

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาศักยภาพหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเลเพื่อใช้ในธุรกิจตู้ปลาทะเล

Potential development of sea grasses and seaweeds for marine aquarium business

คณะผู้วิจัย

จักรี แก้วสุริยิต^{1,2} จันทนา ไพรบูรณ์^{1,2} สหภาพ ดอกแก้ว³ และศาลักษณ์ พรณศิริ⁴

¹ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0 2942 8701

²หน่วยปฏิบัติการแพลงก์ตอนและพืชน้ำประยุกต์ หน่วยวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพและสิ่งแวดล้อมทางน้ำ สถาบันวิจัยขั้นสูงทางอาหารและการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

³ศูนย์วิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีปลาสวยงามและพรรณไม้น้ำประดับ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0 2942 8365 ต่อ 16

⁴ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0 2942 8740 ต่อ 306

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล การเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเล การผลิตหินเทียมและหินเป็น เพื่อนำไปใช้ในธุรกิจตู้ปลาทะเล จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล พบว่า หญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* และ *Thalassia hemprichii* เป็นหญ้าทะเลที่มีศักยภาพในการนำไปใช้เลี้ยงในตู้ปลาทะเลในอนาคต วิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นกับชนิดหญ้าทะเลและชนิดของเนื้อเยื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง เมล็ดหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* สามารถเจริญได้ภายใต้สภาพปลอดเชื้อและสามารถเจริญได้ดีในตู้เลี้ยงปลา หญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* ใช้เมล็ด ลำต้น ใต้ดิน และส่วนยอดของลำต้น ใต้ดินมาใช้ในการเพาะเลี้ยง ขึ้นเนื้อเยื่อส่วนยอดและส่วนข้อของลำต้น ใต้ดิน สามารถเจริญเพิ่มจำนวนยอดได้เป็นต้นอ่อน 3 ต้น ในสภาพปลอดเชื้อ แต่ยังไม่สามารถรอดชีวิตเมื่อนำลงเลี้ยงในตู้เลี้ยงปลา

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเล การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อสาหร่ายทะเลทำได้โดยใช้ส่วนผสมของยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ร่วมกับการใช้ Germanium Dioxide ในระยะเวลาที่เหมาะสม เทคนิคการฟุ้งแห้งสามารถกระตุ้นให้สาหร่ายสกุล *Sargassum* และ *Neogoniolithon* ปล่อยไข่และสปอร์ได้

วิธีการผลิตหินเทียมที่ดีที่สุด คือการใช้ดินสิงห์บุรีผสมกับเกลบเป็นวัสดุหลัก ปั่นขึ้นรูปแล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 1,000 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และปล่อยให้อุณหภูมิลดลงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะต้องนำหินเทียมที่ผลิตได้แช่น้ำอัตราส่วน หินเทียม 1 กิโลกรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน ก่อนนำไปใช้ผลิตหินเป็นต่อไป

คำสำคัญ: เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หญ้าทะเล สาหร่ายทะเล หินเทียม หินเป็น

Abstract

This research was aim to develop tissue culture techniques for sea grasses, and algal culture, and the techniques for artificial rock and living rock production. In sea grass tissue culture, *Enhalus acoroides* and *Thalassia hemprichii* showed good potential for use in marine aquariums in the future. The most appropriate methodology for tissue culture depended on the sea grass species and the tissue type. The seed of *E. acoroides* could grow in axenic culture and grew well in aquarium; while, the seed, rhizome and rhizome tip were used in *T. hemprichii* culture. One piece of rhizome tip and rhizome of *T. hemprichii* could be induced to three in axenic culture. However, the plantlets could not survive in an aquarium.

In the algal culture study, surface sterilization was achieved with a mixture of antibiotics and Germanium Dioxide under an appropriate period. The desiccation technique was successful for stimulating ovule and spore releasing in *Sargassum* and *Neogoniolithon*.

The best technique for artificial rock production was to use a mixture of Sing Buri soil and rice husk as the basic material. The mixed soil was molded and baked at 1,000 °C for 30 minutes and cooled down for 24 hrs. Before using it as a living rock, it was necessary to leave the artificial rock under water (1 kg artificial rock/ 20 l) which was daily rinsed off for four days.

Key words: sea grass tissue culture, algal culture, artificial rock, living rock

บทนำ

สาหร่ายทะเลและหญ้าทะเล จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศทะเลและชายฝั่ง เนื่องจากมีบทบาทเป็นผู้ผลิตขั้นต้นให้กับระบบนิเวศ และทำหน้าที่ในการป้องกันชายฝั่งทะเล ดูดซับธาตุอาหารและหมุนเวียนธาตุอาหารต่างๆ เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยหากินของสัตว์ทะเลนานาชนิด รวมถึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้แก่ การสกัดสารจากสาหร่ายทะเล เช่น วุ้น การจีแน และสารสี ซึ่งมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องสำอาง นอกจากนี้ยังมีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อดินเพื่อใช้ในการบริโภค รวมถึงมีการเลี้ยงร่วมกับกุ้งในบ่อเลี้ยงกุ้งเพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตและเป็นการเลี้ยงอย่างเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สำหรับหญ้าทะเล ยังไม่มีการพัฒนามาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ มีเพียงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลเพื่อนำมาใช้ในการอนุรักษ์แหล่งหญ้าทะเลเท่านั้น

เมื่อคณะผู้วิจัยได้สำรวจเบื้องต้นถึงความต้องการสาหร่ายทะเลและหญ้าทะเล บริเวณตลาดนัดสวนจตุจักร พบว่ามีการนำสาหร่ายทะเลมาใช้ประโยชน์หลายด้านสำหรับการเลี้ยงสัตว์ทะเลสวยงาม เช่น เพื่อการประดับตู้ปลา เป็นอาหารให้สัตว์ทะเล รวมถึงใช้บำบัดคุณภาพน้ำในระบบการเลี้ยงตู้ปลา สาหร่ายทะเลที่เป็นที่นิยมในตลาด ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว สกุล *Caulerpa* ซึ่งมีหลายชนิดและมีรูปร่างแตกต่างกันไป โดยในตลาดใช้ชื่อ สาหร่ายพวงองุ่น สาหร่ายใบเฟิร์น สาหร่ายใบเลื่อย และ สาหร่ายใบพาย นอกจากนี้ยังมีสาหร่ายชนิดอื่นๆ เช่น สาหร่ายใบมะกรูด (*Halimeda* spp.) สาหร่ายลูกปัดแดง กลุ่มที่เป็นที่นิยมในตลาดคือสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบ (Coralline red algae) ซึ่งมีหลากหลายตั้งแต่สีชมพูอ่อน ชมพูเข้ม ส้ม ชมพูม่วง ขึ้นเคลือบบนก้อนหิน ซึ่งร้านค้าเรียกหินเหล่านี้ว่า หินเป็น (Live rock) มีการจำหน่ายในลักษณะเป็นก้อนหินเป็นหรือถุงละ 200-300 บาท ซึ่งสร้างรายได้ให้กับผู้ประกอบการประมาณเดือนละ 20,000 บาทต่อเดือน หากรวมผู้ประกอบการค้าสัตว์ทะเลสวยงามในบริเวณตลาดนัดสวนจตุจักรที่มีอยู่ประมาณ 20 ราย จะมีรายได้รวมอยู่ที่ 400,000 บาทต่อเดือน หรือ 4,800,000 บาท ต่อปี นอกจากนี้ยังพบว่าการจำหน่ายหญ้าทะเลชนิดที่มีขนาดเล็ก (*Halophila ovalis*) โดยทั้งหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเลที่นำมาจำหน่ายส่วนใหญ่ไม่ได้เกิดจากการเพาะเลี้ยง แต่ได้จากการเก็บรวบรวมจากธรรมชาติ และการนำเข้าจากต่างประเทศ เมื่อนำมาเลี้ยงจึงไม่ทนทานเนื่องจากมีความบอบช้ำจากการเก็บ ทำให้มีการเก็บจากธรรมชาติอย่างต่อเนื่องและส่งผลกระทบต่อแหล่งต้นพันธุ์ ความหลากหลายของสาหร่ายทะเลและหญ้าทะเลที่นำมาเลี้ยงมีน้อย ทำให้ส่วนใหญ่ต้องแอบเลี้ยงร่วมกับปะการังซึ่งผิดกฎหมาย

ดังนั้น เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวในเชิงรุก จึงศึกษาหาศักยภาพของหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเลเพื่อนำมาใช้ในการส่งเสริมสำหรับใช้ในธุรกิจตู้ปลาทะเล โดยศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงและขยายจำนวนสาหร่ายทะเล และหญ้าทะเล ชนิดที่มีความเหมาะสมกับการเลี้ยงในตู้ปลาทะเลด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์โดยการใส่เซลล์สืบพันธุ์แบบไม้อาศัยเพศหรือเตตราสปอร์ (Tetraspore) ในระบบปลอดเชื้อ การพัฒนาวัสดุสำหรับผลิตหินเทียมเพื่อนำมาใช้ในการผลิตหินเป็น ทั้งนี้การวิจัยนี้จะเป็นการศึกษาเชิงรุกที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการเพิ่มมูลค่าสาหร่ายและหญ้าทะเล เพิ่มศักยภาพในการใช้ประโยชน์ ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาศักยภาพทางด้านอื่นๆต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาสาหร่ายทะเลและหญ้าทะเลที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในตู้ปลาทะเล
2. เพื่อศึกษาวิธีการขยายพันธุ์และเพิ่มจำนวนสาหร่ายทะเลและหญ้าทะเลในสภาพปลอดเชื้อ
3. เพื่อพัฒนาวัสดุยัดเกาะที่มีความเหมาะสมต่อการยึดเกาะของหินอ่อน
4. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การขยายพันธุ์ และการเพิ่มจำนวนของสาหร่ายและ หญ้าทะเล

