสดงว่ามีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัวที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับตัวแปรตาม คือ การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของผู้ปลูกพืชสมุนไพร (ค่าเฉลี่ยของการปฏิบัติรวม)

ค่าการวิเคราะห์ถดถอยพหุ เพื่อหาปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคมที่มีผลต่อการยอมรับการ-ปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของผู้ปลูกพืชสมุนไพร ในจังหวัดบุรีรัมย์ (Table 3) พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจในเชิงพหุ (multiple coefficient of determination,  $R^2$ ) มีค่าเท่ากับ 0.311 หมายความว่า ตัวแปรอิสระทั้ง 6 ตัวแปร ร่วมกันอธิบายความผันแปรของการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของผู้ปลูกพืชสมุนไพร ได้ร้อยละ 31.10 ซึ่งตัวแปรอิสระ

ทั้ง 6 ตัวแปร มี 2 ตัวแปร ที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อตัวแปรตามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 และ 0.05 ได้แก่ การติดต่อกับเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตร และความหลากหลายของช่องทางการได้รับข้อมูลข่าวสาร

จากผลการศึกษาข้างต้น สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัยดังกล่าวได้ว่า เกษตรกรที่มีการติดต่อกับเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตรทั้งภาครัฐและภาคเอกชนอย่างสม่ำเสมอ และได้รับข้อมูลข่าวสารผ่านสื่อที่หลากหลายช่องทาง ทั้งจากสื่อแบบบุคคล แบบกลุ่ม และแบบมวลชน ย่อมได้รับคำแนะนำหรือข้อมูลข่าวสารใหม่ ๆ ทำให้เกษตรกรมองเห็นโอกาส ความเป็นไปได้ และข้อดีของการเข้าสู่ระบบการเพาะปลูกพืชสมุนไพรปลอดภัย เกษตรกรจึงมีแนวโน้มในการนำคำแนะนำ หรือนำองค์ความรู้ไปสู่การปฏิบัติมากกว่าเกษตรกรที่ไม่ได้มีการติดต่อกับเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตร หรือไม่มีการเปิดรับข้อมูลข่าวสารใหม่ ๆ ซึ่งสอดคล้องกับ Khumdee *et al.* (2022) พบว่า การติดต่อกับเจ้าหน้าที่ มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการปฏิบัติเกษตรที่ดีของเกษตรกรผู้ปลูกสตรอว์เบอร์รี เพราะเกษตรกรมองว่าเจ้าหน้าที่ เป็นแหล่งความรู้หลัก รวมทั้ง Li and Wu (2021) ระบุไว้เช่นเดียวกันว่า การที่เกษตรกรได้รับความรู้และข้อมูลเชิงลึกจากเจ้าหน้าที่ มีส่วนสำคัญที่ทำให้เกษตรกรเกิดการปฏิบัติตามการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีเป็นอย่างมาก

Table 3. Multiple regression analysis of socio-economic factors influencing the adoption of good agricultural practices

Variables	Coefficient (b)	t	P-value
Constant	4.511	8.361	<0.001
1. Contact with agricultural extension officers	0.058	3.106	0.003**
2. Membership in an agricultural group or institution	-0.456	-1.193	0.239
3. Social status	-0.136	-1.049	0.300
4. Access to public or private sector assistance	-0.234	-1.298	0.201
5. Gaining social acceptance from being ownership of legally cultivated land	-0.159	-0.412	0.682
6. Receiving information through various channels	0.236	2.385	0.021*
<b>R = 0.558</b>	<b>R<sup>2</sup> = 0.311</b>	<b>SEE = 0.35809</b>	<b>F = 3.314</b>
			<b>Sig of F = 0.009</b>

Remarks: \* Significant different at  $P \leq 0.05$ , \*\* Significant different at  $P \leq 0.01$

สำหรับประเด็นของการได้รับข้อมูลข่าวสารจากหลากหลายแหล่ง สอดคล้องกับ Kigatiira *et al.* (2018) ระบุว่า การได้รับข้อมูลข่าวสารจากสื่อแบบบุคคล และสื่อแบบมวลชนไปพร้อม ๆ กัน ส่งผลให้เกษตรกรในประเทศเคนยายอมรับการเพาะปลูกมันฝรั่งไอร์ิชในอัตราที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยอิทธิพลของการสื่อสารแบบมวลชนมีส่วนสำคัญในการถ่ายทอดข้อมูล และสร้างความตระหนักรู้ ในขณะที่การสื่อสารแบบบุคคลนำมาซึ่งการเปลี่ยนแปลงทัศนคติจนนำไปสู่การยอมรับมันฝรั่งไอร์ิชในที่สุด

### สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคมที่มีผลต่อการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพร ในจังหวัดบุรีรัมย์ ในพื้นที่อำเภอหนองหงส์ อำเภอหนองกี่ และอำเภอลำปลายมาศ จำนวน 76 คน สามารถสรุปผลการวิจัยได้ว่า เกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพรมีการปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ตีรวมทั้ง 8 ด้าน อยู่ในระดับปฏิบัติมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามพบว่า เกษตรกรมีค่าเฉลี่ยระดับการปฏิบัติในด้านที่เกี่ยวข้องกับการจัดการผลผลิตโดยตรง ได้แก่ ด้านการเก็บรักษาและการขนย้าย ด้านการเก็บเกี่ยวและการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว และด้านวัตถุอันตรายทางการเกษตร มากกว่าประเด็นด้านอื่น ๆ ในขณะที่ในด้านพื้นที่ปลูก เกษตรกรมีค่าเฉลี่ยระดับการปฏิบัติที่น้อยที่สุด เมื่อใช้การวิเคราะห์ถดถอยพหุด้วยวิธีปกติ วิเคราะห์ปัจจัยทางเศรษฐกิจและสังคม 6 ปัจจัย ได้แก่ การติดต่อกับเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตร การเป็นสมาชิกกลุ่มหรือสถาบันทางการเกษตร การมีตำแหน่งทางสังคม การได้รับความช่วยเหลือจากภาครัฐหรือภาคเอกชน การได้รับการยอมรับทางสังคมจากการเป็นเจ้าของที่ดิน ทำกินอย่างถูกกฎหมาย และความหลากหลายของช่องทาง การได้รับข้อมูลข่าวสาร ว่ามีปัจจัยใดที่มีผลต่อการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพร ในจังหวัดบุรีรัมย์ ผลการศึกษาพบว่า ปัจจัยด้านการติดต่อกับเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตร และความหลากหลายของช่องทาง การได้รับข้อมูลข่าวสาร มี

ผลทางบวกต่อการยอมรับการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีของเกษตรกรผู้ปลูกพืชสมุนไพร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 และ 0.05 ซึ่งข้อมูลดังกล่าวข้างต้นสามารถใช้เป็นแนวทางในการวางแผน เพื่อส่งเสริมและพัฒนาการเพาะปลูกพืชสมุนไพร ได้ดังนี้

1. เจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตรทั้งภาครัฐและภาคเอกชนมีบทบาทที่สำคัญต่อการส่งเสริมการปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี ดังนั้นควรมีการติดตาม เยี่ยมเยียน เพื่อรับทราบปัญหาและให้คำแนะนำการปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีกับเกษตรกรอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ เพื่อให้เกษตรกรเกิดความเข้าใจ และเห็นถึงความสำคัญของการปฏิบัติตามข้อกำหนดในทุก ๆ ด้าน โดยอาศัยการใช้สื่อในการถ่ายทอดข้อมูล ความรู้ที่หลากหลายรูปแบบ ทั้งสื่อแบบบุคคล สื่อแบบกลุ่ม และสื่อแบบมวลชน เพื่อให้เกษตรกรเกิดการรับรู้ เกิดความเข้าใจ และนำไปสู่การปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง
2. หน่วยงานส่งเสริมการเกษตร ควรมีการบูรณาการร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะกรมวิชาการเกษตร ซึ่งเป็นหน่วยตรวจรับรอง ร่วมกันพัฒนาคู่มือ เอกสารให้ความรู้และสื่อประชาสัมพันธ์เกี่ยวกับการปลูกและการปฏิบัติดูแลรักษาพืชสมุนไพรตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี โดยเน้นความหลากหลาย สร้างรูปแบบที่น่าสนใจ มีสีสันดึงดูด และสื่อมีความทันสมัยสอดคล้องกับสถานการณ์ปัจจุบัน

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรบุรีรัมย์ สำนักงานเกษตรจังหวัดบุรีรัมย์ สำนักงานเกษตรอำเภอหนองหงส์ สำนักงานเกษตรอำเภอหนองกี่ สำนักงานเกษตรอำเภอลำปลายมาศ และเกษตรกรทุกคน ที่ให้การสนับสนุนจนการวิจัยในครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

- Akkaya, F., R. Yalcin and B. Ozkan. 2006. Good agricultural practices (GAP) and its implementation in Turkey. *Acta Horticulturae* 699: 47-52.
- Bansal, A., V. Chhabra, R.K. Rawal and S. Sharma. 2014. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 4(4): 223-233.
- Bansal, G., N. Suthar, J. Kaur and A. Jain. 2016. Stability testing of herbal drugs: Challenges, regulatory compliance and perspectives. *Phytotherapy Research* 30(7): 1046-1058.
- Bhoyen, K. 2019. Aging society: Opportunities for the future sustainable business. *Journal of Management Science Review* 21(1): 201-209. (in Thai)
- Buriram Provincial Agriculture and Cooperatives Office. 2020. Agriculture and cooperatives Buriram province plans (2018-2022). (Online). Available: <https://www.opsmoac.go.th/buriram-strategic-files422791791887> (August 18, 2022). (in Thai)
- Buriram Provincial Office. 2020. Buriram province plans (2018-2022). (Online). Available: <https://data.go.th/dataset/plan-pr-br-61-63> (March 15, 2023). (in Thai)
- Chen, S.-L., H. Yu, H.-M. Luo, Q. Wu, C.-F. Li and A. Steinmetz. 2016. Conservation and sustainable use of medicinal plants: Problems, progress, and prospects. *Chinese Medicine* 11: 37, doi: 10.1186/s13020-016-0108-7.
- Department of Agriculture. 2022. GAP online. (Online). Available: <https://gap.doa.go.th/> (August 15, 2022). (in Thai)
- Department of Agricultural Extension. 2023. Annual report fiscal year (2022). Department of Agricultural Extension, Bangkok. 100 p. (in Thai)
- Department of International Trade Promotion. 2022. Thailand trading report. (Online). Available: <http://tradereport.moc.go.th/Report/Default.aspx?Report=TradeThExportMonthly> (February 21, 2023). (in Thai)
- Department of Traditional and Alternative Medicine. 2016. Master Plan with the Development of Thai Herbs No. 1 (2017-2021). Department of Traditional and Alternative Medicine, Nonthaburi. 200 p. (in Thai)
- Kanokhong, K., N. Rattanawan and P. Jeerat. 2019. Adoption of crop growing methods under the standards of good agricultural practice (GAP) of farmers, Mon Ngo Royal Project Development Center Mae Tang district, Chiang Mai. *Journal of Agricultural Research and Extension* 36(1): 75-84. (in Thai)
- Khumdee, N., B. Limnirankul, R. Sirisunyaluck and P. Suebpongsung. 2022. Factors affecting good agricultural practices of quality strawberry farmers, Samoeng district, Chiang Mai province. *Journal of Agriculture* 38(2): 201-208. (in Thai)
- Kigatiira, K.K., H.K. Mberia and K.W. Ngula. 2018. The effect of communication channels used between extension officers and farmers on the adoption of Irish potato farming. *International Journal of Academic Research in Business and Social Sciences* 8(4): 373-387.
- Krejcie, R.V. and D.W. Morgan. 1970. Determining sample size for research activities. *Educational and Psychological Measurement* 30(3): 607-610.

- Laosutsan, P., G.P. Shivakoti and P. Soni. 2019. Factors influencing the adoption of good agricultural practices and export decision of Thailand's vegetable farmers. *International Journal of the Commons* 13(2): 867-880.
- Li, X. and X. Wu. 2021. The impact of social norms on rice farmers' behavior of organic fertilizers application: Mediating effect of value perception and moderating effect of education level. *International Journal of Low-carbon Technologies* 16(4): 1492-1503.
- Maneechoti, S. and D. Athinuwat. 2019. Success impacts on organic farming in small farmer community in Nakhon Sawan province. *Thai Journal of Science and Technology* 8(6): 596-608. (in Thai)
- Office of Permanent Secretary Ministry of Commerce. 2022. Thailand trading report. (Online). Available: [http://www.ops3.moc.go.th/infor/Export/recode\\_export\\_rank/repot.asp](http://www.ops3.moc.go.th/infor/Export/recode_export_rank/repot.asp) (January 26, 2022). (in Thai)
- Phromkiang, J., K. Kanokhong, S. Fongmul and P. Kruekum. 2020. Knowledge and practice in accordance with good agricultural practice of farmers growing mulberry in Chalermprakiat district, Nan province. *Journal of Agricultural Research and Extension* 37(1): 52-63. (in Thai)
- Phuseeorn, S. 2018. SPSS application for research data analysis. 8<sup>th</sup> ed. Taksila Printing, Mahasarakham. 391 p. (in Thai)
- Saggar, S., P.A. Mir, N. Kumar, A. Chawla, J. Uppal, Shilpa and A. Kaur. 2022. Traditional and herbal medicines: Opportunities and challenges. *Pharmacognosy Research* 14(2): 107-114.
- Senanayake, S.S. and R.M.S.D. Rathnayaka. 2017. Analysis of factors affecting for adoption of good agricultural practices in potato cultivation in Badulla district, Sri Lanka. *AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences* 10: 1-5.
- Singh, P.A., S.D. Desai and J. Singh. 2018. A review on plant antimicrobials of past decade. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 18(10): 812-833.
- Sookplung, D., C. Thawornratana and A. Jai-aree. 2022. Factors affecting organic farming of farmers in Suphan Buri province. *Journal of Multidisciplinary in Humanities and Social Sciences* 5(3): 1166-1184. (in Thai)
- Tilman, D., K.G. Cassman, P.A. Matson, R. Naylor and S. Polasky. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418(6898): 671-677.
- Wongsa, K. 2021. Rice cultivation practice according to organic agriculture standaras of farmers in Pan district, Chiang Rai province. M.S. Thesis. Maejo University, Chiang Mai. 129 p. (in Thai)
-



# การรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าว ของเกษตรกรผู้ปลูกข้าวอำเภอภักดีไชย จังหวัดกาฬสินธุ์

## Farmers' Perceptions on Effects of Rice Stubble and Straws Burning in Kamalasai District, Kalasin Province

วีรนุช กุดแถลง และ สุกัลยา เชิญขวัญ\*  
Wiranut Kudthaleang and Sukanlaya Choenkwan\*

สาขาวิชาการส่งเสริมและพัฒนาการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40000

Department of Agricultural Extension and Development, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40000, Thailand

\*Corresponding author: E-mail: Sukanl@kku.ac.th

(Received: 15 May 2023; Accepted: 12 September 2023)

**Abstract:** The study of perceptions on effects of rice stubble and straws burning aims; 1. to study social and economic characteristics of farmers and conditions of rice production of the farmers 2. to study perceptions of the farmers towards effects of stubbles and rice straws burning and 3. to compare the perceptions on effects of burning stubbles and rice straws of the farmers with different social and economic characteristics and conditions of rice production. The populations of this study were 1,394 farmers in Kamalasai District, Kalasin Province. The numbers of 210 farmers represented the selected group of sampling population retrieved by using the criterion to determine degree of errors at 15 % of the population. Therefore, a simple random sampling method was used to select the sample farmers. A questionnaire was designed with confidence coefficient of 0.93 and used as a research instrument in the process of data collection starting from June to October in 2022. Collected data were analyzed using both descriptive statistics including frequency, average, percentage, maximum, minimum and standard deviation and inferential statistics including t-test, F-test and LSD. The results of the study showed 61.9% rice farmers were managed by burning because it was easy and convenient method (45.5%). It's also an agreement of tillage operators 34.4%. Whereas 38.9% had non-burning. Most of them used the method of plowing, 60%. Some used it to improve the soil for planting the tree, 13.8%, and some used it to produce organic fertilizers, 13.8%. The levels of perceptions of the farmers on the effects of burning stubbles and rice straws on agriculture, health, environment, tourism, and laws were all in levels of strong except for international trade barriers that 49.5% of the farmers did not know on this topic. The comparison on perception effects of burning rice stubble and straws in 4 aspects such as agriculture, health, environment, and others by classifying according to differentiation of experience in growing rice, receiving information, or transferring knowledge, debt, sickness of household members and management of rice stubble or rice straw showed statistically significant differences ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ ) in some issues.

**Keywords:** Farmer's perceptions, burning, rice stubble and straws, Kamalasai district

**บทคัดย่อ:** การศึกษาการรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวของเกษตรกร ดังนี้ 1. ศึกษาสภาพพื้นฐานทางสังคม เศรษฐกิจ สภาพการผลิตข้าว 2. ศึกษาการรับรู้ของเกษตรกรต่อผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าว และ 3. เปรียบเทียบการรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวของเกษตรกรที่มีสภาพทางสังคม เศรษฐกิจ และการผลิตข้าวที่แตกต่างกัน ซึ่งประชากรที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เกษตรกรผู้ปลูกข้าวอำเภออมลาลัย จังหวัดกาฬสินธุ์ จำนวน 1,394 ราย อนาคตกลุ่มตัวอย่าง ร้อยละ 15 ของประชากร เท่ากับ จำนวน 210 ราย คัดเลือกเกษตรกรโดยใช้วิธีการสุ่มอย่างง่าย เก็บรวบรวมข้อมูลในช่วงเดือนมิถุนายน ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ.2565 โดยใช้แบบสัมภาษณ์ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเชื่อมั่น เท่ากับ 0.93 วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าทางสถิติ ได้แก่ ค่าความถี่ ค่าเฉลี่ย ค่าร้อยละ ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน t-test F-test และ LSD ผลการศึกษา พบว่า เกษตรกร ร้อยละ 61.9 มีการจัดการตอซังและฟางข้าวด้วยการเผา เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวก (ร้อยละ 45.4) และ ร้อยละ 34.4 เป็นข้อตกลงของผู้ประกอบการรถไถเตรียมดิน ส่วนร้อยละ 38.9 มีการจัดการโดยปลอดการเผา โดยใช้การไถกลบตอซัง (ร้อยละ 60) นำไปปรับปรุงบำรุงดินหรือคลุมโคนต้นไม้ (ร้อยละ 13.8) และผลิตปุ๋ยอินทรีย์ (ร้อยละ 13.8) ทั้งนี้ การรับรู้ผลกระทบต่อภาคการเกษตร สุขภาพอนามัย สิ่งแวดล้อม การท่องเที่ยว และกฎหมาย อยู่ในระดับมากทุกประเด็น มีเพียงข้อกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ ที่เกษตรกรไม่มีการรับรู้ถึงร้อยละ 49.5 ส่วนการเปรียบเทียบการรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าว จำนวน 4 ด้าน คือ การเกษตร สุขภาพอนามัย สิ่งแวดล้อม และด้านอื่น ๆ โดยจำแนกตาม ประสบการณ์การทำงาน การได้รับการประชาสัมพันธ์และการถ่ายทอดความรู้ ภาระหนี้สิน การมีโรคประจำตัวเป็นโรครุภูมิแพ้ของสมาชิกครัวเรือนเกษตรกร และการจัดการตอซังและฟางข้าวของเกษตรกรที่แตกต่างกัน พบว่า เกษตรกรมีการรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$  และ  $P < 0.05$ ) ในบางประเด็น

**คำสำคัญ:** การรับรู้ของเกษตรกร การเผาตอซังและฟางข้าว อำเภออมลาลัย

## คำนำ

ปัญหาการเผาตอซังและฟางข้าวเป็นปัญหาที่สำคัญสำหรับประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2565 มีพื้นที่ปลูกข้าวประมาณ 66 ล้านไร่ หรือร้อยละ 20 ของพื้นที่ทั้งประเทศ ทำให้มีตอซังและฟางข้าวเฉลี่ย 45.75 ล้านตันต่อปี หรือประมาณร้อยละ 69 ของพื้นที่ปลูกข้าว (Lerdkrai, 2016) ซึ่งในส่วนตอซังและฟางข้าวที่เป็นเศษวัสดุเหลือใช้หลังจากการเก็บเกี่ยวข้าว นั้น เกษตรกรส่วนใหญ่เลือกใช้วิธีการเผาทำลาย เพื่อเร่งรัดการใช้พื้นที่สำหรับการเพาะปลูก โดยขาดข้อมูลความรู้ที่ถูกต้องในการจัดการ (Dailynews, 2012) โดยตอซังและฟางข้าวที่ถูกเผาทำลายมีการปลดปล่อยมลพิษ  $CO_2$ ,  $CO$ ,  $NO_x$ ,  $SO_2$  และฝุ่นละอองรวมในอัตรา 246.35, 17.37, 0.31, 0.12 และ 147.35 แสตันต่อปี ตามลำดับ (Rongmuang

*et al.*, 2017) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของประชาชน โดยเฉพาะการแผ่ระยะยาวที่ทำให้ดินขาดความอุดมสมบูรณ์ และยังทำลายกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตที่เป็นประโยชน์ในดินอีกด้วย (Biederbeck *et al.*, 1980) นอกจากนั้น ยังเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดภาวะโลกร้อน ฝนไม่ตกตามฤดูกาล รวมทั้งผลกระทบต่อการท่องเที่ยวและระบบเศรษฐกิจในประเทศ (Department of Agricultural Extension, 2020) จากผลกระทบดังกล่าว รัฐบาลได้ให้ความสำคัญต่อการป้องกันและแก้ไขปัญหา โดยมอบหมายให้กรมส่งเสริมการเกษตรรับผิดชอบดำเนินการควบคุมการเผาในพื้นที่การเกษตร การส่งเสริมการหยุดการเผา โดยการถ่ายทอดความรู้ สร้างความรับรู้ ความเข้าใจ และสร้างความตระหนักของเกษตรกรถึงผลกระทบจากการเผาเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

พร้อมสร้างเกษตรกรต้นแบบและเครือข่ายปลอดการเผา (Ministry of Agriculture and Cooperatives, 2020)

อำเภออมลาลัย จังหวัดกาฬสินธุ์ มีข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ จากการได้รับน้ำสำหรับการเกษตรภายใต้โครงการชลประทานเขื่อนลำปาว ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่สามารถผลิตข้าวได้ 2 - 3 ครั้งต่อปี (Kamalasai District Agricultural Office, 2020) ส่งผลทำให้มีเศษตอซังและฟางข้าวในแต่ละรอบการผลิตจำนวนมาก เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย และเวลาในการเตรียมพื้นที่ปลูกข้าวในรอบการผลิตถัดไป เกษตรกรส่วนใหญ่จึงตัดสินใจใช้วิธีการเผาทำลายตอซังและฟางข้าว ในช่วงเดือนธันวาคม - มกราคม และ เมษายน - มิถุนายน ของทุกปี โดยข้อมูลเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม พ.ศ. 2564 รายงานดัชนีคุณภาพอากาศพบว่า พื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ มีค่าดัชนีคุณภาพอากาศ (AQI) สำหรับค่าฝุ่นละอองขนาดเล็ก 2.5 ไมครอน (PM2.5) มีความเข้มข้น 38-50 มคก.ต่อลูกบาศก์เมตรเฉลี่ย 24 ชั่วโมงต่อเนื่อง คุณภาพอากาศเริ่มมีผลกระทบต่อสุขภาพ (Geo-Informatics and Space Technology Development Agency, 2022) ซึ่งอาจเกิดจากการเผาไหม้ ทั้งจากการเผาวัสดุการเกษตร (ตอซังและฟางข้าว) ยานพาหนะ และกระบวนการอุตสาหกรรม (Pollution Control Department, 2021) และจากการสำรวจข้อมูลเบื้องต้นในพื้นที่ ยังพบว่า การเผาตอซังและฟางข้าวของเกษตรกร ส่งผลให้เกิดไฟลุกไหม้ไปสู่อุปกรณ์เครื่องใช้ เป็นวงกว้าง เกิดความเสียหายต่อทรัพย์สินของผู้อื่น ก่อให้เกิดปัญหาหรือข้อขัดแย้ง ในชุมชนและชุมชนข้างเคียงโดยรอบ โดยหมอกควันและฝุ่นละอองยังทำให้บ้านเรือนสกปรก เกิดความรำคาญต่อระบบทางเดินหายใจของชาวบ้านที่เป็นโรคภูมิแพ้ ตลอดจนผลกระทบต่อความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศในนาข้าว ทำให้สัตว์หน้าดินไม่มีที่อยู่อาศัย รวมทั้งดินขาดความอุดมสมบูรณ์ ทำให้เกษตรกรมีต้นทุนการผลิตสูงขึ้นจากการซื้อปุ๋ยเคมีเพื่อเพิ่มธาตุอาหารให้แก่ดิน อย่างไรก็ตาม ถึงแม้มีหน่วยงานภาครัฐและหน่วยงานในสังกัดระดับพื้นที่พยายามเข้ามาแก้ไขปัญหา พร้อมเสนอทางเลือกในการจัดการตอซังและฟางข้าวที่เหมาะสมกับบริบทพื้นที่ แต่การแก้ไขปัญหาดังกล่าวก็ยังไม่ประสบ

ผลสำเร็จเท่าที่ควร (Kamnil, 2015) ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวของเกษตรกรผู้ปลูกข้าวอำเภออมลาลัย โดยเป็นการศึกษาถึงลักษณะพื้นฐานทางสังคม เศรษฐกิจ สภาพการผลิตข้าว และสถานการณ์การเผาตอซังและฟางข้าว ตลอดจนการรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวของเกษตรกร เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการวางแผนดำเนินงานสำหรับหน่วยงานภาครัฐ และเอกชนที่เกี่ยวข้อง ในการแก้ไขปัญหาการเผาตอซังและฟางข้าวในพื้นที่ต่อไป

### อุปกรณ์และวิธีการ

ประชากรที่ทำในการศึกษา คือ เกษตรกรที่ขึ้นทะเบียนผู้ปลูกข้าว (นาปีและนาปรัง) อำเภออมลาลัย จังหวัดกาฬสินธุ์ ปีการผลิต 2563/64 จำนวน 1,394 ราย โดยกำหนดขนาดกลุ่มตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 15 ของประชากร ได้ขนาดกลุ่มตัวอย่างจำนวน 210 ราย (Yothongyos and Sawassan, 2017) ทั้งนี้ ใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างอย่างง่ายสำหรับสุ่มเลือกเกษตรกรตัวอย่าง เก็บรวบรวมข้อมูลตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2565 เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูล คือ แบบสัมภาษณ์แบบกึ่งโครงสร้าง (ปลายปิด - ปลายเปิด) โดยการเลือกตอบ (checklist questions) ประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 เกี่ยวกับลักษณะพื้นฐานทางสังคมและเศรษฐกิจของกลุ่มตัวอย่าง ส่วนที่ 2 เกี่ยวกับสภาพการผลิตข้าวของกลุ่มตัวอย่าง ส่วนที่ 3 คำถามเกี่ยวกับสถานการณ์การเผาตอซังและฟางข้าว และส่วนที่ 4 คำถามเกี่ยวกับการรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวของเกษตรกรผู้ปลูกข้าว โดยแบ่งเป็นข้อย่อยที่ใช้มาตรวัดแบบ Likert method โดยแบ่งระดับการรับรู้ออกเป็น 3 ระดับ (Thaweratana, 1997) ได้แก่ รับรู้มาก รับรู้ปานกลาง และรับรู้น้อย ตรวจสอบเครื่องมือโดยการหาค่าสัมประสิทธิ์ความเชื่อมั่น (Cronbach's alpha) มีค่าเท่ากับ 0.93

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (SPSS) โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistic) ได้แก่ ค่าแจกแจงความถี่ (frequency) ค่าเฉลี่ย

(mean) ค่าร้อยละ (percentage) ค่าสูงสุด (maximum) ค่าต่ำสุด (minimum) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลสภาพพื้นฐานทางสังคม เศรษฐกิจ และสภาพการผลิตข้าว สำหรับการประเมินการรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าว ใช้ค่าเฉลี่ยคะแนนจากการตอบคำถามเกี่ยวกับการรับรู้ โดยแบ่งเป็นข้อย่อยที่ใช้มาตราวัดแบบ Likert method ซึ่งแบ่งเป็น 3 ระดับการรับรู้ ได้แก่ รับรู้มาก ให้ 3 คะแนน รับรู้ปานกลาง ให้ 2 คะแนน และรับรู้น้อย ให้ 1 คะแนน โดยแบ่งเป็น 3 ช่วงคะแนนการรับรู้ ตามทฤษฎีการแบ่งระดับของ Best (1997) ดังนี้ 1.00 - 1.66 หมายถึง รับรู้น้อย 1.67 - 2.33 หมายถึง มีการรับรู้ปานกลาง และ 2.34 - 3.00 หมายถึง มีการรับรู้มาก และการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติเชิงอนุมาน (inferential statistic) เพื่อวิเคราะห์ระดับการรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวกับประสบการณ์การทำนาของเกษตรกรผู้ปลูกข้าว โดยใช้สถิติ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างคู่ด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 และวิเคราะห์ระดับการรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวกับการได้รับการประชาสัมพันธ์และการถ่ายทอดความรู้ การมีภาระหนี้สิน การเป็นโรคประจำตัว ภูมิแพ้ของสมาชิกในครัวเรือน และการจัดการตอซังและฟางข้าวโดยใช้สถิติ T-test

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

### ลักษณะพื้นฐานทางสังคม และเศรษฐกิจบางประการของเกษตรกร

ผลการศึกษา พบว่า เกษตรกรผู้ปลูกข้าวในอำเภอกมลาไสยส่วนใหญ่เป็นเพศหญิง (ร้อยละ 74.3) มีอายุเฉลี่ย 55.80 ปี จบการศึกษาระดับประถมศึกษา (ร้อยละ 57.6) ในปี พ.ศ. 2564 เกษตรกรมีรายได้เฉลี่ย 134,479.38 บาท โดยร้อยละ 43.3 มีรายได้ครัวเรือนไม่เกิน 80,000 บาท ร้อยละ 73.8 มีการกู้ยืมหนี้สินจากแหล่งกู้ยืมเงินต่าง ๆ โดยเฉพาะธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตร (ร้อยละ 45.1) โดยเกษตรกรมีภาระหนี้สินเฉลี่ย 261,967.74 บาท และสมาชิกใน

ครัวเรือนเกษตรกรร้อยละ 83.8 พบว่า ไม่มีโรคภูมิแพ้ เป็นโรคประจำตัว

เกษตรกรส่วนใหญ่ร้อยละ 81.4 เคยได้รับการประชาสัมพันธ์และถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าว ผ่านหลายช่องทาง ได้แก่ การประชาสัมพันธ์ผ่านช่องทางเสียงตามสายในชุมชน (ร้อยละ 32.8) ผ่าน ช่องทางการอบรมหรือประชุม (ร้อยละ 18.6) และผ่านช่องทางโทรทัศน์ (ร้อยละ 16.5) เป็นต้น จะเห็นได้ว่า การได้รับการประชาสัมพันธ์และถ่ายทอดความรู้ของเกษตรกร ส่วนใหญ่เป็นช่องทางที่เกษตรกรเข้าถึงได้ง่าย อาจเนื่องจากมีผู้ประชาสัมพันธ์ถึงบ้าน กลุ่ม หรือชุมชน เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับ Adirekchotikul (2015) อธิบายว่า การรับรู้ข่าวสารประชาสัมพันธ์ของประชาชนส่วนใหญ่ รับรู้จากเสียงตามสายและการประชุมระดับหมู่บ้าน เนื่องจากเป็นสื่อที่สอดคล้องกับความเชื่อ ทศนคติ และค่านิยมของคนในชุมชน โดยประชาชนหรือผู้รับสาร (เป้าหมาย) หาสื่อนั้นได้สะดวก ไม่ต้องจัดซื้อ และเป็นเครื่องมือที่คุ้นเคย

### สภาพการผลิตข้าวของเกษตรกร

เกษตรกรมีประสบการณ์ในการผลิตข้าวเฉลี่ย 35.19 ปี มีพื้นที่เพาะปลูกข้าวเป็นของตนเองเฉลี่ย 7.82 ไร่ ร้อยละ 88.2 ปลูกข้าวโดยวิธีการหว่าน จำนวน 2 ครั้งต่อปี (นาปี - นาปรัง) ส่วนใหญ่ปลูกข้าวโดยใช้สารเคมีในการจัดการศัตรูพืชร้อยละ 76.8 โดยร้อยละ 71.9 มีการจ้างผู้ประกอบการหรือเช่าเครื่องจักรกลทางการเกษตร เพื่อใช้อำนวยความสะดวกในการเตรียมการเพาะปลูกหรือดูแลบำรุงรักษา จนถึงขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งที่เหลือร้อยละ 28.1 มีเครื่องจักรกลเป็นของตนเอง และไม่ได้มีการจ้างหรือเช่าเครื่องจักรกลกับทางผู้ประกอบการ โดยเกษตรกรร้อยละ 45.1 เน้นผลิตข้าวเพื่อนำมาบริโภคในครัวเรือน จากนั้นจะนำไปจำหน่ายที่ลานรับซื้อใกล้เคียง (ร้อยละ 30.4) ซึ่งในปีการผลิต 2563/64 เกษตรกรมีต้นทุนการผลิตข้าวต่อปีเฉลี่ย 4,520.67 บาทต่อไร่ และมีรายได้จากการจำหน่ายข้าวเฉลี่ย 6,911.91 บาทต่อไร่

เกษตรกร มีการจัดการตอซังและฟางข้าวในพื้นที่นาข้าวโดยการเผาตอซังและฟางข้าว ร้อยละ 61.9

ซึ่งร้อยละ 45.4 ของเกษตรกรที่เผา ระบุว่า เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกที่สุด และร้อยละ 34.4 ของเกษตรกรที่เผา ระบุว่า เป็นข้อตกลงของผู้ประกอบการรถไถเตรียมดิน เนื่องจากปัจจุบันรถแทรกเตอร์ที่รับจ้างไถเตรียมดินมีขนาด 30 - 50 แรงม้า โดยมีผานไถอยู่แค่ 2 แบบ คือ ผานไถจาน กับผานไถโรตารี ซึ่งเหมาะกับการนำมาใช้ในพื้นที่ที่ไม่มีตอซัง เมื่อนำมาใช้ในพื้นที่ที่มีตอซังฟางข้าวไม่สามารถขุดพลิกดินชั้นล่างให้ขึ้นมา กลบตอซังและฟางข้าวได้ เพราะตอซังจะหนุหนุผานไถให้ ลอยตัวไม่ตกลงไปถึงดินที่ไถไปแล้ว หากไถเตรียมพื้นที่ ให้เหมาะสมต่อการเพาะปลูก ผู้รับจ้างต้องไถซ้ำหลาย ครั้งและใช้เวลาไถนาน จึงทำให้ผู้รับจ้างไม่ยอมไถกลบ ตอซังและฟางข้าวเพื่อเตรียมดิน หรือต้องคิดค่าจ้างเพิ่ม เท่าตัว หากเกษตรกรไม่ยอมเผาตอซังและฟางข้าว (Thairath Online, 2021) และมีเหตุผลอื่น ๆ ได้แก่ มีปริมาณฟางมาก น้ำไม่เพียงพอต่อการจัดการไถกลบ ตอซังและฟางข้าว ไฟลามจากการเผาของแปลงอื่น เป็นการกำจัดวัชพืช มีผลกระทบต่อการใช้ปุ๋ยเคมีของ ข้าว เนื่องจากตอซังและฟางข้าวย่อยสลายไม่สมบูรณ์ ทำให้เมล็ดข้าวที่หว่านติดค้างอยู่บนฟางข้าว และ รากข้าวไม่สามารถดูดธาตุอาหารจากดินได้ ส่งผลให้ ต้นข้าวแสดงอาการขาดธาตุอาหาร การเร่งผลิตในรอบ ถัดไปไม่จำเป็นต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัด และไม่มี ความรู้ความสามารถในการจัดการโดยวิธีอื่น ทั้งนี้ร้อยละ 38.1 ของเกษตรกรมีการจัดการตอซังและฟางข้าว โดยปลอดการเผา โดย ร้อยละ 60 ของเกษตรกรที่ปลอด การเผา มีการจัดการโดยการไถกลบตอซังและฟางข้าว รองลงมาคือ ร้อยละ 13.8 นำไปปรับปรุงบำรุงดินหรือคลุมโคนต้นไม้ ร้อยละ 10.0 นำไปผลิตปุ๋ยหมัก ร้อยละ 8.5 มีการจัดการโดยการอัดก้อนฟาง และร้อยละ 7.7 นำไปผลิตอาหารสัตว์ ตามลำดับ

### การรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าว ของเกษตรกรผู้ปลูกข้าว

การรับรู้ของเกษตรกรผู้ปลูกข้าวอำเภอ อมลาคู จังหวัดกาฬสินธุ์ ต่อผลกระทบจากการ เผาตอซังและฟางข้าว สามารถแบ่งเป็นด้านต่าง ๆ ดังนี้ (Table 1)

### 1) การรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซัง และฟางข้าวต่อการเกษตร

ผลการศึกษา พบว่า การรับรู้ผลกระทบจาก การเผาตอซังและฟางข้าวของเกษตรกรต่อการเกษตรใน ภาพรวมอยู่ในระดับมาก ( $\bar{x} = 2.59$ ) เมื่อพิจารณาใน ประเด็นย่อยแล้ว พบว่า มีการรับรู้ในระดับมากในทุก ประเด็น ได้แก่ การเผาตอซังและฟางข้าวเป็นสาเหตุของ ดินเสื่อมโทรม ทำให้เกษตรกรต้องใส่ปุ๋ยเคมี ส่งผลให้ ต้นทุนในการผลิตเพิ่มขึ้น ( $\bar{x} = 2.60$ ) การเผาตอซังและ ฟางข้าว ทำให้ระบบนิเวศของดินลดลงและง่ายต่อการ- แพร่ระบาดของโรคข้าว จึงเป็นการเพิ่มต้นทุนในการใช้ สารเคมีเพื่อป้องกันและกำจัดโรคและแมลงของเกษตรกร ( $\bar{x} = 2.59$ ) และการเผาตอซังและฟางข้าวเป็นการทำลาย โครงสร้างดิน ทำให้ดินแน่นทึบไม่ร่วนซุย ส่งผลต่อการ- เจริญเติบโตของพืช ( $\bar{x} = 2.58$ ) ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็น ว่า เกษตรกรส่วนใหญ่รับรู้ถึงผลกระทบจากการเผาตอซัง และฟางข้าวที่เป็นการทำลายโครงสร้างดิน ทำลายธาตุ- อาหารและอินทรีย์วัตถุในดิน รวมถึง ศัตรูธรรมชาติ และจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในดิน ทำให้เสียสมดุลใน ระบบนิเวศของดิน ส่งผลต่อการเพิ่มต้นทุนในการผลิต โดยสอดคล้องกับ Boonyapitaks (2021) ได้อธิบายว่า เกษตรกรมีการรับรู้ถึงผลกระทบจากการเผาที่ทำให้ดิน เกิดการเสื่อมโทรม มีผลต่อแร่ธาตุในดินลดลง เป็นการ- ทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในดิน และมีผลกระทบต่อ โครงสร้างดิน ทำให้ดินแน่นทึบ ไม่ร่วนซุย

### 2) การรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซัง และฟางข้าวต่อสุขภาพอนามัย

จากผลการศึกษา พบว่า การรับรู้ผลกระทบ จากการทำลายตอซังและฟางข้าวต่อสุขภาพอนามัย ในภาพรวมอยู่ในระดับมาก ( $\bar{x} = 2.69$ ) เมื่อพิจารณา ในประเด็นย่อย พบว่า ทุกประเด็นมีการรับรู้ในระดับมาก ได้แก่ เขม่าควันและฝุ่นละอองจากการเผาตอซังและ ฟางข้าวก่อให้เกิดการระคายเคืองตาหรือแสบตา ( $\bar{x} = 2.76$ ) ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวที่ก่อให้เกิดฝุ่น ละอองขนาดเล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของโรคเกี่ยวกับระบบ ทางเดินหายใจ หรือสำหรับผู้ที่เป็โรคภูมิแพ้ อาจจะ ทำให้เกิดอาการแพ้ทางอากาศหรือเป็นไข้หวัดได้ ( $\bar{x} = 2.71$ )

Table 1. Farmer's Perceptions on effects of rice stubble and straws burning in Kamalasai district, Kalasin Province

Perceptions on effects of rice stubble and straws burning	Level of Perceptions (n = 210)			$\bar{x}$	SD	Level
	High (%)	Medium (%)	Low (%)			
<b>Perceptions on effects of rice stubble and straws burning on agriculture</b>				<b>2.59</b>		
1. Cause of soil deterioration, resulting increase in production costs	150 (71.4)	37 (17.6)	23 (11.0)	2.60	0.67 8	High
2. Makes the soil dense, not crumbly, affecting the growth of plants	149 (71.0)	33 (15.7)	28 (13.3)	2.58	0.71 6	High
3. Destroys insects, natural enemies and beneficial microorganisms in the soil	149 (70.9)	35 (16.7)	26 (12.4)	2.59	0.70 2	High
<b>Perceptions on effects of rice stubble and straws burning on health</b>				<b>2.69</b>		
1. Rice stubble and straws burning may cause eye irritation or burning eyes	167 (79.5)	36 (17.2)	7 (3.3)	2.76	0.49 9	High
2. Fine dust causing of respiratory disease, allergies or flu	160 (76.2)	38 (18.1)	12 (5.7)	2.71	0.56 9	High
3. Cause weakness, chest tightness, headache or nausea	147 (70.0)	42 (20.0)	21 (10.0)	2.60	0.66 5	High
<b>Perceptions on effects of rice stubble and straws burning on environment</b>				<b>2.64</b>		
1. Cause of greenhouse gases that cause climate change	159 (75.7)	38 (18.1)	13 (6.2)	2.70	0.58 1	High
2. Cause rain not falling according to the season	136 (64.8)	31 (14.8)	43 (20.4)	2.44	0.81 2	High
3. Reduced visibility which causing accidents on the road	171 (81.4)	33 (15.7)	6 (2.9)	2.79	0.47 6	High
<b>Perceptions on effects of rice stubble and straws burning on another effects</b>				<b>2.27</b>		
1. Barrier to international trade, i.e., taxation for countries with greenhouse gas emissions	75 (35.7)	31 (14.8)	104 (49.5)	1.86	0.91 5	Moderate
2. Burning in the open, must be punished by law	120 (57.1)	38 (18.1)	52 (24.8)	2.32	0.84 7	Moderate
3. Make the scenery not bright and the atmosphere not fresh thus affecting the country's tourism	154 (73.3)	37 (17.6)	19 (9.1)	2.64	0.64 2	High

Levels of perceptions ( $\bar{x}$ ) 1.00 - 1.66 = Low, 1.67 - 2.33 = Moderate, 2.34 - 3.00 = High

และก๊าซพิษที่เกิดจากการเผาตอซังและฟางข้าว สามารถทำให้เกิดอาการอ่อนเพลีย แน่นหน้าอก ปวดศีรษะหรือคลื่นไส้ได้ ( $\bar{x}$  = 2.60) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเกษตรกรส่วนใหญ่มีการรับรู้ถึงผลกระทบจากการเผา

ตอซังและฟางข้าวที่มีผลต่อสุขภาพอนามัย โดยเฉพาะการระคายเคืองต่อดวงตา และระบบทางเดินหายใจเนื่องจากฝุ่นละอองและเขม่าควันที่เกิดจากการเผา อาจทำให้เกษตรกรมีอาการแสบตา แสบคอ ไอจาม หรือ

ไปจนถึงเป็นภูมิแพ้อากาศได้เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับ ผลการศึกษาของ Kamnil (2015) พบว่า เกษตรกรใน ตำบลท่าผา อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ มีการรับรู้ ว่ามีความเสี่ยงจากการเป็นโรคระบบทางเดินหายใจ ที่เพิ่มขึ้นทุกปี เนื่องจากอุตสาหกรรมของขนาดเล็ก และมลพิษหมอกควันที่เกิดจากการเผาที่ยังส่งผลให้เกิด อากาศระคายเคืองตา แสบจมูก ไอ คออักเสบ หายใจ ลำบาก เป็นต้น

### 3) การรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซัง และฟางข้าวต่อสิ่งแวดล้อม

ผลการศึกษา พบว่า การรับรู้ผลกระทบจาก การเผาตอซังและฟางข้าวต่อสิ่งแวดล้อมในภาพรวมอยู่ใน ระดับมาก ( $\bar{x} = 2.64$ ) เมื่อพิจารณาในประเด็นย่อย พบว่า ทุกประเด็นมีการรับรู้ในระดับมาก ได้แก่ ผลกระทบจากหมอกควันหรือฝุ่นละอองที่เกิดจากการ เผาตอซังและฟางข้าวที่ทำให้ทัศนวิสัยในการมองเห็น ลดลงเป็นสาเหตุของการเกิดอุบัติเหตุบนท้องถนน ( $\bar{x} = 2.79$ ) การเผาตอซังและฟางข้าวเป็นสาเหตุของ การเกิดก๊าซเรือนกระจกอันก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ของสภาพภูมิอากาศ (climate change) ซึ่งเป็นสาเหตุ หลักของภาวะโลกร้อน ( $\bar{x} = 2.70$ ) และผลกระทบจาก การเผาตอซังและฟางข้าวเป็นสาเหตุของภาวะฝนไม่ตก ต้องตามฤดูกาล เพราะไอน้ำถูกปนเปื้อนด้วยฝุ่นละออง ขนาดเล็ก ทำให้อุณหภูมิต่ำไม่สามารถกลั่นลงมาเป็นฝนได้ ( $\bar{x} = 2.44$ ) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า เกษตรกรส่วนใหญ่รับรู้ได้ถึงผลกระทบจากการเผาที่มีผลต่อการสัญจร บนท้องถนน อาจเนื่องมาจากหมอกควันและฝุ่นละออง บดบังทัศนวิสัยในการขับขี่ของเกษตรกรหรือผู้ใช้ถนนจน อาจทำให้เกิดอุบัติเหตุขึ้นได้ หรือสถานการณ์ในปัจจุบัน ที่สภาพอากาศมีการเปลี่ยนแปลงมากจนรับรู้ได้ โดยเฉพาะอุณหภูมิที่สูงขึ้น หรือฤดูกาลเปลี่ยนแปลง ทำให้อากาศไม่ตกต้องตามฤดูกาล ทั้งสภาวะฝนทิ้งช่วง (ภัยแล้ง) หรือฝนตกมากกว่าปกติจนเกิดน้ำท่วม ซึ่ง อำเภออมลาลัยประสบปัญหาอุทกภัยในพื้นที่ การเกษตรทุกปี ทำให้เกษตรกรในพื้นที่เสี่ยงภัย ปรับเปลี่ยนช่วงเวลาการปลูกข้าวให้เร็วขึ้น เพื่อ หลีกเลี่ยงการเกิดอุทกภัยดังกล่าว ซึ่งมีความสอดคล้อง กับการศึกษาของ Prangbang *et al.* (2019) พบว่า

เกษตรกรมีการรับรู้ถึงการเพิ่มขึ้นและลดลงของปริมาณ น้ำฝน และมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของอากาศที่ มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยดัชนีชี้วัดดังกล่าวแสดงให้เห็น ถึงการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศที่เป็นสาเหตุ จากภาวะโลกร้อน จึงทำให้เกษตรกรมีการปรับตัวเพื่อ ความปลอดภัยในสภาพการณ์ของโลกปัจจุบัน

