



การประชุมสวนสุนันทาวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 2
“วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และนวัตกรรม เพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน”

The 2nd Suan Sunandha National and International Academic
Conference on Science and Technology (SsSci 2019)

“Science, Technology and Innovation
for Sustainable Development”

วันศุกร์ที่ 8 พฤศจิกายน 2562
8th November 2019

ณ โรงแรมเดอะรอยัลริเวอร์ กรุงเทพมหานคร
The Royal River Hotel, Bangkok, Thailand

ความเป็นมาของการประชุมสวนสุนันทาวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 2

“วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และนวัตกรรม เพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน”

หลักการและเหตุผล

มหาวิทยาลัยราชภัฏเน้นการผลิตบัณฑิตที่มีคุณภาพเป็นเลิศโดยกระบวนการจัดการเรียนการสอนเพื่อการพัฒนาชุมชนและท้องถิ่นให้มีความเข้มแข็ง และยั่งยืน ตามยุทธศาสตร์ใหม่มหาวิทยาลัยราชภัฏเพื่อการพัฒนาท้องถิ่นตามพระบรมราโชบายของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวรัชการที่ 10 และแผนยุทธศาสตร์ระยะ 20 ปี (พ.ศ. 2560 – 2579) โดยมีการขับเคลื่อนงานวิจัย สร้างความรู้และนวัตกรรมให้มีคุณภาพและได้มาตรฐานสากล ให้บริการทางวิชาการ ถ่ายทอดเทคโนโลยี น้อมนำแนวพระราชดำริ สร้างเครือข่ายและความร่วมมือกับภาคประชาชน ชุมชน ท้องถิ่น และผู้ประกอบการในการจัดการศึกษาสู่การเปลี่ยนแปลง และการพัฒนาก้าวหน้า อย่างต่อเนื่องและยั่งยืน ทัดเทียมกับนานาชาติอารยประเทศ ประกอบกับประเทศไทยมีนโยบายการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศที่ขับเคลื่อนด้วยนวัตกรรม (Thailand 4.0) โดยมีแนวคิดหลักคือ เปลี่ยนจากการขับเคลื่อนประเทศด้วยภาคอุตสาหกรรมไปสู่การขับเคลื่อนด้วยเทคโนโลยี การพัฒนาวิชาการ ความคิดสร้างสรรค์ นวัตกรรม วิทยาศาสตร์เทคโนโลยี การวิจัยและพัฒนาแล้วต่อยอดสู่เทคโนโลยีอุตสาหกรรมในหลายกลุ่มเป้าหมาย เช่น กลุ่มอาหาร เกษตร และเทคโนโลยีชีวภาพ กลุ่มสาธารณสุข สุขภาพ และเทคโนโลยีทางการแพทย์ กลุ่มดิจิทัล เทคโนโลยีอินเทอร์เน็ตที่เชื่อมต่อและบังคับอุปกรณ์ต่าง ๆ ปัญญาประดิษฐ์และเทคโนโลยีสมองกลฝังตัว รวมทั้งกลุ่มอุตสาหกรรมสร้างสรรค์ วัฒนธรรม และบริการที่มีมูลค่าสูง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ตระหนักถึงความสำคัญของการศึกษาวิจัยและพัฒนา เพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ การพัฒนาการเรียนการสอน และการวิจัยประยุกต์ บนพื้นฐานการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรของประเทศอย่างมีประสิทธิภาพ ได้ส่งเสริมและสนับสนุนการสร้างงานวิจัย และสร้างความร่วมมือทางวิชาการของนักศึกษา คณาจารย์ นักวิจัย และนักวิชาการจากสถาบันอุดมศึกษาในประเทศ และเครือข่ายมหาวิทยาลัยที่ทำข้อตกลงทางวิชาการ (MoU) ในต่างประเทศ รวมทั้งหน่วยงานเครือข่ายทั้งภาครัฐและเอกชน เพื่อให้ผลิตงานวิจัยที่มีคุณค่าต่อสังคม รวมทั้งส่งเสริมให้เกิดการเผยแพร่ผลงานวิจัยที่มีประโยชน์สู่สาธารณะ เพื่อก่อให้เกิดการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ด้านวิชาการ และการพัฒนา การต่อยอดสู่การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์หรืออุตสาหกรรม นำไปสู่เป้าหมายเพื่อการพัฒนาได้อย่างยั่งยืน

จากความสำคัญดังกล่าว ทางคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจึงได้จัดทำโครงการประชุมสวนสุนันทาวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 2 “วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และนวัตกรรม เพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน” ขึ้น เพื่อเป็นเวทีในการแลกเปลี่ยนประสบการณ์และความรู้ของนักศึกษา คณาจารย์ นักวิจัย และนักวิชาการจากสถาบันอุดมศึกษา รวมทั้งหน่วยงานที่สนใจทั้งภาครัฐและเอกชนทั้งในและต่างประเทศ ในสาขาวิชาต่าง ๆ จำนวน 8 กลุ่มสาระ ได้แก่

- 1) คอมพิวเตอร์ และเทคโนโลยีสารสนเทศ
- 2) คณิตศาสตร์ และสถิติ
- 3) ฟิสิกส์ และพลังงาน
- 4) เคมี และนิติวิทยาศาสตร์

- 5) ชีววิทยา เทคโนโลยีชีวภาพ และจุลชีววิทยา
- 6) วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
- 7) วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร และคหกรรมศาสตร์
- 8) วิทยาศาสตร์การกีฬา และสุขภาพ

วัตถุประสงค์ของการประชุมสนันทาวิชาการ

1. เพื่อเป็นเวทีในการเผยแพร่ผลงานวิจัยและผลงานสร้างสรรค์ในระดับชาติและนานาชาติ
2. เพื่อส่งเสริมให้นักศึกษา คณาจารย์ นักวิจัย และนักวิชาการจากสถาบันอุดมศึกษา รวมทั้งหน่วยงานที่สนใจทั้งภาครัฐและเอกชน ตระหนักถึงความสำคัญของงานวิจัยและการเผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ
3. เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยและผลงานสร้างสรรค์ในระดับชาติและนานาชาติ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการประชุมสนันทาวิชาการ

1. เป็นเวทีในการเผยแพร่ผลงานวิจัยและผลงานสร้างสรรค์ในระดับชาติและนานาชาติ
2. ส่งเสริมให้นักศึกษา คณาจารย์ นักวิจัย และนักวิชาการจากสถาบันอุดมศึกษา รวมทั้งหน่วยงานที่สนใจทั้งภาครัฐและเอกชน ตระหนักถึงความสำคัญของงานวิจัยและการเผยแพร่ผลงานวิจัย ในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ
3. การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยและผลงานสร้างสรรค์ในระดับชาติและนานาชาติ



Conference Background

The 2nd Suan Sunandha National and International Academic Conference on Science and Technology (SsSci2019) “Science, Technology and Innovation for Sustainable Development”



The 2nd Suan Sunandha National and International Academic Conference on Science and Technology, entitled "Science, Technology and Innovation for Sustainable Development" is the prestigious event organizes by Faculty of Science and Technology, SSRU, to provide an excellent platform for the national and international academicians, researchers, industrial participants and students to share their findings and establish collaborations with each other's and experts. The conference will be held in Bangkok, Thailand on 8th November 2019.

The key intention of this conference is to provide opportunity for the national and international participants to share their ideas and experiences. In addition this conference will help the delegates and participants to establish research or business relations and future collaborations in their career path nationally and internationally. We hope the outcome will lead the major impact on updating the knowledge and research base scopes of conference's eight major topics.

This Conference is sponsored and organized by Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University. The conference would offer a large number of invited lectures and presentations from distinguished speakers. The best paper awards will be given for the papers judged to make the most significant contribution to the conference.

This conference provides respectable platform and decent opportunity for participants to exchange knowledge, share experiences and develop connections with faculty members, researchers from academia, industry, government and students. The conference includes eight major research areas:

1. Computer Science and Information Technology
2. Mathematics and Statistics
3. Physics and Energy
4. Chemistry and Forensic Science
5. Biology, Biotechnology, and Microbiology
6. Environmental Science and Technology
7. Food Science and Technology, and Home Economics
8. Sports and Health Science

เจ้าภาพร่วม และผู้สนับสนุน Conference Co-hosts and Supporters

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
Office of the Higher Education Commission

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
National Research council of Thailand

Faculty of Science
University of Hradec Kralove (Czech Republic)

Okayama University (Japan)

Ho Chi Minh City Open University
(Vietnam)

Kazan Federal University
(Russian Federation)

Chia Nan University of Pharmacy and Science
(Taiwan)

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
Chiang Mai Rajabhat University

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช
Nakhon Si Thammarat Rajabhat University

มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง
Lampang Rajabhat University

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
Rajabhat Mahasarakham University

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร
Sakonnakon Rajabhat University

มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์
Surindra Rajabhat University

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University



**Kazan Federal
UNIVERSITY**



Faculty of Science and Technology
Chiang Mai Rajabhat University





SsSci^{2nd conference}2019

เจ้าภาพร่วม และผู้สนับสนุน Conference Co-hosts and Supporters

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี
Thepsatri Rajabhat University



มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
Nakhonratchasima Rajabhat University



มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี
Phetchaburi Rajabhat University



บริษัท อาไลติส เยน่า ฟารีอีสต์ (ประเทศไทย) จำกัด
Analytik Jena Far East (Thailand) Ltd.



บริษัท ฮิสโตเซนเตอร์ จำกัด
Histocenter Co.,Ltd (Thailand)
บริษัท สิทธิพรแอสโซซิเอต จำกัด
Sithiphorn Associates Co.,Ltd.



บริษัท วนาไซเอนซ์ จำกัด
Vana Science Co.,Ltd.



บริษัท ยูไนเต็ด แอนนาลิส แอนท์ เอนจิเนียริง
คอนซัลแตนท์ จำกัด
United Analyst and Engineering Consultant Co., Ltd.



บริษัท เมอร์ค จำกัด
Merck Ltd.



บริษัท ซายน์ สเปค จำกัด
Scispec Co., Ltd.



บริษัท เพอร์กิน เอลเมอร์ จำกัด
PerkinElmer Co., Ltd.



คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาและกลั่นกรองบทความ Conference Committee



กลุ่มคอมพิวเตอร์และเทคโนโลยีสารสนเทศ

- 1 รองศาสตราจารย์ ดร.พยุ่ง มีสัจ
Assoc. Prof. Dr. Phayung Meesad
- 2 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณเฑียร รัตนศิริวงศ์วุฒิ
Asst. Prof. Dr. Montean Rattanasirivongwut
- 3 รองศาสตราจารย์ ดร.พรฤดี เนติโสภาคกุล
Assoc. Prof. Dr. Ponrudee Netisopakul
- 4 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชฎิภัคค์ เขมวิมุตติวงศ์
Asst. Prof. Dr. Chutipuk Kemwimoottiwong
- 5 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมชัย ชื่นธวัช
Asst. Prof. Dr. Ronnachai Chuentawat
- 6 อาจารย์ ดร.นพดล ผู้มีจรรยา
Dr. Noppadon Phumeechaya
- 7 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิจิตรา จอมศรี
Assist. Prof. Dr. Pijitra Jomsri

- มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
King Mongkut's University of Technology North Bangkok
- มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
King Mongkut's University of Technology North Bangkok
- สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
- มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
Chiang Mai Rajabhat University
- มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
Nakhon Ratchasima Rajabhat University
- มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
Nakhon Pathom Rajabhat University
- มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
Suan Sunandha Rajabhat University

กลุ่มคณิตศาสตร์ สถิติ

- 1 รองศาสตราจารย์ ดร.ฉัฐไชย ลีนาวงศ์
Assoc. Prof. Dr. Chartchai Leenawong
- 2 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิโรจน์ ดีกัจจะ
Asst. Prof. Dr. Wirot Tikjha
- 3 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุรพา สิงหา
Asst. Prof. Dr. Boorapa Singha
- 4 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บงกช นิมตระกูล
Asst. Prof. Dr. Bongkoch Nimtrakul
- 5 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณพัทธ์ โสภีพันธ์
Asst. Prof. Dr. Nop Sopipan

- สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
- มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University
- มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
Chiang Mai Rajabhat University
- มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี
Thepsatri Rajabhat University
- มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
Nakhon Ratchasima Rajabhat University

กลุ่มฟิสิกส์ พลังงาน

- 1 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นฤปดี ศรีสังข์
Asst. Prof. Dr. Naruebodee Srisang
- 2 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นววรรณ ทองมี
Asst. Prof. Dr. Navavan Thongmee
- 3 อาจารย์ ดร. ชเนษฎ์ วิชาศิลป์
Dr. Chanade Wichasilp
- 4 อาจารย์ ดร.ปกรณ์ ปรีชาบุรณะ
Dr. Pakorn Preechaburana
- 5 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัณฑ์พัฒน์ กิตติอัครวาลย์
Asst. Prof. Dr. Kanthapat Kitti-atchawan
- 6 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมรุตัย งามะพัฒน์
Asst. Prof. Dr. Kheamrutai Thamaphat
- 7 รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ สังวรนันท์
Assoc. Prof. Dr. Narong Sangwanatee
- 8 รองศาสตราจารย์ ดร.อมรา อธิพงษ์
Assoc. Prof. Dr. Ammara Ittipongse

- สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
- มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University
- มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
Chiang Mai Rajabhat University
- มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
Thammasat University
- มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี
Thepsatri Rajabhat University
- มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
King Mongkut's University of Technology Thonburi
- มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
Suan Sunandha Rajabhat University
- มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
Suan Sunandha Rajabhat University



กลุ่มเคมี นิติวิทยาศาสตร์

1 ศาสตราจารย์ พลตำรวจตรีหญิง ดร.พัชรา สินลอยมา Prof. Pol .Maj. Gen. Patchara Sinloyma	โรงเรียนนายร้อยตำรวจ Royal Police Cadet Academy
2 รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอก วรัชช์ วิชชุวณิชช์ Assoc. Prof. Pol. Col. Witchuvanit Witchuvanit	โรงเรียนนายร้อยตำรวจ Royal Police Cadet Academy
3 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิพรรณ จันทร์มณี Asst. Prof. Dr. Rapiphun Janmanee	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University
4 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สาธิตา ทองพร้อม Asst. Prof. Dr. Saithan Thongphrom	มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต Phuket Rajabhat University
5 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สราวุธ สมนาม Asst. Prof. Dr. Sarawut Somnam	มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ Chiang Mai Rajabhat University
6 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัลลิกา สุขสำราญ Asst. Prof. Dr. Wallika Suksomran	มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี Thepsatri Rajabhat University
7 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนากร เปลื้องกลาง Asst. Prof. Dr. Thanakorn Pluangklang	มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา Nakhon Ratchasima Rajabhat University
8 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา วอนสวัสดิ์ Asst. Prof. Dr. Wanida Wonsawat	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
9 อาจารย์ ดร.พลอยทราย โอฮาม่า Dr. Ploysai Ohama	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University

กลุ่มชีววิทยา เทคโนโลยีชีวภาพ จุลชีววิทยา

1 รองศาสตราจารย์ ดร.มณีนี ตัญเจตมวงค์ Assoc. Prof. Dr. Kooranee Tuitemwong	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ Kasetsart University
2 รองศาสตราจารย์ ดร.อัชฌาณิน จงจิตวิมล Assoc. Prof. Dr. Touchkanin Jongjitvimol	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University
3 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติริน ก้อนคง Asst. Prof. Dr. Chisiri Konkong	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University
4 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กชนิภา อุดมทวี Asst. Prof. Dr. Kotchanipha Udomthawee	มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ Surindra Rajabhat University
5 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณ์ ปิ่นทอง Asst. Prof. Dr. Krit Pinthong	มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ Surindra Rajabhat University
6 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติเดชานรงค์ Asst. Prof. Dr. Kittisak Chotikadachanarong	มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ Chiang Mai Rajabhat University
7 อาจารย์ ดร.ภกกุล สังข์สุริยะ Dr.Pakkakul Sangsuriya	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
8 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทียมหทัย ชูพันธ์ Asst. Prof. Dr. Thiamhathai Choopan	มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา Nakhon Ratchasima Rajabhat University
9 อาจารย์ ดร.ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์ Dr.Triwit Rattanaojpong	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี King Mongkut's University of Technology Thonburi
10 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรพันธ์ อัจจิมาพร Asst. Prof. Dr. Amornpan Ajjimaporn	มหาวิทยาลัยมหิดล Mahidol University
11 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทนา กาญจน์กมล Asst. Prof. Dr. Chantana Kankamol	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
12 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อาชายุทธการ Asst. Prof. Dr. Piyada Achayuthakan	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
13 อาจารย์ ดร.วัฒนา พันธุ์พีช Dr.Wattana Panphut	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
14 Dr. Mohammad Bagher Javadi Nobandegani	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
15 Dr. Ha Thanh Dong	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University



กลุ่มวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมและเทคโนโลยี

1	รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ศิลพานันทกุล Assoc. Prof. Dr. Suthep Silapanuntakul	มหาวิทยาลัยมหิดล Mahidol University
2	รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจภรณ์ ประภักดี Assoc. Prof. Dr. Benjaphorn Prapagdee	มหาวิทยาลัยมหิดล Mahidol University
3	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ Asst. Prof. Dr. Charnwit Kositanont	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย Chulalongkorn University
4	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวนีย์ วิจิตรโกสุม Asst. Prof. Dr. Saowanee Wijitkosum	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย Chulalongkorn University
5	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธันวดี ศรีธาวีรัตน์ Asst. Prof. Dr. Thaunwadee Srithawirat	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University
6	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมณิจารีย์ สาริพันธ์ Asst. Prof. Dr. Khamanijaree Saripan	มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี Thepsatri Rajabhat University
7	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพบุณย์ แจ่มพงษ์ Assoc. Prof. Dr. Paiboon Jeamponk	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
8	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อานัติ ต๊ะปิ่นตา Asst. Prof. Dr. Anat Thapinta	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
9	รองศาสตราจารย์ ศิวพันธุ์ ชูอินทร์ Assoc. Prof. Sivapan Choo-In	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
10	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทัศนาวลัย อุทาสกุล Asst. Prof. Dr. Tatsanawalai Utarasakul	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University

กลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร วิศวกรรมศาสตร์

1	รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิตต์ บุญเกิด Assoc. Prof. Dr. Chuenchit Boonchird	มหาวิทยาลัยมหิดล Mahidol University
2	รองศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ ลิ้มสุวรรณ Assoc. Prof. Dr. Tasanee Limsuwan	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ Kasetsart University
3	รองศาสตราจารย์ ดร.คงศักดิ์ ศรีแก้ว Assoc. Prof. Dr. Khongsak Srikaeo	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University
4	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ Asst. Prof. Dr. Teerin Chysirichote	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
5	อาจารย์ ดร.ธนิดา ชั่วเจริญ Dr. Thanida Chuacharoen	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University

กลุ่มวิทยาศาสตร์การกีฬา วิทยาศาสตร์สุขภาพ

1	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันิดา หลายวัฒนไพศาล Asst. Prof. Dr. Wanida LAIWATTANAPAISAN	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย Chulalongkorn University
2	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมจินตนา ท้วทิพย์ Asst. Prof. Dr. Somjintana Toutip	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม Mahasarakham University
3	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชยานิต ลือวานิช Asst. Prof. Dr. Chayanit Luevanich	มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต Phuket Rajabhat University
4	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรพันธ์ อัจจิมาพร Asst. Prof. Dr. Amornpan Ajjimaporn	มหาวิทยาลัยมหิดล Mahidol University
5	อาจารย์อัมพิกา นันทปัญญา Ampika Nanbancha	มหาวิทยาลัยมหิดล Mahidol University

Editorial Board

1	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อานัติ ต๊ะปิ่นตา Asst. Prof. Dr. Anat Thapinta	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
2	Prof. Dr. Hongjoo Kim	Kyungpook National University, Korea
3	Prof. Dr.-Ing. Mitra Djamel	Institut Teknologi Bandung, Indonesia
4	Assoc. Prof. Dr. Nguyen Hieu Trung	Can Tho University, Vietnam



5	Prof. Dr. Subhash C. Pandey	Journal of Environmental Research and Development (JERAD), India
6	Prof. Emeritus Mani Rappon	Lakehead University, Canada
7	Assoc. Prof. Dr. Thanh Son Dao	Vietnam National University, Vietnam
8	Dr. Soo Rin Kim	Kyungpook National University, Korea
9	Dr. Vinh Truong Hoang	Ho Chi Minh City Open University, Vietnam
10	Dr. Wong Tze Jin	Universiti Putra Malaysia Bintulu Campus, Malaysia
11	Dr. Stephen Raymond Morley	Leicester Royal Infirmary, England

Editorial Managers

1	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาณัติ ต๊ะปิ่นตา Asst. Prof. Dr. Anat Thapinta	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
2	ดร.วัฒนา พันธุ์พีช Dr. Wattana Panphut	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
3	ผศ.ดร.ทัศนาวลัย อุทราสกุล Asst. Prof. Dr. Tatsanawalai Utarasakul	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
4	ผศ.ดร.พิจิตรา จอมศรี Asst. Prof. Dr. Pijitra Jomsri	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
5	ดร.นิช วงศ์สงจำ Dr. Nich Wongsongja	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
6	ดร.มนัสวี เดชกล้า Dr. Manussawee Dechkla	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
7	ดร.ธิดา ฉั่วเจริญ Dr. Thanida Chuacharoen	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
8	ดร.คันสนีย์ แสนศิริพันธ์ Dr. Sansanee Sansiribhan	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
9	ดร.ชูเกียรติ ผุดพรมราช Dr. Chookait Pudprommarat	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
10	ดร.พลอยทราย โอฮามา Dr. Ploysai Ohama	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University
11	ดร.สุริยัน สมพงษ์ Dr. Suriyan Sompong	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา Suan Sunandha Rajabhat University

กำหนดการการประชุมสวนสุนันทาวิชาการฯ



08.00 - 09.00 น.	ลงทะเบียน ณ บริเวณด้านหน้าห้องประชุมกรุงธนบอลล์รูม ชั้น 3
09.00 - 09.15 น.	กล่าวรายงานการประชุม โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาณัติ ต๊ะปันทา คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
09.15 - 09.30 น.	กล่าวเปิดการประชุม โดย รองศาสตราจารย์ ดร.ฤเดช เกิดวิชัย อธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
09.30 - 10.00 น.	- พิธีมอบของที่ระลึกแก่เจ้าภาพร่วมและถ่ายภาพร่วมกัน - พิธีมอบรางวัลบทความวิจัยดีเด่น จำนวน 3 รางวัล โดย รองศาสตราจารย์ ดร.ฤเดช เกิดวิชัย อธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
10.00 - 10.30 น.	บรรยายพิเศษ เรื่อง “Recent Technology Breakthroughs in the Control of Iron Deficiency Anemia” โดย Prof.Dr.Michael Bruce Zimmermann Zurich Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Switzerland
10.30 - 11.00 น.	บรรยายพิเศษ เรื่อง “Universities Facing Severe Challenges of Fewer Children Trend and International Competition” โดย Prof.Dr.Chih-Hsiang Liao Vice President of Chia Nan University of Pharmacy and Science, Taiwan
11.00 - 11.15 น.	รับประทานอาหารว่าง ณ ด้านหน้าห้องประชุมภาณุรังษีบอลล์รูม ชั้น 1
11.00 - 12.15 น.	นำเสนอผลงานวิจัยแบบภาคโปสเตอร์ ณ ด้านหน้าห้องประชุมภาณุรังษีบอลล์รูม ชั้น 1
11.15 - 12.15 น.	นำเสนอผลงานวิจัยแบบภาคบรรยาย ณ ห้องประชุม ชั้น 1, 2 และ 3
ห้องภาณุรังษี เอ	ชั้น 1 กลุ่มสาขาคอมพิวเตอร์และเทคโนโลยีสารสนเทศ (กลุ่มย่อยที่ 1)
ห้องภาณุรังษี ซี	ชั้น 1 กลุ่มสาขาคอมพิวเตอร์และเทคโนโลยีสารสนเทศ (กลุ่มย่อยที่ 2)
ห้องบงกชรัตน์ เอ	ชั้น 2 กลุ่มสาขาฟิสิกส์และพลังงาน
ห้องบงกชรัตน์ บี	ชั้น 2 กลุ่มสาขาวิทยาศาสตร์การกีฬาและวิทยาศาสตร์สุขภาพ
ห้องบงกชรัตน์ ซี	ชั้น 2 กลุ่มสาขาเคมีและนิติวิทยาศาสตร์
ห้องบุษบงกช เอ	ชั้น 2 กลุ่มสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมและเทคโนโลยี
ห้องบุษบงกช บี	ชั้น 2 กลุ่มสาขาชีววิทยา เทคโนโลยีชีวภาพ และจุลชีววิทยา
ห้องกรุงธนบอลล์รูม	ชั้น 3 กลุ่มสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารและคหกรรมศาสตร์
12.15 - 13.15 น.	รับประทานอาหารกลางวัน ณ ห้องอาหารริมน้ำ ชั้น 1

13.15 – 15.30 น.	นำเสนอผลงานวิจัยแบบภาคโปสเตอร์ ณ ด้านหน้าห้องประชุมภาณูรังษีบอลล์รูม ชั้น 1 (ต่อ) พร้อมมอบวุฒิบัตรการนำเสนอผลงานวิจัยแบบภาคโปสเตอร์
13.15 – 14.45 น.	นำเสนอผลงานวิจัยแบบภาคบรรยาย ณ ห้องประชุมชั้น 1, 2 และ 3 (ต่อ)
ห้องภาณูรังษี เอ	ชั้น 1 กลุ่มสาขาคอมพิวเตอร์และเทคโนโลยีสารสนเทศ (กลุ่มย่อยที่ 1)
ห้องภาณูรังษี ซี	ชั้น 1 กลุ่มสาขาคอมพิวเตอร์และเทคโนโลยีสารสนเทศ (กลุ่มย่อยที่ 2)
ห้องบงกชรัตน์ เอ	ชั้น 2 กลุ่มสาขาฟิสิกส์และพลังงาน
ห้องบงกชรัตน์ บี	ชั้น 2 กลุ่มสาขาวิทยาศาสตร์การกีฬาและวิทยาศาสตร์สุขภาพ
ห้องบงกชรัตน์ ซี	ชั้น 2 กลุ่มสาขาคณิตศาสตร์และสถิติ
ห้องบุษบงกช เอ	ชั้น 2 กลุ่มสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมและเทคโนโลยี
ห้องบุษบงกช บี	ชั้น 2 กลุ่มสาขาชีววิทยา เทคโนโลยีชีวภาพ และจุลชีววิทยา
ห้องกรุงธนบอลล์รูม	ชั้น 3 กลุ่มสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารและคหกรรมศาสตร์
14.45 – 15.00 น.	รับประทานอาหารว่าง ณ ด้านหน้าห้องประชุมกลุ่มย่อย ชั้น 1, 2 และ 3
15.00 – 17.00 น.	นำเสนอผลงานวิจัยแบบภาคบรรยาย ณ ห้องประชุม 1, 2 และ 3 (ต่อ) พร้อมมอบวุฒิบัตรการนำเสนอผลงานวิจัยแบบภาคบรรยาย ณ ห้องประชุมกลุ่มย่อย

Conference Schedule

08.00 - 09.00	Registration (Krungthorn Ballroom, 3 rd floor front area)
09.00 - 09.15	Giving a briefing of the conference Asst. Prof. Dr. Anat Thapinta Dean of Faculty of Science and Technology
09.15 - 09.30	SsSCI 2019 Opening ceremony Associate Professor Dr. Luedech Girdwichai President of Suan Sunandha Rajabhat University
09.30 - 10.00	Presenting a token of appreciation to the distinguished co-hosts and taking a group photo Presenting three awards for outstanding Associate Professor Dr. Luedech Girdwichai President of Suan Sunandha Rajabhat University
10.00 - 10.30	Keynote Speech “Recent Technology Breakthroughs in the Control of Iron Deficiency Anemia” Professor Dr. Michael Bruce Zimmermann Zurich Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Switzerland
10.30 - 11.00	Keynote Speech “Universities Facing Severe Challenges of Fewer Children Trend and International Competition” Professor Dr. Chih-Hsiang Liao Vice President of Chia Nan University of Pharmacy and Science, Taiwan
11.00 - 11.15	Refreshment Breaks at Phanurandsi Ballroom, 1st floor front area
11.00 - 12.15	Poster presentation session (Phanurangsai Ballroom, 1st floor front area)
11.15 - 12.15	Oral presentation session (meeting room 1st, 2nd and 3rd floor)
Phanurangsai Room A, 1 st floor	Computer Science and Information Technology (Group 1)
Phanurangsai Room C, 1 st floor	Computer Science and Information Technology (Group 2)
Bongkotrat Room A, 2 nd floor	Physics and Energy
Bongkotrat Room B, 2 nd floor	Sports and Health Science
Bongkotrat Room C, 2 nd floor	Chemistry and Forensic Science
Busabongkot Room A, 2 nd floor	Environmental Science & Technology

Busabongkot Room B, 2 nd floor	Biology, Biotechnology and Microbiology
Krungthon Ballroom, 3 rd floor	Food Science & Technology and Home Economics

12.15 – 13.15 Lunch at Rim Nam Terrace, 1st floor

13.15 – 15.30 **Poster presentation session (Phanurangsi Ballroom, 1st floor front area) (cont.)**
Presenting poster presentation certificates at the presentation area

13.15 – 14.45 **Oral presentation session (Meeting room 1st, 2nd and 3rd floor) (cont.)**

Phanurangsi Room A, 1 st floor	Computer Science and Information Technology (Group 1)
Phanurangsi Room C, 1 st floor	Computer Science and Information Technology (Group 2)
Bongkotrat Room A, 2 nd floor	Physics and Energy
Bongkotrat Room B, 2 nd floor	Sports and Health Science
Bongkotrat Room C, 2 nd floor	Chemistry and Forensic Science
Busabongkot Room A, 2 nd floor	Environmental Science & Technology
Busabongkot Room B, 2 nd floor	Biology, Biotechnology and Microbiology
Krungthon Ballroom, 3 rd floor	Food Science & Technology and Home Economics

14.45 – 15.00 **Refreshment Breaks at front area of each meeting room (1st, 2nd and 3rd floor)**

15.00 – 17.00 **Oral presentation session (Meeting room 1st, 2nd and 3rd floor) (cont.)**

Presenting oral presentation certificates at the presentation rooms

Oral Presentation

Conference Sessions: Computer Science and Information Technology (Group 1)

Phanurangsi Room A, 1st floor (ห้องภาณูรังษี เอ ชั้น 1)

		Chairperson	Co-Chairperson			
		Dr.Vinh Truong Hoang Vice-Dean, Faculty of Information Technology Ho Chi Minh City Open University ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรสิทธิ์ ชูชัยวัฒนา คณบดีวิทยาลัยครีเอทีฟดีไซน์แอนด์ เอ็นเตอร์ เทนเมนต์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต	อาจารย์ ดร.กิตติคุณ มีทองจันทร์ หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา			
No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
1.	11.15-11.30	SSSCI2019_CS_4 SSSCI2019_O_121	Way Sokhom	Mahidol University	Development of Innovative Media for Communication Sangha in Phra Nakhon, Bangkok, Thailand	International
2.	11.30.-11.45	SSSCI2019_CS_8 SSSCI2019_O_56	กรรณิการ์ กมลรัตน์ Kannikar Kamolrat	Sakon Nakhon Rajabhat University	Application Development for Pon-Yang- Kham Fattened Cattle in Sakon Nakhon Province on Android Operating System	National
3.	11.45-12.00	SSSCI2019_CS_1 SSSCI2019_O_4	รุจิจันทร์ วิชวานิเวศน์ Rujijan Vichivanives	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สวนสุนันทา	การพัฒนาต้นแบบสมาร์ตฟาร์มการปลูกดอกมะลิ ด้วยอินเทอร์เน็ตของทุกสรรพสิ่ง	National
4.	12.00-12.15	SSSCI2019_CS_6 SSSCI2019_O_44	จีระศักดิ์ น้าประดิษฐ์ Jeerasak Numpradit	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าพระนครเหนือ	การบำบัดทางเลือกสำหรับโรคกลัวความสูงโดยใช้ ระบบความจริงเสมือน	National
12.15-13.15		Buffet Lunch, Rim Nam Terrace, 1 st floor				
5.	13.15-13.30	SSSCI2019_CS_9 SSSCI2019_O_71	ลูกหนู อู่ทอง Looknu Authong	Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi	การนำเทคโนโลยีอินเทอร์เน็ตออฟติงค์มา ประยุกต์ใช้งาน	National
6.	13.30-13.45	SSSCI2019_CS_10 SSSCI2019_O_80	ชัชชนันท์ น้าวัน Chatchanun Namwon	มหาวิทยาลัยราชภัฏ พิบูลสงคราม	การวิเคราะห์พื้นที่ที่เหมาะสมในการตั้งโรงงาน อุตสาหกรรมชีวมวลอัดแท่งในจังหวัดพิษณุโลก	National

No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
7.	13.45-14.00	SSSCI2019_CS_11 SSSCI2019_O_85	ศราวุธ พาจรทิต Sarawut Pajonetid	มหาวิทยาลัยราชภัฏ เชียงใหม่	โมบายแอปพลิเคชันสำหรับรู้จำสมุนไพรรบน ระบบปฏิบัติการแอนดรอยด์ โดยใช้ไลบรารีของเทน เซอร์โฟร	National
8.	14.00-14.15	SSSCI2019_CS_12 SSSCI2019_O_91	ประภาภรณ์ นพภาลัย Praphaporn Nopparai	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าพระนครเหนือ	การประยุกต์กระบวนการออกแบบประสบการณ์ ผู้ใช้ในการพัฒนาเว็บไซต์พาณิชย์อิเล็กทรอนิกส์ สำหรับผู้ประกอบการที่ไม่เชี่ยวชาญเทคโนโลยี	National
9.	14.15-14.30	SSSCI2019_CS_13 SSSCI2019_O_93	ธนาวุฒิ ฐปฐูชา Thanawut Thoopucha	มหาวิทยาลัยราชภัฏ พิบูลสงคราม	การป้องกันและตรวจจับการรั่วไหลของน้ำภายใน บ้านผ่านระบบควบคุมการไหลของน้ำด้วยอุปกรณ์ เคลื่อนที่	National
10	14.30-14.45	SSSCI2019_CS_14 SSSCI2019_O_95	ศุภชัย พรหมประเสริฐ Supachai Promprasoet	มหาวิทยาลัยราชภัฏ พิบูลสงคราม	ระบบควบคุมการเปิดปิดคอมพิวเตอร์ทางไกลผ่าน อุปกรณ์เคลื่อนที่	National
14.45-15.00				Refreshment Break		
11.	15.00-15.15	SSSCI2019_CS_15 SSSCI2019_O_99	อุบลศิลป์ โพธิ์พรม Ubonsilp Phoprom	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สกลนคร	การพัฒนาแอปพลิเคชันเพื่อสนับสนุนงานบริการ ด้วยมาตรฐานด้านเทคโนโลยีสารสนเทศ	National
12.	15.15-15.30	SSSCI2019_CS_16 SSSCI2019_O_83	พิสิษฐ์ แม้นวงศ์เดือนPisit Manwongdeon	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าพระนครเหนือ	การเพิ่มประสิทธิภาพการบริหารจัดการคลังสินค้า กรณีศึกษาบริษัทผู้ผลิตและจำหน่ายชิ้นส่วน อะไหล่เครื่องจักรกลการเกษตร	National
13.	15.30-15.45	SSSCI2019_CS_17 SSSCI2019_O_117	มนีรัตน์ ภารนนท์ Maneerat Paranan	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราช มงคลตะวันออก วิทยาเขต จักรพงษ์ภูวนารถ	การพัฒนาเว็บปัญญาประดิษฐ์เพื่อการเทียบโอน หน่วยกิตส่งเสริมการเรียนรู้ตลอดชีวิต	National
14.	15.45-16.00	SSSCI2019_CS_18 SSSCI2019_O_120	อุบลศิลป์ โพธิ์พรม Ubonsilp Phoprom	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สกลนคร	การพัฒนาระบบการบริการตอบคำถามอัตโนมัติ โดยเทคโนโลยี โลว์ บอท (LINE BOT) ของ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏ สกลนคร	National
15.	16.00-16.15	SSSCI2019_CS_38 SSSCI2019_O_235	ปานจิต มุสิก	มหาวิทยาลัยราชภัฏ นครศรีธรรมราช	การพัฒนาระบบควบคุมอุณหภูมิและความชื้นใน โรงเรือนปลูกพืชจำลอง	National

SsSci^{2nd} conference 2019

Conference Sessions: Computer Science and Information Technology (Group 2)

Phanurangsi Room C, 1st floor (ห้องภาณูรังษี ซี ชั้น 1)

Chairperson			Co-Chairperson			
ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมศักดิ์ ศรีสุวรรณ คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพ			อาจารย์ ดร.นพดล ผู้มีจรรยา สาขาวิชาคอมพิวเตอร์ศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม			
No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
1.	11.15-11.30	SSSCI2019_CS_24 SSSCI2019_O_152	พฤกษนันท์ คำลาพิศ Pruksanan Kamlapit	มหาวิทยาลัยพะเยา	การวิเคราะห์และพยากรณ์ช่องทางการจำหน่าย สินค้าในธุรกิจอีคอมเมิร์ซ	National
2.	11.30.-11.45	SSSCI2019_CS_25 SSSCI2019_O_156	รัชดาพร คณาวงษ์ Ratchadaporn Kanawong,	มหาวิทยาลัยศิลปากร	Ginrai-Bot for Ordering and Recommending Healthy Food Online Application	National
3.	11.45-12.00	SSSCI2019_CS_26 SSSCI2019_O_158	สุทธิษา กันจู Suttisa Kunju	มหาวิทยาลัยพะเยา	การพัฒนาการส่งเสริมการขายเครื่องสำอางบน เฟสบุ๊ก กรณีศึกษาร้าน เอ็ม แอนด์ แพร์	National
4.	12.00-12.15	SSSCI2019_CS_28 SSSCI2019_O_162	Chaiyapan Charoensuk	มหาวิทยาลัย ราชภัฏพระนคร	แอปพลิเคชันช่วยแจ้งเตือน การรับประทานยา	National
12.15-13.15			Buffet Lunch, Rim Nam Terrace, 1 st floor			
5.	13.15-13.30	SSSCI2019_CS_29 SSSCI2019_O_163	สุมิตร นวลมีศรี Sumitra Nuanmeesri	Suan Sunandha Rajabhat University	การพัฒนาเว็บไซต์และเว็บแอปพลิเคชันด้วยบูทส แตรป กรณีศึกษา นักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยี สารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา	National
6.	13.30-13.45	SSSCI2019_CS_31 SSSCI2019_O_181	ทนาลักษ์ ปรานีคุณากร Thanaluk Pranekunakol	Burapha University	การคัดกรองข้อมูลสำหรับระบบเซนเซอร์ไร้สาย ขนาดใหญ่โดย STackSTorm	National
7.	13.45-14.00	SSSCI2019_CS_32 SSSCI2019_O_202	กิตติพัฒน์ ปันพัก Kttipat Panfak	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ	การออกแบบ FTP เพื่อใช้ในการรับส่งไฟล์ระหว่าง Client และ Server	National

No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
8.	14.00-14.15	SSSCI2019_CS_35 SSSCI2019_O_214	ปรีตาวรรณ เกษเมธีการุณ Preedawon Kadmateekarun	Suan Sunandha Rajabhat University	การพัฒนาแอปพลิเคชันระบบจัดการรดน้ำ อัตโนมัติ	National
9.	14.15-14.30	SSSCI2019_CS_36 SSSCI2019_O_221	กาญจนา ขัฒิทะจักร์ Kanchana Kanthachak	มหาวิทยาลัยราชภัฏ เชียงใหม่	การส่งเสริมการอนุรักษ์ภูมิปัญญาท้องถิ่นด้านการ เพาะเลี้ยงกุ้งโดยใช้เทคโนโลยีทางคอมพิวเตอร์	National
10	14.30-14.45	SSSCI2019_CS_21 SSSCI2019_O_130	จักรภัฏ เจนโรสง Jakapat Janethaisong	Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi	การจัดการความปลอดภัยของดีเอ็นเอ	National
14.45-15.00		Refreshment Break				
11.	15.00-15.15	SSSCI2019_CS_39 SSSCI2019_O_250	ประชุม พันออก	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี	พัฒนาระบบการจัดการห้องประชุมออนไลน์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราช ภัฏเพชรบุรี	National
12.	15.15-15.30	SSSCI2019_CS_23 SSSCI2019_O_150	บพิตร ไชยนอก Bopit Chainok	มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม	ระบบตรวจวัดสภาพอากาศที่มีผลต่อคุณภาพน้ำใน บ่อเลี้ยงกุ้งขาว	National
13.	15.30-15.45	SSSCI2019_CS_20 SSSCI2019_O_123	วุฒิชัย นาคเพียทา Voottichai Nakpeata	Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi	การนำโครงข่ายเฉพาะกิจมาประยุกต์ใช้งาน	National
14.	15.45-16.00	SSSCI2019_CS_19 SSSCI2019_O_122	พัทธนันท์ นาคยศ Pattanan Nakyos	Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi	การนำโปรโตคอลมาใช้หาเส้นทางบนเครือข่ายไร้สาย	National
15.	16.00-16.15	SSSCI2019_CS_5 SSSCI2019_P_42	ชัชชฎา โพธิ์ลักษณ์ Chatchuda Potiluck	Mahidol University	ระบบสารสนเทศควบคุมการประมวลผลการศึกษา กรณีศึกษาวิทยาลัยการจัดการ มหาวิทยาลัยมหิดล	National
16.	16.15-16.30	SSSCI2019_CS_7 SSSCI2019_P_45	อุไรวรรณ รักภักวงศ์ Uraiwn Ruxpakawong	มหาวิทยาลัยราชภัฏ พิบูลสงคราม	การสร้างแบบทดสอบคำสั่งสืบค้นข้อมูล และตรวจ คำตอบ โดยอัตโนมัติ	National

SsSci^{2nd} conference 2019

Conference Sessions: Chemistry and Forensic Science

Bongkotrat Room C, 2nd floor (ห้องบงกชรัตน์ ซี ชั้น 2)

Chairperson		Co-Chairperson				
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พูนศิริ ทิพย์เนตร คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี		อาจารย์ ดร.พลอยทราย โอฮามา สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา				
No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
1.	11.15-11.30	SSSCI2019_CH_7 SSSCI2019_O_160	Pornpan Tana	Maha Sarakham Rajabhat University	The preparation of hybrid material of cobalt complex into mesoporous silica from the rice husk	International
2.	11.30-11.45	SSSCI2019_CH_11 SSSCI2019_O_182	Pasakorn Sangnikul	Maha Sarakham Rajabhat University	DFT investigation of toluene adsorption on silicon carbide nanosheet doping with transition metal for sensing application	International
3.	11.45-12.00	SSSCI2019_CH_19 SSSCI2019_O_604	Jitlada Chumee	Suan Sunandha Rajabhat University	The Effect of Viscosity-imparting Agent on Textural Properties of Toddy Palm Syrup	International
4.	12.00-12.15	SSSCI2019_CH_3 SSSCI2019_O_76	ดุสิตพร ศรีลักษ์ณ์ Dusitporn Srilak	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	อิทธิพลของสารตัวเติมต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์ม ยางธรรมชาติโปรตีนตำผสมลิกนิน	National
12.15-13.15		Buffet Lunch, Rim Nam Terrace, 1 st floor				
5.	13.15-13.30	SSSCI2019_CH_6 SSSCI2019_O_140	ชุตินา ศิลาณีเวช Chutima Silamaneewet	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	ผลของการปรับสภาพขานอ้อยด้วยต่างที่มีต่อการ เพิ่มผลผลิตน้ำตาลและองค์ประกอบทางเคมี	National
6.	13.30-13.45	SSSCI2019_CH_21 SSSCI2019_O_246	วัชรารักษ์ ประภาสโนบล Vacharaporn Prapasanol	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี	การศึกษาสารพิษจากเคมี ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระของจาวตาล	National

No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
7.	13.45-14.00	SSSCI2019_CH_22 SSSCI2019_O_243	ปัทมาพร ยอดสันติ Pattamaporn Yodsanti	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี	การประเมินศักยภาพการเก็บกักคาร์บอนของต้น ตาลในจังหวัดเพชรบุรี	National
8.	14.00-14.15	SSSCI2019_CH_20 SSSCI2019_P_147	Wilasinee Sathitdetkunchorn	Rajabhat Nakhonratchasima University	การวิเคราะห์ตะกั่ว เหล็ก และแคดเมียม ในน้ำ บาดาล โดยเทคนิคอะตอมมิก แอ็บซอร์พ ชันสเปกโทรโฟโตเมทรี	National
9	14.15-14.30	SSSCI2019_CH_14 SSSCI2019_P_199	เอกชัย อชชะ Ekkachai Achcha	มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์	การเคลือบสลายน้ำมือแฝงด้วยรีติวซ์แกรฟีน ออกไซด์บนกระจกเอฟทีโอโดยใช้การเคลือบ ไฟฟ้า	National
14.45-15.00		Refreshment Break				

SsSci^{2nd} conference 2019

Conference Sessions: Mathematics and Statistics
Bongkotrat Room C, 2nd floor (ห้องบงกชรัตน์ ซี ชั้น 2)

Chairperson			Co-Chairperson			
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประยัด แสงงาม ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร			อาจารย์ ดร.ชูเกียรติ ผุดพรมราช หัวหน้าสาขาวิชาสถิติประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา			
No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
10.	14.30-14.45	SSSCI2019_MA_1 SSSCI2019_O_12	สิริพร หล้าปวงคำ Siriporn Lapouangkham	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	เงื่อนไขบางประการของฟังก์ชันการบวก	National
14.45-15.00		Refreshment Break				
11.	15.00-15.15	SSSCI2019_MA_2 SSSCI2019_O_17	เจษฎา สุจริตธุระการ Jedsada Sutjaritthurakan	มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต	ผลของการรณรงค์การสวมหน้ากากอนามัยที่มีผล ต่อตัวแบบเชิงคณิตศาสตร์การแพร่ระบาดของโรค หัด	National
12.	15.15-15.30	SSSCI2019_MA_3 SSSCI2019_O_77	ปณิธิ วิจิตรไกรวิน Paniti Vichitkraivin	มหาวิทยาลัยมหิดล	The Resistance Factors Affecting the Adoption of Healthcare Robots Technology in Thailand Government Hospital	National
13.	15.30-15.45	SSSCI2019_MA_5 SSSCI2019_O_86	สิทธิกร นาคขาว Sitthikorn Nakkao	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	เอกลักษณ์เชิงฟังก์ชันของอนุพันธ์	National
14.	15.45-16.00	SSSCI2019_MA_6 SSSCI2019_O_107	เยาวลักษณ์ ศรีเมือง Yaowaluk Srimuang	Faculty of Science, Ramkhamhang University	General Solution of the n -D Pompeiu Functional Equation	National
15.	16.00-16.15	SSSCI2019_MA_7 SSSCI2019_O_153	ธัญญลักษณ์ เทพสุวรรณ์ Tunyaluk Thepsuwan	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	กิจกรรมการเรียนรู้เกี่ยวกับอัตราส่วนทองบน ร่างกายมนุษย์	National

No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
16.	16.15-16.30	SSSCI2019_MA_8 SSSCI2019_O_171	ศศิวิมล คณทา Sasiwimon Raokhetkit Khontha	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	การศึกษาความเป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์ในการ ลดขั้นตอนของการเคลือบแข็งในกระบวนการผลิต เลนส์	National
17.	16.30-16.45	SSSCI2019_MA_9 SSSCI2019_O_173	Rukchart Prasertpong รักชาติ ประเสริฐพงษ์	Nakhon Sawan Rajabhat University	ไอทีลภายในรฟและควอซี-ไอทีลรฟในปฏิกิริยา ประมาณของกึ่งกลุ่มภายใต้ความสัมพันธ์หรือ เตอร์และคอมแพทิเบิล	National
18.	16.45-17.00	SSSCI2019_MA_10 SSSCI2019_O_176	ธัญวรัตน์ ชัชรัตน์ Thanwarat Chatcharata	มหาวิทยาลัยราชภัฏ นครสวรรค์	ไป-ไอทีลรฟและไป-ไอทีลเฉพาะรฟในปฏิกิริยา ประมาณของกึ่งกลุ่มภายใต้ความสัมพันธ์หรือ เตอร์และคอมแพทิเบิล	National

SsSci^{2nd} conference 2019

Conference Sessions: Physics and Energy
Bongkotrat Room A, 2nd floor (ห้องบงกชรัตน์ เอ ชั้น 2)

Chairperson				Co-Chairperson		
รองศาสตราจารย์ ดร.ปานจิต มุสิก คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช				รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย เทพา คณะพลังงาน สิ่งแวดล้อมและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี		
No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
1.	11.15-11.30	SSSCI2019_PH_25 SSSCI2019_O_164	Nattapon Chantarapanich	Kasetsart Univeristy	Design and Analysis of Plastic Medical Tray for Implant Packaging	International
2.	11.30.-11.45	SSSCI2019_PH_27 SSSCI2019_O_192	Natthaphong Kamma	Khon Kaen University	A Polymeric Coating on Prelithiated Silicon-Based Nanoparticles for High Capacity Anodes used in Li-ion Batteries	International
3.	11.45-12.00	SSSCI2019_PH_1 SSSCI2019_O_6	Pinyapach Tiamduangtawan	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	การพัฒนาวัสดุกำบังอนุภาคนิวตรอนที่สามารถซ่อมแซมตัวเองจากวัสดุเชิงประกอบ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) และซาแมเรียมออกไซด์ (Sm ₂ O ₃)	National
4.	12.00-12.15	SSSCI2019_PH_2 SSSCI2019_O_7	กุลลิตา โกละนันท์ Kullita Kolanan	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	การตรวจวิเคราะห์โลหะอะมัลกัมด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	National
12.15-13.15				Buffet Lunch, Rim Nam Terrace, 1 st floor		
5.	13.15-13.30	SSSCI2019_PH_4 SSSCI2019_O_16	Wichan Lertlop	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สวนสุนันทา	การกำหนดปัญหาให้นักศึกษาค้นคว้าเพื่อพัฒนาผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษาชั้นปีที่ 1 สาขาฟิสิกส์ประยุกต์ปีการศึกษา 2562	National

No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
6.	13.30-13.45	SSSCI2019_PH_7 SSSCI2019_O_37	อัศวิน ยอดรักษ์ Assawin Yodruk	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระ จอมเกล้าพระนครเหนือ	การพัฒนาเครื่องทดสอบความล้าแบบหมุนดัด Development of A Rotary-Bending Fatigue Tester	National
7.	13.45-14.00	SSSCI2019_PH_9 SSSCI2019_O_46	อภิฤดี ตันตเวชกิช Apirudee Tentawechakit	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	การประเมินศักยภาพการอนุรักษ์พลังงาน กรณีศึกษา: โรงพยาบาลของรัฐขนาดใหญ่	National
8.	14.00-14.15	SSSCI2019_PH_10 SSSCI2019_O_47	พิศาล ปานสุข Pisan Pansook	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	การประเมินความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ ของ การผลิตไฟฟ้าด้วยกังหันลมแบบ แนวตั้ง โดยใช้ ลมทั้งจากระบบกำจัดฝุ่นในโรงงานผลิตปูนกาว ซีเมนต์	National
9.	14.15-14.30	sssci2019_PH_23 sssci2019_O_157	รัชนิกร ปันล่า atchaneekorn Punla	Maejo University	การพัฒนาเซลล์แสงอาทิตย์เพอรอฟสไกต์โดยใช้ คอปเปอร์ออกไซด์เป็นวัสดุนำโฮลแบบชั้นคู่	National
10	14.30-14.45	SSSCI2019_PH_29 SSSCI2019_O_136	Pich Khoem รวิภัทร ลาภเจริญสุข Ravipat Lapcharoensuk	สถาบันเทคโนโลยีพระจอม เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	การวิเคราะห์ความแม่นยำของเครื่องเนียร์ อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์สำหรับการตรวจสอบ คุณภาพน้ำเค็ม	National
14.45-15.00		Refreshment Break				
11.	15.00-15.15	SSSCI2019_PH_30 SSSCI2019_O_155	มครินทร์ กาญจนสุต Makkaryn Kanchanasoot	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	การออกแบบและประยุกต์ใช้เซลล์ไฟฟ้าชีวภาพ จากพืช เพื่ออุปกรณ์ไฟฟ้าแรงดันต่ำ	National
12.	15.15-15.30	SSSCI2019_PH_31 SSSCI2019_O_224	อรอนงค์ เสนาะจิต Ornanong Sanorchit	มหาวิทยาลัยราชภัฏ เทพสตรี	การหาสัมประสิทธิ์การลดทอนรังสีแกมมาของ แผ่นเส้นใยชานอ้อยกับ BaSO ₄ โดยมีน้ำยางพารา เป็นตัวประสาน	National
13.	15.30-15.45	SSSCI2019_PH_32 SSSCI2019_O_237	Petcharat Jaiboon	Sakon Nakhon Rajabhat University	Effect of drying temperature on quality of RD6 variety brown parboiled glutinous rice	National
14.	15.45-16.00	SSSCI2019_PH_33 SSSCI2019_O_249	ชนษฎ์ วิชาศิลป์	มหาวิทยาลัยราชภัฏ เชียงใหม่	การเปรียบเทียบศักยภาพเซลล์ไฟฟ้าเคมีที่ใช้น้ำ หมักชีวภาพจากผลไม้	National
15.	16.00-16.15	SSSCI2019_PH_5 SSSCI2019_O_21	บัณฑิต จิตต์สุภาพ Bantorn Chitsupap	มหาวิทยาลัยบูรพา	การควบคุมเครื่องปรับอากาศแบบท่อน้ำสารทำ ความเย็นร่วมเพื่อการประหยัดพลังงานไฟฟ้า	National

SsSci^{2nd} conference 2019

Conference Sessions: Biology, Biotechnology and Microbiology

Busabongkot Room B, 2nd floor (ห้องบุษบกข บี ชั้น 2)

Chairperson				Co-Chairperson		
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวย อุ๋นใจ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล				อาจารย์ ดร.มณฑารพ สุธาธรรม หัวหน้าสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา		
No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
1.	11.15-11.30	SSSCI2019_BT_1 SSSCI2019_O_19	ฤทัยรัตน์ สิริวัฒนรัชต์ Ruthairat Siri Wattanarat	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สวนสุนันทา	ความหลากหลายของชนิดพันธุ์ปลาน้ำจืดใน คลองแสนแสบพื้นที่กรุงเทพมหานคร	National
2.	11.30.-11.45	SSSCI2019_BT_2 SSSCI2019_O_28	Pornsiri Bumrungham พรศิริ บำรุงธรรม	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	การโคลน การแสดงออก และการศึกษาลักษณะ ของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส	National
3.	11.45-12.00	SSSCI2019_BT_9 SSSCI2019_O_89	รพีพรรณ กองตุม Rapeepan Kongtoom	มหาวิทยาลัยราชภัฏ หมู่บ้านจอมบึง	การศึกษาสมบัติบางประการของพันธุ์พริก พื้นเมือง(พริกกะเหรี่ยง) ที่ปลูกในพื้นที่ภาค ตะวันตกของประเทศไทย	National
4.	12.00-12.15	SSSCI2019_BT_11 SSSCI2019_O_103	Krit Phinetsathian ฤกษ์ณ พิเนตรเสถียร	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สกลนคร	ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อม จังหวัดสกลนคร	National
12.15-13.15				Buffet Lunch, Rim Nam Terrace, 1 st floor		
5.	13.15-13.30	SSSCI2019_BT_12 SSSCI2019_O_108	Araya Pranpravit อารยา ปรานประวิตร	Suratthani Rajabhat University	ความสามารถในการต้านโรคเบาหวานผ่านการ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากผักพื้นบ้าน ท้องถิ่นในเขตพื้นที่ หมู่ 9 ตำบลขุนทะเล อำเภอ เมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี	National
6.	13.30-13.45	SSSCI2019_BT_20 SSSCI2019_O_141	Asro Hajiabdullah อัซรอ หะยีอับดุลเลาะ	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	การผลิตกรดซีกินิกจากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ Actinobacillus succinogenes	National

No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
7.	13.45-14.00	SSSCI2019_BT_21 SSSCI2019_O_144	รัชนิกร สวามิ Ruchnekor Swami	มหาวิทยาลัยบูรพา	การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไฟโคไซยานินจาก สาหร่าย <i>Arthrospira platensis</i> และสาหร่าย <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	National
8.	14.00-14.15	SSSCI2019_BT_28 SSSCI2019_O_220	กัลทิมา พิชัย Kaltima Pichai	มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่	การเก็บรักษาเชื้อยีสต์จากน้ำหมักเปลือก สับปะรด โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง	National
9.	14.15-14.30	SSSCI2019_BT_29 SSSCI2019_O_222	กัญญ์วรา วงศ์แพทย์ Kanwara Wongpaet	มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่	พฤติกรรมของนกเป็ดแดง (<i>Dendrocygna javanica</i>) บริเวณอ่างเก็บน้ำ ภายใน มหาวิทยาลัย	National
10	14.30-14.45	SSSCI2019_BT_31 SSSCI2019_O_225	Peangjai Jianwichayakul เพียงใจ เจียรวิญญกุล	มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี	ความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนดินใน จังหวัดลพบุรีที่มีศักยภาพในการผลิตปุ๋ยหมักมูล ไส้เดือนจากผักตบชวา	National
14.45-15.00		Refreshment Break				
11.	15.00-15.15	SSSCI2019_BT_33 SSSCI2019_O_229	รุ่งนภา ทากัน Rungnapa Tagun	มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่	ผลกระทบของมลพิษในระบบนิเวศนาข้าวต่อ สิ่งมีชีวิตในอำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่	National
12.	15.15-15.30	SSSCI2019_EN_15 SSSCI2019_O_106	กิตติมา เกตุสอาด Kittima Ketsa-ad	มหาวิทยาลัยมหิดล	การคัดแยกแบคทีเรียต้านทานแคดเมียมที่สร้าง สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสภาวะที่เหมาะสม ในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	National
13.	15.30-15.45	SSSCI2019_BT_38 SSSCI2019_O_245	ไกรฤกษ์ ทวีเชื้อ Kraierk Taweechue	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี	การศึกษาเพื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และความ ผันแปรของยีนมัยโอสแตตินในแพะ (<i>Capra hircus</i>) ที่เลี้ยงในจังหวัดเพชรบุรี	National
14.	15.45-16.00	SSSCI2019_BT_39 SSSCI2019_O_247	พรอริยา ฉิรินัง Pornariya Chirinang	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี	คุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกของ <i>Lactobacillus plantarum</i> 3C2-10 ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพจากเปลือกส้ม	National
15.	16.00-16.15	SSSCI2019_BT_32 SSSCI2019_P_228	วัชร ชาญเมืองใจ Watcharee Hanmoungjai	มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่	ผลการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจกบนอาหารเลี้ยง เชื้อสูตรดัดแปลงชนิดต่าง ๆ	National

SsSci^{2nd} conference 2019

Conference Sessions: Environmental Science & Technology

Busabongkot Room A, 2nd floor (ห้องบุษบก เอ ชั้น 2)

Chairperson	Co-Chairperson

ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรศักดิ์ นุ่มมีศรี
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทัศนาวลัย อุทาสกุล
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
1.	11.15-11.30	SSSCI2019_EN_1 SSSCI2019_O_22	พรทิพย์ วิมลทรง Pornthip Wimonson	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สุราษฎร์ธานี	การวิเคราะห์แผนเผชิญเหตุอุทกภัยระดับจังหวัด ของประเทศไทย	National
2.	11.30.-11.45	SSSCI2019_EN_2 SSSCI2019_O_34	ชำนาญพงษ์ เฉลิมเผ่า Chamnanpong Chalernpow	มหาวิทยาลัยมหิดล	การผลิตก๊าซไฮเทนชีวภาพจากของเสียทาง การเกษตรและอุตสาหกรรม	National
3.	11.45-12.00	SSSCI2019_EN_3 SSSCI2019_O_43	ภัทรธาดา ฐานวิเศษ Phatlapha Thanwised	Sakon Nakhon Rajabhat University	แนวทางการจัดการขยะภายในมหาวิทยาลัย ราชภัฏสกลนคร	National
4.	12.00-12.15	SSSCI2019_EN_4 SSSCI2019_O_48	สุวิมล คุปติวุฒิ Suwimon Kooptiwoot	Suan Sunandha Rajabhat University	Mining waste separation behavior related factor	National
12.15-13.15		Buffet Lunch, Rim Nam Terrace, 1 st floor				
5.	13.15-13.30	SSSCI2019_EN_5 SSSCI2019_O_50	ทศพร นิละไพจิตร Todsaporn Neelapaijit	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าธนบุรี	การประเมินคาร์บอนฟุตพริ้นท์จากกิจกรรมของ ตลาดชุมชน	National
6.	13.30-13.45	SSSCI2019_EN_6 SSSCI2019_O_53	สุวิมล คุปติวุฒิ Suwimon Kooptiwoot	Suan Sunandha Rajabhat University	Development of a garbage bin selection expert system for waste separation	National
7.	13.45-14.00	SSSCI2019_EN_13 SSSCI2019_O_105	วิเวียน จุลมนต์ Vivian Chullamon	Thammasat University	การวิเคราะห์ความเหมาะสมของพื้นที่ด้วย GIS เพื่อเลือกที่ตั้งโรงงานแปรรูปขยะมูลฝอยเป็น พลังงานในจังหวัดปทุมธานี	National
8.	14.00-14.15	SSSCI2019_EN_18 SSSCI2019_O_116	Aphiranan Phongjetpuk	Mahidol University	การประเมินปริมาณการใช้น้ำ และผลกระทบ ด้านความขาดแคลนน้ำในการผลิตกระแสไฟฟ้า	National

No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
9.	14.15-14.30	SSSCI2019_EN_22 SSSCI2019_O_145	ไพบุลย์ แจ่มพงษ์ Paiboon Jeamponk	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สวนสุนันทา	ผลกระทบจากปัญหาภาวะหมอกควันต่อปัญหา สุขภาพอนามัยของประชาชนที่มาเข้ารับบริการ ที่โรงพยาบาลเชียงแสน จังหวัดเชียงราย	National
10	14.30-14.45	SSSCI2019_EN_23 SSSCI2019_O_148	วลัยพร ฟ่อนพันธ์ Walaiporn Phonphan	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สวนสุนันทา	การติดตามการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสงครามด้วยเทคโนโลยีการสำรวจ ระยะไกล	National
14.45-15.00 Refreshment Break						
11.	15.00-15.15	SSSCI2019_EN_26 SSSCI2019_O_166	นิช วงศ์สงจำ Nich Wongsongja	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา	การศึกษาการมีส่วนร่วมของชุมชนด้านสังคม และสิ่งแวดล้อมบริเวณรอบโรงไฟฟ้าพลังงานน้ำ เขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี Promotion of Community Participation for Saline Soil Remediation by	National
12.	15.15-15.30	SSSCI2019_EN_29 SSSCI2019_O_184	วรารณ โกศลวิตร Waraporn Kosanlavit	มหาวิทยาลัยราชภัฏ นครราชสีมา	Alternative Technology of Bio-Organic Fertilizers and Nano Material at Krabueang Yai, Phimai District, Nakhon Ratchasima Province	National
13.	15.30-15.45	SSSCI2019_EN_30 SSSCI2019_O_186	นฤพร เวชกุลชัย Naruporn Wetchayagulchai	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	การเลือกเทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับ การแปรรูปมูลฝอยเป็นพลังงาน กรณีศึกษา จังหวัดปทุมธานี	National
14.	15.45-16.00	SSSCI2019_EN_33 SSSCI2019_O_203	นิตินาถ เจริญโกคราช Nitinarth Charoenpokarj	Suan Sunandha Rajabhat University	ความหลากหลายชนิด ความชุ่มชื้นและความคล้ายคลึง ของนก ในถิ่นที่อยู่อาศัยของนก บริเวณชายฝั่ง ทะเล เพื่อการอนุรักษ์และการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม	National
15.	16.00-16.15	SSSCI2019_EN_35 SSSCI2019_O_243	ปัทมาพร ยอดสันติ Patmaporn Yodsanti	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี	การประเมินศักยภาพการเก็บกักคาร์บอนของต้น ตาลในจังหวัดเพชรบุรี	National
16.	16.15-16.30	SSSCI2019_EN_17 SSSCI2019_O_115	วนิดา ชูอักษร Wanida Chooaksorn	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต	การศึกษาคุณภาพน้ำจากตู้น้ำดื่มหยอดเหรียญ บริเวณรอบ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์ รังสิต	National

SsSci^{2nd} conference 2019

Conference Sessions: Food Science & Technology and Home Economics

Krungthon Ballroom, 3rd floor (ห้องกรุงธนบอลรูม ชั้น 3)

Chairperson				Co-Chairperson		
รองศาสตราจารย์ ดร.รัชฌณิน จงจิตวิมล คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม				อาจารย์ ดร.ธนิดา ฉั่วเจริญ หัวหน้าสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา		
No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
1.	11.15-11.30	SSSCI2019_FT_19 SSSCI2019_O_114	Supatchalee Sirichokworakrit	Suan Sunandha Rajabhat University	The effect of extraction methods on phenolic, anthocyanin, and antioxidant activities of Riceberry bran	International
2.	11.30.-11.45	SSSCI2019_FT_1 SSSCI2019_O_8	ฐานวีร์ ลอยแก้ว Thanawee Loikaeo	มหาวิทยาลัยรังสิต	ศึกษาสมบัติทางกายภาพ เคมี และ โภชนาการของ แป้งแกล่นตะวัน เพื่อนำมาแทนที่แป้งสาลีบางส่วนใน ผลิตภัณฑ์ขนมอบ	National
3.	11.45-12.00	SSSCI2019_FT_3 SSSCI2019_O_29	กัญญาพัชร เพชรภรณ์ Kanyapat Petcharaporn	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สวนสุนันทา	นวัตกรรมการผลิตกระเทียมเจียวไร้น้ำมันพร้อมรับประทาน ด้วยเทคโนโลยีการทอดด้วยหม้อไอน้ำ (Air Fryer)	National
4.	12.00-12.15	SSSCI2019_FT_5 SSSCI2019_O_38	จุฑามาศ มุลวงศ์ Jutamas Moolwong	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สวนสุนันทา	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมการผลิตน้ำพริกลงเรือดำรับวังสวนสุนันทา กึ่งสำเร็จรูปด้วยเครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้ง	National
12.15-13.15				Buffet Lunch, Rim Nam Terrace, 1 st floor		
5.	13.15-13.30	SSSCI2019_FT_18 SSSCI2019_O_104	ชูสิทธิ์ หงษ์กุลทรัพย์ Choosit Hongkulsap	มหาวิทยาลัย ราชภัฏสวนสุนันทา	ผลของการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อความคงตัวของสารสกัดจาก ดอกกระเจียว	National
6.	13.30-13.45	SSSCI2019_FT_20 SSSCI2019_O_146	ณัฐพล ประเทงจิตต์ Nattapol Prathengjit	มหาวิทยาลัย ราชภัฏสวนสุนันทา	การพัฒนาคุกกี้โดยใช้แป้งมันเทศสีม่วงและแป้งข้าวทดแทนแป้งสาลี	National

The 2nd Suan Sunandha National and International Academic Conference on Science and Technology

No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
7.	13.45-14.00	SSSCI2019_FT_21 SSSCI2019_O_172	วรกร วิวัชรกรกุล Worakorn Wiwatcharakornkul	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ลายพิมพ์เอชพีทีแอลซี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของ ดอกไม้ 5 ชนิดในพิกัดเกษตร	National
8.	14.00-14.15	SSSCI2019_FT_22 SSSCI2019_O_174	ธีรยุทธ์ พูนจันทร์นา Teerayut Poonjunna	มหาวิทยาลัย ราชภัฏนครศรีธรรมราช	การพัฒนาผลิตภัณฑ์เนยประ Development of Pra Butter Products	National
9.	14.15-14.30	SSSCI2019_FT_18 SSSCI2019_O_104	วารารณ์ สงศรีอินท Waraporn Songsriin	มหาวิทยาลัย ราชภัฏนครศรีธรรมราช	การใช้ผงลูกประทดแทนผงอัลมอนต์ในมาการอง	National
10	14.30-14.45	SSSCI2019_FT_14 SSSCI2019_O_88	ครองศักดิ์ ภัคธนกนก Kongsakda Phakthanakanok	มหาวิทยาลัย ราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง	ผลของการอบแห้งต่อลักษณะบางประการของ เอนไซม์โปรตีนเอสจากเหง้าสับปะรด	National
14.45-15.00		Refreshment Break				
11.	15.00-15.15	SSSCI2019_FT_26 SSSCI2019_O_191	วันดี แก้วสุวรรณ Wandee Kaewsuwan	Nakhon Sri Thammarat Rajabhat Univerisity	กรรมวิธีการผสมต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของ กล้วยอบชุบแป้งทอด	National
12.	15.15-15.30	SSSCI2019_FT_27 SSSCI2019_O_207	อรุณชัย ตั้งเจริญบำรุงสุข Arunchai Tangcharoenbumrungsuk	มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์	การศึกษาเพื่อดูความเป็นไปได้ในการใช้ อินพราเรตสเปกโทรสโกปีและคีโมเมตริกส์เป็น สิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ในการระบุแหล่งต้นทาง ของข้าวหอมมะลิ	National
13.	15.30-15.45	SSSCI2019_FT_30 SSSCI2019_O_242	สุนธรา สุนธธธรา	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี	การใช้มอลทิทอลทดแทนน้ำตาลทรายในขนมตาล	National
14.	15.45-16.00	SSSCI2019_FT_32 SSSCI2019_O_248	ธนิดา ขาญชัย	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี	อาหารท้องถิ่นเมืองเพชร	National
15.	16.00-16.15	SSSCI2019_FT_12 SSSCI2019_P_73	นันทยาภรณ์ เมืองแดง Nanyaporn Mueangdang	มหาวิทยาลัยราชภัฏ พิบูลสงคราม	การทดแทนแป้งมันสำปะหลังด้วยผงลูกจันใน ลอดช่องสิงคโปร์	National
16.	16.15-16.30	SSSCI2019_FT_31 SSSCI2019_O_244	สุนธรา สุนธธธรา	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี	การพัฒนาวอฟเฟิลเพื่อสุขภาพจากข้าวโพดออก	National
17.	16.30-16.45	SSSCI2019_FT_28 SSSCI2019_P_227	ขนิษฐา อินทร์ประสิทธิ์ Khanittha Inprasit	กรมวิทยาศาสตร์บริการ	การศึกษาสมบัติสารยึดเกาะผสมระหว่างปลาย ข้าวคั่วกับไฮโดรคอลลอยด์ในการปรับปรุงเนื้อ สัมผัสของขนมปลายข้าวแผ่นอบกรอบ	National

SsSci^{2nd} conference 2019

Conference Sessions: Sports and Health Science
Bongkotrat Room B, 2nd floor (ห้องบงกชรัตน์ ปี ชั้น 2)

Chairperson				Co-Chairperson		
ดร.ภคกุล สังข์สุริยะ นักวิจัยห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)				อาจารย์ ดร.คมกฤช รัตตะมณี หัวหน้าสาขาวิชาวิทยาศาสตร์การกีฬาและสุขภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา		
No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
1.	11.15-11.30	SSSCI2019_SP_15 SSSCI2019_P_128	Churairat Srimanee	Mahidol University	Biomonitoring of metals exposure in Aranyik handicraft workers	International
2.	11.30.-11.45	SSSCI2019_SP_1 SSSCI2019_O_11	Jatuporn Ounprasertsuk	มหาวิทยาลัย ราชภัฏสวนสุนันทา	บุคลิกภาพ 5 มิติ และการจัดการความขัดแย้งของนักศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏแห่งหนึ่งในประเทศไทย	National
3.	11.45-12.00	SSSCI2019_SP_2 SSSCI2019_O_15	Luckwirun Chotisiri	มหาวิทยาลัย ราชภัฏสวนสุนันทา	The Development of Line Application for Home Visit among NCD Patients	National
4.	12.00-12.15	SSSCI2019_SP_5 SSSCI2019_O_23	Wachiaporn Chotipanut	มหาวิทยาลัย ราชภัฏสวนสุนันทา	ผลของโปรแกรมความสุขต่อพฤติกรรมการส่งเสริมสุขภาพจิตผู้สูงอายุในตำบลบางนางลี่ อำเภอมะนัง จังหวัดสมุทรสงคราม	National
12.15-13.15 Buffet Lunch, Rim Nam Terrace, 1 st floor						
5.	13.15-13.30	SSSCI2019_SP_9 SSSCI2019_O_33	ภูวสิทธิ์ ภูลวรรณ Mr.Phoowasit Phoolawan	มหาวิทยาลัย ราชภัฏสกลนคร	พฤติกรรมป้องกันโรคเบาหวานของประชาชนกลุ่มเสี่ยงในตำบลจั่วต่อน อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร	National

No.	Time	Paper Code/ Registration Code	Name	Institute	Topic	International/ National
6.	13.30-13.45	SSSCI2019_SP_29 SSSCI2019_O_219	ดาวิณี ชินวงศ์ Dawinee Chinnawong	มหาวิทยาลัย ราชภัฏสุรินทร์	การศึกษาผลของตำรับยาพอกเข้าในผู้ป่วยข้อ เข่าเสื่อม ณ โรงพยาบาลสังขะและโรงพยาบาล ส่งเสริมสุขภาพตำบลม อำเภอสังขะ จังหวัด สุรินทร์	National
7.	13.45-14.00	SSSCI2019_SP_30 SSSCI2019_O_233	เอกสิทธิ์ ไชยปิ่น	มหาวิทยาลัย ราชภัฏนครราชสีมา	การพัฒนารูปแบบกิจกรรมส่งเสริมสุขภาพโดย กระบวนการมีส่วนร่วมของผู้สูงอายุ เทศบาล ตำบลหนองบัว อำเภอไชยปราการ จังหวัด เชียงใหม่	National
8.	14.00-14.15	SSSCI2019_SP_31 SSSCI2019_O_232	Preetiwat Wonnabussapawich	มหาวิทยาลัย ราชภัฏนครราชสีมา	ผลของโปรแกรมการยืดเหยียดกล้ามเนื้อที่ ส่งผลต่อสมรรถภาพทางกายของนักกีฬาระดับ มัธยมศึกษาจังหวัดนครราชสีมา	National
9.	14.15-14.30	SSSCI2019_SP_32 SSSCI2019_O_238	จิตติมา ถ้ายอง	วิทยาลัยการสาธารณสุข สิรินธร	ประสิทธิผลของรูปแบบการจัดการเรียนการ สอนโดยใช้ปัญหาเป็นหลักเรื่องการดูแลรักษา ผู้ป่วยระบบหัวใจและหลอดเลือดต่อผลสัมฤทธิ์ การเรียนรู้ ทักษะการแก้ปัญหา การทำงานเป็น ทีม และความคิดเห็นของนักศึกษา หลักสูตร ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง สาขาปฏิบัติการ ฉุกเฉินการแพทย์ วิทยาลัยการสาธารณสุข สิรินธร จังหวัดตรัง	National
10	14.30-14.45	SSSCI2019_SP_33 SSSCI2019_O_241	อัสมาต์ ใจเที่ยง	มหาวิทยาลัยราชภัฏ นครศรีธรรมราช	คุณภาพชีวิตและภาวะโภชนาการของเกษตรกร ชาวสวนยางพื้นที่ตำบลนาเคียน อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช	National
14.45-15.00				Refreshment Break		
11.	15.00-15.15	SSSCI2019_SP_8 SSSCI2019_O_32	ทิพย์วารินทร์ เบญจนิรัตน์ Tipvarin Benjanirut	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สวนสุนันทา	ความต้องการและการเข้าถึงบริการด้านสุขภาพ ของผู้สูงอายุในชนบทจังหวัดสมุทรสงคราม	National

Poster Presentation

SsSci ^{2nd} conference
2019

Phanurangsi Ballroom, 1st floor front area: หน้าห้องประชุมภาณุรังษี ชั้น 1

Conference Schedule: กำหนดการนำเสนอผลงาน

- 11.00-16.00 Poster presentation for participation
- 13.00-15.00 Poster presentation for evaluation committee (นำเสนอผลงานและการตรวจให้คะแนนโดยกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ)
- 15.00-16.00 Poster presentation awards ceremony (พิธีมอบรางวัลนำเสนอผลงานวิชาการประเภทโปสเตอร์)

No.	Paper Code/ Registration Code	Topic	Theme	Name	Institute
1.	SSSCI2019_CS_22 SSSCI2019_P_142	การจำแนกนักศึกษาตามคุณลักษณะและคณะที่เรียน โดยใช้เทคนิคการจำแนกข้อมูลด้วยวิธีต้นไม้การตัดสินใจ กรณีศึกษานักศึกษามหาวิทยาลัยหอการค้าไทย	Computer Science and Information Technology	สิริธร เจริญรัตน์ Sirithorn Jalearnrat	มหาวิทยาลัย หอการค้าไทย
2.	SSSCI2019_CS_27 SSSCI2019_P_159	โมเดลการทำนายพฤติกรรมความเสี่ยงการเกิดภาวะความเครียดทางการเมือง	Computer Science and Information Technology	สมจินต์ จันทระเจษฎากร Somjin Junatarajessadkorn	มหาวิทยาลัย ราชภัฏนครปฐม
3.	SSSCI2019_CS_30 SSSCI2019_P_165	การประยุกต์วิธีการเอจล์สำหรับกิจกรรมในการเรียนการสอน	Computer Science and Information Technology	สกวรัตน์ จงพัฒนานกร Sakauwrat Jongpattanakorn	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
4.	SSSCI2019_CS_33 SSSCI2019_P_211	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำนายสีหมึกพิมพ์ยูวีเฟล็กโซกราฟีบนฉลากพอลิโพรพิลีนโดยใช้โครงข่ายประสาทเทียมและซอฟต์แวร์การทำนายสี	Computer Science and Information Technology	ณัฐวิทย์ โสหา Natthawut Soha	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5.	SSSCI2019_MA_4 SSSCI2019_P_78	ทัศนคติและพฤติกรรมของนิสิตระดับปริญญาตรีมหาวิทยาลัยบูรพา ที่มีต่อการใช้บริการรถตู้โดยสารเส้นทางกรุงเทพฯ (รังสิต) – บางแสน	Mathematics and Statistics	ปรียารัตน์ นาคสุวรรณ Preyarat Naksuwan	มหาวิทยาลัยบูรพา

No.	Paper Code/ Registration Code	Topic	Theme	Name	Institute
6.	SSSCI2019_MA_11 SSSCI2019_P_189	Stratified Unified Ranked Set Sampling for Asymmetric Distributions	Mathematics and Statistics	Chainarong Pianpailoon	Sakon Nakhon Rajabhat University
7.	SSSCI2019_MA_12 SSSCI2019_P_193	ความสัมพันธ์ระหว่างลำดับจากคอปและลำดับพี โบนซ์ซีดัดแปลง	Mathematics and Statistics	ณัฐฉิณีย์ คงนวล Nattinee Khongnual	มหาวิทยาลัยราชภัฏ นครศรีธรรมราช
8.	SSSCI2019_MA_13 SSSCI2019_P_205	ผลกระทบของปริมาณน้ำฝนที่มีผลต่อตัวแบบ สำหรับโรคมือ เท้า ปาก	Mathematics and Statistics	กิตติภัทร พลเดช Kittipat Pondach	มหาวิทยาลัยราชภัฏ นครศรีธรรมราช
9.	SSSCI2019_PH_8 SSSCI2019_P_40	การเตรียมไม้เทียมจากพลาสติก และเส้นใย มะพร้าว	Physics and Energy	สิงหนเดช แดงจวง Singhadej Tangjuank	มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์
10.	SSSCI2019_PH_11 SSSCI2019_P_64	Energy Absorption and Exposure Buildup Factors for Coconut fiber gypsum board	Physics and Energy	Kittisak Sriwongsa	มหาวิทยาลัยศิลปากร
11.	SSSCI2019_PH_12 SSSCI2019_P_65	Evaluation of radiation shielding properties for samarium bismuth borate glasses	Physics and Energy	Kittisak Sriwongsa	มหาวิทยาลัยศิลปากร
12.	SSSCI2019_PH_13 SSSCI2019_P_66	Evaluated shielding radiation and exposure build up factor for La ₂ O ₃ based glasses	Physics and Energy	Kittisak Sriwongsa	มหาวิทยาลัยศิลปากร
13.	SSSCI2019_PH_14 SSSCI2019_P_94	Energy Conservation of Split Type Air Conditioner in Mechanical Engineering Department Building of RMUTL Tak	Physics and Energy	Yuttana Sriudom	Rajamangala University of Technology Lanna Tak
14.	SSSCI2019_PH_15 SSSCI2019_P_110	การประยุกต์วิธีการหาค่าสภาพต้านทานไฟฟ้าของ ชั้นดินเพื่อค้นหาแหล่งน้ำบาดาล และการแก้ภัย แล้ง	Physics and Energy	ธนวัฒน์ รุ่งสูงเนิน Thanawat RangSungnoen	NakhonRatchasima Rajabhat University
15.	SSSCI2019_PH_16 SSSCI2019_P_111	Development of quantum mechanics learning by integrated teaching using normal scattering effects on charge transport in a metal/superconductor junction	Physics and Energy	ภาณุพัฒน์ ชัยวร Panupat Chaiworn	มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
16.	SSSCI2019_PH_19 SSSCI2019_P_131	ประสิทธิภาพของเครื่องย่อยชีวมวลและเครื่องอัด แท่งเชื้อเพลิงจากเศษเหลือทิ้งทางการเกษตร	Physics and Energy	พงษ์ศักดิ์ จิตตบุตร Pongsuk Jittabut	มหาวิทยาลัยราชภัฏ นครราชสีมา

No.	Paper Code/ Registration Code	Topic	Theme	Name	Institute
17.	SSSCI2019_PH_20 SSSCI2019_P_143	อิทธิพลของการปรับสภาพทางความร้อนต่อ โครงสร้างจุลภาคและสมบัติของผิวพ่นเคลือบ ความร้อนของโลหะผสมนิกเกิล-โครเมียม-โม ลิบดีนัม-อะลูมิเนียม	Physics and Energy	อรัชพร ศรีจันทร์ Aradchaporn Srichen	Chiang Mai University
18.	SSSCI2019_PH_21 SSSCI2019_P_151	การเผาถ่าน วิธีดั้งเดิมของชุมชนในบริเวณอ่างเก็บ น้ำห้วยเสนง	Physics and Energy	ลำพูน เหลลาราช Lumpoon Laorach	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สุรินทร์
19.	SSSCI2019_PH_22 SSSCI2019_P_154	การเตรียม เฟสโครงสร้างและสมบัติทางไดอิเล็ก ตริกของวัสดุเซรามิก $\text{Na}_1/3\text{Ca}_1/3\text{Yb}_1/3\text{Cu}_3\text{Ti}_4\text{O}_{12}$	Physics and Energy	จุฑาพล จำปาแถม Jutapol Jumpatam	มหาวิทยาลัยราชภัฏ สุรินทร์
20.	SSSCI2019_PH_24 SSSCI2019_P_161	โครงสร้างโฟโตนิกส์คริสตัลของดั่งขาโต <i>Carvedon serratus</i> Olivier เพศผู้	Physics and Energy	ฐิติพร เจาะจง Thitiporn Jorjong	มหาวิทยาลัยราชภัฏ พิบูลสงคราม
21.	SSSCI2019_PH_26 SSSCI2019_P_167	Conductive Composite Paper from Cellulose Fiber by in situ polymerization of pyrrole	Physics and Energy	Siripassorn Sukkhawuttigit	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์ รังสิต
22.	SSSCI2019_PH_28 SSSCI2019_P_195	การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของถ่านกัม มันต์จากกล้วยน้ำว้า โดยวิธีการกระตุ้นด้วย โพแทสเซียมคาร์บอเนต	Physics and Energy	ภาคิน อินทร์จิตจ้อย พรทิพย์ ภูมิยิ่ง	มหาวิทยาลัยราชภัฏ นครสวรรค์
23.	SSSCI2019_CH_1 SSSCI2019_P_54	การใช้ตัวดูดซับแบบผสมสำหรับการเก็บตัวอย่าง สารก่อเพลิงชนิดเหลวตกค้าง	Chemistry and Forensic science	นิสาลักษณ์ ทาเครือ Nisalak Thakheru	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
24.	SSSCI2019_CH_2 SSSCI2019_P_75	การสังเคราะห์ถ่านกัมมันต์จากเปลือกผสมจุลสัประรด ด้วยการกระตุ้น โดยใช้โพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์	Chemistry and Forensic science	พูนฉวี สมบัติศิริ Punchavee Sombatsiri	มหาวิทยาลัยราชภัฏ ลำปาง
25.	SSSCI2019_CH_4 SSSCI2019_P_109	Synthesis and Evaluation of Molecularly Imprinted Polymer as a Selective Material for Vanillin	Chemistry and Forensic science	วีรณัฐ คฤหานนท์ Wiranut Karuehanon	มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง
26.	SSSCI2019_CH_5 SSSCI2019_P_129	การปรับปรุงคุณภาพของผ้าไหมด้วยสนิมเหล็ก	Chemistry and Forensic science	วีรญา สิงคณิภา Weeraya singkanipa	มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์

No.	Paper Code/ Registration Code	Topic	Theme	Name	Institute
27.	SSSCI2019_CH_8 SSSCI2019_P_168	Participation of Evidence Collection in Forensic Science by the Foundation Officer	Chemistry and Forensic science	Somchart Ketpan	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
28.	SSSCI2019_CH_9 SSSCI2019_P_170	Effects of PEG-based triazolyl substituents on copper-catalyzed aerobic alcohol oxidation	Chemistry and Forensic science	ชมติศา บ่อทรัพย์ Chomtisa Borsap	มหาวิทยาลัยมหิดล
29.	SSSCI2019_CH_10 SSSCI2019_P_178	Formulation of Calcium Tablets by Direct Compression Tableting	Chemistry and Forensic science	Auttapol Hogjalern	Chulalongkorn University
30.	SSSCI2019_CH_13 SSSCI2019_P_198	Rapid Analysis of Alpha-Mangostin Content in Mangosteen Pericarps by Near-Infrared Spectroscopy	Chemistry and Forensic science	ศุมาพร เกษมสำราญ Sumaporn Kasemsumran	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
31.	SSSCI2019_CH_15 SSSCI2019_P_208	การศึกษาองค์ประกอบเคมี และประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว	Chemistry and Forensic science	วัชรภรณ์ ทาหาร Watcharaporn Thahan	มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย
32.	SSSCI2019_CH_16 SSSCI2019_P_209	การเตรียมและการวิเคราะห์ลักษณะของอิมัลชันเชิงซ้อนที่เตรียมได้จากน้ำมันถั่วดาวอินคาด้วยเทคนิคสองขั้นตอน	Chemistry and Forensic science	ภัทรฤทัย ปัญหานไรวินท์ Pattararuethai Piyachanraiwin	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
33.	SSSCI2019_CH_17 SSSCI2019_P_210	Selection of alternative commercial amine solutions for acid gases removal	Chemistry and Forensic science	Aomkwan Lueadkrungsri	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
34.	SSSCI2019_CH_18 SSSCI2019_P_216	การตรวจวัดปริมาณโปรตีนบนผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ ด้วยเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน	Chemistry and Forensic science	Apichat Phengdaam	Prince of Songkla University
35.	SSSCI2019_BT_3 SSSCI2019_P_63	ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของฝอยทองต่อการควบคุมไรโซปลาในเห็ดหูหนู	Biology, Biotechnology and Microbiology	Suphak Kondara สุภัก คณดารา	Pibulsongkram Rajabhat University
36.	SSSCI2019_BT_4 SSSCI2019_P_67	การศึกษาเชื้อราที่ก่อโรคเน่าในมันสำปะหลังในเขตอำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก	Biology, Biotechnology and Microbiology	อารียา ประเสริฐกรรณ์ Arriya Prasertgun	Pibulsongkram Rajabhat University

No.	Paper Code/ Registration Code	Topic	Theme	Name	Institute
37.	SSSCI2019_BT_6 SSSCI2019_P_79	การเปรียบเทียบวัสดุฝังชนิดต่าง ๆ เพื่อทำพรรณไม้แห้งแบบสามมิติ ที่เก็บรักษาด้วยพอลิเอสเตอร์เรซิน	Biology, Biotechnology and Microbiology	พรอนันต์ บุญก่อน Pornanan Boongorn	มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง
38.	SSSCI2019_BT_7 SSSCI2019_P_82	ผลของการต้มและการนึ่งต่อศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของผักโขม	Biology, Biotechnology and Microbiology	ชนิกานุจน์ จันทร์มาทอง Chanikan Junmatong	มหาวิทยาลัยราชภัฏ พิบูลสงคราม
39.	SSSCI2019_BT_10 SSSCI2019_P_101	ผลของสารสกัดจากใบและผลตีปัสติการยับยั้งเชื้อ <i>Penicillium digitatum</i> และ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคพืช	Biology, Biotechnology and Microbiology	อังคณา เชื้อเจ็ดตน Angkana Chuajedton	มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง
40.	SSSCI2019_BT_13 SSSCI2019_P_124	Using ultrafiltration technique for concentrate influenza virus from the supernatant.	Biology, Biotechnology and Microbiology	ทรศนีย์ บุญยทรศนีย์ Darsaniya Punyadarsaniya	Mahanakorn University of technilogy
41.	SSSCI2019_BT_14 SSSCI2019_P_125	Screening and identification of the phytase producing bacteria isolated from natural environments and swine manure	Biology, Biotechnology and Microbiology	สงกรานต์ เชื้อครุฑ Songkran Chuakrut	Naresuan University
42.	SSSCI2019_BT_18 SSSCI2019_P_133	ผลของสารสกัดมะขามเครือต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค	Biology, Biotechnology and Microbiology	หฤทัย ไทยสุชาติ Haruthai Thaisuchat	มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง
43.	SSSCI2019_BT_19 SSSCI2019_P_134	การศึกษาขนาดและรูปแบบของโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กึ่งกลาดำที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 17 β -estradiol	Biology, Biotechnology and Microbiology	ศรีภาพรพรณ ธาระนารถ Sripapan Tharanart	มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขต จันทบุรี
44.	SSSCI2019_BT_22 SSSCI2019_P_183	ผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดใบมะรุมในการป้องกันความเป็นพิษของเอทานอลในยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Biology, Biotechnology and Microbiology	วิสุตา ชุมสวัสดิ์ Wisuta Chumsawat	Mahidol University
45.	SSSCI2019_BT_24 SSSCI2019_P_201	แบคทีเรียจากลำไส้ของสัตว์ที่มีศักยภาพย่อยกลากาแฟสำหรับผลิตกาแฟหมักระดับอุตสาหกรรม	Biology, Biotechnology and Microbiology	ธีรวัฒน์ งามนอก Teerawat Ngamnok	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
46.	SSSCI2019_BT_26 SSSCI2019_P_215	ประสิทธิภาพของเจลแถมสีจากสารสกัดกระเทียมและข่าลิ้งต่อการยับยั้งสี	Biology, Biotechnology and Microbiology	สุวิชญา บัวชาติ Suwichaya Buachard	มหาวิทยาลัยราชภัฏ กำแพงเพชร

No.	Paper Code/ Registration Code	Topic	Theme	Name	Institute
47.	SSSCI2019_BT_27 SSSCI2019_P_217	การสกัดคอลลาเจนชนิดที่ 2 จากเศษของครีปปลาหมึกซึ่งเป็นของเสียในอุตสาหกรรมอาหารทะเล	Biology, Biotechnology and Microbiology	Siripong Somsiriwon	Chulalongkorn University
48.	SSSCI2019_BT_30 SSSCI2019_P_223	ผลของสารสกัดหยาบจากกล้วยไม้ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด	Biology, Biotechnology and Microbiology	วิมลรัตน์ พจนไทรทิพย์ Wimonrat Phottraithip	มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
49.	SSSCI2019_BT_35 SSSCI2019_P_234	การศึกษาเบื้องต้นถึงความหลากหลายชนิดและสังคมพืชในป่าผลัดใบภายหลังการสัมปทานทำไม้ บริเวณป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้าง อำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง	Biology, Biotechnology and Microbiology	ชัตนารี มีสุขโข	มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง
50.	SSSCI2019_EN_11 SSSCI2019_P_100	การศึกษาคุณภาพน้ำที่เปลี่ยนแปลงไปในกระบวนการแช่ฟอกเปลือกปอกระเจา	Environmental science and technology	ประภา โชะสลาม Prapa Sohsalam	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
51.	SSSCI2019_EN_12 SSSCI2019_P_102	การลดฝุ่นขนาด 2.5 ไมครอนด้วยการติดตั้งแผงบังแดดพร้อมพืชใบแคบและใบกว้าง	Environmental science and technology	เอกรัตน์ ปานแร่ Akarat Panrare	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
52.	SSSCI2019_EN_14 SSSCI2019_P_81	ความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตในน้ำและคุณภาพน้ำผิวดิน ภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว)	Environmental science and technology	ศิริรัตน์ จิตบรรเทา Silorat Jitbanthao	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
53.	SSSCI2019_EN_31 SSSCI2019_P_187	ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำและไดอะตอมในชุมชนซีแพกเกาะ เพื่อหาแนวโน้มในการประยุกต์ใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำ	Environmental science and technology	เอกชัย ญาณะ Ekkachai Yana	มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง
54.	SSSCI2019_FT_2 SSSCI2019_P_25	ผลของฟอสเฟต น้ำและโซเดียมต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูสับ	Food Science and Home Economics	มาลี ชัมศรีสกุล Malee Simsriskul	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
55.	SSSCI2019_FT_4 SSSCI2019_P_31	ผลของโซเดียมแลคเตทที่มีต่อคุณภาพเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็งที่ผลิตจากปลายี่สก(<i>Probarbus jullieni</i>)	Food Science and Home Economics	ปัทมา ภาสุถาน Pattama Phasuthan	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
56.	SSSCI2019_FT_6 SSSCI2019_P_41	ออกแบบและพัฒนาเครื่องคัดแยกข้าวเปลือกออกจากข้าวกล้องแบบตะแกรงโยก สำหรับโรงสีข้าวชุมชน	Food Science and Home Economics	สุกัญญา ทองโยธี Sukanya Thongyothee	มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์

No.	Paper Code/ Registration Code	Topic	Theme	Name	Institute
57.	SSSCI2019_FT_7 SSSCI2019_P_49	การสกัดและความคงตัวของแอนโธไซยานินจาก ข้าวหอมมะลิสีน้ำเงิน	Food Science and Home Economics	Wipada Siri-anusornsak วิภาดา ศิริ อนุสรณ์ศักดิ์,	Kasetsart University
58.	SSSCI2019_FT_8 SSSCI2019_P_61	การใช้มอลทิทอลทดแทนน้ำตาลซูโครสใน เมอแรงค์	Food Science and Home Economics	ภรณ์ ลิ้มปิสุต Pouranee Limpisut	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระ จอมเกล้าพระนครเหนือ
59.	SSSCI2019_FT_9 SSSCI2019_P_62	การพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวพองปราศจากน้ำมันจาก ข้าวกล้องหับทิมชุมแพ	Food Science and Home Economics	กมลทิพย์ มั่นภักดี Kamontip Manpakdee	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระ จอมเกล้าพระนครเหนือ
60.	SSSCI2019_FT_11 SSSCI2019_P_72	Development of high anthocyanin crispy rice bar	Food Science and Home Economics	Nuttawut Lainumngen	Institute of Food Research and Product Development
61.	SSSCI2019_FT_16 SSSCI2019_P_96	การศึกษาสำหรับอาหารไทยทรงดำตามประเพณี กรณีศึกษา : ตำบลบ่อทอง อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก	Food Science and Home Economics	วรรณิสา สุตวังยาง Wannisa Sutwangyang,	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูล สงคราม
62.	SSSCI2019_FT_17 SSSCI2019_P_97	การศึกษาดำรงอาหารพื้นบ้านชาวไท-ยวน กรณีศึกษา : หมู่บ้านสมอแข ตำบลสมอแข อำเภอ เมือง จังหวัดพิษณุโลก	Food Science and Home Economics	บันฑิตา ทับทิมเพชรรางกูล Bantita Tubtimpeachranggul	มหาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
63.	SSSCI2019_FT_24 SSSCI2019_P_185	การพัฒนาผลิตภัณฑ์ขนมปังปราศจากกลูเตน	Food Science and Home Economics	ปวีณสุดา ชีปนวัฒนา Paweesuda Keepanawattana	Kasetsart University
64.	SSSCI2019_SP_11 SSSCI2019_P_39	Effects of walking meditation and massage on neuropathic symptoms in persons with type-2 diabetic peripheral neuropathy	Sports and Health Science	พิชญา สุขไพบูลย์ Ms.Pichaya Sukphaibool	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
65.	SSSCI2019_SP_12 SSSCI2019_P_60	A Research of Model of Professional Basketball Management for Professional Basketball Players	Sports and Health Science	Jatuporn Banroengsanoh	Kasetsart University
66.	SSSCI2019_SP_13 SSSCI2019_P_113	ความรู้ ทักษะ การปฏิบัติตนในการดูแลสุขภาพ ช่องปาก และสภาวะทันตสุขภาพของนักเรียน มัธยมศึกษาตอนต้น อำเภอมะนัง จังหวัด อุบลราชธานี	Sports and Health Science	Banhan Aemprakhon	วิทยาลัยการสาธารณสุข สิรินธร

No.	Paper Code/ Registration Code	Topic	Theme	Name	Institute
67.	SSSCI2019_SP_14 SSSCI2019_P_118	การจัดการกองทุนหลักประกันสุขภาพระดับ ท้องถิ่นหรือพื้นที่ กรณีศึกษาองค์การบริหารส่วน ตำบลบัวงาม อำเภอดงหลวง จังหวัดอุบลราชธานี Factors Related to achievement of Athlete	Sports and Health Science	Sarawut Saiboon	วิทยาลัยการสาธารณสุข สิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี
68.	SSSCI2019_SP_16 SSSCI2019_P_135	at Institute of Physical Education participating in the University Games of Thailand.	Sports and Health Science	Thitipong Sukdee	มหาวิทยาลัยการกีฬาแห่งชาติ
69.	SSSCI2019_SP_19 SSSCI2019_P_138	ความชุกของฮีโมโกลบินอีในกลุ่มชาติพันธุ์ลาวเทิง ในสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว	Sports and Health Science	Amkha Sanephonasa	Chulalongkorn University
70.	SSSCI2019_SP_20 SSSCI2019_P_139	ปัจจัยที่มีผลต่อพฤติกรรมการซื้อยาของประชาชน ในตำบลเชียงดา อำเภอสว่างคอม จังหวัดอุดรธานี	Sports and Health Science	สรญา แสนมานน Soraya Saenmanot	มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี
71.	SSSCI2019_SP_22 SSSCI2019_P_177	The Development of Promoting Model for Quality of Life of Elderly with a Retro Dance	Sports and Health Science	Atthaphol Rodkaew	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูล สงคราม
72.	SSSCI2019_SP_23 SSSCI2019_P_179	การพัฒนาโปรแกรมการเสริมสร้างการรับรู้ ความสามารถของตนเองในการป้องกันการ ตั้งครรภ์ก่อนวัยอันควร	Sports and Health Science	ชลดา กิ่งมาลา Chonlada Kingmala	วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนี สุรินทร์
73.	SSSCI2019_SP_24 SSSCI2019_P_180	การศึกษาความเครียดและการเผชิญความเครียด ในญาติผู้ดูแลผู้สูงอายุที่เจ็บป่วยด้วยโรคเรื้อรังใน ชุมชน	Sports and Health Science	ภาวิณี แพงสุข Pavinee Pangasuk	วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนี สุรินทร์
74.	SSSCI2019_SP_25 SSSCI2019_P_188	ความรู้และทัศนคติต่อวิชาชีพสาธารณสุข ของ นักศึกษาสาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏ สุรินทร์	Sports and Health Science	นราวุธ สิ้นสุพรรณ Narawut Sinsupun	มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์
75.	SSSCI2019_SP_26 SSSCI2019_P_231	พฤติกรรมการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และ พฤติกรรมการสูบบุหรี่ของนักศึกษาชั้นปี 1 มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์	Sports and Health Science	นภา วงษ์ศรี Napha Wongsri	มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์

No.	Paper Code/ Registration Code	Topic	Theme	Name	Institute
76.	SSSCI2019_SP_27 SSSCI2019_P_204	Enhancement of visual perception in primary education: A case study of Mae Tha school, Lampang province	Sports and Health Science	Chatsuda Mata	มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง
77.	SSSCI2019_SP_28 SSSCI2019_P_218	พฤติกรรมอนามัยที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อพยาธิกับภาวะโภชนาการของประชาชนโดยรอบอ่างเก็บน้ำสำคัญในจังหวัดสุรินทร์	Sports and Health Science	จีระเดช อินทเจริญสานต์ Jeeradach Intajarurnsan	มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์
78.	SSSCI2019_CS_2 SSSCI2019_O_5	การพัฒนาซอฟต์แวร์อ่านบทคัดย่อรูปเล่มโครงงานวิทยาการคอมพิวเตอร์	Computer Science and Information Technology	นินานาถ เตชะเพชรไพบูลย์ Nisanart Tachpetpaiboon	มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
79.	SSSCI2019_CS_3 SSSCI2019_O_9	การพยากรณ์ปริมาณฝุ่น PM2.5 โดยใช้วิธีวิเคราะห์อนุกรมเวลาด้วยเทคนิคเหมืองข้อมูลกรณีศึกษา: กรุงเทพฯ เขตบางรัก	Computer Science and Information Technology	ทศภูมิ รันระนา Tusaphum Runrana	มหาวิทยาลัยสยาม
80.	SSSCI2019_PH_3 SSSCI2019_O_13	กัมมันตภาพรังสีในทรายชายหาด	Physics and Energy	อมรา อธิพิงษ์ Ammara Ittipongse	Suan Sunandha Rajabhat
81.	SSSCI2019_BT_16 SSSCI2019_O_90	การใช้แอคติโนมัยซีท้านทานแคดเมียมกับพืชร่วมกันในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อน	Biology, Biotechnology and Microbiology	ภัสราภรณ์ ฐูปเพ็ง Patsaraporn Thooppeng	Mahidol University
82.	SSSCI2019_BT_17 SSSCI2019_O_98	ความสามารถของแอคติโนมัยซีท้านทานแคดเมียมในการกำจัดแคดเมียมออกจากน้ำและการละลายแคดเมียมในดิน	Biology, Biotechnology and Microbiology	โชตินันท์ จันประดิษฐ์ Chotinant Junpradit	Mahidol University
83.	SSSCI2019_BT_25 SSSCI2019_O_206	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านการเกิดไบโอฟิล์มของสารสกัดสารสกัด จอฉนวนต่อเชื้อในช่องปาก	Biology, Biotechnology and Microbiology	วรพรรณณี เผ่าทองสุข Worapannee Powtongsook	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
84.	SSSCI2019_BT_34 SSSCI2019_O_738	ผลของ Non-albicans <i>Candida</i> species ร่วมกับ <i>Streptococcus mutans</i> ต่อความสามารถในการก่อโรคฟันผุ	Biology, Biotechnology and Microbiology	วิรัชพัชร แสนเสนาะ Wirunphat Sansanoa	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
85.	SSSCI2019_FT_29 SSSCI2019_O_785	การพัฒนาคุณภาพน้ำมันปาล์มสำหรับการทอดอาหารโดยใช้สารสกัดจากสมุนไพร	Food Science and Home Economics	ปริญญญา จิยพิงค์	กรมวิทยาศาสตร์บริการ

No.	Paper Code/ Registration Code	Topic	Theme	Name	Institute
86.	SSSCI2019_SP_17 SSSCI2019_O_55	ประสิทธิภาพของการสอนด้วยชุดสื่อวีดิทัศน์เรื่อง การเช็ดตัวลูกไข้ โดยประยุกต์ทฤษฎีแรงจูงใจใน การป้องกันโรคของผู้ดูแลเด็กป่วยแผนกศัลยกรรม เด็ก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย	Sports and Health Science	ฐมาพร เชี่ยวชาญ Tamaporn Chaiwchart	มหาวิทยาลัย ศรีนคริน ทรวิโรฒ

กลุ่มที่ 5

ชีววิทยา เทคโนโลยีชีวภาพ จุลชีววิทยา Biology, Biotechnology, and Microbiology

ชื่อเรื่อง	หน้า
ความหลากหลายของชนิดพันธุ์ปลาน้ำจืดในคลองแสนแสบพื้นที่กรุงเทพมหานคร ฤทัยรัตน์ สิริวัฒนรัชต์, นกมล แซ่มซ้อย และวีรวิชัย วงศ์โรจน์	5-1
การโคลน การแสดงออก และการศึกษาลักษณะของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส จาก <i>Bacillus</i> sp. พรศิริ บำรุงธรรม และสุกัลยา อุทัยดา	5-12
ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของฝอยทองต่อการควบคุมไรไข่ปลาในเห็ดหูหนู สุภัค คนดารา, พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ, สราวุธ สิทธิกุล, อรรถพล นาขวา, เรืองวุฒิ ชูติมา, ชนิกานต์ คุ่มนง, ทิววัฒน์ นาพิรุณ และกิริติ ต้นเรือน	5-21
การศึกษาเชื้อราที่ก่อโรครากเน่าในมันสำปะหลังในเขตอำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก อารียา ประเสริฐกรรม และราไฟ โภภีสืบ	5-31
การเปรียบเทียบวัสดุฝังชนิดต่าง ๆ เพื่อทำพรรณไม้แห้งแบบสามมิติที่เก็บรักษาด้วยพอลิเอสเตอร์เรซิน พรอนันต์ บุญก่อน, จินตนาภรณ์ สืบชัย, อีรวัฒน์ ชวงค์เจริญกุล, อังคณา เชื้อเจ็ดตน และหฤทัย ไทยสุชาติ	5-40
ผลของการต้มและการนึ่งต่อศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ของผักโขม นัทชา ยาทา และชนิกาญจน์ จันทร์มาทอง	5-50
การศึกษาสมบัติบางประการของพันธุ์พริกพื้นเมือง (พริกกะเหรี่ยง) ที่ปลูกในพื้นที่ภาค ตะวันตกของประเทศไทย รพีพรรณ กองตูม, ณัฐพรภัทร อินทร์ศิริพงษ์ และครองศักดิ์ ภาคนกนก	5-60
ผลของสารสกัดจากใบและผลตีปัสต่อการยับยั้งเชื้อ <i>Penicillium digitatum</i> และ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคพืช อังคณา เชื้อเจ็ดตน	5-71
ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อม จังหวัดสกลนคร กฤษณ์ พิเนตรเสถียร	5-78

ชื่อเรื่อง	หน้า
ความสามารถในการต้านโรคเบาหวานผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากผักพื้นบ้านที่ องุ่นในเขตพื้นที่หมู่ 9 ตำบลขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี อารยา ปรานประวีตร	5-89
การใช้แอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนของ ว่านเศรษฐีเรือนใน ภัสราภรณ์ ธูปเพ็ง, เบญจภรณ์ ประภักดี, วิชญา รงค์สยามานนท์, กรรณิการ์ ดวงมาลย์	5-99
ความสามารถของแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมในการกำจัดแคดเมียมออกจากน้ำและ การละลายแคดเมียมในดิน โชตินันท์ จั่นประดิษฐ์, เบญจภรณ์ ประภักดี, วิชญา รงค์สยามานนท์ และกรรณิการ์ ดวงมาลย์	5-108
การศึกษาขนาดและรูปแบบของโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กิ้งกูดดำที่ได้รับอาหารผสม ฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล ศรัภาพรรณ ธาระนารถ, บัลลังก์ เนื่องแสง, วศิน ยูวนะเดมิย์ และรชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ	5-118
การผลิตกรดซัคซินิกจากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ <i>Actinobacillus succinogenes</i> อัครอ หะยัยบุคลเลาะ, ชุตินา ศิลาภรณ์เวช, ปรัชญา กรธัชฐ์ลิ้ม, ปรีชา กลสิกรรมไพบูลย์ และอุไรวรรณ ขุนจันทร์	5-128
การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย <i>Arthrospira platensis</i> และสาหร่าย <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 รัชนิกร สวามิ, ภริตาภรณ์ ผากกลาง และรชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ	5 -138
แบคทีเรียจากลำไส้ชนิดที่มีศักยภาพย่อยกาแฟกะลาสำหรับผลิตกาแฟหมักระดับ อุตสาหกรรม ธีรวัฒน์ งามนอก และจอมขวัญ มีรักษ์	5-148
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านเชื้อแบคทีเรีย และด้านการเกิดไบโอฟิล์มของสารสกัดสมุนไพรจีน ต่อเชื้อในช่องปาก ดรณรัตน์ สบายใจ, อำพร บุญเอก, ศรมณ สุทินอรภา ศิลมัฐ, รุ่งรัตน์ นิลธเสน, วรพรรณณี เผ่าทองสุข	5-158
ประสิทธิภาพของเจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและขาลึงต่อการยับยั้งสิว สุวิชญา บัวชาติ และอังคณา ภัคดี	5-169

ชื่อเรื่อง	หน้า
พฤติกรรมของนกเป็ดแดง (<i>Dendrocygna javanica</i>) บริเวณอ่างเก็บน้ำภายในมหาวิทยาลัย ราชภัฏเชียงใหม่ ศูนย์แมริม กัญญ์วรา วงศ์แพทย์ และณัฐธิดา สุภาหาญ	5-179
ผลของสารสกัดหยาบจากกล้วยไม้ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด วิมลรัตน์ พจน์ไตรทิพย์, วาสนา ประภาเลิศ และอ้อมหทัย ดีแท้	5-196
ความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนดินในจังหวัดลพบุรีที่มีศักยภาพในการผลิตปุ๋ยหมัก มูลไส้เดือนจากผักตบชวา เพ็ญใจ เจียรวิชัยกุล	5-206
ผลการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจกบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงชนิดต่างๆ วัชร หาดูเมืองใจ และประเสริฐ หาดูเมืองใจ	5-214
ผลกระทบของมลพิษในระบบนิเวศนาข้าวต่อสิ่งมีชีวิตในอำเภอมะนัง จังหวัดเชียงใหม่ รุ่งนภา ทากัน และทัตพร คุณประดิษฐ์	5-224
ผลของ Non-albicans <i>Candida</i> species ร่วมกับ <i>Streptococcus mutans</i> ต่อความสามารถในการก่อโรคฟันผุ วิรัชพัชร แสนเสนาะ, อรนาฏ มาตังคสมบัติ และพนิดา ัญญศรีสังข์	5-234
การศึกษาเบื้องต้นถึงความหลากหลายชนิดและสังคมพืชในป่าผลัดใบภายหลังการสัมปทานทำไม้ บริเวณป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้าง อำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง ชัตนารี มีสุขโข	5-242
คุณสมบัติเป็นโพรไบโอของ <i>Lactobacillus plantarum</i> 3C2-10 ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากเปลือกส้ม พรอริยา ฉิรินัง, วัชรินทร์ ยุทธวานิชกุล และศิริวรรณ ณะวงษ์	5-253
Using ultrafiltration technique for concentrate influenza virus From the supernatant. Darsaniya Punyadarsaniya and Sitthichon Rattanachan	5-264
The inhibitory effect of <i>Rourea stenopetala</i> Schellenb.	5-269

Extracts on pathogenic bacteria

Haruthai Thaisuchat, Chonlada Thouaunraeon, Wachiraporn Lapuangkum,
Satra Ladpala and Pornanan Boonkorn

**Effect of bioactive compounds from *Moringa oleifera* leaf extract
against ethanol toxicity in *Saccharomyces cerevisiae***

5-275

Wisuta Chumsawat, Sarawaree Khotsri, Virayuth Khamdi
and Choowong Auesukaree

**การเก็บรักษาเชื้อยีสต์จากหมักเปลือกสับปะรดโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
กัลทิมา พิชัย, ธิญญาพร แสงศรีจันทร์ และอ้อมหทัย ดีแท้**

5-281

ความหลากหลายของชนิดพันธุ์ปลาน้ำจืดในคลองแสนแสบพื้นที่กรุงเทพมหานคร

ฤทัยรัตน์ สิริวัฒนรัชต์¹ นกตล แหม่ซ้อย¹ วีริชญ์ วงศ์โรจน์²

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา¹

โรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร (ฝ่ายประถม)²

email: ruthairat.si@ssru.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและเก็บตัวอย่างปลาน้ำจืดในคลองแสนแสบพื้นที่กรุงเทพมหานคร ระบุชนิดของปลาที่พบ เริ่มทำการศึกษาดังแต่ เดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2562 รวมเป็นระยะเวลา 1 ปี กำหนดสถานี เก็บตัวอย่างจำนวน 8 สถานี เก็บตัวอย่างเดือนละ 1 ครั้งต่อ 1 สถานี ผลการศึกษาพบปลาจำนวนทั้งสิ้น 12 วงศ์ 17 สกุล และ 18 ชนิด วงศ์ที่มีจำนวนชนิด ที่พบมากที่สุด ได้แก่ วงศ์ Cyprinidae พบ 6 ชนิด ชนิดที่พบตัวอย่างทุกสถานี ได้แก่ ปลาเทศบาล *Pterygoplichtys anisitsi* ชนิดที่พบจำนวนตัวอย่างมากที่สุดคือ ปลาเทศบาล *Pterygoplichtys anisitsi* มีจำนวน 39 ตัว รองลงมาคือ ปลานิล *Oreochromis niloticus* ซึ่งพบทั้งสิ้นจำนวน 31 ตัว

คำสำคัญ: ความหลากหลายชนิดของพันธุ์ปลาน้ำจืด

Diversity of freshwater fishes in Saensaeb Canal Bangkok area

Ruthairat Siriwattanasat¹ Noppadon Chamchoi¹ Weerawich Wongroj²

Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University¹
Srinakharinwirot University Prasarnmit Demonstration School (elementary)²
email: ruthairat.si@ssru.ac.th

Abstract

The objective of this study was to investigate freshwater fishes in area of Bangkok. Specify the type of fish found started the study from October 2561 to July 2019, for a period of 1 year. Specify 8 sampling stations. Samples can be collected 1 time per month per 1 station. The study found a total of 12 families, 17 genera and 18 species. The most common are the Cyprinidae family that found 6 species. Species found in every station are Sucker (*Pterygoplichtys anisitsi*) that found a total of 39 fish, followed by Tilapia (*Oreochromis niloticus*) found a total of 31 fish.

Keywords: diversity of freshwater fishes

บทนำ

กรุงเทพมหานครจัดว่าเป็นพื้นที่ที่ถูกบุกรุกและทำลายสภาพธรรมชาติที่มีอยู่เดิมไปมากที่สุดแห่งหนึ่ง เนื่องจากสภาพการณ์ขยายตัวของชุมชนมีแนวโน้มที่จะกระจายออกไปสู่พื้นที่แถบชานเมือง แม้จะมีการกำหนดผังเมืองขึ้นมาแล้ว แต่ก็ไม่สามารถแก้ปัญหาสภาพแวดล้อมเสื่อมโทรมของพื้นที่บริเวณดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยสาเหตุจากการยกเลิกพระราชบัญญัติควบคุมการใช้ที่ดินประเภทอนุรักษ์ชนบทและเกษตรกรรมจังหวัดสมุทรปราการที่เคยปรากฏในผังเมืองรวม ต่อเนื่องจากพื้นที่อนุรักษ์ในพื้นที่กรุงเทพมหานครเป็นแถบต่อเนื่องลงไปถึงหาดชายฝั่งทะเลหลัง พ.ศ. 2535 เป็นต้นมา และเมื่อมีโครงการก่อสร้างท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ในพื้นที่น้ำหลากบริเวณหนองงูเห่า ทำให้มีการสร้างคลังสินค้าและโรงงานอุตสาหกรรมและการก่อสร้างโครงการต่อเนื่องตามมาอีกมากมาย อาทิศูนย์การค้า โรงแรม หมู่บ้านจัดสรร เป็นต้น ส่งผลให้คลองแสนแสบซึ่งเป็นคลองสายหลักของกรุงเทพมหานครมีตะกอนที่รับน้ำจากทางเหนือผ่านประตูระบายน้ำซึ่งควบคุมปริมาณน้ำเหนือให้ไหลลงสู่จังหวัดสมุทรปราการหรือช่วยผลักดันน้ำลงสู่แม่น้ำเจ้าพระยาจากคลองสาขาต่างๆ ทำให้คลองแสนแสบมีสภาพเป็นท่อระบายน้ำสาธารณะไปโดยปริยาย

ความสำคัญของคลองแสนแสบมีมากขึ้นเป็นลำดับภายหลังการทำสนธิสัญญาเบอร์นีและบาวริง เนื่องจากการค้าขายกับต่างประเทศของไทยขยายตัวมากขึ้น มีการขยายพื้นที่การเพาะปลูกพืชผลที่ใช้เป็นสินค้าส่งออก โดยเฉพาะข้าวและอ้อยมากกว่าเดิมและบริเวณสองฝั่งคลองแสนแสบก็เป็นพื้นที่หนึ่งรัฐใช้เพื่อการนี้โดยเกณฑ์แรงงานจากครัวเชลยที่ถูกกวาดต้อนมาทั้งชาวลาว เขมร มลายู มอญ เขมร รวมถึงชาวจีนที่เข้ามาตั้งหลักแหล่งในเมืองไทยจำนวนมากเป็นแรงงานในการผลิต บริเวณคลองแสนแสบจึงเป็นบริเวณที่มีผู้คนหลายเชื้อชาติอาศัยและอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มก้อนตามเชื้อชาติของตน มีวิถีชีวิตความเป็นอยู่ในกรอบวัฒนธรรมของตนอย่างเสรีและสามารถอยู่ร่วมกันได้อย่างผสมกลมกลืน (วรารณ จิวชัยศักดิ์, 2555)

การสร้างถนนเพชรบุรีตัดใหม่และถนนสุขุมวิทได้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วทั้งจำนวน ความหลากหลายของประชากรและปัญหาสังคมนานาประการ คลองแสนแสบทำหน้าที่เป็นเสมือนปราการด่านสุดท้ายที่ป้องกันชุมชนจากปัจจัยคุกคามภายนอก (ศิริวรรณ ศิริบุญ, 2555)

คลองแสนแสบได้รับการพัฒนา ปรับปรุง พร้อมทั้งรัฐได้จัดการบริหารการปกครองในท้องที่บริเวณสองฝั่งคลองให้เหมาะสมตามลำดับ จนในปัจจุบันมีเขตการปกครองที่มีคลองแสนแสบพาดผ่านถึง 18 เขต คลองแสนแสบที่มีประวัติยาวนานร่วม 200 ปีจึงยังคงเป็นเส้นทางน้ำที่แม้จะลดบทบาทในการเป็นเส้นทางคมนาคมหลักไป แต่ก็ยังคงมีฐานะเป็นคลองสำคัญในประวัติศาสตร์และเป็นเส้นทางสัญจรทางเลี้ยวของคนกรุงเทพมหานคร และเขตชานเมือง อีกทั้งยังเป็นแหล่งน้ำที่มีประวัติทางวัฒนธรรม มีความหลากหลายทางชาติพันธุ์ที่น่าสนใจอีกด้วย (วรารณ จิวชัยศักดิ์, 2555) เพราะต้องรับน้ำทั้งจากชุมชนและเขตเมืองของกรุงเทพมหานครโดยตรงก่อนจะระบายลงสู่แม่น้ำเจ้าพระยาอีกต่อหนึ่ง ส่งผลให้คุณภาพน้ำในคลองแสนแสบอยู่ในภาวะวิกฤต (วรารณ จิวชัยศักดิ์, 2555) แม้ว่าจะมีหลายหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนจัดทำโครงการอนุรักษ์คลองแสนแสบ แต่ก็ยังไม่สามารถทำให้คลองแสนแสบมีคุณภาพน้ำในระดับที่ดีขึ้นกว่าเดิมได้ การที่คุณภาพน้ำในคลองแสนแสบอยู่ในภาวะวิกฤตนั้นมิได้ส่งผลกระทบต่อแค่เพียงแต่คุณภาพชีวิตของประชาชนเพียงเท่านั้น ยังส่งผลกระทบต่อทรัพยากรธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งทรัพยากรสัตว์น้ำ ส่งผลกระทบต่อการทำให้ชนิดและจำนวนของปลาในคลองแสนแสบเปลี่ยนแปลงไป รายงานวิจัยว่าตรวจพบทรัพยากรสัตว์น้ำจืดที่ดำรงชีวิตอยู่ในคลองแสนแสบได้ โดยสิงหา วงศ์โรจน์ (2547) พบว่า ปลาน้ำจืดในพื้นที่กรุงเทพมหานครมีจำนวนออก จาก 20 สถานีซึ่งครอบคลุมคลองแสนแสบด้วย โดยพบชนิดพันธุ์ปลาทั้งสิ้น 42 ชนิด

นอกจากนี้ผลจากเหตุการณ์น้ำท่วมใหญ่ ปี 2554 ก็อาจส่งผลให้การกระจายพันธุ์ของปลาน้ำจืดในคลองแสนแสบเปลี่ยนแปลงไป รวมทั้งการแพร่ระบาดของปลาหมอหางดำซึ่งเป็นปลาต่างถิ่นซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่กรมประมงประกาศให้อยู่ในสถานะสัตว์ต่างถิ่นที่เข้ามารุกรานปลาพื้นถิ่น ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อความหลากหลายชนิดพันธุ์ปลาน้ำจืดในคลองแสนแสบได้ การสำรวจความหลากหลายชนิดของพันธุ์ปลาน้ำจืดในคลองแสนแสบพื้นที่กรุงเทพมหานคร จึงเป็นการสร้างฐานข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญให้กับชุมชนและท้องถิ่นเพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการจัดการการอนุรักษ์แม่น้ำและทรัพยากรปลา เพื่อให้เกิดการเกื้อกูลซึ่งกันและกันระหว่างคนในชุมชนกับคลองแสนแสบสืบต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสำรวจชนิดของพันธุ์ปลาน้ำจืดในคลองแสนแสบพื้นที่กรุงเทพมหานคร

ระเบียบวิธีวิจัย

อุปกรณ์ในการดำเนินการศึกษา

อุปกรณ์ในภาคสนาม ได้แก่ ภาชนะใส่ตัวอย่างปลา เช่น ถังพลาสติก ถังพลาสติก กล่องโฟม ป้ายกระดาษหรือพลาสติกสำหรับบันทึกข้อมูลกำกับตัวอย่างปลา สมุดบันทึก ไม้วัดขนาดความยาว ปากคีบ กล้องถ่ายภาพพร้อมอุปกรณ์

เครื่องมือประมง ได้แก่ แห ข่าย อวนล้อม เบ็ด สวิงและน้ำยาตองเพื่อใช้เก็บรักษาตัวอย่างปลา ได้แก่ ฟอรัมาลิน 10 % และ แอลกอฮอล์ 70 %

อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ แวนช่าย กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ชุดเครื่องมือผ่าตัด และ เวอร์เนียคาลิเปอร์

การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

การสำรวจและเก็บตัวอย่างดัดแปลงจากวิธีการของสิงหา วงศ์โรจน์ (2547)

1. เก็บตัวอย่างโดยใช้เครื่องมือประมงพื้นบ้าน ได้แก่ 1) แห 2) ข่าย 3) อวนล้อม 4) เบ็ด 5) สวิง
2. คัดแยกชนิดพันธุ์ปลาเบื้องต้นภาคสนามจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและบันทึกภาพตัวอย่างปลาแต่ละชนิด
3. นำตัวอย่างปลาที่เก็บได้มาวิเคราะห์ชนิด โดยใช้คู่มือประกอบการวิเคราะห์ชนิด เช่น ทวีศักดิ์ (2530) Jayaram (1981) Kottelat (1991b) Ng (1990) Roberts (1992) Rainboth (1992, 1993, 1996b) Smith (1945) และ Nelson (1994)

4. คัดเลือกตัวอย่างปลาแต่ละชนิดเป็นตัวแทนศึกษาแล้วนับวัดสัดส่วนโครงสร้างภายนอกต่างๆ ที่สำคัญและแสดงสัดส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของความยาวหัว (% head length, HL) และความยาวลำตัว (% standard length, SL) ตัวอย่างปลาที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาความหลากหลายของชนิดพันธุ์ปลา ให้ตัวเลขไว้ในบัญชีรายชื่อ พร้อมข้อมูลกำกับตัวอย่างและเก็บไว้ในห้องเก็บรักษาตัวอย่าง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา โดยกำหนดรหัสของตัวอย่างเป็น SSRU และใส่เลขรหัสเริ่มตั้งแต่ 1000 และจัดทำบัญชีรายชื่อ ปลาที่สำรวจพบของแต่ละสถานีและแต่ละเดือน

ระยะเวลาที่ศึกษาและพื้นที่เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างในพื้นที่คลองแสนแสบในพื้นที่กรุงเทพมหานคร โดยดำเนินการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 ถึง กรกฎาคม 2562 รวมระยะเวลา 10 เดือน เริ่มจากการสำรวจสภาพพื้นที่โดยรวมของกรุงเทพฯ ฝั่งตะวันออก เพื่อกำหนดสถานที่ที่เป็นตัวแทนศึกษาได้อย่างครอบคลุมเหมาะสมและสะดวกต่อการปฏิบัติงาน โดยคำนึงถึงสภาพนิเวศวิทยาของพื้นที่ ความสะดวกต่อการเก็บตัวอย่าง ซึ่งกำหนดสถานที่เก็บตัวอย่างพันธุ์ปลาน้ำจืดตลอดแนวคลองแสนแสบในพื้นที่กรุงเทพมหานคร ตั้งแต่สถานีตลาดหนองจอกถึงสถานีท่าเรือผ่านฟ้าลีลาศ จำนวน 8 สถานี (ภาพที่ 3) ได้แก่ 1) สถานีสะพานผ่านฟ้า 2) สถานีท่าเรือประสานมิตร 3) สถานีวัดศรีบุญเรือง 4) สถานีตลาดน้ำขวัญเรียม 5) สถานีสุเหร่าทรายกองดิน 6) สถานีวัดทรัพย์สโมสร 7) สถานีสะพานศิริศรัทธา 8) สถานีตลาดหนองจอก (ภาพประกอบที่ 1)

ภาพประกอบที่ 1 แสดงสถานี่เก็บตัวอย่างพันธุ์ปลาน้ำจืดตลอดแนวคลองแสนแสบในพื้นที่กรุงเทพมหานคร



สถานี่ที่ 1 สะพานผ่านฟ้า



สถานี่ที่ 5 สุเหร่าทรายกองดิน



สถานี่ที่ 2 ท่าเรือประสานมิตร



สถานี่ที่ 6 วัดทวีปย์สโมสร



สถานี่ที่ 3 ท่าเรือวัดศรีบุญเรือง



สถานี่ที่ 7 สะพานศิริวัฒนา



สถานี่ที่ 4 ตลาดน้ำวัดเวรม



สถานี่ที่ 8 ตลาดหนองจอก

การศึกษาชนิดของปลา

โดยนำตัวอย่างปลาที่เก็บได้มาวิเคราะห์ชนิด คัดเลือกตัวอย่างปลาแต่ละชนิดเป็นตัวแทนศึกษาแล่นวัดสัดส่วนโครงสร้างภายนอกต่างๆ ที่สำคัญและแสดงสัดส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของความยาวหัว (% head length, HL) และความยาวลำตัว (% standard length, SL) ตัวอย่างปลาที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาทางอนุกรมวิธาน ให้ตัวเลขไว้ในบัญชีรายชื่อพร้อมข้อมูลกำกับตัวอย่างและเก็บไว้ในน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยอัตราส่วนของน้ำยา 1 ส่วน ต่อน้ำ 3 ส่วน แล้วจึงนำมา

ดองในน้ำยาแอลกอฮอล์ เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีตัวอย่างปลาขนาดใหญ่ควรทำการผ่าท้องเสียก่อน เพื่อให้ น้ำยา สิ้น เข้าไปภายในช่องท้อง หรืออาจใช้วิธีฉีดยาน้ำยาเข้าไปในช่องท้องก็ได้ (สืบสิน สนธิรัตน์, 2527)

ผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างพันธุ์ปลาตัวอย่างตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 ถึง กรกฎาคม 2562 รวมระยะเวลา 10 เดือน จำนวน 8 สถานี (ภาพประกอบ 1) ได้แก่ 1) สถานีสะพานผ่านฟ้า 2) สถานีท่าเรือประสานมิตร 3) สถานีวัดศรีบุญเรือง 4) สถานีตลาดน้ำขวัญเรียม 5) สุเหร่าทรายกองดิน 6) สถานีวัดทรัพย์สโมสร 7) สถานีสะพานศิริศรัทธา 8) สถานีตลาดหนองจอก พบพันธุ์ปลาจำนวนทั้งสิ้น 18 ชนิด วงศ์ที่มีจำนวนชนิดที่พบมากที่สุด ได้แก่ วงศ์ปลาตะเพียน Cyprinidae พบจำนวน 6 ชนิด

ชนิดของพันธุ์ปลาที่ตรวจพบและสถานีที่ตรวจพบ (ตารางที่ 1)



ปลากลาย *Chitala ornata*



ปลากะมัง *Puntius proctozysron*



ปลาตะเพียนขาว *Barbonyms gonionotus*



ปลาตะเพียนทอง *Barbonyms altus*



ปลาชะ *Labiobarbus leptocheilus*



ปลาแก้มช้ำ *Puntius orphoides*



ปลาตะโกก *Cyclocheilichthys enoplos*



ปลาแขยงขี้กล้วย *Mystus mysticetus*



ปลาดุกอูย *Clarias macrocephalus*



ปลาสวาย *Pangasianodon hypophthalmus*



ปลาสังกะวาดท้องเหลือง *Pangasius macronema*



ปลาเทศบาล *Pterygoplichtys anisitsi*



ปลาไหล *Fluta albus*



ปลานิล *Oreochromis niloticus*



ปลาบู่ทราย *Oxyleotris marmorata*



ปลาหมอไทย *Anabas testudineus*



ปลากระดี่นาง *Trichogaster microlepis*



ปลาช่อน *Channa striata*

ตารางที่ 1 ชนิดของพันธุ์ปลาที่ตรวจพบและสถานที่ตรวจพบ

ชื่อพันธุ์ปลา	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	สถานที่ที่ตรวจพบ
ปลากลาย (<i>Chitala ornata</i>)	1	5
ปลาตะเพียนขาว (<i>Barbonymus gonionotus</i>)	10	5 และ 7
ปลากะมั่ง (<i>Puntioplites proctozysron</i>)	12	5 และ 7
ปลาตะเพียนทอง (<i>Barbonymus altus</i>)	8	5, 6 และ 7
ปลาช่า (<i>Labiobarbus leptocheilus</i>)	16	5, 6 และ 7
ปลาแก้มช้ำ (<i>Puntius orphoides</i>)	7	5, 6 และ 7
ปลาตะโกก (<i>Cyclocheilichthys enoplos</i>)	19	5 และ 7
ปลาแขยงข้างลาย (<i>Mystus mysticetus</i>)	22	4, 5, 6 และ 7
ปลาดุกอุย (<i>Clarias microcephalus</i>)	16	2, 3, 4, 5, 6 และ 7
ชื่อพันธุ์ปลา	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	สถานที่ที่ตรวจพบ
ปลาสวาย (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>)	11	2, 3 และ 4
ปลาสังกะวาดท้องเหลือง (<i>Pangasius macronema</i>)	14	5, 6 และ 7
ปลาเทศบาล (<i>Pterygoplichtys anisitsi</i>)	39	ทุกสถานี
ปลาไหล (<i>Fluta albus</i>)	8	4, 5, 6, 7 และ 8
ปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i>)	31	1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7
ปลาบู่ทราย (<i>Oxyleotris marmorata</i>)	4	8
ปลาหมอไทย (<i>Anabas testudineus</i>)	19	4, 5, 6, 7 และ 8
ปลาช่อน (<i>Channa striata</i>)	15	4, 5, 6 และ 7
ปลากระดี่นาง (<i>Trichogaster microlepis</i>)	24	4, 5, 6 และ 7

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาอนุกรมวิธานของปลาน้ำจืดในคลองแสนแสบในช่วงเวลา 10 เดือน พบ ปลาน้ำจืด 12 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ปลาทราย Notopteridae วงศ์ปลาตะเพียน Cyprinidae วงศ์ปลาแขยง Bagridae วงศ์ปลาตุ๊ก Clariidae วงศ์ปลาซิว Pangasiidae วงศ์ปลาเทศบาล Loricariidae วงศ์ปลาไหล Synbranchidae วงศ์ปลานิล Cichlidae วงศ์ปลาบู่ Eleotridae วงศ์ปลาหมอ Anabantidae วงศ์ปลากระดี่ Belontiidae และวงศ์ปลาช่อน Channidae รวมทั้งหมด 17 สกุล 18 ชนิด วงศ์ที่มีจำนวนชนิดที่พบมากที่สุด ได้แก่ วงศ์ปลาตะเพียน Cyprinidae พบจำนวน 6 ชนิด ที่เหลือเป็นปลาจากวงศ์อื่นๆ อีกรวม 12 ชนิด

วงศ์ปลาน้ำจืดที่พบหลากหลายชนิดที่สุดคือ วงศ์ ปลาตะเพียน Cyprinidae พบทั้งสิ้น 6 ชนิด ได้แก่ ปลาตะโกก *Cyclocheilichthys enoplos* ปลาตะเพียนทอง *Barbonymus altus* ปลาตะเพียน *Barbonymus gonionotus* ปลาแก้มขี้ *Puntius orphoides* ปลากระมัง *Puntioplites proctozyron* และปลาซ่า *Labiobarbus leptocheilus*

วงศ์ที่พบความหลากหลายรองลงมาคือ วงศ์ปลาซิว Pangasiidae พบทั้งสิ้น 2 ชนิด ได้แก่ ปลาสังกะวาดทองเหลือง *Pangasius macronema* ปลาซิว *Pangasianodon hypophthalmus*

วงศ์ปลาทราย Notopteridae พบเพียงชนิดเดียว ได้แก่ ปลาทราย *Chitala ornata*

วงศ์ปลาแขยง Bagridae พบเพียงชนิดเดียว ได้แก่ ปลาแขยงข้างลาย *Mystus mysticetus*

วงศ์ปลาตุ๊ก Clariidae พบเพียงชนิดเดียว ได้แก่ ปลาตุ๊กอู *Clarias macrocephalus*

วงศ์ปลาเทศบาล Loricariidae พบเพียงชนิดเดียว ได้แก่ ปลาเทศบาล *Pterygoplichtys anisitsi*

วงศ์ปลาไหล Synbranchidae พบเพียงชนิดเดียว ได้แก่ ปลาไหล *Fluta albus*

วงศ์ปลานิล Cichlidae พบเพียงชนิดเดียว ได้แก่ ปลานิล *Oreochromis niloticus*

วงศ์ปลาบู่ Eleotridae พบเพียงชนิดเดียว ได้แก่ ปลาบู่ทราย *Oxyeleotris marmorata*

วงศ์ปลาหมอ Anabantidae พบเพียงชนิดเดียว ได้แก่ ปลาหมอ *Anabas testudineus*

วงศ์ปลากระดี่ Belontiidae พบเพียงชนิดเดียว ได้แก่ ปลากระดี่นาง *Trichogaster microlepis* วงศ์ปลาช่อน Channidae พบเพียงชนิดเดียว ได้แก่ ปลาช่อน *Channa striatus*

ปลาที่พบจำนวนตัวมากที่สุดคือ ปลาเทศบาล *Pterygoplichtys anisitsi* มีจำนวน 39 ตัว รองลงมาคือ ปลานิล *Oreochromis niloticus* ซึ่งพบทั้งสิ้นจำนวน 31 ตัว และปลาที่พบจำนวนตัวเพียงตัวเดียวมีทั้งสิ้น 1 ชนิด ได้แก่ ปลาทราย *Chitala ornata* พบในเดือนมกราคม 2561

จากการศึกษาชนิดปลาในกรุงเทพมหานครในอดีตที่ผ่านมา Hora (1940) ได้ตรวจสอบตัวอย่างที่เก็บจาก Smith และ Smith ในเขตกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล ทั้งสิ้น 22 วงศ์ 33 สกุล 47 ชนิด ซึ่งเป็นชนิดที่ซ้ำกับการศึกษาครั้งนี้ 4 ชนิด ได้แก่ ปลาตะเพียนขาว *Barbodes gonionotus* ปลาช่อน *Channa striata* ปลาหมอ *Anabas testudineus* และปลากระดี่นาง *Trichogaster microlepis*

พบว่าการศึกษาชนิดปลาในกรุงเทพมหานครโดย Hora (1940) มีความหลากหลาย ของชนิดพรรณปลามากกว่า การศึกษาครั้งนี้ มีเพียง 4 ชนิดเท่านั้นที่พบซ้ำกับการศึกษาครั้งนี้ ความแตกต่างดังกล่าวนี้อาจเนื่องจากระยะเวลาและพื้นที่ การศึกษาในครั้งนี้น้อยกว่าพื้นที่ที่ Hora เคยทำการศึกษา ส่วนชนิดที่พบเพิ่มในการศึกษาครั้งนี้แต่ไม่พบจากการศึกษาของ Hora เนื่องจากปลาหลายชนิดเป็นปลาน้ำเข้า เช่น ปลาเทศบาล และปลานิล ปัจจุบันมีการนำเอาปลาต่างถิ่นเข้ามาเลี้ยงเป็นจำนวนมาก เมื่อมีการปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ ปลาต่างถิ่นเหล่านี้สามารถแพร่พันธุ์และเพิ่มจำนวนได้มาก ทำให้ปลาที่มีอยู่เดิมลดจำนวนลงหรือหมดไปจากแหล่งที่มีอยู่เดิม

การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมเช่นการขยายตัวของชุมชนซึ่งมีแนวโน้มที่จะกระจายออกไปสู่พื้นที่แถบชานเมือง แม้จะมีการกำหนดผังเมืองขึ้นมาแล้วแต่ก็ไม่สามารถแก้ปัญหาสภาพแวดล้อมเสื่อมโทรมของพื้นที่บริเวณดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยสาเหตุจากการยกเลิกพระราชบัญญัติควบคุมการใช้ที่ดินประเภทอนุรักษ์ชนบทและเกษตรกรรมจังหวัดสมุทรปราการที่เคยปรากฏในผังเมืองรวมต่อเนื่องจากพื้นที่อนุรักษ์ ใน บริเวณกรุงเทพมหานครเป็นแถบต่อเนื่องลงไปทางใต้จรดชายฝั่งทะเลหลัง พ.ศ. 2535 เป็นต้นมา และการพัฒนาพื้นที่อุตสาหกรรมโดยรอบสนามบินสุวรรณภูมิเพื่อรองรับการ

พัฒนาเศรษฐกิจและการคมนาคม ทำให้มีการสร้างคลังสินค้าโรงงานอุตสาหกรรมและการก่อตั้งโครงการต่อเนื่องตามมาอีกมากมาย อาทิ ศูนย์การค้า โรงแรม เป็นต้น

การสร้างประตุน้ำขึ้นในจุดต่างๆของกรุงเทพมหานครซึ่งรองรับน้ำไหลมาจากทางด้านเหนือ (จากจังหวัด ปทุมธานี) และทางตะวันออก (จากจังหวัดฉะเชิงเทรา) ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้จำนวนของชนิดปลาเปลี่ยนแปลง ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาพื้นที่ดังกล่าวได้รับผลกระทบมากมาย การปล่อยน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ชุมชน และสารพิษตกค้างจากการทำการเกษตรในพื้นที่ นอกจากนี้เมื่อถึงเดือนพฤศจิกายนของทุกปีประตุน้ำจะปิดลง ทำให้บริเวณน้ำในพื้นที่ต่างๆ จะค่อยๆ ลดลง เมื่อน้ำจากทางตอนเหนือไม่มีการไหลลงมาไล่น้ำในพื้นที่ให้ออกสู่ทะเลอ่าวไทยทางตอนใต้ของ กรุงเทพมหานครและจังหวัดสมุทรปราการได้ (สำนักงานระบบควบคุมน้ำ กรุงเทพมหานคร, 2561) ทำให้ปลาในกรุงเทพมหานครไม่มีการอพยพย้ายถิ่นออกไปยังพื้นที่ที่มีคุณภาพสูงกว่าได้ ดังนั้นจึงอาจส่งผลกระทบต่อความหลากหลายของชนิดพรรณและปริมาณปลาในพื้นที่ดังกล่าวได้

นอกจากนี้ สิงหา วงศ์โรจน์ (2547) ศึกษาอนุกรมวิธานปลาน้ำจืดในพื้นที่กรุงเทพมหานครฝั่งตะวันออก โดยปลาน้ำจืดที่สำรวจพบ มี 19 วงศ์ 31 สกุล 42 ชนิดซึ่งมีชนิดที่ซ้ำกับการศึกษาครั้งนี้ 17 ชนิด ได้แก่ ปลากราย *Chitala ornata* ปลาตะโกก *Cyclocheilichthys enoplos* ปลาตะเพียนทอง *Barbonymus altus* ปลาตะเพียนขาว *Barbonymus gonionotus* ปลาสร้อยลูกกล้วย *Labiobarbus leptocheilus* ปลาแขยงข้างลาย *Mystus mysticetus* ปลาตุ๊ก *Clarias macrocephalus* ปลาสังกะวาดทองเหลือง *Pangasius macronema* ปลาสร้อย *Pangasianodon hypophthalmus* ปลานิล *Oreochromis niloticus* ปลากระตี่นาง *Trichogaster microlepis* ปลาหมอ *Anabas testudineus* ปลาช่อน *Channa striatus* ปลาเทศบาล *Pterygoplichthys anisitsi* ปลาไหล *Fluta albus* และปลาบู๋ทราย *Oxyeleotris marmorata*

จะเห็นได้ว่าการศึกษาของ สิงหา วงศ์โรจน์ (2547) เป็นการศึกษาหลังจากมีการสร้างประตุน้ำแล้ว และอยู่ในช่วงที่มีการก่อสร้างโครงการขนาดใหญ่ อาทิ การก่อสร้างท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ซึ่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมต่างๆ นี้ยังคงเกิดขึ้นอยู่จนถึงปัจจุบันทำให้ผลการศึกษาความหลากหลายชนิดของปลาน้ำจืดในคลองแสนแสบครั้งนี้ พบหลากหลายของชนิดพรรณใกล้เคียงกับการศึกษาอนุกรมวิธานปลาน้ำจืดพื้นที่กรุงเทพมหานครฝั่งตะวันออก ปริมาณชนิดที่พบลดลงในครั้งนี้อาจเนื่องจากการสำรวจและเก็บตัวอย่างครอบคลุมพื้นที่เฉพาะคลองแสนแสบเท่านั้น ลักษณะแหล่งน้ำในคลองแสนแสบเป็นระบบน้ำไหล จึงมีความจำเพาะต่อชนิดพันธุ์ปลามากกว่าการศึกษอนุกรมวิธานปลาน้ำจืดพื้นที่กรุงเทพมหานครฝั่งตะวันออก

ข้อเสนอแนะ

ปัจจุบันกรุงเทพมหานครประสบภาวะความเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมอย่างรุนแรงแม้ว่าองค์กรเอกชนและหน่วยงานราชการหลายแห่งจะเริ่มตื่นตัวและร่วมมือกันในการอนุรักษ์สภาพแวดล้อมเพื่อฟื้นฟูระบบนิเวศและความหลากหลายของปลาในแหล่งน้ำต่างๆผู้วิจัยเห็นสมควรให้เพิ่มมาตรการดังต่อไปนี้

1. การศึกษาทางด้านระบบนิเวศและความหลากหลายของชนิดปลาในแม่น้ำ ลำคลองต่างๆ ของกรุงเทพมหานคร ควรมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องหลายๆปี เพื่อนำข้อมูลมาประมวลสรุป สำหรับการวางแผนวางในการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้องในอนาคต
2. ควรมีกฎหมายที่เคร่งครัดในการควบคุมระบบบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมแหล่งชุมชน และโครงการก่อสร้างต่างๆ รวมทั้งสารตกค้างจากการทำการเกษตร ก่อนที่จะปล่อยลงสู่แม่น้ำ
3. ควรมีระบบการบริหารจัดการที่มีประสิทธิภาพที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศและระบบนิเวศทางน้ำ เพื่อความยั่งยืนของความอุดมสมบูรณ์ทางทรัพยากรน้ำและเป็นต้นแบบให้กับเมืองที่มีลักษณะเป็นมหานครต่อไป
4. เผยแพร่ความรู้ทางด้านความหลากหลายของชนิดปลาน้ำจืด สัตว์น้ำและระบบ นิเวศของกรุงเทพมหานครให้กับนักเรียน นิสิต นักศึกษา และผู้สนใจ เพื่อเป็นการปลูกฝัง จิตสำนึกการอนุรักษ์ให้กับอนาคตของประเทศต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ทวีศักดิ์ ทรงศิริกุล. (2530). **คู่มือการจำแนกครอบครัวปลาไทย**. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- วราภรณ์ จิวชัยศักดิ์ . (2555). **คลองแสนแสบ: ความเป็นมาและการเปลี่ยนแปลง**. Journal of Thai studies. 8: 2.
- ศิริวรรณ ศิริบุญ. (2555). **กลไกทางสังคมที่นำไปสู่ความเข้มแข็งของชุมชนภายใต้เงื่อนไขความหลากหลายของประชากร : กรณีศึกษาชุมชนสุเหร่าบ้านดอนริมคลองแสนแสบ**. Journal of Thai studies. 8: 2.
- สิงหา วงศ์โรจน์. (2547). **การศึกษาอนุกรมวิธานปลาน้ำจืดในพื้นที่กรุงเทพมหานครฝั่งตะวันออก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต สาขาชีววิทยา กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
- สืบสิน สนธิรัตน์. (2527). **ชีววิทยาของปลา**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานระบบควบคุมน้ำ กรุงเทพมหานคร (ออนไลน์)**. (2561). สืบค้นจาก : <https://dds.bangkok.go.th> [21 ธันวาคม 2561]
- Hora, L.S. (1940). **On a collection of fish from Siam**. Proc. Acad. Nat. Sci.; 4(2): 143 – 184.
- Jayaram, K.C. (1981). **The freshwater fishes of India, Pakistan, Bangladesh, Burma and Sri Lanka a handbook**. Zool Res. India Calcutta: 475(13): 1.
- Kotterat, M. (2001). **Fishes of Laos**. WHT Publ. Sri Lanka.
- Ng P.K.L. & Lim, K.P. (1990). **Snakeheads (Pisces: Channidae): natural history, biology and economic importance**, National University of Singapore.
- Roberts, T.R. & Vidthayang nathayanon, C. Sysmet. (1992a). **revision of the asian catfish Pangasiidae with biological observation and description of three new species**, Proc. Acad. Nat Sci. Philadelphia. 143: 97-144.
- Roberts, T.R. (1992b). **Systematic revision of the Old World freshwater fish family Notopteridae** Ichthyol, Explor, Freshwater .5(4): 297-304.
- Roberts, T.R. (1992a). **Revision of the striped catfishes of Thailand misidentified as *Mystus vittatus*, with descriptions of two new species (Pisces: Bagridae)**, Ichthyol. Explor. Freshwater. 3(1): 77-88
- Roberts, T.R. (1993). **Sysmatic revision of the Southeast Asian cyprinid fish genus *Labiobarbus* (Telostei: Cyprinidae)**, Raffles Bulletin of Zoology: 41(2): 315-329.
- Rainboth, W.J. (1996). **FAO species identification field guide for fishery purposes. Fishes of the Cambodian Mekong**. Rome.
- Smith, H.M. (1945). **The freshwater fishes of Siam or Thailand**. Bull. U.S. Nat. Mus.
- Nelson, J.S. (1994). **Fishes of the world**, ed 3. John Wiley & Sons, Inc. New York.