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

หญ้าทะเลในประเทศไทยและการใช้ประโยชน์ที่เกี่ยวข้อง

ในประเทศไทย มีการพบหญ้าทะเลทั้งสิ้น 7 สกุล 12 ชนิด ใน 3 วงศ์ ได้แก่ *Enhalus acoroides*, *Thalassia hemprichii*, *Halophila ovalis*, *H. minor*, *H. decipiens*, *H. beccarii*, *Syringodium isoetifolium*, *Halodule uninervis*, *H. pinifolia*, *Cymodocea serrulata*, *C. rotundata* และ *Ruppia maritima* โดยในเอกสารบางฉบับไม่ถือว่า *Ruppia maritima* เป็นหญ้าทะเล เนื่องจากในบางประเทศไม่พบในทะเลหรือแหล่งน้ำธรรมชาติที่ต่อเนื่องกับทะเล พบเฉพาะในบ่อเท่านั้น (กาญจนาภรณ์และคณะ, 2534 และ Kuo and McComb, 1989)

จากการรวบรวมข้อมูลเอกสารการสำรวจหญ้าทะเลในประเทศไทยโดย Kaewsuralikhit (2011) พบว่าตลอดแนวชายฝั่งทะเลของไทยมีหญ้าทะเลแพร่กระจายครอบคลุมเนื้อที่ไม่ต่ำกว่า 167 ตารางกิโลเมตร เนื่องจากมีการรายงานการพบหญ้าทะเลในบางพื้นที่แต่ไม่มีการวัดขนาดเนื้อที่ไว้ด้วย อย่างไรก็ตามแนวหญ้าทะเลที่สำคัญในประเทศไทยมีอยู่หลายแห่งด้วยกันเช่น อุทยานแห่งชาติหาดเจ้าไหมและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าเกาะลิบง จังหวัดตรัง เกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี และอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี แนวหญ้าทะเลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศ คือบริเวณอุทยานแห่งชาติหาดเจ้าไหม จังหวัดตรัง มีเนื้อที่ทั้งสิ้น 18 ตารางกิโลเมตร และเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายชนิดมากที่สุด (Nakaoka and Supanwanid, 2000)

การเจริญเติบโตของหญ้าทะเลก่อให้เกิดผลผลิตซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นของใบ ต้นและลำต้นใต้ดิน อัตราการเจริญเติบโตของหญ้าทะเลจะขึ้นอยู่กับชนิด การเจริญเติบโตและยืดยาวของลำต้นใต้ดินเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้แนวหญ้าทะเลเพิ่มพื้นที่ได้มากกว่าการเพิ่มจำนวนต้นที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศซึ่งจะต้องมีการเกิดดอกและผล อีกทั้งจะต้องมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด โดยทั่วไปหญ้าทะเลมีการผลิตดอกและผลน้อยเนื่องจากต้นหญ้าทะเลมักจะไม่สามารถสมบูรณ์หรือตายไปก่อนที่จะถึงอายุที่สามารถสร้างดอกได้ มีหญ้าทะเลเพียง ร้อยละ 10 เท่านั้นที่สามารถเจริญและมีสภาพสมบูรณ์จนสามารถสร้างดอกและผลได้ (Gallegos *et al.*, 1992) หญ้าทะเลส่วนใหญ่มีการสร้างดอกน้อยมาก โดยมีต้นที่สร้างดอกน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ต่อปี แสดงว่าหญ้าทะเลบางต้นอาจไม่มีการสร้างดอกเลยตลอดช่วงชีวิต การผสมเกสรของหญ้าทะเลซึ่งจะต้องมีการผสมเกสรได้น้ำนั้น น้ำเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการผสมเกสรขึ้น การผสมเกสรของหญ้าทะเลส่วนใหญ่เป็นการผสมเกสรได้น้ำ (hydrophilous pollination) (Hemminga and Duarte, 2000) อย่างไรก็ตาม หากการผสมเกสรเกิดขึ้นในขณะน้ำลง ละอองเรณูอาจถูกพัดขึ้นมาที่ผิวน้ำและทำให้เกิดการผสมเกสรที่ผิวน้ำได้ หญ้าทะเลเพียงชนิดเดียวที่มีการผสมเกสรที่ผิวน้ำ (hydrophobous pollination) คือหญ้าชะเงา (*Enhalus acoroides*) (den Hartog, 1970)

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเลี้ยงหญ้าทะเลในระบบปลอดเชื้อเริ่มมีมากกว่า 20 ปี ทั้งนี้เพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงอนุรักษ์ และมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องในต่างประเทศ โดย Durako and Moffler (1987) เริ่มทำการศึกษาปัจจัยทางเคมีที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดหญ้าทะเลชนิด *Thalassia testudinum* ใน

ระบบปลอดเชื้อ หลังจากนั้น ได้มีการทำการศึกษาต่อเนื่องมาถึงปัจจุบัน เป้าหมายของการวิจัยส่วนใหญ่ เพื่อรองรับการฟื้นฟูแหล่งหญ้าทะเลโดยวิธีการย้ายปลูก แต่เนื่องจากการย้ายปลูกแต่ละพื้นที่ต้องใช้ต้นพันธุ์จำนวนมากในการฟื้นฟูแนวหญ้าทะเลบริเวณหนึ่ง ปัญหาที่พบคือการขาดแคลนต้นพันธุ์ ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเลี้ยงหญ้าทะเลในระบบปลอดเชื้อ จึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้สามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ในจำนวนมากเพียงพอต่อการย้ายปลูก สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ และเพื่อใช้ในการศึกษาทางด้านสรีรวิทยา (Loques *et al.*, 1990; Bird *et al.*, 1998) มีการเพาะเลี้ยงหญ้าทะเลในระบบปลอดเชื้อที่ประสบความสำเร็จ โดยใช้ส่วนต่างๆของหญ้าทะเลมาใช้ในการเลี้ยงบางชนิด ได้แก่ เมล็ด ลำต้นใต้ดิน ผลอ่อน ใบ ดอก และส่วนที่เป็นจุดเจริญ (apical meristem) เช่น *Halophila engelmannii* เพาะเลี้ยงโดยใช้เมล็ดและมีการทดสอบอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด (Jewett-Smith and McMillan, 1990) *Posidonia oceanica* มีการเพาะเลี้ยงโดยใช้ส่วนลำต้นใต้ดิน ดอก ผลอ่อน และใบ โดยมีการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ ชนิดของอาหาร ปริมาณธาตุอาหาร ซึ่งพบว่า ส่วนของลำต้นใต้ดินไม่สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงได้เนื่องจากมีปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในต้นพันธุ์ (Loques *et al.*, 1990) *Ruppia maritima* มีการเพาะเลี้ยงโดยใช้ส่วนปลายของลำต้นใต้ดินซึ่งเป็นจุดเจริญ โดยเลือกเฉพาะส่วนที่ไม่ฝังลงไปดิน เพื่อป้องกันการปนเปื้อน มีการทดสอบปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเนื้อเยื่อในระยะต่างๆ (Koch and Durako, 1991) *Cymodocea nodosa* มีการเพาะเลี้ยงโดยใช้ส่วนลำต้นใต้ดิน เพื่อทดสอบหาปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมต่อการเร่งการเกิดต้น (Munoz, 1995), *Halophila decipiens* มีการใช้เมล็ดในการเพาะเลี้ยง โดยมีการทดสอบหาชนิดอาหาร สารเร่งการเจริญเติบโต และวิตามิน ที่มีความเหมาะสมในการเลี้ยง ตลอดจนความสามารถในการปรับตัวจากสภาพปลอดเชื้อสู่การลงเลี้ยงในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ (Bird *et al.*, 1998), *Halophila ovalis* มีการใช้เมล็ดในการเลี้ยงเริ่มต้นเพื่อให้เกิดเป็นต้นอ่อน แล้วจึงนำส่วนข้อที่บริเวณปลายของลำต้นใต้ดินมาเลี้ยงในระบบปลอดเชื้อต่อไป โดยมีการทดสอบชนิดอาหารและปริมาณสารอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (Wilson and Bennett, 2008) และ *Posidonia coriacea* มีการเลี้ยงโดยใช้เมล็ดและทดสอบชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง (Wilson and Bennett, 2008)

จากการตรวจสอบจากเอกสารวิชาการดังกล่าว พบว่า เทคนิค วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการเลี้ยงในระบบปลอดเชื้อ ของหญ้าทะเลมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจาก หญ้าทะเลแต่ละชนิด มีลักษณะทางชีววิทยา สัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา ที่แตกต่างกัน ดังนั้นเทคนิคในการเพาะเลี้ยงหญ้าทะเล จึงมีความแตกต่างกันตั้งแต่ การคัดเลือกเนื้อเยื่อและอวัยวะที่นำมาเพาะเลี้ยง การฟอกฆ่าเชื้อ ลักษณะของอาหารที่นำมาใช้เลี้ยง ปริมาณสารอาหาร ปริมาณและชนิดของสารเร่งการเจริญเติบโตที่ใช้กับเนื้อเยื่อและต้นอ่อนในแต่ละระยะ เทคนิคในการย้ายปลูก (subculture) ไปจนถึงการปรับสภาพเพื่อให้หญ้าทะเลสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่ไม่ปลอดเชื้อซึ่งเลียนแบบธรรมชาติ

สาหร่ายทะเลในประเทศไทยและการใช้ประโยชน์ที่เกี่ยวข้อง

สาหร่ายทะเลมีความสำคัญต่อระบบนิเวศบริเวณชายฝั่งทะเลเนื่องจากเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นที่สำคัญ นอกจากนี้ยังเป็นอาหาร เป็นแหล่งอาศัยหลบภัย วางไข่ และเป็นแหล่งหากินของสัตว์นานาชนิด สาหร่ายเหล่านี้อาจมีการแพร่กระจายเพิ่มจำนวนและพื้นที่เป็นบริเวณกว้างจนเป็นแหล่งที่มีสัตว์ทะเลจำนวนมาก มีความอุดมสมบูรณ์สูง สาหร่ายทะเลส่วนใหญ่มีขึ้นแพร่กระจายอยู่ตามบริเวณชายฝั่งในเขตน้ำขึ้นน้ำลง เนื่องจากต้องการปริมาณและคุณภาพของแสงที่พอเหมาะต่อการกระบวนการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายแต่ละชนิด นอกจากนี้ ปัจจัยทางเคมีและปัจจัยทางกายภาพหลายประการ เช่น ความเค็ม ธาตุอาหาร อุณหภูมิ ความขุ่นใส ลักษณะพื้นทะเล มีผลต่อชนิดและการแพร่กระจายของสาหร่ายทะเล ส่งผลให้แต่ละพื้นที่มีความหลากหลายของชนิดแตกต่างกันไป

การศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายทะเลในประเทศไทย เริ่มต้นในปี ค.ศ. 1866 (Martens, 1866) ต่อมาในปี ค.ศ. 1889-1990 ได้มีคณะนักสำรวจต่างประเทศ สำรวจพรรณพืชบริเวณเกาะช้าง จังหวัดตราด และได้มีการศึกษาสาหร่ายทะเลในบริเวณดังกล่าวด้วย (Schmidt, 1900-1916) จากนั้น ไม่มีผู้ทำการสำรวจสาหร่ายทะเลในประเทศไทยเป็นเวลาหลายปี จนกระทั่ง L. Egarod ได้เข้ามาสำรวจสาหร่ายบริเวณทะเลอันดามัน และได้รายงานสาหร่ายทะเลที่เป็นสกุลและชนิดใหม่หลายชนิด พร้อมกันนี้ มีหลายชนิดที่เป็นรายงานการพบครั้งแรกในประเทศไทย (Egarod, 1974; 1975) ต่อมาในปี ค.ศ. 1935 จึงได้เริ่มมีรายงานของนักวิทยาศาสตร์ไทยเป็นครั้งแรก และมีเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน โดยมีจำนวนสาหร่ายทะเลที่มีผู้เคยทำการสำรวจในประเทศไทย จนถึงปี ค.ศ. 1995 พบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 132 สกุล 333 ชนิด ซึ่งจัดอยู่ใน Division Cyanophyta 63 ชนิด Division Chlorophyta 91 ชนิด Division Phaeophyta 48 ชนิด และ Division Rhodophyta 131 ชนิด เป็นชนิดที่พบในอ่าวไทย 254 ชนิด และพบที่ทะเลอันดามัน 149 ชนิด มีเพียง 77 ชนิดที่พบทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน (Lewmanomont *et al.*, 1995) ต่อมาได้มีการสำรวจพบสาหร่ายที่มีการรายงานเป็นครั้งแรกเพิ่มเติม จำนวน 15 ชนิด (กาญจนภาชน์และคณะ, 2548) และมีการรายงานพบเป็นครั้งแรกในอ่าวไทย 5 ชนิด (จิตรรัตน์และคณะ, 2546) ทำให้ปัจจุบัน มีสาหร่ายทะเลจำนวนทั้งสิ้น 348 ชนิด โดยพบที่ฝั่งอ่าวไทย 274 ชนิด พบที่ทะเลอันดามัน 149 ชนิด และมี 82 ชนิด พบทั้งฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน

การนำสาหร่ายทะเลเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายบางชนิดในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ เริ่มจากการศึกษาเพื่อคัดเลือกชนิดของสาหร่ายผสมนางเพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับสกัดวุ้นเพื่อใช้เป็นอาหาร และใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แบคทีเรีย รา และยีสต์ โดย กาญจนภาชน์และคณะ (2546) ต่อมาจึงมีการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเป็นอาหารของหอยเป่าฮือ การศึกษาการเลี้ยงสาหร่ายในไทยส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงในบ่อดิน บ่อปูน และบ่อพลาสติก นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์ในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยนำสาหร่ายทะเลสีเขียว *Ulva intestinalis* มาใช้เลี้ยงร่วมกับกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาว เพื่อเป็นการเพิ่มอาหารตามธรรมชาติ ลดต้นทุนอาหาร เชื้อเพลิง และเป็นมิตรกับ

สิ่งแวดล้อม (ชนิดดาและคณะ, 2551; จิรายดีและคณะ, 2551) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่า ยังไม่มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเพื่อนำสาหร่ายทะเลมาใช้ในธุรกิจตู้ปลาทะเล ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนางานวิจัยต่อไป

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. สถานที่ดำเนินการวิจัย

- ห้องปฏิบัติการวิจัยแพลงก์ตอนและพืชน้ำประยุกต์ ชั้น 4 อาคารบุญอินทร์มพรรย์ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ศูนย์วิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีปลาสวยงามและพรรณไม้น้ำประดับ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างสาหร่ายและหญ้าทะเล

1. เก็บสาหร่ายทะเลและหญ้าทะเลที่น่าจะมีศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงในตู้ทะเล โดยพิจารณาจาก ขนาด ความสมบูรณ์ของต้นพันธุ์ในแต่ละฤดูกาล ลักษณะทางนิเวศและชีววิทยาที่เหมาะสม ชนิดของหญ้าทะเลที่นำมาศึกษาในเบื้องต้น คือ *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea rotundata*, *Halophila ovalis* และ *Enhalus acoroides* เป็นต้น ชนิดสาหร่ายทะเลที่นำมาศึกษาในเบื้องต้นคือ สาหร่ายในสกุล *Acanthophora*, *Sargassum*, *Caulerpa* และสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบสกุล *Neogoniolothon*

2. รวบรวมสาหร่ายและหญ้าทะเลจากธรรมชาติ โดยการดำน้ำลึก และการดำน้ำตื้น ทำความสะอาด และรักษาสภาพด้วยน้ำทะเลธรรมชาติ โดยมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 3 ชั่วโมง และอาจต้องมีการเพิ่มอากาศให้สำหรับสาหร่ายทะเลบางชนิด นำมาพักไว้ในบ่อพักสาหร่าย นำตัวอย่างที่เก็บมาลงเลี้ยงในน้ำทะเลเทียมที่มีระดับความเค็มใกล้เคียงกับแหล่งธรรมชาติ พร้อมติดตั้งระบบกรองและแสงสว่าง

3. จำแนกชนิดและบันทึกลักษณะเบื้องต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยา เอกสารที่ใช้ในการจำแนกชนิด ได้แก่ Abbott and Huisman (2004), Lewmanomont and Ogawa (1995), Littler and Littler (2000), Trono (1997), Womersley (1994, 1996, 1998, 2003) โดยศึกษาลักษณะภายนอก ลักษณะภายใน ลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์ วาดภาพและถ่ายภาพ เพื่อใช้ในการจำแนกชนิด

4. จำนวนตัวอย่างที่ใช้ตลอดการทดลอง ไม่ต่ำกว่า 5 ซ้ำ ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณชิ้นส่วนและชนิดของสาหร่ายและหญ้าทะเลที่สามารถเก็บได้จากธรรมชาติ ซึ่งมีความแตกต่างกัน

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญาทะเล

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญาทะเล จะดำเนินการเก็บหญาทะเลส่วนต่างๆจากธรรมชาติ โดยชนิดหญาทะเลที่นำมาศึกษา ได้แก่ *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea rotundata*, *Halophila ovalis* และ *Enhalus acoroides* มีวิธีการดำเนินการดังนี้

1. การคัดเลือกส่วนต่างๆของหญาทะเลและการทดสอบหาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่จะนำมาเพาะเลี้ยง

ชิ้นส่วนของหญาทะเลที่มีผู้นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ คือ เมล็ด เนื่องจากค่อนข้างสะอาด และมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียต่ำ สะดวกต่อการฟอกฆ่าเชื้อ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อน ดังนั้น หญาทะเลส่วนใหญ่จึงมีการสร้างเมล็ดค่อนข้างน้อย และยังไม่เคยมีการรายงานการพบ ธนาคารเมล็ดในธรรมชาติ (seed bank) มีหญาทะเลบางชนิด คือ *Enhalus acoroides* ที่พอจะพบเมล็ดได้เกือบตลอดปี ดังนั้นในการทำการศึกษครั้งนี้ จึงรวบรวมต้นพันธุ์หญาทะเล 4 ชนิด เพื่อนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยการใช้สารต่างๆในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ Sodium Hypochlorite และ Alcohol ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาต่างๆ ชิ้นส่วนของหญาทะเลที่มีการศึกษา ได้แก่ ส่วนเมล็ด ข้อของลำต้นใต้ดิน ส่วนยอด อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยได้พบวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับชิ้นส่วนหญาทะเล *Enhalus acoroides* และ *Thalassia hemprichii* แล้วจากการศึกษาในโครงการที่ได้ดำเนินการก่อนโครงการนี้ ดังนั้นในการศึกษครั้งนี้จึงศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อเฉพาะหญาทะเลชนิด *Cymodocea rotundata*, *Halophila ovalis* โดยส่วนของหญาทะเลที่นำมาใช้ในการศึกษาจะแตกต่างกันดังตารางที่ 1 นำส่วนต่างๆมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยการใช้สารต่างๆในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ Sodium hypochlorite และ alcohol ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาต่างๆ การวางแผนการทดลองการฟอกฆ่าเชื้อในการศึกษครั้งนี้ จะคำนึงถึงปัจจัยต่างๆที่จะมีผลต่อประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ ได้แก่ ชนิดของเนื้อเยื่อ วิธีการ ชนิดสารเคมีที่ใช้ ระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อ โดยมีหลักการในการศึกษา 3 ขั้นตอนคือ

- นำต้นพันธุ์หญาทะเลที่คัดเลือกไว้มาทำความสะอาดให้ปราศจากเศษดินและอิมโฟฟต์ ตัดส่วนที่ต้องการนำมาใช้ ทำความสะอาดด้วยแปรงและน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อ แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีและสารเคมีต่างๆ หลังจากฟอกฆ่าเชื้อ ใช้มีดโกนที่นิ่งฆ่าเชื้อตัดส่วนที่ถูกทำลายโดยสารเคมีออก แล้วจุ่มล้างในน้ำทะเลฆ่าเชื้อแล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีและวิธีการ

- ทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการและสารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ปรับจากวิธีของ Polne-Fuller and Gibor (1987) โดยนำส่วนของหญาทะเลที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ แล้ว ไปลงเลี้ยงในอาหารสูตร MS แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มภายในเวลา 2 สัปดาห์ นับจำนวนและเปอร์เซ็นต์เนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อ เปอร์เซ็นต์เนื้อเยื่อที่มีการพัฒนา เพื่อเปรียบเทียบหาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุด สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