### 4) การรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซัง และฟางข้าวในด้านอื่น ๆ

ผลการศึกษา พบว่า การรับรู้ถึงผลกระทบ ต่อด้านอื่น ๆ ในภาพรวมอยู่ในระดับปานกลาง ( $\bar{x} = 2.27$ ) เมื่อพิจารณาในประเด็นย่อย พบว่า มีการ-รับรู้ในระดับปานกลาง 2 ประเด็น ได้แก่ ด้านกฎหมาย ( $\bar{x} = 2.32$ ) เกษตรกรมีการรับรู้ถึงการกระทำผิดความผิด ด้วยกฎหมายเกี่ยวกับการเผาเศษวัสดุทางการเกษตร เปรียบเสมือนการเผาในที่โล่งแจ้ง และการคุ้มครอง สุขภาพอนามัยที่เกิดจากความร้อน แต่เกษตรกรร้อยละ 60.9 ยังมีการจัดการโดยการเผาตอซังและฟางข้าว เช่นเดิม โดยไม่ได้เกรงกลัวต่อกฎหมายแต่อย่างใด ทั้งนี้ เนื่องจากยังไม่มีการบังคับใช้กฎหมายหรือเข้าจับกุมผู้ที่ กระทำการเผาในพื้นที่ทำการเกษตร จึงยังไม่มีการมี ตัวอย่างให้เกษตรกรเกรงกลัว ซึ่ง Montree (2013) ได้ให้ ความเห็นเกี่ยวกับปัญหาดังกล่าวไว้ว่า เกษตรกรไม่ ยอมรับในกฎหมายดังกล่าว เนื่องจากผู้มีอำนาจโดยตรง หรือส่วนท้องถิ่นไม่กล้าที่จะบังคับใช้กฎหมายกับ เกษตรกร เพราะจะส่งผลต่อการปฏิบัติงานในพื้นที่ และ เหตุผลทางการเมือง และประเด็นการรับรู้ผลกระทบจาก การเผาตอซังและฟางข้าวที่สามารถใช้เป็นข้อกีดกันทาง การค้าระหว่างประเทศ ( $\bar{x} = 1.86$ ) ซึ่งร้อยละ 49.5 ของ เกษตรกรที่ให้การสัมภาษณ์ อธิบายว่า ไม่ทราบถึง ผลกระทบในด้านนี้ อาจเนื่องมาจากเกษตรกรส่วนใหญ่ ไม่เคยได้รับการ-ประชาสัมพันธ์หรือถ่ายทอดความรู้ เกี่ยวกับมาตรการกีดกันทางการค้าจากการผลิตสินค้าที่ ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ อันเป็นผลมาจากการกำหนด ราคาข้าวในปัจจุบัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kongjan *et al.* (2021) รายงานว่า เกษตรกรส่วนใหญ่ รับรู้ถึงผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าว โดยเฉพาะผลต่อสุขภาพอนามัยและการเกษตร แต่มี เพียงส่วนน้อยที่ทราบว่า การเผาตอ-ซังและฟางข้าวอาจ

ถูกใช้เป็นข้อกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ ส่วนการรับรู้ของเกษตรกรต่อผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าว ในด้านการท่องเที่ยว พบว่า มีการรับรู้อยู่ในระดับสูง ( $\bar{x} = 2.64$ ) โดยผลกระทบจากหมอกควันและฝุ่นละอองที่เกิดจากการเผาตอซังและฟางข้าว บดบังทัศนียภาพอันสวยงามของสถานที่ท่องเที่ยวต่าง ๆ และทำให้บรรยากาศไม่สดชื่น จึงส่งผลกระทบต่อ การท่องเที่ยวของประเทศเป็นอย่างมาก แสดงให้เห็นว่า เกษตรกรส่วนใหญ่ได้รับข่าวสารประชาสัมพันธ์เกี่ยวกับปัญหาหมอกควันที่มีผลกระทบต่อการท่องเที่ยวของภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ กรุงเทพมหานคร ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Limuntachai (2018) อธิบายว่า ปัญหาของหมอกควันในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นเมืองท่องเที่ยว ส่งผลกระทบต่อกลุ่มนักท่องเที่ยวเป็นอย่างมาก รวมทั้งหมอกควันมีผลกระทบต่อปัญหาด้านสุขภาพ จึงทำให้ปริมาณนักท่องเที่ยวในช่วงเทศกาลปีใหม่ลดลงเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้ชาวบ้านที่ประกอบอาชีพเกษตรกรรมควบคู่การท่องเที่ยวยังมีรายได้ลดลง

### การเปรียบเทียบการรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวของเกษตรกรผู้ปลูกข้าวที่มีสภาพทางสังคม เศรษฐกิจ และการผลิตข้าวที่แตกต่างกัน

มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

#### 1. ประสบการณ์การทำงาน

การศึกษาได้แบ่งเกษตรกร ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ประสบการณ์การทำงานน้อยกว่าหรือเท่ากับ 30 ปี ประสบการณ์ ระหว่าง 31 - 40 ปี และประสบการณ์ มากกว่า 40 ปี เมื่อทดสอบความแตกต่างของค่าคะแนนเฉลี่ยทั้ง 3 กลุ่ม โดยใช้สถิติ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างคู่ด้วยวิธี LSD พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกประเด็น แสดงให้เห็นว่า ประสบการณ์การทำงานของเกษตรกรไม่มีผลต่อการรับรู้ถึงผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าว อาจเนื่องมาจากกรณีที่ประเพณีการทำงานและวิถีชีวิตดั้งเดิมของเกษตรกร มีความเชื่อที่ดีต่อการจัดการตอซังและฟางข้าวด้วยวิธีการเผาเศษวัสดุทางการเกษตรในแปลง

เพื่อให้เป็นข้อเท็จจริงที่เปรียบเทียบเสมือนวัสดุปรับปรุงบำรุงดิน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษารายงานของ Kamnil (2015) อธิบายว่า เกษตรกรมีความรู้ในการจัดการเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในระดับสูง แต่ยังคงเลือกใช้วิธีการเผา เนื่องจากความเชื่อดั้งเดิมและวิธีการที่สืบทอดมาจากรุ่นบรรพบุรุษ คือ การเผาให้ได้เถาถ่านเพื่อใช้เป็นปุ๋ยสำหรับการเจริญเติบโตของพืช (Table 2)

#### 2. การได้รับการประชาสัมพันธ์และการถ่ายทอดความรู้

การศึกษาได้แบ่งเกษตรกร ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ได้รับ และไม่ได้รับการประชาสัมพันธ์และถ่ายทอดความรู้ เมื่อทดสอบความแตกต่างของระดับการรับรู้เฉลี่ยทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้สถิติ t-test พบว่า มีจำนวน 7 ประเด็นที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.001 ได้แก่ ประเด็นสาเหตุที่ส่งผลให้ดินขาดความอุดมสมบูรณ์ สาเหตุของดินแน่นทึบ เป็นการเผาทำลายแมลงศัตรูธรรมชาติ สาเหตุก่อให้เกิดอาการระคายเคืองหรือแสบตา ฝุ่นละอองที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินหายใจ สาเหตุของอาการอ่อนเพลีย แน่นหน้าอก ปวดศีรษะ และสาเหตุของภาวะโลกร้อน ซึ่งจากผลการเปรียบเทียบดังกล่าว จะเห็นได้ว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ที่ได้รับการประชาสัมพันธ์และถ่ายทอดความรู้ มีการรับรู้ถึงผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าว โดยเฉพาะการรับรู้ผลกระทบต่อการเกษตร สุขภาพอนามัย และสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการประชาสัมพันธ์และถ่ายทอดความรู้เป็นช่องทางในการสร้างการรับรู้แก่เกษตรกร โดยการแสดงตัวอย่างให้เห็นถึงผลกระทบที่เกิดขึ้น พร้อมแนวทางแก้ไขสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในบริบทของตนเอง โดย Kamnil (2015) กล่าวว่า การรับรู้ผลกระทบจากการเผาของเกษตรกร มีการรับข้อมูลจากสื่อต่าง ๆ อาทิเช่น โทรทัศน์ วิทยุชุมชน การรณรงค์ประชาสัมพันธ์ รวมถึงระบบเครือข่ายหรือบ้านเรือนเคียงกันที่สามารถแลกเปลี่ยนประสบการณ์ที่ได้รับโดยตรง เป็นต้น (Table 3)

#### 3. ภาระหนี้สิน

การศึกษาได้แบ่งเกษตรกร ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ มีและไม่มีการหนี้สิน เมื่อทดสอบความแตกต่างของระดับการรับรู้เฉลี่ยทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้สถิติ t-test

Table 2. Comparison of farmer's perceptions on effects of rice stubble and straws burning according to different farming experiences

Perceptions on effects of rice stubble and straws burning	farming experience						F	P-value
	≤ 30 years (n = 83)		31–40 years (n = 60)		> 40 years (n = 67)			
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD		
1. Cause of soil deterioration, resulting increase in production costs	2.20	0.92	2.50	0.67	2.63	0.66	2.11	0.124
2. Makes the soil dense, not crumbly, affecting the growth of plants	2.20	0.92	2.50	0.80	2.60	0.70	1.57	0.211
3. Destroys insects, natural enemies and beneficial microorganisms in the soil	2.20	0.92	2.42	0.79	2.62	0.68	2.07	0.129
4. Cause of eye irritation or burning eyes	2.70	0.48	2.75	0.45	2.77	0.51	0.09	0.918
5. Fine dust causing of respiratory disease, allergies or flu	2.50	0.71	2.75	0.45	2.71	0.57	0.70	0.497
6. Cause weakness, chest tightness, headache or nausea	2.40	0.84	2.42	0.79	2.62	0.65	1.02	0.364
7. Cause of greenhouse gases that cause climate change	2.50	0.71	2.67	0.49	2.71	0.58	0.62	0.540
8. Cause rain not falling according to the season	2.10	0.88	2.50	0.79	2.46	0.81	0.95	0.388
9. Reduced visibility which causing accidents on the road	2.60	0.70	2.58	0.52	2.81	0.46	2.08	0.127
10. Barrier to international trade, i.e., taxation for countries with greenhouse gas emissions	2.00	0.94	1.92	0.90	1.85	0.92	0.15	0.863
11. Burning in the open, must be punished by law	2.00	0.94	2.33	0.78	2.34	0.85	0.77	0.466
12. Make the scenery not bright and the atmosphere not fresh thus affecting the country's tourism	2.60	0.70	2.50	0.67	2.65	0.64	0.35	0.708

ดังปรากฏผลตาม Table 4 พบว่า มีจำนวน 1 ประเด็นที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 ได้แก่ ฝุ่นละอองขนาดเล็กเป็นสาเหตุของโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ สำหรับผู้ที่เป็นโรคภูมิแพ้ทำให้เกิดอาการแพ้หรือเป็นไข้หวัด จะเห็นได้ว่าเกษตรกรที่มีภาวะหนี้สินมีการรับรู้ถึงผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวต่อผู้ที่เป็นโรคภูมิแพ้มากกว่าเกษตรกรที่ไม่มี อาจเป็นเพราะผู้ที่มีหนี้สินมักมีแรงขับเคลื่อนในการดำเนินชีวิต และมีความระมัดระวังใน

เรื่องสุขภาพอนามัยของตนเอง จึงเป็นเหตุผลของเกษตรกรที่มีหนี้สินมีการรับรู้มากกว่า และสอดคล้องกับการศึกษาของ Chanthon *et al.*, (2021) ที่พบว่า เกษตรกรที่มีภาวะหนี้สินมีการรับรู้ผลกระทบต่อสถานการณ์ภัยพิบัติ และพร้อมมีการปรับตัวมากกว่าเกษตรกรที่ไม่มีภาวะหนี้สิน อาจเนื่องมาจากต้องการหลีกเลี่ยงปัญหาด้านสุขภาพที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานเพื่อสร้างรายได้ในการนำไปชำระหนี้ต่อไป

Table 3. Comparison of farmer's perceptions on effects of rice stubble and straws burning according to different receiving knowledge transfer

Perceptions on effects of rice stubble and straws burning	Received knowledge transfer				t	P-value
	received (n = 171)		non-received (n = 39)			
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD		
1. Cause of soil deterioration, resulting increase in production costs	2.71	0.57	2.15	0.90	3.66	0.000***
2. Makes the soil dense, not crumbly, affecting the growth of plants	2.71	0.58	2.00	0.95	4.48	0.000***
3. Destroys insects, natural enemies and beneficial microorganisms in the soil	2.69	0.60	2.13	0.92	3.63	0.000***
4. Cause of eye irritation or burning eyes	2.81	0.42	2.56	0.72	2.03	0.000***
5. Fine dust causing of respiratory disease, allergies or flu	2.77	0.47	2.41	0.82	2.66	0.000***
6. Cause weakness, chest tightness, headache or nausea	2.65	0.61	2.38	0.85	1.85	0.000***
7. Cause of greenhouse gases that cause climate change	2.74	0.54	2.49	0.72	2.09	0.000***

\*\*\* Significant different at  $P < 0.001$  level

Table 4. Comparison of farmer's perceptions on effects of rice stubble and straws burning according to different household debt

Perceptions on effects of rice stubble and straws burning	Indebted				t	P-value
	have (n = 155)		not-have (n = 55)			
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD		
1. Fine dust causing of respiratory disease, allergies or flu	2.73	0.53	2.64	0.68	-0.922	0.360*

\* Significant different at  $P < 0.05$  level

#### 4. การมีโรคประจำตัวเป็นโรคภูมิแพ้ของสมาชิก ครัวเรือนเกษตรกรผู้ปลูกข้าว

การศึกษาได้แบ่งเกษตรกร ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ มีและไม่มีสมาชิกครัวเรือนเป็นโรคประจำตัวโรคภูมิแพ้ เมื่อทดสอบความแตกต่างของระดับการรับรู้เฉลี่ยทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้สถิติ t-test พบว่า มีจำนวน 1 ประเด็นที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ได้แก่ การรับรู้ผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อมโดยหมอกควันหรือฝุ่นละอองที่เกิดจากการเผาตอซังและฟางข้าว ทำให้ทัศนวิสัยในการมองเห็นลดลงเป็นสาเหตุของการเกิดอุบัติเหตุบนท้องถนน ซึ่งจะเห็นได้ว่า

ครัวเรือนเกษตรกรที่มีสมาชิกมีโรคประจำตัวเป็นโรคภูมิแพ้ มีการรับรู้ต่ำกว่าครัวเรือนที่ไม่มีสมาชิกมีโรคภูมิแพ้ เป็นโรคประจำตัว อาจเป็นเพราะครัวเรือนที่มีสมาชิกเป็นโรคภูมิแพ้ มีความคิดเห็นว่า ผลกระทบจากหมอกควันหรือฝุ่นละอองที่มีต่อการจราจรบนท้องถนนเป็นเรื่องไกลตัว เพราะผลกระทบดังกล่าวไม่มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับโรคประจำตัวที่เป็นอยู่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมกำบังกันอากาศภูมิแพ้ในเด็ก Somdee *et al.* (2017) พบว่า สิ่งแวดล้อมภายนอกบ้านไม่มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมกำบังกันอากาศภูมิแพ้

โดยเด็กมีการรับรู้ว่าสิ่งแวดล้อมดังกล่าว ไม่สามารถจัดการแก้ไขได้ด้วยตนเอง จึงไม่มีความรู้สึกละอายใจต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกนั้นจะมีผลต่อพฤติกรรมมารป้องกันอาการภูมิแพ้ของตนเอง (Table 5)

### 5. การจัดการตอซังและฟางข้าวของเกษตรกร

การศึกษาได้แบ่งเกษตรกร ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เเผาและไม่มีการเผาตอซัง และฟางข้าว เมื่อทดสอบความแตกต่างของระดับการรับรู้เฉลี่ยทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้สถิติ t-test ดังปรากฏผลตาม Table 6 พบว่า การรับรู้ผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวที่เปรียบเทียบเหมือนการเผาในที่โล่งเป็นการกระทำความผิดตามกฎหมาย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.001 และเป็นสาเหตุของภาวะฝนไม่ตกต้องตามฤดูกาล มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยเกษตรกรที่ไม่เผาตอซังและฟางข้าวมีการรับรู้มากกว่าเกษตรกรที่มีการเผาตอซังและฟางข้าว

เพราะปัจจุบันจะเห็นได้ว่าฝนไม่ตกต้องตามฤดูกาล หรือตกมากกว่าปกติจนก่อให้เกิดน้ำท่วม หรือฝนทิ้งช่วง จนเกิดภัยแล้ง รวมไปถึงฝนตกในฤดูกาลผสมเกสร หรือช่วงเกี่ยวข้าว ส่งผลให้ผลผลิตตกต่ำ ไม่ได้คุณภาพตามที่ตลาดต้องการ จึงทำให้เกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการส่งเสริมการหยุดเผาในพื้นที่การเกษตรปี พ.ศ. 2558 ของกรมส่งเสริมการเกษตร ส่วนใหญ่ร้อยละ 98.52 หยุดเผาเศษวัสดุการเกษตรในไร่นาของตนเอง โดยมีการใช้เทคโนโลยีการเกษตรทดแทนการเผา เช่น โถกลบ ทำปุ๋ยหมัก ใช้น้ำหมักเพื่อเร่งการย่อยสลายซากพืช และนำเศษวัสดุการเกษตรไปใช้ประโยชน์อื่นเพื่อทดแทนการเผา เช่น ใช้เลี้ยงสัตว์ ใช้เป็นวัสดุคลุมแปลงเพาะปลูก ใช้เพาะเห็ด เป็นต้น (Department of Agricultural Extension, 2015) เพื่อเป็นการใช้ทรัพยากรในแปลงให้คุ้มค่า ประหยัดต้นทุนการผลิต รวมทั้งลดการปล่อยมลพิษที่เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน

Table 5. Comparison of farmer's perceptions on effects of rice stubble and straws burning according to different sickness of household members

Perceptions on effects of rice stubble and straws burning	members with allergies				t	P-value
	have (n = 34)		not-have (n = 176)			
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD		
1. Reduced visibility which causing accidents on the road	2.68	0.59	2.81	0.45	-1.22	0.228*

\* Significant different at P < 0.05 level

Table 6. Comparison of farmer's perceptions on effects of rice stubble and straws burning according to different rice stubble and straws management

Perceptions on effects of rice stubble and straws burning	Rice stubble and straws management				t	P-value
	Non-burning (n=34)		Burning (n=176)			
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD		
1. Cause rain not falling according to the season	2.48	0.75	2.42	0.85	0.46	0.039*
2. Burning in the open, must be punished by law	2.48	0.73	2.23	0.90	2.15	0.000***

\*, \*\*\* Significant different at P < 0.05, P < 0.001 levels

## สรุป

จากผลการศึกษา พบว่า เกษตรกรผู้ปลูกข้าวมีการรับรู้ถึงผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวตั้งแต่ภาคการเกษตร สุขภาพอนามัย สิ่งแวดล้อม การท่องเที่ยว และกฎหมาย อยู่ในระดับมากทุกประเด็น มีเพียงข้อกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ ที่เกษตรกรส่วนใหญ่มีการรับรู้ในระดับน้อย ทั้งนี้เกษตรกรที่มีการจัดการตอซังและฟางข้าวโดยปลอดการเผามีการรับรู้ผลกระทบมากกว่าเกษตรกรที่มีการจัดการโดยการเผาทำลาย ซึ่งเกษตรกรให้เหตุผลว่าเป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกที่สุด รวมถึงเป็นข้อตกลงของผู้ประกอบการรถไถเตรียมดิน และเกษตรกรที่ได้รับการประชาสัมพันธ์และถ่ายทอดความรู้มีการรับรู้มากกว่าเกษตรกรที่ไม่ได้รับ โดยช่องทางที่เกษตรกรสามารถเข้าถึงได้มากที่สุดคือเสียงตามสายภายในชุมชน และการประชุมหรือฝึกอบรมต่าง ๆ ซึ่งถือว่าเป็นแนวทางสำคัญที่จะนำไปสู่การสร้างความตระหนักและแก้ไขปัญหาการเผาตอซังและฟางข้าวของเกษตรกรในพื้นที่ให้เกิดเป็นรูปธรรม โดยมุ่งเน้นการส่งเสริมไปที่เกษตรกรที่ยังคงดำเนินการเผาตอซังและฟางข้าว และผู้ประกอบการรถไถเตรียมดิน เนื่องจากกลุ่มเป้าหมายดังกล่าวมีการรับรู้ค่อนข้างน้อยหรือเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเผาตอซังและฟางข้าวในพื้นที่ โดยต้องอาศัยความร่วมมือของหน่วยงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในพื้นที่ ดังนี้ 1) หน่วยงานในชุมชน ควรมีการประชาสัมพันธ์ผ่านเสียงตามสายอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับผลกระทบจากการเผาตอซังและฟางข้าวหรือเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยเฉพาะข้อมูลเชิงประจักษ์เกี่ยวกับข้อกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ และแนะนำทางเลือกในการจัดการตอซังและฟางข้าวหรือเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทดแทนการเผาทำลาย 2) หน่วยงานภาครัฐที่เกี่ยวข้อง ควรมีการจัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการหรือส่งเสริมสนับสนุนกลุ่มเป้าหมายเกี่ยวกับวิธีการจัดการตอซังและฟางข้าวหรือเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทดแทนการเผาทำลาย 3) หน่วยงานภาคเอกชน ควรดำเนินกิจกรรมเพื่อสังคม (CSR) ที่เป็นการกระตุ้นการรับรู้ของเกษตรกรในพื้นที่อย่างต่อเนื่อง โดยเป็นผู้สนับสนุนเงินทุนใน

การพัฒนาเทคโนโลยีเครื่องจักรกลทางการเกษตรที่ใช้ในเตรียมดิน การผลิตปุ๋ยอินทรีย์ หรือการแปรรูปฟางข้าวเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม และให้เกษตรกรหรือกลุ่มเกษตรกรในพื้นที่เป็นดำเนินการ หรือใช้ประโยชน์ร่วมกัน

## เอกสารอ้างอิง

- Adirekchotikul, N. 2015. The perceptions of public relations: A case study of Makluea Mai Tambol Administrative Organization, Sungnoen, Nakhon Ratchasima. Ratchaphruek Journal 13(3): 20-26. (in Thai)
- Best, J.W. 1997. Research in Education. 4<sup>th</sup> ed. Prentice Hall Englewood Cliffs, New Jersey. 684 p.
- Biederbeck, V.O., C.A. Campbell, K.E. Bowren, M. Schnitzer and R.N. McIver. 1980. Effect of burning cereal straw on soil properties and grain yields in Saskatchewan. Soil Science Society of America Journal 44(1): 103-111.
- Boonyapitaks, S. 2021. Factors for agricultural waste management of farmers to reduce burning: A case study of Ban Phai district, Khon Kaen province. M.S. Thesis. National Institute of Development Administration, Bangkok. 154 p. (in Thai)
- Chanthon, N., P. Treewannakul and M. Rengkwunkway. 2021. Adaptation to drought situation of vegetable growers in Na Khu sub-district, Phak Hai district, Phra Nakhon Si Ayutthaya province. Agricultural Science Journal 52(1): 1-10. (in Thai)
- Department of Agricultural Extension. 2015. Project of extension to stop burning in agri-area 2015. (Online). Available: <http://www.plan.doae.go.th/myweb2/prbm58/p2458.pdf> (October 12, 2022). (in Thai)

- Department of Agricultural Extension. 2020. Extension to stop burning in agri-area. 5<sup>th</sup> ed. New Thammasat PCL, Bangkok. 16 p. (in Thai)
- Dailynews. 2012. Stubble burning which causing weakness more than benefit, Negative effects more than Good result. (Online). Available: <https://d.dailynews.co.th/agriculture/288255/> (June 19, 2021). (in Thai)
- Geo-Informatics and Space Technology Development Agency. 2022. Heat point area. (Online). Available: [https://www.gistda.or.th/news\\_view.php?n\\_id=5395 &lang=TH](https://www.gistda.or.th/news_view.php?n_id=5395&lang=TH) (October 10, 2022). (in Thai)
- Kamalasai District Agricultural Office. 2020. Kamalasai district agricultural development strategy (2018-2022). Kamalasai District Agricultural Office, Kalasin. 29 p. (in Thai)
- Kamnil, P. 2015. Perception and awareness of people in Tapha subdistrict Mae Chaem district, Chiang Mai province towards smog problem. M.P.A. Independent study. Chiang Mai University, Chiang Mai. 92 p. (in Thai)
- Kongjan, K., P. Treewannakul and M. Rengkwunkway. 2021. Management of rice stubble and straw of farmers in project of extension for stop burning at agri-area in Phra Nakhon Si Ayutthaya province. Agricultural Science Journal 52(1): 20-31. (in Thai)
- Lerdkrai, V. 2016. Nutrient Cycling and Increasing Organic Matter in the Soil from Plant Residues in the Agricultural Plots by plowing the Stubble. Academic Article. Academic Affairs and Planning Bureau, Agricultural Land Reform Office, Bangkok. 12 p. (in Thai)
- Lerdyoosuk, C., S. Praneetvatakul and P. Chatwachirawong. 2018. Farmer's perception and preference on environmentally friendly harvesting practices of sugarcane at Phetchabun province. Khon Kaen Agriculture Journal 46(2): 237-246. (in Thai)
- Limuntachai, N. 2018. MAI public and people participation in preventing wildfire and haze pollution in Doi Suthep-Pui National Park in Chiang Mai. ARU Research Journal Humanities and Social Sciences 5(2): 77-84. (in Thai)
- Ministry of Agriculture and Cooperatives. 2020. Ministry of Agriculture and Cooperatives going forward with measures to stop burning in agricultural areas. (Online). Available: <https://www.moac.go.th/news-preview-421891792914> (June 1, 2021). (in Thai)
- Montree, W. 2013. Problems and obstacles in solving haze problem of local administrative organizations in Mae Chaem district, Chiang Mai province. M.P.A. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 135 p. (in Thai)
- Pollution Control Department. 2021. Air quality index. (Online). Available: [https://www.pcd.go.th/pcd\\_news/11151](https://www.pcd.go.th/pcd_news/11151) (May 8, 2021). (in Thai)
- Prangbang, P., T. Kunkoon, T. Yamongkol, N. Pumijumnong, S. Sereenonchai, U. Chareonwong, T.N. Stewart and N. Arunrat. 2019. Farmers' perception and adaptation to climate change in Thailand. Prawarun Agricultural Journal 16(1): 105-116. (in Thai)
- Rongmuang, K., W. Arjham, P. Liplap and T. Hinsui. 2017. Assessment of pollutant emission from open field burning of rice straw. Farm

- Engineering and Automation Technology Journal 3(1): 53-61. (in Thai)
- Somdee, P., Y. Pongjaturawit and N. Chaimongkol. 2017. Factors related to preventive behavior of rhinitis symptom among school-age children. The Public Health Journal of Burapha University 12(1):43-53. (in Thai)
- Thaweratana, P. 1997. Research Methodology in Behavioral Sciences and Social Sciences. 7<sup>th</sup> ed. Srinakharinwirot University, Bangkok. 302 p. (in Thai)
- Thairath Online. 2021. Moldboard plow is the answer of rice stubble burning. (Online). Available: <https://www.thairath.co.th/news/local/2303745> (October 12, 2022). (in Thai)
- Yothongyos, M. and P. Sawassan. 2017. Size determination of sample for research. (Online). Available: <http://www.fsh.mi.th/km/wp-content/uploads/2014/04/resch.pdf> (June 12, 2021). (in Thai)
-

การประเมินศักยภาพของเชื้อราก่อโรคแมลงครั้งแรกในห้องปฏิบัติการ  
ต่อการควบคุมหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู *Sesamia inferens* (Walker)  
(Lepidoptera: Noctuidae) ในประเทศไทย

The First Laboratory Evaluation of Potential Entomopathogenic Fungi  
for Controlling the Pink Stem Borer *Sesamia inferens* (Walker)  
(Lepidoptera: Noctuidae) in Thailand

สิริญา คัมภีโร\* และ โสภณ อุไรชื่น  
Siriya Kumpiro\* and Sapon Uraichuen

ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Entomology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,

Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

\*Corresponding author: Email: chulee64@gmail.com

(Received: 27 June 2023; Accepted: 3 August 2023)

**Abstract:** Entomopathogenic fungi serve as crucial natural enemies to insect pests including the pink stem borer, *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), an important pest of sugarcane in Thailand. Therefore, the first laboratory assessment performed to evaluate the efficacy of entomopathogenic fungi for controlling *S. inferens* was conducted under the aims of determining the pathogenicity and virulence of four species and seven isolates of entomopathogenic fungi: *Beauveria bassiana* isolate B001, *B. bassiana* isolate B002, *Fusarium* sp. isolate FSS, *Metarhizium anisopliae* isolate M001, *M. anisopliae* isolate M002, *M. anisopliae* isolate MSS and *Purpureocillium lilacinum* isolate PSS, retrieved from National Biological Control Research Center (NCBRC), Central Regional Center and Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, to control *S. inferens* through topical application by dropping the conidia suspension of the pathogenic fungi locally on the intersegmental membrane of the thorax between segment 1 and segment 2 of the 4th instar larvae under laboratory conditions. The result revealed that *B. bassiana* isolate B001, *M. anisopliae* isolate M001 and *M. anisopliae* isolate MSS could infect the fourth instar larvae of *S. inferens* with mortality rates at  $37.50 \pm 5.80$ ,  $72.50 \pm 9.60$  and  $85.00 \pm 5.80\%$  and the  $LT_{50}$  at 18.12, 6.03 and 2.93 days, respectively. *M. anisopliae* isolate M001 and *M. anisopliae* isolate MSS that elicited more than 50 percent mortality against *S. inferens* were further assessed for their virulence. The latter isolate was more virulent than the former one with  $LC_{50}$  values of  $3.69 \times 10^6$  and  $4.73 \times 10^5$  conidia per milliliter, respectively.

Lastly, *M. anisopliae* isolate MSS, the most virulent fungal pathogen among the tested species, was evaluated against *S. inferens* larvae of instars 2-3, 4-5, and 6-7 for its virulence. Remarkably, the fungus infected *S. inferens* larvae of different ages and showed infectivity to its host with  $LC_{50}$  values of  $9.26 \times 10^4$ ,  $6.02 \times 10^5$  and  $5.12 \times 10^6$  conidia per milliliter, respectively.

**Keywords:** Entomopathogenic fungi, pink stem borer, *Sesamia inferens*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*

**บทคัดย่อ:** เชื้อราสาเหตุโรคแมลงเป็นศัตรูธรรมชาติที่สำคัญของแมลงศัตรูพืช รวมถึงหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู (*Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)) ซึ่งจัดเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของอ้อยในประเทศไทย ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษากิจกรรมประเมิณประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในกรควบคุมหนอน *S. inferens* ขึ้นเป็นครั้งแรกภายใต้วัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 4 ชนิด 7 ไอโซเลทเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท B001 เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B002 เชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลท FSS เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท M001 เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M002 เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS และ เชื้อรา *Purpureocillium lilacinum* ไอโซเลท PSS ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ในการควบคุมหนอน *S. inferens* ด้วยวิธีสัมผัสตาย ด้วยการหยดสารแขวนลอยโคโคนีเดียของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงลงเฉพาะที่บริเวณเนื้อเยื่อปล้องอกระหว่างปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 ของหนอน *S. inferens* วัยที่ 4 ในระดับห้องปฏิบัติการ ในขั้นตอนแรกเป็นขั้นตอนการคัดกรองการเกิดโรคกับหนอน *S. inferens* จากเชื้อราที่ทดสอบทั้งหมด ผลจากการทดสอบมีเพียงเชื้อรา 2 ชนิด 3 ไอโซเลท ที่สามารถก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ได้แก่เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B001 เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 และ เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ซึ่งทำให้หนอนมีอัตราการตาย  $37.50 \pm 5.80$ ,  $72.50 \pm 9.60$  และ  $85.00 \pm 5.80$  เปอร์เซ็นต์ และค่า  $LT_{50}$  18.12, 6.03 และ 2.93 วัน ตามลำดับ จากนั้นนำผลการคัดกรองการเกิดโรคกับหนอน *S. inferens* ที่ทำให้มีอัตราการตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มาทำการทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง พบว่า เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS มีความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ได้ดีกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 มีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ  $4.73 \times 10^5$  และ  $3.69 \times 10^6$  โคโคนีเดียต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขั้นสุดท้ายเป็นการนำเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ซึ่งมีความรุนแรงที่สุดในการก่อโรคของเชื้อราทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ มาทดสอบกับหนอน *S. inferens* วัย 2-3, 4-5 และ 6-7 เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ดังกล่าวสามารถเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* มีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ  $9.26 \times 10^4$ ,  $6.02 \times 10^5$  และ  $5.12 \times 10^6$  โคโคนีเดียต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** เชื้อราสาเหตุโรคแมลง หนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู *Sesamia inferens*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*

## คำนำ

หนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) เป็นแมลงศัตรูที่สำคัญในการเพาะปลูกอ้อย เนื่องจากเป็นแมลง

ศัตรูอ้อยที่เข้าทำลายอ้อยได้ทั้งระยะหนอนอ้อยและระยะอย่างปล้อง โดยระยะหนอนเข้าทำลายหนอนอ้อย ทำให้อ้อยเกิดอาการยอดแห้งตาย แม้อ้อยสามารถแตกหน่อขึ้นใหม่เพื่อชดเชย แต่หนอนอ้อยที่แตกใหม่ในระยะหลัง ๆ มีอายุสั้นลง ทำให้ผลผลิตและคุณภาพอ้อยลดลง

หากหนอน *S. inferens* เข้าทำลายลำต้นอ้อย มีผลทำให้ยอดอ้อยเหี่ยวและเจาะลำต้นอ้อยเป็นรูกลวงด้านในส่งผลให้ลำต้นอ้อยแตก หากตัวหนอนเข้าทำลายที่บริเวณฐานหรือโคนลำ มักพบรอยเจาะเป็นรูบริเวณโคนต้นอ้อยได้ ส่วนใหญ่หนอน *S. inferens* เข้าทำลายอ้อย เมื่ออายุ 1.5 - 4 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่อ้อยแตกหน่อ และสามารถเข้าทำลายอ้อยได้ในทุกพื้นที่ของประเทศไทย โดยเฉพาะพื้นที่ปลูกอ้อยต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน (Attajarusit, 2001) การเข้าทำลายของหนอน *S. inferens* ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและผลผลิต อ้อยที่ถูกทำลายสูญเสียน้ำหนัก 16.59 - 36.53 เปอร์เซ็นต์ สูญเสียค่าโพสซึ่งเป็นคาร์บอนของน้ำตาลซูโครส 4.03 - 33.95 เปอร์เซ็นต์ และสูญเสียความหวาน (CCS) 3.76 - 40.60 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์อ้อย ซึ่งเป็นการสูญเสียผลผลิตอ้อยทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพส่งผลกระทบต่อผลผลิตน้ำตาล (Kokkan et al., 2008) แม้ว่าในสภาพธรรมชาติมีศัตรูธรรมชาติช่วยในการควบคุมการเข้าทำลายของหนอน *S. inferens* และมีการส่งเสริมให้มีการใช้ตัวห้ำและแตนเบียนในการป้องกันกำจัด อันได้แก่ แตนเบียนหนอนโคทีเซีย *Cotesia flavipes* (Cameron) แตนเบียนไซทริโคแกรมมา (*Trichogramma* spp.) และแมลงหางหนีบ *Proreus simulans* (Stal.) (Pitak, 2001) มีข้อจำกัดในการปล่อยแตนเบียนในช่วงฤดูฝนหรือขณะฝนตก แต่ในช่วงฤดูดังกล่าวอาจพบเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงในสภาพธรรมชาติ เชื้อราสาเหตุโรคแมลงมีความสามารถในการเข้าก่อโรคกับแมลงอาศัยได้ด้วยการสัมผัสและเข้าทำลายแมลงอาศัย โดยแทงเส้นใยทะลุผ่านชั้นผนังลำตัวของแมลงเจริญเติบโตภายในช่องว่างลำตัวของแมลง และสร้างเส้นใยปกคลุมตัวแมลง เมื่ออุณหภูมิเหมาะสมเชื้อราผลิตโคโคนิเดียเพื่อแพร่กระจายต่อไป ทำให้แมลงศัตรูมีโอกาสในการติดเชื้อราได้มากกว่า เชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสที่แมลงอาศัยต้องกินเข้าไป และสร้างพิษในระบบทางเดินอาหารของแมลง นอกจากนี้ ข้อดีอื่น ๆ ของการใช้เชื้อราป้องกันกำจัดแมลง เช่น เชื้อราয়งอาศัย ลม ฝน และปัจจัยอื่นในการแพร่กระจายโคโคนิเดียไปในสภาพแวดล้อมได้ดี (Attathom, 2003)

ยังไม่พบรายงานการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงใน การป้องกันกำจัดหนอน *S. inferens* ในประเทศไทย แต่มีการรายงานในต่างประเทศ Varma and Tandan (1996) และ Varma et al. (1988) รายงานว่า เชื้อรา *Beauveria bassiana* (Bals.), Vuill. เชื้อรา *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin สามารถเข้าก่อโรคกับ หนอนวัยที่ 5 ของ *S. inferens* ในสภาพห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม ศักยภาพและความรุนแรงของการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคนั้นมีความแตกต่างไปตามชนิดของเชื้อรา ชนิดและสภาพของแมลงอาศัย และสภาพแวดล้อม ซึ่งจำเป็นต้องมีการทดสอบประเมินและคัดเลือกชนิดของเชื้อราที่มีความเหมาะสมก่อนการพัฒนาต่อยอดเพื่อการใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงใน การควบคุม หนอน *S. inferens* ภายใต้วัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 4 ชนิด 7 ไอโซเลท ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ในการควบคุมหนอน *S. inferens* ด้วยวิธีสัมผัสตาย โดยหยดสารแขวนลอยโคโคนิเดียของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงลงเฉพาะที่บริเวณเนื้อเยื่อปล้อง ออกระหว่างปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 ของหนอน *S. inferens* ในระดับห้องปฏิบัติการระหว่างเดือนธันวาคม 2562 - เดือนมีนาคม พ.ศ. 2565 เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้ควบคุมหนอน *S. inferens* ต่อไปในอนาคต

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเพาะเลี้ยงหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพูเพื่อเป็น stock culture

ทำการเพิ่มปริมาณหนอน *S. inferens* โดยการรวบรวมหนอน *S. inferens* จากแปลงปลูกอ้อยของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี และ ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง จังหวัด

นครปฐม ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 - เดือน ธันวาคม 2564 แยกเลี้ยงตัวหนอนในกล่องพลาสติกใส ทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 17.5 เซนติเมตร สูง 7 เซนติเมตร เจาะฝากล่องเพื่อให้มีการถ่ายเทอากาศ และไม่ให้อากาศในกล่องขึ้นมากเกินไป โดยให้ท่อนอ้อย อ่อนสดสายพันธุ์ LK92-11 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ยาว 22 เซนติเมตร จำนวน 3-4 ท่อนต่อกล่อง เป็นพืชอาหาร เมื่อหนอน *S. inferens* เข้าดักแด่ ทำการ คัดแยกเพศผู้และเพศเมีย จากความห่างของ genital slit และ anal slit ที่ตั้งอยู่ด้านล่างของปล้องท้องที่ 8 และ 9 โดยเพศผู้มี genital slit ชิด anal slit มากกว่าเพศเมีย (Tonphukhiaw *et al.* 2018; Tuncer and Aker, 2017) ภายใต้อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม นำดักแด่มาวางใน กล่องใบใหม่เส้นผ่านศูนย์กลาง 17.5 เซนติเมตร สูง 7 เซนติเมตร จำนวน 10 คู่ต่อกล่อง จำนวน 5 กล่อง เพื่อให้เจริญเติบโตเป็นผีเสื้อตัวเต็มวัยสืบพันธุ์และ วางไข่บนกระดาษทิชชูอเนกประสงค์ที่พับเป็นรูปพัด เหลื่อมซ้อนกัน ใช้ก้อนสำลีชุบน้ำฝึ้งเจือจาง 1 เปอร์เซ็นต์ วางบนฝาขวดน้ำดื่มเป็นอาหาร และให้ความชื้นภายใน กล่องด้วยก้อนสำลีชุบน้ำวางบนฝาขวดน้ำดื่ม เช่นเดียวกัน เก็บรวบรวมไข่แต่ละวันหลังจากแม่ผีเสื้อ ได้รับการผสมพันธุ์ 2 วัน ทำการเก็บไข่ทุกวันจนตัวเต็มวัยตาย แยกไข่ลงในกล่องพลาสติกทรงกลมใสขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร

ที่เจาะฝากล่องเป็นรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เพื่อระบายอากาศ เมื่อไขหนอน *S. inferens* มีจุดสีดำ หรือ blue point จากส่วนหัวของหนอนภายในไข่หรือ ระยะ black head เริ่มวางอาหารเทียมของ *S. inferens* ซึ่งเป็นสูตรที่พัฒนาโดย Maneerat *et al.* (2006) ตัดอาหารเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาด 1x1x1 เซนติเมตร (Tonphukhiaw *et al.*, 2018) และทำการเปลี่ยนอาหาร เทียมทุก 3 วัน นำหนอน *S. inferens* ในระยะการ-เจริญเติบโตที่ต้องการใช้ในการทดลองต่อไป

### การเพิ่มปริมาณและเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคแมลง เพื่อการทดสอบ

นำเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงที่ได้รับความ-อนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์ แห่งชาติ ภาคกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยา เขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม (Table 1) เพิ่มปริมาณ บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร potato dextrose agar (PDA, Difco<sup>®</sup>) ป่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศา-เซลเซียส ความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยโคโคนีด้วยน้ำกลั่น ผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนิ่งฆ่าเชื้อ แล้วประมาณ 3 - 5 มิลลิเมตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อรา ใช้ด้านหลังช้อนออลูมิเนียมที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วถูเบา ๆ ที่ ผิวหน้าของโคโคนี เพื่อเก็บโคโคนีเดียวของเชื้อราสาเหตุโรค

Table 1. List of entomopathogenic fungi, and their previous insect hosts, pathenogenic and virulent screening on pink stem borer (*Sesamia inferens* (Walker)) (Lepidoptera: Noctuidae)

Species <sup>1</sup>	Isolates	Insect hosts
<i>Beauveria bassiana</i>	B001	<i>Nilaparvata lugens</i> (Stål) (Hemiptera: Delphacidae)
<i>Beauveria bassiana</i>	B002	<i>Phyllotreta sinuata</i> Stephens (Coleoptera: Chrysomelidae)
<i>Fusarium</i> sp.	FSS	<i>Chilo tumidicostalis</i> (Hampson)(Lepidoptera: Pyralidae)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	M001	<i>Dorysthenes buqueti</i> Guerin (Coleoptera: Cerambycidae)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	M002	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	MSS	<i>Chilo tumidicostalis</i> (Hampson)(Lepidoptera: Pyralidae)
<i>Purpleocillium lilacinum</i>	PSS	<i>Chilo tumidicostalis</i> (Hampson)(Lepidoptera: Pyralidae)

<sup>1</sup>Source: National Biological Control Research Center (NBCRC), Central Regional Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom

แมลง และนับปริมาณโคโคนีเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า ด้วย hemacytometer จากนั้นปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยโคโคนีเดียด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อผสมกับ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ความเข้มข้นเป็น  $1 \times 10^8$  โคโคนีเดียต่อมิลลิลิตรเตรียมนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

เพื่อให้การวิจัยเป็นไปตามลำดับขั้นตอน การวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วยการศึกษาทดลอง 2 การทดลองหลัก คือ การคัดกรองเชื้อราและการทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความสามารถในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens*

### การคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงกับหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพูด้วยวิธีสัมผัสตาย

นำสารแขวนลอยโคโคนีเดียของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงแต่ละไอโซเลทที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^8$  โคโคนีเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร หยดลงบนด้านสันหลังของหนอน *S. inferens* วัยที่ 4 บริเวณเนื้อเยื่อปล้องอกระหว่างปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 (Mehinto *et al.*, 2014) กรรมวิธีละ 10 ตัว จำนวน 4 ซ้ำ ซึ่งประกอบด้วยเชื้อรา 7 ไอโซเลท (Table 1) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) ให้อ้อยสายพันธุ์ LK 92-11 อ่อนและสดที่ตัดเป็นท่อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ยาว 2.54 เซนติเมตร เป็นอาหารของหนอนที่ได้รับการทดสอบ และเปลี่ยนท่อนอ้อยทุก 2 วัน ป่มไว้ในตู้ป่มเพาะเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่มีด 8 ชั่วโมง (Bautista-Galvez *et al.*, 2012) บันทึกผลการเข้าก่อโรคทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน ย้ายหนอนที่ติดเชื้อตายวางบนแผ่นพลาสติกแข็งใสสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด  $4 \times 4$  เซนติเมตร ในกล่องพลาสติกใสทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร เพื่อสังเกตลักษณะเส้นใยและโคโคนีเดียที่เชื้อราผลิตออกมามากุมตัวหนอนให้ความชื้นในกล่องด้วยสำลีชุบน้ำพอมอาด คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ตายที่แท้จริงของแมลงด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925) และวิเคราะห์ระยะเวลาที่ทำให้หนอน *S. inferens* ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (ค่า  $LT_{50}$ ) โดย Probit analysis (Finney,

1952) ด้วย Excel version 2021 (Mekapogu, 2021) ทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถทำให้หนอน *S. inferens* ตายในอัตราที่สูงกว่าร้อยละ 50 เพื่อใช้ในการทดลองลำดับต่อไป

### การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความสามารถในการเข้าก่อโรคกับหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู

ภายหลังจากการคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงกับหนอน *S. inferens* ด้วยวิธีสัมผัสตาย นำผลที่ได้มาทดสอบมาทดสอบความรุนแรงของเชื้อ ซึ่งในหัวข้อนี้แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย คือ การทดลองย่อยที่ 1 ทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ทำให้หนอน *S. inferens* มีอัตราการตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากการคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่เข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* และการทดลองย่อยที่ 2 นำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความรุนแรงการก่อโรคสูงสุดจากการทดลองย่อยที่ 1 มาทดสอบความรุนแรงการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ระยะวัยต้น (หนอนวัยที่ 2-3) หนอนระยะวัยกลาง (หนอนวัยที่ 4-5) และ หนอนระยะวัยท้าย (หนอนวัยที่ 6-7)

**การทดลองย่อยที่ 1** นำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความสามารถในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ด้วยสารแขวนลอยเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ (5 กรรมวิธี)  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^7$ ,  $1.0 \times 10^8$  และ  $1.0 \times 10^9$  โคโคนีเดียต่อมิลลิลิตร ใช้วิธีสัมผัสตายเช่นเดียวกับการคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคแมลง กรรมวิธีละ 10 ตัว จำนวน 4 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) การสังเกตการตายและบันทึกผลการเข้าก่อโรคทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ตายที่แท้จริงของแมลงด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925) และวิเคราะห์ความเข้มข้นสารแขวนลอยโคโคนีเดียเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ทำให้หนอน *S. inferens* ตายร้อยละ 50 (ค่า  $LC_{50}$ ) โดย Probit analysis (Finney, 1952) ด้วย Excel version 2021 (Mekapogu, 2021) ทำการคัดเลือกเชื้อราสาเหตุ

โรคแมลงที่มีความรุนแรงของการก่อโรคได้สูงสุด (ค่า  $LC_{50}$  ต่ำที่สุด) เพื่อใช้ในการทดลองลำดับต่อไป

**การทดลองย่อยที่ 2** ทำการทดลองในทำนองเดียวกับการทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงด้วยค่าความเข้มข้นของโคนิเดียมที่ทำให้หนอน *S. inferens* ตายร้อยละ 50 ( $LC_{50}$ ) โดยนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีรุนแรงในการเกิดโรคกับหนอน *S. inferens* สูงที่สุด ทดสอบความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ใน 3 ช่วงระยะการเจริญเติบโต คือ หนอนระยะวัยต้น (หนอนวัยที่ 2-3) หนอนระยะวัยกลาง (หนอนวัยที่ 4-5) และ หนอนระยะวัยท้าย (หนอนวัยที่ 6-7) โดยใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 5 กรรมวิธี ได้แก่  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^7$  และ  $1.0 \times 10^8$  โคนิเดียมต่อมิลลิลิตร กรรมวิธีละ 10 ตัว ทำ 4 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) ด้วยวิธีสัมผัสตายเช่นเดียวกับการคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคแมลง การสังเกตการตายและการบันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ค่า  $LC_{50}$  ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองย่อยที่ 1

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

**การคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงกับหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพูด้วยวิธีสัมผัสตาย**

จากเชื้อรา 4 ชนิด 7 ไอโซเลท และกรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่นผสม Tween 80) (Table 1) มีเชื้อราสาเหตุโรคแมลง เพียง 2 ชนิด 3 ไอโซเลท สามารถเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* คือ เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B001 แยกได้จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* (Stål) เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 แยกได้จากด้วงหนวดยาวอ้อย *Dorystenes buqueti* Guerin และเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS แยกได้จากหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยลายจุดใหญ่ *Chilo tumidicostalis* (Linnaeus) (Table 1) โดยเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 3 ไอโซเลท ดังกล่าวสามารถเริ่มเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ในระยะเวลา 2 วัน หลังจากหนอนได้รับเชื้อรา ส่วนหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อรา

(กรรมวิธีควบคุม) ตัวหนอนมีลักษณะปกติ (Figure 1a) ขณะที่หนอนที่ได้รับเชื้อราและตายมีลักษณะตัวแข็งต่อมาเมื่อเส้นใยสีขาวและผลิตโคนิเดียมสีขาวขึ้นปกคลุมบนตัวหนอน *S. inferens* (Figure 1b) สำหรับหนอน *S. inferens* ที่สัมผัสเชื้อรา *M. anisopliae* มีลักษณะของเส้นใยเชื้อราสีขาวขึ้นปกคลุมบนตัวหนอนหลังจากนั้นผลิตโคนิเดียมสีขาวปกคลุมลำตัว (Figure 1c, 1d)