การโคลน การแสดงออก และการศึกษาลักษณะของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส
จาก *Bacillus* sp.

Cloning, expression, and characterization of recombinant mannanase
from *Bacillus* sp.

BT-2

พรศิริ บำรุงธรรม และ สุกัลยา อุทัยดา *

Pornsiri Bumrunghtham and Sugunya Utaida*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง
จังหวัดปทุมธานี 12120

*Corresponding author e-mail: utaidas@gmail.com

บทคัดย่อ

แมนนาเนส เป็นเอนโดเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสายโพลีแซคคาไรด์ในกลุ่มแมนแนนและเฮเทอโรแมนแนน โดยตัดพันธะไกลโคซิดิกแบบสุ่มที่บริเวณ ตำแหน่งเบต้า 1,4 ภายในโครงสร้างหลักของโพลีแซคคาไรด์ และได้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ ปัจจุบันแมนนาเนสถูกนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง เช่นใน อุตสาหกรรมการผลิตกาแฟ อุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมซักล้าง ในงานวิจัยนี้ทำการสร้างและผลิตรีคอมบิแนนท์แมนนาเนสในระบบของ *Escherichia coli* ซึ่งผลการทดลองพบว่ายีนแมนนาเนสที่โคลนได้ มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,086 นิวคลีโอไทด์ และถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน 362 กรดอะมิโน โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus subtilis* SRCM101392 99.63 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกับแมนนาเนสในกลุ่มของไกลโคไซด์ไฮโดรเลส ตระกูลที่ 26 เมื่อทำการผลิตรีคอมบิแนนท์แมนนาเนสใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตได้ มีขนาดประมาณ 38 กิโลดาลตัน กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส สามารถทำงานได้ในช่วงพีเอช และอุณหภูมิที่กว้างคือ ที่พีเอช 5.0 ถึง 7.0 และที่อุณหภูมิ 50 ถึง 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์คงเหลือมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสภาวะพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส คือ พีเอช 6.0 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ รีคอมบิแนนท์แมนนาเนสสามารถย่อยโลคัสบีนกัม โดยมีกิจกรรมของ เอนไซม์เท่ากับ 1,329 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 290 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากการวิเคราะห์ผลของการย่อยโลคัสบีนกัม ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) ได้ผลิตภัณฑ์หลังจากการย่อยเป็นกาแลกโทส แมนโนโบไอส แมนโนไตรไอส แมนโนเพนตะไอส และโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่กว่าแมนโนเฮกซะไอส ดังนั้น รีคอมบิแนนท์แมนนาเนสนี้ อาจเป็นประโยชน์ในการเปลี่ยน วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า เช่น แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

คำสำคัญ : รีคอมบิแนนท์แมนนาเนส แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ *Bacillus* sp.

Abstract

Mannanase is an endo-cleaving enzyme that randomly hydrolyzes β -1,4 glycosidic bonds in mannan and heteromannan polysaccharide backbones releasing mannooligosaccharides as products. Mannanase is widely used in many industrial applications such as coffee extraction, animal feed, pulps and detergent industries. In this research, we constructed recombinant mannanase and produced the protein in *Escherichia coli* expression system. The result showed that mannanase gene composed of 1,086 nucleotides encoding a putative polypeptide of 362 amino acid residues as well as exhibited 99.63 % of nucleotides similar to that of mannanase gene from *Bacillus subtilis* SRCM101392. Its amino acid sequence was also highly homologous to those of mannanases belonging to the glycosyl hydrolase family 26. When study the expression of this mannanase gene in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) pLysS. It found that mannanase was expressed as an intracellular enzyme with a molecular weight approximately of 38 kDa. Interestingly, the enzyme activity showed broad ranges of temperatures (50-65°C) and pH (5.0-7.0) with higher than 80% of its remaining activity. And optimum pH and temperature of recombinant mannanase were 6.0 and 55°C respectively. The recombinant enzyme showed 1,329 U/ml (290 U/mg protein) toward locust bean gum under optimal conditions. Locust bean gum was hydrolyzed into galactose, mannobiose (M2), mannotriose (M3), mannopentaose (M5), and oligomers larger than mannohexaose (M6) as revealed by thin layer chromatography. This recombinant mannanase then may be useful in bioconversion of agriculture wastes to value products such as mannooligosaccharides.

Keywords: recombinant mannanase, mannooligosaccharides, *Bacillus* sp.

บทนำ

ในปัจจุบันมีการนำแมนนาเนสประยุกต์ในอุตสาหกรรมหลายด้านอย่างกว้างขวาง ในอุตสาหกรรมอาหารใช้แมนนาเนสในการลดความหนืดในระหว่างกระบวนการผลิตกาแฟ โกโก้ และซ็อกโกแลต ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตที่สกัดได้เพิ่มสูงขึ้น (Zakaria *et al.*, 1998) อุตสาหกรรมผลิตสารซักล้างเติมแมนนาเนสเพื่อช่วยกำจัดคราบของกัม ซึ่งเป็นสารให้ความหนืดในไอศกรีม ยาสระผม เจลใส่ผม และยาสีฟันที่อาจติดมากับเสื้อผ้าได้ (Bettiol *et al.*, 2000, Prakram *et al.*, 2012) อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษนำแมนนาเนสมาใช้ในขั้นตอนของการฟอกสีเยื่อกระดาษเพื่อลดการใช้สารเคมี และไม่ทำให้เกิดการสูญเสียเยื่อกระดาษ (Benech *et al.*, 2007) และในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์มีการเติมแมนนาเนสลงในอาหารสัตว์ที่มีพอลิแซ็กคาไรด์แมนแนนเป็นองค์ประกอบเนื่องจากสัตว์ไม่สามารถย่อยแมนแนนได้ โดยแมนนาเนสจะย่อยแมนแนนให้ได้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกสำหรับสัตว์ (Leeds *et al.*, 1980, Adibmoradi and Mehri, 2007) เป็นต้น

จากที่กล่าวมาข้างต้นแมนนาเนสจึงเป็นเอนไซม์ที่น่าสนใจ แมนนาเนสสามารถพบได้ทั้งจาก พืช สัตว์และจุลินทรีย์ โดยแมนนาเนสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์นั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์สูง โดยเฉพาะจุลินทรีย์ในกลุ่มของยีส *Bacillus* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้หลายชนิดรวมทั้งมีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงตั้งแต่แมนนาเนสที่ผลิตจากธรรมชาติไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม และต้องใช้เวลาและขั้นตอนที่ยุ่งยากในการศึกษาและควบคุมสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ นอกจากนี้ยังมีขั้นตอนในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์หลายขั้นตอน ซึ่งการผ่านกระบวนการหลายขั้นตอนอาจส่งผลให้ได้โปรตีนน้อยลง และทำให้มีต้นทุนในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสสูงขึ้น จึงมีการนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม มาใช้ในการผลิตแมนนาเนส โดยการโคลนยีนนั้นจะช่วยให้ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากในระยะเวลาสั้น อีกทั้งยังสามารถควบคุมสภาวะในการผลิตโปรตีนได้ง่ายเมื่อใช้เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม งานวิจัยนี้ได้ผลิตแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. โดยใช้ *Escherichia coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านโดยใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์แมนนาเนสในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) pLysS
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *man*

การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *man* โดยรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI ของ *B. subtilis* จำนวน 12 สายพันธุ์ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Bacillus* sp. เพื่อใช้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม CLC sequence viewer 8 (CLC Bio-Qiagen, Denmark) เพื่อหาบริเวณของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นลำดับอนุรักษ์ สำหรับใช้เป็นตำแหน่งที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์ และได้เพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งจดจำลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* ที่ปลาย 5' ของฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (*man-F*) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งจดจำลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ที่ปลาย 5' ของรีเวิร์สไพรเมอร์ (*man-R*) เพื่อให้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสามารถเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ โดย *man-F* และ *man-R* สำหรับเพิ่มปริมาณยีน คือ 5'-GCCCTCGAGTTTAAGAAACATACGATCTCTTTG-3' และ 5'-GCAAGCTTTCACCTCAACGATTGGCGTTAAAGA-3' บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือตำแหน่งจดจำลำดับเบสของ *XhoI* และ *HindIII* ตามลำดับ

2. การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจาก *Bacillus* sp.

ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ที่มาจากดินที่อยู่บริเวณวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. โดยดัดแปลงจากวิธีของ กิตติพัฒน์ (2549) ละลายเซลล์ด้วยสารละลายซาโลนอิดีทีเอ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำตาลละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติมโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 แล้วเติมเอ็บบโซลูทเอทานอลที่เย็นจัด แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยบัฟเฟอร์ทริสอิดีทีเอ พีเอช 8.0 แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การสร้างรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส

ทำการเพิ่มปริมาณยีนแมนนาเนสโดยใช้ ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสชนิด Phusion (Thermo Scientific, Massachusetts, U.S.A) และไพรเมอร์ *man-F* และ *man-R* โดยสภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เริ่มจากการทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวนหนึ่งรอบ จากนั้นแต่ละรอบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประกอบด้วยการแยกดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยว ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 60 ถึง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จำนวน 11 รอบ และทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อโดยแต่ละรอบเริ่มต้นจากการแยกดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยว ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 30 รอบ แล้วทำการตัดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และเวกเตอร์ pRSET-A ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดคือ *XhoI* และ *HindIII* และจากนั้นทำการเชื่อมชิ้นยีนและเวกเตอร์เข้าด้วยกันโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส T4 และถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α ด้วยวิธีการกระตุ้นด้วยความร้อน

ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที คัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์โปรโมเตอร์ของ T7 และเทอร์มินเตอร์ของ T7 ในการตรวจสอบ จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี) แล้วทำการถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้สำหรับการผลิตโปรตีนด้วยวิธีการกระตุ้นด้วยความร้อนอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และคัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การผลิตโปรตีน

ทำการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น จากนั้นเติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมเฟนิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเติมสารละลายไอโซพริลเบต้า-ดี-1-ไทโอกาแลคโตไพราโนไซด์ (IPTG) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดการผลิตแมนนาเนส แล้วนำเซลล์บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยง และละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต พีเอช 7.4 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Sonics Vibracell™ โดยใช้คลื่นความถี่สูง แอมพลิจูด 60 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที บนน้ำแข็ง และนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การทดสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส

การตรวจสอบกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส ทำโดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธีกราดินโตรซาลิไซลิก (DNS) และใช้น้ำตาลแมนโนสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (Miller, 1959) โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาประกอบด้วยโลคัสบีนกัม 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท พีเอช 5.0 และรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (Victor spectrophotometer multilable microplate (Perkin Elmer)) โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์ 1 ยูนิต หมายถึงปริมาณเอนไซม์ทั้งหมด ที่สามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเบรดฟอร์ด (Bradford assay) ด้วยชุดทดสอบโปรตีน (Biorad, California, U.S.A.) และใช้โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาสภาวะพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำโดยการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้บัฟเฟอร์ต่าง ๆ ที่มีพีเอชตั้งแต่ 4.0 ถึง 9.0 ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ดังนี้ บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท พีเอช 4.0 และ 5.0 บัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 6.0 และ 7.0 บัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ พีเอช 8.0 และ 9.0 การศึกษาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำได้ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ในความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 6.0 ที่ช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส

6. การย่อยสลายชีวมวล

การย่อยชีวมวลทำโดยการใช้โลคัสบีนกัมเป็นสับสเตรท โดยเตรียมโลคัสบีนกัม 5 มิลลิกรัม ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และสารละลายรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส 15 และ 30 ยูนิตต่อมิลลิกรัมสับสเตรท แล้วบ่มปฏิกิริยาที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องผสมสารที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ (ThermoMixer™ C) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

แล้วเก็บส่วนใสไว้สำหรับวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นหลังจากย่อย โดยใช้วิธีกรดไดโนโตรซาลิไซลิก และเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

7. การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

ทำการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) โดยใช้แผ่นอลูมิเนียมซิลิกาเจล 60 เอฟ 254 (Merck, Darmstadt, Germany) การตรวจสอบผลิตภัณฑ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยด้วยรีคอมบิแนนท์ ทำโดยการหยดสารตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นอลูมิเนียมซิลิกาเจลโดยเทียบกับการละลายมาตรฐานปริมาตร 2 ไมโครกรัม ได้แก่ กาแลคโทส กลูโคส แมนโนส (M1) แมนโนไบโอส (M2) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตระโอส (M4) แมนโนเพนโทส (M5) แมนโนเฮกซะโอส (M6) จากนั้นทำให้แผ่นอลูมิเนียมซิลิกาแห้งโดยการเป่าด้วยลมร้อน แล้วจึงจุ่มแผ่นอลูมิเนียมซิลิกาเจลลงในแทงค์ที่มีตัวทำละลายโพรพาน-2-อล : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 4:1:1 โดยปริมาตร เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่จนเกือบสุดแผ่นอลูมิเนียมซิลิกาเจลแล้ว จึงนำแผ่นอลูมิเนียมซิลิกาเจลไปพ่นด้วยสารละลายเอทานอล : กรดซัลฟูริก ในอัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตร จนสารละลายกระจายทั่วแผ่น แล้วทำให้อลูมิเนียมซิลิกาเจลแห้ง จากนั้นให้ความร้อนกับแผ่นอลูมิเนียมซิลิกาเจลที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ผลการวิจัย

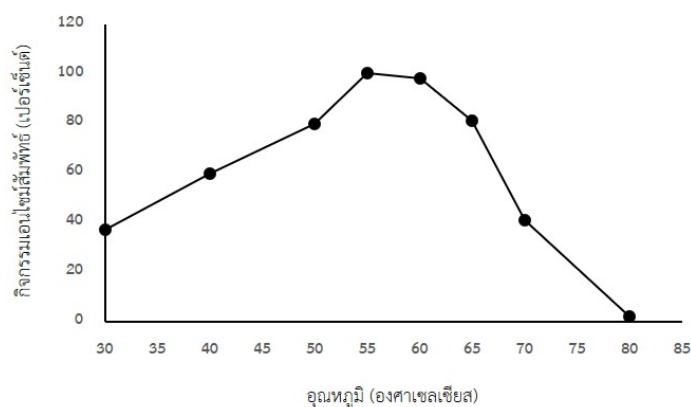
1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนส

จากการวิเคราะห์ยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. พบว่ายีนแมนนาเนสประกอบด้วย 1,086 นิวคลีโอไทด์ และถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน 362 กรดอะมิโน และยีนแมนนาเนสที่โคลนได้มีความเหมือนกับยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแมนนาเนสจาก *B. subtilis* SRCM101392 (CP021921.1) มากที่สุด (99.63 %) *B. subtilis* NBRC 13719 (AP019714.1) (98.99 %) และ *B. subtilis* NCIB 3610 (CP034484.1) (98.99 %) และจากการวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนของแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTp พบว่ามีความเหมือนกับลำดับของกรดอะมิโนของแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. (WP_032677458.1) (99.72 %) มากที่สุด *B. subtilis* SC-8 (EHA29041) (99.45 %) *B. subtilis* CICC 9011 (ACX94024.1) (99.17 %) และ *Bacillus* sp. MK-2(2016) (ANG59296) (98.90 %) และพบว่าแมนนาเนสนี้อยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส ตระกูลที่ 26 จากการทำนายหาบริเวณเร่งปฏิกิริยาของแมนนาเนสด้วยโปรแกรม Prosite พบว่ามีกรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง ที่อยู่บริเวณเร่งปฏิกิริยาคือ กรดอะมิโนกลูตาเมตที่ตำแหน่ง 150 ทำหน้าที่เป็นผู้ให้โปรตอน และกรดอะมิโนกลูตาเมตที่ตำแหน่ง 249 ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์

2. การแสดงออกรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส

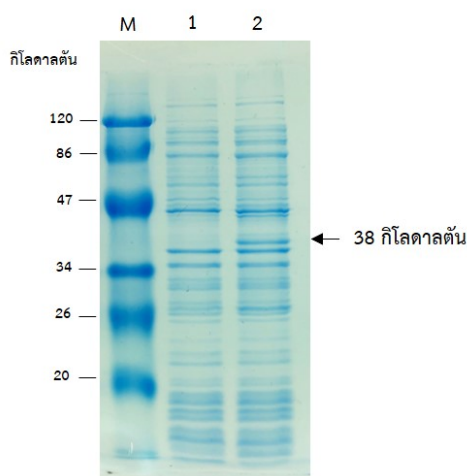
ในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสที่หมักในถังหมักแสดงออกภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ T7 ในเวกเตอร์ pRSET-A จากการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส ด้วยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE) พบว่ารีคอมบิแนนท์แมนนาเนส มีมวลโมเลกุลประมาณ 38 กิโลดาลตัน แสดงดังในภาพที่ 1 ซึ่งรีคอมบิแนนท์แมนนาเนสถูกผลิตออกมาในรูปของสารละลายโปรตีนภายในเซลล์หลังจากถูกชักนำด้วยไอโซโพรพิลเบต้า-D-1-ไทโอไกลาแลคโตไพราโนไซด์ สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแมนนาเนส คือชักนำให้มีการผลิตแมนนาเนสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และพบว่ารีคอมบิแนนท์แมนนาเนสแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ต่อโลคัสบีนกัม เท่ากับ 403 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในความเข้มข้น 50 มิลลิโมลลาร์ บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท พีเอช 5

ภาพที่ 1 รีคอมบิแนนท์แมนนาเนสจากการวิเคราะห์ด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส โดยเลน M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Thermo Scientific) เลน 1 และเลน 2 คือ สารละลายเอนไซม์จาก *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ที่มีเวกเตอร์ pRSET-A และสารละลายเอนไซม์จาก *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ที่มี pRSET-A -*man* รีคอมบิแนนท์พลาสมิด ตามลำดับ



3. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส

การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส ในช่วงอุณหภูมิต่าง ๆ



ตั้งแต่ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส พบว่ารีคอมบิแนนท์แมนนาเนสแสดงกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้รีคอมบิแนนท์แมนนาเนส ยังสามารถทำงานในช่วงอุณหภูมิกว้างคือ ที่ช่วงอุณหภูมิ 50 ถึง 65 องศาเซลเซียส ซึ่งเอนไซม์แมนนาเนสยังมีกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ในช่วงอุณหภูมิดังกล่าว แสดงดังภาพที่ 2 และจากการทดสอบหาสภาวะพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนสโดยทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

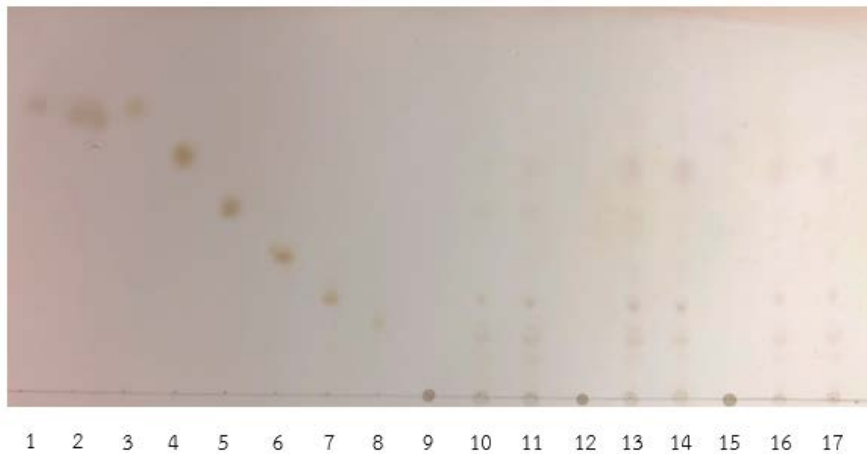
ในบัพเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีช่วงพีเอชต่าง ๆ ตั้งแต่ 4.0 ถึง 9.0 พบว่ารีคอมบิแนนท์แมนนาเนส แสดงกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่พีเอช 6.0 และในช่วงพีเอช 5.0 ถึง 8.0 พบว่ายังมีกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ในช่วงพีเอชดังกล่าว แสดงดังภาพที่ 3 ยังพบว่ารีคอมบิแนนท์แมนนาเนสมีกิจกรรมของเอนไซม์ต่อโลคัสบีบักเท่ากับ 1,329 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 290 หน่วยต่อมิลลิลิตรโปรตีนภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ภาพที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์แมนนาเนส โดยการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในความเข้มข้น 50 มิลลิโมลลาร์ บัพเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต พีเอช 6.0 ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 3 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์แมนนาเนสโดยการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในบัพเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลลาร์ บัพเฟอร์ที่ใช้ คือ บัพเฟอร์โซเดียมอะซิเตต พีเอช 4.0 และ 5.0 บัพเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต พีเอช 6.0 และ 7.0 และบัพเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์พีเอช 8.0 และ 9.0

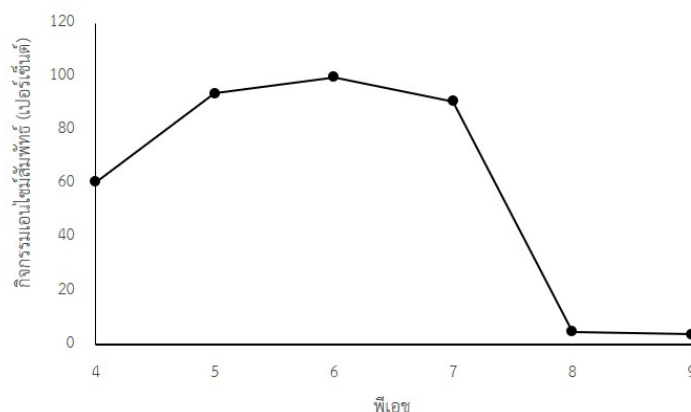
4. การย่อยสลายชีวมวล

การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโลคัสบีบักด้วยรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน แสดงผลดังภาพที่ 4 เมื่อพิจารณาเลนที่ 9-17

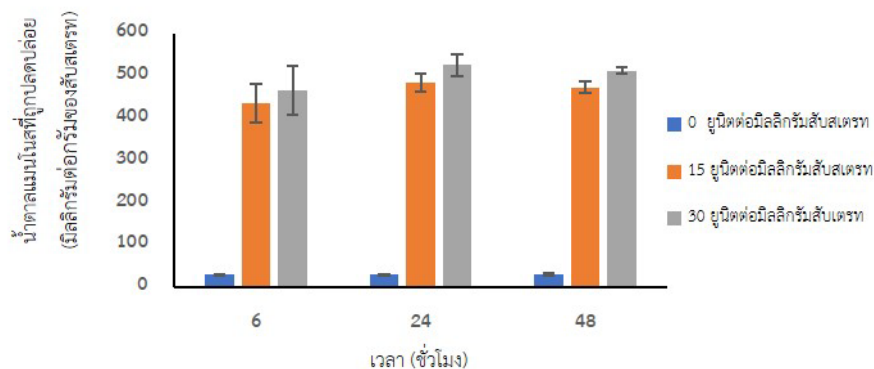


สาร

พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ โอลิโกแซคาไรด์สายสั้น ได้แก่ กาแลกโทส แมนโนไบโอส (M2) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเพนตะโอส (M5) และโอลิโกแซคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่กว่าแมนโนเฮกซาโอส (M6) ซึ่งจะเห็นว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง



สารละลายรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส สกัดหยาบมีความสามารถในการย่อยโลคัสบีบักได้เป็นโอลิโกแซคาไรด์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งไม่แตกต่างกันกับที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีกรดไดโนโตรซาลิไซลิก แสดงผลดังภาพที่ 5 พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยโลคัสบีบักมีค่าสูงสุดที่ 500 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท เมื่อใช้เอนไซม์ 30 หน่วยต่อมิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์แมนนาเนส มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนโลคัสบีบักให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาล 50 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยโลคัสปินกัมด้วยรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง โดยเลนที่ 1-8 คือ สารละลายมาตรฐาน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแลคโทส น้ำตาลแมนโนส (M1) น้ำตาลแมนโนไบโอส (M2) น้ำตาลแมนโนไตรโอส (M3) น้ำตาลแมนโนเตตระโอส (M4) น้ำตาลแมนโนเพนตะโอส (M5) และน้ำตาลแมนโนเฮกซาโอส (M6) ตามลำดับ เลน 9-11 คือสารละลายตัวอย่างของโลคัสปินกัมที่ปริมาณเอนไซม์ 0 15 และ 30 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับที่เวลา 6 ชั่วโมง เลน 12-14 คือ สารละลายตัวอย่างของโลคัสปินกัมที่ปริมาณเอนไซม์ 0 15 และ 30 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับที่เวลา 24 ชั่วโมง เลน 15-17 คือ สารละลายตัวอย่างของโลคัสปินกัมที่ปริมาณเอนไซม์ 0 15 และ 30 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ภาพที่ 5 กราฟวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดจากการย่อยโลคัสปินกัมด้วยรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส ปริมาณ 0 15 และ 30 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมสับสเตรท เป็นเวลา 6 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีกรดไดโนโตรซาลิไซลิก

สรุปและอภิปรายผล

เมื่อทำการวิเคราะห์และโคลนยีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. ที่เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยคู่ไพรเมอร์ *man-F* และ *man-R* เข้าสู่เวกเตอร์ pRSET-A พบว่ายีนแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. มีขนาด 1,086 คู่เบส และจากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนแมนนาเนสในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความใกล้เคียงกับแมนนาเนสในกลุ่มของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ และจากการวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนด้วยโปรแกรมทางชีวสารสนเทศ พบว่าแมนนาเนสนี้จัดอยู่ในกลุ่มของไกลโคไซด์ไฮโดรเลส ตระกูลที่ 26 โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถตัดพันธะไกลโคซิดิกที่บริเวณตำแหน่งเบต้า 1,4 ภายในโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์แมนแนนได้ และจากการตรวจสอบโปรตีนด้วยการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส พบว่ารีคอมบิแนนท์แมนนาเนสนี้มีขนาดประมาณ 38 กิโลดาลตัน ซึ่งเหมือนกับแมนนาเนสที่ผลิตจาก *B. subtilis* WL-7 (Kweun *et al.*, 2004) *B. subtilis* B36 (Li *et al.*, 2006) จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส พบว่ามีสภาวะพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือที่ พีเอช 6.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้รีคอมบิแนนท์แมนนาเนส ยังสามารถทำงานได้ในช่วงพีเอช และอุณหภูมิที่กว้างเช่นเดียวกับกับแมนนาเนสจาก *B. subtilis* WL-7 (Kweun *et al.*, 2004) รวมทั้งสามารถย่อยโลคัสปินกัมได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ ดังนั้นรีคอมบิแนนท์แมนนาเนสนี้อาจมีศักยภาพในการเปลี่ยนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรให้มีมูลค่าสูงขึ้น

ข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการย่อยโลคัสปินกัมด้วยรีคอมบิแนนท์แมนนาเนส อาจใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ในการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่ได้หลังจากการย่อย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ทนุสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ตามสัญญาเลขที่ ทบ ๑/๖/๒๕๕๘ แก่ สุภัทลยา อุทัยดา

ทุนบัณฑิตเรียนดีเพื่อศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ตามบันทึกข้อตกลงเลขที่ ทบ 07/2560)

รองศาสตราจารย์ ดร. สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดาพิทย์ จันทร ดร. เบญจรัตน์ บรรเทิงสุข ดร.หทัยกาญจน์ เลกากาญจน์ และนางสาวเกดสุดา เอี้ยววิริยะสกุล

เอกสารอ้างอิง

- กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. (2549). พันธุศาสตร์. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- Adibmoradi, M., Mehri, M. (2007). Effects of β -mannanase on broiler performance and gut morphology. 16th European Symposium on Poultry Nutrition, Stasburg. France, 471–47.
- Bettiol, J., Boutique J., Gualco L. and Johnston J. (2000). Nonaqueous liquid detergent compositions comprising a borate releasing compound and a mannanase. Patent EP.1059351.
- Benech, R.O., Li, X., Patton, D., Powlowski, J., Storms, R., Bourbonnais, R., Paice, M. and Tsang, A. (2007). Recombinant expression, characterization, and pulp prebleaching property of a *Phanerochaete chrysosporium* endo- β -1,4- mannanase. Enzyme and Microbial Technology. 41: 740-747.
- Kweun, M. A., M. S. Lee, J.-H. Choi, K. H. Cho and K.-H. Yoon (2004). Cloning of a *Bacillus subtilis* WL-7 mannanase gene and characterization of the gene product. Journal of Microbiology and Biotechnology 14: 1295-1302.
- Leeds, AR., Kang SS., Low, AG. (1980). Sambrook IE The pig as a model for studies on the mode of action of guar gum in normal and diabetic man. Proceedings of the Nutrition Society, 39: 44.
- Li, Y. N., K. Meng, Y. R. Wang and B. Yao (2006). "A beta-mannanase from *Bacillus subtilis* B36: purification, properties, sequencing, gene cloning and expression in *Escherichia coli*." Zeitschrift für Naturforschung C 61: 840-846.
- Miller, G. L. (1959). "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." Analytical Chemistry 31: 426-428.
- Prakram, C., Neena, P., Prince, S., Naveen, G. (2012). Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 93: 1817–1830.
- Zakaria, M.M., Yamamoto, S. and Yagi, T. (1998). Purification and characterization of endo- β -1,4- mannanase from *Bacillus subtilis* KU-1. FEMS Microbiology Letters, 158: 25-31.

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของฝอยทองต่อการควบคุมไรโซปลาในเห็ดหูหนู

สุภัค คนดารา^{1,a}, พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ^{1,b}, สราวุธ สิทธิกุล^{1,c}, อรรถพล นาขวา^{1,d}, เรืองวุฒิ ชูติมา^{2,e},
ชนิกานต์ คุ่มนง^{2,f}, ทิววัฒน์ นาพิรุณ^{2,g}, กิรติ ตันเรือน^{2,h*}

¹สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก

²สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก

email: ^asuphak2404@gmail.com, ^b94761008@gmail.com, ^csittigul@gotmail.com, ^dauttpoln@gmail.com, ^eruangwut@psru.ac.th,

^fchanikarnk@yahoo.com, ^gnapiroont@gmail.com, ^hkeerati.t@psru.ac.th

บทคัดย่อ

การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรในการควบคุมป้องกันกำจัดศัตรูทางการเกษตรกำลังได้รับความนิยมในปัจจุบัน ไรบางชนิดสามารถเป็นศัตรูทางการเกษตรด้วยเช่นกัน เช่น ไรโซปลาที่เป็นศัตรูสำคัญของการผลิตเห็ดในประเทศไทย ทำให้ผลผลิตของเห็ดลดลง การวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อหาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากฝอยทอง ชนิด *Cuscuta reflexa* Roxb. และ *C. chinensis* Lam. เพื่อการควบคุมไรโซปลาในเห็ดหูหนู ทำการสกัดสารจากฝอยทองทั้งสองสายพันธุ์ด้วยเอทานอล (80 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร) และเตรียมสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับการทดสอบสารด้วยการสัมผัส โดยใช้ไรโซปลาในระยะท้องจำนวน 3 ชั่วโมง ละ 10 ตัว/ความเข้มข้น/สารสกัด และทดสอบอัตราการตายที่ระยะ 3, 5, 7 และ 9 วันหลังการทดสอบ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบจากต้นฝอยทองชนิด *C. reflexa* มีค่า LC₅₀ ต่อไข่ของไรโซปลา ที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน เท่ากับ 16.59, 7.34, 5.87 และ 2.01 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดหยาบจากต้นฝอยทองชนิด *C. chinensis* มีค่า LC₅₀ ต่อไข่ของไรโซปลา ที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน เท่ากับ 22.86, 12.25, 2.18 และ 1.78 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าอัตราการตายของสารสกัดหยาบจากต้นฝอยทองทั้งสองสายพันธุ์มีประสิทธิภาพสูง โดยที่ความเข้มข้นที่ 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร มีผลทำให้ไรโซปลาในระยะท้องตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการทดสอบที่ 7 วัน สำหรับฝอยทองชนิด *C. chinensis* และ ที่ 9 วัน สำหรับฝอยทองชนิด *C. reflexa* เป็นที่น่าสนใจว่าไม่พบอัตราการตายในชุดความเข้มข้นที่ 0, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร จากทั้งสองสารสกัด อย่างไรก็ตาม จากผลการวิจัยนี้ สารสกัดจากฝอยทองทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้มที่ดีในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อป้องกัน และกำจัดไรโซปลา และไรชนิดอื่น ๆ ที่เข้าทำลายฟาร์มเห็ด

คำสำคัญ: สารสกัดฝอยทอง, ไรโซปลา

Acaricidal properties of crude plant extracts of *Cuscuta reflexa* and *C. chinensis* against *Luciaphorus perniciosus* in *Auricularia auricular*

Suphak Kondara^{1,a}, Pisit Poolprasert^{1,b}, Sarawut Sittikun^{1,c}, Auttpol Nakwa^{1,d}, Ruangwut Chutima^{2,e},
Chanikarn Kumnok^{1,f}, Tiwtawat Napiroon^{1,g} and Keerati Tanruean^{2,h,*}

¹Biology Program, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand

²Biotechnology Program, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand

E-mail; ^asuphak2404@gmail.com, ^bg4761008@gmail.com, ^csittigul@gotmail.com, ^dauttpoln@gmail.com, ^eruangwut@psru.ac.th, ^fchanikarnk@yahoo.com, ^gnapiroont@gmail.com, ^hkeerati.t@psru.ac.th

Abstract

The use of plant extracts for controlling agricultural pests has become increasingly popular in the recent years. Some mites is also considered as pests of economic crops for instance, pyemotid mite (*Luciaphorus perniciosus* Rack) that is a destructive pest of several mushroom species and has been reported to cause severe loss of mushroom cultivation in many places of Thailand. Therefore, the bioefficacies of crude plant extracts obtained from *Cuscuta reflexa* and *C. chinensis* for controlling *L. perniciosus* infesting Jew's Ear mushroom (*Auricularia auricular*) were evaluated in this current study. Both plant species were extracted using 80% v/v ethanol as solvent. Different concentrations of crude plant extracts (0 (control), 0.5, 1.0, 2.5 and 5 % w/v) and pregnant females of *L. perniciosus* (10 mite samples/replication/concentration) were prepared for contact bioassay. The experiment was designed in three completely randomized replicates in each concentration. After 3, 5, 7 and 9 days exposure, it was found that *C. reflexa* stem ethanolic extract exhibited median lethal concentrations to kill 50% (LC₅₀) of the treated mites in 3, 5, 7 and 9 days of 16.59, 7.34, 5.87 and 2.01% w/v, respectively. Meanwhile, *C. chinensis* stem ethanolic extract displayed LC₅₀ of the treated mites in 3, 5, 7 and 9 days of 22.86, 12.25, 2.18 and 1.78 % w/v, respectively. In terms of the mortality rate, the concentration at 5% w/v in both crude plant extracts showed effectiveness in killing pregnant mites with 100% mortality of after exposure for 7 days (*C. chinensis*) and 9 days (*C. reflexa*). Interestingly, the mortalities of mites from both plant extracts in the concentrations of 0, 0.5 and 1% w/v were not observed in this time. However, from the obtained results, both plant extracts are likely to be further applied in preventing *L. perniciosus* and other mushroom pest populations in the mushroom farm.

Keywords: *Cuscuta* spp. stem extracts, *Luciaphorus perniciosus*

บทนำ

โรเป็นศัตรูที่สำคัญของเกษตรกรผู้เพาะเห็ดโดยการเพาะเห็ดในปัจจุบันได้ขยายพื้นที่ไปทั่วภูมิภาค แต่เมื่อมีการเพาะเห็ดในโรงเพาะเห็ดติดต่อกันนานหลายปี ทำให้มีปัญหาของโรคและโรคศัตรูเห็ดเกิดขึ้น ปัญหาโรคศัตรูเห็ดเริ่มมีความรุนแรงมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงเห็ดไม่รักษาความสะอาดหรือสุขอนามัย โดยการนำเอาถุงก้อนเชื้อเก่าที่ถูกโรคศัตรูเห็ดทำลายทิ้งไว้ใกล้ ๆ โรงเพาะหรือภายในโรงเพาะ ซึ่งจะเป็นสาเหตุสำคัญในการเป็นแหล่งเพาะขยายพันธุ์โรคศัตรูเห็ด (กอบเกียรติ และคณะ, 2544) โดยโรคเห็ดสามารถทำลายเส้นใยของเห็ดทำให้เส้นใยเห็ดขาด ไม่สามารถออกดอกและตายได้และยังเป็นพาหะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา เมื่อเกิดการระบาดจะสร้างความเสียหายในด้านผลผลิต ทำให้ผลผลิตลดน้อยลงซึ่งเมื่อพบปัญหาโรคเห็ดเกษตรกรมักจะใช้สารเคมีเพื่อควบคุมโรคเห็ดแต่การใช้สารเคมีในการควบคุมนั้นส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้เพาะเห็ดและเกิดการตกค้างของสารเคมีในเห็ด ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาการศึกษาถึงการนำสารสกัดจากพืชในการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรได้กลายเป็นที่นิยมอย่างมาก ซึ่งสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติไม่เป็นอันตรายต่อเกษตรกรและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมจึงมีการแนะนำให้ใช้สารสกัดจากพืชเป็นทางเลือกในการควบคุมโรคศัตรูเห็ด (Bussaman et al., 2012) อย่างไรก็ตามหลังจากที่มีการประกาศพิษสมุนไพรอันตรายหลายชนิด เป็นวัตถุอันตรายประเภทที่ 1 ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่องบัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2552 ทำให้เกษตรกรที่เพาะเห็ดในฟาร์มเห็ดอินทรีย์ไม่สามารถใช้พืชสมุนไพรที่ถูกขึ้นทะเบียนเป็นวัตถุอันตรายดังกล่าวได้จึงต้องหาพืชที่ทำลายโรคเห็ดแต่ไม่ทำลายเส้นใยเห็ดโดยฝอยทอง (*Cuscuta* sp.) เป็นพืชจำพวกกาฝากขึ้นเกาะและดูดน้ำเลี้ยงจากพืชชนิดอื่นทั้งไม้ยืนต้น ไม้ล้มลุก รวมถึงวัชพืช ในประเทศไทยสามารถพบฝอยทองชนิด *Cuscuta reflexa* และ *Cuscuta chinensis* ได้มากที่สุด โดยชนิด *C. reflexa* มีลักษณะลำต้นเป็นสีเหลืองหรือสีเขียว หรือสีทองแกมเขียว อวบน้ำ และมีลักษณะคล้ายเส้นหนวดแข็งแรง (Figure 1a) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2.5 มิลลิเมตร และมีความยาวได้ประมาณ 1-3 เมตร ไม่มีใบ ดอกเล็กค่อนข้างกลม ออกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มไม่มีก้านดอก กลีบเลี้ยงรูปถ้วยกลีบดอกสีขาว เชื่อมติดกันเป็นรูปประฆัง ปลายแยกเป็น 5 กลีบ งอรั้วส่วนชนิด *C. chinensis* มีลักษณะเป็นเส้นกลม มีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีเหลืองทอง แต่มีขนาดเล็กกว่าชนิด *C. reflexa* (Figure 1b) ใบมีขนาดเล็กรูปสามเหลี่ยม ดอกออกเป็นช่อ กลีบดอกมีขนาดเล็กประมาณ 2 มิลลิเมตร เชื่อมติดกันเป็นรูปถ้วย ส่วนปลายกลีบจะมน แยกออกเป็น 5 แฉก กลางดอกมีเกสรตัวผู้ 5 อัน ตัวเมีย 2 อัน ผลมีลักษณะกลมแบนมีขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร และมีเมล็ด 2 ถึง 4 เมล็ด ลักษณะค่อนข้างกลมรี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพียง 1.5 มิลลิเมตร สีเหลืองอมเทา



a.



b.

Figure 1: Characteristics of *Cuscuta* plant (a) *Cuscuta reflexa* Roxb. and (b) *Cuscuta chinensis* Lam.

เนื่องจากต้นฝอยทองสามารถเจริญเติบโตได้ง่ายจะใช้เวลาไม่นานในการขึ้นปกคลุมพืชถูกอาศัยและทำให้พืชถูกอาศัยตาย จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการรายงานถึงองค์ประกอบทางเคมีของฝอยทองว่าประกอบด้วยสารเคมีหลายกลุ่ม อาทิ flavonoids, phenolic acids, sterols, hydroquinone, terpenes, lignans, polysaccharides, resin glycosides and fatty acids (Patel et al., 2012; Bais and Kakkur, 2013) และมีรายงานถึงการนำต้นฝอยทองมาใช้ประโยชน์ในด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ (Functional food) และต้นฝอยทองนั้นมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Mateen et al., 2011) และมีฤทธิ์ต้านไวรัส ฤทธิ์ต้านมะเร็งและต้านอนุมูลอิสระ (Vijikumar et al., 2011; Perveen et al., 2013) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

(Tanruean et al., 2019) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากต้นฝอยทองมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ (Tanruean et al., 2019) และจากข้อดีของต้นฝอยทองที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายได้และขยายพันธุ์ได้ง่ายสามารถเจริญเติบโตได้ทุกพื้นที่ของประเทศไทย ในงานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากต้นฝอยทองต่อการควบคุมไรศัตรูเห็ด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาผลของสารสกัดฝอยทองต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด
2. ศึกษาผลของสารสกัดฝอยทองต่อไรไข่ปลาระยะท้อง

ระเบียบวิธีวิจัย

1.การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างช่วงเดือนพฤษภาคม 2562 โดยเก็บฝอยทองชนิด *Cuscuta chinensis* ในพื้นที่จังหวัดสุโขทัย อำเภอศรีสขณาสัย (Latitude 17.3889, Longitude 99.8003) และ อำเภอศรีสำโรง (Latitude 17.2128, 17.2147 และ 17.2248 Longitude 99.4935, 99.4912 และ 99.4860) และฝอยทองชนิด *Cuscuta reflexa* จากอำเภอแม่ทะ จังหวัดลำปาง (Latitude 18.136071, Longitude 99.624914) ซึ่งจากการสำรวจพบว่าฝอยทองจากทั้งสองจุดนี้มีปริมาณมากพอที่จะนำมาใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงและเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการทดสอบต่าง ๆ โดยนำตัวอย่างมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำทุกส่วนของฝอยทองมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่น และเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้สกัดต่อไป

2.การเตรียมสารสกัดจากพืช

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดพืชดัดแปลงจากงานวิจัยของ Bussaman et al. (2012) โดยมีการนำตัวอย่างพืชที่เตรียมไว้ 200 กรัม มาแยกสกัดด้วย 80เปอร์เซ็นต์เอทานอล (80%v/v) ปริมาตร 1 ลิตร (1:5 น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดด้วยเครื่อง ultrasonicator 60 นาที หลังจากนั้นนำสารสกัดมารองด้วยผ้าขาวบางและกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman no.1) จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เก็บสารสกัดในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปใช้ในการทดสอบจะใช้น้ำกลั่นในการละลายสารตัวอย่าง

3.การทดสอบผลของสารสกัดจากพืชต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ด

การทดสอบผลของสารสกัดดัดแปลงจากงานวิจัยของ จรงค์ศักดิ์ และคณะ (2557) โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.1.วิธี Paper disc diffusion

การทดสอบผลของสารสกัดต่อการเจริญของเชื้อเห็ดหูหนูระหว่างเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2562 ด้วยวิธี Paper disc diffusion จะนำอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อขณะร้อนมาเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตรต่อจาน ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่วางบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อปล่อยให้เชื้อเจริญโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 5 เซนติเมตร แล้วหยดสารสกัดจากพืช (ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0%w/v) ลงบน paper disc ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วางทางมุมบนและล่างของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเส้นใยเห็ดโดยดูจากการเกิดวงใส (Clear zone) ของ Paper disc ที่วางทางมุมบนและล่างของจานอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละชุดการทดลอง

3.2.วิธี Poison media

การทดสอบผลของสารสกัดต่อการเจริญของเชื้อเห็ดหูหนูระหว่างเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2562 ด้วยวิธี Poison media จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB บรรจุลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเจาะส่วนปลายเส้นใยเห็ดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วย cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วเขี่ยใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร PDB จำนวนขวดละ 3 ขัน หยดสารสกัดจากพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0%w/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่ถ่ายเชื้อเห็ดแล้ว นำไปเขย่าแบบหมุนเหวี่ยง (Rotary Shaker) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปกรองเอาเฉพาะเส้นใยเห็ดด้วยกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันจึงนำไปแช่เพื่อหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดจนน้ำหนักคงที่ในแต่ละชุดการทดลอง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)

4.การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อไรโซปลาระยะท้อง

4.1การทำหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่าง

นำเมล็ดข้าวฟ่างมาล้างด้วยน้ำสะอาด คัดเมล็ดลีบออกให้หมด และแช่น้ำไว้ 1 คืน เพื่อให้เมล็ดนิ่ม จากนั้นล้างเมล็ดด้วยน้ำเปล่าอีก 3 ครั้ง นำไปนึ่งจนกระทั่งเมล็ดข้าวฟ่างบานหรือสุก จากนั้นล้างน้ำเปล่าอีก 1 ครั้งนำไปผึ่งลม พอให้เมล็ดข้าวฟ่างแห้งหมาด ๆ ให้มีความชื้นประมาณ 60% กรอกใส่ขวดแก้วที่สะอาด ประมาณ 1/2 - 2/3 ของขวดแล้วปิดปากขวดด้วยสำลี หุ้มกระดาษเพื่อป้องกันไอน้ำและรดด้วยยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเชยหัวเชื้อเห็ดลงในขวดเมล็ดข้าวฟ่าง เก็บขวดเมล็ดข้าวฟ่างไว้ในอุณหภูมิห้อง เพื่อให้เส้นใยเจริญ (จรงค์ศักดิ์ และคณะ, 2557)

4.2การเพิ่มปริมาณไรโซเห็ด

การเพิ่มปริมาณไรโซปลาเพื่อใช้ในการทดลอง โดยใส่เมล็ดข้าวฟ่างสูง 0.5 เซนติเมตรจากก้นขวดปากกว้าง 5 เซนติเมตร สูง 8.5 เซนติเมตร เชยไรโซปลาระยะท้องลงไปเลี้ยงไว้ จนได้ปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ในการทดลอง

4.3การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อไรโซปลาระยะท้อง

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อไรโซปลาระยะท้องระหว่างเดือนสิงหาคม-กันยายน 2562 ดัดแปลงจากงานวิจัยของ พิเชฐ และคณะ (2554) ทำการหดยีสกัดจากพืชที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0%w/v) และน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนเมล็ดข้าวฟ่างหัวเชื้อเห็ดเห็ดหูหนูที่อยู่ในจานเพาะเชื้อโดยให้สารสกัดจากพืชและน้ำกลั่นเคลือบเมล็ดข้าวฟ่างและจานเพาะเชื้อให้ทั่วถึง หลังจากนั้นเชยไรโซปลาตัวเต็มวัยเพศเมียระยะท้องจำนวน 10 ตัว/ความเข้มข้น/สารสกัด/จำนวน 3 ซ้ำ ลงบนเมล็ดข้าวฟ่างหัวเชื้อเห็ดเห็ดหูหนูแล้วปิดฝาจานแก้วให้สนิทบันทึกผลการตายของไรโซปลาระยะท้องเป็นเวลา 9 วัน

5.การวิเคราะห์ข้อมูล

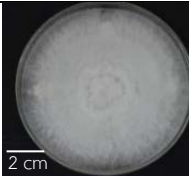
วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ด้วย F-test และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการตายด้วย t-test พร้อมทั้งการเปรียบเทียบข้อมูลภายหลังวิธี Duncan's Multiple Rang Test โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการวิจัย

1. ผลการทดสอบผลของสารสกัดจากพืชต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ด

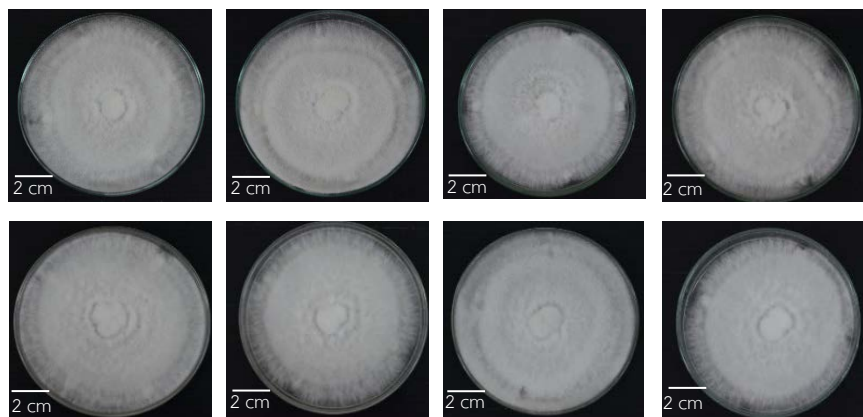
ผลการศึกษาของสารสกัดจากพืชต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ด โดยวิธี Paper disc diffusion ที่ระดับความเข้มข้น (0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0%w/v) และบันทึกผลการทดสอบที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดของฝอยทองทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ด โดยขนาดของโคโลนี และลักษณะของเส้นใยเห็ดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (Table 1)

Table 1: Mycelium growth of *Auricularia auricular* on different concentration 0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0% of *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta chinensis* extracts

Extract	Concentration(%w/v)				
	0	0.5	1	2.5	5
Control		-	-	-	-

C. reflexa

-



*C.
chinensis*

-

จากการทดสอบผลของสารสกัดจากพืชต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ด โดยวิธี Poison media ที่ระดับความเข้มข้น(0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0%w/v) หลังจากนำไปเขย่าแบบหมุนเหวี่ยง (Rotary Shaker) เป็นเวลา 7 วัน แล้วหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ด พบว่า น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดที่ทดสอบกับสารสกัดหยาบฝอยทองชนิด *C. reflexa* เท่ากับ 0.24, 0.23, 0.24 และ 0.23 กรัม ตามลำดับ (Figure 2) และฝอยทองชนิด *C. chinensis* เท่ากับ 0.23, 0.21, 0.26 และ 0.13กรัม ตามลำดับ (Figure 3) ขณะที่น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดในชุดควบคุมเท่ากับ 0.26 กรัม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากฝอยทองชนิด *C. reflexa* ทุกความเข้มข้น และ *C. chinensis* ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.5% ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดยกเว้นสารสกัดหยาบฝอยทองชนิด *C. chinensis* ที่ระดับความเข้มข้น 5.0%w/v มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดถึงร้อยละ50

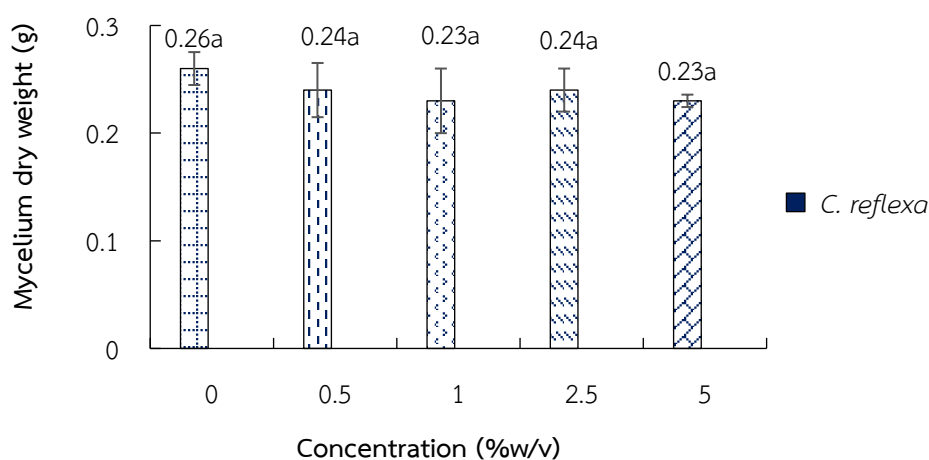


Figure 2: Mycelium dry weight of *Auricularia auricular* in liquid culture supplemented with different concentrations of *Cuscuta reflexa* extract.

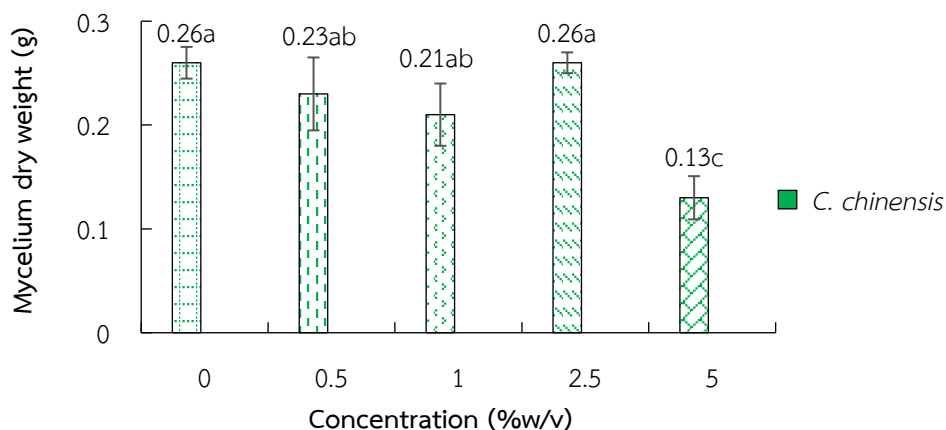


Figure 3: Mycelium dry weight of *Auricularia auricular* in liquid culture supplemented with different concentrations of *Cuscuta chinensis* extract.

2.การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากฝอยทองต่อไรโซปลา

การศึกษาค้นคว้าของสารสกัดหยาบของฝอยทองทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น (0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อไรโซปลา ระยะที่ทดสอบอัตราการตายที่เวลา 3, 5, 7 และ 9 วัน พบว่าสารสกัดฝอยทองชนิด *C. reflexa* ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5.0%w/v เท่านั้นที่มีฤทธิ์ฆ่าไรโซปลา โดยความเข้มข้น 2.5%w/v มีอัตราการตายเท่ากับ 10.00, 16.67, 26.67 และ 83.33% ของวันที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้น 5.0% มีอัตราการตายเท่ากับ 13.33, 30.00, 36.67 และ 100.00% ของวันที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน ตามลำดับ (Figure 4) และสารสกัดฝอยทองชนิด *C. chinensis* ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5.0%w/v เท่านั้นที่มีฤทธิ์ฆ่าไรโซปลา โดยความเข้มข้น 2.5%w/v มีอัตราการตายเท่ากับ 16.67, 23.33, 73.33 และ 93.33% ของวันที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้น 5.0% มีอัตราการตายเท่ากับ 10.00, 16.67, 100.00 และ 100.00% ของวันที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน ตามลำดับ (Figure 5) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการตายเฉลี่ยพร้อมทั้งการเปรียบเทียบข้อมูลด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นผลทำให้อัตราการตายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากการให้สารสกัดจากฝอยทอง 3, 5, 7 และ 9 วัน ($P < 0.05$) โดยสารสกัดหยาบของฝอยทองชนิด *C. reflexa* มีค่า LC_{50} เท่ากับ 16.59, 7.34, 5.87 และ 2.01 (%w/v) ตามลำดับ และสารสกัดหยาบของฝอยทองชนิด *C. chinensis* มีค่า LC_{50} เท่ากับ 22.86, 12.25, 2.18 และ 1.78 (%w/v) ตามลำดับ (Figure 6)

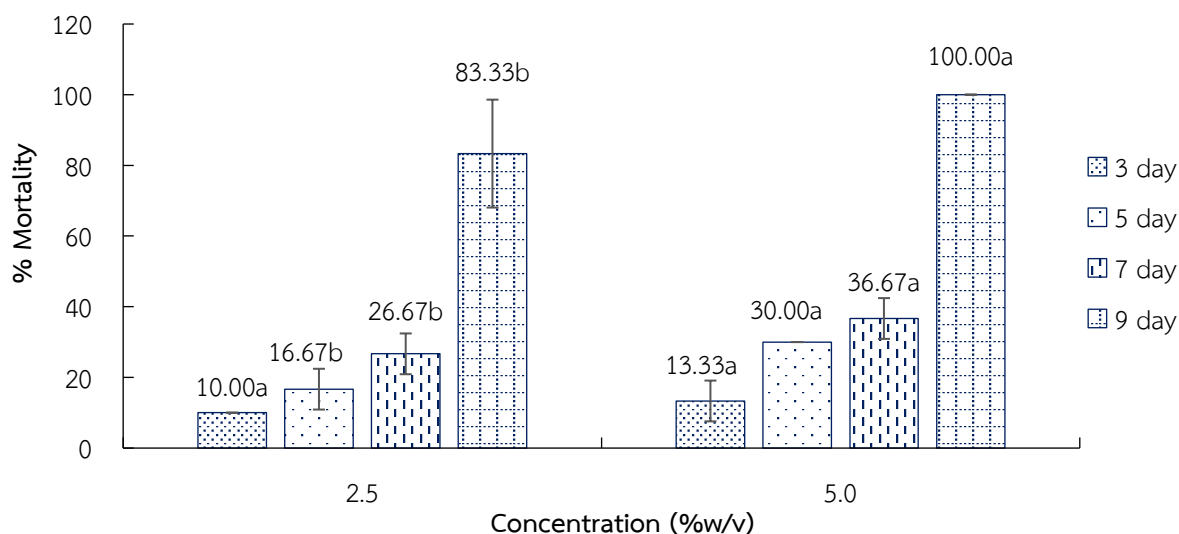


Figure4: The mortality rates of *Luciaphorus* sp. after treated with 2.5 and 5.0% crude extracts of *Cuscuta reflexa* at 3, 5, 7 and 9 days after application. Means with the same letter were not significantly different.

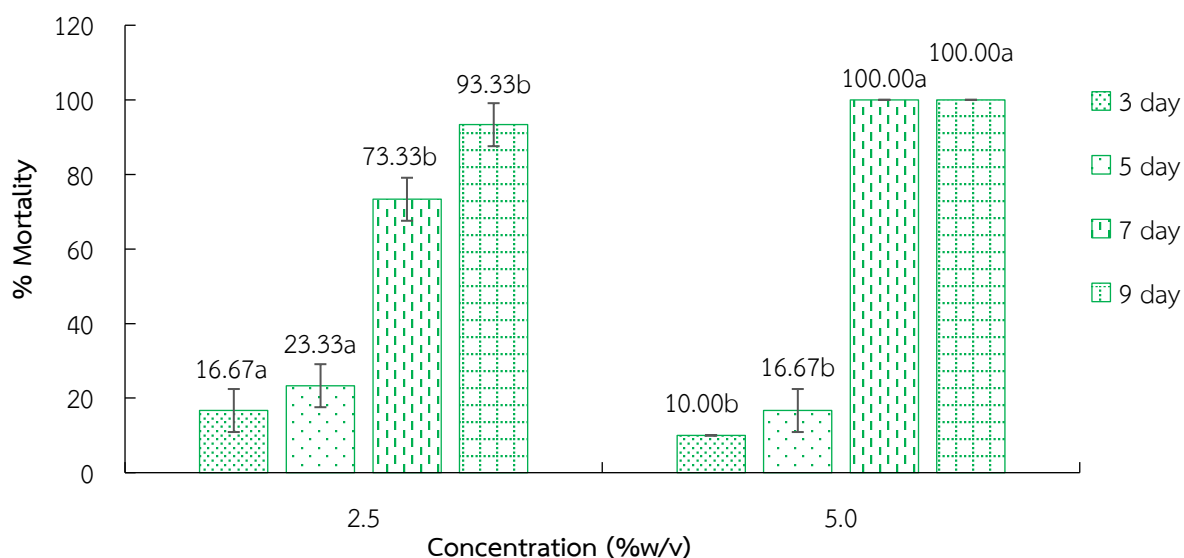


Figure5: The mortality rates of *Luciaphorus* sp. after treated with 2.5 and 5.0% crude extracts of *Cuscuta chinensis* at 3, 5, 7 and 9 days after application. Means with the same letter were not significantly different.

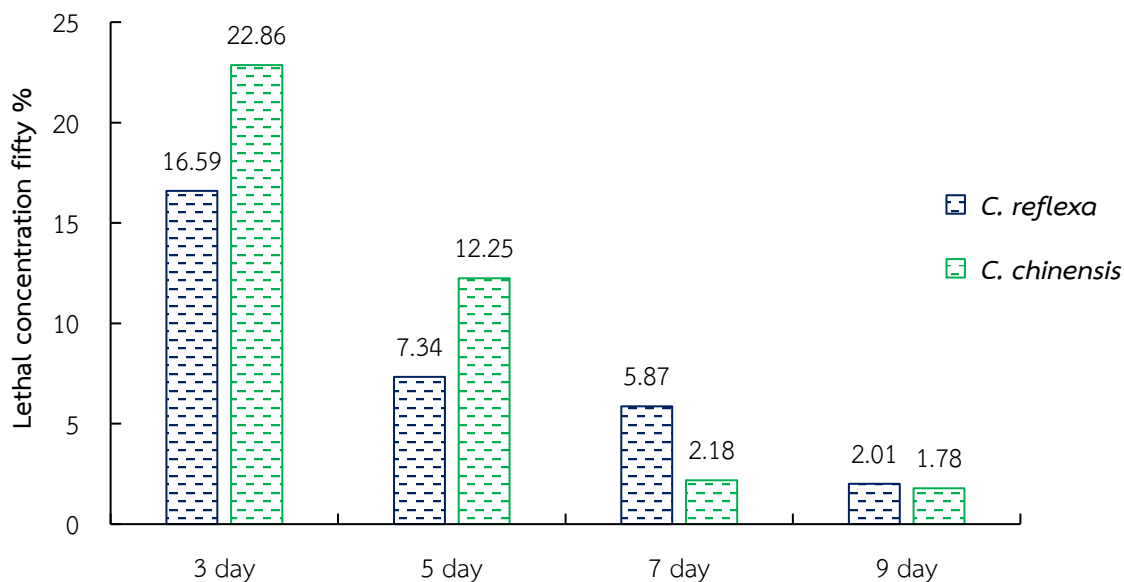


Figure6: Lethal concentration fifty (LC_{50}) rates of *Luciaphorus* sp. after treated with 2.5 and 5.0% crude extracts of *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta chinensis* at 3, 5, 7 and 9 days after application.

สรุปและอภิปรายผล

จากการทดสอบผลของสารสกัดหยาบของฝอยทองทั้ง 2 สายพันธุ์ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดโดยวิธี Paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบของฝอยทองความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.5, และ 5.0% ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

เห็ดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี Poison media ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันพบว่าสารสกัดหยาบ ฝอยทองชนิด *C. chinensis* ที่ระดับความเข้มข้น 5.0%w/v มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดถึงร้อยละ 50 แสดงว่าการทดสอบผลของสารสกัดหยาบโดยอาศัยการระเหยของสารออกฤทธิ์ไม่มีประสิทธิภาพแม้จะใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นสูง ขณะที่ การให้เชื้อเห็ดสัมผัสกับสารสกัดหยาบจากฝอยทองโดยตรง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสูงจะมีผลทำให้เส้นใยเห็ดเจริญ ได้ช้าลง หลักการนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่มีการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อการเจริญของเชื้อเห็ด โดย จรงค์ศักดิ์ และคณะ (2557) พบว่าผลของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้บ้าน ตะไคร้หอม และพริกไทยดำมีผลต่อการ เจริญเติบโตของเชื้อเห็ด นอกจากนี้ในส่วนของการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของฝอยทองทั้ง 2 สายพันธุ์ต่อ โรโซปลาในระยะท้องพบว่าที่ความเข้มข้นที่ 5.0% มีผลทำให้โรโซปลาในระยะท้องตาย 100% โดยฝอยทองชนิด *C. reflexa* ใช้ เวลา 9 วันและชนิด *C. chinensis* ใช้เวลา 7 วัน แม้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากฝอยทองต่อแมลงจะยังไม่มียารงาน มาก่อนแต่จากการศึกษาขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดฝอยทองที่พบสารเคมีโดยเฉพาะสารกลุ่ม terpene ที่ทราบกันดีว่า มีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์ของจุลินทรีย์น่าจะเป็นกลุ่มสารสำคัญมีออกฤทธิ์ต่อเซลล์ของแมลง อีกทั้งจะเห็นได้ว่าสารสกัด หยาบของฝอยทองสามารถใช้กำจัดโรโซปลาในระยะท้องได้และใช้เวลาในการออกฤทธิ์สั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษา ของ พิเชฐ และคณะ(2554) ที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากพืช 8 ชนิด ในการป้องกันกำจัดโรโซปลาในระยะท้อง ท้อง และระยะท้องในเห็ดหูหนู โดยระยะก่อนท้อง พบว่าหลังจาก 24 ชั่วโมงพบจำนวนโรโซปลาตัวเต็มวัยระยะก่อนท้องตาย เฉลี่ย 32 – 48.25 ตัว จาก 50 ตัว ยกเว้นสารสกัดจากสะเดาที่พบเฉลี่ย 32 ตัว โดยในตัวเต็มวัยระยะท้อง หลังจากหยุดสาร 10 วัน พบว่าสารสกัดจากพืชทุกชนิดพบจำนวนโรโซปลาตัวเต็มวัยระยะท้องตายเฉลี่ย 20 ตัว อย่างไรก็ตามการใช้สารสกัดพืช จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อใช้ในการควบคุมตัวเต็มวัยของโรโซปลาในระยะท้องโดย Bussaman et al. (2012) ได้รายงาน ถึงผลการศึกษาความเป็นพิษสารสกัดจากพืช 23 ชนิดต่อโรโซปลา ซึ่งพบว่าหลังการทดสอบ 3 วัน สารสกัดจากเหง้าของว่าน ชักมดลูก และโพลีมีประสิทธิภาพที่ทำให้อัตราการตายของโรโซปลาสูงที่สุดถึง 100.00% ตามด้วย ขมิ้น (98.89%), กระเทียม (97.78%), กระชายดำ (88.89%) และขิง (84.44%) และสารสกัดจากใบของกะเพรา และสะระแหน่มีประสิทธิภาพถึง 100% นอกจากนี้พบว่าการใช้สารสกัดจากพืชในรูปแบบของน้ำมันหอมระเหยจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการกำจัดโรโซปลา จาก งานวิจัยของ Pumnuan et al. (2009) ที่ทำการทดสอบการรมควันด้วยน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู, ตะไคร้หอม, ตะไคร้ บ้าน และขมิ้นต่อโรโซปลาในระยะท้องพบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน และตะไคร้หอมมีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดส่งผลให้มีอัตรา การตาย 97.3 และ 95.8% ตามลำดับ และงานวิจัยของ Pumnuan et al. (2010) ที่ทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหยจาก ตะไคร้ต้น, หมิบั้ง และ เสม็ดขาว กับ โรโซปลาโดยวิธีการสัมผัสและการรมควัน โดยทำการรมควันในห้องน็อคควานขนาด $2.5 \times 10^4 \text{ cm}^3$ พบว่าน้ำมันหอมระเหยของ ตะไคร้ต้นเป็นพืชต่อโรโซปลามากที่สุดโดยวิธีการสัมผัสและการรมควันด้วยค่า LD_{50} เพียง 0.932 และ 0.166 $\mu\text{g} / \text{cm}^3$ ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยของ หมิบั้ง มีค่า LD_{50} 2.793 และ 0.410 $\mu\text{g} / \text{cm}^3$ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบของฝอยทองทั้งสองสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการฆ่าโรโซปลาในระยะท้องซึ่งถือเป็นพืช ทางเลือกอีกชนิดที่เกษตรกรผู้เพาะพันธุ์เห็ดสามารถหาได้ง่ายเนื่องจากฝอยทองเป็นวัชพืชที่เจริญได้ง่ายและรวดเร็ว ใน เบื้องต้นการใช้สารสกัดหยาบฝอยทองในการควบคุมโรเห็ดต้องพิจารณาถึงช่วงที่จะใช้ โดยชนิด *C. reflexa* ต้องใช้ที่ความ เข้มข้น 5% เป็นเวลา 9 วัน ส่วนสารสกัดฝอยทองชนิด *C. chinensis* ต้องใช้ที่ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 7 วัน จะสามารถ กำจัดโรโซปลาในระยะท้องได้ 100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามหากต้องใช้สารสกัดฝอยทองชนิด *C. chinensis* ในช่วงที่เส้นใย เจริญจนถึงการเปิดดอกเห็ดควรใช้ที่ความเข้มข้น 2.5% เป็นเวลา 9 วัน ซึ่งแม้ว่าจะกำจัดโรเห็ดได้ประมาณ 93 เปอร์เซ็นต์แต่ ที่ความเข้มข้นนี้ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อเห็ด

ข้อเสนอแนะ

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากฝอยทองสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการกำจัดโรโซปลาศัตรูเห็ดอย่างไรก็ ตามในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องศึกษาในระดับฟาร์มเพื่อให้แน่ใจถึงประสิทธิภาพของสาร สกัดฝอยทองในการควบคุมกำจัดโรโซปลาเพื่อเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เพาะเห็ดฟาร์มอินทรีย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก สำหรับการเอื้อเฟื้อเครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิจัย และขอขอบคุณกองทุนพัฒนาการวิจัยและบริหาร จัดงานวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พ.ศ. 2562 ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์, พรทิพย์ วิสารทนานท, ฉัตรไชย ศฤงฆไพบูรณ์ และสัจจะ ประสงค์ทรัพย์. (2544). *แมลง-ไรศัตรูเห็ดในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ:โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.
- จรงค์ศักดิ์ พุ่มนวน, พรหมมาศ คูหากาญจน์, อัมร อินทร์สังข์, ณัฐพล หล่อเจริญ และอุดมพร บุญเปลี่ยน. (2557). ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพริกไทยดำ (*Piper nigrum* Linn.), ตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus* (Dc. ex Nees)) และตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus* Rendle) ต่อการเจริญของเชื้อเห็ดบางชนิด. *วารสารแก่นเกษตร*. 42(1), 7-16.
- พิเชฐ เขาวนวัฒนวงศ์, อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล และมานิตา คงชื่นสิน. (2554). *การป้องกันกำจัดไรไข่ปลาบนเห็ดหูหนูโดยการใส่สารสกัดจากพืช*. (รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554) สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร.
- Bais N. and Kakkar A. (2013) Comparative phytochemical analysis of *Cuscuta reflexa* parasite grown on *Cassia fistula* and *Ficus benghlensis* by GC-MS. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, (5), 350-355.
- Bussaman P., Sa-uth C., Rattanasena P., and Chandrapatya A. (2012). *Effect of crude Plant extracts on mushroom mite, Luciaphorus sp. (Acari:pygmephoridae)*. Hindiwi Publishing Corporation Psyche.
- Mateen A., Suresh P.V.K., and Ahmed P. (2011). Evaluation of antibacterial activity of *Cuscuta reflexa* and *abutilon indicum*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*.
- Patel S., Sharma V., Chauhan N.S. and Dixit V.K. (2012). An updated review on the parasitic herb of *Cuscuta reflexa* Roxb. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, (10), 249-255.
- Perveen S., Bukhari IH., Ain QU., Kousar S., and Rehman J. (2013). Antimicrobial, antioxidant and minerals evaluation of *Cuscuta europea* and *Cuscuta reflexa* collected from difference hosts and exploring their role as functional attribute. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, (3),43-49.
- Pumnuan J., Insung A., and Rongpol P. (2009). Effectiveness of medical plant essential oils on pregnant female of *Luciaphorus perniciosus* Rack (Acari: Pygmephoridae). *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. Special Issue, 410-414
- Pumnuan J., Chandrapatya A., and Insung A. (2010). Acaricidal Activities of Plant Essential Oils from Three Plants on the Mushroom Mite, *Luciaphorus perniciosus* Rack (Acari: Pygmephoridae) *Pakistan Journal of Zoology*, 42(3), 247-252.
- Tanruean K., Poolprasert P., Kumla, J., Suwannarach N. and Lumyong S. (2019). Bioactive compounds content and their biological properties of acetone extract of *Cuscuta reflexa* Roxb. grown on various host plants, *Natural Product Research*, 33(4), 544-547.
- Tanruean K., Napiroon T., Phusing S., Torres J. R.D., Villanueva P. M. and Poolprasert P. (2019). Larvicidal effects of *Paederia pilifera* Hook.f. leaf and *Cuscuta reflexa* Roxb. stem extracts against the dengue vector mosquito *Aedes aegypti* Linn. *The Journal of Applied Science*. 18(1).
- Vijikumar S., Ramanathan K., and Devi BP. (2011). *Cuscuta reflexa* Roxb. -A wonderful miracle plant in ethnomedicine, *Indian Journal of Natural Sciences*,11,676-683.

การศึกษาเชื้อราที่ก่อโรครากเน่าในมันสำปะหลังในเขตอำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก

อารียา ประเสริฐภรณ์, ราไฟ โกฎสืบ*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิษณุโลก
Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok
email: kodsueb@yahoo.com

บทคัดย่อ

โรครากเน่าในมันสำปะหลังเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงต่อผลผลิตมันสำปะหลังของเกษตรกร งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเชื้อราที่ก่อโรครากเน่าในมันสำปะหลัง โดยเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการรากเน่า และและเน่าแห้ง จากพื้นที่ที่พบการแพร่ระบาดของโรคในตำบลบ้านกลาง อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 16 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting technique บนอาหาร PDA เมื่อพบเชื้อเจริญออกจากเนื้อเยื่อที่เป็นโรคจึงทำการตัดปลายเส้นใยไปใส่ในอาหารจานใหม่เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ผลการแยกเชื้อสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 16 ไอโซเลต เป็นเชื้อกลุ่มที่สร้างสปอร์ 11 ไอโซเลต และไม่สร้างสปอร์ 5 ไอโซเลต ทำการระบุเชื้อที่แยกได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี ลักษณะการเจริญของเส้นใยบนผิวหน้าอาหารและสัณฐานวิทยาของสปอร์ของเชื้อรา ทำการตรวจสอบลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ โดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์ แล้วจึงระบุเชื้อเชื้อราในระดับสกุลโดยการเปรียบเทียบรายละเอียดของเชื้อกับข้อมูลในเอกสารและรูปวิธานที่เกี่ยวข้อง ผลจากการระบุเชื้อเชื้อพบว่าเชื้อราบางสกุล คือ *Fusarium* sp. และ *Neoscytalidium* sp. ที่แยกได้ในการศึกษานี้ที่พบมีการรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจเมื่อพบว่าเชื้อราในสกุล *Scopulariopsis* sp. ที่พบในการศึกษานี้ไม่เคยมีการรายงานว่าเป็นเชื้อก่อโรคเน่าในมันสำปะหลังในประเทศไทยมาก่อน

คำสำคัญ: มันสำปะหลัง, โรครากเน่า, *Fusarium*, *Neoscytalidium*, *Scopulariopsis*

Study on fungi causing cassava root rot collected from Wang Thong, Phitsanulok Province

Areeya Prasertkan^{1, a}, Rampai Kodsueb^{1, b}

Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand

E-mail; ^aarriya.p@psru.ac.th, ^bkodsueb@yahoo.com

Abstract

Root rot is a disease that causes severe damage to cassava yields. The objective of this study is to study the fungi causing root rot disease in cassava. The study was carried out by collecting cassava samples which exhibited soft rot and dry rot from the area where the epidemic of disease was found in Ban Klang Subdistrict, Wang Thong District, Phitsanulok Province. A total of 16 cassava samples have been collected and isolation of the pathogen then has been done by using tissue transplanting technique on PDA medium. Hyphal tip technique was used to obtain pure culture of the pathogen growing into the PDA and then transferred to new petri dish. Totally 16 isolates of fungi have been obtained, where 11 isolates are sporulated and five isolates are non-sporulated ones. Identification of the pathogen was done based on morphological characteristics of fungal colony, growth characteristics of mycelium and spore morphology. Microscopic characteristics of fungi were then examined under compound microscope using slide culture technique. Generic name of each fungus was specified by comparing the information with relevant fungal taxonomic documents. Identification result showed that some fungal genera; *Fusarium* sp. and *Neoscytalidium* sp., obtained in this study is consistent with the results of previous studies. However, it is worth noting that *Scopulariopsis* sp. isolated in this study has never been reported as causal agent of cassava root rot disease in Thailand before.

Keywords: Cassava, Root rot disease, *Fusarium*, *Neoscytalidium*, *Scopulariopsis*

บทนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ข้อดีของมันสำปะหลังคือ เป็นพืชที่ปลูกง่าย ทนทานต่อสภาพดินฟ้าอากาศที่แปรปรวน สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ สำหรับในจังหวัดพิษณุโลกมีการปลูกมันสำปะหลังมากที่สุดในอำเภอวังทอง โดยมีเนื้อที่เพาะปลูกประมาณ 61,000 ไร่ และมีผลผลิตมากถึง 192,978 ตัน สายพันธุ์ที่มีการปลูกมากที่สุดคือพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) เนื่องจากทนแล้ง ทนฝน ปลูกได้ในทุกสภาพดิน ปลูกได้ตลอดทั้งปี สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ท่อนพันธุ์เก็บรักษาได้นาน เปอร์เซ็นต์แบ่งสูง ทำให้ขายผลผลิตได้ราคาสูง ปัจจุบันมันสำปะหลังเป็นที่ต้องการของตลาดเพิ่มมากขึ้น จึงเป็นเหตุให้เกษตรกรในอำเภอวังทองปลูกมันสำปะหลังติดต่อกันตลอดทั้งปี ส่งผลให้มีการสะสมและแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรค โดยโรคที่สร้างความเสียหายรุนแรงให้แก่ผลผลิตของเกษตรกร คือ โรครากเน่า หรือ root rot disease (กลุ่มอนุรักษดินและน้ำ, 2545; Charaensatapon et al., 2014) ซึ่งโรคนี้จะทำให้รากเน่าอย่างรวดเร็วและมีกลิ่นเหม็น โดยส่วนที่เน่าจะไม่สามารถขายได้ ในขณะที่ส่วนที่ยังพอขายได้จะได้ราคาต่ำ

จากงานวิจัยที่ผ่านมา สุทธิสา ดัชนี (2558) ได้ศึกษาเชื้อสาเหตุของโรคต้นและรากเน่าดำจากมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ จากการแยกเชื้อและนำเชื้อที่แยกได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบเชื้อรา 5 สกุล คือ *Lasiodiplodia* spp., *Fusarium* spp., *Neoscytalidium* sp., *Phytophthora* spp. และ *Sclerotium* sp. นอกจากนี้ พรปวิณ ริ้วมนารานิกุล และคณะ (2562) ได้ทำการจำแนกชนิดและทดสอบการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคหัวและลำต้นเน่ามันสำปะหลัง โดยการแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting method และ baiting technique ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่แยกได้ สามารถจำแนกเชื้อราได้ทั้งหมด 3 สกุล จาก 16 ไอโซเลต คือ *Pythium* spp., *Fusarium* sp. และ *Neoscytalidium* sp. และในส่วนของงานรายงานในต่างประเทศ Ibrahim and Shehu (2014) ได้ทดสอบความสามารถในการก่อโรครากเน่าของเชื้อราในสกุล *Scopulariopsis* sp. ที่แยกได้จากดินรอบ ๆ รากมันสำปะหลัง โดยผลการทดสอบการก่อโรคกับรากมันสำปะหลัง พบว่าเชื้อราในสกุล *Scopulariopsis* sp. สามารถก่อให้เกิดโรครากเน่าในระดับที่ไม่รุนแรงได้ และจากงานวิจัยของ Boas et al. (2017) ที่ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อที่ก่อโรครากเน่าในมันสำปะหลัง โดยทำการศึกษาลำดับเบสของยีน ITS (internal transcribed spacer of the ribosomal DNA) พบเชื้อรา 7 สกุล ได้แก่ *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Neoscytalidium* sp., *Diaporthe* sp., *Phomopsis* sp., *Phytophthora* spp. และ *Corallomycetella* spp.

อย่างไรก็ตามเนื่องจากเกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลังส่วนใหญ่ไม่ทราบสาเหตุของการเกิดโรครากเน่า จึงทำให้ยากต่อการป้องกันกำจัด ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาลักษณะของเชื้อราที่คาดว่าเป็นสาเหตุโรครากเน่าของ มันสำปะหลังที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่ที่พบการแพร่ระบาดของโรค ในตำบลบ้านกลาง อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก โดยผลที่ได้จากการศึกษาคาดว่าจะสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับผู้สนใจจะศึกษาต่อยอด โดยการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรครากเน่า หรือใช้เป็นข้อมูลแก่ผู้ที่ต้องการหาวิธีป้องกันและกำจัดโรคอย่างถูกวิธีต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความหลากหลายชนิดของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าในมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ในเขตอำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการรากเน่า

เก็บรวบรวมตัวอย่างรากมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่แสดงอาการเน่า จากพื้นที่ปลูกในตำบลบ้านกลาง อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก ระหว่างเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ 2562 ใช้วิธีการเก็บตัวอย่างโดยเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (Purposive sampling) โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างรากมันสำปะหลังที่แสดงอาการเน่าและ และเน่าแห้ง จำนวน 16 ตัวอย่าง จากแหล่งปลูกที่มีสภาพพื้นที่แตกต่างกัน โดยเก็บตัวอย่างจากไร่ที่ 1 ปลูกบนพื้นที่ราบ มันสำปะหลังอายุ 10 เดือน ไร่ที่ 2 ปลูกบนพื้นที่ติดลำคลอง มีน้ำไหลผ่าน มันสำปะหลังอายุ 12 เดือน ไร่ที่ 3 ปลูกบนพื้นที่ลุ่ม มันสำปะหลังอายุ 6 เดือน และไร่ที่ 4 ปลูกบนเนินเขาสูง มันสำปะหลังอายุ 8 เดือน จากนั้นห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของผลอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ และหลีกเลี่ยงไม่ให้เชื้อราชนิดอื่นขึ้นปกคลุม เนื่องจากความชื้นบนทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่เก็บ สภาพพื้นที่ปลูก อายุพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ และลักษณะอาการของโรค

พร้อมทั้งถ่ายภาพ แล้วนำตัวอย่างที่ได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

2. การแยกเชื้อรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

นำรากมันสำปะหลังที่แสดงอาการเน่ามาแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting technique โดยตัดเอารอยต่อของเนื้อเยื่อที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติ หนาประมาณ 1.5 เซนติเมตร เปิดน้ำผ่านเพื่อล้างสิ่งสกปรก แช่เนื้อเยื่อใน Clorox 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ติดอยู่ที่ผิวนอก นำมาแช่ต่อใน Alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อในขั้นตอนสุดท้าย จากนั้นตัดเนื้อเยื่อส่วนในระหว่างรอยต่อของเนื้อเยื่อที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติ เป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร วางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 3 ชิ้นต่อจาน โดยวางแต่ละชิ้นห่างจากขอบจานเพาะเชื้อประมาณ 1.5 เซนติเมตร นำจานเพาะเชื้อไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3-7 วัน เมื่อพบเส้นใยของราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืช จึงทำการตัดปลายเส้นใยไปวางใน PDA จานใหม่ (ตัดแปลงจากวิธีการของ อมรรรัตน์ ภูไพบูลย์, 2556) เมื่อเชื้ออายุ 7-10 วัน จึงเก็บเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราใส่ลงในขวดที่บรรจุ mineral oil ที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เก็บไว้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อศึกษาขั้นตอนต่อไป

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

3.1) ศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา วางให้ด้านที่มีเส้นใยของเชื้อคว่ำลงบนอาหารบริเวณกลางจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน หรือจนเชื้อเจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อ (อมรรรัตน์ คิดใจเดียว และคณะ, 2560) บันทึกผลโดยดูลักษณะโคโลนีของเชื้อรา การเจริญที่ผิวหน้าอาหารและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา พร้อมทั้งถ่ายภาพ

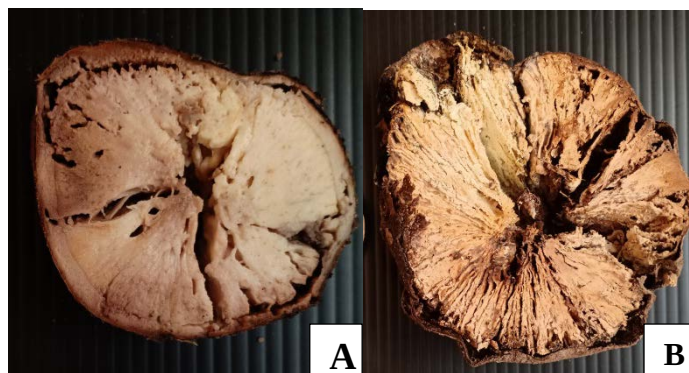
3.2) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์หรือ slide culture (สาขาจุลชีววิทยา, 2561)

เทอาหาร PDA ลงในจานเพาะเชื้อ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร หรือให้ระดับอาหารสูงประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ทิ้งให้เย็นและผิวหน้าอาหารแห้ง ใช้มีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อ กรีดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจานให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างด้านละประมาณ 6 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบ คีบสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟ 2 ครั้ง แล้ววางลงบนแท่งแก้วในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปลอดเชื้อ ใช้มีดยกชิ้นวุ้นมาวางกลางสไลด์บนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ จากนั้นใช้เข็มเขี่ย เขี่ยเชื้อรามาแตะที่ตรงกลางทั้ง 4 ด้านของชิ้นวุ้น นำกระจกปิดสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟแล้วค่อย ๆ วางปิดชิ้นวุ้น ซึ่งลงเชื้อไว้แล้ว นำสำลิจับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววางในจานอาหารเพาะเชื้อ เพื่อให้ความชื้นแก่เชื้อรา บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) จนกระทั่งเส้นใยของเชื้อราเจริญจนถึงขอบของกระจกปิดสไลด์ หรือประมาณ 5-7 วัน จึงนำมาทำสไลด์กึ่งถาวร โดยใช้ปากคีบค่อย ๆ คีบกระจกปิดสไลด์ออกจากจานอาหารเพาะเชื้อ หยดด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 1-2 หยด บนด้านที่มีเส้นใยเชื้อรา เพื่อไล่ความชื้นออกทิ้งไว้เกือบแห้ง จากนั้นหยดสีย้อม Lactophenol cotton blue ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ค่อย ๆ ปิดกระจกปิดสไลด์ด้านที่มีเส้นใยเชื้อราเจริญอยู่ลงไป นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วัดขนาด ถ่ายภาพ และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ ของเชื้อราไว้ แล้วจึงปิดทับขอบกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บแบบใสเพื่อเตรียมเป็นสไลด์กึ่งถาวร สำหรับใช้ในการศึกษารายละเอียดต่าง ๆ เพิ่มเติมในการศึกษาต่อไป จากนั้นจึงทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยการเปรียบเทียบรายละเอียดของเชื้อที่พบกับข้อมูลในเอกสารของสุทธิสา ดัชนี (2558); พรวิวัฒน์ ธีวัฒนวรานิกุล และคณะ (2562) และ Sandoval-Denis et al. (2016)

ผลการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการรากเน่า

เก็บตัวอย่างรากมันสำปะหลังที่แสดงอาการเน่าและเน่าแห้ง (ภาพที่ 1) รวม 16 ตัวอย่าง รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ตัวอย่างรากมันสำปะหลังที่เป็นโรคเน่า (A) รากมันสำปะหลังเน่าและ (B) รากมันสำปะหลังเน่าแห้ง

2. การแยกเชื้อรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

สามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าในมันสำปะหลังได้จำนวน 16 ไอโซเลต (ตารางที่ 1) เป็นเชื้อกลุ่มที่สร้างสปอร์ 11 ไอโซเลต และไม่สร้างสปอร์ 5 ไอโซเลต และได้เก็บทุกไอโซเลตในรูปเชื้อราบริสุทธิ์โดยเก็บใน mineral oil ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาไว้ที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

ตารางที่ 1 เชื้อราที่แยกได้จากรากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรครากเน่า ที่เก็บตัวอย่างจากตำบลบ้านกลาง อำเภอมองทอง จังหวัดพิษณุโลก

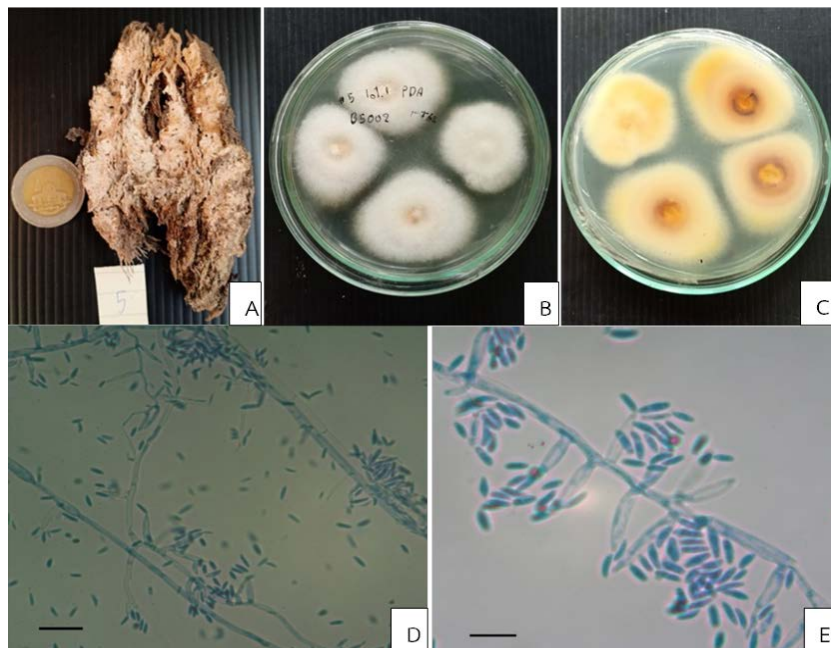
ลำดับที่	ลักษณะการเน่า	ไอโซเลต	สภาพแปลงปลูก
1	เน่าแห้ง	A3001	พื้นที่ราบ
2	เน่าแห้ง	A3002	พื้นที่ราบ
3	เน่าแห้ง	A3003	พื้นที่ราบ
4	เน่าแห้ง	A3004	พื้นที่ราบ
5	เน่าแห้ง	B1001	พื้นที่ติดลำคลอง มีน้ำไหลผ่าน
6	เน่าแห้ง	B1002 (<i>Fusarium</i> sp.)	พื้นที่ติดลำคลอง มีน้ำไหลผ่าน
7	เน่าแห้ง	B2001	พื้นที่ติดลำคลอง มีน้ำไหลผ่าน
8	เน่าและ	B3001	พื้นที่ติดลำคลอง มีน้ำไหลผ่าน
9	เน่าและ	C1001	พื้นที่ลุ่ม
10	เน่าและ	C1002 (<i>Scopulariopsis</i> sp.)	พื้นที่ลุ่ม
11	เน่าแห้ง	C3001	พื้นที่ลุ่ม
12	เน่าแห้ง	C3002	พื้นที่ลุ่ม
13	เน่าและ	C4001 (<i>Neoscytalidium</i> sp.)	พื้นที่ลุ่ม
14	เน่าและ	D1001 (<i>Neoscytalidium</i> sp.)	เนินเขา
15	เน่าและ	D2001	เนินเขา
16	เน่าแห้ง	D4001	เนินเขา

หมายเหตุ

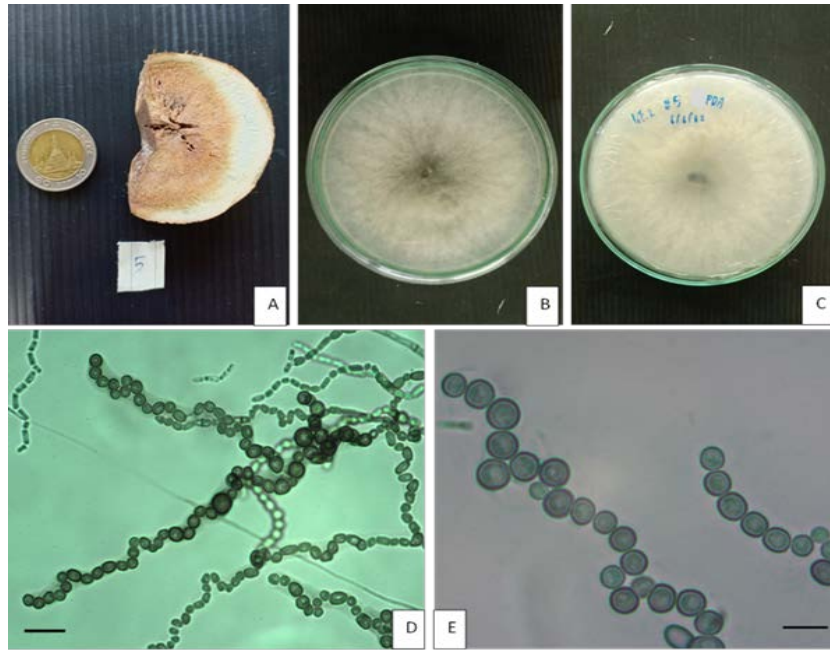
- A-D = แหล่งเก็บตัวอย่างจากแปลงที่ 1-4
- เลขหลักแรก = หมายเลขตัวอย่างที่เก็บจากแต่ละแปลง
- สามหลักท้าย = เชื้อที่แยกได้จากแต่ละตัวอย่าง

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

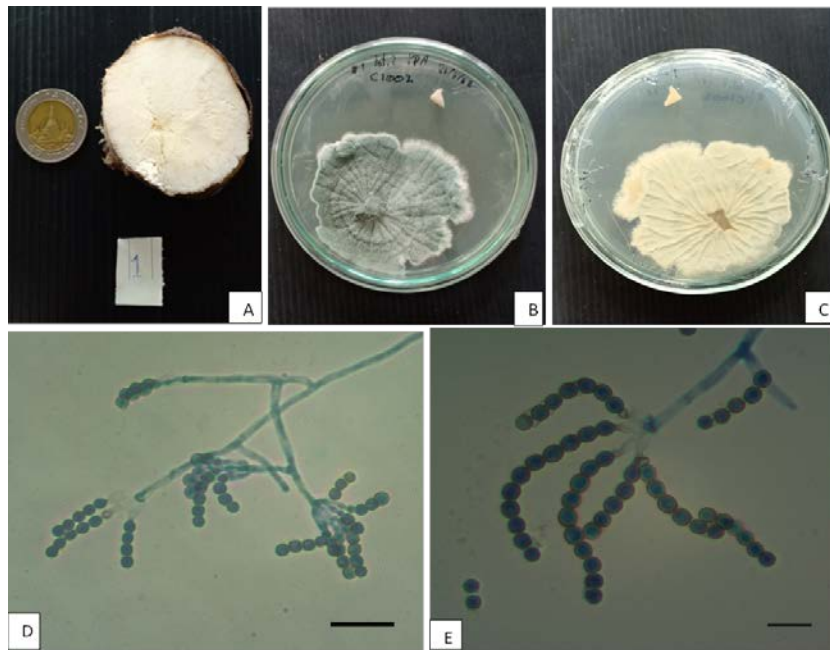
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี ลักษณะการเจริญของเส้นใยบนผิวหน้าอาหารและสัณฐานวิทยาของสปอร์ของเชื้อรา สามารถระบุเชื้อราได้ 3 สกุล คือ *Fusarium* sp., *Neoscytalidium* sp. และ *Scopulariopsis* sp. โดยพบว่ารา *Fusarium* sp. เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ภายใน 3 วัน โคโลนีของเชื้อมีลักษณะละเอียดฟูสีขาวเหลือง ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 400 เท่า เส้นใยมีผนังกัน ใสไม่มีสี ผนังเส้นใยเรียบ macroconidia ประกอบด้วย 3-5 เซลล์ รูปร่างมีทั้งลักษณะตรง และโค้งงอคล้ายเสี้ยวพระจันทร์ ปลายทั้งสองข้างเรียวแคบลง มีขนาดเฉลี่ย 8.9×2.5 ไมโครเมตร ($n = 20$) (ภาพที่ 2) ในส่วนของ *Neoscytalidium* sp. เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ภายใน 3 วัน โคโลนีของเชื้อราเริ่มแรกมีลักษณะเส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย เมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 400 เท่า conidia เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ มีสีเข้ม conidia ระยะอ่อนใสไม่มีสี ส่วนใหญ่มีเซลล์เดียว แต่ต่อมาจะมีการสร้างผนังกันแบ่งเป็น 2 เซลล์ โดยเซลล์ตรงกลางทึบสีน้ำตาล หัวท้ายใส ผนังจะหนาและเหนียวขึ้น มีขนาดเฉลี่ย 7.4×6.2 ไมโครเมตร ($n = 20$) (ภาพที่ 3) สำหรับเชื้อ *Scopulariopsis* sp. เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ภายใน 5 วัน โคโลนีของเชื้อรามีสีเขียว ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 400 เท่า conidia รูปร่างกลม เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ ผนังเรียบและหนา เส้นใยใสไม่มีสี มีผนังกัน ส่วนใหญ่มีเซลล์เดียว ขนาดเฉลี่ย 4.6×4.4 ไมโครเมตร ($n = 20$) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลต B1002. A = ลักษณะการเน่าของรากมันสำปะหลัง. B-C = ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง. D = ลักษณะของ conidia ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า. E = ลักษณะของ conidia ที่กำลังขยายของภาพ 1000 เท่า. D-E mount สไลด์ด้วย lectophenol cotton blue. scale bar: D เท่ากับ 20 ไมโครเมตร, E เท่ากับ 10 ไมโครเมตร.



ภาพที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. ไอโซเลต D1001. A = ลักษณะการเน่าของรากมันสำปะหลัง. B-C = ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง D = ลักษณะของ conidia ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า. E = ลักษณะของ conidia ที่กำลังขยายของภาพ 1000 เท่า. D-E mount สไลด์ด้วย lectophenol cotton blue. scale bar: D เท่ากับ 20 ไมโครเมตร, E เท่ากับ 10 ไมโครเมตร.



ภาพที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของเชื้อรา *Scopulariopsis* sp. ไอโซเลต C1002. A = ลักษณะการเน่าของรากมันสำปะหลัง. B-C = ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง D = ลักษณะของ conidia ที่กำลังขยายของภาพ 400 เท่า. E = ลักษณะของ conidia ที่กำลังขยายของภาพ 1000 เท่า. D-E mount สไลด์ด้วย lectophenol cotton blue. scale bar: D เท่ากับ 20 ไมโครเมตร, E เท่ากับ 10 ไมโครเมตร.

สรุปและอภิปรายผล

ผลการเก็บรวบรวมตัวอย่างรากมันสำปะหลังที่แสดงอาการเน่าและเน่าแห้ง จากแปลงปลูก 4 แปลง ที่สภาพพื้นที่ปลูกมีความแตกต่างกัน คือ พื้นที่ราบ พื้นที่ลุ่ม พื้นที่ติดลำคลองมีน้ำไหลผ่าน และพื้นที่เขาสูง ในตำบลบ้านกลาง อำเภอสว่างทอง จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 16 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าในมันสำปะหลังได้ 16 ไอโซเลต จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา พบเป็นเชื้อกลุ่มที่สร้างสปอร์ 11 ไอโซเลต และไม่สร้างสปอร์ 5 ไอโซเลต และสามารถระบุชื่อเชื้อราได้ 3 สกุล คือ *Fusarium* sp., *Neoscytalidium* sp. และ *Scopulariopsis* sp. แม้ว่าจะเก็บตัวอย่างมาจากสภาพพื้นที่ปลูกที่แตกต่างกัน แต่เมื่อนำมาแยกเชื้อและตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ พบว่าเชื้อราที่พบไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามในสภาพพื้นที่ติดลำคลองซึ่งมีน้ำไหลผ่าน ทำให้ดินแฉะ ดินระบายน้ำได้ไม่ดี รากมันสำปะหลังจะเกิดการเน่าและเสียหายมากกว่าพื้นที่อื่น ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ พรปวีณ์ ธิวัฒน์วานิกุล และคณะ (2562) ที่แยกเชื้อราสาเหตุโรคหัวและลำต้นเน่าจากมันสำปะหลัง พบเชื้อรา *Fusarium* spp. โคลนินของเชื้อมีลักษณะฟูสีขาวครีม เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 200 เท่า และ 400 เท่า macroconidia มีลักษณะค่อนข้างสั้น โค้ง โดยมี 3-4 septa มีขนาด 27.7×4.0 ไมโครเมตร ส่วน microconidia มีลักษณะคล้ายรูปไข่ หรือ กระสวย มี 0-1 septum มีขนาด 8.0×5.0 ไมโครเมตร จำแนกได้เป็น *F. solani* และยังสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ สุทธิสา ดัชนี (2558) ที่แยกเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. จากโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง และผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา พบว่า conidia มีขนาดเล็ก มีลักษณะ 3 เซลล์ เซลล์ตรงกลางมีสีเข้ม หัวท้ายแหลม เมื่อแยกเชื้อราแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA โคลนินมีสีดำ สร้างสปอร์เรียงต่อกัน และได้รายงานเชื้อราชนิดนี้ คือ *N. hyalinum* สาเหตุของโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง สำหรับการรายงานในต่างประเทศ Machado et al. (2014) รายงานว่าโรครากเน่าของมันสำปะหลัง เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia euphorbicola*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* และ *Neoscytalidium hyalinum* นอกจากนี้ Boas et al. (2017) ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อที่ก่อโรครากเน่าในมันสำปะหลัง พบเชื้อรา 7 สกุล ได้แก่ *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Neoscytalidium* sp., *Diaporthe* sp., *Phomopsis* sp., *Phytophthora* spp. และ *Corallomycetella* spp. โดยพบว่า *F. solani* มีการกระจายพันธุ์และพบแพร่หลายมากที่สุด

อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจเมื่อพบว่าเชื้อราในสกุล *Scopulariopsis* sp. ที่พบในการศึกษานี้ไม่เคยมีการรายงานว่าเป็นเชื้อก่อโรคเน่าในมันสำปะหลังในประเทศไทยมาก่อน ดังนั้นการศึกษาเชื้อราที่ก่อโรคเน่าในมันสำปะหลังในเขตอำเภอสว่างทอง จังหวัดพิษณุโลก จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานอย่างหนึ่งที่ทำให้ทราบถึงเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจจะศึกษาต่อยอด เพื่อทำการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรครากเน่า หรือใช้เป็นข้อมูลแก่ผู้ที่ต้องการหาวิธีป้องกันและกำจัดโรคอย่างถูกวิธี นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนจัดการใช้สารเคมีในแปลงเพาะปลูก โดยอาจเลือกใช้สารเคมีชนิดที่มีพิษตกค้างระยะสั้นและมีพิษเจาะจงต่อการกำจัดเชื้อราก่อโรคแต่ละชนิดเท่านั้น

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างรากมันสำปะหลังที่แสดงอาการเน่า ที่เก็บจากแปลงปลูกเพียงแค่ 4 แปลง ซึ่งในช่วงเดือนที่เก็บตัวอย่างเป็นช่วงที่เกษตรกรส่วนใหญ่เร่งเก็บผลผลิตก่อนอายุการเก็บเกี่ยว เนื่องจากพบการแพร่ระบาดของโรครากเน่ามาก หากปล่อยไว้นานอาจขายผลผลิตไม่ได้ ทำให้ตัวอย่างที่เก็บได้มีจำนวนน้อยและอาจไม่ครอบคลุมทั่วพื้นที่เพาะปลูก ทำให้เชื้อราที่พบจากการศึกษาครั้งนี้จึงไม่ค่อยมีความหลากหลายชนิดมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นที่ผ่านมา ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปจึงควรเพิ่มจำนวนการเก็บตัวอย่างให้มากขึ้นและสุ่มเก็บตัวอย่างให้กระจายครอบคลุมทั่วพื้นที่ปลูก

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มอนุรักษ์ดินและน้ำ. (2545). **มันสำปะหลัง**. สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน. กรมพัฒนาที่ดิน. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- พรปวีณ์ ธิวัฒน์วานิกุล, ภาณุวัฒน์ มูลจันทร์, วรณวิไล อินทนู และจินตนา อันอาตม์งาม. (2562). การจำแนกชนิดและทดสอบการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคหัวและลำต้นเน่ามันสำปะหลัง. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, 37(2), 239-249.
- สาขาวิชาจุลชีววิทยา. (2561). **ปฏิบัติการจุลชีววิทยา** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม. 55-56.
- สุทธิสา ดัชนี. (2558). **การระบุเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง**. (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2561). **สถานการณ์และแนวโน้มสินค้าเกษตรที่สำคัญ ปี 2562**. สืบค้นเมื่อ 20 กุมภาพันธ์ 2562, จาก http://www.oae.go.th/assets/portals/1/ebookcategory/24_2562_Final_Download/#page=1.
- อมรรักษ์ คัดใจเดียว, พชร ิตานนท์, ดารณี เจริญผล, สุณิรัตน์ สิมะเตือ, มะโนรัตน์ สุดสงวน, ชนินทร ดวงสอด, พรพิมล อธิปัญญาคม. (2560). **ศึกษาราสกุล *Phytophthora* ในเผือก**. รายงานการวิจัยประจำปี 2560. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. 1357.
- อมรรักษ์ ภูไพบูลย์. (2556). **พืชที่เป็นโรคไฟทอปธอรา**. เอกสารวิชาการ. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 189 หน้า.
- Boas, S.A.V., de Oliveira, S.A.S., Bragança, C.A.D., Ramos, J.B. and de Oliveira, E.J. (2017). Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing region in Brazil. *Scientia Agricola* 74, 60-67.
- Charaensatapon, R., Saelee, T., Chulkod, U. and Cheadchoo, S. (2014). Phytophthora Root and Tuber of cassava in Thailand. Field and renewable energy crops research institute. Department of Agriculture, Thailand, In *Proceedings of 5th Asian Conference on Plant Pathology*. The empress hotel, Chiang Mai, Thailand, 3-6 November 2014.
- Ibrahim, M. and Shehu, K. (2014). Relationship of soilborne mycoflora of cassava growing fields to Incidence of postharvest rots of cassava tubers in Sokoto, Nigeria. *Aceh International Journal of Science and Technology* 3 (3), 168-173.
- Machado, A.R., Pinho, D.B., Oliveira, S.A.S. and Pereira, O.L. (2014). New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39 (6), 464-470.
- Sandoval-Denis, M., Gené, J., Sutton, D.A., Cano-Lira, J.F., de Hoog, G.S., Decock, C.A., Wiederhold, N.P., Guarro, J. (2016). Redefining *Microascus*, *Scopulariopsis* and allied genera. *Persoonia* 36, 1-36.

การเปรียบเทียบวัสดุฝังชนิดต่าง ๆ เพื่อทำพรรณไม้แห้งแบบสามมิติ ที่เก็บรักษาด้วยพอลิเอสเตอร์เรซิน

พรอนันต์ บุญก่อน จินตนาภรณ์ สืบชัย อีรววัฒน์ ชูวงศ์เจริญกุล อังคณา เชื้อเจ็ดตน หฤทัย ไทยสุชาติ

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง จังหวัดลำปาง
email: pomananb@yahoo.com

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาตัวอย่างพืชเพื่อการศึกษาทางพฤกษศาสตร์โดยการฝังในพอลิเอสเตอร์เรซินกำลังได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน ซึ่งต้องทำให้พืชแห้งก่อนการฝัง การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุฝัง 3 ชนิด ได้แก่ ซิลิกาเจล ทราย และแกลบ ต่อคุณภาพของดอกเบญจมาศ ดอกกุหลาบ และใบโพธิ์ ซึ่งเป็นตัวแทนของพืชที่มีรงควัตถุแคโรทีนอยด์ แอนโทไซยานิน และคลอโรฟิลล์ ตามลำดับ แล้วอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสก่อนฝังในพอลิเอสเตอร์เรซิน จากการวิจัยพบว่าวัสดุที่ใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดในการทำให้ดอกเบญจมาศ ดอกกุหลาบ และใบโพธิ์แห้งคือ ซิลิกาเจล (ใช้เวลา 4 ชั่วโมง 15 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณรงควัตถุแคโรทีนอยด์ในดอกเบญจมาศ แอนโทไซยานินในดอกกุหลาบ และคลอโรฟิลล์ในใบโพธิ์หลังการอบแห้ง พบว่าการฝังในซิลิกาเจลมีปริมาณรงควัตถุสูงสุดคือ 0.94, 73.74 และ 0.93 mg/100g ตามลำดับ ผลการวัดค่าสีของดอกเบญจมาศหลังการอบแห้งพบว่าการฝังในซิลิกาเจลคงสภาพสีได้ใกล้เคียงกับดอกเบญจมาศสดมากที่สุด โดยมีค่า L^* , b^* , hue และ chroma เท่ากับ 75.10, 68.20, 1.49 และ 68.38 ตามลำดับ ดอกกุหลาบที่ฝังในทรายคงสภาพสีได้ใกล้เคียงกับดอกกุหลาบสดมากที่สุด โดยมีค่า L^* , a^* , hue และ chroma เท่ากับ 35.21, 35.10, 0.14 และ 32.59 ตามลำดับ และใบโพธิ์ที่ฝังในซิลิกาเจลคงสภาพสีได้ใกล้เคียงกับใบโพธิ์สดมากที่สุด โดยมีค่า L^* , a^* , hue และ chroma เท่ากับ 42.21, -15.75, -1.07 และ 30.33 ตามลำดับ ภายหลังจากฝังพืชในพอลิเอสเตอร์เรซินแล้วเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าดอกเบญจมาศและกุหลาบที่ทำให้แห้งโดยการฝังในซิลิกาเจลมีและใบโพธิ์ที่ฝังในทรายมีการคงรูปร่างได้ดีกว่าชุดการทดลองอื่น ขณะที่ชุดที่ใช้ดอกไม้สดฝังในพอลิเอสเตอร์เรซินทันทีโดยไม่ผ่านการทำให้แห้งพบว่าการยุบตัวและสีซีดลงอย่างชัดเจน

คำสำคัญ: วัสดุฝัง พรรณไม้แห้งแบบสามมิติ ซิลิกาเจล ทราย แกลบ พอลิเอสเตอร์เรซิน

A comparison of embedded materials on drying plant specimens for a three-dimensional preservation in polyester resin

**Pornanan Boonkorn Jintanaporn Supchai Theerawat Chuwong-jaroenkul
Angkhana Chuajedton Haruthai Thaisuchat**

Biology department, Science Faculty, Lampang Rajabhat University, Lampang
email: pornananb@yahoo.com

Abstract

Plant preservation in polyester resin for botanical studies is nowadays increasing interested. However, plant samples must be dried before embedded. The purpose of this research was to compare the efficacy of silica gel, sand and rice husk on drying plant specimens (chrysanthemum flowers, rose flowers and Bodhi leaves as the representative of carotenoids, anthocyanin and chlorophyll, respectively) and then drying at 65°C before polyester resin embedded. The research had shown that silica gel gave the shortest time in drying chrysanthemums, roses and Bodhi leaves (4, 15 and 2 hours, respectively). In comparing on carotenoids content in chrysanthemum, anthocyanin content in roses and chlorophyll content in Bodhi leaves after drying, it was found that embedded in silica gel gave the highest quantity at 0.94 mg/100g, 73.74 mg/100g and 0.93 mg/100g, respectively. The color measurement after drying was found that chrysanthemum embedded in silica gel could preserve their color in comparative to fresh flower. The L*, b* hue and chroma value were 75.10, 68.20, 1.49 and 68.38, respectively. Roses embedded in sand preserved their color in comparative to fresh flower. The L*, a* hue and chroma value were 35.21, 35.10, 0.14 and 32.59, respectively. Bodhi leaves embedded in silica gel preserved their color in comparative to fresh leaves with the L*, a*, hue and chroma value were 42.21, 15.75, -1.07 and 30.33, respectively. Structure collapsed and pale color was found in fresh plants embedded immediately in polyester resin.

Keywords: embedded materials; 3-dimensional herbarium; silica gel; sand; rice husk; polyester resin

บทนำ

การเก็บรักษาตัวอย่างพรรณพืชให้คงอยู่เป็นระยะเวลานาน ๆ เพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงพรรณพืชมีความสำคัญต่อการศึกษาด้านพฤกษอนุกรมวิธาน (plant taxonomy) โดยวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ การอัดแห้ง เพราะเป็นวิธีที่ง่ายในการเก็บรักษาตัวอย่างพืช ใช้อุปกรณ์ไม่มาก และเสียค่าใช้จ่ายน้อย แต่อย่างไรก็ตามการอัดแห้งจะทำให้พืชสูญเสียรูปร่างแบบสามมิติและสีของพืชซีดลงหรือหายไป รวมทั้งเก็บรักษาไว้ได้ไม่นาน เนื่องจากมักพบว่ามีแมลงหรือเชื้อราเข้ามาทำลายหากเก็บไว้ในสภาพที่ไม่ดีพอ ส่วนการดองในสารเคมีชนิดต่าง ๆ มักนิยมใช้กับพืชบางกลุ่มที่มีปัญหาในการทำตัวอย่างแห้งเช่นพวกไม้เนื้อแข็ง พืชที่มีต้นและใบอวบน้ำ พืชที่มีดอกบอบบาง หรือตัวอย่างผลสด เป็นต้น ซึ่งมีข้อเสียคือไม่สามารถรักษาสีตามธรรมชาติของพืชเอาไว้ได้ สารเคมีที่ใช้ในการดองมักจะระเหยออกเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานาน จึงต้องคอยเติมสารเคมีชุดใหม่ลงไป รวมทั้งไม่สะดวกต่อการพกพาหรือขนส่งไปยังแหล่งต่าง ๆ ปัญหาสำคัญของการเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้แห้งโดยเฉพาะในเขตร้อนอีกประการหนึ่งคือการเข้าทำลายของแมลงชนิดต่าง ๆ เช่น ตัวง แผลงสาบ และ *Lasioderma* sp. เป็นต้น (Victor *et al.*, 2004) สำหรับการฝังพืชลงในพอลิเอสเตอร์เรซินเป็นวิธีการใหม่ที่ยังไม่เป็นที่แพร่หลายในประเทศไทย โดยในปัจจุบันมักใช้วิธีนี้กับการนำไปทำงานประดิษฐ์หรือเครื่องประดับมากกว่านำมาใช้เพื่อการศึกษา ขณะที่ต่างประเทศเริ่มได้รับความนิยมมากขึ้น โดยเริ่มมีการนำมาจัดทำเป็นสื่อการสอนแบบสามมิติทั้งพืชและสัตว์ที่ฝังในพอลิเอสเตอร์เรซิน เนื่องจากเป็นการทำให้ตัวอย่างมีความน่าสนใจ สามารถมองรายละเอียดได้ทุกมุม และมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน การจัดเก็บหรือขนส่งก็ทำได้สะดวก ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้ยังคงจำหน่ายในราคาแพงเพราะต้องนำเข้าจากต่างประเทศเป็นส่วนใหญ่ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่างพรรณพืชที่มีอยู่อย่างหลากหลายในประเทศไทย อย่างไรก็ตามการฝังพืชลงในพอลิเอสเตอร์เรซินต้องฝังในขณะที่พอลิเอสเตอร์เรซินยังไม่แข็งตัวซึ่งยังมีความร้อนอยู่ ดังนั้นหากฝังพืชสดลงไปทันทีจะทำให้ภายในเซลล์พืชเกิดการเดือดและเกิดฟองอากาศรอบ ๆ เนื้อเยื่อพืช รวมทั้งเมื่อเก็บรักษาไว้นาน ๆ พบว่าพืชจะมีลักษณะหดตัวและสีซีดลง ดังนั้นการเตรียมพืชก่อนการฝังในพอลิเอสเตอร์เรซินจึงมีความสำคัญมาก โดยเฉพาะเมื่อต้องการรักษาสีและรูปร่างตามธรรมชาติเอาไว้ มีรายงานว่าทำให้พืชแห้งโดยฝังพืชลงในวัสดุชนิดต่าง ๆ แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิไม่สูงมากเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถคงรูปร่าง ขนาด และสีของพืชได้เป็นอย่างดี และสามารถเก็บได้เป็นเวลานาน เมื่อนำตัวอย่างพืชมาศึกษา ก็สามารถศึกษาได้ถึงรูปร่างตามธรรมชาติแบบสามมิติได้ ซึ่ง Rani and Reddy (2015) ทำการทดลองโดยใช้เทคนิคการอบแห้งตัวอย่างพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ การอบแห้งด้วยอากาศ การอบแห้งด้วยน้ำ การอบแห้งด้วยสารดูดความชื้น (ทราย, บอแรกซ์ และซิลิกาเจล) การอบแห้งด้วยเตาอบไมโครเวฟ การอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน การกดทับ และการใช้กลีเซอริน พบว่าเทคนิคบางอย่างก็เหมาะสมกับดอกไม้บางชนิดเท่านั้น โดยพบว่าวิธีการที่เหมาะสมที่สุดคือการฝังในทราย ซิลิกาเจล และบอแรกซ์ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ทำได้ง่ายและใช้งบประมาณไม่สูง Karunanda and Peiris (2007) ทดสอบวัสดุฝังหลายชนิดต่อการทำให้ดอก *Plumeria* แห้ง พบว่าการฝังในซิลิกาเจลช่วยคงสภาพสีของดอกได้ดีที่สุด พชร และคณะ (2550) ศึกษาการเก็บรักษาพืชสีเขียวในวัสดุสังเคราะห์พอลิเมอร์เรซิน พบว่าการทำให้พืชให้แห้งด้วยวิธีการทับในหนังสือและชุบบาง ๆ ด้วยอีพ็อกซีเรซิน ก่อนนำไปหล่อขึ้นรูปในพอลิเมอร์เรซินที่ผสมตัวเร่งแข็งในอัตราส่วน 1% สามารถเก็บรักษาพืชสีเขียวไว้ในพอลิเมอร์เรซินได้ดีที่สุด ดังนั้นผู้วิจัยสนใจที่จะเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุที่ใช้ในการฝังพืชบางชนิด ได้แก่ ซิลิกาเจล ทราย และแคลบ ที่มีต่อคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีบางประการของพืชที่เป็นตัวแทนกลุ่มเป้าหมายที่มีรงควัตถุหลักเป็นแคโรทีนอยด์ (สีเหลือง) แอนโทไซยานิน (สีแดง) และคลอโรฟิลล์ (สีเขียว) ได้แก่ดอกเบญจมาศ ดอกกุหลาบ และใบโพธิ์ตามลำดับ เพื่อเก็บรักษาในพอลิเอสเตอร์เรซิน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาระยะเวลาในการทำแห้งและการรักษารูปร่าง รวมทั้งสีของพืชจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ดอกเบญจมาศ ดอกกุหลาบ และใบโพธิ์ โดยการฝังในวัสดุชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ซิลิกาเจล ทราย และแคลบ
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างพืชหลังการทำให้แห้งแล้วฝังในพอลิเอสเตอร์เรซินเป็นระยะเวลา 6 เดือน

ระเบียบวิธีวิจัย

การทำให้พืชแห้ง

ดอกเบญจมาศและดอกกุหลาบซื้อมาจากตลาดหลักเมือง ตำบลพระบาท อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง ส่วนใบโพธิ์เก็บมาจากภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง ตำบลชมพู อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง โดยดอกเบญจมาศใช้เฉพาะส่วนที่เป็นช่อดอก ดอกกุหลาบใช้ส่วนที่เป็นดอกพร้อมกับก้านดอกความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ซึ่งมีใบประกอบติดอยู่ 1 ชุด ใบโพธิ์ใช้เฉพาะส่วนของใบ ซึ่งพืชแต่ละชนิดถูกคัดมาทำการทดลองโดยเลือกที่มีอายุ ขนาด และสีที่มีความใกล้เคียงกัน มีลักษณะที่ปกติ สะอาด ไม่มีโรคหรือรอยถูกแมลงกัดกิน ในการทำให้พืชแห้ง ได้นำทราย ซิลิกาเจล และกลบ ใส่ลงในภาชนะอะลูมิเนียมประมาณ 1/3 ของปริมาตรภาชนะ โดยซิลิกาเจลซื้อจากบริษัทยูเนี่ยนชาเยน จำกัด จังหวัดเชียงใหม่ ทรายได้มาจากบ้านแจ้ซ้อน ตำบลแจ้ซ้อน อำเภอเมืองปาน จังหวัดลำปาง และกลบได้มาจากโรงสีข้าวบ้านศรีหมวดเกล้า ตำบลชมพู อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง จากนั้นนำตัวอย่างพืชใส่ลงในภาชนะ ค่อย ๆ เททราย ซิลิกาเจล หรือกลบใส่ลงในภาชนะให้ท่วมตัวอย่างพืช แล้วนำไปอบในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างพืชออกมาชั่งน้ำหนักทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนกว่าน้ำหนักของพืชไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนชุดควบคุมคือชุดที่ถูกนำไปอบแห้งที่ 65 องศาเซลเซียสโดยไม่มีการผึ่งในวัสดุใด ๆ

การผึ่งพืชในพอลิเอสเตอร์เรซิน

นำเรซินชนิดพอลิเอสเตอร์ผสมกับตัวทำแข็ง (Hardenner) คนให้เข้ากัน จากนั้นเทลงในแม่แบบยางซิลิโคนประมาณ 1/3 ของปริมาตรของแม่แบบ นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวัสดุต่าง ๆ รวมทั้งตัวอย่างพืชสดใส่ลงในแม่แบบยางซิลิโคนทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเทเรซินให้ท่วมตัวอย่างพืช ทิ้งไว้ให้แห้ง 24 ชั่วโมง แกะออกจากแม่แบบ และทำความสะอาด

การวัดผล

วัดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของพืชในขณะอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส โดยนำพืชออกมาชั่งน้ำหนักทุก ๆ 1 ชั่วโมงด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง จนกระทั่งน้ำหนักของพืชไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

วัดปริมาณรงควัตถุแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในกลีบดอกเบญจมาศสีเหลืองตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Carvalho et al. (2012) โดยการสกัดด้วย acetone และ diethyl ether วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ค่าที่คำนวณได้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/100 กรัม น้ำหนักสด วัดปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินในกลีบดอกกุหลาบสีแดงตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Ranganna (1977) โดยการสกัดด้วย ethanol-HCl เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ค่าที่คำนวณได้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/100 กรัม น้ำหนักสด วัดปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในใบโพธิ์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Arnon (1949) โดยการสกัดด้วย acetone วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 645 นาโนเมตร และ 663 นาโนเมตร ค่าที่คำนวณได้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/100 กรัม น้ำหนักสด แต่ละค่าในแต่ละกรรมวิธีทำการวัด 3 ซ้ำ

วัดค่าสีของตัวอย่างพืชทั้ง 3 ชนิด ด้วยเครื่องวัดสี Colorimeter CR-300 บันทึกผลเป็นค่าสี L^* , a^* และ b^* โดยค่า L^* ที่เข้าใกล้ 100 หมายถึง ตัวอย่างมีความสว่างมากจนเป็นสีขาวหรือสีจาง แต่ถ้าค่า L^* เข้าใกล้ 0 หมายถึง ตัวอย่างมีความสว่างน้อยลงจนเป็นสีดำ ส่วนค่า a^* ที่เป็นบวก แสดงว่าตัวอย่างเป็นสีแดง หากค่า a^* ที่เป็นลบ แสดงว่าตัวอย่างเป็นสีเขียว และค่า b^* ที่เป็นบวกแสดงว่าตัวอย่างเป็นสีเหลือง หากค่า b^* เป็นลบแสดงว่าตัวอย่างเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นนำค่า L^* , a^* และ b^* ที่วัดได้ มาคำนวณให้เป็นค่า hue และ chroma ต่อไป

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

เนื่องจากในการวิจัยครั้งนี้ใช้พืช 3 ชนิดที่มีความแตกต่างกันเพื่อเป็นตัวแทนของรงควัตถุหลัก 3 กลุ่ม ดังนั้นจึงไม่ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างที่เกิดจากชนิดของพืชแต่อย่างใด โดยเปรียบเทียบเฉพาะตัวแปรต้นที่เป็นวัสดุผึ่งแต่ละชนิดเท่านั้น การทดลองนี้จึงวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย Analysis of Variance (One-Way ANOVA) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

ผลการวิจัย

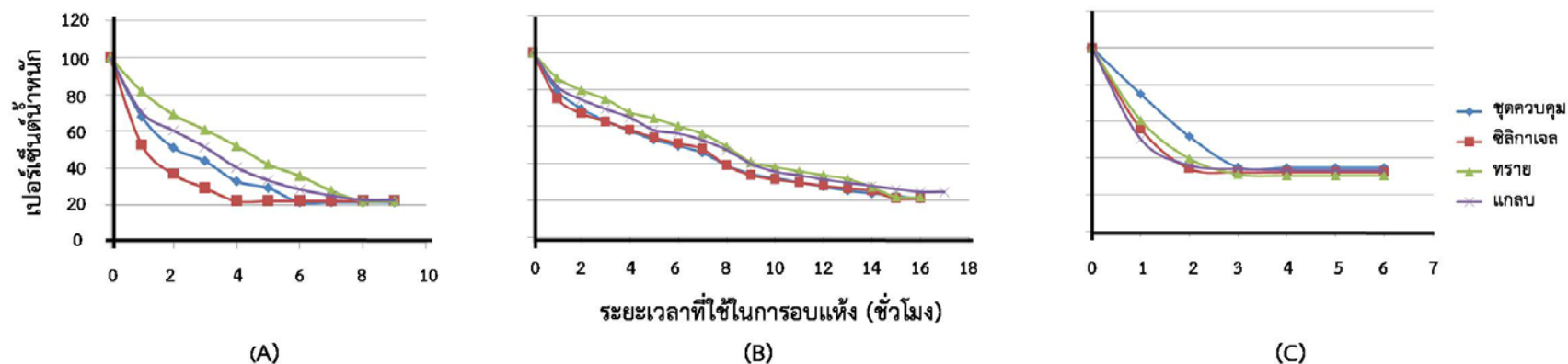
ภายหลังการฝังตัวอย่างพืชในวัสดุชนิดต่าง ๆ แล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พบว่าดอกเบญจมาศที่ฝังในซิลิกาเจลมีการลดลงของน้ำหนักเร็วกว่าการใช้วัสดุชนิดอื่น และครั้งที่ 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเริ่มต้นในช่วงโมเมนต์ที่ 4 รองลงมาคือชุดควบคุม ทราย และกลบ ขณะที่ดอกกุหลาบชุดควบคุม ชุดที่ฝังในซิลิกาเจลและฝังในทราย มีการลดลงของน้ำหนักเร็วกว่าการใช้กลบ และครั้งที่ 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเริ่มต้นในช่วงโมเมนต์ที่ 15 ส่วนในกรณีของใบโพธิ์พบว่าชุดที่ฝังในซิลิกาเจลมีการลดลงของน้ำหนักเร็วกว่าการใช้วัสดุชนิดอื่น และครั้งที่ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเริ่มต้นในช่วงโมเมนต์ที่ 2 รองลงมาคือการฝังในทราย กลบ และชุดควบคุม ผลการวิจัยแสดงดังภาพที่ 1

ภายหลังการฝังดอกเบญจมาศในวัสดุชนิดต่างๆ แล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสจนมีน้ำหนักคงที่พบว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการฝังในวัสดุใด ๆ และชุดที่ฝังในซิลิกาเจลมีปริมาณรงควัตถุแคโรทีนอยด์สูงที่สุดคือ 1.12 และ 0.94 mg/100g ตามลำดับ รองลงมาคือดอกเบญจมาศที่ฝังในทรายและกลบ ขณะที่ปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินในดอกกุหลาบพบว่าชุดควบคุมและชุดที่ฝังในซิลิกาเจลมีปริมาณสูงที่สุดคือ 73.82 และ 73.74 mg/100g ตามลำดับ รองลงมาคือดอกกุหลาบที่ฝังกลบ ดอกสด และฝังในทราย ส่วนใบโพธิ์ในชุดควบคุมและชุดที่ฝังในซิลิกาเจลมีปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์สูงที่สุดคือ 1.02 และ 0.93 mg/100g ตามลำดับ รองลงมาคือใบโพธิ์ที่ฝังในกลบ ทราย และใบสด ผลการวิจัยแสดงดังภาพที่ 2

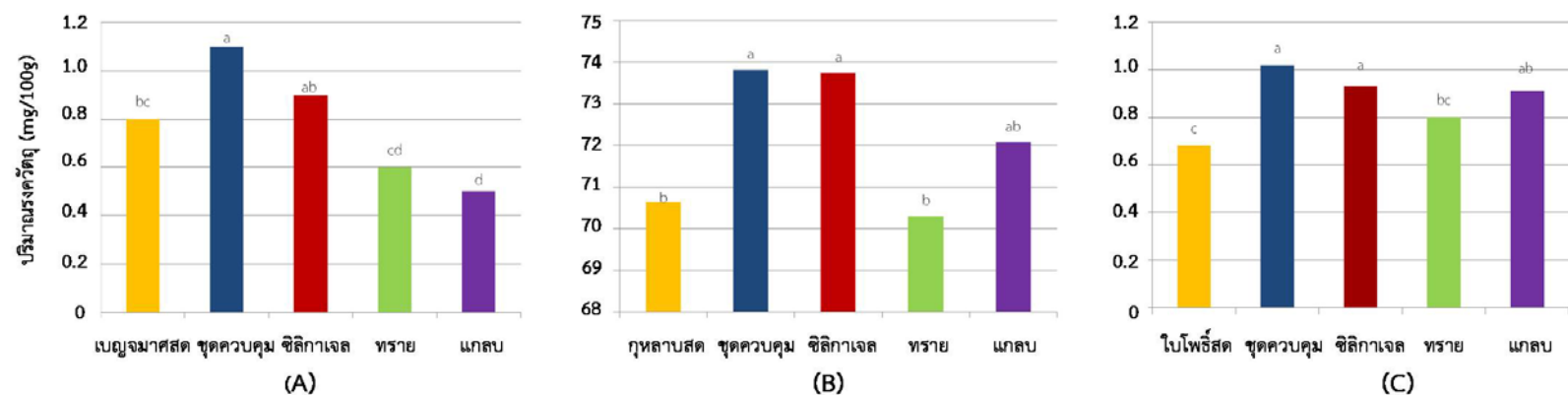
ผลการวิเคราะห์ค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสีแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าดอกเบญจมาศสดมีค่า L^* สูงที่สุดคือ 86.98 รองลงมาคือดอกเบญจมาศที่ฝังในซิลิกาเจล ชุดควบคุม กลบ และทรายมีค่า L^* เท่ากับ 75.10, 64.23, 58.88 และ 55.52 ตามลำดับ ค่า b^* ของดอกเบญจมาศทุกชุดการทดลองมีค่าเป็นบวกแสดงว่าวัตถุมีสีโทนเหลือง โดยดอกเบญจมาศสดมีค่า b^* สูงที่สุดคือ 77.28 รองลงมาคือดอกเบญจมาศที่ฝังในซิลิกาเจล ทราย กลบ และชุดควบคุม มีค่า b^* เท่ากับ 68.20, 55.67, 52.34 และ 50.58 ตามลำดับ ดอกเบญจมาศสดมีค่า hue สูงที่สุดคือ 1.68 แสดงว่าสีของดอกเป็นสีเหลืองสด รองลงมาคือดอกเบญจมาศที่ฝังในซิลิกาเจล ชุดควบคุม ทราย และกลบมีค่า hue เท่ากับ 1.49, 1.42, 1.25 และ 0.58 ตามลำดับ ค่า chroma คือค่าที่บ่งบอกถึงความเข้มของเนื้อสี พบว่าดอกเบญจมาศสดมีค่า chroma สูงที่สุดคือ 78.06 แสดงว่ามีความเข้มของเนื้อสีมาก รองลงมาคือดอกเบญจมาศที่ฝังในซิลิกาเจล ทราย กลบ และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 68.38, 52.93, 52.49 และ 50.71 ตามลำดับ

ดอกกุหลาบสดมีค่า L^* สูงที่สุดคือ 35.77 รองลงมาคือดอกกุหลาบที่ฝังในทราย กลบ ซิลิกาเจล และชุดควบคุมมีค่า L^* เท่ากับ 35.21, 32.42, 31.04 และ 29.64 ตามลำดับ ค่า a^* ของกุหลาบในทุกชุดการทดลองมีค่าเป็นบวกแสดงว่าวัตถุมีสีโทนแดง โดยดอกกุหลาบสดมีค่า a^* สูงที่สุดคือ 41.99 รองลงมาคือดอกกุหลาบที่ฝังในทราย กลบ ซิลิกาเจล และชุดควบคุม มีค่า a^* เท่ากับ 35.10, 34.71, 34.34 และ 33.02 ตามลำดับ ดอกกุหลาบสดมีค่า hue สูงที่สุดคือ 0.18 แสดงว่าสีของดอกเป็นสีแดงสด รองลงมาคือดอกกุหลาบที่ฝังในทราย กลบ ซิลิกาเจล และชุดควบคุม มีค่า hue เท่ากับ 0.14, 0.08, 0.05 และ 0.02 ตามลำดับ ดอกกุหลาบสดมีค่า chroma สูงที่สุดคือ 42.74 รองลงมาคือดอกกุหลาบที่ฝังในทราย กลบ ซิลิกาเจล และชุดควบคุม มีค่าเท่ากับ 32.59, 30.33, 30.22 และ 29.81 ตามลำดับ

ใบโพธิ์สดมีค่า L^* สูงที่สุดคือ 43.18 รองลงมาคือใบโพธิ์ที่ฝังในซิลิกาเจล ทราย กลบ และชุดควบคุมมีค่า L^* เท่ากับ 42.21, 39.29, 35.68 และ 33.77 ตามลำดับ ค่า a^* ในทุกชุดการทดลองมีค่าเป็นลบแสดงว่าวัตถุมีสีออกเขียว พบว่าใบโพธิ์สดมีค่า a^* ต่ำสุดคือ -21.80 รองลงมาคือใบโพธิ์ที่ฝังในซิลิกาเจล ทราย ชุดควบคุม และกลบ โดยมีค่า a^* เท่ากับ -15.75, -13.96, -10.83 และ -9.95 ตามลำดับ ใบโพธิ์สดมีค่า hue สูงที่สุดคือ -0.77 แสดงว่าสีของใบเป็นสีเขียวสด รองลงมาคือใบโพธิ์ที่ฝังในทรายซิลิกาเจล ชุดควบคุม และกลบ มีค่าเท่ากับ -1.01, -1.07, -1.19 และ -1.20 ตามลำดับ ใบโพธิ์สดมีค่า chroma สูงที่สุดคือ 31.58 รองลงมาคือใบโพธิ์ที่ฝังในซิลิกาเจล ชุดควบคุม ทรายและกลบมีค่าเท่ากับ 30.33, 29.14, 26.27 และ 25.73 ตามลำดับ



ภาพที่ 1 ผลของวัสดุฝังที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นของเบญจมาศ (A), กุหลาบ (B) และใบโพธิ์ (C) ภายหลังจากนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาต่าง ๆ



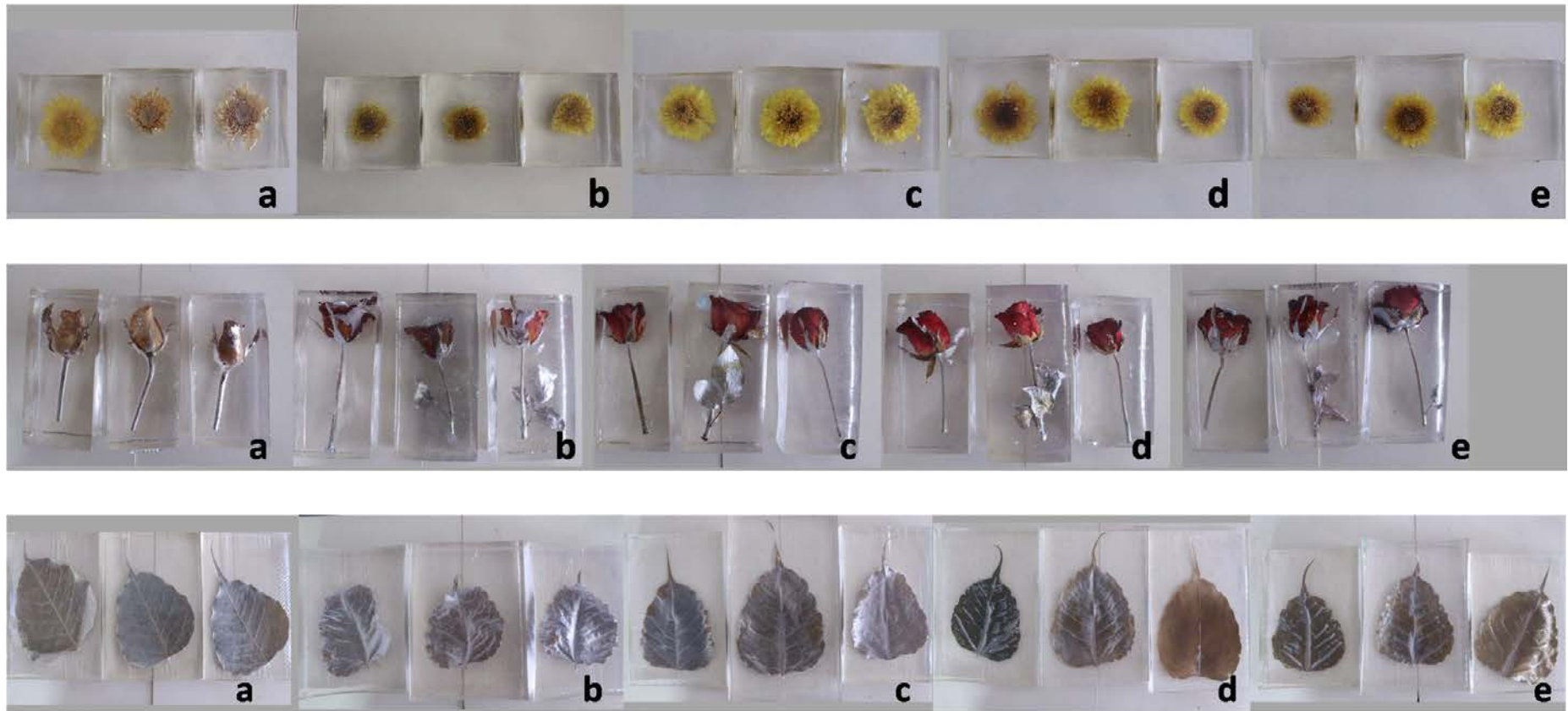
ภาพที่ 2 ผลของวัสดุฝังที่มีต่อปริมาณรังควาญแคโรทีนอยด์ในเบญจมาศ (A), แอนโทไซยานินในกุหลาบ (B) และคลอโรฟิลล์ในใบโพธิ์ (C) ภายหลังจากนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 1 ผลของวัสดุฝังที่มีต่อค่าสีของพืชภายหลังการนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาต่าง ๆ

ชนิดพืช	ชุดการทดลอง	L*	a*	b*	hue	chroma
ดอกเบญจมาศ	ดอกสด	86.98a	11.01a	77.28a	1.68a	78.06a
	ชุดควบคุม	64.23c	10.87c	50.58bc	1.42b	50.71c
	ซิลิกาเจล	75.10b	4.90b	68.20ab	1.49b	68.38b
	ทราย	55.52e	5.11b	55.67ab	1.25c	52.93c
	เกลือ	58.88d	4.05c	52.34c	0.58d	52.49c
%CV		5.63	7.26	4.35	2.36	6.68
ดอกกุหลาบ	ดอกสด	35.77a	41.99a	7.87a	0.18a	42.74a
	ชุดควบคุม	29.64c	33.02b	0.55d	0.02d	29.81c
	ซิลิกาเจล	31.04c	34.34b	1.46cd	0.05cd	30.22bd
	ทราย	35.21a	35.10b	4.26b	0.14b	32.59b
	เกลือ	32.42ab	34.71b	2.37c	0.08c	30.33bc
%CV		8.32	5.22	9.68	5.74	6.32
ใบโพธิ์	ใบสด	43.18a	-21.80e	21.44e	-0.77a	31.58a
	ชุดควบคุม	33.77e	-10.83b	27.01b	-1.19d	29.14b
	ซิลิกาเจล	42.21b	-15.75c	28.62a	-1.07c	30.33a
	ทราย	39.29c	-13.96d	22.24d	-1.01b	26.27c
	เกลือ	35.68d	-9.95a	24.01c	-1.20d	25.73c
%CV		10.21	11.38	9.65	7.29	7.88

หมายเหตุ: อักษรกำกับค่าเฉลี่ยในแนวตั้งของพืชแต่ละชนิดที่ต่างกันแสดงว่าต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

ภายหลังการเก็บรักษาพืชในพอลิเอสเตอร์เรซินเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าพืชสดทั้ง 3 ชนิดที่นำมาหล่อในพอลิเอสเตอร์เรซินมีการยุบตัวและมีฟองอากาศผุดออกมาเป็นจำนวนมาก และมีสีซีดลง ในขณะที่พืชที่ผ่านการทำแห้งด้วยซิลิกาเจลสามารถเก็บรักษาสี ขนาด และรูปร่างเหมือนสภาพก่อนการหล่อขึ้นรูปด้วยพอลิเอสเตอร์เรซิน ขณะที่การใช้ทรายและเกลือก่อนเก็บรักษาในเรซินทำให้พืชหดตัวเล็กน้อยแต่ยังคงรูปร่างเดิมอยู่ ลักษณะของพืชภายหลังการฝังในพอลิเอสเตอร์เรซินแล้วเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 6 เดือน แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ลักษณะของดอกเบญจมาศ ดอกกุหลาบ และใบโพธิ์ ภายหลังการฝังในพอลิเอสเตอร์เรซินแล้วเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 6 เดือน

หมายเหตุ: a คือพืชสดที่ฝังในพอลิเอสเตอร์เรซินทันที, b คือพืชที่ถูกทำให้แห้งโดยไม่มีการฝังในวัสดุใด ๆ, c-d คือพืชที่ถูกทำให้แห้งโดยการฝังในซิลิกาเจล ททราย และ แกลบ ตามลำดับ

อภิปรายผลวิจัยและสรุป

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวัสดุที่ใช้ในการฝัง 3 ชนิดเพื่อนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสได้แก่ ทราย แกลบ และซิลิกาเจล สำหรับพืช 3 ชนิด ได้แก่ ดอกเบญจมาศ ดอกกุหลาบ และใบโพธิ์ ก่อนเก็บรักษาต่อไปในพอลิเอสเตอร์เรซิน จากงานวิจัยพบว่าพืชทั้ง 3 ชนิดที่ฝังในซิลิกาเจลแห้งเร็วกว่าการฝังในวัสดุชนิดอื่น สอดคล้องกับรายงานของ Rani and Reddy (2015) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับวัสดุที่ใช้ในการทำดอกไม้หลายชนิดแห้ง พบว่าวิธีการที่เหมาะสมที่สุดคือการฝังในทราย ซิลิกาเจล และบอแรกซ์ โดยเฉพาะการฝังในซิลิกาเจลซึ่งให้ผลดีที่สุด เช่นเดียวกับรายงานของ Karunanda and Peiris (2007) ซึ่งทดสอบวัสดุฝังหลายชนิดต่อการทำให้ดอก Plumeria แห้ง พบว่าการฝังในซิลิกาเจลช่วยให้ดอกไม้แห้งเร็วที่สุดเนื่องจากโครงสร้างของเม็ดซิลิกาเจลมีลักษณะเป็นโครงข่ายรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมากทำให้เกิดคุณสมบัติการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) และการควบแน่นเป็นของเหลวภายในรูพรุน (capillary condensation) จึงทำให้ซิลิกาเจลดูดซับน้ำและระเหยน้ำออกได้อย่างรวดเร็ว (Sindhuja *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวัดปริมาณรังสีในพืชแต่ละชนิดภายหลังการทำให้แห้งพบว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการฝังพืชในวัสดุชนิดต่างๆ มีปริมาณรังสีที่สูงสุดแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการฝังในซิลิกาเจลแต่อย่างใด ทั้งนี้สันนิษฐานว่าอาจเป็นเพราะการแห้งอย่างรวดเร็วช่วยในการลดการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของรงควัตถุทำให้สามารถรักษารังสีปริมาณรังสีได้เล็กน้อยและเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณรังสีในพืชสดแล้วพบว่าพืชที่อบแห้งมีปริมาณรังสีมากกว่า สันนิษฐานว่าเกิดเนื่องจากการรายงานผลที่แตกต่างกันระหว่างการใช้ค่าน้ำหนักแห้งและน้ำหนักสดซึ่งน้ำหนักสดจะมีปริมาณน้ำอยู่ในเซลล์จำนวนมากทำให้สักรังสีได้ไม่น้อยกว่าการใช้น้ำหนักแห้ง จากผลการวัดค่าสีของพืชพบว่าการฝังดอกเบญจมาศและใบโพธิ์ในซิลิกาเจลสามารถรักษาสีเหลืองและสีเขียวของพืชได้ดีกว่าการฝังในวัสดุชนิดอื่น สอดคล้องกับการรายงานของ Karunanda and Peiris (2007) ซึ่งพบว่าการฝังในซิลิกาเจลช่วยคงสภาพสีของดอก Plumeria ได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามในการทดลองพบว่าดอกกุหลาบที่ฝังในทรายสามารถรักษาค่าความเป็นสีแดงได้ดีกว่าการฝังในวัสดุชนิดอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องจากรังสีของพืชแต่ละชนิดอยู่ในโครงสร้างที่แตกต่างกันโดยรงควัตถุสีเหลืองในดอกเบญจมาศส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ขณะที่รงควัตถุสีเขียวในใบโพธิ์อยู่ในกลุ่มคลอโรฟิลล์ ซึ่งอแกนเซลล์ที่บรรจุรงควัตถุทั้งสองชนิดนี้อยู่ในไซโทพลาซึมของเซลล์ ขณะที่รงควัตถุสีแดงในกลีบดอกกุหลาบเป็นแอนโทไซยานินซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ละลายในแควิโอลของเซลล์พืช ซึ่งความแตกต่างนี้อาจส่งผลให้การรักษาสีของพืชในวัสดุฝังแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน จึงต้องมีการศึกษาในรายละเอียดเพื่อพิสูจน์ข้อสันนิษฐานนี้ต่อไป เมื่อพิจารณาลักษณะของพืชหลังการฝังและทำให้แห้งในวัสดุชนิดต่างๆ พบว่าการฝังในซิลิกาเจลและทรายสามารถรักษารูปร่างของพืชเอาไว้ได้ ขณะที่ Ditta *et al.* (2011) รายงานว่าการทำให้ดอกไม้แห้งโดยใช้ทรายจะช่วยรักษากลิ่นดอกไม้ให้มีลักษณะเรียบ ในขณะที่การใช้ซิลิกาเจลจะทำให้กลีบดอกไม้มีความขรุขระเล็กน้อยเนื่องจากอนุภาคของทรายมีขนาดเล็กกว่าจึงสามารถแทรกเข้าไปในช่องว่างของกลีบดอกไม้ได้ดีกว่า ส่วน Datta (2001) ระบุว่าทรายละเอียดสามารถใช้เป็นวัสดุฝังที่ดีได้ เนื่องจากง่ายต่อการเก็บรักษา มีน้ำหนักกดทับที่ต่ำและไม่ทำปฏิกิริยากับไอน้ำในอากาศ อย่างไรก็ตามทรายที่ใช้ควรมีลักษณะเม็ดละเอียดและควรล้างน้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อล้างเกลือออกโดยเฉพาะทรายที่มาจากทะเล (Jawaharlal *et al.*, 2013) สำหรับการใช้แกลบเป็นวัสดุฝังในงานวิจัยครั้งนี้พบว่ายังมีประสิทธิภาพด้อยกว่าทรายและซิลิกาเจลแต่ก็ช่วยรักษารูปร่างและสีของพืชได้ดีกว่าชุดควบคุม ทั้งนี้เนื่องจากแกลบมีเส้นใยเซลลูโลสและยังมีซิลิกาเป็นส่วนประกอบจำนวนมากซึ่งช่วยในการดูดซับน้ำได้ (Ummah *et al.*, 2015)

เมื่อนำพืชไปเก็บรักษาต่อโดยการหล่อในพอลิเอสเตอร์เรซินเทียบกับการใช้พืชสดเก็บรักษาทันที พบว่าพืชสดที่นำมาหล่อในพอลิเอสเตอร์เรซินมีการยุบตัวอย่างรวดเร็วและมีฟองอากาศผุดออกมาเป็นจำนวนมาก เนื่องจากพืชสดยังมีน้ำอยู่ภายในเซลล์เมื่อได้รับความร้อนจากการแช่ในเรซินทำให้เกิดฟองอากาศออกมา และเมื่อเกิดการสูญเสียในเซลล์ทำให้พืชมีการหดตัวและสีซีดลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่พืชที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยซิลิกาเจลสามารถเก็บรักษาสี ขนาด และรูปร่างเหมือนสภาพก่อนการหล่อขึ้นรูปด้วยพอลิเอสเตอร์เรซินได้ แสดงว่าพืชแห้งสนิทและไม่เปราะ ขณะที่การฝังในทรายและแกลบก่อนเก็บรักษาในเรซินทำให้พืชเปราะและหดตัวเล็กน้อยแต่ยังคงรูปร่างเดิมอยู่ สอดคล้องกับรายงานของ Reyes-Aguero *et al.* (2007) ที่ทดลองเก็บรักษาตัวอย่างผลของกระบองเพชรตระกูล *Opuntia* โดยการฝังในทรายแล้วนำไปอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส แล้วเทเอาทรายออกและหล่อขึ้นรูปส่วนที่เป็นช่องว่างทั้งหมดด้วยเรซินซึ่งสามารถเก็บรักษาผลของกระบองเพชรได้เป็นระยะเวลานานโดยสามารถคงรูปร่างของพืชเอาไว้ได้เช่นกัน

จากการเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของการใช้วัสดุแต่ละชนิดในการทำพืชแห้งพบว่าวัสดุแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การนำไปใช้และงบประมาณที่มีอยู่ โดยซิลิกาเจลมีข้อดีคือสามารถทำให้พืชแห้งโดยใช้เวลาน้อยกว่าการใช้วัสดุอื่น พืชที่ได้ยังคงสีสดและรูปร่างสามมิติเอาไว้ได้และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงภายหลังการเก็บรักษาในพอลิ

เอสเทอร์เรซิน นอกจากนี้ซิลิกาเจลเมื่อดูดความชื้นแล้วยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้โดยนำไปอบแห้ง แต่ข้อเสียคือมีราคาแพงกว่าวัสดุอีก 2 ชนิดและไม่สามารถหาได้จากธรรมชาติ สำหรับทรายมีข้อดีคือช่วยคงรูปร่างสามมิติของพืชภายหลังการทำให้แห้งได้ดี ราคาไม่แพงและหาได้ง่ายในท้องถิ่น แต่มีข้อเสียคือใช้เวลานานในการทำให้แห้งและพืชบางชนิดมีลักษณะเปราะขณะที่การใช้แอลกอฮอล์ช่วยรักษารูปทรงของพืชหลังการทำให้แห้งได้และเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร แต่มีข้อเสียคือใช้เวลานานในการทำให้แห้งและพืชมีการหดตัวเล็กน้อยหลังการเก็บรักษาในพอลิเอสเทอร์เรซิน

จากงานวิจัย สามารถสรุปได้ดังนี้

1. การศึกษาระยะเวลาในการทำให้แห้งและการรักษารูปร่าง รวมทั้งสีของพืชโดยการฝังในวัสดุชนิดต่างๆ พบว่าซิลิกาเจลมีความเหมาะสมที่ใช้ในการทำให้พืชแห้ง

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างพืชหลังการทำให้แห้งแล้วฝังในพอลิเอสเทอร์เรซินเป็นระยะเวลา 6 เดือนพบว่าใบโพธิ์ที่ผ่านการทำให้แห้งโดยการฝังในทรายมีการคงรูปร่างได้ดีที่สุด ขณะที่ดอกกุหลาบและดอกเบญจมาศที่ผ่านการทำให้แห้งโดยการฝังในซิลิกาเจลมีการคงรูปร่างและสีได้ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- พชร จำปาเงิน โสภภาพรรณ แสงศัพท์ และ สิงห์ อินทรชูโต. (2550) การเก็บรักษาพืชสีเขียวในวัสดุสังเคราะห์ : กรณีศึกษาโพลีเมอร์เรซิน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 วันที่ 30 มกราคม 2550-2 กุมภาพันธ์ 2550. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 226-234.
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24, 1-15.
- Carvalho, L.M.J., Gomes, P.B., Godoy, R.L.O., Pacheco, S., Monte, P.H.F., Carvalho, J.L.V., Nutti, M.R., Neves, A.C.L., Vieira, A.C.R.A., Ramos, S.R.R. (2012). Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International* 47, 337-340.
- Datta, S.K. (2001). Dehydration of flowers and foliage in floral crafts. *Floriculture Today* 5, 11-12.
- Dilta, B.S., Sharma, B.P., Baweja, H.S., Kashy, B. (2011). Flower drying techniques- A review. *International Journal of Farm Science* 1(2), 1-16.
- Jawaharlal, M., Visalakshi, M., Cintu, S., Ganga, M. (2013). Standardization for drying, bleaching and dyeing processes in dried flowers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 8(1), 65-69.
- Karunananda, D.P., Peiris, S.E. (2007). Preservation of *Plumeria rubra* L. for dry flower arrangements. *Tropical Agricultural Research* 19, 160-169.
- Rani P.R., Reddy M.V. (2015). Dehydration techniques for flower. *International Journal of Applied Research* 1(10), 306-311.
- Ranganna, S. (1977). Plant pigments. In S. Ranganna (Ed.): *Manual of Analysis of Fruit and Vegetable Products*. Tata Mc Graw-Hill Publishing Co. Ltd. New Delhi. Pp. 72-93.
- Reyes-Aguero, J.A., Carlin-Castelan, F.C., Aguirrer, J.R. and Hernandez, H.M. (2007). Preparation of *Opuntia* herbarium specimens. *Haseltonia* 13, 76-82.
- Sindhuja, S., Padmalatha, T., Padmavathamma, S. (2015). Effect of embedding media on production of quality dry flowers in carnation. *Plant Archives* 15(1), 27-33.
- Ummah, H., Suriyamihardja, D.A., Selintung, M., Wahab, A.W. (2015). Analysis of chemical composition of rice husk used as absorber plate sea water into clean water. *ARPN Journal of Engineering and Applied Science* 10(14), 6046-6047.
- Victor, J.E., Koekemoer, M., Fish, L., Smithies, S.J. and Mössmer, M. (2004). *Herbarium essentials: the Southern African herbarium user manual*. Southern African Botanical Diversity Network Report No. 25. SABONET, Pretoria.