- ทดสอบความสามารถในการขยายจำนวนของชิ้นส่วนที่ผ่านการทดสอบการฆ่าเชื้อมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งพื้นฐานสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เตรียมในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับแหล่งต้นพันธุ์

ตารางที่ 1 การทดลองที่ใช้ในการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อต่างๆของหอยทากชนิด

Cymodocea rotundata และ *Halophila ovalis*

หมายเหตุ ส่วนที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ 1 = ผล (*Cymodocea rotundata*) 2 = ข้อต้นใต้ดิน 3 = ปลายยอดต้นใต้ดิน

●=มีการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหอยทาก

สารฟอกฆ่าเชื้อ	ระยะเวลา (นาที) ครั้งที่ 1+2	ส่วนที่นำมาใช้ศึกษาฟอกฆ่าเชื้อ		
		1	2	3
คลอโรกซ์ 5%	5+0		●	●
คลอโรกซ์ 5%	5+5		●	●
คลอโรกซ์ 8%	2+0		●	●
คลอโรกซ์ 8%	5+0		●	●
คลอโรกซ์ 8%	5+5		●	●
คลอโรกซ์ 8%	10+0		●	●
คลอโรกซ์ 10%	2+0		●	●
คลอโรกซ์ 10%	5+0	●	●	●
คลอโรกซ์ 10%	5+5	●	●	●
คลอโรกซ์ 10%	10+0		●	●
คลอโรกซ์ 10%	10+5		●	●
คลอโรกซ์ 10%	15+0		●	●
คลอโรกซ์ 15%	5+0	●	●	●
คลอโรกซ์ 15%	5+5	●	●	●
คลอโรกซ์ 15%	10+0	●	●	●
คลอโรกซ์ 15%	10+5		●	●
คลอโรกซ์ 15%	15+0		●	●
คลอโรกซ์ 15% ครั้งที่ 1 และ 10% ครั้งที่ 2	5+5	●	●	●
เอทิลแอลกอฮอล์ 70%	5+0		●	●
เอทิลแอลกอฮอล์ 70%	10+0		●	●
เอทิลแอลกอฮอล์ 70% ครั้งที่ 1 และ คลอโรกซ์ 10% ครั้งที่ 2	1+2		●	●
เอทิลแอลกอฮอล์ 70% ครั้งที่ 1 และ คลอโรกซ์ 10% ครั้งที่ 2	1+5	●	●	●
เอทิลแอลกอฮอล์ 70% ครั้งที่ 1 และ คลอโรกซ์ 10% ครั้งที่ 2	1+10	●	●	●

2. การหารูปแบบและสูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเหมาะสมต่อหญ้าทะเล

โดยทั่วไป อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลมี 2 ประเภท คือ

- อาหารเหลวซึ่งประกอบไปด้วย น้ำทะเลฆ่าเชื้อ สารอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต
- อาหารกึ่งแข็ง ซึ่งเป็นอาหารเหลวที่เติมวุ้น มีหลายแบบได้แก่ อาหารกึ่งแข็งเพียงอย่างเดียว และอาหารกึ่งแข็งที่มีน้ำทะเลฆ่าเชื้อเติมลงในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อ พบว่าเนื้อเยื่อหญ้าทะเลที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ เหมาะสมต่อการนำมาศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ *Enhalus acoroides*, *Thalassia hemprichii* ศึกษาหาสูตรของอาหารที่มีความเหมาะสม โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. นำชิ้นส่วนของหญ้าทะเลชนิดต่างๆ ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาทดลองเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 ประเภท คือ

1.1 อาหารเหลว ซึ่งเตรียมโดยใช้สูตรอาหาร MS ในน้ำทะเลที่มีระดับความเค็มใกล้เคียงกับแหล่งต้นพันธุ์

1.2 อาหารกึ่งแข็ง อาหารกึ่งแข็งที่ใช้ในการศึกษา คือ อาหารกึ่งแข็งสูตรอาหาร MS เพียงอย่างเดียว และอาหารกึ่งแข็งที่มีน้ำทะเลฆ่าเชื้อเติมลงในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ- อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่มี activated charcoal เป็นส่วนประกอบ

ในการศึกษา จะใช้สูตรอาหาร MS ที่เตรียมในน้ำทะเลที่มีความเค็มใกล้เคียงกับแหล่งต้นพันธุ์ (25-30 psu)

2. ใส่ชิ้นเนื้อเยื่อขวดละ 1 ชิ้น จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงวันละ 16 ชั่วโมง เปลี่ยนถ่ายอาหารให้ต้นอ่อนทุกเดือน บันทึกลักษณะการพัฒนของชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนเนื้อเยื่อที่รอดชีวิต ภายในระยะเวลา 2 เดือน เพื่อเปรียบเทียบลักษณะของอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของหญ้าทะเลแต่ละชนิด

3. ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อหญ้าทะเล

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลจะต้องมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อให้ชิ้นเนื้อเยื่อหญ้าทะเลพัฒนาไปเป็นส่วนต่างๆ และสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยส่วนใหญ่สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม Auxin และ Cytokinin ที่มีใช้เพื่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล ได้แก่ NAA, IAA, 2,4-D, kinetin, BAP, 2iP, zeatin โดยมีการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อย่างไรก็ตาม หญ้าทะเลแต่ละชนิด รวมถึงชิ้นเนื้อเยื่อนำมาเพาะเลี้ยงจะมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตในระยะต่างๆ ที่แตกต่างกัน โดยปรับอัตราส่วนและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตให้เหมาะกับหญ้าทะเลแต่ละชนิดต่อไปโดยจะเน้นการใช้ BA และ NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตหลักในการศึกษา เนื่องจาก ราคาไม่แพง หาซื้อได้ง่าย และหากประสบผลสำเร็จ จะสะดวกต่อการเผยแพร่และการนำไปใช้ประโยชน์ภายในประเทศ นอกจากนี้ มีการศึกษาโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น 2iP, 2,4-D, TDZ อย่างไรก็ตาม

ตาม สารเหล่านี้มีราคาค่อนข้างแพง แต่หากสามารถกระตุ้นให้หญ้าทะเลเกิดแคลลัสหรือเกิดต้นอ่อนได้เป็นจำนวนมากก็มีความคุ้มค่าต่อการศึกษาวิจัย

การศึกษาทำได้โดย นำสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและอัตราส่วนต่างๆดังตารางที่ 2 มาผสมในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใส่ชิ้นเนื้อเยื่อขดละ 1 ชิ้น จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงวันละ 16 ชั่วโมง เปลี่ยนถ่ายอาหารให้ต้นอ่อนทุกเดือน บันทึกลักษณะการพัฒนของชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนยอด จำนวนราก จำนวนเนื้อเยื่อที่รอดชีวิต ภายในระยะเวลา 2 เดือน เพื่อให้ได้ปริมาณและอัตราส่วนของสารเร่งการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตารางที่ 2 ส่วนผสมอาหารสูตร MS ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและระดับความเข้มข้นต่างๆที่ใช้ในการศึกษา

ชนิด/ความเข้มข้นสารควบคุม การเจริญเติบโต (mg/l)	ความเข้มข้น BA (mg/l)				
	0	0.5	1.0	2.0	3.0
NAA 0 mg/l	●	●	●	●	●
NAA 0.25 mg/l	●	●	●	●	●
NAA 0.5 mg/l	●	●	●	●	●
NAA 1.0 mg/l	●	●	●	●	●
NAA 2.0 mg/l	●	●	●	●	●
NAA 3.0 mg/l	●	●	●	●	●
2,4 D 0.2 mg/l	●	-	-	-	-
2,4 D 0.4 mg/l	●	-	-	-	-
2,4 D 0.8 mg/l	●	-	-	-	-
2,4 D 1.0 mg/l	●	-	-	-	-
2,4 D 2.0 mg/l	●	-	-	-	-
2,4 D 5.0 mg/l	●	-	-	-	-
ชนิด/ความเข้มข้นสารควบคุม การเจริญเติบโต (mg/l)	ความเข้มข้น TDZ (μM)				
	0	0.1	0.2	0.3	0.4
2,4 D 1.0 mg/l	●	●	●	●	●
2,4 D 2.0 mg/l	●	●	●	●	●
2,4 D 4.0 mg/l	●	●	●	●	●
2,4 D 10.0 mg/l	●	●	●	●	●

2.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเล

การศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเล ได้ดำเนินการเก็บสาหร่ายทะเลจากธรรมชาติ โดยชนิดสาหร่ายทะเลที่นำมาศึกษา ได้แก่ สาหร่ายในสกุล *Acanthophora*, *Sargassum*, *Caulerpa*, *Gracilaria* และสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบสกุล *Neogoniolithon* ซึ่งเป็นชนิดที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงที่มีการศึกษา โดยมีรายละเอียดการศึกษาดังนี้

1. การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเล

- นำต้นพันธุ์สาหร่ายทะเลที่คัดเลือกไว้มาทำความสะอาดให้ปราศจากเศษตะกอนและอิมโฟไฟต์ ตัดส่วนที่ต้องการใช้นำมาทำความสะอาดด้วยแปรงและน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อ แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีและสารเคมีต่างๆ ดังตารางที่ 3 หลังจากฟอกฆ่าเชื้อ ใช้มีดโกนที่นึ่งฆ่าเชื้อตัดส่วนที่ถูกทำลายโดยสารเคมีออก แล้วจุ่มล้างในน้ำทะเลฆ่าเชื้อแล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีและวิธีการ

- ทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการและสารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ปรับจากวิธีของ Polne-Fuller and Gibor (1987) โดยนำส่วนของสาหร่ายทะเลที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆแล้ว ไปลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Provasoli (Provasoli, 1968) นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มภายในเวลา 2 สัปดาห์ นับจำนวนและเปอร์เซ็นต์เนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อ เปอร์เซ็นต์เนื้อเยื่อที่มีการพัฒนา เพื่อเปรียบเทียบหาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุด สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3 สารฟอกฆ่าเชื้อและระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อต่างๆ ของ
สาหร่ายทะเลสกุล *Gracilaria*

หมายเหตุ สารฟอกฆ่าเชื้อ 1= Alcohol 2= Sodium Hypochlorite 3= Penicillin 4= Ampicillin