เมื่อครบ 10 วัน หลังการบันทึกข้อมูลการตายของหนอน *S. inferens* ที่ตายด้วยการเข้าก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS สามารถทำให้หนอน *S. inferens* เกิดโรคและมีอัตราตายสูงสุด รองลงมาคือ *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 และ *B. bassiana* ไอโซเลท B001 ตามลำดับ ด้านความสามารถทำให้หนอน *S. inferens* มีการตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $LT_{50}$ ) ในระยะเวลาสั้นที่สุดเท่ากับ 2.93 วัน โดยเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS (Table 2)

จากผลทดลองนี้ เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B001 ที่แยกได้จาก *N. lugens* เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 ที่แยกได้จากหนอน *D. buqueti* และเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ที่แยกได้จากหนอน *C. tumidicostalis* สามารถเข้าก่อโรคกับ *S. inferens* ในอัตราที่ทำให้หนอน *S. inferens* สูงถึงร้อยละ 85 ในระยะเวลา 10 วัน หลังได้สัมผัสโคนิเดียมของเชื้อรา ซึ่งสอดคล้องและเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษา Varma and Tandan (1996) และ Varma et al. (1988) ที่ได้ประเมินการก่อโรคของเชื้อรา *B. bassiana* ที่แยกจากตัวเต็มวัยของด้วง *Phytoscapus* sp. และเชื้อรา *M. anisopliae* ที่แยกได้จากผีเสื้อของ *Pyrilla perpusilla* สามารถเข้าก่อโรคกับหนอนระยะที่ 5 ของ *S. inferens* ได้ 20 - 70 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการศึกษานี้แสดงผลเปอร์เซ็นต์การตายที่สูงกว่าเล็กน้อย

**การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความสามารถในการเข้าก่อโรคกับหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู**

**การทดลองย่อยที่ 1** จากการทดลองข้างต้นได้คัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 และเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS

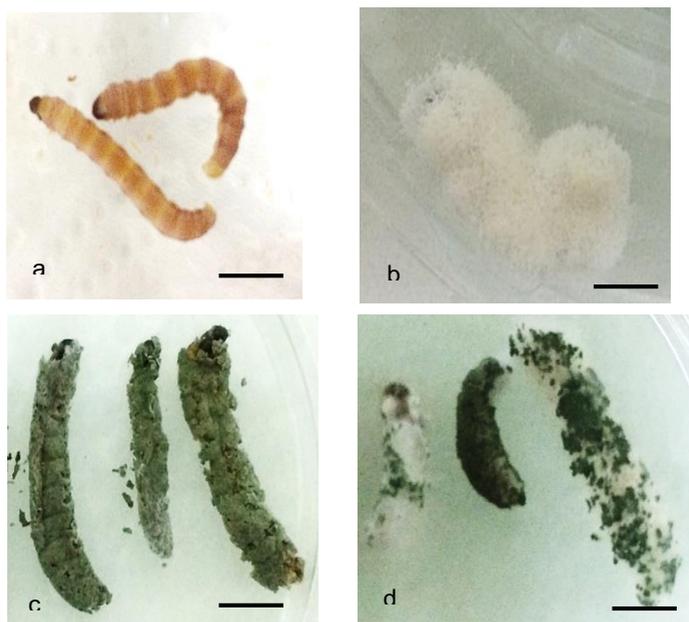


Figure 1. Symptoms of larval cadavers of *Sesamia inferens* (Walker) (a) Normal and (b) infected by *Beauveria bassiana* B001, (c) *Metarhizium anisopliae* M001, (d) *Metarhizium anisopliae* MSS. Each bar represents 2 millimeters

Table 2. Mortality of the fourth instar larvae of *Sesamia inferens* (Walker) at day 10 after contact to conidia suspension of entomopathogenic fungi at  $1.0 \times 10^8$  conidia/milliliter and their median lethal time values ( $LT_{50}$ )

Fungi	% Mortality	$LT_{50}$ (days)	95% Fiducial CI	
			Lower	Upper
<i>Beauveria bassiana</i> B001	37.50 ± 5.80	18.12	8.88	36.97
<i>Beauveria bassiana</i> B002	0.00	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp. FSS	0.00	-	-	-
<i>Metarhizium anisopliae</i> M001	72.50 ± 9.60	6.03	4.94	7.36
<i>Metarhizium anisopliae</i> M002	0.00	-	-	-
<i>Meathrizium anisopliae</i> MSS	85.00 ± 5.80	2.93	2.21	3.87
<i>Purpureocillium lilacinum</i> PSS	0.00	-	-	-
Control (distilled water mixed with 0.1% Tween 80)	0.00	-	-	-

ที่สามารถเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* มีการตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Table 2) นำมาทดสอบความรุนแรงในการเข้าก่อโรคที่ความเข้มข้นของสารแขวนลอยระดับต่าง ๆ ค่าความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS มีความรุนแรงในการเกิดโรคกับหนอน *S. inferens* ที่ความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อรา มีค่า  $LC_{50}$  น้อยกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 ซึ่งมีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ  $4.73 \times 10^5$  และ  $3.69 \times 10^6$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 3)

การประเมินความรุนแรงของเชื้อรานั้น ในกรณีนี้สามารถพิจารณาได้จากค่าระยะเวลาที่ทำให้หนอน *S. inferens* ตายร้อยละ 50 เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ที่แยกได้จากหนอนของ *C. tumidicostalis* (หนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยลายจุดใหญ่) มีความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ในความเข้มข้นของโคนิเดียแขวนลอย  $LC_{50}$   $4.73 \times 10^5$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ที่ต่ำกว่า เชื้อรา *M. anisopliae* M001 ที่แยกได้จากหนอน *D. buqueti*  $LC_{50}$   $3.69 \times 10^6$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เนื่องจากมีค่า  $LT_{50}$  และ  $LC_{50}$  ต่ำกว่ามากถึง 2.06 และ 12.82 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าแมลงอาศัยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS คือ หนอนผีเสื้อ *C. tumidicostalis* ซึ่งมีความใกล้ชิดกับหนอน *S. inferens* มากกว่าแมลงอาศัยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 ที่เป็นด้วงหนวดยาวอ้อย *D. buqueti*

เชื้อรา *M. anisopliae* มีคุณสมบัติในการเข้าทำลายก่อโรคในแมลงได้ดี ในกลุ่มของแมลงจำพวกหนอนผีเสื้อและหนอนด้วง โดยมีกลไกการทำงานเป็น

ขั้นตอนโดยรวมเชื้อราสาเหตุโรคแมลงติดไปกับผนังลำตัวของแมลง และส่วนของโคนิเดียงอกโดยอาศัยความชื้นจากตัวแมลง ซึ่งมีประมาณ 50 - 90 เปอร์เซ็นต์ (Thungrabeab, 2018) สอดคล้องกับการรายงานของ Wangspa et al. (2015) ซึ่งได้ศึกษาความชื้นของแมลงพบว่า ด้วงงวงข้าว *Sitophilus oryzae* มีความชื้น 66.53, 64.21 และ 46.96 เปอร์เซ็นต์ ในระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ตามลำดับ หลังจากสปอร์งอกแทงทะลุผ่านเข้าไปในตัวแมลง มีการสร้าง blastospore และเพิ่มปริมาณในระบบเลือดของแมลง ทำให้แมลงแสดงอาการอ่อนแอและตาย (Thungrabeab, 2018) อย่างไรก็ตาม ปัจจัยที่เป็นสาเหตุของความรุนแรงที่แตกต่างกันนี้ยังไม่สามารถสรุปผลชัดเจนได้ และควรต้องมีการศึกษาในรายละเอียดเพิ่มเติมต่อไป ในการทดลองนี้จึงได้คัดเลือกเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS เพื่อทดสอบในลำดับถัดไป

**การทดลองย่อยที่ 2** ผลจากการทดลองย่อยที่ 1 ได้คัดเลือกเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ทดสอบความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ในระยะการเจริญเติบโตของหนอนที่แตกต่างกัน 3 ช่วง เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS มีความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ในแต่ละช่วงการเจริญเติบโตแตกต่างกัน โดยหนอน *S. inferens* ระยะวัยต้น (วัยที่ 2 - 3) มีค่า  $LC_{50}$  น้อยที่สุด ถัดมาหนอน *S. inferens* ระยะวัยกลาง (วัยที่ 4 - 5) และ หนอน *S. inferens* ระยะวัยท้าย (วัยที่ 6-7) มีค่า  $LC_{50}$  มากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ  $9.26 \times 10^4$ ,  $6.02 \times 10^5$  และ  $5.12 \times 10^6$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 4)

Table 3. Median lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of *Metarhizium anisopliae* isolate M001 and *M. anisopliae* isolate MSS on the fourth instar larvae of *Sesamia inferens* (Walker) after topical application of suspension concentrations ranging from  $1.0 \times 10^5$  to  $1.0 \times 10^9$  conidia/milliliter.

Fungi	$LC_{50}$ (conidia/ml)	95 % Fiducial CI	
		Lower	Upper
<i>Metarhizium anisopliae</i> isolate M001	$3.69 \times 10^6$	$5.17 \times 10^5$	$2.64 \times 10^7$
<i>Metarhizium anisopliae</i> isolate MSS	$4.73 \times 10^5$	$5.47 \times 10^4$	$4.09 \times 10^6$

Table 4. Median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of *Metarhizium anisopliae* MSS on different instar larvae of *Sesamia inferens* (Walker) after the topical application of suspension concentrations ranging from 1.0x 10<sup>4</sup> to 1.0 x 10<sup>8</sup> conidia/milliliter.

Larval instar	LC <sub>50</sub> (conidia/ml)	95 % Fiducial CI	
		Lower	Upper
2 <sup>nd</sup> - 3 <sup>rd</sup>	9.26 x 10 <sup>4</sup>	1.47 x 10 <sup>4</sup>	5.82 x 10 <sup>5</sup>
4 <sup>th</sup> - 5 <sup>th</sup>	6.02 x 10 <sup>5</sup>	1.27 x 10 <sup>5</sup>	2.58 x 10 <sup>6</sup>
6 <sup>th</sup> - 7 <sup>th</sup>	5.12 x 10 <sup>6</sup>	1.27 x 10 <sup>6</sup>	2.06 x 10 <sup>7</sup>

เมื่อนำเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ที่มีความรุนแรงของการก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ในระยะหนอนที่แตกต่างกัน ความรุนแรงของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS มีค่าของ LC<sub>50</sub> เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อหนอนมีระยะที่เพิ่มขึ้น แสดงถึงเชื้อมีความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอนในช่วงวัยที่ 2-3 มากที่สุด และลดลงต่อเนื่องจนต่ำสุดในหนอนระยะที่ 6-7 ซึ่งวัยของแมลงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา ซึ่งแต่ละวัยของแมลงมีความอ่อนแอต่อเชื้อแตกต่างกัน โดยเชื้อราสามารถเข้าก่อโรคกับหนอนวัยต้นได้ง่ายกว่าหนอนวัยท้าย (Patirupanusara, 2011)

จากผลการทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในประเทศไทยที่นำเชื้อราก่อโรคของแมลงมาทดสอบเพื่อเป็นแนวทางควบคุมหนอน *S. inferens* ในอ้อย และมีแนวโน้มว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันกำจัดหนอน *S. inferens* ได้ ทั้งนี้ยังมีความจำเป็นต้องมีงานวิจัยรวบรวมคัดกรองและทดสอบ *M. anisopliae* ไอโซเลทใหม่ ๆ และการทดสอบในแปลงทดลองเพิ่มเติม เพื่อให้ได้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีและสูงยิ่งขึ้น รวมทั้งการผสมเทคโนโลยีใหม่ เช่น การห่อหุ้มเชื้อรา (encapsulation) เพื่อให้เชื้อราสามารถทนต่อสภาพแวดล้อม และในด้านการปลดปล่อยสปอร์พิษทำให้แมลงติดเชื้อได้ดีขึ้น เมื่อนุภาคเชื้อราสัมผัสกับตัวแมลง (Celestino and Oliveira, 2022; Meirelles et al., 2023) นอกจากการนำเชื้อรา *M. anisopliae* มาควบคุมหนอน *S. inferens*

การศึกษากการเป็นเชื้อราที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตในอ้อย (endophyte) เพื่อให้ต้นอ้อยเพิ่มความต้านทานต่อการเข้าทำลายของ *S. inferens* และเพิ่มผลผลิตอ้อย เป็นอีกมุมมองที่น่าสนใจ ซึ่งเคยมีการศึกษาในมะเขือเทศ (Elena et al., 2011; Siqueira et al., 2020; Meirelles et al., 2023)

## สรุป

การวิจัยครั้งนี้ดำเนินการด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนแรก การคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคแมลง จำนวน 4 ชนิด 7 ไอโซเลท คือ 1. เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B001 ที่แยกจาก *Nilaparvata lugens* (Stål) 2. เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B002 ที่แยกจาก *Phyllotreta sinuala* Stephens 3. เชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลท FSS ที่แยกจาก *Chilo tumidicostalis* (Hampson) 4. เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 ที่แยกจาก *Dorysthenes buqueti* Guerin 5. เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M002 ที่แยกจาก *Orysthenes rhinoceros* (Linnaeus) 6. เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ที่แยกจากหนอน *C. tumidicostalis* และ 7. เชื้อรา *P. lilacinum* ไอโซเลท PSS ที่แยกจากหนอน *C. tumidicostalis* กับหนอน *S. inferens* ในห้องปฏิบัติการ ผลการคัดกรองพบว่า มีเชื้อราเพียง 2 ชนิด 3 ไอโซเลท ที่สามารถก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ได้แก่ เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B001 เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 และเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS จากนั้นในขั้นตอนที่สอง

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราพบว่า เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS มีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ  $4.73 \times 10^5$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 ที่มีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ  $3.69 \times 10^6$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS มีศักยภาพในการนำไปใช้ป้องกันกำจัดหอนอน *S. inferens* ได้

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อราสาเหตุโรคแมลง วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ทำการทดลอง

### เอกสารอ้างอิง

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18(2): 265-267.

Attajarusit, J. 2001. Sugarcane borer and its control. Documentation for farmer training program on the Sugarcane Borer and Sugarcane White Leaf Disease Project. Division of Entomology and Zoology, Department of Agriculture, Bangkok. 17 p. (in Thai)

Attathom, T. 2003. Use of microorganisms to control insect pests. pp. 163-193. *In*: C. Chamswarn (ed.). *Biological Control of Plant Diseases and Pests*. Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom. (in Thai)

Bautista-Galvez, A., J.F. Barrera, E. Payro de la Cruz, S. Salgado-Garcia, J. Gomez-Ruiz and J.E. Gomez-Leyva. 2012. Genetic Characterisation of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin isolates from sugarcane fields and their pathogenicity

against *Aeneolamia postica* (Walker) (Hemiptera: Cercopidae). *Universidad Ciencia* 28(3): 217-229.

Celestino, M. and J.A. dos S. Oliveira. 2022. Encapsulation methods of entomopathogenic fungi for their application in the biological control. *Research, Society and Development* 11(16): DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i16.38031> (Abstract)

Elena, G.J., P.J. Beatriz, P. Alejandro and E. Roberto. 2011. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin Promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Advances in Biological Research* 5 (1): 22-27.

Finney, D.J. 1952. *Probit Analysis*. 2<sup>nd</sup>ed. Cambridge University Press, New York. 256 p.

Kokkan, P., N. Siri and N. Pitaksa. 2008. The effect of stem borers infestations on yield and quality of 8 sugarcane varieties. *Khon Kaen Agriculture Journal* 36(Suppl.): 165-171. (in Thai)

Maneerat, T., S. Rattanakaand and W. Suasa-ard. 2006. Comparative study for foodstuff of *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) for *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) production. pp. 390-395. *In*: *Proceedings of 44<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference: Plants*. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

Meirelles, L.N., E. Mesquita, T.A. Correa, R. de O.B. Bitencourt, J.L. Oliveira, L.F. Fraceto, M.G. Camargo and V.R.E.P. Bittencourt. 2023. Encapsulation of entomopathogenic fungal conidia: evaluation of stability and control potential of *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases* 14: 102-184.

- Mehinto, J.T., P. Atachi, O.K.D. Kpindou, E.A. Dannon and M. Tamò. 2014. Mortality of *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae) larval stages induced by different doses of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. International Journal of Advanced Research 2(4): 273-285.
- Mekapogu, A.R. 2021. Finney's probit analysis spreadsheet calculator (Version 2021). (Online). Available: <https://probitanalysis.wordpress.com/> (December 12, 2021).
- Patirupanusara, P. 2011. The role of insect fungi in controlling insect pests. Phitsanulok Rice Research Center Phitsanulok. 184 p. (in Thai)
- Pitak, N. 2001. Alternative technologies for IPM. pp. 241-255. In: Proceedings of the 4<sup>th</sup> Academic Symposium on the Prevention and Control of Sugarcane Insect Pests by Integrated Methods. Division of Entomology and Zoology, Department of Agriculture, Bangkok. (in Thai)
- Siqueira, A.C.O.G., M. Mascarin, C.R.N.C.B. Gonçalves, J. Marcon, M.C. Quecine, A. Figueira and I. Delalibera Jr. 2020. *Metarhizium* species and their activities that stimulate the growth of tomato plants. Frontier in Sustain. Food System Volume 4: 1-15.
- Thungrabeab, M. 2018. Entomopathogenic Fungi as Alternatives for Insect Pest Control. O.S. Printing House CO., LTD. Bangkok. 240 p. (in Thai)
- Tonphukhiaw, V., N. Siriand and T. Jamjanya. 2018. Mass rearing technique of pink stem borer, *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) using baby corn for Larval Parasitoid, *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) production. Khon Kaen Agriculture Journal 46(5): 975-982.
- Tuncer, C. and O. Aker. 2017. Sexual Dimorphism in the Pupal Stage of *Hyphantria Cunea* (Lepidoptera: Erebidiae). Entomological News 127(2): 112-116.
- Varma, A. and B.K. Tandan. 1996. Pathogenicity of three entomogenous fungi against insect pests of sugarcane. Journal of Biological Control 10(1&2): 87-91.
- Varma, A., B.K. Tandan and K. Singh. 1988. First record of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, an entomogenous fungus from the sugarcane defoliator *Phytoscaphus* sp. (Coleoptera: Curculionidae) from India. Current Science 57(7): 396.
- Wangspa, W., Y. Chanbang and S. Vearasilp. 2015. Radio frequency heat treatment for controlling rice weevil in rough rice cv. Khao Dawk Mali 105. Journal of Natural Sciences 14(2): 189-197.
-



# ผลของการเสริมสารสกัดกัญชงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่อุณหภูมิลด

## Effects of Hemp Extract Supplementation in Semen Extender on Boar Semen Quality at Chilled Temperature

กัญญาณัฐ ไชยวรรณ<sup>1</sup> วาที คงบรรทัด<sup>2</sup> พชรพร ตาดี<sup>1</sup> ตะวัน ฉัตรสูงเนิน<sup>3</sup>  
วรรณลักษณ์ ถาวร<sup>1</sup> พัชรี พรหมตัน<sup>1</sup> และ วิวัฒน์ พัฒนาวงศ์<sup>1\*</sup>

Kanyanat Chaiwan<sup>1</sup>, Watee Kongbuntad<sup>2</sup>, Phacharaporn Tadee<sup>1</sup>, Tawan Chaisungnoen<sup>3</sup>,  
Wannaluk Thawornand<sup>1</sup>, Patcharee Promtan<sup>1</sup> and Wiwat Pattanawong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

<sup>1</sup>Faculty of Animal Science and Technology, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

<sup>2</sup>คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

<sup>2</sup>Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

<sup>3</sup>สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ จ. แพร่ 54140

<sup>3</sup>Agro-Industrial Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Phrae 54140, Thailand

\*Corresponding author: E-mail: Wpattanawong@gmail.com

(Received: 3 April 2023; Accepted: 23 June 2023)

**Abstract:** The main problem with artificial insemination on small farms in Thailand is the chilled storage of boar semen, which results in oxidative stress affecting to reduce semen quality of boar. Therefore, this study was conducted to supplement the hemp extract containing cannabinoids as antioxidants in chilled boar semen extenders. Semen samples from 2 boars (Duroc Jersey) were diluted with Beltsville thawing solution extender (BTS) enriched with hemp extract at 5 levels of cannabidiol (CBD) concentrations: 0, 5, 10, 25, and 50 µg CBD /ml. The semen samples were kept at 17 °C for 0, 12, 24, 48, and 72 hours and analyzed using a computer-assisted sperm analysis (CASA) to determine the percentages of motile, static, and progressive sperm. It was found that the static of the group supplemented with hemp extract with 5 µg CBD/ml tended to be the lowest, and the progressive tended to be the highest. Especially, 12 hours of storage were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Finally, the use of extenders containing 5 µg CBD/ml of hemp extract was shown to be a trend in maintaining the quality of sperm in boar semen extenders used as a chilled semen formula.

**Keywords:** Hemp extract, extender, semen quality, boar

**บทคัดย่อ:** ปัญหาหลักของกระบวนการผสมเทียมในฟาร์มเกษตรรรายย่อยในประเทศไทยคือ การเก็บรักษาไข่เชื้อสุกรแช่เย็น ซึ่งเกิดจาก oxidative stress ทำให้ลดคุณภาพน้ำเชื้อหลังการเก็บรักษา ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเสริมสารสกัดกัญชงที่ประกอบด้วยสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidants ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น โดยทำการรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์หรือคเจอร์ซี่ จำนวน 2 ตัว มาเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรมาตรฐาน (Beltsville thawing solution extender; BTS) ที่เสริมสารสกัดกัญชงโดยคำนวณจากระดับความเข้มข้นของสาร cannabidiol (CBD) ที่เหมาะสม 5 ระดับได้แก่ 0, 5, 10, 25 และ 50 µg CBD/ml จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเชื้อมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 17 °C เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง ศึกษาวิเคราะห์หรืออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motile) ร้อยละการตายของอสุจิ (static) ร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive) ด้วย computer assisted sperm analysis; CASA พบว่า ร้อยละการตายของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 µg CBD/ml มีแนวโน้มต่ำที่สุด และร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 µg/ml มีแนวโน้มสูงที่สุด โดยเฉพาะค่าวิเคราะห์หลังการเก็บรักษาที่ 12 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยสารสกัดกัญชงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระลดความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในน้ำเชื้อสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นได้

**คำสำคัญ:** สารสกัดกัญชง น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ คุณภาพน้ำเชื้อ สุกรพ่อพันธุ์

## คำนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรนิยมใช้การ-จัดการด้วยเทคโนโลยีผสมเทียมที่ใช้ไข่สดผ่านการ-เจือจาง เพื่อผสมเทียมให้แม่สุกรหลายตัว โดยต้องไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการตั้งท้องและขนาดครอกเมื่อเปรียบเทียบกับการผสมแบบธรรมชาติ (Gadea, 2003) แต่ในความเป็นจริงมีหลายปัจจัยทั้งประสิทธิภาพการผลิตน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ ระหว่างการเจือจางน้ำ และ การเก็บรักษาไข่เชื้อก่อนผสมเทียมที่มีผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิ เช่น การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ความเครียดจากการออกซิเดชันระยะเวลาการเก็บรักษาที่มีผลทำให้อสุจิมีประสิทธิภาพลดลงหากอุณหภูมิในการเก็บรักษาสูงกว่า 12 °C ระยะเวลา มากกว่า 4 วัน (Lopez Rodriguez *et al.*, 2017) โดยส่วนใหญ่ น้ำ-เชื้อสุกรทำการเก็บรักษาด้วยที่อุณหภูมิ 15-18 °C เนื่องจากน้ำเชื้อสุกรมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำหรือเรียกว่า ปรากฏการณ์ช็อกจากความเย็น (cold shock phenomenon) (Wiebke *et al.*, 2021) แต่คุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่ลดลงในขั้นตอนการแช่เย็นเพื่อเก็บรักษาสำหรับการใช้งานผสมเทียม มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ

(free radical) ไปทำลายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ทั้งโปรตีน และไขมัน (Painupong, 2017) ซึ่งสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ ที่เกิดจากการเผาผลาญอาหาร สารต่าง ๆ กระบวนการสร้างพลังงาน การหายใจระดับเซลล์ รวมไปถึงเกิดขึ้นในกลไกการป้องกันตัวเองของเซลล์จากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ หากมีกระบวนการดังกล่าวที่มากเกินไปหรือขาดสารต้านอนุมูลอิสระทำให้ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress หากเกิดภาวะดังกล่าวเป็นเวลานานทำให้มีความเสี่ยงที่ทำให้เกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มอสุจิ ความผิดปกติของอสุจิ และส่งผลกระทบต่ออัตราการปฏิสนธิในที่สุด (Bansal and Bilaspuri, 2011) และลดการผลิต ATP ในอสุจิสุกรส่งผลให้การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง (Park *et al.*, 2018) ปัจจุบันจึงมีการเติมสาร antioxidants จากพืชต่าง ๆ เพื่อลดปฏิกิริยาดังกล่าว (Ros-Santaella and Pintus, 2021) ทางผู้วิจัยมีความสนใจในพืชกัญชง (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) ที่มีองค์ประกอบของสารสำคัญได้แก่ สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids/ phytocannabinoids) (Taoufik *et al.*, 2017) โดยสาร CBD เป็นสารแคนนาบินอยด์ที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท (nonpsychoactive

cannabinoid) โดยอาศัยการเข้าจับกับโปรตีนตัวรับในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ cannabinoid receptor 2 (CNR2), transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) และ orphan G-protein coupled receptor 55 (GPR55) เป็นต้น ที่ส่งผลต่อการผลิตอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) ที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress (Jaidee and Sootanan, 2022) มีรายงานว่า การใช้ BHE (Benin republic hemp ethanol extract) ในระดับความเข้มข้นที่ 2 และ 10 mg/kg ช่วยเพิ่มจำนวนมีชีวิตของอสุจิ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอสุจิสมบูรณ์ โปรแลคตินในเลือดในพลาสมาลดลง และเพิ่มฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในหนูทดลอง (Alagbonsi *et al.*, 2019) ทั้งนี้การเพิ่มสารสกัดกัญชงมีแนวโน้มเพิ่มความเป็นต่างในน้ำเชื้อทันทีหลังการเจ็จจาง (Vyt *et al.*, 2004) ดังนั้นจากคุณสมบัติดังกล่าวที่กัญชงมีสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงมีความสนใจในการนำสารสกัดกัญชงมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น ซึ่งงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเสริมสารสกัดกัญชงในน้ำยาเจ็จจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่เย็น

## อุปกรณ์และวิธีการ

### สัตว์ทดลอง

ใช้สุกรพ่อพันธุ์ดอร์คเจอร์ซี อายุ 10 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 170 กิโลกรัม จำนวน 2 ตัว โดยเลี้ยงในคอกเลี้ยงเดี่ยวพื้นที่ 2 × 2 เมตร ภายในโรงเรือนแบบเปิด ณ ฟาร์มสุกร คณะสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ และทำการรีดน้ำเชื้อสำหรับการทดลอง จำนวน 2 ครั้ง โดยเว้นระยะห่างในการรีด 1 สัปดาห์ (1 ครั้งต่อสัปดาห์) หมายเลขขออนุญาตใช้สัตว์ทดลอง Approval No. MACUC004A/2565

### การเตรียมสารสกัดกัญชง

นำใบกัญชงสดหลังการเก็บเกี่ยวอบที่อุณหภูมร้อน ที่อุณหภูมิ 45 °C (Chasiotis *et al.*, 2021) เป็นเวลา 8 ชั่วโมงจากนั้นนำไปกัญชงที่อบแห้งแล้ว มาทำการบดด้วยเครื่องบดจนละเอียด และทำการแช่ผงกัญชงในไอโซ-

โพรพิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน ผงกัญชงปริมาณ 5 กรัม ต่อไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางและผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ด้วยเครื่องสุญญากาศทำการระเหยไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ออกให้เหลือเพียงสารสกัดกัญชงที่เข้มข้น ด้วยเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 50 °C จนกระทั่งไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ระเหยออกจนหมด (Manosroi *et al.*, 2019) และทำการวิเคราะห์ปริมาณของสารสำคัญคือ cannabidiol (CBD) ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) โดยศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางการแพทย์สำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

### การทดสอบความเหมาะสมในการใช้สารสกัดกัญชงต่อแรงดันออสโมติกในน้ำยาแช่เย็นน้ำเชื้อสุกร

ศึกษาแรงดันออสโมติกในน้ำยาเจ็จจางน้ำเชื้อสุกรที่เหมาะสมก่อนนำมาเจ็จจางน้ำเชื้อสุกร โดยนำสารละลายเจ็จจางน้ำเชื้อสุกรมาตรฐาน (Beltsville thawing solution extender; BTS) ปรับค่าความเข้มข้นต่างที่ 7.2 แบ่งกลุ่มตัวอย่างเพื่อเสริมสารสกัดหยาบจากกัญชงโดยคำนวณจากระดับความเข้มข้นของสาร cannabidiol (CBD) 9 ระดับ ได้แก่ 0 (ควบคุม), 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 µg/ml จากนั้นนำมาวิเคราะห์ค่า osmotic pressure ด้วย osmometer ยี่ห้อ Gonotec model: osmomat 030-D ตามวิธีการของ Perez-Llano *et al.* (2001)

### การศึกษาความเหมาะสมในการใช้สารสกัดกัญชงในการเจ็จจางน้ำยาแช่เย็นน้ำเชื้อสุกร

ทำการรีดน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์และมีการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อก่อนทำการเจ็จจาง โดยความเข้มข้นต่างของน้ำเชื้ออยู่ระหว่าง 6.8-7.5 ความเข้มข้นของอสุจิในน้ำเชื้อไม่ต่ำกว่า  $0.2 \times 10^9$  ตัวต่อมิลลิลิตร จำนวนอสุจิมากกว่า  $45 \times 10^9$  ตัว ค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิมากกว่า 60% ตัวอสุจิที่รูปร่างปกติมากกว่า 60% (Chomchai, 1999) จากนั้นจึงแบ่งน้ำเชื้อเจ็จจางที่ตามกลุ่มการทดลอง ดังนี้ BTS-extender, BTS+ CBD 5 µg/ml, BTS + CBD 10 µg/ml, BTS+ CBD 25 µg/ml

และ BTS+CBD 50 µg/ml (BTS= Beltsville thawing solution extender, CBD= สารสกัดกัญชง) โดยกำหนดให้อสุจิมีความเข้มข้นเฉลี่ย  $3 \times 10^9$  ตัวต่อได้ส มีปริมาณ 85 ml/ได้ส บรรจุในหลอดสูญญากาศ (Chomchai, 1999) จากนั้นทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 17 °C เพื่อนำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง computer assisted sperm analysis (CASA) ในการประเมินวิเคราะห์ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ ร้อยละการตายของอสุจิ ร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า ลักษณะการเคลื่อนที่และสัญญาณวิทยาของอสุจิ Amann and Waberski, 2014)

**การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

ข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อถูกวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance: ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design, RCBD) และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่  $P < 0.05$  โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ SPSS 16.0

**ผลการศึกษาและวิจารณ์**

**การทดสอบหาความเหมาะสมในการใช้สารสกัดกัญชงต่อแรงดันออสโมติกในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ**

กลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่มีความเข้มข้น 0 (ควบคุม), 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 µg/ml มีค่าแรงดันออสโมติกในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเท่ากับ 337, 350, 356, 385, 387, 444, 588, 863 และ 1,421 mOsm/kg ตามลำดับ ดัง Figure 1 แสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมในการใช้สารสกัดกัญชงในน้ำยาแช่เย็นน้ำเชื้อสุกรจำนวน 5 ระดับได้แก่ระดับที่ 0 (กลุ่มควบคุม), 5, 10, 25, และ 50 µg/ml และมีค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้ออยู่ที่ 7.2 - 8.0 ซึ่งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าแรงดันออสโมซิสของน้ำยาแช่เย็นน้ำเชื้อสุกรเพื่อใช้ในการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อสุกรต่อไป

การทดลองสามารถเสริมสารสกัดกัญชงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อได้ทั้งหมด 5 ระดับได้แก่ 0 (ควบคุม), 5, 10, 25, และ 50 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sonseeda et al. (2011) และ Rodríguez-Gil and Rigau (1996) ที่ระบุว่าโดยปกติแล้วมีค่า osmotic pressure

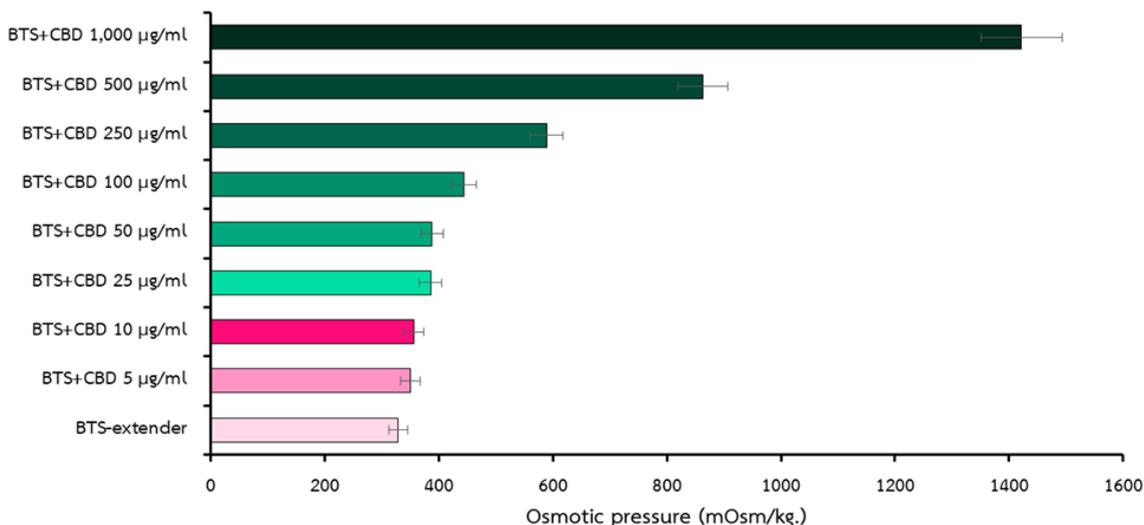


Figure 1. Effect of hemp extract levels in chilled boar extender of osmotic pressure

ของเหลวในร่างกายสุกรอยู่ที่ 290-300 mOsm/kg และออสโมติกสามารถทนค่า osmotic pressure อยู่ได้ในช่วงระหว่าง 240-380 mOsm/kg (King and Macpherson, 1966) ค่า osmotic pressure ต่ำกว่า 200 mOsm/kg มีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่ำลง (Rodríguez-Gil and Rigau, 1996) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาแรงดันออสโมติกน้ำเชื้อสุกรของ Yeste *et al.* (2010) ได้กล่าวว่า โดยจากรายงาน Perez-Llano *et al.* (2001) พบว่า ค่าแรงดันออสโมติกในน้ำเชื้อสูงกว่า 500 mOsm/kg หรือต่ำกว่า 200 mOsm/kg อสุจิที่มีร้อยละการมีชีวิตและร้อยละอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ มีการทดสอบผลเสียของค่าแรงดันออสโมติกในระดับที่ต่ำในน้ำเชื้อโค Padrik *et al.* (2012) พบว่า การลดลงของค่าแรงดันออสโมติกในน้ำเชื้อส่งผลให้เกิดการรวมน้ำและเกิดการแตกตัวของเยื่อหุ้มอสุจิ เนื่องจากการออสโมซิสของของเหลวภายนอกเซลล์ที่มีความหนาแน่นต่ำเข้าสู่เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงเช่นเดียวกับการเกิดหยดน้ำบริเวณหางของอสุจิ อีกทั้งยังสอดคล้องกับผลการศึกษาค่าแรงดันออสโมติกในน้ำเชื้อแมวของ Prochowska *et al.* (2022) แต่ในทางกลับกันผลเสียของค่าแรงดันออสโมติกระดับสูง ซึ่ง Caiza de la Cueva *et al.* (1997a) ได้ศึกษาในน้ำเชื้อสุกรที่ค่า 600-4,000 mOsm พบว่า ร้อยละการมีชีวิตของอสุจิ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากการออสโมซิสของของเหลวภายในเซลล์ที่มีค่าแรงดันออสโมติกต่ำออกจากเซลล์ ที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงกว่าจึงทำให้เกิดสภาวะ hyperosmotic (Einarsson *et al.*, 1970) เช่นเดียวกับการศึกษาในน้ำเชื้อม้าอีกด้วย (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997b)

### คุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นและจลนศาสตร์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

ร้อยละการตายของอสุจิ (static) พบว่า ร้อยละการตายของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 µg/ml มีแนวโน้มต่ำที่สุด โดยเฉพาะค่าวิเคราะห์หลังการเก็บรักษาที่ 12 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) และมีแนวโน้มร้อยละการตายของอสุจิในกลุ่มควบคุม

(BTS-extender) และกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 และ 10 µg/ml ต่ำกว่ากลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml (Table 1) ค่าร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive) พบว่า ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 µg/ml มีแนวโน้มสูงที่สุด โดยเฉพาะค่าวิเคราะห์หลังการเก็บรักษาที่ 12 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (Table 1) ค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motile) พบว่า ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 µg/ml มีแนวโน้มสูงที่สุด โดยเฉพาะค่าวิเคราะห์หลังการเก็บรักษาที่ 12 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (Table 1)

กลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงระดับความเข้มข้น 10 µg/ml อสุจิมีความเร็วเฉลี่ยแบบจุดต่อจุด (VAP: average path velocity) ที่มีแนวโน้มสูงสุดในระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (Figure 2a) ความเร็วเฉลี่ยของอสุจิเป็นเส้นตรง (VSL: straight line velocity) พบว่า กลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงระดับความเข้มข้น 10 µg/ml มีแนวโน้มสูงสุดในระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (Figure 2b) ความเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นโค้งของอสุจิ (VCL: curvilinear velocity) พบว่า อสุจิก่อนที่ไม่เสริมสารสกัดกัญชงมีแนวโน้มสูงสุดหลังระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 6 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (Figure 2c) ความกว้างในการส่ายหัวของอสุจิ (ALH: amplitude of lateral head displacement) พบว่า อสุจิก่อนที่ไม่เสริมสารสกัดกัญชงมีแนวโน้มสูงสุดหลังระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 6 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (Figure 2d) ค่าความถี่ในการส่ายหัวของอสุจิเคลื่อนที่ตัดผ่านระนาบการเคลื่อนที่ (BCF: beat cross frequency) พบว่า กลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงระดับความเข้มข้น 25 µg/ml มีแนวโน้มสูงสุดในระยะเวลาการเก็บรักษาชั่วโมงที่ 6, 12 และ 24 ( $P < 0.05$ ) (Figure 2e) ค่าสัมประสิทธิ์ของระยะทางเส้นตรงของอสุจิ (STP: straightness coefficient) พบว่า กลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงระดับความเข้มข้น 10 µg/ml มีแนวโน้มสูงสุดในระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (Figure 2f) ค่าสัมประสิทธิ์ความใกล้เคียงที่อสุจิจะวายเป็นเส้นตรง (LIN: Linear Coefficient) พบว่า กลุ่มที่เสริมสารสกัด

Table 1. Storage period on the quality of boar semen (mean  $\pm$  SE)

Semen quality		Treatment					P-value
		BTS	BTS+CBD 5 $\mu\text{g/ml}$	BTS+CBD 10 $\mu\text{g/ml}$	BTS+CBD 25 $\mu\text{g/ml}$	BTS+CBD 50 $\mu\text{g/ml}$	
Static (%)	0 hr	43.47 <sup>b</sup> $\pm$ 3.39	43.58 <sup>b</sup> $\pm$ 10.24	48.27 <sup>b</sup> $\pm$ 8.28	91.93 <sup>a</sup> $\pm$ 3.28	94.71 <sup>a</sup> $\pm$ 2.20	<0.01
	6 hr	37.70 <sup>b</sup> $\pm$ 4.53	30.98 <sup>b</sup> $\pm$ 4.52	38.40 <sup>b</sup> $\pm$ 3.93	92.63 <sup>a</sup> $\pm$ 2.54	99.55 <sup>a</sup> $\pm$ 0.11	<0.01
	12 hr	39.80 <sup>ab</sup> $\pm$ 6.60	28.48 <sup>c</sup> $\pm$ 5.89	51.58 <sup>b</sup> $\pm$ 5.53	93.35 <sup>a</sup> $\pm$ 1.79	99.45 <sup>a</sup> $\pm$ 0.20	<0.01
	24 hr	58.65 <sup>b</sup> $\pm$ 5.93	47.45 <sup>b</sup> $\pm$ 8.09	57.02 <sup>b</sup> $\pm$ 3.90	90.70 <sup>a</sup> $\pm$ 1.29	99.55 <sup>a</sup> $\pm$ 0.20	<0.01
	48 hr	56.07 <sup>b</sup> $\pm$ 8.29	75.32 <sup>ab</sup> $\pm$ 9.80	49.43 <sup>b</sup> $\pm$ 8.19	66.10 <sup>b</sup> $\pm$ 12.71	99.48 <sup>a</sup> $\pm$ 0.16	0.001
	72 hr	81.88 <sup>a</sup> $\pm$ 7.94	86.57 <sup>bc</sup> $\pm$ 4.67	93.73 <sup>abc</sup> $\pm$ 1.28	99.03 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.97	102.76 <sup>a</sup> $\pm$ 1.39	0.031
Progressive (%)	0 hr	10.67 <sup>a</sup> $\pm$ 1.56	13.58 <sup>a</sup> $\pm$ 5.22	8.98 <sup>a</sup> $\pm$ 2.68	0.12 <sup>b</sup> $\pm$ 0.05	0.05 <sup>b</sup> $\pm$ 0.05	<0.01
	6 hr	15.87 <sup>a</sup> $\pm$ 1.98	15.72 <sup>a</sup> $\pm$ 3.27	8.67 <sup>b</sup> $\pm$ 2.80	0.47 <sup>c</sup> $\pm$ 0.18	0.00 <sup>c</sup> $\pm$ 0.00	<0.01
	12 hr	16.27 <sup>ab</sup> $\pm$ 4.04	22.07 <sup>a</sup> $\pm$ 5.03	7.50 <sup>bc</sup> $\pm$ 2.28	0.48 <sup>c</sup> $\pm$ 0.21	0.05 <sup>c</sup> $\pm$ 0.02	<0.01
	24 hr	7.10 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.79	12.50 <sup>a</sup> $\pm$ 4.54	4.05 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.15	0.52 <sup>bc</sup> $\pm$ 0.13	0.00 <sup>c</sup> $\pm$ 0.00	<0.01
	48 hr	10.48 <sup>a</sup> $\pm$ 3.35	2.83 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.55	9.57 <sup>a</sup> $\pm$ 3.70	8.55 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.84	0.00 <sup>c</sup> $\pm$ 0.00	0.048
	72 hr	2.87 <sup>a</sup> $\pm$ 1.38	1.45 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.58	0.38 <sup>b</sup> $\pm$ 0.16	0.15 <sup>b</sup> $\pm$ 0.08	0.03 <sup>b</sup> $\pm$ 0.02	0.036
Motile (%)	0 hr	56.53 <sup>a</sup> $\pm$ 3.39	56.42 <sup>a</sup> $\pm$ 10.24	51.73 <sup>a</sup> $\pm$ 8.28	3.90 <sup>b</sup> $\pm$ 1.24	0.57 <sup>b</sup> $\pm$ 0.17	<0.01
	6 hr	62.30 <sup>a</sup> $\pm$ 4.53	69.02 <sup>a</sup> $\pm$ 4.52	61.60 <sup>a</sup> $\pm$ 3.93	7.37 <sup>b</sup> $\pm$ 2.54	0.45 <sup>b</sup> $\pm$ 0.11	<0.01
	12 hr	60.20 <sup>ab</sup> $\pm$ 6.60	71.52 <sup>a</sup> $\pm$ 5.89	48.42 <sup>b</sup> $\pm$ 5.53	6.65 <sup>c</sup> $\pm$ 1.79	0.55 <sup>c</sup> $\pm$ 0.20	<0.01
	24 hr	41.35 <sup>a</sup> $\pm$ 5.93	52.55 <sup>a</sup> $\pm$ 8.09	42.98 <sup>a</sup> $\pm$ 3.90	9.30 <sup>b</sup> $\pm$ 1.29	0.45 <sup>b</sup> $\pm$ 0.20	<0.01
	48 hr	43.93 <sup>a</sup> $\pm$ 8.29	24.68 <sup>ab</sup> $\pm$ 9.80	50.57 <sup>a</sup> $\pm$ 8.19	33.90 <sup>a</sup> $\pm$ 12.71	0.63 <sup>b</sup> $\pm$ 0.13	0.001
	72 hr	18.12 <sup>a</sup> $\pm$ 7.94	13.43 <sup>ab</sup> $\pm$ 4.67	6.27 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.28	2.22 <sup>b</sup> $\pm$ 0.75	0.37 <sup>b</sup> $\pm$ 0.08	<0.01

<sup>abc</sup> There was a statistical difference in confidence levels  $P < 0.05$  in row. SE: Standard error; BTS: Beltsville thawing solution extender

กัญชงระดับความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  มีแนวโน้มสูงสุดในระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 72 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) (Figure 2g)

จากผลการทดลองพบว่า การเสริมสารสกัดกัญชงในระดับความเข้มข้น 5 และ 10  $\mu\text{g/ml}$  ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นได้ (ร้อยละการตายของอสุจิ, ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และ ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ) โดย Alagbonsi *et al.* (2019) ได้รายงานว่าการสกัดกัญชงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในน้ำเชื้อเป็นสารที่ช่วยป้องกันหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันช่วยกำจัดและลดปริมาณ

อนุมูลอิสระ ไม่ให้ไปทำลายสารประกอบของเซลล์ ที่เป็นสาเหตุการตายของอสุจิ หรือค่า static ดังรายงานข้างต้น หากได้รับในปริมาณน้อย ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Alagbonsi *et al.* (2019) ได้ศึกษาการเสริมสารสกัดกัญชงเพื่อลดโปรแลคตินและเพิ่มประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระต่อคุณภาพน้ำเชื้อหนูทดลอง โดยให้กินน้ำผสมน้ำมันกัญชาวิเคราะห์คุณภาพของอสุจิ จำนวนของอสุจิมีชีวิต และการเคลื่อนไหว ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอสุจิพบว่า การให้สารสกัดกัญชงทั้งสองขนาดช่วยเพิ่มจำนวนมีชีวิตของอสุจิ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอสุจิสมบูรณ์กว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริม ในขณะที่

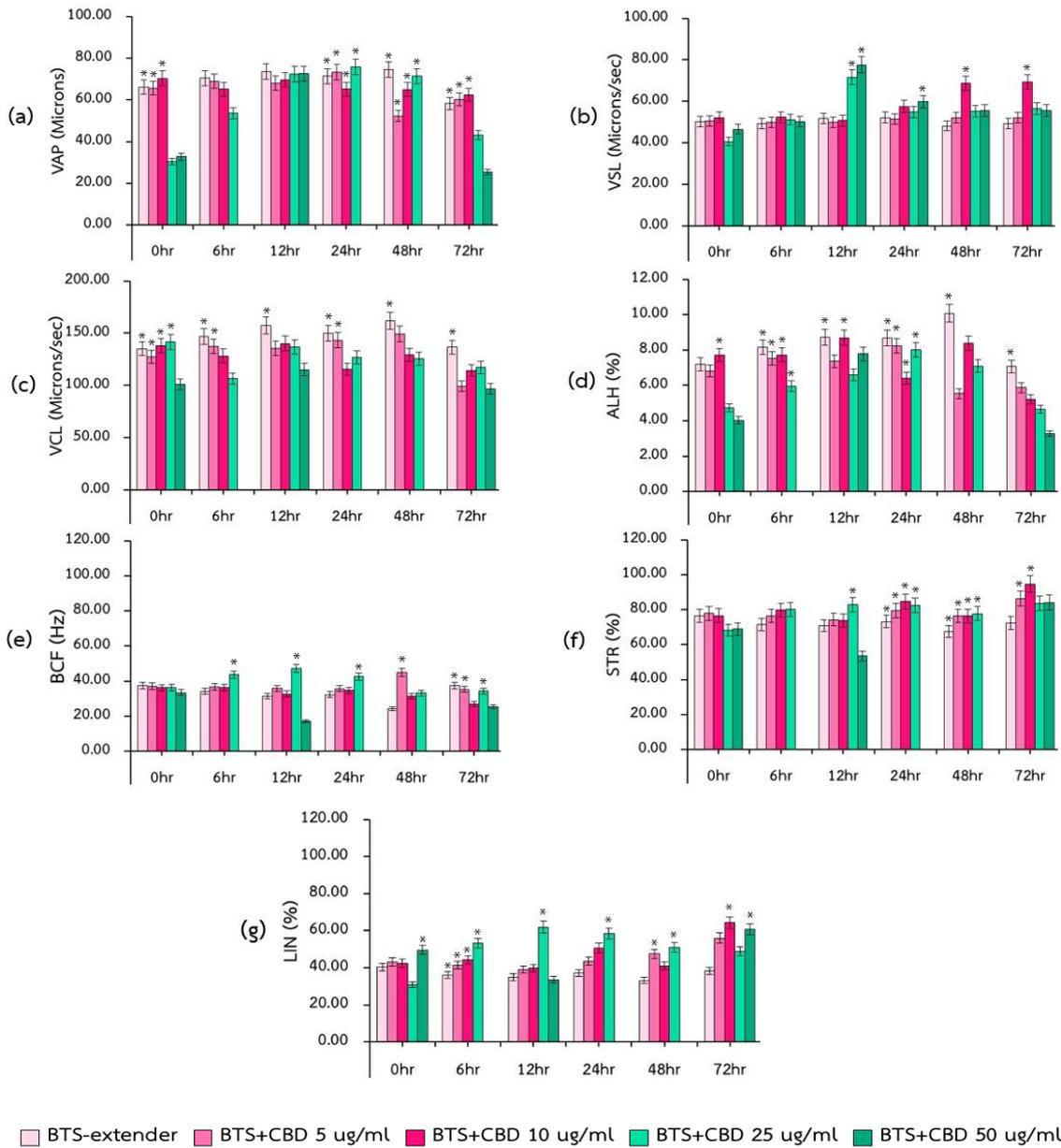


Figure 2. Sperm kinetics: VAP: average path velocity (a); VSL: straight line velocity (b); VCL: curvilinear velocity (c); ALH: amplitude of lateral head displacement (d); BCF: beat cross frequency (e); STR: straightness coefficient (f); LIN: linear coefficient (g). a statistical difference in confidence levels  $P < 0.05$ ;