ผลของการต้มและการนึ่งต่อศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของผักโขม

นัทชา ยาทา^{1,a} และ ชนิกาญจน์ จันทรมาทอง^{*1,b}

¹หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก

Email: ^anatcha.ya@psru.ac.th, ^bchanikanjunmatong@psru.ac.th

บทคัดย่อ

ผักโขมเป็นผักที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์โดยเฉพาะสารต้านอนุมูลอิสระ การรับประทานต้องปรุงสุกก่อน ไม่นิยมรับประทานสดเนื่องจากมีกลิ่นเหม็นเขียว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการให้ความร้อนโดยการต้มและนึ่งต่อศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของผักโขมสองสายพันธุ์ ได้แก่ ผักโขมเขียวและผักโขมแดง ทำการทดลองโดยให้ความร้อนแก่ผักโขมโดยวิธีการต้มนาน 1, 2 และ 3 นาที และวิธีการนึ่งนาน 4, 6 และ 8 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านความร้อน จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity และ วิธี ABTS radical scavenging activity และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ผลการทดลองพบว่า การต้มมีผลลดศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระของผักโขมทั้งสองสายพันธุ์ตามระยะเวลาการต้มที่นานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การนึ่งมีผลเพิ่มศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระของผักโขมทั้งสองสายพันธุ์ โดยการนึ่งนาน 4 นาที สามารถเพิ่มศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด นอกจากนี้การต้มและการนึ่งยังสามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผักโขมได้ โดยผักโขมเขียวและแดงที่ผ่านการนึ่งนาน 8 และ 4 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด ตามลำดับ

คำสำคัญ : สารต้านอนุมูลอิสระ การต้ม การนึ่ง

Effect of boiling and steaming on antioxidant capacity and phenolic content of amaranth

Natcha Yata^{1,a} and Chanikan Junmatong^{*,1,b}

¹Biology program, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand

Email; ^anatcha.ya@psru.ac.th, ^bchanikanjunmatong@psru.ac.th

Abstract

Amaranth is ranked as one of nutritional vegetables especially high in antioxidant. It must be cooked before consumption as its raw state contains strong odors. Therefore, aim of this study was to determine the effect of heat treatment by boiling and steaming on antioxidant capacity and phenolic content of two amaranth namely green and red. The samples of amaranth were heated by boiling for 1, 2 and 3 min and steaming for 4, 6 and 8 min and compared with the non-heated control. The heated amaranth were randomly selected for the assessment of total antioxidant capacity by DPPH radical scavenging activity method and ABTS radical scavenging activity method as well as total phenolic content. The results show that boiling method significantly reduced total antioxidant capacity of amaranth depending on the boiling cooking periods. While steaming method increased total antioxidant capacity of amaranth. Green and red amaranth steamed for 4 min had the highest antioxidant capacities. Moreover, boiling and steaming method can enhance the total phenolic content of amaranth. The green and red amaranth showed the highest phenolic content when steamed for 8 and 4 min respectively.

Keywords: antioxidant; boiling; steaming

บทนำ

ผักโขม (*Amaranthus* sp.) จัดอยู่ในวงศ์ Amaranthaceae (เต็ม สมิตินันท์, 2549) เป็นผักที่อุดมไปด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและวิตามิน เช่น วิตามินเอ วิตามินบี2 วิตามินบี6 วิตามินบี9 และวิตามินเค รวมทั้งมีแร่ธาตุสำคัญต่อร่างกายอีกหลายชนิด เช่น แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม โพแทสเซียม ทองแดง แมงกานีส และสังกะสี เป็นต้น นอกจากนี้ ผักโขมยังอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ซึ่งมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและยังสามารถป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระไปทำลายโครงสร้างเซลล์และการทำงานของเซลล์ได้อีกด้วย จึงมีส่วนช่วยชะลอการเสื่อมสภาพของเซลล์ ปกป้องร่างกายไม่ให้แก่เร็ว ช่วยป้องกันโรคเสื่อมต่างๆ เช่น โรคข้อ โรคหัวใจ โรคอัมพาต และโรคมะเร็ง เป็นต้น (มนพล สงวนเสริมศรี, รัฐพร จันทรเดช, พิระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์, วารุต อยู่คง, และภพแก้ว พุทธรักษ์, 2556) อย่างไรก็ตาม ผักโขมเป็นผักที่มีปริมาณสารออกซาเลตค่อนข้างสูง ดังนั้นผู้ที่ที่มีปัญหาเรื่องนี้ เกาต์ ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ รวมถึงผู้ที่ต้องการสะสมปริมาณแคลเซียมควรจะต้องหลีกเลี่ยงการบริโภคในปริมาณมาก สำหรับการรับประทานผักโขมนิยมปรุงให้สุกก่อนเนื่องจากผักโขมสดมีกลิ่นเหม็นเขียว (สุชาติพ ภมรประวัติ, 2550) จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การให้ความร้อนด้วยกรรมวิธีต่างๆ เช่น การต้ม นึ่ง และไมโครเวฟ สามารถเพิ่มศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดได้ เช่น ฟริก ถั่วแขก บรอกโคลี มะเขือ และคะน้าเม็กซิโก เป็นต้น (Turkmen, Sari, and Velioglu, 2005; ชนิกาญจน์ จันทรมาทอง, 2552; กิตติมา เป็งแห และชนิกาญจน์ จันทรมาทอง, 2562) อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของการใช้ความร้อนต่อศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในผักโขมที่ผ่านมายังมีน้อย ซึ่งผักโขมเป็นผักพื้นบ้านที่นิยมปลูก หาได้ง่าย มีราคาถูก และมีคุณค่าทางอาหารสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการต้มและการนึ่งต่อศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของผักโขมสองสายพันธุ์ ได้แก่ ผักโขมเขียว และผักโขมแดง ซึ่งสามารถนำข้อมูลมาประยุกต์ใช้สำหรับการประกอบอาหารเพื่อบริโภคผักโขมเพื่อให้ได้คุณค่าทางโภชนาการสูงสุดต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาผลของการให้ความร้อนโดยการต้มและนึ่งต่อศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระของผักโขม
2. ศึกษาผลของการให้ความร้อนโดยการต้มและนึ่งต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของผักโขม

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยนำผักโขมเขียวและผักโขมแดงที่ปลูกในจังหวัดพิษณุโลก ซึ่งเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 20-25 วัน มาล้างทำความสะอาด และคัดแยกเอาเฉพาะส่วนใบที่รับประทานได้ จากนั้นแบ่งผักโขมแต่ละพันธุ์ออกเป็น 7 กลุ่ม เพื่อนำไปผ่านกระบวนการให้ความร้อนโดยการต้มและนึ่งที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส โดยกลุ่มที่ 1-3 นำไปต้มนาน 1, 2 และ 3 นาที ตามลำดับ กลุ่มที่ 4-6 นำไปนึ่งนาน 4, 6 และ 8 นาที ตามลำดับ โดยอัตราส่วนในการต้มและนึ่งคือ 100 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ส่วนกลุ่มที่ 7 เป็นชุดควบคุมที่ไม่ได้รับความร้อน ทั้งนี้ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ผักโขมเขียว

ผักโขมแดง

รูปที่ 1 ผักโขมที่ใช้ในการทดลอง

2. การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ

นำผักโขมที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนตามข้อ 1 มาวางให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงและซับน้ำให้แห้ง แล้วมาหั่นเป็นชิ้นให้ละเอียด ซึ่งตัวอย่างผักโขมหนัก 1 กรัม นำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล 80% (v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบดด้วยเครื่อง Homogenizer เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำเฉพาะส่วนของเหลวใสซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ไปใช้วิเคราะห์ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกต่อไป

3. การวิเคราะห์ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging activity

ทำการวิเคราะห์ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging activity ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Huang, Ou, and Prior (2005) โดยเตรียมสารละลาย 7 mM ABTS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 2.45 mM potassium persulphate ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มืดและอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจางด้วยสารละลายเอทานอล 80% (v/v) ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.7 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ก่อนนำไปใช้ ซึ่งเรียกว่า ABTS solution จากนั้นนำ ABTS solution ที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับ crude extract ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้ววางทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer คำนวณศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid (GA) ซึ่งศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระมีหน่วยเป็น $\mu\text{g GA/g FW}$

4. การวิเคราะห์ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity

ทำการวิเคราะห์ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Mun'im, Negishi, and Ozawa (2003) โดยเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 0.12 mM DPPH ซึ่งละลายใน 95% ethanol ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และ crude extract ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer คำนวณศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน GA ซึ่งศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระมีหน่วยเป็น $\mu\text{g GA/g FW}$

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Singleton and Rossi (1965) โดยเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย Folin-Ciocalteu reagent 10% (v/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ crude extract ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5% (w/v) ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร แล้ววางทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับสารมาตรฐาน GA ซึ่งมีหน่วยเป็น $\mu\text{g GA/g FW}$

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของแต่ละการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (statistical packages for the social science) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's new multiple range tests ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity

จากการวิเคราะห์ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity พบว่าผักโขมเขียวสด ($821 \mu\text{g GA/g FW}$) มีศักยภาพรวมสูงกว่าผักโขมแดงสด ($297 \mu\text{g GA/g FW}$) ซึ่งคิดเป็น 2.76 เท่า ในผักโขมเขียวพบว่า การต้มมีผลทำให้ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระลดลงตามระยะเวลาต้มที่นานขึ้น โดยชุดที่ผ่านการต้มนาน 3 นาที มีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดเท่ากับ $711 \mu\text{g GA/g FW}$ ซึ่งต่ำกว่าผักโขมสดคิดเป็น 13.40% ในขณะที่การนึ่งมีผลทำให้ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น โดยชุดที่ผ่านการนึ่งนาน 4 นาที มีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ $893 \mu\text{g GA/g FW}$ ซึ่งสูงกว่าผักโขมสดคิดเป็น 8.77% (ภาพที่ 1a) ส่วนผักโขมแดงพบว่า การต้มมีผลทำให้ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระลดลงตามระยะเวลาต้มที่นานขึ้นเช่นกัน โดยชุดที่ผ่านการต้มนาน 3 นาที มีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดเท่ากับ $167 \mu\text{g GA/g FW}$ ซึ่งต่ำกว่าผักโขมสดคิดเป็น 43.77 % ในขณะที่การนึ่งมีผลทำให้

ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น โดยชุดที่ผ่านการนึ่งนาน 4 นาที มีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เท่ากับ 505 $\mu\text{g GA/g FW}$ ซึ่งสูงกว่าผักโขมสดคิดเป็น 70.03% (ภาพที่ 1b)

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

จากการวิเคราะห์ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity พบว่าผักโขมแดงสด (233 $\mu\text{g GA/g FW}$) มีศักยภาพรวมสูงกว่าผักโขมเขียวสด (167 $\mu\text{g GA/g FW}$) ซึ่งคิดเป็น 1.40 เท่า ในผักโขมเขียว พบว่า ชุดที่ผ่านการต้ม นาน 1, 2 และ 3 นาที มีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 174, 151 และ 154 $\mu\text{g GA/g FW}$ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุมทางสถิติ ในขณะที่การนึ่งมีผลทำให้ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น โดยชุดที่ผ่านการนึ่งนาน 4, 6 และ 8 นาที มีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 232, 204 และ 205 $\mu\text{g GA/g FW}$ ซึ่งสูงกว่าผักโขมสดคิดเป็น 38.92, 22.16 และ 22.75% ตามลำดับ (ภาพที่ 2a) ส่วนผักโขมแดงพบว่า การต้มมีผลทำให้ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระลดลงตามระยะเวลาต้มที่นานขึ้น โดยชุดที่ผ่านการต้ม นาน 3 นาที มีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดเท่ากับ 79 $\mu\text{g GA/g FW}$ ซึ่งต่ำกว่าผักโขมสดคิดเป็น 66.09% ในขณะที่ชุดที่ผ่านการนึ่งนาน 4, 6 และ 8 นาที มีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 247, 227 และ 231 $\mu\text{g GA/g FW}$ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุมทางสถิติ (ภาพที่ 2b)

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าผักโขมเขียวสด (976 $\mu\text{g GA/g FW}$) มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าผักโขมแดงสด (905 $\mu\text{g GA/g FW}$) ซึ่งคิดเป็น 1.08 เท่า ในผักโขมเขียว พบว่าการต้ม นาน 1 และ 3 นาที มีผลเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยมีค่าเท่ากับ 1071 และ 1024 $\mu\text{g GA/g FW}$ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าผักโขมสดคิดเป็น 9.73 และ 4.92% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดที่ผ่านการต้ม นาน 2 นาที มีปริมาณลดลง โดยมีค่าเท่ากับ 913 $\mu\text{g GA/g FW}$ ซึ่งต่ำกว่าผักโขมสดคิดเป็น 6.45% ในขณะที่การนึ่งมีผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น โดยชุดที่ผ่านการนึ่งนาน 8 นาที มีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 1282 $\mu\text{g GA/g FW}$ ซึ่งสูงกว่าผักโขมสดคิดเป็น 31.35% รองลงมาเป็นชุดที่ผ่านการนึ่งนาน 4 และ 6 นาที โดยมีปริมาณเท่ากับ 1139 และ 1074 $\mu\text{g GA/g FW}$ ซึ่งสูงกว่าผักโขมสดคิดเป็น 16.70 และ 10.04% ตามลำดับ (ภาพที่ 3a) ส่วนผักโขมแดงพบว่า ชุดที่ผ่านการต้ม นาน 1, 2 และ 3 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 918, 835 และ 849 $\mu\text{g GA/g FW}$ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุมทางสถิติ ในขณะที่การนึ่งมีผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น โดยชุดที่ผ่านการนึ่งนาน 4, 6 และ 8 นาที มีปริมาณเท่ากับ 1301, 1283 และ 1361 $\mu\text{g GA/g FW}$ ซึ่งสูงกว่าผักโขมสดคิดเป็น 43.76, 41.77 และ 50.39% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ผลที่ผ่านการนึ่ง นาน 4-8 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 3b)

อภิปรายผล

ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระของผักโขมจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ โดยการทดลองนี้พบว่าผักโขมเขียวมีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging activity สูงกว่าผักโขมแดง ในขณะที่วิธี DPPH radical scavenging activity กลับให้ผลที่ตรงกันข้ามกัน ทั้งนี้ความแตกต่างของผลการทดลองที่วิเคราะห์ได้จากสองวิธีนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในผักโขมทั้งสองสายพันธุ์ โดยอนุมูล ABTS สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและสารละลายอินทรีย์ จึงสามารถใช้วิเคราะห์หาศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสารที่ละลายน้ำหรือสารที่ละลายในลิปิด ในขณะที่วิธี DPPH มักนิยมใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์เนื่องจากการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นเดียวกัน (โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยรัตน์, และมาลีรักษ์ อัดตสินทอง, 2549) นอกจากนี้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้จากวิธี ABTS ให้ค่ามากกว่าวิธี DPPH ซึ่งอาจเกิดจากอิเล็กทรอนิกส์ของอนุมูล DPPH จะถูกบดบังด้วยวงแหวนเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตรในสูตรโครงสร้างทางเคมีของอนุมูล DPPH ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางชนิดไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ หรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง (โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยรัตน์, และมาลีรักษ์ อัดตสินทอง, 2549) นอกจากนี้ การทดลองนี้พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผักโขมเขียวมีสูงกว่าในผักโขมแดง ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารฟีนอลิกที่สูงกว่านี้เป็นชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย

ซึ่งสอดคล้องกับศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ได้จากวิธี ABTS จะเห็นได้ว่าศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของผักโขมมีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์เช่นเดียวกับผลการทดลองในใบโหระพาและผลมะเขือ (Javanmardi, Stushnoff, Locke, and Vivanco, 2003; ชนิภาญจน์ จันทรมาทอง, จำนงค์ อุทัยบุตร, และ กอบเกียรติ แสงนิล, 2551)

การให้ความร้อนโดยการนึ่งมีผลเพิ่มศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระของผักโขม ซึ่งให้ผลแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่นึ่ง โดยในผักโขมเขียวและผักโขมแดงที่ได้ผ่านการนึ่งนาน 4 นาที จะมีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นสูงสุด ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระภายหลังการนึ่งนั้นอาจเกิดจากมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเรื่องปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยการนึ่งนาน 4-8 นาที มีผลเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดทั้งในผักโขมเขียวและผักโขมแดง จากที่การนึ่งมีผลเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผักโขมนั้น สันนิษฐานว่าความร้อนที่เกิดในกระบวนการนึ่งส่งผลทำให้สารประกอบฟีนอลิกที่แทรกและสะสมอยู่ในผนังเซลล์หลุดออกมาเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ลอยเป็นอิสระในไซโทซอลเพิ่มมากขึ้น และยังเป็นสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ กิตติมา เป้งแห และชนิภาญจน์ จันทรมาทอง (2562) ที่พบว่าใบคะน้าเม็กซิโกที่ผ่านการนึ่งนาน 3-18 นาที มีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Dewanto, Wu, and Liu (2002) ที่พบว่าข้าวโพดหวานที่ผ่านการนึ่งนาน 25 นาที มีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ละลายอยู่ในไซโทซอลเพิ่มขึ้นด้วย เช่นเดียวกับ Choi, Lee, Chun, Lee, and Lee (2006) ที่พบว่าเห็ดชิตาเกะที่ผ่านการนึ่งนาน 30 นาที มีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับมีปริมาณกรดวานิลิก ไชรินจิก เพอรูริก และ พาราควมาริก ซึ่งจัดเป็นสารประกอบฟีนอลิกอย่างง่ายเพิ่มขึ้น

การให้ความร้อนโดยวิธีการต้มกลับมีผลลดศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระของผักโขม โดยการต้มผักโขมเป็นเวลานานยิ่งทำให้ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระลดต่ำลง โดยชุดที่ต้มนาน 3 นาที จะมีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะการต้มทำให้เซลล์สัมผัสกับน้ำร้อนโดยตรง ทำให้สารประกอบฟีนอลิกหลุดออกจากเซลล์มาละลายอยู่ในน้ำต้มได้ง่าย ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในเนื้อเยื่อลดลง สอดคล้องกับผลการทดลองในผัก 20 ชนิด ที่พบว่าการต้มเป็นวิธีที่ทำให้มีการสูญเสียสารประกอบฟีนอลิกและศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (Jimenez-Monreal, Garcia-Diz, Martinez-Tome, Mariscal, and Murcia, 2009) ในทางตรงกันข้าม การนึ่งเซลล์ไม่ได้สัมผัสกับน้ำโดยตรง แต่ความร้อนที่เซลล์ได้รับจะช่วยส่งเสริมทำให้สารประกอบฟีนอลิกที่เกาะอยู่บริเวณผนังเซลล์หลุดออกเป็นอิสระและละลายอยู่ในไซโทซอล และยังทำให้ผนังเซลล์มีความอ่อนนุ่มมากขึ้น จึงทำให้สามารถสกัดสารต่างๆ ในเซลล์ออกมาได้มากขึ้น (Palermo, Pellegrini, and Fogliano, 2014) อย่างไรก็ตาม ในการทดลองครั้งนี้พบว่าผักโขมเขียวและผักโขมแดงที่ผ่านการต้มไม่ได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลงเหมือนรายงานการศึกษาที่ผ่านมา ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาหาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์กับศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระของผักโขมที่เปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับความร้อนเพิ่มเติมต่อไป ดังเช่นการทดลองในผลฟักทองที่ผ่านการต้มนาน 2-6 นาที พบว่ามีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นสอดคล้องกับมีปริมาณเบต้าแคโรทีนและไลโคปีนเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดต่ำลง (Azizah, Wee, Azizah, and Azizah, 2009) เช่นเดียวกับการทดลองใน *Cassia auriculata* L. ซึ่งเป็นผักใบเขียวที่ผ่านการต้มและนึ่งนาน 5 นาที พบว่ามีศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นสอดคล้องกับมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์ลดต่ำลง (Gunathilake, Ranaweera, and Rupasinghe, 2018)

สรุปผลการวิจัย

1. การนึ่งมีผลเพิ่มศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระของผักโขมทั้งสองสายพันธุ์ โดยการนึ่งนาน 4 นาที สามารถเพิ่มศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด ส่วนการต้มมีผลลดศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระของผักโขมทั้งสองสายพันธุ์ตามระยะเวลาการต้มที่นานขึ้น
2. การนึ่งมีผลเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผักโขมทั้งสองสายพันธุ์ โดยผักโขมเขียวและผักโขมแดงที่ผ่านการนึ่งนาน 8 และ 4 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

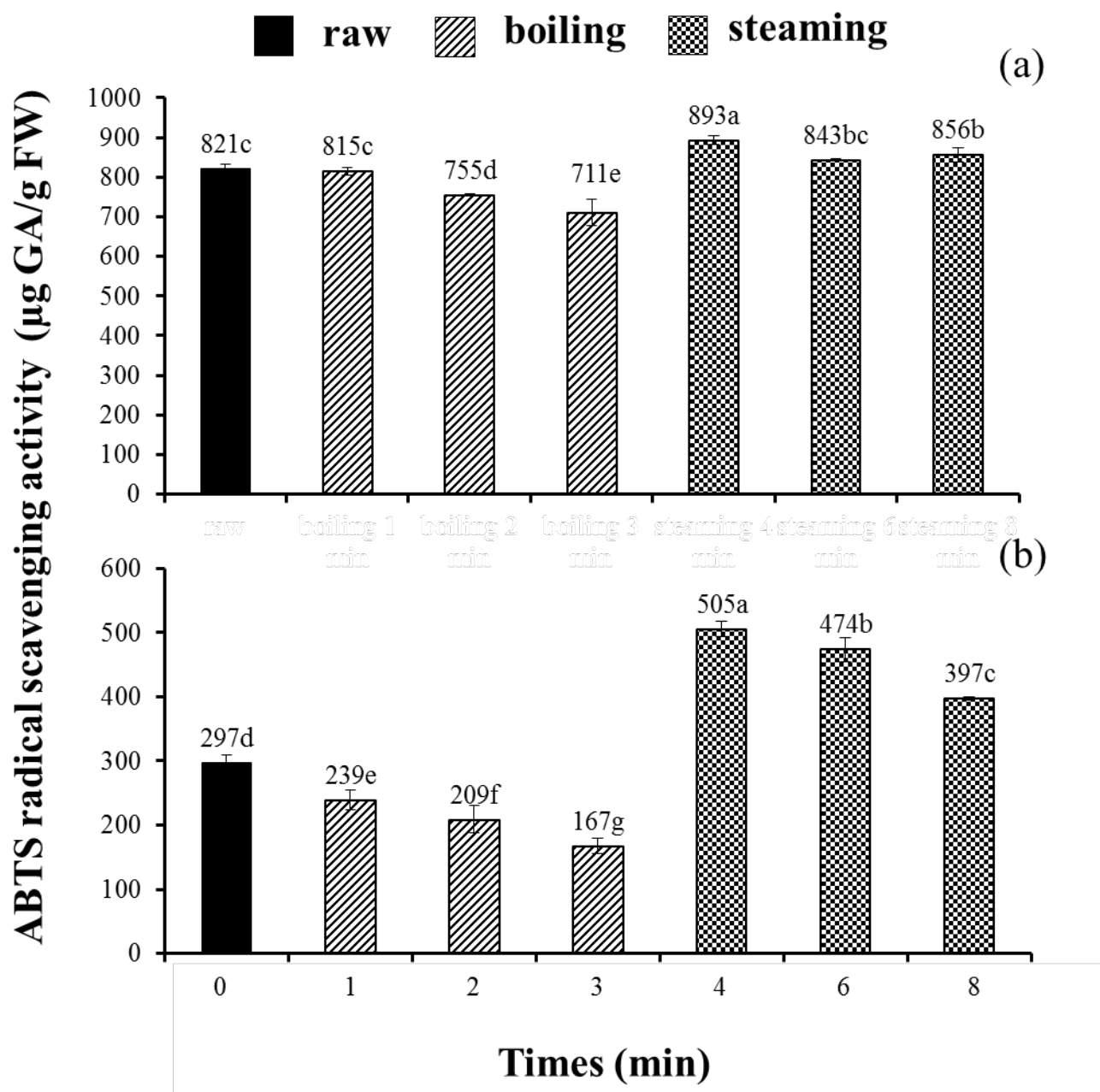
ขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และกองทุนการพัฒนางานวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม สำหรับทุนสนับสนุนการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

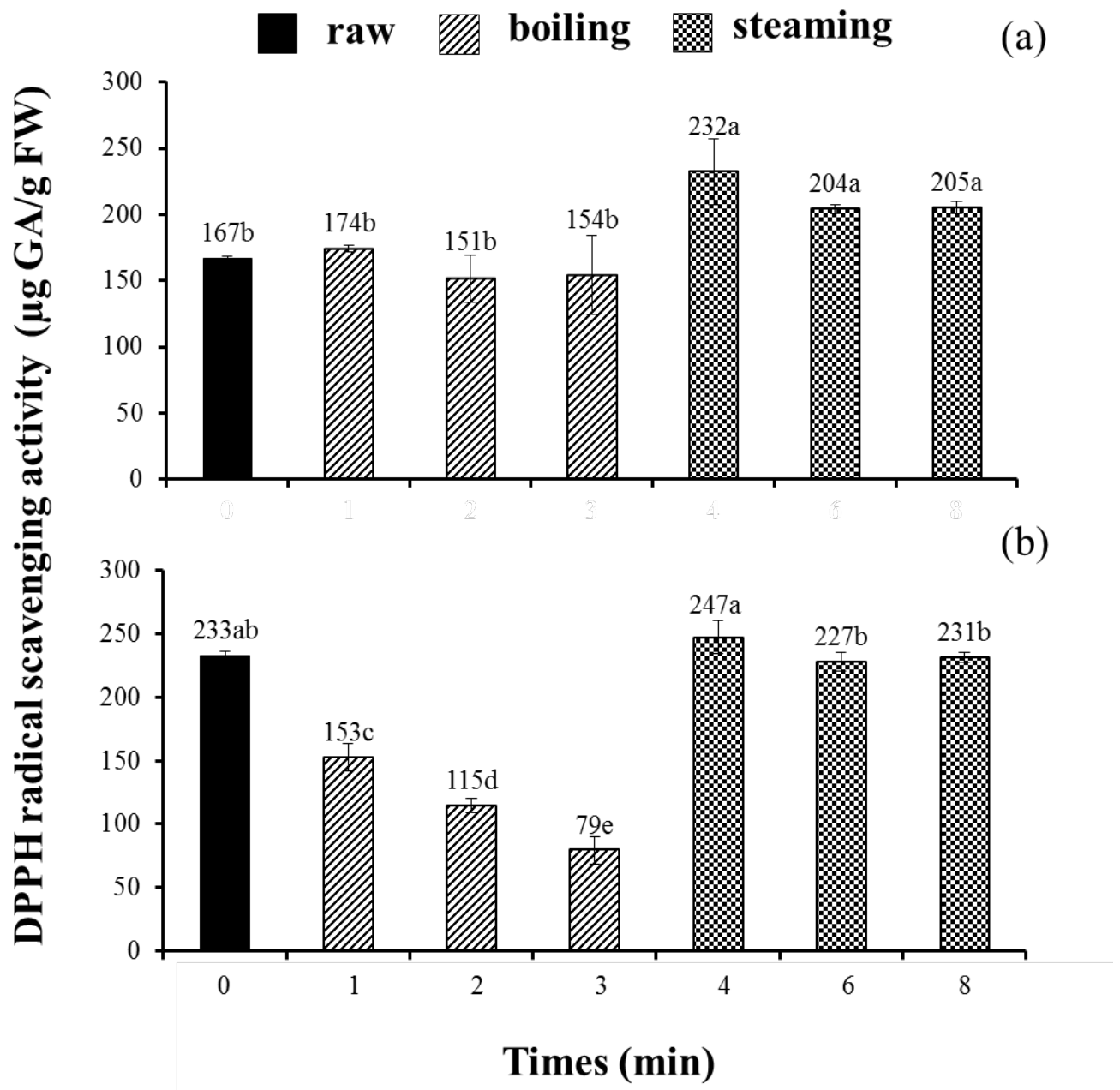
- กิตติมา เป็งแท และชนิกายุจน์ จันทร์มาทอง. (2562). ผลของการให้ความร้อนต่อศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในคื่นห้าน้ำเม็กซีโก (*Cnidoscolus aconitifolius*). รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 5 ประจำปี พ.ศ. 2562 (Proceedings) “ศาสตร์พระราชาสู่การวิจัยและนวัตกรรม” วันที่ 15 มีนาคม 2562 กลุ่มด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 326-333.
- ชนิกายุจน์ จันทร์มาทอง. (2552). กิจกรรมต้านออกซิเดชันและปริมาณสารต้านออกซิเดชันบางชนิดในผลมะเขือ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ชนิกายุจน์ จันทร์มาทอง, จำนงค์ อุทัยบุตร และกอบเกียรติ แสงนิล. (2551). กิจกรรมต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเปลือกและเนื้อของผลมะเขือ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 39: 384-387.
- เต็ม สมิตินันท์. (2549). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช.
- มณฑล สงวนเสริมศรี, รัฐพร จันทรเดช, พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์, วารุต อยู่คง และภพเก้า พุทธรักษ์. (2556). ผลรวมของ α -naphthaleneacetic acid กับ N⁶-benzyladenine ต่อการเพิ่มจำนวนยอดของผักโขม. วารสารนเรศวรพะเยา: วิทยาศาสตร์สุขภาพ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, ฉบับที่ 6 (3), 202-206.
- สุธาทิพ ภารประวัติ. (2550). ผักขม. นิตยสารหมอชาวบ้าน, 333. สืบค้น 19 ตุลาคม 2562, จาก <https://www.doctor.or.th/article/detail/4092>
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. (2549). สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ: พี. เอส.พรินท์.
- Azizah, A.H., Wee, K.C., Azizah, O. and Azizah, M. (2009). Effect of boiling and stir frying on total phenolics, carotenoids and radical scavenging activity of pumpkin (*Cucurbita moschato*). International Food Research Journal, 16: 45-51.
- Choi, Y., Lee, S.M., Chun, J., Lee, H.B. and Lee, J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. Food Chemistry, 99: 381-387.
- Dewanto, V., Wu, X. and Liu, R.H. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 4959-4964.
- Gunathilake, K.D.P.P., Ranaweera, K.K.D.S. and Rupasinghe, H.P.V. (2018). Effect of different cooking methods on polyphenols, carotenoids and antioxidant activities of selected edible leaves. Antioxidants (Basel, Switzerland), 7(9): 117. doi:10.3390/antiox7090117
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. (2005). The Chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 1841-1856.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. and Vivanco, J.M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. Food Chemistry, 83: 547-550.
- Jimenez-Monreal, A.M., Garcia-Diz, L., Martinez-Tome, M., Mariscal, M. and Murcia, M.A. (2009). Influence of cooking methods on antioxidant activity of vegetables. Journal of Food Science, 74: 97-103
- Mun'im, A., Negishi, O. and Ozawa, T. (2003). Antioxidant compounds from *Crotalaria sessiliflora*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 67: 410-414.
- Palermo, M., Pellegrini, N., and Fogliano, V. (2014). The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture, 94: 1057-1070.

Singleton, V. L. and Rossi, J. R. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-157.

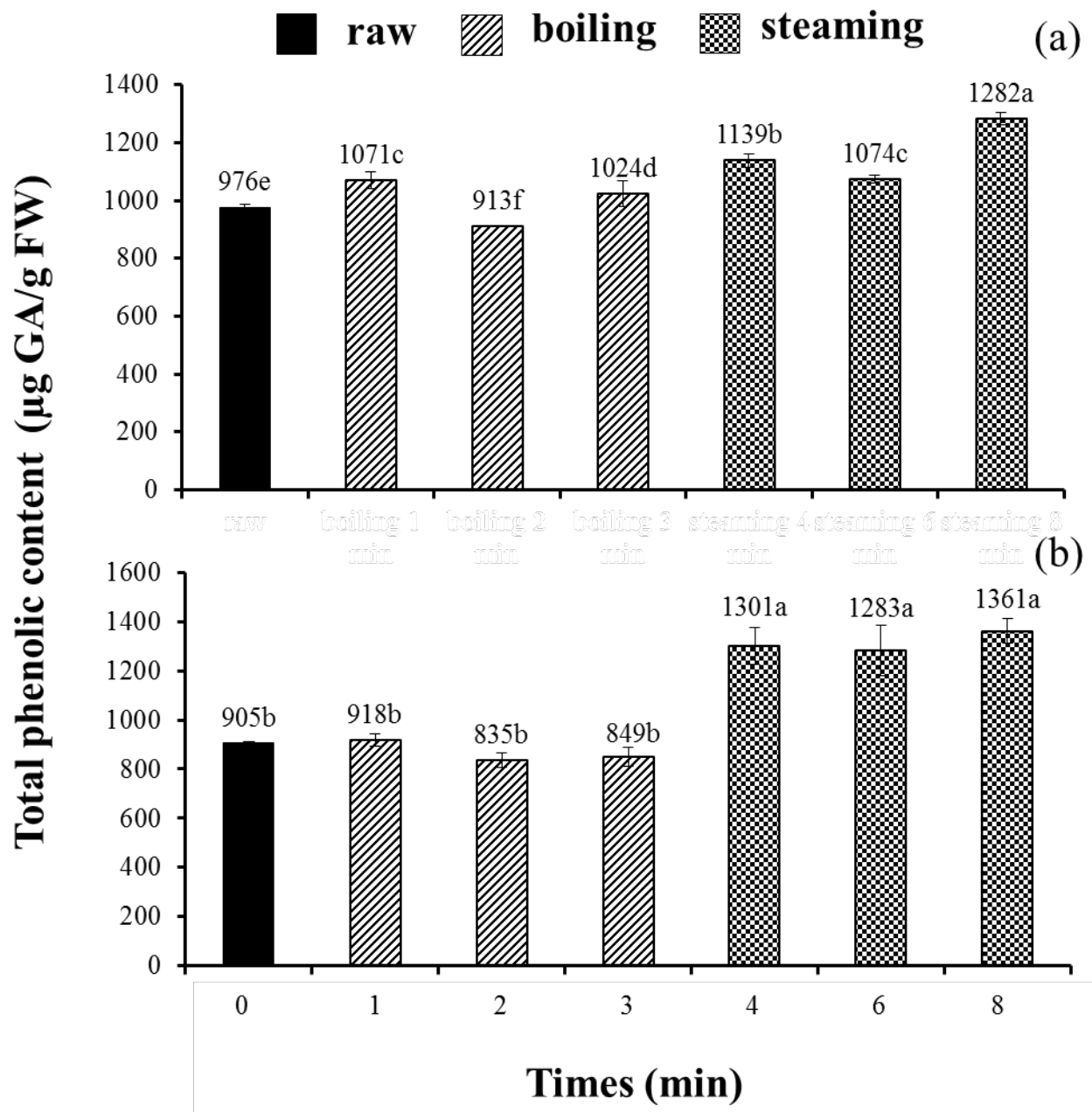
Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, Y.S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 93: 713-718.



ภาพที่ 1 ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging activity ของผักโขมเขียว (a) และ ผักโขมแดง (b) ที่ผ่านการต้มและนึ่งที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับผักโขมสด



ภาพที่ 2 ศักยภาพรวมในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity ของผักโขมเขียว (a) และ ผักโขมแดง (b) ที่ผ่านการต้มและนึ่งที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับผักโขมสด



ภาพที่ 3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผักโขมเขียว (a) และ ผักโขมแดง (b) ที่ผ่านการต้มและนึ่งที่ระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับผักโขมสด

การศึกษาสมบัติบางประการของพันธุ์พริกพื้นเมือง (พริกกะเหรี่ยง) ที่ปลูกในพื้นที่ภาคตะวันตกของประเทศไทย

รพีพรรณ กองตูม^{1,a} ณฐพรภัทร อินทร์ศิริพงษ์^{1,b} และ ครองศักดิ์ ภัคธณกนก^{2,c}

¹ สาขาวิชาวิทยาการเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง

² สาขาวิชาเทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง

Email: ^arapeepan2555@gmail.com ^bNattapornpash@gmail.com, ^ckrongsakdapha@mcru.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจพริกกะเหรี่ยงพันธุ์พื้นเมืองในภูมิภาคตะวันตกของประเทศไทยและทดลองปลูกในแปลงของเกษตรกรพื้นราบ เปรียบเทียบความแตกต่างทางกายภาพและทางเคมีบางประการ ผลการสำรวจพบการปลูกพริกกะเหรี่ยงใน 3 จังหวัด ได้แก่ 1) บ้านพุระกำ บ้านตะโกกลาง บ้านบางกะมา จังหวัดราชบุรี 2) บ้านบางกะชู จังหวัดเพชรบุรี และ 3) บ้านเขาสามชั้น จังหวัดกาญจนบุรี โดยลักษณะทางกายภาพที่ปรากฏด้านรูปทรง สีเปลือก และขนาดของพริกแต่ละพื้นที่มีลักษณะเด่นที่ต่างกัน ปริมาณสารแคปไซซินอยด์ ค่าความเผ็ดและปริมาณสารสีแคปแซนทินแตกต่างกัน โดยพริกกะเหรี่ยงบางกะชูจะมีความเผ็ดมากที่สุดเท่ากับ 1,183,679 SHU รองลงมาได้แก่ จากบ้านพุระกำ บ้านตะโกกลาง บ้านเขาสามชั้น และบ้านบางกะมา ตามลำดับ ส่วนพริกพุระกำจะมีปริมาณสารแคปแซนทินมากที่สุด ผลการเปรียบเทียบลักษณะปรากฏทางกายภาพกับการปลูกในแปลงทดลองของเกษตรกรพื้นราบพบว่า ต้นพริกมีความสูงเฉลี่ย 70-100 cm และพบอาการโรคใบด่างและโคนเน่า โดยลักษณะปรากฏของรูปทรงและสีเปลือกพริกยังคงเหมือนเดิม ต่างกันที่ขนาดผลเพียงเล็กน้อย ปริมาณสารแคปไซซินอยด์และความเผ็ดของพริกกะเหรี่ยงในแปลงทดลองมีปริมาณลดลงมากกว่าร้อยละ 80 ในทุกตัวอย่าง อีกทั้งปริมาณสารสีแคปแซนทินก็มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ: พริกกะเหรี่ยง แคปไซซินอยด์ แคปแซนทิน

Partial Characteristics Study on Native Chili (Karen Chili) Planting in the Western Region of Thailand

Rapeepan Kongtoom^{1,a}, Nattapornpash Insiripong^{1,b} Kongsakda Phaktanakanok^{2,c}

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology,
Muban Chombueng Rajabhat University, Ratchaburi, Thailand

² Department of Food Processing Technology, Faculty of Science and Technology,
Muban Chombueng Rajabhat University, Ratchaburi, Thailand

E-mail; ^arapeepan2555@gmail.com, ^bNattapornpash@gmail.com, ^ckongsakdapha@mcru.ac.th

Abstract

The objective of this research is to investigate the Karen chilies in western Thailand, by to compare the differences of their physical and chemical characteristics with the cultivated on flat area. The study of planting in 3 provinces, 1) Phurakam, Takolang, Bangkama, Ratchaburi Province, 2) Bangkazu, Phetchaburi Province and 3) Khaosamchan, Kanchanaburi Province, the results showed that physical appearance in term of shape, skin-color and fruit size of the chili were different depend on each area. The capsaicinoids content, spices and capsanthin were different, with the Karen chili from Ban Bang Kazu has the highest spiciness equal to 1,183,679 SHU, followed from Ban Phurakam, Tako Lang, Khaosamchan and Ban Bangkama, respectively. And the Karen chili from Ban Phurakam has the highest capsanthin content. The comparison of physical appearance with planting in the cultivated on flat area showed that the chili plants height have an average height of 70-100 cm and found the yellow mosaic leaves and root rot symptoms. The appearance, shape and skin-color of fruit remain the same, differ only in the size of the fruit. The amount of capsaicin content and spiciness of Karen chili in the cultivated on flat area decreased by more than 80% in all samples. In addition, the amount of capsanthin is significantly different.

Keywords: Karen Chili; Capsaicinoid; Capsanthin

บทนำ

พริกเป็นเครื่องปรุงที่ให้รสชาติเผ็ดร้อน ซึ่งเกิดจากสารแคปไซซินอยด์ที่อยู่ในพริก สารแคปไซซินอยด์ในพริกนั้นมียูหลายชนิด ชนิดที่มีสัดส่วนมากที่สุดและให้ความเผ็ดมากที่สุด คือ แคปไซซิน (capsaicin) ซึ่งปัจจุบันนอกจากจะใช้เพื่อเป็นเครื่องปรุงรสอาหารแล้ว ยังนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ อาทิ ด้านการเกษตร เพื่อเป็นสารไล่แมลง ด้านการเลี้ยงสัตว์เพื่อเป็นส่วนผสมในอาหารช่วยกระตุ้นการเผาผลาญและให้เจริญอาหาร ด้านเภสัชศาสตร์ นำมาเป็นส่วนผสมในครีมหรือเจลบรรเทาปวด เป็นต้น นอกจากสารแคปไซซินแล้ว ในพริกยังมีสารสีที่สำคัญหลายกลุ่ม สารสีที่นำมาใช้ประโยชน์มากที่สุดคือ แคปแซนทีน (capsanthin) ซึ่งเป็นสารสีแดงที่นำมาใช้ประโยชน์ทั้งในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อเป็นวัตถุปรุงแต่งสี และเป็นวัตถุสีในการผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ เช่นอาหารไก่ไข่ เพื่อให้ไข่แดงมีสีสวย เป็นต้น (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2559) ประเทศไทยพื้นที่การเพาะปลูกพริกกระจายทั่วทั้งประเทศ จากข้อมูลพื้นที่ปลูกของกรมส่งเสริมการเกษตรพบว่า ปัจจุบันมีการปลูกพริก 5 ชนิดคือ พริกชี้ฟ้าหน่อใหญ่ พริกชี้ฟ้าหน่อเล็ก พริกชี้ฟ้า พริกหยวกและพริกยักษ์ เป็นต้น ซึ่งแต่ละประเภทก็มีการจำแนกออกเป็นอีกหลายชนิดตามสายพันธุ์

พริกกะเหรี่ยง (*Capsicum frutescens* Linn.) เป็นพริกชี้ฟ้าพันธุ์พื้นเมืองชนิดหนึ่ง ที่ขึ้นชื่อในเรื่องความเผ็ดหอม โดยชื่อพริกกะเหรี่ยงนั้นได้มาจาก ชาวไทยกะเหรี่ยงได้นำพริกที่ปลูกไว้ลงมาแลงอาหารและจำหน่ายยังพื้นราบ เมื่อชาวเมืองได้ลิ้มลองรสชาติ ก็เป็นที่ติดใจในความหอมและเผ็ดของพริก จึงพากันเรียกพริกนี้ว่าพริกกะเหรี่ยง การตั้งถิ่นฐานของชาวไทยกะเหรี่ยงในประเทศไทยนั้นจะอยู่ตามแนวชายแดนที่อกเขาตะนาวศรี ซึ่งเป็นรอยต่อระหว่างประเทศไทยและพม่าแถบภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศไทย ได้แก่จังหวัดตาก แม่ฮ่องสอน เพชรบุรี กาญจนบุรี และราชบุรี (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, 2553) การปลูกพริกของชาวไทยกะเหรี่ยงจะปลูกแซมในพื้นที่ที่ปลูกข้าวไร่ และผักสวนครัวอื่น ๆ ต้นพริกกะเหรี่ยงจะมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี เก็บผลผลิตได้นาน ถึงแม้จะไม่ค่อยมีน้ำ ไม่ให้ปุ๋ยและสารเคมีเลยก็สามารถให้ผลผลิตได้ พริกกะเหรี่ยงจะมีเอกลักษณ์ที่เด่นในเรื่องของความหอมและเผ็ดร้อน ทำให้พริกกะเหรี่ยงเป็นที่นิยมโดยนำไปเป็นส่วนผสมในเครื่องแกงชนิดต่างๆ และนำไปเป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมการทำซอสพริก เป็นต้น ราคาพริกกะเหรี่ยงจะสูงกว่าพริกทั่วไปประมาณเท่าตัว เนื่องจากหายากและมีการปลูกบนที่สูงตามแนวชายแดนเท่านั้น การขนส่งเป็นไปด้วยความยากลำบาก จากการสอบถามข้อมูลจากผู้รับซื้อและจำหน่ายพริกกะเหรี่ยงในปัจจุบันจะมีน้อยลง เนื่องจากการพื้นที่การปลูกพริกกะเหรี่ยงลดลง

จากสถานการณ์ปัญหาดังกล่าวข้างต้น จึงเป็นที่มาของคำถามวิจัยว่าทำไมจึงไม่นำพริกกะเหรี่ยงมาปลูกในพื้นที่ราบหรือพื้นที่เกษตรกรรมทั่วไป ซึ่งจากการสอบถามและสัมภาษณ์ชาวกะเหรี่ยง ได้คำตอบว่า เมื่อนำพริกกะเหรี่ยงปลูกในพื้นที่ที่แตกต่างจากเดิม และมีการใช้ปุ๋ยและสารเคมี จะทำให้ความหอมและความเผ็ดของพริกเปลี่ยนไป (บทสัมภาษณ์, 2560) ดังนั้นด้วยเหตุผลดังกล่าวคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาความเป็นไปได้ในการทดลองปลูกพริกกะเหรี่ยงในแปลงของเกษตรกรพื้นที่ราบ โดยไม่มีการใช้สารเคมีใดๆ นอกจากบำรุงดินและให้ปุ๋ยคอกเท่านั้น เพื่อนำผลการวิจัยที่ได้เป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาและส่งเสริมการปลูกพริกกะเหรี่ยงและอนุรักษ์พันธุ์พริกกะเหรี่ยงพื้นเมืองของพื้นที่ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีบางประการของพริกกะเหรี่ยงพันธุ์พื้นเมืองของภูมิภาคตะวันตกระหว่างพื้นที่ปลูกจริงกับการทดลองปลูกในแปลงของเกษตรกรพื้นที่ราบ

ระเบียบวิธีวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแบบทดลองเพื่อศึกษาทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยมีลำดับขั้นตอนวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

การสำรวจและเก็บตัวอย่างพริกกะเหรี่ยงพันธุ์พื้นเมือง

สำรวจและเก็บตัวอย่างพริกกะเหรี่ยงพันธุ์พื้นเมืองใน 3 จังหวัดของภูมิภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรี และราชบุรี โดยเลือกพื้นที่เป้าหมายคือหมู่บ้านชาวไทยกะเหรี่ยง โดยทำการเก็บและคัดเลือกตัวอย่างพริกทั้งผลดิบและผลสุกที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่หักงอ ไม่มีหนอนเจาะ และไม่เป็นโรค เก็บใส่ในถุงเก็บตัวอย่าง ตีตราละเอียด และนำมาเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 °C เพื่อทำการวิเคราะห์ทดสอบทางกายภาพและทางเคมีต่อไป

การปลูกพริกกระเทียมในแปลงทดลอง

การเตรียมเมล็ดพันธุ์พริก คัดเลือกพริกกระเทียมที่มีลักษณะสุกเต็มที่เพื่อนำไปบ่มให้ผลสุกจัด จากนั้นนำไปตากแดดให้แห้ง แล้วนำมาแกะเอาเมล็ดข้างในผลพริกออก เก็บใส่ถุงพลาสติกและติดป้ายแสดงรายละเอียดกำกับไว้

การเตรียมต้นกล้าพริก นำเมล็ดพันธุ์พริกกระเทียมแช่น้ำ 1 คืน จากนั้นนำมาห่อด้วยผ้าขาวบางบ่มไว้ 3 วัน จนกระทั่งสังเกตเห็นตุ่มรากสีขาว ๆ แดงออกตามเมล็ดพริก นำไปหยอดลงในหลุมถาดเพาะ หลุมละ 1 เมล็ด โดยใช้วัสดุเพาะสำเร็จรูป กดเมล็ดพันธุ์พริกลงไปลึกประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปไว้ในที่มีแสงแดดรำไร รดน้ำวันละสองครั้ง เช้า-เย็น จนกระทั่งต้นพริกมีใบขึ้นมาประมาณ 4-5 ใบ หรือต้นกล้าพริกมีอายุได้ 30 วัน ก่อนทำการย้ายลงแปลงปลูก

การเตรียมแปลงปลูก ดำเนินการทดลองในแปลงเกษตรกร พื้นที่ตำบลหนองสีนวล อำเภोजอมบึง จังหวัดราชบุรี ทำการเก็บตัวอย่างดินเพื่อวิเคราะห์และประเมินคุณสมบัติดินในเบื้องต้น คือ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระดับไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) ด้วยชุดทดสอบคุณสมบัติดิน ปรับปรุงคุณภาพดินก่อนปลูก โดยใส่ปุ๋ยมูลไก่ลงไปในอัตราส่วน 1000 กิโลกรัมต่อไร่ ไถและตากดินไว้ 2 สัปดาห์ เตรียมแปลงปลูกจำนวน 4 แปลง ขนาดแปลงกว้าง 1.0 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลง 50 เซนติเมตร กำหนดให้ปลูกเป็นแถวเดียวในแต่ละแปลง ระยะห่างระหว่างต้น 60 เซนติเมตร ใส่ปุ๋ยมูลไก่ รองกันหลุม ๆ ละ 50 กรัม

การปลูกและการดูแล ทำการปลูกตัวอย่างพริกกระเทียมจำนวน 5 ตัวอย่าง (จำแนกตามพื้นที่) ตัวอย่างละ 8 ข้ำ โดยออกแบบการทดลองเป็นแบบ CRD (completely randomized design) นำต้นกล้าพริกกระเทียมที่แข็งแรงมาปลูกลงในหลุม ๆ ละ 1 ต้น การให้ปุ๋ยจะให้ปุ๋ยมูลไก่ หลังปลูก 15 35 และ 75 วัน ตามลำดับ โดยการโรยรอบโคนต้น แล้วพรวนดินกลบ และให้น้ำด้วยระบบมินิสปริงเกอร์แบบหัวฉีดฝอย กำจัดวัชพืชโดยใช้วิธีการถาง และไม่ใช้สารเคมีใด ๆ ตั้งแต่ปลูกจนกระทั่งเก็บเกี่ยวผลผลิต

การเก็บตัวอย่าง พริกกระเทียมเมื่อปลูกได้ประมาณ 90 วัน จะเริ่มให้ผลผลิต ทำการเก็บตัวอย่างพริกทั้งผลดิบและผลสุก โดยจะเก็บตัวอย่างพริกชนิดเดียวกันทุกต้นรวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง ใส่ถุงพลาสติก ติดรายละเอียด และนำกลับไปวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมียังห้องปฏิบัติการ

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของพริกกระเทียม

ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพริกกระเทียมจากพื้นที่ปลูกจริงกับที่ทดลองปลูกในแปลงทดลอง ประกอบด้วยรูปร่างของพริก ขนาดความยาวผลพริก ลักษณะและสีเปลือกพริก โดยใช้เครื่องวัดสี (color meter) บันทึกผลจากการวัดซ้ำหลายจุด รายงานเป็นค่า L^* , a^* , b^* โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของการทดลองโดยตัดสินด้วยสถิติแบบ one-way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละการทดลองด้วย LSD เมื่อ $p \leq 0.05$ โดยใช้โปรแกรม PSPP Freeware

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพริก

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี คือ ปริมาณสารให้ความเผ็ดแคปไซซินอยด์และสารสีแคปแซนทีน โดยมีวิธีการวิเคราะห์ทดสอบดังนี้

การวิเคราะห์หาปริมาณสารแคปไซซินอยด์ นำตัวอย่างพริกสุกมาหั่นให้มีขนาดประมาณ 0.2 มิลลิเมตร ชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 1.0 กรัม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน เติมหั่นทำละลาย น้ำ : เอทานอล 1 : 1 ลงไป 20 มิลลิลิตร เขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่สกัดแล้วมากรองด้วยกระดาษกรอง ทำการสกัดตัวอย่างเดิมซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้รวมกัน และปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย ให้เป็น 100 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารแคปไซซินอยด์ 3 ชนิดคือ แคปไซซิน ไดไฮโดรแคปไซซิน และ นอร์ไดไฮโดรแคปไซซิน ด้วยเทคนิค HPLC-ECD สารแคปไซซินอยด์ถูกแยกโดยใช้คอลัมน์ C18, 5 μm , 250 mm x 4.6 mm i.d. และตรวจวัดสัญญาณโดยเครื่อง Electrochemical detector (ECD) ที่ศักย์ไฟฟ้า 0.7 โวลต์ คำนวณปริมาณสารแคปไซซินอยด์ โดยเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน และคำนวณค่าความเผ็ดในหน่วยสควิลล์ (SHU) โดยใช้สมการ

$$\text{SUH} = [\text{capsaicin (ppm)} + \text{dihydrocapsaicin (ppm)}] \times 16.1 \\ + \text{nordihydrocapsaicin (ppm)} \times 9.3$$

การวิเคราะห์ปริมาณสารสีแคปแซนทีน นำตัวอย่างพริกที่ผ่านการสกัดสารแคปแซนทีนออกแล้ว มาเติมตัวทำละลายอะซิโตนลงไป 25 มิลลิลิตร เขย่าปิดฝาทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรอง และปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 460 nm โดยใช้อะซิโตนเป็นสารละลายเบส และคำนวณโดยใช้วิธี ASTA 20.1

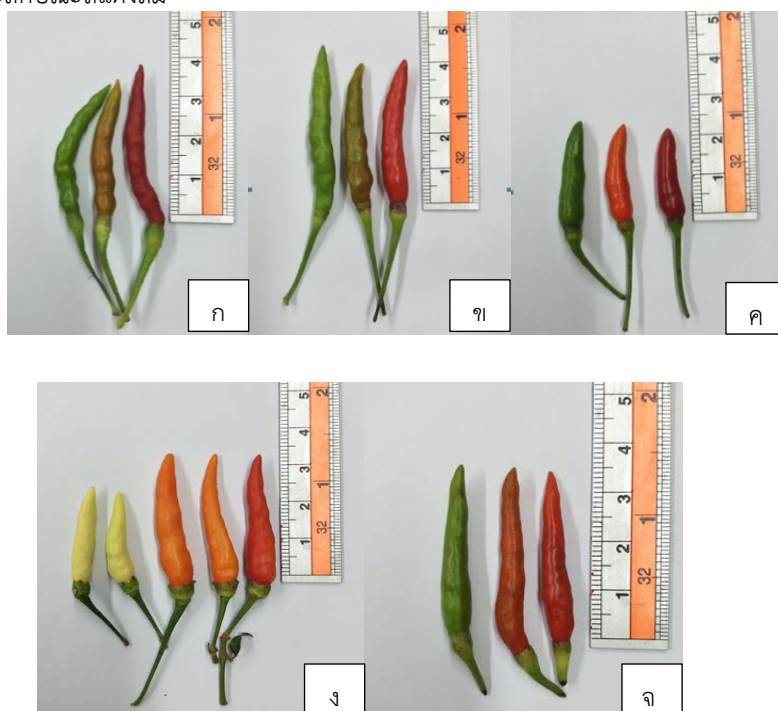
เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีคือแคปแซนทีนและแคปแซนทีนระหว่างตัวอย่างพริกกะเหรี่ยงพันธุ์พื้นเมืองที่เก็บมาจากพื้นที่ปลูกจริงกับที่ปลูกในแปลงทดลอง หาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้สถิติ one-way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยสถิติ Pair t-test เมื่อ $p \leq 0.05$ โดยใช้โปรแกรม PSPP Freeware

ผลการวิจัย

ผลการสำรวจและศึกษาลักษณะพริกกะเหรี่ยงพันธุ์พื้นเมือง

จากการสำรวจพื้นที่ปลูกพริกกะเหรี่ยงในภูมิภาคตะวันตก 3 จังหวัด พบว่าการปลูกในพื้นที่บ้านพระกำ บ้านตะโกกลาง อำเภอสวนผึ้ง บ้านบางกะม่า อำเภอบ้านคา จังหวัดราชบุรี บ้านบางกะชู้ อำเภอนองหญ้าปล้อง จังหวัดเพชรบุรี และบ้านเขาสามชั้น อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ลักษณะปรากฏของพริกกะเหรี่ยงพื้นเมืองที่ปลูกในแต่ละพื้นที่จะมีลักษณะที่ต่างกันไป ทั้งรูปทรงผลพริก สีเปลือกพริก และขนาดของผลพริก โดยจะมีชื่อเฉพาะที่เรียกกันในท้องถิ่นตามลักษณะปรากฏของพริก เช่น พริกกะเหรี่ยงพระกำ จะมีชื่อเรียกว่า กะเหรี่ยงเขากวาง ซึ่งลักษณะของเม็ดพริกจะโค้งงอเหมือนเขากวาง พริกกะเหรี่ยงตะโกกลาง จะเรียกว่าพริกกะเหรี่ยงหอม ซึ่งจะมีกลิ่นหอมฉุนมาก และพริกจำปี หรือพริกกะเหรี่ยงขาวจะเป็นชื่อเรียกพริกกะเหรี่ยงของบ้านเขาสามชั้น ซึ่งมีสีเปลือกพริกขาวเหลืองเหมือนดอกจำปี เป็นต้น โดยลักษณะของพริกกะเหรี่ยงของแต่ละพื้นที่แสดงดังภาพที่ 1

การศึกษาความเข้มสีเปลือกของพริก โดยใช้เครื่องวัดสี ได้ผลดังตารางที่ 1 พบว่าพริกผลดิบที่มีความเข้มสีเขียวจากมากไปน้อยคือ พริกกะเหรี่ยง พระกำ บางกะชู้ ตะโกกลาง บางกะม่า และเขาสามชั้น ตามลำดับ โดยพริกบางกะม่า ตะโกกลาง บางกะชู้ มีสีเขียวของเปลือกไม่แตกต่างกัน แต่พริกพระกำและเขาสามชั้นมีความแตกต่างจากกลุ่ม ส่วนผลสุกมีความเข้มของสีแดงจากมากไปน้อยคือ พริกกะเหรี่ยงพระกำ ตะโกกลาง บางกะม่า บางกะชู้ และเขาสามชั้น โดยพริกกะเหรี่ยงพระกำ ตะโกกลาง และบางกะม่า มีความเข้มสีแดงของเปลือกไม่แตกต่างกัน และมีความเข้มของสีแดงมากกว่ากลุ่มของบางกะชู้ และเขาสามชั้น ซึ่งจะลักษณะสีแดงส้ม



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะพริกกะเหรี่ยงของแต่ละพื้นที่ (ก) พระกำ (ข) บางกะชู้ (ค) ตะโกกลาง (ง) เขาสามชั้น และ (จ) บางกะม่า

ที่มา : ผู้วิจัย (2561)

ตารางที่ 1 ผลการวัดค่าสีของเปลือกพริกกะเหรียงของแต่ละพื้นที่

พันธุ์พริก	ผลดิบ			ผลสุก		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
พริกกำ	35.93 ^b	-8.58 ^c	30.79 ^b	25.62 ^a	35.65 ^b	28.60 ^b
บางกะม่า	30.51 ^a	-7.00 ^b	26.12 ^a	32.10 ^c	34.60 ^b	27.36 ^b
ตะโกกลาง	39.29 ^c	-7.93 ^b	34.78 ^c	29.06 ^b	35.21 ^b	22.68 ^a
บางกะชู้	33.39 ^b	-7.99 ^b	29.20 ^b	35.20 ^d	32.33 ^a	35.87 ^c
เขาสามชั้ง	53.64 ^d	-5.16 ^a	33.36 ^c	38.18 ^e	32.15 ^a	37.60 ^c

L* คือค่าความสว่าง มีค่า 0 -100 เมื่อ 0 คือสีดำ และ 100 คือสีขาว ส่วนค่า a* ค่าความเป็นสีแดง (+) และสีเขียว (-) และค่า b* คือค่าความเป็นสีเหลือง (+) และสีน้ำเงิน (-)

ค่าสีที่ตามหลังตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดยวิธี one-way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละการทดลองด้วย LSD เมื่อ $p \leq 0.05$

ผลการปลูกพริกกะเหรียง

การปลูกพริกกะเหรียงมีขั้นตอนการดำเนินการตั้งแต่การเลือกพื้นที่แปลงทดลองปลูก การวิเคราะห์สมบัติของดิน การเพาะต้นกล้า การปลูกและการดูแลรักษาจนกระทั่งเก็บผลผลิตไปวิเคราะห์ทดสอบ โดยมีผลการทดลองดังนี้

ต้นกล้าพริก

หลังจากเริ่มหยอดเมล็ดพริกลงในหลุมถาดเพาะ ต้นกล้าพริกจะเริ่มงอกขึ้นมาโดยใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์ และค่อย ๆ เจริญเติบโตจนกระทั่งมีใบจริงประมาณ 4-5 ใบในระยะเวลาประมาณ 30 วัน ลักษณะต้นกล้าพริกกะเหรียงเมื่ออายุได้ 30 วัน จะมีขนาดความสูงเฉลี่ยประมาณ 10 เซนติเมตร มีลักษณะใบเป็นรูปไข่ปลายแหลม ดังภาพที่ 2



ที่มา ภาพโดยผู้วิจัย

ผลการวิเคราะห์สมบัติของดิน

ผลการทดสอบสมบัติดิน โดยใช้ชุดทดสอบพบว่า ดินในแปลงทดลองปลูกมีค่า pH ปริมาณธาตุอาหารหลัก N P K แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติของดินในแปลงทดลองปลูกพริกกะเหรียง

องค์ประกอบ	pH	N	P	K
ผลการทดสอบ	5.5	สีชมพูอ่อน	สีฟ้าเข้ม	ใสไม่มีตะกอน
การวิเคราะห์สมบัติ	เป็นกรดเล็กน้อย	ต่ำมาก	สูงมาก	ต่ำ

จากตารางที่ 1 สมบัติของดินในแปลงทดลองปลูกมีค่า pH เท่ากับ 5.5 ซึ่งมีความเป็นกรดเล็กน้อย ซึ่งถือว่าอยู่ในช่วงเกณฑ์ที่มีความเหมาะสมในการปลูกพริก ทั้งนี้จรัญภา (2551) รายงานว่า สมบัติดินที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของพริกต้องมีลักษณะเนื้อดินเป็นดินร่วนปนทราย มีการระบายน้ำดี และมีค่า pH ระหว่าง 5.5-6.5 ดังนั้นถือว่า

สภาพดินในแปลงทดลองมีความเหมาะสมต่อการปลูกพริก ส่วนปริมาณธาตุอาหารหลักพบว่า มีปริมาณ N และ K ต่ำ แต่มีปริมาณ P สูง ดังนั้นก่อนปลูกจึงมีการปรับปรุงสมบัติดินโดยใช้ปุ๋ยมูลไก่เพื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนและโพแทสเซียมให้มากขึ้น

การปลูกและการดูแล

นำต้นกล้าอายุ 30 วันปลูกลงหลุมละ 1 ต้น กลบลำต้นและติดป้ายกำกับไว้ให้น้ำและปุ๋ยตามวิธีการข้างต้น จนกระทั่งต้นพริกเจริญเติบโตและสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ โดยต้นพริกเมื่อปลูกได้ 1 เดือน จะมีลักษณะทรงพุ่มแตกแขนงและความสูงของต้นเมื่ออายุครบ 3 เดือนเฉลี่ย 70-100 เซนติเมตร ลักษณะต้นพริกกะเหรี่ยงพันธุ์พื้นเมืองแต่ละพื้นที่แสดงดังภาพที่ 3 จากการทดลองปลูกพริกกะเหรี่ยงในแปลงทดลองนั้น พบว่าการเจริญเติบโตของพริกในระยะแรกนั้นมีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ดีมาก แต่ในระยะย้ายปลูกได้ 2 เดือน หรือประมาณ 60 วัน จะพบลักษณะอาการที่ผิดปกติของใบพริก คือ ใบพริกจะมีลักษณะใบเหลือง และใบต่าง และใบหักเล็กน้อย โดยเส้นใบนั้นยังคงเขียวปกติ ส่วนในระยะสามเดือน จะพบลักษณะอาการเหี่ยวเฉาของต้นพริกบางต้น และแห้งตาย เมื่อทำการถอนต้นพริกขึ้นมาดู จะพบว่าที่โคนรากจะมีลักษณะเป็นรู เหมือนโดนเจาะเข้าไปทำลาย และทำให้เกิดอาการโคนเน่า ดังภาพที่ 4



บางกะม่า



ตะโกล่ำง



เขาสามซัน



พุดะกำ



บางกะซู่

ภาพที่ 3 ต้นพริกกะเหรี่ยงหลักย้ายปลูกเป็นเวลา 1 เดือน

ที่มา : ผู้วิจัย (2561)



ที่มา : ผู้วิจัย (2561)

การเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของพริกกะเหรี่ยง

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพที่ปรากฏ และขนาดของพริกกะเหรี่ยงจากพื้นที่ปลูกจริงกับแปลงทดลองพบว่า ขนาดผลของพริกกะเหรี่ยงที่ปลูกในแปลงทดลองจะมีขนาดที่สั้นกว่า ยกเว้นพริกกะเหรี่ยงเขาสามชั้นจะมีขนาดผลที่ใหญ่กว่าเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญดังตารางที่ 3 แต่ทั้งนี้รูปทรงที่ปรากฏของพริกกะเหรี่ยงแต่ละพื้นที่นั้นยังคงเหมือนเดิม ซึ่งแสดงถึงลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ของพริกกะเหรี่ยงในแต่ละพื้นที่

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบลักษณะปรากฏและขนาดของพริกกะเหรี่ยงระหว่างพื้นที่ปลูกจริงกับแปลงทดลอง

ตัวอย่าง	ลักษณะปรากฏ	พื้นที่จริง (cm)	แปลงทดลอง (cm)
พริกกำ	ผลเล็ก ผิวหยาบเป็นคลื่น ไม่มันวาว	3.5-4.0	2.0-2.2
บางกะม่า	ผลเรียวยาว ผิวค่อนข้างเรียบและมันวาว	3.4-4.0	2.5-3.0
ตะโกกลาง	ผลสั้นผิวเรียบมันวาว	2.0-2.5	1.5-2.0
บางกะชู	ผลเรียวยาวตรง หยาบเป็นคลื่นเล็กน้อย ผิวมันวาว	4.0-4.5	3.0-3.5
เขาสามชั้น	ผลลักษณะรูปรวยกันมนปลายแหลม หยาบเป็นคลื่นเล็กน้อย ผิวมันวาวเล็กน้อย	3.0-3.5	3.5-4.0

ในส่วนของการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีคือปริมาณสารกลุ่มแคปไซซินอยด์ ความเผ็ดและสารสีแคปแซนทิน ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณแคปไซซินอยด์และค่าความเผ็ดในพริกกะเหรี่ยงของแต่ละพื้นที่

ตัวอย่าง	ปริมาณแคปไซซินอยด์ (มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักสด)			ความเผ็ด (SHU)			แคปแซนทิน (mg/kg fresh)	
	แปลงทดลอง	พื้นที่จริง	ร้อยละที่ลดลง	แปลงทดลอง	พื้นที่จริง	ร้อยละที่ลดลง	แปลงทดลอง	พื้นที่จริง
บางกะม่า	828	3,086	73.17	11,653	45,235	74.24	50.00 ± 0.44	74.44 ± 0.41
พริกกำ	514	14,337	96.42	6,970	205,927	96.62	87.58 ± 0.52	86.25 ± 0.28
ตะโกกลาง	738	12,804	94.23	10,740	186,670	94.25	76.63 ± 0.43	105.03 ± 0.41
เขาสามชั้น	356	10,962	96.75	5,108	160,528	96.82	21.78 ± 0.10	25.92 ± 0.62
บางกะชู	888	21,722	95.91	12,461	313,962	96.03	61.13 ± 0.47	74.44 ± 0.41

จากตารางจะพบว่าพริกกะเหรี่ยงที่ปลูกในแปลงทดลอง มีปริมาณสารกลุ่มแคปไซซินอยด์ลดลงมากกว่าร้อยละ 80 จากพื้นที่ปลูกจริง และส่งผลให้ค่าความเผ็ดของพริกทดลองด้วย โดยที่ระดับความเผ็ดของพริก มีค่าเฉลี่ยในช่วง 6,000-12,000 SHU (ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน, 2559) จัดว่าเป็นพริกที่มีความเผ็ดในระดับปานกลาง เมื่อเทียบกับพื้นที่จริงถือว่ามีความเผ็ดสูงมาก ส่วนปริมาณแคปแซนทินพบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณแคปแซนทินของพริกกะเหรี่ยงแปลงทดลองจะมีปริมาณสูงกว่าพื้นที่จริงอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปและอภิปรายผล

พริกกะเหรี่ยงในแต่ละพื้นที่นั้นจะมีลักษณะปรากฏที่แตกต่างกันในคือ ขนาด รูปทรง สีเปลือกผิว มีการเรียกชื่อที่บ่งบอกลักษณะเฉพาะ เช่น พริกกะเหรี่ยงเขากวางจากพริกกำ หรือพริกกะเหรี่ยงขาวจากเขาสามชั้น พริกกะเหรี่ยงหอมจากตะโกกลาง เป็นต้น นอกจากลักษณะทางกายภาพที่ต่างกันแล้ว องค์ประกอบทางเคมี คือ สารกลุ่มแคปไซซินอยด์ยังมีปริมาณแตกต่างกันส่งผลให้มีระดับความเผ็ดที่ต่างกัน จากการศึกษาครั้งนี้พริกกะเหรี่ยงพันธุ์พื้นเมืองที่มีความเผ็ดมากที่สุดคือ พริกกะเหรี่ยงบางกะชู อำเภอนองพญาปล้อง จังหวัดเพชรบุรี ส่วนสารสีแดงแคปแซนทิน ก็มีปริมาณแตกต่างกัน โดยพริกกะเหรี่ยงตะโกกลางจะมีปริมาณมากที่สุด การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพและทางเคมี ระหว่างตัวอย่างพริกกะเหรี่ยงจากพื้นที่ปลูกจริงการทดลองปลูกในแปลงของเกษตรกรพื้นราบนั้น พบว่าลักษณะปรากฏทางกายภาพยังคงมีลักษณะคงเดิมแต่มีความแตกต่างกันด้านขนาดผลเล็กน้อย สำหรับองค์ประกอบทางเคมี คือปริมาณสารแคปไซซินอยด์

และแคปแซนทีน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณสารแคปไซซินอยด์ลดลงมากกว่าร้อยละ 80 ส่วนปริมาณสารสีแดงแคปแซนทีนของตัวอย่างพริกที่ปลูกในแปลงทดลองมีปริมาณเพิ่มขึ้น จากรายงานวิจัยของ Prasad และคณะ กล่าวว่าสิ่งที่เป็นตัวกำหนดความเผ็ดของพริกขึ้นอยู่กับว่าในพันธุ์พริกนั้นมี C gene ที่ควบคุมการสร้าง enzyme capsaicin synthase หรือไม่ ซึ่งการทำงานของเอนไซม์จะขึ้นกับ สภาพแวดล้อม เช่น ธาตุอาหาร อุณหภูมิและความชื้นในดิน (Prasad, et al., 2006 อ้างถึงใน พัฒนา ภาสอน, 2555) โดยเฉพาะธาตุโพแทสเซียม (K) จะมีอิทธิพลต่อความเผ็ดของพริกเนื่องจากมีบทบาทต่อการทำงานของเอนไซม์ Phenylalanine Ammonium Lyase (PAL) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างสารเผ็ดในพริก เมื่อระดับของ K เพิ่มขึ้น การตอบสนองของเอนไซม์ PAL ในการสร้างสารเผ็ดจะเพิ่มขึ้น (ธรรมศักดิ์ ทองเกตุ, 2559) อีกทั้งหากความชื้นในดินลดลงก็จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ PAL ทำให้มีการสังเคราะห์สารแคปไซซินอยด์เพิ่มมากขึ้นด้วย (Castro-Concha, 2016) จากงานวิจัยดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของดินในแปลงปลูกที่มีปริมาณ K ต่ำ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผลผลิตสารแคปไซซินอยด์และทำให้ความเผ็ดลดลง รวมทั้งสภาพพื้นที่และอากาศที่ต่างกันล้วนส่งผลต่อการสังเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในพริก

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการต่อยอดงานวิจัยในการศึกษาความหลากหลายของชนิดพันธุ์ การยืนยันความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ด้วยวิธีการทางพันธุศาสตร์ เพื่อการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ โดยวิธีการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายหรือพันธุวิศวกรรม และเป็นแนวทางในการวางแผนทดลอง ศึกษาตัวแปร และควบคุมปัจจัย ที่เกี่ยวข้องกับความเผ็ดของพริกจะเหรียญในการปลูกยังพื้นที่ราบให้มีความเผ็ดและความหอมคงที่ เพื่อส่งเสริมการปลูกและอนุรักษ์พันธุ์พริกจะเหรียญพื้นเมืองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

บุญส่ง ใจชื่น (2560/5/พฤศจิกายน). ชุมชนกะเหรี่ยงและการปลูกพริกจะเหรียญ. ผู้นำชุมชนกะเหรี่ยง จังหวัดราชบุรี.

สัมภาษณ์.

พัฒนา ภาสอน, ถวิล ชนะบุญ สมบัติอัปมระภา และ เรียมจิตร สุทธิโสภะเชือก. (2555). ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารแคปไซซินอยด์ของพริกน้อย (*Capsicum frutescens* Linn.) และคุณสมบัติเคมีของดิน. *J Sci Technol MSU*, 31(3), 211-216.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. (2555). **กลุ่มชาติพันธุ์ตะวันตก : กะเหรี่ยง**. สืบค้นเมื่อ 28 กันยายน 2559, <https://th.wikipedia.org/wiki>

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. (2553). **พริกจะเหรียญ: การพัฒนาพันธุ์พื้นเมืองสู่พันธุ์การค้า**. สืบค้นเมื่อ 28 กันยายน 2559, จาก <http://www.trf.or.th/>

ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (ม.ป.ป.). **เพิ่มรสชาติให้กับชีวิต-พริก**.

สืบค้นเมื่อ 29 กันยายน 2559, <http://www.ku.ac.th/kaset60/Theme04/theme-04-01/index-04-01.html>

จิราภา จอมไธสง. (2551). **คู่มือนักวิชาการส่งเสริมการเกษตรพริก**. กรมส่งเสริมการเกษตร : กรุงเทพฯ.

ธรรมศักดิ์ ทองเกตุ. (2559). **อิทธิพลของธาตุอาหารเพื่อควบคุมความเผ็ดในพริก**. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Castro-Concha, L.A. et al. (2016). Phenylalanine biosynthesis and its relationship to accumulation of capsaicinoids during *Capsicum chinense* fruit development. *Biologia Plantarum*, 60(3): 579-584.

Phimchan, P., Chanthai, S., Bosland, P.W. & Techawongstein, S. (2014). Enzymatic changes in phenylalanine ammonia-lyase, cinnamic-4-hydroxylase, capsaicin synthase, and peroxidase activities in capsicum under drought stress. *J Agric Chem*. 62(29): 7057-62.

ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบและผลดิบลิด้วยเอทานอลต่อการยับยั้งเชื้อ *Penicillium digitatum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคพืช

อังคณา เชื้อเจ็ดตน

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง จังหวัดลำปาง 52100

email: achuajedton@gmail.com

บทคัดย่อ

โรคหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อราเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้คุณภาพของผลผลิตเกิดความเสียหาย การควบคุมโรคพบการใช้สารเคมีเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคราเน่าสีเขียว และโรคแอนแทรคโนส งานวิจัยนี้จึงศึกษาการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบและผลดิบลิด้วย 95 % เอทานอลต่อการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium digitatum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคพืช โดย poisoned food technique ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 1,250, 2,500, 3,750, และ 5,000 ppm พบว่า สารสกัดจากใบและผลของดิบลิที่ระดับความเข้มข้น 1,250 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* ได้สูงสุด คือ 32.91% และ 49.07% ตามลำดับ จากเส้นใยเชื้อราที่เจริญเป็นเวลา 7 วัน และสารสกัดจากใบและผลของดิบลิที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้สูงสุด คือ 31.48 % และ 58.20 % ตามลำดับ จากเส้นใยเชื้อราที่เจริญเป็นเวลา 14 วัน ดังนั้นการใช้สารสกัดจากดิบลิเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถยับยั้งเชื้อราและควบคุมโรคพืชได้

คำสำคัญ: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium digitatum*, ดิบลิ, สารสกัดหยาบ

Effects of Leaves and Fruits Extracted by Ethanol of *Piper retrofractum* Vahl on Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*, Causing Plant Disease

Angkhana Chuajedton^{1, a}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Lampang Rajabhat University, Lampang 52100, Thailand
E-mail; ^aachuajedton@gmail.com

Abstract

Postharvest diseases caused by mold are the major problem of loss product quality. Disease control has found increased the use of chemicals, especially the use of chemicals to control green mold rot and anthracnose disease. This study was determined the effects of leaves and fruits of *Piper retrofractum* Vahl extracted by 95% ethanol on inhibition of *Penicillium digitatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*, causing plant disease, by using poisoned food technique at several concentrations of 0 (Control), 1,250, 2,500, 3,750, and 5,000 ppm were studied. The results showed that the concentrations of crude extracts (leaves and fruits) at 1,250 ppm gave the high inhibition of mycelium growth of *P. digitatum*, which were 32.91% and 49.07%, respectively when testing with seven days of mycelium growth. For *C. gloeosporioides*, it was shown that the concentration of crude extracts at 5,000 ppm, revealed the high inhibition of mycelium growth from both leaves and fruits about 31.48 % and 58.20 %, respectively when testing with 14 days of mycelium growth. Therefore, the antifungal activity from Piperaceae extracts may be valuable to control plant pathogenic fungi.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium digitatum*, *Piper retrofractum*, crude extract

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตและส่งออกผลิตผลพืชผักและผลไม้ที่สำคัญ สามารถผลิตและส่งออกผลิตผลที่ได้จากพืชผักและผลไม้หลายชนิดออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ ซึ่งการผลิตพืชผักจะพบโรคหลังการเก็บเกี่ยว (Postharvest diseases) โดยเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อราต่างๆ มีรายงานเกี่ยวกับโรคหลังการเก็บเกี่ยวของ โรคเน่าราสีเขียว (green mold rot) และโรคเน่าราสีน้ำเงิน (blue mold rot) เป็นโรคที่สำคัญและพบมากในระยะหลังการเก็บเกี่ยวของส้ม (Snowdon, 1990) เชื้อสาเหตุคือ *Penicillium digitatum* เชื้อราจะเข้าทำลายผลที่มีแผล และเชื้อราแพร่กระจายมาจากผลที่เป็นโรคซึ่งตกหล่นอยู่ในโรงคัดบรรจุและในสวน การเข้าทำลายสามารถเกิดโดยเข้าทางแผลที่มีขนาดเล็กมาก เช่น ต่อม น้ำมันที่ผิวถูกทำลาย เป็นต้น (दनัย, 2543) อาการของโรคหลังการเก็บเกี่ยวส่วนใหญ่เป็นอาการที่เกิดจากการเน่า โดยเชื้อสาเหตุสร้างเอนไซม์มาย่อยสลายเนื้อเยื่อทำลายส่วนที่เป็นเพคตินทำให้เซลล์แยกออกจากกัน เนื้อเยื่อจึงยุบตัวลงทำให้เน่าและเลอะ อาการอีกชนิดที่พบคือ อาการที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อถูกทำลายให้ตายไป แล้วมีการสะสมสารประกอบฟีนอลทำให้แผลเกิดเป็นสีน้ำตาลซึ่งอาจแห้งหรือสีน้ำตาลก็ได้ สำหรับโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลส้มได้แก่ โรคเน่าราสีเขียว โรคเน่าราสีน้ำเงิน โรคเน่าสีน้ำตาล โรคที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizopus* โรคเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* โรคเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* และโรคขั้วผลเน่า (दनัย, 2543) โรคแอนแทรคโนสเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ซึ่งเชื้อราที่พบเข้าทำลายพริกก็มีอยู่ 3 ชนิดด้วยกัน คือ *Colletotrichum gloeosporioides* เข้าทำลายพริกผลใหญ่เป็นหลัก *C. capsici* เข้าทำลายพริกผลเล็ก (พริกในกลุ่มพริกชี้หู) และ *C. piperatum* เข้าทำลายพริกยักษ์ (พริกหวาน) ลักษณะการเข้าทำลายก็คือ จะเกิดจุดดำน้ำขึ้น โดยที่ผิวของผลพริกจะมีรอยบุ๋มเล็กน้อย และมีอาการฉ่ำน้ำเป็นรูปวงกลมหรือวงรี ต่อมาแผลจะค่อย ๆ ขยายออกเชื้อราจะสร้างสปอร์ซึ่งเห็นเป็นวงกลมสีดำชัดเจน

การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราของผักและผลไม้ใช้สารเคมีควบคุมในแปลงปลูกและมีการใช้สารเคมีควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว เพราะการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวจะได้ผลหรือมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารเคมีกับผลไม้ก่อนการเก็บเกี่ยว สารเคมีที่ใช้ป้องกันโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลส้ม ได้แก่ thiabendazole, thiophanatemethyl, benomyl, guazatine, SOPP (sodium orthophenylphenate), 2-amino-butane, biphenyl และ captan (วิชชา และคณะ, 2546) ศึกษาการลดการเน่าเสียของส้มระหว่างการเก็บรักษา โดยนำส้มตราไปจุ่มยา benomyl และ imazalil ที่ 500 ppm แล้วนำไปเคลือบผิวด้วย Wax 551 พบว่าเมื่อเก็บไว้ 12 สัปดาห์ผลส้มที่จุ่มยาและเคลือบผิวดีกว่าวิธีอื่นๆ คือ เกิดโรคน้อยที่สุด ซึ่งการควบคุมโรคเน่าสีเขียวลหลังจากเก็บเกี่ยวโดยใช้ยาฆ่าเชื้อรานั้นเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเพราะอาจเกิดสารพิษตกค้างและเกิดการดื้อยาของเชื้อสาเหตุ เช่น การใช้ thiabendazole เพื่อควบคุมโรคเน่า ที่เกิดจากเชื้อ *P. digitatum* พบว่าเชื้อสาเหตุมีการต้านทานยาได้ดีขึ้น (Holmes and Eckertm, 1999) รายงานการวิเคราะห์การใช้ยากำจัดเชื้อราพบว่า *P. digitatum* สามารถต้านทานยา imazalil, thiabendazole และ o-phenylphenol เพิ่มขึ้น จากที่เกษตรกรนิยมใช้การป้องกันและควบคุมโรคที่เกิดกับพืช พบสารเคมีมีส่วนผสมของสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้และพืช โดยเฉพาะการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคราเน่าสีเขียว และโรคแอนแทรคโนส จึงทำให้มีการศึกษาวิธีการใหม่ๆ ที่จะนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช พบการศึกษาวิจัยโดยสารสกัดสมุนไพร เพื่อการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวเพิ่มขึ้น

ตีป्ली มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Piper retrofractum* Vahl. อยู่ในวงศ์ Piperaceae เป็นไม้เลื้อยชนิดหนึ่ง ใบรูปไข่ โคนมน ปลายแหลม เป็นพืชใบเดี่ยว คล้ายใบยางนางแต่ผิวใบมันกว่า บางกว่าเล็กน้อย ดอกเป็นรูปทรงกระบอกปลายมน เมื่อแก่จะมีผลเป็นสีแดง ตีป्लीมีสารสำคัญพวกสารอัลคาลอยด์ (Piperine) ประมาณ 4-6% Piplartine พบได้ในลำต้นและราก และมีสาร Alkaliod A ที่เป็นของเหลว นอกจากนี้ยังมีสาร Sesamim ,Dihydrostigmasterol และ Sterol น้ำมันหอมระเหยได้จากการนำตีป्लीแห้งมากลั่นด้วยไอน้ำ ประกอบด้วยสารหลักคือ Alpha-Thujene Terpinolene Zingiberene และ Para-Cymene เป็นต้น (วรรณภาพร, 2550) ซึ่งมักพบการใช้สารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อรา ดังงานวิจัยของ กัทลีวัลย์ และคณะ (2549) ศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ทางไหลและสารสกัดจากพืช ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา การสร้างสปอร์ การงอกของสปอร์ การงอกของเมตสโครโรเตีย และการควบคุมโรคพืช พบว่า สารสกัดสูตร 6 (ทางไหล : ตีป्ली : กานพลู อัตราส่วน 1:1:1 โดยปริมาตร ความเข้มข้น 1 %) มีประสิทธิภาพดีที่สุดสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ 5 ชนิด (*Sclerotium rolfsii* Marssonina sp. *Colletotrichum gloeosporioides* *Pythium* sp. และ *Phytophthora* sp.) ได้ 100 % ซึ่งพืชในวงศ์ Piperaceae มีสารสำคัญที่สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Srichana et al., 2009 พบว่า สารสกัดจากพลูสามารถควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *F. verticillidices* ได้ และพบสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยของ Amazon Piper species ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. cladosporioides* และ *C. sphareospermum* และในก้านและใบของชะพลูพบสารสำคัญที่ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* ได้

(Reigada et al., 2007; Masuda et al., 1991) ซึ่งการใช้สารสกัดจากพืชเป็นวิธีการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เพื่อทดแทนสารเคมีกำจัดโรคพืช ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่ศึกษาสารสกัดจากใบและผลดีปลีต่อการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium digitatum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมเชื้อราโรคพืชในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากดีปลีในการควบคุมเชื้อราก่อโรค *Penicillium digitatum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคพืช ในระดับห้องปฏิบัติการ

ระเบียบวิธีวิจัย

ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมเชื้อสาเหตุโรคพืช เชื้อราที่ใช้สำหรับงานวิจัยนี้ คือ *Penicillium digitatum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* โดยทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากส้มและมะม่วงจากห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี และนำราที่ได้มาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เพื่อเก็บเป็น stock culture ไว้ทำการทดลองในขั้นต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากใบและผลดีปลี

นำใบและผลดีปลีมาทำความสะอาดและผึ่งให้แห้ง จนได้น้ำหนักคงที่ แล้วนำมาบดเป็นชิ้นเล็กๆ บรรจุลงในภาชนะแก้ว เติมน้ำเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % จนท่วม แช่ตัวอย่างในตู้แช่กลายเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองแยกตัวอย่างสารสกัด แล้วนำสารสกัดที่กรองได้ไปผ่านขั้นตอนการระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง rotary evaporatory ที่อุณหภูมิ 40 °C ทำการระเหยจนกระทั่งสารสกัดมีลักษณะข้น นำตัวอย่างสารสกัดมาระเหยให้แห้ง ด้วยเครื่อง Vacuum Freeze Dryer และชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ โดยให้น้ำหนักคงที่ เก็บสารสกัดพืชที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบและผลดีปลีต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี poisoned food technique โดยผสมสารสกัดพืชในอาหาร PDA ที่ระดับความเข้มข้น 1,250, 2,500, 3,750 และ 5000 ppm นำอาหารที่ผสมสารสกัดไปฆ่าเชื้อในเครื่องหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารที่ผสมสารสกัดลงในจานเลี้ยงเชื้อ และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยชุดควบคุม ไม่ผสมสารสกัด เมื่อผิวหน้าของอาหารที่ผสมสารสกัดและชุดเปรียบเทียบแห้งสนิท นำชิ้นวุ้นที่ได้จากการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะเส้นใยรอบเชื้อรา *P. digitatum* และ *C. gloeosporioides* ที่มีอายุ 7 และ 14 วัน ตามลำดับ วางลงบนผิวหน้าอาหารที่ผสมสารสกัดจากพืช นำเชื้อบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28±1 °C) เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน ตามลำดับ และทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลอง โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [(A - B) / A] \times 100$$

เมื่อ A คือค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อราชุดควบคุม

B คือค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อราผสมสารสกัด

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์สถิติ จากการวิเคราะห์แบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ผลการวิจัย

นำสารสกัดจากใบและผลของดีปลีมาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. digitatum* สาเหตุโรคผลเน่าราสีชมพูที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±1°C) เป็นระยะเวลา 7 วัน ผลที่ได้ ดังนี้

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบตบตีต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* สาเหตุโรคพีช

สารสกัดจากใบของตบตีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* สาเหตุโรคผลเน่าราสีเขียว ในทุกระดับความเข้มข้น โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ 1,250 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีที่สุด โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 32.91 % และของสารสกัดที่ 3,750 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้น้อยที่สุด โดยมีการยับยั้งเท่ากับ 10.31 % ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 1

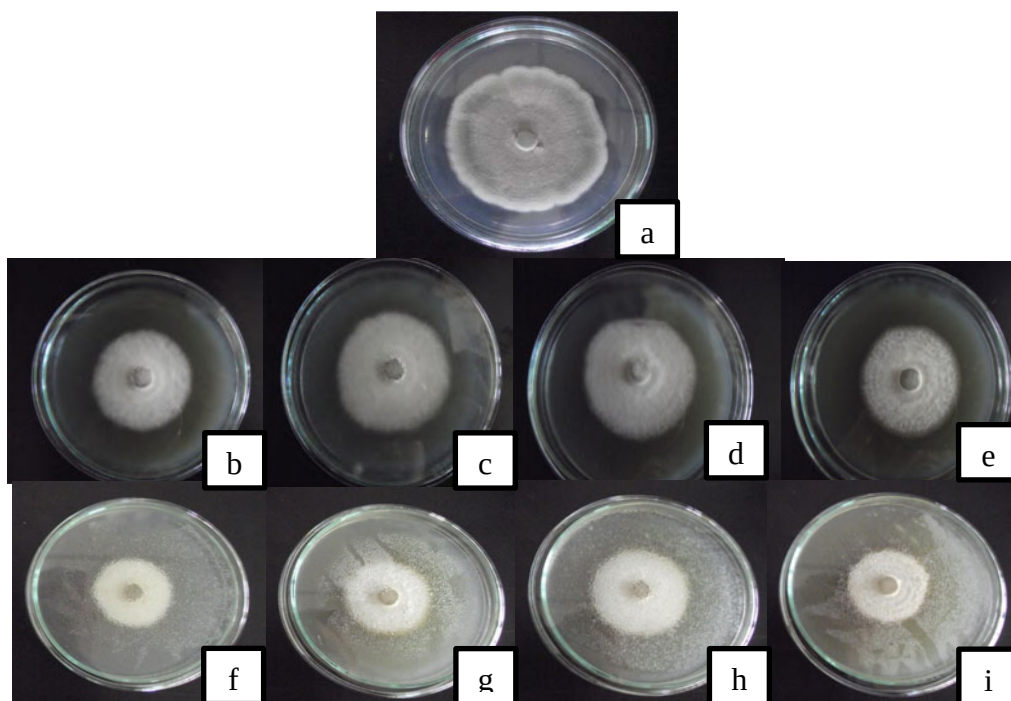
ประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลตบตีต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* สาเหตุโรคพีช

สารสกัดจากผลของตบตีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* สาเหตุโรคผลเน่าราสีเขียว ในทุกระดับความเข้มข้น โดยระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ 1,250 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีที่สุด โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 49.07% และระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ 3,750 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้น้อยที่สุด โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 33.13 % ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดจากตบตีต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum*

Treatment	Diameter of colony (cm)			Average (cm)	Diameter % inhibition
Leaves extract					
Control	4.3	2.5	3.5	3.43	0.00 ^c
1,250 ppm	3.2	1.6	2.2	2.33	32.91 ^a
2,500 ppm	3.9	1.8	2.8	2.83	19.42 ^{bc}
3,750 ppm	4.1	2.2	3.0	3.10	10.31 ^{cd}
5,000 ppm	3.2	1.6	2.7	2.50	21.48 ^b
Fruits extract					
Control	4.3	2.5	3.5	3.43	0.00 ^c
1,250 ppm	1.2	1.0	1.2	1.13	49.07 ^a
2,500 ppm	1.4	1.4	1.5	1.43	35.54 ^b
3,750 ppm	1.2	1.7	1.6	1.50	33.12 ^b
5,000 ppm	1.3	1.6	1.3	1.40	33.33 ^b

*ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์แบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



ภาพที่ 1 ผลของสารสกัดจากใบและผลของดีป्लीมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Penicillium digitatum* (a:ชุดควบคุม, b:ใบ 1250 ppm, c:ใบ 2500 ppm, d:ใบ 3750 ppm, e:ใบ 5000 ppm, f:ผล 1250 ppm, g:ผล 2500 ppm, h:ผล 3750 ppm, i:ผล 5000 ppm)

เมื่อนำสารสกัดจากใบและผลของดีป्लीมาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 1^{\circ}\text{C}$) เป็นระยะเวลา 14 วัน ผลที่ได้ ดังนี้

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบดีป्लीต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคพืช

สารสกัดจากใบของดีป्लीมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ทุกระดับความเข้มข้น โดยที่ระดับความเข้มข้น 1,250, 2,500, 3,750 และ 5,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 10.37, 20.00, 21.85 และ 31.48 % ตามลำดับ และพบว่า สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดโดยมีความแตกต่างทางนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % กับสารละลายความเข้มข้นอื่นๆ และชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 2

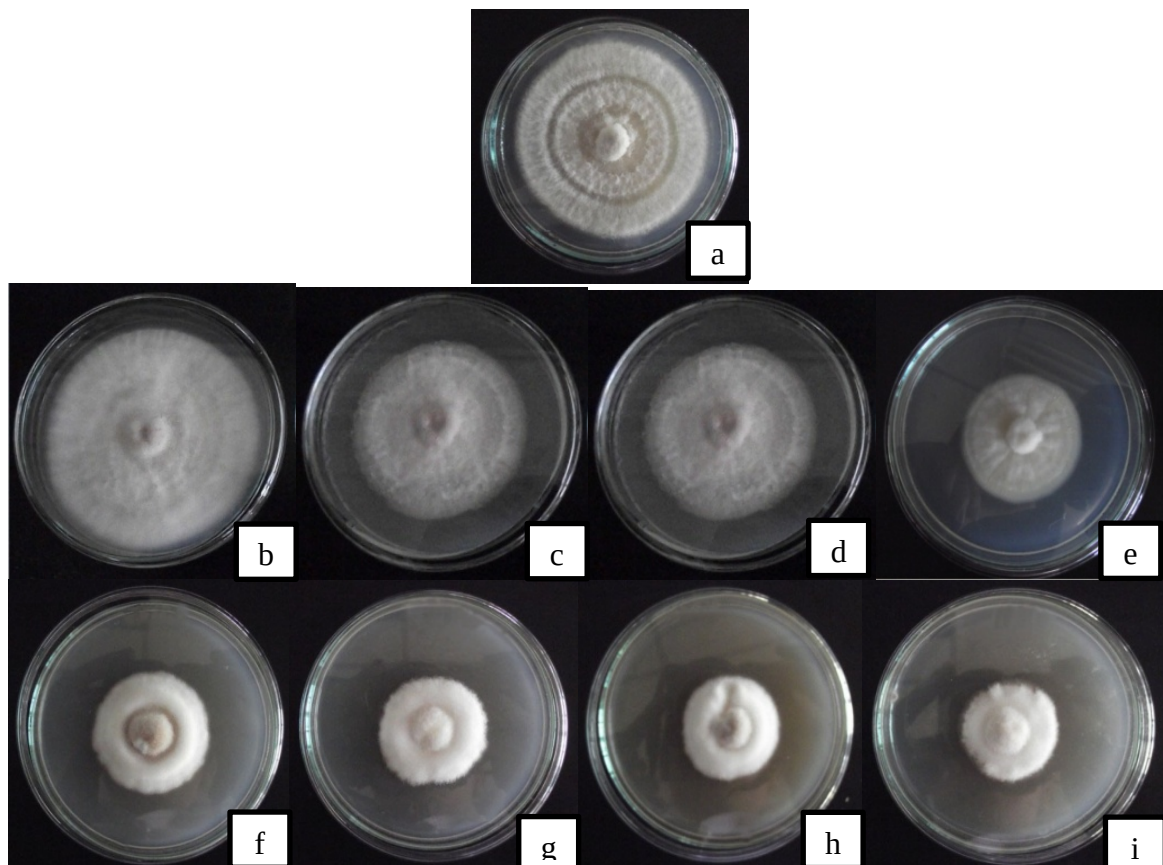
ประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลดีป्लीต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคพืช

สารสกัดจากผลของดีป्लीมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ทุกระดับความเข้มข้น โดยที่ระดับความเข้มข้น 1,250, 2,500, 3,750 และ 5,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 43.78, 51.77, 53.60 และ 58.20 % ตามลำดับ และพบว่า ทุกระดับความเข้มข้นมีค่ายับยั้งที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 2 และที่ความเข้มข้น 5,000 ppm ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรค

ตารางที่ 2 แสดงผลสารสกัดจากใบและผลดีปัสต่อการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส

Treatment	Diameter of colony (cm)			Average (cm)	Diameter % inhibition
Leaves extract					
Control	9.00	9.00	9.00	9.00	0.00 ^c
1,250 ppm	8.00	8.20	8.07	8.07	10.37 ^{bc}
2,500 ppm	6.00	7.90	7.20	7.20	20.00 ^{ab}
3,750 ppm	6.30	7.50	7.03	7.03	21.85 ^{ab}
5,000 ppm	4.80	6.60	6.17	6.17	31.48 ^a
Fruits extract					
Control	8.00	8.50	8.40	8.30	0.00 ^d
1,250 ppm	4.50	4.70	4.70	4.67	43.73 ^c
2,500 ppm	4.00	4.00	4.00	4.00	51.81 ^b
3,750 ppm	3.70	3.70	3.70	3.77	54.58. ^b
5,000 ppm	3.50	3.40	3.40	3.47	58.19 ^a

*ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการวิเคราะห์แบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดจากใบและผลของดีปัสมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* (a:ชุดควบคุม, b:ใบ 1250 ppm, c:ใบ 2500 ppm, d:ใบ 3750 ppm, e:ใบ 5000 ppm, f:ผล 1250 ppm, g:ผล 2500 ppm, h:ผล 3750 ppm, h:ผล 5000 ppm)

สรุปและอภิปรายผล

สารสกัดจากดีปัสสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* ได้ และระดับความเข้มข้นของสารสกัดของใบ และผลจากดีปัสเหมาะสมต่อการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียว สารสกัดทั้งใบและผลที่ระดับความเข้มข้น 1,250 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ทั้งนี้เนื่องจากในดีปัสมีน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ เช่นเดียวกับการวิจัยของ Ounchokdee et al., (2016) รายงานว่า สารสกัดจากดีปัสในตัวทำละลาย diethyl ether และ ethyl acetate มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช คือ *C. cladosporioides*, *C. capsici* และ *F. oxysporum* เช่นเดียวกับ Srichana et al., 2009 พบว่า สารสกัดจากพลุด้วยเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 10000 ppm สามารถควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *F. verticillides* ได้ จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบและผลดีปัสในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในอาหาร PDA ด้วยวิธี poison food technique พบว่าสารสกัดจากใบและผลดีปัสที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งดี โดยมิเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 31.48 % และ 58.20 % ตามลำดับ ใกล้เคียงกับผลการวิจัยของวันสนันท์และพิทยา (2548) ที่ศึกษาผลยับยั้งของสารสกัดจากผลดีปัสต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ 100 % พบสารสำคัญในดีปัสซึ่งมี piperine เป็นสารองค์ประกอบหลัก นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* อีกทั้งทางด้านการเกษตรมีการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการนำสารสกัดจากพืชที่ประกอบด้วยสาร piperine พบว่ามีฤทธิ์ฆ่าแมลง ได้แก่ หนอนกระทู้ผัก ลูกน้ำและตัวเต็มวัยยุงลาย เป็นต้น (วันดี, 2534; โสภา, 2537 และรัตติยา, 2542)

นอกจากนี้ดีปัสยังเป็นพืชวงศ์เดียวกับใบพลูควา ซึ่งวรัญญาและคณะ (2545) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากใบพลูควาต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบพลูควาสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ 12 ชั่วโมง ไม่พบการงอกของสปอร์ และจากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อราโดยวิธี paper disc technique พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อได้เท่ากับ 2,000 ppm ซึ่งมีค่าตรงกันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งได้บนแผ่น TLC-plate โดยน้ำมันหอมระเหยมีผลทำให้ลักษณะและองค์ประกอบของเซลล์เชื้อราเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยเซลล์มีลักษณะรูปร่างเบี้ยวผิดรูป ทั้งนี้อาจเนื่องจากการปลดปล่อยของเหลวภายในเซลล์ออกมาภายนอกเซลล์ (plasmolysis) เนื่องจากทุกส่วนประกอบของเซลล์เชื้อรามีความสำคัญต่อการเจริญและพัฒนาของเซลล์ ดังนั้นจึงส่งผลให้เส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* เจริญได้ช้ามาก แสดงให้เห็นว่าสารสกัดดีปัสมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้ดี และจากผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดดีปัสในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในอาหาร PDA พบว่าการเจริญของเส้นใยเชื้อรามีลักษณะเส้นใยโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดจากผลดีปัสมีความผิดปกติ โดยเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA มีลักษณะเส้นใยฟู อัดแน่น สอดคล้องกับการวิจัยของ ชาศรีย์และคณะ (2549) ที่ทำการวิจัยผลของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก พบว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 10,000 – 15,000 ppm เส้นใยของเชื้อมีการเจริญขึ้นสู่ด้านบนมากกว่าที่จะเจริญออกสู่ด้านข้าง นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อมีการสร้างเส้นใยอัดกันแน่นมาก โดยเฉพาะบริเวณตรงกลางโคโลนี และที่ระดับความเข้มข้น 20,000 ppm สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100 %

เอกสารอ้างอิง

- กัทลิวัลย์ สุขช่วย ญัฐชัย เทียงบุรณธรรม และจุฑารัตน์ ทิพย์ชู. (2549). **ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ทางไทย ในการควบคุมโรคพืชบางชนิดในสภาพห้องปฏิบัติการและโรงเรือน**. สถาบันวิจัยและฝึกอบรม การเกษตรลำปาง
- ชาศรีย์ เหล่ามนโนธรรม ชลิดา เล็กสมบุรณ์ และชัยณรงค์ รัตนกริยากุล. (2549). **ผลของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- दनัย บุญญเกียรติ. (2543). **โรคหลังเก็บเกี่ยวของพืชสวน**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. หน้า 156

- วันสนันท์ สะอาดล้วน และ พิทยา สรวมศิริ.(2548). ผลยับยั้งของสารสกัดจากผลดิบต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วง. วารสารเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 251-257
- วรรณภาพร กลั่นประสิทธิ์. (2550). ดิบลิ. สืบค้นจาก <http://www.learners.in.th/blogs/posts/30839> [15 พฤศจิกายน 2550]
- วรัญญา อาจจันทิก วิชา สะอาดสุด อูราภรณ์ สะอาดสุด และ ดำรัส ทรัพย์เย็น (2545). ผลของสารสกัดจากใบพลูควาต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 33 (6) (พิเศษ) : 87-90
- วิชา สะอาดสุด อูราภรณ์ สะอาดสุด และสาริณี ประสาทเขตต์กรณ์. (2546). การควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงและผลเน่าของส้มเขียวหวานหลังเก็บเกี่ยว. รายงานโครงการวิจัยประจำปี ที่ 1 ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- วันดี กฤษณพันธ์. (2534). พืชเคมีเบื้องต้นยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. ภาควิชาวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร.
- สมศิริ แสงโชติ เนตรนภิส เขียวขำ และศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ. (2553). การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* โดยใช้สารสกัดกิ่งบริสุทธิจากขมิ้น และโคโตแซน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41: 1(พิเศษ), หน้า 287-290
- โสภา ห้วนแสง. (2537). โครงสร้างและฤทธิ์การควบคุมแมลงของสารประกอบจากต้น *Aglaia oligophylla* Miq. และการคัดเลือกของต้นดิบลิ (*Piper retrofractum* Vahl.) กับพริกไทย (*Piper nigrum* L.) เพื่อควบคุมแมลง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 142 หน้า.
- รัตติยา นวลหล้า. (2537). การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูในกระถาง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 91 หน้า.
- Holmes, G.J. and Eckertm, J.W. (1999). Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Journal of Phytopathology* 89: 716- 721.
- Masuda, T., Inazumi, A., Yamada, Y., Padolina, W. G., Kikuzaki, H. and Nakatani, N. (1991). Antimicrobial phynylpropanoides from *Piper samentosum* . *Phytpchemistry* 30:3227-3228.
- Ounchokdee, U., Rueangrit, S. and Dethoup, T. (2016). Antifungal activity profile of *Piper longum* fruit extract against plant pathogenic fungi. *Journal of Biopesticides* 9(2) :97-103.
- Reigada, J. B., Tcacenco, C. M., Andrade, L. H. and Kato, M. J. (2007). Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq.(Piperaceae)- antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). *Ttrahedron Asymmetry*. 18: 1054-1058.
- Silva, J. K. R., Pinto, L. C., Burbano, R. M. R. and Montenegro, R. C. (2014) Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrail Crops and Products*. 58: 55-60.
- Srichana, D., Phumruang, A. and Chongkid, B. (2009). Inhibition Effect of Betal Leaf Extract on the Growth of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Thammasat International Journal of Science and Technology* 14 No.3, July-September.
- Snowdon, A.L. (1990). Color atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables, Vol. 1: General introduction and fruits. Boca Raton, FL: CRC Press.

ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อม จังหวัดสกลนคร

กฤษณ์ พิเนตรเสถียร¹

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร จ.สกลนคร 47000

email: krit807@gmail.com

บทคัดย่อ

การสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อมในจังหวัดสกลนคร มีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมชนิดของพืชที่ให้สีย้อมจากพืชในชุมชนที่มีการทอผ้า และเทคนิคการใช้พืชทำสีย้อมผ้า ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อความสำเร็จของผู้ผลิตผ้าย้อมสีธรรมชาติในด้านการผลิตคือสีที่นำมาย้อม เป็นฐานทำให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อก่อให้เกิดรายได้เข้าสู่ชุมชน ในการสำรวจครั้งนี้ลงพื้นที่สำรวจและสัมภาษณ์ชุมชนที่เกี่ยวข้องกับการย้อมสีธรรมชาติในจังหวัดสกลนคร ผลการสำรวจพบพืชที่ให้สีย้อมทั้งหมด 71 ชนิด โดยพบว่า ส่วนของพืชที่ใช้ย้อมคือเปลือก ต้น ผล และใบ แหล่งที่มาของพืชที่ให้สีย้อมได้แก่ บ้าน ป่า ชุมชน และภูเขา พืชที่มีค่ารายงานการใช้ (Use Value Index) มาก ได้แก่ ครามตรง(*Indigofera tinctoria*) ครามงอ(*Indigofera suffruticosa*) ประดู่(*Pterocarpus indicus*) มะม่วง(*Mangifera indica*) คูณ(*Cassia fistula*) และขนุน(*Artocarpus heterophyllus*) เทคนิคการใช้พืชย้อมสีผ้า มี 2 แบบคือการย้อมเย็นและย้อมร้อน การย้อมเย็นคือสกัดสีย้อมโดยไม่ผ่านความร้อนได้แก่การย้อมคราม ส่วนการย้อมร้อนคือสกัดสีย้อมโดยการต้มขึ้นส่วนของพืชก่อนนำผ้ามาย้อม ได้แก่ การย้อมสีธรรมชาติจากเปลือกไม้ สีที่ได้จากพืชอาจให้สีมากกว่า 1 สีขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของพืชที่นำมาย้อม กรรมวิธีการย้อม การใช้สารช่วยย้อม นอกจากนี้พบว่าภูมิปัญญาในการใช้สารที่ช่วยติดสี (mordant) ได้แก่ เกลือแกง สารส้ม น้ำปูนใส น้ำมะขามเปียก น้ำด่าง ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นองค์ความรู้พื้นบ้านที่สมควรได้รับการถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไป เพื่ออนุรักษ์ภูมิปัญญาท้องถิ่นให้คงอยู่สืบไป

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางชีวภาพ, การย้อมสีธรรมชาติ, พืชให้สี

THE DIVERSITY OF DYEING PLANTS, SAKON NAKHON PROVINCE

Krit Phinetsathian¹

Program Biology Faculty of Science and Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, Sakon, Thailand

E-mail; krit807@gmail.com

Abstract

The diversity of dyeing plants at Sakon Nakhon Province aims to survey the diversity of dye plants and dyeing techniques are the success factors influencing the achievement of the occupational group, who produced natural dye cloth in order to develop the production for income to the community. This study were collected by area based on surveying and interviews with relevant people in community about natural dyeing at Sakon Nakhon Province. The findings were that there were 71 species of dyeing plants. The findings were that components of plants that provide color parts were bark, stem, fruits and leaves while dyeing resources collected from area house, community forest and the mountain. The use value index were *Indigofera tinctoria*, *Indigofera suffruticosa*, *Pterocarpus indicus*, *Mangifera indica*, *Cassia fistula* and *Artocarpus heterophyllus*. The dyeing technique found that 2 types were cool dyeing (color extracted by ferment method) such as kram dyeing and hot dyeing (color extracted by boiling method) such as natural dyeing from bark. The color shading more than one shade depending on the components of plant species, dyeing process and mordanting. Besides were found mordant: salt, alum, limewater, tamarind juice and alkali water. These traditional knowledge appropriately pass on next generation and conservation to remain forever.

Keywords: biodiversity; natural dyeing; dyeing plants

บทนำ

สีธรรมชาติ คือ สีที่มีแหล่งกำเนิดจากธรรมชาติ ซึ่งส่วนใหญ่ได้มาจากส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ เปลือกไม้ แก่นไม้ ใบ ดอก และผล โดยมีแหล่งวัตถุดิบสำหรับสีย้อมผ้าธรรมชาติมักเป็น พืชให้สีที่มีอยู่ในแต่ละท้องถิ่น (ศูนย์วิชาการและเทคโนโลยีสิ่งทอพื้นบ้าน, 2558)

การย้อมสีธรรมชาติเป็นส่วนหนึ่งในภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีการสืบทอดจากอดีตให้คงอยู่ในสังคมปัจจุบัน และมีกระแสดความต้องการอนุรักษ์ และสืบทอดภูมิปัญญาท้องถิ่น โดยได้รับการสนับสนุนจากภาครัฐ ภาคเอกชน และประชาชนทั่วไป ในประเทศไทยชาวบ้านได้นำสีธรรมชาติที่จัดเป็นทรัพยากรในแต่ละท้องถิ่นมาอ้อมเส้นด้ายจากเส้นใยธรรมชาติ เช่น ฝ้าย และไหม ก่อนนำมาทอเป็นผืนผ้า และตัดเย็บเป็นผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การย้อมผ้าด้วยสีย้อมจากธรรมชาติมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าการใช้สังเคราะห์ซึ่งมีสารเคมีที่อันตราย เช่น ในอุตสาหกรรมสิ่งทอมักมีสารตกค้าง สารเคมีปนเปื้อนในน้ำทิ้ง ที่เกิดจากกระบวนการฟอกย้อม ทำให้แหล่งน้ำในธรรมชาติเน่าเสีย ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงานฟอกย้อม เพราะสีสังเคราะห์บางประเภทมีส่วนผสมที่เป็นสารก่อมะเร็ง ทำให้เกิดความระมัดระวังในการใช้สิ่งทอที่ย้อมด้วยสังเคราะห์จากผลกระทบต่อที่เกิดขึ้นจึงเกิดการตื่นตัวในการใช้สิ่งทอที่ได้มาจากการย้อมสีธรรมชาติจึงเพิ่มมากขึ้น (ศูนย์วิชาการและเทคโนโลยีสิ่งทอพื้นบ้าน, 2558) การใช้สีย้อมจากธรรมชาติเป็นการลดการใช้สารเคมีก่อโรคต่าง ๆ ในระบบทางเดินหายใจ โรคกระเพาะ และโรคผิวหนัง ซึ่งต่างจากสีธรรมชาติเป็นสีที่บริสุทธิ์ ไม่มีพิษต่อร่างกายไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ ผ้าที่ได้มีความโดดเด่นเฉพาะตัว สีไม่ตก และเสริมความทนทานให้กับวัสดุที่นำมาอ้อม แต่ขั้นตอนการทำซับซ้อน ต้องอาศัยทักษะ ความอดทน ความชำนาญ และประสบการณ์ในการย้อม (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2558)

ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจจะศึกษาพืชให้สีย้อม ของหมู่บ้านที่มีฐานทรัพยากรธรรมชาติ และมีภูมิปัญญาการย้อมสีจากธรรมชาติ ซึ่งได้รับการถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่น และได้รับการพัฒนาองค์ความรู้ต่าง ๆ จากทางภาครัฐ และเอกชนในการพัฒนานำส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เปลือกไม้ แก่นไม้ ใบ ดอก และผล มาใช้ในการย้อมสีผ้าในจังหวัดสกลนคร เพื่อนำสีที่ได้ไปใช้ทดแทนสีที่ทำมาจากสารเคมี และใช้เป็นฐานข้อมูลสนับสนุนการศึกษาค้นคว้าและการทำวิจัยเกี่ยวกับพืชให้สีต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อมในจังหวัดสกลนคร
2. เพื่อศึกษาเทคนิคในการสกัดสีย้อมและสีที่ได้จากพืชให้สีย้อมในจังหวัดสกลนคร

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การรวบรวมข้อมูล

1.1 การศึกษาความหลากหลายของพืชให้สีย้อม มีวิธีการดังนี้

1.1.1 สัมภาษณ์ปราชญ์ชาวบ้าน ผู้ที่มีความรู้ในด้านการใช้ประโยชน์จากพืชให้สี โดยออกแบบสอบถามสอบถามเกี่ยวกับ ชื่อพืช ส่วนที่ใช้ และลักษณะการใช้ประโยชน์ในงานย้อมสี

1.1.2 เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนพืชให้สี (เปลือกไม้ แก่นไม้ ใบ ดอก และผล)

1.1.3. การจำแนกชนิดโดยใช้คู่มือ หนังสือพันธุ์ไม้ย้อมสีธรรมชาติ (พินัย ห่องทองแดง, 2548)

1.2 การศึกษาเทคนิคในการสกัดสีย้อมและสีที่ได้จากพืชให้สีย้อม มีวิธีการดังนี้

1.2.1 การย้อมร้อน (กระบวนการสกัดสีโดยใช้ความร้อน) การเตรียมสารสกัดจากพืชให้สีและศึกษาสีที่ได้จากการย้อม ซึ่งตัวอย่างพืชแห้ง 100 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เพื่อเป็นตัวทำละลายสารสี จากนั้นนำไปต้มอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองตะกอนออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำน้ำสารสกัดจากพืชให้สีไปวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter และนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปโดยนำผ้าฝ้ายลงย้อมกับสารสกัดจากพืชให้สีที่เตรียมได้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วล้างผ้าด้วยน้ำให้สะอาดจนน้ำไม่มีสี นำผ้าฝ้ายที่ย้อมแล้วมาผึ่งในที่ร่มให้แห้งจากนั้นทำการสังเกตสี

1.2.2 การย้อมเย็น (กระบวนการสกัดสีโดยการหมัก) สัมภาษณ์ปราชญ์ชาวบ้าน

2. การวิเคราะห์ข้อมูล เป็นส่วนที่ระบุให้ทราบวิธีการในการวิเคราะห์ข้อมูล ทั้งเชิงปริมาณจากข้อมูลการสำรวจความหลากหลายชนิดพืช และภูมิปัญญาการใช้ประโยชน์พืช โดยวิเคราะห์ข้อมูลจากแบบสัมภาษณ์ และคุณภาพจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ

ผลการวิจัย

1. ข้อมูลการสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อมในพื้นที่ ของจังหวัดสกลนคร ภาพที่ 1 แต่เดิม จังหวัดสกลนครมีหลายกลุ่มชาติพันธุ์ เช่น ลาวอีสาน ภูไท ไทญ้อ กะเลิง ไส้ ไย้ ซึ่งล้วนมีวัฒนธรรมการแต่งกายที่เป็นเอกลักษณ์ร่วม คือนิยมใส่เสื้อผ้าสีดำและสีน้ำเงิน ที่มาจากการย้อมครามซึ่งอยู่ในวิถีชีวิตตั้งแต่บรรพบุรุษในอดีตเป็นต้นมา เทคนิคการย้อมผ้า ภูมิปัญญาในการใช้สารที่ช่วยติดสี (mordant) ได้แก่ เกลือแกง สารส้ม น้ำปูนใส น้ำมะขามเปียก น้ำด่าง ทำให้เกิดการพัฒนาลวดลายหลากหลายสีสันทที่เกิดขึ้น และจากการสำรวจและสัมภาษณ์ พบว่าชนิดของพันธุ์พืชให้สีย้อมธรรมชาติ มีจำนวน 32 วงศ์ 71 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพืชที่อยู่ในท้องถิ่นนั้นๆ เช่น มะเกลือ ผาง ประดู่ มะขาม มะม่วง คำแสด และ สมอ เป็นต้น บางชนิดนำมาปลูกเพื่อการย้อมโดยเฉพาะ เช่น ครามตรง ครามงอ และขนุน เป็นต้น มีรายละเอียดความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อมในจังหวัดสกลนคร และสีที่ได้จากพืชให้สีย้อมดังตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ภาพสัมภาษณ์ปราชญ์ชาวบ้าน และลักษณะการใช้ประโยชน์ในงานย้อมสี

ที่มา : ภาพถ่ายโดยนายภุชงค์ พินทรเสถียร เมื่อวันที่ 7 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2561

ตารางที่ 1 ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อมในจังหวัดสกลนคร และสีที่ได้จากพืชให้สีย้อม

ลำดับ	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ให้สีย้อม	สีที่ได้จากพืช
1	ANACARDIACEAE	<i>Anacardium occidentale</i> L.	มะม่วงหิมพานต์	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
2		<i>Mangifera indica</i> L.	มะม่วง	ใบ	เขียวเข้มอมน้ำตาล
3		<i>Mangifera caloneura</i> Kurz	มะม่วงป่า	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
4		<i>Spondias pinnata</i> (L.f.) Kurz	มะกอก	เปลือกลำต้น	เขียว
5	ARECACEAE	<i>Cocos nucifera</i> L.	มะพร้าว	ผล	เทาดำ
6	ASCLEPIADACEAE	<i>Marsdenia tinctoria</i> R.	ครามเถา	ใบและเถา	น้ำเงิน คราม

ตารางที่ 1 ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อมในจังหวัดสกลนคร และสีที่ได้จากพืชให้สีย้อม (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ให้สีย้อม	สีที่ได้จากพืช
7	BIGNONIACEAE	<i>Markhamia stipulata</i> (Wall.) Seem. ex K. Schum	แคนหางค่าง	เปลือกลำต้น	ขาว
8		<i>Millingtonia hortensis</i> L. f.	ปีบ	เปลือกลำต้น	เทา
9		<i>Oroxylum indicum</i> (L.) Kurz	เพกา	เปลือกลำต้น	เขียวอ่อน เขียวขี้ม้า
10	BIXACEAE	<i>Bixa orellana</i> L.	คำแสด	ผล	ส้ม แสด
11	BOMBRACACEAE	<i>Bombax ceiba</i> L.	จ้าว, หนู่น	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
12	CABOMBACEAE	<i>Delonix regia</i> (Bojer ex Hook.) Raf.	หางนกยูงฝรั่ง	แก่น	น้ำตาล
13	CLUSIACEAE	<i>Garcinia cowa</i> Roxb. ex Choisy	ชะมวง	เปลือกลำต้น	เหลือง
14	COMBRETACEAE	<i>Terminalia bellirica</i> (Gaertn.) Roxb	สมอพิเภก	เปลือกลำต้น	เหลือง
15		<i>Terminalia catappa</i> L.	หูกวาง	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
16		<i>Terminalia chebula</i> Retz.	สมอไทย	ใบ	สีเขียวยขี้ม้า
17	COSTACEAE	<i>Costus speciosus</i> (J.Konig) Sm.	เอื้องหมายนา	ดอก	แดง
18	DIPTEROCARPACEAE	<i>Dipterocarpus alatus</i> Roxb. ex G. Don	ยางนา	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
19	DIPTEROCARPACEAE	<i>Dipterocarpus obtusifolius</i> Teijsm. ex Miq.	เหียง	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
20	EBENACEAE	<i>Diospyros mollis</i> Griff.	มะเกลือ	ผล	ดำ
21		<i>Diospyros rhodocalyx</i> Kurz	ตะโกนา	ผล	น้ำตาล
22	EUPHORBIACEAE	<i>Phyllanthus emblica</i> L.	มะขามป้อม	ใบ	น้ำตาล
23	GENTIANACEAE	<i>Fagraea fragrans</i> Roxb.	กันเกรา	ใบ	เหลือง
24	IRVINGIACEAE	<i>Irvingia malayana</i> Oliv. ex a. Benn.	กระบก	ผล	เทา
25	LAMIACEAE	<i>Tectona grandis</i> (L.) Kurz	สัก	ใบ	น้ำตาล

ตารางที่ 1 ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อมในจังหวัดสกลนคร และสีที่ได้จากพืชให้สีย้อม (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ให้สีย้อม	สีที่ได้จากพืช
26	LECYTHIDACEAE	<i>Careya sphaerica</i> Roxb.	กระโดน	เปลือกลำต้น	แดง
27	LEGUMINOSAE	<i>Peltophorum dasyrhachis</i> (Miq.) Kurz	อะราง	เปลือกลำต้น	แดง
28		<i>Senna siamea</i> (Lam.) Irwin & Barneby	ขี้เหล็กบ้าน	ใบ	เขียวแกมเหลือง
29		<i>Parkia javanica</i> (Lam.) Merr.	เหรีียง	เปลือกลำต้น	ชมพู
30		<i>Acacia auriculiformis</i> A. Cunn. ex Benth.	กระถินณรงค์	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
31		<i>Indigofera tinctoria</i> L.	ครามตรง	ใบและต้น	น้ำเงิน คราม
32		<i>Indigofera suffruticosa</i> Mill.	ครามกอ	ใบและต้น	น้ำเงิน คราม
33		<i>Bauhinia purpurea</i> L.	ชงโค	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
34		<i>Samanea saman</i> (Jacq.) Merr.	จามจุรี	เปลือกลำต้น	เหลือง
35		<i>Acacia catechu</i> (L.f.) Willd.	สีเสียดเหนือ	แก่น	เหลือง
36		<i>Xylia xylocarpa</i> (Roxb.) Taub. var. <i>kerrii</i> (Craib & Hutch.) I.C.Nielsen	แดง	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
37		<i>Dialium cochinchinense</i> pierre	เขลง, หมากเค็ง	แก่น	น้ำตาลอมแดง
38		<i>Caesalpinia sappan</i> L.	ฝางเสน	แก่น	แดง
39		<i>Peltophorum pterocarpum</i> (DC.) Back. ex Heyne	นนทรี	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
40		<i>Adenanthera pavonina</i> L.	มะกล่ำต้น	แก่น	แดง
41		<i>Butea monosperma</i> (Lam.) Taub.	ทองกวาว	ดอก	แดง

ตารางที่ 1 ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อมในจังหวัดสกลนคร และสีที่ได้จากพืชให้สีย้อม (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ให้สีย้อม	สีที่ได้จากพืช
42	LEGUMINOSAE	<i>Pterocarpus indicus</i>	ประดู่	เปลือกลำต้น	แดง
43		<i>Sesbania grandiflora</i> (L.) Desv.	แคบ้าน	ใบ	เขียว
44		<i>Cassia fistula</i> L.	คูณ	ผล	เหลือง
45		<i>Albizia procera</i> (Roxb.) Benth.	ถ่อน	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
46		<i>Tamarindus indica</i> L.	มะขาม	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
47	LYTHRACEAE	<i>Lagerstroemia floribunda</i> Jack	ตะแบกนา	เปลือกลำต้น	เทา
48		<i>Punica granatum</i> L. var. <i>granatum</i>	ทับทิม	ผล	น้ำตาล
49		<i>Lagerstroemia speciosa</i> (L.) Pers.	อินทนิลน้ำ	เปลือกลำต้น	เทา
50	MALVACEAE	<i>Microcos paniculata</i> Linn.	พลับพลา (คอม)	เปลือกลำต้น	แดง
51	MALVACEAE	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	กระเจี๊ยบแดง	ดอก	แดง
52	MELIACEAE	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	สะเดา	เปลือกลำต้น	แดง
53	MORACEAE	<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.	ขนุน	แก่น	เหลือง
54		<i>Swietenia macrophylla</i> King	มะฮอกกานี	เปลือกลำต้น	แดง
55		<i>Morus alba</i> Linn.	หม่อน	ใบ	เขียว
56	MUSACEAE	<i>Musa sapientum</i> L.	กล้วย	กาบใบ	น้ำตาล
57	MYRTACEAE	<i>Syzygium cinereum</i> (Kurz) Chantar. & J. Parn.	หว่านา	เปลือกลำต้น	เทา
58		<i>Psidium guajava</i> Linn.	ฝรั่ง	แก่น	เหลือง
59		<i>Syzygium gratum</i> (Wight) S.N.Mitra var. <i>gratum</i>	เสม็ด	ใบ	น้ำตาล
60		<i>Eucalyrtus citriodora</i> Hook.	ยูคาลิปตัส	เปลือกลำต้น	น้ำตาล

ตารางที่ 1 ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อมในจังหวัดสกลนคร และสีที่ได้จากพืชให้สีย้อม (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนที่ให้สีย้อม	สีที่ได้จากพืช
61	PHYLLANTHACEAE	<i>Phyllanthus acidus</i> (L.) Skeels	มะยม	เปลือกลำต้น	น้ำตาล
62		<i>Antidesma puncticulatum</i> Miq.	มะเเฒ่า	ผล	แดง
63	POACEAE	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	ตะไคร้	เหง้า	เหลืองอ่อน
64	RUBIACEAE	<i>Morinda coreia</i> Buch.-Ham.	ยอป่า	แก่น	เหลือง
65		<i>Morinda citrifolia</i> L.	ยอบ้าน	แก่น	เหลือง
66	RUTACEAE	<i>Aegle marmelos</i> (L.) Correa ex Roxb.	มะตูม	ผล	เหลือง
67	SAPINDACEAE	<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Oken	ตะคร้อ	เปลือกลำต้น	แดง
68	SAPINDACEAE	<i>Lepisanthes rubiginosa</i> (Roxb.) Leenh	มะหวด	ผล	ม่วง
69	TILIACEAE	<i>Muntingia calabura</i> L.	ตะขบฝรั่ง	ใบ	เขียว
70	VERBENACEAE	<i>Duranta erecta</i> L.	เทียนทอง	ใบ	เขียว
71	ZINGIBERACEAE	<i>Curcuma roscoeana</i> Wall.	ขมิ้น	เหง้า	เหลืองอมส้ม

หมายเหตุ: ชื่อวงศ์ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ (เต็ม, 2557)

: ส่วนที่ให้สีย้อม เป็นข้อมูลจากการสัมภาษณ์

: สีที่ได้จากพืช เป็นข้อมูลจากห้องปฏิบัติการ

2. ผลการศึกษาเทคนิคในการสกัดสีย้อมและสีที่ได้จากพืชให้สีย้อม

2.1 จำแนกโดยวิธีการย้อมร้อน (กระบวนการสกัดสีโดยใช้ความร้อน) ภาพที่ 2 พบว่าสีของพันธุ์พืชได้ 7 โทนสี

- โทนสีแดง-ชมพู ได้แก่ เอื้องหมายนา กระโดน ละคราง เหยียง ผางเสน มะกล่ำต้น ทองกวาว ประดู่ พลับพลา กระเจี๊ยบแดง สะเดา มะฮอกกานี มะเฒ่า และตะคร้อ

- โทนสีเหลือง ได้แก่ ขมิ้น มะม่วง สมอพิเภก กันเกรา จามจุรี สีเสียดเหนือ คุณ ขนุน ฝรั่ง ตะไคร้ ยอป่า ยอบ้าน มะตูม และขมิ้น

- โทนสีน้ำตาล ได้แก่ มะม่วงหิมพานต์ มะม่วงป่า จั้ว หางนกยูงฝรั่ง หูกวาง ยางนา เหยียง ตะโกนา มะขามป้อม สัก กระถินณรงค์ ชงโค แดง เกล้ง นนทรี ถ่อน มะขาม ทับทิม กล้วย เสม็ด ยูคาลิปตัส และมะยม

- โทนสีเทา-ดำ ได้แก่ มะพร้าว ปับ กระบก ตะแบกนา อินทนิลน้ำ หวานา

- โทนสีม่วง ได้แก่ มะฮวด

- โทนสีส้ม-แสด ได้แก่ คำแสด

- โทนสีเขียว ได้แก่ มะม่วง มะกอก เพกา ขี้เหล็กบ้าน แคบ้าน หม่อน ตะขบฝรั่ง และเทียนทอง



ภาพที่ 2 ภาพการสกัดสีย้อมโดยวิธีการย้อมร้อน (กระบวนการสกัดสีย้อมโดยใช้ความร้อน)
ที่มา : ภาพถ่ายโดยนายภุชญ์ พิเนตรเสถียร เมื่อวันที่ 7 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2561

2.2 จำแนกโดยวิธีการย้อมเย็น (กระบวนการสกัดสีย้อมโดยการหมัก) ภาพที่ 3 พบว่าสีของพันธุ์พืชได้ 2

โทนสี

- โทนสีน้ำเงิน คราม ได้แก่ ครามฝักตรง ครามฝักงอ ครามเถา
- โทนสีดำ มะเกลือ



ภาพที่ 3 ภาพการสกัดสีย้อมโดยวิธีการย้อมเย็น (กระบวนการสกัดสีย้อมโดยการหมัก)
ที่มา : ภาพถ่ายโดยนายภุชญ์ พิเนตรเสถียร เมื่อวันที่ 7 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2561

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพของพืชให้สีย้อมในจังหวัดสกลนคร ทำการศึกษาระหว่างเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2560 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2561 โดยแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนที่หนึ่ง คือ สัมภาษณ์ข้อมูลจากปราชญ์ชาวบ้านที่มีความรู้เรื่องพืชให้สี ภูมิปัญญาในขณะย้อมผ้าคือการใช้สารที่ช่วยติดสี (mordant) ได้แก่ เกลือแกง สารส้ม น้ำปูนใส น้ำมะขามเปียก น้ำด่าง และเก็บตัวอย่างพืช เพื่อนำไปสกัดสีจากธรรมชาติด้วยวิธีการย้อมร้อนและย้อมเย็น โดยเลือกใช้ ส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ เปลือกไม้ แก่นไม้ ใบ ดอก และผล ขั้นตอนที่สอง คือ เทคนิคในการสกัดสีย้อมและสีที่ได้จากพืชให้สี ย้อม ได้ผลดังนี้พบพืชให้สีย้อมผ้าฝ้ายทั้งหมด 32 วงศ์ 71 ชนิด โดยพบพืชวงศ์ LEGUMINOSAE มีการใช้ประโยชน์มากที่สุด ได้แก่ ครามตรง ครามงอ แคบ้าน คุณ ประดู่ ก่อน สีเสียดเหนือ แดง จามจุรี และมะขาม เพราะเป็นพืชให้สีที่ปลูกง่าย โตเร็ว และบางชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างเป็นที่อยู่อาศัย ซึ่งชาวบ้านได้รับการสนับสนุนจาก โครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดสกลนคร ในโครงการปลูกป่า 3 อย่าง ประโยชน์ 4 อย่าง เพื่อสนองงานในพระราชดำริของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 9 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของอนุวัช หลานเศรษฐา และ ดนิตร์ โสภามร (2556) ที่สำรวจพืชให้สีในตำบลยอดเขาด อำเภอวังยาง จังหวัดนครพนม พบพืช Family LEGUMINOSAE มากที่สุดเช่นกัน การใช้ประโยชน์จากพืช ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของวิถีชีวิตชุมชนที่อาศัยอยู่ใกล้แหล่งทรัพยากรธรรมชาติ พบว่าปัจจัยที่ทำให้ชาวบ้านเข้าไปใช้ประโยชน์จากป่า คือความต้องการขั้นพื้นฐานในการใช้ประโยชน์จากป่าของชาวบ้านเพื่อการดำรงชีวิต ใช้ประโยชน์จากพื้นที่ป่าในเชิงพาณิชย์คือ การเก็บหาเห็ด สมุนไพร เก็บพืชผักอาหารหรือไม้ผล การหาแมลงและสัตว์ที่เป็นอาหาร และเก็บหาของป่าที่ใช้ประโยชน์อื่น ๆ

จำแนกชนิดสีโดยวิธีการย้อมร้อน (กระบวนการสกัดสีโดยใช้ความร้อน) ได้ 7 สี ดังนี้ (1) สีแดง-ชมพู (2) สีเหลือง (3) สีนํ้าตาล (4) สีเทา-ดำ (5) สีม่วง (6) สีส้ม-แสด และ (8) เขียว ส่วนที่ให้สีประกอบด้วย (1) ใบ (2) ดอก (3) เปลือกลำต้น (4) แก่น (5) เหง้า (6) ผลหรือฝัก ซึ่งแต่ละชนิดพันธุ์พืชอาจให้สีมากกว่า 1 สี ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของของพืชในการให้สี กรรมวิธีการย้อมสี เช่น ย้อมร้อน ย้อมเย็น การใช้สารช่วยย้อมหรือกระตุ้นสีธรรมชาติ เช่น ปูนใส น้ำด่าง น้ำโคลน และน้ำบาดาล การใช้สารติดสีในการย้อม ส่วนจำแนกโดยวิธีการย้อมเย็น (กระบวนการสกัดสีโดยการหมัก) ได้ 2 สี ดังนี้ (1) น้ำเงิน-คราม (2) สีดำ

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการดำเนินการโครงการอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชให้สีย้อมในชุมชนและการอนุรักษ์พันธุ์พืชให้สีย้อมไหมธรรมชาติที่กำลังจะสูญพันธุ์ หรือเพื่อเป็นการศึกษารวบรวมพันธุ์พืชให้สีย้อมไหมธรรมชาติ ให้เป็นแหล่งเรียนรู้ในด้านภูมิปัญญาของไหมสุรินทร์ต่อไป และทดสอบสารที่ช่วยย้อมชนิดต่างๆมีผลต่อการติดสีย้อมที่ได้จากธรรมชาติอย่างไร

เอกสารอ้างอิง

- โครงการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (ออนไลน์). สืบค้นจาก : กระเจี๊ยบแดง : http://www.rspg.or.th/plants_data/pdata_03.htm (14 มิถุนายน 2561).
- เต็ม สมิตินันท์. 2557. ชื่อพรรณไม้ในประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. สืบค้นเมื่อ 10 กรกฎาคม 2561. จาก <http://www.dnp.go.th/botany/mplant/index.aspx>
- ปิยาภรณ์ เพชรสูงเนิน. ภูมิปัญญาการย้อมสีธรรมชาติ. สุรินทร์ : ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ สุรินทร์, 2549.
- พรเพ็ญ โชชัย, ระมัด โชชัย และเมทินี ทวีผล. การย้อมสีเส้นด้ายฝ้ายด้วยสีย้อมธรรมชาติจากเปลือกจั่วสำหรับอุตสาหกรรมครอบครัว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต. กำแพงเพชร : มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร, 2558.
- พินัย ห่องทองแดง. พันธุ์ไม้ย้อมสีธรรมชาติ. กรุงเทพฯ : โครงการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2548.
- ศูนย์วิชาการและเทคโนโลยีสิ่งทอพื้นบ้าน. การย้อมผ้าด้วยสีธรรมชาติ. (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://www.kasetporpeang.com/forums/index.php?topic=67764.0;wap2>. (20 กรกฎาคม 2561).

ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดตาก. พืชให้สี ธรรมชาติ. (ออนไลน์).
 สืบค้นจาก : http://qsds.go.th/qthalsilk_center/Inside.php?Com_option = page&aid= 372&sub= 321&site =tak. (21 กรกฎาคม 2561).

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. การย้อมสีธรรมชาติ. (ออนไลน์). สืบค้นจาก:
http://www.ist.cmu.ac.th/cottonnaturalColor_Human.pho subnav =3.(8 กรกฎาคม 2561).

สุนต์ทิพย์ คงตันจันทร์พัก. “การพัฒนาสีย้อมผมจากพืชสมุนไพรไทย”, วารสารวิทยาศาสตร์เกษตรมหาวิทยาลัยเทคโนโลยี
 พระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 41 (3/1) : 426 ; กันยายน-ธันวาคม 2553.

อนุวัช หลานเศรษฐา และดนิตร์ โสภภาพรม. สสำรวจพืชที่ให้สีในตำบลยอดขาด อำเภอวังยาง จังหวัด
 นครพนม. โครงการวิจัยทางชีววิทยา. สกลนคร : มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร, 2556.

ความสามารถในการต้านโรคเบาหวานผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จากผักพื้นบ้านท้องถิ่นในเขตพื้นที่หมู่ 9 ตำบลขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี

อารยา ปรานประวิตร

สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

email: a.pranprawit@gmail.com

บทคัดย่อ

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase) และแอลฟาไกลูโคซิเดส (alpha-glucosidase) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ในผู้ป่วยโรคเบาหวานการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสสามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจผักพื้นบ้านในท้องถิ่นพื้นที่หมู่ 9 ต.ขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี และศึกษาฤทธิ์การต้านโรคเบาหวานของผักพื้นบ้านดังกล่าวในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ข้อมูลจากสำรวจเบื้องต้นพบผักพื้นบ้านจำนวน 18 ชนิดที่ถูกนำไปใช้ในการรักษาโรคเบาหวานโดยหมอพื้นบ้าน ประกอบด้วย กะเพรา (*Ocimum tenuiflorum* Linn.), ขี้เหล็ก (*Senna siamea* (Lam.) Irwin & Berneby), ตำลึง (*Coccinia grandis* (L.) Voigt), เตยหอม (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *Unguiculata*), ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica* Forssk.), มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* Linn.), มะเขือพวง (*Solanum torvum* Sw.), มะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium occidentale* Linn.), มะระ (*Momordica charantia* Linn.), มะระขี้นก (*Momor dica charantia* Linn.), มะรุม (*Moringa oleifera* Lamk.), ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera* (Linn.) Burm.f.), เนียง (*Archidendron jiringa* Nielsen), สะเดา (*Azadirachta indica* A. Juss. var. *Indica*), สะตอ (*Parkia speciosa* Hassk.), หมุย (*Micromelum minutum* (G. Forst.) Wight & Arn.) และห้วปลี (*Musa acuminata* Colla) โดยพบว่าในจำนวนผักพื้นบ้านดังกล่าว มะม่วงหิมพานต์ (ใบ) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุด เท่ากับ 92.98 ± 4.65 เปอร์เซ็นต์ เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Acarbose รองลงมา คือ ใบกะเพราและยอดสะเดา (68.01 ± 3.40 เปอร์เซ็นต์ และ 66.16 ± 3.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) นอกจากนั้น สะเดา (ใบและยอดอ่อน) ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสสูงสุด คือ 82.41 ± 4.12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่า Acarbose ซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวาน (81.89 ± 1.64 เปอร์เซ็นต์) ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าผักพื้นบ้านเหล่านี้มีแนวโน้มในการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้ดี โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตในร่างกาย

คำสำคัญ : ผักพื้นบ้าน, โรคเบาหวาน, เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส, เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

Potential diabetes prevention through key enzymes inhibition from local vegetables in Moo 9, Khun-Thalay Sub-district, Muang District, Suratthani Province

Araya Pranprawit

Department of Public Health, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University
email: a.pranprawit@gmail.com

Abstract

Alpha- amylase and alpha- glucosidase enzymes are important for starch and carbohydrate metabolizing process into monosaccharides. Inhibition of the activity of these enzymes can help to reduce blood glucose level in patients with diabetes. The objective of this research was to survey local vegetables used for diabetic treatment in Moo 9, Khun-Taley Sub district, Muang, SuratThani and to evaluate alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activities of these local vegetables. Data from the survey indicated that a total of 18 local vegetables traditionally used for treatment of diabetes and/or lowering hyperglycemia by local healer, including; *Ocimum tenuiflorum* Linn., *Senna siamea* (Lam.) Irwin & Berneby, *Coccinia grandis* (L.) Voigt, *Pandanus amaryllifolius* Roxb., *Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *Unguiculata*, *Ipomoea aquatica* Forssk., *Phyllanthus emblica* Linn., *Solanum torvum* Sw., *Anacardium occidentale* Linn., *Momordica charantia* Linn., *Momor dica charantia* Linn., *Moringa oleifera* Lamk., *Aloe vera* (Linn.) Burm.f., *Archidendron jiringa* Nielsen, *Azadirachta indica* A. Juss. var. *Indica*, *Parkia speciosa* Hassk., *Micromelum minutum* (G. Forst.) Wight & Arn. and *Musa acuminata* Colla. Among these local plants, the extract of *Anacardium occidentale* Linn. exhibited the highest anti-alpha amylase activity ($92.98 \pm 4.65 \%$), which was equal to the activity of the standard Acarbose, followed by the extract of *Ocimum tenuiflorum* Linn. and *Azadirachta indica* A. Juss. var. *Indica* (68.01 ± 3.40 and 66.16 ± 3.31 , respectively). Furthermore, the extract of *Azadirachta indica* exhibited the highest anti-alpha glucosidase activity ($82.41 \pm 4.12 \%$), slightly higher than the authentic drug, Acarbose. The data from this study showed the promising used of local vegetables for prevention of diabetes through alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory pathways.

Keywords: local vegetables; diabetes; alpha-amylase enzyme; alpha-glucosidase enzyme

บทนำ

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) เป็นโรคหนึ่งในกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (non-communicated diseases) ที่นับเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยในปัจจุบัน โรคเบาหวานเป็นภาวะที่ร่างกายมีระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดต่ำ หรือเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกายมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลินน้อยลงหรือนำอินซูลินที่มีอยู่ไปใช้ไม่ได้ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของระบบการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน จนทำให้น้ำตาลในเลือดสูงกว่าระดับปกติ (Diatewa, 2004) โดยผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ จะส่งผลข้างเคียงทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ ตามมาอีกด้วย เช่น ความดันโลหิตสูง หลอดเลือดหัวใจตีบ ตามัว ไตเสื่อมจนอาจถึงภาวะไตวาย ฯลฯ จากรายงานของ International Diabetes Federation ในปี 2012 พบว่า ปัจจุบันมีประชากรทั่วโลกที่เป็นโรคเบาหวานทั้งสิ้น 387 ล้านคน และคาดว่าจะอุบัติการณ์ของการเกิดโรคเบาหวานจะเพิ่มขึ้นเป็น 552 ล้านคนทั่วโลกภายในปี 2030 นอกจากนี้ ยังพบว่ามีผู้เสียชีวิตจากภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคเบาหวานประมาณ 3.2 ล้านคนต่อปี หรือมีผู้เสียชีวิตประมาณ 6 คนต่อวินาที (IDF, 2012) สำหรับในประเทศไทย อัตราความชุกของโรคเบาหวานในประชากรที่มีอายุ 35 ปีขึ้นไป ในปี 2543 เท่ากับร้อยละ 9.6 ของประชากรทั้งหมด หรือคิดเป็นจำนวนทั้งสิ้น 2.4 ล้านคน

การลดระดับน้ำตาลในเลือด และ/หรือการรักษากระดับน้ำตาลในเลือดให้คงที่ เป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาอาการของโรคเบาหวานที่ใช้ได้ผลดี ในปัจจุบัน มีการใช้ยาประเภท Acarbose, Miglitol และ Voglibose (Dong et al., 2012) ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานลดลง แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า ยาดังกล่าวเหล่านี้มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยเบาหวาน เช่น ทำให้เกิดอาการท้องอืด และท้องร่วง เป็นต้น ดังนั้นการใช้พืชผักพื้นบ้านหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและกำลังเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase) และเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (alpha-glucosidase) เป็นเอนไซม์ซึ่งอยู่ที่บริเวณผนังเซลล์ของลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ดังนั้น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิด จะสามารถช่วยลดการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดและชะลอการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในกระแสเลือด ข้อมูลจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ (*in-vitro* experiments) พบว่า สารสกัดจากผักและผลไม้หลายชนิด เช่น มะเขือยาว หัวหอม และสตรอเบอรี่ ฯลฯ มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (alpha-glucosidase) ส่งผลให้ชะลอการดูดซึมกลูโคสและลดการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลเข้าสู่กระแสเลือด (Kwon et al. 2008; Cheplick et al. 2010; Kim et al. 2010; El-Beshbishy and Bahashwan, 2012) นอกจากนั้น การศึกษาของ Kim ในสัตว์ทดลองในปี 2012 ยังพบอีกว่า สารสกัดจากพืชน้ำทองถิ่นของประเทศเกาหลี (*Ecklonia cava*) มีคุณสมบัติช่วยกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน และลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวาน

รายงานการวิจัยเป็นจำนวนมาก พบว่าสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ที่พบในพืช มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ซึ่งมีความสัมพันธ์ในการช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเรื้อรังชนิดต่างๆ (วรานนท์ ทองอินลา และคณะ, 2557) นอกจากนั้น พืชผักพื้นบ้านเหล่านี้ยังมีปริมาณสารพฤกษเคมีประเภทสารประกอบฟีนอลิก (Phenolics) ในปริมาณสูง ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าผักพื้นบ้านเหล่านี้อาจมีคุณสมบัติในการป้องกันหรือต้านโรคเบาหวานได้ แต่อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับคุณสมบัติในการต้านโรคเบาหวานของพืชผักพื้นบ้านทองถิ่นเหล่านี้ยังมีอยู่อย่างจำกัด การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการลดระดับน้ำตาลในเลือดและฤทธิ์การต้านโรคเบาหวานผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase) และเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (alpha-glucosidase) ของผักพื้นบ้านที่บริโภคในทองถิ่นจังหวัดสุราษฎร์ธานี เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำพืชผักพื้นบ้านในทองถิ่นเพื่อประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรคเบาหวานต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเก็บรวบรวมตัวอย่างผักพื้นบ้านทองถิ่นในเขตพื้นที่หมู่ 9 ต.ขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านโรคเบาหวานผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase) และเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (alpha-glucosidase) ในผักพื้นบ้านทองถิ่น

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างผักพื้นบ้าน

สำรวจข้อมูลผักพื้นบ้านที่นิยมบริโภคในเขตพื้นที่หมู่ 9 ต.ขุนทะเล อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี โดยใช้แบบสอบถาม ตารางระบุรายการผักพื้นบ้านเพื่อรวบรวมชนิด แหล่งที่ได้มาของผักพื้นบ้าน วิธีการใช้ประโยชน์ในด้านการนำมาประกอบอาหาร และการสัมภาษณ์ผู้นำชุมชน ประชาชนชาวบ้านของพื้นที่หมู่ 9 ต.ขุนทะเล อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี พร้อมทั้งเก็บตัวอย่าง ผักพื้นบ้านเพื่อตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์และเปรียบเทียบตัวอย่างพืช ณ หอพรรณไม้ (Herbarium) ตามหลักอนุกรมวิธาน

2. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดผักพื้นบ้าน

นำตัวอย่างผักพื้นบ้านมาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (blender) ทำการสกัดสารออกฤทธิ์ด้วยตัวทำละลายน้ำ (water) โดยใช้อัตราส่วนพืช 1 กรัมต่อตัวทำละลาย 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสออกเก็บไว้ ส่วนที่เป็นตะกอนนำมาเติมตัวทำละลายน้ำอีก 5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงซ้ำที่ความเร็วรอบเดิมอีก 5 นาทีและนำส่วนใสมารวมกัน หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง whatman#1 เก็บสารสกัดที่ได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase) ของสารสกัดผักพื้นบ้าน

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylase) ด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Gowri et al. (2007) โดยนำสารสกัดผักพื้นบ้านจำนวน 300 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นให้เต็มสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (4.0 unit/ml) จำนวน 250 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น เติมน้ำกลั่นให้เต็มสารละลาย 1% (w/v) จำนวน 250 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการ เติมน้ำกลั่นให้เต็มสารละลาย dinitrosalicylic acid colour reagent 500 ไมโครลิตร (เตรียมจาก 3,5-dinitrosalicylic acid 1 กรัม และ sodium potassium tartrate 30 กรัม ผสมกับ 2N NaOH จำนวน 20 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น) นำส่วนผสมทั้งหมดที่ได้ไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงระหว่าง 85-90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากครบเวลาดังตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเจือจางส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Acarbose ซึ่งใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน และนำไปคำนวณหาร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition activity) ดังสูตร

$$\% \text{ inhibition activity} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100$$

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (alpha-glucosidase) ของสารสกัดผักพื้นบ้าน

ดัดแปลงบางส่วนจากวิธีที่ใช้โดย Kim et al. (2005) และ Schafer and Hogger (2007) โดยนำสารสกัดผักพื้นบ้านจำนวน 300 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (1.0 unit/ml) จำนวน 250 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น เติมน้ำกลั่นให้เต็มสารละลาย *p*-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside (*p*NPG) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มต่ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสอีกครั้งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา เติมน้ำกลั่นให้เต็มสารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้น 0.67 โมลาร์ ปริมาตร 590 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ หลังจากนั้นเจือจางส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Acarbose ซึ่งใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน และนำไปคำนวณหาร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition activity)

$$\% \text{ inhibition activity} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100$$

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดสอบๆ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และนำเสนอผลการทดลองที่ได้ในรูปแบบของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยสถิติ Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$

ผลการวิจัย

ข้อมูลรายชื่อพืชผักพื้นบ้านที่สำรวจพบในท้องถิ่นหมู่ 9 ต.ขุนทะเล อำเภอเมือง จ. สุราษฎร์ธานีที่มีคุณสมบัติในการลดระดับน้ำตาลในเลือด

จากการสำรวจรายชื่อผักพื้นบ้านที่บริโภคในท้องถิ่นหมู่ 9 ต.ขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยใช้แบบสอบถามตารางระบุรายการผักพื้นบ้านเพื่อรวบรวมชนิดของผักพื้นบ้านที่บริโภคในท้องถิ่น แหล่งที่ได้มาของผักพื้นบ้าน วิธีการใช้ประโยชน์ในด้านการบริโภคและ/หรือการใช้ประโยชน์ทางยา โดยทำการสอบถามกลุ่มตัวอย่าง คือ ชาวบ้านในชุมชน หมู่ 9 ตำบลขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี กำหนดขนาดกลุ่มตัวอย่างโดยใช้เกณฑ์ 10% ของจำนวนประชากรทั้งหมด ได้กลุ่มตัวอย่างจำนวนทั้งสิ้น 180 คน และใช้วิธีคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบสะดวก (accidental or convenience sampling) ในการเก็บข้อมูล หลังจากนั้น ทำการตรวจสอบข้อมูลของผักพื้นบ้านดังกล่าวที่เคยมีประวัติถูกนำไปใช้ในการรักษาโรคเบาหวานหรือใช้ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยหมอยาพื้นบ้านในท้องถิ่นหมู่ 9 ต.ขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี คือ นายถนอม คงวิจิตร อยู่บ้านเลขที่ 32 หมู่ 9 ตำบลขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี อาชีพหมอยาแผนโบราณ ด้วยวิธีการสัมภาษณ์เชิงลึก โดยใช้แบบสัมภาษณ์แบบกึ่งมีโครงสร้าง เกี่ยวกับประสบการณ์การใช้พืชผักพื้นบ้านมาใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน/ลดน้ำตาลในเลือด ในประเด็นต่างๆ ประกอบด้วย ชื่อผักพื้นบ้าน ส่วนของพืชที่นำมาใช้ วิธีการใช้ แหล่งของพืชในท้องถิ่นและฤดูกาลที่พบ โดยจากข้อมูลที่สำรวจพบ พืชในท้องถิ่นหมู่ที่ 9 ต.ขุนทะเล อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี ที่คาดว่าจะมีคุณสมบัติในการลดน้ำตาลในเลือด ซึ่งหมอยาพื้นบ้านในท้องถิ่นใช้ในการรักษาโรคเบาหวานที่ผ่านมา จำนวนทั้งสิ้น 18 ชนิด ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (anti-alpha amylase assay) และเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (anti-alpha glucosidase assay)

ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสด้วยวิธี *p*-nitrophenol colometric ทำการทดลอง 3 ซ้ำโดยใช้ Acarbose ซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวานเป็นสารมาตรฐาน ข้อมูลจากการสำรวจผักพื้นบ้านในเขตพื้นที่หมู่ 9 ตำบลขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวนทั้งสิ้น 18 ชนิด ได้ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดพืชที่ระดับ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ข้อมูลของพืชผักพื้นบ้านในท้องถิ่นหมู่ 9 ตำบลขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานีที่มีคุณสมบัติในการลดน้ำตาลในเลือด

ชื่อสามัญ	ส่วนที่นำมาใช้	แหล่งพืชในท้องถิ่น	ฤดูกาลที่พบ	การใช้ประโยชน์ทางยาและ/หรือด้านการบริโภค
1 กะเพรา	ใบ	ปลูกเอง/ตลาด	หาได้ตลอดปี	นำไปกะเพราตากแห้ง 2-5 กรัม ละลายในน้ำแล้วดื่ม หรือนำไปประกอบเป็นอาหาร
2 ขี้เหล็ก	ดอก/ยอด	ปลูกเอง/ตลาด	หาได้ตลอดปี	นำไปประกอบอาหาร เช่น ใบ ดอกอ่อนหรือยอดอ่อนนำมาแกงขี้เหล็ก หรือนำไปดองแล้วนำไปประกอบอาหาร เช่น แกงส้ม
3 ตำลึง	ใบ	ปลูกเอง/ตลาด	หาได้ตลอดปี	ลวกและรับประทานร่วมกับอาหาร หรือนำไปประกอบอาหาร เช่น แกงจืด แกงเลียง หรือนำไปผัด
4 เตยหอม	ราก	ปลูกเอง/ตลาด	หาได้ตลอดปี	รากใบเตยหอมสับให้ป็นท่อน ต้มกับน้ำให้เดือด แล้วนำมาดื่ม
5 ถั่วฝักยาว	ฝัก	ปลูกเอง/ตลาด	หาได้ตลอดปี	ฝักรับประทานได้ทั้งดิบและสุกเป็นผักเหนาะร่วมกับอาหาร จิ้มกับน้ำพริก หรือประกอบอาหารผัด
6 ผักบุ้ง	ลำต้น/ใบ	ปลูกเอง/ตลาด	หาได้ตลอดปี	ใบ ยอดอ่อน ลำต้น นำไปลวกน้ำหรือน้ำกะทิรับประทาน หรือใช้ปรุงอาหารประเภทแกงหรือผัด
7 มะขามป้อม	ผล	ปลูกเอง/ตลาด	เดือน พย.- มค.	รับประทานสด หรือใช้ในการประกอบอาหารประเภทแกง
8 มะเขือพวง/มะแว้ง	ผล	ปลูกเอง/ตลาด	หาได้ตลอดปี	รับประทานสด/ผลอ่อนใช้ประกอบอาหารประเภทแกง
9 มะม่วงหิมพานต์	ยอดอ่อน	ปลูกเอง/ตลาด	หาได้ตลอดปี	ใบอ่อน ยอดอ่อน รับประทานสดเป็นผักเหนาะร่วมกับน้ำพริก แกงเผ็ด หรือ ขนมหิน
10 มะระ	ผล	ร้านค้า/ตลาด	หาได้ตลอดปี	นำไปประกอบอาหาร เช่น แกงจืด ผัด หรือนำไปลวกจิ้มกับน้ำพริก
11 มะระขี้นก	ผล	ปลูกเอง/ตลาด	หาได้ตลอดปี	ลวก/รับประทานสด ต้มน้ำจากผลคั้นสดหรือ นำเนื้อมะระขี้นกมาตากแห้งและชงน้ำดื่ม
12 มะรุม	ใบ/ผล/ฝัก	ปลูกเอง/ตลาด	หาได้ตลอดปี	รับประทานเป็นอาหาร เช่น เนื้อในฝักและเมล็ดนำไปปรุงอาหารประเภทแกง ฝักอ่อนนำมาประกอบอาหาร เช่น แกงส้ม ผัดและยำฝักมะรุม เป็นต้น
13 ว่านหางจระเข้	วุ้น	ปลูกเอง	หาได้ตลอดปี	วุ้นว่านหางจระเข้หั่นสดประมาณ 1 ช้อนโต๊ะมาปั่น รับประทาน
14 เนียง	ผล	ตลาด	ฤดูฝน	ผลอ่อน นำไปปอกเปลือกรับประทานสดร่วมกับน้ำพริกหรืออาหารที่มีรสเผ็ด เช่น แกงส้ม ขนมหิน ฯลฯ หรือนำไปดอง รับประทานเป็นผักจิ้ม ผักแกล้ม
15 สะเดา	ใบ/ยอดอ่อน	ปลูกเอง/ตลาด	เดือน พย.- มค.	ตากแห้งและนำไปต้ม รับประทานส่วนที่เป็นน้ำ หรือนำไปลวกรับประทานกับอาหาร
16 สะตอ	ใบ/ฝัก เมล็ด	ปลูกเอง/ตลาด	ฤดูฝน	ตากแห้งและนำไปต้ม รับประทานส่วนที่เป็นน้ำหรือใช้รับประทานเป็นอาหาร เช่น เมล็ด รับประทานสด/ดองเป็นผักเหนาะ หรืออาจนำไปผัดเผ็ดหรือต้มกะทิ
17 หนุ่ย	ใบ/ยอด	ปลูกเอง/ตลาด	ฤดูฝน	ใบอ่อน ยอดอ่อน รับประทานเป็นผักเหนาะร่วมกับอาหาร เช่น แกงไตปลา ขนมหินและน้ำพริก ฯลฯ
18 กลั้ว	ช่อดอก/หัวปลี	ปลูกเอง/ตลาด	หาได้ตลอดปี	ลวก/รับประทานสดร่วมกับอาหาร เช่น ข้าวยา ขนมหิน ผัดไทย เป็นต้น

ตารางที่ 2 ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดผักพื้นบ้านที่มีคุณสมบัติในการลดน้ำตาลในเลือด

ตัวอย่างพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส (% inhibition)	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ แอลฟาไกลูโคซิเดส (% inhibition)
1 กะเพรา (ใบและยอดอ่อน)	<i>Ocimum tenuiflorum</i> Linn.	68.01 ± 3.40 ^b	72.38 ± 3.62 ^d
2 ขี้เหล็ก (ดอกและยอดอ่อน)	<i>Senna siamea</i> (Lam.) Irwin & Berneby	63.71 ± 3.20 ^c	68.72 ± 3.44 ^e
3 ตำลึง (ใบและยอดอ่อน)	<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt	61.46 ± 3.07 ^{cd}	66.77 ± 3.34 ^{ef}
4 เตยหอม (ราก)	<i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb.	63.25 ± 3.16 ^c	78.19 ± 3.91 ^b
5 ถั่วฝักยาว (ฝัก)	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. subsp. <i>unguiculata</i>	44.30 ± 2.22 ^f	34.26 ± 1.71 ^j
6 ผักบุ้ง (ใบและลำต้น)	<i>Ipomoea aquatica</i> Forssk.	57.95 ± 2.90 ^d	68.52 ± 3.43 ^e
7 มะขามป้อม (ผล)	<i>Phyllanthus emblica</i> Linn.	48.94 ± 2.45 ^e	71.30 ± 3.56 ^{de}
8 มะเขือพวง (ผล)	<i>Solanum torvum</i> Sw.	50.20 ± 2.51 ^e	48.10 ± 2.40 ⁱ
9 มะม่วงหิมพานต์ (ใบอ่อน)	<i>Anacardium occidentale</i> Linn.	92.98 ± 4.65 ^a	77.16 ± 2.63 ^b
10 มะระ (ผล)	<i>Momordica charantia</i> Linn.	58.15 ± 2.91 ^d	72.33 ± 3.62 ^d
11 มะระขี้นก (ผล)	<i>Momordica charantia</i> Linn.	59.93 ± 3.00 ^{cd}	75.26 ± 3.76 ^c
12 มะรุม (ฝัก)	<i>Moringa oleifera</i> Lamk.	63.05 ± 3.15 ^c	78.45 ± 3.92 ^b
13 ว่านหางจระเข้ (ใบ)	<i>Aloe vera</i> (Linn.) Burm.f.)	57.55 ± 2.88 ^d	51.03 ± 2.55 ^h
14 เนียง (ผล)	<i>Archidendron jiringa</i> Nielsen	62.52 ± 3.13 ^c	77.31 ± 3.87 ^b
15 สะเดา (ใบและยอดอ่อน)	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss. var. <i>indica</i>	66.16 ± 3.31 ^{bc}	82.41 ± 4.12 ^a
16 สะตอ (เมล็ด)	<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	56.36 ± 2.82 ^d	69.96 ± 3.50 ^e
17 หมุย (ใบและยอดอ่อน)	<i>Micromelum minutum</i> (G. Forst.) Wight & Arn.	62.32 ± 3.12 ^c	77.16 ± 3.86 ^b
18 กล้วย (หัวปลี)	<i>Musa acuminata</i> Colla	56.23 ± 2.81 ^d	54.53 ± 2.73 ^g
19 สารมาตรฐาน Acarbose	-	94.24 ± 1.88 ^a	81.89 ± 1.64 ^a

หมายเหตุ : 1) ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารสกัดพืชที่ความเข้มข้น 5 mg/ml

2) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผักพื้นบ้านทั้ง 18 ชนิด พบว่า มะม่วงหิมพานต์ (ใบ) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงสุด เท่ากับ 92.98 ± 4.65 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ กะเพรา มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เท่ากับ 68.01 ± 3.40 เปอร์เซ็นต์ และสะเดา ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เท่ากับ 66.16 ± 3.31 เปอร์เซ็นต์ โดยในจำนวนผักพื้นบ้านดังกล่าวที่มีข้อมูลว่ามีคุณสมบัติช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด พบว่า ถั่วฝักยาว มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่ำที่สุด คือ 44.30 ± 2.22 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ มะขามป้อม และมะเขือพวง ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เท่ากับ 48.94 ± 2.45 เปอร์เซ็นต์ และ 50.20 ± 2.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสารสกัดผักพื้นบ้านดังกล่าวกับ Acarbose ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูงที่สุดเท่ากับ 94.24 ± 1.88 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารสกัดด้วยน้ำของมะม่วงหิมพานต์ (ใบ) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสไม่ต่างกับสารมาตรฐาน Acarbose ที่ระดับความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำของผักพื้นบ้านชนิดอื่นๆ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่ำกว่าสารมาตรฐาน ในส่วนของฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่า ในจำนวนผักพื้นบ้านทั้ง 18 ชนิด สะเดา (ใบและยอดอ่อน) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสสูงสุด เท่ากับ 82.41 ± 4.12

เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ มะรุม (ฝัก) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเท่ากับ 78.45 ± 3.92 เปอร์เซ็นต์ และเตยหอม (ราก) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เท่ากับ 78.19 ± 3.91 เปอร์เซ็นต์ ในทิศทางตรงกันข้าม ถั่วฝักยาว มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสต่ำที่สุด คือ 34.26 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ มะเขือพวง และว่านหางจระเข้ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เท่ากับ 48.10 ± 2.40 เปอร์เซ็นต์ และ 51.03 ± 2.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และนอกจากนั้น ยังพบว่า เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดผักพื้นบ้านกับสารมาตรฐาน Acarbose ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดด้วยน้ำของสะเดา (ใบและยอดอ่อน) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสสูงกว่าสารมาตรฐาน Acarbose ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเท่ากับ 81.89 ± 1.64 เปอร์เซ็นต์ อยู่เล็กน้อย (แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาคุณสมบัติในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของผักพื้นบ้านในท้องถิ่นหมู่ 9 ตำบลขุนทะเล อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี ผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่า สารสกัดด้วยน้ำของผักพื้นบ้านทั้ง 18 ชนิด ประกอบด้วย กะเพรา ขี้เหล็ก ตำลึง เตยหอม ถั่วฝักยาว ผักบุ้ง มะขามป้อม มะเขือพวง ใบมะม่วงหิมพานต์ มะระ มะระขี้นก มะรุม ว่านหางจระเข้ เนียง สะเดา สะตอ หนุ่ย และหัวปลี มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ ซึ่งการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะช่วยให้ความสามารถในการย่อยแป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้นๆ ลดลง ส่วนการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส จะลดการย่อยคาร์โบไฮเดรตสายสั้นๆ เหล่านั้นให้เป็นกลูโคส ซึ่งจะช่วยลดการดูดซึมกลูโคสเหล่านั้นในลำไส้เล็ก และส่งผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Acarbose ซึ่งใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน พบว่า สารสกัดของใบมะม่วงหิมพานต์ และใบและยอดอ่อนสะเดา มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ดีใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในการส่งเสริมการบริโภคผักพื้นบ้านในชุมชน รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อพัฒนาต่อยอดการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดผักพื้นบ้าน เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่พืชที่มีในท้องถิ่นและช่วยในการบรรเทาโรคเบาหวานต่อไป

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองที่พบในงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของวิมลพรรณ และคณะ ในปี 2552 ที่พบว่า สารสกัดเมทานอลของมะรุม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 50.84 และจากการศึกษาฤทธิ์การต้านโรคเบาหวานผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากผักใบเปรี้ยวพื้นบ้านของไทย โดยอุทัยวรรณ สุทธิคันสนีย์ และคณะ (2557) รายงานในทิศทางเดียวกันว่า พืชท้องถิ่น 5 ชนิดของไทย คือ ชะมวง มะกอก เม็ก มะขามและตัว มีศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวาน โดยพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากใบมะกอกสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (มีค่าการยับยั้งร้อยละ 99) ได้ดีกว่าใบเม็ก ใบมะขาม ใบชะมวง และใบตัว ตามลำดับ โดยในส่วนของฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่า ใบตัวมีค่าการยับยั้งสูงสุดอยู่ที่ร้อยละ 29 แสดงให้เห็นว่าผักพื้นบ้านเป็นแหล่งของสารที่มีแนวโน้มในการป้องกันโรคเบาหวานผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ได้เลือกวิธีการสกัดด้วยน้ำแทนวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอื่นๆ ที่นิยมใช้ เช่น เอทานอล เมทานอล เอทิลแอลกอฮอล์ อะซิโตน เป็นต้น อาจทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ผ่านมาในแง่ของปริมาณ (เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส) ได้ รวมถึง ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อาจสูงกว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในงานวิจัยอื่นๆ ที่ผ่านมา เนื่องจาก โดยปกติแล้วมีประสิทธิภาพต่ำกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น เอทานอล เมทานอล ฯลฯ ในการสกัดสารสำคัญในตัวอย่างพืช แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยนี้ได้เลือกวิธีการสกัดด้วยน้ำเพื่อให้สอดคล้องกับวิถีการบริโภคพืชผักพื้นบ้าน ซึ่งส่วนใหญ่จะนิยมนำไปบริโภคด้วยการรับประทานสด ลวก หรือนำไปประกอบอาหารประเภทแกงต่างๆ ซึ่งใช้น้ำเป็นส่วนประกอบ

ข้อเสนอแนะ

1. ผลการศึกษาที่ได้ในงานวิจัยนี้ สามารถนำไปใช้ในการส่งเสริมการบริโภคผักพื้นบ้านในชุมชน เพื่อประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรคเบาหวาน
2. ในการศึกษาวิจัยขั้นต่อไป ควรมีการศึกษาเพื่อยืนยันผลทาง *in vivo* ของผักพื้นบ้านเหล่านี้ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดในสัตว์ทดลองและในผู้ป่วยโรคเบาหวาน
3. ควรมีการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำผักพื้นบ้านที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดระดับน้ำตาลในเลือด มาสกัดสารออกฤทธิ์เพื่อพัฒนาต่อยอดในรูปแบบของยาสมุนไพรเพื่อบรรเทาและ/หรือบำบัดโรคเบาหวานต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- วิมลพรรณ รุ่งพรหม, ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล และสมฤดี เลี่ยมทอง. (2552). สารยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคไซด์จากมะรุม. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 40(3), 49-52.
- วรานนท์ ทองอินลา, ชลธิชา วรรณวิมลรักษ์ และ ภารดี ช่วยบำรุง. (2557). ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DMPD กับปริมาณฟีนอลิก วิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 19(2), 93-104.
- อุทัยวรรณ สุทธิคันสนีย์, พุทธชา สอนจันทร์ และกัลยารัตน์ เครือวัลย์. (2557). การต้านโรคเบาหวานผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากผักใบเปรี้ยวพื้นบ้านของไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 45(2)(พิเศษ), 13-16.
- Cheplick, S., Kwon, Y. I., Bhowmik, P. and Shetty, K. (2010). Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension. *Bioresource Technology*. 101, 404-413.
- Diatewa, M., Samba, C. B., Assah, T. C. H. and Abena, A. A. (2004). Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of diethyl ether fraction isolated from the aqueous extract of the leaves of *Cordia alliodora* Baillon in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*. 92 (2), 229-232.
- Dong, H. Q., Li, M., Zhu, F., Liu, F. L. and Huang, J. B. (2012). Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes. *Food Chemistry*. 130, 261-266.
- El-Beshbishy, H. A. and Bahashwan, S. A. (2012). Hypoglycemic effect of basil (*Ocimum basilicum*) aqueous extract is mediated through inhibition of α -glucosidase and α -amylase activities: An *in vitro* study. *Toxicology and Industrial Health*. 28, 42-50.
- Gowri, P. M., Tiwari, A. K., Ali, A. Z., and Rao, J. M. (2007). Inhibition of α -glucosidase and amylase by bartogenic acid isolated from *Barringtonia racemosa* Roxb. seeds. *Phytotherapy Research*. 21 (8), 796-799.
- International Diabetes Federation. (2012). IDF diabetes atlas, 5th Ed. Retrieved August 23, 2013, from <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden>
- Kim, Y. M., Jeong, Y. K., Wang, M. H., Lee, W. Y. and Rhee, H. I. (2005). Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition*. 21 (6), 756-761.
- Kim, M. H., Jo, S. H., Jang, H. D., Lee, M. S. and Kwon, Y. I. (2010). Antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory potential of onion (*Allium cepa* L.) extracts. *Food Science and Biotechnology*. 19, 159-164.
- Kim, H. K. (2012). *Ecklonia cava* inhibits glucose absorption and stimulates insulin secretion in streptozotocin-induced diabetic mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2012/439294.

- Kwon, Y. I., Apostolidis, E. and Shetty, K. (2008). *In vitro* studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology*. 99, 2981-2988.
- Schäfer, A. and Högger, P. (2007). Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol®) effectively inhibit α -glucosidase. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 77 (1), 41-46.

การใช้แอคติโนมัยซีทต้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนของ ว่านเศรษฐีเรือนใน

ภัสราภรณ์ รูปเพ็ง¹, เบญจภรณ์ ประภักดี¹, วิชญา รงค์สยามานนท์¹, กรรณิการ์ ดวงมัลย์²

¹ คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170 ประเทศไทย

² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย

email: pppooohpat@gmail.com

บทคัดย่อ

ปัญหาสิ่งแวดล้อมที่สำคัญในพื้นที่เกษตรกรรมคือดินปนเปื้อนโลหะหนักโดยเฉพาะแคดเมียม เนื่องจากแคดเมียมมีความเป็นพิษต่อสุขภาพของมนุษย์อย่างมากปัจจุบันมีเทคโนโลยีที่หลากหลายในการบำบัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดิน ซึ่งการบำบัดโลหะหนักในดินปนเปื้อนโดยใช้พืช จัดเป็นเทคโนโลยีสีเขียวที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตาม ดินที่มีโลหะหนักความเข้มข้นสูงส่งผลกระทบต่อการทำงานของพืช และทำให้พืชสร้างชีวมวลต่ำ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีทสองสายพันธุ์คือ *Nocardia* sp. K5PN7 ที่สร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก และ *Streptomyces* sp. 11-10SHTH ที่สร้างสารไซโตโครฟอรในการส่งเสริมการเติบโตและการสะสมแคดเมียมของว่านเศรษฐีเรือนใน(ที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม โดยทำการปลูกว่านเศรษฐีเรือนในในกระถางที่มีดินปนเปื้อนแคดเมียม และแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด คือ ชุดควบคุม ชุดการทดลองที่เติม K5PN7 และชุดการทดลองที่เติม 11-10SHTH และทำการปลูกเป็นระยะเวลา 1 เดือน สำหรับผลการศึกษาพบว่าว่านเศรษฐีเรือนในที่เติม K5PN7 มีชีวมวลมากขึ้น และมีค่า Translocation factor สูงสุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าว่านเศรษฐีเรือนในที่เติม K5PN7 และ 11-10SHTH มีปริมาณแคดเมียมสะสมมากกว่าชุดทดลองควบคุม ส่วนว่านเศรษฐีเรือนในที่มีการเติม 11-10SHTH มีค่า Phytoextraction coefficient สูงสุด ซึ่งจากผลการทดลองนี้ สรุปได้ว่าการทำงานร่วมกันระหว่างแอคติโนมัยซีทต้านทานแคดเมียมและว่านเศรษฐีเรือนในสามารถช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพพืชในการบำบัดดินปนเปื้อนแคดเมียมได้

คำสำคัญ: ดินปนเปื้อนแคดเมียม, แอคติโนมัยซีทต้านทานแคดเมียม, การบำบัดแคดเมียมโดยพืช, ว่านเศรษฐีเรือนใน

USE OF CADMIUM RESISTANT ACTINOMYCETES FOR PROMOTING CADMIUM PHYTOREMEDIATION IN CONTAMINATED SOIL BY *CHLOROPHYTUM COMOSUM*

Patsaraporn Thooppeng¹, Benjaphorn Prapagdee¹, Witchaya Rongsayamanont¹
and Kannika Duangmal²

¹ Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

² Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

E-mail: pppoohpat@gmail.com

Abstract

The important environment problem in agricultural areas is the soil contaminated with heavy metals, particularly cadmium. Cadmium is one of extremely toxic heavy metals to human health. Currently, many technologies are used for remediation of heavy metals contaminated soil. Phytoremediation technology is a green technology to remove heavy metals from contaminated soil that has received widely attention. However, high concentration of heavy metals in the soil cause adverse effects on plant growth, resulting in low biomass production. This study aimed to study the performance of two strains of cadmium resistant actinomycetes, namely *Nocardia* sp. K5PN7, an IAA-producing actinomycete and *Streptomyces* sp. 11-10SHTh, a siderophore-producing actinomycete on promoting the plant growth and cadmium accumulation in *Chlorophytum comosum* planted in cadmium polluted soil. The results found that K5PN7 promoted the dry biomass of *C. comosum* and translocation factor better than those of other treatments. In addition, cadmium contents accumulated in *C. comosum* inoculated with K5PN7 and 11-10SHTh were higher than that of the uninoculated control. The highest phytoextraction coefficient was observed in the plant inoculated with 11-10SHTh. Our findings concluded that the synergistic interactions between cadmium resistant actinomycetes and *C. comosum* can improve phytoremediation efficiency in cadmium contaminated soil.

Keywords: Cadmium contaminated soil, Cadmium resistant actinomycetes, Phytoremediation, *C. comosum*;

บทนำ

ปัญหาสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งในปัจจุบัน คือ ดินในพื้นที่เกษตรกรรมเกิดการปนเปื้อนของโลหะหนัก โดยเฉพาะการปนเปื้อนแคดเมียม แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่เป็นพิษอย่างมากต่อสุขภาพของมนุษย์ และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แคดเมียมสามารถเคลื่อนย้ายจากดินไปยังพืชโดยการดูดซับของราก และสะสมเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช แล้วไปถึงผู้บริโภคอื่นๆ ผ่านทางห่วงโซ่อาหารทำให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพ (Moreno et al., 2002) โดยแหล่งที่มาหลักของการปนเปื้อนแคดเมียมในดิน คือ เหมืองสังกะสี โรงถลุง และการจัดการของเสียอย่างไม่เหมาะสม (National Research center for Environmental and Hazardous Waste Management, 2005) จากรายงานของกรมวิชาการเกษตรประเทศไทย พบว่าดินเกษตรกรรมรอบพื้นที่เหมืองแร่สังกะสีที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก มีความเข้มข้นของแคดเมียมในดินสูง และค่าความเข้มข้นของแคดเมียมในตัวอย่างข้าวอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 4.4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สูงกว่าความเข้มข้นเฉลี่ยของข้าวไทยทั่วไป 0.043 ± 0.019 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Phaenark et al., 2009; Pongsakul and Attajarusit, 1999) ดังนั้นการกำจัดแคดเมียมออกจากดินเกษตรกรรมจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อหลีกเลี่ยงการเคลื่อนย้ายแคดเมียมเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร

ปัจจุบันมีหลากหลายเทคโนโลยีที่ใช้ในการบำบัดการปนเปื้อนของโลหะหนักในดิน การเลือกใช้เทคโนโลยีในการบำบัดจึงต้องพิจารณาถึงต้นทุน และความซับซ้อนทางเทคนิค (Barcelo and Poschenrieder, 2003) วิธีการฟื้นฟูหลักๆ ได้แก่ วิธีการกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ ซึ่งโดยทั่วไปวิธีการทางกายภาพ และทางเคมีต้องเผชิญกับข้อจำกัดมากมาย เช่น ค่าใช้จ่ายสูง ใช้แรงงานจำนวนมาก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดิน และการรบกวนจุลินทรีย์ในดิน นอกจากนี้วิธีการทางเคมีอาจก่อให้เกิดมลพิษทุติยภูมิเพิ่มได้อีก (Ali et al., 2013) การบำบัดดินปนเปื้อนโดยใช้พืช (Phytoremediation) จึงเป็นเทคนิคทางเลือกทางชีวภาพที่ใช้พืชที่มีชีวิตเพื่อดูดดึงและสะสมโลหะหนักจากดินไปไว้ยังราก ยอด และส่วนต่างๆ ของพืช (Kumar et al., 1995) และเป็นเทคโนโลยีสีเขียวที่ใช้กำจัดโลหะหนักออกจากดินในพื้นที่เกษตรกรรมที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง (Chaney et al., 1997) ซึ่งข้อดีในการใช้ Phytoremediation คือ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ใช้ต้นทุนต่ำ เป็นวิธีแก้ปัญหาอย่างยั่งยืน ไม่ทำลายสภาพแวดล้อม และได้รับการยอมรับในสังคม (McGrath et al., 2002; Sheng et al., 2011) อย่างไรก็ตามเมื่อพืชสะสมโลหะหนักที่ความเข้มข้นสูงจะต่อการเจริญเติบโตของพืช และทำให้ชีวมวลของพืชต่ำ นอกจากนี้ยังทำให้ความสามารถในการละลาย หรือการดูดซับโลหะหนักที่เป็นเป้าหมายได้น้อยลง ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำคัญของเทคนิค Phytoremediation (Barocsi et al., 2003; Glick, 2010) มีรายงานว่าการใช้พืชร่วมกับจุลินทรีย์ที่ต้านทานโลหะหนักสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และการดูดซับโลหะหนักได้ (Mayak et al., 2004) ซึ่งการใช้กลุ่มแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรอบรากพืชที่สามารถผลิตสารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือที่เรียกว่า plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) สามารถผลิตสารหรือฮอร์โมนที่มีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเติบโตของพืชได้ ซึ่งไซเดอโรฟอรัส (Siderophores) เป็นสารประกอบคีเลตที่แบคทีเรียจำนวนมากรวมถึง PGPR สามารถผลิตได้ โดยไซเดอโรฟอรัสสามารถละลายเหล็กกรรมถึงโลหะอื่นๆ ทั้งยังช่วยเพิ่มการเคลื่อนย้ายของโลหะบริเวณรากพืช และทำให้พืชดูดดึงโลหะได้ง่ายขึ้น (Rajkumar et al., 2010; Padmavathiamma and Li, 2007; Braud et al., 2009) นอกจากนี้ PGPR ยังสามารถผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติก ซึ่งสามารถกระตุ้นการเติบโตของพืชได้ (Glick, 2010)

แอคติโนมัยซีตเป็นจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมที่ได้รับความสนใจเป็นพิเศษเพราะมีคุณสมบัติมากมายที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยการผลิตสารประกอบที่คล้ายฮอร์โมนพืช นอกจากนี้ยังมีศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิ และเอนไซม์หลายชนิด ที่สามารถเป็นปัจจัยหลักในการต้านทานความเครียดจากสิ่งแวดล้อม (Sadeghi et al., 2012) ดังนั้นจึงเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญซึ่งในการสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เช่น กรดอินโดล-3-อะซีติก และไซเดอโรฟอรัส สารทุติยภูมิส่วนใหญ่ผลิตจากแอคติโนมัยซีตหลายสปีชีส์ที่อยู่ในจีนัส *Streptomyces* ชนิดต่างๆ (Hamedi et al., 2015; Behal, 2000) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นในการใช้แอคติโนมัยซีตต้านทานแคดเมียมที่มีสมบัติส่งเสริมการเติบโตของพืชร่วมกับพืช เพื่อส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อน โดยทำการศึกษาศักยภาพของแอคติโนมัยซีตต้านทานแคดเมียม 2 สายพันธุ์ คือ *Nocardia* sp. K5PN7 ที่สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติก (IPA) และ *Streptomyces* sp. 11-10SHTH ที่สามารถสร้างสารไซเดอโรฟอรัส (SPA) เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการทำงานร่วมกันกับพืช และเปรียบเทียบความสามารถของแอคติโนมัยซีตทั้งสองสายพันธุ์ ในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และส่งเสริมความสามารถในการสะสมแคดเมียมของวุ้นเชื้อราในดินปนเปื้อนแคดเมียม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการเติบโตและการสะสมแคดเมียมของว่านเศรษฐีเรือนในที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม

2. เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมสองสายพันธุ์ในการส่งเสริมการเติบโตและการสะสมแคดเมียมของว่านเศรษฐีเรือนในที่ปลูกในดินที่ปนเปื้อนแคดเมียม

ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ และในโรงเรือน คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยทำการศึกษาศักยภาพของแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมที่มีสมบัติส่งเสริมการเติบโตของพืชร่วมกับว่านเศรษฐีเรือนใน เพื่อส่งเสริมการการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนซึ่งเก็บรวบรวมจากพื้นที่ทำการเกษตรใกล้กับเหมืองแร่สังกะสีที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

สายพันธุ์แอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียม 2 สายพันธุ์ คือ *Nocardia* sp. K5PN7 ที่สร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก (IPA) และ *Streptomyces* sp. 11-10SHTb ที่สร้างสารไฮเดรโอฟอร์ (SPA) ที่ได้รับมาจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมพืชที่ใช้ทดสอบ

พืชที่ใช้ในการทดสอบ คือ ว่านเศรษฐีเรือนใน หรือ *Chlorophytum comosum* L. (Spider plant) อายุ 1 เดือน ได้มาจากตลาดต้นไม้ธนบุรี จังหวัดนครปฐม ปลูกในดินเกษตรที่ไม่ปนเปื้อนโลหะหนัก โดยพืชมีค่าน้ำหนักสด ความยาวยอดและความยาวรากเฉลี่ยเท่ากับ 10.56 ± 2.18 กรัม 22.76 ± 3.02 เซนติเมตร และ 11.52 ± 1.43 เซนติเมตร ตามลำดับ

การเตรียมสารแขวนลอยของแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียม

นำแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมทั้ง 2 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose yeast extract (GYE) agar และเติมแคดเมียมไนเตรท ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) 2 มิลลิโมลาร์ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงถ่ายเส้นใยของแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE broth และนำไปเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาตรของหัวเชื้อ โดยถ่ายเชื้อจากอาหารเหลวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE broth ใหม่ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยเซลล์ ให้มีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 10^5 - 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

การทดสอบการบำบัดแคดเมียมของว่านเศรษฐีเรือนในระดับโรงเรือนทดลอง

นำว่านเศรษฐีเรือนในมาย้ายปลูกในกระถางที่บรรจุดินปนเปื้อนแคดเมียม และวางไว้ในโรงเรือนภายใต้แสงแดดธรรมชาติ โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ คือ T1) ว่านเศรษฐีเรือนใน T2) ว่านเศรษฐีเรือนใน + IPA และ T3) ว่านเศรษฐีเรือนใน + SPA และทำการปลูกเป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยรดน้ำช่วงเช้าสัปดาห์ละ 2 ครั้ง และทำการเก็บตัวอย่างพืช และตัวอย่างดินแต่ละกระถางไปทำวิเคราะห์

การวิเคราะห์ตัวอย่างพืช

นำตัวอย่างพืชมาวัดความสูงของต้นหรือยอด (Shoot) และความยาวราก (Root) และแยกพืชออกเป็นสองส่วน ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งของพืชและนำมาบดผ่านตระแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร จากนั้นนำตัวอย่างพืช 0.5 กรัม มาเติมด้วยกรดไนตริก 10 มิลลิลิตร และย่อยด้วยเครื่องไมโครเวฟไดเจสเตอร์ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นกรองด้วย Whatman filter paper No.42. จากนั้นนำไปวัดค่าความเข้มข้นของแคดเมียม โดยเครื่อง Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (FAAS)

การวิเคราะห์ตัวอย่างดิน

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคดเมียมทั้งหมดในดิน โดยนำตัวอย่างดินไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส บดผ่านตระแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร นำตัวอย่างดิน 0.5 กรัม เติมด้วยกรดไนตริกและกรดไฮโดรคลอริก นำไปย่อยด้วยเครื่องไมโครเวฟไดเจสเตอร์ จากนั้นกรองด้วย Whatman filter paper No.42. ส่วนการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคดเมียมในดินในรูปพร้อมใช้ทางชีวภาพ (bioavailable cadmium) ทำการสกัดตัวอย่างดินด้วยสาร Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองด้วย Whatman filter paper No.42. (Faust and Christians, 2000) จากนั้นนำไปการวัดค่าแคดเมียมในตัวอย่างดินโดยใช้ FAAS

การคำนวณและวิเคราะห์ผล

นำค่าที่ได้มาคำนวณเพื่อวัดอัตราการเจริญเติบโตของพืชแต่ละกระถาง โดยคำนวณจากอัตราส่วนน้ำหนักแห้งของรากต่อน้ำหนักแห้งของลำต้น (R/S ratio) โดยใช้สมการที่ 1 และการคำนวณเพื่อประเมินประสิทธิภาพการบำบัดแคดเมียมของวุ้นเสริมเชื้อเรณูใน โดยการคำนวณหาค่า Phytoextraction coefficient (PEC) คือ ค่าประสิทธิภาพของพืชในการสะสมโลหะหนัก คำนวณจากสมการที่ 2 (Lorestani et al., 2011) ค่า Bioaccumulation factor (BAF) คือ อัตราส่วนของความเข้มข้นของแคดเมียมในพืชทั้งหมดต่อความเข้มข้นของแคดเมียมที่มีอยู่ในดิน คำนวณจากสมการที่ 3 (Khaokaew and Landrot, 2015) และค่า Translocation factor (TF) คือ ค่าที่ใช้ในการประเมินความสามารถของพืชในการเคลื่อนย้ายโลหะหนักจากรากไปยังลำต้น (Yoon et al., 2006) โดยคำนวณจากสมการ 4 ดังนี้

R/S ratio	=	$\frac{\text{Root dry weight of plant (g)}}{\text{Shoot dry weight of plant (g)}}$	 สมการที่ 1
Phytoextraction coefficient	=	$\frac{\text{Cadmium concentration in whole plant tissue}}{\text{Cadmium concentration in soil}}$	 สมการที่ 2
Bioaccumulation factor	=	$\frac{\text{Cadmium concentration in whole plant tissue}}{\text{Cadmium bioavailable concentration in soil}}$	 สมการที่ 3
Translocation factor	=	$\frac{\text{Cadmium concentration in shoots (Cshoot)}}{\text{Cadmium concentration in roots (Croot)}}$	 สมการที่ 4

ผลการวิจัย

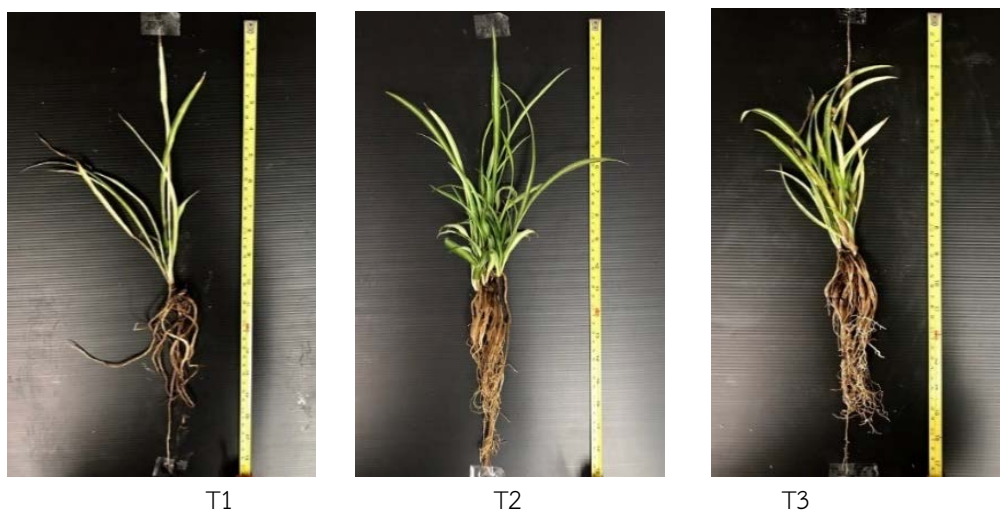
ประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการเติบโตของว่านเศรษฐีเรือนในที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม

หลังจากทำการทดลองปลูกต้นว่านเศรษฐีเรือนใน ในกระถางดินปนเปื้อนแคดเมียมเป็นระยะเวลา 1 เดือน ผลการเจริญเติบโตของว่านเศรษฐีเรือนใน ในแต่ละชุดการทดลองแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเติบโตของว่านเศรษฐีเรือนในหลังปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมเป็นเวลา 1 เดือน

Treatment	Root length (cm)	Shoot height (cm)	fresh weight (g)	Total dry biomass (g)	R/S ratio
T1 (control)	22±0.87	23±0.87	14.85±0.58	1.39±0.03	0.83
T2 (IPA)	22.33±1.53	26.67±1.61	24.04±0.89	2.08±0.09	0.70
T3 (SPA)	21.67±0.58	22.83±0.58	12.31±1.72	1.60±0.05	0.78

จากตารางที่ 1 พบว่าชุดทดลอง T2 ว่านเศรษฐีเรือนในที่เติม IPA มีน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความยาวต้นหรือยอด (Shoot) และความยาวรากสูงกว่าในชุดทดลองอื่นๆ แสดงให้เห็นว่า *Nocardia* sp. K5PN7 หรือ IPA สามารถช่วยส่งเสริมการเติบโตของว่านเศรษฐีได้ดี ส่วนชุดทดลอง T1 ว่านเศรษฐีเรือนในที่ไม่มีการเติมแอคติโนมัยซีท และชุดทดลอง T3 ว่านเศรษฐีเรือนในที่เติม SPA มีน้ำหนักสด ความยาวต้นหรือยอด และความยาวรากใกล้เคียงกัน แต่ชุดทดลอง T3 มีค่าน้ำหนักแห้งสูงกว่าชุดทดลองควบคุม นอกจากนี้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของว่านเศรษฐีเรือนในหลังปลูกในดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมเป็นเวลา 1 เดือน แสดงให้เห็นว่าต้นว่านเศรษฐีเรือนในที่มีการเติมแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมทั้ง 2 สายพันธุ์ มีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกคือ ปริมาณของใบ และรากเจริญได้สมบูรณ์กว่าต้นว่านเศรษฐีเรือนในที่ไม่มีการเติมแอคติโนมัยซีท ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกว่านเศรษฐีเรือนในหลังเป็นเวลา 1 เดือน ของแต่ละชุดการทดลอง

ประสิทธิภาพแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนของว่านเศรษฐีเรือนใน

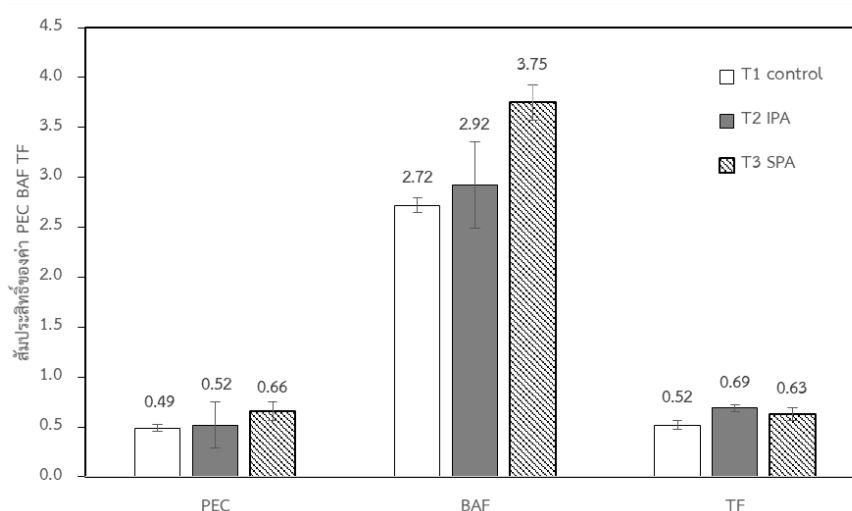
ตารางที่ 2 แสดงค่าความเข้มข้นของแคดเมียมที่สะสมในส่วนยอด และรากของว่านเศรษฐีเรือนใน หลังจากปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมเป็นเวลา 1 เดือน โดยพบว่าแคดเมียมสะสมอยู่ในส่วนรากมากกว่าส่วนยอดในทุกชุดทดลอง โดยชุดการทดลอง T3 ที่มีการเติม SPA มีปริมาณแคดเมียมสูงสุดทั้งในส่วนราก และส่วนยอดส่วนชุดการทดลอง T2 ที่มีการเติม IPA ถึงแม้ว่ามีปริมาณแคดเมียมสะสมในส่วนรากใกล้เคียงกับชุดการทดลอง T1 แต่ชุดการทดลอง T2 มีค่าปริมาณแคดเมียมที่

สะสมต่อต้นสูงที่สุด โดยมีค่าถึง 51.68 มิลลิกรัมต่อต้น แสดงให้เห็นว่าชุดทดลองที่มีการเติมแอกติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมทั้งสองสายพันธุ์ช่วยส่งเสริมให้วุ้นเครซซีเรื้อนในชุดตั้งและสะสมแคดเมียมได้ดีขึ้น

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของแคดเมียมในแต่ละส่วนของวุ้นเครซซีเรื้อนหลังปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมเป็นเวลา 1 เดือน

Treatment	Cadmium concentration (mg/kg)			Cadmium content (µg/plant)
	Root	Shoot	Total	
T1 (control)	31.80±4.95	16.40±1.70	23.38±2.33	32.50
T2 (IPA)	30.40±1.94	20.93±0.21	24.85±0.33	51.68
T3 (SPA)	37.20±2.97	23.45±0.49	29.47±1.59	47.15

ส่วนค่าประสิทธิภาพในการสกัดแคดเมียมออกจากดินการสะสมแคดเมียม รวมถึงความสามารถในการลำเลียงแคดเมียมจากส่วนรากไปยังส่วนยอดของวุ้นเครซซีเรื้อนใน แสดงในรูปของสัมประสิทธิ์ของค่า Phytoextraction coefficient (PEC) ค่า Bioaccumulation factor (BAF) และค่า Translocation factor (TF) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 ประสิทธิภาพการสะสมและการลำเลียงแคดเมียมของวุ้นเครซซีเรื้อนในที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียม

จากรูปที่ 2 พบว่าในชุดทดลอง T3 มีค่า PEC และค่า BAF สูงที่สุด ซึ่งวุ้นเครซซีเรื้อนในชุดการทดลองที่ 3 สามารถดูดตั้งและสะสมแคดเมียมได้มากกว่าชุดทดลองอื่นๆ แต่มีค่า TF น้อยกว่าชุดทดลอง T2 ซึ่งในชุดการทดลอง T2 ที่มีการเติม IPA ช่วยทำให้วุ้นเครซซีสามารถลำเลียงแคดเมียมจากส่วนรากไปยังส่วนยอดได้ดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าชุดทดลองที่มีการเติมแอกติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมทั้งสองสายพันธุ์ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการบำบัดแคดเมียมของวุ้นเครซซีเรื้อนในได้

สรุปและอภิปรายผล

จากผลการศึกษาในชุดการทดลอง T2 ของวุ้นเครซซีเรื้อนในที่เติม *Nocardia* sp. K5PN7 หรือ IPA ที่ผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก พบว่ามีค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความยาวต้นหรือยอด และความยาวรากสูงที่สุด และยังมีค่าความสามารถในการลำเลียงแคดเมียมจากส่วนรากไปยังส่วนยอด หรือค่า TF สูงสุดอีกด้วย ทำให้วุ้นเครซซีเรื้อนในที่เติม IPA มีปริมาณแคดเมียมที่สะสมต่อต้นสูงกว่าชุดทดลองอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าแอกติโนมัยซีทที่สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และการสะสมแคดเมียมของวุ้นเครซซีเรื้อนในที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prapagdee et al. (2013) รายงานว่า *Micrococcus* sp. MU1 ที่สามารถผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก ช่วยกระตุ้นการเจริญของราก และส่วนต้น รวมถึงส่งเสริมการดูดตั้งและการสะสมแคดเมียมของทานตะวันในที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมได้ ส่วนชุดการทดลอง T3 ต้นวุ้นเครซซีเรื้อนในที่เติม *Streptomyces* sp. 11-10SHT หรือ SPA ที่สร้างสารไซเดอโรฟอร์

ช่วยให้ว่านเครษฐีเรื้อนในสะสมแคดเมียมทั้งในส่วนรากและส่วนยอดได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดทดลองอื่นๆ รวมถึงมีค่า PEC และค่า BAF สูงที่สุดอีกด้วย แสดงให้เห็นถึงความสามารถของ *Streptomyces* sp. 11-10SHTH ที่ไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของว่านเครษฐีเรื้อนในการดูดซับและสะสมแคดเมียม เนื่องจากสารไซเดอโรฟอร์ที่แอคติโนมัยซีทผลิตมามีส่วนช่วยให้แคดเมียมที่อยู่ในอนุภาคดินหลุดออกมาอยู่ในรูปพร้อมใช้ทางชีวภาพ (bioavailable form) ซึ่งทำให้ว่านเครษฐีเรื้อนสามารถดูดซับแคดเมียมได้ง่ายขึ้นกว่าชุดทดลองอื่นๆ สอดคล้องกับรายงานของ Rajkumar et al. (2010) ที่พบว่าสารไซเดอโรฟอร์สามารถลีสและละลายเหล็ก รวมถึงโลหะอื่นๆ ช่วยเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนย้ายของโลหะบริเวณรากพืช และทำให้พืชดูดซับโลหะหนักได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ งานวิจัยของ Ali et al. (2017) พบว่า *Streptomyces pactum* Act12 สามารถช่วยส่งเสริมการเติบโตทั้งในรูปการเพิ่มมวลชีวภาพของยอดและราก ปริมาณคลอโรฟิลล์ และปริมาณแคโรทีนอยด์ของผักกาดเขียวปลี (*Brassica juncea*) และส่งเสริมการดูดซับโลหะหนักของผักกาดเขียวปลีที่ปลูกในดินปนเปื้อนโลหะหนักได้อีกด้วย ดังนั้น จากผลการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า *Nocardia* sp. K5PN7 สามารถช่วยส่งเสริมการเติบโต และเพิ่มการสะสมแคดเมียมในว่านเครษฐีเรื้อนในเมื่อคิดเป็นปริมาณแคดเมียมต่อต้นได้ดีที่สุด เนื่องจากว่านเครษฐีมีชีวมวลต่อต้นมากกว่าชุดทดลองอื่นๆ ส่วน *Streptomyces* sp. 11-10SHTH มีความสามารถในการช่วยส่งเสริมการดูดซับและสะสมแคดเมียมทั้งในส่วนรากและส่วนยอดของว่านเครษฐีเรื้อนในที่ปลูกในดินที่ปนเปื้อน แสดงให้เห็นว่าแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมทั้งสองสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนของว่านเครษฐีเรื้อน

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในการใช้แอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมทั้งสองสายพันธุ์ คือ *Nocardia* sp. K5PN7 และ *Streptomyces* sp. 11-10SHTH ในรูปแบบ Co-culture เพื่อช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการบำบัดดินปนเปื้อนแคดเมียมของพืช และศึกษากับพืชชนิดอื่นๆ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านความหลากหลายทางชีวภาพ ภายใต้โปรแกรมวิจัย “จุลินทรีย์ในป่าและแนวทางการใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตรและสิ่งแวดล้อม” (BDC-PG1-160003)

เอกสารอ้างอิง

- Ali A, Guo Di, Mahar A, Wang Z, Muhammad D, Li R, Wang P, Shen F, Xue Q, Zhang Z. (2017). Role of *Streptomyces pactum* in phytoremediation of trace elements by *Brassica juncea* in mine polluted soils. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety* (144), 387-395.
- Ali H, Khan E, Sajad M. (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere* 91(7), 869-881.
- Barceló J, Poschenrieder C. (2003). Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science*. (2), 333-344.
- Barocsi A, Csintalan Z, Kocsanyi L, Dushenkov S, Kuperberg JM, Kucharski R, Richter P. (2003). Optimizing Phytoremediation of heavy metal contaminated soil by exploiting plants' stress adaptation. *International Journal of Phytoremediation* 5(1), 13-23.
- Behal V. Bioactive products from *Streptomyces*. (2000). *Advances in Applied Microbiology* 47, 113-157.
- Braud A, Jezequel K, Bazot S, Lebeau T. (2009). Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere*. 74, 280-286.
- Chaney R, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJM. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Environmental Biotechnology* 8(3), 279-284.
- Glick BR. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. (2010). *International Journal of Biotechnology Advances* 28, 367-374.
- Khaokaew S, Landrot G. (2015). A field-scale study of cadmium phytoremediation in a contaminated

- agricultural soil at Mae Sot district, Tak province, Thailand: (1) Determination of Cd hyperaccumulating plants. *Chemosphere* 138, 883–887.
- Kumar PV, Dushenkov H, Motto I, Raskin K. (1995). Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29, 1232-1238.
- Lorestani B, Cheraghi M, Yousefi N. (2011). Accumulation of Pb, Fe, Mn, Cu and Zu in plants and choice of hyperaccumulator plant in the industrial town of Vian, Iran. *Archives of Biological sciences. Belgrade* 63(3), 739-745.
- Mayak S, Tirosh T, Glick BR. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 565-572.
- McGrath SP, Zhao FJ, Lombi E. (2002). Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Advances in Agronomy* 75, 1-15.
- Moreno JL, Hernández T, Pérez A, Garcia C. (2002). Toxicity of cadmium to soil microbial activity: effect of sewage sludge addition to soil on the ecological dose. *Applied Soil Ecology*. (21), 149-158.
- National Research Center for Environmental and Hazardous Waste Management. Zoning of Cadmium Level in Flood Plains Area of Mae Tao and Mae Ku Subcatchments. (2005). Bangkok, Thailand: Chulalongkorn University.
- Padmavathiamma PK, Li LY. (2007). Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution* 184, 105-126.
- Phaenark C, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, Ngernsarsaruy C. (2009). Cd and Zn accumulation in plants from the Padaeng zinc mine area. *International Journal of Phytoremediation* (11), 479–495.
- Pongsakul P, Attajarusit S. (1999). Assessment of heavy metals in soils. *Thai Journal of Soils Fertilizer* (21), 71–82.
- Prapagdee B, Chanprasert M, Mongkolsuk S. (2013). Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus* L. *Chemosphere* 92(6), 659-666.
- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology* 28, 142-9.
- Sadeghi A, Karimi E, Dahazi PA, Javid MG, Dalvand Y, Askari H. (2012). Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil condition. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1503–1509.
- Sheng X, He L, Wang Q, Ye H, Jiang C. (2011). Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41, 168-214.
- Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma L. (2006). Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of The Total Environment* 368, 456-464.

ความสามารถของแอคติโนมัยซีท้านทานแคดเมียมในการกำจัดแคดเมียมออกจากน้ำและ การละลายแคดเมียมในดิน

โชตินันท์ จันประดิษฐ์¹, เบญจวรรณ ประภักดี¹, วิชญา รงค์สยามานนท์¹ และกรรณิการ์ ดวงมาลัย²

¹คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

E-mail: kik_chotinana@hotmail.com

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนโลหะหนักในน้ำและในดินก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางน้ำและทางดินที่สำคัญและส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต การปนเปื้อนโลหะหนักอาจเกิดได้จากแหล่งธรรมชาติและจากกิจกรรมของมนุษย์ การสะสมของโลหะหนักทั้งในน้ำและดินในปริมาณมากส่งผลให้เกิดการเสื่อมโทรมของทรัพยากรธรรมชาติ และเกิดการปนเปื้อนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแอคติโนมัยซีท้านทานแคดเมียมที่มีสมบัติในการส่งเสริมการเติบโตของพืชและมีความสามารถในการกำจัดแคดเมียมในสารละลาย และเพิ่มการละลายของแคดเมียมในดินปนเปื้อน โดยทำการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกมาจากป่าพรุ และป่าชายเลนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคดเมียมในเตรท และทดสอบการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก ผลการศึกษาพบว่าแอคติโนมัยซีทจำนวน 21 ไอโซเลตจากจำนวนทั้งหมด 92 ไอโซเลตที่คัดแยกมาจากป่าพรุ และป่าชายเลน ที่สามารถต้านทานต่อแคดเมียมในเตรทที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ โดยแอคติโนมัยซีททั้ง 21 ไอโซเลต สามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก ได้ในช่วง 5.13 ± 0.09 ถึง 87.91 ± 9.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีเพียงไอโซเลต K5PN1 ที่สร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกสูงสุด โดย K5PN1 จำแนกเป็น *Streptomyces rapamycinicus* และมีค่าความเข้มข้นของแคดเมียมต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ ที่ 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ *S. rapamycinicus* K5PN1 ยังมีประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียมออกจากสารละลายแคดเมียมได้ร้อยละ 41.7 ที่ระดับความเข้มข้นของแคดเมียม 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และช่วยละลายแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อน โดยไปช่วยเพิ่มค่าอุปพร้อมใช้ทางชีวภาพของแคดเมียมในดินปนเปื้อนได้ด้วย จึงสรุปได้ว่า *S. rapamycinicus* K5PN1 เหมาะสำหรับในการนำไปใช้บำบัดน้ำและดินปนเปื้อนแคดเมียม

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีท้านทานแคดเมียม, กรดอินโดล-3-แอซิดิก, แคดเมียม

Ability of Cadmium-resistant Actinomycetes on Cadmium Removal from Aqueous Solution and Cadmium Solubility in Contaminated Soil

**Chotinan Junpradit¹, Benjaphorn Prapagdee¹, Witchaya Rongsayamanont¹
and Kannika Duangmal²**

¹ Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

² Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand
E-mail: kik_chotinan@hotmail.com

Abstract

Heavy metal contaminated in water and soil cause the important water and soil pollution and affect living organisms. Heavy metal contamination occurs from natural sources and human activities. Excess accumulation of heavy metals in soil and water results in deterioration of natural resources and contamination to the food chain. This study focused on the screening of cadmium resistant actinomycetes which have plant growth promoting (PGP) property and the ability on cadmium removal from aqueous solution and increasing cadmium solubility in contaminated soil. Actinomycetes isolated from mangrove and swamp were cultured in culture medium amended with cadmium nitrate and measured the production of indole-3-acetic acid (IAA). The results found that only 21 actinomycetes among 92 actinomycetes isolated from rhizosphere soils at the swamp forest and mangrove were resistant to 2 mM cadmium nitrate. Twenty-one isolates produced IAA in the range of 5.13 ± 0.09 to 87.91 ± 9.69 $\mu\text{g/mL}$. Only one isolates, K5PN1, highly produced IAA and identified as *Streptomyces rapamycinicus*. The minimum inhibitory concentration of cadmium for K5PN1 was 3,000 mg/L. In addition, *S. rapamycinicus* K5PN1 had the ability to remove cadmium from aqueous solution. The percentage of removal was 41.7% and to solubilize cadmium from contaminated soil by increasing bioavailable cadmium concentration in contaminated soil. It could be concluded that *S. rapamycinicus* K5PN1 is suitable to use for bioremediation of cadmium contaminated water and soil.

Keywords: Cadmium resistant actinomycetes, Indole-3-acetic acid, Cadmium

บทนำ

การปนเปื้อนแคดเมียมในน้ำและในดินจัดเป็นมลพิษสิ่งแวดล้อมที่สำคัญ เนื่องจากแคดเมียมเป็นโลหะหนักที่เป็นพิษต่อมนุษย์ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แคดเมียมจัดเป็นโลหะที่ไม่จำเป็นต้องกระบวนการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต และไม่สามารถย่อยสลายได้ทั้งในกระบวนการทางชีวภาพ และทางกายภาพ ซึ่งวิธีการบำบัดดินและน้ำที่ปนเปื้อนแคดเมียมแบ่งออกเป็น วิธีทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ ซึ่งแต่ละประเภทย่อมมีข้อดี และข้อเสียที่แตกต่างกัน ทั้งในเรื่องของต้นทุนที่ใช้ในการบำบัด ผลกระทบต่อความหลากหลายต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม ความยั่งยืนของกระบวนการบำบัดและความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งกระบวนการทางชีวภาพจึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการกำจัดโลหะหนักที่ปนเปื้อนในน้ำและดินอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์และพืชในกระบวนการบำบัดโลหะหนัก โดยการนำจุลินทรีย์มาช่วยในการเคลื่อนย้าย การตรึง และการลดมลพิษในดิน ดินตะกอน และในน้ำใต้ดิน อย่างไรก็ตาม การใช้จุลินทรีย์และพืชในการบำบัดแคดเมียมยังมีข้อจำกัดหลายประการ โดยเฉพาะความเป็นพิษของแคดเมียมที่ปนเปื้อนในน้ำหรือในดินไปมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และพืช

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต มีการเจริญเป็นเส้นใย และมีการสร้างสปอร์ เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย แอคติโนมัยซีทมีกลไกที่สามารถต้านทานโลหะหนักที่มีความเข้มข้นสูงรวมทั้งความสามารถในส่งเสริมการเติบโตของพืช ความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิ หรือเอนไซม์ที่สามารถเป็นปัจจัยสำคัญในการต้านทานความเครียดจากสิ่งแวดล้อม หรือ ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของแคดเมียมสูง (Hamedi และ Dehghani, 2015) แอคติโนมัยซีทยังส่งเสริมการเติบโตของพืชได้ โดยการผลิตฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน ไซโตไคนิน จิบเบอเรลลิน และสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต ได้แก่ ซิเดอรอฟอร์ การละลายฟอสเฟต การตรึงไนโตรเจน โดยสามารถเรียกแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารดังกล่าวว่า แอคติโนมัยซีทส่งเสริมการเติบโตของพืช (Plant growth Promoting (PGP) actinomycetes) ซึ่งกรดอินโดล-3-แอซิดิก (Indole-3-acetic acid, IAA) ฮอร์โมนพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิน มีกลไกสำคัญในการเร่งการงอกของเมล็ด และการเจริญของรากพืช นอกจากนี้ ยังมีรายงานการกำจัดโลหะหนักโดยใช้แอคติโนมัยซีท ซึ่งพบว่าชีวมวลของ *Nocardiopsis* sp. MORSY1948 และ *Nocardia* sp. MORSY2014 สามารถกำจัด โครเมียม นิกเกิล และสังกะสีในสารละลายได้ (El-Gendy และ El-Bondkly, 2016) และ Hamedi และคณะ (2015) รายงานความสามารถของ *Promicromonospora* sp. UTMC 2243 ในการกำจัดแคดเมียมออกจากสารละลายได้ถึง 96.5%

ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทต้านทานแคดเมียม ที่คัดเลือกได้จากดินบริเวณป่าพรุ และดินบริเวณพื้นที่ป่าชายเลนทางภาคใต้ของประเทศไทย โดยภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทำการตรวจวัดการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกของแอคติโนมัยซีทต้านทานแคดเมียมที่คัดเลือกได้ นอกจากนี้ ยังทำการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียมที่ยับยั้งการเจริญของแอคติโนมัยซีท (minimum inhibitory concentration) และทำการศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีทต้านทานแคดเมียม ในการกำจัดแคดเมียมออกจากสารละลายและประสิทธิภาพในการเคลื่อนย้ายหรือละลายแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อน ซึ่งผลการศึกษารั้งนี้ สามารถนำแอคติโนมัยซีทต้านทานแคดเมียมนี้ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำและดินที่ปนเปื้อนแคดเมียมได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1 เพื่อคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่ต้านทานแคดเมียมและสามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก
- 2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีทต้านทานแคดเมียมในการกำจัดแคดเมียมออกจากสารละลายและดินที่ปนเปื้อนแคดเมียม

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถต้านทานแคดเมียม

นำแอคติโนมัยซีททั้งหมด 92 ไอโซเลตมาจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่คัดแยกจากป่าพรุ และป่าชายเลนทางภาคใต้ของประเทศไทย มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal Medium (MM)

agar ที่มีการเติมแคดเมียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (ดัดแปลงจาก Schmidt และคณะ, 2007) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน และคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการเจริญบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคดเมียมได้

2. การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมที่สามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก

ทำการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose yeast extract (GYE) agar เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ Cork borer เบอร์ 2 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 5 มิลลิเมตร เจาะลงบนผิวหน้าอาหารที่มีการเจริญของโคโลนีแอคติโนมัยซีท และนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE broth 20 มิลลิลิตรที่มีการเติม L-tryptophan ให้มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และเก็บส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ เพื่อนำไปตรวจวัดการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก โดยใช้วิธี Colorimetric assay (Gordon และ Weber, 1951)

3. การตรวจวัดการเจริญและการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกของแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมที่ระยะการเจริญต่างๆ

นำเซลล์แขวนลอยของแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมและสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 ที่มีจำนวนเชื้อในช่วง 10^5 - 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตรมาเพาะเลี้ยงในอาหาร GYE broth จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ 15 ตามลำดับ โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง เพื่อตรวจวัดการเจริญ และนำส่วนใสไปตรวจวัดปริมาณกรดอินโดล-3-แอซิดิก

4. การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียมที่ยับยั้งการเจริญแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียม

ทำการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM broth ที่เติมแคดเมียมไนเตรทที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 500 1,000 1,500 2,000 2,500 และ 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ดัดแปลงจาก Hamed และคณะ (2015) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บเซลล์เพื่อไปอบแห้งและตรวจวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง

5. การศึกษาการกำจัดแคดเมียมออกจากสารละลายแคดเมียมของแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียม

ทำการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE broth เป็นเวลา 3 วัน และทำการล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 รอบ และนำมาเติมในสารละลายแคดเมียมที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมไอออนที่ 25, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำไปเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยส่วนสารละลายด้วย Whatman filter paper No.42 เพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณแคดเมียมโดยใช้เครื่อง Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (FAAS) และนำมาคำนวณประสิทธิภาพการกำจัดแคดเมียมไอออนดังนี้ (Aloysius และคณะ, 1999)

$$\text{ประสิทธิภาพการกำจัดแคดเมียม (Removal efficiency) (\%)} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100$$

โดย ; C_i คือความเข้มข้นเริ่มต้นของแคดเมียม (มิลลิกรัมต่อลิตร)

C_f คือความเข้มข้นสุดท้ายของแคดเมียม (มิลลิกรัมต่อลิตร)

6. การศึกษาการละลายแคดเมียมในดินปนเปื้อนของแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียม

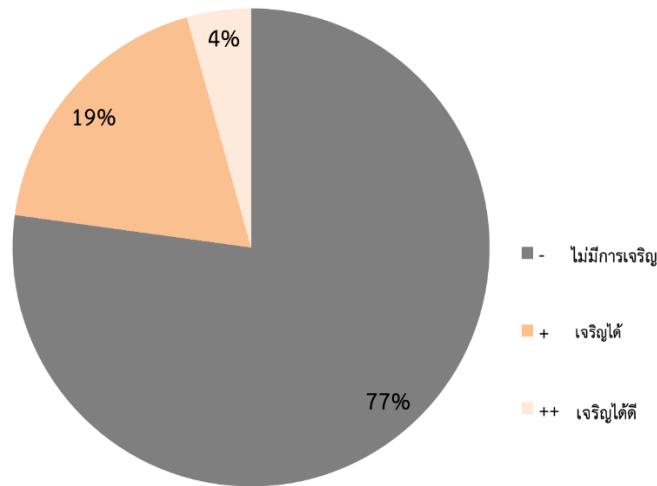
แบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ T1: ดินปนเปื้อนแคดเมียม และ T2: ดินปนเปื้อนแคดเมียม + สารแขวนลอยแอคติโนมัยซีทด้านทานแคดเมียม โดยทำการทดลองในหลอดพลาสติกที่ปราศจากเชื้อและห่อด้วยกระดาษสีน้ำตาล และนำไปเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างดินมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคดเมียมในรูปพร้อมใช้ทางชีวภาพ โดยการสกัดด้วยสาร DTPA- (Diethylenetriaminepentaacetic acid) ตามวิธีการของ Faust และ Christians

(2000) และตรวจวัดปริมาณแคดเมียมทั้งหมดในดิน (Total cadmium) ด้วยวิธีการสกัดและย่อยด้วยกรด โดยเครื่องไมโครเวฟไดเจสเตอร์ จากนั้นนำไปตรวจค่าความเข้มข้นของแคดเมียม โดยเครื่อง FAAS

ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกแอคติโนไมซีตต้านทานแคดเมียม

ผลการทดสอบการต้านทานแคดเมียมของแอคติโนไมซีตทั้ง 92 ไอโซเลตที่คัดแยกมาจากป่าพรุและป่าชายเลน พบว่าแอคติโนไมซีตจำนวน 21 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 23 ของแอคติโนไมซีตที่ทำการทดสอบ สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแคดเมียม



รูปที่ 1 ความต้านทานแคดเมียมของแอคติโนไมซีต 92 ไอโซเลต

จากรูปที่ 1 จะเห็นว่าแอคติโนไมซีตจากจำนวน 92 ไอโซเลตมีการเจริญบนอาหารที่เติมแคดเมียมในระดับเจริญได้ (+) จำนวน 17 ไอโซเลตคิดเป็นร้อยละ 19 และพบแอคติโนไมซีตที่สามารถเจริญบนอาหารที่เติมแคดเมียมในระดับเจริญได้ดี จำนวน 4 ไอโซเลตคิดเป็นร้อยละ 4 จากจำนวนทั้งหมดที่ทำการทดสอบ

2. การคัดแยกแอคติโนไมซีตต้านทานแคดเมียมที่สามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก

ผลการตรวจวัดปริมาณกรดอินโดล-3-แอซิดิกที่สร้างจากแอคติโนไมซีตต้านทานแคดเมียมทั้ง 21 ไอโซเลต พบว่าสามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ในช่วงระหว่าง 5.13 ± 0.09 และสูงสุดที่ 87.91 ± 9.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แอคติโนไมซีตต้านทานแคดเมียมส่วนใหญ่ถึงร้อยละ 57 สร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ในระดับต่ำ (ตารางที่ 1) โดยไอโซเลตที่มีการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกสูงสุดมีเพียง 1 ไอโซเลตคือไอโซเลต K5PN1

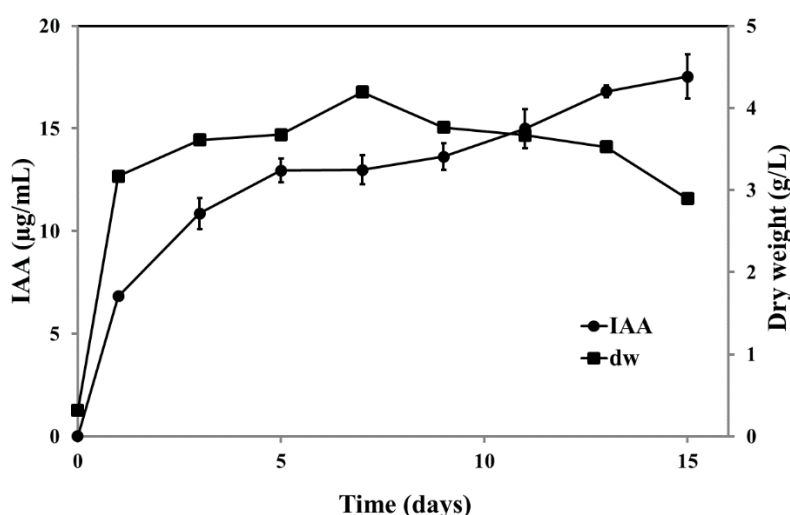
ตารางที่ 1 ระดับของกรดอินโดล-3-แอซิดิกที่สร้างจากแอคติโนไมซีตต้านทานแคดเมียม

IAA level ($\mu\text{g/mL}$)	Number of isolate (%)
0-15	12 (57)
15-30	7 (33)
31-45	1 (5)
>45	1 (5)
Total	21 (100)

เมื่อนำไอโซเลต K5PN1 มาทำการจำแนกชนิดโดยใช้วิธี 16S rRNA gene sequencing พบว่าไอโซเลต K5PN1 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces rapamycinicus* NRRL B-5491 ถึงร้อยละ 99.13 (% Similarity)

3. การเจริญและการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกของแอคติโนมัยซีท้านทานแคดเมียมที่คัดเลือกได้ที่ระยะเวลาการเจริญต่างๆ

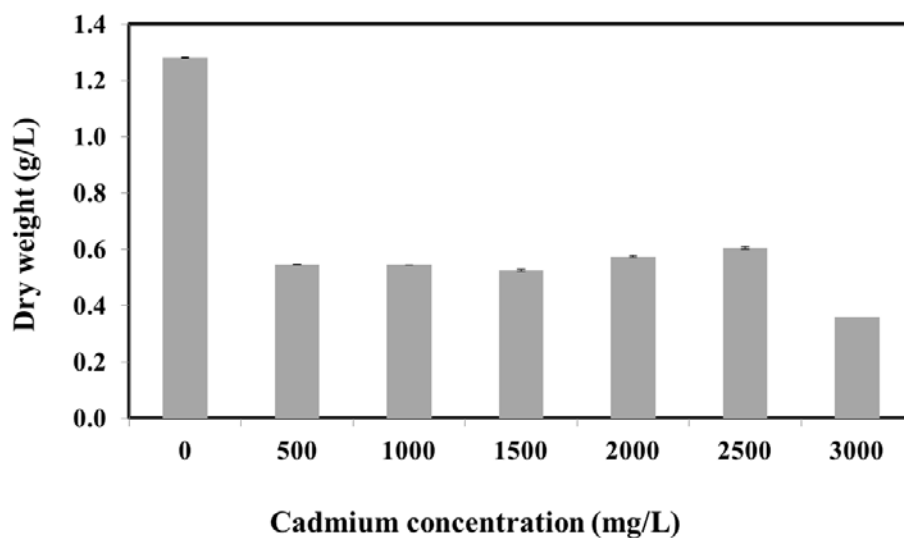
เมื่อนำ *S. rapamycinicus* K5PN1 ที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYE broth และทำการตรวจวัดการเจริญและการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิก ได้ผลการศึกษาในรูปแบบที่ 1 โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นเท่ากับ 0.32 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง 1 วัน พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นมาเป็น 3.17 กรัมต่อลิตร และการน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นไปจนสูงสุดในวันที่ 7 โดยได้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 4.19 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเชื้อมีการเจริญลดลง น้ำหนักเซลล์ที่ 2.90 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ส่วนผลการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกในแต่ละช่วงการเจริญของ *S. rapamycinicus* K5PN1 (รูปที่ 2) พบว่า *S. rapamycinicus* K5PN1 สร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยงที่ 1 วัน โดยสร้างได้ปริมาณ 6.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันที่ 15 ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงที่ 16.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากกราฟจะเห็นได้ว่า *S. rapamycinicus* K5PN1 เริ่มมีการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกหลังจากช่วง Exponential phase และมีการเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ช่วงของ Stationary phase ของการเจริญ



รูปที่ 2 น้ำหนักเซลล์แห้งและการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกของ *S. rapamycinicus* K5PN1 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ช่วงระยะเวลา 15 วัน

4. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียมในการยับยั้งการเจริญ (ค่า MIC) ของ *S. rapamycinicus* K5PN1

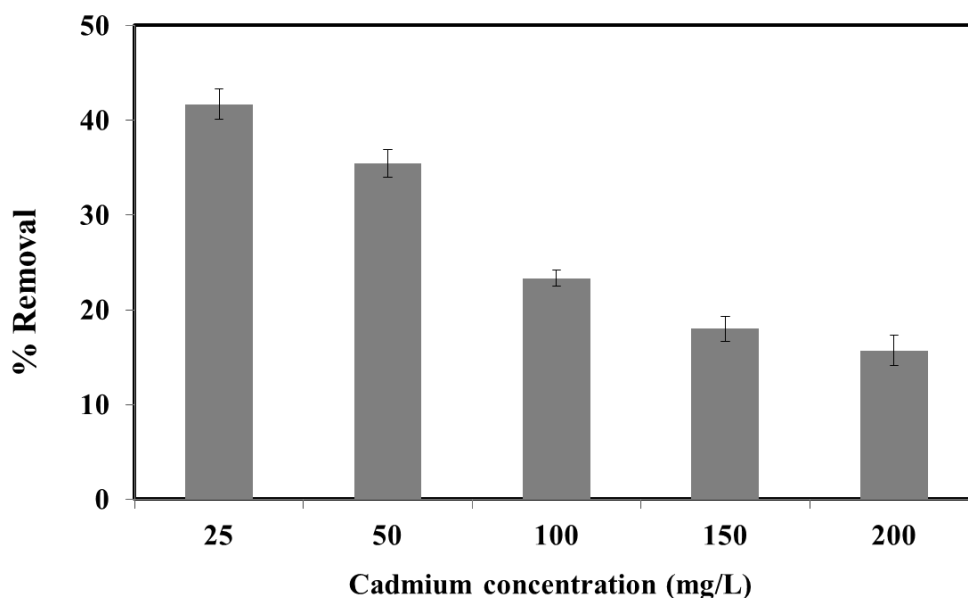
นำ *S. rapamycinicus* K5PN1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MM broth ที่เติมแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 วัน และนำมาวัดการเจริญของเชื้อในรูปแบบของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดย *S. rapamycinicus* K5PN1 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นที่ 0.36 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองในรูปแบบที่ 3 พบว่า *S. rapamycinicus* K5PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแคดเมียมมีการเจริญได้ดี แต่ *S. rapamycinicus* K5PN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแคดเมียมมีการเจริญลดลง โดยเฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแคดเมียมความเข้มข้น 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นแสดงให้เห็นว่าค่า MIC ของแคดเมียมต่อ *S. rapamycinicus* K5PN1 อยู่ระดับที่ 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 3 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *S. rapamycinicus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM broth ที่เติมแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ

5. การกำจัดแคดเมียมออกจากสารละลายแคดเมียมโดย *S. rapamycinicus* K5PN1

ผลการนำ *S. rapamycinicus* K5PN1 มากำจัดแคดเมียมในสารละลายแคดเมียม พบว่า *S. rapamycinicus* K5PN1 มีประสิทธิภาพการกำจัดแคดเมียมได้ถึงร้อยละ 41.7 ที่ระดับความเข้มข้นของแคดเมียม 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าประสิทธิภาพการกำจัดแคดเมียมลดลงเมื่อค่าความเข้มข้นของแคดเมียมเข้มข้นขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ความสามารถในการกำจัดแคดเมียมในสารละลายของ *S. rapamycinicus* K5PN1

6. ความสามารถของ *S. rapamycinicus* K5PN1 ในการส่งเสริมการละลายแคดเมียมในดินที่ปนเปื้อนแคดเมียม

ผลของการทดสอบความสามารถการส่งเสริมการละลายแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อนของ *S. rapamycinicus* K5PN1 แสดงในตารางที่ 2 พบว่าความเข้มข้นแคดเมียมในรูปพร้อมใช้ทางชีวภาพที่สกัดด้วย DTPA ในชุดการทดลอง T2 ที่มีการเติมสารแขวนลอยเซลล์ของ *S. rapamycinicus* K5PN1 หลังบ่มเป็นระยะเวลา 10 วัน มีค่ามากกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อลงไป (T1) รวมทั้งปริมาณแคดเมียมทั้งหมดในดินในชุดการทดลอง T2 น้อยกว่าในชุดควบคุมอีกด้วย

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของแคดเมียมในรูปพร้อมใช้ทางชีวภาพและแคดเมียมทั้งหมดในดินปนเปื้อนแคดเมียม

Treatment	Cadmium concentration	
	Bioavailable form (mg/L)	Total (mg/kg)
T1: cadmium contaminated soil (control)	13.15	34.80
T2: cadmium contaminated soil + <i>S. rapamycinicus</i>	15.46	33.02

สรุปและอภิปรายผล

จากผลการศึกษาพบว่า *S. rapamycinicus* K5PN1 เป็นแอคติโนมัยซีท้านทานแคดเมียมที่สามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้สูงสุดจากแอคติโนมัยซีท้านทานแคดเมียมทั้งหมด 21 ไอโซเลต กรดอินโดล-3-แอซิดิกจัดเป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซินที่มีความสำคัญต่อการเจริญของพืชในส่วนรากทั้งขนรากและรากแขนง ซึ่งมีแอล-ทริปโตเฟน (L-tryptophan) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ออกซินในพืชและจุลินทรีย์ (Frankenberger และ Arshad, 1995) กรดอินโดล-3-แอซิดิกเป็นปัจจัยสำคัญในช่วยพืชต้านทานความเครียดจากสิ่งแวดล้อม หรือ ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของแคดเมียมสูง (Hamed และ Dehghani, 2015) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rajkumar และ Freitas (2008) ได้รายงาน *Pseudomonas* PsM6 และ PjM15 สามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกที่ 17.74 ± 2.06 และ 39.88 ± 3.68 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สามารถเพิ่มมวลชีวภาพของ ฝักรัก (Ricinus communis) ได้ในสภาวะที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก นอกจากนี้ ยังพบการสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้ในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่หลากหลาย เช่น *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, และ *Klebsiella* (Khamna และคณะ, 2009; Trivedi และคณะ, 2007; Prapagdee และคณะ, 2013)

จากผลการศึกษา MIC ของ *S. rapamycinicus* K5PN1 ที่ 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีรายงานการการต้านทานแคดเมียมของ *Terichoderma* sp. ที่ 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งค่า MIC บอถึงความสามารถในการต้านทานของแบคทีเรียต่อ สารเฉพาะที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญโต นอกจากนี้ *S. rapamycinicus* K5PN1 ยังสามารถกำจัดแคดเมียมออกจากสารละลายได้ถึงร้อยละ 41.7 ที่ระดับความเข้มข้นของแคดเมียม 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งการดูดซับทางชีวภาพเป็นกระบวนการของการจับไอออนของสารละลายออกจากน้ำ กระบวนการนี้เป็นอิสระจากการเผาผลาญพลังงานระดับเซลล์ แบคทีเรียมีอัตราส่วนพื้นผิวต่อปริมาตรสูงจึงมีความสามารถในการดูดซับทางชีวภาพสูง ผิวสัมผัสขนาดใหญ่ที่มีประจุเป็นลบ ทำให้สามารถดูดซับไอออนบวกของโลหะได้ (Collins และ Stotzky, 1992) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hamed และคณะ (2015) รายงานความสามารถของ *Promicromonospora* sp. UTM 2243 สามารถกำจัดแคดเมียมออกจากสารละลายได้ถึง 96.5% และรายงานของ Hou และคณะ (2015) พบว่าการดูดซับทางชีวภาพของ *Klebsiella* sp. ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีค่าความสามารถในการดูดซับแคดเมียม เท่ากับ 170.4 มิลลิกรัมต่อกรัม

S. rapamycinicus K5PN1 ยังสามารถเพิ่มความเข้มข้นของแคดเมียมในรูปพร้อมใช้ทางชีวภาพเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งโลหะหนักถูกดึงหรือละลายออกมาจากดินที่ปนเปื้อนได้ โดยอาศัยกลไกของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอินทรีย์ได้ (Gavrilescu M., 2004) ส่งผลให้ความเข้มข้นในรูปพร้อมใช้ทางชีวภาพของแคดเมียมเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Prapagdeeและคณะ (2013) พบว่า *Micrococcus* sp. และ *Klebsiella* sp. ช่วยเพิ่มการละลายของแคดเมียมให้อยู่ในรูปพร้อมใช้ทางชีวภาพมากขึ้น และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพพืชในการบำบัดดินปนเปื้อนแคดเมียมอีกด้วย ซึ่งความเข้มข้นของแคดเมียมในรูปพร้อมใช้ทางชีวภาพเป็นปัจจัยที่สำคัญในการดูดดึงโลหะหนักจากดินของพืช ดังนั้นการช่วยการเจริญเติบโตของพืช และเพิ่มค่ารูปพร้อมใช้ทางชีวภาพของแคดเมียมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการบำบัดร่วมกับพืช ซึ่งจากผลการทดลองสรุปได้ว่า *S. rapamycinicus* K5PN1 มีความสามารถในการต้านทานแคดเมียมและความสามารถสร้างกรดอินโดล-3-แอซิดิกได้สูงสุด และ *S. rapamycinicus* K5PN1 มีประสิทธิภาพในการกำจัดแคดเมียมออกจากสารละลายและยังเพิ่มการ

ละลายของแคดเมียมในดินปนเปื้อนแคดเมียม ทำให้ค่าแคดเมียมในรูปพร้อมใช้ทางชีวภาพสูงขึ้นและช่วยให้พืชกำจัดแคดเมียมออกจากดินปนเปื้อนได้ดีขึ้น

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการนำแอคติโนมัยซีท้านทานแคดเมียมที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชคือ *S. rapamycinicus* K5PN1 ไปทำการศึกษเพื่อช่วยส่งเสริมการเติบโตของพืชและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดแคดเมียมในดินปนเปื้อนของพืช

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านความหลากหลายทางชีวภาพ ภายใต้โปรแกรมวิจัย “จุลินทรีย์ในป่าและแนวทางการใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตรและสิ่งแวดล้อม” (BDC-PG1-160003)

เอกสารอ้างอิง

- Aloysius R, Karim MIA, Ariff AB. (1999). The mechanism of cadmium removal from aqueous solution by non-metabolizing free and immobilized live biomass of *Rhizopus oligosporus*. World Journal of Microbiology and Biotechnol, 15, 571-578.
- Collins, Y.E. and Stotzky, G. (1992). Heavy metals alter the electrokinetic properties of bacteria, yeasts and clay minerals. Appl. Environ. Microbiol, 58 (5), 1592–1600.
- El-Gendy, El-Bondkly. (2016). Evaluation and enhancement of heavy metals bioremediation in aqueous solutions by *Nocardiopsis* sp. MORSY1948, and *Nocardia* sp. MORSY2014. Brazilian Journal of Microbiology, 47, 571-586.
- Faust MB, Christians NE. (2000). Copper reduces shoot growth and root development of creeping bent grass. Crop Science, 40, 498–502.
- Fazli M.M., Negin Soleimani , Mehrasbi M., Darabian S., Mohammadi J., Ramazani A. (2015). Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. Journal of Environmental Health Science & Engineering, 13-19
- Frankenberger, W.T., Arshad, M. (1995). Phytormones in Soils. Marcel Dekker Inc., New York, 35-71.
- Gavrilescu M. (2004). Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption. Engineering in Life Sciences, 4(3), 219-232.
- Gordon SA, Weber RP. Colormetric estimation of indoleacetic acid solon. (1951). Plant Physiology, 26(1), 192–195.
- Hamed J, Dehghani M, Mohammadian F. (2015). Isolation of extremely heavy metal resistant strains of rare actinomycetes from high metal content soil in Iran. International Journal of Environmental Research, 9(2), 475-48
- Hemida A. M, Abdel-Hamied M. R, El-Sayed A. (2013). Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt. Journal of Biology and Earth Science 3(2), 182-193.
- He L. Y, Zhang Y. F, Ma H. Y, Su L. N, Chen Z.J, Wang Q. Y, Qian M, Fang X. (2009). Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. Applied Soil Ecology 44(1),49-55

- Hou Y, Cheng K, Li Z, Ma X, Wei, Zhang L. Wang Y.(2018). Biosorption of Cadmium and Manganese Using Free Cells of *Klebsiella* sp. Isolated from Waste Water PLOS One, 13(5), e0198309
- Khamna S, Yokota A, Lumyong S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25, 649-655.
- Khan MU, Sessitsch A, Harris M, Fatima K, Imran A, Arslan M, Shabir G, Khan QM, Afzal M. (2015). Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils. Frontiers in Plant Science, 5: 755 (1-10).
- Nimnoi P, Pongsilp N, Lumyong S. (2010). Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010; 26: 649-655.
- Prapagdee B., Chanprasert M., Mongkolsuk S. (2013). Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*. Chemosphere, 92, 659–666.
- Sameera B., Sripathy H. P., Nalini M.S., (2018). Actinomycetes from the Coffee Plantation Soils of Western Ghats: Diversity and Enzymatic Potentials. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7(8), 3599-3611.
- Schmidt A, Haferburg G , Schmidt As, Lischke U, Merten D, Ghergel F, Buchel G, Kothe E. (2009). Heavy metal resistance to the extreme: *Streptomyces* strains from a former uranium mining area. Geochemistry, 69, 35-44.
- Sejiny, M. (1991) Growth Phases of Some Antibiotics Producing *Streptomyces* and Their Identification. Journal of King Abdulaziz University: Science, 3, 21-29.

การศึกษาขนาดและรูปแบบของโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ ที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล

ศรียาพรณ ธาระนารถ^{2*} บัลลังก์ เนื่องแสง² วคิน ยูวณะเตมีย์² และ รชนิมข หิรัญสัจจาเลิศ^{1,2}

¹หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล

²คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี 22170

sripapan@buu.ac.th.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาขนาดและรูปแบบของโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 ชุดการทดลองคือ กุ้งไม่ถูกตัดตาได้รับอาหารเม็ดปกติหรือชุดควบคุม (N=12), กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้างได้รับอาหารเม็ดปกติ (N=12), กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมนความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 500 mg/kg ของอาหาร (N=16, 16, 16 และ 8) ตามลำดับ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน เก็บตัวอย่างรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือด ในวันที่ 35 และ 60 ของการเลี้ยง จากการหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่ของวันที่ 35 พบว่า กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้างได้รับอาหารเม็ดปกติมีค่าสูงกว่าการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนกุ้งที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน เปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่มีค่าไม่แตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง จากการวัดปริมาณโปรตีนในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ พบว่าในเลือดมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับรังไข่ และตับ/ตับอ่อนซึ่งมีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน ในการตรวจสอบรูปแบบโปรตีนทั้งหมดด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จำนวน 20-40 แถบ และเมื่อศึกษาขนาดของโปรตีนไวเทลลินด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนไวเทลลินของกุ้งกุลาดำที่ขนาด 74 กิโลดาลตัน พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน มีการผลิตโปรตีนไวเทลลินสูงที่สุดโดยพบแถบโปรตีนไวเทลลินชัดเจนที่สุดในรังไข่และเลือดตามลำดับ แต่ไม่พบในตับ/ตับอ่อน

คำสำคัญ: เวสเทิร์นบลอต, 17 เบต้า-เอสตราไดออล, โปรตีนไวเทลลิน, กุ้งกุลาดำ

Identification of size and pattern of Vitelline in the female domesticated giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) broodstock fed with 17 β -estradiol hormone enhanced diets

Sripapan Tharanart² Bunlung Nuangsaeng² Vasin Yuvanatemiya²
and Rachanimuk Hiransuchalert^{1,2}

¹ Marine Biotechnology Research Unit

² Faculty of Marine Technology, Burapha University, Chanthaburi Campus, Chanthaburi, Thailand.

E-mail; sripapan@buu.ac.th

Abstract

This study was examined the vitelline protein levels examination in term of size and pattern in the female domesticated giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) broodstock. The samples were divided into 6 treatments, i.e., shrimps fed with diets without hormone (N=12), eyestalk-ablation shrimps fed with diets without hormone (N=12), shrimps fed with diets enhanced with 17 β -estradiol hormone at 10, 50, 100 and 500 mg/kg (N=16, 16, 16 and 8), respectively. The experiment had been performed for a period of 60 days and the samples were collected at day 35 and 60 for determinations of ovary, hepatopancreas and hemolymph. The results showed that the average GSI of eyestalk-ablation shrimp fed with diets without hormone was significantly higher than other groups ($p<0.05$) at day 35. While, there was no statistically significant difference of the GSI in each experimental groups at day 60. The protein levels in hemolymph were higher than the one in ovary and hepatopancreas. Moreover, analysis protein patterns by SDS-PAGE in ovaries, hepatopancreas and hemolymph were found that the protein bands could be seen with 20-40 bands. Size of vitelline protein were analyzed by Western Blotting through using anti-vitelline of giant tiger shrimp at the size of 74 kilodalton, it was found that shrimp fed with hormone-mixed diets of 17 β -estradiol hormone at 100 mg / kg of diet at 35 days showed the highest production of vitellin protein. The most clearly vitellin protein were found in the ovaries and blood, respectively, but not in the hepatopancreas.

Keywords: Western Blot; 17 β -estradiol; vitelline protein; *Penaeus monodon*

บทนำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นสัตว์น้ำเค็มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้ประเทศไทยมากเป็นอันดับแรกในบรรดาสัตว์น้ำ (กรมประมง, 2538) ต่อมาอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งกุลาดำประสบปัญหาด้านการผลิตกุ้งที่มีคุณภาพ ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งคือการไม่เจริญพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในโรงเรือน (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, 2556) ปัจจุบันเกษตรกรกระตุนการวางไข่ของกุ้งกุลาดำด้วยวิธีการตัดก้านตา เนื่องจากบริเวณก้านตาของแม่พันธุ์กุ้งมีฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนารังไข่ หากตัดก้านตาออกจะส่งผลให้แม่พันธุ์กุ้งพัฒนารังไข่ไปจนถึงระยะสมบูรณ์เพศและพร้อมที่จะผสมพันธุ์ตามเวลาที่ต้องการ แต่การตัดก้านตากุ้งส่งผลให้ฮอร์โมนต่างๆ ในตัวกุ้งทำงานผิดปกติ ลูกกุ้งที่ได้ไม่แข็งแรง แม่พันธุ์บอบช้ำ ที่สำคัญสิ้นเปลืองแม่พันธุ์ที่ราคาแพงและหาได้ยาก (กรมประมง, 2538) นอกจากนี้ยังมีอีกแนวทางหนึ่ง คือ การใช้ฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล (17β -estradiol) ในการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ โดย 17 เบต้า-เอสตราไดออล เป็นฮอร์โมนกลุ่มสเตียรอยด์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการไวเทลโลเจเนซิส (vitellogenesis) มีโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนโพเรเจสเทโรน และ ฮอร์โมน 17 แอลฟา-ไฮดรอกซีโพเรเจสเตโรน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในกุ้งกุลาดำ (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, 2556) โดยทั่วไปแล้วการตรวจสอบความสมบูรณ์เพศในกุ้งกุลาดำที่แม่นยำ สามารถทำได้โดยการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในอวัยวะต่างๆ เช่น เลือด ตับ/ตับอ่อน และรังไข่ ซึ่งการตรวจสอบมีหลายวิธี เช่น การให้โปรตีนเคลื่อนที่ผ่านเจลด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลในการแยกโปรตีน การวัดปริมาณโปรตีนโดยตรงด้วยวิธีเอสเทิร์นบลอต ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง แต่จะมีความจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีสูง จึงเล็งเห็นความสำคัญในการพัฒนาข้อมูลรูปแบบโปรตีนที่มีอยู่รังไข่ของกุ้งกุลาดำ เพื่อเป็นการเพิ่มองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ในกุ้งกุลาดำ เพื่อเป็นพื้นฐานที่สำคัญนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ในกุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นข้อมูลในการเข้าใจกลไกการสมบูรณ์เพศของกุ้งกุลาดำ และสามารถเพาะผลิตแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในสภาพกักขังได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาขนาดและรูปแบบของโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมอาหารเม็ดสำหรับเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

นำอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำมาบดให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.1 ไมครอน ผสมฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล ความเข้มข้นต่างกันจำนวน 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg และ 500 mg/kg ของอาหาร นำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่องอัดเม็ดให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร ยาว 4 มิลลิเมตร นำเข้าตู้อบไอน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำอาหารไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วคัดอาหารผ่านตะแกรง บรรจุใส่ถุงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. วิธีดำเนินการทดลองและการเก็บตัวอย่าง

เลี้ยงกุ้งกุลาดำพ่อแม่พันธุ์จากศูนย์เพิ่มจำนวนพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี อายุ 20 เดือน ด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 60 วัน ในโรงเรือนระบบปิด ณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี แบ่งการทดลองเป็น 6 ชุดการทดลอง ได้แก่ กุ้งไม่ตัดตาได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน หรือชุดควบคุม (T1), กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้างได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน (T2), กุ้งไม่ตัดตาได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg (T3), 50 mg/kg (T4), 100 mg/kg (T5) และ 500 mg/kg (T6) เก็บตัวอย่างในวันที่ 35 วัน และ 60 วัน มาชั่งน้ำหนักตัว วัดความยาว ชั่งน้ำหนักรังไข่ และ เก็บเลือด รังไข่ และตับ/ตับอ่อนที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยในแต่ละถึงการทดลองจะมีแม่พันธุ์กุ้ง 8 ตัว และ พ่อพันธุ์กุ้ง 1 ตัว

3. การสร้างกราฟสารถลายโปรตีนมาตรฐาน

สร้างกราฟสารถลายโปรตีนมาตรฐานโดยใช้สารถลาย BSA (bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้น 0, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นใส่สารถลาย BSA ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปในไมโครเพลท เติม Dry reagent (Bio-Rad, Bradford 1x Dry reagent) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐานระหว่างค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารถลายมาตรฐาน BSA โดยรายงานเป็นค่ามิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

นำรังไข่ และตับ/ตับอ่อนไปบดในสารละลาย TBS-PMSF (50mM Tris-HCl, pH7.5 ที่มี 0.9% NaCl และ 1mM phenyl- methylsulphonyl fluoride (PMSF)) โดยใช้อัตราส่วนเนื้อเยื่อ 0.5 กรัม ต่อ TBS-PMSF 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดส่วนใสให้หมดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเซนตริฟิวก์ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแยกเอาส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดโปรตีนไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford (Bradford, 1976)

5. การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนทั้งหมดของแม่พันธุ์กึ่งกลาดำด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

นำสารสกัดจากรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำสารสกัดเจือจาง ไปผสมกับ 2X Sample buffer (0.5 tris-HCl pH 7.4, Glycerol, 10% SDS, bromophenol blue และ β -Merceptoethanol) (อัตราส่วน 1:2) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน 30 ไมโครกรัม นำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกปริมาณโปรตีนด้วย 10% polyacrylamide gel ย้อมสีด้วย Coomassie blue R-250 ประมาณ 15 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินด้วย destaining Solution

6. การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต

นำสารสกัดจากรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือด มาแยกโปรตีนใน 10% Separating gel จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลลงแผ่น PVDF เมมเบรน นำแผ่นเมมเบรนแช่ใน Blocking Buffer เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทสารละลายออก จากนั้นเติม washing buffer เขย่าเป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายออกแล้วเติม Anti-rabbit VTG, 1°Ab (1:5000) เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ชำมคืน หลังจากนั้นเท 1°Ab ออก แล้วเติม washing buffer และเขย่าเป็นเวลา 5 นาที ทำ 3 ครั้ง และเทออก จากนั้นเติม Goat Anti-Rabbit IgG-AP Conjugate, 2°Ab (1:3000) นำไปเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาเท 2°Ab ออก ตรวจสอบการปรากฏของแถบโปรตีนด้วยการเติมน้ำยา develop (Ap color Reagent A, Ap color Reagent B, 25x Ap color Development Buffer) เขย่าด้วยมือจนกว่าจะปรากฏแถบสี ล้างสีส่วนเกินแล้วบันทึกผลการทำปฏิกิริยา โดยโปรตีนไวเทลลินที่คาดหวังมีขนาด 74 กิโลดาลตัน

ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

จากการนำตัวอย่างแม่พันธุ์กึ่งกลาดำก่อนเริ่มการทดลองมาชั่งน้ำหนัก และวัดความยาว พบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวมีค่าสูงสุดในแม่พันธุ์กึ่งกลาดำที่ 2 (116.90±19.06 กรัม) และน้อยที่สุดในชุดการทดลองที่ 3 (94.59±19.66 กรัม) ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวในแม่พันธุ์กึ่งกลาดำทั้งสองชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ในขณะที่ค่าเฉลี่ยความยาวในแม่พันธุ์กึ่งกลาดำชุดการทดลองที่ 2 มีค่าสูงสุด (22.76±1.14 เซนติเมตร) มีความแตกต่างจากชุดการทดลองที่ 3, 4 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 1) เมื่อนำตัวอย่างแม่พันธุ์กึ่งกลาดำที่ได้จากการทดลองเป็นระยะเวลา 35 วัน และ 60 วัน มาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และ ชั่งน้ำหนักของรังไข่ พบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของแม่พันธุ์กึ่ง ความยาวของแม่พันธุ์กึ่งและค่าดัชนีรังไข่ (%GSI) มีค่าดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและความยาวของแม่พันธุ์กึ่งกลาดำก่อนการทดลอง

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ย		
	น้ำหนักตัว (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	จำนวนตัวอย่าง (N)
1	105.21±11.65 ^{ab}	21.87±1.20 ^{ab}	12
2	116.90±19.06 ^b	22.76±1.14 ^b	12
3	94.59±19.66 ^a	21.07±1.52 ^a	16
4	105.10±22.25 ^{ab}	21.44±2.00 ^a	16
5	108.13±14.66 ^{ab}	21.88±1.02 ^{ab}	16
6	110.18±16.85 ^{ab}	21.48±1.59 ^a	8

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

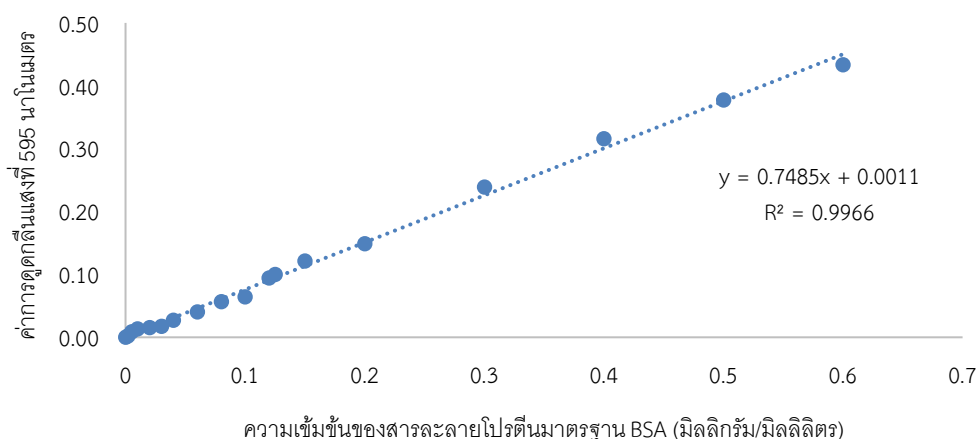
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว ความยาว น้ำหนักไข่ และ ค่าดัชนีไข่ (%GSI) ของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำ

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ย					
	น้ำหนักตัว (กรัม)		ความยาว (เซนติเมตร)		GSI (%)	
	35 วัน	60 วัน	35 วัน	60 วัน	35 วัน	60 วัน
1	100.81±13.26 ^a	95.00±11.18 ^a	21.35±1.14 ^a	20.63±1.00 ^a	1.08±0.35 ^{ab}	1.15±0.30 ^a
2	108.86±24.10 ^a	-	22.08±1.81 ^a	-	1.78±0.65 ^b	-
3	91.53±11.26 ^a	81.06±4.22 ^a	20.48±0.85 ^a	19.40±1.01 ^a	0.97±0.56 ^a	1.10±0.34 ^a
4	108.61±22.93 ^a	95.47±26.34 ^a	21.78±1.28 ^a	20.85±2.18 ^a	1.36±0.53 ^{ab}	1.29±0.76 ^a
5	111.05±16.72 ^a	99.60±16.83 ^a	21.58±1.28 ^a	21.53±1.34 ^a	1.12±0.24 ^{ab}	1.37±0.70 ^a
6	104.58±21.88 ^a	-	20.67±1.36 ^a	-	1.04±0.16 ^{ab}	-

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

เมื่อนำสารละลาย BSA เจือจางความเข้มข้น 0, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.4, 0.06, 0.08, 0.1, 0.125, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Bradford ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่ 595 นาโนเมตร สร้างกราฟโปรตีนมาตรฐานระหว่างค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA โดยรายงานเป็นค่ามิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

3. การศึกษาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)

จากการวัดปริมาณโปรตีนของสารสกัดไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำตามวิธีของ Bradford (1976) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA (ภาพที่ 1) พบว่า ปริมาณโปรตีนในไข่ของแม่พันธุ์ที่เลี้ยงเป็นระยะ เวลา 35 วัน และ 60 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 2.09–4.05 และ 2.99–5.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณโปรตีนในตับ/ตับอ่อนของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน และ 60 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 2.03–4.55 และ 2.58–4.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ ปริมาณโปรตีนในเลือดของแม่พันธุ์ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน และ 60 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 90.70–176.87.32 และ 131.72–199.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

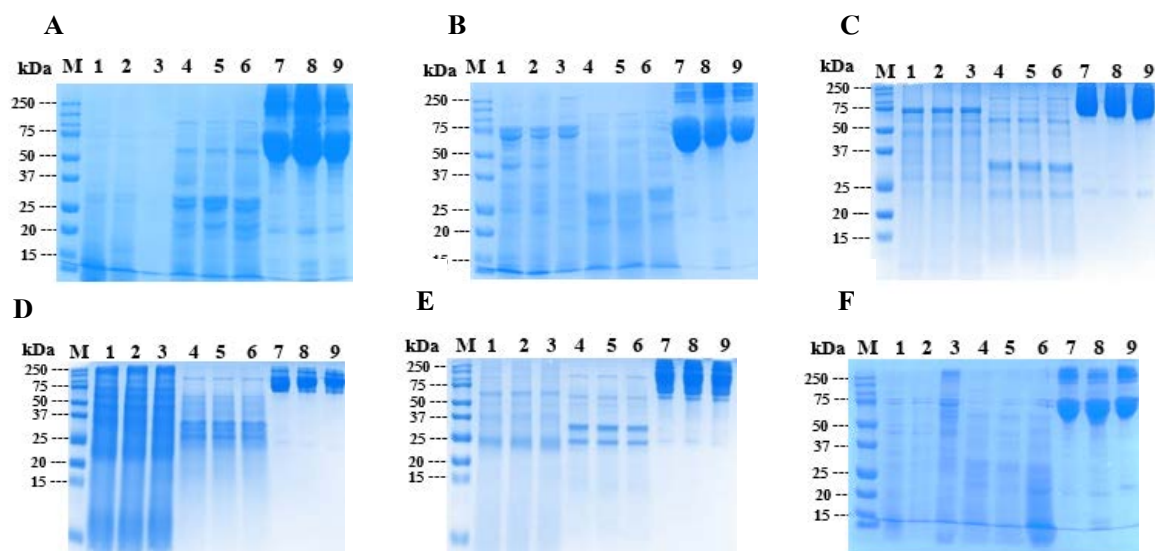
ระยะเวลา ในการทดลอง	ชุด การทดลองที่	ปริมาณโปรตีน ในรังไข่ (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน ในตับ/ตับอ่อน (mg/ml)	ปริมาณโปรตีน ในเลือด (mg/ml)
35 วัน	1	2.76±1.83	4.55±2.88	76.51±48.73
	2	2.52±1.21	2.03±0.48	91.64±40.36
	3	2.09±1.26	2.46±0.99	104.52±52.10
	4	3.62±0.67	2.79±1.31	90.70±75.40
	5	4.05±3.17	3.40±2.58	176.46±87.32
	6	3.79±0.93	2.46±0.71	124.40±63.81
60 วัน	1	2.99±1.19	3.36±1.10	131.72±52.65
	3	4.40±1.03	3.08±3.48	199.88±114.25
	4	5.17±2.07	2.58±1.24	140.01±62.29
	5	4.76±1.67	4.08±0.82	157.49±56.48

4. การเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนทั้งหมดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

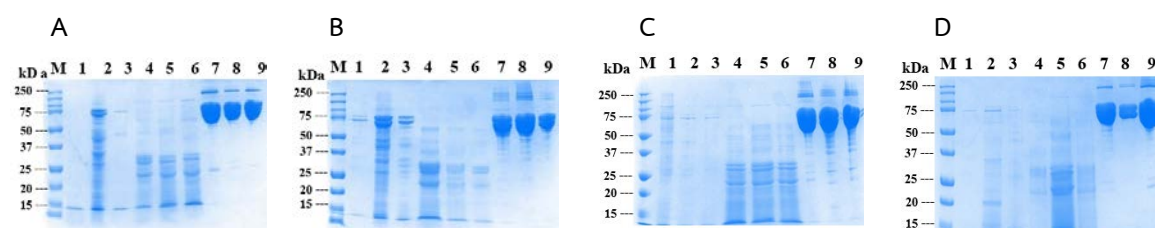
จากการเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีนในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 และ 60 วัน พบแถบโปรตีนประมาณ 20 ถึง 40 แถบ จากตัวอย่างที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 พบว่า โปรตีนที่พบในเลือด รังไข่ และตับ/ตับอ่อนของการทดลองมีจำนวน 5 แถบที่เหมือนกัน ได้แก่ 104, 74, 58, 28 และ 23 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนที่พบเฉพาะในรังไข่มีจำนวน 2 แถบ ได้แก่ 157 และ 130 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนที่พบเฉพาะในตับ/ตับอ่อน มีจำนวน 2 แถบ ได้แก่ 53 และ 45 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนที่พบเฉพาะในเลือดมีจำนวน 2 แถบ ได้แก่ 240 และ 34 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนขนาด 240, 220, 200 และ 168 กิโลดาลตัน ไม่พบในตับ/ตับอ่อนของการทดลอง และในทุกอวัยวะของชุดควบคุมไม่พบแถบโปรตีนที่ 200 กิโลดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 2 และจากตัวอย่างที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 พบว่า โปรตีนที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อนและเลือดของการทดลองมีจำนวน 9 แถบที่เหมือนกัน ได้แก่ 104, 58, 50, 45, 38, 34, 28, 26 และ 23 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนที่พบเฉพาะในรังไข่มีจำนวน 3 แถบ ได้แก่ 83, 63 และ 20 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนที่พบเฉพาะในเลือดมีจำนวน 2 แถบ ได้แก่ 168 และ 157 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนขนาด 240, 200, 168 และ 83 กิโลดาลตัน ไม่พบในตับ/ตับอ่อนของการทดลอง แถบโปรตีนขนาด 83 กิโลดาลตัน พบเฉพาะในรังไข่และเลือดเท่านั้น และในทุกอวัยวะของชุดควบคุมไม่พบแถบโปรตีนขนาด 240, 200 และ 53 กิโลดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 3

5. การวิเคราะห์ผลโปรตีนไวเทลลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต

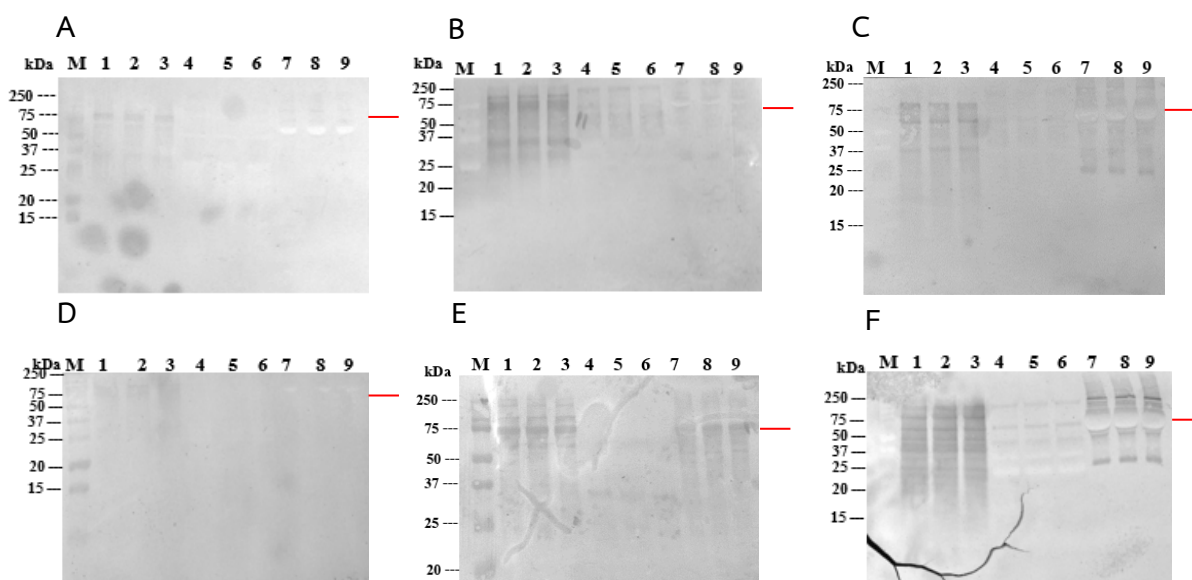
จากการวิเคราะห์ระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 และ 60 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง โดยโปรตีนไวเทลลินที่คาดหวังมีขนาด 74 กิโลดาลตัน พบว่า ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน พบแถบโปรตีนจำนวน 13 ขนาด ได้แก่ 200, 157, 130, 104, 74, 63, 58, 50, 45, 38, 34, 28 และ 26 กิโลดาลตัน โดยกุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร พบแถบโปรตีนไวเทลลินขนาด 74 กิโลดาลตันชัดเจนที่สุดในรังไข่และเลือดตามลำดับ แต่ไม่พบในตับ/ตับอ่อน รายละเอียดดังภาพที่ 4 และตารางที่ 4 และ ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน พบแถบโปรตีนจำนวน 15 ขนาด ได้แก่ 240, 200, 168, 157, 130, 104, 74, 63, 58, 50, 45, 38, 34, 26 และ 23 กิโลดาลตัน โดยกุ้งที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร พบแถบโปรตีนไวเทลลินขนาด 74 กิโลดาลตันชัดเจนที่สุดในรังไข่และเลือดตามลำดับ แต่ไม่พบในตับ/ตับอ่อน รายละเอียดดังภาพที่ 5 และตารางที่ 4



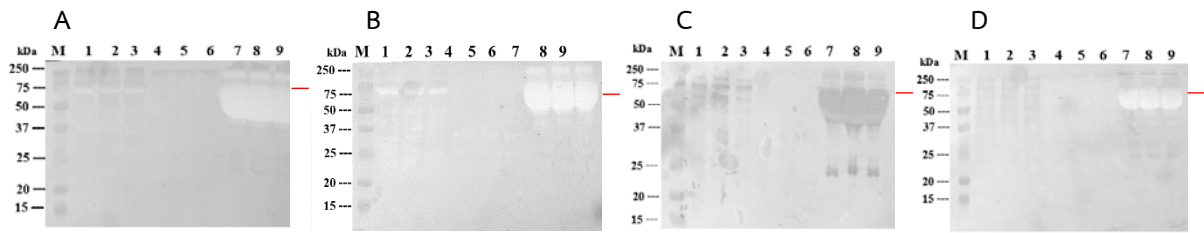
ภาพที่ 2 ผล SDS-PAGE ของรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน A=ชุดการทดลองที่ 1, B=ชุดการทดลองที่ 2, C=ชุดการทดลองที่ 3, D=ชุดการทดลองที่ 4, E=ชุดการทดลองที่ 5 และ F=ชุดการทดลองที่ 6 โดยที่ M = โปรตีนมาตรฐาน โดยช่อง 1-3 = รังไข่, 4-6 = ตับ/ตับอ่อน และ 7-9 = เลือด



ภาพที่ 3 ผล SDS-PAGE ของรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน A=ชุดการทดลองที่ 1, B=ชุดการทดลองที่ 3, C=ชุดการทดลองที่ 4 และ D=ชุดการทดลองที่ 5 โดยที่ M= โปรตีนมาตรฐาน โดยช่อง 1-3 = รังไข่, 4-6 = ตับ/ตับอ่อน และ 7-9 = เลือด



ภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง A = ชุดการทดลองที่ 1, B = ชุดการทดลองที่ 2, C = ชุดการทดลองที่ 3 D = ชุดการทดลองที่ 4, E = ชุดการทดลองที่ 5, F = ชุดการทดลองที่ 6 M = โปรตีนมาตรฐาน ช่อง 1-3 = รังไข่, 4-6 = ตับ/ตับอ่อน และ 7-9 = เลือด



ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำ ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน วิเคราะห์ด้วยเครื่องส่งถ่ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนแบบกึ่งแห้ง

A = ชุดการทดลองที่ 1, B = ชุดการทดลองที่ 3, C = ชุดการทดลองที่ 4, D = ชุดการทดลองที่ 5 M = โปรตีนมาตรฐาน
ช่อง 1-3 = รังไข่, 4-6 = ตับ/ตับอ่อน และ 7-9 = เลือด

ตารางที่ 4 ผลของโปรตีนไวเทลลินที่พบในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำ

	kDa	กึ่งไม่ถูกตัดดา ได้รับอาหารเม็ด ปกติ			กึ่งที่ถูกตัดดา 1 ข้างได้รับ อาหารเม็ดปกติ			กึ่งที่ได้รับ อาหารเม็ดผสม ฮอร์โมน 10 mg/kg			กึ่งที่ได้รับ อาหารเม็ดผสม ฮอร์โมน 50 mg/kg			กึ่งที่ได้รับ อาหารเม็ดผสม ฮอร์โมน 100 mg/kg			กึ่งที่ได้รับ อาหารเม็ดผสม ฮอร์โมน 500 mg/kg		
		OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL	OV	HP	HL
35	104	++	-	+	++	-	+	++	-	+	+	-	-	++	-	+	-	-	+
วัน	74	+	-	-	++	+	+	+	-	+	+	-	-	+++	-	++	++	-	-
60	104	+	-	+	NO	NO	NO	+	-	-	-	-	+	+	-	+	NO	NO	NO
วัน	74	-	-	-	NO	NO	NO	-	-	-	++	-	++	+	-	-	NO	NO	NO

หมายเหตุ: OV = รังไข่ HP = ตับ/ตับอ่อน HL = เลือด NO = ไม่มีตัวอย่าง

สรุปและอภิปรายผล

1. ผลของฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลต่อน้ำหนักตัว ความยาว และ เปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่ของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำ

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว และความยาวของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว และความยาวของแม่พันธุ์กิ้งกูดทั้ง 6 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่ของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำในกึ่งที่ถูกตัดดา 1 ข้างได้รับอาหารเม็ดปกติ มีเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่แตกต่างจากกึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg ของอาหาร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับชุดการทดลองอื่นที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน ส่วนในแม่พันธุ์กิ้งกูดดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและความยาว และค่าเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่ของแม่พันธุ์กิ้งกูดทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 2) อาจมีผลมาจากการถูกตัดก้านตาส่งผลให้ฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์บกพร่องหรือถูกทำลายทำให้รังไข่มีการพัฒนาเร็วกว่าปกติ เนื่องจากการตัดก้านตากิ่งเป็นการทำลาย X-Organ และ Sinus Gland ซึ่งเป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนที่ไปยับยั้งการวางไข่ (gonad inhibiting hormone : GIH) โดยจะทำงานร่วมกับระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) ที่ทำหน้าที่ควบคุมระดับของฮอร์โมนสองชนิด คือ ฮอร์โมน GIH และฮอร์โมน GSH (gonad stimulating hormone) ที่มีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนารังไข่ กล่าวคือเมื่อ GIH ถูกทำลายส่งผลให้ GSH ทำงานได้มากกว่าปกติ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นที่ได้รับฮอร์โมน พบว่า ไม่แตกต่างทางสถิติ อาจเป็นเพราะฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลสามารถชักนำให้เกิดกระบวนการไวเทลโลเจเนซิส และการพัฒนารังไข่ในแม่พันธุ์กิ้งกูดดำได้ ซึ่งมีผลไปในทางเดียวกับการศึกษาของ รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ และคณะ (2556) ที่ศึกษาอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลต่อการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำ พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่กิ้งกูดดำที่ถูกตัดก้านตา 1 ข้าง และกิ้งกูดดำที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออล 1 mg/kg มีค่าสูงกว่ากึ่งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม โครงสร้างของฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลที่ใช้ในงานวิจัยนี้อาจไม่ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตในกลุ่มครึ่งเตี้ยโดยตรงจึงทำให้รังไข่ของแม่พันธุ์กิ้งกูดดำพัฒนาไม่ถึงระยะสุดท้าย

2. การศึกษาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford

จากการวัดปริมาณโปรตีนจากสารสกัดโปรตีนจากรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และ เลือดของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำ พบว่า เลือดมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด ส่วนรังไข่และตับ/ตับอ่อนมีปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งให้ผลในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ สุนิสา ปุ่มาก (2558) ที่ผลเป็นเช่นนี้เนื่องจากในกึ่งกุลาดำเลือดจะเป็นตัวกลางในการส่งผ่านโปรตีนไวเทลินจากตับ/ตับอ่อน ไปเก็บสะสมที่รังไข่ สรุปคือเมื่อตับ/ตับอ่อนถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน จึงมีการสร้างและสะสมโปรตีนไข่แดงขึ้น (โปรตีนไวเทลิน) จากนั้นจะส่งไปเพื่อพัฒนารังไข่ผ่านทางเลือดจึงมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในเลือดสูงกว่าในรังไข่และตับ/ตับอ่อน เนื่องจากเลือดเป็นตัวกลางในการส่งโปรตีนจากอวัยวะหนึ่งไปยังอีกอวัยวะหนึ่ง (นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร, 2550)

3. การวิเคราะห์ผลโปรตีนไวเทลินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต

จากการตรวจสอบระดับโปรตีนไวเทลินในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือด ของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำที่ด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต แบบกึ่งแห้ง รุ่น Trans-Blot® Turbo™ Transfer System โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนไวเทลินของกึ่งกุลาดำที่ขนาด 74 กิโลดาลตัน พบว่า ในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน พบแถบโปรตีน 13 ขนาด ได้แก่ 200, 157, 130, 104, 74, 63, 58, 50, 45, 38, 34, 28 และ 26 กิโลดาลตัน และ ในรังไข่ ตับ/ตับอ่อน และเลือดของแม่พันธุ์กึ่งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน พบแถบโปรตีน 15 ขนาด ได้แก่ 240, 200, 168, 157, 130, 104, 74, 63, 58, 50, 45, 38, 34, 26 และ 23 กิโลดาลตัน โดยในตัวอย่างที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน มีแถบโปรตีนขนาด 240 168 และ 23 กิโลดาลตันเพิ่มมาจากการทดลองที่ 35 วัน แต่ไม่พบโปรตีนขนาด 28 กิโลดาลตัน การที่พบแถบโปรตีนนอกเหนือจากขนาดที่คาดหวังอาจคล้ายกับงานวิจัยของ Longyant *et al.*, 2000 ที่ได้วิเคราะห์โปรตีนไวเทลินในรังไข่และเลือดของกึ่งกุลาดำด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอตแล้วพบว่าในรังไข่มีโปรตีนไวเทลิน 5 ขนาด ได้แก่ 104, 83, 74, 58 และ 45 กิโลดาลตัน และในเลือดมีโปรตีนไวเทลิน 4 ขนาด ได้แก่ 200, 104, 83 และ 74 กิโลดาลตัน โดยได้อธิบายความสัมพันธ์ทางอิมมูโนแอกทีฟระหว่างโปรตีนเหล่านี้ว่า ไวเทโลจีจีนอาจถูกปล่อยออกสู่กระแสเลือดสองรูปแบบ คือ ขนาด 200 และ 74 กิโลดาลตัน จากนั้นโพลีเปปไทด์ขนาด 200 กิโลดาลตัน จะถูกประมวลผลเป็นโพลีเปปไทด์ขนาด 104 และ 83 กิโลดาลตัน หรือนำเข้าสู่เซลล์โดยตรง ในโอโอไซต์โปรตีนขนาด 104 กิโลดาลตัน จะถูกแยกออกเป็นโพลีเปปไทด์ขนาด 58 และ 45 กิโลดาลตัน ในขณะที่โปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน จะได้รับการตัดแปลงเล็กน้อยหรือยังคงไม่เปลี่ยนแปลง

จากงานวิจัย พบว่า โปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน ในกึ่งที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน จะพบเป็นแถบจางๆ ในกึ่งไม่ถูกตัดตาได้รับอาหารเม็ดปกติ และ ในกึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 และ 50 mg/kg ของอาหาร แถบชัดขึ้นในกึ่งที่ถูกตัดตา 1 ชั่วโมงได้รับอาหารเม็ดปกติ และ ในกึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg ของอาหาร และชัดเจนที่สุดในกึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร การที่กึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร มีการผลิตโปรตีนสูงกว่ากึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg ของอาหาร อาจเป็นเพราะในกึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหาร ยังคงมีการส่งโปรตีนจากเลือดไปสู่รังไข่ สังเกตได้จากในเลือดพบแถบโปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตันค่อนข้างชัดเจน แต่ไม่พบในเลือดของกึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 500 mg/kg ของอาหาร ในขณะที่กึ่งที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ไม่พบโปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน ในกึ่งไม่ถูกตัดตาได้รับอาหารเม็ดปกติ และ ในกึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg/kg ของอาหาร ในกึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหารจะเห็นแถบโปรตีนจางๆ และชัดเจนขึ้นในกึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 50 mg/kg ของอาหาร แต่ก็ยังไม่ชัดเจนเท่ากึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 100 mg/kg ของอาหารที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน อาจเป็นเพราะโครงสร้างของฮอร์โมน 17 เบต้า-เอสตราไดออลที่ใช้ในงานวิจัยนี้ส่งผลต่อการผลิตโปรตีนไวเทลินในระยะสั้นๆ

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Hiransuchalert *et al.* (2013) ที่ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนไวเทโลเจนิในรังไข่ระยะต่างๆ ในกึ่งกุลาดำโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต พบแถบโปรตีนที่ 104 และ 74 กิโลดาลตัน ในรังไข่แต่ไม่พบโปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน ในตับ/ตับอ่อน ซึ่งจากการทดลองมีแนวโน้มที่มีทิศทางเดียวกับ Hiransuchalert *et al.* (2013) ที่พบแถบโปรตีนที่ 74 กิโลดาลตันในเลือดและรังไข่มากกว่าในตับ/ตับอ่อน และจากการที่นพคุณ ภักดิณรงค์ (2555) ได้สรุปกลไกการกระตุ้นด้วยเอสโตรเจนต่อการทำงานของตับตับอ่อน รังไข่ และการวางไข่ ไว้ว่า ฮอร์โมนในกลุ่มเอสโตรเจนจะไปกระตุ้นตับ/ตับอ่อนให้สร้างไวเทโลจีจีน แล้วส่งผ่านเลือดไปเก็บสะสมในรังไข่และทำให้รังไข่สร้างเอสโตรเจนเพื่อกระตุ้นให้ไข่สุก เกิดความสมบูรณ์ของโอโอไซต์ (Oocyte maturation) และเกิดการวางไข่ของแม่กึ่ง อาจเป็นสาเหตุให้ไม่พบแถบโปรตีนไวเทลินขนาด 74 กิโลดาลตัน ในตับ/ตับอ่อน

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. (2538). สถิติการประมงแห่งประเทศไทย ปี 2538 Fisheries Statistics of Thailand 1995. กรุงเทพฯ: กรมประมง.
- นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร. (2550). ชีวิตวิทยาของครัสเตเชียน. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์ บางกอกน้อย.
- นพคุณ รักดิณรงค์. (2555). ฮอร์โมนเอสโตรเจน บทบาทในงานวิจัยกุ้ง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย อุบลราชธานี, 14(2), 45-54.
- รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ. (2556). กระบวนการสร้างไข่แดงของกุ้งกุลาดำ. แก่นเกษตร, 41(2), 286-287.
- รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, ธนัช เลิศพัฒนาไพบูรณ์, พิชธีราพร ทิพย์พชรโรจน์, เสรี ดอนเหนือ และสมเกียรติ ปิยะธีรธิตวรกุล. (2556). การพัฒนาอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β -estradiol เพื่อการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในโรงเรือน. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง, 7(2), 14-26.
- สุนิสา ปุ่มาก. (2558). ผลของอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β -estradiol ต่อระดับโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เลี้ยงจากบ่อดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีทางทะเล; บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยบูรพา 101 หน้า.
- Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Hiransuchalert, R., Thamniemdee, N., Khamnamtong, B., Yamano, K. and Klinbunga, S. (2013). Expression profiles and localization of vitellogenin mRNA and protein during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 412-413 (2013), 193-201.
- Longyant, S., Sithigorngul, P., Thammapalerd, N., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. (2000). Characterization of vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn *Penaeus monodon* using monoclonal antibodies specific to vitellin subunits. *Invertebrate Reproduction and Development*, 37(3):211-221.