5= Claraxim[®] 6= Germanium Dioxide

วิธีที่	ชนิดสารฟอกฆ่าเชื้อ ความเข้มข้น (% หรือ mg/l) และระยะเวลาการฟอกฆ่าเชื้อ (min หรือ hr)						หมายเหตุ
	1 (%: min)	2 (%: min)	3 (mg/l: hr)	4 (mg/l: hr)	5 (mg/l: hr)	6 (mg/l: hr)	
1	70/0.5	0.5/5	-	-	-	-	-
2	70/0.5	0.5/10	-	-	-	-	-
3	-	0.5/10	-	-	-	-	-
4	-	0.5: 10	150: 12	150: 12	150: 12	-	นำ 3+4+5+6 รวมกัน
5	-	0.5: 10	150: 12	150: 12	150: 12	5: 12	นำ 3+4+5+6 รวมกัน
6	-	0.5: 10	150: 24	150: 24	150: 24	-	นำ 3+4+5+6 รวมกัน
7	-	0.5: 10	150: 24	150: 24	150: 24	5: 24	นำ 3+4+5+6 รวมกัน
8	-	0.5: 10	150: 48	150: 48	150: 48	-	นำ 3+4+5+6 รวมกัน
9	-	0.5: 10	150: 48	150: 48	150: 48	5: 48	นำ 3+4+5+6 รวมกัน
10	-	0.5: 10	150: 56	150: 56	150: 56	-	นำ 3+4+5+6 รวมกัน
11	-	0.5: 10	150: 56	150: 56	150: 56	5: 56	นำ 3+4+5+6 รวมกัน

2. การเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเพื่อกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

นำสาหร่ายที่เก็บจากธรรมชาติทำความสะอาดด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ โดยชิ้นส่วนสาหร่ายไม่ต้องผ่านการฟอกฆ่าเชื้อเนื่องจากการฟอกฆ่าเชื้อทำให้เซลล์สืบพันธุ์ไม่สมบูรณ์ หลังจากตรวจสอบหาชิ้นเนื้อเยื่อที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำแล้วจึงตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดเล็กลง ทำความสะอาดอีกครั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และฟอกฆ่าเชื้อด้วยยาหรือสารเคมี

3. การกระตุ้นให้สาหร่ายปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

นำชิ้นส่วนที่เตรียมไว้มากระตุ้น ด้วยการฝังชิ้นเนื้อเยื่อที่เวลาต่างๆ แล้วจึงนำลงกลับไปเลี้ยงในน้ำทะเลอีกครั้ง สาหร่ายจะถูกกระตุ้นให้ปล่อยสปอร์ หรือเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในรูปแบบอื่นๆ เมื่อสาหร่ายปล่อยสปอร์แล้ว จึงทำการดึงสปอร์หรือเซลล์สืบพันธุ์สาหร่ายออกจากน้ำทะเลครั้งละ 1 เซลล์ โดยใช้วิธี Single-cell isolation ด้วย micropipette ตามวิธีของ Andersen and Kawachi (2005) มีการใส่สารเคมีเพื่อป้องกันการเกิดโคอะตอม แล้วนำไปใช้ในการศึกษาทดสอบการลงเกาะต่อไป

4. การทดสอบการลงเกาะของเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

นำเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่แยกได้แล้วมาใส่ในน้ำทะเลซึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รองด้วยวัสดุยึดเกาะหินเทียมที่ผลิตจากการศึกษาภายใต้โครงการนี้ โดยรูปแบบของหินเทียมจะกำหนดในการศึกษาต่อไป

5. ติดตามการเจริญเติบโตของต้นอ่อนสาหร่ายทะเล

ติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายทะเลที่ได้จากการแยกเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยนับจำนวน ตรวจสอบอัตราการรอด วัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำในระยะแรก

2.4 การพัฒนาวัสดุยึดเกาะสาหร่าย (หินเทียม) ที่มีความเหมาะสมต่อการใช้งานในตู้ทะเล

หินเทียมที่ใช้ในตู้ทะเลในปัจจุบัน เป็นการนำทราย ปูน หรือเปลือกหอยมาผสมกัน ปัญหาที่เกิดขึ้นคือ วัสดุที่นำมาใช้มีความเปราะ เมื่อแช่น้ำจะเปื่อยและละลาย มีส่วนประกอบที่ทำให้คุณภาพน้ำเปลี่ยน จึงได้ทำการศึกษาโดยมีรายละเอียดดังนี้

1. ศึกษาเนื้อดินชนิดต่างๆ สำหรับการผลิตหินเป็นเทียม

เลือกดินชนิดต่างๆ เช่น ดินเหนียวปากเกร็ด ดินขาวจีน ดินขาวลำปาง ดินผสมสิงห์บุรี เมื่อผสมน้ำให้มีความชื้นพอสมควร สามารถนวดและศึกษาปั้นขึ้นรูปได้ทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร หนา 1 เซนติเมตร จากนั้นนำชิ้นงานที่ได้ ฝังลงในอ่างอย่างช้าๆ เพื่อลดการแตกร้าวเมื่อดินขาวหดตัว ต่อมนำไปเผาที่ระดับอุณหภูมิต่างกัน 4 ระดับ คือที่อุณหภูมิ 600, 800, 1000 และ 1,200 องศาเซลเซียส เมื่อเตาเผามีอุณหภูมิถึงที่กำหนด จะเผาต่ออีก 30 นาที และทิ้งไว้ในคลาเยความร้อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 4 ซ้ำ (Replication) แต่ละซ้ำ จำนวน 30 ก้อน บันทึกข้อมูล เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การหดตัวของหินเป็นเทียม ความแข็ง (กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) เปอร์เซ็นต์ความพรุน

2. พัฒนาเทคนิคการเพิ่มรูพรุนบนหินเป็นเทียม

การศึกษาการผลิตเซรามิกพรุน เพื่อให้เกิดช่องว่างจำนวนมาก เหมาะสำหรับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สำหรับบำบัดคุณภาพน้ำ ทำโดยเลือกดินที่มีคุณสมบัติทางกายภาพเบื้องต้นในการทดลองที่ 1 จากนั้นผสมสารอินทรีย์ที่สามารถเผาไหม้ด้วยอุณหภูมิต่ำ เพื่อให้เกิดช่องว่างเมื่อเผาไหม้สารอินทรีย์อย่างสมบูรณ์ คือ ขุยมะพร้าว แกลบ และขี้เถ้าตามลำดับ ผสมในอัตราส่วน ดิน : สารอินทรีย์ เท่ากับ 1: 0.05 โดยน้ำหนัก โดยแบ่งเป็น 4 การทดลอง คือ ผสมดินที่ได้จากการทดลองที่ 1 ซึ่งไม่ผสมสารอินทรีย์ ผสมขุยมะพร้าว, ผสมแกลบ และผสมขี้เถ้า โดยเมื่อผสมแล้ว นำดินมาขึ้นรูปทรงกลม ขนาด 5 เซนติเมตร เผาในอุณหภูมิเหมาะสมจากการทดลองที่ 1 เมื่อถึงอุณหภูมิที่กำหนดจะเผาต่ออีก 30 นาที และทิ้งไว้ในคลาวยความร้อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกข้อมูล เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การหดตัวของหินเป็นเทียม ความแข็ง (กิโกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) เปอร์เซ็นต์ความพรุน ทุกชนิดในแต่ละชุดการทดลอง

3. การผลิตหินเป็นเทียมจากเซรามิก

เลือกใช้ชนิดดินจากผลการศึกษาจากการทดลองที่ 1 และเทคนิคการทำให้เกิดรูพรุนจากการทดลองที่ 2 เพื่อนำมาใช้ในการผลิตหินเป็นเทียม โดยนำมาขึ้นรูปให้คล้ายกับหินเป็น จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี เพื่อให้หินเป็นเทียมจากเซรามิก มีความแข็งแรง คงทน เหมาะสำหรับการใช้เป็นวัสดุปลูกสำหรับต่อไป

2.5 การศึกษาการผลิตหินเป็น (Live rock)

หินเป็น คือก้อนหินในทะเลที่มีสิ่งมีชีวิตอื่น โดยเฉพาะสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบมาขึ้นเคลือบ หากมีสาหร่ายหลายชนิดเคลือบอยู่ จะทำให้ก้อนหินมีสีแตกต่างกัน ตั้งแต่ สีชมพูอ่อน เขียวอ่อน ชมพูเข้ม แดง แดงปนม่วง เป็นต้น การศึกษาวิธีการผลิตหินเป็นมีรายละเอียดดังนี้

1. คัดเลือกและเก็บสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบจากธรรมชาติ

ดำน้ำเก็บสาหร่ายสีแดงที่มีองค์ประกอบจากธรรมชาติซึ่งขึ้นเคลือบก้อนหิน ทำความสะอาด และสกัดเฉพาะส่วนที่เป็นสาหร่ายออกมาจากก้อนหิน กำจัดสาหร่ายชนิดอื่นที่เป็นอีฟิไฟต์ รวมถึงสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น หอย ไข่เดือนทะเล ปู ดาวเปราะ ซึ่งอาศัยและเกาะโพรงอยู่เพื่อป้องกันการเน่าเสียของสาหร่ายในภายหลัง คัดเลือกชิ้นสาหร่ายที่มีเซลล์สืบพันธุ์ โดยการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

2. ศึกษาการเหนี่ยวนำให้สาหร่ายปล่อยสปอร์และการเกาะติด

นำก้อนสาหร่ายมาผึ่งแห้งที่ระยะเวลาต่างๆ แล้วนำไปแช่ในน้ำทะเลซึ่งมีหินเทียมที่ได้จากการศึกษา ตรวจสอบเซลล์สืบพันธุ์ที่ถูกปล่อยออกมา และแยกเฉพาะเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำเซลล์ที่แยกได้ปล่อยลงในน้ำซึ่งมีหินเทียมรองรับ แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำทะเล โดยทิ้งไว้ประมาณ 1 เดือน จึงเริ่มตรวจสอบจำนวนพื้นที่ของสาหร่ายที่ขึ้นเคลือบบนหินเทียม