การให้สารสกัดกัญชาและโบรโมคริปทีน (bromocriptine) ทำให้โปรแลคตินในเลือดในพลาสมาลดลง และเพิ่มฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ดังรายงานของ Shepherd *et al.* (2022) ที่ได้ศึกษาการเสริม GameteGuard®-CP ซึ่งเป็นส่วนผสมของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากพืชธรรมชาติในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกร ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการปฏิสนธิ พบว่า การเสริมสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ GameteGuard®-CP ช่วยรักษาคุณภาพน้ำเชื้อระหว่างกระบวนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 17 °C อัตราการปฏิสนธิและอัตราการคลอดดีขึ้นเมื่อใช้น้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้นานถึง 4 วัน เนื่องจากน้ำเชื้อสุกรแช่เย็นที่อุณหภูมิ 17 °C มีการเมตาบอลิซึมลดลง ส่งผลให้มีการผลิต reactive oxygen species (ROS) อย่างต่อเนื่องจากการประเมินปฏิกิริยาต่อต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดพบว่า กลุ่มที่เสริม GameteGuard®-CP มีปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยลดการผลิตของ ROS และส่งผลให้การผลิต malondialdehyde: MDA ลดลง ไมโทคอนเดรียของอสุจิที่ได้รับสารเสริมอยู่ได้นานขึ้น ซึ่งปกติแล้วเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียเปิดการซึมผ่านเพื่อตอบสนองต่อ ROS ในปริมาณมากเมื่อความเข้มข้นของ ROS อยู่ในเกณฑ์เกินความจุของไมโทคอนเดรีย จึงเกิดการซึมผ่านทำให้สูญเสียสภาพของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียและการส่งสัญญาณการเหนี่ยวนำกระบวนการ- apoptotic นำไปสู่การเพิ่มการผลิต ROS และ lipid peroxidation ส่งผลเสียต่อเซลล์ ซึ่ง Gamete-Guard®-CP อาจส่งผลให้ความเข้มข้นของ ROS โดยรวมลดลง ไม่ถูกกระตุ้นให้เกิดการซึมผ่านและส่งผลให้การตายของเซลล์ลดลงในที่สุด ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vitorovic *et al.* (2021) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันเมล็ดกัญชาในระดับ 12.5, 18.7, 31.2, 62.5 และ 125 µl/ml มีผลต่อความเครียดจากการออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำความเครียดด้วย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ของตัวอ่อนแมลงหวี่พบว่า น้ำมันเมล็ดกัญชาในระดับที่ 18.7 และ 31.2 µl/ml สามารถป้องกันความเครียดจากการออกซิเดชันได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยน้ำมันเมล็ดกัญชามีปริมาณของไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสูงมีสาร secondary metabolites ที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว และ

ลดการทำงานของ catalase ให้ถึงระดับที่เซลล์ไม่เกิดความเครียด แต่ระดับของน้ำมันเมล็ดกัญชาตั้งแต่ 125 µl/ml ขึ้นไปไม่มีผลต่อความสามารถในการป้องกันความเครียดจากการออกซิเดชันและยังเพิ่มอัตราการตายของอ่อนแมลงหวี่อีกด้วย เนื่องจากน้ำมันเมล็ดกัญชามีความเข้มข้นสูงนั้นกระตุ้นการเกิด lipid peroxidation ในตัวอ่อนแมลงหวี่ เช่นเดียวกับการศึกษาความปลอดภัยและผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจาก cannabidiol ต่อเซลล์ผิวหนังของ Tassaneesuwan *et al.* (2023) ซึ่งได้รายงานวาระดับ CBD ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.6 µg/ml) ปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนังแต่เซลล์ที่ได้รับ CBD ที่ความเข้มข้นสูง (มากกว่า 2.5 µg/ml) สามารถลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งสรุปได้ว่าระดับ CBD ที่ความเข้มข้นสูงเป็นพิษต่อเซลล์ โดย Schanknecht *et al.* (2023) ได้รวบรวมการศึกษาการใช้กัญชา (*Cannabis sativa*) ในการรักษามะเร็งผิวหนัง เซลล์มะเร็งมีช่วงชีวิตสั้นลงเมื่อได้รับสาร THC และ CBD ร่วมกัน ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าเซลล์มะเร็งที่ได้รับเพียงสาร THC และพบการตอบสนองของ LNCaP androgen-responsive ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ยับยั้ง cytokines ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ และกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับสารสกัดกัญชาที่มี CBD ต่ำ THC สูง ดังนั้น หากเซลล์อสุจิได้รับสารสกัดกัญชามีสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) ในระดับที่ต่ำกว่า 5 µg/ml จึงไม่เพียงพอต่อการป้องกันความเครียดจากการออกซิเดชันและไม่สามารถต้านการผลิต ROS และ lipid peroxidation จากการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ (Abdellatif *et al.*, 2022) ส่งผลให้เซลล์อสุจิและการเสื่อมสภาพตามระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งแสดงถึงผลการศึกษาระดับของการเสริมสารสกัดกัญชงที่เหมาะสมคือ 5 และ 10 µg/ml แต่หากเซลล์อสุจิได้รับสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในระดับสูงกว่า 10 µg/ml ไม่มีผลต่อความสามารถในการป้องกันความเครียดจากการออกซิเดชัน และยังส่งผลเสียต่อเซลล์อสุจิ (Tassaneesuwan *et al.*, 2023) คาดว่าเซลล์อสุจิได้รับสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ที่มีความเข้มข้นมากเกินไปทำให้ไมโทคอนเดรียเปิดการซึมผ่านเพื่อตอบสนองต่อ ROS ในปริมาณมากเกินควบคุมและการส่งสัญญาณ

การเหนี่ยวนำกระบวนการ apoptotic นำไปสู่การเพิ่มการผลิต ROS และ lipid peroxidation (Vitorovic *et al.*, 2021) ส่งผลเสีย และเกิดการตายของเซลล์อสุจิลงในที่สุดและมีแนวโน้มปรับปรุงจลนศาสตร์การเคลื่อนที่ของอสุจิได้ (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STP และ LIN) โดยคาดว่าเป็นผลต่อเนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดกัญชงที่เสริมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกร สอดคล้องกับรายงานของ Shepherd *et al.* (2022) ได้กล่าวว่าการลด ROS สามารถผลกระทบต่อจลนศาสตร์การเคลื่อนที่ของอสุจิได้ (Abdellatif *et al.*, 2022) สอดคล้องกับรายงานของ Ros-Santaella and Pintus (2021) ได้ศึกษาการเสริมสารสกัด Melissa officinalis ที่ความเข้มข้น 2.5-5 g/l สามารถเพิ่มค่า LIN และ STR ของน้ำเชื้อสุกรแข็งแห้งหลังการละลาย 120 นาทีได้ และยังสามารถลดปริมาณการผลิต MDA ในน้ำเชื้อได้ และการเสริมสารสกัดจาก Salvia officinalis (Sage) ระดับความเข้มข้นที่ 5 g/l ในน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง พบว่า การเสริมสารสกัดมีผลดีต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และเพิ่มตัวอสุจิมีชีวิตช่วยปกป้องอะโครโซม และความสมบูรณ์ของ DNA หลังการละลายน้ำเชื้ออีกด้วย แต่ผลการทดลองนี้ขัดแย้งกับผลการทดลองของ Pintus *et al.* (2018) จลนศาสตร์การเคลื่อนที่ของอสุจิไม่มีความแตกต่างกันเมื่อทำการเสริม Aminoguanidine มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระดับความเข้มข้น 0.1 - 1 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ Ros-Santaella and Pintus (2021) ได้กล่าวอีกว่า การใช้สารสกัดจากพืชสามารถให้สารทุติยภูมิจำนวนมาก (เช่น ฟีนอล เทอร์พีนอยด์ ฯลฯ) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งโพลีฟีนอลบางชนิดสามารถปรับวิถีเมแทบอลิซึมของเซลล์และเปลี่ยนสารประกอบบางชนิดเป็นสารประกอบอื่น ๆ มีการแสดงโพลีฟีนอลบางชนิดเพื่อปรับเมแทบอลิซึมของอสุจิโดยการเพิ่มประสิทธิภาพของการหายใจระดับไมโทคอนเดรีย

### สัณฐานวิทยาของอสุจิ

อสุจิที่มีหางคด (bent tail) อสุจิที่มีหางคดเป็นวง (coiled tail) อสุจิที่มีหยดน้ำเกาะที่บริเวณหาง (distal droplet) อสุจิที่มีหยดน้ำเกาะบริเวณกลางตัว (proximal droplet) ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริม

สารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5 และ 10 µg/ml มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml ( $P > 0.05$ ) (Figure 3)

สัณฐานวิทยาของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 µg/ml มีค่าอสุจิที่มีหางคดต่ำกว่ากลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยการคดของหางอสุจิอาจเกิดได้จากการเปลี่ยนแปลงของค่าแรงดันออสโมติกดังที่ Perez-Llano *et al.* (2001) ได้กล่าวไว้ และยังพบอีกว่าสัณฐานวิทยาของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 µg/ml อสุจิที่มีหางคดเป็นวงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมกลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อสุจิที่มีหยดน้ำเกาะที่บริเวณมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml อสุจิที่มีหยดน้ำเกาะบริเวณกลางตัวต่ำกว่ากลุ่มที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 50 µg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับ Payne *et al.* (2019) ได้พบรายงานว่าสารกลุ่มแคนนาบินอยด์มีผลต่อความผิดปกติของลักษณะสัณฐานวิทยาของอสุจิสูง ในหนูทดลองที่ทำการฉีดกระตุ้นทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 35 วัน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Thun *et al.* (2002) ยังพบความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์ CASA ที่อาจตรวจนับผิดพลาดจากการเสริมสารสกัดในระดับที่สูงขึ้นจึงพบปริมาณของอสุจิที่มีหยดน้ำเกาะที่บริเวณหางและบริเวณกลางตัวของอสุจิของกลุ่มที่มีการเสริมสารสกัดกัญชงมากกว่ากลุ่มควบคุม

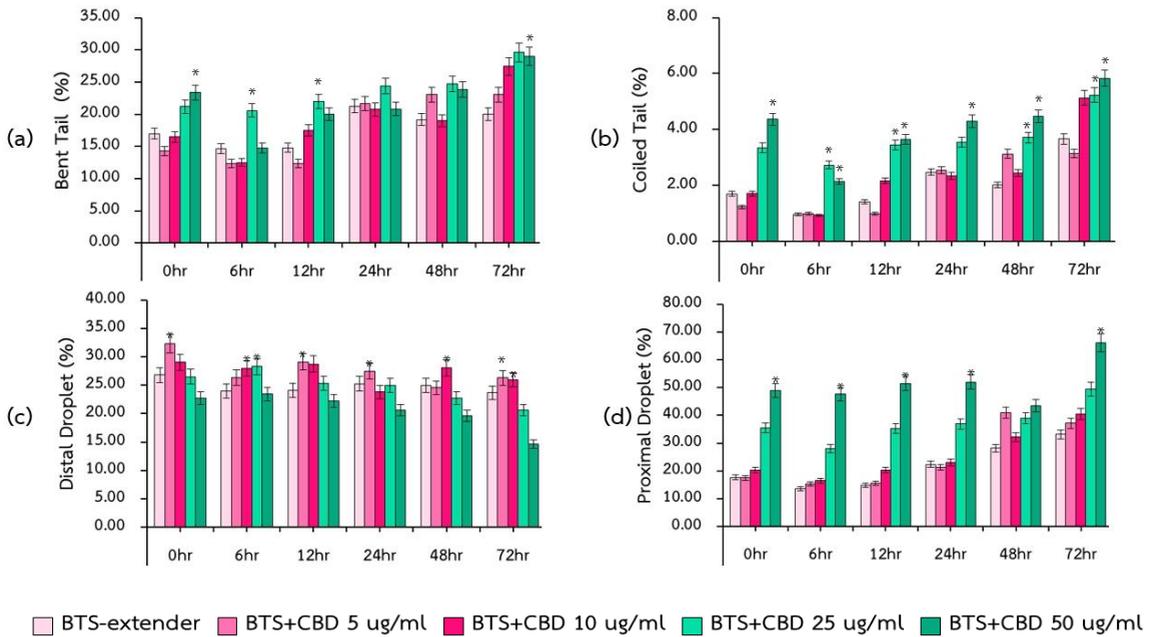


Figure 3. Sperm morpholog: Bent tail (a); Coiled tail (b); Distal droplet (c); Proximal droplet (d). a statistical difference in confidence levels  $P < 0.05$

### สรุป

สารสกัดกัญชงสามารถให้เสริมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรสำหรับการแช่เย็น ที่ระดับความเข้มข้น 5 ถึง 50  $\mu\text{g}$  CBD/ml เนื่องจากระดับการเสริมสารสกัดดังกล่าวยังคงค่าความดันออสโมติกของน้ำยาเจือจางแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรสำหรับการแช่เย็นให้อยู่ในระดับที่นำไปใช้งานได้ การใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรที่เสริมสารสกัดกัญชงที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{g}$  CBD/ml มีแนวโน้มในการช่วยรักษาคุณภาพของอสุจิในน้ำเชื้อ อัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิ ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิดีขึ้น และเหมาะสมสำหรับใช้เป็นสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรที่อุณหภูมิเย็น

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ “ทุนศิษย์กัญญา” ประจำปีการศึกษา 2563 ฟาร์มสุกร คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยแม่โจ้และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องที่ได้ให้การสนับสนุนสถานที่ในการทดลอง สัตว์ทดลอง การผลิตน้ำเชื้อแช่เย็น การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ และรวบรวมข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์ผลทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

### เอกสารอ้างอิง

Abdellatif, M.A., S.A. Gabr, M.A. El-Sherbieny and A.I.A. Yousif. 2022. Effect of aqueous and methanolic green tea extracts on motility, normal forms, and kinetic parameters of spermatozoa in Rahmani ram semen equilibrated at 5 °C for 4 hours. *Journal of Animal and Poultry Production* 13(5): 63-70.

Alagbonsi, A.I., L.A. Olayaki, H.A. Abdulrahim, T.S. Adetona and G.T. Akinyemi. 2019. Cannabinoid-deficient Benin republic

- hemp (*Cannabis sativa* L.) improves semen parameters by reducing prolactin and enhancing anti-oxidant status. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19(1): 132, doi: 10.1186/s12906-019-2541-5.
- Amann, R.P. and D. Waberski. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81(1): 5-17.
- Bansal, A.K. and G.S. Bilaspuri. 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International* 2011: 686137, doi: 10.4061/2011/686137.
- Caiza de la Cueva, F.I., T. Rigau, R. Pujol, J. Piedrafita and J.E. Rodríguez-Gil. 1997a. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: The role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Animal Reproduction Science* 48(2-4): 301-315.
- Caiza de la Cueva, F.I., M.R. Pujol, T. Rigau, S. Bonet, J. Miró, M. Briz and J.E. Rodríguez-Gil. 1997b. Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: The role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology* 48(6): 947-968.
- Chasiotis, V.K., D.A. Tzempelikos and A.E. Filios. 2021. Assessment of constant and time-varying temperature schemes on the convective drying characteristics of hemp leaves. *Case Studies in Thermal Engineering* 26, doi.10.1016/j.csite.2021.101098.
- Chomchai, S. 1999. Manual for Artificial Insemination in Pigs. 3<sup>rd</sup> ed. National Swine Research and Training Center, Kasetsart University, Nakhon Pathom. 294 p. (in Thai)
- Einarsson, S., B. Crabo and L. Ekman. 1970. A comparative study on the chemical composition of plasma from the cauda epididymidis, semen fractions, and whole semen in boars. *Acta Veterinaria Scandinavica* 11(2): 156-180.
- Gadea Joaquin. 2003. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research* 1(2): 17-27.
- Jaidee, T. and P. Sootanan. 2022. A survey on molecular biological processes of cannabinoids by functional module-based network analysis. *Burapha Science Journal* 27(1): 274-299. (in Thai)
- King, G.J. and J.W. Macpherson. 1966. Alkaline and acid phosphatase activity, pH and osmotic pressure of boar semen. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 30(11): 304-307.
- Lopez Rodriguez, A., A.V. Soom, L. Arsenakis and D. Maes, 2017. Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. *Porcine Health Management* 3(15): 1-12.
- Manosroi A.,C. Chankhampan, B.Kietthanakorn, W. Ruksiriwanich, P. Chaikul, K. Boonpisuttinant, M. Sainakham, W. Manosroi, T. Tangjai and J. Manosroi. 2019. Pharmaceutical and Cosmeceutical Biological Activities of Hemp (*Cannabis sativa* L var. *sativa*) Leaf and Seed Extracts. *Chiang Mai Journal of Science* 46(2): 180-195.

- Padrik, P., T. Hallap, T. Kaart, T. Bulitko and Ü. Jaakma. 2012. Relationships between the results of hypo-osmotic swelling tests, sperm motility, and fertility in Estonian Holstein dairy bulls. Czech Journal of Animal Science 57(10): 490-497.
- Painupong, A. 2017. Free radicals and anti-oxidants in humen. PKRU SciTech Journal 1(2): 20-27. (in Thai)
- Park, Y.S., S.H. Lee, H.W. Choi, H.S. Lee, J.S. Lee and J.T. Seo. 2018. Abnormal human sperm parameters contribute to sperm DNA fragmentation in men with varicocele. The World Journal of Men's Health 36(3): 239-247.
- Payne, K.S., D.J. Mazur, J.M. Hotaling and A.W. Pastuszak. 2019. Cannabis and male fertility: A systematic review. The Journal of Urology 202(4): 674-681.
- Perez-Llano, B., J.L. Lorenzo, P. Yenes, A. Trejo and P. Garcia-Casado. 2001. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. Theriogenology 56(3): 387-398.
- Pintus, E., M. Kadlec, M. Jovičić, M. Sedmíková and J.L. Ros-Santaella. 2018. Aminoguanidine protects boar spermatozoa against the deleterious effects of oxidative stress. Pharmaceutics 10(4): 212, doi: 10.3390/pharmaceutics10040212.
- Prochowska, S., W. Nizanski and A. Fontbonne. 2022. Hypo-osmotic swelling test (HOST) for feline spermatozoa: The simplified procedure and the aspect of sperm morphology. Animals 12(7): 903, doi: 10.3390/ani12070903.
- Rodríguez-Gil, J.E. and T. Rigau. 1996. Effects of ouabain on the response to osmotic changes in dog and boar spermatozoa. Theriogenology 45(4): 873-888.
- Ros-Santaella, J.L. and E. Pintus. 2021. Plant extracts as alternative additives for sperm preservation. Antioxidants 10(5): 772, doi: 10.3390/antiox10050772.
- Schanknecht, E., A. Bachari, N. Nassar, T. Piva and N. Mantri. 2023. Phytochemical constituents and derivatives of *Cannabis sativa*; bridging the gap in melanoma treatment. International Journal of Molecular Sciences 24(1): 859, doi: 10.3390/ijms24010859.
- Shepherd, M.J., A.M. Minton, C. Schwab and L.A. Herickhoff. 2022. Effects of boar sperm antioxidant supplementation on fertility. Animal Reproduction Science 237: 106923, doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.106923.
- Sonseeda, P., T. Vongphalup and J. Phongpeng. 2011. Effect of solid on subsequent quality of boar semen. KKU Veterinary Journal 21(2): 164-171. (in Thai)
- Taoufik, B., S. Hamid, E.B. Aziz, F. Abdellah, S. Seddik, E. Yassine, F. Mouhcine, C. Zoubida and T. Mohamed. 2017. Comparative study of three varieties of *Cannabis sativa* L. cultivate in different region of Morocco. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 9(5): 643-653.
- Tassaneesuwan, N., C. Thammarat and P. Khongkow. 2023. Safety and potential effects of cannabidiol on skin cells. Journal of Health Science and Medical Research

- 41(3): 2023919, doi: 10.31584/jhsmr.2023919.
- Thun, R., M. Hurtado and F. Janett. 2002. Comparison of Biociphos-Plus<sup>®</sup> and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* 57(3): 1087-1094.
- Vitorovic, J., N. Jokovic, N. Radulovic, T. Mihajlov-Krstev, V.J. Cvetkovic, N. Jovanovic, T. Mitrovic, A. Aleksic and N. Bernstein. 2021. Antioxidant activity of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil in *Drosophila melanogaster* larvae under non-stress and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress Conditions. *Antioxidants* 10(6): 830, doi: 10.3390/antiox10060830.
- Vyt, P., D. Maes, E. Dejonckheere, F. Castryck and A. Van Soom. 2004. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reproduction in Domestic Animals* 39(1): 8-12.
- Wiebke, M., B. Hensel, E. Nitsche-Melkus, M. Jung and M. Schulze. 2022. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): Boar, bull, and stallion. *Animal Reproduction Science* 246: doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.106822.
- Yeste, M., M. Briz, E. Pinart, S. Sancho, E. Bussalleu and S. Bonet. 2010. The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter. *Animal Reproduction Science* 119(3-4): 265-274.
-



# องค์ประกอบทางโภชนาและพลังงานใช้ประโยชน์ได้ของเศษเหลือเครื่องใน สัตว์ปีกในไก่ประดู่หางดำและไก่กระดูกดำโครงการหลวง

## Nutrient Composition and Metabolizable Energy of Poultry Offal Waste in Pradu Hang Dam and Royal Project Black Bone Chicken

ธีรเจต พิงคะสัน วรันทร์ธร สิทธิสอน บุญล้อม ชีวะอิสระกุล และ สุขชน ตั้งทวีวัฒน์  
Teerached Pingkasun, Waruntorn Sittisor, Boonlom Cheva-Isarakul and Suchon Tangtaweewipat\*

ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

Department of Animal and Aquatic Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

\*Corresponding author: E-mail: agani002@gmail.com

(Received: 26 May 2023; Accepted: 17 August 2023)

**Abstract:** The objective was to determine the nutritional composition and metabolizable energy (ME) of poultry offal waste (POW). After autoclave sterilization, POW exhibited crude nutritional content expressed as a percentage of dry matter (% DM), i.e., crude protein (CP), ether extract (EE), crude fiber (CF), ash, and nitrogen free extract (NFE) at 66.57, 23.35, 1.01, 4.90, and 4.16 % respectively, with a gross energy (GE) of 6.520 kcal/g DM. The study aimed to determine metabolizable energy (ME) using adult male native chicken of 2 breeds i.e. Pradu Hang Dam chicken vs. Royal Project black bone chicken as experimental animals. Two experiments were conducted in which the first experiment was done by single force-feeding method. In the second experiment the substitution method was conducted using POW at 0, 2, 4 and 8 %. The obtained data of this later method were subjected to a linear regression equation for ME prediction. The results showed that no significant difference ( $P>0.05$ ) was found among birds of the 2 breeds. When the result of 2 experiments were taken into consideration. It was found that single force-feeding method showed a slightly higher ME value of  $4.226 \pm 0.037$  kcal/g DM as compared to the substitution method ( $4.073 \pm 0.015$  kcal/g DM, R-square = 0.99). Furthermore, using the regression equation, ME was nearly equivalent to the replacement of POW in the basal diet at a single level of 8 % ( $4.059$  kcal/g DM). The result tended to indicate that the appropriate level of POW utilization in poultry diet should be around 8 %.

**Keywords:** Single force-feeding method, metabolizable energy, poultry offal waste, regression equation, substitution method

**บทคัดย่อ:** วัตถุประสงค์เพื่อหาองค์ประกอบทางโภชนาและพลังงานใช้ประโยชน์ (Metabolizable energy; ME) ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก (Poultry offal waste; POW) เมื่อฆ่าเชื้อ POW โดยใช้หม้อนึ่งแรงดัน พบว่า มีโภชนาคิดเป็นร้อยละวัตถุดิบ (% DM) ดังนี้ โปรตีน (crude protein; CP), ไขมัน (ether extract; EE), เยื่อใย (crude fiber; CF), เถ้า (ash) และสารไร้นโตรเจนที่ละลายได้ในน้ำ (nitrogen free extract; NFE) เท่ากับ 66.57, 23.35, 1.01, 4.90 และ 4.16% ตามลำดับ โดยมีพลังงานรวม (Gross energy; GE) เท่ากับ 6.520 kcal/g DM หาค่า ME โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองใช้ไก่เพศผู้โตเต็มวัย 2 สายพันธุ์ คือ ไก่พื้นเมืองประดู่หางดำกับไก่กระดุกดำมูลนิธิโครงการหลวง การทดลองที่ 1 ใช้วิธีบังคับให้กินวัตถุดิบทดสอบ (POW) เพียงอย่างเดียวด้วย (single force-feeding method) การทดลองที่ 2 ใช้วิธีแทนที่อาหารพื้นฐาน (substitution method) ด้วย POW ที่ระดับ 0, 2, 4 และ 8% จากนั้นใช้สมการถดถอย (linear regression equation) ทำนายค่า ME ผลพบว่า ค่า ME จากไก่ทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P>0.05$ ) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการ พบว่า การบังคับให้กิน POW มีค่า ME สูงกว่าการทำนายโดยใช้สมการถดถอย ( $4.226\pm 0.079$  vs.  $4.073\pm 0.015$  kcal/g DM, R-square = 0.99) และพบว่า ค่า ME ที่ได้จากการทำนายใกล้เคียงกับค่า ME เมื่อใช้ POW แทนที่อาหารพื้นฐานที่ระดับ 8% ( $4.059$  kcal/g DM) ซึ่งอาจบ่งบอกระดับการใช้ที่เหมาะสมในอาหารสัตว์ปีกได้

**คำสำคัญ:** วิธีบังคับให้กินวัตถุดิบทดสอบ พลังงานใช้ประโยชน์ได้ เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก สมการถดถอย วิธีใช้วัตถุดิบทดสอบแทนที่ส่วนของอาหารพื้นฐาน

## คำนำ

เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก (poultry offal waste; POW) เป็นผลพลอย (by-product) ได้จากกระบวนการชำแหละตักแต่งซากสัตว์ปีกเพื่อการบริโภคของมนุษย์ ทำให้มีเศษเหลือจำนวนมาก อาทิเช่น ขนไก่ อวัยวะภายใน หัว เถ้า และเลือด นับเป็นของเสียที่ไม่เหมาะแก่การรับประทาน (Senkoylu *et al.*, 2005) หากมีการจัดการที่ไม่ดีมักก่อปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การส่งกลิ่นเหม็นรบกวน เป็นแหล่งสะสมเชื้อโรคในแหล่งดินและน้ำ เช่น *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* และ *Listeria spp.* (Giri *et al.*, 2010) โดยมีรายงานว่า เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกสามารถใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้ (Sahraei *et al.*, 2012) เช่น ใช้ในไก่เนื้อ (Romoser, 1955) เป็นต้น องค์ประกอบทางโภชนาและปริมาณ ME เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำวัตถุดิบไปประกอบสูตรอาหารสัตว์ แต่เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกในแต่ละประเทศมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ขึ้นกับสัดส่วนของเศษเหลือที่ไม่นำไปบริโภค ส่งผลต่อคุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบ (Dale and Fuller, 1984) ตัวอย่างเช่น ระดับ โปรตีน (crude protein; CP)

ไขมัน (ether extract; EE) เยื่อใย (crude fiber; CF) เถ้า (ash) สารไร้นโตรเจนที่ละลายได้ในน้ำ (nitrogen free extract; NFE) แคลเซียม (calcium; Ca) และฟอสฟอรัส (phosphorus; P) Wisman *et al.* (1958) รายงานว่า เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกในรัฐเวอร์จิเนีย สหรัฐอเมริกา ประกอบด้วย หัว เถ้า และอวัยวะภายใน มีค่า CP, EE, ash, CF, NFE, Ca และ P เท่ากับ 58.09, 15.87, 18.05, 0.85, 7.14, 8.57 และ 3.25% DM ตามลำดับ Dale *et al.* (1993) รายงานค่าเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกจาก 4 ประเทศ (สหรัฐอเมริกา คอสตาริกา เอลซัลวาดอร์ และเวเนซุเอลา) ซึ่งมีสัดส่วนของอวัยวะที่เหลือทิ้งแตกต่างกัน โดยเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกของสหรัฐอเมริกามีขนไก่รวมอยู่ด้วย มีค่าเฉลี่ย CP และ EE เท่ากับ 56.52 และ 35.00% DM มีค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้จริง (true metabolizable energy; TME) เท่ากับ 5.032 kcal/g DM Salami and Oyewole (1997) และ Oyewole and Salami (1997) รายงานว่าเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกของไนจีเรียซึ่งเป็นเศษเหลือที่มีเฉพาะส่วนลำไส้มีค่าเฉลี่ย CP, EE, CF, ash และ NFE เท่ากับ 59.57, 14.36, 0.37, 5.44 และ 20.25% DM ตามลำดับ ในประเทศเดียวกัน Udedibie *et al.* (1988) ได้รายงาน

ถึงเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่ประกอบด้วย หัว ลำไส้  
ขน เลือด เปลือกไข่ และไก่ที่ตายก่อนเข้าสู่กระบวนการ-  
ฆ่าและรวมอยู่ด้วยมีค่า CP, EE, CF และ ash เท่ากับ  
56.40, 20.90, 4.60 และ 7.70% DM ตามลำดับ มีค่า  
ME เท่ากับ 3.180 kcal/g DM เห็นได้ว่าเศษเหลือเครื่อง  
ในสัตว์ปีกที่มีส่วนหัว ขน เลือด เปลือกไข่ และไก่ที่ตาย  
ก่อนฆ่าและ มีค่าโปรตีนต่ำกว่าแต่มีค่า EE, CF และ  
ash สูงกว่า D' Agostini *et al.* (2004) รายงานว่าเศษ  
เหลือเครื่องในสัตว์ปีกในบราซิลซึ่งเป็นเศษเหลือจาก  
อวัยวะภายในที่ไม่มีส่วนขนมีค่า CP และ EE เท่ากับ  
71.92 และ 20.55% DM มีค่า GE และ ME เท่ากับ  
6.220 และ 4.750 kcal/g DM ขณะที่ Eyng *et al.* (2010)  
รายงานถึงเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกของบราซิลเช่นกัน  
แต่มีเฉพาะลำไส้เท่านั้น มีโปรตีนและไขมัน เท่ากับ  
61.35 และ 16.02% DM มีค่า GE, พลังงานใช้ประโยชน์  
ปรากฏ (apparent metabolizable energy; AME) และ  
TME เท่ากับ 5.501, 3.219 และ 4.112 kcal/g DM  
ตามลำดับ Nunes *et al.* (2006) รายงานว่าเศษเหลือ  
เครื่องในสัตว์ปีกจากโรงฆ่าและสัตว์ปีกในโปรตุเกส  
ซึ่งมีส่วนอวัยวะภายในรวมกับหัว และคอ โดยไม่มีขน  
มี CP, EE, ash, CF, NFE, Ca และ P เท่ากับ 59.10, 17.50,  
18.79, 1.85, 2.77, 3.99 และ 2.89% DM ตามลำดับ มีค่า  
AME และ TME เท่ากับ 3.062 และ 3.211 kcal/g DM  
Feedipedia (2012) รายงานค่าเฉลี่ยของเศษเหลือเครื่อง  
ในสัตว์ปีกจากแหล่งศึกษาต่าง ๆ ว่ามี CP, EE และ ash  
เท่ากับ 60.20, 27.90 และ 10.60% DM ตามลำดับ มีค่า  
GE เท่ากับ 5.830 kcal/g DM ส่วน Röcker *et al.* (2021)  
รายงานถึงเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกจากโรงงานแปรรูป  
สัตว์ปีกตามหลักสากลของออสเตรเลียมี CP, EE, ash,  
NFE และ GE เท่ากับ 70.32, 13.00, 16.86, 5.14% DM และ  
5.400 kcal/g DM ตามลำดับ สำหรับในประเทศไทย  
Khieokhajonkhet and Detpan (2019) ได้รายงานว่าเศษ  
เหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่ได้จากโรงงานฆ่าและสัตว์ปีก  
มี CP, EE และ ash เท่ากับ 46.46, 16.54 และ 6.14% DM  
ตามลำดับ และมี GE เท่ากับ 4.528 kcal/g DM เห็นได้ว่า  
คุณค่าทางโภชนาการของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก  
จากแหล่ง ต่าง ๆ มีความความผันผวนค่อนข้างสูงขึ้นไป  
สัดส่วนของเศษเหลือ (อวัยวะ) ที่มนุษย์ไม่นำไปบริโภค

การหาค่าพลังงานของวัตถุดิบแต่ละชนิด  
เป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญเพื่อใช้ประกอบสูตรอาหาร  
ให้เหมาะสมกับความต้องการของสัตว์ ค่า ME เป็นค่า  
หนึ่งที่ใช้ในการคำนวณสูตรอาหารสัตว์ปีก โดย Farrell  
(1978) รายงานว่า การหาค่า ME สามารถทำได้ 2 วิธี  
คือ การให้ไก่เพศผู้โตเต็มวัยกินวัตถุดิบที่ต้องการทดสอบ  
เพียงชนิดเดียวโดยกรอกเข้าทางปากไก่ (single force-  
feeding method or single ingredient) กับการใช้วัตถุดิบ  
ทดสอบไปแทนที่ส่วนของอาหารพื้นฐานที่รู้คุณค่าทาง  
โภชนาแล้ว (substitution method) ซึ่งทั้งสองวิธีดังกล่าว  
McIntosh *et al.* (1962) ได้ศึกษากับเมล็ดธัญพืช พบว่า  
ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก แต่ Sibbald (1979) พบว่า  
วิธีการบังคับให้ไก่กินวัตถุดิบทดสอบเพียงชนิดเดียว  
ให้ผลที่น่าพอใจเฉพาะวัตถุดิบประเภทเมล็ดธัญพืชบาง-  
ชนิดเท่านั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าวิธีนี้เหมาะสมกับวัตถุดิบ  
บางชนิดแต่ไม่เหมาะกับวัตถุดิบทั่ว ๆ ไป ที่อาจมี  
ลักษณะไม่น่ากิน หรือมีคุณค่าทางโภชนาไม่สมดุล  
ทำให้เกิดการสลายตัวของเนื้อเยื่อมาใช้เป็นพลังงาน  
ส่งผลให้ค่า ME ลดลง (Sibbald, 1979) ส่วนวิธีการใช้  
วัตถุดิบทดสอบไปแทนที่ส่วนของอาหารพื้นฐานใน  
ระดับที่สูงขึ้นตามลำดับจนถึงระดับปกติที่ใช้ในการ-  
ประกอบสูตรอาหาร จากนั้นใช้สมการถดถอย (regression  
analysis equation) ทำนายค่า ME ของวัตถุดิบทดสอบ  
(Miller, 1974) วิธีนี้ให้ผลเป็นที่น่าพอใจกับวัตถุดิบทุก  
ชนิด (Sibbald *et al.*, 1960) แต่ค่า ME ที่ได้จากวิธีนี้  
อาจมีความคลาดเคลื่อนได้หากใช้แทนที่อาหารพื้นฐาน  
ในระดับต่ำ ๆ (Campbell *et al.*, 1983) การหาโดยวิธี  
นี้จะเป็ค่าที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากที่สุดเพราะ  
วัตถุดิบแต่ละชนิดที่ประกอบกันเป็นสูตรอาหาร มีการ-  
เสริมสร้างคุณค่าทางโภชนาพร้อมกัน (feed ingredient  
interaction) มีผลทำให้ค่า ME ของวัตถุดิบอีกชนิดหนึ่ง  
มีค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงเรียกว่า การเกิด association  
effect (Tangtaweewipat *et al.*, 1988)

ปัจจุบันข้อมูลคุณค่าทางโภชนาของเศษเหลือ  
เครื่องในสัตว์ปีกภายในประเทศไทยมีรายงานไม่แพร่  
หลายนัก โดยทั้งประเทศมีโรงเชือดสัตว์ปีกมาตรฐาน  
ที่ได้รับใบอนุญาตทั้งสิ้น 529 แห่ง (Bureau of Livestock,  
2022) และมีปริมาณการผลิตเนื้อไก่รวมจำนวน 3.3 ล้านตัน

(USDA, 2023) หรือเทียบเป็นน้ำหนักไก่มีชีวิตประมาณ 4.0 ล้านตัน คาดว่ามีเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกประมาณ 6 หมื่นตัน ซึ่งอ้างอิงจาก Diarra *et al.* (2015) ที่ระบุว่า เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกมีสัดส่วนร้อยละ 1.46 ของน้ำหนักมีชีวิต โดยส่วนของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกนี้ จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปีตามอัตราการผลิตที่เพิ่มขึ้น การนำเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบเป็นอาหารสัตว์ จึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าองค์ประกอบทางโภชนาการและค่า ME ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่ได้จากโรงงานชำแหละไก่เนื้อในจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำพูน ซึ่งเป็นโรงงานมาตรฐานมีกำลังการผลิตประมาณวันละหนึ่งแสนตัว เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ใช้ประโยชน์ในการประกอบสูตรอาหารสัตว์ปีก รวมถึงเป็นการตอบสนองต่อนโยบายการพัฒนาเศรษฐกิจแบบองค์รวมที่มุ่งเน้นการพัฒนา 3 เศรษฐกิจไปพร้อมกัน (Bio-Circular-Green Economy Model: BCG Model) ในด้านการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า โดยการลดปัญหาที่เกิดขึ้นเนื่องจากผลพลอยได้ (เศษเหลือ) จากกระบวนการชำแหละตัดแต่งซากสัตว์ปีก ก่อให้เกิดการผลิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเตรียมวัตถุดิบ

เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกนำมาจากโรงงานในจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำพูน ที่มีกระบวนการชำแหละและตัดแต่งซากไก่เนื้อตามมาตรฐานสากล มีกำลังการผลิตวันละหนึ่งแสนตัว ประกอบด้วย กระเพาะพัก กระเพาะจริง ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ ตับอ่อน และไขมันห่อหุ้มอวัยวะในช่องท้อง โดยเก็บตัวอย่างสดจากโรงงานในช่วงเช้า จากนั้นนำตัวอย่างเข้ากระบวนการฆ่าเชื้อ (sterilization) ด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (autoclave) ที่ความดัน 30 psi อุณหภูมิ 134 °C เป็นเวลา 3 นาที ซึ่ง Park *et al.* (2010) รายงานว่า วิธีการข้างต้นเป็นการฆ่าเชื้อในอาหารตามหลักสากลทั่วไป ประกอบกับ McNaughton *et al.* (1977) ได้แนะนำว่า ควรใช้เวลาในกระบวนการฆ่าเชื้อนี้ให้สั้นที่สุด เพราะ

หากใช้เวลานานส่งผลต่อการใช้ประโยชน์ได้ของไลซีนที่ลดลง หลังจากนั้นทำการกรองแยกส่วนของน้ำออกอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนกว่าแห้งดี เมื่อแห้งสนิทนำตัวอย่างไปบดผ่านตะแกรงที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มม. เก็บรวบรวมไว้เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

### การประเมินคุณค่าทางโภชนาการ

ทำการสุ่มเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่ได้เก็บรวบรวมไว้ข้างต้นไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีอย่างหยาบ (proximate analysis) ตามที่บ่งไว้โดย AOAC (2005) โดยค่า DM, CP, EE, CF และ ash อ้างอิงตาม AOAC Official Method 934.01, 2001.11, 920.39, 962.09 และ 942.05 ตามลำดับ ในขณะที่ค่าสารไร้ไนโตรเจนที่ละลายได้ในน้ำ (NFE) คำนวณจากค่า %DM - %ash - %EE - %CP - %CF ส่วนการวิเคราะห์ค่าพลังงานรวม (GE) ใช้เครื่อง bomb calorimeter รุ่น AC-500 (LECO, 2018) การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นใช้เครื่อง ARACUS รุ่น Classic ผลิตโดยบริษัท Membrapure ประเทศเยอรมัน ที่ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตามวิธีการจาก Chinese National Standard (2000) อ้างอิงเลขที่ GB/T18246-2000

### การหาค่าพลังงานใช้ประโยชน์

การศึกษาในครั้งนี้ ได้ปฏิบัติตามข้อกำหนดจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สัตว์เกษตร) ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ AG02002/2565 แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

**การทดลองที่ 1: วิธีบังคับให้ไก่กินวัตถุดิบเพียงชนิดเดียวด้วยการกรอกปาก (single force-feeding method) ใช้ไก่เพศผู้โตเต็มวัย ที่มีอายุ 26 สัปดาห์ จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ ไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำ (Pradu Hang Dam; PDHD) เทียบกับไก่กระดูกดำที่คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์โดยมูลนิธิโครงการหลวง (Royal Project black-bone chicken; RPBB) จำนวนสายพันธุ์ละ 8 ตัว เลี้ยงในกรง metabolic cage แบบซิง**

เดี่ยวขนาด 35 × 45 × 50 ซม. มีถาดรองรับมูลใต้กรง และมีภาชนะใส่อาหาร ภาชนะใส่น้ำสำหรับให้ไก่กิน แยกเป็นรายตัว ใช้ระยะเวลาทดลอง 9 วัน โดยในช่วง 7 วันแรกให้ไก่ทุกตัวได้รับอาหารที่มี 18% CP แบบเต็ม ที่เพื่อให้ปรับตัวคุ้นเคยกับสภาพกรงและสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นระยะเตรียมพร้อม (preliminary period) จากนั้นทำการอดอาหารไก่ทุกตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ขับถ่ายมูลออกให้หมด เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว แบ่งไก่แต่ละพันธุ์ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกจำนวน 6 ตัว ทำการกรอกเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกเข้าทางปากไก่ตัวละ 30 กรัม ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Sibbald (1976) ดังนี้ หลังจากให้ไก่อดอาหารครบ 24 ชั่วโมง นำไก่ออกจากกรง metabolic cage ซึ่งนำหนักตัวไก่ จากนั้นใช้มือเปิดปากไก่เพื่อให้อาหารทดสอบ ซึ่งเตรียมได้จากเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกจำนวน 30 กรัม นำไปผสมกับน้ำสะอาดสัดส่วน 20% หรือประมาณ 6 มล. คลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วปั้นให้เป็นเม็ดเล็ก ๆ โดยจะได้จำนวน 10 เม็ด จากนั้นจึงนำเม็ดอาหารทดสอบกรอกผ่านปากไก่อลงสู่หลอดอาหารไปยังกระเพาะพัก (crop) ทำครั้งละเม็ด จนครบ 10 เม็ด ทำการฉีดน้ำเข้าทางปากไก่เพื่อไล่เม็ดอาหารทดสอบลงสู่กระเพาะพัก โดยใช้ระบบกรอกอัตโนมัติแบบพลาสติกขนาด 5 มล. ที่บรรจุน้ำสะอาดเต็มกระบอกฉีด ทำการฉีดน้ำ 2 ครั้ง จนอาหารทุกเม็ดลงไปอยู่ที่กระเพาะพัก ซึ่งนำหนักตัวไก่อีกครั้งก่อนปล่อยเข้ากรง metabolic cage พร้อมกับนำแผ่นพลาสติกแบบใสรองบนถาดรองรับมูลใต้กรง เพื่อเก็บมูลเป็นเวลา 24 ชั่วโมงนับตั้งแต่กรอกอาหารทางปากเสร็จสิ้น สำหรับนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่อไป ส่วนไก่ที่เหลืออีก 2 ตัวทำการอดอาหารต่อไปอีก 24 ชั่วโมงเพื่อหาค่า endogenous loss สำหรับคำนวณค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้จริง (TME)

บันทึกข้อมูลปริมาณอาหารที่ให้กินและน้ำหนักมูลจากไก่ทุกตัวหลังจากกรอกเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกครบ 24 ชั่วโมง รวมทั้งบันทึกน้ำหนักมูลไก่ 2 ตัวที่อดอาหารด้วย นำมูลที่เก็บได้จากไก่แต่ละตัวมาอบแห้งในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2 วัน หรือจนกว่าแห้งดี บันทึกน้ำหนักมูลก่อนและหลังอบ จากนั้นบดผ่านตะแกรงที่มีรูขนาดเส้นผ่าน

ศูนย์กลาง 1 มม. ทำการผสมตัวอย่างอาหารและมูลไก่ไปวิเคราะห์ค่า GE เพื่อคำนวณค่า AME หรือโดยทั่วไปใช้คำว่า ME และค่า TME โดยใช้สูตรที่อ้างอิงจาก Cheva-Isarakul *et al.* (2001) ดังนี้

$$\text{AME หรือ ME (kcal/g DM)} = \frac{(\text{GE}_f \times \text{F}_i) - (\text{GE}_r \times \text{E}_r)}{\text{F}_i}$$

$$\text{TME (kcal/g DM)} = \frac{(\text{GE}_f \times \text{F}_i) - [(\text{GE}_r \times \text{E}_r) - (\text{GE}_f \times \text{E}_r)]}{\text{F}_i}$$

โดยที่:

GE<sub>f</sub> = GE ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก (kcal/g DM)

GE<sub>r</sub> = GE ของมูลไก่ตัวที่ให้เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก (kcal/g DM)

GE<sub>t</sub> = พลังงานรวมของมูลไก่ตัวที่อดอาหาร (kcal/g DM)

F<sub>i</sub> = ปริมาณเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่กรอกปาก (g DM)

E<sub>r</sub> = ปริมาณมูลไก่ตัวที่ให้เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก (g DM)

E<sub>f</sub> = ปริมาณมูลไก่ตัวที่อดอาหาร (g DM)

ในการเก็บตัวอย่างมูลไก่ หากมีเศษอาหารขนไก่ หรือสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ปะปนกับตัวอย่างมูล ใช้คีมคีบหรือช้อนเล็ก ๆ ตักออก ส่วนกรณีที่เป็นเศษอาหารหรือขนไก่ที่มีขนาดเล็กมาก ไม่สามารถใช้ช้อนตักหรือคีมคีบออกได้ ทำการคัดแยกสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้อีกครั้งภายหลังจากนำมูลไปอบให้แห้ง ทำการบดด้วยครกบดยา (mortar) จากนั้นนำไปร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มม. เพื่อแยกสิ่งปนเปื้อนออก ทำเช่นนี้ซ้ำ 5-10 รอบ หรือจนกว่าสิ่งปนเปื้อนหมดไป นำสิ่งปนเปื้อนที่แยกได้ทั้งหมดซึ่งนำหนักเพื่อหักออกจากร้านหนักมูลก่อนและหลังอบ

#### การทดลองที่ 2: วิธีการแทนที่อาหาร

**พื้นฐาน (Substitution method)** ใส่ไก่ทดลองในกรงขังเดี่ยว มีถาดรองรับมูล ภาชนะใส่อาหาร และใส่น้ำแบบแยกรายตัวเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่ใช้ไก่จำนวนสายพันธุ์ละ 4 ตัว วางแผนการทดลองแบบ 4 × 4 Latin square โดยใช้เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกแทนที่ส่วนของอาหารพื้นฐาน (Table 1) ที่ระดับต่าง ๆ คือ 0, 2, 4 และ 8% แบ่งระยะเวลาทดลองเป็น 4 ช่วง ๆ ละ 9 วัน รวมเวลาทดลองทั้งสิ้น 36 วัน แต่ละช่วงแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะ 5 วันแรก (preliminary period) เพื่อให้

Table 1. Ingredients and nutrient composition of basal diet

Ingredients	(%)	Calculated nutrient composition (% air dry basis)	
Yellow corn	57.45	CP	18.00
Rice bran	14.00	GE (kcal/g)	3.89
Soybean meal	16.00	ME (kcal/g)	2.90
Fish meal (55% CP)	8.00	CF	4.10
Calcium carbonate	1.89	EE	4.77
Monocalcium phosphate (22% P)	0.85	Calcium	1.01
L-Lysine	0.11	Available phosphorus	0.45
DL-Methionine	0.20	Lysine	1.03
Salt	0.5	Methionine	0.51
Premix <sup>1</sup>	1.0	Methionine + Cysteine	0.91
<b>Total</b>	<b>100.00</b>		

<sup>1</sup> mg/kg feed unless otherwise noted: Vitamin A 37.5 IU, Vitamin D<sub>3</sub> 7.5 IU, Vitamin E 0.06 IU, Vitamin K<sub>3</sub> 0.01, Vitamin B<sub>1</sub> 0.01, Vitamin B<sub>2</sub> 0.02, Vitamin B<sub>6</sub> 0.01, Vitamin B<sub>12</sub> 0.06, Pantothenic acid 0.03, Nicotinic acid 0.09, Folic acid 0.003, Biotin 0.04 µg, Choline chloride 0.63, Cu 0.004, Manganese 0.15, Zinc 0.11, Iron 0.20, Iodine 0.001 and Selenium 0.0004

GE = Gross energy; ME = Metabolizable energy; CP = Crude protein; CF = Crude fiber; EE = Ether extract

ไก่ปรับตัวเข้ากับอาหารทดลองและสภาพของกรง ส่วน 4 วันหลังเป็นระยะเก็บข้อมูล (collection period) โดยบันทึกปริมาณอาหารที่กิน และมูลที่ถ่ายออกทุกวัน ที่เวลา 9.00 น. จากนั้นนำมูลไก่ที่เก็บได้ในแต่ละวัน จากไก่แต่ละตัวใส่ถุงพลาสติกไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่ อุณหภูมิ -4 °C (ทั้งหมด 4 วัน) เมื่อเสร็จการทดลอง ในแต่ละช่วง นำมูลที่เก็บไว้ออกจากตู้แช่แข็งไปไว้ที่ อุณหภูมิห้องเพื่อให้ละลาย แล้วนำไปอบให้แห้งที่ อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 2 วันหรือจนกว่าแห้งดี บันทึก นำหนักมูลแห้งอบ บดและคลุกเคล้าให้เข้ากัน ทำการ- สุ่มตัวอย่างอาหารและมูลไปวิเคราะห์หาค่าพลังงานรวม เพื่อคำนวณค่า ME

หลังจากทำการทดลองครบ 9 วันในช่วงแรก แล้ว ให้เปลี่ยนอาหารทดลองไปให้ไก่ตัวอื่น โดยสลับ ตัวไก่จนแต่ละตัวได้รับอาหารครบทั้ง 4 สูตร ตามแผน

การทดลองแบบ 4 × 4 Latin square จากนั้นนำค่า ME ของสูตรอาหารที่ไก่ทุกตัวได้รับในแต่ละช่วงเข้าสมการ- ถดถอยเชิงเส้น (Linear regression equation) เพื่อ คาคคเนค่า ME ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกเหมือน การแทนที่อาหารพื้นฐานที่ 100 %

นอกจากนี้ในการทดลองที่ 2 (การใช้เศษเหลือ เครื่องในสัตว์ปีกแทนที่อาหารพื้นฐาน 4 ระดับ) ยังสามารถคำนวณหาค่า ME ของเศษเหลือเครื่องใน สัตว์ปีกที่ระดับนั้น ๆ ได้ด้วย ซึ่งอ้างอิงไว้โดย Cheva- Isarakul and Tangtaweewipat (1990) เพื่อใช้เป็นค่า เปรียบเทียบกับ 2 วิธีการข้างต้นได้ โดยมีสูตรในการ+ คำนวณ ดังนี้

$$= \frac{\text{AME หรือ ME of POW (kcal/g DM)} - \text{ME of Mix diet} - (\% \text{ Basal diet} \times \text{ME of Basal diet})}{\% \text{ POW}}$$

## การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลการเปรียบเทียบระหว่างสองสายพันธุ์ (PDHD vs. RPBB) ที่ได้จาก single force - feeding method วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย T-test ข้อมูลที่ได้จาก substitution method ใช้แผนการทดลองแบบ 4 × 4 Latin square design และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Duncan's new multiple range test (Steel *et al.*, 1997) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 21.