การผลิตกรดซัคซินิกจากกากน้ำตาลด้วยเชื้อ *Actinobacillus succinogenes*

อัครอ หะยิอับดุลเลาะ¹ ชุตินา ศิลาณินเว¹ ปัทธญา กรธัญญ์²
ปรีชา กลีกรมไพบูลย์¹ และ อุไรวรรณ ขุนจันทร์^{1*}

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี จ.ปัตตานี 94000

²ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี จ.ปัตตานี 94000

*email : uraiwan.khu@psu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตกรดซัคซินิกโดยใช้แบคทีเรียชนิด *Actinobacillus succinogenes* TISTR 1994 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้สภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจนและมีการเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตกรดซัคซินิกให้ได้ผลผลิตที่สูง และมีการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟิวริกก่อนนำไปใช้เพื่อศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลให้แบคทีเรียสามารถผลิตกรดซัคซินิกได้สูงสุด ได้แก่ เวลาในการหมักที่ 24 48 และ 60 ชั่วโมง และความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดที่ 30 60 90 120 150 และ 180 g/L จากการศึกษาคุณสมบัติของกากน้ำตาลพบว่าปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด 70.29 % และพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดซัคซินิกได้สูงสุด 0.62 ± 0.02 g/L และสำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซัคซินิก พบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดเริ่มต้น 180 g/L สามารถให้ผลผลิตกรดซัคซินิกได้สูงที่สุด 2.16 ± 0.12 g/L ผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตกรดซัคซินิกโดยใช้เชื้อ *Actinobacillus succinogenes* TISTR 1994 สามารถลดต้นทุนในการผลิตและใช้ชีวมวลที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมได้อย่างมีนัยสำคัญ

Keywords: กรดซัคซินิก กากน้ำตาล *Actinobacillus succinogenes*

Production of Succinic Acid from Molasses by *Actinobacillus succinogenes*

Asro Hajiabdullo¹, Chutima Silamaneewet¹, Paphatchaya Konthathalim²,
Preecha kasikamphaiboon¹ and Uraiwan Khunjan^{1*}

¹Department of Science, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University,
Pattani Campus, Thailand 94000

²Instrument Center, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University,
Pattani Campus, Thailand 94000

*E-mail: uraiwan.khu@psu.ac.th

Abstract

In this study, the production of succinic acid by using *Actinobacillus succinogenes* TISTR 1994 in culture media was performed using sugar cane molasses, a by-product of sugar production process, as a carbon source under anaerobic condition with the addition of carbon dioxide to create the optimal conditions for the growth of bacteria to achieve high yield of succinic acid. The molasses was pretreated with sulfuric acid before being used to study various properties. The optimal conditions that allow bacteria to produce the highest succinic acid yield were examined with the fermentation times of 24, 48, and 60 hours and the initial total sugar concentrations of 30, 60, 90, 120, 150 and 180 g/L. It was found that the molasses used in this study contained 70.29 % of total sugar. The results showed that the highest succinic acid production of 0.61 ± 0.02 g/L was obtained at 24 hours of fermentation. The optimal initial total sugar concentration was found to be 180 g/L, resulting in the highest succinic acid production 2.16 ± 0.12 g/L. The results obtained in this study suggest that the use of molasses as a raw material in the production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* TISTR 1994 can significantly reduce the production costs and utilize biomass wastes from industry.

Keywords: Succinic acid, Molasses, *Actinobacillus succinogenes*

บทนำ

ปัจจุบันความแปรปรวนของสภาพภูมิอากาศและภัยพิบัติทางธรรมชาติหรือภาวะโลกร้อนที่กำลังเกิดขึ้นถือเป็นเรื่องที่น่าเป็นห่วงอย่างยิ่ง สภาพเศรษฐกิจในปัจจุบันได้เกิดการเปลี่ยนแปลงและมีการปฏิวัติอุตสาหกรรมเปลี่ยนเป็นการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล (ปิโตรเลียม ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ) เข้ามาในกระบวนการผลิตมากขึ้นซึ่งอัตราการใช้น้ำมันของภาคอุตสาหกรรมเคมีมีมากกว่า 1 พันล้านบาร์เรลต่อปี (Delhomme *et al.*, 2008) เมื่อพิจารณาถึงการบริโภคเชื้อเพลิงฟอสซิลที่มีอยู่อย่างจำกัดแล้ว จึงไม่น่าแปลกใจที่สถานะเศรษฐกิจในปัจจุบันต้องเผชิญกับปัญหาหลายประการ ได้แก่ ราคาน้ำมันที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ความขัดแย้งทางด้านการเมืองและผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อมที่รุนแรงขึ้นทุกวัน ปัญหาเหล่านี้ทำให้เกิดการกระตุ้นทางเลือกใหม่เพื่อทดแทนการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล โดยหันมาใช้เทคโนโลยีชีวภาพ หรือเรียกว่า “เคมีสีเขียว” เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมทางเคมีและทดแทนทรัพยากรเชื้อเพลิงฟอสซิลที่สูญหายบางส่วน เช่น การเลือกใช้แหล่งทรัพยากรหมุนเวียนในกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารเคมีถือเป็นการช่วยลดผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อมจากอุตสาหกรรมเคมี เช่น ลดการใช้พลังงานด้วยการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพ และใช้ตัวทำละลายที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยลง (Delhomme *et al.*, 2008) กระทรวงพลังงานสหรัฐ (The US Department of Energy; DOE) ได้มุ่งเน้นถึงการใช้แหล่งทรัพยากรหมุนเวียนในการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตสารเคมีที่ยั่งยืน (Werpy *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2006; Beauprez *et al.*, 2010) และได้มีการระบุถึง 10 อันดับหน่วยพื้นฐานทางเคมีที่มีศักยภาพในการผลิตอนุพันธ์ที่มีมูลค่าจากแหล่งพลังงานทดแทน ซึ่งกรดซัคซินิก (succinic acid, SA) (Werpy *et al.*, 2004; Beauprez *et al.*, 2010) ถือเป็นส่วนตัวกลางที่สำคัญและถูกนำมาใช้ในการผลิตภาคอุตสาหกรรมอย่างมากมาย เช่น อุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอก/สารลดแรงตึงผิว อุตสาหกรรมการผลิตอาหาร (เช่น สารเพิ่มความข้นหนืดในอาหาร สารปรุงแต่งอาหารหรือสารต้านจุลชีพ) และอุตสาหกรรมเภสัชกรรม (Beauprez *et al.*, 2010) ส่วนใหญ่การผลิตกรดซัคซินิกจะอาศัยกระบวนการทางเคมีแบบดั้งเดิมในการผลิต เช่น การออกซิเดชันของพาราฟิน การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน การรีดิวซ์กรดมาเลอิกและมาเลอิกแอนไฮไดรด์ ซึ่งจะเกิดข้อเสียตามมาอย่างมากจากการใช้ปิโตรเคมี กระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์เป็นวิธีที่สะอาดและมีประสิทธิภาพสามารถเป็นทางเลือกใหม่ทดแทนการใช้ปิโตรเคมี และจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดซัคซินิกสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากการหมักแอลกอฮอล์ได้ ทำให้ช่วยลดผลกระทบภาวะเรือนกระจกได้ (Xu *et al.*, 2018) สอดคล้องกับนโยบายรัฐบาลร่างยุทธศาสตร์ชาติระยะ 20 ปี (พ.ศ. 2560-2579) โดยการพัฒนาและใช้พลังงานที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อลดการปล่อยแก๊สเรือนกระจก กระบวนการผลิตกรดซัคซินิกทางชีวภาพนั้นอาศัยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน จากการศึกษาของ Liu *et al.* (2008) ได้ศึกษาการผลิตกรดซัคซินิกจากกากน้ำตาลโดยแบคทีเรียชนิด *A. succinogenes* CGMCC1593 ในสภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจนและได้เลือกวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟิวริกพบว่าสามารถให้ผลผลิตกรดซัคซินิกสูงถึง $79.5 \pm 1.1\%$ ในระยะเวลาการหมัก 60 ชั่วโมง ซึ่งการศึกษาของ Almgvist *et al.* (2016) ได้ใช้ *A. succinogenes* ในการผลิตกรดซัคซินิกโดยผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ดังนี้ xylose, arabinose, glucose, mannose และ galactose ซึ่งเติมน้ำตาลแต่ละชนิดเพียง 10 g/L พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสจะทำให้ได้ผลผลิตของกรดซัคซินิกสูงที่สุดที่ 0.56 g/g ในขณะที่ xylose, mannose และ arabinose ให้ผลผลิตกรดซัคซินิกเป็น 0.42, 0.38 และ 0.44 g/g ตามลำดับ จะเห็นได้ว่ากากน้ำตาลซึ่งเป็นวัตถุดิบผลพลอยได้มีที่องค์ประกอบของน้ำตาลมากมายสามารถให้ผลผลิตกรดซัคซินิกที่สูง

ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้เลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ *A. succinogenes* สำหรับใช้ผลิตกรดซัคซินิกโดยใช้วัตถุดิบจากชีวภาพเป็นแหล่งคาร์บอน คือ กากน้ำตาล ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลจากอ้อยประกอบกับประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีการปลูกอ้อยในปริมาณมาก จากอ้อย 1 ตันจะได้กากน้ำตาลประมาณ 60 กิโลกรัม ดังนั้น โรงงานน้ำตาลปัจจุบันจะมีกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ไม่น้อยกว่า 1 ล้าน 5 แสนตัน จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำกากน้ำตาลมาใช้ในการผลิตกรดซัคซินิกซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่กากน้ำตาลในการนำมาผลิตสารกรดซัคซินิก ผลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นแนวทางหนึ่งในการนำไปศึกษาต่อยอดเพื่อการผลิตกรดซัคซินิกสำหรับใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาคูสมบัติของกากน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดซัคซินิกด้วยแบคทีเรีย *A. succinogenes*
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้สำหรับการผลิตกรดซัคซินิกให้ได้ปริมาณสูงด้วยแบคทีเรีย *A. succinogenes*

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 1 แสดงวิธีการและอ้างอิงของการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

รายการ	วิธีการวิเคราะห์	อ้างอิง
การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้น	หาความชื้นโดยใช้โถดูดความชื้น (Desicator)	AOAC (1999)
การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์เถ้า	หาเปอร์เซ็นต์เถ้าโดยใช้เตาเผาเถ้า (Furnace)	AOAC (1999)
การวิเคราะห์โปรตีนรวม	Kjeldahl Method	AOAC (1999)
การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ไขมัน	Soxhlet	AOAC (2019)
การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์โลหะ	ICP-AES	Huseyin <i>et al.</i> (2015)
การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์เกลือ	หาเปอร์เซ็นต์เกลือโดยใช้สารละลาย KSCN ในการไตเตรต	AOAC (2002)
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	Dinitrosalicylic acid method (DNS-method)	Miller (1959)
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด	Phenol Sulfuric acid Method	Dubois <i>et al.</i> (1956) ศิริพันธ์, (2559)

2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Actinobacillus succinogenes*

ดัดแปลงตามวิธีการของ Jiang *et al.* (2013)

นำเชื้อแบคทีเรีย *Actinobacillus succinogenes* TISTR 1994 จากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ culture media ที่มีส่วนประกอบของอาหารดังนี้ tryptone 15 g/L, peptone from soy bean 5 g/L และ NaCl 5 g/L อาหารปริมาตร 50 mL ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 mL และนำอาหารไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน และนำเชื้อนี้ไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3. การเตรียมตัวอย่างกากน้ำตาล

ดัดแปลงตามวิธีของ Liu *et al.* (2008)

กากน้ำตาลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ซื้อจากบริษัทมิตรผล จำกัด แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar concentration) ตามวิธีในข้อที่ 1 โดยเริ่มต้นจากการเจือจางกากน้ำตาลด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดสุดท้ายเท่ากับ 30% w/v จากนั้นนำสารละลายกากน้ำตาลไปปรับสภาพด้วยกรด 5 M H₂SO₄ โดยปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 3.5 จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตั้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 40000 rpm เป็นเวลา 30 นาที แล้วเอาส่วนใสไปปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.5 ด้วย 10 M NaOH แล้วนำกากน้ำตาลที่ผ่านการปรับสภาพไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

4. การศึกษาปริมาณกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซัคซินิก

สำหรับวิธีการผลิตกรดซัคซินิกดัดแปลงตามวิธีของ Liu *et al.* (2008); Jiang *et al.* (2013) นำเชื้อแบคทีเรีย *A. succinogenes* ตั้งต้นที่เตรียมได้จากข้อ 2 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.2 ปริมาณ 10% (v/v) ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ fermentation medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และมีส่วนประกอบของอาหารดังนี้ yeast extract 10 g/L, NaH₂PO₄ 1 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, MgCl₂ 0.2 g/L, CaCl 0.2 g/L, NaCl 1 g/L และ MgCO₃ 30 g/L เพื่อเป็นบัฟเฟอร์ควบคุมความค่า pH รวมถึงใช้เป็นแหล่งให้แก๊ส CO₂ ในระหว่างการหมัก และปรับ pH เท่ากับ 6.5 โดยเตรียมอาหารปริมาตร 100 mL ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 mL และเติมกากน้ำตาลที่ผ่านการปรับสภาพมาแล้วตามวิธีในข้อที่ 3 ปริมาณ 30 60 90 120 150 และ 180 g/L ตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาที และเก็บตัวอย่างที่เวลา 24 48 และ 60 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลตามวิธีในข้อที่ 5

5. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

5.1 การวิเคราะห์กรดซัคซินิกและกรดอินทรีย์ชนิดอื่น

ดัดแปลงตามวิธีของ Borges and Pereira (2010); Chen *et al.* (2011) และ ญัฐพงษ์ (2559) เก็บตัวอย่างที่ได้จากการหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วถ่ายส่วนใสเพื่อนำไปกรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.45 μm ใส่ลงในขวดตัวอย่างก่อนจะนำไปวิเคราะห์กรดซัคซินิก กรดอะซิติกและกรดฟอร์มิก ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น 1,200 ยี่ห้อ Agilent โดยใช้ตัวตรวจวัดแบบ photodiode array detector คอลัมน์ C18 ความยาว 250 mm และเส้นผ่าศูนย์กลางภายในขนาด 4.6 mm ซึ่งใช้สารละลาย 0.025 KH_2PO_4 เป็น mobile phase ที่อัตราการไหล 1 mL/min injVot : 20 μL และใช้คอลัมน์ที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}\text{C}$ จากนั้นคำนวณค่าที่วิเคราะห์ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณปริมาณของกรดซัคซินิก กรดอะซิติก และ กรดฟอร์มิกในตัวอย่าง

5.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

5.2.1 สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

5.2.2 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ One-way analysis of variance (ANOVA) โดยการเปรียบเทียบข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาลตามวิธีการในตารางที่ 1 สามารถให้ผลการวิเคราะห์จากวิธีการต่าง ๆ ได้ดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดลองของการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยวิธีการต่าง ๆ

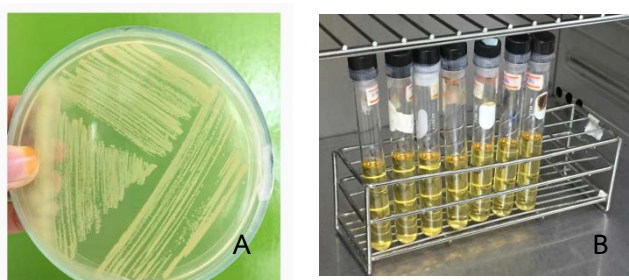
รายการ	ผลการวิเคราะห์ (% w/w)	ผลจากอ้างอิง (% w/w)
ความชื้น	27.82	24.6 $\pm$ 1.3 Sutigoolabud <i>et al.</i> (2005)
เถ้า	7.8	7-15 จุไรรัตน์ (2543)
โปรตีนรวม	3.8	2.5-4.5 จุไรรัตน์ (2543)
ไขมัน	0.027	0.1-1 จุไรรัตน์ (2543)
โลหะรวม ได้แก่ Fe Mg Ca Cu Na และ K	0.76	8.9 Liu <i>et al.</i> (2008)
เกลือ	4.07	4.6 Liu <i>et al.</i> (2008)
น้ำตาลรีดิวซ์	25.68	23.5 $\pm$ 1.9 Sutigoolabud <i>et al.</i> (2005)
น้ำตาลรวมทั้งหมด	70.29	38.8 $\pm$ 2.9 Sutigoolabud <i>et al.</i> (2005)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาลที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลจากอ้อยพบว่ายังคงมีปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดที่สูงถึง 70.29 % ซึ่งถือว่าสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลได้ดี กากน้ำตาลเป็นหนึ่งในชีวมวลที่มีการนำไปใช้อุตสาหกรรมการผลิตอย่างแพร่หลาย เช่น ในอุตสาหกรรมผลิต เอทานอลผ่านกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ อุตสาหกรรมผลิตกรดแลคติก อุตสาหกรรมผลิตยีสต์ เป็นต้น แต่ก่อนที่จะนำกากน้ำตาลก่อนจะเข้าสู่กระบวนการผลิต จำเป็นต้องมีการปรับปรุงสภาพเนื่องจากกากน้ำตาลมีโลหะหนักอยู่ในระดับหนึ่ง (เช่น เหล็ก สังกะสี ทองแดง แมงกานีส แมกนีเซียม แคลเซียม ฯลฯ) และจากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณโลหะรวมอยู่ที่ 0.76 % ซึ่งถือ

ว่าอยู่เกณฑ์ที่พอดีไม่มากเกินไปเพราะไม่เช่นนั้นโลหะหนักเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ มีผลต่อค่า pH ของแหล่งคาร์บอน และทำให้เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตเสื่อมสภาพ

2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Actinobacillus succinogenes*

จากการเตรียมเชื้อแบคทีเรียในอาหารแข็ง (medium agar) และอาหารเหลว (culture media) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่าเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ O.D. 600 เท่ากับ 1.764 ± 0.004 ถือว่าเชื้อมีความการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเมื่อนำไปใช้ในการหมักต้องเจือจางให้ได้ค่า O.D. 600 ที่เหมือนกันคือ 1.2



ภาพที่ 1 โคโลนีของเชื้อ *Actinobacillus succinogenes* บนอาหารแข็ง (A) และการขยายเชื้อ *Actinobacillus succinogenes* ลงในอาหารเหลว (B)

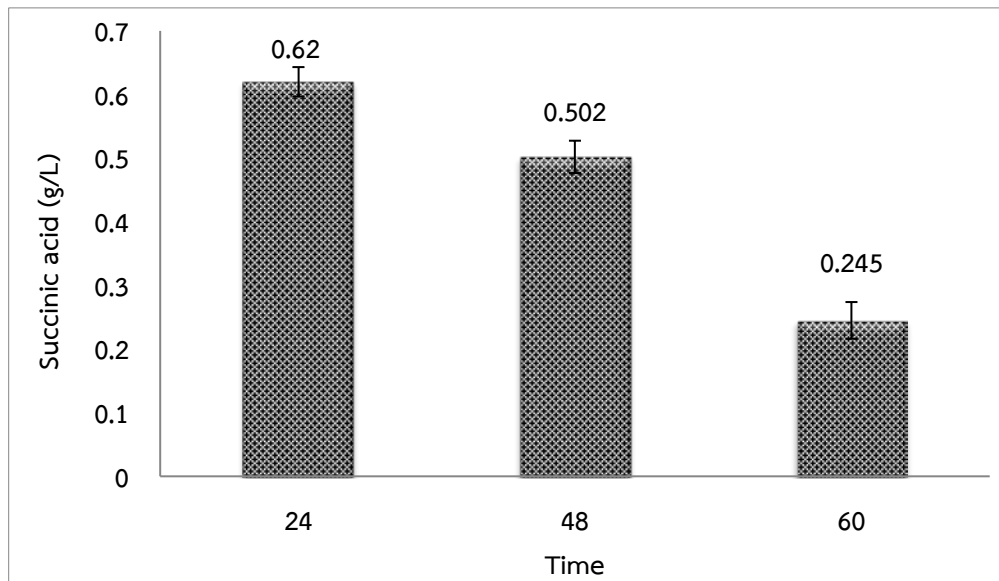
3. การเตรียมตัวอย่างกากน้ำตาล

เนื่องจากกากน้ำตาลมีโลหะหนักอยู่ในระดับหนึ่งจึงจำเป็นต้องปรับสภาพก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง สำหรับวิธีการปรับสภาพสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ไตรแคลเซียมฟอสเฟต โปแตสเซียมเพอร์โรไฮไดรด์ กรดเอทิลีนไดอามีนเตตระอะซิติก (EDTA) เรซินแลกเปลี่ยนไอออน และถ่านกัมมันต์ (Roukas, 1998; Kotzamanidis *et al.*, 2002; Wee, 2004) จากการศึกษาของ Liu *et al.* (2008) ได้ศึกษาการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยวิธีที่ต่างกันไป ดังนี้ Sulfuric acid treatment, Potassium ferrocyanide treatment, Activated carbon treatment และ Cation exchange resin ผลปรากฏว่าการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกสามารถให้ผลผลิตกรดซัคซินิกได้สูงที่สุด 50.1 ± 0.8 g/L เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Xu *et al.* (2015) ที่เห็นได้ชัดว่าการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟิวริกอย่างเดียวหรือจะใช้กรดซัลฟิวริกไปควบคู่กับโปแตสเซียมเพอร์โรไฮไดรด์ จึงเห็นได้ชัดว่าการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเพียงอย่างเดียวเป็นที่ต้องการสำหรับการผลิตกรดซัคซินิกในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง จากการทดลองปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดวิเคราะห์ที่ได้เบื้องต้นในหัวข้อที่ 1 พบว่ามี 70.29 % จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดลดลงเหลือ 30 % จึงนำไปปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกต่อไป

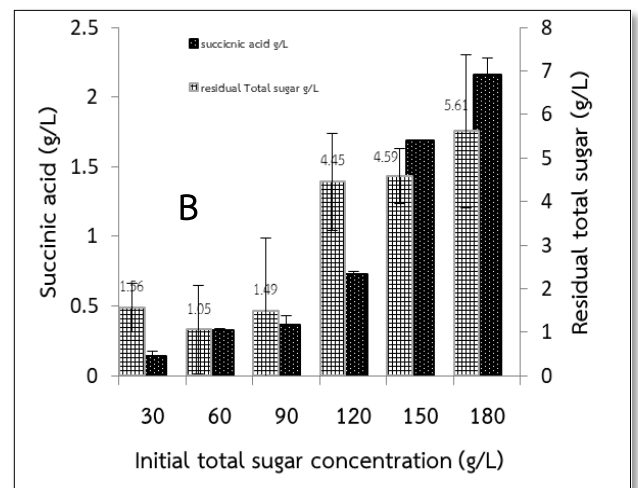
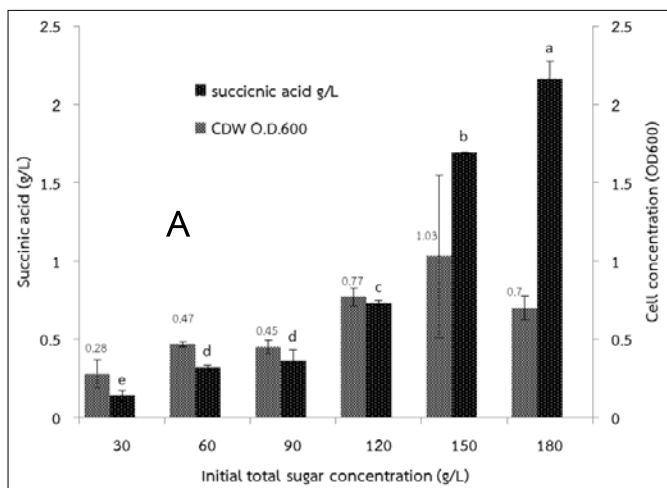
4. การศึกษาสภาวะและปริมาณกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซัคซินิกของแบคทีเรีย *A. succinogenes*

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลให้แบคทีเรียสามารถผลิตกรดซัคซินิกได้สูงสุด จากสภาวะที่ได้ทำการศึกษาคือ เวลาในการหมัก และความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น ซึ่งเวลาที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ 24 48 และ 60 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรวมทั้งหมดเท่ากับ 65 g/L และศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดได้แก่ 30 60 90 120 150 และ 180 g/L จากการศึกษาผลของเวลาในการหมักเพื่อให้สามารถผลิตกรดซัคซินิกได้ผลสูงสุดให้ผลดังภาพที่ 2 จากกราฟเห็นได้ว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรีย *A. succinogenes* สามารถผลิตกรดซัคซินิกได้สูงสุด 0.62 ± 0.02 g/L รองลงมาคือที่เวลา 48 และ 60 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดซัคซินิกได้ 0.5 ± 0.03 และ 0.24 ± 0.03 g/L ตามลำดับและสำหรับความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซัคซินิกเพื่อให้สามารถผลิตกรดซัคซินิกได้ผลสูงสุดให้ผลดังภาพที่ 4 พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดเริ่มต้น 180 g/L สามารถให้ผลผลิตกรดซัคซินิกได้สูงที่สุด 2.16 ± 0.12 g/L มีค่าน้ำตาลรวมทั้งหมดที่ใช้เหลือเท่ากับ 5.61 g/L และค่าความขุ่นเท่าที่ O.D. 600 เท่ากับ 0.7 รองลงมาคือที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดเริ่มต้น 150 120 90 60 และ 30 g/L เท่ากับ 1.69 ± 0.05 , 0.73 ± 0.02 , 0.36 ± 0.07 , 0.32 ± 0.02 และ 0.14 ± 0.03 g/L ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดที่ใช้เหลือและค่าความขุ่นได้แสดงผลดังภาพที่ (4)

ดังนั้นจากผลการศึกษาเห็นได้ว่ระยะเวลาในการหมักและปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดเริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักเชื้อแบคทีเรีย *A. succinogenes* ในสภาวะไร้ออกซิเจนคือ 24 ชั่วโมงและใช้น้ำตาลรวมทั้งหมดเริ่มต้นที่ 180 g/L สามารถให้ผลผลิตกรดซัคซินิกได้สูงที่สุด



ภาพที่ 2 ผลจากการศึกษาเวลาในการหมักที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดของกากน้ำตาลเท่ากับ 65 g/L ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซัคซินิกโดยเชื้อ *Actinobacillus succinogenes*.

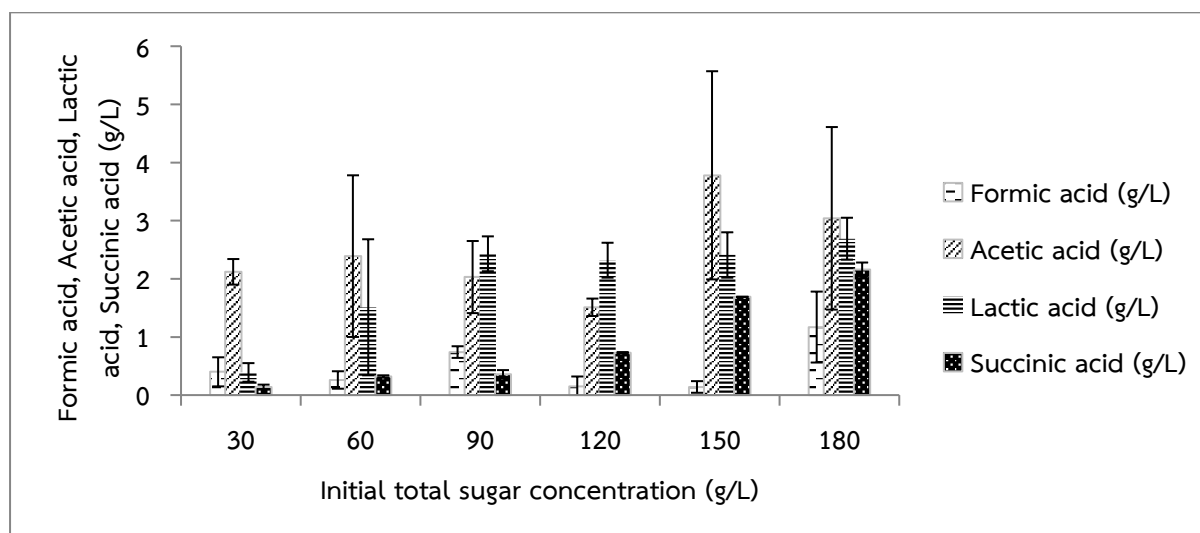


ภาพที่ 4 ผลจากการศึกษา A ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดที่แตกต่างกันและค่าความขุ่นของเซลล์ B ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดที่แตกต่างกันและปริมาณน้ำตาลที่เหลือของเชื้อที่สามารถผลิตกรดซัคซินิกได้สูงสุดโดยเชื้อ *Actinobacillus succinogenes*

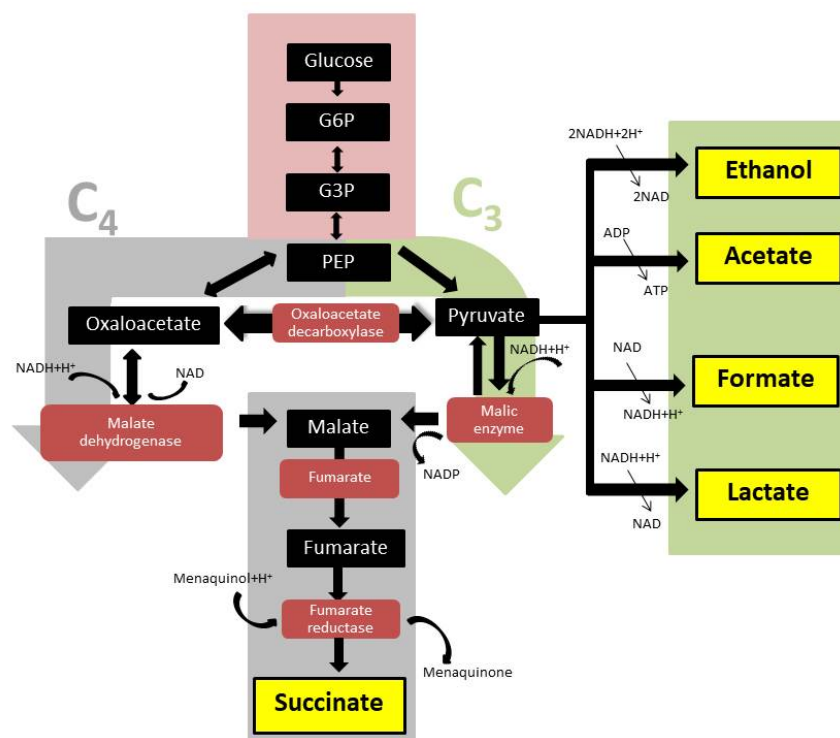
สรุปและอภิปรายผล

จากการทดลองการผลิตกรดซัคซินิกจากกากน้ำตาลที่เหลือใช้ทางการเกษตรผู้วิจัยคาดหวังว่ากากน้ำตาลสามารถเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเพื่อผลิตกรดซัคซินิกในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนและมีการเพิ่มแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปเพื่อปรับสภาวะการหมักที่เหมาะสมปรากฏว่าเชื้อ *A. succinogenes* สามารถผลิตกรดซัคซินิกได้ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมทั้งหมด 65 g/L เท่ากับ 0.62 ± 0.02 g/L ที่เวลา 24 ชั่วโมงแต่เมื่อทำการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดที่แตกต่างกันปรากฏว่าที่ น้ำตาลรวมทั้งหมดเริ่มต้น 180 g/L สามารถให้ผลผลิตที่ดีที่สุด 2.16 ± 0.12 g/L และมีเปอร์เซ็นต์การใช้น้ำตาลเท่ากับ 96.9% ซึ่งพบว่าผลผลิตสุดท้ายที่ได้ยังน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Liu *et al.* (2008) ที่ได้ผลิตกรดซัคซินิกจากกากน้ำตาลโดยแบคทีเรียชนิด *A. succinogenes* CGMCC01593 ในสภาวะการหมักแบบไร้ออกซิเจนและได้เลือกวิธีการปรับสภาพกากน้ำตาลด้วยกรดซัลฟิวริกและเลือกใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 65 g/L พบว่าสามารถให้ผลผลิตกรดซัคซินิกสูงถึง 56.0 ± 0.9 g/L แต่เนื่องจากว่าระบบการหมักของเรายังไม่มีความเสถียรรวมทั้งปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เติมเข้าไปยังมีปริมาณที่ไม่มากพอจึงทำให้ผลที่ได้มีปริมาณกรดซัคซินิกที่น้อยกว่าและมีการดื้อยีนชนิดอื่นมากกว่าดังแสดงในภาพที่ 5 การสังเคราะห์กรดซัคซินิกของแบคทีเรียนี้สามารถผ่านเส้นทางการเมแทบอลิซึมของ C_3 และ C_4 ซึ่งสามารถผลิตได้ทั้งเส้นทางของ C_3 และสามารถสังเคราะห์ได้โดยตรงผ่านเส้นทางของ C_4 สรุปเส้นทางการสังเคราะห์กรดซัคซินิกไว้ดังภาพที่ 6 พบว่าสาเหตุที่การทดลองครั้งนี้ได้กรดอินทรีย์ชนิดอื่นมากกว่ากรดซัคซินิกเนื่องจากว่าปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ยังไม่มากพอจึงทำให้เมแทบอลิซึมของแบคทีเรียไปทางเส้นทาง C_3 มากกว่าจึงทำให้มีปริมาณ กรดอะซิติก และกรดแลกติกที่มากกว่าเท่ากับ 3.04 ± 1.57 และ 2.69 ± 0.36 g/L ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรวมทั้งหมดเริ่มต้น 180 g/L

กากน้ำตาลสามารถเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีต่อการผลิตกรดซัคซินิกโดยเชื้อ *A. succinogenes* ได้ที่เวลา 24 ชั่วโมงสามารถให้ผลได้ดีที่สุดในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดเริ่มต้นขึ้นก็ทำให้ได้กรดซัคซินิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 5 ผลจากการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดที่แตกต่างกันที่สามารถผลิตกรดซัคซินิกและกรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ โดยเชื้อ *Actinobacillus succinogenes*



ภาพที่ 6 Metabolic pathways of *Actinobacillus succinogenes* (Song and Lee, 2006). G6 P, glucose 6-phosphate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate.

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่ากากน้ำตาลมีศักยภาพมากพอที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้กับแบคทีเรียเพื่อนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้เนื่องจากกากน้ำตาลยังมีปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดที่เหลืออยู่อีกมากซึ่งเป็นที่ต้องการสำหรับการขยายต่อด้านอุตสาหกรรมทางชีวภาพ แต่ทั้งนี้หากจะมีการทดลองการผลิตกรดซักซินิกโดยใช้แบคทีเรียในสภาวะไร้ออกซิเจนอาจจะต้องเข้มงวดเรื่องระบบการผลิตและต้องมีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่มากพอจึงทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตกรดซักซินิกได้สูงที่สุด และอาจมีการศึกษาปัจจัยด้านอื่น ๆ เข้ามาด้วย เช่น การเทียบสูตรอาหาร ศึกษาแหล่งไนโตรเจนหรือระบบการหมักที่ไม่การเขย่าไปด้วย เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- Almgvist, H., Pateraki, C., Alexandri, M., Koutinas, A. and Liden, G. 2016. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* from batch fermentation of mixed sugars. Journal Indian Microbiology Biotechnology. 43(8), 1117-30.
- AOAC, 1999. Official methods of analysis method 988.05, AOAC International, Maryland.
- Beauprez, J.J., Mey, M.D. and Soetaert, W.K. 2010. Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. Process Biochemistry. 45, 1103-1114.
- Delhomme C, Weuster-Botz D and Kühn FE. 2009. Succinic acid from renewable resources as a C4 building-block chemical-a review of the catalytic possibilities in aqueous media. Green Chemistry. 11,13-26.
- Liu, Y.P., Zheng, P., Sun, Z.H., Ni, Y., Dong, J.J. And Zhu, L.L. 2008. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. Bioresource Technology. 99, 1736-1742.

- Patel, M., Dornburg, V., Hüsing, B., Overbeek, L., Tarragni, F. and Recchia, E. 2006. Medium and long-term opportunities and risks of the biotechnological production of bulk chemicals from renewable resources.
- Werpy, T., Petersen, G., Aden, A., Bozell, J., Holladay, J. and White, J. 2004. Top value added chemicals from biomass. Results of screening for potential candidates from sugar and synthesis gas, vol. I. Oak Ridge, USA: *United States Department of Energy*; p. 76.
- Xu, C., Zhang, J., Zhang, Y., Guo, Y., Xu, H. and Xu, J. 2018. Long chain alcohol and succinic acid co-production process based on full utilization of lignocellulosic materials. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 14, 1-9.

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* และสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803

รัชนิกร สวามิ ภริตาภรณ์ ผากกลาง และ รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ

หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

email: rachanimuk@buu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไฟโคไซยานินบริสุทธิ์จากสาหร่าย *Arthrospira platensis* และสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 (ในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำความเค็ม 15 หนึ่งในพันส่วน) จากการติดตามแนวโน้มการเจริญเติบโต พบว่าสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 (15 วัน) ใช้เวลาน้อยกว่าสาหร่าย *A. platensis* (21 วัน) แต่เมื่อทำการเก็บเกี่ยวเซลล์พบว่าสาหร่าย *A. platensis* (8.90 กรัมต่อลิตร) มีมากกว่าสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 (1.025 กรัมต่อลิตร) และพบว่าความเข้มข้นของสารไฟโคไซยานินของสาหร่าย *A. platensis* (1.085 ± 0.023 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีความเข้มข้นสูงกว่าสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 (0.548 ± 0.011 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

นำไฟโคไซยานินไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp. โดยทำการทดสอบ 2 แบบ คือ agar well diffusion; A (กำหนดความเข้มข้นไฟโคไซยานินเป็น 150-300 ไมโครกรัม) และ Minimum inhibitory concentration; B (กำหนดความเข้มข้นไฟโคไซยานินเป็น 150-200 ไมโครกรัม) พบว่าไฟโคไซยานินจากสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp. ได้ การทดสอบด้วยวิธี A พบว่าไฟโคไซยานินจากสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด เริ่มมีการยับยั้งเชื้อตั้งแต่ 150 ไมโครกรัม ส่วนการทดสอบด้วยวิธี B ที่เก็บผลทดสอบในชั่วโมงที่ 4, 5 และ 6 พบว่าไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *A. platensis* และสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 เริ่มมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียตั้งแต่ 150 และ 200 ไมโครกรัม, ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของชั่วโมงที่ 4, 5 และ 6 จะพบว่าในชั่วโมงที่ 4 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อดีที่สุด

คำสำคัญ: สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน, ไฟโคไซยานิน, *Pseudomonas* sp., *Arthrospira platensis*, *Synechocystis* sp.

Bacterial inhibition of phycocyanin from *Arthrospira platensis* and *Synechocystis* sp. PCC6803

Ruchnekorn Swami, Paritaporn Phaklang and Rachanimuk Hiransuchalert

Marine Biotechnology Research Unit, Faculty of Marine Technology, Burapha University Chanthaburi Campus
email: rachanimuk@buu.ac.th

Abstract

The objective of this report was studied on the efficacy of bacterial inhibition of pure phycocyanin from *Arthrospira platensis* and *Synechocystis* sp. PCC6803 (in medium prepared with 15 ppt salinity). *Synechocystis* sp. PCC6803 (15 days) had higher growth rate than *A. platensis* (21 days). In contrast harvesting' cells of *A. platensis* (8.90 g/L) provided higher wet weight than *Synechocystis* sp. PCC6803 (1.025 g/L). Moreover, according to the phycocyanin extraction result, *A. platensis* (1.085 ± 0.023 mg/ml) had higher concentration than *Synechocystis* sp. PCC6803 (0.548 ± 0.011 mg/ml).

Extracted phycocyanin was utilized to inhibit *Pseudomonas* sp. There were 2 bacterial inhibition methods conducted in this study agar well diffusion method; A (set the phycocyanin concentration 150-300 µg) and Minimum inhibitory concentration method; B (set the phycocyanin concentration 150-200 µg). The results showed that the extracted phycocyanin from both cyanobacteria can inhibit *Pseudomonas* sp. According to method A, phycocyanin from both cyanobacteria could started inhibit bacteria from 150 µg. While method B collected the test results at the 4th, 5th and 6th hour. It was found that phycocyanin from *A. platensis* and *Synechocystis* sp. PCC6803 to started inhibit bacteria from 150 and 200 µg, respectively. When comparing the bacterial inhibition efficiency at the 4th, 5th and 6th hour, it was found that the 4th hour has the best inhibition effectiveness.

Keywords: Cyanobacteria, Phycocyanin, *Pseudomonas* sp., *Arthrospira platensis*, *Synechocystis* sp.

บทนำ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria) จัดเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรียแต่มีลักษณะแตกต่างจากแบคทีเรียตรงที่มีรงควัตถุ จึงสามารถสังเคราะห์แสงได้และให้ออกซิเจน (กาญจนาภรณ์ ลีวโนมนต์, 2527) และในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีรงควัตถุสีน้ำเงินจำนวนมาก ซึ่งเกิดจากไฟโคบิลินที่ประกอบด้วย ซี-ไฟโคไซยานิน (C-Phycocyanin) และแอลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ให้สีน้ำเงินหรือฟ้าคราม

สาหร่าย *Spirulina* หรือ *Arthrospira* มีลักษณะเป็นรูปเกลียวคล้ายสว่าน (Spiral) เซลล์ทรงกระบอกหลายเซลล์เรียงต่อกันเป็นสายตรง หรือขดเป็นเกลียวหรือเป็นวง ไม่มีก้าน สาหร่ายสไปรูลินามีการเจริญเติบโตโดยการแบ่งเซลล์ (binary fission) เท่านั้น (ยุวดี พิรพรพิศาล, 2549) ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 20-30 วัน เซลล์สาหร่ายสไปรูลินามีเยื่อหุ้มนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์ แต่มีผนังเซลล์ประกอบด้วยเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) และเยื่อพลาสมา (plasma membrane) ที่มีชั้นของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) แทรกอยู่ระหว่างเยื่อทั้งสองและมีเยื่อไทลาคอยด์ (thylakoid membrane) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง และเป็นแหล่งพกรงควัตถุสังเคราะห์แสงต่างๆ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ประมาณ 0.4% ของน้ำหนักแห้ง, คลอโรฟิลล์ประมาณ 1% ของน้ำหนักแห้ง และไฟโคบิลินโปรตีน 14-16% ของน้ำหนักแห้ง ส่วนสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เซลล์มีลักษณะกลมหรือรีเล็กน้อยอาจจะมีอยู่เดี่ยวๆ หรืออยู่เป็นคู่ๆ ไม่มีเยื่อหุ้ม ตรงกลางเซลล์จะเห็นเป็นจุดสีเข้ม (ยุวดี พิรพรพิศาล, 2549) สาหร่ายชนิดนี้ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 7-10 วัน สาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 มีผนังของเซลล์หนาทำให้สกัดสารไฟโคไซยานินออกมาได้ปริมาณน้อย ซึ่งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการปรับตัวได้สูงมาก เช่น สร้างเมือก (gelatinous sheath) ห่อหุ้มเซลล์เพื่อเก็บความชื้นไว้ในเซลล์และเป็นฉนวนกันความร้อนและความเย็น ในเซลล์จะมีถุงลมเพื่อเพิ่มการพองตัวหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แสง มีเม็ดสีช่วยในการต่อต้านแสงอัลตราไวโอเลตจากดวงอาทิตย์ เป็นต้น จึงได้นำสาหร่าย *Arthrospira platensis* และสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 มาเลี้ยงในสภาวะที่ความเค็มสูงได้

ไฟโคบิลินมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง ละลายได้ดีในน้ำ ไฟโคบิลินแต่ละชนิดจะอยู่รวมกับโปรตีนอย่างใกล้ชิดมาก กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเรียกว่า ไฟโคบิลินโปรตีน รายงานของ Myers และ Kratz (1955) พบว่าไฟโคไซยานินจะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อมีแสงจำกัด นอกจากนี้ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ไฟโคไซยานินยังเป็นแหล่งสะสมไนโตรเจน ซึ่งจะทำหน้าที่ให้ธาตุอาหารแก่เซลล์สาหร่ายในยามที่ขาดแคลนธาตุไนโตรเจน (สุมาลี ดุลยบุญกิจ, 2540)

ซึ่งซี-ไฟโคไซยานินนั้นมีประโยชน์อย่างมากทางอุตสาหกรรมและเภสัชกรรม ด้วยคุณสมบัติของรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีส้ม (วันเพ็ญ ภูติจันทร์, 2549) ซี-ไฟโคไซยานินบริสุทธิ์สูงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดที่ดื้อยาได้บางชนิดโดยมีการทดลองที่แสดงถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งในหลอดทดลอง (in vitro) และในสิ่งมีชีวิต (in vivo) (Rojas et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ด้านเนื้องอก (anti-tumor) และต้านเซลล์มะเร็ง (anti-cancer)

ในการศึกษานี้มุ่งเน้นเกี่ยวกับการศึกษาการสกัดสารไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เพื่อนำมาทดสอบถึงคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เพื่อทราบปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดไฟโคไซยานินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านเชื้อแบคทีเรียระหว่างสาหร่าย *Arthrospira platensis* และสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803

วิธีการศึกษา

การเลี้ยงสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803, *Arthrospira platensis* และการสกัดไฟโคไซยานิน

เลี้ยงสาหร่าย *Arthrospira platensis* และ *Synechocystis* sp. PCC6803 ในอาหาร Zarrouk Medium ที่เตรียมด้วยน้ำเค็ม 15 ppt ภายในห้องปฏิบัติการจนถึงระยะเวลาที่สาหร่ายอยู่ในระยะทวีคูณ (log phase) ใช้อัตราส่วนของอาหารเลี้ยงสาหร่ายต่อหัวเชื้อสาหร่ายที่ใช้เท่ากับ 20:1 จึงทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 15 นาที ทำให้เซลล์ของสาหร่ายแตกโดยวิธีการแช่แข็งสลับกับละลาย (freeze-thaw) ซังสาหร่าย 200 mg แล้วเติมสารละลาย 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.0) 10 ml ผสมให้เข้ากันและนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงและสลับกับการนำไปวางที่อุณหภูมิห้องอีก 6 ชั่วโมง (สำหรับสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 จะใส่ Rattler Plating Beads เพื่อทำให้เซลล์แตกง่ายขึ้น และเพิ่มขั้นตอนการ Sonication เป็นเวลา 30 นาที

หลังจากละลายเซลล์สาหร่ายแล้ว ทำทั้งหมด 3 รอบ จากนั้นนำไปแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์ที่ 13,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายสีฟ้ามาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 25%/50% (พนาภรณ์ วีระศิลป์เลิศ, 2559) คำนวณปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ใช้ได้จากสมการที่ 1 (ชรินทร์ เตชะพันธุ์, 2542) นำสารละลายสีฟ้าที่ได้มาทำแห้งโดยวิธีการ Freeze drying อุณหภูมิ -31 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทุกขั้นตอนการสกัดต้องคำนวณหาความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน (C-PC), อัลโลไฟโคไซยานิน (APC) และไฟ-โคอิริทริน (PE) ตามสูตรของ Patel et al., (2005) จากสมการที่ 2, 3 และ 4 คำนวณหาความบริสุทธิ์ของซี-ไฟโคไซยานินจากสมการที่ 5 และคำนวณหาค่า recovery yield จากสมการที่ 6 (Liao et al., 2011)

$$G = 533 (S_2 - S_1) / (100 - 0.3 S_2) \quad \text{สมการที่ 1}$$

เมื่อ S_1 คือ เปอร์เซ็นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในสารละลายโปรตีนเริ่มต้น

S_2 คือ เปอร์เซ็นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในสารละลายโปรตีนที่ต้องการ

G คือ ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงไป (หน่วยเป็นกรัม)

$$C-PC \text{ (mg/ml)} = [A_{620nm} - 0.474 (A_{652 nm})] / 5.34 \quad \text{สมการที่ 2}$$

$$APC \text{ (mg/ml)} = [A_{652nm} - 0.208 (A_{620 nm})] / 5.09 \quad \text{สมการที่ 3}$$

$$PE \text{ (mg/ml)} = [A_{562m} - 2.41(C-PC) - 0.849(APC)] / 9.62 \quad \text{สมการที่ 4}$$

$$\text{Purity ratio} = A_{620} / A_{280} \quad \text{สมการที่ 5}$$

$$\text{Yield(\%)} = [(phycocyanin \text{ concentration}_{(mg/ml)} \times \text{collected volume}_{(ml)}) / (\text{initial phycocyanin concentration}_{(mg/ml)} \times \text{initial volume}_{(ml)})] \times 100 \quad \text{สมการที่ 6}$$

การทดสอบคุณสมบัติของสารไฟโคไซยานินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion method

นำสารไฟโคไซยานินมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ด้วยวิธี agar well diffusion method ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth (LB) แบบแข็ง โดยกำหนดปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดไฟโค-ไซยานินจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* เป็น 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 350 µg, 400 µg, 450 µg และ 500 µg ส่วนปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 เป็น 150 µg, 200 µg, 250 µg และ 300 µg กำหนดโพวโดิน ไอโอดีน (เบตาดีน) ความเข้มข้น 5 µg เป็นตัวควบคุม บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง วัดขนาดโซนที่เกิดขึ้นโดยวัดจากโซนใสขอบอีกข้างหนึ่งไปยังโซนขอบอีกข้างหนึ่งนำผลการวัดความยาวของโซนใสที่เกิดขึ้นของเชื้อทดสอบมาหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางโดย

ขนาดของโซนใส = เส้นผ่าศูนย์กลางของหลุมและโซนใสของเชื้อ - เส้นผ่าศูนย์กลางของหลุม (Inhibition zone; mm)

การทดสอบคุณสมบัติของสารไฟโคไซยานินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Minimum inhibition concentration (MIC)

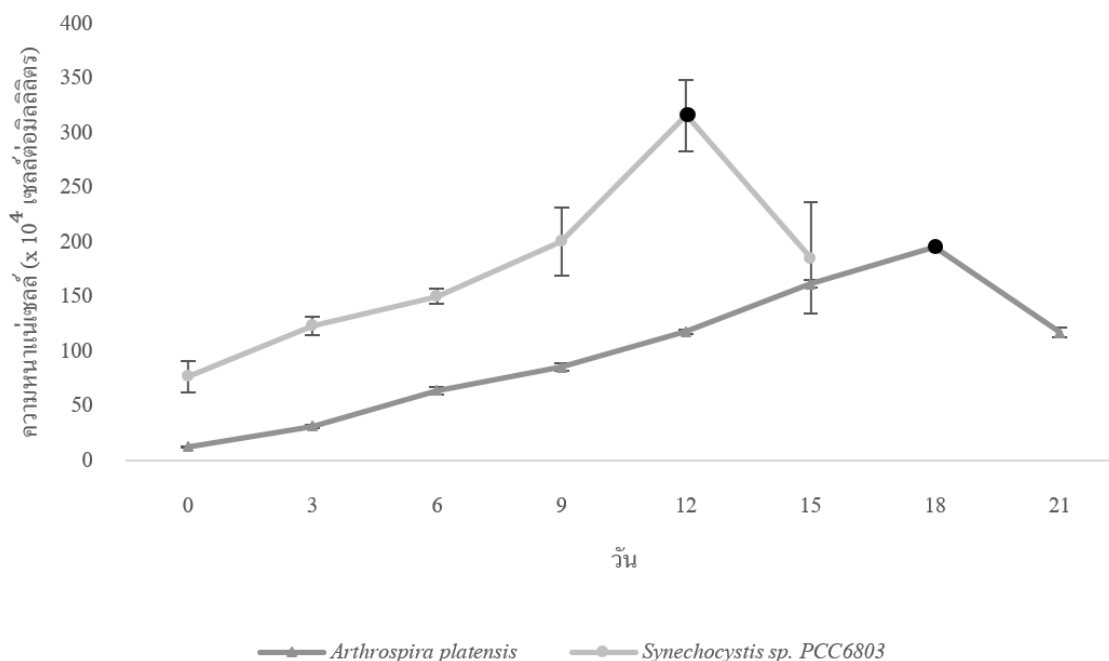
นำสารไฟโคไซยานินมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ด้วยวิธี Minimum inhibition concentration (MIC) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth (LB) แบบเหลว โดยกำหนดปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* เป็น 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 350 µg, 400 µg, 450 µg และ 500 µg ส่วนปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 เป็น 150 µg และ 200 µg กำหนดโพวโดิน ไอโอดีน (เบตาดีน) ความเข้มข้น 5 µg เป็นตัวควบคุม บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4, 5 และ 6 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm นำผลค่าดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นมาเฉลี่ยโดย

ค่าดูดกลืนแสงของเชื้อแบคทีเรีย = ค่าดูดกลืนแสงของเชื้อแบคทีเรียและไฟโคไซยานินในอาหารเหลว-ค่าดูดกลืนแสงไฟโคไซยานินในอาหารเหลว

ผลการศึกษา

การเจริญเติบโตปริมาณของสาหร่าย *Arthrospira platensis* และ *Synechocystis* sp. PCC6803

จากการติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Arthrospira platensis* และ *Synechocystis* sp. PCC6803 (ในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำความเค็ม 15 ppt) จะพบว่าสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตสั้นที่สุดคือ 15 วัน (รูปที่ 1) แต่จะพบว่าสาหร่าย *Arthrospira platensis* มีน้ำหนักเปียกมากกว่าคือ 8.90 g/L (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 1 ภาพกราฟเปรียบเทียบแนวโน้มการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Arthrospira platensis* และ *Synechocystis* sp. PCC6803 (ในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำ ความเค็ม 15 ppt)
ที่มา รัชนิกร สวามิ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบน้ำหนักเปียกสาหร่าย *A. platensis* และ *Synechocystis* sp. PCC6803 (ในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำ ความเค็ม 15 ppt)

ชนิดของสาหร่าย	น้ำหนักเปียกของสาหร่าย	
	น้ำหนักเปียกทั้งหมด (g)	น้ำหนักเปียกต่อลิตร (g/L)
<i>Arthrospira platensis</i>	44.50	8.90
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	2.05	1.025

ปริมาณไฟโคไซยานิน

จากตารางที่ 2 และตารางที่ 3 จะพบว่าความเข้มข้นสารสกัดซี-ไฟโคไซยานิน (CPC), อัลโลไฟโคไซยานิน (APC) และไฟโคอิทริน (PE) มีมากขึ้นเมื่อนำสารสกัดไฟโคไซยานินไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือและจะพบว่า สารสกัดไฟ-โคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่าย *Arthrospira platensis* มีความเข้มข้นสูงกว่าของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 และจากตารางที่ 4 จะพบว่าค่าความบริสุทธิ์ของสาหร่าย *Arthrospira platensis* มีค่ามากกว่าของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความเข้มข้นสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *A. platensis* (ในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำความเค็ม 15 ppt)

ชนิดของรงควัตถุ	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดไฟโคไซยานินจากทั้ง 3 ขั้นตอน (mg/ml)		
	Freeze-thaw	saturation with ammonium sulphate	Freeze drying
C-PC	1.085±0.023 ^a	2.586±0.283 ^b	2.652±0.278 ^c
APC	0.379±0.039 ^a	0.678±0.179 ^b	0.778±0.382 ^c
PE	0.112±0.009 ^a	0.141±0.173 ^b	0.271±0.173 ^c

หมายเหตุ: a, b และ c (ตามแนวนอน) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ P<0.05

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบความเข้มข้นสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 (ในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำความเค็ม 15 ppt)

ชนิดของรงควัตถุ	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดไฟโคไซยานินจากทั้ง 3 ขั้นตอน (mg/ml)		
	Freeze-thaw	saturation with ammonium sulphate	Freeze drying
C-PC	0.548±0.011 ^a	0.976±0.388 ^b	1.071±0.272 ^c
APC	0.204±0.053 ^a	0.341±0.662 ^b	0.604±0.410 ^c
PE	0.073±0.006 ^a	0.168±0.261 ^b	0.277±0.195 ^c

หมายเหตุ: a, b และ c (ตามแนวนอน) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ P<0.05

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่าบริสุทธิ์และ Yield (%) ของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *A. platensis* และสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 (ในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำความเค็ม 15 ppt)

ชนิดของสาหร่าย	Purity ratio	Yield (%)
<i>Arthrospira platensis</i>	3.748	100
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	0.082	100

ผลการทดสอบคุณสมบัติของไฟโคไซยานินด้วยวิธี agar well diffusion method

จากตารางที่ 5 พบว่าสารสกัดไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* และสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ได้ (แต่ละความเข้มข้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ P<0.05) โดยไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดคือ 150 µg ซึ่งมีค่า inhibition zone อยู่ที่ 5.43±4.712 mm ส่วนไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดคือ 150 µg ซึ่งมีค่า inhibition zone อยู่ที่ 6.90 mm (ตัวอย่างไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 มีไม่เพียงพอจึงไม่สามารถทำซ้ำได้)

ตารางที่ 5 ผลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย inhibition zone (มิลลิเมตร) ของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่ทดสอบกับสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *A. platensis* และ *Synechocystis* sp. PCC6803 (ในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำความเค็ม 15 ppt)

ความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน	Inhibition zone ของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> sp. (mm) (Mean±STDEV)	
	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803
Na-phosphate buffer pH 7.0	0.00±0.00 ^a	0.00
150 µg	8.15±0.35 ^b	6.90
200 µg	4.80±3.97 ^{ab}	8.40
250 µg	8.90±4.24 ^b	7.90
300 µg	9.40±0.71 ^b	6.40
Betadine	9.15±0.35 ^b	11.90

หมายเหตุ: -ไม่สามารถหาค่าทางสถิติได้เนื่องจากไม่มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดไฟโคไซยานินในแต่ละเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 สกัดได้น้อยจึงต้องลดความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบลง

-a, ab และ b (ตามแนวตั้ง) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

จากตารางที่ 6 เมื่อนำ inhibition zone มาเทียบสัดส่วนกับยาฆ่าเชื้อเบตาดีนพบว่าสารสกัดไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดคือ 150 µg มีค่าสัดส่วนอยู่ที่ 0.448±0.444 mm (แต่ละความเข้มข้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$) ส่วนไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 ที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดคือ 150 µg มีค่าสัดส่วนอยู่ที่ 0.57 mm (ตัวอย่างไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 มีไม่เพียงพอจึงไม่สามารถทำซ้ำได้)

ตารางที่ 6 ผลเปรียบเทียบสัดส่วน inhibition zone/ยาฆ่าเชื้อเบตาดีน ของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่ทดสอบกับสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *A. platensis* และ *Synechocystis* sp. PCC6803 (ในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำความเค็ม 15 ppt)

ความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน	สัดส่วน Inhibition zone ของไฟโคไซยานิน/ยาฆ่าเชื้อเบตาดีน (mm)	
	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803
Na-phosphate buffer pH 7.0	0.00±0.00 ^a	0.00
150 µg	0.67±0.30 ^{ab}	0.57
200 µg	0.46±0.44 ^{ab}	0.70
250 µg	0.96±0.43 ^b	0.66
300 µg	0.48±0.01 ^{ab}	0.53
Betadine	1.00±0.00 ^b	1.00

หมายเหตุ: -ไม่สามารถหาค่าทางสถิติได้เนื่องจากไม่มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดไฟโคไซยานินในแต่ละเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากสารสกัดไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 สกัดได้น้อยจึงต้องลดความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบลง

-a, ab และ b (ตามแนวตั้ง) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

ผลการทดสอบคุณสมบัติของสารไฟโคไซยานินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Minimum inhibition concentration (MIC)

การทดสอบคุณสมบัติของสารไฟโคไซยานินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Minimum inhibition concentration (MIC) จะแบ่งออกเป็น 3 รอบ โดยจะเก็บผลในชั่วโมงที่ 4, 5 และ 6 เนื่องจากเริ่มมีการยับยั้งแบคทีเรียตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 เป็นต้นไป จากตารางที่ 7 เป็นการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารไฟโคไซ

ยานินในชั่วโมงที่ 4, 5 และ 6 พบว่าสารไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* และสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 ในการเก็บผลการทดสอบของชั่วโมงที่ 4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดโดยความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้คือ 150 μg (14.68 ± 5.5 เปอร์เซ็นต์) และ 200 μg (88.86 ± 2.4 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ส่วนการเก็บผลการทดสอบของชั่วโมงที่ 5 และ 6 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เช่นเดียวกันกับชั่วโมงที่ 4 แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียลดลง

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพผล MIC ชั่วโมงที่ 4, 5 และ 6 ของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่ทดสอบกับสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *A. platensis* และ *Synechocystis* sp. PCC6803 (ในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำความเค็ม 15 ppt)

ความเข้มข้น ของไฟโคไซยา นิน	เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Mean $\pm$ STDEV)					
	ชั่วโมงที่ 4		ชั่วโมงที่ 5		ชั่วโมงที่ 6	
	<i>A. platensis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	<i>A. platensis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	<i>A. platensis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803
bacterial	100 ^c	100 ^c	100 ^c	100 ^b	100 ^d	100 ^b
150 μg	14.68 ± 5.5^a	112.76 ± 3.9^d	81.82 ± 2.5^b	111.83 ± 2.9^c	82.29 ± 0.5^b	106.36 ± 1.9^c
200 μg	10.13 ± 4.6^a	88.86 ± 2.4^b	79.81 ± 2.2^b	99.63 ± 1.7^b	86.33 ± 0.9^c	97.25 ± 3.2^b
Betadine	70.10 ± 19.5^b	16.91 ± 2.6^a	7.84 ± 2.5^a	36.66 ± 2.3^a	4.30 ± 1.4^a	40.18 ± 1.0^a

หมายเหตุ: -a, b และ c (ตามแนวตั้ง) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษานี้พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและยังส่งผลต่อปริมาณไฟโคไซยานิน จากรายงานของ Hiroko *et al.* (2015) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *Synechocystis* sp. PCC6803 ในอาหารเลี้ยง 3 แบบ ได้แก่ 1.) อาหารเลี้ยงสังเคราะห์ หรือ น้ำทะเลเทียมที่เพิ่มไนโตรเจนฟอสฟอรัสในอาหาร 2.) น้ำทะเลธรรมชาติจาก Oshima และ 3.) น้ำทะเลธรรมชาติจากคาบสมุทรชิซุ ผลคือสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 เจริญได้ดีในอาหารสังเคราะห์มากกว่าน้ำทะเลธรรมชาติทั้ง 2 ชนิด เนื่องจากในอาหารสังเคราะห์มีปริมาณธาตุอาหารของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่คงที่ต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายมากกว่า

จากการศึกษานี้พบว่าสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดไฟโคไซยานินน้อยกว่าสาหร่าย *Arthrospira platensis* ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเป็นสาเหตุมาจากสายพันธุ์ของสาหร่ายที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ รชนิมข หิรัญสัจจาเลิศ และคณะ (2558) ที่ทำการทดลองสกัดสารสี-ไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp. ในสภาวะความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 2 ระดับคือ 1 กิโลลิตร และ 4 กิโลลิตร พบว่าสาหร่าย *Arthrospira* sp. มีปริมาณสารสกัดสี-ไฟโคไซยานินต่อน้ำหนักมากกว่าสาหร่าย *Synechocystis* sp. นอกจากนี้ปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินยังขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย รูปแบบการเลี้ยงและวิธีการสกัดด้วย (รชนิมข หิรัญสัจจาเลิศ และคณะ, 2558; Kumar *et al.*, 2014; Soundarapandian *et al.*, 2008)

จากผลการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดไฟโคไซยานินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจะพบว่าสารสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* และสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 (ในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำความเค็ม 15 ppt) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ซึ่งแบ่งการทดสอบเป็นสองวิธีคือวิธี agar well diffusion method และวิธี Minimum inhibition concentration (MIC) โดยทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion method พบว่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* และสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้คือ 150 μg ส่วนวิธี Minimum inhibition concentration (MIC) พบว่าการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อในชั่วโมงที่ 4 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด และความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* และสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้คือ 150 μg และ 200 μg ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยสอดคล้องกับ งานวิจัยของ Muthulakshmi *et al.* (2012) ที่ได้ทำการสกัดสารสี-ไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina maxima* พบว่าสารสกัดสี-ไฟโค

ไซยานินสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Bacillus* sp. ได้ โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถเริ่มยับยั้งได้คือ 100 µl จากงานวิจัยของ Sarada et al. (2011) พบว่า ซี-ไฟโคไซยานินที่สกัดมาจากสาหร่าย *Spirulina platensis* มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจำพวก *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Klebsiella pneumonia* และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดีที่สุทธด้วยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้คือ 50 µg/ml (ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่ใช้คือ 1×10^3 เซลล์) และจากงานวิจัยของ Murugan et al. (2012) ได้สกัดสารซี-ไฟโคไซยานิน จากสาหร่าย *Spirulina platensis* มาทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, (แยกได้จาก หนอง) และ *Klebsiella pneumoniae* และ *Escherichia coli* (แยกจากตัวอย่างปัสสาวะ UTI) ทำโดยเตรียมแผ่นความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานินที่แตกต่างกัน (5, 10, 20, 30, 40 และ 50 µg/disc) มาเปรียบเทียบกับการยับยั้งกับแผ่นยาปฏิชีวนะ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ผลคือซี-ไฟโคไซยานินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้

สรุป

สารสกัดไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* และสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC6803 (ในอาหารที่เตรียมด้วยน้ำความเค็ม 15 ppt) เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้เช่นเดียวกัน แต่สารไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* มีประสิทธิภาพมากกว่า

เอกสารอ้างอิง

- กนกกานต์ นาคทอง. (2556). การหาภาวะที่เหมาะสมและการผลิตไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.. **ปริญญาานิพนธ์ปริญญา.วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต.** สาขาชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- กาญจนาภรณ์ ลิ้มโนมนต์. (2527). สาหร่าย. กรุงเทพฯ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จิตา เพชรมณี. (2542). **คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงตอน.** กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- พนาภรณ์ วีระศิลป์เลิศ. (2559). การแยกซี-ไฟโคไซยานินของสาหร่าย *Synechocystis* sp. ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอน. **ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต.** สาขาเทคโนโลยีทางทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พรทิพย์ อนันต์. (2551). การสกัดสารสีจากสาหร่ายสไปรูลินาเพื่อนำมาใช้เป็นสีย้อม. **ปริญญาานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.** สาขาวิทยาศาสตร์. คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พินิจ คล้าคลองตัน. (2553). การแพร่กระจายเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในสถานพยาบาล: กรณีศึกษา **โรงพยาบาลนาลย์ จังหวัดสมุทรสงคราม.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม. คณะวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- มณชัย เดชสังกรานนท์ และ สาโรจน์ ศิริคั่นสนียกุล. (2535). ซี-ไฟโคไซยานิน (C-Phycocyanin : C-PC). **มหากาพย์ราชินีแห่งสารสี** (1) – (8). สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, (2), 33-38 และ 40-44.
- มณฑล เลิศวรปรีชา และ ชัยสิทธิ์ นิยะสม. (2554). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). **พยาธิกำเนิดและระบาดวิทยา**, (14), 109-117.
- ยุวดี พิรพรพิศาล. (2549). **สาหร่ายวิทยา.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- รชนิमुख หิรัญสัจจาเลิศ, กนกนันท์ เอกบรรพต, มะลิวัลย์ คุณะโต และ ศรีภาพรณ ธาระนาถ. (2558). **ผลของความเข้มข้นต่อปริมาณซี-ไฟโคไซยานินในสาหร่าย *Arthrospira* sp. และ *Synechocystis* sp..** แก่นเกษตร, (43), 548-555.
- รัชนิกร สวามี. (2560). **การศึกษาปริมาณไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Spirulina* sp. ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด.** ปริญญาานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีทางทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา.
- รัตนา ชัยกล้าหาญ, ณัฐยาภรณ์ ชีระสุวรรณ และบุษยา บุณนาค. (2554). **การศึกษาความคงตัวของสารสกัดไฟโคไซยานิน.** คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. (2544). **แพลงก์ตอนพืช.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- วีณา ชูโชติ. (2556). ผลของสารสกัดจากสาหร่าย *Chlorella* spp. ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค. วารสาร วิทยาศาสตร์ลาดกระบัง, (22), 102-114.
- สมศักดิ์ โชคนุกูล. (2530). การนำทรัพยากรธรรมชาติทะเลสาบ สงขลา (สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) มาใช้ประโยชน์เพื่อ เพิ่มผลผลิตทางด้านเกษตรกรรมในท้องถิ่นภาคใต้. ปรินิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขา ชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- สุมาลี ดุลยกิจ. (2535). ผลของระดับความเข้มข้นต่างๆของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในสูตรอาหาร Zarrouk ต่อการเลี้ยง สาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina* sp.). กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Hiroko, I., Yuka, N., Ayuko, K., Masami, Y.H. and Takashi, O. (2015). Seawater cultivation of freshwater cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 drastically alters amino acid composition and glycogen metabolism. *Frontiers in Microbiology*, (6), 1-10.
- Kamble, S.P., Gaikar, R.B., Padalia, R.B. and Shinde, K.D. (2013). Extraction and purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, (3), 149-153.
- Maria, B. (2016). Natural solutions for blue colors in food. *Handbook on natural pigments in food and beverages*. Stuttgart. University of Stuttgart.
- Mahmoud, S., Ali, O., Abdel, G. and Ali, S. (2015). Antibacterial phycocyanin from *Anabaena oryzae* SOS13. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, (8), 27-36.
- Murugan, T. (2012). Antibacterial activity of C-phycocyanin against clinical isolates by disc diffusion method. *Journal of Pharmacy Research*, (5), 3020-3021.
- Muthulakshmi, M., Saranya, A., Sudha, M. and Selvakumar, G. (2012). Extraction, partial purification, and antibacterial activity of phycocyanin from *Spirulina* isolated from fresh water body against various human pathogens. *J. Algal Biomass Utiln*, (3), 7-11.
- Patel, A., Mishra, s., Pauer, R. and Ghosh, P.K. (2004). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, (4), 248-255.
- Richmond, A. (1986). *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Florida: CRC Press.
- Sarada, V.L., Kumar, C. and Rengasamy, R. (2011). Purified C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, (27), 779-783.

แบคทีเรียจากลำไส้ชะมดที่มีศักยภาพย่อยกาแฟกะลา สำหรับผลิตกาแฟหมักระดับอุตสาหกรรม

ธีรวัฒน์ งามนอก¹, จอมขวัญ มีรักษ์²

¹หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail: ¹teerawat_ng@cmu.ac.th, ²jomjoyjon@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคและมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ pectinase, cellulose, amylase, protease และ lipase จากอุจจาระของชะมดที่เก็บตัวอย่างจากฟาร์มเพาะเลี้ยงชะมดในจังหวัดเชียงรายและจังหวัดลำปาง เพื่อลดการใช้ชะมดในการผลิตกาแฟขึ้นชะมดในประเทศไทย โดยใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกเป็นหัวเชื้อในการผลิตกาแฟหมักทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับโรงงานต้นแบบ การผลิตกาแฟขึ้นชะมดเกี่ยวข้องกับการค้าที่ทารุณกรรมสัตว์โดยให้ชะมดกินผลกาแฟสุกเพื่อสร้างกลิ่นและรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ ส่งผลให้มีราคาสูงและปริมาณจำกัด จากอุจจาระชะมดจำนวน 26 ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมในเดือนธันวาคม 2560 คัดแยกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์บนอาหารแข็งที่เติมซับสเตรตของเอนไซม์ได้ทั้งหมด 164 ไอโซเลท และคัดเลือกไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมซับสเตรตได้ 37 ไอโซเลท จากนั้นจึงเลือก 11 ไอโซเลท ที่ทดสอบว่าผลิตเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิดได้ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียด้วยลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่ามี 4 สปีชีส์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., และ *Lysinibacillus* sp. มาทดสอบการย่อยกาแฟกะลา โดยเลี้ยงใน minimal media ที่เติมกาแฟกะลาลานาน 0, 48, 96, 144 และ 196 ชั่วโมง พบว่า *Paenibacillus* sp. CMU-RSC29 และ *Lactobacillus* sp. CMU-RLPC16 มีกิจกรรมเอนไซม์ pectinase, cellulose, amylase และ lipase สูงสุดที่ 48 ชั่วโมงและเอนไซม์ protease สูงสุดที่ 96 ชั่วโมง แบคทีเรียทั้งสองดังกล่าวจะนำมาพัฒนาสูตรหมักกาแฟทั้งประเภทหัวเชื้อผสม และหัวเชื้อบริสุทธิ์สำหรับการผลิตกาแฟหมักในถังหมักขนาดเล็กและขนาดใหญ่ต่อไป โดยจะวัดคุณภาพของกาแฟหมักทั้งเชิงคุณภาพด้วยการชิมมาตรฐาน และการตรวจสอบสารสำคัญด้วยเทคนิค metabolomics

คำสำคัญ: กาแฟกะลา, กาแฟหมัก, กาแฟขึ้นชะมด, แบคทีเรียไม่ก่อโรค, แมทาไบโโลมิกส์

Civet's intestinal bacteria capable of parchment coffee digestion for commercial coffee fermentation

Teerawat Ngamnok¹, Jomkhwan Meerak²

¹Master's Degree Program in Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

²Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
E-mail; ^ateerawat_ng@cmu.ac.th, ^bjomjoyjon@hotmail.com

Abstract

The purposes of this research are to isolate and screen for non-pathogenic bacteria with high potency of pectinase, cellulase, amylase, protease and lipase production from Civet's feces, mainly collected at Civet's coffee cultivation farm in Chiang Rai and Lampang. To reduce the use of Civet animal for coffee production in Thailand, selected bacteria were used as inoculum for fermented coffee production in both rural and pilot plants. Civet's coffee or Kopi Luwak production is concerned as cruel commercial trading by feeding Asian Palm Civet with cherry coffee to generate the unique aroma and flavour, resulting in the most expensive and rare to purchase. From 26 feces samples collected in December 2017, 164 isolates were obtained and preliminary screened for those enzymes activity with specific substrate on plate. Thirty-seven isolates showed the highest activity of each enzyme that measured in culture broth. First 11 strains which produced all target enzymes above were further identified by 16S rDNA sequences. Four selected strains that identified as *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., and *Lysinibacillus* sp. were repeated determination of the digestion ability of parchment coffee in minimal media for 0, 48, 96, 144 and 196 hours. *Paenibacillus* sp. CMU-RSC29 and *Lactobacillus* sp. CMU-RLPC16 revealed significantly highest ability to digest coffee at 48 hours and initially decreased after 96 hours. For further fermented coffee production, the inoculum will be formulated as mixed and pure culture for different fermentation processes in small and large reactors. The qualities of coffee will be determined for cupping test and its metabolomics.

Keywords: Parchment coffee; Fermented coffee; Civet's coffee; Metabolomics; Non-pathogenic bacteria

บทนำ

กาแฟเป็นเครื่องดื่มเชิงพาณิชย์ที่เป็นที่นิยมของกลุ่มผู้บริโภคทั่วโลก เนื่องจากมีรสชาติและกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ที่แตกต่างกันไปตามการเพาะปลูกและกระบวนการผลิต ซึ่งรสชาติและกลิ่นของกาแฟเป็นผลอันเนื่องมาจากการผสมผสานระหว่างสารประกอบทางเคมีที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ รวมถึงกรด สารประกอบแอลดีไฮด์ คีโตน โปรตีน กรดอะมิโน กรดไขมัน น้ำตาล สารประกอบฟีนอลิก และกิจกรรมของเอนไซม์ (Chin *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015)

กาแฟช้ะมัด หนึ่งในกาแฟที่มีกลิ่นและรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ เป็นกาแฟที่ผลิตจากการให้ช้ะมัดกินผลกาแฟสุก แล้วเก็บเมล็ดกาแฟที่ได้จากการขบถ่ายของช้ะมัดมาตากแห้ง และคั่ว มีมูลค่าทางการตลาดสูงมาก เนื่องจากผลผลิตที่ได้มีจำนวนจำกัด จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ราคาของกาแฟช้ะมัดมีมูลค่าสูงถึง 20 เท่าเมื่อเทียบกับกาแฟธรรมดาหรือประมาณ 300 บาทต่อแก้ว หรือ กิโลกรัมละหนึ่งหมื่นบาท อย่างไรก็ตามการผลิตกาแฟช้ะมัดมีการทารุณกรรมสัตว์ โดยการกักขังและให้ช้ะมัดกินแต่ผลกาแฟที่ไม่ใช่อาหารหลัก ทำให้ช้ะมัดไม่มีอิสรภาพในการดำรงชีพตามธรรมชาติ (Jumhawan *et al.*, 2016; Hadipernata and Nugraha, 2018)

นอกจากนี้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ถือว่ามีสำคัญในการพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้เพิ่มขึ้น อีกทั้งสามารถลดระยะเวลากระบวนการผลิตในเวลาอันสั้นลง โดยการสร้างกรด สารประกอบเมทาโบไลต์ เอนไซม์ pectinase, (Silva *et al.*, 2013) cellulase, amylase, protease และ lipase ในระหว่างกระบวนการหมักเอนไซม์จะย่อยสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครสที่พบในส่วนกะลากาแฟและเมล็ดกาแฟ ซึ่งมีผลต่อกลิ่นของกาแฟอย่างมาก (Ramos *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015) อันเป็นผลมาจากเอนไซม์สามารถเพิ่มหรือย่อยสารประกอบที่ระเหยได้ เช่น เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) เอทิลไอโซบิวทีเรต (ethyl isobutyrate) และอะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) (Pereira *et al.*, 2015) ไพราซีน (pyrazines) ฟูราโนน (furanones) กัวไอคอล (guaiacols) และไทออล (thiols) โดยตัวอย่างที่เห็นได้ชัด คือ เอนไซม์โปรติเอส สามารถเพิ่มสารโพรลีน (Proline) และกรดแอสปาร์ติก (Aspartic acid) ที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ที่ให้กลิ่นคาราเมลในกาแฟ (Lee *et al.*, 2015)

จุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการหมักกาแฟ เพื่อต้องการปรับปรุงกลิ่นและรสชาติให้มีความเป็นเอกลักษณ์ ได้แก่ แบคทีเรีย เช่น *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus rhamnosus* (Pereira *et al.*, 2016) และ (Wang *et al.*, 2018) เชื้อรา เช่น *Rhizopus oligosporus* และยีสต์ เช่น *Pichia guilliermondii*, *Pichia fermentans*, *Candida parapsilosis*, *Yarrowia lipolytica* และ *Saccharomyces cerevisiae* (Evangelista *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015) ซึ่งสามารถปรับเปลี่ยนและเพิ่มกลิ่นของกาแฟได้โดยการเปลี่ยนสารตั้งต้นของกลิ่นและการสร้างสารระเหยในเมล็ดกาแฟ ซึ่งเหมือนกับกาแฟช้ะมัดที่มีความเป็นเอกลักษณ์ในด้านรสชาติและกลิ่น อันเป็นผลมาจากกรดและเอนไซม์ในลำไส้ของช้ะมัดย่อยโปรตีนให้กลายเป็นกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้เป็นองค์ประกอบของสารระเหยในกาแฟ จึงทำให้เกิดรสชาติและกลิ่นที่แตกต่างออกไป (Marcone, 2004; Yusianto *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2016)

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคในทางเดินอาหารที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ pectinase, cellulase, amylase, protease และ lipase จากอุจจาระช้ะมัดที่เก็บตัวอย่างจากฟาร์มเพาะเลี้ยงช้ะมัดในจังหวัดเชียงรายและจังหวัดลำปาง เพื่อคัดเลือกเป็นหัวเชื้อแบคทีเรียในการผลิตกาแฟหมักที่ให้รสชาติและกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับโรงงานต้นแบบ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกและคัดกรองแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในทางเดินอาหารจากอุจจาระช้ะมัด
2. เพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ pectinase, cellulase, amylase, protease และ lipase ของแบคทีเรียที่แยกได้ในการย่อยกาแฟกะลา

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและคัดกรองแบคทีเรีย

สุ่มเก็บตัวอย่างอุจจาระช้ะมัดจากฟาร์มเลี้ยงช้ะมัดใน 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย 20 ตัวอย่าง และจังหวัดลำปาง 6 ตัวอย่าง รวมจำนวนทั้งสิ้น 26 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดแยกแบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแบคทีเรียทั่วไป ได้แก่ อาหารเหลว M9 minimal salts ที่เติม 0.5% pectin, 1% starch soluble, 1% carboxymethyl cellulose (CMC), 10% skim milk, และ 1% tween 80 และแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคติก ได้แก่

อาหารเหลว De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth ที่เติมซัลเฟอร์ต เช่นเดียวกับก่อนหน้า จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์จากอุจจาระขมด

นำสารละลายเชื้อจากข้อ 1 มาทำแยกเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยของเอนไซม์ pectinase, cellulase, amylase, protease และ lipase ด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อ (spread plate technique) บนอาหารแข็งสูตรเช่นเดียวกับข้อ 1 ที่เติมซัลเฟอร์ตดังกล่าว แล้วสุ่มเลือกโคโลนีที่ผลิตเอนไซม์มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยด้วยการ spot โคโลนีแบคทีเรียบนอาหารแข็งที่เติมซัลเฟอร์ตของแต่ละเอนไซม์ ได้แก่ อาหารแข็ง pectinase สำหรับเอนไซม์ pectinase บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบด้วยการราด KI แล้วล้างออกด้วย 1M NaCl (Soares *et al.*, 1999) อาหารแข็ง CMC สำหรับเอนไซม์ cellulase บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นราดด้วย 1% Congo red ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วล้างออกด้วย 1M NaCl (Patagundi *et al.*, 2014) อาหารแข็ง starch สำหรับเอนไซม์ amylase บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบด้วยไอโอดีนทิ้งไว้ 10 นาที (Sudharhsan *et al.*, 2007) อาหารแข็ง skim milk สำหรับเอนไซม์ protease บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Lakshmi *et al.*, 2014) และอาหารแข็ง tween 80 สำหรับเอนไซม์ lipase บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Duza *et al.*, 2014) เอนไซม์ทั้ง 5 หากมีการสร้างเอนไซม์จะเกิดโซนใสรอบๆ โคโลนี

3. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

นำแบคทีเรียที่สามารถสร้างโซนใสจากข้อ 2 ทุกไอโซเลท มาทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิด โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Luria-Bertani broth (LB broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นล้างเซลล์แบคทีเรียเพื่อปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียให้เท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร basal medium ที่เติมซัลเฟอร์ตของเอนไซม์เช่นเดียวกับข้อ 2 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มและเขย่าด้วยตุ้มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ pectinase, cellulase และ amylase ด้วยวิธี DNS method (Miller, 1959) เอนไซม์ protease ด้วยวิธี Lowry protein assay (Lowry *et al.*, 1951) และเอนไซม์ lipase ตามวิธีของ Weerapong (2015) แบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดจะถูกนำไปวัดกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิดบนอาหารแข็งแต่ละเอนไซม์ ในข้อ 2 เพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์อื่นๆ นอกจากเอนไซม์หลัก

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรีย

นำแบคทีเรียจากข้อ 3 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยการหาลำดับเบสของ 16S rDNA โดยเลี้ยงเชื้ออาหารเหลว LB broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนเซลล์ของแบคทีเรียมาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ (Zymo Research, USA) และเพิ่มปริมาณยีน 16s rDNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') และ 1492R (5' TACGGYTACCTTGTACGACTT3') หาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA sequencing แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 ด้วยวิธี neighbor-joining และ maximum composite likelihood ที่ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000

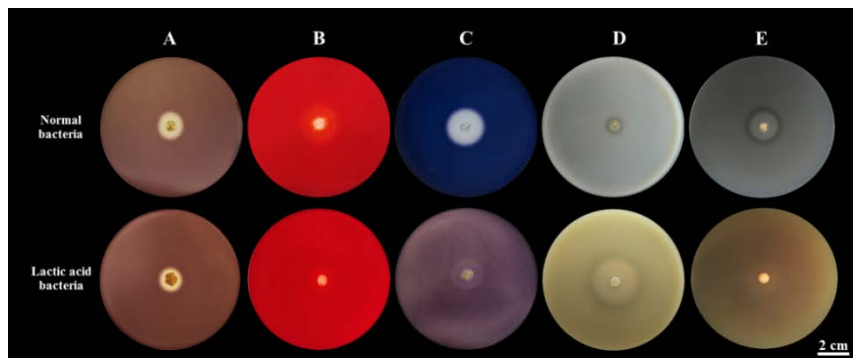
5. การย่อยกาแฟกะลาเพื่อเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์กาแฟหมัก

วิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยกาแฟกะลาด้วยหัวเชื้อที่คัดเลือก โดยเลือกแบคทีเรียจากข้อ 5 ที่ไม่เป็นแบคทีเรียก่อโรคมหากับกาแฟกะลาที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้กาแฟกะลา 1 กรัม โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 48, 96, 144 และ 196 ชั่วโมง วัดกิจกรรมของเอนไซม์จากส่วนใส เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีหัวเชื้อ เพื่อคัดเลือกหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์กาแฟหมักในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ pectinase, cellulase, amylase, protease และ lipase

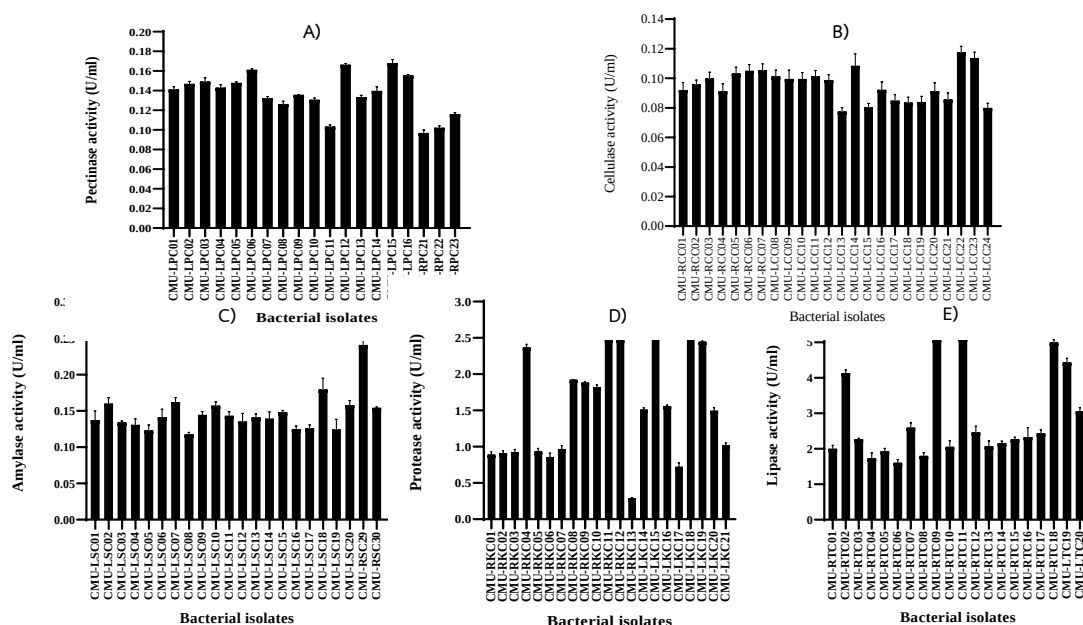
จากการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียจากอุจจาระชุมชนที่มีลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกันโดยคัดเลือกจากโคโลนีที่เกิดโซนใส (ภาพที่ 1) ได้ทั้งหมด 164 ไอโซเลท แบ่งเป็นแบคทีเรียทั่วไปที่สามารถผลิตเอนไซม์ pectinase, cellulase, amylase, protease และ lipase ได้ 19, 24, 22, 21 และ 20 ไอโซเลท ตามลำดับ และแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติกที่สามารถผลิตเอนไซม์ pectinase, cellulase, amylase, protease และ lipase ได้ 11, 17, 8, 11 และ 11 ไอโซเลท ตามลำดับ



ภาพที่ 1 การคัดเลือกความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียทั่วไป (บน) และแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติก (ล่าง)
A) ลักษณะโซนใสของเอนไซม์ pectinase B) ลักษณะโซนใสของเอนไซม์ cellulase C) ลักษณะโซนใสของเอนไซม์ amylase
D) ลักษณะโซนใสของเอนไซม์ protease และ E) ลักษณะโซนใสของเอนไซม์ lipase

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ pectinase, cellulase, amylase, protease และ lipase

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ของแบคทีเรียทั่วไปให้ค่ากิจกรรมสูงสุด เอนไซม์ pectinase ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลท CMU-LPC06, CMU-LPC12, CMU-LPC15 และ CMU-LPC16 เอนไซม์ cellulase ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลท CMU-LCC14, CMU-LCC22 และ CMU-LCC23 เอนไซม์ amylase ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลท CMU-LSC18 และ CMU-RSC29 เอนไซม์ protease ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลท CMU-LKC15 และ CMU-LKC18 และเอนไซม์ lipase ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลท CMU-RTC09, CMU-RTC11, CMU-RTC18 และ CMU-LTC19 สำหรับค่ากิจกรรมของเอนไซม์แสดงในภาพที่ 2

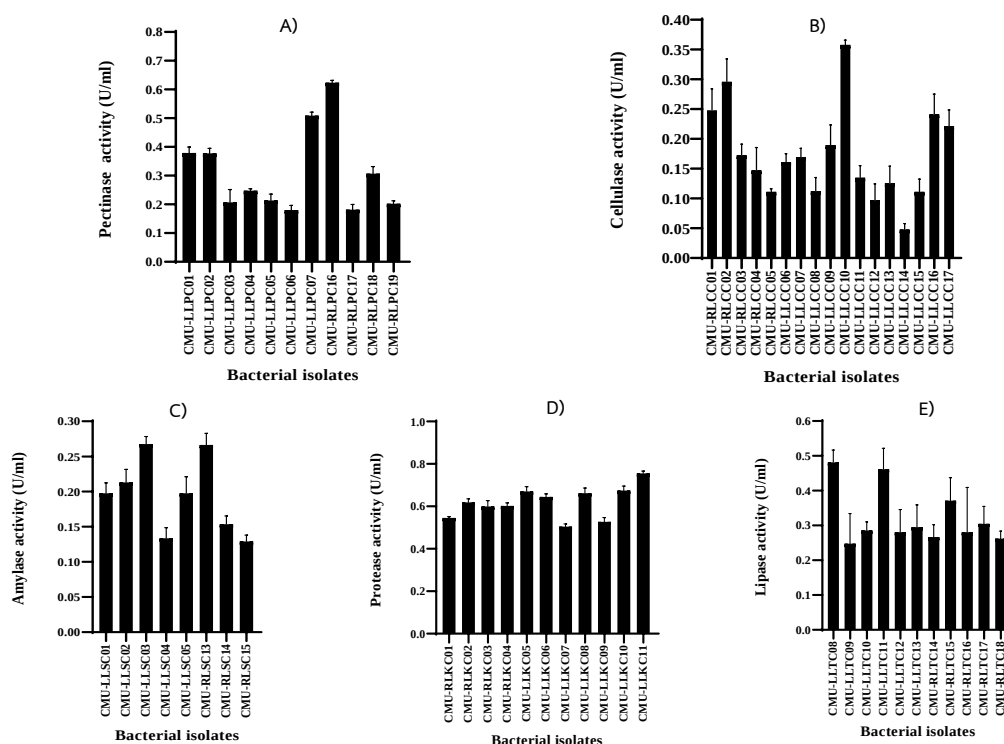


ภาพที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์ A) เอนไซม์ pectinase B) เอนไซม์ cellulase C) เอนไซม์ amylase

D) เอนไซม์ protease และ E) เอนไซม์ lipase ของแบคทีเรียในซัสเตรตของแต่ละเอนไซม์

สำหรับแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติก ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ให้ค่ากิจกรรมสูงสุด pectinase ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลท CMU-RLPC07 และ CMU-RLPC16 เอนไซม์ cellulase ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลท CMU-RLCC02

และ CMU-LLCC10 เอนไซม์ amylase ได้แก่ แบคทีเรียไฮโซเลท CMU-LLSC03 และ CMU-RLSC13 เอนไซม์ protease ได้แก่ แบคทีเรียไฮโซเลท CMU-LLKC05, CMU-LLKC08, CMU-LLKC10 และ CMU-LLKC11 และเอนไซม์ lipase ได้แก่ แบคทีเรียไฮโซเลท CMU-LLTC08 และ CMU-LLTC11 สำหรับค่ากิจกรรมของเอนไซม์แสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ A) เอนไซม์ pectinase B) เอนไซม์ cellulase C) เอนไซม์ amylase D) เอนไซม์ protease และ E) เอนไซม์ lipase ของแบคทีเรียกลุ่มผลิตภัณฑ์แลคติกในซีสเตอร์ของแต่ละเอนไซม์

3. การคัดเลือกความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์อื่นนอกจากเอนไซม์หลัก

จากการคัดเลือกแบคทีเรียทั่วไปและแบคทีเรียผลิตภัณฑ์แลคติกด้วยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยเลือกไฮโซเลทที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด แล้วนำมาทดสอบบนอาหารแข็งของเอนไซม์อื่น ๆ นอกจากเอนไซม์หลัก พบว่ามี 11 ไฮโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์อื่นนอกจากเอนไซม์หลัก และมี 4 ไฮโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ครบทั้ง 5 เอนไซม์ที่ต้องการ ได้แก่ CMU-RSC29, CMU-RLPC16, CMU-LLKC08 และ CMU-LLKC11 ดังตารางที่ 1

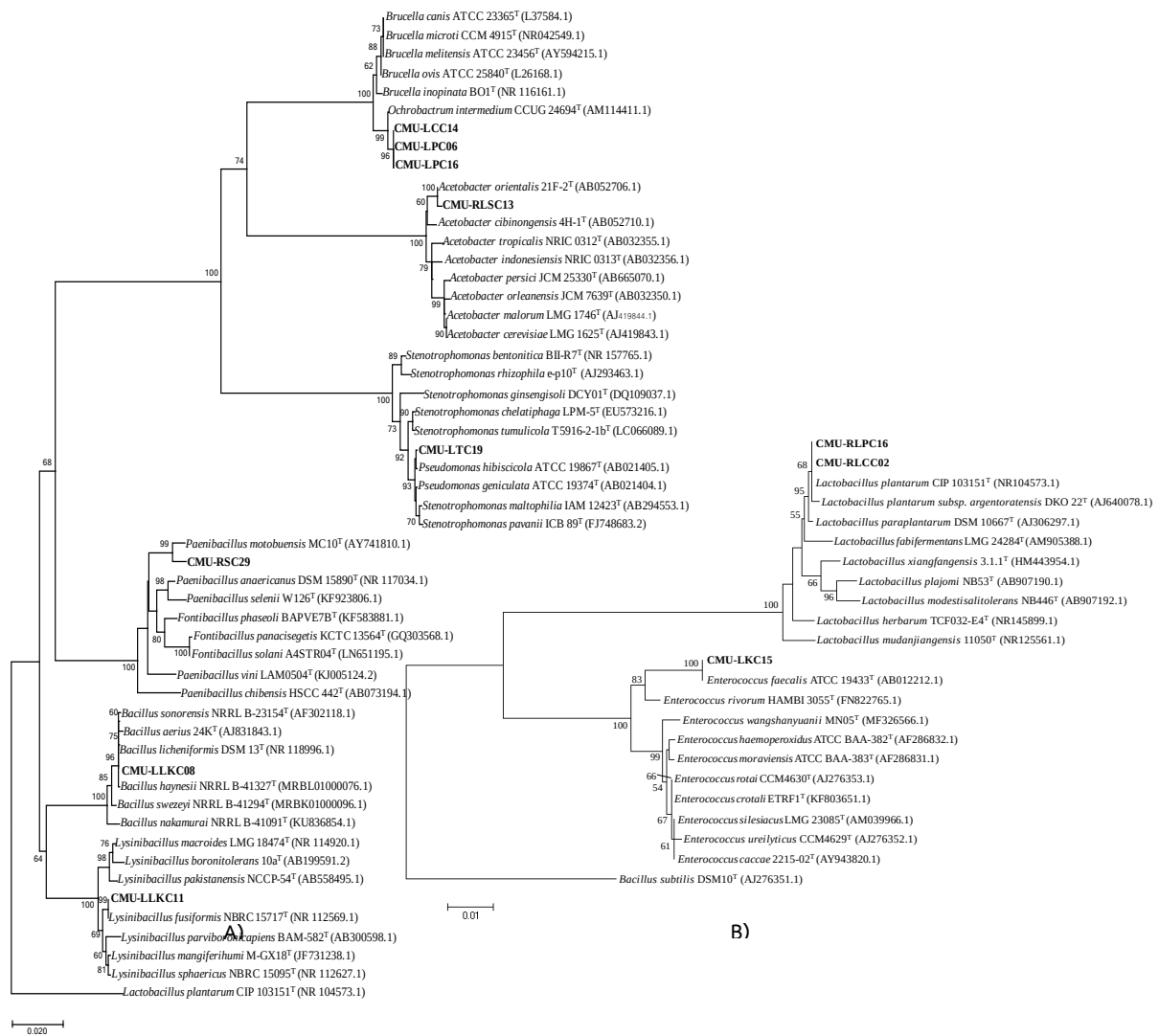
ตารางที่ 1 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อื่น ๆ นอกจากเอนไซม์หลักของแบคทีเรีย

Isolates	Cellulase	Pectinase	Amylase	Protease	Lipase
CMU-LPC06	-	+	+	+	+
CMU-LPC16	-	+	-	-	+
CMU-LCC14	+	+	-	-	-
CMU-RSC29	+	+	+	+	+
CMU-LKC15	-	-	+	+	-
CMU-LTC19	-	-	+	+	+
CMU-RLPC16	+	+	+	+	+
CMU-RLCC02	+	+	-	-	+
CMU-RLSC13	+	+	+	-	-
CMU-LLKC08	+	+	+	+	+
CMU-LLKC11	+	+	+	+	+

หมายเหตุ: + มีความสามารถผลิตเอนไซม์, - ไม่มีความสามารถผลิตเอนไซม์

4. การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

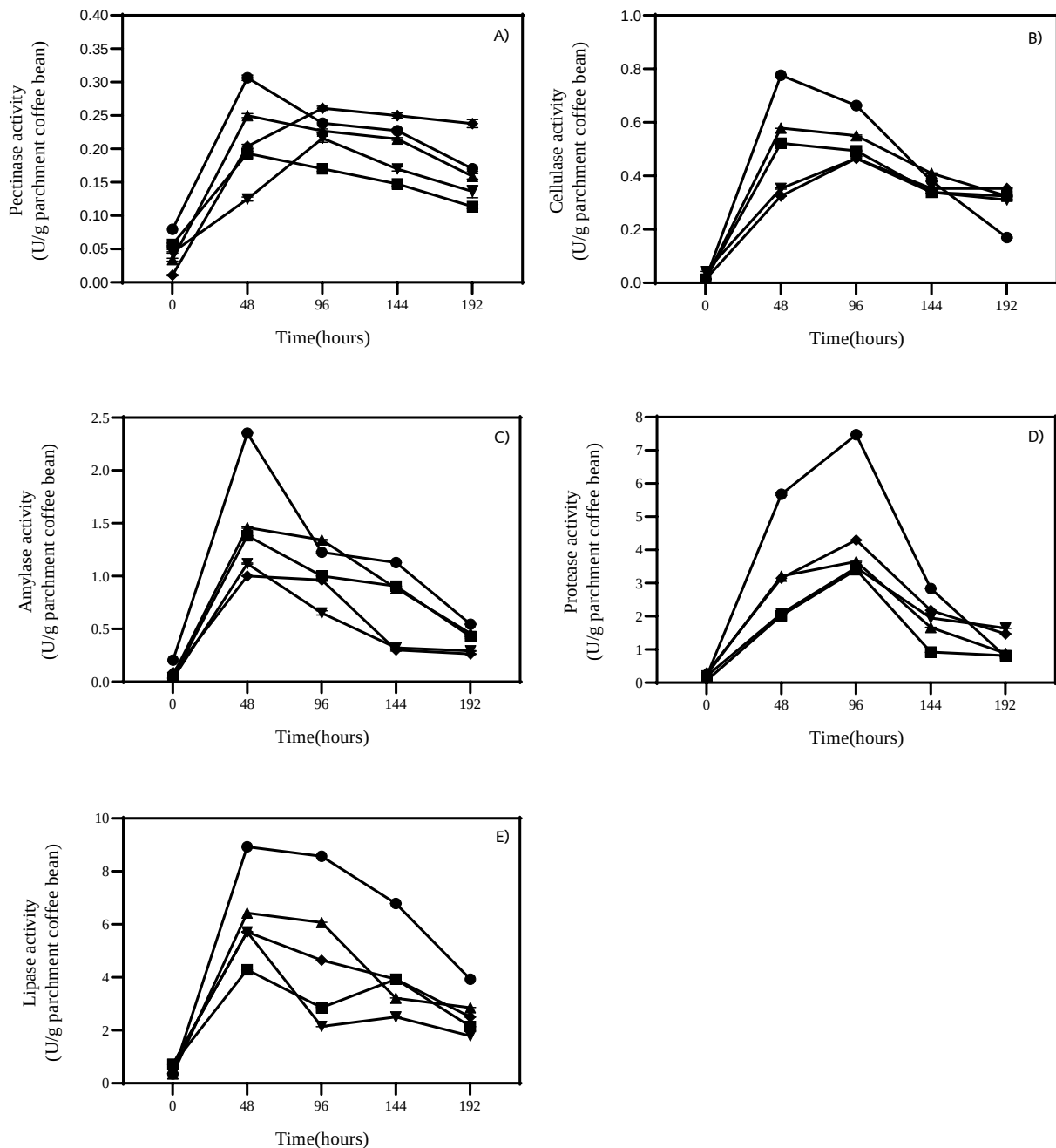
การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 15 ไอโซเลตด้วยการ blast กับฐานข้อมูลและการนำลำดับของ 16S rDNA มาสร้าง phylogeny พบว่าระบุเอกลักษณ์ของไอโซเลตทั้งหมดได้ดังภาพที่ 4 จึงคัดเลือกแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคที่อ้างอิงจาก Biosafety Guidelines for Modern Biotechnology และ NIAID Emerging Infectious Diseases/Pathogens และมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต คือ CMU-RSC29, CMU-LLKC11, CMU-LLKC08, CMU-RLPC16 และ CMU-RLCC02 สำหรับนำไปทดสอบการย่อยกาแฟกะลาต่อไป



ภาพที่ 4 แผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ A) แบคทีเรียทั่วไป และ B) แบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติก

5. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต่อกาแฟกะลา

คัดเลือกแบคทีเรียทั่วไปไอโซเลต CMU-RSC29, CMU-RLPC16, CMU-RLCC02, CMU-LLKC08 และ CMU-LLKC11 มาทดสอบการย่อยกาแฟกะลา โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่แบคทีเรียผลิต ได้แก่ pectinase, cellulase, amylase , protease และ lipase ไอโซเลต CMU-RSC29 สามารถย่อยได้ดีที่สุดระหว่าง 48-96 ชั่วโมงและแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก ไอโซเลต CMU-RLPC16 ให้ผลสอดคล้องเช่นเดียวกันดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์ A) เอนไซม์ pectinase, B) เอนไซม์ cellulase, C) เอนไซม์ amylase D) เอนไซม์ protease และ E) เอนไซม์ lipase โดยแบคทีเรียไอโซเลต CMU-RSC29 (●), CMU-RLPC16 (■), CMU-RLCC02 (▲), CMU-LLKC08 (▼), CMU-LLKC11 (◆) ในการย่อยกาแฟกะลา

สรุปและอภิปรายผล

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกหัวเชื้อแบคทีเรียจากอุจจาระชะมดเพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อหมักกาแฟในระดับอุตสาหกรรมทดแทนการผลิตกาแฟขึ้นชะมด ซึ่งมีข้อวิพากษ์ว่าเป็นกาแฟที่ทำให้เกิดการทารุณกรรมสัตว์ และเป็นอุปสรรคทางการค้าสำหรับผู้ส่งออกกาแฟขึ้นชะมด (Jumhawan *et al.*, 2016; Hadipernata and Nugraha, 2018) รวมถึงการหมักด้วยแบคทีเรียจะช่วยลดต้นทุนการผลิต อีกทั้งยังช่วยให้เกิดกลิ่นและรสชาติที่แตกต่างและเป็นเอกลักษณ์ เช่น เพิ่มกลิ่นคาราเมลในกาแฟ (Wang *et al.*, 2018) ทำให้กาแฟชนิดพิเศษเป็นที่นิยมแพร่หลาย ช่วยส่งเสริมธุรกิจของผู้ค้ากาแฟอีกด้วย การคัดเลือกแบคทีเรียในงานวิจัยนี้ เน้นกลุ่มแบคทีเรียทั่วไปและแบคทีเรียกลุ่มผลิตภัณฑ์กรดแลคติกมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับการย่อยกาแฟกลา รวมถึงพัฒนาระบบการหมักเพื่อใช้เป็นแนวทางพัฒนาการหมักระดับอุตสาหกรรมในอนาคต จากแบคทีเรียทั้งหมดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ได้คัดเลือกแบคทีเรียมา 2 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพการย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนในเมล็ดกาแฟได้ดีที่สุดเนื่องจากเป็นสารที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติกาแฟ (Marcone, 2004; Yusianto *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2016) โดยกระบวนการคัดเลือกหัวเชื้อในงานวิจัยนี้มีการศึกษากิจกรรมเอนไซม์สำคัญก่อนจึงแตกต่างจากการหมักกาแฟในงานวิจัยก่อนหน้านี้ รวมถึงให้ความสนใจการย่อยกาแฟกลาแทนผลกาแฟสุก (cherry bean) และสารกาแฟ (green bean) เพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้จริงกับเกษตรกรได้ และทำได้แพร่หลายกว่า จากการพัฒนาสูตรหัวเชื้อสำหรับหมักกาแฟและกระบวนการจากแบคทีเรียทั้งสองที่คัดเลือกได้ ผลตรวจสอบคุณภาพของกาแฟคั่วที่ได้พบว่ามีกลิ่นและรสชาติที่ดีกว่าโดยการประเมินจากผู้เชี่ยวชาญ (ไม่ได้เสนอในรายงานครั้งนี้) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงสำหรับการผลิตกาแฟหมักจากแบคทีเรียแทนการผลิตกาแฟขึ้นชะมดต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านความหลากหลายทางชีวภาพ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (BDC-PG4-161010) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) (MSD60I0034) ขอขอบคุณสาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือสำหรับการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Chin, S.T., Eyres, G.T., Marriott, P.J. (2015). Application of integrated comprehensive/multidimensional gas chromatography with mass spectrometry and olfactometry for aroma analysis in wine and coffee. *Food Chemistry* 185, 355-361.
- Duza, M.B., Mastan, S.A. (2014). Optimization of Lipase Production from *Bacillus thuringiensis* (TS11BP), *Achromobacter xylosoxidans* J2 (TS2MCN)–Isolated from Soil sediments near oilseed farm. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 9 (2), 66-76.
- Evangelista, S.R., da Cruz Pedrozo Miguel, M.G., de Souza Cordeiro, C., Silva, C.F., Marques Pinheiro, A.C., Schwan, R.F. (2014). Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. *Food Microbiology* 44, 87-95
- Hadipernata, M., & Nugraha, S. (2018). Process technology of Luwak coffee through bioreactor utilization. *International Symposium on Food and Agro-biodiversity (ISFA) 2017-IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 102.
- Jumhawan, U., Putri, S. P., Yusianto, Bamba, T., & Fukusaki, E. (2016). Quantification of coffee blends for authentication of Asian palm civet coffee (Kopi Luwak) via metabolomics: A proof of concept. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 122 (1), 79-84.
- Juntachai, W., & Kajiwar, S. (2015). Differential expression of extracellular lipase and protease activities of mycelial and yeast forms in *Malassezia furfur*. *Mycopathologia* 180 (3-4), 143-151.

- Lakshmi, B.K.M., Ratna, P.V., Ambika, D. K., Hemalatha, KP.J. (2014). Screening, optimization of production and partial characterization of alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *International Journal of Research in Engineering and Technology* 3 (2), 650-659.
- Lee, L.W., Cheong, M.W., Curran, P., Yu, B., Liu, S.Q. (2015). Coffee fermentation and flavor – an intricate and delicate relationship. *Food Chemistry* 185, 182-191
- Lee, L.W., Cheong, M.W., Curran, P., Yu, B., Liu, S.Q. (2016). Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*□: I. Green coffee. *Food Chemistry* 211, 916-924.
- Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL., & Randall, RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1), 265-275.
- Marcone, M. F. (2004). Composition and properties of Indonesian palm civet coffee (Kopi Luwak) and Ethiopian civet coffee. *Food Research International* 37 (9), 901-912.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3), 426-428.
- Patagundi, B.I., Shivasharan, C.T., Kaliwal, B.B. (2014). Isolation and characterization of cellulase producing bacteria from soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3 (5), 59-69.
- Pereira Melo de, G.V., Neto D.P., Medeiros, A.B.P., Soccol, V.T., Neto, E., Woiciechowski, A.L., Soccol, C.R. (2016). Potential of lactic acid bacteria to improve the fermentation and quality of coffee during on-farm processing. *International Journal of Food Science and Technology* 51 (7), 1689–1695.
- Pereira Melo de, G.V., Neto, E., Soccol, V.T., Medeiros, A.B.P., Woiciechowski, A.L., Soccol, C.R. (2015). Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. *Food Research International* 75, 348-356.
- Ramos, C.L., Almeida, E.G., Pereira, G.V.M., Cardoso, P.G., Dias, E.S.D., Schwan, R.F. (2010). Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* 140 (2–3), 225-231.
- Silva, C.F., Vilela, D.M., Cordeiro, C.S., Duarte, W.F., Dias, D.R., Schwan, R.F. (2013). Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29 (2), 235-347.
- Soares, M.M.C.N., Da Silva, R., Gomes, E. (1999). Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia* 30, 299-303.
- Sudharhsan, S., Senthilkumar, S., Ranjith, K. (2007). Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. *African Journal of Biotechnology* 6 (4), 430-435.
- Wang, C., Sun, J., Lassabliere, B., Yu, B., Zhao, F., Zhao, F., Chen, Y., Liu, S.Q. (2019). Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose supplementation: Fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99 (1), 409–420.
- Yusianto, H. R., Sulistiyowati, M. S., Ismayadi C. (2015). Physical, chemical and flavors of some varieties of arabica coffee. *Pelita Perkebunan* 21 (3), 200-222.

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านเชื้อแบคทีเรีย และด้านการเกิดไบโอฟิล์มของสารสกัด สมุนไพรรังจืดในช่องปาก

ดร.ณรัตน์ สบายใจ¹ อัมพร บุญเอก¹ ศรมน สุทิน¹ อรภา ศิลมัฐ² รุ่งรัตน์ นิธิเสนา¹ วรพรรณ เผ่าทองสุข^{*1}

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ประเทศไทย

³คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ กรุงเทพฯ ประเทศไทย

*ผู้ประสานงานหลัก อีเมล: Worrapanee2000@gmail.com

บทคัดย่อ

แบคทีเรียสกุล *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุ และพบได้ทั่วไปในช่องปากมนุษย์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสมุนไพรรังจืดต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก โดยการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรรังจืดสามชนิดได้แก่ รังจืด จินอินฮวา และกันเฉ่า ต่อแบคทีเรียสองชนิดได้แก่ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus salivarius* ผลการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบของรังจืดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus salivarius* ได้ดีที่สุด จึงนำมาทำการทดสอบในขั้นต่อไป ประกอบด้วยฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ด้านการเกิดไบโอฟิล์ม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่าการออกฤทธิ์ของรังจืดต่อเชื้อทั้งสองชนิดมีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 0.049 และ 0.098 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบรังจืดสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้น 0.012 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ *Streptococcus mutans* และที่ความเข้มข้น 1.563 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ *Streptococcus salivarius* ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH scavenging assay พบว่าสารสกัดหยาบรังจืดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีค่า IC₅₀ ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน BHT (Butylated hydroxyl toluene) ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรรังจืด มีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ต้านเชื้อในช่องปาก

คำสำคัญ : สารสกัดหยาบจากสมุนไพรรังจืด รังจืด จินอินฮวา กันเฉ่า สารต้านอนุมูลอิสระ MIC MBC ไบโอฟิล์ม

Antibacterial, anti-biofilm and antioxidant activities of *Lithospermum erythrorhizon* against oral cavity bacteria

Darunrat Sabayjai¹ Amphon Bun-ek¹ Soramon Sutin¹ Orapa Sinlamuth² Rungrat Nintasen¹
Worrapanee Powtongsook¹

¹Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakarn, Thailand

²Faculty of Chinese medicine, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakarn, Thailand

E-mail; Worrapanee2000@gmail.com

Streptococcus is the typical bacterium found in human oral cavity and associated with tooth decay disease. The objective of this study was to evaluate the efficiency of Chinese herbs against oral cavity disease bacteria. Antimicrobial activities of three Chinese herbs zicao (*Lithospermum erythrorhizon*), jinyinhua (*Lonicera japonica*) and gancao (*Glycyrrhiza uralensis*) were evaluated against two oral cavity bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius*. Results from agar well diffusion revealed that crude extract of zicao had the highest activity among those three herbs. Hence, antimicrobial, antibiofilm and antioxidant activities were further examined with zicao. As a result, antimicrobial activity of zicao against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius* was exhibited by the MIC and MBC of 0.049 and 0.098 mg/ml, respectively. Zicao also provided 80% inhibition of biofilm at 0.012 mg/ml for *Streptococcus mutans* and 1.563 mg/ml for *Streptococcus salivarius*. Antioxidant activity test using DPPH radical scavenging assay showed that zicao had a good antioxidant activity with an IC₅₀ value close to the standard BHT (Butylated hydroxyl toluene). Results obtained from this research could be applied for oral cavity disease prevention using Chinese herb zicao.

Keywords: crude Chinese herbs extracted, zicao, jinyingua, gancao, antioxidant, MIC, MBC, biofilm

บทนำ

แบคทีเรียสกุล *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุและพบได้ทั่วไปในช่องปากมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Streptococcus mutans* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของโรคฟันผุในมนุษย์ คุณสมบัติที่สำคัญในการก่อโรคคือความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มที่ผิวฟัน เรียกว่าคราบพลัค (dental plaque) นอกจากนี้แบคทีเรียมีเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferases) โปรตีนที่จับกับกลูแคน (glucan-binding proteins) หลายชนิด โปรตีนแอนติเจน ซี (protein antigen C) ที่ผิวเซลล์ และ โปรตีนที่จับกับคอลลาเจน (collagen-binding protein) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีส่วนร่วมก่อให้เกิดคราบพลัค และชักนำให้เกิดโรคฟันผุ นอกจากนี้แบคทีเรียยังใช้ระบบควอรัมเซนซิงเป็นการสื่อสารของแบคทีเรีย (quorum-sensing) เพื่อตอบสนองต่อความเครียดในสิ่งแวดล้อมโดยควบคุมการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม (Matsumoto-Nakano, 2018) ส่วนเชื้อ *Streptococcus salivarius* เป็นหนึ่งในเชื้อที่พบเป็นชนิดแรก ๆ ในช่องปาก และลำไส้ของมนุษย์ตั้งแต่แรกเกิด และยังคงอยู่แบบถาวรต่อไป (Hakalehto, Vilpponen-Salmela, Kinnunen, Wright, 2011) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *Streptococcus salivarius* นั้นจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อฉวยโอกาสกับผู้ที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือผู้ที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด รวมทั้งเกิดการติดเชื้อในระหว่างการทำฟันได้ (Tunkel and Sepkowitz, 2002) ดังนั้นการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ในช่องปากสามารถป้องกันการเกิดฟันผุ และช่วยป้องกันการติดเชื้อชนิดรุนแรงในผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำ

เนื่องมาจากการแพทย์แผนจีนให้ความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรค และบรรเทาอาการ มีการใช้ตำรับยาจีนที่ใช้สมุนไพรจีนเพื่อการรักษาฟันผุ และเสริมภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยอาศัยการปรับสมดุลในร่างกาย เช่น จื่อฉ่าว (*Lithospermum erythrorhizon*) มีรายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Yingming, Ying, Hengshan, and Min, 2004) ด้านการอักเสบ (Chung et al., 2005) ด้านแบคทีเรีย (Li, Xu, Zhu and Wang, 2012) ด้านเชื้อรา (Sasaki, Abe, Yoshizaki, 2002) และ ด้านเชื้อไวรัส (Gao et al., 2011) จีนอันฮวาหรือดอกสายน้ำผึ้ง (*Lonicera japonica*) ในทางการแพทย์แผนจีนได้นำส่วนของใบและดอกมาใช้เป็นยาจีนแผนโบราณเพื่อรักษาโรคหลายชนิด เช่น เป็นไข้ปวดศีรษะ ติดเชื้อทางเดินหายใจ โรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ โรคไขข้ออักเสบ และโรคเบาหวาน (Ko, Wei and Chiou, 2006) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ตรุณรัตน์ สบายใจ และคณะ, 2562) กันเฉ่า (*Glycyrrhiza glabra*) มีรายงานฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยสาร glycyrrhizic acid มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ และการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (Chakotiya, Tanwar, Narula and Sharma, 2016)

สารต้านจุลินทรีย์หลายชนิดถูกนำมาใช้ในการต่อต้านการเกิดคราบพลัค เช่น คลอเฮกซีดีน สารลดแรงตึงผิวประจุบวกในกลุ่ม quaternary ammonium compounds หรือสารที่มีรายงานวิจัยพบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าสารเดิม เช่น โลหะอนุภาคนาโน (metal nanoparticles) (Besinis, De Peralta, Handy, 2014) คลอเฮกซีดีนเป็นสารเคมีมาตรฐานในการปฏิบัติทางทันตกรรม แต่การใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีคลอเฮกซีดีนอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดคราบบนฟัน ลิ้น และเหงือก เกิดการรับรสชาติที่เปลี่ยนไป เกิดภาวะปากแห้ง เป็นต้น ดังนั้นจึงไม่เหมาะกับการใช้เป็นประจำต่อเนื่อง (Renuka and Muralidharan, 2017) ดังนั้นสารชีวภาพที่มีความปลอดภัยเช่น สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ด้านการเกิดไบโอฟิล์ม และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นทางเลือกที่ดี และมีความเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในช่องปากป้องกันการเกิดโรคในช่องปากเพื่อใช้ทดแทนยาหรือสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาจากกระบวนการทางเคมี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรที่ดีที่สุดต่อการยับยั้งการเจริญ และการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผลที่ได้จากการศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในการใช้สมุนไพรจีนในการป้องกันและรักษาโรคในช่องปากต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพรจีน

นำส่วนก้านและใบของสมุนไพรจีนจื่อฉ่าว จีนอันฮวา และกันเฉ่า ที่ซื้อจากร้านขายสมุนไพรจีนร้านแสงธรรมเภสัช หั่นและปั่นให้ละเอียด นำมาชั่ง 300 กรัม แช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อัตราส่วนสมุนไพรจีนต่อเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 1:6 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วกรองหยาดด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นกรองละเอียดด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) จะได้สาร

สกัดหยาบ (crude extract) ทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งเยือกแข็ง (freeze dryer) ซึ่งสารที่ได้ เพื่อคำนวณร้อยละของ น้ำหนักสารสกัดหยาบ (% yield) เก็บใส่ในขวดสีชาและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพรจีนด้วยวิธี Agar well diffusion

ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรจีน จื่อฉ่าว จินอันฮวา และกันเฉ่า ด้วยวิธี Agar well diffusion ตามวิธีของ Balouiri, Sadiki and Koraichi (2016) โดยเตรียมเชื้อทดสอบ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 และ *Streptococcus salivarius* ATCC 7073 ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.15 ± 0.005 (ประมาณ 10^8 cells/ml) นำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวอาหารเพาะเชื้อ Brain Heart Infusion Agar (BHA) รอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง เจาะรูให้เป็น หลุมด้วย cork borer เบอร์ 2 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) หยดสารสกัดจื่อฉ่าวที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO (dimethyl sulfoxide) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมทดสอบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก และใช้ DMSO (dimethyl sulfoxide) เป็นชุดควบคุมผลลบ รองนสารทดสอบซึมเข้าเนื้อวุ้นไปจนหมด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองโดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ (vernier caliper) วัดขนาด โซนใสหรือบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นทั้ง 3 ด้าน แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย

3. การทดสอบการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration: MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) ของสารสกัดจื่อฉ่าว

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารสกัดหยาบจื่อฉ่าวให้ผลต้านเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus salivarius* ได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงใช้สารสกัดหยาบจื่อฉ่าวมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ทดสอบหา ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration: MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration: MBC) ของสารสกัดจื่อฉ่าว ดัดแปลงตาม วิธี Balouiri, Sadiki and Koraichi (2016) โดยปิเปตต์อาหารเพาะเชื้อ Brain Heart Infusion Broth (BHI broth) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท แบบ 96 หลุม ทำการเจือจางสารสกัดจนมีความเข้มข้น 50-0.195 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตต์เชื้อทดสอบความเข้มข้นประมาณ 10^6 CFU/ml ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทุกหลุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ยา ปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมผลบวก และใช้เชื้อทดสอบเป็นชุดควบคุมผลลบ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดค่า OD 625 นาโน เมตร โดยเครื่อง microplate reader อ่านค่าและคำนวณผล ความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้คือ ค่า MIC จากนั้น หาค่า MBC โดยใช้รูปแบบเชื้อจากหลุมทดสอบทุกความเข้มข้นมา streak ลงบนอาหารเพาะเชื้อ BHI agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลอง โดยความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถฆ่า เชื้อแบคทีเรียได้ คือ ไม่มีโคโลนีของเชื้อปรากฏขึ้น บันทึกเป็นค่า MBC

4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจื่อฉ่าวต่อการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี crystal violet staining for biofilm assay

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจื่อฉ่าวต่อการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ด้วยวิธี crystal violet staining for biofilm assay ดัดแปลงตามวิธีของ Lin, Keeler and Kraisley (2018) โดยปิเปตต์อาหาร SBHI (Brain heart infusion ที่มีการเติม sucrose) ลงในไมโครเพลท แบบ 96 หลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เจือจางสารสกัดจนมีความเข้มข้น 6.5-0.006 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร เติมน้ำที่ต้องการทดสอบ 10^6 CFU/ml ลงไป 50 ไมโครลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศา เซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำ reverse osmosis (RO) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เขย่าไมโครเพลท เพื่อนำแบคทีเรียที่ไม่มีการเกาะติดออก นำไปบ่มให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 45 นาที จากนั้นเติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ crystal violet ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 20 นาที ล้างออกด้วยน้ำ RO 3 ครั้ง ทำการชะสี ออกจากไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย (เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ 25 เปอร์เซ็นต์) เขย่าเบา ๆ ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ถ่ายสารละลาย 100 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทใหม่ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ

ยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (microplate reader) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าที่วัดได้นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (% inhibition) ตามสมการ

$$("A570" \text{ ของชุดควบคุม} - "A570" \text{ ของชุดทดสอบ}) / ("A570" \text{ ของชุดควบคุม}) \times 100$$

นำผลการทดลองไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism ด้วยวิธี Newman Keuls Multiple Comparison test โดยค่า p-value < 0.05 แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจืดน้ำต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจืดน้ำต่อการสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดัดแปลงตามวิธีของ Lin, Keeler and Kraigsley, (2018) ทำการสร้างไบโอฟิล์มในไมโครเพลทแบบ 96 หลุมแบบกันแบน (96 well microplate) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำ RO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เขย่าไมโครเพลท แบบ 96 หลุม เพื่อนำแบคทีเรียที่ไม่มีการเกาะติดออก นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 45 นาที หลังจากนั้น เติมน้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ crystal violet 30 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำ RO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 1 ครั้ง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาส่องดูไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า บันทึกภาพไบโอฟิล์มเพื่อนำมาเปรียบเทียบผลของสารสกัดสมุนไพรจีนจืดน้ำต่อความหนาแน่นของไบโอฟิล์ม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 6.25-0.006 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร

6. ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดจืดน้ำ ด้วยวิธีการ DPPH radical scavenging assay

นำสารสกัดจืดน้ำมาทดสอบโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay ตามวิธีของ Lu, Yuan, Zeng and Chen (2011) เตรียมสารละลายดีพีพีเอช (DPPH[•] reagent) โดยชั่ง DPPH 0.0079 g ละลายในเอทานอล 100 mL ทำการทดสอบสารสกัด ที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.1, 0.05 และ 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร แต่ละความเข้มข้นประกอบไปด้วย หลอดอ้างอิง 1 หลอด หลอดควบคุม 3 หลอด หลอดอ้างอิงของสารสกัด 1 หลอด และหลอดทดสอบสารสกัด 3 หลอด เติมน้ำสารละลาย DPPH ลงไปในสารทดสอบแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อใช้ในการหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้ สีม่วงของอนุมูลอิสระ (DPPH) จางลงจนกลายเป็นสีเหลืองอ่อนหรือไม่มีสี นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นที่ยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (% inhibition) ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT (Butylated hydroxyl toluene) และคำนวณหา IC₅₀

$$\text{สูตรคำนวณหา \% inhibition} = \{(C - (S - BS)) / C\} \times 100$$

เมื่อ C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม

S คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด และ BS คือ ค่าการดูดกลืนแสงอ้างอิงของสารสกัด

ค่า IC₅₀ คือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ถ้าสารสกัดมีค่า IC₅₀ น้อยกว่าสารมาตรฐาน BHT แสดงว่ามีความสามารถต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT

ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดสารจากสมุนไพรจีน

จากการนำสมุนไพรจีนจืดน้ำส่วนก้านและใบสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:6 จากนั้นนำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนจะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งเยือกแข็ง จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาชั่ง เพื่อคำนวณร้อยละของน้ำหนักสารสกัดหยาบ (% yield) คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้งที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ได้ 1.883

4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรจีนด้วยวิธี Agar well diffusion

ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรจีน 3 ชนิด ที่สกัดในชั้นเอทานอล ละลายด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้เชื้อทดสอบ 2 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus salivarius* ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรจีนในชั้นเอทานอล

สารสกัดหยาบจากสมุนไพรจีน	ค่าเฉลี่ยโซนใส (มิลลิเมตร) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน*	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
จ๊อฉ่าว	31.13 $\pm$ 0.70	20.84 $\pm$ 0.51
จินอินฮวา	16.8 $\pm$ 0.30	16.14 $\pm$ 0.53
กันเฉ่า	10.16 $\pm$ 0.45	10.6 $\pm$ 0.72
ชุดควบคุมผลบวก	12.17 $\pm$ 0.06	11.37 $\pm$ 0.25
ชุดควบคุมผลลบ	-	-

หมายเหตุ *ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
ชุดควบคุมผลบวก หมายถึง ยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ชุดควบคุมผลลบ หมายถึง DMSO
- หมายถึง ไม่เกิดโซนยับยั้ง

4.3 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารสกัดจ๊อฉ่าวที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)

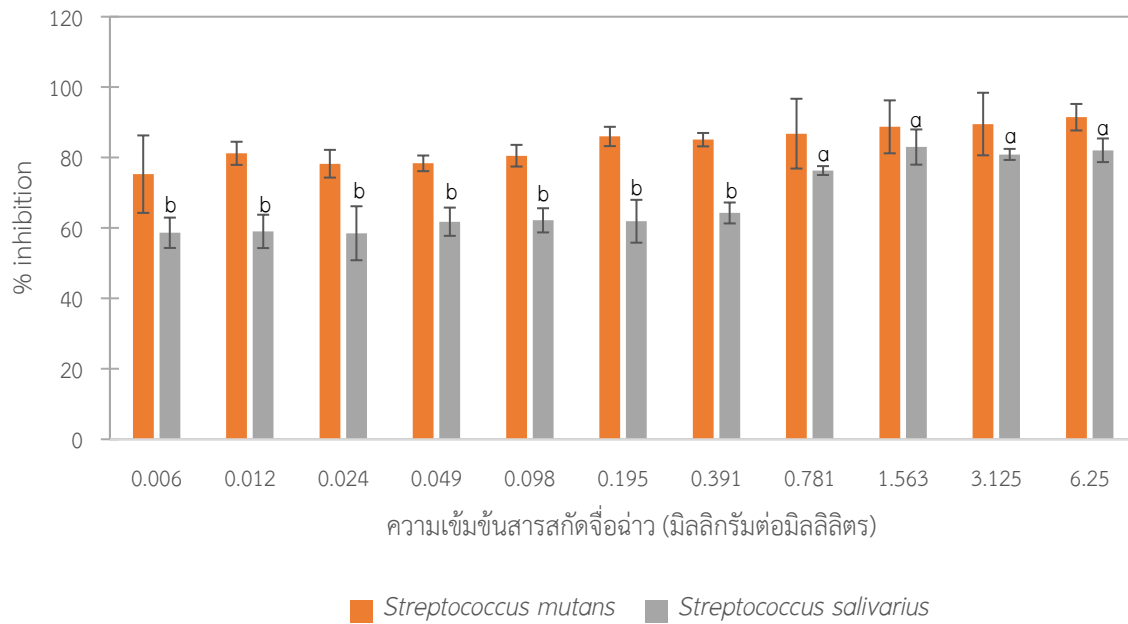
จากผลการทดสอบ agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบของจ๊อฉ่าวมียุทธในการต้านเชื้อ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus salivarius* ได้ดีที่สุทธจึงนำมาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ด้วยวิธี Modified broth microdilution เพื่อหาค่า MIC และ MBC ผลการทดสอบพบว่าค่า MIC และ MBC ของเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีค่าเท่ากัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.049 และ 0.098 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจ๊อฉ่าวต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี crystal violet staining for biofilm assay

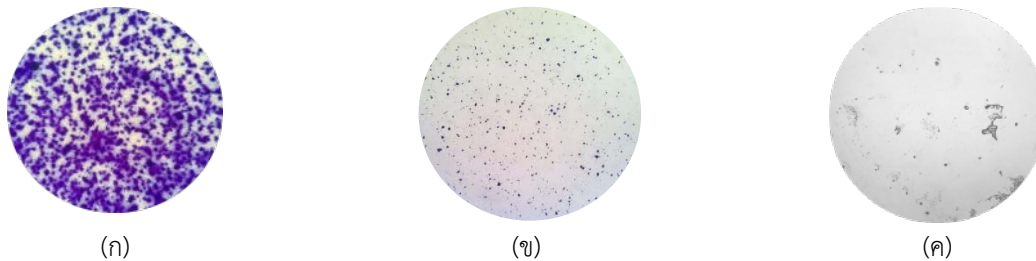
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มพบว่า สารสกัดจ๊อฉ่าว สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus mutans* ได้ดีกว่าเชื้อ *Streptococcus salivarius* ภายในเวลา 4 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของสารสกัดจ๊อฉ่าวที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้มากกว่าร้อยละ 50 (minimum biofilm inhibitory concentration : MBIC₅₀) ต่อเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีค่าน้อยกว่า 0.006 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า MBC₈₀ มีค่าเท่ากับ 0.012 และ 1.563 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* ของสารสกัดจ๊อฉ่าวที่มีความเข้มข้น 0.006-6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 1)

4.5 ผลของสารสกัดจ๊อฉ่าวต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

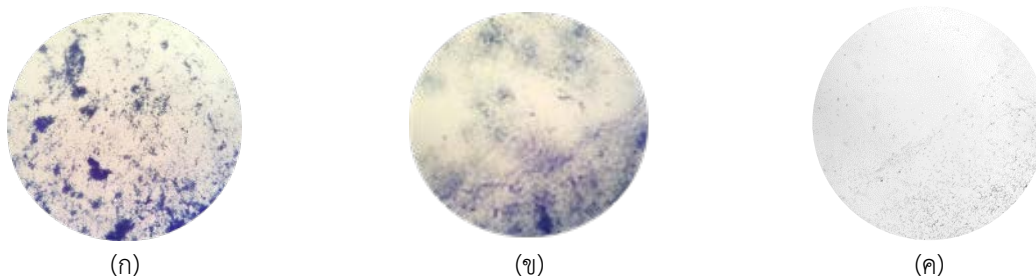
ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มจะลดลง ภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Streptococcus mutans* นั้นมีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีกว่าเชื้อ *Streptococcus salivarius* อย่างเห็นได้ชัด สารสกัดจ๊อฉ่าวมียุทธในการต้านการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีภายในเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3)



ภาพที่ 1 เปอร์เซนต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus salivarius* ต่อสารสกัดจิ้งฉว ที่ความเข้มข้น 0.06 – 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากกราฟตัวอักษร a, b ของ *Streptococcus salivarius* อักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 2 ภาพไตกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 100 เท่า ของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus mutans* ต่อสารสกัดจิ้งฉวที่ความเข้มข้น 0.006 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพ ข และ ค ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่ไม่มีการเติมสารสกัดจิ้งฉว (ภาพ ก)



ภาพที่ 3 ภาพไตกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 100 เท่า ของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus salivarius* ต่อสารสกัดจิ้งฉวที่ความเข้มข้น 0.006 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพ ข และ ค) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัดจิ้งฉว (ภาพ ก)

4.6 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

จากผลการทดลองที่รายงานเป็นค่า IC_{50} แสดงถึงความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูล DPPH ลดลงร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจื๋อฉ่าวกับสารมาตรฐาน BHT พบว่ามีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งสารอนุมูลอิสระ และค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบสมุนไพรจื๋อฉ่าวเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT

สาร	% inhibition (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)	$IC_{50} \pm SD$ (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)
จื๋อฉ่าว	0.025-0.05	0.046 ± 0.001
BHT	0.025-0.05	0.034 ± 0.0005

สรุปและอภิปรายผล

จื๋อฉ่าวเป็นสมุนไพรดั้งเดิมของประเทศจีนมีรายงานวิจัยถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายชนิดรวมถึงความต้านทานต่อ human immunodeficiency virus (HIV) type 1 โดยสารที่สกัดได้จากส่วนรากคือ shikonin เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ด้านการเกิดเนื้องอก และยังช่วยทำให้แผลหายเร็วขึ้น (Chen et al., 2003) ในส่วนของก้าน และใบ ยังไม่พบรายงานผลการวิจัยนี้พบว่าสารสกัดจื๋อฉ่าวด้วยเอทานอลส่วนของก้านและใบมีฤทธิ์ทั้งต้านสารอนุมูลอิสระ ด้านแบคทีเรีย และด้านการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียในช่องปาก เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus salivarius* ของสารสกัดจื๋อฉ่าวกับสารสกัดกานพลูที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าสารสกัดจื๋อฉ่าวออกฤทธิ์ต้านเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่าโดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 0.049 และ 0.098 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ในขณะที่สารสกัดกานพลูมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* เท่ากับ 12.5 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และเชื้อ *Streptococcus salivarius* เท่ากับ 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ (Mirpour, Siahmazgi and Kiasaraie, 2015) ในทำนองเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* เท่ากับ 1.56 และ 3.17 ตามลำดับ (Teanpaisan, Kawsud, Pahumunto and Puripattanavong, 2017) ค่า MIC และ MBC ที่ต่ำกว่าของสารสกัดจื๋อฉ่าวแสดงถึงฤทธิ์ต้านเชื้อในช่องปากทั้งสองชนิดได้ดีกว่าสารสกัดสมุนไพรไทยทั้ง 2 ชนิด นอกจากฤทธิ์การต้านเชื้อแล้ว สารสกัดจื๋อฉ่าวยังแสดงการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีโดยอาจเป็นผลจากการที่สารสกัดจื๋อฉ่าวไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์ เอนไซม์กลูโคซิลทรานส์เฟอร์เรส (glucotransferase) มีผลให้เกิดการสร้างกลูแคนน้อยลงเชื้อจึงเกาะติดได้น้อยลง หรือสารสกัดอาจไปยับยั้งโปรตีนจับลิโปลิแซคคาไรด์ (glucan-binding proteins) ทำให้เชื้อมาจับกับกลูแคนได้น้อยไบโอฟิล์มจึงไม่สามารถก่อตัวให้หนาขึ้นได้ รวมถึงสารสกัดอาจมีผลต่อโปรตีนแอนติเจน ซี (protein antigen C) ที่ผิวเซลล์ และ โปรตีนที่จับกับคอลลาเจน (collagen-binding protein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีส่วนที่ทำให้เกิดคราบพลัคที่ผิวฟัน และก่อให้เกิดโรคฟันผุ

นอกจากนี้จื๋อฉ่าวเป็นสมุนไพรจีนที่เต็มไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ โดยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นสารที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง โดยให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไป และหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อไป สารต้านอนุมูลอิสระจึงมีความสำคัญที่จะช่วยต้านการอักเสบของเหงือกที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคฟันผุ มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดจื๋อฉ่าว ประกอบด้วยสารประกอบ 7 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระคือ deoxyshikonin , b,b-dimethylacrylshikonin, isobutylshikonin, shikonin, 5,8-dihydroxy-2-(1-methoxy-4-methyl-3-pentenyl)-1,4-naphthalenedione, b-sitosterol และเอสเทอร์ของกรดคาเฟอิก อีก 2 ชนิด (Han, Xinchu Weng, and Bi, 2008) ที่ช่วยลดขนาดการอักเสบ (Chung et al., 2005)

จากผลการวิจัยทำให้ทราบว่าสามารถใช้สารสกัดจื๋อฉ่าวในการควบคุมการเกิดคราบพลัคที่เกิดมาจากแบคทีเรียในช่องปากเพื่อป้องกันโรคเหงือกอักเสบ โรคฟันผุ และการเกิดกลิ่นปากได้ รวมถึงป้องกันการติดเชื้อชนิดรุนแรงในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำที่มีสาเหตุจากมาจากการติดเชื้อในช่องปาก ซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนสารเคมี เช่นคลอเฮกซิดีนซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้กันมานานใน

น้ำยาบ้วนปากซึ่งเป็นสารเคมีมาตรฐานในการปฏิบัติทางทันตกรรมแต่ยังมีข้อด้อยบางประการที่ไม่เหมาะสมที่จะใช้ต่อเนื่องเป็นประจำ ดังนั้นสารสกัดจากสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการป้องกันการเกิดการติดเชื้อในช่องปาก การเกิดโรคฟันผุ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยมากกว่าการใช้สารเคมีเมื่อใช้อย่างต่อเนื่องและยังรวมถึงการคัดกรองสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่สามารถนำมาใช้เป็นยาอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

สารสกัดด้วยเอทานอลของสมุนไพรจีนจื่อฉ่าวมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้านแบคทีเรีย และด้านการเกิดไบโอฟิล์ม ดังนั้นควรศึกษาถึงสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ และนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร เช่น ยาสัฟีน น้ำยาบ้วนปาก เพื่อป้องกันโรคฟันผุ และป้องกันการติดเชื้อในช่องปากที่อาจลุกลามได้

เอกสารอ้างอิง

- ดรณรัตน์ สบายใจ อำพร บุญเอก ศรมน สุทิน อรภา สลิษฐ์ รุ่งรัตน์ นิลธเสน วรพรรณี เผ่าทองสุข. (2562).ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย ด้านการเกิดไบโอฟิล์ม และต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจิงอินฮวาต่อเชื้อในช่องปาก. การประชุมวิชาการ ระดับชาติ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 7 (น. 983-990). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรังสิต.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Koraichi, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6, 71–79.
- Besinis, A., De Peralta, T., Handy, R. D. (2014). The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. *Nanotoxicology*, 8(1), 1-16.
- Chakotiya, A.S., Tanwar, A., Narula, A., Sharma, R. K. (2016). Alternative to antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*: Effects of *Glycyrrhiza glabra* on membrane permeability and inhibition of efflux activity and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and its in vitro time-kill activity. *Microbial Pathogenesis*, 98, 98-105.
- Chen, X., Yang, L., Zhang, N., Turpin, J. A., Buckheit, R. W., Osterling, C., Oppenheim, J. J., Howard, O. M. Z. (2003). Shikonin, a component of Chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 9(47), 2810–2816.
- Chung, H. S., Kang, M., Cho, C., Park, S., Kim, H., Yoon, Y. S., Kang, J., Shin, M. K., Hong, M. C., Bae, H. (2005) Inhibition of lipopolysaccharide and interferon-gamma-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha by *Lithospermum radix* in mouse peritoneal macrophages. *Journal of Ethnopharmacol.* 102, 412–417.
- Gao, H., Liu, L., Qu, Z. Y., Wei, F. X., Wang, S. Q., Chen, G., Qin, L., Jiang, F. Y., Wang, Y.C., Shang, L., Gao, C. Y. (2011). Anti-adenovirus activities of shikonin, a component of Chinese herbal medicine in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 34(2), 197-202
- Hakalehto, E., Vilpponen-Salmela, T., Kinnunen, K., and Wright, A. (2011). Lactic acid bacteria enriched from human gastric biopsies. *ISRN Gastroenterol*, 2011, 1-4. doi: 10.5402/2011/109183.
- Han, J., Weng, X., and Bi, k. (2008). Antioxidants from a Chinese medicinal herb – *Lithospermum erythrorhizon*. *Food Chemistry*, 106, 2–10.
- Ko, H.C., Wei, B.L., Chiou, W.F. (2006). The effect of medicinal plants used in Chinese folk medicine on RANTES secretion by virus-infected human epithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 10, 205–210.