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยต่อยอดจากการวิจัยที่ได้รับทำมาก่อนภายใต้โครงการ “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลเพื่อการอนุรักษ์ สนับสนุนโดยสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีงบประมาณ 2554” และโครงการ “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลเพื่อการอนุรักษ์หญ้าทะเล สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (NRCT-JSPS) ปีงบประมาณ 2555” ซึ่งศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล 2 ชนิด คือ *Enhalus acoroides* และ *Thalassia hemprichii* โดยผลที่ได้เป็น การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต่างๆ สำหรับในการวิจัยครั้งนี้ ได้ดำเนินการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเพิ่มอีก 2 ชนิด คือ *Halophila ovalis* และ *Cymodocea rotundata* และศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อชิ้นเนื้อเยื่อของหญ้าทะเล

ในการนำเสนอผลการศึกษายกเสนอผลที่ได้จากการศึกษาแยกเป็นชนิดหญ้าทะเลที่ได้ศึกษาวิจัยในขั้นตอนต่างๆ เพื่อความต่อเนื่องในการติดตามผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัยไปพร้อมกันทั้งนี้ เนื่องจากหญ้าทะเลแต่ละชนิดมีศักยภาพในการนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตกต่างกัน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides*

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยได้วิธีที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต่างๆ ของหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* และสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในเบื้องต้นจากโครงการที่ได้ดำเนินการมาก่อนหน้า และได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมดังนี้

ลักษณะทั่วไป หญ้าทะเลใบยาว *Enhalus acoroides* เป็นหญ้าทะเลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดที่พบในประเทศไทย มีการแพร่กระจายทั้งบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย และทะเลอันดามัน มีต้นตั้งตรงขึ้นมาจากเหง้าหรือลำต้นใต้ดิน ซึ่งมีขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7-1.7 ซม. และฝังอยู่ใต้ดิน ลึกประมาณ 30-150 ซม. โดยมีรากขนาดใหญ่และมีจำนวนมากเกิดจากเหง้า แต่ละต้นมีใบ 2-5 ใบ ความยาวของใบ 19-180 ซม. ความกว้างของใบ 0.75-1.5 ซม. ปลายใบมน มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศซึ่งแตกต่างกับหญ้าทะเลชนิดอื่นๆ คือ มีการผสมเกสรที่ผิวน้ำขณะน้ำลดต่ำสุด ช่อดอกตัวผู้มีก้านสั้นเกิดที่โคนต้น ภายในประกอบด้วยอับเรณูจำนวนมาก ซึ่งจะลอกสู่วิวัฒนาการเมื่อกาบดอกเปิดออก ดอกตัวเมียเป็นดอกเดี่ยว มีก้านยาว 11.0-28.5 ซม. หรือยาวกว่านี้ ขึ้นอยู่ที่ระดับความลึกของน้ำ หลังจากได้รับการผสมแล้วก้านดอกจะขดเป็นเกลียว และหดสั้นพันอยู่บริเวณโคนต้น ส่วนผลมีขนาดใหญ่ ลักษณะกลมปลายแหลม เปลือกเป็นลอนมี 8-10 ลอน แต่ละลอนมีขนคลุม ความยาวของผล 4.0-6.2 ซม. ความกว้างของผล 2.3-3.5 ซม. ภายในมีเมล็ด 4-9 เมล็ด เมล็ดมีลักษณะเป็นรูปกรวยคว่ำ ฐานกว้างปลายแคบ เมื่อผลแก่จะแตก เมล็ดหลุดออกจมลงสู่พื้นแล้วงอกเป็นต้นทันที (รูปที่ 1-4)

การฟอกฆ่าเชื้อ ฟอกฆ่าเชื้อส่วนผล โดยนำผลมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำไหล ใช้แปรงขัดส่วนผิวให้ปราศจากตะกอนทรายและอิพิไฟต์ โคนขคนที่บริเวณผิวออกพร้อมกับตัดส่วนก้านผลให้มีความยาวประมาณไม่เกิน 2 เซนติเมตร ขัดล้างด้วยน้ำจืดอีกครั้ง และฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้คลอโรกซ์ ที่ระดับความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ในน้ำทะเลฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 10-15 นาที แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำทะเลฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง เมื่อผ่าผล และลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก ในการฟอกฆ่าเชื้อส่วนผล จะต้องระมัดระวังในการเลือกผล หากผลมีความแก่ จะสามารถเห็นผิวแบ่งเป็นลอนได้อย่างชัดเจน ซึ่งจะได้เมล็ดที่แก่ พร้อมจะเจริญเป็นต้นอ่อนได้ทันที แต่มีข้อเสียคือ เปลือกของผลอาจปริแตกได้ง่ายระหว่างขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ ทำให้เมล็ดภายในไม่อยู่ในสภาพปลอดภัยและไม่สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ผลที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อจะถูกนำไปใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป



รูปที่ 1 ลักษณะทั่วไปของหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides*



รูปที่ 2 ลักษณะผลอ่อนของหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* ก้านดอกมีลักษณะม้วนงอ



รูปที่ 3 ลักษณะผลแก่ของหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* ก้านดอกซึ่งติดกับส่วนผล มีลักษณะม้วนงอทำให้ผลแก่อยู่ติดกับพื้นทะเล หรือจมลงไปได้พื้น ส่วนขนที่เปลือกของผลมีตะกอนเกาะเป็นจำนวนมาก



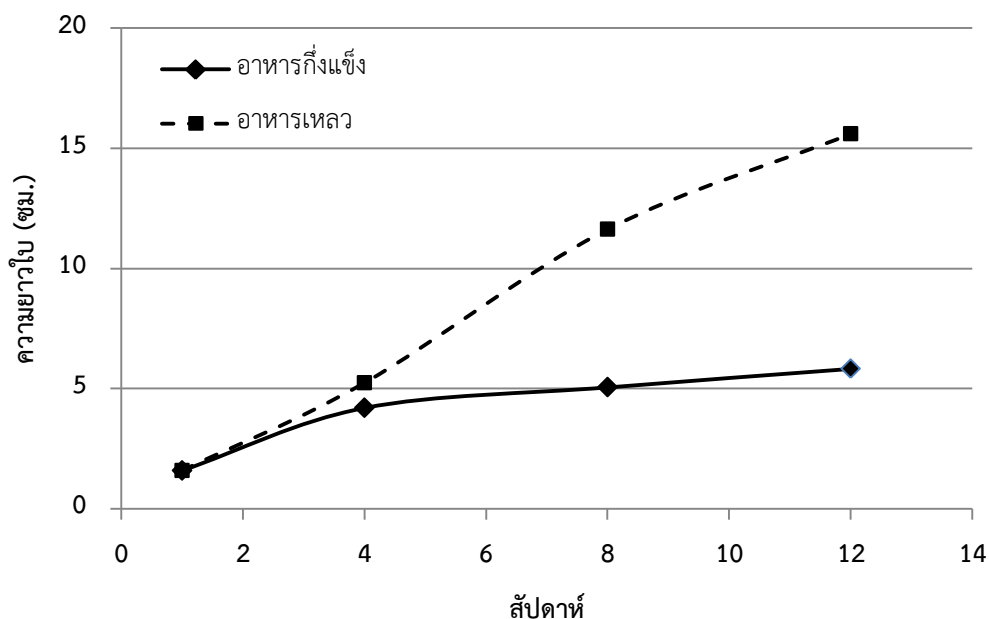
รูปที่ 4 ผลแก่ของหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* ภายในมีเมล็ดที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดหุ้มไว้

การฟอกฆ่าเชื้อภายนอกส่วนปลายยอดของต้นทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากส่วนปลายยอดของต้นถูกหุ้มด้วยกาบใบเป็นชั้นๆ ประมาณ 2-3 ชั้น และฝังอยู่ใต้ดิน ทำให้มีชอกให้เศษทรายและตะกอนต่างๆเข้าไปฝังอยู่บริเวณระหว่างกาบใบ เมื่อเก็บต้นหญ้าทะเลมาแล้ว จะต้องนำมาทำความสะอาดผ่านน้ำไหล ตัดส่วนโคนต้นซึ่งมีลักษณะแข็งและมีเส้นขนซึ่งเป็นเส้นขอบใบ (bristle) ออกให้หมด ตัดส่วนใบที่มีสีเขียวออกเพื่อให้เหลือส่วนยอดที่มีความยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร ลอกส่วนกาบใบที่มีเศษดินติดออกให้หมดนำไปล้างน้ำทำความสะอาด แล้วจึงนำส่วนยอดไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ใช้คลอโรกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 หรือ 10 นาที และฟอกครั้งที่ 2 ด้วยคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างส่วนยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 3 รอบ นำส่วนยอดเข้าสู่เชื้อเชื้อ แล้วลอกส่วนกาบใบที่เหลือเฉพาะส่วนยอด (รูปที่ 5) ตัดส่วนยอดให้มีความยาวประมาณ 3-5 มิลลิเมตร แล้วนำวางลงบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS พบว่าเนื้อเยื่อมีลักษณะขาว แข็ง และสามารถคงสภาพได้นานกว่า 6 สัปดาห์ เนื้อเยื่อบางส่วนมีการพัฒนายีดยาวออกเล็กน้อยและหยุดการเจริญ แต่เมื่อขึ้นสัปดาห์ที่ 6 เนื้อเยื่อมีลักษณะแห้ง และมีสีน้ำตาล มีการกระจายของ phenolic compound จากชั้นเนื้อเยื่อลงสู่อาหารเป็นวงกว้าง phenolic compound ซึ่งเป็นสารสีน้ำตาลที่พืชผลิตขึ้นมา มีการรายงานการสร้าง phenolic compound โดยเนื้อเยื่อระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด ทำให้เนื้อเยื่อไม่มีการพัฒนา มีสีน้ำตาล และตายในที่สุด (Chamandoosti, 2010; Lux-Endrich et al, 2000; Volpert et al., 1995; Arnaldos et al., 2001; Ozyigit et al., 2007) ซึ่งคณะนักวิจัยได้พยายามแก้ไขปัญหาดังกล่าว โดยการเติม activated charcoal ลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ามีการสร้าง phenolic compound ลดลง แต่เนื้อเยื่อยังไม่สามารถพัฒนาเจริญเป็นต้นได้ ดังนั้นการศึกษาในขั้นตอนต่อไปจึงเป็นการศึกษาโดยใช้ส่วนเมล็ดเท่านั้น