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

### คุณค่าทางโภชนาการของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก

คุณค่าทางโภชนาการของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกเมื่อผ่านการ autoclave ที่ความดัน 30 psi อุณหภูมิ 134 °C เป็นเวลา 3 นาที (Table 2) ปรากฏว่ามี CP, EE, CF, และ ash เท่ากับ 66.57, 23.35, 1.01 และ 4.90 % DM มี GE 6.520 kcal/g DM เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกในการศึกษาครั้งนี้ มีค่า CP สูงกว่าที่รายงานโดย McNaughton *et al.* (1976); Feedipedia (2012) แต่น้อยกว่า Rocker *et al.* (2021) ในด้านพลังงานพบว่า มีค่า GE สูงกว่าที่รายงานไว้โดย Rocker *et al.* (2021); Feedipedia (2012) นอกจากนี้พบว่า มีคุณค่าทางโภชนาการโดยเฉพาะค่า CP และ EE สูงกว่าปลาป่น (fish meal; FM 61 % CP) ที่นิยมใช้ในประเทศไทยด้วย

สำหรับกรดอะมิโนที่จำเป็นของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก (Table 2) มีค่าเมทไธโอนีน สูงกว่าปริมาณที่รายงานไว้โดย McNaughton *et al.* (1976); Feedipedia (2012); Rocker *et al.* (2021) รวมทั้งยังมีกรดอะมิโนจำเป็นบางชนิดที่สูงกว่าปลาป่น โดยเฉพาะค่าเฟนิลอะลานีน ลิวซีน และวาลีน เห็นได้ว่าเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกมีศักยภาพที่นำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารสัตว์ปีกได้

### ค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก

#### การทดลองที่ 1: Single force-feeding method

ค่า AME หรือ ME และค่า TME ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกในไก่ประดู่หางดำ (PDHD) และไก่กระ-

ดุกดำโครงการหลวง (RPBB) ที่ศึกษาโดยวิธีบังคับให้ไก่กิน (Table 3) มีค่า ME เท่ากับ 4.199 และ 4.252 kcal/g DM ส่วน TME มีค่าเท่ากับ 4.360 และ 4.370 kcal/g DM ในไก่สายพันธุ์ PDHD และ RPBB ตามลำดับ โดยค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) ค่าเฉลี่ยจากในทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า ME และ TME เท่ากับ 4.226 และ 4.365 kcal/g DM หรือเท่ากับ 4.038 และ 4.171 kcal/g air dry ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่ารายงานของ Dale *et al.* (1993) ที่ระบุว่า มีค่าเท่ากับ 5.032 kcal/g DM ทั้งนี้ อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีปริมาณ EE ต่ำกว่า (23.35 vs. 35.00 % DM) แต่ผลจากการศึกษานี้มีค่าสูงกว่าของ Nunes *et al.* (2006); Eyng *et al.* (2010) ที่รายงานว่ามีค่า AME เท่ากับ 3.026 และ 3.219 kcal/g DM และมีค่า TME เท่ากับ 3.211 และ 4.112 kcal/g DM ตามลำดับ ซึ่งอาจเนื่องมาจากตัวอย่างที่ใช้ศึกษาของทั้ง 2 รายงานข้างต้นมีค่า EE ต่ำกว่า (17.49 และ 16.02 % DM ตามลำดับ) ในขณะที่ค่าจากการศึกษานี้ใกล้เคียงกับรายงานของ D' Agostini *et al.* (2004) ที่ระบุว่า มี ME เท่ากับ 4.750 kcal/g DM โดยมีค่า EE เท่ากับ 20.55 % DM ซึ่งใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ใช้ในครั้งนี้นี้ ดังนั้น จึงเห็นได้ว่า ค่า AME หรือ TME มีความผันแปรตามปริมาณ EE หรือขึ้นกับส่วนประกอบของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่นำมาใช้ศึกษา

#### การทดลองที่ 2: Substitution method

ค่า ME หรือ AME ที่ได้จากการศึกษาโดยให้ไก่ประดู่หางดำ (PDHD) และไก่กระดุกดำ (RPBB) ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกแทนที่อาหารพื้นฐานระดับต่าง ๆ ด้วยแผนการทดลองแบบ 4 × 4 Latin square (Table 4) เมื่อแทนที่อาหารพื้นฐานด้วยเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกในสัดส่วนที่สูงขึ้น มีผลทำให้ค่า ME ที่ศึกษาในไก่ทั้ง 2 สายพันธุ์เพิ่มขึ้นตามระดับของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยกลุ่มที่ได้รับในระดับ 8% มีค่า ME สูงที่สุดตามมาด้วยระดับ 4% และ 2% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่พบนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเมื่อไก่แต่ละตัว (4 ตัว) ได้รับอาหารทั้ง 4 สูตรซึ่งให้ผลเช่นเดียวกัน ไม่ว่าจะใช้ไก่สายพันธุ์ PDHD หรือ

Table 2. Chemical composition, essential amino acids and ME content of poultry offal waste in this study compared with other references and fish meal

Ingredient	POW				FM (61% CP)
	Present study <sup>1</sup>	McNaughton <i>et al.</i> (1976)	Rocker <i>et al.</i> (2021)	Feedipedia (2012)	NRC (1994)
<b>Chemical composition (% DM):</b>					
CP	66.57	60.07	70.32	60.20	65.76
EE	23.35	28.06	13.00	27.90	10.22
CF	1.01	5.21	n.a	n.a.	0.76
ash	4.90	6.54	16.86	10.60	n.a.
NFE	4.16	n.a.	5.14	n.a.	n.a.
GE (kcal/g DM)	6.52	n.a.	5.40	5.83	n.a.
<b>Essential amino acids (% DM):</b>					
Methionine	1.53	0.84	1.14	1.40	1.77
Lysine	3.30	2.38	3.77	4.40	4.90
Phenylalanine	2.46	2.74	2.39	3.90	2.40
Threonine	2.33	2.68	2.73	3.90	2.67
Tryptophan	0.35	n.a.	n.a.	0.70	0.53
Arginine	3.73	3.75	3.70	6.60	4.00
Histidine	1.30	0.63	n.a.	1.80	1.54
Isoleucine	2.62	2.56	2.23	3.90	2.48
Leucine	4.60	4.53	4.44	7.00	4.52
Valine	3.26	3.69	2.85	5.40	3.01

<sup>1</sup> Chemical compositions and essential amino acids analyzed at Feed Laboratory, Department of Animal and Aquatic Sciences and Central Laboratory, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, respectively.

POW = poultry offal waste; FM = fish meal; n.a. = no data available; GE = gross energy; CP = crude protein; CF = crude fiber; EE = ether extract; NFE = nitrogen free extract

RPBB ก็ตาม โดยมีค่าระหว่าง 3.077 - 3.083 kcal/g DM (Table 4) แสดงให้เห็นว่า ในการศึกษาเพื่อหาค่า ME ในไก่ทั้ง 2 สายพันธุ์ ใช้ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ใดก็ได้ โดยให้ผลไม่แตกต่างกัน

การแทนที่อาหารพื้นฐานด้วยเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกระดับ 2 - 8% แล้วทำให้อาหารผสมมีระดับพลังงานเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่ใช้ศึกษาครั้งนี้มีค่าพลังงานสูงกว่าอาหารพื้นฐานโดยมีค่า GE เท่ากับ 6.52 kcal/g DM หรือ 6.06 kcal/g air dry เทียบกับ 3.89

kcal/g air dry ซึ่งสอดคล้องกับ Cheva-Isarakul and Tangtaweewipat (1990) ที่ได้ศึกษาค่า ME ของเมล็ดทานตะวันด้วยการใช้แทนที่อาหารพื้นฐานเช่นกัน พบว่า เมล็ดทานตะวันซึ่งมีค่า GE สูงกว่าอาหารพื้นฐาน (6.20 เทียบกับ 3.70 kcal/g air dry) มีผลทำให้ ME ของอาหารผสมมีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับ ME ของอาหารพื้นฐาน

สำหรับปัจจัยด้านตัวไก่แต่ละตัวของทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งไม่พบนัยสำคัญนั้น โดยมีค่า ME เฉลี่ยจากไก่แต่ละตัวใกล้เคียงกัน (3.075 - 3.083 kcal/g DM ในไก่

Table 3. Appearance metabolizable energy (AME) and true metabolizable energy (TME) of poultry offal waste from single force-feeding method comparing between 2 breeds of chicken (Experiment 1)

Poultry type	PDHD	RPBB	Average	P-value
AME (kcal/g DM) <sup>1</sup>	4.199 ± 0.019	4.252 ± 0.190	4.226 ± 0.079	0.520
TME (kcal/g DM) <sup>2</sup>	4.360 ± 0.020	4.370 ± 0.177	4.365 ± 0.083	0.898

$${}^1 \text{AME} = \frac{(\text{GE}_i \times \text{F}_i) - (\text{GE}_f \times \text{E}_f)}{\text{F}_i} \quad {}^2 \text{TME} = \frac{(\text{GE}_i \times \text{F}_i) - [(\text{GE}_f \times \text{E}_f) - (\text{GE}_r \times \text{E}_r)]}{\text{F}_i}$$

No significant difference was found between breeds of chicken. The value indicates as Mean ± SD

POW = poultry offal waste; PDHD = Pradu Hang Dam chicken; RPBB = Royal Project black bone chicken; AME = apparent metabolizable energy; TME = true metabolizable energy

Table 4. Metabolizable energy of 4 experimental diets and 4 birds from substitution method using 2 breeds of chicken (Experiment 2)

Level of POW in diet (%)	0 (Basal diet)	2	4	8	Average <sup>1</sup>	P-value
PDHD (kcal/g DM)						
Bird No.						
1	3.051	3.060	3.086	3.135	3.083 ± 0.038	
2	3.042	3.059	3.082	3.124	3.077 ± 0.036	
3	3.039	3.065	3.090	3.130	3.081 ± 0.039	
4	3.046	3.062	3.079	3.121	3.077 ± 0.032	
Average	3.045 ± 0.005 <sup>d</sup>	3.062 ± 0.003 <sup>c</sup>	3.084 ± 0.005 <sup>b</sup>	3.128 ± 0.006 <sup>a</sup>		< 0.01
RPBB (kcal/g DM)						
Bird No.						
1	3.047	3.067	3.090	3.126	3.083 ± 0.034	
2	3.045	3.057	3.084	3.127	3.078 ± 0.036	
3	3.051	3.064	3.087	3.123	3.081 ± 0.032	
4	3.040	3.062	3.080	3.128	3.078 ± 0.037	
Average	3.046 ± 0.005 <sup>d</sup>	3.063 ± 0.004 <sup>c</sup>	3.085 ± 0.004 <sup>b</sup>	3.126 ± 0.002 <sup>a</sup>		< 0.01

<sup>a-d</sup> Values within a row with no common superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ )

<sup>1</sup> No significant difference was found among birds of each breed

POW = poultry offal waste; PDHD = Pradu Hang Dam chicken; RPBB = Royal Project black bone chicken

ทั้ง 2 สายพันธุ์) แสดงให้เห็นถึงค่า ME ที่ได้จากไก่แต่ละตัวมีความแปรปรวนน้อย ซึ่งการหาค่า ME โดยวิธีนี้จัดว่ามีความแม่นยำสูงเหมาะที่จะนำไปใช้ศึกษาเกี่ยวกับวัตถุดิบทุกชนิด โดย Tangtaweewipat *et al.* (1988); Cheva-Isarakul and Tangtaweewipat (1990) ได้ให้ความเห็นว่า วิธีการแทนที่อาหารพื้นฐานหลายระดับเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมกับวัตถุดิบอาหารแทบทุกชนิด เพราะสามารถกำจัดปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้ในตัววัตถุดิบอาหาร เช่น การมีโภชนะที่ไม่สมดุล แม้ว่าจะต้องทำการทดลองเป็นเวลานานและมีความยุ่งยากในการเตรียมวัตถุดิบก็ตาม

จากข้อมูลค่า ME ของอาหารผสมแต่ละระดับที่ได้จากวิธี Substitution method (Table 4) นี้ เมื่อนำมาเข้าสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression equation) เพื่อหาค่า ME ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกโดยทำการแทนที่อาหารพื้นฐานที่ระดับสูงสุด (100%) พบว่ามีค่า ME ในไก่ PDHD เท่ากับ 4.083 kcal/g DM หรือเทียบเท่ากับ 3.819 kcal/g air dry โดยสมการเส้นตรงที่คำนวณได้ คือ

$$Y = 3.043 + 0.0104X$$

$$(R\text{-square} = 0.99; n = 4)$$

ส่วนในไก่ RPBB เมื่อเข้าสมการเส้นตรง พบว่าที่ระดับสูงสุดมีค่า ME เท่ากับ 4.046 kcal/g DM หรือเท่ากับ 3.784 kcal/g air dry โดยสมการเส้นตรงที่คำนวณได้ คือ

$$Y = 3.042 + .0102X$$

$$(R\text{-square} = 0.99; n = 4)$$

เมื่อ  $Y =$  ค่า ME ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก(kcal/g DM)

$X =$  ระดับการใช้เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกแทนที่อาหารพื้นฐาน (%)

$n =$  จำนวนข้อมูลที่ใช้ในการคำนวณ

$R\text{-square} =$  ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจจากทั้ง 2 สมการข้างต้นมีค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ ( $R\text{-square}$ ) สูงถึง 99% ซึ่งให้เห็นถึงความแม่นยำของสมการ อย่างไรก็ตามเมื่อนำค่าดังกล่าวเปรียบเทียบกับวิธีการบังคับให้ไก่กินวัตถุดิบเพียงชนิดเดียว พบว่า มีค่า ME ที่ต่ำกว่า อาจเนื่องจากเป็น

ธรรมชาติของวัตถุดิบชนิดเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก โดย Sibbald (1979) ซึ่งเป็นผู้รวบรวมเทคนิคและวิธีการสำหรับหาค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้จากวัตถุดิบอาหารสัตว์ปีกชนิดต่าง ๆ ได้ให้ความเห็นว่า การให้สัตว์ปีกกินวัตถุดิบเพียงชนิดเดียว (single ingredient assay) ใช้ได้เฉพาะกับวัตถุดิบบางชนิดเท่านั้น โดยวัตถุดิบนั้นต้องมีโภชนะใกล้เคียงกับความต้องการของสัตว์ปีกหรือเป็นอาหารตามธรรมชาติอยู่แล้ว แต่สำหรับวัตถุดิบที่มีโภชนะที่ไม่สมดุล ไม่น่ากิน ถ้าให้กินเป็นเวลาติดต่อกันหลายวัน อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของสัตว์ทดลองวิธีข้างต้นจึงไม่เหมาะสมกับวัตถุดิบบางชนิด ในขณะที่วิธีการแทนที่อาหารพื้นฐานระดับต่าง ๆ เพื่อนำค่าพลังงานอาหารผสมในแต่ละระดับมาเข้าสมการเส้นตรงแม้ว่าเป็นวิธีที่ยุ่งยากและใช้เวลาในการทดสอบนานแต่สามารถขจัดความแปรปรวนของค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้ของวัตถุดิบ (Miller, 1974) การคำนึงถึงธรรมชาติของวัตถุดิบให้เหมาะสมกับวิธีการหาค่า ME จึงเป็นเรื่องสำคัญ Tangtaweewipat *et al.* (1988) ได้ศึกษาการหาค่า ME จากข้าวเปลือกอบและถั่วมะแฮะบดโดยวิธีแทนที่ส่วนของอาหารพื้นฐานและการใช้เป็นอาหารเดี่ยวในสัตว์ปีก พบว่า ข้าวเปลือกมีค่า ME ที่ได้จากการทำนายด้วยสมการเส้นตรงต่ำกว่าค่าที่ได้จากวิธีการใช้เป็นวัตถุดิบเพียงชนิดเดียว แต่ผล ME ในถั่วมะแฮะนั้นได้ผลตรงกันข้าม โดยจะได้ค่าที่สูงกว่าวิธีให้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียวอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากในถั่วมะแฮะมี trypsin inhibitor และ chymotrypsin inhibitor (Tangtaweewipat and Elliott, 1989) ที่ทำให้การใช้ประโยชน์ได้จากโปรตีนลดลง ส่งผลให้เมื่อใช้วิธีให้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว ME จึงลดต่ำลง

ค่า ME ของสูตรอาหารที่ใช้เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกแทนที่อาหารพื้นฐานแต่ละระดับ แล้วเข้าสมการถดถอยประเมินค่า ME ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกในไก่ทั้ง 2 สายพันธุ์ (Table 5) ค่า ME เพิ่มขึ้นตามระดับเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่แทนที่อาหารพื้นฐาน (2, 4 และ 8%) ซึ่งสอดคล้องกับ Miller (1974) ที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น โดยการใช้เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกแทนที่ในระดับ 8% มีค่า ME สูงสุด และมีค่าใกล้เคียงกับ ME ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่ทำนายโดยใช้สมการ

Table 5. Metabolizable energy of POW calculated from single level of substitution method compared with the predicted from regression equation, as well as from single force-feeding method

Methods	Average from two breeds		
	PDHD	RPBB	
ME of POW from each single level of substitution <sup>1</sup>			
2% POW	3.973	3.785	3.879
4% POW	4.059	3.981	4.020
8% POW	4.101	4.017	4.059
<b>Average</b>	<b>4.044±0.065</b>	<b>3.928±0.125</b>	
ME of POW being predicted from regression equation	4.083	4.062	4.073±0.015
ME of POW from single force-feeding method	4.199±0.018	4.252±0.019	4.226±0.079

$$^1 \text{ ME of POW at each substitution level} = \frac{\text{ME of Mix diet} - (\% \text{ basal diet} \times \text{ME of basal diet})}{\% \text{ POW}}$$

POW = poultry offal waste; PDHD = Pradu Hang Dam chicken; RPBB = Royal Project black bone chicken; ME = metabolizable energy

ถดถอย (4.101 และ 4.017 kcal/g DM vs. 4.083 และ 4.062 kcal/g DM ในไก่ PDHD และ RPBB ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าหากต้องการหา ME ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกด้วยการแทนที่ระดับเดียว ควรเลือกใช้ที่ระดับ 8% จะมีความแม่นยำกว่าระดับอื่น ผลการศึกษาค่า ME ในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Tangtaweewipat *et al.* (1988); Cheva-Isarakul and Tangtaweewipat (1990) ที่รายงานว่า ME ของวัตถุดิบจากวิธีการแทนที่อาหารพื้นฐานที่ระดับใดระดับหนึ่งมักสอดคล้องกับค่า ME ที่ได้จากการทำนายด้วยสมการถดถอย แต่จะใกล้เคียงกับระดับใดนั้นต้องขึ้นอยู่กับธรรมชาติของวัตถุดิบชนิดนั้น อย่างไรก็ตาม ค่า ME ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกจากวิธีบังคับให้ไก่กินวัตถุดิบเพียงชนิดเดียว ยังมีค่าสูงกว่าวิธีแทนที่อาหารพื้นฐาน โดยไก่ PDHD มีค่าเท่ากับ 4.199 kcal/g DM ส่วนไก่ RPBB มีค่าเท่ากับ 4.252 kcal/g DM แสดงให้เห็นว่า วัตถุดิบชนิดเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ หากนำค่า ME ที่ได้จากการบังคับให้ไก่กินเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกชนิดเดียวไปใช้คำนวณในสูตรอาหารสัตว์ปีกมีความเป็นไปได้ที่สัตว์จะได้รับพลังงานใช้ประโยชน์ไม่

ครบถ้วน เนื่องจากใช้ค่า ME ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกสูงเกินความเป็นจริงในการคำนวณ

เมื่อทำการเฉลี่ยค่า ME ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกในไก่ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า การใช้สมการถดถอยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.073 ± 0.015 kcal/g DM หรือเทียบเท่ากับ 3.791 kcal/g air dry ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยเมื่อใช้เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกแทนที่อาหารพื้นฐานที่ระดับ 8% (4.059 kcal/g DM; Table 5)

ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลแหล่งอื่น ๆ พบว่า มีค่า ME หรือ AME ต่ำกว่ารายงานของ D' Agostini *et al.* (2004) ที่รายงานค่า ME มีค่าเท่ากับ 4.750 kcal/g DM ซึ่งเป็นเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่มีโปรตีนและไขมันสูงมาก (71.92 และ 20.55% % DM ตามลำดับ) แต่มีค่าสูงกว่า Udedibie *et al.* (1988); Nunes *et al.* (2006); Eyng *et al.* (2010) ซึ่งรายงานว่ามีค่า 3.180, 3.062 และ 3.219 kcal/g DM ตามลำดับ สำหรับค่า TME ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งได้จากวิธีบังคับให้ไก่กินเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกชนิดเดียว โดยเฉลี่ยจากไก่ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีค่าเท่ากับ 4.226 kcal/g DM นั้น พบว่า มีค่าต่ำ

กว่า Dale *et al.* (1993) แต่สูงกว่า Nunes *et al.* (2006) ค่อนข้างมาก ซึ่งรายงานไว้ว่ามีค่าเท่ากับ 5.032 และ 3.211 kcal/g DM ตามลำดับ ในขณะที่มีค่าใกล้เคียงกับ Eyng *et al.* (2010) ที่รายงานว่ามีค่า 4.112 kcal/g DM ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ มีค่า ME สูงกว่าวัตถุดิบประเภทโปรตีนที่นิยมใช้ในสูตรอาหารสัตว์ทั่วไป เช่น ปลาป่น (61 % CP) และกากถั่วเหลือง ซึ่งมี ME อยู่ที่ 3.065 และ 2.478 kcal/g DM ตามลำดับ (NRC, 1994) จึงอาจเป็นข้อดีสำหรับการเลือกใช้เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่เป็นเศษเหลือจากโรงฆ่าแหละไก่เนื้อในพื้นที่ภาคเหนือ หรือโรงฆ่าแหละสัตว์ปีกขนาดเล็กในท้องถิ่นหรือในชุมชนต่าง ๆ โดยใช้ทดแทนวัตถุดิบแหล่งโปรตีนที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

## สรุป

เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีก (Poultry offal waste) ที่ได้จากโรงงานฆ่าแหละในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน ซึ่งประกอบด้วยกระเพาะพัก กระเพาะจริง ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ ตับอ่อน และไขมันห่อหุ้มอวัยวะในช่องท้อง เมื่อนำไปผ่าน autoclave ที่ความดัน 30 psi อุณหภูมิ 134 °C เป็นเวลา 3 นาที มีคุณค่าทางโภชนาการเทียบเป็นร้อยละของวัตถุดิบ (% DM) ดังนี้ CP, EE, CF, ash และ NFE เท่ากับ 66.57, 23.35, 1.01, 4.90 และ 4.16 ตามลำดับ โดยมี GE เท่ากับ 6.520 kcal/g DM

เมื่อนำเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกไปหาค่าพลังงานใช้ประโยชน์ ด้วยวิธีการบังคับให้กินวัตถุดิบเพียงชนิดเดียว และวิธีการแทนที่อาหารพื้นฐานแต่ละระดับ จากนั้นใช้การทำนายด้วยสมการถดถอยในไก่พื้นเมืองสองสายพันธุ์ (ไก่ประดู่หางดำเทียบกับไก่กระดุกดำ) ผลปรากฏว่า ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ เมื่อเทียบระหว่างวิธีการ ค่าพลังงานใช้ประโยชน์ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่ได้จากวิธีการบังคับให้กินวัตถุดิบเพียงชนิดเดียวสูงกว่าการทำนายโดยใช้สมการถดถอยเล็กน้อย ( $4.226 \pm 0.079$  vs.  $4.073 \pm 0.015$  kcal/g DM) อย่างไรก็ตามวิธีการ

ทำนายโดยใช้สมการถดถอยผลมีความแม่นยำมากกว่า เนื่องจากมีค่าใกล้เคียงกับการใช้ประกอบสูตรอาหารจริง (R square = 0.99) จึงแนะนำให้ใช้ข้อมูลพลังงานใช้ประโยชน์ของเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกเท่ากับ  $4.073 \pm 0.015$  kcal/g DM หรือ  $3.810 \pm 0.014$  kcal/g air dry โดยเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับวิธีการแทนที่อาหารพื้นฐานด้วยเศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกระดับ 8% ( $4.059$  kcal/g DM) ซึ่งอาจบ่งบอกถึงระดับการใช้เศษเหลือเครื่องในสัตว์ปีกที่เหมาะสมในอาหารสัตว์ปีกได้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบคุณ คุณกิติกร พลเมืองดี ผู้จัดการทั่วไป สำนักงานเชียงใหม่ บริษัท เบทาโกรเกษตรอุตสาหกรรม จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 18<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, Maryland.
- Bureau of Livestock. 2022. Number of slaughterhouses in Thailand (Online). Available: <https://certify.dld.go.th/certify/index.php/th/2021-08-25-02-54-50/66-2016-05-18-06-09-08/1695-2022-05-18-03-12-46> (July 13, 2023). (in Thai)
- Campbell, G.L., L.D. Campbell and R. Blair. 1983. Calculation of metabolizable energy for ingredients incorporated at low levels into a reference diet. Poultry Science 62(4): 705-707.
- Cheva-Isarakul, B. and S. Tangtaweewipat. 1990. Nutritive value of sunflower seeds in poultry diet. pp. 61-72. In: Proceedings of

- 28<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference: Animals, Veterinary Medicine and Fisheries. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Cheva-Isarakul, B., S. Tangtaweewipat and P. Sangsrijun. 2001. Chemical composition and metabolizable energy of mustard meal. pp. 153-160. *In*: Proceedings of 39<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference. Animals and Veterinary Medicine. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Chinese National Standard. 2000. Determination of Amino Acids in Feeds, GB/T 18246-2000, China Standard Press, Beijing.
- D' Agostini, P., P.C. Gomes, L.F.T. Albino, H.S. Rostagno and L.M. Sá. 2004. Values of chemical and energy composition of some feedstuffs for broiler chicks. *Revista Brasileira de Zootecnia* 33(1): 128-134. (in Portuguese)
- Dale, N. and H.L. Fuller. 1984. Correlation of protein content of feedstuffs with the magnitude of nitrogen correction in true metabolizable energy determinations. *Poultry Science* 63(5): 1008-1012.
- Dale, N., B. Fancher, M. Zumbado and A. Villacres. 1993. Metabolizable energy content of poultry offal meal. *Journal of Applied Poultry Research* 2(1): 40-42.
- Diarra, S.S., D. Sandakabatu, D. Perera, P. Tabuaciri and U. Mohammed. 2015. Growth performance and carcass yield of broiler chickens fed commercial finisher and cassava copra meal-based diets. *Journal of Applied Animal Research* 43(3): 352-356. <http://dx.doi.org/10.1080/09712119.2014.978774>.
- Eyng, C., R.V. Nunes, H.S. Rostagno, L.F.T. Albino, C.G.V. Nunes and L.D.G. Bruno. 2010. Chemical composition, energetic values and real digestible amino acid of different viscera meals for poultry. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39(4): 779-786. (in Portuguese)
- Farrell, D.J. 1978. Rapid determination of metabolisable energy of foods using cockerels. *British Poultry Science* 19(3): 303-308.
- Feedipedia. 2012. Animal feed resources information system (Online). Available: <https://www.feedipedia.org/node/12474> (August 14, 2022).
- Giri, S.S., S.K. Sahoo and S.N. Mohanty. 2010. Replacement of by-catch fishmeal with dried chicken viscera meal in extruded feeds: effect on growth, nutrient utilisation and carcass composition of catfish *Clarias batrachus* (Linn.) fingerlings. *Aquaculture International* 18(4): 539-544.
- Khieokhajokhet, A. and N. Detpan. 2019. Effects of replacement of fishmeal protein by chicken viscera meal protein on growth performance and feed efficiency in hybrid catfish (*Clarias microcephalus* x *C. gariepinus*). *Khon Kaen Agriculture Journal* 47(1): 95-104. (in Thai)
- LECO. 2018. AC500 Bomb calorimeter. (Online). Available: <https://leco.co.th/product/ac500-bombcalorimeter> (August 24, 2022). (in Thai)
- McIntosh, J.I., S.J. Slinger, I.R. Sibbald and G.C. Ashton. 1962. Factors affecting the metabolizable energy content of poultry feeds: 7. The Effects of Grinding, Pelleting

- and Grit Feeding on the Availability of the Energy of Wheat, Corn, Oats and Barley; 8. A Study on the Effects of Dietary Balance. *Poultry Science* 41(2): 445-456.
- McNaughton, J.L., J.D. May and A.C. Strickland. 1976. Compositions of poultry offal meals from various processing plants. *Poultry Science* 56(5): 1659-1661.
- McNaughton, J.L., H.A. Pasha, E.J. Day and B.C. Dilworth. 1977. Effect of pressure and temperature on poultry offal meal quality. *Poultry Science* 56(4): 1161-1167.
- Miller, W.S. 1974. The determination of metabolizable energy. pp. 91-112. *In*: T.R Morris and B.M. Freeman (eds.). *Energy Requirements of Poultry*. British Poultry Science Ltd., Edinburgh.
- NRC. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9<sup>th</sup> ed. National Academy Press, Washington, D.C. 176 p.
- Nunes, R.V., H.S. Rostagno, P.C. Gomes, C.G.V. Nunes, L.F.T. Albino, P.C. Pozza, M. A. Dionizio and M.S. de Araújo. 2006. Energetic values of different feedstuffs of animal origin for poultry. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35(Suppl.4): 1752-1757. (in Portuguese)
- Oyewole, S.O.O. and R.I. Salami. 1997. Replacement value of poultry visceral offal meal in the diet of broiler chickens. *Nigerian Journal of Animal Production* 24(2): 116-123.
- Park, J.G., B.S. Song, J.H. Kim, J.N. Park, I.J. Han, H.J. Hwang, M.W. Byun, H.Y. Cho, Y.W. Kim, J.H. Mah and J.W. Lee. 2010. Effect of autoclaving and irradiation on microbiological safety and quality of ready-to-eat *bulgogi*. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 30(5): 780-786.
- Rocker, M.M., M.J. Lewis, T.S. Mock, D.S. Francis, F. Bellagamba, V.M. Moretti, G.P. Quinn, R.P. Smullen and G.M. Turchini. 2021. Poultry offal meal production conditions impact meal quality and digestibility in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 542: 736909, doi: 10.1016/j.aquaculture. 2021.736909.
- Romoser, G.L. 1955. Studies on feather meal, poultry by-product meal and methionine in broiler rations. *Feedstuffs* 27(18): 48-50.
- Sahraei, M., H. Lootfollahian and A. Ghanbari. 2012. Effect of poultry by product meal on performance parameters, serum uric acid concentration and carcass characteristics. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 2(1): 73-77.
- Salami, R.I. and S.O.O. Oyewole. 1997. Evaluation of poultry visceral offal meal as a substitute for fish meal in grower pullets' diets. *Nigerian Journal of Animal Production* 24(1): 20-25.
- Senkoylu, N., H.E. Samli, H. Akyurek, A. Agma and S. Yasar. 2005. Performance and egg characteristics of laying hens fed diets incorporated with poultry by-product and feather meals. *Journal of Applied Poultry Research* 14(3): 542-547.
- Sibbald, I.R. 1976. A bioassay for true metabolizable energy in feedingstuffs. *Poultry Science* 55(1): 303-308.
- Sibbald, I.R. 1979. Metabolizable energy evaluation of poultry diets. pp. 35-50. *In*: W. Haresign and D. Lewis (eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition-1979: Studies in*

- Agricultural and Food Sciences. Butterworths, London.
- Sibbald, I.R., J.D. Summers and S.J. Slinger. 1960. Factors affecting the metabolizable energy content of poultry feeds. *Poultry Science* 39(3): 544-556.
- Steel, R.G.D., J.H. Torrie and D.A. Dickey. 1997. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. 3<sup>rd</sup> ed. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York. 666 p.
- Tangtaweewipat, S. and R. Elliott. 1989. Nutritional value of pigeon pea (*Cajanus cajan*) meal in poultry diets. *Animal Feed Science and Technology* 25(1-2): 123-135. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(89\)90113-2](https://doi.org/10.1016/0377-8401(89)90113-2).
- Tangtaweewipat, S., T. Veerasilp and B. Chevassarakul. 1988. Metabolizable energy value of ground paddy and ground pigeon pea determined by regression and single feeding methods in poultry diets. *Journal of Agriculture* 4(2): 108-121. (in Thai)
- Udedibie, A.B.I., G. Anyanwu, U.I. Ukpai and A.J. Oyet. 1988. Poultry offal meal as a protein supplement for laying hens and finisher broilers. *Nigerian Journal of Animal Production* 15(1): 103-109.
- USDA. 2023. *Livestock and poultry world markets and trade* (Online). Available: [https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock\\_poultry.pdf](https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf) (July 15, 2023).
- Wisman, E.L., C.E. Holmes and R. W. Engel. 1958. Utilization of poultry by-products in poultry rations. *Poultry Science* 37(4): 834-838.
-



# ผลของการเสริมกรดแกมมาเอมิโนบิวทีริกในอาหารต่อความเครียดจากการขนส่งและการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

## Effects of Gamma-Aminobutyric Acid Supplementation in Diet on Transportation Stress and Growth Performance of Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

ยุพรัตน์ อินบำรุง<sup>1</sup> อรพินท์ จินตสถาพร<sup>1\*</sup> ศรีน้อย ชุ่มคำ<sup>2</sup> และ ศุภวิทย์ ไตรวุฒานนท์<sup>3</sup>  
Yuparat Inbumrung<sup>1</sup>, Orapint Jintasataporn<sup>1\*</sup>, Srinoy Chumkam<sup>2</sup> and Supawit Triwutanon<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

<sup>1</sup>Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>2</sup>คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จ. ปทุมธานี 13180

<sup>2</sup>Faculty of Agricultural Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University, Pathum Thani 13180, Thailand

<sup>3</sup>คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

<sup>3</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

\*Corresponding author: E-mail: ffsora@ku.ac.th

(Received: 12 May 2023; Accepted: 21 September 2023)

**Abstract:** The effect of 0%, 0.2%, and 0.4% gamma-aminobutyric acid (GABA) supplementation in diet on transportation stress of PL25 and growth performance of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during PL27-PL87 were investigated. The first experiment was assigned a factorial of 2x3 in complete randomized design (CRD). PL12 Shrimps were fed 3 dosages of GABA supplemented with a commercial diet of 39%CP and 7%CF and coated with pullulan at concentrations of 20 ml/kg of feed then applied to shrimp for 14 days. After that, PL25 shrimp contained in plastic bags (45x75 centimeters) were transported at 100 and 500 individuals/liter for 3 hours, and the postlarval quality was investigated. The second experiment was assigned in CRD. Shrimps transported at 100 individuals/liter were fed continuously and acclimated for 2 days then distributed in a glass aquarium and fed certainly GABA treatment diets for the other 60 days to study growth performance, while shrimp fed GABA diets during PL39 were applied stress at the end of feeding experiment by disease challenge against *Vibrio parahaemolyticus* AHPND for 12 days. The results found that shrimp quality and survival rate after transportation was higher in group of shrimp transported at density of 100 individuals/liter than 500 individuals/liter and certainly related to levels of GABA in the diets ( $P<0.05$ ). Shrimp at PL27 - PL87 fed diet of 0.4% GABA had the highest average weights of  $2.367 \pm 0.110$  g ( $P<0.05$ ). Under stressful conditions of Vibriosis immersion test, the bacteria count from the hepatopancreas of shrimp fed a diet of 0.4% GABA was the lowest, and shrimp had the highest survival rate ( $P<0.05$ ). In conclusion, GABA 0.4% supplementation in shrimp diet could promote larvae shrimp quality after transportation stress and enhance shrimp survival rates during disease challenge stress conditions, including improved growth performance during high EHP infection.

**Keywords:** Gamma-aminobutyric acid, Whiteleg shrimp, *Vibrio parahaemolyticus*, transport, stress

**บทคัดย่อ:** งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก (GABA) 0%, 0.2% และ 0.4% ในอาหารต่อคุณภาพกุ้งขาวแวนนาไม PL25 ที่ได้รับความเครียดจากการขนส่ง และการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม ในช่วงระยะ PL27-PL87 การทดลองที่ 1 การจัดชุดการทดลองแบบ 2x3 แฟกทอเรียล ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการเสริม GABA 3 ระดับในอาหารสำเร็จรูปที่มีโปรตีน 39% และไขมัน 7% เคลือบด้วยสารละลายพอลิกลูแลน อัตราส่วน 20 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นำมาเลี้ยงกุ้งระยะ PL12 นาน 14 วัน จากนั้นบรรจุกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 ลงในถุงพลาสติกขนาด 45x75 เซนติเมตร ความหนาแน่น 100 และ 500 ตัวต่อลิตร ระยะเวลาที่ใช้การขนส่ง 3 ชั่วโมง ประเมินคุณภาพกุ้งภายหลังการขนส่งทันที การทดลองที่ 2 วางแผนแบบ CRD นำกุ้งหลังขนส่งชุด 500 ตัวต่อลิตร มาปรับสภาพ 2 วัน สุ่มลงในตู้กระจกขนาด 100 ลิตร และเลี้ยงด้วยอาหารเสริม GABA ต่อเนื่องเป็นเวลา 60 วัน เพื่อศึกษาการเติบโต และการต้านทานเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* AHPND นาน 12 วัน ผลการวิจัย พบว่า ระดับ GABA ในอาหารสัมพันธ์กับคุณภาพกุ้งและอัตราการรอดตายหลังขนส่งที่ความหนาแน่น 100 ตัวต่อลิตร สูงกว่า 500 ตัวต่อลิตร ( $P < 0.05$ ) การเติบโตของกุ้งระยะ PL27-PL87 ที่เสริม GABA 0.4% มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด  $2.367 \pm 0.110$  กรัม ( $P < 0.05$ ) และภายใต้สภาวะเครียดจากเชื้อก่อโรคในน้ำ กุ้งที่เสริมด้วย GABA 0.4% มีปริมาณเชื้อไวรัสในตับ และตับอ่อนของกุ้งต่ำสุด และมีอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มอื่น ( $P < 0.05$ ) ดังนั้น การเสริม GABA 0.4% ในอาหาร ช่วยส่งเสริมคุณภาพกุ้งภายใต้ความเครียดในการขนส่ง และเพิ่มอัตราการรอดตายในสภาวะความเครียดจากเชื้อก่อโรค รวมถึงเติบโตดีขึ้นภายใต้สภาวะติดเชื้อ EHP

**คำสำคัญ:** กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก กุ้งขาวแวนนาไม *Vibrio parahaemolyticus* การขนส่ง ความเครียด

## คำนำ

การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยมีการพัฒนาสายพันธุ์มาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย เจริญเติบโตได้ดีทั้งในน้ำเค็มสูงและน้ำที่มีความเค็มต่ำ สามารถเพาะเลี้ยงได้ในระบบอัตราความหนาแน่นสูง และยังให้ผลตอบแทนมูลค่าสูงแก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงอีกด้วย จึงนับได้ว่าเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจหลักที่สามารถสร้างรายได้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงได้เป็นอย่างดี เมื่อวิเคราะห์จากสถานการณ์ในปี พ.ศ. 2554 เป็นต้นมา การเลี้ยงกุ้งประสบกับปัญหาภาวะการเกิดโรคระบาด ในช่วง 10 - 14 วันแรก ที่เกษตรกรมีการลงเลี้ยงกุ้งนั้น จะพบลูกกุ้งตายอย่างรวดเร็ว และอาจมีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาพบว่าสาเหตุหลักเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคตายด่วน (early mortality syndrome: EMS) หรือ โรคตับอักเสบเฉียบพลัน (acute

hepatopancreatic necrosis disease: AHPND) ส่งผลให้บริเวณตับและตับอ่อนของลูกกุ้งลีบฝ่อ สีขาวซีด เนื่องจากสูญเสียเม็ดสีในตับ ปริมาณเม็ดไขมันภายในตับและตับอ่อนน้อยผิดปกติ กุ้งมีอาการว่ายน้ำเชื่องช้า กินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหาร และตายอย่างรวดเร็วในเวลาต่อมา (Nuangsaeng *et al.*, 2016) แบคทีเรียชนิดนี้ เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 9.5 - 45 องศาเซลเซียส มักกินอาหารจำพวกสารอินทรีย์ที่เกิดจากการขับถ่ายของเสียของกุ้งที่มีการสะสมอยู่ในบ่อเพาะเลี้ยง หากมีการจัดการในการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ไม่เหมาะสมมักเกิดการสะสมของสารอินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก (Sonthi, 2015) ซึ่งเป็นแหล่งอาหารของเชื้อก่อโรค แบคทีเรีย ไวรัส และโปรโตซัว เช่น แบคทีเรียพวก *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *Aeromonas hydrophila* เป็นต้น ส่งผลให้เชื้อเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว และอาจมีปัจจัยสำคัญที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค เช่น การจัดการด้านคุณภาพของลูกพันธุ์ ด้านอาหาร สภาพแวดล้อมและ

สุขภาพของโรงเพาะฟักที่ยังไม่ได้มาตรฐาน อันก่อให้เกิดเชื้ออหิวาต์โรคได้ การตายของลูกกุ้งนี้ถือเป็นต้นทุนแฝงอันก่อให้เกิดความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงเป็นอย่างมาก และยังส่งผลกระทบต่อภาพรวมของประเทศด้านโอกาสทางการแข่งขันในตลาดโลกด้วย ซึ่งในปัจจุบันถึงแม้จะมีการศึกษาเกี่ยวกับโรคตายด่วนนี้อย่างแพร่หลาย ยังไม่พบวิธีที่สามารถกำจัดหรือป้องกันโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีเพียงแนวทางปฏิบัติเบื้องต้น เช่น การจัดการฟาร์มอย่างมีมาตรฐานถูกสุขลักษณะ การควบคุมคุณภาพน้ำรวมถึงการลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในน้ำ การเลือกใช้อุณหภูมิที่มีคุณภาพและปลอดภัย ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคได้อีกทาง โดยต้องมีการจัดการป้องกันโรคระหว่างการเลี้ยงควบคู่ไปด้วย (Limsuwan *et al.*, 2006) การปรับขนาดและอายุลูกกุ้งให้มากกว่าระยะ โพลลาร์วา 12 ก่อนลงเลี้ยงในบ่อเพื่อให้มีอัตราการรอดและการเจริญเติบโตที่ดี เนื่องจากกุ้งมีพัฒนาการของระบบเหงือกและตับสมบูรณ์ สามารถปรับสมดุลของแร่ธาตุและน้ำในร่างกายจากการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ (Department of Fisheries, 2018) การปรับลดความเสี่ยงการเกิดโรคของลูกกุ้งที่เพาะเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูง โดยทำการเติมหรือเคลือบสารบางชนิดลงในอาหารกุ้ง เช่น วิตามินซี แอสต้าแซนทีน กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก และสมุนไพรรักษา เป็นต้น สารที่นำมาเติมหรือเคลือบนี้จะพบสารประกอบที่สำคัญ จำพวกสารประกอบฟีนอลิก เช่น กลุ่ม ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannin) ซาโปนิน (saponin) และ กรดฟีนอลิก (phenolic acid) เป็นต้น สามารถต้านอนุมูลอิสระที่เกิดภายในตัวกุ้งได้เป็นอย่างดี (Bahorun *et al.*, 1996; Froehlicher *et al.*, 2009) ช่วยลดการทำลายเซลล์ ลดสภาวะความเครียดที่ทำให้กุ้งอ่อนแอ กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น และยังสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ได้ มีผลเช่นเดียวกับการใช้สารสกัดจากพืช เช่น พื้ทะเลลายใจ กระเทียม กระเจี๊ยบ ขาเขียว เป็นต้น ที่สามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสได้ และให้การเจริญเติบโตของกุ้งดีขึ้น (Chirawithayaboon *et al.*, 2020; Tummarongkongsatit,

2007) นอกจากนี้ มีการเสริมด้วยกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรค และสามารถทดแทนยาปฏิชีวนะได้

กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกมีคุณสมบัติเป็นสารธรรมชาติ ส่วนใหญ่พบได้ในพืช และสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาจากจุลินทรีย์ได้ (Janney *et al.*, 2010; Jorgensen, 2005) มีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อตัวกุ้ง ทั้งระยะโพลลาร์วาจนถึงตัวเต็มวัย อีกทั้งมีความปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม และผู้บริโภค ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท และมีคุณสมบัติของสารสำคัญจำพวกฟลาโวนอยด์ ในการช่วยลดสารอนุมูลอิสระที่เป็นพิษ โดยยับยั้งความผิดปกติของสารสื่อประสาทอันเกิดจากความเครียด ช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อให้ผลิตฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ช่วยในการเจริญเติบโตมากขึ้น กระตุ้นความอยากอาหาร และส่งเสริมการกินอาหาร (Wu *et al.*, 2016) การนำสารอาหารไปใช้สะสมในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ต่าง ๆ ของสัตว์น้ำ การปรับ microbiome ในลำไส้ ควบคุมสภาวะต่าง ๆ ภายในร่างกายให้ปกติคงที่ ส่งผลให้เกิดการสร้างและซ่อมแซมส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ทั้งยังช่วยให้ตับมีสุขภาพที่ดีขึ้น ป้องกันการสะสมไขมัน สามารถป้องกันการเพิ่มระดับแอมโมเนียในกระแสเลือดอย่างเฉียบพลัน (Liang *et al.*, 2022; Xie *et al.*, 2017) ควบคุมพลังงานให้สมดุลอยู่เสมอ (van den Pol, 2003) ส่งผลให้ลูกกุ้งสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มและความทนทานต่อฟอร์มาลินอย่างฉับพลันได้ (Xie *et al.*, 2017) เมื่อนำมาเคลือบอาหารกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพลลาร์วา จนถึงอาหารระยะกุ้งวัยรุ่น สามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต บำรุงหรือลดการทำลายตับและตับอ่อนเมื่อเกิดความเครียด ส่งผลให้ตับและตับอ่อนมีคุณภาพที่ดีขึ้น ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ลดสารอนุมูลอิสระ กระตุ้นให้กุ้งเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เป็นการเตรียมความพร้อมในการรับมือกับเชื้อก่อโรคที่จะบุกรุกเข้ามาในระหว่างการเลี้ยง (Ngo *et al.*, 2019) และสามารถทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้ (Bae *et al.*, 2022) โดยพบว่าสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (triterpene glycosides) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรม

ลบและยีสต์ได้ (Abdel-Naime *et al.*, 2019)

การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก ในระดับที่แตกต่างกันในอาหาร ต่อความสมบูรณ์ของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 ที่ได้รับความเครียดจากการขนส่งที่อัตราความหนาแน่นแตกต่างกัน และศึกษาผลการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ในระหว่างการเลี้ยงกุ้งระยะ PL27 - PL87 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับแตกต่างกันในอาหาร เพื่อเป็นแนวทางในการใช้กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกปรับปรุงคุณภาพกุ้งขาวแวนนาไมในการเลี้ยงของเกษตรกรต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### สัตว์ทดลอง

ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาาร์วา (PL12) ฟาร์มเอกชน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์คุณภาพตามวิธีซีริมพีไบโอเทคทดสอบด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา เพื่อยืนยันการปลอดโรคที่สำคัญในกุ้งขาวแวนนาไม ได้แก่ โรคตายด่วน (acute hepatopancreatic necrosis syndrome: AHPNS), โรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus: WSSV) และทดสอบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียม (*Enterocytozoon hepatopenaei*: EHP) ทำการสุ่มลูกกุ้งขาวแวนนาไม จำนวน 20,000 ตัวต่อบ่อ จำนวน 9 บ่อ ขนาดบ่อ 2x2x1 เมตร ปริมาตร 2,000 ลูกบาศก์เมตร ให้อาหารเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับ 0, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสำเร็จรูป วันละ 6 ครั้ง ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนของเสียทุกวัน ก่อนการขนส่ง 14 วัน (PL12-PL25)

### อาหารทดลอง

อาหารกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาาร์วา เป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดเกล็ดจมน้ำ สำหรับลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่ 1 ขนาด 1.2-2.5 เซนติเมตร เริงการค้ำ ที่มีความเข้มข้นโภชนาระดับโปรตีนไม่น้อยกว่า 39% และไขมันไม่น้อยกว่า 7%

กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก เป็นสมุนไพรผสมของพืชจำพวก hawthorn, กลุ่ม valerian และพืชชนิดอื่น ๆ เช่น hops, พืชในวงศ์กัญชา และสะระแหน่ (lemon balm)

ทำการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับ 0, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม แล้วเคลือบด้วยสารละลายพุลลูแลนในอัตราส่วน 20 มิลลิลิตรต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ผึ่งลมให้แห้ง

**การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบผลของการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับแตกต่างกันในอาหาร ต่อความสมบูรณ์ของลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาาร์วา 25 ที่ได้รับความเครียดจากการขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่นที่แตกต่างกัน**

การจัดชุดการทดลองแบบ 2x3 แฟกทอเรียล ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยทำการศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ อัตราความหนาแน่นในการขนส่งต่างกัน 2 ระดับ คือ 100 และ 500 ตัวต่อบ่อ 1 ลิตร และ ระดับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสำเร็จรูป 3 ระดับ คือ 0, 0.2 และ 0.4 %

ทำการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับ 0, 0.2 และ 0.4 % ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม แล้วเคลือบด้วยสารละลายพุลลูแลน (pullulan®) ในอัตราส่วน 20 มิลลิลิตรต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ผึ่งลมให้แห้ง นำไปเลี้ยงลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะ PL12 เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำลูกกุ้ง ระยะ PL25 บรรจุลงในถุงพลาสติก ขนาด 45 x 75 เซนติเมตร ที่มีน้ำความเค็ม 2-3 ส่วนในพันส่วน ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนแล้ว ในอัตราความหนาแน่น 100 และ 500 ตัวต่อบ่อ 1 ลิตรต่อถุง ตามชุดการทดลอง ทำการเติมอากาศและใช้ยางรัดปากถุงให้สนิทก่อนการขนส่งระยะเวลาขนส่ง 2-3 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บข้อมูลคุณภาพลูกกุ้งขาวแวนนาไมตามวิธีซีริมพีไบโอเทค ภายหลังการขนส่งแล้วเสร็จทันที

ทดสอบคุณภาพลูกกุ้งขาวแวนนาไมตามวิธีซีริมพีไบโอเทค (Ruchirawat and Vaikrudha, 2003) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างลูกกุ้ง PL25 จำนวน 20 ตัว ทำการ

ตรวจให้คะแนนความสมบูรณ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (10x) แบ่งออกเป็น จำนวนกริ ความยาวตัว ความสมบูรณ์ของรยางค์ ประสิทธิภาพนอก อัตรากล้ามเนื้อต่อลำไส้ (M:G ratio) ปริมาณเม็ดไขมัน ในตับและความสมบูรณ์ของตับลูกกุ้ง สรุปผลการให้ คะแนนเป็นเปอร์เซ็นต์มาตรฐานการยอมรับ โดยขั้นตอน การตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งคะแนนการตรวจ ตั้งแต่ 85% ขึ้นไปจึงจะถือว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (Department of Fisheries, 2018)

เก็บข้อมูลสุขภาพเพื่อวิเคราะห์คุณภาพ ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ทำการทดสอบความทนทานต่อ ความเครียด โดยการแช่น้ำจืด สุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 100 ตัว มาแช่น้ำจืด ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วทำการตรวจ นับการรอดตายของลูกกุ้ง ต้องไม่น้อยกว่า 90% และ ทดสอบการแช่ฟอร์มาลิน สุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 100 ตัว มาแช่น้ำฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 100 ส่วนในพัน ส่วน ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วตรวจนับการรอดตายของลูกกุ้ง ต้องไม่น้อยกว่า 95% (Department of Fisheries, 2018)

ทดสอบคุณภาพลูกกุ้งขาวแวนนาไมด้วย วิธีทางอณูชีววิทยา โรคที่ตรวจวินิจฉัย ได้แก่ โรคตาย ด่วน (acute hepatopancreatic necrosis syndrome: AHPND), โรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus: WSSV) (Department of Fisheries, 2018) โดย นำตัวอย่างลูกกุ้ง ไม่น้อยกว่า 150 ตัว มาตัดส่วนหัวออก เพื่อแยกส่วนตากุ้งซึ่งมีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ทำ การอบให้ละเอียด ซึ่งตัวอย่าง 1 กรัม นำไปสกัดสาร- พันธุกรรม โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป DNAzol® Reagent แล้วจึงนำมาตรวจด้วยเทคนิค nested PCR โดยใช้ primer 2 คู่ (Songkhla Aquatic Animal Health Research Center, 2018)

ทำการตรวจสอบการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (*Enterocytozoon hepatopenaei*: EHP) นำเฉพาะส่วน ตับ/ตับอ่อน โดยเฉพาะในตำแหน่งที่อยู่ติดกับกระเพาะ อาหาร วางบนแผ่นสไลด์ หยดน้ำกลั่น 1 หยด ปิดทับ ด้วย cover glass นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยลักษณะสปอร์ของ EHP จะมีรูปร่างกลม และรูปร่าง คล้ายรักบี้ มีขนาด 1 - 2 ไมครอน ซึ่งต้องใช้กำลังขยาย 1000 เท่า (100x) (Department of Fisheries, 2018)

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติโดย analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความ- แตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความ- เชื่อมัน 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

**การทดลองที่ 2 การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทริกที่ระดับแตกต่างกันในอาหาร ต่อการเติบโต ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์วา (PL27 - PL87) และความทนทานต่อความเครียดในสภาวะการแช่ ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ สร้างสารพิษ ก่อให้เกิดโรคตายด่วน (AHPND)**

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง (treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ เลี้ยงเป็น ระยะเวลา 60 วัน ซึ่งแบ่งชุดการทดลอง ที่ระดับความ- เข้มข้นของกรดแกมมาอะมิโนบิวทริก 0, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เสริมในอาหารสำเร็จรูป แล้วเคลือบด้วย สารละลายพุลูลแลน (pullulan®) ในอัตราส่วน 20 มิลลิลิตรต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม นำไปเลี้ยง กุ้งขาวแวนนาไมระยะ PL25 ที่ได้รับการเสริมกรด แกมมาอะมิโนบิวทริก 0 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการขนส่ง ด้วยอัตราความหนาแน่น 500 ตัวต่อลิตร ในการทดลอง ที่ 1 ทำการสุ่มคัดเลือกกุ้ง จำนวน 120 ตัวต่อตู้ ตู้ทดลอง มีปริมาตรน้ำ 100 ลิตร ความเค็มของน้ำ 3 ส่วนใน พันส่วน ให้อาหารวันละ 3 ครั้ง โดยให้กินอาหารวันละ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำและ ดูดตะกอนของเสียทุกวัน เก็บข้อมูลการเติบโตและอัตราการรอดตาย โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างลูกกุ้งขาว แวนนาไม ระยะ PL27, PL39, PL51, PL63, PL75 และ PL87 จำนวน 30 ตัว มาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ย ต่อตัว และหาอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (average daily growth: ADG) และหาอัตราการรอด ตาย (survival rate) ภายหลังการชั่งน้ำหนักและนับ จำนวน นำตัวอย่างกุ้งลงเลี้ยงในตู้ทดลองเช่นเดิม

การทดสอบความทนทานต่อความเครียด ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของเชื้อก่อโรคสูง อันเกิด จากเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus* โดยนำกุ้งขาว

แวนนาไม ระยะ PL39 (ช่วงเดือนแรกหลังลงเลี้ยงที่ประสบปัญหาการเกิดโรคตายด่วน) มาทดสอบคุณภาพเมื่ออยู่ในสภาวะความเครียดจากเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus* AHPND ความเข้มข้นสูง ( $1.0 \times 10^6$  CFU/ml) โดยวิธีการแช่ (immersion method) ดัดแปลงจากวิธีการของ Balcázar *et al.* (2007) เป็นระยะเวลา 12 วัน

วิธีการเตรียมเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ดำเนินการโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในจานอาหารแข็ง tryptic soy agar (TSA) ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำ single colony จำนวน 3-5 โคโลนี มาใส่ลงในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอน ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ  $5 \pm 1$  องศาเซลเซียส เสร็จแล้วทำการล้างตะกอนด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง แล้วทำการเจือจางตะกอนของแบคทีเรียด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เพื่อวัดความเข้มข้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับปริมาณเชื้อเทียบกับ 0.5 McFarland (ปริมาณเชื้อมีค่าประมาณ  $10^6$  CFU/ml)

ทำการสุ่มกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL39 น้ำหนักรวมเฉลี่ย  $1.31 \pm 0.00$  กรัม จากชุดควบคุมจำนวน 30 ตัว เลี้ยงในตู้กระจก ขนาด 18 ลิตร จำนวน 9 ตู้ ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เตรียมไว้ ให้มีปริมาณเชื้อภายในตู้  $10^6$  CFU/ml ทำการให้อาหารแต่ละชุดการทดลอง วันละ 6 มื้อ ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ และดูดตะกอนจนสิ้นสุดการทดลอง เมื่อทดลองครบ 12 วัน นับจำนวนกุ้งที่คงเหลือ เพื่อหาอัตราการรอดตาย และศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตับและตับอ่อน ลำไส้ และน้ำเลี้ยงภายในตู้ โดยสุ่มกุ้งขาวแวนนาไมแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 5 ตัว เก็บตัวอย่างตับและตับอ่อนพร้อมลำไส้ ใส่ในหลอดปั่นกันแหลม (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการเติมน้ำเกลือความ-

เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียดแล้ว เติมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มลงไปอีก 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทำการเจือจางตัวอย่างดับและดับอ่อน พร้อมลำไส้ และน้ำเลี้ยงภายในตู้ ที่ระดับ  $10^0$ ,  $10^{-1}$ , และ  $10^{-2}$  ดูดตัวอย่างด้วยปิเปต ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย ด้วยวิธี spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) ) ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีสีเขียวของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เกิดขึ้น นำไปคำนวณหาปริมาณเชื้อในหน่วย colony forming unit (CFU) ต่อตับและลำไส้ กุ้ง 1 กรัม หรือ น้ำเลี้ยง 1 มิลลิลิตร

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติโดย Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน ระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

## ผลการทดลองและวิจารณ์

**การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบผลของการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก ที่ระดับแตกต่างกันในอาหาร ต่อคุณภาพของลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 ที่ได้รับความเครียดจากการขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่นที่แตกต่างกัน**

เมื่อทดสอบคุณภาพลูกกุ้งตามวิธีชิมพีไปโอเทค พบว่า ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกระดับ 0, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสำเร็จรูป ภายหลังจากขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่น 100 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตร มีค่าเฉลี่ยคะแนนเท่ากับ  $85.00 \pm 2.00$ ,  $91.33 \pm 1.15$  และ  $96.33 \pm 1.15$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และภายหลังจากขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่น 500 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตร ค่าเฉลี่ยคะแนนคุณภาพเท่ากับ  $77.00 \pm 2.65$ ,  $88.67 \pm 0.58$  และ  $94.00 \pm 2.65$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเฉลี่ย

คะแนนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แสดงว่า การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับต่าง ๆ และอัตราความหนาแน่นในการขนส่ง มีผลทำให้คุณภาพของลูกกุ้งขาวแวนนาไมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ขนส่งด้วยความหนาแน่น 100 ตัวต่อลิตร และ 500 ตัวต่อลิตร แปรผันตามกับอัตราส่วนการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับต่าง ๆ ในอาหาร โดยมีอัตราการรอดตายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) (Table 1) โดยกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในระดับสูงขึ้นไป มีอัตราการรอดสูงขึ้นไป เนื่องจากเมื่อใช้ความหนาแน่นในการขนส่งที่มากเกินไป กุ้งจะสะสมความเครียด อันเนื่องมาจากกุ้งอยู่ในสภาวะที่ถูกจำกัดในถุงบรรจุ จำกัดปริมาณน้ำ อีกทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ มีการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนียและไนไตรท์ ปริมาณออกซิเจนลดลง ส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางสรีรเคมีอย่างรุนแรง ทำให้กุ้งเกิดการกินกันเอง เห็นได้จากที่รังยาค์กุ้งกุดกร่อน (Pratoomchat, 2018; Wangsoontorn *et al.*, 2013) จะเห็นได้ว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ไม่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหาร มีรังยาค์กุดกร่อน แม้ขนส่งด้วยอัตรา 100 ตัวต่อลิตร หรือ 500 ตัวต่อลิตร โดยยิ่งความหนาแน่นมากขึ้น คุณภาพรยางค์กุ้งยิ่งลดลง ความเครียดสะสมภายในตัวกุ้ง ส่งผลต่อความสมบูรณ์ทางกายภาพของตัวและตัวอ่อน โดยตัวและตัวอ่อนเกิดการคอดตัวของท่อตัว หากเกิดมากขึ้น กุ้งจะมีความสามารถในการควบคุมระบบการเผาผลาญอาหารภายในร่างกายต่ำลง ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์และหลั่งเอนไซม์ในการย่อยและดูดซึมลดลง การสะสมไขมันก็ลดลง (Hiransuchalert *et al.*, 2013) ดังนั้น กุ้งขาวแวนนาไม ระยะเวลา PL25 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสำเร็จรูประดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ช่วยลดความเครียดในการขนส่ง ลดความก้าวร้าวของกุ้งเมื่ออยู่ในพื้นที่จำกัด โดยพิจารณาจากผลการตรวจสอบระยะยาค์ การควบคุมสมดุลของแร่ธาตุภายในร่างกาย พิจารณาจากการทดสอบความเครียดโดยการแช่น้ำจืดและแช่ฟอร์มาลิน ทำให้สามารถขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่น 500 ตัวต่อลิตรได้

โดยที่คุณภาพของกุ้งขาวแวนนาไมยังอยู่ในระดับดีและเหมาะสม (คะแนนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป) (Department of Fisheries, 2018) ซึ่งแนวโน้มสอดคล้องกับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสัตว์ อาทิเช่น การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกอัตรา 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไมสูตรปลาปนต่ำ จะช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ช่วยในการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี และทนทานต่อแอมโมเนีย ได้อย่างเหมาะสม ลดความเครียดที่เกิดขึ้นเมื่อสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลง (Xie *et al.*, 2017) การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารกุ้งขาวแวนนาไมอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตมากขึ้น เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเชื้อก่อโรค การเสริมด้วยกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกอัตราส่วน 175.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารส่งผลให้อัตราการรอดตายสูงขึ้น แสดงว่า สามารถทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้อีกทางหนึ่ง (Bae *et al.*, 2022) และการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารปลา จะช่วยป้องกันความเครียด กระตุ้นการกินอาหารระดับโปรตีนในร่างกายเพิ่มขึ้น กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลา Jian carp (Chen *et al.*, 2021) กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกช่วยควบคุมการกระตุ้นประสาทในสัตว์ลดความเครียดที่เกิดขึ้น (Nakamura *et al.*, 2022; Turenus *et al.*, 2009) เพิ่มอัตราการเจริญเติบโต อัตราการกินอาหาร และเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของตัว (Jeong *et al.*, 2020) และไก้ (Wang *et al.*, 2013) ดังนั้น ระดับการเสริมด้วยกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารของสัตว์น้ำนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ ช่วงวัย และจุดประสงค์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เมื่อทดสอบคุณภาพลูกกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา พบว่า ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะเวลา PL25 ภายหลังจากการขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่น 100 และ 500 ตัวต่อลิตร 1 ลิตร ไม่พบการติดเชื้อก่อโรคตายด่วน (AHPND) และ เชื้อตัวแดงดวงขาว (WSSV) (Table 1) กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกเป็นสารสกัดจากพืช hawthorn (*Crataegus monogyna*) ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจำพวกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) วิตามินซี (vitamin C) ไกลโคไซด์ (glycoside) แทนนิน (tannin)

Table 1. Quality after transportation at a density rate of 100 and 500 individuals/liter of PL25-whiteleg shrimp fed with 0, 0.2 and 0.4% gamma-aminobutyric acid supplementation in commercial diets

Parameters	100 individuals/liter			500 individuals/liter			P-value		
	0% GABA	0.2% GABA	0.4% GABA	0% GABA	0.2% GABA	0.4% GABA	Density	GABA	Inter- action
Number of spines <sup>1</sup> (score)	10.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	10.00 ±0.00 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	<0.001	<0.001	0.038
Completion of appendix <sup>1</sup> (score)	14.67 ± 0.58 <sup>a</sup>	15.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	15.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	14.00 ± 1.00 <sup>a</sup>	14.67 ± 0.58 <sup>a</sup>	15.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.000	1.000	1.000
Completion of the hepatopancreas <sup>1</sup> (score)	11.00 ± 1.73 <sup>a</sup>	11.00 ± 1.73 <sup>a</sup>	13.00 ± 1.73 <sup>a</sup>	6.00 ± 3.00 <sup>b</sup>	10.00 ± 1.73 <sup>a</sup>	12.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.204	0.115	0.565
Lipid in the hepatopancreas <sup>1</sup> (score)	16.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	18.67 ± 2.31 <sup>ab</sup>	20.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	12.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	17.33 ± 2.31 <sup>ab</sup>	18.67 ± 2.31 <sup>ab</sup>	0.021	<0.001	0.144
Muscle to gut ratio <sup>1</sup> (score)	10.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.014	<0.001	0.300
Salinity shock <sup>1</sup> (score)	8.33 ± 2.89 <sup>a</sup>	11.66 ± 2.89 <sup>a</sup>	13.33 ± 2.89 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	11.67 ± 2.89 <sup>a</sup>	13.33 ± 2.89 <sup>a</sup>	1.000	1.000	1.000
Formalin stress tests <sup>1</sup> (score)	15.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	15.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	15.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	15.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	15.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	15.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.663	0.053	0.821
Total Score <sup>1</sup> (%)	85.00 ± 2.00 <sup>e</sup>	91.33 ± 1.15 <sup>bc</sup>	96.33 ± 1.15 <sup>a</sup>	77.00 ± 2.65 <sup>f</sup>	88.67 ± 0.58 <sup>d</sup>	94.00 ± 2.65 <sup>ab</sup>	1.000	1.000	1.000
Survival rate (%)	91.50 ± 2.00 <sup>cd</sup>	93.33 ± 1.76 <sup>bc</sup>	97.67 ± 1.26 <sup>a</sup>	79.73 ± 1.62 <sup>e</sup>	90.60 ± 0.79 <sup>d</sup>	95.03 ± 0.47 <sup>b</sup>	<0.001	<0.001	<0.001
AHPND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
WSSV	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
EHP	++++	++++	++++	++++	++++	++++			

Means values in the same row with different superscripts are significantly different ( $P \leq 0.05$ )

<sup>1</sup> Evaluate the results according to the shrimp biotech method

ND = non-detect pathogenically, tested by molecular biological methods

++++ = More than 10 EHP spores were found

ซาโปนิน (saponin) แอนโทไซยานิน (anthocyanin) และ protoanthocyanidins ซึ่งจำแนกได้ว่าเป็น cyanidin-3-O-galactoside ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้อย่างชัดเจนกว่าฟีนอลิกกลุ่มอื่น ๆ (Bahorun *et al.*, 1996; Froehlicher *et al.*, 2009) จากคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกจากพืชกลุ่มดังกล่าวนี้ ให้ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคคล้ายคลึงกับงานวิจัยจากพืชหลายชนิด เช่น น้ำมันหอมระเหย *Melissa officinalis* ที่ความเข้มข้น 1 µl/ml สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ได้ (Yu *et al.*, 2022) และมีรายงานการศึกษาของ Wu *et al.* (2016) ได้เสริมสารสกัดจากใบพืช *Gynura bicolor* ในอาหารกุ้ง พบว่า สามารถต้านเชื้อ *V. alginolyticus* และเชื้อไวรัส WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไมได้ และการเสริมสาหร่ายสไปรูลินาสดในอาหาร เพิ่มความต้านทานต่อโรค EMS จากการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไมได้

เมื่อทดสอบการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (EHP) ของลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะ PL25 ด้วยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 ภายหลังการขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่น 100 และ 500 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตร มีการติดเชื้อ EHP โดยพบสปอร์ของเชื้อมากกว่า 10 สปอร์ อ่านผลการติดเชื้อในระดับ ++++ ซึ่งเป็นระดับที่มีการติดเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยง (Table 1) นอกจากนี้ กุ้งขาวแวนนาไมระยะ PL12 พบการติดเชื้อ EHP ในระดับ ++++ อีกด้วย สาเหตุอาจเกิดได้หลายปัจจัย เช่น การปนเปื้อนสปอร์ EHP ในระบบโรงเพาะฟักและอนุบาล แล้วเข้าสู่ลูกกุ้งระยะ PL ทางปากและเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหาร ตับและตับอ่อนของลูกกุ้ง (Chaweepack, 2022) กุ้งที่มีการติดเชื้อพบการเจริญของเชื้อภายในตับและตับอ่อนเป็นจำนวนมาก และมีการหลุดลอกออกมาพร้อม สิ่งขับถ่ายสะสมวนเวียนภายในบ่อเลี้ยง สามารถลดปริมาณเชื้อโดยการถ่ายน้ำเพื่อลดเชื้อในตัวเนื่องจากไม่มีสารหรือยาที่สามารถฆ่าเชื้อ EHP ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Songkhla Aquatic Animal Health Research Center, 2022)

**การทดลองที่ 2 การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับแตกต่างกันในอาหาร ต่อการเติบโตของลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาาร์วา (PL27-PL87) และความทนทานต่อความเครียดในสภาวะการแช่ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* AHPND**

ผลการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาาร์วา (PL27-PL87) ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีระดับโปรตีน 39% ผสมกับกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกระดับ 0, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาาร์วา ได้รับอาหารที่ไม่มีกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกเป็นกลุ่มควบคุม (Table 2) พบว่า กุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL39 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก ในอาหารสำเร็จรูป ระดับ 0, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ส่วนกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL51, PL63, PL75 และ PL87 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสำเร็จรูประดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสูงสุด เท่ากับ  $0.103 \pm 0.004$ ,  $0.201 \pm 0.006$ ,  $0.751 \pm 0.068$  และ  $2.367 \pm 0.110$  กรัม ตามลำดับ มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูงสุด เท่ากับ  $0.003 \pm 0.000$ ,  $0.008 \pm 0.001$ ,  $0.016 \pm 0.001$  และ  $0.040 \pm 0.002$  กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวและอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันในกุ้งแต่ละระยะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสำเร็จรูป ระดับ 0 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งอัตราการรอดตายสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แสดงได้ว่า แนวโน้มการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในระดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกุ้งขาวแวนนาไมที่ไม่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหาร สอดคล้องกับการศึกษาของ Bae *et al.* (2022) พบว่า การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก อัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Table 2. Growth performance of whiteleg shrimp larvae fed with 0, 0.2, and 0.4% gamma-aminobutyric acid supplementation in commercial diets for 60 days

Growth performance	Level of gamma-aminobutyric acid		
	0%	0.2%	0.4%
Average weight (g/PL)			
PL27	0.029 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.029 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.029 ± 0.000 <sup>a</sup>
PL39	0.032 ± 0.016 <sup>a</sup>	0.042 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.047 ± 0.001 <sup>a</sup>
PL51	0.082 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.085 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.103 ± 0.004 <sup>b</sup>
PL63	0.141 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.167 ± 0.017 <sup>b</sup>	0.201 ± 0.006 <sup>c</sup>
PL75	0.461 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.628 ± 0.107 <sup>b</sup>	0.751 ± 0.068 <sup>b</sup>
PL87	1.613 ± 0.070 <sup>a</sup>	1.840 ± 0.303 <sup>a</sup>	2.367 ± 0.110 <sup>b</sup>
Average daily growth (g/PL)			
PL39	0.001 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.002 ± 0.000 <sup>b</sup>
PL51	0.002 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.002 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.003 ± 0.000 <sup>b</sup>
PL63	0.005 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.007 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.008 ± 0.001 <sup>b</sup>
PL75	0.010 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.014 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.016 ± 0.001 <sup>b</sup>
PL87	0.027 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.031 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.040 ± 0.002 <sup>b</sup>
Survival rate (%)	91.11 ± 3.85 <sup>a</sup>	95.56 ± 1.92 <sup>ab</sup>	97.78 ± 1.92 <sup>b</sup>

Means values in the same row with different superscripts are significantly different ( $P \leq 0.05$ )

ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม ช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้มากที่สุด และสามารถทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้อีกด้วย รายงานการวิจัยของ Xie *et al.* (2017) พบว่าการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหารกุ้งขาวแวนนาไมสูตรปลาป่นต่ำช่วยให้น้ำหนักกุ้งเพิ่มขึ้น ค่าดัชนีตับ (hepatosomatic index) ดีขึ้น อัตราการรอดตายเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นฮอร์โมนและภูมิคุ้มกันอีกด้วย โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง กุ้งขาวแวนนาไมสามารถทนต่อความเข้มข้นสูงนั้นได้โดยพิจารณาจากอัตราการรอดตายที่มากขึ้นกว่าการไม่ได้เสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหาร ให้ผลสอดคล้องกับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารปลาเฉา (*Ctenopharyngodon idellus*) ระยะเวลา juvenile โดยเมื่อเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอัตราส่วน 87.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อาหารช่วยเพิ่มอัตราการเติบโตที่จำเพาะ (SGR) อย่างมีนัยสำคัญและ

ควบคุมการแสดงออกของยีน NPY และ ghrelin ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นความอยากอาหารได้อย่างเหมาะสมที่สุด ทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะมีค่าสูงสุดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น ทำให้ malondialdehyde ลดลงได้ (Wu *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่ามีผลรวมการเติบโตช้า ( $2.37 \pm 0.11$  กรัม) แม้ว่าอัตราการรอดมีค่าค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เป็นเวลา 60 วัน ของ Vieira *et al.* (2010) ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย  $6.39 \pm 0.86$  กรัม ทั้งนี้ เนื่องจากกุ้งมีการติดเชื้อ EHP ระดับ ++++ มาตั้งแต่ระยะ PL12 ชว่นนำมาปรับสภาวะก่อนการทดลอง จึงมีผลให้กุ้งมีการเจริญเติบโตช้า ดังนั้นกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกมีผลน้อยในการควบคุม EHP แต่ส่งผลให้สุขภาพดี ความเครียดลดลง และสุขภาพตับดีขึ้น จึงทำให้กุ้งมีอัตราการรอดดี แต่มีขนาดเล็กกว่าปกติ

เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมในกุ้งระยะ PL39 ภายใต้สภาวะความเครียดจากความเข้มข้นของเชื้อก่อ

โรคสูง ( $1.0 \times 10^6$  CFU/ml) อันเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ระยะเวลาการทดสอบ 12 วัน (Table 3) พบว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL39 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสำเร็จรูป ระดับ 0 (กลุ่มควบคุม), 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ที่คงเหลือเมื่อครบระยะเวลา มีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง  $8.80 \times 10^3 \pm 6.79$  ถึง  $10.53 \times 10^3 \pm 0.28$  CFU/ml ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) และเมื่อทดสอบหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตับของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL39 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสำเร็จรูป ระดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้อยสุด  $0.15 \times 10^3 \pm 0.42$  CFU/ml และยังมีอัตราการรอดตายสูงสุด  $64.44 \pm 1.93$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL39 กลุ่มควบคุม ซึ่งมีอัตราการรอดตายเท่ากับ  $52.22 \pm 6.94$  เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องจากกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกนั้น มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ

แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ได้ และยังช่วยให้ตัวมีความสมบูรณ์และแข็งแรงสูงสุด สามารถปกป้องตัวไม่ให้เชื้อแบคทีเรียเข้ามาได้ในปริมาณที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงได้ และลดความเสี่ยงในการเกิดโรคได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Xie *et al.* (2017) พบว่าการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก อัตรา 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม สูตรปลาป่นต่ำ ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม และทนทานต่อแอมโมเนีย ได้อย่างเหมาะสม การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกอัตรา 50-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม ช่วยให้กุ้งขาวมีอัตราการรอดตายสูงขึ้น เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเชื้อ *V. alginolyticus* สูง (Bae *et al.*, 2022) ปริมาณการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่แตกต่างกันนั้น เนื่องมาจากแหล่งของกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่นำมาใช้ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกัน รวมถึงสภาวะในระหว่างการเลี้ยงที่แตกต่างกันอีกด้วย

Table 3. Survival rate and vibriosis count after stress condition of high concentrations of sever bacteria *Vibrio parahaemolyticus* in water, immersion treatment for 12 days

Parameters	Level of gamma-aminobutyric acid		
	0%	0.2%	0.4%
Numbers of bacteria in hepatopancreas (CFU/ml)	$0.21 \times 10^3 \pm 0.12^b$	$0.15 \times 10^3 \pm 0.21^a$	$0.15 \times 10^3 \pm 0.42^a$
Numbers of bacteria in water (CFU/ml)	$10.53 \times 10^3 \pm 0.28^a$	$9.38 \times 10^3 \pm 3.84^a$	$8.80 \times 10^3 \pm 6.79^a$
Survival rate (%)	$52.22 \pm 6.94^a$	$63.33 \pm 6.66^{ab}$	$64.44 \pm 1.93^b$

Means values in the same row with different superscripts are significantly different ( $P \leq 0.05$ )

## สรุป

การศึกษาในครั้งนี้เมื่อทำการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก ระดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ในอาหารสำเร็จรูป จะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต และส่งผลให้คุณภาพของลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 มีค่าสูงสุดภายหลังการขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่น 100 ตัวต่อลิตร หากเมื่อคำนึงถึงต้นทุนในการขนส่งของเกษตรกรพบว่า สามารถขนส่งลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 ในอัตราความหนาแน่นเพิ่มขึ้นได้ในอัตรา 500 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตรได้ โดยที่คุณภาพอยู่ในระดับคุณภาพสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก ระดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ในอาหารสำเร็จรูป มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ และเมื่อทดสอบความเครียดภายใต้สภาวะความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียสูง กุ้งที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหาร สามารถยับยั้งหรือป้องกันการติดเชื้อก่อโรคไวรัสโอเน็ตได้ โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในตับมีค่าต่ำกว่ากลุ่มอื่น ส่งผลให้มีอัตราการรอดตายสูงขึ้น แสดงได้ว่า การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก 0.4% ในอาหารของกุ้งขาวแวนนาไมนี้ ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต เพิ่มความแข็งแรงของสุขภาพกุ้ง และสุขภาพตับ ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี แต่มีผลน้อยในการควบคุมเชื้อ EHP

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง ที่อนุเคราะห์การวิเคราะห์โรคสัตว์น้ำด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาและวิธีประเมินคุณภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนิสิตปริญญาตรีและนิสิตปริญญาโท ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์อาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่อนุเคราะห์การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ต่าง ๆ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาภายใต้โครงการพัฒนาวิชาการ 062/65 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

## เอกสารอ้างอิง

- Abdel-Naime, W.A., J.R. Fahim, U.R. Abdelmohsen, M.A. Fouad, K.O. Al-Footy, A.A. Abdel-Lateff and M.S. Kamel. 2019. New antimicrobial triterpene glycosides from lemon balm (*Melissa officinalis*). South African Journal of Botany 125: 161-167. doi: 10.1016/j.sajb.2019.07.004.
- Bae, J., A. Hamidoghli, N.W. Farris, O.S. Olowe, W. Choi, S. Lee, S. Won, M. Ohh, S. Lee and S.C. Bai. 2022. Dietary  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) promotes growth and resistance to *Vibrio alginolyticus* in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition 2022: 9105068, doi: 10.1155/2022/9105068.
- Bahorun, T., B. Gressier, F. Troitin, C. Brunet, T. Dine, M. Luyckx, J. Vasseur, M. Cazin, J.C. Cazin and M. Pinkas. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittel-forschung 46(11): 1086-1089.
- Balcázar, J.L., T. Rojas-Luna and D.P. Cunningham. 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Invertebrate Pathology 96(2): 147-150.
- Chaweepack, T. 2022. Expose the secret of white feces syndrome in marine shrimp. Aquatic Life Magazine 31(384): 45-49. (in Thai)

- Chen, X., C. Gao, X. Du, H. Xu, G. Wang and D. Zhang. 2021. Effects of dietary  $\gamma$ -aminobutyric acid levels on the growth, serum biochemical indexes, immune-related signalling molecules of Jian carp. *Aquaculture Research* 52(3): 1096-1105.
- Chirawithayaboon, P., N. Areechon and O. Meunpol. 2020. Hepatopancreatic antioxidant enzyme activities and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed diet supplemented with garlic (*Allium sativum*) extract. *Agriculture and Natural Resources* 54(4): 377-386. (in Thai)
- Department of Fisheries. 2018. Standard criteria for evaluation of white leg shrimp postlarvae. (Online). Available: [https://www4.fisheries.go.th/local/file\\_document/2019030113530\\_5\\_1\\_file.pdf](https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/2019030113530_5_1_file.pdf) (March 4, 2023). (in Thai)
- Froehlicher, T., T. Hennebelle, F. Martin-Nizard, P. Cleenewerck, J.-L. Hilbert, F. Trotin and S. Grec. 2009. Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chemistry* 115(3): 897-903.
- Hiransuchalert, R., T. Lertpattanapaiboon, P. Tippachararoch, S. Donnuea and S. Piyateratitivorakul. 2013. Development of 17 $\beta$ -estradiol hormone mixed diets for ovarian maturation of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) broodstock in maturation tank. *Journal of Fisheries Technology Research* 7(2): 14-26. (in Thai)
- Jannoey, P., H. Niamsup, S. Lumyong, S. Tajima, M. Nomura and G. Chairote. 2010.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) accumulations in rice during germination. *Chiang Mai Journal of Science* 37(1): 124-133.
- Jeong, S.-B., Y.B. Kim, J.-W. Lee, D.-H. Kim, B.-H. Moon, H.-H. Chang, Y.-H. Choi and K.-W. Lee. 2020. Role of dietary gamma-aminobutyric acid in broiler chickens raised under high stocking density. *Animal Nutrition* 6(3): 293-304.
- Jorgensen, E.M. 2005. GABA. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1-13. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.14.1>
- Liang, Y., Y. Wu, J. Li, R. Peng, M. Jiang, X. Jiang, S. Chen and J. Lin. 2022. Effects of ammonia toxicity on the histopathology, detoxification, oxidative stress, and immune response of the cuttlefish *Sepia pharaonis* and the mitigation of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 232: 113256, doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113256.
- Limsuwan, C., N. Chuchird, P. Prompamorn and K. Sangrungruang. 2006. Epizootiology of white shrimp *Litopenaeus vannamei* diseases in Thailand. Research report. National Research Council of Thailand, Bangkok. 539 p. (in Thai)
- Nakamura, U., T. Nohmi, R. Sagane, J. Hai, K. Ohbayashi, M. Miyazaki, A. Yamatsu, M. Kim and Y. Iwasaki. 2022. Dietary gamma-aminobutyric acid (GABA) induces satiation by enhancing the postprandial activation of vagal afferent nerves. *Nutrients* 14(12): 2492, doi: 10.3390/nu14122492.
- Ngo, D.H. and T.S. Vo. 2019. An updated review on pharmaceutical properties of Gamma-aminobutyric acid. *Molecules* 24(15): 2678. doi: 10.3390/molecules24152678.

- Nuangsaeng, B., V. Yuvanatemiya, R. Hiransuchalert, M. Sonthi, S. Tharanat, T. Samosorn and C. Chaiharn. 2016. Breed improvement and productivity increase of marine shrimp bloodstock raised from soil ponds in a biosecurity system for sustainable marine shrimp farming. Research Report. National Research Council of Thailand, Bangkok. 84 p. (in Thai)
- Pratoomchat, B. 2018. Effects of temperature and density for transportation the post larva of *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii* on survival rate and changeable some properties of transported medium. Research reports. Faculty of Science, Burapha University, Chonburi. 29 p. (in Thai)
- Ruchirawat, K. and K. Vaikrudha. 2003. Quality inspection of shrimp fry using the "Biotech Lab" method. pp. 271-280. In: S. Dilokkiat (ed.), Thai shrimp, a new step, one of the sustainable world leaders., Bangkok. (in Thai)
- Songkhla Aquatic Animal Health Research Center. 2018. Manual for Aquatic Animal's Disease Diagnosis Using PCR Techniques. Technical document. Songkhla Aquatic Animal Health Research Center, Songkhla. 101 p. (in Thai)
- Songkhla Aquatic Animal Health Research Center. 2022. EHP management in marine shrimp hatcheries and nurseries. (Online). Available: [https://www4.fisheries.go.th/local/pic\\_activities/202207111614471\\_pic.pdf](https://www4.fisheries.go.th/local/pic_activities/202207111614471_pic.pdf) (March 4, 2023). (in Thai)
- Sonthi, M. 2015. Farm management model and organic matter control in shrimp ponds of farmers. for prevention of early mortality disease in marine shrimp. Research Report. Burapha University, Chanthaburi. 49 p. (in Thai)
- Turenus, C.I., J.R. Charles, D.H. Tsai, P.L. Ebersole, M.H. Htut, P.T. Ngo, R.N. Lara and B.G. Stanley. 2009. The tuberal lateral hypothalamus is a major target for GABA<sub>A</sub>-but not GABA<sub>B</sub>-mediated control of food intake. *Brain Research* 1283: 65-72.
- Tummarongkongsatit, A. 2007. Effective of Thai herb extracts to inhibit bacterial pathogens in Giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). M.S. Thesis. Maejo University, Chiang Mai. (in Thai)
- van den Pol, A.N. 2003. Weighing the role of hypothalamic feeding neurotransmitters. *Neuron* 40(6): 1059-1061.
- Vieira, F.N., C.C. Buglione, J.P.L. Mourifio, A. Jatobá, M.L. Martins, D.D. Schleder, E.R. Andreatta, M.A. Barraco and L.A. Vinatea. 2010. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 62(3): 631-638.
- Wang, D.M., C. Wang, H.Y. Liu, J.X. Liu and J.D. Ferguson. 2013. Effects of rumen-protected  $\gamma$ -aminobutyric acid on feed intake, lactation performance, and antioxidative status in early lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 96(5): 3222-3227.
- Wangsoontorn, S., C. Limsuwan and N. Chuchird. 2013. Effect of density and transportation times on survival rate of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. pp. 198-206. In: Proceedings of 51<sup>st</sup> Kasetsart University Annual Conference: Veterinary Medicine,

- Fisheries. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Wu, F., M. Liu, C. Chen, J. Chen and Q. Tan. 2016. Effects of dietary gamma aminobutyric acid on growth performance, antioxidant status, and feeding-related gene expression of juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 47(6): 820-829.
- Xie, S.-W., Y.-T. Li, W.-W. Zhou, L.-X. Tian, Y.-M. Li, S.-L. Zeng and Y.-J. Liu. 2017. Effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid supplementation on growth performance, endocrine hormone and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed low fishmeal diet. *Aquaculture Nutrition* 23(1): 54-62.
- Yu, H., J. Pei, W. Qiu, J. Mei and J. Xie. 2022. The antimicrobial effect of *Melissa officinalis* L. essential oil on *Vibrio parahaemolyticus*: Insights based on the cell membrane and external structure. *Frontiers in Microbiology* 13: 812792, doi: 10.3389/fmicb.2022.812792.
-



ผลของการเสริมยีสต์ออโตไลเซทในอาหารต่อการเติบโตและ  
ระบบภูมิคุ้มกันภายใต้สภาวะความเครียดภายหลังการเหนี่ยวนำด้วยโรค vibriosis  
ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effects of Dietary Yeast Autolysate Supplementation on  
Growth Performance and Immunity After Stress Condition by Vibriosis Infection  
in Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

พัชรพร จันทร์รอด<sup>1\*</sup>, อรพินท์ จินตสถาพร<sup>1</sup>, ศรีน้อย ชุ่มคำ<sup>2</sup> และ ศุภวิทย์ ไตรวุฒานนท์<sup>3</sup>  
Phatcharaphorn Janrot<sup>1\*</sup>, Orapint Jintasataporn<sup>1</sup>, Srinoy Chumkam<sup>2</sup> and Supawit Triwutanon<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

<sup>1</sup>Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>2</sup>คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จ. ปทุมธานี 13180

<sup>2</sup>Faculty of Agricultural Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University, Pathum Thani 13180, Thailand

<sup>3</sup>คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

<sup>3</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

\*Corresponding author: Email: ffsora@ku.ac.th

(Received: 23 May 2023; Accepted: 27 July 2023)

**Abstract:** The study on the effects of dietary yeast autolysate supplementation on growth performance, and immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was assigned to a completely randomized design (CRD) with 3 treatments and 5 replications. Commercial shrimp diets were supplemented yeast autolysate at 0, 0.1 and 0.2% on top by pullulan coated. Shrimp with an initial weight of  $0.66 \pm 0.55$  g/shrimp were stocked at 100 ind./m<sup>3</sup> into fifteen 500-L fiberglass tanks and cultured for 65 days. After that stress was induced for 8 hr by subcutaneous injecting of  $2.6 \times 10^4$  CFU/ml *Vibrio parahaemolyticus*. The results showed that the growth performance of shrimp was in the same range ( $P > 0.05$ ), which was 10.67- 11.41 g/shrimp. The immunity under normal conditions demonstrated that total hemocyte count of shrimp fed with yeast autolysate was significantly higher than control ( $P < 0.05$ ). There was  $10.40 \pm 0.44 \times 10^6$  cell/ml in shrimp fed with 0.2% yeast autolysate. After applied stress condition by subcutaneous injection of *V. parahaemolyticus*, shrimp fed with yeast autolysate 0.1 -0.2% exhibited the significantly higher levels of superoxide dismutase ( $P < 0.05$ ). This indicates the efficacy of yeast autolysate on improving innate-immunity of Pacific white shrimp under normal and stress condition after *V. parahaemolyticus* infection.