- Li, M., Xu, Z., Zhu, C., Wang J. (2012). Effect of different derivatives of shikonin from *Lithospermum erythrorhizon* against the pathogenic dental bacteria. *Current Pharmaceutical Analysis*, 8, 255–260.
- Lin, N. J., Keeler, C., Kraigsley, A. M., Ye, J., Gibson, S. L. (2018). Effect of dental monomers and initiators on *Streptococcus mutans* oral biofilms. *Dental materials*. 34, 776-785.
- Lu, M., Yuan, B., Zeng, M., Chen, J. (2011). Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International*. 44, 530–536.
- Matsumoto-Nakano, M. (2018) Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Japanese Dental Science Review*, 54, 22—29.
- Mirpour, M., Siahmazgi, Z.G., Kiasaraie, M.S. (2015). Antibacterial activity of clove, gall nut methanolic and ethanolic extracts on *Streptococcus mutans* PTCC 1683 and *Streptococcus salivarius* PTCC 1448. *Journal of oral biology and craniofacial research*, 1, 7-10.
- Renuka, S. and Muralidharan, N. P. (2017). Comparison in benefits of herbal mouthwashes with chlorhexidine mouthwash: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(2), 3-7.
- Sasaki, K., Abe, H., Yoshizaki, F. (2002). In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 669–670.
- Teanpaisan, R., Kawsud, P., Pahumunto, N and Puripattanavong, J. (2017). Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7, 172-177.
- Tunkel, A. R. and Sepkowitz, K. A. (2002). Infections caused by viridans Streptococci in patients with neutropenia. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 1524-1529.
- Yingming, P., Ying, L., Hengshan, W., and Min, L. (2004). Antioxidant activities of several Chinese medicine herbs. *Food Chemistry*, 88, 347–350.

ประสิทธิภาพของเจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและข้าลิงต่อการยับยั้งสิว

สุวิษฐา บัวชาติ* และ อังคณา ภัคติ

โปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร

*email: suwichaya.gift@gmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพเจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและข้าลิงสกัดต่อการยับยั้งสิว การต้านเชื้อแบคทีเรียของเจลป้องกันสิวต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Propionibacterium acnes* โดยวิธีวิธี agar well diffusion method พบว่าสูตรที่เหมาะสมที่สุดของเจลแต้มสิว ประกอบด้วย น้ำ Carbopol Ultrez 21, Methyl Paraben, Glycerin, Propyl Paraben, Tween 20, TEA 99%, สารสกัด กระทือและสารสกัดข้าลิง เท่ากับร้อยละ 90.60, 0.60, 0.20, 2.00, 0.02, 5.00, 1.50, 2.00 และ 1.00 ตามลำดับ มีบริเวณ การยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes* เท่ากับ 11.86, 11.70 และ 12.20 มิลลิเมตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. acnes* ยังน้อยกว่าเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (Clindalin) และสูตรสมุนไพรมาตรฐานทางการค้า จากการสำรวจความพึงพอใจของอาสาสมัคร 30 ราย พบว่าร้อยละ 70 ยอมรับเจลแต้มสิวและความชอบโดยรวมค่อนข้างมาก โดยเจลแต้มสิวนี้อาจรักษาสิวยาวภายใน 3-7 วัน

คำสำคัญ: เจลแต้มสิว, กระทือ, ข้าลิง

Efficiency of anti-acne gel from *Zingiber zerumbet* (L.) Smith and *Alpinia conchigera* Griff extract on inhibition of acne

Suwichaya Buachard* and Angkana Pakdee

Biology Program, Faculty of Science and Technology, Kamphaeng Phet Rajabhat University

*email: suwichaya.gift@gmail.com

Abstract

The objective of this study is to develop an effective anti-acne gel from *Zingiber zerumbet* (L.) Smith and *Alpinia conchigera* Griff extract for inhibition of acne. The Antibacterial of anti- acne gel on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* were determined by agar well diffusion method. The result showed that the optimal formula of anti-acne gel contained water, Carbopol Ultrez 21, Methyl Paraben, Glycerin, Propyl Paraben, tween 20, TEA 99%, *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. extract and *Alpinia conchigera* Griff. extract of 90.60, 0.60, 0.20, 2.00, 0.02, 5.00, 1.50, 2.00 and 1.00%, respectively. The zone of inhibition of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes* of 11.86, 11.70 and 12.20 mm, respectively. Nevertheless, it was less effective to inhibit of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes* compared to standard antibiotic (Clindalin) and standard commercial herbal formulation. The satisfaction survey with 30 volunteer showed that 70 % of them accepted the anti-acne gel and the overall liking was a great like. This anti-acne gel will treat acne in 3-7 days.

Keywords: anti-acne gel, *Zingiber zerumbet* (L.) Smith, *Alpinia conchigera* Griff

บทนำ

สิวเป็นโรคผิวหนังชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้แพร่หลายมากที่สุดในโลก (Azimi et al., 2012) มักปรากฏอาการในเพศหญิงช่วงอายุ 16 – 17 ปี และเพศชายช่วงอายุ 17-19 ปี (Mahmood and Shipman, 2017) ส่วนใหญ่สิวจะหายเมื่ออายุ 20 ปี มีเพียงร้อยละ 15 – 20 ของผู้เป็นสิวะระดับปานกลางหรือรุนแรงที่อาการไม่ทุเลาลง (Bhate and Williams, 2013) สิวไม่เพียงแต่ส่งผลกระทบต่อร่างกายเท่านั้นแต่ยังส่งผลกระทบต่อจิตใจ ทำให้ผู้เป็นเกิดความเครียด ความกังวล และขาดความมั่นใจในการเข้าสังคม (Jeong and Kim, 2017; O'Brien et al., 1998) โดยปัจจัยสำคัญของการเกิดสิว คือ ฮอโมนแอนโดรเจน (androgen) ไปกระตุ้นการทำงานต่อมไขมันให้สร้างไขมันมากขึ้น รวมทั้งเซลล์ผิวหนังชั้นเคอราตินเกิดการหนาตัวกว่าปกติทำให้รูขุมขนเกิดการอุดตัน จึงเป็นสาเหตุให้แบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* เจริญเติบโตและเกิดการอักเสบของผิวหนังตามมา (Toyoda and Morohashi, 2001) เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวได้แก่, *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* โดยแบคทีเรียหลัก คือ *P. acnes* (Kapoor and Saraf, 2011; Hassanzadeh et al., 2008) *P. acnes* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต อาศัยอยู่ในต่อมไขมันและรูขุมขนของผิวหนัง (Dizay et al., 2017) ปัจจุบันการรักษามีหลากหลายวิธี เช่น ยาปฏิชีวนะ เรตินอยด์ (retinoid) ยาปรับฮอโมน เวชสำอาง เป็นต้น (Jain et al., 2014) แต่พบว่าการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวทำให้เชื้อจุลินทรีย์ดื้อยา เกิดข้างเคียงต่อผู้ป่วย และค่าใช้จ่ายสูง ภายหลังจึงมีความสนใจในการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษามากขึ้น กระเทียม (*Zingiber zerumbet* Smith) และข่าลิง (*Alpinia conchigera* Griff) เป็นพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ในเอเชียพบพืชวงศ์นี้ประมาณ 141 ชนิด โดยส่วนใหญ่พบมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Yob et al., 2011; Tzeng et al., 2014; Ujang et al., 2013) กระเทียมจัดเป็นสมุนไพรประจำบ้านชนิดหนึ่ง เนื่องจากคนไทยนิยมปลูกเพื่อใช้ประโยชน์ด้านอาหาร เช่น จิ้ม น้ำพริก แกง อีกทั้งมีสรรพคุณในการรักษาโรคท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่นจุกเสียด ขับลม เบื่ออาหาร ปวดท้องบิด ปวดฟัน ไข้ เป็นต้น (มติชนสุดสัปดาห์, 2559) ในกระเทียมมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ คือ ซิริมบอน (Zerumbone) สามารถต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย การอักเสบ มะเร็ง เอ็ดส์ การแข็งตัวของเลือด ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดอาการปวด เป็นต้น (Murakami et al., 1999; Thha et al., 2010; Yob et al., 2011). ข่าลิงมีสรรพคุณในการรักษาอาการปวดท้อง จุกเสียดแน่นเฟ้อ ท้องผูก แผลงัดต่อย เวียนศีรษะ ฝีหนอง กลากเกลื่อน ขับพยาธิ และโรคหนองใน (สุภารัตน์ จันทรเหลียง และคณะ, 2555) ข่าลิงมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด คือ 1'-acetoxychavicol acetate, chavicol, chavicol acetate, 1,8-cineole, β -bisabolene, β -sesquiphellandrene และ β -sitosterol ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ การอักเสบ (Wong et al., 2005; Faridah et al., 2010) เจลแต้มสิวเป็นการรักษาสิวที่จะช่วยต้านเชื้อแบคทีเรีย เร่งการหลุดลอกของ epithelial cells ทำให้หัวสิวลุดลอก ลดการเกิดสิว และมีฤทธิ์ลดการอักเสบ (กุสาวดี, 2558) งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพเจลแต้มสิวจากรสสกัดกระเทียมและข่าลิงต่อการยับยั้งเชื้อก่อสิว และการรักษาสิว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเจลแต้มสิวจากรสสกัดกระเทียมและข่าลิงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการรักษาสิวของเจลแต้มสิวจากรสสกัดกระเทียมและข่าลิงในอาสาสมัคร

ระเบียบวิธีวิจัย

การเตรียมสารสกัดจากเหง้ากระเทียมและข่าลิง

นำเหง้ากระเทียมและข่าลิงมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ตากแดดจนแห้ง ปั่นให้ละเอียดแล้วแช่ในเอทานอลร้อยละ 95 ในอัตราส่วนกระเทียมต่อเอทานอล 1:4 แช่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบางและกรองต่อด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำการระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส เก็บสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ส่วนสารสกัดเหง้ากระเทียมทำเช่นเดียวกับสารสกัดกระเทียม (อุดมลักษณ์, 2553)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟีนอลิก

วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน นำ สารสกัดเหง้ากระเทียมและข่าลิง 200 ไมโครลิตร เติมน้ำละลาย Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ค่าการเจือจาง 10 เท่า และเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เขย่า เติมน้ำละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 2

มิลลิลิตร เขย่า 2 นาทีเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร เขย่า เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับ blank ใช้ น้ำกลั่นแทนสารสกัดและใช้กรดแกลลิก ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน โดยทำการทดลอง เช่นเดียวกับสารสกัด โดยเปลี่ยนจากสารสกัดตัวอย่างเป็นสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก สร้างกราฟมาตรฐาน (Singleton et al, 1999)

ฟลาโวนอยด์

สารสกัดแห้งกระทือและข่าลิ้ง 100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียม ไนไตรท์ (NaNO₂) เข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร บ่ม 6 นาทีเติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl₃) เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มเวลา 5 นาทีเติมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สำหรับ blank ใช้ น้ำกลั่นแทนสารสกัดและใช้ catechin ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐาน (Jia et al, 1999)

วิธีการเตรียมเจล

ทำการเตรียมเจลแถมสัปดาห์ตารางที่ 1 โดยดัดแปลงสูตรจาก (ปณิธิ, 2549) โดยใช้ citric acid ในการปรับค่าความเป็นกรดต่างของเจลแถมสัปดาห์ให้อยู่ในช่วง 6.8-7.4

ตารางที่ 1 การเตรียมเจลจากสารสกัดกระทือและข่าลิ้ง

ส่วนประกอบ	% w/w					
	สูตรควบคุม	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	เจลแถมสัปดาห์กระทือ	เจลแถมสัปดาห์ข่าลิ้ง
Part 1						
Carbopol Ultrez 21	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
Methyl Paraben	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Part 2						
Glycerin	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Propyl Paraben	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Part 3						
กระทือ	-	2.00	1.50	1.00	3.00	-
ข่าลิ้ง	-	1.00	1.50	2.00	-	3.00
Tween 20	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Part 4						
TEA 99%	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
DI Water	90.60	87.60	87.60	87.60	87.60	87.60
Total	100	100	100	100	100	100

หมายเหตุ: สูตรควบคุมตำรับเจลพื้น

สูตร 1 ตำรับเจลรักษาผิวจากสารสกัดกระทือ, ข่าลิ้ง 2, 1 % w/w

สูตร 2 ตำรับเจลรักษาผิวจากสารสกัดกระทือ, ข่าลิ้ง 1.5, 1.5 % w/w

สูตร 3 ตำรับเจลรักษาผิวจากสารสกัดกระทือ, ข่าลิ้ง 1, 2 % w/w

การทดสอบประสิทธิภาพเจลแถมสัปดาห์ของสารสกัดกระทือและข่าลิ้งต่อการยับยั้งเชื้อก่อสัปดาห์ด้วยวิธี Agar well diffusion method

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 2326 และ *Staphylococcus epidermidis* TISTR 2138 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยและ *Propionibacterium acnes* DMST 14916 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นำเชื้อ *S. aureus* เลี้ยงในอาหาร Muller Hinton broth ส่วน

S. epidermidis และ *P. acnes* เลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth โดยเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* นำไปเขย่าที่ 240 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *P. acnes* เลี้ยงในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml เปรียบเทียบกับ McFarland No.0.5 เกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง พักไว้ให้แห้งนำ cork borer เจาะบนอาหารกว้างหลุมละ 7 มิลลิเมตร แล้วนำเจลแถมสิวทั้ง 6 สูตรจากตารางที่ 1 และเจลแถมสิวที่มีขายตามท้องตลาดได้แก่ เจลแถมสิวยาปฏิชีวนะที่ขายในท้องตลาดที่มียาปฏิชีวนะ Clindamycin เข้มข้นร้อยละ 1 และเจลแถมสมุนไพรสมุนไพรทางการค้า (ตัวควบคุมเชิงบวก) ใส่ลงไปในหลุม หลุมละ 0.08 กรัม โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศสำหรับเชื้อ *P. acnes* สังเกตบริเวณการยับยั้งแบคทีเรีย (inhibition zone)

การวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และสารห้ามใช้ในเจลแถมสิวของสารสกัดกระทือและข่าลิง

นำเจลแถมสิวของสารสกัดกระทือและข่าลิงสูตรที่ดีที่สุด มาทำการทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ จำนวนแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ที่เจริญโดยใช้อากาศ ด้วยวิธี ISO 21149:2006 และ ISO 16212:2008 *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี ISO 22718:2006 *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี ISO 22717:2006 *Candida albicans* ด้วยวิธี ISO 18416:2007 และ *Clostridium* spp. ด้วยวิธี USP 39:2016 เกณฑ์กำหนดตาม ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดลักษณะของเครื่องสำอางที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127 ตอนพิเศษ 51 ง ลงวันที่ 23 เมษายน 2553 การทดสอบการปนเปื้อนสารห้ามใช้ ได้แก่ ไฮโดรควิโนน ด้วยวิธี ASEAN Harmonized Method, 2005 เกณฑ์กำหนดตาม ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง (ฉบับที่ 2) ลงวันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2552 พรอท ด้วยวิธี ASEAN Harmonized Method, 2005 กรดเรติโนอิก ด้วยวิธี Clarke's Analysis of Drugs and Poisons สเตียรอยด์ (เพรดนิโซโลน, เดกซาเมธาโซน, เบต้าเมธาโซน, ไตรแอมซิโนโลน, คลอเบธาซอล) เกณฑ์กำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง ลงวันที่ 26 มีนาคม 2551 โดยศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การทดสอบประสิทธิภาพการรักษาเจลแถมสิวจากสารสกัดกระทือและข่าลิงในอาสาสมัคร

คัดเลือกอาสาสมัครชายหญิงอายุระหว่าง 15-35 ปี จำนวน 30 คน จากการสัมภาษณ์ ได้แก่ ประวัติการแพ้เครื่องสำอาง ยารักษาสิว และการแพ้สมุนไพร ก่อนทดสอบให้อาสาสมัครทดสอบการระคายเคืองก่อน โดยทาเจลแถมสิวที่ท้องแขนทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทดสอบดูอาการแพ้ต่ออาสาสมัครก่อนใช้ผลิตภัณฑ์บริเวณผิวหนัง กำหนดให้อาสาสมัครทาผลิตภัณฑ์เจลแถมสิวจากกระทือและข่าลิงวันละ 2 ครั้ง ในเวลาเช้าและเย็นเป็นประจำทุกวัน 1 สัปดาห์ จากนั้นให้อาสาสมัครบันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นตามแบบฟอร์มที่กำหนดให้และติดตามผลโดยการถ่ายรูปเปรียบเทียบการหายของสิว และให้อาสาสมัครทำแบบสอบถามความพึงพอใจผลิตภัณฑ์เจลแถมสิวสารสกัดกระทือและข่าลิงโดยแบบสอบถามจะแบ่งเป็น 4 ส่วน คือ ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการใช้ผลิตภัณฑ์รักษาสิว ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการใช้ผลิตภัณฑ์เจลแถมสิว และข้อมูลเกี่ยวกับการทดสอบผลิตภัณฑ์เจลแถมสิวจากสารสกัดกระทือและข่าลิง

การวิเคราะห์ข้อมูล

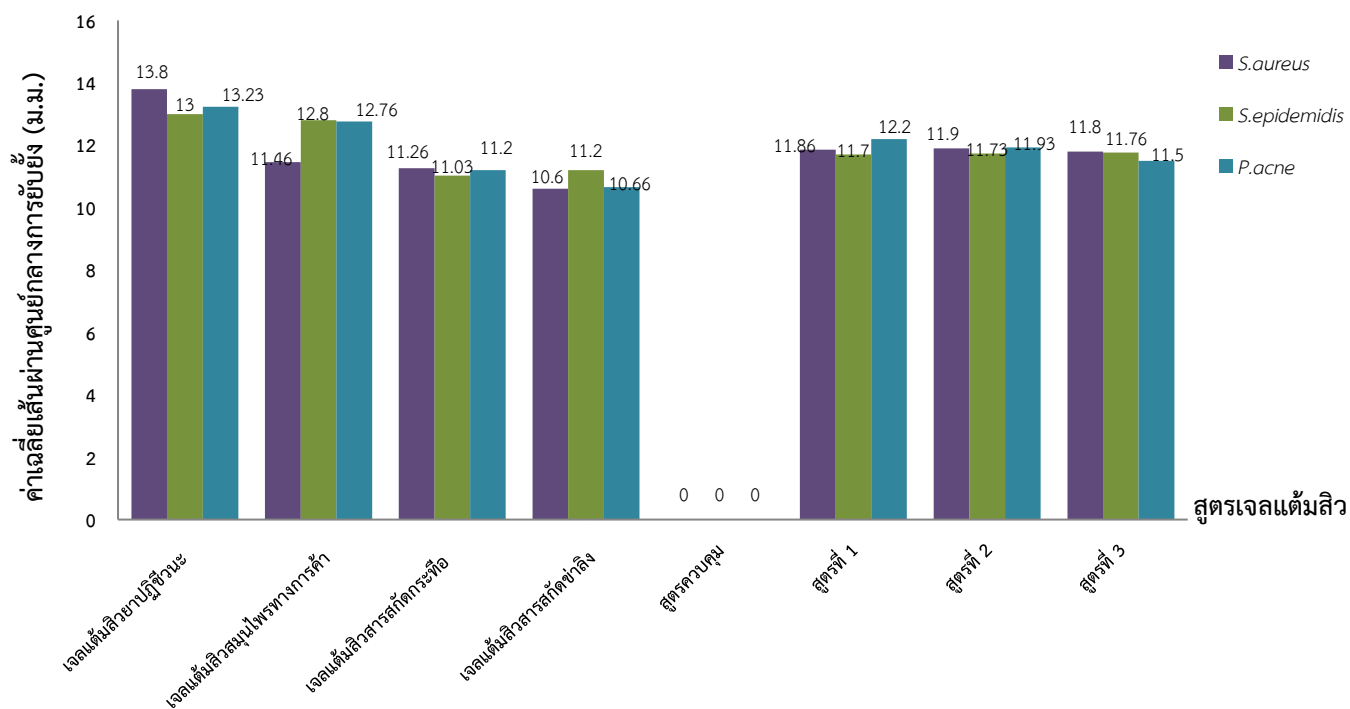
ทำการศึกษาวเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบน โดยใช้ซอฟต์แวร์ IMB SPSS Statistics 20

ผลการวิจัย

จากการนำสารสกัดเหง้ากระทือและข่าลิงมาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ พบว่าสารสกัดเหง้ากระทือและข่าลิงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 42.22 และ 15.06 mg gallic acid/100g sample และ ปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เท่ากับ 33.89 และ 66.94 mg catechin/100g sample ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของเจลแถมสิว พบว่าเจลแถมสิวยาปฏิชีวนะ Clindamycin (ความเข้มข้น Clindamycin ร้อยละ 1) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. acnes* ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเท่ากับ 13.8, 13.00 และ 13.23 มิลลิเมตร โดยเจลแถมสิวสมุนไพรทางการค้าให้ประสิทธิภาพรองลงมา และเจลแถมสิวจากสารสกัดกระทือและข่าลิงสามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่าเจลแถมสิวสูตรที่ใช้สมุนไพรเพียงชนิดเดียว แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งเจลแถมสิวจากสารสกัดกระทือและข่าลิงสูตรที่ 1 พบว่าปริมาณสารสกัดกระทือมีผลยับยั้งการเจริญของ *P. acnes* เชื้อก่อให้เกิดสิวโดยตรงได้ดีกว่าสูตรที่ 2 และ 3 ที่มีการเติมสารสกัดกระทือปริมาณน้อยกว่า แต่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ดี และเจลแถมสิวสูตรควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัดสมุนไพรไม่สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 1

ตารางที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟาวโวนอยด์ของสารสกัดกระเทียมและข่าลิง

สารสกัด	สารประกอบฟีนอลิก (mg gallic acid/100g sample)	ฟาวโวนอยด์ (mg catechin/100g sample)
กระเทียม	42.22 ± 0.16	33.89 ± 0.23
ข่าลิง	15.06 ± 0.01	66.94 ± 0.43



ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Propionibacterium acnes* DMST 14916 ของเจลแต้มสิวลูสมุนไพรรักษา

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของเจลแต้มสิว

สูตรเจลแต้มสิว	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้ง (ม.ม.)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
เจลแต้มสิวยาปฏิชีวนะ Clindamycin	13.80 ± 0.17 ^a	13.00 ± 0.17 ^a	13.23 ± 0.05 ^a
เจลแต้มสิวมุนไพรรักษาสิว	11.46 ± 0.20 ^{bc}	12.80 ± 0.17 ^a	12.76 ± 0.23 ^b
เจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือ	11.26 ± 0.20 ^c	11.03 ± 0.05 ^c	11.20 ± 0.20 ^e
เจลแต้มสิวจากสารสกัดขาลิง	10.60 ± 0.17 ^d	11.20 ± 0.17 ^c	10.66 ± 0.56 ^f
เจลสูตรควบคุม	00.00 ± 0.00 ^e	00.00 ± 0.00 ^d	00.00 ± 0.00 ^g
เจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและขาลิงสูตรที่ 1	11.86 ± 0.23 ^b	11.70 ± 0.20 ^b	12.20 ± 0.10 ^c
เจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและขาลิงสูตรที่ 2	11.90 ± 0.36 ^b	11.73 ± 0.32 ^b	11.93 ± 0.05 ^c
เจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและขาลิงสูตรที่ 3	11.80 ± 0.26 ^b	11.76 ± 0.20 ^b	11.50 ± 0.17 ^d

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range test

ตารางที่ 4 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในเจลแต้มสิวของสารสกัดกระทือและขาลิง

เชื้อจุลินทรีย์	ปริมาณที่พบ (โคโลนี/กรัม)	เกณฑ์กำหนด* (โคโลนี/กรัม)
แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ที่เจริญโดยใช้อากาศ	น้อยกว่า 10	ไม่เกิน 10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	ไม่พบ	ไม่พบต่อกรัม
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ไม่พบ	ไม่พบต่อกรัม
<i>Candida albicans</i>	ไม่พบ	ไม่พบต่อกรัม
<i>Clostridium</i> spp.	ไม่พบ	ไม่พบต่อกรัม

ตารางที่ 5 การปนเปื้อนสารห้ามใช้ในเจลแต้มสิวของสารสกัดกระทือและขาลิง

สารห้ามใช้	ปริมาณที่พบ (%w/w)	เกณฑ์กำหนด (%w/w)
ไฮโดรควิโนน	ไม่พบ	ไม่พบ
ปรอท	ไม่พบ	ไม่พบ
กรดเรติโนอิก	ไม่พบ	ไม่พบ
สเตียรอยด์ (เพรดนิโซโลน, เด็กซาเมธาโซน, เบต้าเมธาโซน, ไตรแอมซิโนโลน, คลอเบธาซอล)	ไม่พบ	ไม่พบ

เจลแต้มสิวสมุนไพรสูตรที่ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อก่อโรค คือ เจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและข่าลิงสูตรที่ 1 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. acnes* เท่ากับ 11.86, 11.70 และ 12.20 มิลลิเมตร ตามลำดับ นำสูตรดังกล่าวมาวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และสารห้ามใช้ในเครื่องสำอางค์) ตามเกณฑ์ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พบว่า เจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและข่าลิงสูตรที่ 1 มีมาตรฐานตามเกณฑ์ โดยมีปริมาณแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ที่เจริญโดยใช้อากาศน้อยกว่า 10 โคโลนี/กรัม ไม่พบเชื้อ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* และ *Clostridium* spp. และไม่พบการปนเปื้อนสารห้าม ได้แก่ ไฮโดรควิโนน โปรท กรดเรติโนอิก สเตียรอยด์ (เพรดนิโซโลน เด็กซาเมธาโซน เบต้าเมธาโซน ไตรแอมซิโนโลน และคลอเบซาซอล) ดังตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 6 การใช้ผลิตภัณฑ์เจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือในอาสาสมัคร 30 คน เป็นเวลา 1 สัปดาห์

อาการ	ก่อนใช้ผลิตภัณฑ์	จำนวนวันหลังใช้ผลิตภัณฑ์						
		1	2	3	4	5	6	7
อาการบวมแดง (อักเสบ)	30	-	-	-	-	-	-	-
สิวกอักเสบลดลง	-	12	15	3				
อาการบวมแดงลดลง	-		6	19	5			
รอยสิวแห้ง	-			3	19	7	1	
สิวหาย (ไม่มีการอักเสบสิวแห้ง)	-			4	12	9	3	2
รวม	30	12	21	29	36	16	4	2

นำเจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและข่าลิงสูตรที่ 1 มาทดสอบกับอาสาสมัคร 30 คน แบ่งเป็นชาย 15 คน หญิง 15 คน โดยอาสาสมัครที่อายุ 15 – 19 ปี และ 20 – 24 ปี มีจำนวนช่วงละ 7 คน อายุ 25 – 29 ปี และ 30 – 35 ปี มีจำนวนช่วงละ 8 คน พบว่าก่อนใช้ผลิตภัณฑ์เจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและข่าลิงอาสาสมัครทั้ง 30 คน มีลักษณะสิวบวมแดง (อักเสบ) หลังจากใช้ผลิตภัณฑ์เจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและข่าลิงสูตรที่ 1 อาสาสมัครส่วนใหญ่สิวลดการอักเสบ ในช่วง 1 - 3 วัน อาการบวมแดงลดลง ในช่วง 2 - 4 วัน อาการสิวแห้ง 3 - 6 วัน สิวหายในช่วง 3 - 7 วัน แสดงว่าผลิตภัณฑ์เจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและข่าลิง สามารถลดการอักเสบของสิวได้ใน 2-3 วันโดยไม่เกิดการระคาย การแสบ ลอกเป็นขุยหรือแพ้ ดังนั้นผลิตภัณฑ์เจลแต้มสิวจากสารสกัดกระทือและข่าลิงน่าจะสามารรถซึมผ่านผิวและออกฤทธิ์ต้านและลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวได้ ภายใน 2-3 วัน และทำสิวหายได้ภายใน 3 – 5 วัน โดยมากสิวจะหายในวันที่ 4 เป็นจำนวน 12 คน คิดเป็นร้อยละ 40 ของอาสาสมัคร แต่ก็ขึ้นอยู่กับสภาพผิวหนังของอาสาสมัครแต่ละคน ดังตารางที่ 6

สรุปและอภิปรายผล

สารสกัดเหง้ากระทือที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 42.22 mg gallic acid/100g sample และ 33.89 mg catechin/100g sample ตามลำดับ โดยปริมาณสารจะแตกต่างกันชนิดตัวทำละลาย และอายุของตัวอย่าง Nag et al. (2013) สารสกัดเอทานอลของเหง้ากระทือที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์เท่ากับ 33.64 mg gallic acid/g extract และ 26.79 mg quercetin/g extract Mokhtar et al. (2018) ทำการสกัดเหง้ากระทือด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100 - 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 25 นาที ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์เท่ากับ 2.12 - 18.52 mg GAE/g DW และ 0.95 - 2.34 mg QE/g DW. Ghasemzadeh et al. (2016) รายงานว่าเหง้ากระทือที่มีอายุมากจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าเหง้าที่มีอายุน้อย โดยเหง้ากระทือที่อายุ 3, 6 และ 9 เดือน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 19.2, 26.7 และ 44.8 mg GAE/g DM ตามลำดับ และปริมาณฟลาโวนอยด์ 11.2, 19.6 และ 29.7 mg QE/g DM กระทือมีสารออกฤทธิ์ที่โดดเด่น คือ สารกลุ่มเทอร์ปีน เช่น Zerumbone, Borneol, α -pinene และสารกลุ่มสารประกอบฟลาโวนอยด์ เช่น Kaempferol-3-O-(2,4-di-O-acetyl- α -l-rhamnopyranoside), Kaempferol-3-O-(3,4-di-O-acetyl- α -l-rhamnopyranoside) (Adriana et al., 2016) สารสกัดเหง้าข่าลิงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 15.06 mg gallic acid/100g sample และ 66.94 mg catechin/100g sample ตามลำดับ ตามลำดับ Masud et al. (2017) สารสกัดเมทานอลเหง้าข่าลิงมีปริมาณสารประกอบ

พีนอลิก 71.08 mg of GAE/gm extracts เมทานอลมีสารออกฤทธิ์ที่โดดเด่น คือ β - pinene, Eucalyptol, Cyclohexene, 1-methyl- 4-(5-methyl- 1-methylene-4-hexenyl), 1,6,10-dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene, Bicyclo(7.2.0)undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene, Chavicol, Eucalyptol, α -Caryophyllene (Halijah et al., 2009; Mohammad et al., 2010; Halijah et al., 2014) โดยสารสกัดจากเหง้ากระเทียมและข่ายังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ด้านสารอนุมูลอิสระ ยับยั้งเซลล์มะเร็ง เป็นต้น เจลแต้มสิวจากสารสกัดกระเทียมและข่าสามารถยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุก่อโรคสิวได้ทั้ง 3 ชนิด สอดคล้องกับการรายงานของสุวิษฐา และคณะ (2558) สารสกัดเอทานอลเหง้ากระเทียมให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *P. acnes* และ *S. epidermidis* เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และสารสกัดเอทานอลเหง้าข่าให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร Halijah et al. (2009) รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยข่าให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) และ *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1228) คือ มากกว่า 33.3 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร อาแอเอชะ (2553) ได้ผลิตเจลแต้มสิวด้านเชื้อ *S. aureus* จากสารสกัดกระชายดำ พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ ฟลาโวนอยด์ โดยเจลแต้มสิวมียุทธศาสตร์ด้านการอักเสบ และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ได้ดี แต่อย่างไรก็ตามเจลแต้มสิวมุนไพรมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเจลแต้มสียาปฏิชีวนะ Clindamycin เพราะส่วนผสมหลักคือตัวยา Clindamycin เป็นยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Anaerobic bacteria, streptococci และ staphylococci รวมถึงต่อต้านเชื้อโปรโตซัว (Protozoa) บางชนิด เป็นยาที่ช่วยลดการอักเสบของสิวได้ดี ทำงานโดยยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย โดยจับกับไรโบโซม ซับยูนิต 50S แบบผันกลับได้ ทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ transpeptidation หรือ translocation ของบริเวณที่ถูกจับด้วยตัวยา เป็นผลให้เกิดการชะงักของการเติบโตของเซลล์ทำให้แบคทีเรียตายและไม่สามารถเจริญเติบโตต่อได้ สารไฮโดรควิโนน มีคุณสมบัติในการฟอกสีผิว แต่ต่อมาพบว่าทำให้เกิดการระคายเคืองและจุดด่างขาวที่ผิว ทำให้เป็นฝ้าถาวร โปรทแอมโมเนียออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้ลดการสร้างเม็ดสีผิวจึงช่วยให้หน้าขาว สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้จึงป้องกันสิวได้ นิยมใช้ในครีมแก้สิวดำ ต่อมาพบว่าสามารถทำลายไ้ระบบประสาท เยื่อบุทางเดินหายใจ หากสะสมนานๆทำให้เกิดตับและไตอักเสบได้ สำหรับกรดเรทีโนอิกเป็นสารที่ช่วยให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนึ่งและหลุดลอกได้ จึงช่วยให้สิวลื่นและผิวหนึ่งที่ยาบกร้านหลุดออกง่ายขึ้น ทำให้ผิวผ่องใส ความเป็นพิษคือทำให้หน้าแดงแสบร้อนรุนแรง ระคายเคืองอักเสบ เป็นอันตรายต่อทารกในครรภ์ จึงทำให้สารทั้ง 3 ชนิดนี้ ถูกกำหนดเป็นสารต้องห้ามในเครื่องสำอาง (นพพร และคณะ 2551) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดลักษณะของเครื่องสำอางที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย ได้ระบุว่าเครื่องสำอางต้องมีสมบัติทางจุลชีววิทยา คือ ต้องไม่พบ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Clostridium* spp. (เฉพาะเครื่องสำอางผสมสมุนไพร) และจำนวนรวมของแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่เจริญเติบโตโดยใช้อากาศต้องไม่เกิน 1,000 โคโลนีต่อกรัมหรือลูกบาศก์เซนติเมตร (ราชกิจจานุเบกษา, 2559) วิภาวี (2549) ได้ทำการพัฒนาเครื่องสำอางรักษาสิवरูปแบบเจลจากสารสกัดกระเทียมเจ็ดตัว โดยเตรียมตำรับสองรูปแบบคือ ไฮโดรเจล และ transparent oil in water gel (TOW gel) พบว่าสามารถลดอาการอักเสบของสิว ของอาสาสมัครได้ใน 2-3 วัน

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาเพิ่มเติมด้านการระคายเคืองในสัตว์ทดลองเพิ่มเติม เพื่อเป็นข้อมูลยืนยันด้านประสิทธิภาพที่จะส่งเสริมให้ประชาชนหันมาใช้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรไทยมากขึ้น และควรศึกษาการทำบริสุทธิ์สารสกัดเพื่อทดสอบสารออกฤทธิ์ที่มีผลเฉพาะเจาะจงกับเชื้อทั้ง 3 ชนิด ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาสิวเพิ่มขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กุสาวดี เมลืองนนท์. (2558). ยารักษาสิว. สืบค้นวันเสาร์ที่ 31 มีนาคม 2561 จาก <http://www.pharm.tu.ac.th/pdf/acne57.pdf>.
- นพพร อนันตสินกุล, สุดธิดา หมีทอง, พรชยา ไชยวานิช และจรรยา มีศรี. (2551) การพัฒนาห้องปฏิบัติการเครือข่ายตรวจเอกลักษณ์สารห้ามใช้ (ไฮโดรควิโนน กรดเรทีโนอิก และโปรทแอมโมเนีย) ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง. ว กรมวิทย พ 50 (4), 311-325.

- ปณิธิ ชุณหะวัณ. (2549). การพัฒนาเจลแต้มสิวที่มีส่วนผสมน้ำมันการพลู. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง) มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
- มิตินันต์ สดุดา. (2559). เหง้า-ใบ-ดอก-เกสร-ต้น ประโยชน์เพียบ! “กระทือ” ของดีที่คนไทยหลงลืม? เผยแพร่วันพุธที่ 21 ธันวาคม 2559. สืบค้นวันเสาร์ที่ 31 มีนาคม 2561.
- ราชกิจจานุเบกษา. (2559). ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดลักษณะของเครื่องสำอางที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย พ.ศ. 2559. เล่ม 133 ตอนพิเศษ 72 ง ราชกิจจานุเบกษา 28 มีนาคม 2559.
- วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม) มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
- วิภาวี อุบลศักดิ์. (2559). การพัฒนาเครื่องสำอางรักษาสิวรูปแบบเจลจากสารสกัดกระทือเจ็ดตัว.
- สุภารัตน์ จันทน์เหลือง สมยพล อาลัย เวทย์ ศรีละคร และนพวัฒน์ เพ็งคำศรี. (2555).ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดฆ่าล้างต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* ที่เจริญแบบไบโอฟิล์ม. วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. 5 (4); 279 – 285.
- สุวิธญา บัวชาติ ภัสสร จันเฝือก และรัตนา สระทองวาท. (2558) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของสารสกัดจากพืชสมุนไพร. ว. วิทย. กษ. 46(3)(พิเศษ), 317-320.
- อาอ์เอเซียะ หะยีสและ. (2553). การผลิตเจลแต้มสิวด้านเชื้อ *Saphylococcus aureus* จากสารสกัดกระชายดำ. วิทยานิพนธ์ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม.
- Adriana, Y. K., Flávio, L.B, Airton, V.P. (2016). Several aspects of *Zingiber zerumbet*: a review. Revista Brasileira de Farmacognosia 26, 385–391
- Ali, G., Hawa Z. E. J., Sadegh, A., Asmah, R., Abdul S. J., Adam, P., Mahmud T. M. Variation in secondary metabolite production as well as antioxidant and antibacterial activities of *Zingiber zerumbet* (L.) at different stages of growth. BMC Complementary and Alternative Medicine 16, 1-10
- Azimi, H., Tafti, M.F, Khakshur, A.A, Abdollahi, M. (2012). A review of phytotherapy of acne vulgaris: Perspective of new pharmacological treatments. Fitoterapia 83, 1306–1317.
- Bhate, K., Williams, H.C. (2013). Epidemiology of acne vulgaris. Br. J. Dermatol. 168, 474–485.
- Dizay, H.H., Lau, D.G., Nottage, W.M. (2017). Benzoyl peroxide and clindamycin topical skin preparation decreases *Propionibacterium acnes* colonization in shoulder arthroscopy. J Shoulder Elbow Surg. 26, 1190–1195
- Faridah, Q. Z., Abdelmageed A. H. A., Nor Hazirah A. N. , Yaacob, M. (2010). Comparative study of essential oil composition of leaves and rhizomes of *Alpinia conchigera* Griff. at different post- harvest drying periods. Journal of Medicinal Plants Research 4(24), 2700-2705.
- Halijah, I., Ahmad, N.A., Devi, R.S., Nor, A.M.A, Mastura, M., Rasadah M.A., Khalijah, A. (2009). Essential oils of *Alpinia conchigera* Griff. and their antimicrobial activities. Food Chemistry 113, 575–577
- Halijah, I., Yasodha, S., Devi, R.S., Noor, H.N., Natasha, J., Khalijah, A. (2014). Essential Oil Composition and Antimicrobial Activities of Two Closely Related Species, *Alpinia mutica* Roxb. and *Alpinia latilabris* Ridl., from Peninsular Malaysia. Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal Volume 2014, Article ID 430831, 6 pages
- Hassanzadeh, P., Bahmani, M., Mehrabani, D. (2008). Bacterial resistance to antibiotics in acne vulgaris: An in vitro study. Indian J. Dermatol. 53, 122-124.
- Jain, A.K., Jain, A., Garg, N.K., Agarwal, A., Jain, A., Jain, S.A., Tyagi, R.K., Jain, R.K., Agrawal, H., Agrawal, G.P. (2014). Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: an effective approach for acne treatment. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 121, 222-229
- Jeonga, W.Y., Kim, K. (2017). Anti-*Propionibacterium acnes* and the anti-inflammatory effect of *Aloe ferox* miller components. Journal of Herbal Medicine 9: 53–59
- Jia, Z., Tang, M., Wu, J. (1999). The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. Journal of Food Chemistry 64, 555–559

- Kapoor, S., Saraf, S. (2011). **Topical Herbal Therapies an Alternative and Complementary Choice to Combat Acne**. Research Journal of Medicinal Plants 5, 650-669.
- Mahmood, N.F., Shipman, A.R. (2017). **The age-old problem of acne**. International Journal of Women's Dermatology 3, 71–76
- Mohammad, N.I.B., Jasim, U.C., Jaripa, B., Nemai, C.N. (2010). **Essential oils analysis of the rhizomes of *Alpinia conchigera* Griff. and leaves of *Alpinia malaccensis* (Burm. f.) Roscoe from Bangladesh**. African Journal of Plant Science 4(6), 197-201
- Mokhtar, N., Nordin, M. F. M., Morad, N. A. (2018). **Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content and Radical Scavenging Activity from *Zingiber zerumbet* Rhizome using Subcritical Water Extraction**. International Journal of Engineering. IJE TRANSACTIONS B: Applications 31 (8), 1421-1429
- Murakami, A., Takahashi, M., Jiwajinda, S., Koshimizu, K., Ohigashi, H. (1999). **Identification of zerumbone in *Zingiber zerumbet* Smith as a potent inhibitor of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation**. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 63, 1811–1812.
- Masud, R., Thanmin, J.T., Shamima, A., Anwar, U.I. (2017). **In-Vitro Evaluation of Antioxidant, Membrane Stabilizing and Anthelmintic Activities with Phytochemical Screening of Methanolic Extract of *Alpinia Conchigera* Griff.** International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences 4 (4), 16-23
- Nag, A., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A. (2013). **Antioxidant activities and cyto-toxicity of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith rhizome**. J. Pharmacogn. Phytochem 2, 102–108
- O'Brien, S., Lewis, J., Cunliffe, W. (1998). **The Leeds revised acne grading system**. Journal of Dermatological Treatment. 9(4), 215 – 220.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., LamuelaRaventós, R.M. (1999). **Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-ciocalteu Reagent**. Journal of Methods in Enzymology. 299, 152-178
- Toyoda M, Morohashi M. (2001). **Pathogenesis of acne**. Med Electron Microsc 34, 29–40.
- Thha, M. M. E., Abdul, A. B., Abdullah, R., Ibrahim, T. A. T., Abdelwahab, S. I., Mohan, S. (2010). **Potential chemoprevention of diethylnitrosamine- initiated and 2- acetylaminofluorene- promoted hepatocarcinogenesis by zerumbone from the rhizomes of the subtropical ginger (*Zingiber zerumbet*)**. Chemico-Biological Interactions. 186, 295–305.
- Tzeng, T.F., Lu, H.J., Liou, S.S., Chang, C.J., Liu, I.M. (2014). **Lipid-lowering effects of zerumbone, a natural cyclic sesquiterpene of *Zingiber zerumbet* Smith, in high-fat diet-induced hyperlipidemic hamsters**. Food and Chemical Toxicology 69, 132–139
- Ujang, Z.B., Subramaniam, T., Diah, M.M., Wahid, H.B., Abdullah, B.B., Rashid, A.H.B.A., Appleton, D. (2013). **Bioguided Fractionation and Purification of Natural Bioactives Obtained from *Alpinia conchigera* Water Extract with Melanin Inhibition Activity**. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology 4, 265 – 272.
- Wong, K.C., Lee, B.C., Lam, N.F., Ibrahim, P. (2005). **Essential oils of the rhizomes of *Alpinia conchigera* Griff. and *Alpinia latilabris* Ridl**. Flavour Fragr.J. 20, 431 – 433.
- Yob, N.J., Jofrry, S.M., Affandi, M. M., Teh, L. K., Salleh, M. Z., Zakaria, Z. A. (2011). ***Zingiber zerumbet* (L.) Smith: A Review of Its Ethnomedicinal, Chemical, and Pharmacological Uses**. Evid. based complement. Alternat. Med. Article ID 543216, doi:10.1155/2011/543216, 12 pages,

การเก็บรักษาเชื้อยีสต์จากน้ำหมักเปลือกสับปะรด โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

กัลติมา พิชัย* ธัญญาพร แสงศรีจันทร์ อ้อมหทัย ดีแท้

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

*email: kaltimap@hotmail.com

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ มีจุดประสงค์เพื่อรักษาสภาพและดูแลเชื้อบริสุทธิ์ให้อยู่ในสภาพที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยเมื่อนำกลับมาเพาะเลี้ยงแล้วต้องมีคุณสมบัติเหมือนเชื้อดั้งเดิม ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกยีสต์จากน้ำหมักเปลือกสับปะรด นำมาเพาะเลี้ยงแล้วศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของยีสต์ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา กำลังขยาย 400 เท่า และเก็บรักษาเชื้อยีสต์ที่แยกได้ โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ผลการศึกษาสามารถแยกเชื้อยีสต์จากน้ำหมักสับปะรดได้ 3 ไอโซเลต เมื่อนำมาเก็บรักษาโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ อัตรารอดของเชื้อ อยู่ระหว่างร้อยละ 77 ถึง 96 ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาเชื้อเพื่อใช้ในห้วงปฏิบัติการได้ และอาจได้ผลดียิ่งขึ้นหากมีการนำสารป้องกันเซลล์มาใช้ในการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

คำสำคัญ: การรักษาสภาพ ยีสต์ การทำแห้งแบบเยือกแข็ง อัตรารอด

Yeast Preservation from Fermented Pineapple Peel by Freeze-Drying

*Kaltima Phichai Thanyaporn Sangsrichan Aomhatai Deethae

Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai, Thailand

*E-mail: kaltimap@hotmail.com

Abstract

The purpose of preserving microorganism cultures in a university laboratory is to ensure they remain viable for laboratory classes, research, and to generate consistent laboratory test results over time. The objectives of this study were 1) to isolate yeast from fermented pineapple peel 2) to characterize the basic morphology of yeast isolated under a compound light microscope at 400x magnifying power 3) to preserve the cells by freeze-drying method. The results showed that three isolates of yeast were found from fermented pineapple peel. The survival rate of isolated yeasts after 4 weeks preservation at -54°C by freeze-drying were 77-96 percentage. Data presented here will help laboratorians make a more informed choice about how they preserve and maintain their microorganism cultures. In addition, cryoprotectants need to be considered to get better preservation.

Keywords: Preservation; Yeast; Freeze-Drying; Survival Rate

บทนำ

การเก็บรักษาจุลินทรีย์มีวัตถุประสงค์เพื่อรักษาจุลินทรีย์ให้มีชีวิตรอดได้นาน โดยยังมีความบริสุทธิ์และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม มีความสามารถในการขยายพันธุ์ได้หลังการเก็บรักษา วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์มีหลายวิธี แต่มีหลักการสำคัญ คือ การหยุดหรือลดกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ให้ต่ำลง โดยควบคุมปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญ เช่น การจำกัดอากาศ อุณหภูมิ สารอาหารและน้ำ หรือลดอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา เป็นต้น การคัดเลือกกรรมวิธีที่ใช้ในการเก็บรักษาจะต้องเลือกวิธีที่สามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้เป็นระยะเวลานาน โดยไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งรูปร่างและการให้ผลผลิต ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม นอกจากนี้เชื้อที่เก็บรักษาจะต้องมีชีวิตรอดอยู่รอดได้ภายหลังจากการเก็บรักษา เชื้อที่เก็บจะต้องเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ไม่มีการปนเปื้อนในระหว่างการเก็บรักษา อีกทั้งต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษา จำนวนของเชื้อและความสำคัญของเชื้อที่ต้องการเก็บรักษา รวมทั้งความสะดวกในการขนส่งด้วย

การทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้เป็นเวลานานและไม่ยุ่งยากระหว่างการเก็บรักษา สามารถเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องได้ (Miyamoto-Shinohara, Nozawa, Sukenobe, & Imaizumi, 2010) ขั้นตอนการเก็บรักษาเชื้อ คือการทำสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ให้แข็งตัวลงอย่างรวดเร็ว และกำจัดน้ำให้อยู่ในรูปของไอน้ำโดยไม่ผ่านการเป็นของเหลว น้ำจะถูกกำจัดออกโดยการทำให้เป็นไอภายใต้สุญญากาศ กรรมวิธีนี้ต้องอาศัยองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ ส่วนที่ใช้ในการแช่แข็งเซลล์ ส่วนที่ต่อกับสุญญากาศและส่วนดักจับน้ำ ตัวอย่างสารละลายของเชื้อที่ต้องการเก็บรักษาที่อยู่ภายในหลอดแก้วเล็กจะถูกนำมาทำให้แข็งตัวก่อนโดยจุ่มในสารละลายทำเยน เช่น ในส่วนผสมของคาร์บอนไดออกไซด์แข็งและแอลกอฮอล์ หรือเกลือและน้ำแข็งหลังจากแช่แข็งเซลล์แล้ว นำมากำจัดความชื้นออกโดยอยู่ในรูปของไอภายใต้สุญญากาศ เมื่อเซลล์แห้งดีแล้วปิดปากหลอดแก้วเล็กภายใต้สุญญากาศ หรือบรรจุในโตรเจนแห้งเข้าไปและปิดปากหลอด อีกวิธีหนึ่งคือ การทำเซลล์ให้แข็งโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยการหมุนเหวี่ยง (centrifugal freeze-drying) โดยนำสารละลายของเชื้อที่บรรจุในหลอดแก้วเล็กปากกว้าง และอุดจุกด้วยสำลีมาต่อกับเครื่องที่หมุนเหวี่ยงได้ ภายใต้ระบบสุญญากาศ ความเย็นจะทำให้เซลล์แข็งตัวและไออระเหยออกจากสารละลาย เมื่อสารละลายของเซลล์แข็งตัวแล้ว เครื่องหมุนเหวี่ยงจะหยุดทำงาน แต่การกำจัดน้ำจะยังคงมีอยู่จนกระทั่งความชื้นถูกกำจัดออกไปจนหมด หลังจากนั้นปิดปากหลอดแก้วเล็กภายใต้สุญญากาศ หรือเติมไนโตรเจนแห้งลงไปแล้วปิดปากหลอด ตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านขั้นตอนนี้แล้วจะนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส หรืออาจเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องที่มีอุณหภูมิคงที่ในช่วง 24 ถึง 26 องศาเซลเซียส แต่พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (-20 องศาเซลเซียส ถึง -70 องศาเซลเซียส) จะช่วยให้เชื้อที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลานานมีความคงทนและอยู่รอดได้ดี (Berner & Viernstein, 2006)

ยีสต์ คือ ราชนิดหนึ่งที่ดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม รี สามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ ยีสต์สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ บนส่วนต่างๆ ของพืช ยีสต์บางชนิดพบอยู่กับแมลง และในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่พบยีสต์บ่อยๆ คือ แหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน น้ำผึ้ง และผลไม้สุก เป็นต้น โดยยีสต์ที่รู้จักในปัจจุบันมีมากกว่า 2,500 ชนิด (อรุณ ขาญชัยเขารัตน์, 2558) ชนิดที่รู้จักอย่างแพร่หลาย คือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้ในการทำขนมปัง เบียร์ ไวน์ ฯลฯ ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภทโดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เช่น ใช้ในการผลิตขนมปัง เบียร์ ไวน์ และวิสกี นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่น อาหารสัตว์ เครื่องสำอางค์ และใช้ผลิตเอทานอล เชื้อเพลิง เป็นต้น เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง จึงนิยมนำมาใช้เป็นตัวแทนศึกษาในห้องปฏิบัติการ และการทำวิจัยเสมอๆ อย่างไรก็ตามการแยกเชื้อยีสต์เพื่อให้ได้สายพันธุ์จากธรรมชาติและเก็บรักษาเชื้อในรุ่น (batch) เดียวกันไว้ เพื่อใช้ตลอดเวลาของการศึกษาหรือการทำวิจัยจึงเป็นสิ่งจำเป็น การศึกษาในครั้งนี้จึงต้องการที่จะแยกสายพันธุ์ยีสต์จากน้ำหมักเปลือกสับปะรดและนำมาเก็บรักษาเพื่อให้เป็นเชื้อหลัก (master seed) ตลอดการศึกษา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกเชื้อยีสต์จากน้ำหมักเปลือกสับปะรด
2. เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของยีสต์ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
3. เพื่อเก็บรักษาเชื้อยีสต์ที่แยกได้ โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมน้ำหมักเปลือกสับปะรด

ล้างทำความสะอาดเปลือกสับปะรด จากนั้นนำเปลือกสับปะรดมาคั้นแล้วทำการกรองด้วยผ้าขาวบาง เมื่อได้น้ำจากเปลือกสับปะรดแล้ว นำไปหมักในภาชนะปิดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การแยกเชื้อบริสุทธิ์

นำน้ำหมักจากเปลือกสับปะรดที่ได้จากข้อ 1 มาทำการเจือจาง 10 เท่า (ten-fold serial dilution) โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water) เป็นตัวเจือจาง จนถึงความเข้มข้น 10^{-6} ต่อมาทำการทดสอบการละลายที่มีความเข้มข้นที่ 10^{-4} ถึง 10^{-6} ลงบนอาหาร YM Agar แล้วทำการเกลี่ยสารละลายของเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าด้วยแท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำความเข้มข้นละ 2 ข้ำ จากนั้นทำการเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันมาทำการซิดลงบนอาหาร YM Agar แล้วทำการบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวๆแล้ว นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยการนำเชื้อยีสต์หยดลงบนสไลด์แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายด้วยห่วงเย็บเชื้อ เพื่อดูรูปร่างและขนาดของเซลล์ยีสต์

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้ มาเลี้ยงในอาหาร YM Broth โดยทำการเชยเชื้อยีสต์ที่บริสุทธิ์มา 1 หลวงเย็บเชื้อ ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร YM Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวราบที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (starter) จากนั้นใช้เครื่องดูดจ่ายสารละลายดูดเชื้อตั้งต้นมา 5 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร YM Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตรชนิดละ 2 ขวด ทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวราบที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อแล้วนำไปทำการวัดค่าความดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทุกๆ 6 ชั่วโมง จนถึงขั้นการเจริญคงที่ (stationary phase) และทำการวัดการเจริญของเซลล์ยีสต์ โดยวิธี spread plate ที่ความเข้มข้น 10^{-4} ถึง 10^{-6} ความเข้มข้นละ 4 จาน หลังจากนั้นทำการเก็บเชื้อยีสต์เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

4. การเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-drying)

นำเชื้อยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการเก็บรักษาแบบเยือกแข็ง โดยนำมาใส่ในขวดแก้วฝาเกลียว ขวดละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด แล้วนำไปแช่แข็งในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ให้น้ำภายในขวด แก้วระเหยออกไปบางส่วน ต่อมานำเชื้อยีสต์ที่ทำการแช่แข็งในตู้เย็นไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ยี่ห้อ Christ รุ่น Alpha 1-4 LD plus) ด้วยการลดความดันให้ต่ำกว่าบรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ -54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส

5. การตรวจสอบอัตราการรอดของเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ที่ได้จากการทำแห้งแบบเยือกแข็งมาทำการตรวจสอบอัตราการรอดหลังจากทำการเก็บรักษาเชื้อยีสต์เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ นับจำนวนเซลล์ด้วยวิธีการ spread plate เช่นเดียวกับข้อ 3 นับเซลล์ ในหน่วยโคโลนีฟอร์มมิงยูนิต (cfu) แล้วนำมาคำนวณหาอัตราการรอดของเชื้อจากสูตร

$$\frac{\text{จำนวนเซลล์ยีสต์หลังการเก็บรักษา}}{\text{จำนวนเซลล์ยีสต์ก่อนการเก็บรักษา}} \times 100$$

ผลการศึกษา

การแยกเชื้อยีสต์จากน้ำหมักเปลือกสับปะรด สามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลท ที่แตกต่างกัน โดยงานวิจัยนี้ แยกเชื้อยีสต์จากน้ำหมักเปลือกสับปะรดสดและเมื่อนำเชื้อยีสต์ไปทำการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า ไอโซเลทที่ 1 โคโลนีมีลักษณะกลม สีครีม ขอบเรียบ เซลล์มีรูปร่างรีและมีขนาด 5 ไมโครเมตร ไอโซเลทที่ 2 โคโลนีมีลักษณะกลม สีครีม ขอบหยักฟันหนาม เซลล์มีรูปร่างกลมและมีขนาด 7.5 ไมโครเมตร และไอโซเลทที่ 3 โคโลนีมีลักษณะกลม สีครีม ขอบเรียบ เซลล์มีรูปร่างกลมและมีขนาด 5 ไมโครเมตร ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 1-3

ตารางที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น				
	ลักษณะโคโลนี	สีของโคโลนี	ลักษณะขอบ	รูปร่างเซลล์	ขนาดเซลล์
1	กลม	ครีม	ขอบเรียบ	รี	5.0 μm
2	กลม	ครีม	หยักฟันหนาม	กลม	7.5 μm
3	กลม	ครีม	ขอบเรียบ	กลม	5.0 μm



ภาพที่ 1 เชื้อยีสต์ไอโซเลทที่ 1



ภาพที่ 2 เชื้อยีสต์ไอโซเลทที่ 2



ภาพที่ 3 เชื้อยีสต์ไอโซเลทที่ 3

เมื่อนำเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทไปเพาะเลี้ยงในอาหาร YM Broth จนถึงขั้นการเจริญคงที่ ที่ 96 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ของยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทมีค่าแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เชื้อยีสต์	จำนวนเซลล์ยีสต์ ($\times 10^9$ cfu/ml)
ไอโซเลทที่ 1	1.54 $\pm$ 0.10
ไอโซเลทที่ 2	2.26 $\pm$ 0.22
ไอโซเลทที่ 3	2.56 $\pm$ 0.50

จากการเก็บรักษาเชื้อยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่า ยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทมีลักษณะแห้งสีน้ำตาล บางส่วนเกาะติดบริเวณข้างขวด ดังแสดงในภาพที่ 4 และเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์แล้วนำมาตรวจสอบอัตราการรอดของเชื้อได้ผลดังตารางที่ 3



ภาพที่ 4 ลักษณะของยีสต์หลังการเก็บรักษาโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ตารางที่ 3 อัตราการรอดของเชื้อยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลท

ไอโซเลท	จำนวนเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ($\times 10^9$ cfu/ml.)	จำนวนเซลล์หลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ($\times 10^9$ cfu/ml.)	อัตราการรอด (ร้อยละ)
1	1.53 $\pm$ 0.04	1.47 $\pm$ 0.03	96.08 $\pm$ 3.96
2	1.85 $\pm$ 0.06	1.43 $\pm$ 0.03	77.30 $\pm$ 1.49
3	2.19 $\pm$ 0.04	1.93 $\pm$ 0.02	88.13 $\pm$ 2.25

จากตารางที่ 2 จะพบว่าเชื้อยีสต์ไอโซเลทที่ 1 มีอัตราการรอดสูงสุดที่ร้อยละ 96.08 รองลงมาได้แก่ ไอโซเลทที่ 3 และ 2 ด้วยอัตราการรอดร้อยละ 88.13 และ 77.30 ตามลำดับ และเซลล์มีจำนวนลดลงเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบเยือกแข็งทั้ง 3 ไอโซเลท

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาในครั้งนี้แยกเชื้อยีสต์ได้ 3 ไอโซเลท โดยลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่แยกได้คล้ายกับการศึกษาของ อภิษฎา เลาฮีเปา (2556) ที่ทำการแยกเชื้อยีสต์จากสับประรดเน่า ได้ 4 ไอโซเลท โคโลนีมีรูปร่างกลม นูน ผิวหน้าเกลี้ยง มัน วาว สีขาว และครีม เมื่อดูใต้กล้องจุลทรรศน์จะมีลักษณะกลม รี ซึ่งโดยทั่วไปยีสต์กลุ่มนี้จะเป็นยีสต์ *Saccharomyces* (Nasir, Rahman, Hossain, & Choudhury, 2017) ซึ่งจะแยกได้จากน้ำผลไม้ที่มีความเป็นกรด เช่น น้ำสับประรด น้ำส้ม เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในขวดรูปชมพู่โดยใช้อาหาร YM broth ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งสังเคราะห์ (semi-defined medium) และได้เซลล์สูงสุดอยู่ที่ประมาณ 10^9 cfu/ml นับว่าเป็นไปตามที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในสถานะเช่นนี้ (Shang, Wen, Wang, & Tan, 2006) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในสถานะแบบนี้ไม่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง และไม่สามารถควบคุมสภาวะความเป็นกรด-ด่างได้ ซึ่งถือเป็นข้อด้อยของการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ (shake-flask culture) (Buchs, 2001) หากต้องการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มากกว่านี้ควรใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพและเลือกการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเฟ้ดแบทช์ (fed-batch culture) หรือการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบต่อเนื่อง (continuous culture) (Stanbury, Whitaker, & Hall, 2017)

การเก็บรักษาเซลล์โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งมีอัตราการรอดชีวิตเมื่อสัปดาห์ที่ 4 อยู่ที่ร้อยละ 77-96 ซึ่งจำนวนเซลล์ที่ลดลงเนื่องมาจากเซลล์ถูกทำให้เปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็งก่อนนำมาทำแห้ง หรือการเปลี่ยนค่าออสโมติกภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว (osmotic shock) ส่งผลให้เซลล์แตกได้ และเมื่อมีการเก็บรักษานานขึ้นปริมาณเซลล์ก็อาจจะลดลงตามลำดับ (Miyamoto-Shinohara, Nozawa, Sukenobe, & Imaizumi, 2010) อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นวิธีหนึ่งที่สะดวกและให้ผลดีในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ รวมทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อราที่สร้างสปอร์และไวรัสบางชนิด เนื่องจากวิธีนี้สามารถคงสภาพกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตหลังการเก็บรักษาได้ดี แต่ไม่เหมาะกับเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ ไวรัสบางชนิด และโปรโตซัว มีรายงานพบว่าอัตราการมีชีวิตรอดจากการเก็บรักษาโดยวิธีนี้ต่ำถึง 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Abadias, Benabarre, Teixido, Usall, & Vi, 2001) เหตุผลหลักที่เซลล์เสียสภาพการมีชีวิต อาจะมาจากการเกิดผลึกน้ำแข็ง เนื่องจากความเข้มข้นของสารภายในเซลล์สูงทำให้ค่าความดันออสโมติก (osmolality) สูง ส่งผลให้เยื่อเมมเบรนถูกทำลาย สารโมเลกุลเสียสภาพ (denaturation) และการดึงน้ำออก (dehydration) ซึ่งล้วนเป็นผลต่อคุณสมบัติของสารโมเลกุลใหญ่ที่ชอบน้ำ (hydrophilic macromolecule) ภายในเซลล์ ซึ่งในกรณีของเชื้อรา วิธีนี้เหมาะกับการเก็บรักษาเชื้อ *Penicillium* มากที่สุด และนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่เก็บรักษาโดยวิธีนี้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้เป็นเวลา 20 ถึง 40 ปี แต่ก็มีรายงานพบว่าการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีนี้อาจทำให้เกิดการกลายได้ (Ashwood-Smith & Grant, 1976) นอกจากนี้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งคือ สารป้องกันการเซลล์ (protective agent หรือ cryoprotectant) เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้มีการใส่สารป้องกันเซลล์ก่อนการเก็บรักษาจึงส่งผลทำให้เซลล์มีอัตราการรอดที่ลดลง ได้มีการศึกษากับ *Lactobacillus plantarum* พบว่าการเติมสาร cryoprotectant เช่น sorbitol หรือ monosodium glutamate ใน cell culture จะทำให้อัตราการรอดของเซลล์ดีขึ้น (Champagne, Mondou, Raymond, & Roy, 1996) เช่นเดียวกับ สมพร ลินธรา (2544) ที่ศึกษาการรอดชีวิตของยีสต์โดยการนำเซลล์ยีสต์กับสารละลายหางนม หลังผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งแล้ว เชื้อแต่ละชนิดมีอัตราการรอดที่แตกต่างกันไป โดยมีไอโซเลทที่มีอัตราการรอดหลังผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งตั้งแต่ต่ำกว่าร้อยละ 1 จนถึงร้อยละ 100 ซึ่งก็ถือได้ว่าการเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาเชื้อเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการหรือการทำวิจัยเพื่อให้ได้เชื้อที่เป็นรุ่นเดียวกันตลอดการศึกษาได้

ข้อเสนอแนะ

การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ปริมาณมากกว่านี้เพื่อให้อัตราการรอดสูงตามไปด้วย ควรทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีของการเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูง (high cell density culture) และควรทดลองใช้สารป้องกันเซลล์ชนิดต่างๆ เพื่อปกป้องเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

เอกสารอ้างอิง

- สมพร สีนธารา. (2544). การแยก การจัดจำแนก และการเก็บรักษายีสต์และราที่แยกได้จากลูกแบ่งข้าวหมากและลูกแบ่งเหล้าในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภิษฎา เลาฮีเปา. (2556). การเพิ่มมูลค่าเปลือกสับปะรดโดยกระบวนการหมักด้วยยีสต์ที่แยกได้จากธรรมชาติ. รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.
- อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. (2558). ยีสต์และเทคโนโลยียีสต์. กรุงเทพฯ : ก้าวไทยแอดเวอร์ไทซิง แอนด์ พรินติ้ง.
- Abadias, M., Benabarre, A., Teixido, N., Usall, J., & Vi, I. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.*, 65, 173-182.
- Ashwood-Smith, M. J., & Grant, E. (1976). Mutation induction in bacteria by freeze-drying. *Cryobiol.*, 13, 206-213.
- Berner D. Viernstein H. (2006) Effects of protective agents on the viability of *Lactococcus latis* subjected to freeze-thawing and freezing drying. *Sci Pharm* 74, 137-149.
- Buchs, J. (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 7(2), 91-98.
- Champagne, C. P., Mondou, F., Raymond, Y. & Roy, D. (1996). Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria, *Food Research International*, 29(5-6), 555-562.
- Miyamoto-Shinohara, Y., Nozawa, F., Sukenobe, J., & Imaizumi, T. (2010). Survival of yeasts stored after freeze-drying or liquid drying. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 56, 107-119.
- Nasir, A., Rahman, S., Hossain, M., & Choudhury, N. (2017). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* from pineapple and orange and study of metal's effectiveness on ethanol production. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 7(1), 1-16.
- Shang, F., Wen, S., Wang, X., & Tan, T. (2006). High-cell-density fermentation for ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(1), 38-41.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). *Principles of fermentation technology* (3rd ed.). Oxford: Elsevier Science.

พฤติกรรมของนกเป็ดแดง (*Dendrocygna javanica*) บริเวณอ่างเก็บน้ำ ภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ศูนย์แมริม

กัญญ์วรา วงศ์แพทย์¹ และณัฐธิดา สุภาพาน^{1,2,*}

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50300

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านความหลากหลายทางชีวภาพในท้องถิ่น คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50300

*corresponding email: n.supahan@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาพฤติกรรมของนกเป็ดแดง (*Dendrocygna javanica*) บริเวณอ่างเก็บน้ำในมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ศูนย์แมริม เริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2561 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพฤติกรรมทั่วไปของนกเป็ดแดงบริเวณพื้นที่ใกล้แหล่งน้ำที่มีระดับของการถูกรบกวนโดยมนุษย์แตกต่างกัน ซึ่งเก็บข้อมูลพฤติกรรมบริเวณอ่างเก็บน้ำ 2 แห่ง คือ อ่างเก็บน้ำที่ปิงกร (ไม่ถูกรบกวน) และอ่างเก็บน้ำสะลงโน (ถูกรบกวน) สังเกตพฤติกรรม 3 ช่วงเวลา ได้แก่ 08.00-09.55 น. 12.00-13.55 น. และ 16.00-17.55 น. และบันทึกข้อมูลพฤติกรรมทุก 5 นาที โดยวิธีการส่องกราด (scan sampling method) จากการศึกษาพบว่า นกเป็ดแดงที่อาศัยบริเวณอ่างเก็บน้ำที่ปิงกรแสดงพฤติกรรมการยืนชูคอมากที่สุด รองลงมาคือ การใช้ขน การยืนพับคอ การบิน การลอยน้ำ การนั่ง การว่ายน้ำ การอาบน้ำ และการเดิน ตามลำดับ และนกเป็ดแดงที่อาศัยบริเวณอ่างเก็บน้ำสะลงโนแสดงพฤติกรรมการยืนชูคอมากที่สุด รองลงมาคือ การยืนพับคอ การว่ายน้ำ การใช้ขน การบิน การนั่ง และการเดิน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่านกเป็ดแดงที่อาศัยบริเวณอ่างเก็บน้ำสะลงโนที่ถูกรบกวนมีร้อยละความถี่ของการแสดงพฤติกรรมต่าง ๆ น้อยกว่านกเป็ดแดงที่อาศัยบริเวณอ่างเก็บน้ำที่ปิงกร ซึ่งการศึกษานี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลในการบริหารจัดการ พื้นฟูแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหาร และกำหนดแนวทางการอนุรักษ์สัตว์ป่าภายในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ศูนย์แมริม ได้

คำสำคัญ: นกเป็ดแดง พฤติกรรม อ่างเก็บน้ำ

Behaviour of lesser whistling-ducks (*Dendrocygna javanica*) in the reservoir areas within Chiang Mai Rajabhat University, Mae Rim Campus

Kanwara Wongpaet¹, Nattida Supahan^{1,2,*}

¹Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai, Thailand

²Centre of Excellence on Biodiversity Research and Implementation for Community (BRIC), Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai, Thailand

*corresponding email: n.supahan@gmail.com

Abstract

The study of behaviour of lesser whistling-duck (*Dendrocygna javanica*) in the reservoir areas, in Chiang Mai Rajabhat University (CMRU), Mae Rim Campus, started from May to October 2018. It aimed to study the general behaviour of lesser whistling-ducks in areas near water sources that have different levels of human disturbance. Data was collected from two reservoirs, the Dipangkorn reservoir (undisturbed) and the Saluang Nai reservoir (disturbed). General behaviour of the ducks was observed in three periods, between 0800 h to 0955 h, 1200 h to 1355 h, and 1600 h to 1755 h, and was recorded every five minutes by scan sampling method. It was found that the ducks living in Dipangkorn reservoir showed the highest standing-head-up behaviour, followed by preening, standing-neck-fold, flying, floating, sitting, swimming, bathing and walking respectively. The ducks living in Saluang Nai reservoir also showed the highest standing-head-up behaviour, followed by standing-neck-fold, swimming, preening, flying, sitting and walking respectively. In addition, the ducks that lived here showed lesser frequency of general behaviour than Dipangkorn reservoir. This study can be used as management information for restoring habitat and food sources, and establishing wildlife conservation guidelines in the area of CMRU, Mae Rim Campus.

Keywords: Lesser whistling-ducks; Behaviour; Reservoir

บทนำ

นกเป็ดแดง (*Dendrocygna javanica*) จัดเป็นนกในวงศ์ Anatidae เป็นนกที่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศ ปากีสถาน บริเวณแม่น้ำทางตะวันออกลงไปถึงประเทศอินเดีย เนปาล พม่า ศรีลังกา ไทย บังคลาเทศ มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซียและทางตอนใต้ของจีน ส่วนใหญ่เป็นนกประจำถิ่น มีการอพยพในพื้นที่บ้างตามภัยแล้งหรือน้ำท่วมต่าง ๆ ส่วนในประเทศไทยนกเป็ดแดงอพยพย้ายถิ่นฐานมาอาศัยจนกลายเป็นนกประจำถิ่น ซึ่งพบได้ในทุกภาคของประเทศไทย แต่ในปัจจุบันพบว่านกเป็ดแดงในประเทศไทยถูกคุกคามโดยการล่าไปทำเป็นอาหาร เนื่องจากเนื้อของนกเป็ดแดงมีรสชาติอร่อย คล้ายกับเป็ดบ้าน จึงทำให้เป็นจุดสังเกตของพรานป่า โดยปัจจุบันสถานะของนกเป็ดแดงในประเทศไทยถูกจัดให้เป็นสัตว์คุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 เนื่องจากมีแนวโน้มเป็นสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ ห้ามมิให้ครอบครอง (สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า, 2546) อีกทั้งยังตกอยู่ในภาวะอันตรายจากการล่าและมีการทำลายแหล่งที่อยู่อาศัยทำให้ประชากรนกเป็ดแดงลดลง ซึ่งที่อยู่อาศัยของนกเป็ดแดงจะทำรังอยู่บนต้นไม้บริเวณใกล้แหล่งน้ำและอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูง ประมาณ 100 ตัวขึ้นไป หากมีการพบนกเป็ดแดงอาศัยอยู่รวมกันในบริเวณใด สามารถบ่งบอกถึงความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่ชุ่มน้ำแห่งนั้นว่ามีแหล่งอาหารที่เหมาะสมและแหล่งที่อยู่ปลอดภัย (วรพจน์ บุญความดี, 2556)

แหล่งพื้นที่ชุ่มน้ำ เช่น ห้วย หนอง บึง อ่างเก็บน้ำ เป็นต้น จะพบว่ามีนกเป็ดแดงอพยพมาในช่วงหน้าหนาว บางตัวอพยพมาทำรัง เลี้ยงลูกอ่อน จนตั้งเป็นนกประจำถิ่นโดยไม่มีการอพยพกลับ นักวิจัยจึงมีการศึกษาว่านกเป็ดแดงสามารถเป็นดัชนีบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่แหล่งชุ่มน้ำนั้นได้ โดยสังเกตจากพฤติกรรมและกิจกรรมที่นกเป็ดแดงได้แสดงออกมา เช่น พฤติกรรมการกินอาหาร ว่ายน้ำ อาบน้ำ ใช้ขน เดิน นั่ง ลอยแช่น้ำ และพฤติกรรมการสื่อสารด้วยเสียง เป็นต้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ว่าพื้นที่แห่งนั้นมีนกเป็ดแดงมาใช้ประโยชน์ ดังนั้นจึงนำมาสู่การศึกษาพฤติกรรมของนกเป็ดแดงในพื้นที่อ่างเก็บน้ำของมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ศูนย์แมริม เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเป็นค่าดัชนีบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่ชุ่มน้ำแห่งนั้น โดยมีการศึกษาเป็นตัวอย่างบอกความอุดมสมบูรณ์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์และสัตว์อื่น ๆ อีกทั้งยังเป็นประโยชน์ต่อการนำไปสู่แนวทางการจัดการด้านอนุรักษ์นกเป็ดแดงในพื้นที่ธรรมชาติควบคู่ไปกับการอนุรักษ์พื้นที่ชุ่มน้ำแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารของนกอพยพ เพื่อเป็นแนวทางที่ทำให้มนุษย์สามารถดำรงชีวิตร่วมกับธรรมชาติได้อย่างสมดุล

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาแบบแผนพฤติกรรมของนกเป็ดแดง
2. เพื่อเปรียบเทียบความถี่ของพฤติกรรมต่าง ๆ ของนกเป็ดแดงในพื้นที่อ่างเก็บน้ำที่ถูกรบกวนและไม่ถูกรบกวนของมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ศูนย์แมริม

ระเบียบวิธีวิจัย

1. พื้นที่ศึกษา

กำหนดพื้นที่ศึกษาทั้งหมด 2 อ่างเก็บน้ำ ภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ศูนย์แมริม ได้แก่ อ่างเก็บน้ำที่ปึงกร (พิกัด 19°01'35"N 98°55'55"E ที่ความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 364 เมตร) ซึ่งเป็นอ่างเก็บน้ำที่ไม่ถูกรบกวน และอ่างเก็บน้ำสะลงโน (พิกัด 19°01'22"N 98°55'05"E ที่ความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 370 เมตร) ซึ่งเป็นอ่างเก็บน้ำที่ถูกรบกวนมาก (ภาพที่ 1)

2. การรวบรวมข้อมูล

การศึกษาพฤติกรรมทั่วไปของนกเป็ดแดง แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน (นริทธิ์ สีตะสุวรรณ, 2548) คือ การเก็บข้อมูลเชิงคุณภาพ เป็นการสังเกตพฤติกรรมทั่วไปของนกเป็ดแดงในสภาพธรรมชาติ โดยสังเกตพฤติกรรมส่วนตัวและพฤติกรรมสังคมของนกเป็ดแดงว่ามีพฤติกรรมอะไรบ้าง แต่ละพฤติกรรมมีลักษณะอย่างไร และมีแบบแผนการแสดงออกอย่างไร บันทึกข้อมูลในลักษณะของการบรรยายทั่วไป และการเก็บข้อมูลเชิงปริมาณ เป็นการเก็บข้อมูลพฤติกรรมที่มีหลักเกณฑ์ทางสถิติ โดยข้อมูลดิบที่ได้จากการเก็บรวบรวมเป็นตาราง ethogram สามารถนำไปคำนวณหาความถี่หรือร้อยละของพฤติกรรมในแต่ละช่วงเวลาได้ ระยะเวลาในการเก็บรวบรวมข้อมูลตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 รวมระยะเวลา 6 เดือน โดยแต่ละอ่างเก็บน้ำเลือกทำการศึกษาดือนละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วย 3 ช่วงเวลา ได้แก่ 08.00 - 09.55 น. 12.00 - 13.55 น. และ 16.00 - 17.55 น. ในแต่ละช่วงเวลากลับบันทึกข้อมูลทุก ๆ 5 นาที วิธีการที่ใช้ในการเก็บข้อมูลคือการเก็บข้อมูลแบบส่องกราด (scan sampling method) เป็นการเก็บข้อมูลพฤติกรรมทั้งกลุ่มอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาหนึ่ง เนื่องจาก

ประชากรของนกเป็ดแดงมีจำนวนตั้งแต่ 100 ตัวขึ้นไป พฤติกรรมที่บันทึกจึงเป็นพฤติกรรมที่นกเป็ดแดงมากกว่าร้อยละ 60 แสดงออก ณ ช่วงเวลานั้น ๆ

3. พฤติกรรมที่ศึกษา

พฤติกรรมที่พบและศึกษาตัดแปลงมาจาก สุทธิดา สัทธิธรรมวิไล (2547) ที่แบ่งพฤติกรรมเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มพฤติกรรมทั่วไป ได้แก่ พฤติกรรมการเคลื่อนที่ (การเดินและการบิน) พฤติกรรมการพักผ่อน (การนั่ง การยืนพับคอ และการยืนชูคอ) และพฤติกรรมการทำให้สบายตัว (การใช้ขน การอาบน้ำ การว่ายน้ำ และการลอยน้ำ) และกลุ่มพฤติกรรมสังคม ได้แก่ พฤติกรรมการสื่อสารด้วยเสียง และพฤติกรรมการตื่นตัวระวังภัย

ผลการวิจัย

แบบแผนพฤติกรรมต่าง ๆ ที่พบของนกเป็ดแดงแสดงดังตารางที่ 1

จากการวิเคราะห์ร้อยละของควมถี่พฤติกรรมของนกเป็ดแดงในสภาพธรรมชาติบริเวณอ่างเก็บน้ำที่ปึงกร ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่ถูกรบกวนหรือถูกรบกวนน้อย พบว่า นกเป็ดแดงแสดงพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับการยืนชูคอมากที่สุด รองลงมาคือ พฤติกรรมใช้ขน พฤติกรรมการยืนพับคอ พฤติกรรมการบิน พฤติกรรมลอยน้ำ พฤติกรรมการนั่ง พฤติกรรมว่ายน้ำ พฤติกรรมอาบน้ำ พฤติกรรมการเดิน ตามลำดับ (ภาพที่ 2) สำหรับร้อยละของควมถี่พฤติกรรมของนกเป็ดแดงบริเวณอ่างเก็บน้ำสะลงใน ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกรบกวนมาก พบว่า นกเป็ดแดงแสดงพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับการยืนชูคอมากที่สุด รองลงมาคือ พฤติกรรมการยืนพับคอ พฤติกรรมว่ายน้ำ พฤติกรรมการใช้ขน พฤติกรรมการบิน พฤติกรรมการนั่ง และพฤติกรรมการเดิน (ภาพที่ 3)

จากการวิเคราะห์ร้อยละของควมถี่พฤติกรรมต่าง ๆ ในแต่ละช่วงเวลาตลอดระยะเวลาการศึกษา 6 เดือนนั้น พบว่า บริเวณอ่างเก็บน้ำที่ปึงกร นกเป็ดแดงแสดงพฤติกรรมการยืนชูคอมากที่สุดในช่วงเวลา 08.00 - 08.55 น. รองลงมาคือ พฤติกรรมการยืนพับคอในช่วงเวลา 16.00 - 16.55 น. พฤติกรรมการบินในช่วงเวลา 08.00 - 08.55 น. พฤติกรรมการเดินในช่วงเวลา 09.00 - 09.55 น. พฤติกรรมการนั่งในช่วงเวลา 09.00 - 09.55 น. พฤติกรรมการใช้ขนในช่วงเวลา 13.00 - 13.55 น. พฤติกรรมว่ายน้ำในช่วงเวลา 12.00 - 12.55 น. พฤติกรรมลอยน้ำในช่วงเวลา 09.00 - 09.55 น. และพฤติกรรมการอาบน้ำในช่วงเวลา 17.00 - 17.55 น. ตามลำดับ (ภาพที่ 4) สำหรับบริเวณอ่างเก็บน้ำสะลงใน นกเป็ดแดงแสดงพฤติกรรมการยืนชูคอมากที่สุดในช่วงเวลา 13.00 - 13.55 น. รองลงมาคือ พฤติกรรมการยืนพับคอในช่วงเวลา 13.00 - 13.55 น. พฤติกรรมการบินในช่วงเวลา 09.00 - 09.55 น. พฤติกรรมการเดินในช่วงเวลา 17.00 - 17.55 น. พฤติกรรมการนั่งในช่วงเวลา 13.00 - 13.55 น. พฤติกรรมการใช้ขนในช่วงเวลา 17.00 - 17.55 น. และพฤติกรรมการว่ายน้ำในช่วงเวลา 17.00 - 17.55 น. ตามลำดับ (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 1 แบบแผนพฤติกรรมที่พบของนกเป็ดแดง บริเวณอ่างเก็บน้ำภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ศูนย์แมริม

กลุ่มพฤติกรรม	พฤติกรรมที่ศึกษา	พฤติกรรมย่อย	แบบแผนพฤติกรรมที่แสดงออก
พฤติกรรมทั่วไป	การเคลื่อนที่	การเดิน	ขณะเดินตัวจะโยกไปตามจังหวะขาที่ก้าวไปข้างหน้า โดยจะก้าวขาซ้ายและขาขวาไปข้างหน้า สลับกันไปมาทั้งสองข้าง ยืดคอยาวแล้วมองไปข้างหน้า เป็นพฤติกรรมที่พบไม่บ่อยนัก
		การบิน	ขณะบินจะกางปีกขนานกับลำตัวแล้วยกปีกขึ้น-ลงสลับกัน และจะเหยียดเท้าไปข้างหลัง มักส่งเสียงร้องในขณะบิน เมื่อจะบินลงสู่พื้นดินหรือพื้นน้ำจะดิ่งปีกไปข้างหลังแล้วโน้มหัวมาข้างหน้า เป็นพฤติกรรมที่พบบ่อย
	การพักผ่อน	การนั่ง	มักหุดคองหรือยืดคอขึ้นแล้วค่อย ๆ พับขาหลังซึ่งจะเอาบริเวณอกและท้องวางติดพื้น เป็นพฤติกรรมที่พบไม่บ่อยนัก
		การยืนพับคอ	ยืนสองขาแล้วหุดพับคอไปวางไว้บริเวณด้านหลังหรือบางครั้งก็จะหุดคองมา พบในช่วงที่อากาศร้อน
	การทำให้สบายตัว	การยืนชูคอ	ยืนสองขายืดคอสูงแล้วยืนนิ่งไม่ขยับไปไหน เป็นระยะเวลาสั้น เป็นพฤติกรรมที่พบมากที่สุดในเกือบทุกช่วงเวลา
		การใช้ขน	ใช้ขนตามตำแหน่งต่าง ๆ ของร่างกาย โดยยืนอยู่กับที่แล้วก้มหน้าลง เอียงคอไปตามจุดที่ต้องการใช้ขน ใช้จะงอยปากจิกไปตามเส้นขนตรงบริเวณต่าง ๆ มักพบในช่วงหลังฝนตกใหม่หรือหลังจากอาบน้ำเสร็จ และพบได้ตลอดทั้งวัน
		การอาบน้ำ	เป็นการทำความสะอาดร่างกาย โดยลอยตัวอยู่ในน้ำแล้วใช้ปีกตีกระทบน้ำให้กระเด็นเข้าตัวประมาณ 2 - 3 ครั้ง แล้วหยุดพัก จากนั้นทำต่ออีก 1 - 2 ครั้งและจะใช้ขนต่อไป เป็นพฤติกรรมที่พบไม่บ่อยนัก
		การว่ายน้ำ	ลอยตัวบริเวณผิวน้ำแล้วเคลื่อนตัวเองให้ลอยไปข้างหน้า ในขณะที่ลอยไปข้างหน้าจะชูคอขึ้นสูง เป็นพฤติกรรมที่พบไม่บ่อยนัก มักพบในช่วงเวลาบ่ายและเย็น
พฤติกรรมสังคม	การสื่อสารด้วยเสียง	การลอยน้ำ	ลอยอยู่บนผิวน้ำ และลอยอยู่นิ่ง ๆ ในขณะที่ลอยน้ำอาจมีการพับคอหรือยืดคอสูงในบางครั้ง สามารถพบพฤติกรรมนี้ได้ตลอดทั้งวันแต่ไม่บ่อยนัก
			มักพบพร้อมกับการอาบน้ำและการบินขึ้น เป็นการส่งเสียงดัง วิ๊ด-วิ๊ด เพื่อเตือนสมาชิกในกลุ่มให้รู้ตัวหากมีผู้บุกรุกหรือมีสิ่งรบกวนอื่น ๆ
	การตื่นตัวระวังภัย		นกเป็ดแดงบางตัวทำหน้าที่คอยระวังภัยและผลัดกันสอดส่อง หากมีผู้บุกรุกจะบินทันทีและบินสูงมากแล้วจะบินวนจนกว่าจะเห็นว่าปลอดภัยจึงค่อย ๆ ลดระดับความสูงลง และในขณะที่บินจะส่งเสียงร้องเรียกเตือนสมาชิก

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาพฤติกรรมทั่วไปของนกเป็ดแดงของทั้งสองอ่างเก็บน้ำซึ่งประกอบไปด้วย พฤติกรรมการยืนชูดอ พฤติกรรมการยืนพับคอ พฤติกรรมการนั่ง พฤติกรรมการเดิน พฤติกรรมใช้ขน พฤติกรรมการบิน พฤติกรรมว่ายน้ำ พฤติกรรมอาบน้ำ พฤติกรรมลอยน้ำ พบว่านกเป็ดแดงแสดงพฤติกรรมการพักผ่อนมากที่สุด โดยพฤติกรรมการพักผ่อนได้แก่ การยืนชูดอ การยืนพับคอ และการนั่งโดยพฤติกรรมการนั่งจะพบในช่วงเวลา 09.00 - 09.55 น. และ 13.00 - 13.55 น. ซึ่งนกเป็ดแดงจะนั่งอยู่ตามพื้นที่ไม่มีหญ้าปกคลุม การยืนชูดอก็มักจะพบในช่วงเวลา 08.00 - 08.55 น. และ 13.00 - 13.55 น. โดยจะยืนนิ่งๆตามบริเวณที่น้ำตื้น ๆ และกระจายตัวไม่ไกลจากของอ่างโดยประมาณ 2 - 3 เมตร การยืนพับคอก็จะเป็นการหอคอยลงมา โดยจะยืนนิ่ง ๆ เพื่อเป็นการหลับพักผ่อนซึ่งนกชนิดนี้จะบินออกหากินในเวลากลางวัน และจะกลับมาพักผ่อนบริเวณอ่างเก็บน้ำหรือบึงขนาดใหญ่ในเวลากลางวัน (รัตนาศา สารีวงศ์จันทร์, 2560) รองลงมาคือ พฤติกรรมการทำให้สบายตัว ซึ่งประกอบไปด้วย พฤติกรรมการใช้ขน พฤติกรรมอาบน้ำ พฤติกรรมว่ายน้ำ และพฤติกรรมการลอยน้ำ โดยพฤติกรรมการใช้ขนมักพบมากที่สุดในช่วงเวลา 13.00 - 13.55 น. และ 17.00 - 17.55 น. เนื่องจากเป็นพฤติกรรมที่มีความต่อเนื่องมาจากการว่ายน้ำ การลอยน้ำ และการอาบน้ำ เป็นการแสดงออกถึงการทำความสะอาดร่างกาย ดูแลขนให้สะอาดเพื่อไม่ให้เกิดปัญหาหยาบ บิน ส่วนพฤติกรรมการอาบน้ำมักพบมากในช่วงเวลาตอนเย็น เพราะเป็นการทำให้ตัวเย็นสบายและทำความสะอาดร่างกายให้ขนสะอาดพร้อมที่จะใช้ในการบินออกหาอาหารในช่วงค่ำ พฤติกรรมว่ายน้ำและลอยน้ำมักจะพบในช่วงเวลา 09.00 - 09.55 น. และ 17.00 - 17.55 น. เป็นพฤติกรรมการแช่ตัวเองให้มีความเป็นสบายตัว ในขณะที่แดดเริ่มร้อนขึ้น และพฤติกรรมกลุ่มนี้สามารถพบได้ตลอดทั้งวัน (สุธิดา สัทธิธรรมวิไล, 2547; ประภากร ธาราฉาย, 2552ก) รองลงมาคือ พฤติกรรมการเคลื่อนไหว ซึ่งประกอบไปด้วยพฤติกรรมการเดินและพฤติกรรมการบิน ส่วนมากจะพบพฤติกรรมการบินมากกว่าการเดิน โดยพฤติกรรมการเดินของนกเป็ดแดงจะเดินได้ในระยะทางที่ไกลประมาณ 2 - 3 เมตร และมีช่วงการก้าวที่ช้า เนื่องจากเป็นนกที่มีลำตัวขนาดใหญ่และมีเท้าเป็นพังพืด (ประภากร ธาราฉาย, 2552ข) ส่วนพฤติกรรมการบินมักแสดงออกพร้อมกับพฤติกรรมอื่น ๆ โดยเฉพาะพฤติกรรมทางสังคม เช่น การสื่อสารด้วยเสียงและการตื่นตัวระแวดระวัง เป็นต้น โดยการสื่อสารด้วยเสียงและการตื่นตัวของนกเป็ดแดงจะสื่อสารในขณะที่พบศัตรูหรือผู้บุกรุก ซึ่งนกเป็ดแดงตัวที่คอยสังเกตการณ์ให้กับฝูงจะบินขึ้นก่อนพร้อมส่งเสียงร้องดัง วี๊ด-วี๊ด ในขณะที่บิน ให้สมาชิกในฝูงรู้ และจะบินวนบริเวณนั้นอยู่ประมาณ 5 - 10 นาทีเพื่อสังเกตความสงบของนกเป็ดแดงสามารถบินร่อนลงสู่ผิวน้ำและบินขึ้นจากผิวน้ำหรือขณะที่ยืนได้เร็วมาก เพราะสามารถกระพือปีกได้เร็วกว่านกชนิดอื่น จึงทำให้บินได้เร็วและสูง เมื่อพบศัตรูจะมีการส่งสัญญาณให้สมาชิกทราบและพากันหลบอย่างรวดเร็ว (รัตนาศา สารีวงศ์จันทร์, 2560)

ปัจจัยภายนอกที่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาพฤติกรรมของนกเป็ดแดงคือ รถขุดดิน (แบคโฮ) และรถบรรทุกดินที่เข้ามาขุดขยายอ่าง ช่อมแซมถนน การสัญจรผ่านไปมาของรถยนต์และรถจักรยานยนต์ และมนุษย์ล้วนเป็นการรบกวนแหล่งที่อยู่อาศัยของนกเป็ดแดงและนกชนิดอื่น ๆ ซึ่งแต่ละเดือนจะมีสิ่งรบกวนที่ไม่เหมือนกัน โดยในเดือนพฤษภาคม บริเวณอ่างเก็บน้ำที่ปึงกรจะพบพฤติกรรมการยืนชูดอ การยืนพับคอ การบิน การใช้ขน และยังสามารถพบพฤติกรรมของนกเป็ดแดงได้ตลอดทั้งวัน เนื่องจากอ่างเก็บน้ำแห่งนี้มีความเงียบสงบ ปราศจากการถูกรบกวน และรอบ ๆ อ่างเต็มไปด้วยต้นไม้ที่ใบเหมาะสำหรับเป็นที่หลบภัย และในเวลากลางวันใช้เป็นที่พักผ่อนหรือทำให้สบายตัวโดยมักยืนสองขาชูดออยู่บนดินบริเวณขอบอ่าง ส่วนอ่างเก็บน้ำสะลงในในช่วงแรกที่เก็บข้อมูลยังไม่มีมีการถูกรบกวนจากรถขุดดินและรถบรรทุกดิน แต่จะถูกรบกวนจากรถยนต์และรถจักรยานยนต์ที่ผ่านไปมา สภาพภายในอ่างเก็บน้ำสะลงในเป็นดินโคลนตื้น ๆ มีซากตอไม้ผุร่อนกระจายอยู่เต็มบริเวณอ่าง และมีเนินดินขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางอ่าง จึงพบพฤติกรรมการยืนชูดอ การยืนพับคอ ว่ายน้ำ และใช้ขน ซึ่งอ่างแห่งนี้เหมาะสมเป็นแหล่งอาหารของนกเป็ดแดง อีกทั้งยังเป็นที่พักพิงของนกเป็ดแดงได้ เพราะสีของนกเป็ดแดงมีความกลมกลืนกับสีของดินโคลน ถ้าหากผู้ที่ผ่านไปมาไม่ได้สังเกตจะดูไม่ออกว่ามีนกเป็ดแดงอยู่ในอ่าง ทำให้ปลอดภัยจากการถูกล่า (ประภากร ธาราฉาย, 2552ค) ในเดือนมิถุนายน บริเวณอ่างเก็บน้ำที่ปึงกรจะพบพฤติกรรมการยืนชูดอ การยืนพับคอ การบิน การเดิน การนั่ง การใช้ขน และว่ายน้ำ แม้เดือนนี้จะมีพฤติกรรมที่ปรากฏหลากหลายกว่าเดือนพฤษภาคม แต่พบว่าทุกช่วงเวลาจะไม่พบตัวของนกเป็ดแดงมากนักเมื่อเทียบกับเดือนพฤษภาคม โดยมักไม่พบตัวในช่วงเวลาเช้า แต่พอช่วงเย็นนกเป็ดแดงกลับมาใช้ประโยชน์ในพื้นที่อ่างเพิ่มขึ้น เนื่องจากเดือนนี้มีกิจกรรมของทางมหาวิทยาลัย ทำให้บริเวณอ่างเก็บน้ำที่ปึงกรซึ่งเป็นบริเวณที่มีการจัดกิจกรรมเกิดเสียงรบกวนบ่อยครั้ง ทำให้นกตกใจเพราะนกเป็ดแดงมีความไวต่อภัยคุกคามหรือสิ่งรบกวน จึงพากันแตกตื่นบินหนีหายไปและใช้เวลาหลายวันกว่านกเป็ดแดงจะกลับเข้ามาใช้ประโยชน์จากอ่างอีกครั้ง ส่วนในอ่างเก็บน้ำสะลงในพบพฤติกรรมการยืนชูดอ การยืนพับคอ การบิน การเดิน การนั่ง การใช้ขน และว่ายน้ำ ซึ่งพบเหมือนกับอ่างที่ปึงกร อีกทั้งยังพบว่าทุกช่วงเวลาจะไม่พบตัวของนกเป็ดแดงเข้ามาใช้ประโยชน์มากนัก เนื่องจากเป็นเดือนแรกที่เริ่มโครงการก่อสร้างขยาย

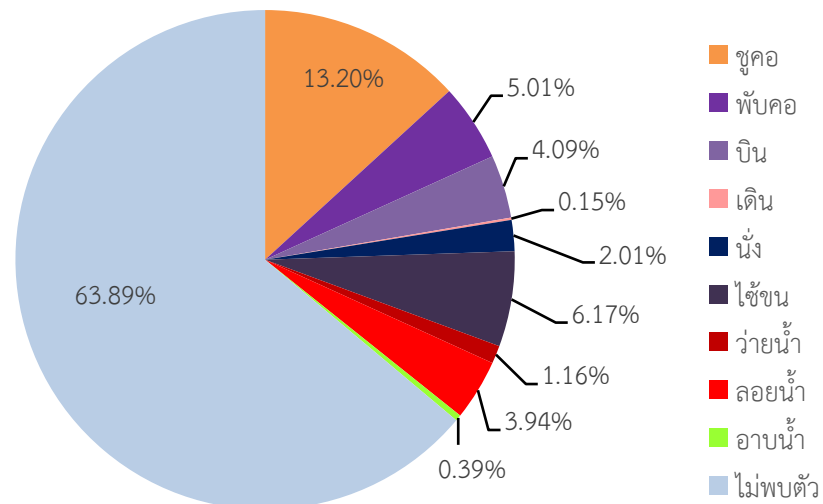
อ่างเก็บน้ำแห่งนี้ โดยช่วงกลางเดือนพบว่าซากไม้ผุที่กระจายอยู่เต็มบริเวณอ่างหายไป เหลือเพียงเนินดินขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางอ่าง และปริมาณน้ำในอ่างเพิ่มขึ้นจนไม่เห็นโคลนดินเนื่องจากฝนเริ่มตกในช่วงต้นเดือน ทำให้นกเปิดแดงหายไปในช่วงเวลา 09.00 - 09.55 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่รถชุดดินและรถบรรทุกดินเริ่มทำงาน แต่จะบินกลับมาบริเวณอ่างเก็บน้ำในช่วงเวลา 13.00 - 13.55 น. 16.00 - 16.55 น. และ 17.00 - 17.55 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่การพักการทำงานและช่วงเวลาหลังจากเลิกงาน (ประกาศ ธาราฉาย, 2552ก) ในเดือนกรกฎาคม อ่างเก็บน้ำที่ปึงกรจะพบพฤติกรรมการบินชูคอ การบิน การนั่ง และการใช้ขน โดยพฤติกรรมเหล่านี้จะพบเฉพาะช่วงเช้าของวัน ส่วนอ่างเก็บน้ำสะลงในพบพฤติกรรมการบินชูคอ การบิน การนั่ง และว่ายน้ำ แต่จะพบเฉพาะในช่วงเย็นเนื่องจากการชดชยายอ่างเก็บน้ำยังคงดำเนินการอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลากลางวัน นอกจากนี้เมื่อเวลาผ่านไปพบว่านกเปิดแดงไม่มาใช้ประโยชน์จากอ่างเก็บน้ำสะลงในอีก อาจเป็นเพราะนกได้จดจำเสียงของสิ่งเร้าที่เป็นตัวรบกวน ทำลายที่อยู่อาศัยของมัน และเมื่อมาใช้ประโยชน์ที่อ่างแล้วเจอกับสิ่งรบกวนทุกวัน จึงทำให้มันกลัวและบินหนีทุกครั้งจนไม่กลับมาที่อ่างเก็บน้ำสะลงในอีก (ประกาศ ธาราฉาย, 2552ก)

ต่อมาในเดือนสิงหาคม อ่างที่ปึงกรพบพฤติกรรมการบินชูคอ การบิน การนั่ง และการบิน โดยพฤติกรรมเหล่านี้จะพบในช่วงเช้า และนกเปิดแดงจะบินหายเข้าป่าไปและไม่กลับมาอีกทั้งวัน เพราะเดือนนี้เป็นเดือนที่มีฝนตกหนักและตกต่อเนื่องตลอดทั้งวัน ทำให้ปริมาณน้ำในอ่างที่ปึงกรเพิ่มขึ้นสูงมาก บริเวณขอบอ่างที่นกเปิดแดงมักบิน นั่ง เดิน ถูกน้ำท่วมจึงทำให้นกเปิดแดงไม่ค่อยมาใช้ประโยชน์จากอ่างแห่งนี้ และในเดือนนี้จะเห็นว่านกเปิดแดงมักบินไปมาเป็นคู่ ๆ ซึ่งฤดูผสมพันธุ์ของนกเปิดแดงอยู่ในช่วงฤดูฝน มักอยู่กันเป็นคู่ ทำรังตามกอกก ต้นอ้อหรือต้นหญ้าใกล้แหล่งน้ำ (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2559) จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้นกเปิดแดงไม่ค่อยบินมาที่อ่างแห่งนี้ ส่วนอ่างเก็บน้ำสะลงในในตลอดทั้งเดือนไม่พบตัวของนกเปิดแดง พบแต่พฤติกรรมการบินในช่วงเวลา 09.00 - 09.55 น. พฤติกรรมนี้เป็นเพียงการบินวนรอบอ่างเพื่อสังเกตความสงบของอ่าง ซึ่งในเดือนกันยายนนี้การชดชยายอ่างยังคงดำเนินการอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นการรบกวนการดำรงชีวิตของนกเปิดแดงจึงทำให้นกชนิดนี้ไม่มาใช้ประโยชน์จากอ่างเก็บน้ำแห่งนี้อีก ในเดือนกันยายน อ่างเก็บน้ำที่ปึงกรพบพฤติกรรมการบินชูคอ การบิน การนั่ง การเดิน การบิน การนั่ง การใช้ขน ลอยน้ำ และอาบน้ำ โดยพบการแสดงพฤติกรรมของนกเปิดแดงในทุกช่วงเวลา เนื่องจากอ่างเก็บน้ำที่ปึงกรกลับเข้าสู่ภาวะปกติที่มีแต่ความเงียบสงบปราศจากสิ่งรบกวน จึงทำให้นกเปิดแดงกลับมาใช้เป็นที่พักผ่อน เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยอีกครั้ง (ศรีณย์ เกียรติมาลีสถิต, 2559) ในเดือนตุลาคม อ่างเก็บน้ำที่ปึงกรพบพฤติกรรมการบินชูคอ การบิน การนั่ง การเดิน การบิน การใช้ขน ว่ายน้ำ ลอยน้ำ และอาบน้ำ โดยส่วนใหญ่พบพฤติกรรมการลอยน้ำมากที่สุด เนื่องจากอ่างเก็บน้ำกลับมาสู่ความเงียบสงบ และนกชนิดนี้มักอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำที่ห่างไกลต่อสิ่งรบกวนจึงทำให้แสดงพฤติกรรมการลอยน้ำอยู่เต็มอ่างเก็บน้ำอย่างไม่กลัวเป็นจุดสนใจ อีกทั้งการลอยน้ำและอาบน้ำยังทำให้สบายตัวช่วยในการกำจัดปรสิตให้ออกจากร่างกาย ทำให้ร่างกายสะอาด ส่วนอ่างเก็บน้ำสะลงในก็ยังคงไม่พบตัวของนกเปิดแดงตลอดทั้งเดือน แม้การชดชยายอ่างเก็บน้ำได้สิ้นสุดเมื่อกลางเดือน แต่ยังคงมีการซ่อมแซมถนนบริเวณข้างอ่างเก็บน้ำที่ชำรุดเสียหายหนักอันเนื่องมาจากการบรรทุกดินผ่านไปมา (วรพจน์ บุญความดี, 2556)

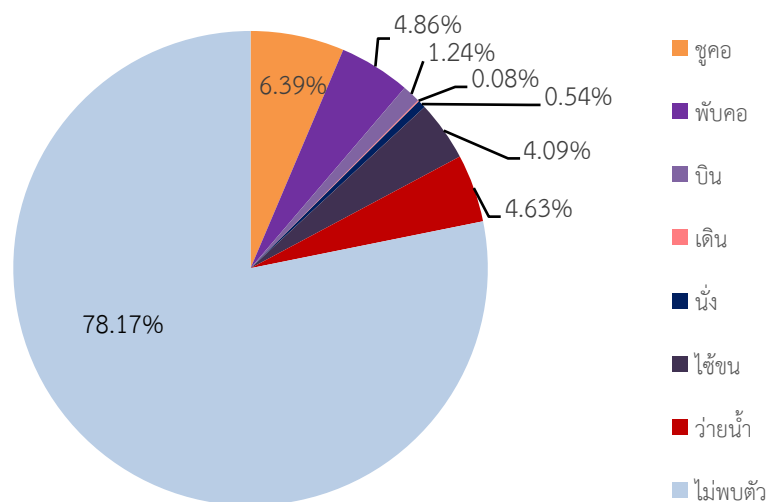
จากพฤติกรรมของนกเปิดแดงในทุกเดือนที่ผ่านมา อ่างเก็บน้ำที่ปึงกรจะแสดงพฤติกรรมการบินชูคอ การบิน การนั่ง การเดิน การบิน การนั่ง การใช้ขน ว่ายน้ำ ลอยน้ำ และอาบน้ำ ส่วนอ่างเก็บน้ำสะลงในจะแสดงพฤติกรรมการบินชูคอ การบิน การนั่ง การเดิน การบิน การนั่ง การใช้ขน และว่ายน้ำ จึงเห็นว่าอ่างเก็บน้ำที่ปึงกรมีการแสดงพฤติกรรมที่แตกต่างจากอ่างเก็บน้ำสะลงใน 2 พฤติกรรม คือลอยน้ำและอาบน้ำ ซึ่งไม่พบที่อ่างเก็บน้ำสะลงใน เนื่องจากอ่างเก็บน้ำที่ปึงกรเป็นอ่างที่ไม่ถูกรบกวนบ่อยและยังสามารถปรับเข้าสู่ภาวะปกติได้เร็วกว่าอ่างเก็บน้ำสะลงใน โดยอ่างเก็บน้ำสะลงในเป็นอ่างที่ถูกรบกวนหนักและรบกวนตลอดเวลาจึงทำให้นกเปิดแดงกลับเข้าสู่ภาวะปกติได้ยากและมีการแสดงพฤติกรรมที่แตกต่างออกไป



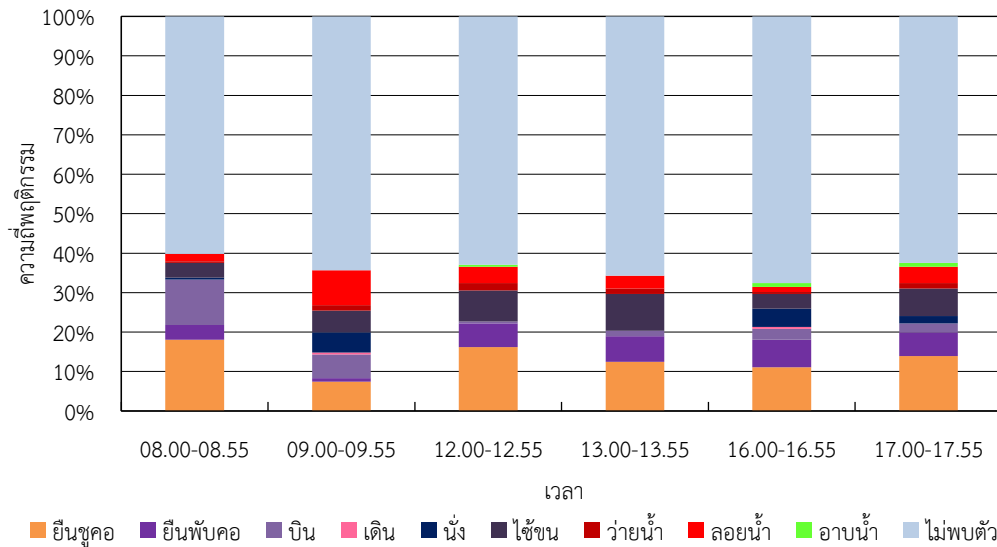
ภาพที่ 1 พื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ศูนย์แมริม และแหล่งน้ำสำคัญ 3 แห่ง ได้แก่
 1.อ่างเก็บน้ำที่ปิงกร 2.อ่างเก็บน้ำสะลงโน และ 3.อ่างเก็บน้ำตึงเปียง
 ที่มา : Google Maps (2561)



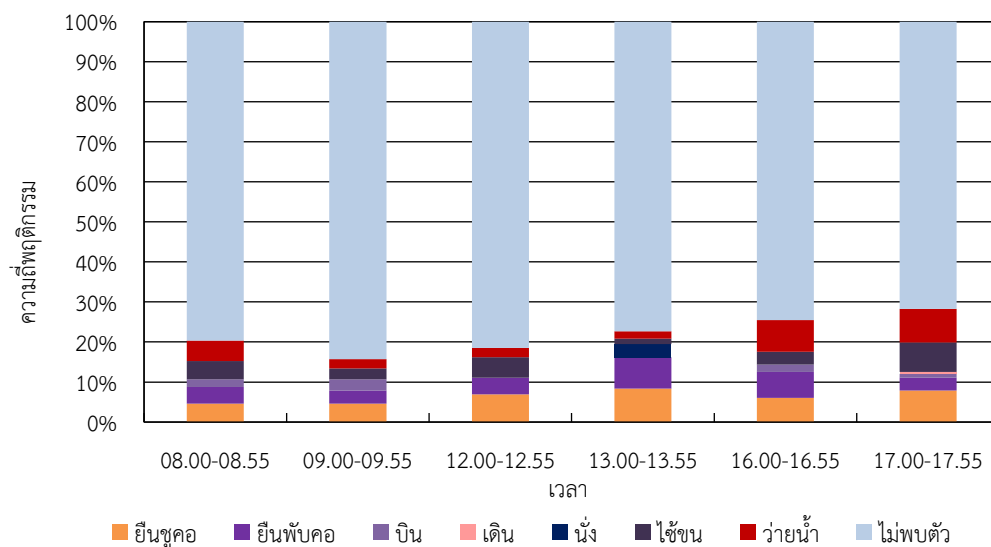
ภาพที่ 2 ร้อยละของความถี่พฤติกรรมทั้งหมดของนกเป็ดแดงที่พบบริเวณอ่างเก็บน้ำที่ปิงกร



ภาพที่ 3 ร้อยละของความถี่พฤติกรรมทั้งหมดของนกเป็ดแดงที่พบบริเวณอ่างเก็บน้ำสะลงใน



ภาพที่ 4 ร้อยละของความถี่พฤติกรรมของนกเป็ดแดงแต่ละช่วงเวลาในอ่างเก็บน้ำที่ปึงกร



ภาพที่ 5 ร้อยละของความถี่พฤติกรรมของนกเป็ดแดงแต่ละช่วงเวลาในอ่างเก็บน้ำสะลงใน

ข้อเสนอแนะ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ศูนย์แม่ริม ควรจัดพื้นที่บริเวณอ่างเก็บน้ำเป็นพื้นที่อนุรักษ์สัตว์ป่าและธรรมชาติ

เอกสารอ้างอิง

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช. (2559). *นกเป็ดแดง*. สืบค้น 27 พฤศจิกายน 2561, จาก <http://www.dnp.go.th.pdf>

- นริทธิ์ สีสวรรณ. (2548). *พฤติกรรมวิทยา*. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ประภากร ธาราฉาย. (2552ก). *เอกสารประกอบการเรียนการจัดการถิ่นอาศัย*. คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้, จาก <http://www.as.mju.ac.th>
- ประภากร ธาราฉาย. (2552ข). *เอกสารประกอบการเรียนอนุกรมวิธานของนกที่พบในประเทศไทย*. คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้, จาก <http://www.as.mju.ac.th>
- ประภากร ธาราฉาย. (2552ค). *เอกสารประกอบการเรียนกายวิภาคและการปรับตัวนก*. คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้, จาก <http://www.as.mju.ac.th>
- รัตนา สารวิงศ์จันทร์. (2560). *ลักษณะทั่วไปของเป็ดแดง*. สำนักบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 16 กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. สืบค้น 18 พฤศจิกายน 2561, จาก <http://www.dnp.go.th/fca16/file/8ox3fghmns2m4sp.pdf>
- วรพจน์ บุญความดี. (2556). *นกเป็ดแดงอพยพในเชียงใหม่*. ศูนย์ข่าวเชียงใหม่. สืบค้น 11 มีนาคม 2562, จาก <http://www.mrgonline.com>
- ศรัณย์ เกียรติมาลีสถิตย์. (2559). *ฝูงนกเป็ดแดงโผล่บึงสี่ฐาน*. สืบค้น 11 มีนาคม 2562, จาก <http://www.kku.ac.th>
- สุธิดา สัทธรรมวิไล. (2547). *การศึกษาพฤติกรรมของนกหัวว่า (Argusianus argus) ในสภาพกรง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า. (2546). *บัญชีสัตว์ป่าคุ้มครองชนิดเฉพาะพันธุ์ได้*. สืบค้น 11 มีนาคม 2562, จาก <http://www.dnp.go.th>
- Google Maps. (2561). *มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ศูนย์แม่ริม*. Google Maps (ออนไลน์). สืบค้น 14 ธันวาคม 2561, จาก <https://goo.gl/maps/9muTrfEdRCVSAhDq5>

ผลของสารสกัดหยาบจากกล้วยไม้ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด

วิมลรัตน์ พจนไตรทิพย์ วาสนา ประภาเลิศ และอ้อมหทัย ดีแท้

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

Email; pptawan@hotmail.com, p.sanaa@hotmail.com, aomhatai121@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้สนับสนุนโครงการเพื่อสนองพระราชดำริของสมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้า กรมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ตามโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) โดยคัดเลือกกล้วยไม้ในป่าชุมชนบ้านหัวทุ่ง ต.เชียงดาว อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ จำนวน 3 ชนิด นำส่วนดอกมาสกัดและศึกษาผลของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด เมื่อใช้ตัวทำละลายเมทานอลสกัดดอกกล้วยไม้ตัวอย่าง 3 ชนิด ได้แก่ เอื้องคำ เอื้องกุหลาบกระเปาเปิดและกะเรกะร่อน พบว่าสารสกัดตัวอย่างที่ให้ร้อยละผลผลิต (% yield) มากที่สุดคือ เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด ร้อยละ 31.45 รองลงมาได้แก่ เอื้องคำ และกะเรกะร่อน มีค่าร้อยละผลผลิต (% yield) เท่ากับ ร้อยละ 23.89 และ 17.87 ตามลำดับ การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* ด้วยวิธี Agar well diffusion method พบว่า ในช่วงความเข้มข้น 31.25-500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากดอกเอื้องคำสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *B. cereus* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* และ *E. aerogenes* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์แกรมลบได้ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากดอกเอื้องกุหลาบกระเปาเปิดและดอกกะเรกะร่อนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ทดสอบ 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *B. cereus* ได้ อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากดอกกล้วยไม้ทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ทดสอบได้เพียง 1 ชนิด คือ *E. coli* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. aerogenes* ได้ ข้อมูลจากการวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ทางด้านการแพทย์และการอนุรักษ์พันธุ์พืชอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ

กล้วยไม้ เอื้องคำ เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด กะเรกะร่อน ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

Effect of crude extracts from local orchids on antimicrobial activity

Wimonrat Phottraithip¹, Wasana Prapalert¹ and Aomhatai Deethae¹

Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai, Thailand

E-mail; pptawan@hotmail.com, p.sanaa@hotmail.com, aomhatai121@gmail.com

Abstract

This research work is supported by the Plant Genetic Conservation Project under the Royal initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn. Three local orchid species, *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. , *Aerides falcata* Lindl. & Paxton and *Cymbidium aloifolium*, were selected from Ban Hua Thung Community Forest, Chiang Dao Wildlife Sanctuary, Chang Dao District, Chiang Mai Province. The methanol extract from the flower of each orchid species was tested for its antimicrobial activity. *Aerides falcata* Lindl. & Paxton had the highest yield crude extract (31.45%), followed by *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (23.89%) and *Cymbidium aloifolium* (17.87%). Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes* was tested using Agar well diffusion method. Within a concentration range of 31.25-500 mg/mL, the extract of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. inhibited the growth of the gram positive bacteria *S. aureus* and *B. cereus*, but did not inhibit the growth of the gram negative bacteria *E. coli* and *E. aerogenes*. In the same concentration range, the extracts of *Aerides falcata* Lindl. & Paxton and *Cymbidium aloifolium* inhibited the growth of gram positive *S. aureus* and *B. cereus* as well as gram negative *E. coli*. None of the extracts inhibited the growth of *E. aerogenes*. The results obtained from this study provide valuable information for future research involving medicinal application and conservation of local orchid species

Keywords: Orchid, *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. , *Aerides falcata* Lindl. & Paxton, *Cymbidium aloifolium*, Antimicrobial activity

บทนำ

ชุมชนบ้านหัวทุ่ง ต.เชียงดาว อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ ตั้งอยู่ที่ราบชายขอบของผืนป่าขนาดใหญ่ ทับซ้อนอยู่ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว ด้วยภูมิประเทศที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง 500 - 2,225 เมตร ส่งผลให้มีความหลากหลายของชนิดป่าและพันธุ์พืชหลากหลายชนิด ได้แก่ พืชสมุนไพร กล้วยไม้และมักพบพืชถิ่นเดียวและหายาก ซึ่งหากยังไม่มีกรอนุรักษ์ และขาดการจัดการวางแผนที่ดีประกอบกับสภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไป อาจทำให้พันธุ์พืชบางชนิดสูญหาย หรือลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะกล้วยไม้ซึ่งการขยายพันธุ์ตามธรรมชาตินั้นทำได้ยาก และใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตนาน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีโครงการสำรวจรวบรวมกล้วยไม้หายากหรือเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในพื้นที่ เพื่อนำมาทำการขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ดังกล่าวให้มีปริมาณเพียงพอกับความต้องการ เป็นการลดภาวะการคุกคามถิ่นกำเนิด และสนับสนุนให้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่าโดยการทดสอบหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกล้วยไม้ป่าบางชนิด เพื่อเป็นข้อมูลในการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และการอนุรักษ์อย่างยั่งยืนต่อไป

นับตั้งแต่อดีตที่ผ่านมาในการบำบัดโรคของแพทย์แผนโบราณ มีการนำกล้วยไม้หลากหลายสายพันธุ์มาใช้ประโยชน์เพื่อบรรเทาอาการของโรค เนื่องจากส่วนต่างๆ ของต้นกล้วยไม้เช่น ราก ฝัก ดอก ใบ และลำลูกกล้วย (pseudobulb) มีสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติ (natural substance) ที่สำคัญมากมาย เช่น อัลคาลอยด์ (alkaloid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ไกลโคไซด์ (glycosides) แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นต้น (Rahman and Husen, 2003; Yang et al., 2006) ซึ่งมีการศึกษาวิจัยสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของต้นกล้วยไม้ที่มีฤทธิ์ทางธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในทางการแพทย์เป็นอย่างมาก เช่น รากของเอื้องช้าง-สารภีน้อย หรือเอื้องตีนตุ๊กแก (*Acampe papillosa* (Lindl.) Lindl.) สามารถนำมาใช้เพื่อรักษาอาการของโรคข้ออักเสบ-รูมาตอยด์ โรคซิฟิลิส และโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ หรือใช้ส่วนของผล (ground fruit) ของเอื้องกุหลาบกระเปาะเปิด (*Aerides odorata* Lour.) ในการรักษาแผลติดเชื้อที่ผิวหนังได้ (wounds) (Dourness J, 1995; Pant, 2013) นอกจากนี้ยังมีการวิจัยที่พบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของต้นกล้วยไม้หลากหลายสายพันธุ์ มีฤทธิ์ในด้านต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างสูง เช่น มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory activities) ฤทธิ์ต้านการติดเชื้อไวรัส (anti-viral activities) ฤทธิ์การชะลอวัย (anti-aging) ฤทธิ์ต้านอาการชักของโรคลมชัก (anti-convulsive) เป็นต้น (Avasthi et al., 2013; Singh and Duggal, 2009; Pant, 2013).

ในงานวิจัยนี้จึงได้สนใจศึกษาสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ 3 ชนิดที่สำคัญทางเศรษฐกิจ และเป็นสายพันธุ์ที่ปลูกในท้องถิ่นชุมชนบ้านหัวทุ่ง ต.เชียงดาว อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ คือ เอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.) เอื้องกุหลาบกระเปาะเปิด (*Aerides falcata* Lindl. & Paxton) และกะเหรี่ยงร้อน (*Cymbidium aloifolium*) โดยทั่วไปกล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์ Orchidaceae เป็นไม้ตัดดอกยอดนิยม เนื่องจากมีลักษณะดอกและสีอันลวดลายสวยงาม และเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย เพราะเป็นไม้ส่งออกขายต่างประเทศทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท เอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.) เป็นกล้วยไม้สกุลเด่นโดโรบิอุม นิยมเรียกว่ากล้วยไม้สกุลหวาย ซึ่งเป็นสกุลที่มีมากที่สุดในประเทศไทย พบว่ามีมากกว่า 150 ชนิด ทุกชนิดเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย ลักษณะต้นมีทั้งแบบที่เป็นลำกลมยาวคล้ายหวายย่อส่วนตลอดจนพวกที่ลำต้นพอมยาวคล้ายเส้นลวด ลักษณะการเจริญเติบโตส่วนใหญ่เป็นแบบเจริญทางด้านข้าง ใบมีทั้งพวกใบยาวใบหนา ใบเล็กเรียวกว้างกลม และพวกที่ทิ้งใบก่อนฤดูดอก หรือพวกที่มีใบมีอายุยาวนานหลายปี (อบฉันท ไทยทอง, 2548)

เอื้องกุหลาบกระเปาะเปิด (*Aerides falcata* Lindl. & Paxton) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยสกุลอะเริดีส หรือแอริดีส (*Aerides*) เป็นที่รู้จักกันทั่วไปในชื่อไทยที่เรียกว่า เอื้องกุหลาบ พวงกุหลาบ เอื้องกุหลาบพวง เอื้องคำสบนก เอื้องกุหลาบป่า อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีเอกสารอ้างอิงด้านประโยชน์และสรรพคุณทางการแพทย์มากนัก ส่วนกะเหรี่ยงร้อน (*Cymbidium aloifolium*) นักพฤกษศาสตร์ชาวสวีเดน ได้ตั้งชื่อพฤกษศาสตร์เป็นครั้งแรกว่า “*Epideredrum aloifoliar*” หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1799 Peter Olof Swartz ได้ศึกษาทบทวนและตั้งเป็นสกุลใหม่ โดยใช้ชื่อพฤกษศาสตร์ว่า “*Cymbidium aloifolium*” สำหรับชื่อระบุชนิดมาจากภาษาละติน 2 คำ คือ คำว่า aloi แปลว่า มาก และ folia แปลว่า ใบ หมายถึง มีใบจำนวนมาก (สลิล

สิทธิธรรม, 2549) นิยมปลูกเลี้ยงตามบ้านรวมทั้งในสวนพฤกษศาสตร์ อีกทั้งยังนำมาขยายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการเพื่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ และคืนสู่ป่าตามโครงการพระราชดำริฯ

สำหรับงานวิจัยส่วนนี้เป็นการคัดเลือกกล้วยไม้ที่สำคัญในป่าเชียงดาว 3 ชนิด เพื่อนำมาสกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธีการแช่หมัก (maceration) และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดด้วยวิธี Agar well diffusion และนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ 3 สายพันธุ์ ในป่าชุมชนบ้านหัวทุ่ง ต.เชียงดาว อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่

ระเบียบวิธีวิจัย

พืชที่ใช้ในการศึกษา คือ กล้วยไม้ตัวอย่างเก็บจากป่าชุมชนบ้านหัวทุ่ง ต.เชียงดาว อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ ได้แก่ เอื้องคำ กุหลาบกระเปาะเปิดและกะเหรี่ยงร้อน

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

การเตรียมสารสกัดจากดอกกล้วยไม้

นำส่วนดอกของตัวอย่างกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด มาผึ่งลมในที่ร่มนาน 5-7 วัน จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น และนำส่วนที่บดละเอียดมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

นำตัวอย่างแต่ละชนิดมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล 3 ครั้ง ครั้งละ 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง โดยวิธีการแช่หมัก (maceration) นำสารละลายของส่วนสกัดทั้งหมดรวมกันแล้วกรองผ่านสำลี และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) จะได้สารสกัดจากดอกกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด คำนวณหาร้อยละผลผลิตของสารสกัดต่อน้ำหนักแห้งของดอกกล้วยไม้ (% yield) จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อไป

การเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดและเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

เตรียมสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 10% DMSO เป็นตัวทำละลาย จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดหยาบลดลงทีละ 2 เท่า (two fold serial dilution) จนได้ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น คือ 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* โดยการ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ตุ้มเพาะเชื้อแบบเขี่ยควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 18-22 ชั่วโมง นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ได้ค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.80-1.00 (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/ml)

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar well diffusion

นำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ได้ค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.80-1.00 มาทำการ swab ลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar โดยใช้ไม้พ่นสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รอให้เชื้อแห้งติดผิวหน้าอาหารแล้วใช้ cork borer ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะอาหาร

Mueller-Hinton agar จำนวน 7 หลุม (วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมได้ประมาณ 0.6 เซนติเมตร) ใช้ไมโครปิเปตหยดสารสกัดที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้นลงในหลุมอาหาร ปริมาณหลุมละ 30 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายยาเตตราไซคลีน (Tetracycline) ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) และใช้ 10% DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ และบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของบริเวณที่มีการยับยั้ง (inhibition zone) และนำข้อมูลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (inhibition zone) มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ One-way ANOVA โดยทดสอบความแตกต่างพหุคูณด้วยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

ผลการเตรียมสารสกัดจากดอกกล้วยไม้

จากการเตรียมสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้ 3 ชนิด ได้แก่ เอื้องคำ กุหลาบกระเปาเปิดและกะเหรี่ยง และคำนวณหาร้อยละของผลผลิตของสารสกัดต่อน้ำหนักแห้งของดอกกล้วยไม้ (%yield) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 ตารางที่ 1 น้ำหนักสารสกัด ร้อยละผลผลิต (%yield) และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้

ชนิดของดอกกล้วยไม้	น้ำหนัก (กรัม)		ร้อยละผลผลิต (%yield)	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด
	ตัวอย่างแห้ง	สารสกัด		
เอื้องคำ	38.2316	9.1324	23.89	ของเหลวข้นหนืดสีส้มเข้ม
กุหลาบกระเปาเปิด	152.1992	47.8600	31.45	ของแข็งสีเหลืองอมน้ำตาล
กะเหรี่ยง	37.7482	6.7451	17.87	ของเหลวหนืดสีเหลืองส้ม

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากดอกกล้วยไม้เอื้องคำ กุหลาบกระเปาเปิดและกะเหรี่ยงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* และ *E. aerogenes* ด้วยวิธี Agar well diffusion สามารถอ่านผลการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear zone) เฉลี่ย มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร ได้ตามตารางที่ 2-4 ดังนี้

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดจากดอกเอื้องคำต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ย (มิลลิเมตร)			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>
Tetracycline (1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)	30.00 ^a ±0.71	28.60 ^a ±0.82	24.50 ^a ±0.93	24.50 ^a ±1.12
10% DMSO	6.00 ^c ±0.00	6.00 ^d ±0.00	6.00 ^b ±0.00	6.00 ^b ±0.00
500	23.30 ^b ±1.67	11.40 ^b ±2.07	6.00 ^b ±0.00	6.00 ^b ±0.00
250	22.60 ^b ±2.04	8.00 ^c ±0.70	6.00 ^b ±0.00	6.00 ^b ±0.00
125	20.20 ^c ±1.09	6.60 ^d ±0.54	6.00 ^b ±0.00	6.00 ^b ±0.00
62.50	18.00 ^d ±1.27	6.20 ^d ±0.44	6.00 ^b ±0.00	6.00 ^b ±0.00
31.25	16.40 ^d ±1.14	6.80 ^d ±0.44	6.00 ^b ±0.00	6.00 ^b ±0.00

หมายเหตุ: - ขนาดของหลุมเท่ากับ 6.00 มิลลิเมตร

- ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์ หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดหยาบจากกุหลาบกระเปาเปิดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ความเข้มข้นของ สารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ย (มิลลิเมตร)			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>
Tetracycline				
(1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	36.27 ^a ±0.83	24.20 ^a ±1.97	25.70 ^a ±1.40	23.67 ^a ±0.47
10% DMSO	6.00 ^f ±0.00	6.00 ^f ±0.00	6.00 ^c ±0.00	6.00 ^b ±0.00
500	15.17 ^b ±2.18	10.80 ^b ±1.97	6.43 ^b ±0.97	6.00 ^b ±0.00
250	12.03 ^c ±2.14	9.30 ^c ±0.45	6.00 ^c ±0.00	6.00 ^b ±0.00
125	10.70 ^{cd} ±1.20	8.37 ^{cd} ±0.50	6.00 ^c ±0.00	6.00 ^b ±0.00
62.50	9.10 ^d ±0.65	7.40 ^{cd} ±0.55	6.00 ^c ±0.00	6.00 ^b ±0.00
31.25	7.10 ^e ±0.22	6.20 ^e ±0.45	6.00 ^c ±0.00	6.00 ^b ±0.00

หมายเหตุ: - ขนาดหลุมเท่ากับ 6.00 มิลลิเมตร

- ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์ หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดหยาบจากกะเหรี่ยงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ความเข้มข้นของ สารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ย (มิลลิเมตร)			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>
Tetracycline				
(1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	26.00 ^a ±0.00	26.00 ^a ±0.70	25.00 ^a ±0.00	24.60 ^a ±0.55
10% DMSO	6.00 ^f ±0.00	6.00 ^f ±0.00	6.00 ^c ±0.00	6.00 ^b ±0.00
500	16.20 ^{bc} ±0.84	16.60 ^b ±1.14	12.60 ^b ±0.58	6.00 ^b ±0.00
250	14.60 ^{de} ±1.67	14.20 ^c ±1.30	6.00 ^c ±0.00	6.00 ^b ±0.00
125	17.40 ^b ±0.55	11.80 ^d ±1.48	6.00 ^c ±0.00	6.00 ^b ±0.00
62.5	15.40 ^{cd} ±1.67	9.60 ^e ±1.82	6.00 ^c ±0.00	6.00 ^b ±0.00
31.25	13.40 ^e ±1.52	7.80 ^e ±1.30	6.00 ^c ±0.00	6.00 ^b ±0.00

หมายเหตุ: - ขนาดหลุมเท่ากับ 6.00 มิลลิเมตร

- ตัวอักษรภาษาอังกฤษ ที่แตกต่างกันในสดมภ์ หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ตัวทำลายเมทานอลสกัดดอกกล้วยไม้ตัวอย่าง 3 ชนิด ได้แก่ เอื้องคำ เอื้องกุหลาบกระเปาเปิดและกะเหรี่ยงร้อน พบว่าสารสกัดตัวอย่างที่ให้ร้อยละผลผลิต (% yield) มากที่สุดคือ เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด ร้อยละ 31.45 รองลงมาได้แก่ เอื้องคำ และกะเหรี่ยงร้อน มีค่าร้อยละผลผลิต (% yield) เท่ากับ ร้อยละ 23.89 และ 17.87 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และผลประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด พบว่าสารสกัดจากดอกเอื้องคำสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *B. cereus* ได้ ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ ส่วนความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้คือ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) ความเข้มข้นดังกล่าวให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างจากตัวควบคุมเชิงลบ (10% DMSO) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sandrasagaran et al. (2014) ที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของพืชชนิด *Dendrobium crumenatum* (หวายตะมอยหรือเอื้องมะลิ) ซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกับเอื้องคำ ในการนำมายับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 8 ชนิด ด้วยวิธี Disk diffusion พบว่า สารสกัดเมทานอลของ *D. crumenatum* ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้มากที่สุด

ผลจากงานวิจัยนี้ปรากฏว่า สารสกัดเมทานอลจากดอกเอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *E. aerogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเมทานอลจากดอกกล้วยไม้ 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นของเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นองค์ประกอบส่วนนอกสุด ส่วนแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นของไขมัน 2 ชั้น คือ Lipopolysaccharide (outer membrane) และ lipid bilayer (cytoplasmic membrane) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติที่พบในสารสกัดจากดอกเอื้องคำไม่สามารถทำลายชั้นไขมันส่วนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ จึงไม่ให้เกิดผลงาในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 2)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากกุหลาบกระเปาเปิดและกะเหรี่ยงร้อนต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แสดงในตารางที่ 3 และ 4 พบว่า สารสกัดทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ทดสอบ 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *B. cereus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยให้ผลเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (inhibition zone) ที่แสดงถึงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 250, 125, 62.50 และ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงค่ายับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียลดลงตามระดับความเจือจาง แต่มีประสิทธิภาพไม่เทียบเท่ากับ positive control

อย่างไรก็ตามสารสกัดเมทานอลจากกุหลาบกระเปาเปิดและกะเหรี่ยงร้อน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ทดสอบได้เพียง 1 ชนิด คือ *E. coli* ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น และสกัดหยาบไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. aerogenes* ได้ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของผนังเซลล์ส่วนนอกสุดที่เป็นชั้นไขมัน และมีการเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา ซึ่ง *E. coli* และ *E. aerogenes* มีแฟลกเจลลายื่นออกมารอบๆ เซลล์เป็นจำนวนมาก (peritrichous flagella) บริเวณแฟลกเจลลานั้น มีส่วนของยีนก่อโรค (immunogen) คือ แอนติเจน H (antigen H) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย (Veterinary Microbiology, 2554 อ้างใน นงลักษณ์และปรีชา, 2541) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jhansi and Khasim (2018) ที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากกุหลาบกระเปาเปิด ซึ่งเป็นกล้วยไม้สกุลเดียวกับกุหลาบกระเปาเปิด โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำลายในการสกัดสารสำคัญ และใช้วิธี Agar well diffusion เพื่อทดสอบเชื้อ *E. coli* และเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบชนิดอื่นอีก 7 ชนิด พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

แบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งผลการทดสอบนี้แตกต่างจากงานวิจัยของ Shubha and Srinivas (2016) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากส่วนอื่นๆ ได้แก่ ใบ เปลือกของผล และรากของกะเหรี่ยง และใช้วิธี Disc diffusion พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ แต่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่า ส่วนงานวิจัยของ Radhika et al. (2013) ได้ศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกะเหรี่ยง โดยทำการทดลองกับเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus mitis*, *Staphylococcus angriness* พบว่าสารสกัดจากดอกกะเหรี่ยงที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด คือ เฮกเซนและเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 10 ชนิด โดยได้ค่า Inhibition zone อยู่ที่ 7-18 มิลลิเมตร

ดังนั้นจากผลงานวิจัยนี้ จึงอาจกล่าวได้ว่าสารออกฤทธิ์จากสารสกัดเมทานอลของกุหลาบกระเปาะเปิดและกะเหรี่ยงไม่สามารถทำลายโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะส่วนของแฟลกเจลลาได้ ซึ่งโดยทั่วไปสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติจะมีชนิดและปริมาณที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของดอกไม้ ส่วนของต้นไม้ (Mohammed et al., 2016; Seema et al., 2019) หรือชนิดของตัวทำละลายที่นำไปใช้ในกระบวนการสกัดสาร (extraction) (Paulomi et al., 2013; Seema et al., 2019) ซึ่งมีการวิจัยที่ให้ผลการยับยั้งในทางเดียวกัน เช่น สารสกัดเมทานอลและอะซีโตนจากส่วนของ capsule cover ของกะเหรี่ยงที่ประเทศอินเดีย ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ได้มากที่สุด โดยใช้วิธี disc diffusion ให้ผลวงใสการยับยั้งเท่ากับ 16 มิลลิเมตร (Shubha and Srinivas, 2016) หรือผลวิจัยสารสกัดไดเอทิลอีเทอร์ (di-ethyl ether extract) จากใบและราก ของกล้วยไม้สายพันธุ์ *Acampe praemorsa* และกล้วยไม้แวนด้า (*Vanda tessellate*) ประเทศอินเดีย ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* และ *S. aureus* ได้ 100% ด้วยวิธีการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และให้ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเชื้อได้ 3.5- 25.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Behera et al., 2013)

จากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่า สารสกัดจากดอกกล้วยไม้เอื้องคำ เอื้องกุหลาบกระเปาะเปิดและกะเหรี่ยงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกคือ *S. aureus* และ *B. cereus* เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่ก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพ เช่น โรคติดเชื้อที่ผิวหนังจากเชื้อ *S. aureus* และโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *B. cereus* (Anna et al., 2019; Fabio et al., 2019) และมีผลต่อเศรษฐกิจและสังคมเป็นอย่างมาก ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุง และคิดค้นยารักษาโรคจากพืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพได้ต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

คัดเลือกชนิดของกล้วยไม้เพื่อหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2541). *ลักษณะและโครงสร้างละเอียดของแบคทีเรีย จุลชีววิทยาทั่วไป* (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สลิล สิทธิสังธรรม. (2549). *กล้วยไม้ป่าเมืองไทย* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สายธุรกิจโรงพิมพ์ บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด.