**Keywords:** Yeast autolysate , Pacific white shrimp, growth performance, innate immunity, *Vibrio parahaemolyticus*

**บทคัดย่อ:** การศึกษาผลการเสริมยีสต์ออโตไลเซทในอาหารต่อการเติบโตและภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม วางแผนทดลองแบบสุ่มทดลอง (CRD) จำนวน 3 ชุดทดลอง ชุดทดลองละ 5 ซ้ำ โดยเสริมยีสต์ออโตไลเซทที่ระดับ 0, 0.1 และ 0.2% ในอาหารสำเร็จรูปที่ถูกเคลือบด้วยพอลิแลน เลียงในถังไฟเบอร์กลาสที่ความหนาแน่น 100 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร จำนวน 15 ถึง มีปริมาตรน้ำ 500 ลิตรต่อถัง เป็นเวลา 65 วัน จากนั้นเหนี่ยวนำความเครียดโดยฉีดเชื้อไวรัสโอซิส โดยใช้เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ความเข้มข้น  $2.6 \times 10^4$  CFU/ml เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ผลพบว่า การเสริมยีสต์ออโตไลเซทที่ระดับ 0-0.2% มีผลให้กุ้งขาวแวนนาไมมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน ( $P > 0.05$ ) มีค่าเฉลี่ย 10.67-11.41 กรัมต่อตัว ในสภาวะปกติกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออโตไลเซทมีปริมาณเม็ดเลือด สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ 0.2% มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงที่สุด  $10.40 \pm 0.44 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายหลังได้รับความเครียดจากเชื้อไวรัสโอซิส กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออโตไลเซทมีกิจกรรมซูเปอร์ออกไซด์ดีสซูเทสสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ดังนั้น การเสริมยีสต์ออโตไลเซทในอาหารที่ปริมาณ 0.1-0.2% สามารถส่งเสริมประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสภาวะปกติและภายหลังได้รับเชื้อไวรัสโอพาราฮีมโกลิดิคัส

**คำสำคัญ:** ยีสต์ออโตไลเซท กุ้งขาวแวนนาไม การเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน ไวรัสโอพาราฮีมโกลิดิคัส

## คำนำ

ผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งกุลาดำใน ปี พ.ศ. 2565 จากการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนา มีผลผลิตรวม 256,822.41 ตัน โดยคิดเป็นผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไม 241,516.07 ตัน และผลผลิตกุ้งกุลาดำ 15,306.34 ตัน ซึ่งผลผลิตกุ้งทั้งหมดเพิ่มขึ้น 0.78% เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2564 โดยมีผลผลิตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (Langkapon, 2023) เนื่องจากเกษตรกรมีการจัดการฟาร์มที่ดีขึ้น อย่างไรก็ตามเกษตรกรประสบปัญหาต่าง ๆ อันได้แก่ สภาพอากาศที่แปรปรวน ต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้น เช่น ราคาอาหารกุ้งขาวแวนนาไม ค่าไฟฟ้า ค่าแรงงาน (Rattanapun, 2019) รวมถึงปัญหาโรคกุ้งขาวแวนนาไม ที่มักพบเมื่อเลี้ยงไปได้ระยะหนึ่ง ในปัจจุบันเกษตรกรที่ประสบกับปัญหาเรื่องโรคที่เกิดขึ้นระหว่างการเลี้ยง เลือกใช้สารเสริมชีวณะ (probiotics) เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์มีชีวิตหรือผลิตภัณฑ์ที่มีจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิต (El-Saadony *et al.*, 2021) ซึ่งในสัตว์น้ำจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ถูกนำมาใช้เพื่อควบคุมโรคผ่านการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ยีสต์คัลเจอร์ (yeast culture) ยีสต์ออโตไลเซท (yeast autolysate) เป็นการสลายเซลล์ของยีสต์ ด้วยกรดหรือเอนไซม์หรือสารละลายเกลือ

เพื่อให้เซลล์แตกซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มแรงดันออสโมติก ประกอบไปด้วยส่วนของผนังเซลล์และของเหลวภายในเซลล์ยีสต์ (Shurson, 2018) โดยมีรายงานว่า การเสริมยีสต์ออโตไลเซทในอาหารปลากะพง มีความสามารถในการส่งเสริมการเติบโตและค่าการย่อยได้ของอาหารได้ดีขึ้นกว่าชุดควบคุม (Takii *et al.*, 2004) นอกจากนี้ ยังมียีสต์ไฮโดรไลเซท (yeast hydrolysate) เป็นยีสต์ที่มีการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ (biotransformation processes) ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยการใช้เอนไซม์และกระบวนการการแยกส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ของเปปไทด์ไฮโดรไลเซท โดยผ่านการกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดต่าง ๆ เพื่อแยกขนาดและลักษณะจำเพาะที่ระดับความดันต่าง ๆ (Amorim *et al.*, 2016) และมีรายงานว่ายีสต์ไฮโดรไลเซทที่มีปริมาณของกรดอะมิโน เปปไทด์ ที่มากกว่ายีสต์อื่น ๆ (Shi *et al.*, 2018) ในส่วนของยีสต์สกัด (yeast extracts) ประกอบด้วยองค์ประกอบของของเหลวภายในเซลล์ยีสต์ (intracellular components) เท่านั้น ซึ่งอุดมไปด้วยกรดอะมิโน วิตามินและแร่ธาตุ นอกจากนี้ สารสกัดยีสต์ยังถูกนำมาใช้ในแง่ของการกระตุ้นจุลินทรีย์ (microbial stimulants) ในกระบวนการหมักและในอุตสาหกรรมยา (Hassan, 2011) ในกลุ่มของยีสต์แห้ง (dried yeast) ซึ่งเป็นกลุ่มของ nutritional yeast

product ประกอบไปด้วยมวลชีวภาพของยีสต์ที่ตายแล้ว ถูกใช้เป็นทางเลือกในการเพิ่มโภชนาในอาหารสัตว์ เช่น ยีสต์โฮลเซลล์ (yeast whole cell) ที่ประกอบไปด้วยองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ ภายหลังกระบวนการผลิตยีสต์หรือเป็นเซลล์ยีสต์ที่เหลือทิ้งจากการหมักแอลกอฮอล์ ในขณะที่ยีสต์นิวคลีโอไทด์ (yeast nucleotide) เป็นยีสต์ที่มีความเฉพาะมีปริมาณของนิวคลีโอไทด์มากกว่ายีสต์ชนิดอื่น (Biswas *et al.*, 2012) จะเห็นได้ว่ายีสต์ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ งานวิจัยของ Jin *et al.* (2018) พบว่า การใช้สารเสริมจากยีสต์นิวคลีโอไทด์สามารถกระตุ้นการเติบโต และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและความทนทานต่อสภาวะที่มีแอมโมเนียในกุ้งขาวแวนนาไมได้เช่นเดียวกับ Rairat *et al.* (2022) รายงานว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์นิวคลีโอไทด์มีความสามารถในการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานโรคได้

ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์ออกโตไลเซทที่เสริมในอาหารที่ระดับ 0.1-0.2% ต่อการเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไมในสภาวะการเลี้ยงทั่วไปและระบบภูมิคุ้มกันภายหลังได้รับเชื้อไวรัสโอพาราฮิโมไลติคัส

## อุปกรณ์และวิธีการ

### สัตว์ทดลอง

คัดเลือกกุ้งขาวแวนนาไม จำนวน 750 ตัว จากฟาร์มเอกชน อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร นำมาพักในถังไฟเบอร์กลาสความจุ 500 ลิตร ที่ความเค็ม 3 พีพีที ให้อาหารโปรตีน 34% วันละ 2 ครั้ง เป็นระยะเวลา 3 วัน เพื่อให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมก่อนทำการทดลอง จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์การปลดเชื้อโรคตายด่วน (Early Mortality Syndrome) ก่อนนำมาศึกษาทดลอง

### อาหารทดลอง

อาหารทดลองเป็นอาหารกุ้งขาวแวนนาไมเชิงการค้าชนิดเกล็ดขนาด 1.6 มิลลิเมตร (อาหารเบอร์ 3)

ที่มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 39% และไขมันไม่น้อยกว่า 7% คลุกยีสต์ออกโตไลเซท จากบริษัท มิตรผล ไปโอฟูเอล จำกัด ที่ปริมาณ 0, 0.1 และ 0.2% แล้วเคลือบด้วยพอลิเมอร์<sup>®</sup> ป้องกันการละลายน้ำ จากนั้นผึ่งให้แห้ง 15 นาทีก่อนนำไปใช้ เก็บรักษาในตู้เย็นในห้องปฏิบัติการ (Laboratory Refrigerator) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีการเตรียมอาหารใหม่ทุกสัปดาห์

### แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) โดยแบ่งการทดลอง ออกเป็น 3 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 1 คือ อาหารที่ไม่เสริมยีสต์ออกโตไลเซท (T1C)

ชุดการทดลองที่ 2 คือ อาหารที่เสริมยีสต์ออกโตไลเซท 0.1% (T2Y)

ชุดการทดลองที่ 3 คือ อาหารที่เสริมยีสต์ออกโตไลเซท 0.2% (T3Y)

### สภาวะการทดลอง

กุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักเริ่มต้น  $0.66 \pm 0.05$  กรัมต่อตัว เลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาส 15 ถัง ปล่อยลงในถังที่มีความจุน้ำ 500 ลิตร พร้อมระบบให้อากาศที่ความหนาแน่น 50 ตัวต่อถัง (100 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร) ด้วยน้ำความเค็ม 3 พีพีที ให้อาหาร 3 -10% ของน้ำหนักตัว โดยแบ่งเป็น 3 มื้อต่อวัน (8.00, 12.00, และ 16.00 น.) มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 10 - 20% ในทุกวัน และใช้ระยะเวลาเลี้ยง 65 วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำโดยใช้น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน คุณภาพน้ำในระหว่างการเลี้ยงควบคุมค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.5 - 8.0 ออกซิเจนละลายน้ำมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเป็นด่างไม่ต่ำกว่า 80 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนียรวมน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการศึกษาาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ภายหลังได้รับเชื้อแบคทีเรียไวรัสโอพาราฮิโมไลติคัส (*Vibrio parahaemolyticus*)

## การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

### 1. การเติบโต

เก็บรวบรวมข้อมูลและทำการวิเคราะห์ข้อมูลการเติบโต ได้แก่ น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดตาย

### 2. การศึกษาภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

ทำการวิเคราะห์ค่าทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม จำนวน 3 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างเลือดของกุ้งขาวแวนนาไม 5 ตัวต่อซ้ำ คิดเป็นชุดทดลองละ 25 ตัว โดยมีวิธีเก็บตัวอย่าง ดังนี้

2.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (total hemocyte count) โดยวิธีการของ Supamattaya *et al.* (2000)

หยดเลือดกุ้งขาวแวนนาไม 100 ไมโครลิตร ลงใน trypan blue solution 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหยดลงบนแผ่นสไลด์นับเม็ดเลือด 20 ไมโครลิตร สองกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X เพื่อนับเม็ดเลือด

2.2 ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (total protein in hemolymph) ตามวิธีการของ Supamattaya *et al.* (2000)

หยดน้ำกลั่นลงใน solution I (2% sodium carbonate, 1% copper sulfate, 2% sodium potassium tartrate) 2 มิลลิลิตร แล้วหยดเลือดกุ้ง 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที และเติม Folin (1:10) 3 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร และนำไปเปรียบเทียบกับ standard curve ของ bovine serum albumin

2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอกซีออกซิเดส (phenoloxidase activity) โดยวิธีการดัดแปลงจาก Smith and Söderhäll (1991)

เติมสารละลาย L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA; Sigma) 300 ไมโครลิตร ใส่ใน HEPES 570 ไมโครลิตร แล้วเติมเลือดกุ้ง 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

1 หน่วยของฟีนอกซีออกซิเดส =  $\Delta OD_{490}$ /นาที่/มิลลิกรัม โปรตีน

2.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme activity) โดยใช้วิธีการของ Ellis (1990)

หยดเลือดกุ้ง 10 ไมโครลิตร ลงในไมโครเวลเพลท จากนั้นใช้ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร สำหรับหยดเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่ 1 นาที และที่ 6 นาที จากนั้นคำนวณค่าหนึ่งหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ มีค่าเท่ากับกิจกรรมในการทำลายเซลล์ *Micrococcus* เมื่อวัดจากการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดซับแสงที่ 450 นาโนเมตรในเวลา 0.001 นาที ที่พีเอช 6.24 และ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ( $\Delta A_{450}$  of 0.001 per minute at pH 6.24 and 25 °C)

2.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) ตามวิธีการของ Ukeda *et al.* (1999) โดยใช้ SOD Assay Kit#19160-1KTF (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)

หยดเลือดกุ้ง 20 ไมโครลิตร จากนั้นกำหนดหลอด blank (a. Blank 1 ใส่ น้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร, b. Blank 2 ใส่ตัวอย่างเลือดกุ้ง 20 ไมโครลิตร และ c. Blank 3 ใส่ น้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร) จากนั้นเติมด้วย WST ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอดและผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม dilution buffer 20 ไมโครลิตร ใน blank 2 และ blank 3 ตามด้วยเอนไซม์ 20 ไมโครลิตร ลงในทุกหลอดและผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ -37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และคำนวณค่า SOD

2.6 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไธโอน โดยทำการหยดเลือดกุ้งขาวแวนนาไม 10 ไมโครลิตร จากนั้นกำหนดหลอด blank 1 หลอด โดยเติมน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร และหยดด้วย 5% SSA แล้วเติม working mixture 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมด้วย NADPH solution 50 ไมโครลิตร และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที และคำนวณค่าเพื่อเปรียบเทียบกับ standard curve (glutathione assay kit; CS0260; Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)

3. ผลของความเครียดจากการเหนี่ยวนำโดยเชื้อไวรัสโอซิส (vibriosis challenge test) ต่อภูมิคุ้มกันโรค  
ทำการเหนี่ยวนำให้กุ้งขาวแวนนาไมเกิดความเครียดจากโรคไวรัสโอซิสโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ภายหลังกุ้งขาวแวนนาไมได้รับอาหารทดลอง ครบ 65 วัน สุ่มกุ้งทั้ง 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ จำนวน 10 ตัวต่อซ้ำ มาทดสอบด้วยสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในปริมาณความเข้มข้นที่  $2.6 \times 10^4$  CFU/ml ซึ่งเตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกเชื้อจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคไวรัสโอซิส ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ทดสอบความแข็งแรงของเชื้อแล้ว นำเลี้ยงใน tryptic soy broth (TSB) ที่มีเกลือ 1.5% เป็นเวลา 15-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 29-37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที แล้วดูดแบคทีเรีย ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายแบคทีเรีย mid-log phase ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวร์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 3,500 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำเชื้อแบคทีเรียไวรัสโอ ไปวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้มีค่า optical density (OD) เท่ากับ 0.1 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อ  $10^6 - 10^8$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแบคทีเรียที่ OD 0.1 ทำการเจือจาง โดยใช้จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับกับสารละลายน้ำเกลือ 0.85% 9 มิลลิลิตร และทำการเจือจางอีกครั้งโดยใช้จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับกับสารละลายน้ำเกลือ 0.85% 9 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นของเชื้อโดยประมาณ  $10^4 - 10^5$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร มานับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธีการ spread plate บนอาหาร thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) ที่มีเกลือ 1.5% ที่ป่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น เพื่อยืนยันความเข้มข้นที่ใช้ในการฉีด และนำสารละลายชุดเดียวกันมาฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อบริเวณปล้องที่ 2 ของลำตัว ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดขนาด 26 G นำกุ้งขาวแวนนาไมที่ฉีดเชื้อแล้วใส่ตู้ทดสอบ ขนาด 100 ลิตร

หลังการฉีดเชื้อ 8 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไม ศึกษากระบวนการภูมิคุ้มกัน ตามวิธีการศึกษาในกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะปกติ และนับจำนวนกุ้งขาวแวนนาไมที่ตายทุกวัน ประเมินผล การทดลองโดยเปรียบเทียบอัตราการตายของกุ้งแวนนาไมกลุ่มควบคุม กับกลุ่มทดลอง ภายในระยะเวลา 7 วัน ทำการแยกเชื้อจากตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม และลำไส้ เพื่อยืนยันว่ากุ้งขาวแวนนาไมมีการตายจากเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* (Noble et al., 2021)

### ผลการทดลองและวิจารณ์

การเสริมยีสต์ออกโตไลเซทต่อการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมระยะเติบโต ที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 100 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร ที่ระดับการเสริมยีสต์ออกโตไลเซท 0, 0.1 และ 0.2 % เคลือบทับบนอาหารนั้น กุ้งขาวแวนนาไมทดลองมีขนาดน้ำหนักเริ่มต้น  $0.65 \pm 0.05$ ,  $0.66 \pm 0.03$  และ  $0.70 \pm 0.06$  กรัมต่อตัว ตามลำดับ ผลการเจริญเติบโตในการทดลองให้อาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทเป็นเวลา 65 วัน พบว่า มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติของการเติบโต ( $P > 0.05$ ) ซึ่งได้แก่ ค่าน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย (final weight) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (average daily gain) อัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio) และอัตราการรอดตาย (survival rate)

ค่าน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้ายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในชุดการทดลอง T1C, T2Y และ T3Y นั้น มีค่า  $11.25 \pm 0.06$ ,  $11.41 \pm 0.94$  และ  $10.67 \pm 0.26$  กรัมต่อตัว ตามลำดับ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในชุดการทดลอง T1C, T2Y, และ T3Y มีค่า  $10.58 \pm 0.08$ ,  $10.76 \pm 0.92$  และ  $10.08 \pm 0.27$  กรัมต่อตัว ตามลำดับ น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในชุดการทดลอง T1C, T2Y, และ T3Y มีค่า  $0.16 \pm 0.00$ ,  $0.17 \pm 0.01$  และ  $0.15 \pm 0.00$  กรัมต่อวัน ตามลำดับ อัตรา

การเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในชุดการทดลอง T1C, T2Y, และ T3Y มีค่า  $4.33 \pm 0.05$ ,  $4.40 \pm 0.11$  และ  $4.19 \pm 0.03$  เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ตามลำดับ อัตราแลกเปลี่ยนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในชุดการทดลอง T1C, T2Y, และ T3Y มีค่า  $1.44 \pm 0.06$ ,  $1.43 \pm 0.04$  และ  $1.45 \pm 0.05$  ตามลำดับ อัตรารอดของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในชุดการทดลอง T1C, T2Y, และ T3Y มีค่า  $83.67 \pm 5.19$ ,  $84.67 \pm 10.87$  และ  $89.00 \pm 4.32$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 1)

ผลของการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในการทดลองนี้ มีแนวโน้มเช่นเดียวกับงานทดลองของ Rungrassamee *et al.* (2014) ที่รายงานว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ในแง่ของการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม ต่อการได้รับอาหารกุ้งที่เสริมด้วยสารแมนแนนโพลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 2, 3 และ 4 กรัมต่อกิโลกรัม เช่นเดียวกับงานทดลองสารเสริมยีสต์สกัด ในปูก้ามขน (*Eriocheir sinensis*) ที่ปริมาณ 2.5, 5 และ 10 กรัมในอาหาร 1 กิโลกรัม ผลการวิจัยพบว่ามีผลแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ของน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการแลกเปลี่ยน และจำนวนของการลอกคราบเฉลี่ย ของครีบกอบในร่างกายสัตว์ (body composition) ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (non-specific immunity) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant status) (Zhang *et al.*, 2019) ในขณะที่งานทดลองของ Zheng *et al.* (2021) รายงานว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารเสริมยีสต์สกัด (yeast extract) 2% มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และ Zhang *et al.* (2012) รายงานว่าปริมาณการเสริมแมนแนนโพลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้นอย่างน้อย 2 กรัมต่อกิโลกรัมสามารถพัฒนาการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ผลของการทดลองที่มีความแตกต่าง อาจเนื่องมาจากการทดลองต่าง ๆ มีสูตรอาหาร แหล่งที่มาของสารเสริมยีสต์ พันธุกรรม

ของสัตว์ทดลอง สภาพแวดล้อม ที่แตกต่างกัน (Lara-Flores *et al.*, 2003)

การศึกษาภูมิคุ้มกันในสภาวะปกติ (normal condition) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซท ผลการศึกษาภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 3 ชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 65 วัน ในสภาวะปกติ พบว่าปริมาณเม็ดเลือด (total hemocyte count) โปรตีนในเลือด (hemolymph protein) และกิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในขณะที่ค่ากิจกรรมไลโซไซม์ (lysozyme activity) ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (superoxide dismutase) ในกลุ่มที่ได้รับยีสต์ออกโตไลเซทมีแนวโน้มสูงขึ้น ( $P = 0.08$ ) และกลูตาไทโอน (glutathione) ( $P = 0.82$ ) มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ภูมิคุ้มกันในชุดการทดลอง T1C, T2Y และ T3Y นั้น มีปริมาณเม็ดเลือดรวม มีค่าเท่ากับ  $9.65 \pm 0.64$ ,  $8.35 \pm 0.56$  และ  $10.40 \pm 0.44$  ( $\times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ โปรตีนในเลือด มีค่าเท่ากับ  $6.52 \pm 0.66$ ,  $4.96 \pm 0.33$  และ  $6.17 \pm 0.36$  กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ กิจกรรมฟีนอลออกซิเดส มีค่า  $26.99 \pm 4.24$ ,  $31.61 \pm 3.36$  และ  $21.17 \pm 2.93$  หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ไลโซไซม์มีค่า  $180.00 \pm 26.46$ ,  $253.33 \pm 55.08$  และ  $260.00 \pm 26.46$  หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กิจกรรมซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส มีค่า  $4.51 \pm 1.88$ ,  $6.22 \pm 0.62$  และ  $7.33 \pm 0.74$  หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และกลูตาไทโอนรวม มีค่า  $17.41 \pm 1.13$ ,  $17.65 \pm 1.25$  และ  $17.97 \pm 0.64$  นาโนโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 2)

องค์ประกอบที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันภายในของสัตว์รวมทั้งกุ้งขาวแวนนาไม คือ เม็ดเลือดที่ไหลเวียนอยู่ในระบบหมุนเวียนของเลือด มีการจัดแบ่งเม็ดเลือดในกุ้งตามลักษณะสัณฐานวิทยาออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ ไฮยาลิโนไซต์ (hyalinocytes) เซมิแกรนูโลไซต์ (semigranulocytes) และ แกรนูโลไลต์ (granulocyte) โดยเม็ดเลือดทำหน้าที่ทั้งในระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดและระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเม็ดเลือดเป็นตัวหลักในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม

**ผลของการเสริมยีสต์ออกโตไลเซทในอาหารต่อการเติบโตและระบบภูมิคุ้มกัน  
ภายใต้สภาวะความเครียดภายหลังการเหนี่ยวนำด้วยโรคไวรัสโอในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)**

**Table 1. Growth performance of Pacific white shrimp fed with yeast autolysate for 65 days**

Growth performance	T1C	T2Y	T3Y	P-value
Initial weight (g/ind.)	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.03	0.70 ± 0.06	0.31
Final weight (g/ind.)	11.25 ± 0.06	11.41 ± 0.94	10.67 ± 0.26	0.44
Weight gain (g/ind.)	10.58 ± 0.08	10.76 ± 0.92	10.08 ± 0.27	0.39
Average daily gain (g/ind./day)	0.16 ± 0.00	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.40
Specific growth rate (%/day)	4.33 ± 0.05	4.40 ± 0.11	4.19 ± 0.03	0.09
Feed conversion ratio	1.44 ± 0.06	1.43 ± 0.04	1.45 ± 0.05	0.94
Survival rate (%)	83.67 ± 5.19	84.67 ± 10.87	89.00 ± 4.32	0.76

Note: Data with superscript letters a,b in the same row indicates a significant difference ( $P < 0.05$ )

**Table 2. Immune parameters of Pacific white shrimp fed with yeast autolysate for 65 days under normal condition**

Parameter	(T1C)	T2Y0.1%	T3Y0.2%	P-value
Total hemocyte count ( $\times 10^6$ cell/ml)	9.65 ± 0.64 <sup>a</sup>	8.35 ± 0.56 <sup>b</sup>	10.40 ± 0.44 <sup>a</sup>	<0.01
Hemolymph protein (g/dL)	6.52 ± 0.66 <sup>a</sup>	4.96 ± 0.33 <sup>b</sup>	6.17 ± 0.36 <sup>a</sup>	<0.01
Phenoloxidase activity (unit/min/mg Protein)	26.99 ± 4.24 <sup>a</sup>	31.61 ± 3.36 <sup>a</sup>	21.17 ± 2.93 <sup>b</sup>	0.01
Lysozyme (unit/ml)	180.00 ± 26.46	253.33 ± 55.08	260.00 ± 26.46	0.08
Superoxide dismutase (unit/ml)	4.51 ± 1.88	6.22 ± 0.62	7.33 ± 0.74	0.08
Glutathione (nmole/ml)	17.41 ± 1.13	17.65 ± 1.25	17.97 ± 0.64	0.82

Note: Data with superscript letters a,b in the same row indicates a significant difference ( $P < 0.05$ )

โดยกระบวนการต่างๆ เช่น การกลืนกินเซลล์ (phagocytosis) การเข้าแคปซูล (encapsulation) และการเกิดตุ่มปม (nodule formation) เป็นต้น จะเห็นได้ว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซท 0.2% มีปริมาณเม็ดเลือดรวมที่มากที่สุด ทั้งนี้ เนื่องจาก บีต้ากลูแคน จัดเป็นกลุ่มของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) ซึ่งพบว่าเป็นองค์ประกอบของยีสต์ โดยโมเลกุลของบีต้ากลูแคน เมื่อกุ้งขาวแวนนาไมได้รับเข้าไปในกระแสเลือดแล้วนั้น จะเรียกว่าเป็น pathogen associated molecular pattern (PAMPs) ไปเจอกับโปรตีนที่ทำหน้าที่ช่วยในการเข้าจับกับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคในกระแสเลือดที่เรียกว่า pattern recognition protein (PRPs) จะส่งผลให้เกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อน (protein

complex) เรียกว่า beta-1,3-glucan-binding protein complex โดยโมเลกุลเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดเคลื่อนที่เข้ามา (migration) และเกิดกระบวนการแตกของเม็ดเลือด (degranulation) หลังโปรตีนและเอนไซม์กับระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อพร้อมทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามา (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ตัวอย่างเช่น ในกระบวนการ phagocytosis เป็นการตอบสนองแบบ non-specific immune response และเป็น cytoskeleton-dependent process ซึ่งเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึม โดยเริ่มจากการที่ฟาโกไซตส์มีการยึดติดกับสิ่งแปลกปลอมโดยเกิดผ่าน non-specific receptor อย่างเช่น toll-like receptor (TLR) จับโครงสร้างของบีต้ากลูแคน และ

ส่งผลให้เกิดกระบวนการกลืนกินและทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นต่อไป ซึ่งถือเป็นการทำงานแบบ cellular immunity โดยเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด แบ่งหน้าที่ในการทำงานโดยเม็ดเลือดชนิด hyaline cell ที่มีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดเล็กที่สุด ทำหน้าที่ phagocytosis และมีการหลั่งเอนไซม์ไลโซไซม์เพื่อกำจัดเชื้อโรค อีกทั้งยังมีส่วนในการส่งเสริมการทำงานแบบ humoral immunity คือช่วยกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด (blood clotting) ในขณะที่ semigranulocyte ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มเชื้อโรค (encapsulation) การกลืนกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) การเก็บและการปลดปล่อยเอนไซม์ prophenoloxidase ส่วน granular cell ทำหน้าที่ในการเก็บและปลดปล่อยเอนไซม์ prophenoloxidase ใช้เซลล์ฆ่าเซลล์ (cytotoxicity) ในขณะที่มีกระบวนการกำจัดเชื้อโรคเกิด สารอนุมูลอิสระชนิดต่างๆมากมาย ที่ไปทำลายเซลล์เม็ดเลือดและเนื้อเยื่อต่างๆ ร่างกายสัตว์จึงมีการปกป้องตนเองโดยการหลั่งเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส-แคทตาเลสและกลูตาไทโอน เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นโดยการเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และน้ำ ซึ่งปลอดภัยต่อตัวสัตว์ (Song *et al.*, 1994) โดยพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวม โปรตีนในเลือด กิจกรรมไลโซไซม์ และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส ( $P \leq 0.08$ ) ในกุ่มกุ่มที่ได้รับยีสต์ออกโตไลเซท 0.2% โดยรวมมีค่าสูงขึ้น โดยเป็นผลมาจากการทำงานของกุ่มกุ่มในเซลล์เม็ดเลือดและในน้ำเลือดดังที่กล่าวไปข้างต้น

ผลของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดโดยเชื้อไวรัสโอซิสต่อกุ่มกุ่มในโรค โดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้นต่ำ พบว่า กุ่มกุ่มแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซท 0.1-0.2% มีกุ่มกุ่มสูงขึ้น ( $P < 0.05$ ) ในส่วนกิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (superoxide dismutase) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่ากุ่มกุ่มในชุดการทดลอง T1C, T2Y, และ T3Y มีค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส  $52.50 \pm 10.32$ ,  $38.49 \pm 2.62$ , และ  $29.00 \pm 0.17$  หน่วยต่อเวลาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเลือด ตามลำดับ กิจกรรมซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตสมีค่า  $7.55 \pm 1.05$ ,  $11.53 \pm 1.72$  และ  $11.90 \pm 1.90$  หน่วยต่อ

มิลลิลิตรของเลือด ตามลำดับ ขณะที่ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count) โปรตีนในเลือด (hemolymph protein) กิจกรรมไลโซไซม์ (lysozyme activity) และกลูตาไทโอน (glutathione) มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) กับกลุ่มควบคุม กุ่มกุ่มแวนนาไมในชุดการทดลอง T1C, T2Y และ T3Y นั้น มีปริมาณเม็ดเลือดรวม มีค่าเท่ากับ  $5.58 \pm 0.31$ ,  $6.42 \pm 1.01$  และ  $5.92 \pm 0.92$  ( $\times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ โปรตีนในเลือดมีค่าเท่ากับ  $5.01 \pm 1.16$ ,  $6.98 \pm 0.58$  และ  $6.28 \pm 0.05$  กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ ไลโซไซม์มีค่า  $213.33 \pm 32.15$ ,  $220.00 \pm 26.46$ , และ  $243.33 \pm 35.12$  หน่วยต่อมิลลิลิตรของเลือด ตามลำดับ และกลูตาไทโอนมีค่า  $17.23 \pm 1.07$ ,  $17.69 \pm 0.60$ , และ  $17.96 \pm 0.78$  นาโนโมลต่อมิลลิลิตรของเลือด ตามลำดับ (Table 3)

ผลการศึกษาภายหลังการเหนี่ยวนำโดยเชื้อไวรัสโอซิสต่อกุ่มกุ่มในโรค พบว่า กิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (superoxide dismutase) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยกุ่มกุ่มที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (T1C) มีปริมาณกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสที่สูงกว่าชุดทดลองอื่นๆ ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากปริมาณของยีสต์ที่เสริมลงไปในการเสริม ซึ่งมีความสำคัญต่อการส่งเสริมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในกุ่มกุ่มแวนนาไม รวมถึงความต้านทานของกุ่มต่อเชื้อโรค (Andrews *et al.*, 2011) งานวิจัยของ Ma *et al.* (2020) รายงานว่ากุ่มกุ่มแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมยีสต์ออกโตไลเซท (yeast autolysate) 1% มีปริมาณของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้นกว่าชุดควบคุม ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count) ความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (total antioxidative capacity) กิจกรรมการหายใจระดับเซลล์ (respiratory burst) และกิจกรรมของไลโซไซม์ (lysozyme activity) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยรายงานว่า การเสริมยีสต์คัลเจอร์ (yeast culture) ในอาหาร 1.1% มีความสามารถในการเพิ่มปริมาณของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ่มกุ่มแวนนาไม ได้แก่ ยีน penaeidin (PEN), lysozyme (LYZ) และ prophenoloxidase (proPO) (Licon-Jain *et al.*, 2020)

Table 3. Immune responses of Pacific white shrimp fed with yeast autolysate under stress condition by injection *Vibrio parahaemolyticus*

Parameter	T1C	T2Y	T3Y	P-value
Total hemocyte count ( $\times 10^6$ cell/ml)	5.58 $\pm$ 0.31	6.42 $\pm$ 1.01	5.92 $\pm$ 0.92	0.61
Hemolymph protein (g/dL)	5.01 $\pm$ 1.16	6.98 $\pm$ 0.58	6.28 $\pm$ 0.05	0.10
Phenoloxidase activity (unit/min/mg protein)	52.50 $\pm$ 10.32 <sup>a</sup>	38.49 $\pm$ 2.62 <sup>ab</sup>	29.00 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	0.02
Lysozyme (unit/ml)	213.33 $\pm$ 32.15	220.00 $\pm$ 26.46	243.33 $\pm$ 35.12	0.51
Superoxide dismutase (unit/ml)	7.55 $\pm$ 1.05 <sup>b</sup>	11.53 $\pm$ 1.72 <sup>a</sup>	11.90 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>	0.03
Glutathione (nmole/ml)	17.23 $\pm$ 1.07	17.69 $\pm$ 0.60	17.96 $\pm$ 0.78	0.59

Note: Data with superscript letters a,b in the same row indicates a significant difference ( $P < 0.05$ )

กุ้งขาวแวนนาไมมีการปกป้องตัวเองจากเชื้อก่อโรค ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งซึ่งประกอบด้วย ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune system) ที่ไม่มีการจดจำแอนติเจนและไม่สามารถทำวัคซีนได้เหมือนในสัตว์ชั้นสูง จะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรค โดยอาศัยเซลล์และสารน้ำ (cellular and humoral mechanisms) ไปยับยั้งและกระตุ้นการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรค โดยการทำงานของ เซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ที่เรียกว่า ฮีโมไซต์ (hemocytes) ซึ่งทำหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจน และยังมีหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันด้วย เมื่อฮีโมไซต์เจอกับสิ่งแปลกปลอมจะถูกกระตุ้นผ่านตัวรับกลุ่ม pattern recognition proteins และนำไปสู่การทำกรของเซลล์และการสร้างสารน้ำต่าง ๆ ที่จะช่วยควบคุมทำลายเชื้อโรค เช่น กระบวนการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) การสร้างก้อน (nodule formation) การหลั่งสารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides) (AMPs) และไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นต้น (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006) นอกจากการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) แล้ว การป้องกันตนเองของกุ้งยังมีการโอบล้อมสำหรับปรสิตที่มีขนาดใหญ่และการสร้างตุ่มหรือปมสำหรับจุลชีพขนาดเล็ก (encapsulation and nodule formation) (Aguirre-Guzman *et al.*, 2009) ในส่วนของภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immune defense) ที่เกิดจากการหลั่งโปรตีนหลาย ๆ ชนิดที่ใช้ในการทำลายเชื้อโรค

เช่นสารกลุ่ม เลคติน (non-enzymatic proteins) ไกลโคโปรตีน (glycoproteins) เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysosome enzymes) ใช้ในการกำจัดเชื้อโรค และสารต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides, AMPs) ที่ไปเกาะบนผิวของเชื้อโรค และทำลายเซลล์นั้น สารเหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมและจดจำโมเลกุลของผนังเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับระบบ prophenoloxidase (ProPO) cascade ซึ่งได้ผลิตภักซ์เป็น quinone ที่ช่วยยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และนำไปสู่การเกิดเม็ดสีดำ (melanization) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า กุ้งขาวแวนนาไมมีการติดเชื้อ โดยเซลล์ฮีโมไซต์หลั่งโปรตีน (antimicrobial protein) ที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (blood clotting) เมื่อมีการติดเชื้อ ดังนั้น กิจกรรมการทำงานของไลโซไซม์และกิจกรรมฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immune defense) จะเพิ่มขึ้น และทำงานรวดเร็วขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อโรคแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, และ *V. cholerae* เป็นต้น (Chong *et al.*, 2022) การที่เซลล์เม็ดเลือดยื่นไซโทพลาสซึมล้อมรอบและจับกินสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีการ phagocytosis นั้น เป็นกลไกที่สำคัญของการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกัน โดยเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง (cellular defense) เมื่อมีกระบวนการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) อนุภาคของสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพจะถูกกลืนเข้าไปอยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดและกลายเป็น digestive vacuole ที่เรียกว่า phagosome

การผลิตของ reactive oxygen intermediates (ROIs) นั้น เป็นผลมาจากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (respiratory burst) ซึ่ง reactive intermediates 3 ตัวหลัก ได้แก่ superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) และ hypochlorous acid (HOCl) เกิดจาก เอนไซม์ NADPH oxidase ไปรีดิวซ์ออกซิเจน ( $O_2$ ) และได้ superoxide anion ซึ่งเป็นอันตรายต่อเม็ดเลือด และเซลล์เนื้อเยื่อต่าง ๆ เมื่อเกิดสารอนุมูลอิสระ (ROS) จากการต่อสู้ป้องกันเชื้อโรค กุ้งมีเอนไซม์กลุ่มที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น เม็ดเลือดจึงมีบทบาทในการสร้างเอนไซม์ในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidative stress enzymes) ซึ่งได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส (superoxide dismutase) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจน และมีการสร้างเอนไซม์กลุ่มคาตาเลส (catalase) และ กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ซึ่งเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและออกซิเจน ซึ่งปลอดภัยกับตัวสัตว์ (Di Giulio *et al.*, 2020) ดังนั้น ในเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อโรคระบบภูมิคุ้มกันทั้งสองระบบดังกล่าวจะทำงานร่วมกันในการทำลายสิ่งแปลกปลอม และเชื้อโรคต่าง ๆ

### สรุป

การเสริมอีสต์อโตไลเซทในอาหารต่อการเติบโต และภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ในสภาวะการเลี้ยงทั่วไปและภายใต้สภาวะความเครียดภายหลังการเหนี่ยวนำด้วยโรควิริโอนั้น การเสริมอีสต์อโตไลเซท 0, 0.1 และ 0.2% เคลือบที่บนอาหารนั้น มีผลให้การเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น 100 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร เป็นเวลา 65 วัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) ในส่วนของ ค่าน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการเติบโตจำเพาะ อัตราแลกเนื้อ และอัตราการรอด โดยกุ้งขาวแวนนาไมมีน้ำหนักเฉลี่ย 10.67-11.41 ± 0.94 กรัมต่อตัว เมื่อพิจารณาถึงภูมิคุ้มกันในสภาวะปกติพบว่า ในกุ้งกลุ่มที่ได้รับอีสต์อ

โตไลเซท 0.2% (T2Y) มีปริมาณเม็ดเลือดรวม โปรตีนในเลือด กิจกรรมไลโซไซม์ และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตส ( $P\leq 0.08$ ) ที่สูงกว่าชุดทดลองอื่น และภายหลังการได้รับ ความเครียดจากการได้รับเชื้อโรควิริโอซิส โดยการฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้นต่ำ  $2.6 \times 10^4$  CFU/ml กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมอีสต์อโตไลเซทที่ระดับ 0.2% (T2Y) มีปริมาณซูเปอร์ออกไซด์ดิสมูเตสที่ใช้ในการกำจัดเชื้อโรคสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ ) ดังนั้น การเสริมอีสต์อโตไลเซท 0.2% ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งในสภาวะปกติและในสภาวะความเครียดภายหลังการได้รับเชื้อ

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีสัตว์น้ำ คาร์กิลล์ บ้านแพ้ว สมุทรสาคร ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาวิจัยเพิ่มพูนความรู้ และให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์อาหารสัตว์น้ำ ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์ สารเคมีในการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนิสิตปริญญาตรี นิสิตปริญญาโท และนิสิตปริญญาเอก ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์อาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่อนุเคราะห์การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ต่าง ๆ การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ภายใต้โครงการพัฒนาวิชาการ 0527/64 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

### เอกสารอ้างอิง

Aguirre-Guzman, G., J.G. Sanchez-Martinez, A.I. Campa-Cordova, A. Luna-Gonzalez and F. Ascencio. 2009. Penaeid shrimp immune system. The Thai Journal of Veterinary Medicine 39(3): 205-215.

- Andrews, S.R., N.P. Sahu, A.K. Pal, S. C. Mukherjee and S. Kumar. 2011. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. *Research in veterinary science* 91(1): 103-109.
- Amorim, M., J.O. Pereira, D. Gomes, C.D. Pereira, H. Pinheiro and M. Pintado. 2016. Nutritional ingredients from spent brewer's yeast obtained by hydrolysis and selective membrane filtration integrated in a pilot process. *Journal of Food Engineering* 185: 42-47.
- Biswas, G., H. Korenaga, R. Nagamine, T. Kono, H. Shimokawa, T. Itami and M. Sakai. 2012. Immune stimulant effects of a nucleotide-rich baker's yeast extract in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture* 366-367: 40-45.
- Chong, R.S.-M., B. Vaseeharan and A. Iswarya. 2022. Crustacean immunology. pp 13-26. *In*: F.S.B. Kibenge, B. Baldisserotto and R. S.-M. Chong (eds.). *Aquaculture Pathophysiology Volume II. Crustacean and Mollusks Diseases*. Academic Press, London.
- Di Giulio, R.T., W.H. Benson, B.M. Sanders and P.A. Van Veld. 2020. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. pp. 523-561. *In*: G.M. Rand (ed.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. CRC Press, Boca Raton.
- Ellis, A.E. 1990. Lysozyme assays. pp. 101-103. *In*: J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson and W.B. Van Muiswinkel (eds.). *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, Fair Haven.
- El-Saadony, M.T., M. Alagawany, A.K. Patra, I. Kar, R. Tiwari, M. A. Dawood, K. Dhama and H.M. Abdel-Latif. 2021. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish & shellfish immunology* 117: 36-52.
- Hassan, H.M.M. 2011. Antioxidant and immunostimulating activities of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) autolysates. *World Applied Sciences Journal* 15(8): 1110-1119.
- Jin, M., J. Xiong, Q.-C. Zhou, Y. Yuan, X.-X. Wang and P. Sun. 2018. Dietary yeast hydrolysate and brewer's yeast supplementation could enhance growth performance, innate immunity capacity and ammonia nitrogen stress resistance ability of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology* 82: 121-129.
- Jiravanichpaisal, P., B.L. Lee and K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211(4): 213-236.
- Langkapon, P. 2023. Marine shrimp products in 2022. (Online). Available: <https://www.fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/pages/fish%20shrimp.html> (May 20, 2023). (in Thai)
- Lara-Flores, M., M.A. Olvera-Novoa, B.E. Guzmán-Méndez and W. López-Madrid. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216(1-4): 193-201.

- Licon-Jain, A., Á. Campa-Córdova, A. Luna-González, I.S. Racotta, M. Tello and C. Angulo. 2020. Dietary supplementation of marine yeast *Yarrowia lipolytica* modulates immune response in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 105: 469-476.
- Ma, S., X. Wang, W. Gao, W. Xu, W. Zhang and K. Mai. 2020. Effects of yeast autolysate in the practical diet on the growth performance, immune response, and disease resistance of Pacific white shrimp. *Journal of Aquatic Animal Health* 32(3): 109-115.
- Noble, T.H., M. Rao, M. Briggs, A.P. Shinn, C. Simon and J.W. Wynne. 2021. Novacq™ improves survival of *Penaeus vannamei* when challenged with pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture* 545:737235, doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737235.
- Rairat, T., N. Chuchird, A. Keetanon, P. Carcano, M. Comi and W. Koppe. 2022. Effects of dietary yeast-derived nucleotide and RNA on growth performance, survival, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Reports* 27:101352, doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101352.
- Rattanapun, E. 2019. Costs and returns of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* BOONE, 1931) culture in Surat Thani province after the effects of EMS disease. Technical Paper. Surat Thani Provincial Office, Department of Fisheries, 67 p. (in Thai)
- Rungrassamee, W., Y. Kingcha, Y. Srimarut, S. Maibunkaew, N. Karoonuthaisiri and W. Visessanguan. 2014. Mannooligosaccharides from copra meal improves survival of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after exposure to *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 434: 403-410.
- Shi, L., Y. Ren, C. Zhang, W. Yue and F. Lei. 2018. Effects of organic selenium (Se-enriched yeast) supplementation in gestation diet on antioxidant status, hormone profile and haemato-biochemical parameters in Taihang Black Goats. *Animal Feed Science and Technology* 238: 57-65.
- Shurson, G.C. 2018. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal Feed Science and Technology* 235: 60-76.
- Smith, V.J. and K. Söderhäll. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Developmental & Comparative Immunology* 15(4): 251-261.
- Song, Y.L and Y.T. Hsieh. (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental & Comparative Immunology* 18(3): 201-209.
- Supamattaya, K., J. Raungsri, S. Kiriratnikom and N. Suanyuk. 2000. Immune system in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius: VI. Effect of diseases on immuno-physiological function and blood components in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Songkhlanakarin Journal of Science and Technology* 22(Suppl.): 615-621. (in Thai)

- Takii, K., S.I. Akiyama, T. Maoka, K. Hidaka, K. Otaka, M. Seoka and H. Kumai. 2004. Evaluation of dietary yeast autolysates for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture Science* 52(4): 387-394.
- Ukeda, H., D. Kawana, S. Maeda and M. Sawamura. 1999. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63(3): 485-488.
- Vargas-Albores, F. and G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191(1-3): 13-21.
- Zhang, J., Y. Liu, L. Tian, H. Yang, G. Liang and D. Xu. 2012. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 33(4): 1027-1032.
- Zhang, R., Y. Jiang, L. Zhou, Y. Chen, C. Wen, W. Liu and Y. Zhou. 2019. Effects of dietary yeast extract supplementation on growth, body composition, non-specific immunity, and antioxidant status of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Fish and Shellfish Immunology* 86: 1019-1025.
- Zheng, L., S. Xie, Z. Zhuang, Y. Liu, L. Tian and J. Niu. 2021. Effects of yeast and yeast extract on growth performance, antioxidant ability and intestinal microbiota of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 530:735841, doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735941.
-



# การเอนแคปซูเลชันสารสกัดแคโรทีนอยด์จาก สาหร่ายเกลียวทองด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย

## Encapsulation of Carotenoid Extract from Spirulina by Spray Drying Technique

สุภาวดี พลโยธา และ สุทัศน์ สุระวัง\*  
Supavadee Phonyotha and Suthat Surawang\*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการพัฒนามลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50100

Division of Product Development Technology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100, Thailand

\*Corresponding author: Email: [ssurawang@gmail.com](mailto:ssurawang@gmail.com)

(Received: 26 April 2023; Accepted: 12 July 2023)

**Abstract:** *Spirulina platensis* is a highly nutritious cyanobacterium. It also contains carotenoids, which are important antioxidants. Carotenoids are light and temperature sensitive, and thus easily breakdown. The extracted carotenoid of microwave assisted extraction from spirulina was encapsulated using different ratio of wall materials (maltodextrin : gum arabic) as 2.0:0.0, 1.5:0.5 and 1.0:1.0 and inlet temperature of 140 and 180 °C by spray drying. The physicochemical properties and morphology using scanning electron microscopy (SEM) of the encapsulated powder was investigated. The results showed that the ratio of wall material and inlet temperature had a significant effect on yield, moisture content, β-carotene content, total carotenoid content and the encapsulation efficiency. The ratio of maltodextrin : gum arabic of 1.0 : 1.0 and the inlet temperature of 180 °C, resulting the highest encapsulation efficiency of  $47.34 \pm 2.96\%$  with  $22.07 \pm 0.50\%$  yield, β-carotene content of  $6.97 \pm 0.52 \mu\text{g/g}$  dry powder and carotenoid content of  $2.50 \pm 0.16 \text{ mg/g}$  dry powder. The physicochemical properties of encapsulated powder were moisture content of  $1.03 \pm 0.21\%$  and water activity of  $0.068 \pm 0.008$ .