- อบฉันท ไทยทอง.(2548). *กล้วยไม้เมืองไทย* (พิมพ์ครั้งที่ 9). กรุงเทพฯ : ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Anna, B., Antoni P., Monika, G., Ilona, S. (2019). Prevalence and Toxicity Characterization of *Bacillus cereus* in Food Products from Poland. *Foods* 8(269), 1-12.
- Avasthi, A.S., Ghosal, S., Purkayastha, S. (2013). Study of Antimicrobial activity of *Orchis Latifolia*. *International Journal of Pharma & Bio Sciences*. 4(4).
- Behera, D., Rath, C.C., Tayung, K., Mohapatra, U.B. (2013). Ethnomedicinal uses and antibacterial activity of two orchid species collected from Similipal Biosphere Reserve Odisha, India. *International Journal of Agricultural Technology* 9(5), 1269-1283.
- Dourness J. (1995). Deuxime Contribution a l’Ethnobotanique Indochinoise. *Journal d’Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée. Paris*. 14, 64-86.
- Fabio, S.Y.Y., Josenilson, F.L., Maria, N.S., Yasmin, Á.L.R., Valeria, A., Raquel, L.O. (2019). Exploring the Role of *Staphylococcus Aureus* Toxins in Atopic Dermatitis. *Toxins*. 11(321), 1-13.
- Jhansi, K., Khasim, S.M. (2018). Antimicrobial and in vitro cytotoxic studies of *Acampe praemorsa* and *Aeridis odorata* of Orchidaceae. *Annals of Plant Sciences*. 2(18), 2088-2095.
- Mohammed, M.H., Laila, K., Mohammad, Al-Forkan. (2016). Evaluation of pharmaceutical properties on microbial activities of some important medicinal orchids of Bangladesh. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 5(2), 265-269.
- Pant, B. (2013). Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of Plant Science*. 7(10), 448-467.
- Paulomi, P., Abhishek, C., Deepa, N., Mrinal, K.B. (2013). Antimicrobial efficacy of orchid extracts as potential inhibitors of antibiotic resistant strains of *Escherichia coli*. *Asian Journal of Pharmaceutical and clinical research*. 6(3), 108-111.
- Radhika, B., Murthy, J.V.V.S.N., Grace, D.N. (2013). Preliminary phytochemical analysis & antibacterial activity against clinical pathogens of medicinally important orchid *Cymbidium aloifolium* (L.) SW. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 4(10), 3925-3931.
- Rahman, M., Husen, A. (2003). Orchids an important group of plants of traditional system of medicine in India. *The Indian Forester*. 129(5), 651-653.
- Sandrasagaran, U.M., Subramaniam, S., Marugaiyah, V. (2014). New perspective of *Dendrobium crumenatum* orchid for antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria. *Pakistan Journal of Botany*. 46(2), 719-724.
- Seema, A., Mohammed, K.H., Minhajur. R., Mohammed, M.H., Tarina, A.E. (2019). Phytochemical Profiling and Bioactivities of *Pholidota pallida* Lindl. *International Journal of Advanced Research in Botany*. 5(1), 8-13.
- Shubha, J., Srinivas, C. (2016). Phytochemical analysis and Antibacterial activity of *Cymbidium aloifolium* L. a medicinal orchid from Western Ghats of Karnataka, India. *International Journal of Advanced Scientific Research and Publications*. 2, 19-23.
- Singh, A., Duggal, S. (2009). Medicinal Orchids: An Overview. *Ethnobotanical Leaflets*. 13, 351-363.

Yang, L., Wang, Z., Xu, L. (2006). Simultaneous determination of phenols (Bibenzyl, phenanthrene, and fluorene) in *Dendrobium* species by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*. 1104, 230-237.

ความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนดินในจังหวัดลพบุรีที่มีศักยภาพในการผลิตปุ๋ยหมัก มูลไส้เดือนจากผักตบชวา

Peangjai Jianwitthayakul¹, Pattana Somniam² and ³Sittisak Rungrueang

¹ Department of Agriculture, Thepsatri Rajabhat University

² Faculty of Agriculture, Uttaradit Rajabhat University

³ Artificial Insemination Unit, Lam Sonthi District, Lopburi

¹peangjai04@hotmail.com

²psomniam@hotmail.com

³Sittisakrungrueang@gmail.com

บทคัดย่อ

ผักตบชวาเป็นวัชพืชที่อันตรายและสร้างมลพิษชนิดหนึ่งในโลกเนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว หลายหน่วยงานได้ความพยายามที่จะกำจัดพืชชนิดนี้แต่ยังไม่มีวิธีใดที่ประสบผลสำเร็จ เมื่อมองผักตบชวาในด้านทรัพยากรพบว่าพืชชนิดนี้ดูดซับไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมจากแหล่งน้ำ ดังนั้น ผักตบชวาจึงมีศักยภาพในการผลิตเป็นปุ๋ยไส้เดือนได้ ในประเทศไทยพบว่าไส้เดือนที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงในฟาร์มเป็นไส้เดือนที่นำเข้ามาจากต่างประเทศซึ่งบางชนิดไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพภูมิประเทศของประเทศไทยได้ ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมพันธุ์ไส้เดือนพันธุ์ท้องถิ่นจากฟาร์มโคนมในอำเภอพัฒนานิคม อำเภอท่าหลวง อำเภอลำสนธิและอำเภอยะบะดาล จังหวัดลพบุรีแล้วนำมาจัดจำแนกด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา เก็บตัวอย่างดินเพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางฟิสิกส์-เคมีของดิน แล้วนำไส้เดือนท้องถิ่น 6 ชนิดมาทดสอบศักยภาพในการผลิตปุ๋ยหมักจากผักตบชวาโดยการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design จำนวน 3 ซ้ำ จากการศึกษาพบไส้เดือนทั้งหมด 2 วงศ์ 4 สกุล 9 ชนิด เป็นไส้เดือนที่ไม่เคยมีรายงานในประเทศไทยมาก่อน 2 ชนิดคือ *Metaphire peguana* sp. 1 และ *Metaphire peguana* sp. 2 อำเภอที่พบจำนวนชนิดของไส้เดือนมากที่สุดคือ อำเภอพัฒนานิคม พบไส้เดือน 3 สกุล 6 ชนิด มีดัชนีความหลากหลายของ Shannon-Weiner (H') เท่ากับ 1.45 และดัชนีความเท่าเทียม (E') เท่ากับ 0.81 ผลการทดสอบศักยภาพการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนจากผักตบชวาเป็นเวลา 90 วันพบว่า *Metaphire peguana* sp. 1 (ลำสนธิ) มีประสิทธิภาพในการผลิตปุ๋ยหมักผักตบชวาได้มากที่สุดและได้ปริมาณปุ๋ยไส้เดือนมากที่สุด

คำสำคัญ ความหลากหลายทางชีวภาพ ไส้เดือน ปุ๋ยไส้เดือน ผักตบชวา

Diversity of Earthworm in Lopburi Province for Potential of the Production of Water Hyacinth Vermicompost

Peangjai Jianwichayakul¹, Pattana Somniam² and ³Sittisak Rungrueang

¹ Department of Agriculture, Thepsatri Rajabhat University

² Faculty of Agriculture, Uttaradit Rajabhat University

³ Artificial Insemination Unit, Lam Sonthi District, Lopburi

¹peangjai04@hotmail.com

²psomniam@hotmail.com

³Sittisakrungreung@gmail.com

Abstract

Water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart. Soims)) is one of the world's most destructive and noxious weed that has prolific growth rate. Many efforts were made to eradicate this weed but they have not been successful. However, referring to a resource view, they absorb Nitrogen, Phosphorus and Potassium from water. They have a potential for vermicompost production. However, most earthworm species in agriculture farm were imported from abroad. Nevertheless, many terrestrial earthworm species in many area have never been asserted. The aim of this research is collecting the terrestrial earthworm in daily farms at Phattana Nikhom district, Tha Luang district, Lam Sonthi district and Chai Badan district, Lopburi province by using morphological method. Soils were collected to analyze for physicochemical properties. Further, test feasibility of indigenous earthworm to converse water hyacinth into vermicompost. The experiment was Completely Randomized Design with 3 replications. The results found 2 families 4 genera and 9 species. There were 2 species which had never been found in Thailand ; *Metaphire peguana* sp. 1 and *Metaphire peguana* sp. 2. The data indicated Phattana Nikhom district discovered the highest earthworm species (3 genera 6 species), Shannon-Weiner index (H') was 1.45 and evenness index (E') was 0.81. In addition, testing ability of conversion water hyacinth into vermicompost. The experiment revealed that *Metaphire peguana* sp. 1 (Lam Sonthi) has the highest potential for decomposition water hyacinth and the highest biomass of vermicompost.

Keywords: diversity, earthworm, Lopburi, vermicompost, water hyacinth

บทนำ

ผักตบชวา (*Eichhornia crassipes* (Mart. Soims)) เป็นวัชพืชน้ำชนิดหนึ่งที่สร้างปัญหาในแหล่งน้ำทั่วโลก (Abbasi, 1998, Tchnolobanoglous et al., 1999) โดยผักตบชวาได้กีดขวางทางเดินของน้ำในแหล่งน้ำไม่ว่าจะเป็นแม่น้ำ ลำคลอง ทางระบายน้ำ และทะเลสาบ ความหนาแน่นของผักตบชวาเป็นอุปสรรคต่อการผลิตกระแสไฟฟ้า การชลประทาน การขนส่ง ตลอดจนการประมง (Patil et al., 2012) ผักตบชวาเป็นพืชที่กำจัดได้ยาก ไม่ว่าจะกระทำโดยวิธีการทางกายภาพ เคมี ชีววิธีและอื่น ๆ (Abbasi and Ramasamy, 2001) ดังนั้น จึงได้มีความพยายามที่จะนำผักตบชวามาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ทำเยื่อกระดาษ อาหารสัตว์ เฟอร์นิเจอร์ ภาชนะบรรจุของและยารักษาโรค แต่ยังไม่พบวิธีที่ดีที่สุดที่ลดปริมาณผักตบชวาได้ (Deka et al., 2013) จนกระทั่งมีเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยหมักจากมูลไส้เดือนเข้ามาใช้อย่างแพร่หลายยิ่งขึ้น ซึ่ง Gajalakshmi and Abbasi (2004) พบว่าไส้เดือนสามารถเปลี่ยนอินทรีย์วัตถุบางส่วนให้อยู่ที่รูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น นอกจากนี้ในปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนยังมีเอนไซม์และฮอร์โมนบางชนิดที่ได้จากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในลำไส้ของไส้เดือน ดังนั้น การใช้ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนจะเป็นประโยชน์ต่อพืชมากกว่าการใช้ปุ๋ยหมักธรรมดา Patil et al. (2012) รายงานว่าผักตบชวาเป็นพืชที่ดูดซับไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมจากแหล่งน้ำ จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้ผลิตเป็นปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนได้

ในประเทศไทยได้มีผู้สนใจในการเลี้ยงไส้เดือนเพื่อใช้กำจัดขยะอินทรีย์แต่ไส้เดือนที่นิยมนำมาเลี้ยงเพื่อผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนทางการค้านิยมใช้สายพันธุ์ต่างประเทศ เช่น ไทเกอร์ (*Eisenia foetida*) อัฟริกันไนท์คลอเลอร์ (*Eudrilus eugeniae*) เรดวอร์ม (*Lambricus rubellus*) จึงทำให้มีการนำไส้เดือนจากต่างประเทศเข้ามาเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ประโยชน์ซึ่งพบว่าไส้เดือนจากต่างประเทศไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพภูมิประเทศของประเทศไทยได้ (อานัฐ, 2555) และในประเทศไทยมีไส้เดือนเพียงสายพันธุ์เดียวที่มีความเหมาะสมต่อการย่อยสลายขยะอินทรีย์คือซีตาแร่ (*Perionyx* sp.) หากได้มีการสำรวจสายพันธุ์ไส้เดือนท้องถิ่นที่เหมาะสมในการย่อยสลายขยะอินทรีย์ให้มากขึ้นก็จะเป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรผู้สนใจและเป็นการเพิ่มมูลค่าของไส้เดือนดินสายพันธุ์ท้องถิ่นไทยอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนดินในฟาร์มโคนม จังหวัดลพบุรี
2. เพื่อศึกษาศักยภาพของไส้เดือนท้องถิ่นในจังหวัดลพบุรีในการย่อยสลายผักตบชวาเป็นปุ๋ยไส้เดือน

ระเบียบวิธีวิจัย

1. ทำการสำรวจไส้เดือนในฟาร์มโคนม 4 อำเภอ ได้แก่ อำเภอพัฒนานิคม อำเภอชัยบาดาล อำเภอลำลูกเกดและอำเภอลำสนธิ บริเวณทางระบายของเสียจากคอกสัตว์
2. ขุดหลุมขนาด 50×50×25 ลูกบาศก์เซนติเมตรเพื่อเก็บตัวอย่างไส้เดือนฟาร์มละ 3 จุด เก็บรวบรวมตัวอย่างไส้เดือนโดยวิธี passive method และใช้มือแคะดินและเก็บไส้เดือนอย่างละเอียด นำไส้เดือนมาใส่ในภาชนะที่บรรจุน้ำสะอาดเพื่อล้างไส้เดือน จากนั้นนำไส้เดือนใส่ลงในสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์แล้วนำไปจำแนกไส้เดือนโดยวิธีของ Gates (1972) Sim and Eastons (1972) และเอกสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง
3. นำดินที่ได้จากการขุดตัวอย่างไส้เดือนไปวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ของดินในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ อุณหภูมิดิน ความชื้นดิน ค่า pH (1 : 10, pH meter) ไนโตรเจนทั้งหมดในดิน โดยวิธี Kjeldahl method (Bremner, 1996) ฟอสฟอรัสที่สกัดได้ โดยวิธี Bray II and Murphy Riley method (Bray and Kurtz, 1945) โพแทสเซียมที่สกัดได้ ด้วยการสกัดด้วย 1 N NH₄OAc pH 7 แล้ววิเคราะห์ด้วย atomic absorption spectrophotometer (AAS) (Isaac and Kerber. 1971) อินทรีย์วัตถุและอินทรีย์คาร์บอนในดินโดยวิธี Walkley and Black (Walkley and Black, 1943)
4. คัดเลือกไส้เดือนที่เก็บรวบรวมมาได้ 6 พันธุ์ไปศึกษาศักยภาพในการย่อยสลายผักตบชวาทากแห้งนาน 15 วัน เป็นเวลา 90 วัน โดยมีไส้เดือนการค้า *Eudrilus eugeniae* เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ วางแผนการทดลองแบบ Completely

Randomized Design จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย ปริมาณปุ๋ยที่ผลิตได้และประสิทธิภาพในการย่อยสลายปุ๋ยหมักแล้ววิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistic 2-

ผลการวิจัย

จากการศึกษาพบไส้เดือน 2 วงศ์ 4 สกุล 9 ชนิด เป็นไส้เดือนที่ไม่มีรายงานในประเทศไทยมาก่อน 1 สกุล 2 ชนิด ได้แก่ *Metaphire peguana* sp. 1 และ *Metaphire peguana* sp. 2 โดยอำเภอที่พบชนิดของไส้เดือนมากที่สุดคืออำเภอยะลาพัฒนา (1 วงศ์ 4 สกุล 7 ชนิด) มีดัชนีความหลากหลาย (H') เท่ากับ 0.28 และดัชนีความเท่าเทียม (E') เท่ากับ 0.16 และอำเภอชัยบาดาล 1 วงศ์ 2 สกุล 6 ชนิด มีดัชนีความหลากหลายเท่ากับ 1.45 ดัชนีความเท่าเทียม เท่ากับ 0.81 ส่วนอำเภอท่าหลวงพบชนิดของไส้เดือนน้อยที่สุด (2 วงศ์ 3 สกุล 4 ชนิด) มีดัชนีความหลากหลายเท่ากับ 1.20 และดัชนีความเท่าเทียม เท่ากับ 0.86 (ตารางที่ 1)

สำหรับลักษณะทางฟิสิกส์-เคมีของดินที่พบไส้เดือนพบว่ามีความแตกต่างกันไปตามความหนาแน่นและจำนวนชนิดของไส้เดือน โดยอำเภอชัยบาดาลซึ่งมีความหนาแน่นและจำนวนชนิดของไส้เดือนมากที่สุดมีอุณหภูมิระหว่าง 31.62-34.26 องศาเซลเซียส ความชื้น 34.79-71.37 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 6.24-7.16 ปริมาณไนโตรเจน 2.04-6.87 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสที่สกัดได้ 2.21-3.33 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมที่สกัดได้ 0.46-0.55 เปอร์เซ็นต์ อินทรีย์วัตถุ 0.95-2.11 เปอร์เซ็นต์ อินทรีย์คาร์บอน 0.95-2.11 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอำเภอท่าหลวงที่พบความหนาแน่นและจำนวนชนิดของไส้เดือนของไส้เดือนน้อยที่สุดมีอุณหภูมิ 29.33-34.67 องศาเซลเซียส ความชื้น 29.84-44.30 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.80-7.47 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน 1.58-3.04 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสที่สกัดได้ 2.51-5.85 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมที่สกัดได้ 0.24-0.64 เปอร์เซ็นต์ อินทรีย์วัตถุ 1.89-2.54 เปอร์เซ็นต์ อินทรีย์คาร์บอน 1.88-2.85 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

เมื่อนำไส้เดือนพันธุ์ท้องถิ่นมาทดสอบศักยภาพในการย่อยสลายผักตบชวาพบว่าไส้เดือนแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนแตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดยไส้เดือน *Metaphire peguana* sp. 1 (ลำสนธิ) สามารถผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนได้มากที่สุด (55.72) กรัมและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายผักตบชวาได้มากที่สุด (12.38 เปอร์เซ็นต์) แต่ยังมีปริมาณที่ต่ำกว่า *Eudirus eugeniae* ซึ่งเป็นไส้เดือนพันธุ์การค้าที่ผลิตได้ 89.55 กรัม และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 19.90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไส้เดือน *M. peguana* sp. 1 (ท่าหลวง) ผลิตปุ๋ยไส้เดือนได้น้อยที่สุด (32.05 กรัม) และมีประสิทธิภาพในการผลิตปุ๋ยหมักได้น้อยที่สุด (7.12 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 3)

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนในฟาร์มโคนม จังหวัดลพบุรีพบไส้เดือน 2 วงศ์ 4 สกุล 9 ชนิด โดยชนิดที่พบมากที่สุดจะอยู่ในวงศ์ Megascolecidae ซึ่งสอดคล้องกับ Somniam and Suwanwaree (2009) ที่รายงานว่าไส้เดือนที่พบมากในพื้นที่การเกษตรส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม Pheretimid และ Edward and Lofty (1972) ได้รายงานว่าไส้เดือนที่พบมากในแถบทวีปเอเชียส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Megascolecidae และเป็นไส้เดือนในกลุ่ม Pheretimid

ตารางที่ 1 แสดงชนิด ความหนาแน่น ดัชนีความหลากหลายและความสม่ำเสมอของไส้เดือนดินในอำเภอต่าง ๆ จังหวัดลพบุรี

วงศ์/ชนิด	พัฒนานิคม	ท่าหลวง	ลำสนธิ	ชัยบาดาล
Megascoecide				
<i>Amyntus alexandri</i>	36	25	-	29
<i>Metaphire bahli</i>	33	-	32	5
<i>Metaphire houlleti</i>	-	-	-	12
<i>Metaphire peguana</i>	153	-	37	53

<i>Metaphire peguana</i> sp. 1	-	60	360	3279
<i>Metaphire peguana</i> sp. 2	36	-	-	-
<i>Metaphire posthuma</i>	200	20	132	33
<i>Polyheretima elongata</i>	23	-	19	-
Moniligastridae				
<i>Drawida</i> sp.	-	97	-	-
ความหนาแน่น	481	202	561	3411
จำนวนชนิด (s)	6	4	5	6
ดัชนีความหลากหลาย (H')	1.45	1.2	1.08	0.28
ดัชนีความเท่าเทียม (E')	0.81	0.86	0.67	0.16

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะทางฟิสิกส์-เคมีของดินที่พบไส้เดือนในอำเภอต่าง ๆ ของจังหวัดลพบุรี

ลักษณะทางฟิสิกส์-เคมี	พัฒนานิคม	ท่าหลวง	ลำสนธิ	ชัยบาดาล
อุณหภูมิดิน	23.43-32.93	29.33-34.67	27.40-32.76	31.63-34.26
ความชื้นในดิน	33.53-55.10	29.84-44.30	34.43-44.48	34.79-71.37
ความเป็นกรด-ด่าง	7.23-7.49	6.80-7.47	6.33-7.57	6.24-7.16
ไนโตรเจนทั้งหมด	1.93-4.56	1.58-3.04	1.02-2.53	2.04-6.87
ฟอสฟอรัสที่สกัดได้	2.32-4.23	2.51-5.85	2.24-4.45	2.21-3.33
โพแทสเซียมที่สกัดได้	0.41-0.62	0.24-0.64	0.24-0.50	0.46-0.55
อินทรีย์วัตถุ	0.66-3.84	1.89-2.54	1.47-4.56	1.63-3.62
อินทรีย์คาร์บอน	0.38-2.23	1.10-1.71	0.86-2.65	0.95-2.11
C/N ratio	0.19-1.43	0.43-0.69	0.57-1.59	0.22-1.08

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณปุ๋ยที่ผลิตได้จากไส้เดือนพันธุ์ท้องถิ่นและประสิทธิภาพในการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนจากผักตบชวา

ชนิดไส้เดือน	ปริมาณปุ๋ยที่ผลิตได้				ประสิทธิภาพ ในการผลิต ปุ๋ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ปริมาณปุ๋ยทั้งหมด	
<i>Eudrilus eugeniae</i>	30.95	26.44a	32.16a	89.55a	19.90a
<i>Amyntus alexandri</i>	12.80	13.50b	11.72b	38.02b	8.45b
<i>Metaphire bahli</i>	10.48	14.98ab	7.10b	32.56b	7.24b
<i>Metaphire peguana</i>	30.43	13.19b	9.78b	53.40b	11.86b

<i>Metaphire peguana</i> sp.1 (ลำสนธิ)	21.31	23.50ab	10.91b	55.72b	12.38b
<i>Metaphire peguana</i> sp.1 (ท่าหลวง)	9.63	11.81b	10.61b	32.05b	7.12b
<i>Polypheretima elongata</i>	19.42	18.58ab	9.24b	47.24b	10.50b
F-test	ns	ns	*	*	*
C.V. (%)	67.82	38.49	55.35	36.29	36.3

หมายเหตุ ns หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
* หมายถึงแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

เมื่อพิจารณาชนิดของไส้เดือนและลักษณะทางฟิสิกส์-เคมีของดินในแต่ละพื้นที่พบว่ามีความแตกต่างกัน ซึ่ง Makin et al. (2014) รายงานว่าลักษณะทางเคมีของดินที่มีผลต่อจำนวนชนิดของไส้เดือนได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของธาตุโพแทสเซียม ฟอสฟอรัสและกำมะถัน นอกจากนี้ Nunes et al.(2006) และ Tao et al. (2013) รายงานว่าลักษณะทางนิเวศวิทยาที่ต่างกันจะมีชนิดของไส้เดือนที่ต่างกัน และยังพบว่าในแต่ละพื้นที่ยังมีความหนาแน่นของไส้เดือนที่แตกต่างกันด้วย โดยอำเภอชัยบาดาลมีความหนาแน่นของไส้เดือนมากที่สุด ในขณะที่อำเภอท่าหลวงมีความหนาแน่นของไส้เดือนน้อยที่สุด โดยอำเภอชัยบาดาลจะมีความชื้นของดินมากที่สุด (34.79-71.37 เปอร์เซนต์) และอำเภอท่าหลวงมีความชื้นในดินเพียง 29.34-44.30 เปอร์เซนต์ ซึ่ง Valle et al. (1997) รายงานว่าปัจจัยที่มีผลต่อความหนาแน่นของไส้เดือนคือความชื้น ซึ่ง Edward and Bohlen (2004) รายงานว่าอุณหภูมิดินและความชื้นในดินมีความสำคัญต่อกระบวนการเมตะบอลิซึม การหายใจ การสืบพันธุ์และรักษาความสมดุลของน้ำในร่างกาย นอกจากนี้พบว่าในอำเภอชัยบาดาลมีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนและไนโตรเจนในดินในระดับที่สูง ในขณะที่อำเภอท่าหลวงที่มีจำนวนชนิดและความหนาแน่นของไส้เดือนต่ำจะมีปริมาณไนโตรเจนและอินทรีย์คาร์บอนในระดับปกติ แต่มีค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ต่ำกว่าพื้นที่อื่น ๆ ซึ่ง Goswami and Mandal (2015) รายงานว่าค่า C/N ratio ที่ลดลงส่งผลให้ประชากรของไส้เดือนลดลง

ด้านความสามารถในการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนจากผักตบชวาพบว่า *Eudirus eugeniae* สามารถผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนได้มากที่สุดและมีประสิทธิภาพในการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนได้มากที่สุด ในขณะที่ไส้เดือนพันธุ์ท้องถิ่นพบว่า *M. peguana* สามารถผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนเป็นอันดับรองลงมา ซึ่งสอดคล้องกับ Gajalaskshmi et al. (2001) ได้ใช้ไส้เดือน 4 ชนิดได้แก่ *Eudirus eugeniae*, *Perionyx excavates*, *Lumbricus mauritii* และ *Dendrobaena willsi* ในการย่อยสลายผักตบชวาพบว่า *E. eugeniae* และ *P. excavates* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายผักตบชวาได้สูงกว่า *L. mauritii* และ *D. willsi* และสุธีรักษ์ (2557) รายงานว่าไส้เดือนต่างชนิดจะมีประสิทธิภาพในการผลิตปุ๋ยหมักได้แตกต่างกัน

เอกสารอ้างอิง

- สุธีรักษ์ อารักษ์ธรรม. (2557). *การผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินด้วยสายพันธุ์ท้องถิ่นไทย*. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- อานัฐ ต้นโช. (2555). *คู่มือการผลิตปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดินจากขยะอินทรีย์*. เชียงใหม่ : กองทุนปุ๋ยอินทรีย์และไฮโดรโปนิกส์มูลนิธิโครงการหลวง.
- Abbasi, S.A. (1998). Weeds of despair, and hope. In Abbasi et al. (Eds). *Wetlands of India. Vol III*. New Delhi : Discovery Publishing House.
- Abbasi, S.A. and Ramasamy, E.V. (2001). *Solid waste management with earthworm*. New Delhi : Discovery Publishing House.
- Bray, R.H., Kurtz, L.T. (1945). Determination of total organic and available forms of Phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59 : 39-45.

- Bremner, J.M. (1996). Nitrogen-Total In D.L Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston, M.E. Sumner (Eds) *Method of Soil Analysis Part 3 : Chemical Method* (pp. 1085-1121). Wisconsin : SSSA Inc., ASA Inc., Madison.
- Deka, H., Deka, S., Baruah, C.K. (2013). Vermicomposting of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart. Soims)) employing indigenous earthworm species. In *International conference on chemical, agricultural and medical sciences (CAMS-2013). Dec 29-30 2013*, Kuala Lumpur (Malaysia) <http://doi.org/10.15242/11CBE.C1213074>.
- Edwards, C.A. (2004). The importance of earthworms as key representative of the soil fauna In C.A., Edwards (EDs) *Earthworm Ecology* (pp.220-224). Boca Ration : St. Lucie Press.
- Edward, C.A., Lofty, J.R. (1977). *Biology of earthworm*. London : Chapman and Hall.
- Gate, G.E. (1972). Burmese earthworm, an introduction to the systematics and biology of megadrile oligochaetes with special reference to Southeast Asia. *Transaction of the American Philosophical Society*. 62 : 1-236.
- Gajalakshmi, S., Ramasamy, E.V., Abbasi, S.A. (2001). Potential of two epigenic and two aneic earthworm species in vermicomposting water hyacinth. *Bioresource Technol.* 76 : 177-181.
- Gajalakshmi, S., Abbasi, S.A. (2004). Earthworms and vermicomposting. *Indian Journal of Biotechnology* 3 : 486-494.
- Goswami, R., Mondal, C.K. (2015). A study on earthworm population and diversity with special reference to physicochemical parameters in different habitats of south 24 Parganas district in west Bengal. *Rec. Zool. Surv. India* 115 : 31-38.
- Isaac, R.A., Kerber, J.D. (1971). Atomic absorption and flame photometry : technique and uses in soil, plant, and water analysis. In L.M. Walsh (EDs) *Instrumental Methods for Analysis of Soil and Plant Tissue* (pp. 17-38). Wisconsin : Soil Sri Sot.
- Makin, A.A., Miah, M.F., Yadav, S.K., Deb, M. and Khan, Z.K. (2014). Ecological diversity and abundance of earthworm in Sylhet metropolitan area of Bangladesh. *Advance in Zoology and Botany* 2(4) : 63-68.
- Nunes, D.H., Pasini, A., Benito, N.P., Brown, G.G. (2006). Earthworm diversity in four land use systems in the region of Jaguapita, Parana state, Brazil. *Caribbean Journal of Science* 42 : 331-338.
- Patil, J. H., Sanil, P. H., Malini, B. M., Manoj, V., Deepika, D., Chaitra, D. (2012). Vermicomposting of water hyacinth with poultry litter using rotary drum reactor. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4 : 2585-2589.
- Sims, R.W., Easton, E.G. (1972). A numerical revision of the earthworm genus *Pheretima* (Megascolecidae : Oligochaeta) with the recognition of new genera an appendix on the earthworm collected by the Royal Society North Borneo Expedition. *Biological Journal of the Linnean Society* 4 : 169-268.
- Somniam, P. and Suwanwaree, P. (2009). The diversity and distribution of terrestrial earthworms in Sakaerat Environmental Research Station and adjacent area. *World Applied Sciences* 6 : 221-226.
- Tao, Y., Gu, W., Chen, J., Tao, J., Xu, Y.J., Zhang, H. (2013). The influence of land use practices on earthworm communities in the saline agricultural soils of the west coast region of China's Bohai Bay. *Plant, Soil and Environment* 59(1) : 8-13.

- Tchnobanoglous, G., Burton, F.L. (1999). *Wastewater engineering treatment, disposal, and reuse*. New Delhi : Tata McGrawHill Publishing Company Limited.
- Valle, J.V., Moro, R.P., Gravin, H.M., Trigo, D., Cosin, D.D.J. (1997). Annual dynamic of the earthworm *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) in central Spain. *Soil Biology and Biochemistry* 29 : 309-312.
- Walkley, A., Black, I.A. (1943). An examination of degtjareff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. *European Journal of Soil Science* 37 : 29-37.

ผลการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจกบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงชนิดต่างๆ

วัชร หาดเมืองใจ และประเสริฐ หาดเมืองใจ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

email : watchareec@hotmail.com

บทคัดย่อ

เห็ดโคนดำหรือเห็ดจิ้งจก เกิดมาจากการผสมหลายสายพันธุ์ในประเทศจีน แต่ที่หลักๆเป็นเห็ดโคนจีนหรือเห็ดจิ้งจก (Xeruloid mushrooms) ซึ่งเป็นลูกผสมกับเห็ดโคนของจังหวัดกาญจนบุรี และได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในประเทศจีน การวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจกบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงชนิดต่างๆ ได้แก่ อาหารแข็งสูตรดัดแปลง และอาหารเหลวสูตรดัดแปลง 3 สูตร ได้แก่ มันฝรั่ง รำข้าว เมล็ดขนุน และอาหารเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด คือ ข้าวฟ่าง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวเปลือก ข้าวเหนียวพันธุ์ กข.10 และถั่วเขียว จากการศึกษาการเจริญโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีพบว่าเส้นใยเห็ดจิ้งจก มีอัตราการเจริญของเส้นใยเร็วที่สุดบนอาหารแข็งมันฝรั่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 8.53 เซนติเมตร และเส้นใยเห็ดจิ้งจก มีอัตราการเจริญของเส้นใยเร็วที่สุดบนอาหารเมล็ดข้าวฟ่าง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 9.10 เซนติเมตร และผลการเจริญของเส้นใยในอาหารเหลวทดแทนเส้นใยเห็ดจิ้งจก มีอัตราการเจริญของเส้นใยเร็วที่สุดในอาหารเหลวมันฝรั่ง โดยมีน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 17.8 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ : เห็ดจิ้งจก อาหารแข็งสูตรดัดแปลง อาหารเหลวสูตรดัดแปลง อาหารเมล็ดธัญพืช

Effects of mycelium Jejong mushrooms growth on various modified culture medium

Watcharee Hanmoungjai^{1,a} Prasert Hanmoungjai²

¹Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University

²Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University

email : watchareec@hotmail.com

Abstract

Black *Termitomyces* mushrooms or Jejong mushrooms caused by mixing many species in China but the main ones are Chinese *Termitomyces* mushrooms or Xeruloid mushrooms, which are hybrid with *Termitomyces* mushrooms of Kanchanaburi and is very popular in China. This research the objective of this research was to study the effect of Jejong mushrooms growth on various modified medium, including modified solid medium and 3 modified liquid medium, consisting of potatoes, rice bran, jackfruit seeds and 4 types of cereal medium, sorghum, maize, paddy, glutinous rice (RD10), and green beans. From the study of growth by measuring the colony diameter found that Jejong mushrooms mycelium has the fastest fiber growth rate on potato solid medium the colonies are 8.53 centimeters in diameter and Jejong mushrooms mycelium. Had the fastest mycelium growth rate on sorghum seed cereal medium the colonies were 9.10 centimeters in diameter and the growth of mycelium in liquid medium was substituted for Jejong mushrooms. Has the fastest mycelium growth rate in the potato liquid diet with dry weight equal to 17.8 grams/L.

Keywords: Jejong mushrooms, mycelium, growth, modified culture medium

บทนำ

เห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตที่สำคัญชนิดหนึ่งของป่าไม้ในประเทศไทย ซึ่งประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเห็ดหลายชนิด และสามารถนำมาใช้เป็นอาหารได้ เนื่องจากเห็ดมีประโยชน์ต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์ เห็ดเป็นทั้งอาหารที่มีรสชาติที่ดี เป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง บางชนิดเป็นยาโรคบางชนิดเป็นไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่กับรากพืช เพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้แก่ดินป่า และเห็ดยังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สร้างเสริมรายได้ให้แก่ชาวบ้านในชุมชนได้ ทั้งนำมาบริโภคและจำหน่ายสู่ท้องตลาด แต่ปัจจุบันมีการบุกรุกป่า และมีการเผาป่าเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่ได้รับผลกระทบนี้โดยตรง จึงทำให้ปริมาณเห็ดมีแนวโน้มที่จะลดลงเรื่อยๆ

จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยสนใจทำการศึกษากาการเจริญของเส้นใยตัวอย่าง เห็ดจิ้ง ที่เป็นเห็ดเศรษฐกิจ สามารถเพาะได้ง่าย เจริญเติบโตเร็ว มาศึกษาการเจริญของเส้นใยบนอาหารแข็ง อาหารเหลว อาหารเมล็ดธัญพืชซึ่งเมล็ดข้าวฟ่าง ยังเป็นที่นิยมในการนำมาเพาะเลี้ยง เส้นใยเห็ด เพื่อผลิตหัวเชื้อเห็ดแต่ปัจจุบันบางท้องถิ่นมีปัญหาเรื่องการหาเมล็ดข้าวฟ่างและบางฤดูข้าวฟ่างมีราคาแพง ทำให้เกษตรกรบางรายได้ทดลอง นำเอาเมล็ดข้าวเปลือกมาใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดปรากฏว่าเชื้อเห็ดเจริญเติบโตได้ดีและเชื้อเห็ดยังสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานกว่าเชื้อเห็ดที่ทำมาจากข้าวฟ่าง (ประภาพร พิระโง, 2556) ดังนั้นในการทำวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงคิดหาอาหารเลี้ยงเชื้อทดแทน เช่น มันฝรั่ง ข้าว และเมล็ดขนุน และอาหารแข็งเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ เมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์ กข.10 ถั่วเขียวที่ชกนํ้าให้เกิดการสร้างเส้นใยของเชื้อเห็ดได้ดีและเหมาะสม มีราคาถูก หาได้ตามท้องถิ่น ทำให้ทราบว่าเมล็ดธัญพืชและเมล็ดธัญพืชในท้องถิ่น ที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อเห็ดที่ลดต้นทุนของการผลิต สามารถนำมาประกอบเป็นอาชีพของชาวบ้านได้อีกด้วย ซึ่งเป็นการนำวัสดุเสริมและเมล็ดธัญพืชในท้องถิ่น มาทำให้เกิดประโยชน์มากยิ่งขึ้น สามารถเผยแพร่ข้อมูลให้กับผู้ที่สนใจในการแก้ไขปัญหาทางด้านต้นทุนการผลิต และเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาผลการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสูตรดัดแปลงชนิดต่างๆ
2. ศึกษาผลการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดธัญพืชสูตรชนิดต่างๆ
3. ศึกษาผลการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสูตรดัดแปลงชนิดต่างๆ

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมเส้นใยเห็ดจิ้งบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ

ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ดจิ้งจากสต็อกเชื้อเห็ด จากนั้นใช้เข็มเย็บเย็บเย็บเส้นใยเห็ดจิ้งไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) โดยวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ และนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

2. การย้ายเส้นใยเห็ดจิ้งลงบนอาหารแข็งดัดแปลง 3 สูตร

การศึกษากาการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสูตรดัดแปลง 3 สูตร คือ สูตรที่ 1 : มันฝรั่ง สูตรที่ 2 : เมล็ดขนุน และสูตรที่ 3 : ข้าว โดยวิธีขั้นตอนดังนี้

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสูตรดัดแปลง 3 สูตร จากนั้นนำเส้นใยเห็ดจิ้ง จากการเตรียมเส้นใย ที่มีอายุ 10 วัน โดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ดจิ้ง แล้วใช้เข็มเย็บเย็บเย็บเส้นใยเห็ดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดแข็งทั้ง 3 สูตร โดยวางบริเวณกลางจานเพาะเชื้อ 1 ชั้นต่อ 1 จานอาหาร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อ 1 สูตรอาหาร และนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจก บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร บันทึกผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเห็ดจิ้งจกทุก 2 วัน จนเส้นใยเห็ดเจริญครบ 10 วัน

3. ศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจกบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด

การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจก ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด คือ ข้าวฟ่าง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวเปลือกพันธุ์ กข.10 และถั่วเขียว โดยมีขั้นตอนดังนี้

การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจก บนอาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดธัญพืช โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมอาหารเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด โดยการคัดเลือกใช้เส้นใยเห็ดจิ้งจกที่เจริญดีที่สุดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตรต่อ เห็ด 1 ชนิด โดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ดจิ้งจกแล้วใช้เข็มเย็บเย็บย้ายเส้นใยจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง โดยใส่ 1 ชิ้นวันต่อ 1 ขวด ซึ่งทำการทดลอง 5 ซ้ำต่อ 1 สูตรอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจกบนอาหารเมล็ดธัญพืช บันทึกการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด ทุก 2 วัน จนครบ 10 วัน

4. ศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจก ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสูตรดัดแปลง 3 สูตร

การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจกในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสูตรดัดแปลง 3 สูตร คือสูตรที่ 1: มันฝรั่ง สูตรที่ 2 : เมล็ดขนุน และสูตรที่ 3 : รำข้าว โดยมีขั้นตอนดังนี้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสูตรดัดแปลง 3 สูตร จากนั้นนำเส้นใยเห็ดที่มีอายุ 10 วัน จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งจากการเตรียมเส้นใย โดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ดแล้วใช้เข็มเย็บเย็บย้ายเส้นใยจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสูตรดัดแปลง 3 สูตร โดยใส่ 5 ชิ้นวันต่อ 1 ขวดรูปชมพู่ (ดัดแปลงจากบุญสนอง แก้วช่วย และ อุมารณ แก้วถาวร. 2553.) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อ 1 สูตรอาหาร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส เก็บผลการทดลองทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 10 วัน โดยนำมากรองเซลล์จากปั๊มสุญญากาศกรองสารแบบแรงดันสูง (High Output Pump) ซึ่งน้ำหนักสดโดยเครื่องชั่งดิจิตอล ความละเอียดสูง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital Balance) แล้วบันทึกผล น้ำหนักสด จากนั้นนำเส้นใยเห็ดโคนน้อยไปอบที่ตู้อบรมร้อน (Hot air Oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำเส้นใยที่ผ่านการอบมาชั่งน้ำหนักแห้ง ซึ่งโดยเครื่องชั่งดิจิตอลความละเอียดสูง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital Balance) แล้วบันทึกผลน้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)

5. การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดจิ้งจกบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง 3 สูตร ทำการวัดการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจก โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 10 วัน ในแต่ละตัวอย่างหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บข้อมูล 3 ซ้ำ

2. การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจกบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด ทำการวัดการเจริญของเส้นใยเห็ด โดยวัดระยะการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจก ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 10 วัน ในแต่ละตัวอย่างหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บข้อมูล 5 ซ้ำ

3. การศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดจิ้งจกในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง 3 สูตร โดยการหาน้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร) โดยการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วันเป็นเวลา 10 วัน ในแต่ละตัวอย่างหาค่าเฉลี่ยจากการเก็บข้อมูล 3 ซ้ำ

4. วิเคราะห์ข้อมูล ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ แบบ One -way ANOVA ใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจกในอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง อาหารเมล็ดธัญพืช น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร) ของเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

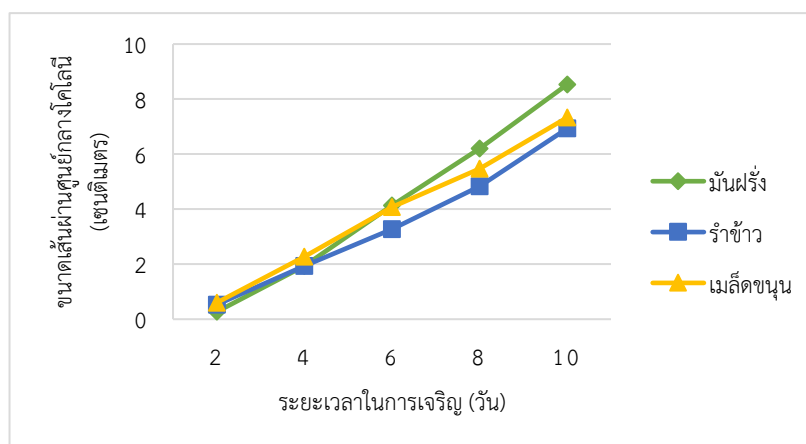
สูตรอาหารแข็งดัดแปลง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง(เซนติเมตร)					ความหนาแน่นของเส้นใย
	วันที่2	วันที่4	วันที่6	วันที่8	วันที่10	
มันฝรั่ง	0.27 ^a ±0.12	1.93 ^a ±0.76	4.13 ^a ±0.42	6.20 ^a ±0.72	8.53 ^a ±0.12	++
รำข้าว	0.53 ^a ±0.23	1.93 ^a ±0.12	3.27 ^b ±0.12	4.83 ^b ±0.29	6.93 ^c ±0.12	+++
เมล็ดขนุน	0.60 ^a ±0.20	2.27 ^a ±0.30	4.07 ^a ±0.23	5.47 ^{ab} ±0.15	7.33 ^b ±0.06	++

การนำเส้นใยเห็ดจิ๊จ๊ง มาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง 3 สูตร ได้แก่ มันฝรั่ง รำข้าว และเมล็ดขนุนบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี พบว่าเส้นใยเห็ดจิ๊จ๊ง มีอัตราการเจริญของเส้นใยเร็วที่สุดบนอาหารแข็งสูตรมันฝรั่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 8.53 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหาร เมล็ดขนุนและอาหารรำข้าว โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 6.57 และ 3.67 เซนติเมตร ซึ่งให้ผลแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังตาราง 4.1 และการเจริญของเส้นใยทุกชุดการทดสอบจะมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 4 เป็นต้นไป ดังภาพที่ 4.1 และยังพบว่าเส้นใยเห็ดจิ๊จ๊งมีอัตราการแพร่กระจายของเส้นใยเห็ดบนอาหารแข็งสูตรมันฝรั่งได้ดีกว่า อาหารแข็งเมล็ดขนุน และอาหารแข็งรำข้าว ดังภาพ 4.2

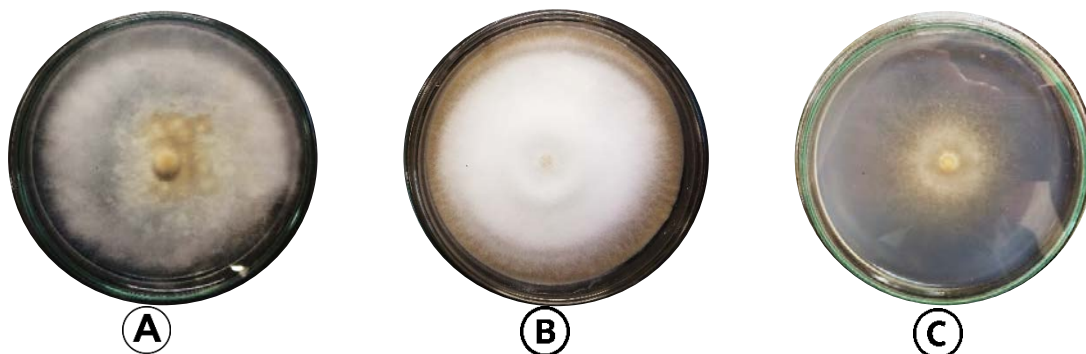
ตาราง 4.1 การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดจิ๊จ๊ง บนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในกลุ่มนี้แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธี Duncan

ความหนาแน่นของเส้นใยโดยกำหนด ดังนี้ - = ไม่เจริญ , + = หนาแน่นน้อย , ++ = หนาแน่นปานกลาง , +++ = หนาแน่นมาก



ภาพที่ 4.1 การเจริญของเส้นใยเห็ดจิ๊จ๊งบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง 3 สูตร เป็นเวลา 10 วัน



ภาพ 4.2 การเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจกบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง 3 สูตร เป็นเวลา 10 วัน (A=มันฝรั่ง B=รำข้าว และ C=เมล็ดขนุน)

จากการทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวฟ่าง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวเปลือกพันธุ์ กข.10 และถั่วเขียว บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน แล้ววัดระยะการเจริญเติบโต พบว่าเส้นใยเห็ดจิ้งจก มีอัตราการเจริญของเส้นใยเร็วที่สุดบน ข้าวฟ่าง มีระยะการเจริญเติบโต เท่ากับ 9.10 เซนติเมตร รองลงมาคือ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวเปลือกพันธุ์ กข. 10 และถั่วเขียว โดยมีระยะการเจริญเติบโต เท่ากับ 6.40, 4.10 และ 2.10 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติในวันที่ 10 พบว่า ข้าวฟ่าง ให้ผลการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจกที่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังตาราง 4.2

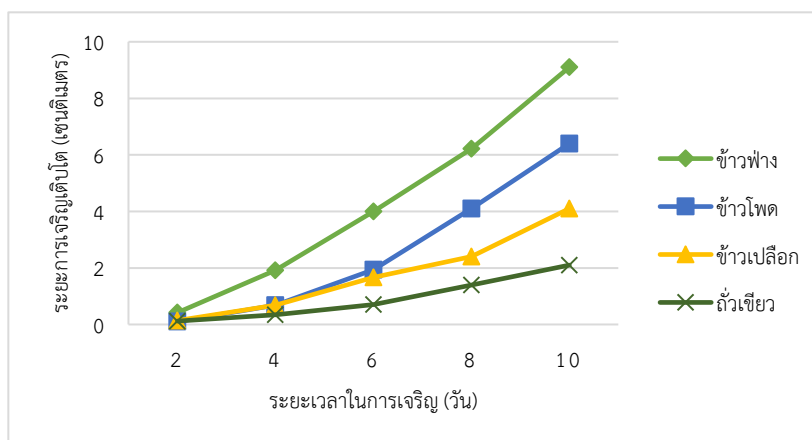
ตาราง 4.2 การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดจิ้งจก บนอาหารเมล็ดธัญพืช

สูตรอาหาร เมล็ดธัญพืช	ระยะการเจริญของเส้นใย (เซนติเมตร)					ความหนาแน่นของ เส้นใย
	วันที่2	วันที่4	วันที่6	วันที่8	วันที่10	
ข้าวฟ่าง	0.42 ^a ±0.13	1.92 ^a ± 0.11	4.00 ^a ±0.54	6.22 ^a ±0.44	9.10 ^a ±0.96	++
ข้าวโพดเลี้ยง สัตว์	0.10 ^b ±0.00	0.68 ^b ±0.22	1.94 ^b ±0.34	4.10 ^b ±0.74	6.40 ^b ±0.90	+++
ข้าวเปลือก กข.10	0.14 ^b ±0.05	0.68 ^b ±0.13	1.67 ^b ±0.35	2.40 ^c ±0.63	4.10 ^c ±0.80	+
ถั่วเขียว	0.12 ^b ±0.08	0.34 ^c ±0.09	0.70 ^c ±0.20	1.40 ^d ±0.31	2.10 ^d ±0.54	++

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในกลุ่มนั้นแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธี Duncan

ความหนาแน่นของเส้นใยโดยกำหนด ดังนี้ - = ไม่เจริญ , + = หนาแน่นน้อย , ++ = หนาแน่นปานกลาง , +++ = หนาแน่นมาก

จากการนำเส้นใยเห็ดจิ้งจก มาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารเมล็ดธัญพืช ได้แก่ ข้าวฟ่าง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวเปลือกพันธุ์ กข.10 และถั่วเขียว บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน พบว่าทุกชุดการทดลองของอาหารเมล็ดธัญพืชให้ผลการเจริญของเส้นใยเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 4 เป็นต้นไป แต่การเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งจกบนอาหารข้าวฟ่างจะเจริญอย่างรวดเร็ว ให้ผลดังภาพที่ 4.3 และพบว่าเส้นใยเห็ดจิ้งจกมีอัตราการแพร่กระจายของเส้นใยเห็ดบนอาหารเมล็ดธัญพืช ข้าวฟ่าง ได้ดีกว่า ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวเปลือกพันธุ์ กข.10 และถั่วเขียว ได้อย่างชัดเจน ดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.3 การเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งบนอาหารเมล็ดธัญพืช เป็นเวลา 10



ภาพที่ 4.4 การเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งบนอาหารเมล็ดธัญพืชเป็นเวลา 10 วัน (A=ข้าวฟาง B=ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

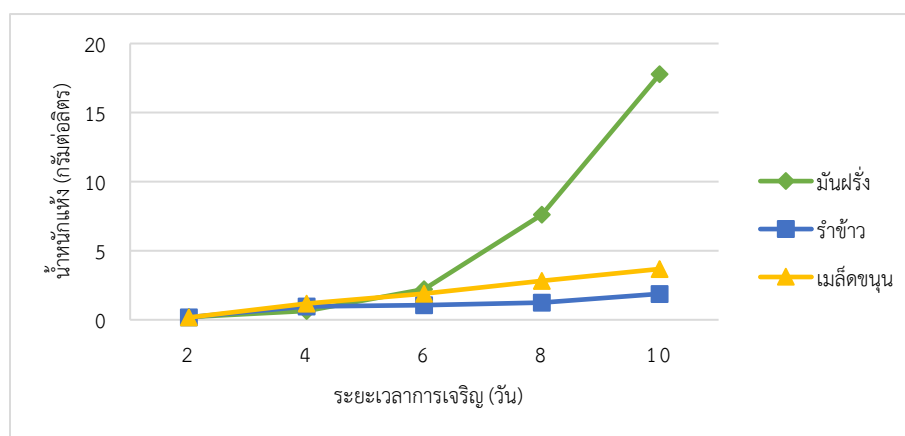
C=ข้าวเปลือกพันธุ์ กข.10 และ D=ถั่วเขียว)

การนำเส้นใยเห็ดจิ้ง มาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารเหลือสูตรดัดแปลง 3 สูตร ได้แก่ มันฝรั่ง รำข้าว และเมล็ดขนุน เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารแนวนอนเป็นเวลา 10 วัน แล้ววัดน้ำหนักแห้ง พบว่าเส้นใยเห็ดจิ้ง มีอัตราการเจริญของเส้นใยเร็วที่สุดบนอาหารเหลือมันฝรั่ง โดยมีน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 17.78 ± 0.07 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ อาหารเหลือเมล็ดขนุน และอาหารเหลือรำข้าว โดยมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 3.68 ± 0.30 และ 1.88 ± 1.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งให้ผลแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังตาราง 4.3 และการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งบนอาหารเหลือดัดแปลงมันฝรั่งจะเจริญอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 8 เป็นต้นไป ส่วนการเจริญบนอาหารเหลือดัดแปลงเมล็ดขนุนและรำข้าวมีการเจริญของเส้นใยที่ช้าและให้ปริมาณเส้นใยที่น้อย ดังภาพที่ 4.4

ตาราง 4.3 การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดจิ้ง ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง

สูตรอาหารเหลว ดัดแปลง	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)				
	วันที่2	วันที่4	วันที่6	วันที่8	วันที่10
มันฝรั่ง	0.20 ^a ±0.08	0.63 ^a ±0.52	2.21 ^a ±0.77	7.61 ^a ±0.25	17.78 ^a ±4.07
รำข้าว	0.19 ^a ±0.00	0.90 ^a ±0.38	1.05 ^a ±0.19	1.24 ^c ±0.17	1.88 ^b ±1.28
เมล็ดขนุน	0.17 ^a ±0.11	1.18 ^a ±.24	1.90 ^a ±0.57	2.84 ^b ±0.75	3.68 ^b ±0.30

หมายเหตุ : อักษรต่างกันในกลุ่มนี้แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธี Duncan



ภาพที่ 4.4 การเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้งบนอาหารเหลวสูตรดัดแปลง 3 สูตร เป็นเวลา 10 วัน

สรุปและอภิปรายผล

จากการนำเส้นใยเห็ดเห็ดจิ้ง มาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง 3 สูตร ได้แก่ มันฝรั่ง รำข้าว และเมล็ดขนุนบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยการสังเกตลักษณะการเจริญของเส้นใยและความหนาแน่นของเส้นใยแตกต่างกัน อาหารแข็งที่มีลักษณะการเจริญและความหนาแน่นของเส้นใยดีที่สุด คือ อาหารรำข้าว โดยเส้นใยเจริญแพร่กระจายรอบอาหารแข็งตามวันที่เพิ่มขึ้นและเส้นใยมีลักษณะที่ฟูขึ้นอย่างชัดเจน รองลงมาคือ อาหารเมล็ดขนุน และอาหารมันฝรั่ง โดยเส้นใยเจริญแพร่กระจายรอบอาหารแข็งตามวันที่เพิ่มขึ้น ซึ่งให้ผลการทดลองที่ต่างกับบุญสนอง ช่วยแก้ว และอุมาภรณ์ แก้วถาวร, (2553) ที่พบว่า อาหารเมล็ดขนุน มีการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรมฮังการีดีที่สุด จะมีความหนาแน่นของเส้นใยมากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ ซึ่งในช่วงวันที่ 2-10 จะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญของเห็ดมีอัตราการเจริญแบบความชัน อาจเนื่องมาจากสารอาหารบางชนิดที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด และการติดตามการเจริญของเส้นใยเห็ดจิ้ง จะเห็นว่าความหนาแน่นของเส้นใยอาจเกิดจากตัวของเส้นใยที่ชอบสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต โปรตีนจึงทำให้กราฟนั้นเกิดความชัน มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุด

จากการนำเส้นใยเห็ดจิ้ง มาทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารเมล็ดธัญพืช 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวฟ่าง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวเปลือกพันธุ์ กข.10 และถั่วเขียว บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน แล้วระยะการเจริญเติบโต โดยการสังเกตลักษณะการเจริญของเส้นใยและความหนาแน่นของเส้นใยแตกต่างกัน อาหารเมล็ดธัญพืชที่มีลักษณะการเจริญดีที่สุดคือ ข้าวฟ่าง รองลงมา คือ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวเปลือกพันธุ์ กข.10 และถั่วเขียว และความหนาแน่นของเส้นใยดีที่สุดคือ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

โดยเส้นใยเจริญแพร่กระจายรอบอาหารแข็งตามวันที่เพิ่มขึ้นมาก โดยเส้นใยเจริญแพร่กระจายรอบอาหารแข็งตาม ซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับ วชิร หาญเมืองใจ และคณะ, (2553) ที่พบว่า เมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อมากที่สุดคือ เมล็ดข้าวฟ่าง เส้นใยเจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างเต็มหลอดทดลองเร็วที่สุด ใช้ระยะเวลา 29 วัน และปาริฉัตร สุใจยา, (2552) ที่พบว่าเส้นใยของเห็ดหล่มขาว (*Russula delica*) เส้นใยสามารถเจริญในอาหารแข็งดีที่สุดบนเมล็ดข้าวฟ่าง ซึ่งในช่วงวันที่ 2 จะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญของเห็ดมีอัตราการเจริญที่สูงขึ้น อาจเนื่องมาจากสารอาหารบางชนิดที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด อาจเกิดจากตัวของเส้นใยที่ชอบสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต และขนาดของเมล็ดธัญพืชที่แตกต่างกัน จึงทำให้การดูดซึมสารอาหารได้ช้ากว่า ทำให้เส้นใยเดินช้า แต่พอเส้นใยได้รับสารอาหารที่เพียงพอ ก็จะทำให้บางช่วงของเห็ดแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นอย่างชัดเจน

จากการการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดจิ้งจกบนอาหารเหลวสูตรดัดแปลง 3 สูตร โดยใช้ระยะเวลา 10 วัน ซึ่งเส้นใยเห็ดจิ้งจกมีการเจริญของเส้นใยเห็ดบนอาหารเหลวมันฝรั่งได้ดี โดยให้ค่าน้ำหนักแห้งที่สูง และการเจริญที่รวดเร็ว กว่าอาหารเหลวเมล็ดขนุนและอาหารเหลวรำข้าวซึ่งมีการเจริญของเส้นใยน้อยมาก ซึ่งให้ผลการทดลองที่ต่างกับงานลักษณะ จ่านง และคณะ, (2557) ที่พบว่า ในสภาวะที่มีการเขย่า มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหลินจือมากที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อฟักทอง เมล็ดขนุน และมันเทศ เป็นวัตถุดิบที่ราคาถูก หาได้ง่าย และมีสารอาหารที่หลากหลายกว่าวัตถุดิบชนิดอื่นๆ และในช่วงวันที่ 6 จะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญของเห็ดจิ้งจกมีอัตราการเจริญที่สูงขึ้น อาจเนื่องมาจากสารอาหารบางชนิดที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด และอาจเกิดจากตัวของเส้นใยที่ชอบสารอาหารประเภทที่มีคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมันน้อย และน้ำตาลที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ได้ใช้เป็นน้ำตาลทรายขาว (ซูโครส) เพื่อจะได้นำไปประยุกต์ใช้กับเกษตรกรต่อไปในอนาคตได้ และในงานวิจัยส่วนใหญ่จะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบในอาหาร ซึ่งน้ำตาล 2 ชนิดนี้ มีโครงสร้างที่ต่างกัน กลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ซึ่งมีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่า จึงทำให้การดูดซึมสารอาหารได้ช้ากว่า แต่พอเส้นใยได้รับสารอาหารที่เพียงพอ ก็จะทำให้มีการเจริญเพิ่มขึ้นได้อย่างรวดเร็วได้

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดจิ้งจก พบว่าเส้นใยสามารถเจริญได้ดีในอาหารแข็งดัดแปลงมันฝรั่ง และอาหารเหลวดัดแปลงมันฝรั่ง เพราะในอาหารมันฝรั่งมีสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต โปรตีนสูง ซึ่งจัดได้ว่าเป็นอาหารที่มีไขมันน้อย ส่วนการเจริญบนเมล็ดธัญพืชข้าวฟ่างได้ดี แสดงว่าเห็ดจิ้งจกชอบที่จะเจริญได้ดีบนอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง

ดังนั้นจึงสรุปการของเส้นใยเห็ดจิ้งจก สามารถเจริญได้บนอาหารแข็งสูตรดัดแปลงและอาหารเหลวสูตรดัดแปลงที่เหมาะสมที่สุด คือ อาหารมันฝรั่ง และสามารถเจริญในอาหารเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมที่สุด คือ ข้าวฟ่าง งานวิจัยนี้จึงเป็นสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพที่จะสามารถช่วยลดระยะเวลา ในการเพาะเลี้ยงและช่วยลดต้นทุนการผลิตการเพาะเลี้ยงเห็ดในทางการค้าได้เป็นอย่างดี

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด เช่น อุณหภูมิและความชื้น และผลของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดแต่ละชนิดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- บุญสนอง แก้วช่วย และ อุมาภรณ์ แก้วถาวร. (2553). อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเส้นใย เพื่อการเพาะเลี้ยงเห็ดนางรมฮังการี. วารสารวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี 7(1): 27-35.
- ปริญญา จันทศรี. (2547). การเพาะเลี้ยงเห็ดโคนน้อย. เชียงใหม่. สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ประภาพร พิระโง. (2556). การเจริญของเส้นใยเห็ดตับเต่าบนเมล็ดธัญพืชและวัสดุเสริมที่เหมาะสม. เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.
- ปาริฉัตร สุไอยา. (2552). การเพาะเลี้ยงเส้นใยของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาที่บริโภคได้ให้บริสุทธิ์ บนอาหารวันสูตรต่างๆและอาหารแข็งจากเมล็ดธัญพืช. (รายงานผลการวิจัย). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.
- ปัญญา โพธิ์ฐิตีรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. (2538). เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. กรุงเทพฯ. ไร่เขียว
- ราชบัณฑิตยสถาน. (2539). เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทยฉบับราชบัณฑิตยสถาน. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ. อมรินทร์
- ปรินต์แอนด์พับลิชชิง.
- วัชรีย์ หาญเมืองใจ, ประเสริฐ หาญเมืองใจ, และอักรสิทธิ์ บุญส่งแท้. (2553). อนุรักษและการใช้ประโยชน์ความหลากหลายของเห็ดป่าในพื้นที่สะลอง อำเภอมะแมง และอำเภอมะริม จังหวัดเชียงใหม่ (ปีที่2). (รายงานผลการวิจัย). เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
- สมคิด นาพรม อับราฮัม กิเด เทกี ทูสิดา นันตะนะ จาซิง อราซชิ และ สุจินต์ สิมาร์กซ์ (2557). ระบบการผลิตเห็ดในพื้นที่ตัวเมืองและรอบๆ ตัวเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น. แก่นเกษตร 42 (2) : 279-287.
- อนงค์ จันทรศรีกุล. (2542). เห็ดเมืองไทย เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. (พิมพ์ครั้งที่ 7). กรุงเทพฯ. ไทยวัฒนาพานิช.

ผลกระทบของมลพิษในระบบนิเวศนาข้าวต่อสิ่งมีชีวิตในอำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่

รุ่งนภา ทากัน^{*1,2} และทัตพร คุณประดิษฐ์^{1,2}

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านความหลากหลายทางชีวภาพในท้องถิ่น

email: rungnapatag@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาสำรวจและติดตามผลการใช้สารปราบศัตรูพืชในนาข้าวในพื้นที่อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่เพื่อศึกษาผลกระทบของมลพิษในระบบนิเวศนาข้าวต่อสิ่งมีชีวิตในอำเภอแม่แตงนั้น ทำการสำรวจประชากรแบบสุ่มสัมภาษณ์ทั้งหมด 50 ครัวเรือน ทำการเก็บข้อมูลโดยการสัมภาษณ์ ในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2560 ในพื้นที่ครอบคลุมทั้งหมด 7 ตำบล ประกอบด้วย ตำบลอินทิล ตำบลบ้านเป้า ตำบลช่อแล ตำบลแม่หอพระ ตำบลสันมหาพน ตำบลแม่แตง และตำบลชี้เหล็ก ผลการสำรวจและติดตามผลการใช้สารปราบศัตรูพืชในนาข้าวพบว่าประชากรมีการใช้ผลิตภัณฑ์สารเคมีทั้งหมด 23 ชนิด พบว่ามีการใช้สารเคมีชนิด สารกำจัดวัชพืชมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 53 มีการใช้สารเคมีมากที่สุดในเดือนสิงหาคม จำนวน 12 ชนิด ในพื้นที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์สารเคมี เอชซีเอ็นดี 95 มากที่สุด 140 ไร่ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างในพื้นที่ โดยอ้างอิงการใช้ตาม Tier Rice model ของ US EPA, 2012 พบว่ามีปริมาณการสารตกค้างของกลุ่มสารออกฤทธิ์ 2,4-D Sodium salts เป็นสารที่มีความเสี่ยงในการตกค้างในดินในนาข้าวมากที่สุด โดยสารกลุ่มนี้ มีฤทธิ์ในการทำลายวัชพืชได้ทางใบและรากใช้ควบคุมวัชพืชในนาข้าว มีความคงทนในดินนาน 1 - 4 สัปดาห์มีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายเป็นฮอร์โมนพืชออกซิน และนอกจากนี้สารกลุ่มนี้ยังมีผลต่อเกษตรกรผู้ใช้ เช่นเกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องจากการระคายเคืองที่มีต่อเยื่อบุทางเดินอาหาร และพบว่าความหลากหลายทางชีวภาพมีความสัมพันธ์กับชนิดและปริมาณสารเคมีที่ใช้อย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ: สารปราบศัตรูพืช แม่แตง นาข้าว

The Effects of pollution in rice field ecosystem on organisms at Mae Taeng, Chiang Mai Province

Rungnapa Tagun^{1, 2, a} and Tatporn Kunpradid^{1, 2, b}

¹Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai, Thailand

²Centre of Excellence Biodiversity Research and Implementation for Community,

Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai, Thailand

E-mail; ^arungnapatag@gmail.com, ^btatporn@gmail.com

Abstract

This study aims to survey and monitoring of pesticide use in rice fields in Mae Taeng District Chiang Mai Province in order to explore the effects of pollution in rice paddy ecosystems on aquatic organisms in Mae Taeng District. The interviewing survey were randomized 50 households and collected prior to analysis between July and November 2017, the area covers 7 sub-districts in Mae Taeng. The results found that the farmer used 23 chemical products. Most herbicides Accounted for 53%. The most chemicals used in August were 12 types and the most used was H-95 products (140 rai). The analyzed to find residue in the area based on the use of the Tier Rice model of the US EPA, 2012 found that the residue of the active ingredient 2,4-D Sodium salts is the substance that has the highest risk of soil residue in the rice fields. This herbicide group has the effect of destroying weeds through roots and monocots. It is used to control weeds in rice fields. The persistence in the soil for 1 - 4 weeks with mechanism of action similar to plant hormones. In addition, these substances also affect farmers such as nausea and vomiting, stomach pain due to irritation of the gastrointestinal mucosa. In term of living organism in rice field found that biodiversity is significantly related to the type and amount of chemicals used.

Keywords: Pesticides; Mae Taeng; Rice field

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศกสิกรรม ประชากรส่วนใหญ่ทำการเกษตรเพาะปลูกพืชไร่ พืชสวน และไม้ผลเป็นหลักเพราะนอกจากจะก่อให้เกิดรายได้แล้ว ยังพบว่าการพัฒนาเกษตรที่ผ่านมามีรายได้และความเป็นอยู่ของเกษตรกรโดยรวมดีขึ้น ในจำนวนพืชที่เกษตรกรปลูก พบว่าข้าวมีพื้นที่การปลูกมากกว่าพืชชนิดอื่น คิดเป็นพื้นที่ประมาณ 11.3 % ของพื้นที่ทั่วประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) ในปี 2559 ประเทศไทยมีการส่งออกข้าวทั้งหมด 9,907 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 154,733 ล้านบาท เป็นประเทศที่มีการส่งออกข้าว เป็นอันดับสองของโลก ดังนั้นเกษตรกรจึงได้พยายามเพิ่มผลผลิตโดยการหันมาใช้สารปราบศัตรูพืช เช่น สารกำจัดวัชพืช สารกำจัดแมลง และสารกำจัดและป้องกันโรคพืช เพื่อกำจัดศัตรูพืชในนาข้าว

ในปัจจุบันพบว่าประเทศไทยมีการใช้สารปราบศัตรูพืชอย่างแพร่หลาย จากข้อมูลการนำเข้าสารปราบศัตรูพืช สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ในปี 2553-2559 พบว่ามีการนำเข้าสารปราบศัตรูพืชในแต่ละปีมีปริมาณมากและมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ย่อมส่งผลให้ศัตรูพืชมีการต่อต้านฤทธิ์หรือการดื้อต่อสารปราบศัตรูพืช ทำให้มีการเพิ่มปริมาณสารที่เกษตรกรจากที่เคยใช้ไม่ก่อให้เกิดผลเหมือนที่ผ่านมา ทำให้การฉีดพ่นครั้งต่อไปใช้ปริมาณที่เพิ่มขึ้น เกษตรกรต้องใช้สารปราบศัตรูพืชในปริมาณที่มากกว่าเดิม ปัญหาในการใช้สารเคมีในปริมาณมากเกินไปจนความจำเป็นทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในดิน ในน้ำ และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาวอีกด้วย (สถิติการเกษตรของประเทศไทย, 2552)

แนวคิด ทฤษฎีและ/หรือผลการศึกษาและวิจัยที่เกี่ยวข้อง ส่วนนี้เป็นการตรวจเอกสารโดยบรรยายข้อมูลความรู้เดิม ผลการวิจัย ตลอดจนแนวความคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับเรื่องที่จะทำวิจัย ซึ่งได้จากการตรวจสอบจากหนังสือ ตำรา เอกสารและแหล่งข้อมูลอื่นๆ ตลอดจนสมมติฐาน อาจมีนิยามศัพท์เฉพาะ หรือนิยามศัพท์ปฏิบัติการ และกรอบแนวคิดในการวิจัยที่แสดงขั้นตอน หรือความสัมพันธ์ของตัวแปรที่ใช้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสำรวจและติดตามผลการใช้สารปราบศัตรูพืชในนาข้าว
2. เพื่อศึกษาพิษวิทยาเบื้องต้นของสารเคมี

ระเบียบวิธีวิจัย

พื้นที่ศึกษา

อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ มีลักษณะภูมิประเทศเป็นภูเขาสลับซับซ้อน พื้นที่ 1 ใน 3 เป็นที่ราบเชิงเขา มีแหล่งน้ำธรรมชาติ และแหล่งน้ำที่พัฒนาแล้วหลายแหล่ง แหล่งน้ำที่สำคัญ ได้แก่ แม่น้ำปิง น้ำแม่แตง น้ำแม่จัด และเขื่อนแม่งัดสมบูรณ์ชล และประชากรส่วนใหญ่ในอำเภอแม่แตง ทำอาชีพเกษตรกร และมีรายได้หลักจากการปลูกข้าวเป็นหลัก เกษตรกรจึงหันมาใช้สารปราบศัตรูพืชเพื่อเพิ่มผลผลิตในการเกษตร

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเกษตรกรผู้ปลูกข้าวปี พ.ศ. 2560 ในอำเภอแม่แตง รวมทั้งหมด 13 ตำบล และได้กำหนดการเก็บข้อมูลประชากรที่ทำนาข้าว จำนวน 50 คน ในพื้นที่อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

แบบสอบถาม ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ข้อมูลพื้นฐาน ข้อมูลการใช้สารปราบศัตรูพืช และความคิดเห็นเกี่ยวกับการใช้สารเคมี

การเก็บแบบสอบถาม

เก็บโดยใช้วิธีการสัมภาษณ์ประชากรในพื้นที่จำนวน 50 คน โดยใช้แบบสอบถามชุดเดียวกัน และเลือกใช้วิธีการสัมภาษณ์แบบสุ่มเพื่อให้สามารถเก็บข้อมูลได้อย่างทั่วถึง ซึ่งรายละเอียดในแบบสอบถามได้มีการเก็บข้อมูลพื้นฐานทั่วไป และข้อมูลการใช้สารปราบศัตรูพืชในนาข้าวเบื้องต้นของเกษตรกรชาวนาใน อำเภอแม่แตง โดยข้อมูลทั่วไป ได้แก่ ชื่อ อายุ เพศ ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์ จำนวนพื้นที่ของนาข้าว พันธุ์ข้าวที่ปลูก และข้อมูลการใช้สารปราบศัตรูพืช ได้แก่ ระยะเวลาการใช้สารปราบศัตรูพืชในนาข้าว ชื่อสาร ปริมาณที่ใช้ จำนวนครั้งที่ใช้ และช่วงเวลาในการใช้สารต่อปี และคำถามเกี่ยวกับความคิดเห็นของเกษตรกรในการใช้สารกำจัดศัตรูพืช ลักษณะคำถาม เป็นแบบปลายปิดและปลายเปิดมีจำนวน ดังต่อไปนี้

ชื่อ อายุ เพศ จำนวนพื้นที่ของนาข้าว การใช้ยาฆ่าแมลงในนาข้าว การผสมยาฆ่าแมลง การใช้ปุ๋ยเคมีในนาข้าว การใช้ฮอร์โมนพืชในนาข้าว ผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อมที่ได้รับจากการใช้สารเคมีในนาข้าว รวมถึงการเก็บตัวอย่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดใหญ่ในนาข้าวเพื่อความสัมพันธ์กับปริมาณสารเคมีที่เกษตรกรใช้ในแต่ละเดือน

วิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ข้อมูลการใช้สารเคมีในนาข้าวโดยใช้โปรแกรม โปรแกรม Excel โดยจะแสดงข้อมูลในรูปของตาราง แผนภูมิ และกราฟในการแสดงผลข้อมูล

2. วิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับความคิดเห็นของเกษตรกรในการใช้สารกำจัดศัตรูพืชลักษณะคำถาม เป็นแบบปลายปิด และปลายเปิดมีจำนวนทั้งหมด 5 ข้อโดยคำนวณค่าทางสถิติ ได้แก่ ร้อยละ

3. การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ต่อพื้นที่

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ต่อพื้นที่ โดยใช้

สูตร $Q = Al \times R \times Area$ (Tagun and Boxall, 2018)

Q = ปริมาณของสารออกฤทธิ์

Al = ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ของสารกำจัดศัตรูพืชในพื้นที่

R = อัตราการใช้สารต่อเฮกเตอร์พื้นที่

4. หาความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดใหญ่ในนาข้าวและปริมาณสารเคมีที่ใช้

ผลการวิจัย

พื้นที่ศึกษา

การสำรวจพื้นที่ประชากรในอำเภอ แม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าประชากรทำอาชีพเกษตรกร และทำนาข้าวแบบนาปีเป็นหลัก เพราะเนื่องจากอำเภอแม่แตง เป็นอำเภอที่มีความอุดมสมบูรณ์ทั้งทรัพยากรดิน และทรัพยากรน้ำ

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

จากการสำรวจโดยใช้แบบสอบถามทั้งหมด 50 ชุด พบว่าประชากรใน อำเภอแม่แตง ทั้งหมด 7 ตำบล ที่ได้รับการสำรวจ ได้แก่ ตำบลอินทขิล ตำบลหอพระ ตำบลช่อแล ตำบลชี้เหล็ก ตำบลบ้านเป้า ตำบลแม่แตง ตำบลสันมหาพนและตำบลกุดช้าง

ข้อมูลทั่วไป

การสัมภาษณ์เกษตรกรโดยวิธีการสุ่ม เกษตรกรในพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นเพศชาย และมีอายุระหว่าง 40-80 ปี เนื่องจากการใช้สารเคมีเป็นงานอันตราย และต้องอาศัยความแข็งแรงในการพ่น หรือฉีดยา ซึ่งเป็นงานที่เหมาะสมสำหรับผู้ชายมากกว่า จึงทำให้พบว่าเกษตรกรที่ตอบแบบสอบถามเกี่ยวกับการใช้สารเคมีได้นั้นเป็นเพศชาย

สารเคมีที่ใช้ในนาข้าวอำเภอแม่แตง

จากการสำรวจจะเห็นว่าผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่มีการใช้ผลิตภัณฑ์สารเคมี เอชโซนด์ 95 มากที่สุด (ตารางที่ 1) เนื่องจากเป็นสารที่มีราคาถูกเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์สารเคมีชนิดอื่น ซึ่งเป็นวิธีการลดต้นทุนการผลิตที่เกษตรกรส่วนใหญ่เลือกใช้

ตารางที่ 1 การใช้สารเคมีในนาข้าวอำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่โดยภาพรวม

ชื่อสามัญ	ชื่อผลิตภัณฑ์	กลุ่มสารเคมี	จำนวนผู้ใช้ (%)
2,4-D Sodium salt	เอชโซนด์ 95	phenoxycarboxylic acid	34.6
fenobocarb	ฟิโนบูคาร์บ	carbamate	11.5
paraquat dichloride	กรัมม็อกโซน	bipyridylum	10.3
cypermethrin	ไซเปอร์เมทริน	pyrethroid	9.0
azoxystrobin + difenoconazole	ออดีวา 325 เอสซี	strobilurin analogue + triazole	3.8
isoprothiolane	ฟูจิวัน	prosporothiolate	2.6
Abamectin	แฉ็คเก็ค	avermectin	2.6
methomyl	แลนเนท	carbamate	2.6
etridiazole + quintozone	เทอร์ราคลอร์ ซุปเปอร์ เอ็กซ์	aromatic hydrocarbon	2.6
metalaxyl	เอ็กซ์ตราแลกซิล	phenylamind (acylalanine type)	2.6
2,4-D butyl ester+butachlor	ดาราท็อก เอ็กซ์	phenoxycarboxylic acid + chloroacetamide	2.6
carbusulfan	คาร์โบซัลแฟน	carbamate	1.3
Mancozeb	ไดเทน เอ็นที เอ็ม 6	Alylenebis (dithiocarbamate)	1.3
pretialchlor + pyribenzoxim	โซลิโต้	chloroacetanilide + pyrimidinyloxybenzoic	1.3
benfuracarb	ออนคอล	carbamate	1.3
penoxsulam	เรนโบร์ 25 โอดี	triazolopyrimidine	1.3
carbaryl	เซฟวิน 85	carbamate	1.3
Bispyribac-sodium	เลกาซี 20	Pyrimidinyloxybenzoic	1.3
glyphosate-isopropylammonium	ไกลโฟเซต 48	glycine derivative	1.3
alaclor	อะลาคลอร์	chloroacetamide	1.3
atrazine	อาทราซีน	1,3,5- trizine	1.3
chlorantraniliprole	คูปองท์ ฟรีวอรอน	diamides	1.3
2,4-D isobutyl ester +thiobencarb	แซทเทอนร์-ดี	carbamate	1.3

จากตารางที่ 1 จำนวนของผู้ตอบแบบสอบถาม พบว่า ประชากรกลุ่มตัวอย่างในอำเภอแม่แตง ผลิตภัณฑ์สารเคมีที่มีการใช้มากที่สุด คือ เอชโซนด์ 95 คิดเป็นร้อยละ 34.6 รองลงมา คือ ฟิโนบูคาร์บ, กรัมม็อกโซน, ไซเปอร์เมทริน และโอวีต้า 325 SC คิดเป็นร้อยละ 11.5, 10.3, 9.0 และ 3.8 ตามลำดับ

เกษตรกรใน อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ มีการใช้ผลิตภัณฑ์สารเคมีมากที่สุดคือ เอชโซนด์ 95 เมื่อนำมาเทียบกับ Rungrapa and Boxall (2018) พบว่ามีการใช้ กรัมม็อกโซน มากที่สุด รองลงมาคือ แลนเนท แอล, ฟูโฟดี 80 และ เอชโซนด์ 95 ตามลำดับ นัฐวุฒิ และคณะ (2557) พบว่ามีการใช้พาราควอตมากที่สุด รองลงมาคือ ไกลโฟเซต และคลอโรไพริฟอส ตามลำดับ ซึ่งพบว่าการใช้สารผลิตสารเคมีที่แตกต่างกันแต่สารที่มีการใช้มากที่สุดนั้นก็จัดอยู่ในกลุ่มของสารกำจัดวัชพืชเหมือนกัน ซึ่งสาเหตุที่ทำให้มีการใช้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันนั้น อาจเกิดจากการแนะนำของเซลแมน และการบอกต่อกันจากเพื่อนบ้านที่เคยมีการใช้สารเคมีชนิดนั้นๆ ซึ่งสอดคล้องกับภฤติญา และคณะ (2557) ได้มีการศึกษาการเลือกใช้สารเคมีของเกษตรกร พบว่ามีอยู่ด้วยกัน 4 หลักในการเลือกใช้สินค้า คือ 1) ใช้อันที่เคยใช้ มาก่อนเมื่อครั้งที่แล้วเมื่อพบกับโรคแมลงชนิด

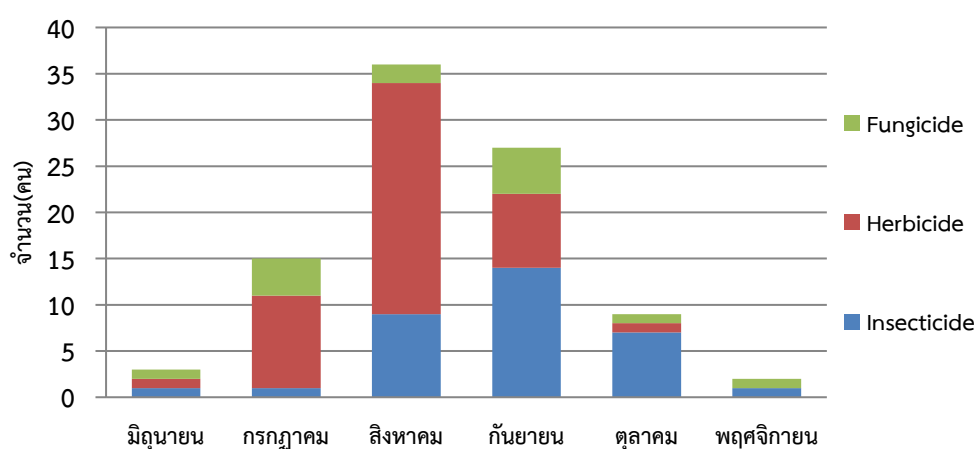
เดิมจึงเลือกใช้สารเคมีชนิดนั้นๆ 2) ใช้วันที่เพื่อนใช้ เป็นการเลือก ที่มีการสนทนาแลกเปลี่ยนกับเพื่อนบ้านที่ทำนา เช่นเดียวกันว่าใช้สารเคมีอะไร และจะตัดสินใจเลือก ใช้ตาม 3) ใช้วันที่ร้าน หรือตัวแทนบริษัทแนะนำให้ใช้ และ 4) ใช้เพราะเซลล์แมนเอามาทดลองให้ใช้ฟรี

ชนิดของสารเคมีที่ใช้

จากการสำรวจ พบว่ามีการใช้สารเคมีชนิด สารกำจัดวัชพืชมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 53 รองลงมาคือ สารเคมีกำจัดแมลง คิดเป็นร้อยละ 32 และสารกำจัดเชื้อรา คิดเป็นร้อยละ 15 ตามลำดับจากการศึกษาพบว่าเกษตรกรมีการใช้สารเคมีชนิดสารกำจัดวัชพืชมากที่สุด เนื่องเป็นสารเคมีที่มีการใช้อย่างแพร่หลายทางการเกษตร ซึ่งสอดคล้องกับสอดคล้องกับรายงาน กรมวิชาการเกษตร ระบุว่าประเทศไทยนำเข้าสารเคมีในปี 2559 นำเข้า 160,824 ตัน มูลค่ากว่า 2.1 หมื่นล้านบาท สารเคมีทางการเกษตรที่เกษตรกรไทยนำมาใช้ ได้แก่ สารเคมีกำจัดแมลง และสารเคมี กำจัดวัชพืช และสารป้องกันและกำจัดโรคพืช ซึ่งประเทศไทยใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชมากที่สุด มีการนำเข้า 125,596 ตัน มูลค่า 9.7 พันล้านบาทรองลงมาคือสารกำจัดแมลง และสารป้องกันและกำจัดโรคพืชตามลำดับ

การใช้ชนิดสารเคมีในในแต่ละเดือน

จากการสำรวจพบว่าการใช้สารเคมีมากที่สุดในเดือนสิงหาคม จำนวน 36 คน รองลงมาคือเดือนกันยายน เดือนกรกฎาคม เดือนตุลาคม เดือนมิถุนายน และเดือนพฤศจิกายน คิดเป็นจำนวนคนที่ใช้ คือ 27,15,9,3,2 คนตามลำดับ และพบว่าตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึงเดือนตุลาคมมีการใช้ชนิดสารเคมีทั้งสามชนิด ได้แก่ สารกำจัดวัชพืช (Herbicide) สารกำจัดแมลง (Insecticide) และสารป้องกันและกำจัดโรคพืช (Fungicide) ซึ่งมีเพียงเดือนพฤศจิกายนที่มีการใช้ชนิดสารเคมีเพียงสองชนิด ได้แก่ สารกำจัดแมลง (Insecticide) และสารกำจัดเชื้อรา (Fungicide) ดังภาพที่ 2

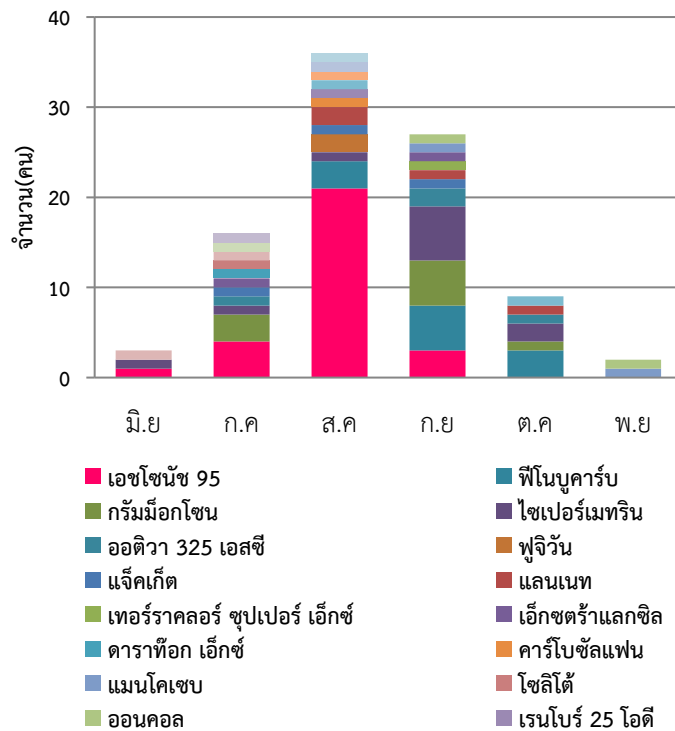


ภาพที่ 2 ภาพแสดงการใช้ชนิดสารเคมีในเดือน มิถุนายน กรกฎาคม สิงหาคม กันยายน ตุลาคม และพฤศจิกายน

จากการศึกษาพบว่า เกษตรกรมีการใช้สารเคมีมากที่สุดในเดือนสิงหาคม เนื่องจากเป็นช่วงที่ข้าวมีการเจริญเติบโต มีการแตกกอ ซึ่งสอดคล้องกับ กรมการข้าว (2557)ได้ทำการเก็บข้อมูลว่าช่วงที่ข้าวที่การเจริญเติบโต แตกก่อนนั้นเป็นช่วงที่มีการระบาดของแมลง และเป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตของวัชพืชมามากที่สุด จึงทำให้เกษตรกรมีการใช้สารปราบศัตรูพืชมาก และนอกจากนี้พบว่าในทุกเดือนจะมีการใช้ชนิดสารเคมีทั้งสามชนิด คือสารกำจัดวัชพืช (Herbicide) สารกำจัดแมลง (Insecticide) และสารป้องกันและกำจัดโรคพืช (Fungicide) ยกเว้นเดือนพฤศจิกายนที่ไม่พบการใช้สารกำจัดวัชพืช เนื่องจากเป็นระยะการการเก็บเกี่ยวจึงทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้สารกำจัดวัชพืชในการควบคุมหญ้าแต่อาจจะมีระบาดของแมลงหรือโรคบางชนิดจึงทำให้ยังมีการใช้สารสารกำจัดแมลง และสารป้องกันและกำจัดโรคพืชอยู่ซึ่งก็พบว่าการใช้ในปริมาณที่น้อยมาก

จำนวนผลิตภัณฑ์สารเคมีที่ใช้ในแต่ละเดือน

จากการสำรวจพบว่าเดือนสิงหาคมมีการใช้ผลิตภัณฑ์สารเคมีมากที่สุด คือ 12 ชนิด รองลงมาคือเดือนกันยายน และเดือนกรกฎาคม ใช้จำนวน 10 ชนิด ตามด้วยเดือนมิถุนายน พฤศจิกายน คือ 3, 2 ชนิด ตามลำดับ ดังภาพที่ 3

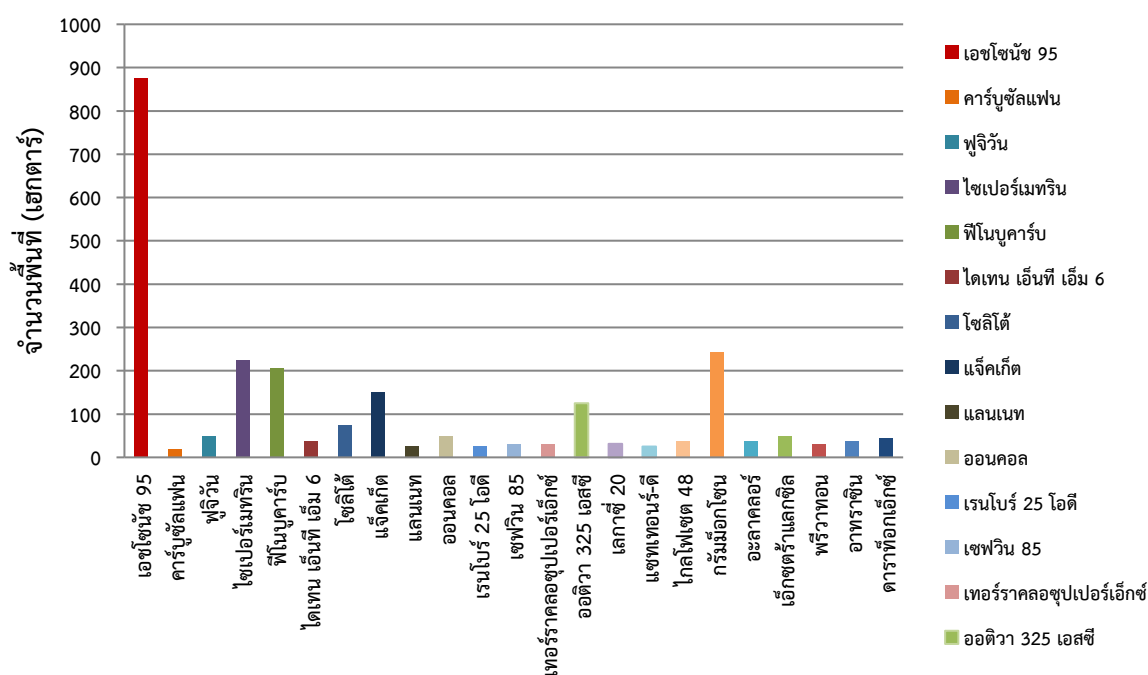


ภาพที่ 3 ภาพแสดงจำนวนผลิตภัณฑ์สารเคมีที่ใช้ในเดือน มิถุนายน กรกฎาคม สิงหาคม กันยายน ตุลาคม และพฤศจิกายน

จากการศึกษาพบว่าเกษตรกรเริ่มมีการใช้สารเคมีตั้งแต่เดือนมิถุนายนเนื่องด้วยเป็นช่วงดำนาจึงมีโรค แมลง วัชพืช เกิดขึ้นน้อยจึงทำให้มีการใช้สารเคมีน้อยตามไปด้วย และจะพบว่ามีการใช้สารเคมีเพิ่มขึ้น และมากที่สุดในเดือนสิงหาคม ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้สารเคมีตามการเจริญเติบโตของต้นข้าวซึ่งระยะการเจริญแต่ละระยะมีการระบาดของโรค แมลง และวัชพืชที่แตกต่างกันทำให้มีการใช้สารเคมีในแต่ละเดือนแตกต่างกัน สอดคล้องกับกรมการข้าว (2557) มีการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับการระบาดของโรคในแต่ละระยะ โดยพบว่าระยะแตกกอ และระยะออกรวง ซึ่งอยู่ในช่วงเดือน กรกฎาคม สิงหาคม และกันยายน มีการเกิดโรค และมีการระบาดของแมลงมากที่สุด ซึ่งประกอบด้วย โรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง โรคใบวงสีน้ำตาล การระบาดของแมลงมีการระบาดของแมลงหนอนกอข้าว เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว แมลงบัว เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และหนอนห่อใบข้าว จึงทำให้เกษตรกรมีการใช้สารเคมีมากกว่าช่วงเวลาอื่น และจะเห็นได้ว่าการใช้สารเคมีลดลงในเดือนตุลาคม และเดือนพฤศจิกายน เนื่องจากเป็นช่วงที่ใกล้กับฤดูเก็บเกี่ยวข้าว และการระบาดของแมลงลดลงจึงทำให้มีการใช้สารเคมีลดลงตามลำดับ

สารเคมีที่ใช้ต่อพื้นที่ทั้งหมด

จากการสำรวจพบว่าในพื้นที่ทั้งหมดที่ได้รับการสำรวจพบว่ามีการใช้ผลิตภัณฑ์สารเคมี เอชโซนซ์ 95 มากที่สุด คือ 875 เฮกตาร์ รองลงมาคือ กรัมม็อกโซน, ไซเปอร์เมทริน, ฟิโนบูคาร์บ, แจ็กเก็ต และออตวา 325 เอสซี ในปริมาณ 243.75, 225, 206.25, 150 และ 125 ตามลำดับ

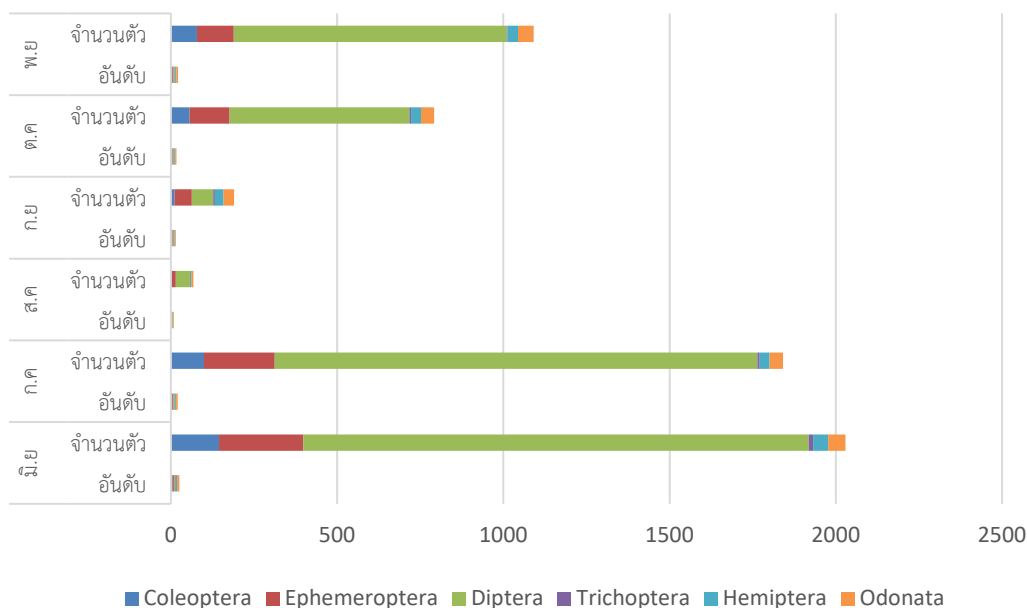


ภาพที่ 4 ภาพแสดงการสารเคมีที่ใช้ต่อพื้นที่ทั้งหมด

จากการศึกษาพบว่าเกษตรกรมีการใช้ผลิตภัณฑ์สารเคมี เอชโซนซ์ 95 มากที่สุด เนื่องจากเป็นสารเคมีกำจัดวัชพืช (Herbicide) ในกลุ่ม 2,4-ดีโซเดียมซอลต์ ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีการสลายตัวเร็ว เกษตรกรจึงมีการใช้มากที่สุด สอดคล้องกับ กรมวิชาการเกษตร (2554) ที่มีการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณการนำเข้าสารเคมีทางการเกษตร พบว่ามีการนำเข้าสารเคมีกำจัดวัชพืชมากที่สุด และยังพบว่าสอดคล้องกับ กรมควบคุมมลพิษ (2550) ที่ได้ทำการสัมภาษณ์เกษตรกรจำนวน 590 ราย ที่ทำนาในพื้นที่คลองสารภีจังหวัดปราจีนบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2550 พบว่าส่วนใหญ่เกษตรกรจะใช้ สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกลุ่มที่สลายตัวเร็ว คือ สารเคมีกำจัดวัชพืช (Herbicide) ได้แก่ 2,4-ดีโซเดียมซอลต์ และไกลโฟเซต

ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตและปริมาณสารเคมีในพื้นที่

จำนวนตัวอย่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดใหญ่ในนาข้าวพบจำนวนทั้งสิ้น 6 อันดับ 25 วงศ์ จำนวน 6001 ตัว พบมากที่สุดในเดือน มิถุนายน 2029 ตัว พบน้อยที่สุดคือเดือนสิงหาคมจำนวน 68 ตัว



ภาพที่ 5 ภาพแสดงจำนวนอันดับและจำนวนตัวของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดใหญ่ในนาข้าวในเดือนที่ทำการสำรวจ จากการวิเคราะห์ทางสถิติจะเห็นได้ว่าจำนวนอันดับและจำนวนตัวของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดใหญ่ในนาข้าวมีสัมพันธ์กับปริมาณการใช้สารเคมีในแต่ละเดือนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เนื่องด้วยเดือนมิถุนายนเป็นเดือนที่มีน้ำมากและมีการใช้ปริมาณสารเคมีน้อย ทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของกลุ่มสิ่งมีชีวิต (รุ่งนภา และ ทตพร, 2562) ตรงกันข้ามกันในเดือนสิงหาคม เป็นเดือนที่เกษตรกรมีการใช้สารเคมีปริมาณมากส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาสำรวจและติดตามผลการใช้สารปราบศัตรูพืชในนาข้าวในพื้นที่อำเภอมะนัง จังหวัดเชียงใหม่จากการสำรวจการประชากรในอำเภอมะนัง จังหวัดเชียงใหม่ มีการใช้ผลิตภัณฑ์สารเคมีทั้งหมด 23 ชนิด พบว่ามีการใช้สารเคมีชนิดสารกำจัดวัชพืชมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 53 มีการใช้สารเคมีมากที่สุดในเดือนสิงหาคมจำนวน 12 ชนิด ในพื้นที่ที่มีการใช้ผลิตภัณฑ์สารเคมี เอชซีเอ็นดี 95 มากที่สุด คือ 875 เฮกตาร์ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างในพื้นที่ พบว่ามีปริมาณการสารตกค้างของผลิตภัณฑ์ของ เอชซีเอ็นดี 95 คิดเป็นร้อยละ 98.83 ซึ่งเป็นสารที่มีการตกค้างมากที่สุด ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม phenoxycarboxylic acid เป็นสาร 2, 4-D มีฤทธิ์ในการทำลายวัชพืชได้ทางใบและรากใช้ควบคุมวัชพืชในนาข้าว มีความคงทนในดินนาน 1 - 4 สัปดาห์มีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายเป็นโมนิฟิออกซิน และนอกจากนี้สารกลุ่มนี้ยังมีผลต่อเกษตรกรผู้ใช้ เช่นเกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องจากการระคายเคืองที่มีต่อเยื่อบุทางเดินอาหาร เป็นพิษต่อกล้ามเนื้อหัวใจ และอาการทางระบบประสาทประกอบด้วย ชัก ชี้น กล้ามเนื้ออ่อนแรง และรูม่านตาเล็ก

ข้อเสนอแนะ

ผู้วิจัยจะได้มีการนำผลการศึกษาด้านการตกค้างของปริมาณสารเคมีในพื้นที่นาข้าวกลับลงสู่ชุมชนเพื่อให้เกษตรกรในพื้นที่ทราบถึงผลกระทบของการใช้สารเคมี สร้างจิตสำนึกในการใช้สารเคมีและการดูแลรักษาสิ่งแวดล้อมให้มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กรมการข้าว (ออนไลน์). (2557). สืบค้นจาก <http://www.ricethailand.go.th/web/> [15 สิงหาคม 2562]
- กรมควบคุมมลพิษ (ออนไลน์). (2550). สืบค้นจาก http://www.pcd.go.th/info_serv/water_sarape.html [21 กันยายน 2562]
- กรมวิชาการเกษตร (ออนไลน์). (2554). สืบค้นจาก http://doa.go.th/pibai/pibai/n19/v_1-feb/rai.html [28 สิงหาคม 2562]
- กฤติญา แสงภักดิ์, กัญจน์ ศิลปะสิทธิ์, ดวงรัตน์ แพงไทย, วสินี ไชว์พันธุ์, ศิริณา ศิริยนต์ และ ภัทรพงษ์ เกริกสกุล. (2557) การศึกษาพฤติกรรมการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชของชาวนา อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก. แก่นเกษตร 42 (3) : 375-384 (2557). 375-384
- นัฐวุฒิ ไม้ผาด , สมจิตต์ สุพรรณทัศน์ และ อีรพัฒน์ สุทธิประภา. (2557) ผลจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชของเกษตรกรผู้ปลูกข้าวต่อสุขภาพ และสิ่งแวดล้อม อำเภอร่องคำ จังหวัดกาฬสินธุ์. แก่นเกษตร ปีที่ : 42 ฉบับที่ : 3 เลขหน้า : 301-310 ปีพ.ศ. : 2557
- สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2552. สำนักงานสถิติการเกษตร, กรุงเทพฯ. 205 หน้า
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (ออนไลน์). (2559). สืบค้นจาก <http://www.oae.go.th/view> [20 มิถุนายน 2562]
- Tagun, R., Boxall, A. B. A. (2018). The Response of Lemna minor to Mixtures of Pesticides That Are Commonly Used in Thailand. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(4), 516-523. doi:10.1007/s00128-018-2291-y
- Tagun, R, Kunpradid, T (2019). Do Environmental Factors Influence the Distributions and Diversity of Tropical Macroinvertebrate Assemblages?: A Case Study of Mae Taeng River Basin, Northern Thailand. *Naresuan University Journal: Science and Technology*. 27(3) July-September 2019, 20-34.

ผลของ *Non-albicans Candida* species ร่วมกับ *Streptococcus mutans* ต่อความสามารถในการก่อโรคฟันผุ

วิรัชพัชร แสนเสนาะ^{1,a} อรนาฏ มาตังคสมบัติ^{2,b} และพนิดา ัญญศรีสังข์^{2,c}

¹สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

²ภาควิชาจุลชีววิทยา และหน่วยปฏิบัติการวิจัยจุลชีววิทยาช่องปากและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

email: ^armc_satit@hotmail.com, ^boranart.m@chula.ac.th, ^cpanida.t@chula.ac.th

บทคัดย่อ

โรคฟันผุในเด็กปฐมวัยเป็นปัญหาสำคัญทางทันตสาธารณสุข เชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) เป็นหนึ่งในปัจจัยก่อโรค มีรายงานการพบ *Candida albicans* ร่วมกับ *S. mutans* ในคราบจุลินทรีย์ของเด็กที่มีฟันผุ ส่งผลเพิ่มความรุนแรงของโรค แต่ยังไม่มีการศึกษาผลของเชื้อกลุ่ม *Non-albicans Candida* ซึ่งพบได้ในเด็กฟันผุเช่นกัน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*) และ *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*) ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่ม *Non-albicans Candida* ต่อการสร้างกรดและการสร้างไบโอฟิล์มซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคฟันผุ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. mutans* โดยผลการศึกษาพบว่า ค่าความเป็นกรดต่างของเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันอยู่ในระดับต่ำกว่าค่าของเชื้อ *Candida* แบบเดี่ยวๆ และต่ำกว่าค่าความเป็นกรดต่างที่สามารถละลายแร่ธาตุจากผิวเคลือบฟันได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *S. mutans* ร่วมกับ *C. dubliniensis* หรือ *C. parapsilosis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมซูโครสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเชื้อที่เจริญร่วมกันมีการสร้างไบโอฟิล์มมากกว่าผลรวมของเชื้อเดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญ สรุปได้ว่าการเจริญร่วมกันของ *C. dubliniensis* หรือ *C. parapsilosis* กับ *S. mutans* ส่งผลให้มีการการสร้างไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้น และมีค่าความเป็นกรดในระดับที่ต่ำและอาจก่อให้เกิดการละลายแร่ธาตุของเคลือบฟันได้ ซึ่งอาจส่งเสริมให้เชื้อมีความสามารถในการก่อโรคฟันผุสูงขึ้นได้

คำสำคัญ: การสร้างกรด; การสร้างไบโอฟิล์ม; *Non-albicans Candida*; *Streptococcus mutans*; โรคฟันผุ

Effects of Non-*albicans* *Candida* species and *Streptococcus mutans* on cariogenicity

Wirunphat Sansanoa^{1,a}, Oranart Matangkasombut^{2,b} and Panida Thanyasrisung^{2,c}

¹Medical Microbiology, Interdisciplinary Program, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Department of Microbiology and Research Unit on Oral Microbiology and Immunology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

E-mail; ^armc_satit@hotmail.com, ^boranart.m@chula.ac.th, ^cpanida.t@chula.ac.th

Abstract

Early childhood caries is a major problem in dental public health. Microorganisms, especially *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), is an important causative factor. Recent studies reported that the presence of *Candida albicans* together with *S. mutans* in plaques of children with dental caries enhances cariogenicity. However, no information exists regarding the effect of non-*albicans* *Candida* species (NACs), which are also found in children with caries. Therefore, this study aimed to examine the effects of two important non-*albicans* *Candida* species, *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*) and *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*), when co-cultured with *S. mutans* on acid production and biofilm formation, which are important cariogenic factors. The results showed that the pH of dual-species culture was lower than that of *Candida* alone and was lower than the critical pH that can demineralize enamel when *S. mutans* was co-cultured with *C. dubliniensis* or *C. parapsilosis* in media supplemented with sucrose for 36 hours. Moreover, biofilm formation of dual-species culture was significantly higher than the sum of single-species biofilm. In conclusion, co-culture of *C. dubliniensis* or *C. parapsilosis* together with *S. mutans* resulted in increased biofilm formation and a pH that was lower than the critical pH of enamel. This could lead to an increase in cariogenicity of the microorganisms.

Keywords: Acid production; Biofilm formation; Non-*albicans* *Candida*; *Streptococcus mutans*; Dental caries

บทนำ

โรคฟันผุยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบได้ทั้งในเด็ก และผู้ใหญ่ ในหลายประเทศ สาเหตุของโรคฟันผุมีหลายปัจจัยร่วมกัน โดยปัจจัยหนึ่งที่สำคัญคือคราบจุลินทรีย์ หรือไบโอฟิล์ม (biofilm) ในช่องปากที่มีองค์ประกอบหลักเป็นเชื้อจุลินทรีย์ และ extracellular polymeric substances (EPS) ที่เชื่อมสร้างออกมาจากการย่อยสลายน้ำตาล (Pitts et al., 2017) เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม mutans streptococci หรือ MS โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* เป็นเชื้อที่มักพบได้บ่อยในคราบจุลินทรีย์ของเด็กที่มีรอยโรคฟันผุ (Anil & Anand, 2017) โดยเชื่อดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างกรด และสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อโรค (Kawada-Matsuo, Oogai, & Komatsuzawa, 2016)

ความสามารถในการก่อโรคฟันผุของเชื้อ *S. mutans* เกิดจากกระบวนการย่อยสลายอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตจำพวกแป้งและน้ำตาล เช่น น้ำตาลซูโครส (sucrose) โดยเชื้อจะนำไปใช้ในการสร้างพลังงาน และเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรด (organic acid) ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของกรดแลคติก (lactic acid) นอกจากนี้เชื้อ *S. mutans* ยังมีความสามารถในการสังเคราะห์ extracellular polymeric substances (EPS) ผ่านกระบวนการใช้น้ำตาลซูโครส (sucrose metabolism) โดยอาศัยเอนไซม์ glucosyltransferase (GTFs) ในการสร้างกลูแคนชนิดที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble glucan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของไบโอฟิล์ม (Forssten, Bjorklund, & Ouwehand, 2010; Kawada-Matsuo et al., 2016) ในสภาวะที่มีการบริโภคอาหารจำพวกแป้งและน้ำตาลเพิ่มขึ้น จะทำให้เชื้อมีการผลิตกรดออกมาในปริมาณมากขึ้น ส่งผลให้มีความเป็นกรดต่างลดลง และอาจลดลงจนต่ำกว่าระดับค่าความเป็นกรดต่างที่สามารถละลายแร่ธาตุจากผิวเคลือบฟัน (Critical pH = 5.5) นอกจากนี้ยังส่งผลให้เชื้อมีการสร้างไบโอฟิล์มเพิ่มมากขึ้น กรดที่ถูกผลิตออกมาจะถูกกักเก็บอยู่ภายในไบโอฟิล์ม ทำให้เกิดการทำลายผิวฟันและเกิดฟันผุในที่สุด (Pitts et al., 2017)

การศึกษาทางคลินิกหลายการศึกษาได้รายงานการพบ *Candida albicans* (*C. albicans*) ร่วมกับ *S. mutans* จากคราบจุลินทรีย์ในช่องปากของเด็กที่เป็นโรคฟันผุ (de Carvalho, Silva, Hebling, Spolidorio, & Spolidorio, 2006; Xiao et al., 2018) จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ และในสัตว์ทดลอง พบว่าการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่างต่ำลง และมีปริมาณของไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว ส่งผลให้การสูญเสียความแข็งแรงของเนื้อฟันเพิ่มมากขึ้น และพบว่ารอยโรคฟันผุที่ชัดเจนในสัตว์ทดลอง (Falsetta et al., 2014; Sampaio et al., 2019) แม้ว่าการศึกษาส่วนใหญ่พบ *C. albicans* ร่วมกับ *S. mutans* ได้บ่อยในกลุ่มเด็กที่มีฟันผุ แต่ในปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อกลุ่ม non-*albicans Candida* species (NACs) เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่สภาวะภูมิคุ้มกันไม่สมบูรณ์ เช่น ในเด็กเล็ก ผู้สูงอายุ และกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Lozano Moraga, Rodriguez Martinez, Lefimil Puente, Morales Bozo, & Urzua Orellana, 2017; Owotade, Patel, Ralephenya, & Vergotine, 2013; Papadimitriou-Oliveris et al., 2019; Sadeghi, Ebrahimi-Rad, Mousavi, Shams-Ghahfarokhi, & Razzaghi-Abyaneh, 2018) ซึ่งมีรายงานการศึกษาที่พบเชื้อในกลุ่มของ NACs ในเด็กที่มีฟันผุ ได้แก่ *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*) และ *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*) มีความชุกเป็นอันดับ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยเฉพาะ *C. dubliniensis* ซึ่งพบเฉพาะในเด็กที่มีฟันผุ แต่ไม่พบในเด็กที่ไม่มีฟันผุ (Al-Ahmad et al., 2016; Lozano Moraga et al., 2017) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้ง 2 นี้กับ *S. mutans* ในแง่ของความสามารถในการสร้างกรด รวมถึงการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อให้เกิดฟันผุ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบผลของเชื้อ *C. dubliniensis* และ *C. parapsilosis* ต่อการผลิตกรด และการสร้างไบโอฟิล์มเพื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *S. mutans*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของ *Candida dubliniensis* และ *Candida parapsilosis* เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Streptococcus mutans* ต่อการสร้างกรด และการสร้างไบโอฟิล์มซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคฟันผุ

ระเบียบวิธีวิจัย

1. เชื้อจุลินทรีย์ และสภาวะการเลี้ยงเชื้อ

Streptococcus mutans (*S. mutans*) UA159, *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*) NCPF3949 และ *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*) ATCC90018 เป็นเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ทำการเพาะเลี้ยง เชื้อ *S. mutans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นแยกโคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าความขุ่น (optical density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) และทำการปรับค่าความขุ่นให้ได้ OD600 เท่ากับ 0.1 จากนั้นทำการบ่มต่อจนได้ OD600 อยู่ในช่วงระหว่าง 0.4-0.6 (เท่ากับ log phase)

เพาะเลี้ยงเชื้อ *C. dubliniensis* และ *C. parapsilosis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายโคโลนีลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm. (OD600) และทำการปรับค่าความขุ่นให้ได้ OD600 เท่ากับ 0.1 และทำการบ่มต่อจนได้ OD600 อยู่ในช่วงระหว่าง 0.4-0.6

จากนั้นจึงนำเชื้อทั้งสองชนิดไปใช้ในการสร้างไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมในการทดลองต่อไป

2. การสร้างไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม

นำเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 1 มาทำการปรับค่าความขุ่นเพื่อให้ได้อัตราส่วนเชื้อสอดคล้องกับอัตราส่วนที่พบในตัวอย่างน้ำลายของเด็กที่มีฟันผุ โดยใช้ *S. mutans* ประมาณ 10⁸ CFU/ml และ *Candida* spp. ประมาณ 10⁶ CFU/ml (Hwang et al., 2017)

นำเชื้อที่ปรับค่าความขุ่นแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออก แล้วทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI ที่มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 เพื่อให้เกิดการสร้างไบโอฟิล์ม โดยไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยว ได้แก่ เชื้อ *S. mutans*, *C. dubliniensis* และ *C. parapsilosis* สำหรับกลุ่มไบโอฟิล์มเชื้อผสม ได้แก่ กลุ่มเชื้อ *S. mutans* ที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *C. dubliniensis* และกลุ่มเชื้อ *S. mutans* ที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *C. parapsilosis* ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI ที่มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 ที่ไม่ผสมเชื้อเป็นกลุ่มควบคุม ทำการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยวในหลุมแยกกันใน 24 well-plate และทำการผสมเชื้อทั้งสองชนิดลงในหลุมเดียวกันเพื่อเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มแบบเชื้อผสม แล้วทำการบ่มเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂

3. การวัดความเป็นกรดของไบโอฟิล์ม

หลังทำการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มครบ 36 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความเป็นกรดของไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม โดยวัดจาก supernatant ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (LAQUATwin, HORIBA, Singapore) ทำการทดลองนี้ซ้ำ 3 ครั้ง อย่างเป็นอิสระต่อกัน

4. การวัดมวลไบโอฟิล์มโดยใช้การย้อมสีคริสตัล ไวโอเลต

หลังการเพาะเลี้ยงไบโอฟิล์มครบ 36 ชั่วโมง ทำการล้างไบโอฟิล์มใน 24 well-plate ด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4) จากนั้นเติม 0.1% (w/v) Crystal violet (CV) ลงในแต่ละหลุม ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการล้างด้วย sterile distill water จนไม่มีสีส่วนเกินหลุดติดออกมา แล้วเติม 33% acetic acid เพื่อสกัดสีที่ย้อมติดไบโอฟิล์ม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm. โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI ที่มีน้ำตาล

ซูโครสร้อยละ 5 ที่ไม่ผสมเชื้อเป็นกลุ่มควบคุม ทำการทดลองนี้ซ้ำ 3 ครั้งอย่างเป็นอิสระต่อกัน นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{อัตราส่วนของมวลไบโอฟิล์มของเชื้อเดี่ยว} = \frac{\text{OD}_{520\text{nm}} \text{ ของไบโอฟิล์มของ } S. \text{ mutans} + \text{OD}_{520\text{nm}} \text{ ของไบโอฟิล์มของ } Candida}{\text{OD}_{520\text{nm}} \text{ ของไบโอฟิล์มของ } S. \text{ mutans} + \text{OD}_{520\text{nm}} \text{ ของไบโอฟิล์มของ } Candida}$$

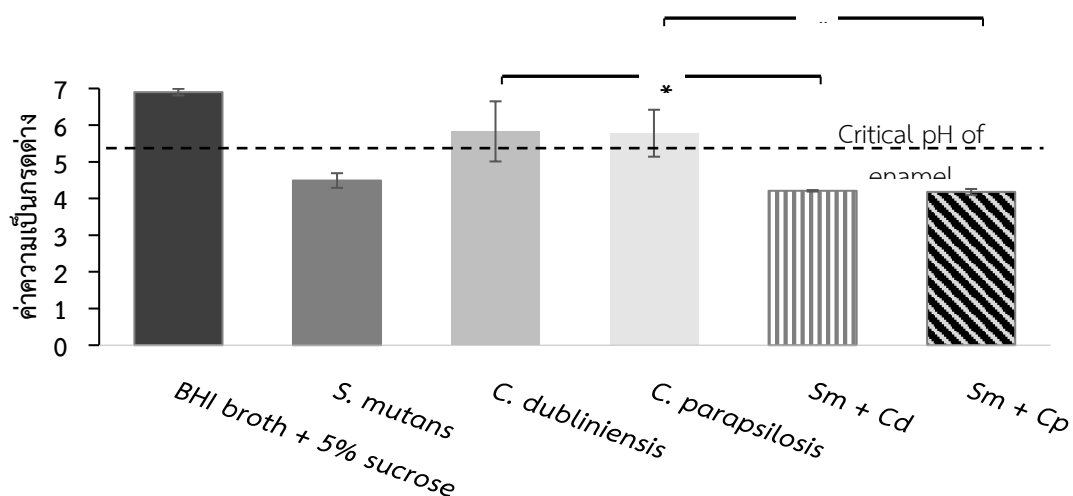
$$\text{อัตราส่วนของมวลไบโอฟิล์มของเชื้อผสม} = \frac{\text{OD}_{520\text{nm}} \text{ ของไบโอฟิล์มของเชื้อผสม}}{\text{OD}_{520\text{nm}} \text{ ของไบโอฟิล์มของ } S. \text{ mutans} + \text{OD}_{520\text{nm}} \text{ ของไบโอฟิล์มของ } Candida}$$

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics 23.0 โดยความเป็นกรดของไบโอฟิล์มและมวลไบโอฟิล์มถูกนำไปทดสอบการแจกแจงโดยใช้ Shapiro-Wilk test สำหรับค่าความเป็นกรดของไบโอฟิล์ม พบว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ จึงวิเคราะห์เปรียบเทียบความเป็นกรดของไบโอฟิล์มโดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test และตามด้วย Dunn-Bonferroni (pairwise comparisons) สำหรับมวลไบโอฟิล์มพบว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ จึงวิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราส่วนของมวลไบโอฟิล์มระหว่างเชื้อเดี่ยวกับเชื้อผสมแต่ละคู่โดยใช้สถิติ T-test โดยการวิเคราะห์ถูกกำหนดระดับนัยสำคัญไว้ที่ 0.05

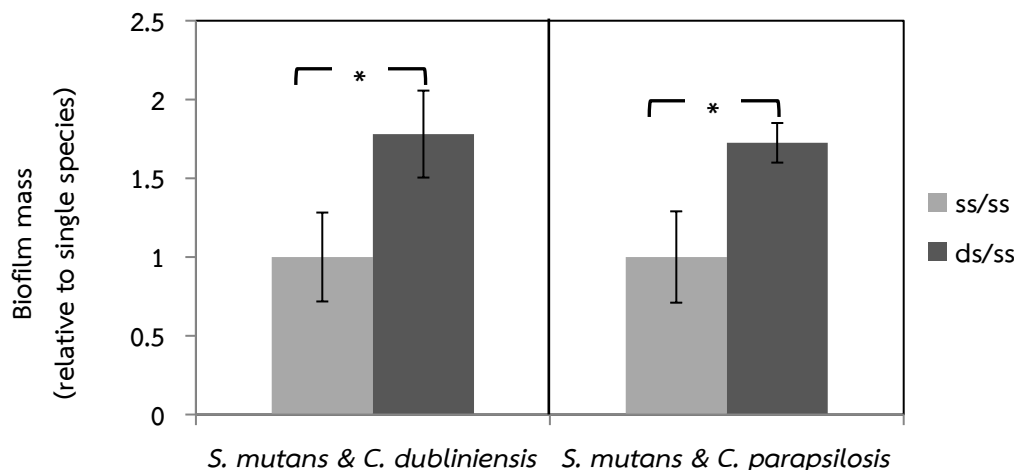
ผลการวิจัย

ค่าเฉลี่ยความเป็นกรดต่างของไบโอฟิล์มของเชื้อเดี่ยว *S. mutans*, *C. dubliniensis* และ *C. parapsilosis* มีค่า 4.49 ± 0.20 , 5.83 ± 0.82 และ 5.78 ± 0.64 ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยความเป็นกรดต่างของไบโอฟิล์มแบบเชื้อผสมระหว่าง *S. mutans* และ *C. dubliniensis* มีค่าเท่ากับ 4.2 ± 0.02 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าของ *S. mutans* และ *C. parapsilosis* ที่มีค่าเท่ากับ 4.18 ± 0.08 ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าความเป็นกรดต่างของไบโอฟิล์มแบบเชื้อผสม *S. mutans* และ *C. dubliniensis* หรือ *S. mutans* และ *C. parapsilosis* มีค่าแตกต่างจากค่าความเป็นกรดต่างของเชื้อ *Candida* เดี่ยวสายพันธุ์ที่ตรงกับ *Candida* ในเชื้อผสมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.006$ และ $P = 0.001$ ตามลำดับ) แต่ไม่แตกต่างจากเชื้อ *S. mutans* เดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ภาพแสดงค่าเฉลี่ยความเป็นกรดต่าง และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ *S. mutans* (*Sm*), *C. dubliniensis* (*Cd*) และ *C. parapsilosis* (*Cp*) ไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม เครื่องหมายดอกจัน (*) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์มวลไบโอฟิล์มพบว่าอัตราส่วนของมวลไบโอฟิล์มแบบเชื้อผสมต่อเชื้อเดี่ยวของ *S. mutans* กับ *C. dubliniensis* และ *S. mutans* กับ *C. parapsilosis* มีค่า 1.80 ± 0.28 และ 1.70 ± 0.13 ตามลำดับ ซึ่งมีความมากกว่าอัตราส่วนของมวลไบโอฟิล์มของเชื้อเดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.03$ และ $P = 0.02$ ตามลำดับ) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ภาพแสดงค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของมวลไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยวรวมกัน (สีเทาอ่อน) และอัตราส่วนของมวลไบโอฟิล์มแบบเชื้อผสม (สีเทาเข้ม) ต่อผลรวมของมวลไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยวรวมกัน โดย ss = เชื้อเดี่ยว (single species) และ ds = เชื้อผสม (dual species) เครื่องหมายดอกจัน (*) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการเพื่อศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันระหว่าง *Non-albicans Candida* species กับ *Streptococcus mutans* ต่อการสร้างกรด และการสร้างไบโอฟิล์มซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคฟันผุ จากการทดลองทั้งหมดพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อให้สร้างไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยวเป็นเวลา 36 ชั่วโมง *S. mutans* ให้ค่าความเป็นกรดต่างที่ต่ำกว่าค่าความเป็นกรดต่างวิกฤตของผิวเคลือบฟัน (critical pH of enamel = 5.5) ซึ่งเป็นสาเหตุเริ่มต้นของการสูญเสียแร่ธาตุออกจากเคลือบฟัน หากปล่อยทิ้งไว้ก็จะนำไปสู่การเกิดฟันผุในที่สุด ในขณะที่ค่าความเป็นกรดต่างของไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยวของ *C. dubliniensis* และ *C. parapsilosis* มีค่าสูงกว่าค่าความเป็นกรดต่างวิกฤตของผิวเคลือบฟัน แต่เมื่อนำเชื้อราทั้งสองชนิดนี้มาเลี้ยงร่วมกับ *S. mutans* แล้วพบว่าทำให้ค่าความเป็นกรดต่างของไบโอฟิล์มแบบเชื้อผสมต่ำกว่าเชื้อ *S. mutans* เดี่ยว แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับผลการวัดมวลไบโอฟิล์มพบว่า อัตราส่วนของมวลไบโอฟิล์มแบบเชื้อผสมต่อผลรวมของมวลไบโอฟิล์มแบบเชื้อเดี่ยว มีความมากกว่าค่าของเชื้อเดี่ยวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลทั้งสองนี้แสดงให้เห็นว่าการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *S. mutans* กับ *Non-albicans Candida* species ทั้งสองชนิดนี้ส่งผลต่อการผลิตกรด และการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งค่าความเป็นกรดต่างที่ต่ำลง และมวลไบโอฟิล์มที่เพิ่มขึ้น สามารถส่งผลให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดฟันผุได้มากยิ่งขึ้นในสถานะที่มีน้ำตาลซูโครส ซึ่งเทียบได้กับการที่รับประทานอาหารหวาน

ผลจากการศึกษานี้พบว่าการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *C. dubliniensis* และ *C. parapsilosis* กับ *S. mutans* ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการศึกษาการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *C. albicans* กับ *S. mutans* ซึ่งพบว่ามีค่าความเป็นกรดต่างต่ำลง และมีปริมาณของไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว (Barbosa et al., 2016; Sampaio et al., 2019) งานวิจัยเกี่ยวกับกลไกของการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *C. albicans* กับ *S. mutans* พบว่าเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ glucosyltransferase (GTFs) ที่สร้างจาก *S. mutans* ไปจับกับ Mannan ซึ่งเป็นโครงสร้างบนผนังเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ *C. albicans* ส่งผลให้ *C. albicans* มีคุณสมบัติเป็น glucan producer ทำให้มีการสร้างไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อทั้งสองชนิดอยู่ร่วมกัน (Falsetta

et al., 2014; Hwang et al., 2017) แต่เนื่องจากโครงสร้าง Mannan บนผิวของ *C. dubliniensis* และ *C. parapsilosis* มีความแตกต่างจาก Mannan ของ *C. albicans* (Ližičárová, Matulová, Capek, & Machová, 2007; Shibata et al., 1995) ดังนั้นการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *S. mutans* กับ Non-*albicans Candida* species ทั้งสองชนิดนี้ อาจอาศัยกลไกที่แตกต่างจากการอยู่ร่วมกับเชื้อ *C. albicans* ซึ่งยังต้องทำการศึกษาต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำไปใช้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ในระดับกลไกระหว่างเชื้อ *S. mutans* และ Non-*albicans Candida* species ในการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคฟันผุ ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจกลไกการเกิดโรคที่ชัดเจน และการพัฒนาวิธีการป้องกัน และการรักษาโรคฟันผุที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Al-Ahmad, A., Auschill, T. M., Dakhel, R., Wittmer, A., Pelz, K., Heumann, C., . . . Arweiler, N. B. (2016). Prevalence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in caries-free and caries-active children in relation to the oral microbiota-a clinical study. *Clin Oral Investig*, 20(8), 1963-1971. doi:10.1007/s00784-015-1696-9
- Anil, S., & Anand, P. S. (2017). Early Childhood Caries: Prevalence, Risk Factors, and Prevention. *Front Pediatr*, 5, 157. doi:10.3389/fped.2017.00157
- Barbosa, J. O., Rossoni, R. D., Vilela, S. F., de Alvarenga, J. A., Velloso Mdos, S., Prata, M. C., . . . Junqueira, J. C. (2016). *Streptococcus mutans* Can Modulate Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of *Candida albicans*. *PLoS One*, 11(3), e0150457. doi:10.1371/journal.pone.0150457
- de Carvalho, F. G., Silva, D. S., Hebling, J., Spolidorio, L. C., & Spolidorio, D. M. (2006). Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol*, 51(11), 1024-1028. doi:10.1016/j.archoralbio.2006.06.001
- Falsetta, M. L., Klein, M. I., Colonne, P. M., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Pai, C. H., . . . Koo, H. (2014). Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*, 82(5), 1968-1981. doi:10.1128/IAI.00087-14
- Forssten, S. D., Bjorklund, M., & Ouwehand, A. C. (2010). *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients*, 2(3), 290-298. doi:10.3390/nu2030290
- Hwang, G., Liu, Y., Kim, D., Li, Y., Krysan, D. J., & Koo, H. (2017). *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development in vivo. *PLoS Pathog*, 13(6), e1006407. doi:10.1371/journal.ppat.1006407
- Kawada-Matsuo, M., Oogai, Y., & Komatsuzawa, H. (2016). Sugar Allocation to Metabolic Pathways is Tightly Regulated and Affects the Virulence of *Streptococcus mutans*. *Genes*, 8(1), 11. doi:10.3390/genes8010011
- Ližičárová, I., Matulová, M., Capek, P., & Machová, E. (2007). Human pathogen *Candida dubliniensis*: A cell wall mannan with a high content of β -1,2-linked mannose residues. *Carbohydrate Polymers*, 70(1), 89-100. doi:10.1016/j.carbpol.2007.03.007
- Lozano Moraga, C. P., Rodriguez Martinez, G. A., Lefimil Puente, C. A., Morales Bozo, I. C., & Urzua Orellana, B. R. (2017). Prevalence of *Candida albicans* and carriage of *Candida non-albicans* in the saliva of preschool children, according to their caries status. *Acta Odontol Scand*, 75(1), 30-35. doi:10.1080/00016357.2016.1244560

- Owotade, F. J., Patel, M., Ralephenya, T. R., & Vergotine, G. (2013). Oral *Candida* colonization in HIV-positive women: associated factors and changes following antiretroviral therapy. *J Med Microbiol*, 62(Pt 1), 126-132. doi:10.1099/jmm.0.047522-0
- Papadimitriou-Olivgeris, M., Spiliopoulou, A., Kolonitsiou, F., Bartzavali, C., Lambropoulou, A., Xaplanteri, P., . . . Christofidou, M. (2019). Increasing incidence of candidaemia and shifting epidemiology in favor of *Candida non-albicans* in a 9-year period (2009-2017) in a university Greek hospital. *Infection*, 47(2), 209-216. doi:10.1007/s15010-018-1217-2
- Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., . . . Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17030. doi:10.1038/nrdp.2017.30
- Sadeghi, G., Ebrahimi-Rad, M., Mousavi, S. F., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Emergence of non-*Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. *J Mycol Med*, 28(1), 51-58. doi:10.1016/j.mycmed.2017.12.008
- Sampaio, A. A., Souza, S. E., Ricomini-Filho, A. P., Del Bel Cury, A. A., Cavalcanti, Y. W., & Cury, J. A. (2019). *Candida albicans* Increases Dentine Demineralization Provoked by *Streptococcus mutans* Biofilm. *Caries Res*, 53(3), 322-331. doi:10.1159/000494033
- Shibata, N., Ikuta, K., Imai, T., Satoh, Y., Satoh, R., Suzuki, A., . . . Suzuki, S. (1995). Existence of Branched Side Chains in the Cell Wall Mannan of Pathogenic Yeast, *Candida albicans*: STRUCTURE-ANTIGENICITY RELATIONSHIP BETWEEN THE CELL WALL MANNANS OF *CANDIDA ALBICANS* AND *CANDIDA PARAPSILOSIS*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 1113-1122. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/270/3/1113.abstract>
- Xiao, J., Grier, A., Faustoferri, R. C., Alzoubi, S., Gill, A. L., Feng, C., . . . Gill, S. R. (2018). Association between Oral *Candida* and Bacteriome in Children with Severe ECC. *J Dent Res*, 97(13), 1468-1476. doi:10.1177/0022034518790941

การศึกษาเบื้องต้นถึงความหลากหลายชนิดและสังคมพืชในป่าผลัดใบภายหลังการสัมปทานทำไม้ บริเวณป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้าง อำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง

ชัตนารี มีสุขโข*

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง

*Corresponding author. E-mail: cmeesukko@hotmail.com

บทคัดย่อ

แนวคิดเรื่องป่าชุมชนเป็นแนวทางในการดูแลรักษาป่าที่ให้ความสำคัญกับชุมชนซึ่งอาศัยและใช้ประโยชน์อยู่ในพื้นที่ แนวคิดนี้ได้รับความสนใจและปฏิบัติอย่างแพร่หลายมาสิบปี โดยเฉพาะในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาที่มีทรัพยากรป่าไม้เป็นฐานการผลิต สำหรับประเทศไทย แนวคิดเรื่องป่าชุมชนมีความสำคัญเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการประกาศเขตพื้นที่ป่าชุมชนที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายชนิดและสังคมไม้นิเวศของป่าผลัดใบภายหลังการสัมปทานทำไม้ โดยเปรียบเทียบป่าที่มีการฟื้นตัวตามธรรมชาติและป่าที่มีการฟื้นฟูโดยชุมชน ซึ่งได้ทำการศึกษาในป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้าง ตำบลแจ้คอน อำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง โดยวางแผนตัวอย่างขนาด 40x40 ตารางเมตร จำนวน 8 แปลง บันทึกชนิดพรรณไม้ต้นและวัดเส้นรอบวงที่ความสูงเพียงอกและวิเคราะห์ค่าดัชนีทางนิเวศวิทยา ผลการศึกษาพบ 1) พรรณไม้จำนวน 1,124 ต้น จำแนกเป็น 25 วงศ์ 36 สกุล 47 ชนิด โดยมีค่าพื้นที่หน้าตัดไม้ต้นของป่าที่ฟื้นตัวตามธรรมชาติและป่าที่ฟื้นฟูโดยชุมชนมีค่าเท่ากับ 9.872 และ 11.242 ตารางเมตรต่อไร่ ตามลำดับ 2) ดัชนีความสำคัญ (IVI) ของไม้ยืนต้นในสังคมป่าที่มีการฟื้นตัวตามธรรมชาติที่มีค่าสูงสุด 5 ลำดับแรก ได้แก่ กูก (Lansea coromandelica (Houtt.) Merr.) ประดู่ (Pterocarpus macrocarpus Kurz.) เต็ง (Shorea obtusa Wall. ex Blume.) ค่าเจ้าะ (Millettia kangensis Craib.) และ ปี่ (Dalbergia cultrata Grah.ex Berth.) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 45.88, 40.41, 24.71, 18.65 และ 17.02 ตามลำดับ และในสังคมป่าที่ฟื้นฟูโดยชุมชนมีค่าดัชนีความสำคัญสูงสุด 5 ลำดับแรก ได้แก่ ได้แก่ สักทอง (Ectona grandis Linn.) กูก (Lansea coromandelica (Houtt.) Merr.) ประดู่ (Pterocarpus macrocarpus Kurz.) เต็ง (Shorea obtusa Wall. ex Blume.) และตะแบกเลือด (Terminalia corticosa Pierre ex Laness.) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 65.57, 34.29, 18.95, 18.62 และ 16.77 ตามลำดับ และ 3) ดัชนีความหลากหลายของพรรณไม้ตามสูตร Shannon-Weiner ของป่าที่มีการฟื้นตัวตามธรรมชาติและป่าที่ผ่านฟื้นฟูโดยชุมชนมีค่าเท่ากับ 3.021 และ 2.367 ตามลำดับ และค่าดัชนีความสม่ำเสมอมีค่าเท่ากับ 0.698 และ 2.376 ตามลำดับ สำหรับแนวทางการจัดการเบื้องต้นนั้นควรปล่อยให้มีการกระบวนการทดแทนตามธรรมชาติต่อไปและควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในด้านการใช้ประโยชน์ทรัพยากรของชาวบ้านและสถานภาพทางเศรษฐกิจและสังคมอันเกี่ยวข้องกับป่าชุมชนแห่งนี้ เพื่อประกอบการวางแผนในการจัดการพื้นที่ป่าอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: ป่าผลัดใบ ความหลากหลายชนิด สัมปทานป่าไม้ จังหวัดลำปาง

The Preliminary Study of Speices Diversity and Plant Community of the Deciduous Forest after Logging Concession in Ban-Thung-Hang Community Forest, Lampang Province

Chatnaree Meesukko*

Faculty of Science, Lampang Rajabhat University

*Corresponding author. E-mail: cmeesukko@hotmail.com

Abstract

The concept of community forest, which underlies the significance of local community has been widely accepted and implemented in developing countries, where product based on the forest resources. For Thailand, the role of community forest has become important for decades, and the number of community forests has been increasing in every year. This research aims to study species diversity and tree community of the deciduous forest after logging concession. To compare of natural regeneration and reforested forests that allow Ban-Tung-Hang, a small community forest in Lampang province. The 8 main sample plots with side 40x40 m² were set in the area. The results showed that 1) 1,124 trees were identified into 25 families, 36 genera and 47 species. Basal area of natural regeneration and reforested forests were 9.872 and 11.242 m²/rai, respectively 2) Important Value Index showed the most important plants of natural regeneration forest to be *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merr.) , *Pterocarpus macrocarpus* Kurz., *Shorea obtusa* Wall. ex Blume., *Millettia kangensis* Craib., and *Dalbergia cultrata* Grah.ex Berth, and the values were 45.88, 40.41, 24.71, 18.65 and 17.02, respectively. While Important Value Index showed the most important plants of reforested forests to be *Ectona grandis* Linn., *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merr., *Millettia kangensis* Craib., *Shorea obtusa* Wall. ex Blume. and *Terminalia corticosa* Pierre ex Laness., and the values were 65.57, 34.29, 18.95, 18.62 and 16.77, respectively. 3) Shannon-Weiner Index of diversity of natural regeneration and reforested forests were 3.021 and 2.367 respectively, while Evenness Indexes were 0.698 and 0.548, respectively. For the initial of management plan, this area should be conserved through the natural processes. Moreover, the study of socio-economic status of the village and forest resources utilization should be conducted for the purpose of sustainable forest management.

Keywords: deciduous forest, speices diversity, logging concession, Lampang

บทนำ

ในอดีตที่ผ่านมาประเทศไทยได้มีการอนุญาตสัมปทานทำไม้กระจายไปในพื้นที่ป่าทั่วทุกภาค โดยเฉพาะในพื้นที่ป่าภาคเหนือซึ่งอุดมไปด้วยป่าไม้ที่มีค่าทางเศรษฐกิจ แม้ว่ารัฐบาลได้มีการปิดป่าสัมปทานลงในช่วงปี พ.ศ. 2532 และมีการส่งมอบพื้นที่ให้กับหน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้องดูแลต่อไป อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการปลูกไม้ตามเงื่อนไขสัมปทานยังขาดการจัดการที่เหมาะสมทั้งไม้ที่ปลูกขึ้นและไม่ตัดเดิมที่ขึ้นทดแทนตามธรรมชาติทำให้ความหลากหลายของชนิดพรรณไม้ในท้องถิ่นยังมีอยู่ค่อนข้างน้อย ส่งผลต่อผลผลิตและคุณภาพของป่า นอกจากนี้การลักลอบตัดไม้ในแหล่งป่าไม้ธรรมชาติยังคงมีปรากฏให้เห็นอย่างต่อเนื่อง

ป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้างอยู่ในเขตชุมชนบ้านทุ่งฮ้าง ตำบลทุ่งผิง อำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง ซึ่งจัดเป็นป่าชุมชนต้นน้ำขนาดเล็ก มีพื้นที่รวม 2500 ไร่ มีลักษณะภูมิประเทศเป็นภูเขาเนินสูงต่ำสลับกัน โดยทางด้านทิศใต้พื้นที่ค่อนข้างเป็นที่ราบและมีความลาดชันต่ำซึ่งเป็นบริเวณที่ตั้งของหมู่บ้าน (ภาพที่ 1) ภายหลังจากที่รัฐบาลประกาศการปิดป่าสัมปทานในช่วงปี พ.ศ. 2532 ทำให้พื้นที่ป่าสัมปทานทยอยปิดตัวลงตามกำหนด ส่งผลทำให้พื้นที่ป่าบริเวณนี้มีการทำไม้และเร่งนำไม้มีค่าออกจากป่าในอัตราสูงกว่าเดิมมาก โดยมีนายทุนจากต่างถิ่นในจังหวัดใกล้เคียงเข้ามาตัดถลุงผลประโยชน์จากการป่ากันอย่างกว้างขวาง จนประมาณปลายปี พ.ศ. 2536 จึงหมดระยะสัมปทานทำไม้ไปพร้อมๆ กับสภาพป่าที่เสียหายอย่างมาก หลังจากนั้นไม่นานพื้นที่ป่าก็เกิดสภาพความแห้งแล้งและขาดความอุดมสมบูรณ์อย่างชัดเจน พืชผลทางการเกษตรของชาวบ้านเสียหายอย่างต่อเนื่องและรุนแรงยิ่งขึ้นทุกปี จนชาวบ้านถึงขั้นต้องซื้อข้าวสารและน้ำเพื่อการอุปโภคจากแหล่งพื้นที่อื่น กระทั่งในราวปี พ.ศ. 2539 กลุ่มแกนนำชุมชนและปราชญ์ชาวบ้าน นำโดย นายชาญ จานแก้ว (ซึ่งดำรงตำแหน่งผู้ใหญ่บ้านในขณะนั้นจนถึงปัจจุบัน) เกิดความตระหนักถึงสาเหตุแห่งการเกิดสภาพความแห้งแล้ง จึงได้มีการรวมกลุ่มหารือระดมความคิดเห็นและคิดวิเคราะห์แนวทางแก้ไขปัญหาคความแห้งแล้งที่เกิดขึ้นในพื้นที่ โดยได้น้อมนำศาสตร์ของพระราชประกอบกับข้อมูลจากการเฝ้าสังเกตการเปลี่ยนแปลงของทรัพยากรและสภาพแวดล้อมในชุมชน และเริ่มร่วมกันพัฒนาฟื้นฟูผืนป่าอย่างต่อเนื่องด้วยวิธีการที่หลากหลาย ทั้งการปลูกไม้เสริมทดแทน การทำฝายขนาดเล็ก การบริหารจัดการน้ำโดยชุมชน รวมถึงการพัฒนาด้านอาชีพทำกินที่หลากหลายมากขึ้น มีการออกข้อปฏิบัติร่วมกันในการเข้าใช้ทรัพยากรป่าและมีการกำหนดแบ่งพื้นที่ป่าเสื่อมโทรมหลังการสัมปทานมาทำการฟื้นฟูอย่างต่อเนื่องโดยสมาชิกในชุมชน และยังคงดำเนินการต่อเนื่องมาจวบกระทั่งปัจจุบันผ่านมากกว่า 20 ปี พื้นที่ป่าจึงได้รับการฟื้นตัวทั้งจากกระบวนการทดแทนทางธรรมชาติ และจากการจัดการฟื้นฟูโดยชุมชน ผืนป่าจึงกลับมามีความอุดมสมบูรณ์มากขึ้น ทั้งยังสามารถอำนวยความสะดวกตลอดทั้งปี ส่งผลให้พืชผลทางการเกษตรและปศุสัตว์ได้ผลดีขึ้นอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม ชุมชนยังมีความต้องการพัฒนาพื้นที่ป่าให้มีความอุดมสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ต้องการให้มีการปรับตัวเพื่อรองรับการพัฒนาด้านการท่องเที่ยว รวมถึงชุมชนยังมีความต้องการพัฒนาพื้นที่ป่าที่ค่อนข้างเสื่อมโทรมและเกิดไฟป่าซ้ำซากยากต่อการฟื้นฟูที่มีอยู่โดยรอบพื้นที่ชุมชน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายชนิดและสังคมไม้ยืนต้นในผืนป่า และเปรียบเทียบองค์ประกอบของชนิดไม้ยืนต้นในพื้นที่ป่าที่มีการฟื้นตัวตามธรรมชาติและพื้นที่ป่าที่มีการฟื้นฟูโดยชุมชน โดยจะจัดให้มีการค้นข้อมูลสู่ชุมชนในลำดับต่อไป สำหรับข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบถึงสถานภาพทางนิเวศวิทยาป่าไม้เบื้องต้น อันจะช่วยให้การวางแผนการใช้ประโยชน์ การติดตามเฝ้าระวังชนิดพันธุ์ที่มีคุณค่า มีน้อยหรือหายาก รวมถึงวางแผนในการเลือกพื้นที่ศึกษาเพิ่มเติมด้านอื่นๆ ซึ่งจะนำไปสู่การวางแผนการจัดการที่เหมาะสมและเกิดประโยชน์แก่ชุมชนต่อไป



ภาพที่ 1 แสดงพื้นที่ป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้าง ตำบลทุ่งผิ้ว อำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายชนิดและสังคมไม้ยืนต้นในป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้างภายหลังการสัมปทานทำไม้
2. เปรียบเทียบองค์ประกอบของสังคมป่าที่มีการฟื้นตัวตามธรรมชาติและพื้นที่ป่าที่ผ่านการฟื้นฟูโดยชุมชน

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ดำเนินการในช่วงเดือนพฤษภาคม 2560 ถึง เมษายน 2561 ในบริเวณป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้าง ตำบลแจ้คอน อำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง โดยการวางแปลงตัวอย่างขนาด 40x40 ตารางเมตร กระจายในพื้นที่ป่าที่มีการฟื้นตัวตามธรรมชาติ จำนวน 4 แปลง และพื้นที่ป่าที่มีการฟื้นฟูโดยชุมชนจำนวน 4 แปลง รวมจำนวน 8 แปลง ทำการศึกษาข้อมูลไม้ใหญ่ (tree)

โดยทำการวัดเส้นรอบวงของต้นไม้ที่มีความสูงตั้งแต่ 130 เซนติเมตร เพื่อคำนวณหาเส้นผ่านศูนย์กลางระดับอก ทำการวัดต้นไม้ที่มีเส้นรอบวงตั้งแต่ 15 เซนติเมตร (หรือมี DBH 5.0 เซนติเมตร) จำแนกชนิดพรรณพืชตามชื่อพื้นเมืองโดยอาศัยผู้เชี่ยวชาญในพื้นที่ จากนั้นทำตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ โดยใช้คู่มือจำแนกพรรณพืช (เต็ม สมิตินันท์, 2544 ; Gardner et al.,) เก็บตัวอย่างพืชที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้มาตรวจสอบกับตัวอย่างพรรณพืชในพิพิธภัณฑ์พืชต่อไป นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ค่าความหนาแน่นสัมพัทธ์ (Relative Dominant = RD) ความถี่สัมพัทธ์ (Relative Frequency = RF) ความเด่นสัมพัทธ์ (Relative Dominance = R Do) ดัชนีความสำคัญ (Important Value Index : IVI) (อุทิศ กุญอินทร์, 2542) ค่าดัชนีความหลากหลายชนิด (Shannon- Wiener Index H') (Shannon and Wiener, 1949) และค่าดัชนีความสม่ำเสมอ (Evenness Index : E) (Hill, 1973)

ผลการวิจัย

จากการศึกษาพรรณไม้ในบริเวณป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้างพบไม้ยืนต้นทั้งหมด 25 วงศ์ 36 สกุล 47 ชนิด (ตารางที่ 1) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายชนิดพบว่า สังคมป่าที่มีการฟื้นตัวตามธรรมชาติพบไม้ยืนต้นจำนวน 43 ชนิด ในขณะที่สังคมป่าที่ฟื้นฟูโดยชุมชนพบจำนวน 41 ชนิด โดยวงศ์ที่สำรวจพบมากที่สุด คือวงศ์ LEGUMINOSAE หรือพืชวงศ์ถั่ว พบทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ ประดู่ ปี่ มะขาม มะค่าโมง ส้มเสี้ยว และเสี้ยวป่า

ตารางที่ 1 แสดงชนิดพันธุ์ไม้ยืนต้นที่พบในป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้าง ตำบลทุ่งผิ้ว อำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง

ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์
กูก	<i>Lannea coromandelica</i> (Houtt.) Merr.	ANACARDIACEAE
เก๋ม	<i>Canarium sabulatum</i> Guillaumin.	BURSERACEAE
ค่าเจ้าะ	<i>Millettia kangensis</i> Craib	PAPILIONACEAE
เคาะโซค	<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Oken	SAPINDACEAE
เคาะพาน	<i>Schleichera</i> sp.	SAPINDACEAE
แคป้า	<i>Dolichandrone serrulata</i> (DC.) Seem.	BIGNONIACEAE
จิวป่า	<i>Bombax insigne</i> Wall.	BOMBACOIDEAE
จี่	<i>Ceriscoides turgida</i> (Roxb.) Tirveng.	RUBIACEAE
แดง	<i>Tectona grandis</i> Linn.f.	VERBENACEAE
ตะแบกเลือด	<i>Terminalia corticosa</i> Pierre ex Laness.	COMBRETACEAE
ตับเต่า	<i>Diospyros ehretioides</i> Wall. ex G.Don	EBENACEAE
ติ้ว	<i>Cratoxylum formosum</i> (Jacq.) Benth.	HYPERICACEAE
ตีนนก	<i>Vitex pinnata</i> Linn	LAMIACEAE
ตั่ง	<i>Strychnos nux-blanda</i> A.W. Hill	STRYCHNACEAE
ตุ้ม	<i>Haldina cordifolia</i> (Roxb.) Ridsdale	RUBIACEAE
เต็ง	<i>Shorea obtusa</i> Wall. ex Blume	DIPTEROCAPACEAE
แตงหนาม	<i>Shorea</i> sp.	DIPTEROCAPACEAE
ถ่านไฟสี	<i>Diospyros montana</i> Roxb.	EBENACEAE
ไทร	<i>Ficus annulata</i> BL.	MORACEAE
ประดู่	<i>Pterocarpus macrocarpus</i> Kurz.	LEGUMINOSAE
ประดู่ขาว	<i>Terminalia nigrovenulosa</i> Pierre ex Laness	COMBRETACEAE
ปอຍาย	<i>Sterculia</i> sp.	MORACEAE
ปี่	<i>Dalbergia cultrata</i> Grah.ex Berth.	LEGUMINOSAE
ปู่เจ้า	<i>Terminalia triptera</i> Stapf.	COMBRETACEAE
เปาเตี้ย	<i>Shorea</i> sp.	DIPTEROCAPACEAE
โปยสักแอน	<i>Lagerstroemia</i> sp.	LYTHRACEAE
ผักตืด	<i>Albizia lebbeck</i> (L.) Benth.	FABACEAE
มะกอกป่า	<i>Spondias bipinnata</i> (L. f.) Kurz.	ANACARDIACEAE
มะก้าตัน	<i>Adenanthra pavonina</i> L.	MIMOSACEAE
มะเกลือ	<i>Diospyros mollis</i> Griff.	EBENACEAE
มะขาม	<i>Tamarindus indica</i> L.	LEGUMINOSAE
มะค่าโมง	<i>Afzelia xylocarpa</i> (Kurz) Craib.	LEGUMINOSAE
มะตูม	<i>Aegle marmelos</i> (L.) Correa	RUTACEAE
มะเฒ่า	<i>Antidesma ghaesembilla</i> Gaertn.	EUPHORBIACEAE
มะยมหิน	<i>Chukrasia tabularis</i> A. Juss.	MELIACEAE

มันปลา	<i>Fagraea fragrans</i> Roxb.	GENTIANACEAE
มานะ	<i>Terminalia bellirica</i> (Gaertn.) Roxb.	COMBRETACEAE
ยอป่า	<i>Morinda coreia</i> Ham.	RUBIACEAE
รกฟ้า	<i>Terminalia alata</i> Heyne ex Roth.	COMBRETACEAE
ราชพฤกษ์	<i>Cassia fistula</i> Linn.	FABACEAE
ลัก	<i>Gluta usitata</i> (Wall.) Ding Hou	ANACARDIACEAE
วืด	<i>Garuga pinnata</i> Roxb.	BURSERACEAE
ส้มเสี้ยน	<i>Bauhinia malabarica</i> roxb.	LEGUMINOSAE
ลักทอง	<i>Ectona grandis</i> Linn.	LABIATAE
เส้า	<i>Lagerstroemia loudoni</i> Teijsm. & Binn.	LYTHRACEAE
เสี้ยวป่า	<i>Bauhinia saccocalyx</i> Pierre.	LEGUMINOSAE
เหมือด	<i>Memecylon edule</i> Roxb.	MELASTOMATACEAE

จากการวางแผนสำรวจพรรณไม้ พบว่าพรรณไม้ต้นของสังคมป่าที่พื้นตัวตามธรรมชาติมีค่าความหนาแน่นเท่ากับ 163.75 ต้นต่อไร่ โดยพบว่า กูก (Lansea coromandelica (Houtt.) Merr.) มีความหนาแน่นสูงสุดที่ 33.50 ต้นต่อไร่ และพรรณไม้ต้นของสังคมป่าที่พื้นฟูโดยชุมชนมีความหนาแน่นเท่ากับ 117.25 ต้นต่อไร่ โดยที่ สักทอง (Ectona grandis Linn.) มีความหนาแน่นสูงสุดที่ 27.75 ต้นต่อไร่ ทั้งนี้เนื่องจากชุมชนมีการปลูกป่าทดแทนป่าเสื่อมโทรมอย่างต่อเนื่อง โดยมักเลือกปลูกไม้สักทอง เพราะเห็นว่าเป็นไม้ดั้งเดิมที่มีค่าทางเศรษฐกิจประกอบกับเป็นชนิดพรรณไม้ที่เจริญเติบโตอยู่แล้วในท้องถิ่น สามารถเก็บเมล็ดมาเพาะกล้าไม้ได้ง่าย และกล้าไม้มีความทนทานต่อสภาพความแห้งแล้งในช่วงฤดูร้อนได้ดี โดยชุมชนมีการจัดการถางตัดหญ้าพืชพื้นล่างอย่างสม่ำเสมอ ทำให้พืชชนิดอื่นงอกและเจริญเติบโตได้ยาก จึงพบสักทองมีจำนวนต้นต่อไร่สูงกว่าชนิดพรรณอื่นในสังคมป่าที่พื้นฟูโดยชุมชน โดยเมื่อเปรียบเทียบการศึกษาของณัฐวัฒน์ คลังทรัพย์ และคณะ (2556) ซึ่งสำรวจบริเวณป่าดิบแล้งภายหลังการสัมปทานทำไม้ในพื้นที่สถานีวิจัยและฝึกอบรมวนเกษตรตราราด จังหวัดตราราดภายหลังมีการปลูกทดแทนตามเงื่อนไขสัมปทานป่าไม้มานาน 35 ปี พบว่า ความหนาแน่นของไม้ยืนต้นมีค่าเท่ากับ 186.08 ต้นต่อไร่ และมีไม้กระพุ่ม (Anthocephalus chinensis) มีความหนาแน่นสูงสุด

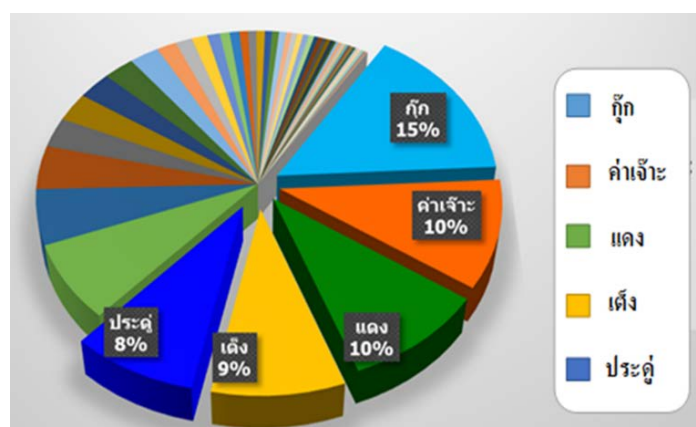
เมื่อพิจารณาด้านพื้นที่หน้าตัดพรรณไม้ (Basal Area) พบว่าสังคมป่าที่พื้นฟูโดยชุมชนมีค่าพื้นที่หน้าตัดเท่ากับ 11.242 ตารางเมตรต่อไร่ ซึ่งมีค่าสูงกว่าสังคมป่าที่พื้นตัวตามธรรมชาติที่มีค่าเท่ากับ 9.872 ตารางเมตรต่อไร่ (ตารางที่ 2) โดยพบว่า ในสังคมป่าที่พื้นตัวตามธรรมชาติมีชนิดพรรณไม้เด่นตามสัดส่วนพื้นที่หน้าตัดมากที่สุด 5 ลำดับแรก ได้แก่ กูก (Lansea coromandelica (Houtt.) Merr.) ค่าเจ้าะ (Milletia kangensis Craib.) แดง (Tectona grandis Linn.f.) เต็ง (Shorea obtusa Wall. ex Blume.) และประดู่ (Pterocarpus macrocarpus Kurz.) โดยมีค่าสัดส่วนร้อยละเท่ากับ 15, 10, 10, 9 และ 8 ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ซึ่งกลุ่มพรรณไม้เด่นมีสัดส่วนร้อยละไม่แตกต่างกันมากนัก ในขณะที่สังคมป่าที่พื้นฟูโดยชุมชนมีชนิดพันธุ์ไม้เด่นตามสัดส่วนพื้นที่หน้าตัดมากที่สุด 5 ลำดับแรก ได้แก่ สักทอง (Ectona grandis Linn.) กูก (Lansea coromandelica (Houtt.) Merr.) ค่าเจ้าะ (Milletia kangensis Craib.) เต็ง (Shorea obtusa Wall. ex Blume.) และตะแบกเลือด (Terminalia corticosa Pierre ex Laness.) โดยมีค่าสัดส่วนร้อยละเท่ากับ 22, 15, 14, 8 และ 7 ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ซึ่งกลุ่มพรรณไม้เด่นมีสัดส่วนร้อยละแตกต่างกันมากขึ้น โดยเฉพาะไม้สักทอง รวมถึงกลุ่มพรรณไม้เด่น 5 ลำดับแรก มีสัดส่วนร้อยละสูงขึ้นอย่างชัดเจน โดยเมื่อเปรียบเทียบการศึกษาของณัฐวัฒน์ คลังทรัพย์ และคณะ (2556) ซึ่งสำรวจบริเวณป่าดิบแล้งในจังหวัดตาก ภายหลังมีการปลูกทดแทนตามเงื่อนไข

สัมปทานป่าไม้มานาน 35 ปี พบว่าพื้นที่หน้าตัดพรรณไม้ มีค่าเท่ากับ 7.232 ตารางเมตรต่อไร่ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการศึกษาครั้งนี้

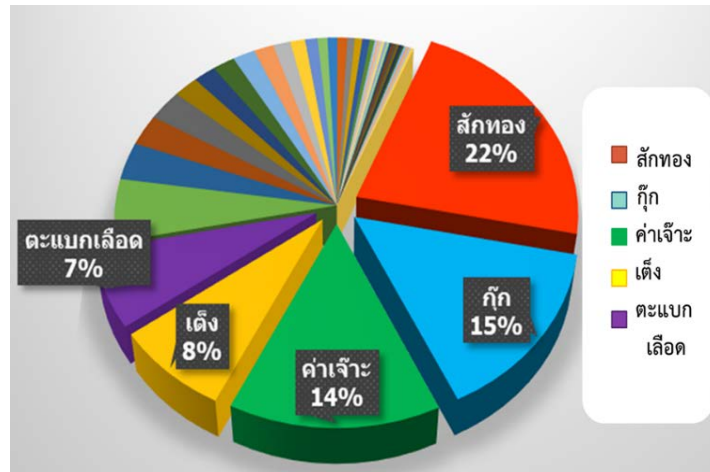
ตารางที่ 2 พื้นที่หน้าตัดพรรณไม้ของป่าผลัดใบภายหลังการสัมปทานทำไม้ บริเวณป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้าง

อำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง

ค่าทางนิเวศวิทยาป่าไม้	สังคมป่าที่ พื้นตัวตามธรรมชาติ	สังคมป่า ที่มีการฟื้นฟูโดยชุมชน
พื้นที่หน้าตัดพรรณไม้ (ตารางเมตรต่อไร่)	9.872	11.242



ภาพที่ 2 แสดงสัดส่วนร้อยละของพื้นที่หน้าตัดพรรณไม้ในสังคมป่าที่พื้นตัวตามธรรมชาติ



ภาพที่ 3 แสดงสัดส่วนร้อยละของพื้นที่หน้าตัดพรรณไม้ในสังคมป่าที่ฟื้นฟูโดยชุมชน

เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความสำคัญ (IVI) ของไม้ยืนต้นพบว่าสังคมป่าที่มีการฟื้นตัวตามธรรมชาติมีค่าดัชนีความสำคัญของพรรณไม้ยืนต้นสูงสุด 5 ลำดับแรก ได้แก่ กุ๊ก (*Lannea coromandelica* (Houtt.) Merr.) ประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz.) เต็ง (*Shorea obtusa* Wall. ex Blume.) ค่าเจ้าะ (*Millettia kangensis* Craib.) และ ปี่ (*Dalbergia cultrata* Grah.ex Berth.) โดยมีค่าเท่ากับ 45.88, 40.41, 24.71, 18.65 และ 17.02 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ในขณะที่สังคมป่าที่มีการฟื้นฟูโดยชุมชนมีค่าดัชนีความสำคัญของพรรณไม้ยืนต้นสูงสุด 5 ลำดับแรก ได้แก่ สักทอง (*Ectona grandis* Linn.) กุ๊ก (*Lannea coromandelica* (Houtt.) Merr.) ประดู่ (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz.) เต็ง (*Shorea obtusa* Wall. ex Blume.) และตะแบกเลือด (*Terminalia corticosa* Pierre ex Laness.) โดยมีค่าเท่ากับ 65.57, 34.29, 18.95, 18.62 และ 16.77 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) โดยค่าดัชนีความสำคัญ (IVI) ของไม้ต้นในสังคมป่ามีลำดับมากน้อยแตกต่างกันได้บ้างเมื่อเทียบกับลำดับชนิดพันธุ์เด่น เนื่องจากชนิดพันธุ์เด่นจะพิจารณาเฉพาะจำนวนต้นเป็นหลัก แต่ค่าดัชนีความสำคัญนั้นจะพิจารณาทั้ง จำนวนต้น ความถี่ที่พบในแปลงสำรวจ และขนาดพื้นที่หน้าตัดไม้ต้น ดังนั้นเมื่อสังคมป่ามีอายุยาวนานขึ้น ค่าดัชนีความสำคัญอาจเปลี่ยนแปลงไปด้วย

ตารางที่ 3 แสดงชนิดพรรณพืชและค่าดัชนีความสำคัญของพรรณไม้ต้นสูงสุด 15 ลำดับแรก ของสังคมป่าที่ฟื้นตัวตามธรรมชาติในป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้าง

ชื่อไทย	ชนิดพรรณพืช	ความ				
		หนาแน่น (ต้นต่อไร่)	RD	RF	Rdo	IVI
กุ๊ก	<i>Lannea coromandelica</i> (Houtt.) Merr.	33.50	20.46	5.19	20.23	45.88
ประดู่	<i>Pterocarpus macrocarpus</i> Kurz.	20.25	12.37	5.19	22.85	40.41
เต็ง	<i>Shorea obtusa</i> Wall. ex Blume	19.50	11.91	3.90	8.90	24.71
ค่าเจ้าะ	<i>Millettia kangensis</i> Craib.	20.25	12.37	2.60	3.69	18.65
ปี่	<i>Dalbergia cultrata</i> Grah.ex Berth.	7.50	4.58	5.19	7.25	17.02
ตะแบกเลือด	<i>Terminalia corticosa</i> Pierre ex Laness.	11.75	7.18	2.60	4.05	13.83
แดง	<i>Tectona grandis</i> Linn.f.	10.25	6.26	3.90	2.11	12.27
มะยมป่า	<i>Chukrasia tabularis</i> A.Juss.	7.75	4.73	2.60	1.78	9.11
มะค่าโมง	<i>Azelia xylocarpa</i> (Kurz) Craib.	1.00	0.61	1.30	6.35	8.26
ตูม	<i>Haldina cordifolia</i> (Roxb.) Ridsdale	4.00	2.44	3.90	1.82	8.16

โปยสักแอน	<i>Lagerstroemia</i> sp.	1.00	0.61	2.60	4.20	7.41
ติ่ง	<i>Strychnos nux-blanda</i> A.W. Hill	3.00	1.83	3.90	0.60	6.33
เก็ม	<i>Canarium sabulatum</i> Guillaumin.	0.25	0.15	5.19	0.60	5.95
วีด	<i>Garuga pinnata</i> Roxb.	1.00	0.61	3.90	0.71	5.22
มะกอกป่า	<i>Spondias bipinnata</i> (L. f.) Kurz.	1.25	0.76	2.59	1.03	4.39

ตารางที่ 4 แสดงชนิดพรรณพืชและค่าดัชนีความสำคัญของพรรณไม้ต้นสูงสุด 15 ลำดับแรก ของสังคมป่าที่ฟื้นฟูโดยชุมชน ในป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้าง

ชื่อไทย	ชนิดพรรณพืช	ความหนาแน่น (ต้นต่อไร่)	RD	RF	Rdo	IVI
สักทอง	<i>Ectona grandis</i> Linn.	27.75	23.67	4.65	37.25	65.57
กูก	<i>Lansea coromandelica</i> (Houtt.) Merr.	18.75	15.99	4.65	13.65	34.29
ประดู่	<i>Pterocarpus macrocarpus</i> Kurz.	6.50	5.54	4.65	8.76	18.95
เต็ง	<i>Shorea obtusa</i> Wall. ex Blume	10.00	8.53	2.33	7.76	18.62
ตะแบกเลือด	<i>Terminalia corticosa</i> Pierre ex Laness.	7.00	5.97	4.65	6.15	16.77
ค่าเจ้าะ	<i>Millettia kangensis</i> Craib.	10.25	8.74	2.33	4.12	15.19
แดง	<i>Tectona grandis</i> Linn.f.	4.75	4.05	4.65	1.79	10.49
โปยสักแอน	<i>Lagerstroemia</i> sp.	3.50	2.99	3.49	2.68	9.16
ดับเต่า	<i>Diospyros ehretioides</i> Wall. ex G.Don	3.50	2.99	4.65	0.76	8.40
วีด	<i>Garuga pinnata</i> Roxb.	1.75	1.49	4.65	1.59	7.73
เคาะโจ๊ก	<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Oken	3.75	3.20	3.49	0.94	7.63
ยมหิน	<i>Chukrasia tabularis</i> A. Juss.	2.50	2.13	3.49	1.47	7.09
มะกอกป่า	<i>Spondias pinnata</i> (L. f.) Kurz	2.25	1.92	3.49	0.57	5.97
ปู่เจ้า	<i>Terminalia triptera</i> Stapf.	1.50	1.28	3.49	0.87	5.64
ปอยาบ	<i>Sterculia</i> sp.	1.00	0.85	3.49	0.88	5.22

เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความหลากหลายชนิดและค่าดัชนีความสม่ำเสมอของชนิดพรรณไม้พบว่า สังคมป่าที่ฟื้นตัวตามธรรมชาติมีค่าดัชนีความหลากหลายชนิดค่อนข้างสูงโดยมีค่าเท่ากับ 3.021 และมีค่าสูงกว่าในสังคมป่าที่ฟื้นฟูโดยชุมชนซึ่งมีค่าเพียง 2.376 นอกจากนี้ค่าความสม่ำเสมอของชนิดพรรณไม้ก็มีความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน โดยในสังคมป่าที่ฟื้นตัวตามธรรมชาติมีค่าดัชนีความสม่ำเสมอของชนิดพรรณไม้เท่ากับ 0.698 สูงกว่าในสังคมป่าที่ฟื้นฟูโดยชุมชนซึ่งมีค่าเพียง 0.548 (ตารางที่ 5) โดยค่าดัชนีความสม่ำเสมอของชนิดพรรณไม้ที่มีค่าเข้าใกล้ 1 มากเท่าใดหมายถึงการบ่งชี้ว่าบริเวณนั้นมีการกระจายตัวของชนิดพรรณต่างๆ เหมือนๆ กัน จึงมีโอกาสมพบเห็นพรรณพืชชนิดต่างๆ ใกล้เคียงกันมากยิ่งขึ้นเท่านั้น โดยเมื่อเปรียบกับงานวิจัยของ จตุฎฐพร เพชรพรหม และคณะ (2556) ซึ่งทำการศึกษาความหลากหลายของพืชพรรณจากป่าชุมชนดอน จังหวัดกาฬสินธุ์พบว่า มีค่าดัชนีความหลากหลายเท่ากับ 3.21 และค่าดัชนีความสม่ำเสมอเท่ากับ 1.02

ตารางที่ 5 ค่าดัชนีความหลากหลายและค่าดัชนีความสม่ำเสมอของชนิดพรรณไม้ในป่าผสมผลัดใบ

ภายหลังการสัมปทานทำไม้ บริเวณป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้าง อำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง

ดัชนี	สังคมป่าที่	สังคมป่า
	พื้นตัวตามธรรมชาติ	ที่มีการฟื้นฟูโดยชุมชน
Shannon- Wiener Index	3.021	2.376
Evenness Index	0.698	0.548

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาพื้นที่ป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้างพบความหลากหลายของไม้ยืนต้น จำแนกเป็น 25 วงศ์ 36 สกุล 47 ชนิด สภาพป่ามีกระบวนการทดแทนเป็นอย่างดี แม้ว่าจากการศึกษาจะพบว่า การจัดการฟื้นฟูป่าไม้ของชุมชน อาจทำให้ความหลากหลายทางชีวภาพลดลงระดับหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับปล่อยให้เกิดการฟื้นฟูตามธรรมชาติ แต่ประโยชน์สำคัญชัดเจนประการหนึ่งคือ เป็นการช่วยเพิ่มพื้นที่ป่าในการกักเก็บคาร์บอนและช่วยเร่งอัตราการทดแทนให้เร็วยิ่งขึ้น เนื่องจากพบว่าป่าที่ชุมชนทำการฟื้นฟูโดยการปลูกไม้สักและมีการดูแลรักษาอย่างต่อเนื่อง มีค่าพื้นที่หน้าตัดพรรณไม้สูงกว่าบริเวณป่าที่ปล่อยให้เกิดการฟื้นฟูตามธรรมชาติ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าป่าเต็งรังที่ถูกรบกวนโดยกิจกรรมของมนุษย์ ต้องใช้ระยะเวลากว่า 40 ปี (Okada et, al., 2003) ในการฟื้นฟูสภาพให้ใกล้เคียงกับป่าดั้งเดิมก่อนการรบกวน นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบค่าพื้นที่หน้าตัดพรรณไม้ของป่าบ้านทุ่งฮ้าง กับป่าฟื้นฟูหลังสัมปทานซึ่งปลูกทดแทนมากกว่า 35 ปี พบว่าในการศึกษาคครั้งนี้ ป่าที่มีการจัดการฟื้นฟูโดยชุมชนมีค่าพื้นที่หน้าตัดสูงกว่าป่าที่ปล่อยให้เกิดการฟื้นฟูตามธรรมชาติค่อนข้างมาก จึงนับได้ว่าชุมชนประสบความสำเร็จในการฟื้นฟูป่าเป็นอย่างดี โดยชุมชนแห่งนี้เป็นชุมชนที่มีความตระหนักและผูกพันกับผืนป่า มีวิถีชีวิตที่พึ่งพาทั้งในด้านสินค้าและบริการจากผืนป่ามาอย่างยาวนาน ทำให้สมาชิกในชุมชนมีความรักและหวงแหนในผืนป่าจนเกิดเป็นพลังขับเคลื่อนในเชิงบวก (สมศักดิ์ สุขวงศ์, 2550) แกนนำและสมาชิกในชุมชนมีความสามัคคี ร่วมเรียนรู้และพัฒนาพื้นที่ป่าจากประสบการณ์และความล้มเหลวในการใช้ทรัพยากรในอดีต และยังมีความมุ่งมั่นที่จะฟื้นฟูเพื่อเพิ่มพื้นที่ป่าให้กลับมามีความอุดมสมบูรณ์อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นหากชุมชนได้เข้าถึงข้อมูลและมีความรู้ความเข้าใจในกระบวนการอนุรักษ์ป่าที่เป็นไปตามหลักนิเวศวิทยาป่าไม้ถูกต้องเหมาะสมและทันสมัย รวมถึงการได้รับการสนับสนุนจากหน่วยงานของรัฐ และองค์ต่างๆ อย่างต่อเนื่อง น่าจะเป็นผลดีต่อการวางแผนการจัดการป่าชุมชนแห่งนี้ให้สมดุลและยั่งยืนต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาคครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น โดยความรู้ที่ได้เป็นส่วนหนึ่งของข้อมูลพื้นฐานทางนิเวศวิทยา สำหรับใช้ประกอบการพิจารณาเพื่อหาแนวทางในการวางแผนการจัดการทรัพยากรในป่าชุมชน ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ส่งคืนข้อมูลที่ได้ให้กับชุมชนเป็นระยะ และร่วมวางแผนเกี่ยวกับการพัฒนาและฟื้นฟูพื้นที่ป่าชุมชนอย่างต่อเนื่อง สำหรับแนวทางการวิจัยต่อไป ควรได้มีการศึกษาข้อมูลด้านการเข้าใช้ทรัพยากรจากระบบนิเวศป่าทั้งในด้านการเป็นสินค้าและบริการ ทั้งจากสมาชิกในชุมชนและคนนอกพื้นที่ รวมถึงข้อมูลด้านสถานภาพทางเศรษฐกิจและสังคมของคนในชุมชน ซึ่งข้อมูลทั้งสามด้านอันได้แก่ ระบบนิเวศ เศรษฐกิจและสังคมเหล่านี้ จะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการจัดการพื้นที่ป่าชุมชนบ้านทุ่งฮ้างให้ยั่งยืน ทั้งนี้ผลการศึกษาคครั้งนี้จะเป็นข้อมูลประกอบการวางแผนเพื่อการฟื้นฟูป่าและการปลูกสวนป่า โดยไม่ทำให้ความหลากหลายทางชีวภาพลดลงไปกว่าที่มีอยู่ ณ ปัจจุบัน ในช่วงยุคสมัยที่รัฐอนุญาตให้ประชาชนสามารถตัดไม้มีค่าในที่ดินครอบครองของตนได้อย่างเสรี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายชาญ จานแก้ว ผู้ใหญ่บ้าน นายประพันธ์ ไทยใหม่ ผู้ช่วยผู้ใหญ่บ้าน นายบุญมา จักรรถ ที่ปรึกษานายกเทศบาล และชาวชุมชนทุ่งฮ้างที่ร่วมเข้าวิจัยในพื้นที่ป่าและอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และคณะมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปางที่อำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และห้องปฏิบัติการในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จตุฏฐากร เพชรพรหม ปัญญา หมั่นเก็บ และอึ้ง ร่มโพธิ์. (2556). ความหลากหลายของพืชพรรณ การใช้ประโยชน์ และมูลค่าทางเศรษฐกิจ จากป่าชุมชนดอนยาง ตำบลหลักเมือง อำเภอกมลาไสย จังหวัดกาฬสินธุ์. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*. 31: 2 (37-46) กรุงเทพฯ: สาขาวิชาพัฒนาการเกษตรและจัดการทรัพยากร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คมเชษฐา จรุงพันธ์ และบุญส่ง ม่วงศรี. (2556). การศึกษานิเวศวิทยาป่าไม้ระยะยาวในพื้นที่อุทยานแห่งชาติ: เครือข่ายแปลงตัวอย่างถาวรในเขตร้อน ป่าผสมผลัดใบ อุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง จังหวัดพิษณุโลก-เพชรบูรณ์. ใน การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิชาการเครือข่ายงานวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ประเทศไทย ครั้งที่ 2: ความรู้ในนิเวศวิทยาเพื่อการฟื้นฟู. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะวนศาสตร์ เครือข่ายงานวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ประเทศไทย; มหาวิทยาลัยแม่โจ้; กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช; สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา. เชียงใหม่.

ณัฐวัฒน์ คลังทรัพย์ อนุชา ทะรา จงรัก วชิรินทร์รัตน์ ดอกกรัก มารอด และ มณฑล จำเริญฤกษ์ (2556) ความหลากหลายของพืชพรรณป่าดิบแล้งภายหลังมีการสัมปทานทำไม้ ในพื้นที่จังหวัดตาก. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิชาการเครือข่ายงานวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ประเทศไทย: ความรู้ในนิเวศเพื่อการฟื้นฟู. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่: สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา.

เต็ม สมิตินันท์. (2544). (พิมพ์ครั้งที่ 2). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544)*. กรุงเทพฯ: ประชาชน.

สมศักดิ์ สุขวงศ์. (2550). *การจัดการป่าชุมชนเพื่อคนและเพื่อป่า*. กรุงเทพฯ: ทวีพัฒนาการพิมพ์.

อุทิศ ภูอินทร์. (2542). *นิเวศวิทยาพื้นฐานเพื่อการป่าไม้.ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Hill, M.O. (1973). Diversity and Evenness: A unifying notation and its consequences. *Ecol.*54: 427-432.

Gardner, S., Sidisunthorn, P. and Anusarnsunthorn, V. (2000). *A field guide to forest trees of Northern Thailand*. Bangkok: Kobfai Publishing Project.

Okuda, T., Suzuki, M., Adachi, N., Quah, E. S., Hussein, N. A., and Manokaran, N. 2003. Effect of selective logging on canopy and structure and tree composition in a lowland dipterocarp forest in peninsular Malaysia. *Forest Ecology and Management* 175: 297-230.

Shannon, C.E. and Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. Urbana: Illinois Press University.

คุณสมบัติเป็นโฟมของ *Lactobacillus plantarum* 3C2-10 ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเปลือกส้ม

พรอริยา ฉิริน^{1,a}, วชรินทร์ ยุทธวานิชกุล^{2,b}, และศิริวรรณ ณะวงษ์^{3,c*}

¹สาขาวิชาอาหารและโภชนาการประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ม.ราชภัฏเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี

²สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร ม.ราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

³สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม จังหวัด นครราชสีมา
email: ^apornariya.chi@mail.pbru.ac.th; ; ^bTonwatcharin@hotmail.com;; ^csiriwannawong@slri.or.th

บทคัดย่อ

เปลือกส้มเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ หาได้ง่ายและมีราคาถูก สามารถเพิ่มมูลค่าได้โดยนำมาผลิตเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant: BSF) ที่มีคุณสมบัติเป็นโฟม งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของการผลิต BSF จากเปลือกส้มโดยการหมักร่วมกับการเติมกลีเซอรอล *Lactobacillus plantarum* 3C2-10 เป็นระยะเวลา 90 วัน ผลการวิจัยพบว่า เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ค่า Emulsification index (EI), Emulsification activity (EA) และ Emulsification stability (ES) มีค่าเพิ่มสูงขึ้น และมีค่ามากที่สุดที่ระยะเวลาการหมัก 60 วัน เป็นร้อยละ 75.87, 82.57 และ 81.74 ตามลำดับ เมื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโฟมพบว่า ลักษณะของโฟมที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กและคงที่ได้ดีเทียบเท่า BSF ทางการค้าและสารละลาย SDS การเจริญของแบคทีเรียในแต่ละตัวอย่าง พบว่ามีการเจริญและเพิ่มจำนวนจากเดิม (วันที่ 1) ถึง 2 Log (CFU/ml) ในระยะเวลา 7 ถึง 30 วัน และลดจำนวนลงเมื่อระยะเวลา 60 วัน เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบชีวเคมีโมเลกุลด้วยเทคนิค FTIR พบว่า สเปกตรัมของ สาร BSF จาก *L. plantarum* 3C2-10 มีลักษณะคล้ายกับสเปกตรัมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Lactobacillus* สายพันธุ์อื่น แต่พบตำแหน่ง C=O stretching of carbonyl group แตกต่างจากสเปกตรัมของสารลดแรงตึงผิวทางการค้าและสารละลาย SDS นอกจากนี้ตลอดระยะเวลาการหมัก 90 วันของ BSF จาก *L. plantarum* 3C2-10 พบว่าพีคของสเปกตรัมช่วงเลขคลื่น 1700-1500 cm⁻¹ มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นที่ระยะเวลาการหมัก 14-60 วันและลดลงที่ระยะเวลาการหมัก 90 วัน จากผลการวิจัยแสดงว่า *L. plantarum* 3C2-10 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเปลือกส้มที่มีคุณสมบัติเป็นโฟมได้

คำสำคัญ: สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ, คุณสมบัติเป็นโฟม, *Lactobacillus plantarum* 3C2-10

Foam ability of biosurfactant producing *Lactobacillus plantarum* 3C2-10 from orange peels

Pornariya Chirinang ^{1,a}, Watcharin Yuttavanichakul ^{2,b}, and Siriwan Nawong ^{3,c*}

¹ Applied Food and Nutrition Program, Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University, Phetchaburi, Thailand

² Agricultural Program, faculty of Agricultural Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage, Pathum Thani, Thailand.

³ Synchrotron light Research Institute (Public Organization), Muang, Nakhonratchasima, Thailand
E-mail; ^apornariya.chi@mail.pbru.ac.th; ^bTonwatcharin@hotmail.com; ^csiriwannawong@slri.or.th

Abstract

Orange peels is waste from orange juice production which available and cheap. It could be used to produce biosurfactant (BSF) with foam ability. Thus, the objective of this research was study of the effect of biosurfactant production from orange peels combine with adding *Lactobacillus plantarum* 3C2-10 fermented for 90 days. The results showed that when fermentation period increased, Emulsification index (EI), Emulsification activity (EA) and Emulsification stability (ES) is also increased and a maximum value at day 60th of fermentation period were 75.87%, 82.57% and 81.74%, respectively. Foam ability testing exhibited that the characteristics of the foam were small and stable comparable to commercial surfactant and SDS solution. The growth of bacteria in each sample showed that the growth and numbers of bacteria were both increased (Day 1) up to 2 log (CFU/ml) in day 7th to 30th. After this period until day 60th, the numbers of bacteria were decreased. FTIR analysis was determined for biochemical compositions. The results revealed that spectrum of BSF from *L. plantarum* 3C2-10 similar to spectrum of BSF from other *Lactobacillus spp.*, while C=O stretching of carbonyl group different from commercial surfactant and SDS solution. Moreover, all fermentation period of BSF from *L. plantarum* 3C2-10 (90 days) showed the spectrum of 1700-1500 cm⁻¹ tend to increase at day 14th to 60th and decreasing of spectrum at the end of fermentation period. The result of this research indicated that *L. plantarum* 3C2-10 could use for biosurfactant production of orange peels.

Keywords: Biosurfactant, Foam ability, *Lactobacillus plantarum* 3C2-10

*Corresponding author

บทนำ

ในปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวมีบทบาทสำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์ทั้งในครัวเรือนและอุตสาหกรรม โดยมีการนำไปใช้ไม่ว่าจะอยู่ในรูปของสบู่ ยาสระผม ผงซักฟอก น้ำยาทำความสะอาดพื้น น้ำยาล้างจาน เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการใช้สารลดแรงตึงผิวที่มาจากสารสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ย่อยสลายได้ยาก ทำให้เกิดสารเคมีตกค้าง และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งกลายเป็นปัญหาสำคัญของโลกในปัจจุบัน การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) ด้วยจุลินทรีย์เพื่อใช้ทดแทนการใช้สารที่ผลิตจากสารเคมี จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจ เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ ต้นทุนต่ำ มีความปลอดภัย มีความเป็นพิษต่ำ สามารถย่อยสลายได้ง่าย ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม มีความเฉพาะเจาะจงกับสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น มีอุณหภูมิ ค่า pH ความเค็มไม่เหมาะสม และสามารถสังเคราะห์ได้จากวัตถุดิบที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Martins and Martins, 2018) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการบำบัดมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยคุณสมบัติและกลไกของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก เช่น การกำจัดสารมลพิษโดยผนังเซลล์ การตกตะกอนภายในเซลล์โดยการสร้างสารเมตาบอไลต์ที่เซลล์สร้างขึ้น (Brierley, 1990; กฤษฎา บุญชัย, จรูญ สารินทร์ และ ศิริพรรณ สารินทร์, 2009) และการทำเครื่องสำอาง เช่น จากงานวิจัยการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากข้าวโพดโดยอาศัยคุณสมบัติการเป็นสารให้ความคงตัวกับอิมัลชันในผลิตภัณฑ์ดูแลผิว (Knoth, et al., 2019)

เปลือกส้มเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่สำคัญจากกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ การนำเปลือกส้มมาผลิตเป็นสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพโดยการหมักด้วยจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ จากการศึกษาพบว่า มีการนำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ มาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนสำหรับกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ เช่น กากอ้อย (Rakeshkumar et al., 2013) และเศษปลา (Aguiar et al., 2014) เป็นต้น จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ได้แก่ แบคทีเรียและเชื้อราหลากหลายสายพันธุ์ โดยแบคทีเรียที่มีรายงานการใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ เช่น *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodococcus* (กฤษฎา บุญชัย, จรูญ สารินทร์ และ ศิริพรรณ สารินทร์, 2009; Souza et al., 2014; Decesaro et al., 2013), *Corynebacterium aquaticum* (Pinto et al., 2009; Aguiar et al., 2014; Martins and Martins, 2018) และ *Lactobacillus jensenii* P6A และ *Lactobacillus gasserii* P65 (Morais et al., 2017) ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มผลิตภัณฑ์แลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความน่าสนใจในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์นำวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรได้แก่ เปลือกส้มมาเตรียมเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียในกลุ่มผลิตภัณฑ์แลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* 3C2-10 ทำการศึกษาองค์ประกอบ และคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเปลือกส้มโดยกระบวนการหมักด้วย *Lactobacillus plantarum* 3C2-10
2. เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบและคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้
3. เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตร

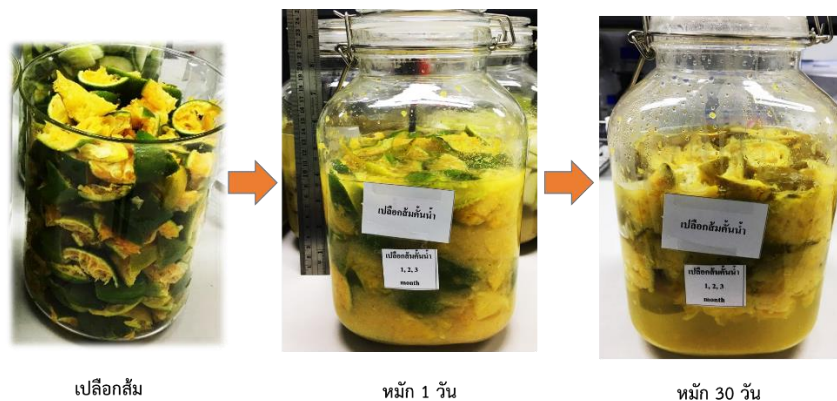
ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* 3C2-10 ที่คัดแยกได้จากกากมันสำปะหลัง (Nawong, Oonsivilai, Boonkerd and Truelstrup Hansen, 2016) อายุ 1 วัน ที่เจริญบนอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 °C ไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที เพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์จากอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร และล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย 0.85% NaCl (w/v) ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2. วัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบ

นำเปลือกส้มที่เหลือทิ้งจากการคั้นน้ำ มาลดขนาดโดยการหั่นย่อย ให้มีขนาดประมาณ 1-5 เซนติเมตร เพื่อให้ง่ายต่อการหมักและการย่อยสลายของจุลินทรีย์ ทำการหมักในขวดแก้วขนาด 5 ลิตร โดยใช้อัตราส่วนเปลือกส้มกับน้ำ 1:500 (w/v) จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10% บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ติดตามการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะเวลา 60 วัน โดยตรวจติดตามที่ระยะเวลาการหมัก 0, 1, 3, 5, 7, 14, 21, 30, 60 และ 90 วัน และทำการตรวจสอบค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsification index), ค่ากิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (Emulsification activity), ค่าความคงที่ของอิมัลชัน (Emulsification stability) และความสามารถในการเกิดโฟมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Formability activity)



รูปที่ 1 แสดงระบบการหมักเปลือกส้มด้วยการเติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* 3C2-10

3. การทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.1. ตรวจสอบค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsification index; EI)

ปิเปต Biosurfactant (BSF) 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม น้ำมันก๊าดลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ที่ระดับความเร็วสูงสุด นาน 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที คำนวณหาค่า emulsification activity Index ดัดแปลงจากวิธีการของ Cooper and Goldenberg (1987) และ Khyati and Hareshkumar (1994)

$$EI = \frac{\text{ความสูงของ } emulsion \text{ ที่เกิดขึ้น}}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}} \times 100$$

3.2. ตรวจสอบค่ากิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (Emulsification activity; EA)

ปิเปต BSF 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม น้ำมันก๊าดลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ที่ระดับความเร็วสูงสุด นาน 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลอง (ดัดแปลงจากวิธีของ Khyati and Hareshkumar ; 1994)

3.3. ตรวจสอบค่าความคงที่ของอิมัลชัน (Emulsification stability (ES))

ปิเปต BSF 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม น้ำมันก๊าดลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ที่ระดับความเร็วสูงสุด นาน 2 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทุก 10 นาที จนครบ 60 นาที จากนั้น นำค่ามาคำนวณหา Logarithm ของค่า การดูดกลืนแสงต่อเวลา นำไปสร้าง

กราฟ หาความชันของค่า decay constant (ค่า kd) เพื่อนำคำนวณเป็นค่า Emulsification stability บันทึกผลการทดลอง (ดัดแปลงจากวิธีของ Khyati and Hareshkumar; 1994)

4. การศึกษาความสามารถในการเกิดโฟมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Foamability activity)

ทดสอบความสามารถในการเกิดโฟม (Foamability activity) ดัดแปลงจาก Kim and Lee (2004) และ Khyati and Hareshkumar (1994) นำ BSF 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำมันก๊าดลงไป 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมอากาศในอัตรา 500 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมกับจับเวลา 20 นาที สังเกตปริมาณฟองที่เกิดขึ้น บันทึกปริมาณตัวอย่างที่เกิดฟองและไม่เกิดฟอง โดยใช้ 10% SDS เป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณค่า Foamability rate ได้จากสูตร ดังนี้

$$\text{Foamability rate (ml/min)} = \frac{100 - \text{ปริมาณสารตัวอย่างที่ไม่เกิดฟอง}}{\text{เวลาที่ใช้ไป (นาท)}} \times 100$$

5. ตรวจวัดค่าความเป็นกรด

5.1. pH-meter

ตรวจวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ทำการอ่านค่า และบันทึกผล

5.2. Titration

ทำการไทเทรต (Titration) เพื่อตรวจวัดความเป็นกรดทั้งหมด (Titratable acidity) นำตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วย 1 N NaOH 1% phenolphthalein เป็น indicator ไทเทรตจนถึงจุดยุติ สังเกตสารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูโดยไม่จางหายไป นำปริมาณสารละลาย NaOH ที่ใช้เพื่อคำนวณหาปริมาณกรดในตัวอย่างต่อไป

$$\text{คำนวณค่า Titratable Acidity (\%)} = \frac{\text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้} \times 0.1 \text{ N} \times (\text{meq.wt.acid})}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100$$

1 มิลลิกรัม สมมูล ของน้ำหนักรวม acetic acid (CH_3COOH) = 0.060

6. ตรวจวัดความถ่วงจำเพาะ

นำตัวอย่างตรวจวัดค่าความถ่วงจำเพาะของสารละลายด้วย hydrometer และทำการอ่านค่าบันทึกผลการทดลอง

7. ตรวจติดตามปริมาณจุลินทรีย์

7.1. ตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

นำตัวอย่างที่ได้มาทำการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยใช้เทคนิค drop plate บนอาหาร Plate count agar (PCA) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ บ่มที่ 37°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนี และบันทึกผล (FDA Bacterial Analytical Manual; BAM Edition 8, Revision A/1998)

7.2. ตรวจนับจุลินทรีย์ในกลุ่มแลคติกแบคทีเรีย (Lactic bacteria)

นำตัวอย่างที่ได้มาทำการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยใช้เทคนิค drop plate บนอาหาร de Man Rogosa Sharpe (MRS) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ บ่มที่ 37°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนี และบันทึกผล (FDA Bacterial Analytical Manual; BAM Edition 8, Revision A/1998)

8. ตรวจสอบองค์ประกอบชีวเคมีโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

นำตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ปั่นหยาบที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาบรจุลงขวด เพื่อทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dehydration) ตรวจสอบปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหมู่ฟังก์ชันในตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค FT-IR spectrometer (Bruker Tensor 27 Infrared Spectrometer) ใช้ PLATINUM Diamond ATR เป็นอุปกรณ์เสริม วัดที่ 64 scans, Spectral resolution 4 cm⁻¹ ช่วงเลขคลื่น 4000-400 cm⁻¹ วัดตัวอย่างละ 5 ซ้ำ (Bruker Tensor 27 Infrared Spectrometer) ทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.5 (Bruker Optics Ltd, Ettlingen, Germany)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถพบได้โดยทั่วไปในพืชและจุลินทรีย์ โดยส่วนมากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่พบจะอยู่ในกลุ่ม แอมฟิฟิลิก (amphiphilic molecule) ซึ่งมักถูกนำมาใช้เป็นสัณฐานในน้ำยาหรือผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด เนื่องจากสารในกลุ่มนี้แสดงคุณสมบัติในการชะล้าง (Akbari et al., 2018) อย่างไรก็ตามการจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้ได้คุณภาพและมีปริมาณที่มากขึ้นหรือเพียงพอต่อความต้องการ จำเป็นต้องมีการผลิตในสภาวะที่เหมาะสม และเนื่องจากในภาคเกษตรมีวัตถุดิบเหลือใช้จากการเกษตรถูกทิ้งเป็นจำนวนมากโดยไม่เกิดประโยชน์ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการศึกษา การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้เปลือกส้มที่เหลือทิ้งจากการคั้นน้ำมาทำการศึกษาคูณสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิว ด้วยการตรวจหาค่าการเกิดอิมัลชัน หรือ Emulsion Index (EI) โดยผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *L. plantarum* 3C2-10 โดยจำลองการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพขนาด 5 ลิตร

จากผลการตรวจคุณสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant; BSF) ผลิตจากเปลือกส้ม เป็นระยะเวลา 60 วัน ด้วยการตรวจสอบการเกิดอิมัลชันของ BSF พบว่า เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ค่า EI, EA และ ES มีค่าเพิ่มสูงขึ้น และมีค่ามากที่สุดที่ระยะเวลา 60 วัน คือ 75.87, 82.57 และ 81.74 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ ค่า EI, EA และ ES ของ 10%SDS อย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05)

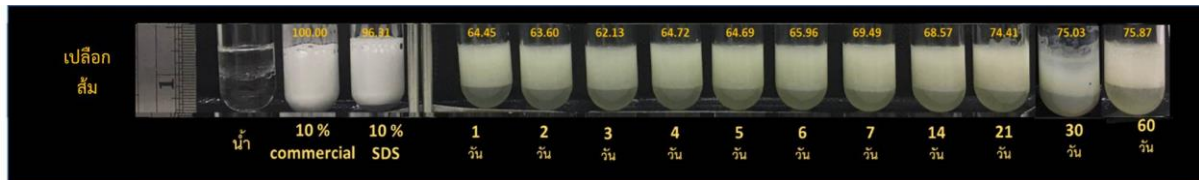
ตารางที่ 1 แสดงค่าการเกิดโฟม (Foamability rate), ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsification Index), ค่ากิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (Emulsification activity) และ ค่าความคงที่ของอิมัลชัน (Emulsification stability) ของ BSF จากเปลือกส้มที่ระยะเวลาการหมัก 60 วัน เปรียบเทียบกับสาร Bio-surfactant Commercial และ สารเคมี 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

การทดสอบ คุณสมบัติการ เป็นสารลดแรง ตึงผิว	สารลดแรงตึงผิวจากเปลือกส้ม												
	10 % Commercial	10% SDS	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	30 วัน	60 วัน
Foamability rate (mL/min)	100.00	99.66	97.32 ⁱ	97.64 ^{ef}	97.71 ^{ef}	97.90 ^{bcd}	97.94 ^{bcd}	98.07 ^{abcd}	98.12 ^{abcd}	98.43 ^{abc}	98.73 ^{ab}	98.82 ^a	98.90 ^a
EI	100.00	96.31	64.45 ^{ef}	63.60 ^f	62.13 ^g	64.72 ^e	64.69 ^e	65.96 ^d	69.49 ^c	68.57 ^c	74.41 ^b	75.03 ^{ab}	75.87 ^a
EA	100.00	85.71	75.08 ^{bc}	64.00 ^d	63.81 ^d	72.23 ^{cd}	74.53 ^{bc}	76.03 ^{bc}	71.61 ^{cd}	74.48 ^{bc}	79.00 ^{ab}	79.57 ^{ab}	82.57 ^a
ES	100.00	85.71	17.59 ⁱ	21.47 ⁱ	36.87 ^f	39.16 ^{ef}	51.16 ^{de}	60.59 ^{cd}	63.41 ^{bcd}	65.75 ^{bc}	72.21 ^{abc}	75.06 ^{ab}	81.74 ^a

nabcd... แสดงการเปรียบเทียบการเกิด EI ทางสถิติเปรียบเทียบกับระหว่างวันที่ทำการทดสอบทั้งหมด (p ≤ 0.05)

2. ผลการศึกษาความสามารถในการเกิดโฟมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

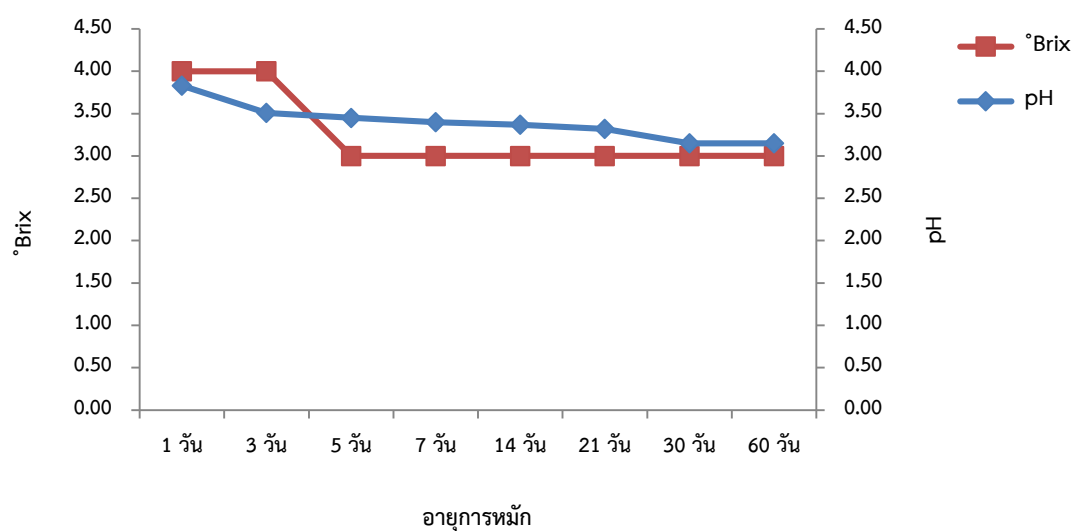
จากผลการตรวจความสามารถในการเกิดโฟมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *L. plantarum* 3C2-10 โดยใช้วัตถุบับเปลือกส้ม พบว่า เมื่อมีการเติมอากาศ 500 มิลลิลิตรต่อหน้าที่ พบว่าลักษณะของโฟมที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กและคงที่ได้ดี เทียบเท่า Bio-surfactant Commercial และ Sodium Dodecyl Sulfate ดังรูปที่ 2



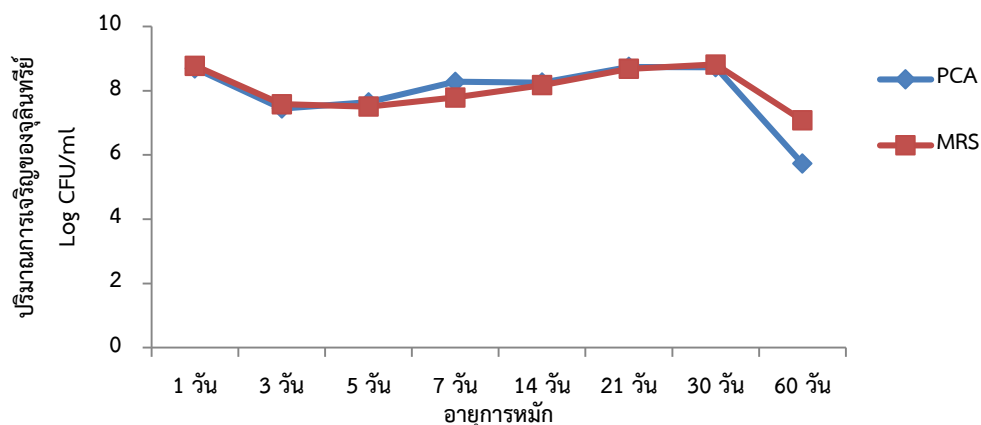
รูปที่ 2 แสดงการเกิด Foamability สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *L. plantarum* 3C2-10 จากเปลือกส้ม

3. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณจุลินทรีย์

จากการติดตามผลการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์เบื้องต้นของ BSF จากเปลือกส้มโดยใช้ *L. plantarum* 3C2-10 ในโถขนาด 5 ลิตร ผลการติดตามปริมาณขององศาบริกซ์ ($^{\circ}\text{Brix}$) พบว่า $^{\circ}\text{Brix}$ ลดลงในวันที่ 9 และเริ่มคงที่ตลอดระยะเวลาการหมักที่ 60 วัน (รูปที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับค่า pH ที่มีปริมาณลดลงอย่างชัดเจนใน 3 วันแรก (รูปที่ 3) ซึ่งสภาวะความเป็นกรดสูงที่พบในเปลือกส้มนั้น เนื่องมาจากกรดผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว อย่างไรก็ตามที่ระดับ pH 3.2 จะเป็นช่วงที่ช่วยคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มผลิตกรดแลคติก นอกจากนี้ความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นส่วนหนึ่งอาจมีผลมาจากผลผลิตของแบคทีเรียในกลุ่มผลิตกรดแลคติกที่เกิดการหมักหรือใช้กลูโคส ซึ่งจะเห็นได้จากการลดลงของค่า $^{\circ}\text{Brix}$ และผลของการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละตัวอย่าง พบว่าการเจริญและเพิ่มจำนวนจากเดิม (วันที่ 1) ถึง 2 Log (CFU/ml) ในระยะเวลา 7 ถึง 30 วัน และลดจำนวนลงเมื่อระยะเวลา 60 วัน (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายในน้ำ ($^{\circ}\text{Brix}$) และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างระบบการหมัก BSF เป็นเวลา 60 วัน

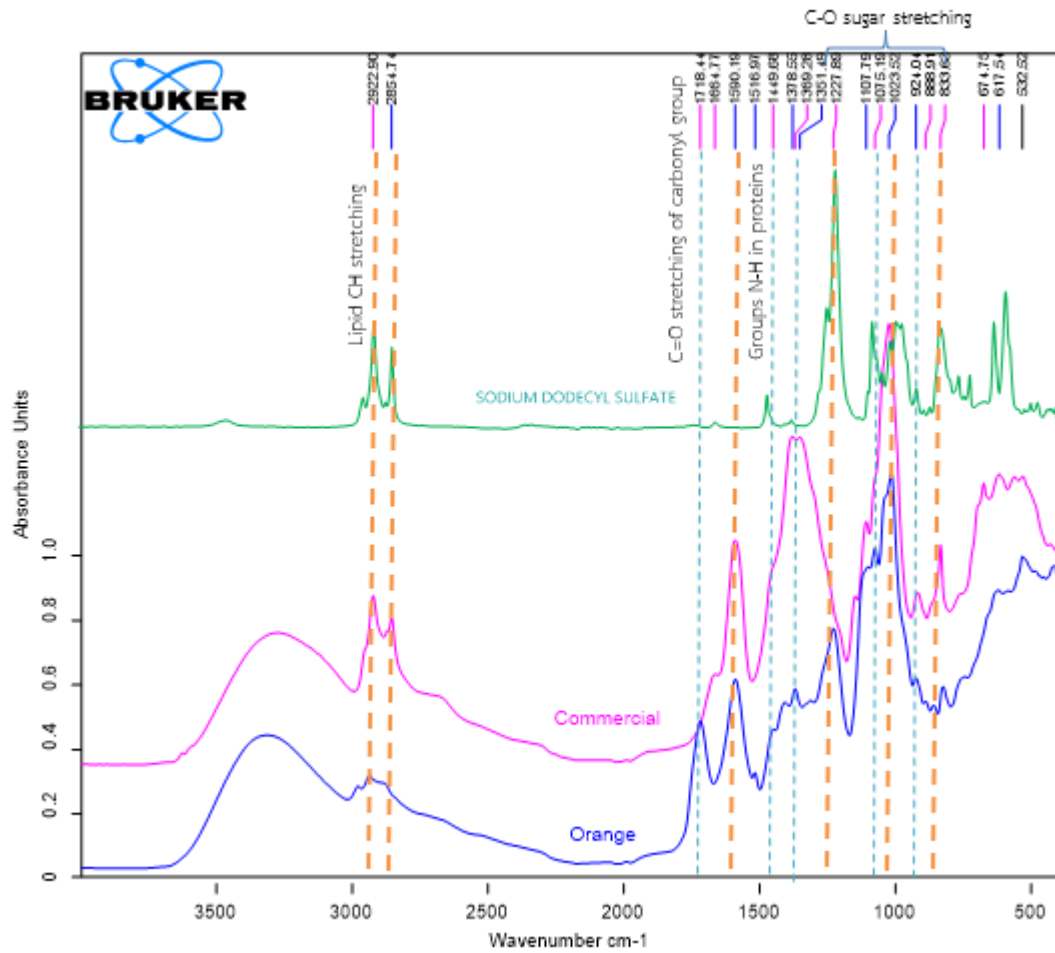


รูปที่ 4 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร plate count agar (PCA) (a) และ De Man Rogosa and Sharpe (MRS) (b) ในตัวอย่างระบบการหมัก BSF เป็นเวลา 60 วัน บ่มให้เชื้อเจริญที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง

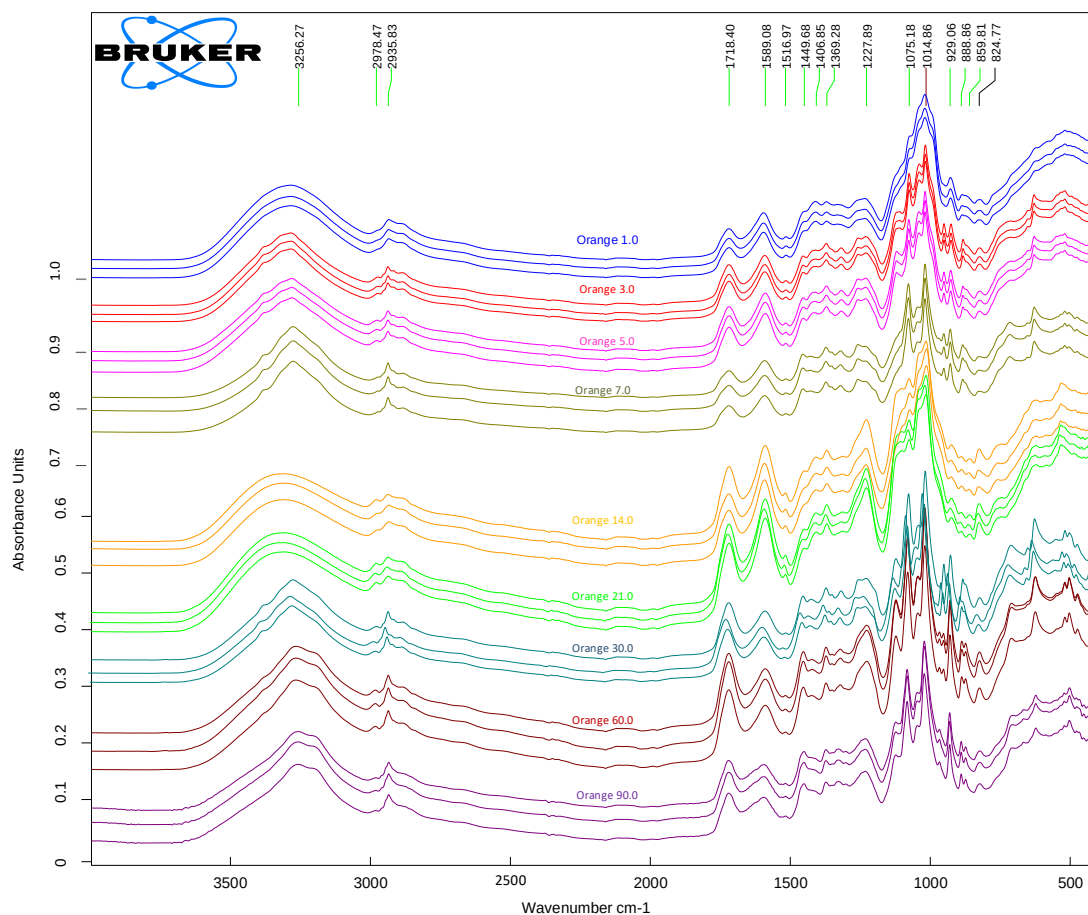
4. ตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบชีวเคมีโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

จากการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสาร BSF ที่ได้จากการหมักด้วยวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ พบว่า สเปกตรัมของ สาร BSF ที่หมักด้วยเปลือกส้มร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* 3C2-10 ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1718, 1590, 1449, 1378, 1369, 1227, 1107, 1023 และ 924 cm^{-1} ซึ่งเป็นตำแหน่งของสเปกตรัมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยแบคทีเรีย (Moldes et al 2013) และมีลักษณะคล้ายกับสเปกตรัมของสารชีวเคมีโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Lactobacillus jensenii* P6A และ *Lactobacillus gasserii* P65 (Morais et al, 2017) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับ สารลดแรงตึงผิวทางการค้าและ sodium dodecyl sulfate พบตำแหน่ง C=O stretching of carbonyl group แตกต่างจาก สเปกตรัมของ สาร BSF ที่ผลิตจาก *L. plantarum* 3C2-10 ดังรูปที่ 5

และเมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีโมเลกุลของ BSF จาก *L. plantarum* 3C2-10 ตลอดระยะเวลาการหมัก 90 วัน พบว่าพีคของสเปกตรัมช่วงเลขคลื่น 1700-1500 cm^{-1} มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นที่ระยะเวลาการหมัก 14-60 วัน และลดลงที่ระยะเวลาการหมัก 90 วัน ดังรูปที่ 6



รูปที่ 5 เปรียบเทียบ FTIR Spectrum ของสาร BSF ที่ได้จากการหมักวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ ที่ระยะเวลาการหมัก 21 วัน กับสารลดแรงตึงผิวทางการค้า



รูปที่ 6 แสดง FTIR Spectrum ของสาร BSF ที่ได้จากการหมักเปลือกส้ม ที่ระยะเวลาการหมัก 0-90 วัน

สรุป

จากผลการทดลองการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) จาก *L. plantarum* 3C2-10 ที่หมักด้วยเปลือกส้มเหลือทิ้งจากการคั้นน้ำ พบว่า เปลือกส้มสามารถนำมาทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี ในการหมักร่วมกับการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* 3C2-10 โดยวัดจากค่าการเกิดอิมัลชันกับสารกลุ่มน้ำมัน (Emulsion index) สูงถึง 80 % ที่ระยะเวลาการหมัก 60 วัน จากการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพและทางเคมีเบื้องต้นพบว่า เปลือกส้มมีแหล่งคาร์บอน ที่เพียงพอต่อการเจริญและการผลิตสาร BSF ของ *L. plantarum* 3C2-10 อีกทั้งเปลือกส้มเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายและมีราคาถูก ส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตต่ำลง ซึ่งเป็นผลดีต่อการขยายระดับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาในระดับสเกลที่ใหญ่เพิ่มขึ้นอีก เพื่อให้ใกล้เคียงกับการดำเนินการในระดับอุตสาหกรรมจริงมากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท เอส โอ ซี ไบโอเทค จำกัด สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) และมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

เอกสารอ้างอิง

- กฤษฎา บุญชัย, จรุง สารินทร์ และ ศิริพรรณ สารินทร์. (2552). คุณสมบัติเป็นโพลีเมอร์ของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วันที่ 12-13 กุมภาพันธ์ 2552.
- Aguiar, G.P.S., Limberger, G.M., Silveira, E.L. (2014). Technological alternatives for the use of residues from the industrialization of fish. *Rev. Eletrônica UNIVAR* 1, 219–225.
- Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Fayaz, F., Alara, O. R. (2018). Biosurfactants-a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnology Research and Innovation* 2 (1), 81-90.
- Brierley, CL. (1990). Metal immobilization using bacteria. *Microbial Mineral Recovery*. New York: McGraw-Hill
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environment al Microbiology* 53(2), 224-229.
- Decesaro, A., Rigon, M.R., Thomé, A., Colla, L.M. (2013). Production of biosurfactants by microorganisms isolated from soil contaminated with diesel oil. *Quimica Nova* 36, 947-954
- Knoth, D., Rincón-Fontán, M., Stahr, P.-L., Pelikh, O., Eckert, R.-W., Dietrich, H., Cruz, J.M., Moldes, A.B., Keck, C.M. (2019). Evaluation of a biosurfactant extract obtained from corn for dermal application. *International Journal of Pharmaceutics*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.048>
- Martins, P.C., Martins, V. G. (2018). Biosurfactant production from industrial wastes with potential remove of insoluble paint. *International Biodeterioration & Biodegradation* 127, 10-16.
- Moldes A.B., Paradelo R., Vecino X., Cruz J.M., Gudina E.J., Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Domínguez J.M., Barral M.T. (2013). Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *Biomed Res Int*. 2013:961842
- Morais, I.M.C., Cordeiro, A.L., Teixeira, G.S., Domingues, V.S., Nardi, R.M.D, Monteiro, A.S., Alves, R.J., Siqueira, E.P. and Santos, V.L. (2017). Microbial Cell Factories. *BioMed Central* 16:155, 1-15.
- Nawong, S., Oonsivilai, R., Boonkerd, N., and Truelstrup Hansen, L. (2016). Entrapment in food-grade transglutaminase cross-linked gelatin-maltodextrin microspheres protects *Lactobacillus* spp. during exposure to simulated gastro-intestinal juices. *Food Research International* 85, 191-199.
- Pinto, M.H., Martins, R.G., Costa, J.A.V. (2009). Bacteria biosurfactants production kinetic evaluation. *Quím. Nova* 32, 2104–2108.
- Rakeshkumar, M.J., Kalpana, M., Nidhi, J., Avinash, M., Bhavanath, J. (2013). Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. *International journal of biological macromolecules* 62, 52–58.
- Souza, E.C., Vessoni-Penna, T.C., Oliveira, R.P.S. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. *International Biodeterioration & Biodegradation* 89, 88–94.

Using ultrafiltration technique for concentrate influenza virus from the supernatant.

Darsaniya Punyadarsaniya^{1, a}, Sitthichon Rattanachan^{1, b}

¹Veterinary medicine Faculty, Mahanakorn University of technology, Bangkok, Thailand

E-mail; ^adarsaniya_p@yahoo.de, ^brsitthich@mut.ac.th

Abstract

The Influenza virus is rapid widespread disease which highly effect for health of humans and animals. Occasionally, non-appropriated sample collection methods lead to low amount of detectable pathogenic agent; this can be a subsequent possible cause of misdiagnosis. Therefore, ultrafiltration technique was evaluated for its potential to concentrate influenza virus from the supernatant. Three different amounts of influenza A virus, 4ml, 32ml, and 64ml loading volumes were concentrated through ultrafiltration device with MWCO of 10kDa filter by refrigerated centrifuge to concentrate at a final volume of 1 ml. The concentrated viral titer was measured by the 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀). The results showed the increase of viral titer after ultrafiltration. The highest detected viral titer was from viral load of 64 ml at 3.9×10^9 TCID₅₀/ml compared to the viral control at 1.9×10^7 TCID₅₀/ml. These findings indicate the possibility of ultrafiltration technique can obtain a higher amount of concentrated virus with increased loading viral volume. In summary, the difference of viral titer from varying viral concentrations showed the efficacy of ultrafiltration technique in concentrating influenza A virus subtype H3N2. This experiment shows that the fundamental virology laboratory is possible to concentrate the virus sample.

Keywords: Influenza A virus, ultrafiltration, concentrate virus

1. Introduction

Influenza is a respiratory illness that infects between 5-15% of the global population annually. Human annual seasonal influenza vaccines are composed of influenza A and B strains. The H3N2 subtypes of influenza A be part of them in every year even they showed a poor efficacy (Melidou et al., 2017, p. 29-32.). Symptoms of influenza infection commonly are fever, sore throat, coughing, nasal discharge, headache, and myalgia. More severe cases can also lead to the development of conditions such as bronchitis or pneumonia (Shim, Kim, Tenson, Min, and Kainov, 2017, p. 223), especially in pregnant women, children younger than 5 years old, and senile over 65 years old, with the latter being the most affected (Broberg, Penttinen and Snacken, 2016; World health organization, 2017). This virus is not only infected to human but also affected to swine. The virus can cause the disease that leads to economic losses by reduce growth rate in young swine. However, a sufficient concentration of isolated virus is required for proper validation in a laboratory, thus, the ability to concentrate virus is crucial in detecting virus from infinitesimal specimen, would be beneficial for accurate viral diagnosis and treatment. There were varieties of viruses concentrated methods available such as PEG/NaCl precipitation (Guo et al., 2012, p. 139-146), ultracentrifugation (Hutchinson & Fodor, 2014, p. 1038), column chromatography (Kalbfuss, Wolff, Morenweiser, and Reichl, 2007, p. 932-944). But all of them need very specific and expensive

instrument. Therefore, an ultrafiltration technique might be a possible method to collect virus by a physical separation without application of heat using membrane filtration techniques such as ultrafiltration with known the molecular weight cut-off (MWCO) of the membrane and whole size of virus particle (Armarego, & Perrin, 2000, p.454 ; GE Healthcare, 2008; Wickramasinghe,., Kalbfuß, Zimmermann, Thom, & Reichl, 2005, p. 23 – 27). Fortunately, the morphology and molecular mass of influenza viruses have been investigated and elucidated as an enveloped single stranded RNA virus, with an average diameter of 80 -120 nm. The whole particle of the virus has a molecular weight of approximately 477,805 Da (Shaw, Stone, Colangelo, Gulcicek, and Palese, 2008, p. e1000085). These data offer the possibility of virus concentration by using ultrafiltration in a laboratory.

2. Objectives

The aim of this study is to determine the efficacy of using ultrafiltration technique for concentrate influenza virus from the supernatant.

3. Methodology (Materials and Methods)

3.1. Virus and virus propagation

Swine influenza A virus subtype H3N2 (A/sw/Bissendorf/IDT1864/2003) were propagated in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells that were maintained in Eagle's minimal essential medium (EMEM) containing acetylated trypsin 1 mg/ml (Sigma Aldrich, Munich). The infected cells were incubated at 37°C in 5% CO₂ incubator for 3 days. The supernatants with viruses were clarified and stored at -80°C.

3.2. Ultrafiltration technique

The ultrafiltration by membrane filtration techniques using Vivaspin 20[®] (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). The stocked virus with four different volumes including, 4 ml, 32 ml, and 64 ml, respectively, was applied into Vivaspin 20[®] concentrator with filter membrane MWCO of 10 kDa. The viruses was filtrated through centrifugation at 4°C by swing bucket rotor at 3,000 x g, interrupted every 25 minutes for avoid the heat obtained by frictions, until the final volume of 1 ml were obtained. The non-centrifugal samples were used as a viral control to compare with the concentrated samples. Each condition was tested in triplicates.

3.3. Virus titration

All of the samples in every conditions including control, were perform the 50% tissue culture infective dose assay (TCID₅₀). The samples were inoculated into MDCK cells with 10-fold serial dilution of each sample, and incubated at 37°C in 5% CO₂ incubator. The infected cells were inspected for cytopathogenic effect CPE (twice a day for 3 days. At the end of the incubation period, the infected cells were stained with crystal violet for confirmation. The TCID₅₀ was determined by Spearman-Kärber method (Mahy, & Kangro, 1996).

4. Results and discussion

Influenza virus titer were observed by CPE of MDCK cells and confirmed by crystal violet staining. the results of virus concentrations which calculated by Spearman-Kärber method, was shown in table 1. The viral control concentration presents 1.9×10^7 TCID₅₀/ml, the higher concentrations of virus shows increased TCID₅₀ titer. The highest viral titer from this experiment was found at the x 64 concentration) 3.9×10^9 TCID₅₀/ml (table 1). This data indicates that Vivaspin® has the efficacy to concentrate influenza virus. Influenza A virus particle that presented the molecular weight of approximately 477,805 Da) . Shaw, Stone, Colangelo, Gulcicek, and Palese (2008, p. e1000085) was concentrated in this study. The result showed that an ultrafiltration device with a selected MWCO membrane of 10 kDa (GE Healthcare, 2008) was proved to be efficacious in concentrating Influenza virus subtype H3N2 sample.

Higher concentration of influenza virus yielded higher viral titer, this indicates that the trend of viral titer would be possibly increased when use more volume of virus resemble to the previous experiment of Ichim & Wells (2011, p. 1-8) in retrovirus. The ultrafiltration methods were used and the viral titer after still increased after 4 times concentrated.

The outcome titer was not proportionally to increased might due to result of virus escaping from the concentrator body to filtrate tube by their pleomorphism. The Influenza A virus morphology could be found from spherical particles to greatly elongated filamentous particles. The most commonly found in laboratory-adapted strains is spherical particles (Choppin, Murphy, and Tamm, 1960, p. 945-952 ; Chu, Dawson, and Elford, 1949, p. 602-603). This might due to original human isolates and early egg passages (Burnet, & Lind, 1957, p. 413; Kilbourne, & Murphy, 1960, p. 387-405). The virus we used originally from swine and propagated mainly in cell culture, therefore the morphology of virus should be more filamentous particles than spherical particles.

One important point to aware in this technique is temperature. Influenza virus is temperature sensitive. There are alteration of the influenza protein after approach the heat in different level such as Neuraminidase protein was thermal inactivated at 50 °C (Sahasrabudhe et al., 1998, p. 14-21A) and Hemagglutinin present conformational change at 63 °C (Ruigrok et al., 1986, p. 484-497). More over when the acidic pH condition is involved, the HA protein present largely in the monomeric form at 25 °C (Epanand, & Epanand, (2002), p. 841-848). This interesting informations suggest the novel aspect to concern in the future.

Another advantage of this technique is to use the refrigerated centrifuge that available in every fundamental virology laboratory for concentrate the virus. This method is easily way to perform virus concentration for improve diagnostic technique.

5. Tables

Table 1. The Titer of concentrated Swine influenza viruses in different concentrations that define in log₁₀ TCID₅₀/ml (mean±SD) after using ultrafiltration technique

Volume of virus (ml)	Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml
1	7.33±0.14
4	7.42±0.14
32	8.58±0.14
64	9.42±0.29

References

- Armarego, W.L.F & Perrin, D.D. (2000). *Purification of laboratory chemistry*. (5th ed.). Butterworth-Heinemann. Woburn. 454.
- Broberg, E., Penttinen, P., & Snacken, R. (2016). *Risk assessment of seasonal influenza, EU/EEA, 2016/2017*. Retrieved September 22, 2019, from <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Risk-assessment-seasonal-influenza-2016-2017-update.pdf>.
- Burnet, F. M., & Lind, P. E. (1957). Studies on filamentary forms of influenza virus with special reference to the use of dark-ground microscopy. *Arch. Ges. Virusforsch*, 7, 413.
- Choppin, P. W., Murphy, J. S., & Tamm, I. (1960). Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A virus strains. III. Morphological and functional traits. *J. Exp. Med.*, 112, 945-952.
- Chu, C. M., Dawson, I. M., & Elford, W. J. (1949). Filamentous forms associated with newly isolated influenza virus. *Lancet*, 1, 602-603.
- Epand, R.M., & Epand, R.F. (2002). Thermal denaturation of influenza virus and its relationship to membrane fusion. *Biochem J*, 365(3):841-848.
- Guo, P., El-Gohary, Y., Prasad, K., Shiota, C., Xiao, X., Wiersch, J., Paredes, J., Tulachan, S., Gittes, G.K. (2012). Rapid and simplified purification of recombinant adeno-associated virus. *J Virol Methods*, 183, 139-146.
- GE Healthcare. (2008). *Vivaspin*. Data file 28-9356-53 AA. Retrieved September 22, 2019, from <https://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/28935653.pdf>.
- Hutchinson, E., & Fodor, E. (2014). Purification of influenza virions by haemadsorption and ultracentrifugation. *Protocol Exchange*, 10, 1038.
- Ichim, C.V., & Wells, R.A. (2011). Generation of high-titer viral preparations by concentration using successive rounds of ultracentrifugation. *Journal of Translational Medicine*, 9(137), 1-8.
- Kalbfuss, B., Wolff, M., Morenweiser, R., & Reichl, U. (2007). Purification of cell culture-derived human influenza A virus by size-exclusion and anion-exchange chromatography. *Biotechnol Bioeng*, 96, 932-944.
- Kilbourne, E. D., & Murphy, J. S. (1960). Genetic studies of influenza virus. I. Viral morphology and growth capacity as exchangeable genetic traits. Rapid in ovo adaptation of early passage Avian strain isolated by combination with PR8. *J. Exp. Med.*, 111, 387-405.
- Mahy, B., & Kangro, H. (1996). *Virology methods manual*. Academic press limited. London. 37.
- Takahashi, K., Maeda, K., Izutani, N., Yanagi, S., Nakashima, Y. (2014). Method for producing purified influenza virus antigen. *U.S. PATENT DOCUMENTS*, US8709780B2.
- Melidou, A., Gioula, G., Exindari, M., Ioannou, E., Gkolfinopoulou, K., Georgakopoulou, T., Tsiodras, S., Papa, A. (2017). Influenza A (H3N2) genetic variants in vaccinated patients in northern Greece. *J Clinical Virology*, 94, 29-32.
- Ruigrok, R. W., Martin, S. R., Wharton, S. A., Skehel, J. J., Bayley, P. M., & Wiley, D. C. (1986). Conformational changes in the hemagglutinin of influenza virus which accompany heat-induced fusion of virus with liposomes. *Virology*, 155, 484-497.
- Sahasrabudhe, A., Lawrence, L., Epa, V. C., Varghese, J. N., Colman, P. M., & McKimm-Breschkin, J. L. (1998). Substrate, inhibitor, or antibody stabilizes the Glu119Gly mutant influenza virus neuraminidase. *Virology*, 247, 14-21.

- Shaw, M.L., Stone, K.L., Colangelo, C.M., Gulcicek, & E.E., Palese, P. (2008). Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathogen*, 4(6), e1000085.
- Shim, J.M., Kim, J., Tenson, T., Min, J.Y., & Kainov, D.E. (2017). Influenza Virus Infection, Interferon Response, Viral Counter-Response, and Apoptosis. *Viruses*, 9(8), 223.
- Wickramasinghe, S.R., Kalbfuß, B., Zimmermann, A., Thom, V., & Reichl U. (2005) .Tangential Flow Microfiltration and Ultrafiltration for Human Influenza A Virus Concentration and Purification .*BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*,92(2), 199 -208.
- World health organization .(2017). *Influenza virus update* .Retrieved September 22, 2019, from http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2017_01_09_surveillance_update_280.pdf?ua=1.

The inhibitory effect of *Roureopsis stenopetala* Schellenb. extracts on pathogenic bacteria

Haruthai Thaisuchat^{1,a}, Chonlada Thouaunraeon¹, Wachiraporn Lapuangkum¹, Satra Ladpala¹ and Pornanan Boonkorn¹

¹Faculty of Science, Lampang Rajabhat University, Lampang, Thailand

E-mail; ^aharuthaitai@yahoo.com

Abstract

Roureopsis stenopetala Schellenb. is a vine plant commonly found in the forests of Thailand and is used as an herb in the northeast region. The objective of current research was to evaluate the inhibitory effect of this plant extract on human pathogenic bacteria. Hexane, methanol and ethyl acetate were used as solvent of plant extraction. Crude extracts were tested for their antibacterial efficacy by agar disc-diffusion method against 9 bacteria (*Proteus mirabilis* DMST 8212, *Enterobacter aerogenes* DMST 8841, *Shigella flexneri* DMST 4423, *Salmonella typhimurium* DMST 562, *Escherichia coli* O157:H7 DMST 12743, enterotoxigenic *E. coli* DMST 30543, enteropathogenic *E. coli* DMST 30546, *Vibrio cholerae* non O1, non O139 DMST 2873 and *Staphylococcus aureus* DMST 8840). The result showed that the ethyl acetate extract of *R. stenopetala* exhibited antibacterial activity against *V. cholerae* non O1, non O 139 with 27.10cm of inhibition zone. Using the broth microdilution technique, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) values of ethyl acetate extract of this plant was determined as 125 mg/ml and 250 mg/ml, respectively. The plant extracts using hexane and methanol had no any inhibitory effect on all bacterial strains.

Keywords: antibacterial activity; *Roureopsis stenopetala* Schellenb.; *Vibrio cholerae*

1. Introduction

In 1998, infectious diseases are the major cause of death among 45% of the population in Southeast Asia and Africa (World Health Organization, 1999). Currently, they remain the leading cause of death worldwide, particularly in low income countries. Three infectious diseases ranked in the top ten causes of death worldwide in 2016 by the World Health Organization are lower respiratory infections, diarrheal diseases, and tuberculosis (World Health Organization, 2018). Infectious diseases can be spread from one host to another rapidly through contact with bodily fluids, by aerosols, or via a vector. The majority of agents that cause disease in humans are bacteria or viruses. (Baylor college of medicine, 2019). Bacteria caused varieties of infection are known as pathogenic bacteria. They use that host's body to sustain itself, reproduce, and colonize. Some bacterial infections are mild, but some infections are severe and life-threatening, and some are resistant to treatment. Most bacterial diseases can be treated with appropriate antibiotic but misuse of traditional antibiotics is causing microbial resistance (Sakha et al., 2018, pp. 1-6). The increase in multidrug-resistant bacteria has created enormous clinical problem in the treatment of infectious diseases. The development of alternative antibacterial agents is urgently required. Plants have served as a valuable source of antimicrobial substances since they have ability to produce a wide variety of biomolecules.

Thailand has a large diversity of plant species that has been used as traditional medicine (Mitra et al., 2007, pp. 508-518; Chotchoungchatchai, Saralamp, Jenjittikul, Pornsiripongse, and Prathanturug, 2012, pp. 193-205). Numerous plants have been studied for therapeutic purposes, but many other plants have not been investigated. *Roureopsis stenopetala* Schellenb. is a vine plant commonly found in the forests of Thailand. Few reports revealed that it was used as a medicinal plant in the northeast region and had the biological activities (Khonkayan, Saengsiri, and Thipsontae, 2019, pp. 1-17; coordination center of the royal initiative projects, KKU, 2018). To confirm the previous preliminary study, evaluation of antibacterial activity of *R. stenopetala* on human pathogenic bacteria was carried out. The results of this research could show which bacteria had been affected by plant extracts and use to consider *R. stenopetala* plant as a potential new source of antibacterial substance.

2. Objectives

The objective of the research was to produce the crude extract from *R. stenopetala* by successive extraction with 3 solvents including hexane, methanol and ethyl acetate. The inhibitory effect of these plant extracts on 9 pathogenic bacterial strains were then investigated using the standard agar disc-diffusion and broth microdilution methods.

3. Materials and Methods

3.1. Plant material and plant extracts preparation

R. stenopetala sample was collected from Ban Na Khao Kam community in Na Sak Sub-district, Mae Moh District, Lampang Province. It was rinsed with distilled water and shade dried at room temperature for one week. Dried plant material was then milled into powder using a blender. Maceration technique in 3 solvent systems (hexane, methanol and ethyl acetate) was used for plant extraction. A total of 25 g of dried sample was soaked in 100 mL of solvent at room temperature for 7 days with frequent agitation. The plant macerates were filtered with Whatman filter paper no.1 and the filtrates were then concentrated using rotary vacuum evaporator. A concentration of 250 mg/mL of different crude extracts (stock solution) was prepared by dissolving the dried extracts obtained from methanol and ethyl acetate fractions with ethanol:water (8:2) while the dried extract achieved from hexane fraction was dissolved with ethanol:dichloromethane (6:4) (Valgas, Machado de Souza, Smania, and Smania Jr., 2007, pp. 369-380).

3.2. Bacterial strains and inoculum preparation

The antibacterial activity of plant extracts was evaluated against 9 human pathogenic bacteria species: *Proteus mirabilis* DMST 8212, *Enterobacter aerogenes* DMST 8841, *Shigella flexneri* DMST 4423, *Salmonella typhimurium* DMST 562, *Escherichia coli* O157:H7 DMST 12743, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) DMST 30543, enteropathogenic *E. coli* (EPEC) DMST 30546, *Vibrio cholerae* non O1, non O139 DMST 2873 and *Staphylococcus aureus* DMST 8840 (Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand). *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio* and *Escherichia* species are responsible for diarrheal disease (Hodges and Gill, 2010, pp. 4-21). *P. mirabilis* is an agent of complicated urinary tract infections (Armbruster, Mobley, and Pearson, 2018). *E. aerogenes* and *S. aureus* are nosocomial pathogens (Davin-Regli and Pages, 2015, p. 392; Valaperta et al., 2010, pp. 223-232).

They were maintained in glycerol broth at -20°C . Five mL of tryptic soy broth (TSB) was added with 100 μL of each stock-culture and incubated for 16-18 h at 35°C in shaking incubator. After overnight cultivation, the bacterial cultures were subcultured into 10 mL of Mueller Hinton broth (MHB) and further incubated for 3-4 h at 35°C . Before running the bioassay, bacterial suspensions were measured by OD_{600} using spectrophotometer and subsequently diluted to obtain a density of approximately 10^7 CFU/ml and 10^6 CFU/ml for agar disc-diffusion method and for broth microdilution method, respectively.

3.3. Antibacterial assay of plant extracts by agar disc-diffusion method

The agar disc-diffusion assay was performed according to the method described by Balouiri, Sadiki, and Ibnsouda (2016, pp. 71-79) with some modifications. Each bacterial suspension (10^7 CFU/ml) was spread over plate containing Mueller Hinton agar (MHA) using a sterile cotton swab and discs (6 mm in diameter) saturated with 20 μL of the crude extracts (5 mg/disc) were placed on the surface of the media. The discs loaded with chloramphenicol (100 μg /disc) and solvents used for dried extract dissolving (ethanol:water (8:2) and ethanol:dichloromethane (6:4)) were used as positive and negative control, respectively. The plates were incubated for 24 h at 35°C , and the experiments were performed in triplicate. The inhibition of bacterial growth was evaluated by measuring the clear zone surrounding the disc in mm with ruler.

3.4. Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

The effective plant extract which exhibiting an antibacterial activity in the disc-diffusion assay was manipulated to determine its MIC using a broth microdilution technique incorporating a modified resazurin assay (Sarker, Nahar, and Kumarasamy, 2007, pp. 321-324) with some modifications. A 2-fold serial dilution of plant extract (250 mg/mL) was prepared in the 96-well microtiter plate containing MHB to achieve concentrations from 7.81 to 250 mg/mL in a total volume of 50 μL . Fifty μL of bacterial inoculum (10^6 CFU/ml) was added in each well. The plate was wrapped loosely with cling film and placed in an incubator set at 35°C for 18-24 h. The experiment was prepared in triplicate. A set of controls was also performed for each plate including a well with chloramphenicol (in 2-fold serial dilution starting from 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), a well with all solutions with the exception of the test sample and a well with all solutions with the exception of the bacterial inoculum. After overnight incubation, 10 μL of resazurin indicator solution (1 mg/mL) was added to the microplate wells and incubated at 35°C for 2 h. The MIC was assessed visually from the purple color of solution as the lowest concentration of plant extract that prevent visible bacterial growth.

To determine the MBC of plant extract, all purple solutions from MIC plate was freshly inoculated on tryptic soy agar plate. The lowest concentration of plant extract that led to bacterial growth inhibition was taken as MBC.

4. Results and discussion

The extract of 25 g of dried *R. stenopetala* with three solvents yielded plant extract residues ranged from 0.38 to 4.84 g. The extraction weight of ethyl acetate fraction was the highest (4.84 g), followed by hexane fraction (0.61 g) and methanol fraction was the lowest (0.38 g).

Agar disc-diffusion method revealed that the ethyl acetate extract of *R. stenopetala* had the

antibacterial activity against *V. cholerae* non O1, non O139 with zone of inhibition of 10.27 mm (Figure 1A) at 250 mg/mL concentration and no activity toward other strains. The hexane and methanol extract of *R. stenopetala* exhibited no inhibitory activity against most of the tested bacteria. The MIC and MBC values of ethyl acetate extract of *R. stenopetala* were found to be 125 mg/mL (Figure 1B) and 250 mg/mL (Figure 1C), respectively.

R. stenopetala was one of the herbs that was economically important to communities in Phu Mae Nang Mon area, Mukdahan province. People in the northeast region of Thailand used boiled water from leaves of *R. stenopetala* for healthy drinking (Khonkayan, Saengsiri and Thipsontae, 2019, pp. 1-17). Only a few studies addressed the biological activity of *R. stenopetala*. In Thailand, coordination center of the royal initiative projects, KKU (2018) informally reported that the alcoholic extract of stem of this plant showed antioxidant activity ($EC_{50} = 5.05$ mg/mL), antiviral activity against herpes simplex virus type 1 ($IC_{50} = 49.79$ mg/mL) and antibacterial activity against *Streptococcus mutans* (MIC = 3.125 mg/mL), *S. aureus* (MIC = 1.56 mg/mL) and *V. cholerae* (MIC = 12.50 mg/mL). The results regard to the antibacterial activity were not consistent with this research. Extract of *R. stenopetala* only with ethyl acetate had an inhibitory effect on *V. cholerae*, while the alcoholic extract could not affect neither *S. aureus* nor *V. cholerae*.

The type of solvent used for plant extraction influences which biomolecule compounds are isolated. Methanol and ethanol are the most successful at extracting unknown antibacterial compounds from various plants (Sakha et al., 2018; pp. 1-6; Bacon et al., 2017, pp. 497-503; Onivogui, Letsididi, Diaby, Wang, and Song, 2016, pp. 20-25; Muthii, Mucunu, Peter, Gitahi, and Onzago, 2014, pp. 343-347). The methanolic or ethanolic extracts frequently exhibited higher antibacterial activity than the other solvents used. However, acetone (50% v/v) was found to be the optimal extraction solvent for extractable compounds from *Salacia chinensis* L. (Ngo, Scarlett, Bowyer, Ngo, and Vuong, 2017), hexane was more effective at extracting antibacterial substances from medicinal plant in Malaysia when compared to water and ethanol (Samsudin et al., 2018, pp. 573-579) and *Spinacia oleracea* has higher antibacterial activity in ethyl acetate extract compared to other extracts (Olasupo, Aborisade, and Olagoke, 2018, p. 8). Additionally, the differences of biological activity of plants maybe come from the differences in that geographical area of plant collection, the parts of plant used and bacterial strains used (Debalke, Birhan, Kinubeh, and Yayeh, 2018).

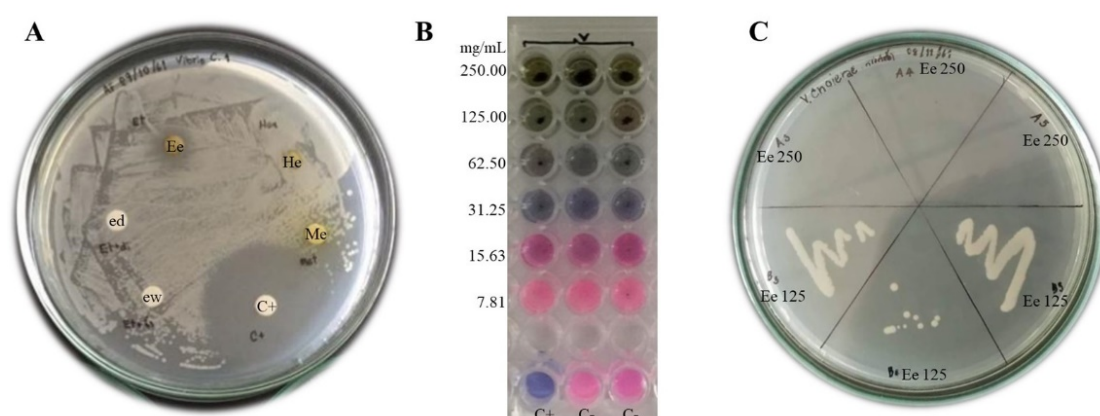


Figure 1 Growth inhibition of ethyl acetate extract of *R. stenopetala* (Ee) by agar disc-diffusion assay (A). He, hexane extract; Me, methanol extract; ed, ethanol:dichloromethane (6:4); ew, ethanol:water

(8:2) and C+, chloramphenicol (100 µg/disc). The MIC value of ethyl acetate extract of *R. stenopetala* against *V. cholerae* determined by broth microdilution technique (B) and MBC value evaluated on the agar plate (C).

5. Conclusions

R. stenopetala is a medicinal plant which can be a possible source to obtain an antibacterial agent for treatments of infectious diseases caused by *V. cholerae*. The ethyl acetate extract of *R. stenopetala* has a moderate antibacterial activity against *V. cholerae*. To achieve enough quality and quantity of bioactive molecules, the plant parts should be extracted with other solvent types, and further phytochemical studies are required to determine the potential active compounds.

References

- Armbruster, C.E., Mobley, H.L.T., & Pearson, M.M. (2018). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection. *EcoSal Plus*, 8(1). Retrieved Oct 12, 2011, from <https://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017>.
- Bacon, K., Boyer, R., Denbow, C., O'Keefe, S., Neilson, A., & Williams, R. (2017). Evaluation of different solvents to extract antibacterial compounds from jalapeño peppers. *Food Science & Nutrition*, 5, 497-503.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71-79.
- Baylor college of medicine. (2019). *Introduction to Infectious Diseases*. Retrieved Oct 12, 20, from <https://www.bcm.edu/departments/molecular-virology-and-microbiology/emerging-infections-and-biodefense/introduction-to-infectious-diseases>.
- Chotchoungchatchai, S., Saralamp, P., Jenjittikul, T., Pornsiripongse, S., & Prathanturarug, S. (2012). Medicinal plants used with Thai traditional medicine in modern healthcare services: A case study in Kabchoeng hospital, Surin province, Thailand. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1), pp. 193-205.
- Coordination center of the royal initiative projects, KKU. (2018). *Production of a medicinal plant database that is surveyed and researched in the plant genetic conservation project under the royal initiative of her royal highness princess Maha Chakri Sirindhorn* (in Thai). Retrieved Oct 12, 2011, from <https://home.kku.ac.th/orip2/thaiherbs/index.php/2013-05-04-04-14-43/33-2013-05-07-09-41-01>.
- Davin-Regli, A., & Pages, J.-M. (2015). *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, 6, 392.
- Debalke, D., Birhan, M., Kinubeh, A., & Yayeh, M. (2018). Assessments of antibacterial effects of aqueous-ethanolic extracts of *Sida rhombifolia*'s aerial part. *Scientific World Journal*, Retrieved Oct 14, 2011, from <https://doi.org/10.1155/2018/8429809>.
- Hodges, K., & Gill, R. (2010). Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes*, 1(1):4-21.
- Khonkayan, S., Saengsiri, V., & Thipsontae, H. (2019). Medicinal plants in Phu Mae Nang mon, Phu Sri Tan wildlife sanctuary, Mukdahan province. *Burapha Science Journal*, 24(2), 1-17.
- Mitra, R., Agricola, S., Mitchell, B., Orbell, J., Gray, C., & Muralitharan, M.S. (2007). Medicinal plants of Thailand. *Asia-Pacific Biotech News*, 11(8), pp. 508-518.
- Muthii, R.Z., Mucunu, M.J., Peter, M.M., Gitahi, K.S., & Onzago, O.R. (2014). Antimicrobial activity

- of aqueous and methanol extract of naturally growing and cultivated *Aloe turkanensis*. *The Journal of Phytopharmacology*, 3(5), 343-347.
- Ngo, T.V., Scarlett, C.J., Bowyer, M.C., Ngo, P.D., & Vuong, Q.V. (2017). Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of *Salacia chinensis* L. *Journal of Food Quality*. Retrieved Oct 12, 2011, from <https://doi.org/10.1155/2017/9305047>.
- Olasupo, A.D., Aborisade, A.B., & Olagoke, O.V. (2018). Phytochemical analysis and antibacterial activities of spinach leaf. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 6(2), 8.
- Onivogui, G., Letsididi, R., Diaby, M., Wang, L., & Song, Y. (2016). Influence of extraction solvents on antioxidant and antimicrobial activities of the pulp and seed of *Anisophyllea laurina* R. Br. Ex Sabine fruits. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 20-25.
- Sakha, H., Hora, R., Shrestha, S., Acharya, S., Dhaka, D., Thapaliya, S. & Prajaati, K. (2018). Antimicrobial activity of ethanolic extract of medicinal plants against human pathogenic bacteria. *Tribhuvan University Journal of Microbiology*, 5(1), 1-6.
- Samsudin, N.I.P., Lee, H.Y., Chern, P.E., Ng, C.T., Panneerselvam, L., Phang, S.Y., Tan, W.T., & Mahyudin, N.A. (2018). In vitro antibacterial activity of crude medicinal plant extracts against ampicillin+penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Food Research Journal*, 25(2), 573-579.
- Sarker, S.D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y.K. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42, 321-324.
- Valgas, C., Machado de Souza, S., Smania, E.F.A., & Smania Jr., A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369-380.
- Valaperta, R., Tejada, M. R., Frigerio, M., Moroni, A., Chilla, E., Cioffi, S., Capelli, P., Costa, E. (2010). *Staphylococcus aureus* nosocomial infections: The role of a rapid and low-cost characterization for the establishment of a surveillance system. *New Microbiologica*, 33(3), 223-232.
- World Health Organization. (1999). *Removing obstacles to healthy development*. Retrieved Oct 10, 2011, from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/65847/1/WHO_CDS_99.1.pdf.
- World Health Organization. (2018). *The top 10 causes of death*. Retrieved Oct 10, 2011, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

Effect of bioactive compounds from *Moringa oleifera* leaf extract against ethanol toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*

Wisuta Chumsawat¹, Sarawaree Khotsri², Virayuth Khamdi², and Choowong Auesukaree^{1,a}

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

² Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

E-mail; choowong.aue@mahidol.ac.th^a

Abstract

During fermentation, increased concentration of ethanol is a major stress that causes yeast cell damage and finally reduces ethanol production. Therefore, the reduction of ethanol toxicity may be a key step to improve ethanol production. Previously, the protective effect of *Moringa oleifera* leaf extract against ethanol toxicity has been reported. This study aims to investigate the effect MOLE and its bioactive compounds on reducing ethanol toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Since the cell wall is one of major cellular targets of ethanol, we examined the effect of MOLE on protecting yeast cell wall against ethanol by using Zymolyase sensitivity assay. However, our result showed that MOLE has no effect on yeast cell wall during ethanol stress. Since it has been reported that the generation of intracellular reactive oxygen species is induced during ethanol stress and MOLE is rich in antioxidants, it is possible that the major antioxidants in MOLE such as quercetin and gallic acid may have ability to reduce ethanol toxicity. To test this hypothesis, we determined the yeast growth under ethanol stress conditions in the presence and absence of quercetin or gallic acid by using spot susceptibility assay. Our results revealed that quercetin and gallic acid did not promote the yeast growth during ethanol stress. Further study is therefore needed to clarify the cellular mechanism of MOLE on reducing ethanol toxicity.

Keywords: cell wall; ethanol; gallic acid; quercetin; *Moringa oleifera*; *Saccharomyces cerevisiae*

1. Introduction

One of the biggest challenges for energy demand is to reduce the usage of fossil fuel. Fossil fuel has been the major energy resource for industrial development and urbanization over the centuries (Zou, Zhao, Zhang, & Xiong, 2016). Due to an increase in global consumption of fossil fuels, a major greenhouse gas CO₂ is released into the atmosphere, thereby causing several environmental problems including global warming and air pollution (Höök & Tang, 2013; Perera, 2017). Therefore, a more sustainable and eco-friendly alternative fuels such as bioethanol have received increasing attention. Bioethanol is a biodegradable and renewable energy (Williams, Dahiya, & Porter, 2015), whose major sources of feedstock are grains and crops with high starch and sugar such as corn, cassava, sugarcane, and molasse (Bušić et al., 2018).

Bioethanol is mainly produced via biological process called fermentation. *Saccharomyces cerevisiae* is an ethanologenic microbe commonly used in ethanol production (Favaro, Jansen, & van Zyl, 2019; Mohd Azhar et al., 2017). Stresses occurring during fermentation, especially the increasing of ethanol concentrations, can inhibit yeast's growth and viability, leading to the decline of fermentation performance (Stanley, Bandara, Fraser, Chambers, & Stanley, 2010). Cellular toxicities of ethanol have been reported to be caused by the effects of ethanol on increasing membrane

permeability, enhancing reactive oxygen species generation, induction of protein denaturation, and cell wall perturbation (Auesukaree, 2017; Gibson, Lawrence, Leclaire, Powell, & Smart, 2007; Ma & Liu, 2010; Stanley et al., 2010; You, Rosenfield, & Knipple, 2003). For this reason, minimizing the ethanol toxicity may be an important factor to promote the growth and metabolism of yeast cells during ethanol fermentation, which in turn enhances the ethanol production yield.

Moringa oleifera is a beneficial medicinal plant belonging to Moringaceae family (Leone et al., 2015). *M. oleifera* is also known as miracle tree due to its wide-range of pharmaceutical properties such as antioxidant, anticancer, antihypertension, antimicrobial, antiviral, and antidiabetic (Bhattacharya, Tiwari, Sahu, & Kumar, 2018; Dhakar et al., 2011; Kerdsomboon, Tatip, Kosasih, & Auesukaree, 2016; Matic, Guidi, Kenzo, Mattei, & Galgani, 2018; Muhammad, Asmawi, & Khan, 2016; Nilanjana, 2014; Vergara-Jimenez, Almatrafi, & Fernandez, 2017; Vongsak et al., 2013; Younus, 2015). Moreover, the protective effect of *M. oleifera* leaf extract (MOLE) against ethanol toxicity in *S. cerevisiae* had been found (unpublished data). Therefore, in this study, the mechanism of MOLE on reducing ethanol toxicity will be investigated.

2. Objectives

To investigate the effect of MOLE and its bioactive compounds on reducing ethanol toxicity in *S. cerevisiae*

3. Methodology

3.1. Preparation of soluble MOLE

Five g of the dried *M. oleifera* leaf powder was mixed with 30 mL of water and vortexed for 30 s, left at room temperature for 5 min, and vortexed again for 1 min. To separate the water-soluble fraction, the *M. oleifera* mixture was centrifuged at 13,000 rpm for 20 min, and filtrated by filter paper. The soluble 50 mg/mL MOLE was sterilized by filtrating with 0.2 µm-syringe filter and stored at 4 °C until use (Kerdsomboon et al., 2016).

3.2. Strain and media

S. cerevisiae wild-type BY4742 strain (*MATα*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *lys2Δ0* and *ura3Δ0*) was used in this study. Yeast was cultured in YPD media (Bio Basic Inc) containing 2% peptone, 1% yeast extract, and 2% glucose.

3.3. Zymolyase sensitivity assay

The effect of MOLE on cell wall remodeling under ethanol stress condition was investigated by monitoring susceptibilities to cell wall-degrading enzyme Zymolyase (whose major activities are β-1,3 glucanase and β-1,3-glucan laminaripentaohydrolase). The yeast wild-type cells were grown to log phase in YPD media and inoculated into YPD media and YPD media containing 7% ethanol in the presence and absence of MOLE at 30 °C for 12 h. The cells then washed with TE buffer (10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA, pH 7.5) and adjusted to OD₆₀₀ of 0.5 in TE buffer containing 100 µg/mL (1.5 U) Zymolyase 20T (Zymo Research). Changing of the OD₆₀₀ was monitored at 15-min intervals for 120 min (Charoenbhakdi, Dokpikul, Burphan, Techo, & Auesukaree, 2016).

3.4. Spot susceptibility assay

To examine the effect of gallic acid and quercetin on the growth of yeast cells under ethanol stress conditions, the yeast wild-type cells grown to log phase in YPD media was inoculated into YPD media, YPD containing 3% and 7% (v/v) ethanol, in the presence of 0.1, 0.5, 1, 5 mg/mL gallic acid or quercetin, and incubated at 30 °C for 12 h. Cells were harvested by centrifugation at 5,000 rpm for 5 min and were then 10-fold diluted (10^0 - 10^{-4}) in sterile water. Aliquot (2 µl) of each cell suspension was spotted on YPD agar plates and incubated at 30 °C for 2 day.

3.5 Statistical analysis

The experiments were independently performed at least three times. The data is expressed as mean $\pm$ standard deviation. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using the least significant difference (LSD) method in the SPSS statistical package (version 18.0 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The level of statistical significance was set at *P* value of <0.05.

4. Results and discussion

4.1. The effect of *M. oleifera* leaf extract (MOLE) on cell wall during ethanol exposure.

As a stress defense mechanism of yeast cell, yeast cell wall is the first defense mechanism against external stimuli including ethanol. It is well-known that yeast cell wall will be reconstructed into a more rigid structure in response to ethanol. Previously, it has been shown that the resistance of yeast cells against cell wall-lytic enzyme Zymolyase increases after ethanol treatment (Charoenbhakdi et al., 2016; Udom, Chansongkrow, Charoensawan, & Auesukaree, 2019). Recently, the protective effect of *M. oleifera* leaf extract (MOLE) against ethanol toxicity has been found. Since cell wall perturbation is one of ethanol effect (Charoenbhakdi et al., 2016), it is possible that MOLE may protect yeast cell wall from ethanol toxicity. To investigate the effect of MOLE on protection strengthening yeast cell wall against ethanol stress, the wild-type (BY4742) strain was cultured in YPD media and YPD media containing 7% ethanol in the presence and absence of 20 mg/ml MOLE. The cells were harvested and resuspended in TE buffer containing Zymolyase to observe the Zymolyase susceptibility. Consistently with the previous report (Udom et al., 2019), we found that the Zymolyase resistance was increased after ethanol treatment (**Figure 1**). However, the co-incubation with MOLE did not significantly alter the Zymolyase resistance of the ethanol-treated cells (**Figure 1**), suggesting that MOLE has no effect on yeast cell wall during ethanol stress.

4.2. The effect of gallic acid and quercetin on yeast growth during ethanol stress.

Previously, it has been shown that the generation of reactive oxygen species is induced during ethanol exposure (You et al.) and MOLE is rich of antioxidants (Bhattacharya et al., 2018; Fahey, 2005). It is therefore possible that the major antioxidants in MOLE such as gallic acid and quercetin (Vergara-Jimenez et al., 2017) may play the important role in reducing the ethanol-induced oxidative damage. To investigate the effect of gallic acid and quercetin on protecting yeast cells against ethanol stress, the yeast growth under ethanol stress conditions in the presence and absence of gallic acid or quercetin was examined by using spot susceptibility assay. Our results showed that the addition of gallic acid or quercetin did not improve the growth of yeast cells grown under ethanol stress

conditions (**Figure 2**), suggesting that gallic acid and quercetin are not the bioactive compounds responsible for protection against ethanol stress. Based on these findings, it is likely that some other compounds of the MOLE are important for the protection against ethanol toxicity or the effect against ethanol toxicity will be exerted only when used in a mixture form as crude extract.

In conclusion, we found that MOLE has no effect on strengthening yeast cell wall against ethanol stress. Furthermore, gallic acid and quercetin were not the bioactive compounds responsible for protecting yeast cells against ethanol toxicity. Therefore, further investigation is required to understand the mechanism of MOLE on reducing ethanol toxicity.

5. Figures

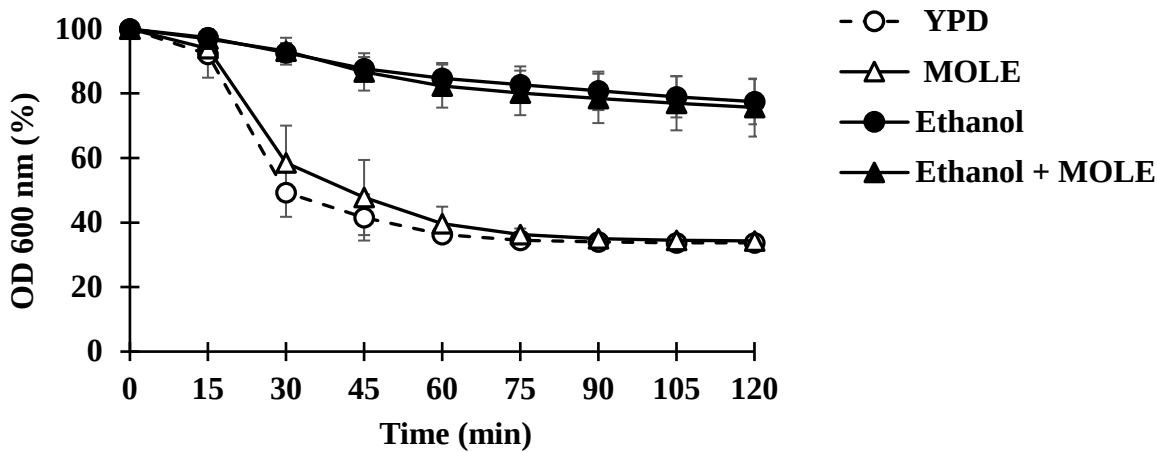


Figure 1. Effect of MOLE on cell wall under ethanol stress conditions. The wild-type cells were incubated in YPD media and YPD media containing 7% (v/v) ethanol in the presence and absence of 20 mg/mL MOLE at 30 °C for 12 h. The cells were harvested and adjusted to OD₆₀₀ of 0.5 in TE buffer containing 100 µg/mL (1.5 U) Zymolyase 20T. Sensitivity to Zymolyase was monitored by measuring the OD₆₀₀ at 15-min intervals for 120 min and expressed as a percentage of OD₆₀₀ relative to the 0 min point. The mean ± SD values are from three independent experiments. *P* < 0.05

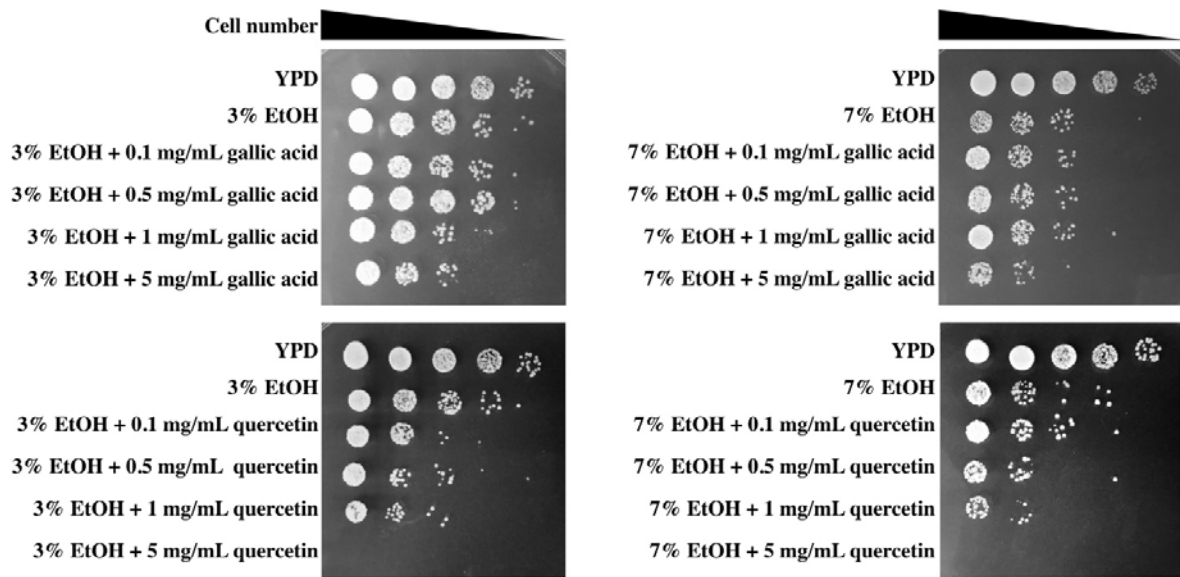


Figure 2. Effect of gallic acid and quercetin on yeast growth during ethanol stress. The wild-type cells were incubated in YPD media and YPD media containing 3% or 7% (v/v) ethanol in the presence of 0.1, 0.5, 1, 5 mg/mL gallic acid or quercetin at 30 °C for 12 h. Aliquot (2 µl) of 10-fold serially-diluted cultures were spotted onto YPD agar plates and incubated at 30 °C for 2 day.

References

- Auesukaree, C. (2017). Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *J Biosci Bioeng*, 124(2), 133-142.
- Bhattacharya, A., Tiwari, P., Sahu, P. K., & Kumar, S. (2018). A review of the phytochemical and pharmacological characteristics of *Moringa oleifera*. *J Pharm Bioallied Sci*, 10(4), 181-191.
- Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., & Šantek, B. (2018). Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: A Review. *Food Technol Biotechnol*, 56(3), 289-311.
- Charoenbhakdi, S., Dokpikul, T., Burphan, T., Techo, T., & Auesukaree, C. (2016). Vacuolar H⁺-ATPase protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against ethanol-induced oxidative and cell wall stresses. *Appl Environ Microbiol*, 82(10), 3121-3130.
- Dhakar, R., Pooniya, B., Gupta, M., Maurya, S., Bairwa, N., & Sanwarmal. (2011). Moringa : The herbal gold to combat malnutrition. *Chron Young Sci*, 2(3).
- Fahey, J. W. (2005). *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Tree for Life J*, 1(5), 157-164.
- Favaro, L., Jansen, T., & van Zyl, & W. H. (2019). Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol. *Crit Rev Biotechnol*, 17.
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P., Powell, C. D., & Smart, K. A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev*, 31(5), 535-569.
- Höök, M., & Tang, X. (2013). Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change—A review. *Energy Policy*, 52, 797-809.
- Kerdsomboon, K., Tatip, S., Kosasih, S., & Auesukaree, C. (2016). Soluble *Moringa oleifera* leaf extract reduces intracellular cadmium accumulation and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*, 121(5), 543-549.
- Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2015). Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An Overview. *Int J Mol Sci*, 16(6), 12791-12835.
- Ma, M., & Liu, Z. L. (2010). Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87(3), 829-845.
- Matic, I., Guidi, A., Kenzo, M., Mattei, M., & Galgani, A. (2018). Investigation of medicinal plants traditionally used as dietary supplements: A review on *Moringa oleifera*. *J Public Health Afr*, 9(3), 841.
- Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem Biophys Rep*, 10, 52-61.
- Muhammad, H. I., Asmawi, M. Z., & Khan, N. A. K. (2016). A review on promising phytochemical, nutritional and glycemic control studies on *Moringa oleifera* Lam. in tropical and sub-tropical regions. *Asian Pac J Trop Biomed*, 6(10), 896-902.
- Perera, F. (2017). Pollution from fossil-fuel combustion is the leading environmental threat to global pediatric health and equity: solutions exist. *Int J Environ Res Public health*, 15(1), 16.
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J., & Stanley, G. A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol*, 109(1), 13-24.

- Udom, N., Chansongkrow, P., Charoensawan, V., & Auesukaree, C. (2019). Coordination of the cell wall integrity and high-osmolarity glycerol pathways in response to ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 85(15), e00551-00519.
- Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M. M., & Fernandez, M. L. (2017). Bioactive components in *Moringa oleifera* leaves protect against chronic disease. *Antioxidants (Basel)*, 6(4).
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: feedstock and current technologies. *J Environ Chem Eng*, 2(1), 573-584.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Ind Crops Prod*, 44, 566-571.
- Williams, C. L., Dahiya, A., & Porter, P. (2015). Chapter 1 - Introduction to bioenergy. In A. Dahiya (Ed.), *Bioenergy* (pp. 5-36). Boston: Academic Press.
- You, K. M., Rosenfield, C. L., & Knipple, D. C. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol*, 69(3), 1499-1503.
- Younus, I. S., A.; Assad, T.; Badar, S.; Jameel, S & Ashraf, M. (2015). Screening antiviral activity of *Moringa oliefera* L. leaves against foot and mouth disease virus. *Glob Vet*, 15(4), 409-413.
- Zou, C., Zhao, Q., Zhang, G., & Xiong, B. (2016). Energy revolution: from a fossil energy era to a new energy era. *Natural Gas Industry B*, 3(1), 1-11.

การเก็บรักษาเชื้อยีสต์จากน้ำหมักเปลือกสับปะรด โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

กัลทิมา พิชัย* ธัญญาพร แสงศรีจันทร์ อ้อมหทัย ดีแท้

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

*email: kaltimap@hotmail.com

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ มีจุดประสงค์เพื่อรักษาสภาพและดูแลเชื้อบริสุทธิ์ให้อยู่ในสภาพที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยเมื่อนำกลับมาเพาะเลี้ยงแล้วต้องมีคุณสมบัติเหมือนเชื้อดั้งเดิม ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกยีสต์จากน้ำหมักเปลือกสับปะรด นำมาเพาะเลี้ยงแล้วศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของยีสต์ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา กำลังขยาย 400 เท่า และเก็บรักษาเชื้อยีสต์ที่แยกได้ โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ผลการศึกษาสามารถแยกเชื้อยีสต์จากน้ำหมักสับปะรดได้ 3 ไอโซเลต เมื่อนำมาเก็บรักษาโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ อัตรารอดของเชื้อ อยู่ระหว่างร้อยละ 77 ถึง 96 ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาเชื้อเพื่อใช้ในห้วงปฏิบัติการได้ และอาจได้ผลดียิ่งขึ้นหากมีการนำสารป้องกันเซลล์มาใช้ในการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

คำสำคัญ: การรักษาสภาพ ยีสต์ การทำแห้งแบบเยือกแข็ง อัตรารอด

Yeast Preservation from Fermented Pineapple Peel by Freeze-Drying

***Kaltima Phichai Thanyaporn Sangsrichan Aomhatai Deethae**

Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai, Thailand

*E-mail; kaltimap@hotmail.com

Abstract

The purpose of preserving microorganism cultures in a university laboratory is to ensure they remain viable for laboratory classes, research, and to generate consistent laboratory test results over time. The objectives of this study were 1) to isolate yeast from fermented pineapple peel 2) to characterize the basic morphology of yeast isolated under a compound light microscope at 400x magnifying power 3) to preserve the cells by freeze-drying method. The results showed that three isolates of yeast were found from fermented pineapple peel. The survival rate of isolated yeasts after 4 weeks preservation at -54°C by freeze-drying were 77-96 percentage. Data presented here will help laboratorians make a more informed choice about how they preserve and maintain their microorganism cultures. In addition, cryoprotectants need to be considered to get better preservation.

Keywords: Preservation; Yeast; Freeze-Drying; Survival Rate

บทนำ

การเก็บรักษาจุลินทรีย์มีวัตถุประสงค์เพื่อรักษาจุลินทรีย์ให้มีชีวิตรอดได้นาน โดยยังมีความบริสุทธิ์และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม มีความสามารถในการขยายพันธุ์ได้หลังการเก็บรักษา วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์มีหลายวิธี แต่มีหลักการสำคัญ คือ การหยุดหรือลดกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ให้ต่ำลง โดยควบคุมปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญ เช่น การจำกัดอากาศ อุณหภูมิ สารอาหารและน้ำ หรือลดอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา เป็นต้น การคัดเลือกกรรมวิธีที่ใช้ในการเก็บรักษาจะต้องเลือกวิธีที่สามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้เป็นระยะเวลานาน โดยไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งรูปร่างและการให้ผลผลิต ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม นอกจากนี้เชื้อที่เก็บรักษาจะต้องมีชีวิตรอดอยู่รอดได้ภายหลังจากการเก็บรักษา เชื้อที่เก็บจะต้องเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ไม่มีการปนเปื้อนในระหว่างการเก็บรักษา อีกทั้งต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษา จำนวนของเชื้อและความสำคัญของเชื้อที่ต้องการเก็บรักษา รวมทั้งความสะดวกในการขนส่งด้วย

การทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้เป็นเวลานานและไม่ยุ่งยากระหว่างการเก็บรักษา สามารถเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องได้ (Miyamoto-Shinohara, Nozawa, Sukenobe, & Imaizumi, 2010) ขั้นตอนการเก็บรักษาเชื้อ คือการทำสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ให้แข็งตัวลงอย่างรวดเร็ว และกำจัดน้ำให้อยู่ในรูปของไอน้ำโดยไม่ผ่านการเป็นของเหลว น้ำจะถูกกำจัดออกโดยการทำให้เป็นไอภายใต้สุญญากาศ กรรมวิธีนี้ต้องอาศัยองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ ส่วนที่ใช้ในการแช่แข็งเซลล์ ส่วนที่ต่อกับสุญญากาศและส่วนดักจับน้ำ ตัวอย่างสารละลายของเชื้อที่ต้องการเก็บรักษาที่อยู่ภายในหลอดแก้วเล็กจะถูกนำมาทำให้แข็งตัวก่อนโดยจุ่มในสารละลายทำเยน เช่น ในส่วนผสมของคาร์บอนไดออกไซด์แข็งและแอลกอฮอล์ หรือเกลือและน้ำแข็งหลังจากแช่แข็งเซลล์แล้ว นำมากำจัดความชื้นออกโดยอยู่ในรูปของไอภายใต้สุญญากาศ เมื่อเซลล์แห้งดีแล้วปิดปากหลอดแก้วเล็กภายใต้สุญญากาศ หรือบรรจุในโตรเจนแห้งเข้าไปและปิดปากหลอด อีกวิธีหนึ่งคือ การทำเซลล์ให้แข็งโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยการหมุนเหวี่ยง (centrifugal freeze-drying) โดยนำสารละลายของเชื้อที่บรรจุในหลอดแก้วเล็กปากกว้าง และอุดจุกด้วยสำลีมาต่อกับเครื่องที่หมุนเหวี่ยงได้ ภายใต้ระบบสุญญากาศ ความเย็นจะทำให้เซลล์แข็งตัวและไออระเหยออกจากสารละลาย เมื่อสารละลายของเซลล์แข็งตัวแล้ว เครื่องหมุนเหวี่ยงจะหยุดทำงาน แต่การกำจัดน้ำจะยังคงมีอยู่จนกระทั่งความชื้นถูกกำจัดออกไปจนหมด หลังจากนั้นปิดปากหลอดแก้วเล็กภายใต้สุญญากาศ หรือเติมไนโตรเจนแห้งลงไปแล้วปิดปากหลอด ตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านขั้นตอนนี้แล้วจะนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส หรืออาจเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องที่มีอุณหภูมิคงที่ในช่วง 24 ถึง 26 องศาเซลเซียส แต่พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (-20 องศาเซลเซียส ถึง -70 องศาเซลเซียส) จะช่วยให้เชื้อที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลานานมีความคงทนและอยู่รอดได้ดี (Berner & Viernstein, 2006)

ยีสต์ คือ ราชนิดหนึ่งที่ดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม รี สามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ ยีสต์สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ บนส่วนต่างๆ ของพืช ยีสต์บางชนิดพบอยู่กับแมลง และในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่พบยีสต์บ่อยๆ คือ แหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน น้ำผึ้ง และผลไม้สุก เป็นต้น โดยยีสต์ที่รู้จักในปัจจุบันมีมากกว่า 2,500 ชนิด (อรุณ ขาญชัยเขารัตน์, 2558) ชนิดที่รู้จักอย่างแพร่หลาย คือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้ในการทำขนมปัง เบียร์ ไวน์ ฯลฯ ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภทโดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เช่น ใช้ในการผลิตขนมปัง เบียร์ ไวน์ และวิสกี นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่น อาหารสัตว์ เครื่องสำอางค์ และใช้ผลิตเอทานอล เชื้อเพลิง เป็นต้น เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง จึงนิยมนำมาใช้เป็นตัวแทนศึกษาในห้องปฏิบัติการ และการทำวิจัยเสมอๆ อย่างไรก็ตามการแยกเชื้อยีสต์เพื่อให้ได้สายพันธุ์จากธรรมชาติและเก็บรักษาเชื้อในรุ่น (batch) เดียวกันไว้ เพื่อใช้ตลอดเวลาของการศึกษาหรือการทำวิจัยจึงเป็นสิ่งจำเป็น การศึกษาในครั้งนี้จึงต้องการที่จะแยกสายพันธุ์ยีสต์จากน้ำหมักเปลือกสับปะรดและนำมาเก็บรักษาเพื่อให้เป็นเชื้อหลัก (master seed) ตลอดการศึกษา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกเชื้อยีสต์จากน้ำหมักเปลือกสับปะรด
2. เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของยีสต์ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
3. เพื่อเก็บรักษาเชื้อยีสต์ที่แยกได้ โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมน้ำหมักเปลือกสับปะรด

ล้างทำความสะอาดเปลือกสับปะรด จากนั้นนำเปลือกสับปะรดมาคั้นแล้วทำการกรองด้วยผ้าขาวบาง เมื่อได้น้ำจากเปลือกสับปะรดแล้ว นำไปหมักในภาชนะปิดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การแยกเชื้อบริสุทธิ์

นำน้ำหมักจากเปลือกสับปะรดที่ได้จากข้อ 1 มาทำการเจือจาง 10 เท่า (ten-fold serial dilution) โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water) เป็นตัวเจือจาง จนถึงความเข้มข้น 10^{-6} ต่อมาทำการทดสอบการละลายที่มีความเข้มข้นที่ 10^{-4} ถึง 10^{-6} ลงบนอาหาร YM Agar แล้วทำการเกลี่ยสารละลายของเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าด้วยแท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำความเข้มข้นละ 2 ข้ำ จากนั้นทำการเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีที่ต่างกันมาทำการซิดลงบนอาหาร YM Agar แล้วทำการบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวๆแล้ว นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยการนำเชื้อยีสต์หยดลงบนสไลด์แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายด้วยหัวเข็มเย็บผ้า เพื่อดูรูปร่างและขนาดของเซลล์ยีสต์

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้ มาเลี้ยงในอาหาร YM Broth โดยทำการเชยเชื้อยีสต์ที่บริสุทธิ์มา 1 หลังเย็บเชื้อ ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร YM Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวราบที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (starter) จากนั้นใช้เครื่องดูดจ่ายสารละลายดูดเชื้อตั้งต้นมา 5 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร YM Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตรชนิดละ 2 ขวด ทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวราบที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อแล้วนำไปทำการวัดค่าความดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทุกๆ 6 ชั่วโมง จนถึงขั้นการเจริญคงที่ (stationary phase) และทำการวัดการเจริญของเซลล์ยีสต์ โดยวิธี spread plate ที่ความเข้มข้น 10^{-4} ถึง 10^{-6} ความเข้มข้นละ 4 จาน หลังจากนั้นทำการเก็บเชื้อยีสต์เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

4. การเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-drying)

นำเชื้อยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการเก็บรักษาแบบเยือกแข็ง โดยนำมาใส่ในขวดแก้วฝาเกลียว ขวดละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด แล้วนำไปแช่แข็งในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ให้น้ำภายในขวด แก้วระเหยออกไปบางส่วน ต่อมานำเชื้อยีสต์ที่ทำการแช่แข็งในตู้เย็นไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ยี่ห้อ Christ รุ่น Alpha 1-4 LD plus) ด้วยการลดความดันให้ต่ำกว่าบรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ -54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส

5. การตรวจสอบอัตราการรอดของเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ที่ได้จากการทำแห้งแบบเยือกแข็งมาทำการตรวจสอบอัตราการรอดหลังจากทำการเก็บรักษาเชื้อยีสต์เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ นับจำนวนเซลล์ด้วยวิธีการ spread plate เช่นเดียวกับข้อ 3 นับเซลล์ ในหน่วยโคโลนีฟอร์มมิงยูนิต (cfu) แล้วนำมาคำนวณหาอัตราการรอดของเชื้อจากสูตร

$$\frac{\text{จำนวนเซลล์ยีสต์หลังการเก็บรักษา}}{\text{จำนวนเซลล์ยีสต์ก่อนการเก็บรักษา}} \times 100$$

ผลการศึกษา

การแยกเชื้อยีสต์จากน้ำหมักเปลือกสับปะรด สามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลท ที่แตกต่างกัน โดยงานวิจัยนี้ แยกเชื้อยีสต์จากน้ำหมักเปลือกสับปะรดสดและเมื่อนำเชื้อยีสต์ไปทำการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า ไอโซเลทที่ 1 โคโลนีมีลักษณะกลม สีครีม ขอบเรียบ เซลล์มีรูปร่างรีและมีขนาด 5 ไมโครเมตร ไอโซเลทที่ 2 โคโลนีมีลักษณะกลม สีครีม ขอบหยักฟันหนาม เซลล์มีรูปร่างกลมและมีขนาด 7.5 ไมโครเมตร และไอโซเลทที่ 3 โคโลนีมีลักษณะกลม สีครีม ขอบเรียบ เซลล์มีรูปร่างกลมและมีขนาด 5 ไมโครเมตร ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 1-3

ตารางที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น				
	ลักษณะโคโลนี	สีของโคโลนี	ลักษณะขอบ	รูปร่างเซลล์	ขนาดเซลล์
1	กลม	ครีม	ขอบเรียบ	รี	5.0 μm
2	กลม	ครีม	หยักฟันหนาม	กลม	7.5 μm
3	กลม	ครีม	ขอบเรียบ	กลม	5.0 μm



ภาพที่ 1 เชื้อยีสต์ไอโซเลทที่ 1



ภาพที่ 2 เชื้อยีสต์ไอโซเลทที่ 2



ภาพที่ 3 เชื้อยีสต์ไอโซเลทที่ 3

เมื่อนำเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทไปเพาะเลี้ยงในอาหาร YM Broth จนถึงขั้นการเจริญคงที่ ที่ 96 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ของยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทมีค่าแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เชื้อยีสต์	จำนวนเซลล์ยีสต์ ($\times 10^9$ cfu/ml)
ไอโซเลทที่ 1	1.54 $\pm$ 0.10
ไอโซเลทที่ 2	2.26 $\pm$ 0.22
ไอโซเลทที่ 3	2.56 $\pm$ 0.50

จากการเก็บรักษาเชื้อยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่า ยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทมีลักษณะแห้งสีน้ำตาล บางส่วนเกาะติดบริเวณข้างขวด ดังแสดงในภาพที่ 4 และเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์แล้วนำมาตรวจสอบอัตราการรอดของเชื้อได้ผลดังตารางที่ 3



ภาพที่ 4 ลักษณะของยีสต์หลังการเก็บรักษาโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ตารางที่ 3 อัตราการรอดของเชื้อยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลท

ไอโซเลท	จำนวนเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ($\times 10^9$ cfu/ml.)	จำนวนเซลล์หลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ($\times 10^9$ cfu/ml.)	อัตราการรอด (ร้อยละ)
1	1.53 $\pm$ 0.04	1.47 $\pm$ 0.03	96.08 $\pm$ 3.96
2	1.85 $\pm$ 0.06	1.43 $\pm$ 0.03	77.30 $\pm$ 1.49
3	2.19 $\pm$ 0.04	1.93 $\pm$ 0.02	88.13 $\pm$ 2.25

จากตารางที่ 2 จะพบว่าเชื้อยีสต์ไอโซเลทที่ 1 มีอัตราการรอดสูงสุดที่ร้อยละ 96.08 รองลงมาได้แก่ ไอโซเลทที่ 3 และ 2 ด้วยอัตราการรอดร้อยละ 88.13 และ 77.30 ตามลำดับ และเซลล์มีจำนวนลดลงเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบเยือกแข็งทั้ง 3 ไอโซเลท

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาในครั้งนี้แยกเชื้อยีสต์ได้ 3 ไอโซเลท โดยลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่แยกได้คล้ายกับการศึกษาของ อภิษฎา เลาเยีเปา (2556) ที่ทำการแยกเชื้อยีสต์จากสับประรดเน่า ได้ 4 ไอโซเลท โคโลนีมีรูปร่างกลม ขนุน ผิวหน้าเกลี้ยง มันวาว สีขาว และครีม เมื่อดูใต้กล้องจุลทรรศน์จะมีลักษณะกลม รี ซึ่งโดยทั่วไปยีสต์กลุ่มนี้จะเป็นยีสต์ *Saccharomyces* (Nasir, Rahman, Hossain, & Choudhury, 2017) ซึ่งจะแยกได้จากน้ำผลไม้ที่มีความเป็นกรด เช่น น้ำสับประรด น้ำส้ม เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในขวดรูปชมพู่โดยใช้อาหาร YM broth ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งสังเคราะห์ (semi-defined medium) และได้เซลล์สูงสุดอยู่ที่ประมาณ 10^9 cfu/ml นับว่าเป็นไปตามที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในสภาวะเช่นนี้ (Shang, Wen, Wang, & Tan, 2006) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะแบบนี้ไม่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง และไม่สามารถควบคุมสภาวะความเป็นกรด-ด่างได้ ซึ่งถือเป็นข้อด้อยของการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ (shake-flask culture) (Buchs, 2001) หากต้องการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มากกว่านี้ควรใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพและเลือกการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเฟ็ดแบทช์ (fed-batch culture) หรือการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบต่อเนื่อง (continuous culture) (Stanbury, Whitaker, & Hall, 2017)

การเก็บรักษาเซลล์โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งมีอัตราการรอดชีวิตเมื่อสัปดาห์ที่ 4 อยู่ที่ร้อยละ 77-96 ซึ่งจำนวนเซลล์ที่ลดลงเนื่องมาจากเซลล์ถูกทำให้เปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็งก่อนนำมาทำแห้ง หรือการเปลี่ยนค่าออสโมติกภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว (osmotic shock) ส่งผลให้เซลล์แตกได้ และเมื่อมีการเก็บรักษานานขึ้นปริมาณเซลล์ก็น่าจะลดลงตามลำดับ (Miyamoto-Shinohara, Nozawa, Sukenobe, & Imaizumi, 2010) อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นวิธีหนึ่งที่สะดวกและให้ผลดีในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ รวมทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อราที่สร้างสปอร์และไวรัสบางชนิด เนื่องจากวิธีนี้สามารถคงสภาพกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตหลังการเก็บรักษาได้ดี แต่ไม่เหมาะกับเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ ไวรัสบางชนิด และโปรโตซัว มีรายงานพบว่าอัตราการมีชีวิตรอดจากการเก็บรักษาโดยวิธีนี้ต่ำถึง 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Abadias, Benabarre, Teixido, Usall, & Vi, 2001) เหตุผลหลักที่เซลล์เสียสภาพการมีชีวิต อาจะมาจากการเกิดผลึกน้ำแข็ง เนื่องจากความเข้มข้นของสารภายในเซลล์สูงทำให้ค่าความดันออสโมติก (osmolarity) สูง ส่งผลให้เยื่อเมมเบรนถูกทำลาย สารโมเลกุลเสียสภาพ (denaturation) และการดึงน้ำออก (dehydration) ซึ่งล้วนเป็นผลต่อคุณสมบัติของสารโมเลกุลใหญ่ที่ชอบน้ำ (hydrophilic macromolecule) ภายในเซลล์ ซึ่งในกรณีของเชื้อรา วิธีนี้เหมาะกับการเก็บรักษาเชื้อ *Penicillium* มากที่สุด และนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่เก็บรักษาโดยวิธีนี้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้เป็นเวลา 20 ถึง 40 ปี แต่ก็มีรายงานพบว่า การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีนี้อาจทำให้เกิดการกลายได้ (Ashwood-Smith & Grant, 1976) นอกจากนี้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งคือ สารป้องกันการเซลล์ (protective agent หรือ cryoprotectant) เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้มีการใส่สารป้องกันเซลล์ก่อนการเก็บรักษาจึงส่งผลทำให้เซลล์มีอัตราการรอดที่ลดลง ได้มีการศึกษากับ *Lactobacillus plantarum* พบว่าการเติมสาร cryoprotectant เช่น sorbitol หรือ monosodium glutamate ใน cell culture จะทำให้อัตราการรอดของเซลล์ดีขึ้น (Champagne, Mondou, Raymond, & Roy, 1996) เช่นเดียวกับ สมพร ลินธรา (2544) ที่ศึกษาการรอดชีวิตของยีสต์โดยการนำเซลล์ยีสต์กับสารละลายหางนม หลังผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งแล้ว เชื้อแต่ละชนิดมีอัตราการรอดที่แตกต่างกันไป โดยมีไอโซเลทที่มีอัตราการรอดหลังผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งตั้งแต่ต่ำกว่าร้อยละ 1 จนถึงร้อยละ 100 ซึ่งก็ถือได้ว่าการเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาเชื้อเพื่อใช้ในหองปฏิบัติการหรือการทำวิจัยเพื่อให้ได้เชื้อที่เป็นรุ่นเดียวกันตลอดการศึกษาได้

ข้อเสนอแนะ

การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ปริมาณมากกว่านี้เพื่อให้อัตราการรอดสูงตามไปด้วย ควรทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีของการเพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่นสูง (high cell density culture) และควรทดลองใช้สารป้องกันเซลล์ชนิดต่างๆ เพื่อปกป้องเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

เอกสารอ้างอิง

- สมพร สีนธรา. (2544). การแยก การจัดจำแนก และการเก็บรักษายีสต์และราที่แยกได้จากลูกแบ่งข้าวหมากและลูกแบ่งเหล้าในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภิษฎา เลาอี้เปา. (2556). การเพิ่มมูลค่าเปลือกสับปะรดโดยกระบวนการหมักด้วยยีสต์ที่แยกได้จากธรรมชาติ. รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.
- อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. (2558). ยีสต์และเทคโนโลยียีสต์. กรุงเทพฯ : ก้าวไทยแอดเวอร์ไทซิง แอนด์ พรินติ้ง.
- Abadias, M., Benabarre, A., Teixido, N., Usall, J., & Vi, I. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.*, 65, 173-182.
- Ashwood-Smith, M. J., & Grant, E. (1976). Mutation induction in bacteria by freeze-drying. *Cryobiol.*, 13, 206-213.
- Berner D. Viernstein H. (2006) Effects of protective agents on the viability of *Lactococcus latis* subjected to freeze-thawing and freezing drying. *Sci Pharm* 74, 137-149.
- Buchs, J. (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 7(2), 91-98.
- Champagne, C. P., Mondou, F., Raymond, Y. & Roy, D. (1996). Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria, *Food Research International*, 29(5-6), 555-562.
- Miyamoto-Shinohara, Y., Nozawa, F., Sukenobe, J., & Imaizumi, T. (2010). Survival of yeasts stored after freeze-drying or liquid drying. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 56, 107-119.
- Nasir, A., Rahman, S., Hossain, M., & Choudhury, N. (2017). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* from pineapple and orange and study of metal's effectiveness on ethanol production. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 7(1), 1-16.
- Shang, F., Wen, S., Wang, X., & Tan, T. (2006). High-cell-density fermentation for ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(1), 38-41.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). *Principles of fermentation technology* (3rd ed.). Oxford: Elsevier Science.