**Keywords:** Spirulina, carotenoid, encapsulation, spray drying

**บทคัดย่อ:** สาหร่ายเกลียวทองเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง อีกทั้งยังเป็นแหล่งของแคโรทีนอยด์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ เนื่องจากแคโรทีนอยด์มีความไวต่อแสง และอุณหภูมิ ทำให้สลายตัวได้ง่าย จึงทำการเอนแคปซูลชันสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายเกลียวทองที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบไมโครเวฟ โดยศึกษาชนิดของสารห่อหุ้ม (มอลโตเด็กซ์ตรินต่อกัมอะราบิก) ในอัตราส่วนโดยมวล 2.0 : 0.0, 1.5 : 0.5 และ 1.0 : 1.0 และอุณหภูมิขาเข้าในการทำแห้งแบบพ่นฝอย 140 และ 180 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมี รวมทั้งวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานของอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า อุณหภูมิขาเข้าและอัตราส่วนของสารห่อหุ้มส่งผลต่อร้อยละผลผลิต ปริมาณความชื้น ปริมาณปีตาแคโรทีน ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลชัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยการใช้มอลโตเด็กซ์ตริน และกัมอะราบิก ในอัตราส่วน 1.0:1.0 ที่อุณหภูมิขาเข้า 180 องศาเซลเซียส ทำให้มีประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลชันดีที่สุด คิดเป็นร้อยละ  $47.34 \pm 2.96$  โดยมีร้อยละผลผลิต ร้อยละ  $22.07 \pm 0.50$  มีปริมาณปีตา - แคโรทีน  $6.97 \pm 0.52 \mu\text{g/g dry powder}$  และมีปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด  $2.50 \pm 0.16 \text{ mg/g dry powder}$  ซึ่งผงตัวอย่างที่ผ่านการเอนแคปซูลชันมีปริมาณความชื้น คิดเป็นร้อยละ  $1.03 \pm 0.21$  และค่าวอเตอร์แอกทิวิตี  $0.068 \pm 0.008$

**คำสำคัญ:** สาหร่ายเกลียวทอง แคโรทีนอยด์ เอนแคปซูลชัน การทำแห้งแบบพ่นฝอย

## คำนำ

สาหร่ายเกลียวทองเป็นไซยาโนแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุ อีกทั้งยังมีซี - ไพโคไซยานิน และแคโรทีนอยด์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ (Bingula *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016) แคโรทีนอยด์ที่พบในสาหร่ายเกลียวทองมีมากถึง 0.3 - 2.6% ได้แก่  $\beta$ -carotene, zeaxanthin และ  $\beta$ -cryptoxanthin (Ambati *et al.*, 2019; Assuncao *et al.*, 2021; Finamore *et al.*, 2017) ซึ่งแคโรทีนอยด์นั้นเป็นกลุ่มของรงควัตถุที่มีสีแดง ส้ม เหลือง ละลายได้ในไขมัน สามารถจำแนกแคโรทีนอยด์ในโมเลกุลเป็น 2 กลุ่ม (Kikias *et al.*, 2016) ได้แก่ แคโรทีน (carotene) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ซึ่งมนุษย์และสัตว์อื่นไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เองได้ จึงจำเป็นต้องได้รับจากแหล่งอื่น พบได้ในพืชและจุลินทรีย์ต่าง ๆ โดยแคโรทีนอยด์ในสาหร่ายนั้นมีประสิทธิภาพในการเป็นแหล่งของ สารตั้งต้นวิตามินเอที่ได้จากปีตาแคโรทีน (Assuncao *et al.*, 2021) มีหน้าที่สำคัญในเมแทบอลิซึมของมนุษย์และสัตว์ ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ โรคหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับสายตา

เช่น จอประสาทตาเสื่อม หรือต้อกระจก เป็นต้น (Liang *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2018)

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้แคโรทีนอยด์จากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย เนื่องจากผู้บริโภคนั้นยังตระหนักถึงความปลอดภัย และประโยชน์ของอาหารมากกว่าแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ จึงทำให้แนวโน้มในอุตสาหกรรมอาหารที่มีส่วนผสมของแคโรทีนอยด์เติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันการใช้แคโรทีนอยด์เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารยังคงมีข้อจำกัดในการใช้งานจากหลายปัจจัย เช่น มีความไม่เสถียรสูง ไม่ละลายน้ำ สลายตัวได้ง่ายจากแสง อุณหภูมิ ความชื้น รวมถึงในระหว่างกระบวนการแปรรูปและการเก็บรักษา (Ribeiro *et al.*, 2020) จึงไม่สามารถนำแคโรทีนอยด์มาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้โดยตรง อีกทั้งสารสกัดแคโรทีนอยด์นั้นอยู่ในรูปของน้ำมัน ซึ่งสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้โดยการนำเทคโนโลยีเอนแคปซูลชันมาประยุกต์ใช้ในการห่อหุ้มและป้องกันการสลายตัวได้ง่ายของแคโรทีนอยด์ อีกทั้งยังสะดวกต่อการนำไปใช้งาน

การเอนแคปซูลชันเป็นเทคนิคการกักเก็บสารที่สลายตัวได้ง่ายไว้ด้านใน แล้วเคลือบด้วยสารห่อหุ้มด้านนอก สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทำแห้งแบบ

แช่เยือกแข็ง (freeze dry), เอกซ์ทรูชัน (extrusion), โคอะเคอเวชัน (coacervation), ฟลูอิดไดส์เบด (fluidized bed coating) และการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก ต้นทุนต่ำ ปริมาณผลผลิตสูง โดยประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลเส้นขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของตัวอย่าง ความดัน และอัตราการไหลของอากาศ อุณหภูมิอากาศ และขนาดของอนุภาคนอกจากนี้ชนิดของสารห่อหุ้ม ยังเป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการเอนแคปซูลเส้น (Soukoulis and Bohn, 2018) ซึ่งการใช้สารห่อหุ้มที่ต่างกันทำให้ผงตัวอย่างที่ได้มีคุณภาพทางกายภาพ และเคมีที่ต่างกันด้วย เช่น สารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ และโปรตีน เป็นต้น สารห่อหุ้มที่นิยมใช้มากที่สุด คือ มอลโตเด็คซ์ตริน เป็นสารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโมเลกุลของสตาρχบางส่วนให้เป็นสายสั้น ๆ ของน้ำตาลกลูโคส มีสมบัติในการขึ้นรูปฟิล์มที่ดี สามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่มีคุณสมบัติในการเป็นอิมัลชันที่ต่ำ จึงต้องใช้ร่วมกับสารห่อหุ้มชนิดอื่นเนื่องจากสารสกัดแคโรทีนอยด์อยู่ในรูปของน้ำมัน ซึ่งควรทำให้อยู่ในเมทริกซ์ที่เหมาะสมก่อนทำการเอนแคปซูลเส้น โดยการทำให้อยู่ในระบบอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water, W/O) คือระบบที่ประกอบด้วยอนุภาคน้ำมัน (สารสกัดแคโรทีนอยด์) ที่กระจายแขวนลอยอยู่ในวัฏภาคน้ำ โดยสารห่อหุ้มที่นำมาใช้ควรเป็นสารที่มีสมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และสารให้ความคงตัว เช่น กัมอะราบิก ซึ่งเป็นสารกลุ่มไฮโดรคอลลอยด์ที่ได้จากยางพืชรากในสกุลอะเซีย (*Acacia*) มีสมบัติในการเป็นอิมัลชันและให้ความคงตัวที่ดี และมีความหนืดต่ำเมื่อใช้ความเข้มข้นมาก (Oliyaei *et al.*, 2020) นิยมใช้เป็นสารห่อหุ้มที่มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญพวกวิตามินต่าง ๆ

ดังนั้น การเอนแคปซูลเส้นสารสกัดด้วยสารห่อหุ้มด้านนอกจะช่วยลดการสลายตัวของสารสกัดแคโรทีนอยด์ ที่ได้จากสาหร่ายเกลียวทอง และตัวอย่างผงที่กักเก็บยังสะดวกต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเอนแคปซูลเส้นสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่ายเกลียวทองด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยการเปรียบเทียบชนิด

และอัตราส่วนของสารห่อหุ้ม 2 ชนิด ได้แก่ มอลโตเด็คซ์ตริน และกัมอะราบิกในอัตราส่วนโดยมวล 2.0 : 0.0, 1.5 : 0.5 และ 1.0 : 1.0 และอุณหภูมิอากาศ 140 และ 180 องศาเซลเซียส ที่มีต่อประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลเส้น รวมถึงคุณภาพทางกายภาพ และเคมีของผงที่ผ่านการเอนแคปซูลเส้น

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเตรียมสารสกัดจากสาหร่ายเกลียวทอง

การสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายเกลียวทองสกัดด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมสกัด (ดัดแปลงวิธีจาก Elik *et al.*, 2020; Hiranvarachat *et al.*, 2013) กำหนดอัตราส่วนของสาหร่ายเกลียวทอง (น้ำหนักแห้ง) ต่อน้ำมันทานตะวัน (ตัวทำละลาย) ในอัตราส่วนโดยมวล 1:100 โดยใช้เครื่องไมโครเวฟ (Toshiba รุ่น MW2-MM24PC(BK)) ช่วยสกัดพร้อมทั้งชุดเครื่องแก้วสกัดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Hettich รุ่น MIKRO 220) กำหนดความเร็วรอบ 3,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในขวดสีชาเพื่อเตรียมการเอนแคปซูลเส้นสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่ายเกลียวทองด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย

### การเอนแคปซูลเส้นสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายเกลียวทองด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย

การเอนแคปซูลเส้นสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายเกลียวทองด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยกำหนดอัตราส่วนของวัฏภาคน้ำต่อวัฏภาคน้ำมัน (สารสกัดแคโรทีนอยด์) ต่อสารห่อหุ้ม อัตราส่วนโดย 7 : 1 : 2 ผสมวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมันให้เข้ากันโดยผสม Tween 80 ปริมาณร้อยละ 1.0 ของส่วนผสมทั้งหมด ด้วยเครื่องโฮโมจีไนซ์ชนิดความเร็วสูง (homogenizer) (IKA รุ่น T25) กำหนดความเร็ว 7,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย (BUCHI รุ่น B-290) โดยใช้อัตราการไหลของตัวอย่าง 6.5 มิลลิลิตรต่ออนาที ที่ความดัน 40 บาร์ (ดัดแปลงวิธีจาก Kang *et al.*, 2019; Tolun *et al.*, 2016)

ทำการศึกษ้อัตราส่วนมอลโตเดกซ์ทริน และกัมอะราบิกของสารห่อหุ้มในการเอนแคปซูลชัน สารสกัดแคโรทีนอยด์ ได้แก่ 2.0:0.0, 1.5:0.5 และ 1.0:1.0 และศึกษาอุณหภูมิขาเข้า (inlet temperature) ของการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่ 140 และ 180 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิขาออก (outlet temperature) ที่  $80 \pm 5$  และ  $100 \pm 5$  องศาเซลเซียส ตามลำดับ

#### การวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (%)

การวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (%) ของผงที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน สามารถคำนวณจากสมการที่ 1

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{mass of encapsulated}}{\text{Total mass of feed solution}} \times 100 \quad (1)$$

#### การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกทิวิตี ( $a_w$ )

การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของตัวอย่างด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC (2000) และการวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี ( $a_w$ ) ของตัวอย่าง ด้วยเครื่อง Aqualab LITE (DECAGON, USA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

#### การวิเคราะห์ปริมาณบีตา-แคโรทีน ( $\beta$ -carotene)

นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณบีตา-แคโรทีน ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC Agilent Technologies รุ่น 1260 Infinity) ใช้คอลัมน์ชนิด Agilent Poroshell 120 SB-C18 (ขนาด  $2.1 \times 100$  mm, 2.7 micron) และใช้ตัวพา 2 ชนิด คือ 40 % ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย A และ 60 % methanol เป็นตัวทำละลาย B กำหนดให้ มีอัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลาวิเคราะห์ (run time) 10 นาที และเวลาชะ (retention time) 5.2 - 5.4 นาที ตรวจวัดโดยใช้ Diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้สารมาตรฐานบีตา-แคโรทีน (C4582-5MG, Sigma-Aldrich) (ดัดแปลงวิธีจาก Kupan *et al.* (2016) และ Kiokias *et al.* (2016))

#### การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด โดยซึ่งตัวอย่าง 5 กรัม ละลายในตัวทำละลาย (hexane : acetone : ethanol = 2 : 1 : 1) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่องเขย่า (shaker) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้น นำเฉพาะส่วนใส วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Thermo Fisher รุ่น Genesys 10S UV-Vis) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานบีตา-แคโรทีน (C4582-5MG, Sigma-Aldrich) คำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในหน่วย มิลลิกรัม บีตา-แคโรทีน ต่อ 1 กรัม สารสกัด (mg  $\beta$ -carotene / g extract) (ดัดแปลงวิธีจาก Hiranvarachat *et al.* (2013))

#### การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลชัน (encapsulation efficiency; EE)

$$\text{Encapsulation efficiency} =$$

$$\frac{\text{Total carotenoids content of encapsulated}}{\text{Total carotenoids content of feed solution}} \times 100 \quad (2)$$

#### ลักษณะสัณฐานของอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM)

การศึกษาลักษณะสัณฐานของอนุภาค เตรียมตัวอย่างให้มีความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 6 ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Thermo fisher scientific Inc. รุ่น Prisma E) ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า

#### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษานี้ได้วางแผนการทดลองแบบ  $2 \times 3$  factorial experimental in CRD นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Statistic 17.0 (SPSS Inc., USA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### การวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต

จากผลการวิเคราะห์ร้อยละผลผลิตของผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วยมอลโตเด็คซ์ตรินและกัมอะราบิกที่อุณหภูมิเข้า 140 และ 180 องศาเซลเซียส (Table 1) พบว่า มีร้อยละผลผลิตอยู่ในช่วงร้อยละ 20.35 - 24.19 โดยการใช้อัตราส่วนของมอลโตเด็คซ์ตรินร่วมกับกัมอะราบิกในการเอนแคปซูเลชันมีร้อยละผลผลิตมากกว่าการใช้อัตราส่วนของมอลโตเด็คซ์ตรินเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Alvarez-Henao *et al.* (2018) รายงานว่ามีร้อยละผลผลิตอยู่ในช่วงร้อยละ 21.00 - 21.30 เมื่อให้ความร้อนอุณหภูมิเข้าที่  $185 \pm 5$  องศาเซลเซียส ในการศึกษาผลของการเอนแคปซูเลชันลูทีนด้วยมอลโตเด็คซ์ตรินร่วมกับกัมอะราบิก เนื่องจากสารสกัดแคโรทีนอยด์อยู่ในรูปของน้ำมันจึงทำให้มีโครงสร้างแบบไฮโดรลิพิด (Hydro-lipid) ในขณะที่มอลโตเด็คซ์ตรินมีความสามารถในการขึ้นรูปฟิล์ม และการเป็นอิมัลชันต่ำ ทำให้มีการจับกันของน้ำมันและโครงสร้างได้น้อย จึงส่งผลให้ร้อยละผลผลิตที่ได้น้อยกว่าการใช้ร่วมกันกับกัมอะราบิกที่มีโครงสร้างทั้งส่วนที่เป็นแบบไฮโดรลิพิดและไฮโดรฟิลิก (Tupuna *et al.*, 2018) นอกจากนี้ อุณหภูมิเข้าในการทำแห้งแบบพ่นฝอยยังส่งผลต่อร้อยละผลผลิตของผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน โดยการใช้อุณหภูมิสูงทำให้มีร้อยละผลผลิตน้อยกว่าอุณหภูมิต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เนื่องจากการถ่ายเทมวลของความร้อนในการระเหยระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งการใช้อุณหภูมิต่ำเกิดการห่อหุ้มได้ช้า จึงเกิดการสูญเสียร้อยละผลผลิตน้อย ทำให้การใช้อุณหภูมิต่ำมีร้อยละผลผลิตของผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันมากกว่าการใช้อุณหภูมิต่ำสูงในการทำแห้งแบบพ่นฝอย (Kaderides and Goula, 2019; Piñón-Balderrama *et al.*, 2020)

### การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกทิวิตี

ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกทิวิตีเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความคงตัว และอายุการเก็บรักษาของสารสำคัญในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่มี

ลักษณะเป็นผง โดยทั่วไปผงตัวอย่างที่ทำการเอนแคปซูเลชันน้ำมันควรมีปริมาณความชื้นไม่เกินร้อยละ 3 - 4 หรือ ค่าวอเตอร์แอกทิวิตีน้อยกว่า 0.6 (Aksoylu Özbek and Günç Ergönül, 2017; Alvarez-Henao *et al.*, 2018) ซึ่งจากการศึกษาในงานวิจัยนี้ (Figure 1) พบว่า อุณหภูมิเข้าของการทำแห้งแบบพ่นฝอย และอัตราส่วนของมอลโตเด็คซ์ตรินและกัมอะราบิกส่งผลต่อปริมาณความชื้น และค่าวอเตอร์แอกทิวิตี โดยการใช้อุณหภูมิเข้า 140 องศาเซลเซียส มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 1.84 - 2.48 ในขณะที่การใช้อุณหภูมิเข้า 180 องศาเซลเซียส มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 1.03 - 1.75 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tolun *et al.* (2016) รายงานว่า การใช้อุณหภูมิสูงในการพ่นฝอย ทำให้อัตราการถ่ายเทความร้อนภายในอนุภาคสูงขึ้นนำไปสู่การระเหยของน้ำได้รวดเร็วขึ้น จึงทำให้ความชื้นของผงตัวอย่างที่ใช้อุณหภูมิเข้า 180 องศาเซลเซียส มีปริมาณความชื้นน้อยกว่าการใช้อุณหภูมิเข้า 140 องศาเซลเซียส (Lourenco *et al.*, 2020) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาถึงผลของอัตราส่วนของสารห่อหุ้ม พบว่าการใช้มอลโตเด็คซ์ตรินร่วมกับกัมอะราบิกในสัดส่วนที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกทิวิตีลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เนื่องจากมอลโตเด็คซ์ตรินมีโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งเป็นหมู่ที่ชอบน้ำ จึงทำให้โมเลกุลของน้ำสามารถยึดติดกับหมู่ไฮดรอกซิลของมอลโตเด็คซ์ตรินได้ดี ดังนั้นการใช้อัตราส่วนของมอลโตเด็คซ์ตรินเป็นสารห่อหุ้มเพียงอย่างเดียว มีปริมาณความชื้นมากกว่าการใช้อัตราส่วนของมอลโตเด็คซ์ตรินร่วมกับกัมอะราบิกในสัดส่วนที่เพิ่มขึ้น (Archaina *et al.*, 2019)

### การวิเคราะห์ปริมาณบีตา-แคโรทีนและปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

ทำการวิเคราะห์ปริมาณบีตา-แคโรทีนและปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดของผงที่ได้จากการเอนแคปซูเลชันสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายเกลียวทอง (Table 2) พบว่า การใช้อุณหภูมิต่ำ (140 องศาเซลเซียส) มีปริมาณบีตา-แคโรทีน และปริมาณแคโรทีนอยด์มากกว่าการใช้อุณหภูมิสูง (180 องศาเซลเซียส) ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งการใช้อัตราส่วนของมอลโตเด็คซ์ตริน เพียงชนิดเดียวที่

Table 1. Yield of encapsulated powders with different inlet temperature and wall material ratio of maltodextrin (MD) and gum arabic (GA)

Wall material ratio (MD : GA)	Inlet temperature (°C)	Yield of encapsulated powders (%)
2.0 : 0.0	140	22.95 ± 1.16 <sup>ab</sup>
1.5 : 0.5	140	22.87 ± 0.84 <sup>ab</sup>
1.0 : 1.0	140	24.19 ± 1.46 <sup>a</sup>
2.0 : 0.0	180	20.35 ± 0.38 <sup>c</sup>
1.5 : 0.5	180	21.05 ± 1.07 <sup>c</sup>
1.0 : 1.0	180	22.07 ± 0.50 <sup>bc</sup>

<sup>a-c</sup> Common letters in the same columns represent a significant difference ( $P < 0.05$ )

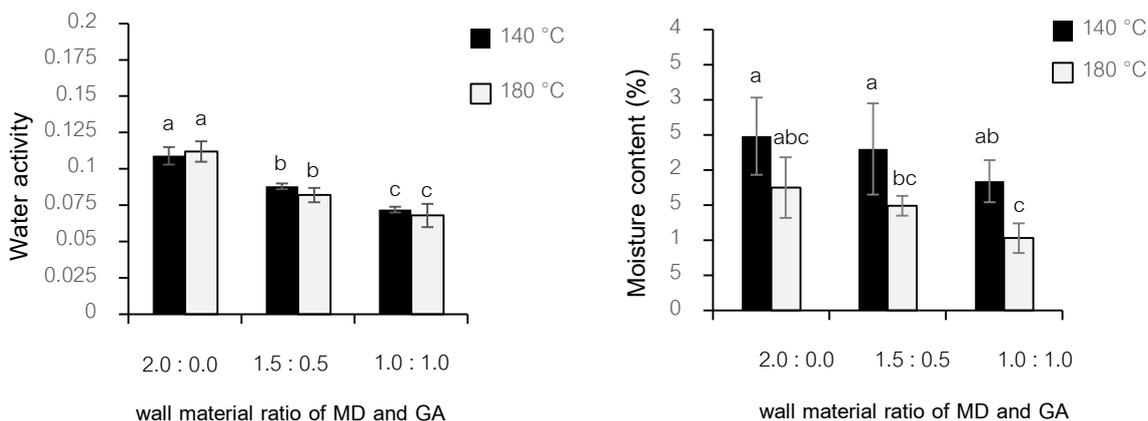


Figure 1. Water activity and moisture content of encapsulated powders with different inlet temperature and wall material ratio of maltodextrin (MD) and gum arabic ratio (GA)

อุณหภูมิเข้า 140 องศาเซลเซียส มีปริมาณ บีตา-แคโรทีน  $5.43 \pm 1.06 \mu\text{g/g}$  dry powder และปริมาณ แคโรทีนอยด์ทั้งหมด  $1.45 \pm 0.10 \text{mg/g}$  dry powder ในขณะที่อุณหภูมิเข้า 180 องศาเซลเซียส มีปริมาณ บีตา-แคโรทีน  $2.50 \pm 0.18 \mu\text{g/g}$  dry powder และ ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด  $1.14 \pm 0.03 \text{mg/g}$  dry powder เนื่องจากการใช้อุณหภูมิต่ำในการระเหยน้ำ ออก สามารถช่วยลดการสลายตัวของแคโรทีนอยด์ได้ ดีกว่าการใช้อุณหภูมิสูง (Correa-Filho *et al.*, 2019) จึงแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิต่ำในการทำแห้งแบบพ่น

ฝอยส่งผลต่อปริมาณบีตา-แคโรทีน และปริมาณแคโรทีน-นอยด์ทั้งหมดของผงที่ได้จากการเอนแคปซูเลชัน เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของมอลโตเด็คซ์ตริน และกัมอะราบิกที่ใช้เป็นสารห่อหุ้ม พบว่า ที่อุณหภูมิเข้า 140 องศาเซลเซียส ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย การใช้อัตราส่วนของมอลโตเด็คซ์ตรินต่อกัมอะราบิก 1.5:0.5 และ 1.0:1.0 มีปริมาณบีตา-แคโรทีน  $5.24 \pm 0.87$  และ  $4.77 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$  dry powder และปริมาณ แคโรทีน-นอยด์ในผงผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน  $1.66 \pm 0.05$  และ  $1.91 \pm 0.12 \text{mg/g}$  dry powder ตามลำดับ

Table 2.  $\beta$ -carotene content, total carotenoid content and encapsulation efficiency of encapsulated powders with different inlet temperature, maltodextrin (MD) and gum arabic ratio (GA)

Wall material ratio (MD : GA)	Inlet temperature (°C)	$\beta$ -carotene content ( $\mu\text{g/g}$ dry powder)	Total carotenoid content (mg/g dry powder)	Encapsulation efficiency (%)
2.0 : 0.0	140	$5.43 \pm 1.06^b$	$1.45 \pm 0.10^d$	$28.62 \pm 0.27^d$
1.5 : 0.5	140	$5.24 \pm 0.87^{bc}$	$1.66 \pm 0.05^c$	$32.54 \pm 0.95^c$
1.0 : 1.0	140	$4.77 \pm 0.55^{bc}$	$1.91 \pm 0.12^b$	$39.69 \pm 2.48^b$
2.0 : 0.0	180	$2.50 \pm 0.18^d$	$1.14 \pm 0.03^e$	$19.97 \pm 0.43^f$
1.5 : 0.5	180	$4.11 \pm 0.42^c$	$1.49 \pm 0.04^d$	$26.92 \pm 0.73^e$
1.0 : 1.0	180	$6.97 \pm 0.52^a$	$2.50 \pm 0.16^a$	$47.34 \pm 2.96^a$

<sup>a-f</sup> Common letters in the same columns represent a significant difference ( $P < 0.05$ )

เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิเข้า 180 องศาเซลเซียส ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย ที่อัตราส่วนของมอลโตเด็คซ์ตรินต่อกัมอะราบิก 1.5:0.5 และ 1.0:1.0 มีปริมาณบีตา-แคโรทีน  $4.11 \pm 0.42$  และ  $6.97 \pm 0.52 \mu\text{g/g}$  dry powder และปริมาณแคโรทีนอยด์ในผงผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน  $1.49 \pm 0.04$  และ  $2.50 \pm 0.16 \text{ mg/g}$  dry powder ตามลำดับ ดังนั้น ชนิดและอัตราส่วนของสารห่อหุ้มที่ใช้จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อปริมาณ บีตา-แคโรทีน และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดของผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันเช่นกัน เนื่องจากกัมอะราบิกมีคุณสมบัติในการสร้างฟิล์ม และเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ดี โดยกัมอะราบิกประกอบด้วยส่วนของอะราบินอกาแลคแทน (arabinogalactan) และไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งโปรตีนมีส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิกและไฮโดรฟิลิก สามารถยึดเกาะได้ทั้งส่วนที่เป็นน้ำกับน้ำมัน จึงทำหน้าที่ในการเป็นตัวประสาน ทำให้สามารถห่อหุ้มสารสำคัญในน้ำมันทานตะวันได้ดีกว่า (Bustos-Garza *et al.*, 2013; Oliyai *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2020) การเพิ่มสัดส่วนของกัมอะราบิกในสารห่อหุ้ม จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญได้ดีขึ้น เนื่องจากกัมอะราบิกสามารถสร้างฟิล์มได้ดี

และป้องกันการแตกของเมทริกซ์ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อลักษณะอนุภาคของตัวอย่างที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันอีกด้วย (Adejoro *et al.*, 2019; Kausadikar *et al.*, 2015)

#### การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลชัน

ประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลชันของสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายเกลียวทอง มีความสอดคล้องกับปริมาณบีตา-แคโรทีน และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดของผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน โดยปริมาณบีตา-แคโรทีน ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดของผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันมีปริมาณมาก ทำให้มีประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลชันที่ดีด้วย (Table 2) โดยจากผลการทดลอง พบว่า การใช้อุณหภูมิเข้า 180 องศาเซลเซียส ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย และอัตราส่วนของมอลโตเด็คซ์ตรินต่อกัมอะราบิก 1.0:1.0 มีปริมาณ บีตา-แคโรทีน  $6.97 \pm 0.52 \mu\text{g/g}$  dry powder ปริมาณแคโรทีนอยด์ในผงตัวอย่าง  $2.50 \pm 0.16 \text{ mg/g}$  dry powder และมีประสิทธิภาพการเอนแคปซูเลชัน ร้อยละ  $47.34 \pm 2.96$  ซึ่งเป็นสภาวะและอัตราส่วนของสารห่อหุ้มที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

**การวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานของอนุภาคผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน**

ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานของอนุภาคผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอยในอัตราส่วนของสารห่อหุ้มและอนุภาคน้ำตาลเข้าต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 2,000 เท่า ดัง Figure 2 พบว่า การใช้อนุภาคน้ำตาลเข้า 140 องศาเซลเซียส (Figure 2. A1-A3) มีอนุภาคของผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันเป็นลักษณะหยาบและหดรัดตัวลงในระดับหนึ่ง ในขณะที่อนุภาคน้ำตาลเข้า 180 องศาเซลเซียส (Figure 2. B1-B3) มีอนุภาคของผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน มีลักษณะเป็นทรงกลมผิวเรียบ นอกจากนั้นชนิดและอัตราส่วนของสารห่อหุ้มยังส่งผลต่อลักษณะสัณฐานของอนุภาคผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันเช่นกัน โดยการใช้น้ำตาลโตนด์ร่วมกับกัมอะราบิกในอัตราส่วน 1.0:1.0 มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มได้ดีที่สุด จะมีลักษณะของผงห่อหุ้มเป็นทรงกลมได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลโตนด์เป็นสารห่อหุ้มเพียงชนิด

เดียว เนื่องจากอัตราในการระเหยและอุณหภูมิในการทำแห้ง ทำให้เกิดการสูญเสียความชื้นและเย็นตัวลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เดียวกันเกิดการสร้างฟิล์มที่บริเวณผิวนอก ทำให้อนุภาคของผงที่เป็นทรงกลมมีความเว้าบนพื้นผิวหรือหดรัดตัวเมื่อใช้สารห่อหุ้มที่ต่างกัน ซึ่งการทำแห้งด้วยอุณหภูมิต่ำ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของน้ำช้าลง จึงใช้ระยะเวลาในการห่อหุ้มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผงเอนแคปซูเลทเป็นรอยเหี่ยวย่น และยุบตัว (Adejoro *et al.*, 2019; Alvarez-Henao *et al.*, 2018; Tolun *et al.*, 2016) ลักษณะสัณฐานของอนุภาคภายนอกของผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันเป็นสิ่งสำคัญที่บ่งบอกถึงความคงตัวและอายุการเก็บรักษาของสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่สามารถห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ได้ ทำให้ป้องกันสารสำคัญจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแสง หรือสภาพแวดล้อมภายนอก ทำให้ยืดอายุการเก็บรักษาสารสกัดแคโรทีนอยด์ได้นานขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ได้อย่างหลากหลาย (Burhan *et al.*, 2019)

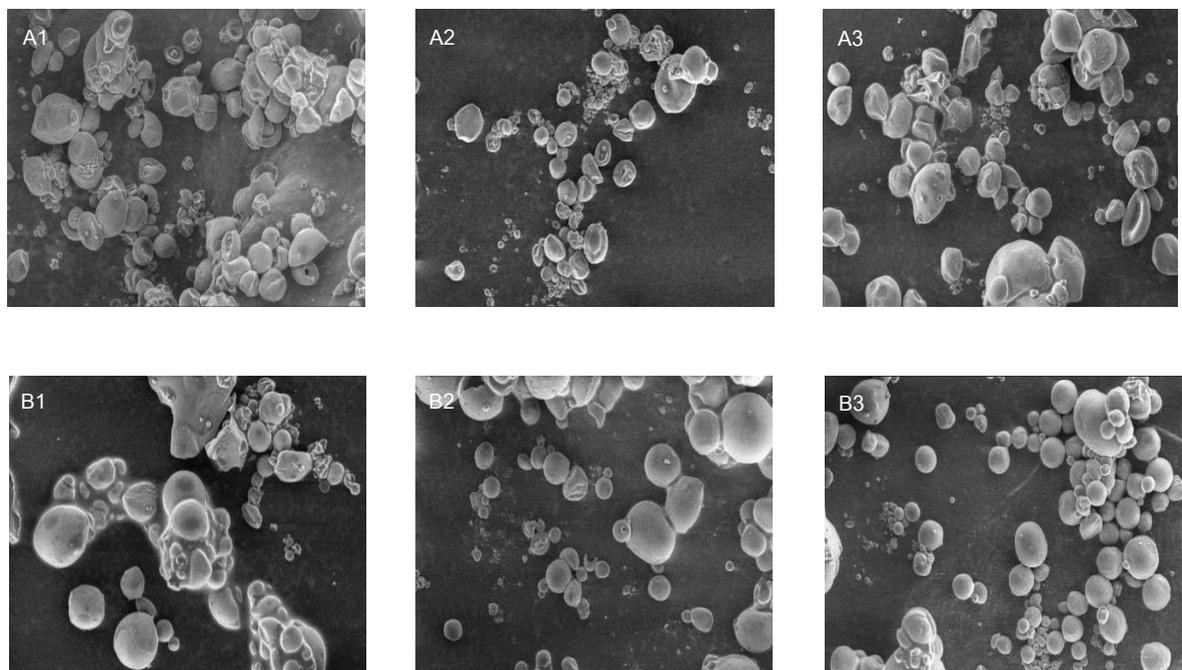


Figure 2. SEM micrograph of encapsulated powders at different inlet temperature (A) 140 °C and (B) 180 °C with different ratio of MD:GA (1= 2.0 : 0.0, 2= 1.5 : 0.5, 3= 1.0 : 1.0)

## สรุป

การเอนแคปซูเลชันสารสกัดแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายเกลียวทองด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยเปรียบเทียบชนิด และอัตราส่วนของสารห่อหุ้ม 2 ชนิด ได้แก่ มอลโตเด็คซ์ตรินและกัมอะราบิก ในอัตราส่วนโดยมวล 2.0 : 0.0, 1.5 : 0.5 และ 1.0 : 1.0 และอุณหภูมิขาเข้า 140 และ 180 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิขาเข้าและอัตราส่วนของสารห่อหุ้มเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อร้อยละผลผลิต ปริมาณความชื้น ปริมาณบีตา-แคโรทีน ปริมาณแคโรทีนอยด์ ทั้งหมด และประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลชันของผงที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิขาเข้า 180 องศาเซลเซียส และใช้มอลโตเด็คซ์ตรินต่อกัมอะราบิกเป็นสารห่อหุ้ม ในอัตราส่วนโดยมวล 1.0:1.0 มีประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลชันสูงที่สุด ซึ่งมีปริมาณบีตา-แคโรทีน 6.97  $\mu\text{g/g}$  dry powder และปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 2.50  $\text{mg/g}$  dry powder

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริม และสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ขอขอบคุณบริษัท กรีนไดมอนด์ จำกัด (บุญสม ฟาร์ม) ที่ให้ความอนุเคราะห์สาหร่ายเกลียวทอง และคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุน ใช้อุปกรณ์ และสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

Adejoro, F.A., A. Hassen and M.S. Thantsha. 2019. Characterization of starch and gum arabic-maltodextrin microparticles encapsulating acacia tannin extract and evaluation of their potential use in ruminant nutrition. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 32(7): 977-987.

Aksoylu Özbek, Z. and P. Günç Ergönül. 2017. A review on encapsulation of oils. Celal Bayar University Journal of Science 13(2): 293-309.

Alvarez-Henao, M.V., N. Saavedra, S. Medina, C.J. Cartagena, L.M. Alzate and J. Londono-Londono. 2018. Microencapsulation of lutein by spray-drying: Characterization and stability analyses to promote its use as a functional ingredient. Food Chemistry 256: 181-187.

Ambati, R.R., D. Gogisetty, R.G. Aswathanarayana, S. Ravi, P.N. Bikkina, L. Bo and S. Yuepeng. 2019. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 59(12): 1880-1902.

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. Association of the Official Analysis Chemists, Inc., Washington, D.C.

Archaina, D., F. Vasile, J. Jiménez-Guzmán, L. Alamilla-Beltrán and C. Schebor. 2019. Physical and functional properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract spray dried with maltodextrin-gum arabic mixtures. Journal of Food Processing and Preservation 43(9): e14065, doi: 10.1111/jfpp.14065.

Assuncao, L.S., P.Q.M. Bezerra, V.S.H. Poletto, A.O. Rios, I.G. Ramos, C.D.F. Ribeiro, B.A.S. Machado, J.I. Druzian, J.A.V. Costa and I.L. Nunes. 2021. Combination of carotenoids from *Spirulina* and PLA/PLGA or PHB: New options to obtain bioactive nanoparticles. Food Chemistry 346: 128742, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128742.

- Bingula, R., C. Dupuis, C. Pichon, J.-Y. Berthon, M. Filaire, L. Pigeon and E. Filaire. 2016. Study of the effects of betaine and/or C-phycocyanin on the growth of lung cancer A549 cells *in vitro* and *in vivo*. Journal of Oncology 2016: 8162952, doi: 10.1155/2016/8162952.
- Burhan, A.M., S.M. Abdel-Hamid, M.E. Soliman and O.A. Sammour. 2019. Optimisation of the microencapsulation of lavender oil by spray drying. Journal of Microencapsulation 36(3): 250-266.
- Bustos-Garza, C., J. Yáñez-Fernández and B.E. Barragán-Huerta. 2013. Thermal and pH stability of spray-dried encapsulated astaxanthin oleoresin from *Haematococcus pluvialis* using several encapsulation wall materials. Food Research International 54(1): 641-649.
- Correa-Filho, L.C., M.M. Lourenco, M. Moldao-Martins and V.D. Alves. 2019. Microencapsulation of  $\beta$ -carotene by spray drying: Effect of wall material concentration and drying inlet temperature. International Journal of Food Science 2019: 8914852, doi: 10.1155/2019/8914852.
- Elik, A., D.K. Yanik, and F. Göğüş. 2020. Microwave-assisted extraction of carotenoids from carrot juice processing waste using flaxseed oil as a solvent. LWT - Food Science and Technology 123: 109100, doi: 10.1016/j.lwt.2020.109100.
- Finamore, A., M. Palmery, S. Bensehaila and I. Peluso. 2017. Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly *Spirulina*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2017: 3247528, doi: 10.1155/2017/3247528.
- Hiranvarachat, B., S. Devahastin, N. Chiewchan and G.S.V. Raghavan. 2013. Structural modification by different pretreatment methods to enhance microwave-assisted extraction of  $\beta$ -carotene from carrots. Journal of Food Engineering 115(2): 190-197.
- Kaderides, K. and A.M. Goula. 2019. Encapsulation of pomegranate peel extract with a new carrier material from orange juice by-products. Journal of Food Engineering 253: 1-13, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2019.02.019.
- Kang, Y.-R., Y.-K. Lee, Y.J. Kim and Y.H. Chang. 2019. Characterization and storage stability of chlorophylls microencapsulated in different combination of gum arabic and maltodextrin. Food Chemistry 272: 337-346.
- Kausadikar, S., A.D. Gadhave and J. Waghmare. 2015. Microencapsulation of lemon oil by spray drying and its application in flavour tea. Advances in Applied Science Research 6(4): 69-78.
- Kiokias, S., C. Proestos and T. Varzakas. 2016. A review of the structure, biosynthesis, absorption of carotenoids-analysis and properties of their common natural extracts. Current Research in Nutrition and Food Science 4 (Special Issue 1): 25-37.
- Kupan, S., H. Hamid, A. Kulkarni and M. Yusoff. 2016. Extraction and analysis of beta-carotene recovery in CPO and oil palm waste by using HPLC. ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences 11(4): 2184-2188.

- Liang, R., C.F. Shoemaker, X. Yang, F. Zhong and Q. Huang. 2013. Stability and bioaccessibility of  $\beta$ -carotene in nanoemulsions stabilized by modified starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(6): 1249-1257.
- Lourenco, S.C., M. Moldao-Martins and V.D. Alves. 2020. Microencapsulation of pineapple peel extract by spray drying using maltodextrin, inulin, and arabic gum as wall matrices. *Foods* 9(6): 718, doi: 10.3390/foods9060718.
- Oliyai, N., M. Moosavi-Nasab, A.M. Tamaddon and M. Fazaeli. 2020. Double encapsulation of fucoxanthin using porous starch through sequential coating modification with maltodextrin and gum arabic. *Food Science and Nutrition* 8(2): 1226-1236.
- Park, W.S., H.-J. Kim, M. Li, D.H. Lim, J. Kim, S.-S. Kwak, C.-M. Kang, M.G. Ferruzzi and M.-J. Ahn. 2018. Two classes of pigments, carotenoids and C-Phycocyanin, in spirulina powder and their antioxidant activities. *Molecules* 23(8): 2065, doi: 10.3390/molecules23082065.
- Piñón-Balderrama, C.I., C. Leyva-Porras, Y. Terán-Figueroa, V. Espinosa-Solís, C. Álvarez-Salas and M.Z. Saavedra-Leos. 2020. Encapsulation of Active Ingredients in Food Industry by Spray-Drying and Nano Spray-Drying Technologies. *Processes* 8(8): 889, doi: 10.3390/pr8080889.
- Ribeiro, A.M., M. Shahgol, B.N. Estevinho and F. Rocha. 2020. Microencapsulation of vitamin A by spray-drying, using binary and ternary blends of gum arabic, starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids* 108: 106029, doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106029.
- Soukoulis, C. and T. Bohn. 2018. A comprehensive overview on the micro- and nano-technological encapsulation advances for enhancing the chemical stability and bioavailability of carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58(1): 1-36.
- Tolun, A., Z. Altintas and N. Artik. 2016. Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *Journal of Biotechnology* 239: 23-33.
- Tupuna, D.S., K. Paese, S.S. Guterres, A. Jablonski, S.H. Flôres and A. de Oliveira Rios. 2018. Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. *Industrial Crops and Products* 111: 846-855.
- Wu, Q., L. Liu, A. Miron, B. Klimova, D. Wan and K. Kuca. 2016. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: An overview. *Archives of Toxicology* 90(8): 1817-1840.

## คำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ (ต่อ)

1.7 กรณีอ้างอิงเป็นภาษาอื่น เช่น ภาษาไทย ต้องแปลเป็นภาษาอังกฤษ และเปลี่ยนปี พ.ศ. เป็น ปี ค.ศ.

1.8 กรณีเป็นหน่วยงาน ได้แก่ หน่วยงานราชการ สมาคม สถาบัน สำนักงาน ฯลฯ ให้ใช้ชื่อหน่วยงานเต็มในการอ้างอิงทั้งบทความ ตัวอย่าง (Department of Agricultural Extension, 1995).....

1.9 กรณีมีผู้แต่งที่มีทั้งบุคคลและเป็นหน่วยงาน ให้ใส่ชื่อผู้แต่งตามด้วยหน่วยงาน และใช้ ( ) คั่นระหว่างชื่อผู้แต่งและหน่วยงาน

### 2. การเขียนเอกสารอ้างอิง มีรูปแบบการเขียนมีดังนี้

**วารสาร (Journals)** อ้างอิงวารสารที่มีความทันสมัยและเป็นปัจจุบันมากที่สุด

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. ชื่อวารสาร (เขียนเต็ม) ปีที่(ฉบับที่): เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าที่สิ้นสุด.

TH: Muthita, W. and N. Kuanprasert. 2004. Cytogenetics and flower color inheritance of fuchsias. *Journal of Agriculture* 20(1): 10-18. (in Thai)

EN: Barcenas, N.M., T.R. Unruh and L.G. Neven. 2005. DNA diagnostics to identify internal feeders (Lepidoptera: Tortricidae) of pome fruits of quarantine importance. *Journal of Economic Entomology* 98(2): 299-306.

ในกรณีที่เป็นการวารสารออนไลน์ ไม่สามารถระบุเลขหน้าเริ่มต้นและเลขหน้าสิ้นสุดได้ ให้ระบุ doi แทน

EN: Bukhari, T., W. Takken and C.J.M. Koenraadt. 2011. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasites & Vectors* 4: 23, doi: 10.1186/1756-3305-4-23.

**หนังสือ และตำรา (Books & Textbooks)**

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อหนังสือ. สำนักพิมพ์, เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

TH: Ek-amnuay, P. 2016. Diseases and Pests of Economic Importance. 5<sup>th</sup> ed. Amarin Printing and Publishing PCL, Bangkok. 704 p. (in Thai)

EN: Gullan, P.J. and P.S. Cranston. 2005. The Insects: An Outline of Entomology. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Publishing, Malden. 505 p.

**เรื่องย่อในตำราหรือหนังสือที่มีผู้เขียนแยกเรื่องเขียน และมีบรรณาธิการ**

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่องย่อ. หน้า เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าที่สิ้นสุด. ใน: ชื่อบรรณาธิการ (บก.). ชื่อหนังสือ. สำนักพิมพ์, เมืองที่พิมพ์.

TH: Krainiksh, S. and W. Namruangsri. 1997. Integrated pest control of mango. pp. 137-144. *In: K. Jumroenma (ed.). Integrated Pest Control. The Agricultural Cooperative Federation of Thailand, Ltd., Bangkok. (in Thai)*

EN: Kubo, T. 2003. Molecular analysis of the honeybee sociality. pp. 3-20. *In: T. Kikuchi, N. Azuma and S. Higashi (eds.). Gene, Behaviors and Evolution of Social Insects. Hokkaido University Press, Sapporo.*

**รายงานการประชุม สัมมนา (Reports and Proceedings)**

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่องย่อ. หน้า เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าที่สิ้นสุด. ใน: รายงานการประชุม สัมมนา. สถานที่จัดประชุม.

TH: Tantarawongsa, P. and D. Ketrot. 2017. Diuron residue in soils under pineapple cultivation. pp. 17-24. *In: Proceedings of 55<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference: Plants, Animals, Veterinary Medicine, Fisheries, Agricultural Extension and Home Economics, Bangkok. (in Thai)*

EN: Feigenbaum, S., A. Bar-Tal and D.L. Sparks. 1990. Dynamics of soil potassium in multicationic systems. pp. 145-161. *In: Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Colloquium of the International Potash Institute, Bern.*

**วิทยานิพนธ์ (Thesis)**

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. ระดับวิทยานิพนธ์. สถาบันการศึกษา, เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

TH: Maneepong, A. 2004. Effects of ozone treatments on postharvest quality and pesticide residue of Mandarin cv. Sai Nam Pung. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 100 p. (in Thai)

EN: Liquido, N.J. 1982. Population ecology of *Cyrtorhinus lividipennis* Reuter (Heteroptera: Miridae). Ph.D. Dissertation. University of Hawaii, Honolulu. 175 p.

**เอกสารวิชาการอื่น ๆ**

ชื่อผู้เขียน หรือหน่วยงาน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่องหรือชื่อหนังสือ. ประเภทของเอกสาร. สถาบันหรือหน่วยงานที่จัดพิมพ์, เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

TH: Shutsirung, A., C. Santasup and K. Kunasakdakul. 2010. Screening of bio-organic inputs for high quality tea production. Final Report. The Thailand Research Fund, Bangkok. 109 p. (in Thai)

EN: Siriphontangmun, S., U. Nounart, S. Rounchaiapikun and S. Srijuntra. 2016. Insect Pests of Vegetable, Mushroom and Cut Flower. Technical Document. Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok. 74 p. (in Thai)

**สื่ออิเล็กทรอนิกส์**

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. (ระบุออนไลน์). แหล่งข้อมูล: ที่อยู่ของไฟล์หรือเว็บไซต์ (URL) (เดือน วันที่, ปีที่ สืบค้นข้อมูล).

(ในกรณีที่ไม่มีข้อมูลปีที่ตีพิมพ์ ให้ระบุเป็นปีที่เข้าไปสืบค้นข้อมูล)

TH: Department of Agricultural Extension. 2005. Hydroponics. (Online). Available: <http://www.doae.go.th/proster/nondin/htm> (April 21, 2005). (in Thai)

EN: Marja, L.L. 2000. How Mycostop<sup>®</sup> acts in the control of fungal plant diseases. (Online). Available: [http://www.shkagro.com/otros/efecto\\_funcicida.pdf](http://www.shkagro.com/otros/efecto_funcicida.pdf) (April 1, 2016).

**การส่งต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์**

โปรดตรวจสอบบทความต้นฉบับให้เป็นไปตามคำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ พร้อมแนบแบบฟอร์มนำส่งบทความเพื่อพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารเกษตร (<https://li01.tci-thaijo.org/index.php/joacmu/information/authors>) โดยนำส่งบทความผ่านทาง online เท่านั้น ที่ <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/joacmu/index>

**การพิจารณาบทความ**

1) ต้นฉบับที่ไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับของวารสารเกษตร จะไม่ได้รับการพิจารณา

2) ทุกบทความที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารเกษตร ต้องผ่านการประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิ ไม่น้อยกว่า 3 ท่าน

3) กองบรรณาธิการขอสงวนสิทธิ์ในการตรวจและแก้ไขบทความทุกเรื่องที่เราเห็นสมควรตีพิมพ์ในวารสารเกษตร (The Editorial Board claims a right to review and correct all articles submitted for publishing in Journal of Agriculture)

4) หากบทความใดขาดการติดต่อเกิน 6 เดือน กองบรรณาธิการจะดำเนินการลบบทความดังกล่าวออกจากระบบ ThaiJo 2.0 เพื่อให้การจัดทำวารสารเกษตรเป็นไปด้วยความเรียบร้อยและมีคุณภาพ

5) ผู้เขียนไม่สามารถดำเนินการร้องขอเพิ่มชื่อผู้เขียนบทความหรือขอลบชื่อผู้เขียนบทความในวารสารเกษตรได้ หากมีความประสงค์ที่จะเปลี่ยนชื่อ First author หรือ Corresponding author สามารถดำเนินการได้ (เปลี่ยนชื่อภายในบทความเท่านั้น ไม่สามารถเพิ่มหรือเปลี่ยนเป็นชื่อผู้เขียนท่านอื่นนอกเหนือจากที่ปรากฏในบทความต้นฉบับได้) ทั้งนี้การร้องขอเปลี่ยนแปลงดังกล่าว สามารถดำเนินการได้ในระหว่างกระบวนการพิจารณาบทความเท่านั้น หากได้รับเอกสารตอบรับการตีพิมพ์เรียบร้อยแล้วไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้

**สำนักงานและการติดต่อสอบถาม (Office and Inquiries)**

กองบรรณาธิการวารสารเกษตร

งานบริหารงานวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
จ.เชียงใหม่ 50200 โทร. 0 5394 4089-92 ต่อ 12 โทรสาร 0 5394 4089-92 ต่อ 12

Editorial Board, Journal of Agriculture

Division of Research and International Affairs, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand Tel: 0 5394 4089-92 ext. 12

Fax: 0 5394 4089-92 ext. 12 Email: [agjournal22@gmail.com](mailto:agjournal22@gmail.com)

# JOURNAL OF AGRICULTURE

A Technical Journal of Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

## Volume 40, Issue 1 January - April 2024

Effects of Goat Manure-Biochar Compost on Soil Microbial Activities Relating Soil Carbon Sequestration Bhanudacha Kamolmanit, Siwaporn Paengkom and Natthakittiya Paiboon.....	1
Effects of Phosphorus on Growth and Development, and Quality of Crown of Thorns ( <i>Euphorbia milii</i> ) Wutthipong Pangjai and Saychol Sukyankij.....	17
Concentration of Heavy Metals in <i>Andrographis paniculata</i> (Burm. f.) Wall. ex Nees Growing Area, Nakhon Pathom Province Kavalin Srichan, Tawatchai Inboonchuay, Sirisuda Bootpetch, and Thamthawat Saengngam.....	29
Effects of LED Light and Vernalization on Growth and Development, and Hormonal Changes in Strawberry cv. Praratchatan 80 Yossatorn Pechthong and Daruni Naphrom.....	47
Aqueous Extracts from Climbing Weeds with Antioxidants and Inhibitory Activities of Enzymes Related to Hyperglycemia and Obesity Jamnian Chompoo, Boonkhwan Kidsom, Waraporn Tipkostonwong and Monsicha Kumkongkeaw.....	61
Relationships Between Vegetation Density and Preference of Bioretention Landscapes: The Roles of Perceived Naturalness and Safety in the United States Pongsakorn Suppakittpaisarn, Ekachai Yaipimol, Chulalux Wanitchayapaisit, Vipavee Surinseng and Nadchawan Charoenlerthanakit.....	75
Detection of Viruses Caused Leaf Spot and Crinkle Leaf in Strawberry cv. Praratchatan 80 Growing in Fang District, Chiang Mai Province Noppadon Pontharangsee, Sirinapa Chaipon, Prapaipit Suwitchayanon, Kaewalin Kunasakdakul and Niwat Khantho.....	85
Socio-economic Factors Influencing Good Agricultural Practices of Herbal Farmers in Buriram Province Parichat Buakaew and Chaiteera Panpakdee.....	101
Farmers' Perceptions on Effects of Rice Stubble and Straws Burning in Kamalasai District, Kalasin Province Wiranut Kudthaleang and Sukanlaya Choenkwan.....	113
The First Laboratory Evaluation of Potential Entomopathogenic Fungi for Controlling the Pink Stem Borer <i>Sesamia inferens</i> (Walker) Lepidoptera: Noctuidae) in Thailand Siriya Kumpiro and Sopon Uraichuen.....	127
Effects of Hemp Extract Supplementation in Semen Extender on Boar Semen Quality at Chilled Temperature Kanyanat Chaiwan, Watee Kongbuntad, Phacharaporn Tadee, Tawan Chaisungnoen, Wannaluk Thawornand, Patcharee Promptan and Wiwat Pattanawong.....	139
Nutrient Composition and Metabolizable Energy of Poultry Offal Waste in Pradu Hang Dam and Royal Project Black Bone Chicken Teerached Pingkasun, Waruntorn Sittisoron, Boonlom Cheva-Isarakul and Suchon Tangtaweewipat.....	153
Effects of Gamma-Aminobutyric Acid Supplementation in Diet on Transportation Stress and Growth Performance of Whiteleg Shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) Yuparat Inbumrung, Orapint Jintasataporn, Srinoy Chumkam and Supawit Triwutanon.....	169
Effects of Dietary Autolysate Yeast Supplementation on Growth Performance and Immunity After Stress Condition by Vibriosis Infection in Whiteleg Shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) Phatcharaphorn Janrot, Orapint Jintasataporn, Srinoy Chumkam and Supawit Triwutanon.....	185
Encapsulation of Carotenoid Extract from Spirulina by Spray Drying Technique Supavadee Phonyotha and SuthatSurawang.....	199