รูปที่ 5 ส่วนยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อภายนอก ก่อนการตัดแต่ง

การศึกษาศารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความเหมาะสมต่อการพัฒนาเนื้อเยื่อ นำส่วนเมล็ดของ *Enhalus acoroides* ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เป็นอาหารเหลวสูตร MS ในน้ำที่มีความเค็ม 28 psu เนื่องจากจากการเปรียบเทียบการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนผลในอาหารเหลว และอาหารกึ่งแข็ง พบว่า ต้นอ่อนที่เกิดจากเมล็ดซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS มีความยาวใบสูงกว่าการเลี้ยงต้นอ่อนในอาหารกึ่งแข็งสูตรเดียวกัน (รูปที่ 6 ตารางที่ 4) โดยความยาวใบเฉลี่ยในช่วง 1 และ 4 สัปดาห์แรกของการเลี้ยงมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าระหว่าง 1-2 ซม. และ 3-6 ซม. ตามลำดับ หน่uating เลี้ยงในอาหารเหลวมีการยืดยาวของใบอย่างต่อเนื่องจนถึงสัปดาห์ที่ 12 มีความยาวสูงสุด 20 ซม. เมื่อพิจารณาจากความยาวใบของหน่uating เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง พบว่า ใบหน่uating เลมีความยาวเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ในสัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป โดยพบว่าถึงแม้หน่uating เลจะสามารถเจริญต่อไปได้จนถึงสัปดาห์ที่ 12 แต่ความยาวใบเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยลักษณะใบค่อนข้างแห้ง ปลายใบมีสีน้ำตาลเข้ม และมีการผลัดใบค่อนข้างเร็ว ทำให้ต้องเปลี่ยนอาหารถี่กว่าปกติ เนื่องจากจะทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย ดังนั้น คณะนักวิจัยจึงใช้อาหารเหลวในการทำการศึกษาการควบคุมการเจริญเติบโตต่อไป



รูปที่ 6 ความยาวใบเฉลี่ยของหอยทาก *Enhalus acoroides* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว และอาหารกึ่งแข็ง

ตารางที่ 4 ความยาวใบของต้นอ่อนหอยทาก *Enhalus acoroides* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารกึ่งแข็ง

สูตรอาหาร	ความยาวใบ (ซม.)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 12
อาหารเหลว	1.59±0.34 ^a	5.24±0.68 ^a	11.63±2.82 ^a	15.60±3.34 ^a
อาหารกึ่งแข็ง	1.59±0.32 ^a	4.20±0.73 ^b	5.06±0.93 ^b	5.83±1.15 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ถึงแม้ว่า หอยทาก *Enhalus acoroides* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว จะมีการเจริญของใบรวดเร็วและยาวกว่า แต่ส่วนรากมีการพัฒนาน้อยกว่าต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารแข็ง เนื่องจากพบว่าความยาวของรากต้นอ่อนในอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลว เท่ากับ 2.3 ± 0.6 และ 1.4 ± 0.7 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 7) ลักษณะการพัฒนาเช่นนี้ เป็นลักษณะทั่วไปของต้นอ่อนหอยทาก เพื่อช่วยให้หอยทากสามารถยึดเกาะกับพื้นท้องทะเลได้ดี ดังนั้น เมื่อวางเมล็ดลงบนอาหารกึ่งแข็ง จึงมีการพัฒนาของรากได้ดี ถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนาของส่วนใบน้อยกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารเหลว



ต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง



ต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเหลว

รูปที่ 7 ลักษณะต้นอ่อนหญ้าทะเล *Enhalus acoroides* ที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง และอาหารเหลว สูตร MS เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อนำเมล็ดของหญ้าทะเล *Enhalus acoroides* มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีชนิดและปริมาณต่างๆ ดังตารางที่ 2 มีการเปลี่ยนถ่ายอาหารให้แก่ต้นอ่อนทุกเดือน บันทึกจำนวนต้นอ่อนที่รอดชีวิต ความยาวใบ (ตารางที่ 5) ความยาวราก จำนวนราก รวมถึงบันทึกลักษณะอื่นๆ ที่สังเกตได้ภายใน 12 สัปดาห์ โดยมีเป้าหมายเพื่อให้เมล็ดมีการพัฒนาเป็นแคลลัส จากการวิจัย พบว่า ตลอดการศึกษา ต้นอ่อนหญ้าทะเลมีอัตราการรอดมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีอัตราการติดเชื่อน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเทคนิคในการย้ายเมล็ดเพื่อลงปลูกในสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นถึงแม้ว่า ต้นอ่อนหญ้าทะเลที่อยู่ระหว่างการศึกษามีการติดเชื้อ แต่ยังสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ จึงได้ย้ายปลูกในสภาพเลียนแบบธรรมชาติในห้องปฏิบัติการ

ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรต่างๆ และชุดควบคุมดังตารางที่ 5 ตลอดเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าความยาวใบของหญ้าทะเลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ยกเว้น หญ้าทะเลที่เลี้ยงด้วยอาหาร MS ที่เติม NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ อาหารที่เติม NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีการยืดยาวของใบหญ้าทะเลในสัปดาห์ที่ 12 เท่ากับ 16.4 ± 2.0 เซนติเมตร และ 14.7 ± 3.1 เซนติเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ความยาวใบของต้นอ่อนหญ้าทะเล *Enhalus acoroides* ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA

ความเข้มข้นและชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโต		ความยาวใบ (ซม.)		
NAA (mg/l)	BA (mg/l)	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 12
0	0	2.1±0.2	2.5±0.4	3.6±0.5
	0.5	2.2±0.3	2.4±0.6	3.8±0.6
	1.0	2.3±0.4	2.6±0.5	3.7±0.5
	2.0	2.3±0.3	2.5±0.5	4.0±0.6
	3.0	2.2±0.3	2.7±0.6	4.1±0.5
0.25	0	2.0±0.4	2.6±0.6	3.6±0.7
	0.5	2.2±0.3	2.7±0.5	3.8±0.5
	1.0	2.4±0.3	2.7±0.6	3.5±0.5
	2.0	2.3±0.2	3.2±0.5	3.7±0.7
	3.0	2.6±0.3	3.5±0.6	4.0±0.6
0.5	0	2.2±0.3	2.5±0.6	4.0±0.5
	0.5	2.5±0.4	2.7±0.8	3.3±1.0
	1.0	2.3±0.4	2.8±0.6	3.3±0.6
	2.0	3.0±0.5	3.6±0.7	4.0±0.8
	3.0	3.0±0.3	3.3±0.5	3.7±0.8
1.0	0	2.3±0.2	2.8±0.5	3.1±0.7
	0.5	2.5±0.3	2.7±0.6	3.3±0.7
	1.0	2.5±0.4	2.7±0.6	3.4±0.5
	2.0	2.4±0.5	2.6±0.7	3.3±0.7
	3.0	2.2±0.3	2.5±0.6	4.0±0.5
2.0	0	2.5±0.3	2.7±0.6	3.3±0.7
	0.5	2.5±0.3	2.7±0.5	3.3±0.6
	1.0	2.4±0.4	2.5±0.6	3.8±0.8
	2.0	3.5±0.4	5.7±0.5	16.4±2.0
	3.0	2.3±0.3	2.5±0.7	3.0±0.8
3.0	0	2.5±0.3	2.7±0.6	3.3±0.7
	0.5	2.4±0.3	2.8±0.5	3.7±0.9
	1.0	2.3±0.4	2.5±0.5	3.6±0.7
	2.0	3.5±0.3	5.3±0.5	14.7±3.1
	3.0	2.5±0.4	2.8±0.6	3.0±0.5

การพัฒนาส่วนรากของต้นอ่อนหญ้าทะเลที่เลี้ยงในอาหารที่เพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตส่วนใหญ่ไม่มีความผิดปกติ มีการสร้างรากใหม่ โดยในสัปดาห์ที่ 4 มี 1-2 ราก สัปดาห์ที่ 8 มี 1-3 ราก และสัปดาห์ที่ 12 มี 2-4 ราก อย่างไรก็ตาม พบว่า ต้นอ่อนหญ้าทะเลที่เจริญเติบโตในอาหารที่เติม BA 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีจำนวนรากมากกว่าในอาหารสูตรอื่นๆ โดยรากมีจำนวน 2-6 ราก (รูปที่ 8) พบการพัฒนาารากสูงสุดในอาหารที่มี BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นอ่อนหญ้าทะเลที่เจริญในอาหารที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญของรากน้อยกว่าปกติโดยมีจำนวน 1-3 รากในสัปดาห์ที่ 12



รูปที่ 8 ลักษณะต้นอ่อนหญ้าทะเล *Enhalus acoroides* ที่มีรากจำนวนมาก เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อนำเมล็ดหญ้าทะเล *Enhalus acoroides* มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ (ตารางที่ 6) พบว่า ต้นอ่อนหญ้าทะเลส่วนใหญ่มีลักษณะผิดปกติของส่วนใบ หรือมีการสร้างเนื้อเยื่อที่มีลักษณะคล้ายแคลลัสเกิดขึ้น (รูปที่ 9-12) เนื้อเยื่อส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงด้านล่างเกิดการแบ่งเซลล์เบียดกันแน่นฟูออกจากเนื้อเยื่อเดิม ลำต้นเหนือใบเลี้ยงอาจมีการยืดยาวผิดปกติ คาดว่าลักษณะเช่นนี้ เป็นการเกิดแคลลัสอยู่รอบๆ ส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง เมื่อทำการตัดแบ่งมาขยายเลี้ยง พบว่ามีการเจริญค่อนข้างช้า และค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเนื่องจากสารประกอบกลุ่ม phenolic compound ที่เนื้อเยื่อสร้างขึ้น ทำให้เนื้อเยื่อค่อยๆ ตายลงในที่สุด

ตารางที่ 6 ลักษณะต้นอ่อนหญ้าทะเล *Enhalus acoroides* ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ

ความเข้มข้นและชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโต		ความยาวใบ (ซม.)		
2,4 D (mg/l)	TDZ (μ g/l)	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 12
1.0	0	ปกติ	ใบยาวผิดปกติไม่มีราก	ใบยาวผิดปกติไม่มีราก
	0.1	ปกติ	ปกติ	ปกติ
	0.2	ปกติ	ปกติ	ปกติ
	0.3	ใบแคบยาวผิดปกติ	ใบแคบยาวผิดปกติ	ใบแคบยาวผิดปกติ
	0.4	ใบแคบยาวผิดปกติ	ใบแคบยาวผิดปกติ	ใบแคบยาวผิดปกติ
2.0	0	ใบแคบยาวผิดปกติ	ใบแคบยาวผิดปกติ	ใบแคบยาวผิดปกติ
	0.1	ใบปกติไม่มีราก	ใบปกติไม่มีราก	ใบปกติไม่มีราก
	0.2	ใบปกติไม่มีราก	ใบปกติไม่มีราก	ใบปกติไม่มีราก
	0.3	-	แบ่งเซลล์คล้ายแคลลัส	แบ่งเซลล์คล้ายแคลลัส
	0.4	-	แบ่งเซลล์คล้ายแคลลัส	แบ่งเซลล์คล้ายแคลลัส
4.0	0	ปกติ	ใบยาวผิดปกติไม่มีราก	ใบยาวผิดปกติไม่มีราก
	0.1	-	แบ่งเซลล์คล้ายแคลลัส	แบ่งเซลล์คล้ายแคลลัส
	0.2	-	แบ่งเซลล์คล้ายแคลลัส	แบ่งเซลล์คล้ายแคลลัส
	0.3	-	แบ่งเซลล์คล้ายแคลลัส	แบ่งเซลล์คล้ายแคลลัส
	0.4	-	แบ่งเซลล์คล้ายแคลลัส	แบ่งเซลล์คล้ายแคลลัส
10.0	0	ใบใหม่ แคระ หักงอ	ใบใหม่ แคระ หักงอ	ใบใหม่ แคระ หักงอ
	0.1	ใบใหม่ แคระ หักงอ	ใบใหม่ แคระ หักงอ	ใบใหม่ แคระ หักงอ
	0.2	ใบใหม่ แคระ หักงอ	ใบใหม่ แคระ หักงอ	ใบใหม่ แคระ หักงอ
	0.3	ใบใหม่ แคระ หักงอ	ใบใหม่ แคระ หักงอ	ใบใหม่ แคระ หักงอ
	0.4	ใบใหม่ แคระ หักงอ	ใบใหม่ แคระ หักงอ	ใบใหม่ แคระ หักงอ

เมื่อนำต้นอ่อนหญ้าทะเล *Enhalus acoroides* ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ มาเลี้ยงต่อในสภาพเลียนแบบธรรมชาติในห้องปฏิบัติการ ที่มีการควบคุมอุณหภูมิและให้แสงสว่างเช่นเดียวกับห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าต้นอ่อนหญ้าทะเล สามารถเจริญได้ดี มีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถเจริญได้อย่างต่อเนื่องจนมีระดับความสูง 30 เซนติเมตร และอยู่ได้ในระบบเลียนแบบธรรมชาตินานกว่า 4 เดือน (รูปที่ 13) อย่างไรก็ตาม การนำหญ้าทะเลจากสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ ยังมีปัญหาการติดเชื้อรา ซึ่งจะรบกวนระบบการเลี้ยงและระบบการกรองน้ำ และอาจก่อปัญหาที่ระบบการเลี้ยงในภาพรวม ดังนั้น ในช่วงแรกของการนำหญ้าทะเลจากระบบปลอดเชื้อมาสู่ระบบเลียนแบบธรรมชาติ

จะต้องมีการปรับสภาพของหญ้าทะเลและสร้างระบบการเลี้ยงที่เหมาะสม ก่อนนำหญ้าทะเลลงเลี้ยงร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นในตู้ปลาทะเลสวยงาม



รูปที่ 9 เมล็ด *Enhalus acoroides* ที่ตัดจุดเจริญออกและเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ เนื้อเยื่อส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงด้านล่างเกิดการแบ่งเซลล์เบียดกันแน่นฟูออกจากเนื้อเยื่อเดิม คล้ายแคลลัส



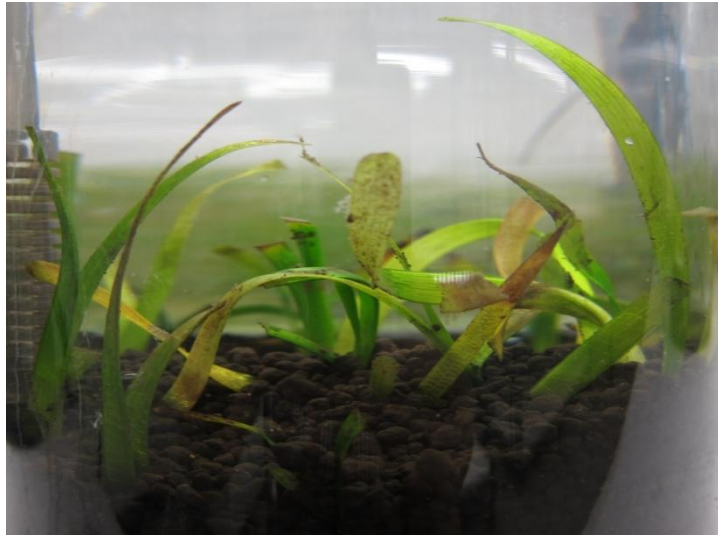
รูปที่ 10 ลักษณะการเจริญที่ผิดปกติของต้นอ่อนหญ้าทะเล *Enhalus acoroides* ใบมีลักษณะหงิกงอและปลายใบไหม้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ



รูปที่ 11 ใบของต้นอ่อนหญ้าทะเล *Enhalus acoroides* มีลักษณะพอมยาวและไม่มีรากเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ



รูปที่ 12 ลักษณะการเจริญปกติของต้นอ่อนหญ้าทะเล *Enhalus acoroides* ส่วนรากมีการพัฒนาน้อยมาก บางต้นไม่เกิดรากเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ



รูปที่ 13 หญ้าทะเล *Enhalus acoroides* ที่เลี้ยงในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ

เมื่อพิจารณาถึงศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล *Enhalus acoroides* เพื่อพัฒนาสำหรับรองรับธุรกิจตู้ปลาทะเล พบว่ามีข้อเด่นข้อด้อยดังนี้

ข้อเด่น ปัจจุบัน มีความก้าวหน้าในด้านวิธีการฟอกฆ่าเชื้อและนำลงเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อได้ เมื่อนำเมล็ดมาเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีการสร้างกลุ่มเซลล์ซึ่งมีลักษณะคล้ายแคลลัส ซึ่งหากศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง คาดว่าจะมีโอกาสกระตุ้นให้เนื้อเยื่อมีการแบ่งเซลล์และกระตุ้นให้เกิดต้นอ่อนได้ในอนาคต สามารถนำต้นอ่อนที่เจริญในสภาพปลอดเชื้อเลี้ยงในสภาพเลียนแบบในธรรมชาติได้ ถึงแม้จะมีปัญหาเรื่องการติดเชื้อรา แต่คาดว่าจะสามารถปรับแก้ได้ในอนาคต ต้นอ่อนหญ้าทะเลสามารถเจริญและทนทานกับสภาพเลียนแบบธรรมชาติมากกว่า 4 เดือน ใบไม่ยาวเช่นเดียวกับธรรมชาติเนื่องจากอยู่ในสภาพแวดล้อมที่จำกัด ใบยาวช้าและเน่าจากปลายใบอย่างช้าๆ จึงเหมาะกับการนำมาเลี้ยงในตู้ปลาทะเล ซึ่งไม่ต้องการการดูแลมากนัก

ข้อด้อย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำเป็นต้องใช้เมล็ดเท่านั้น สามารถฟอกฆ่าเชื้อส่วนจุดเจริญของยอดได้ แต่ยอดมีการพัฒนาเพียงเล็กน้อยและตายลง ซึ่งทำให้ยังมีความจำเป็นต้องเก็บเมล็ดมาใช้เพื่อการศึกษาวิจัย และยังไม่เหมาะที่จะส่งเสริมให้มีการปลูกเลี้ยงในธุรกิจตู้ปลาทะเล หรือการปลูกเพื่อการอนุรักษ์ เนื่องจากจะต้องมีการเก็บเมล็ดจากธรรมชาติ ซึ่งจะทำลายแหล่งต้นพันธุ์ในธรรมชาติได้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลชนิด *Thalassia hemprichii*

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยได้วิธีที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของหญ้าทะเลชนิด *Thalassia hemprichii* และสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในเบื้องต้นจากโครงการที่ได้ดำเนินการมาก่อนหน้า และได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมดังนี้

ลักษณะทั่วไป หญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* เป็นหญ้าทะเลที่มีต้นขนาดกลางขึ้นตั้งตรงจากลำต้นใต้ดิน ซึ่งแข็งแรง เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.3-3.9 มม. แต่ละต้นมีใบ 2-6 ใบ ลำต้นสั้นหรือยาวขึ้นอยู่กับอายุ ต้นสูง 3.4-24.2 ซม. มีราก 2-4 เส้น ใบโค้งงอ ความยาวของใบ 3.0-19.5 ซม. ส่วนล่างเป็นกาบใบบางใส ไม่มีสี ความยาว 1.9-9.5 ซม. ตัวใบสีเขียวเข้ม ความยาว 1.1-10.0 ซม. ความกว้าง 3.3-7.9 มม. เส้นใบเรียงขนานตามความยาวของใบ ระหว่างเส้นใบมีเส้นขวางเป็นระยะ ๆ ปลายใบมนอาจมีรอยหยักเล็ก ๆ ขอบใบเรียบ หลังจากใบแก่ตัวใบจะเน่าเปื่อยเหลือแต่กาบใบหุ้มลำต้นซ้อนกันหลายชั้น ดอกและผลเกิดตามฤดูกาล ผลมีก้านผล เกิดบริเวณโคนต้นและฝังตัวอยู่ใต้ทราย มีลักษณะกลมสีน้ำตาลอมเขียว ยาว 2.0-2.5 ซม. กว้าง 1.7-3.2 ซม. เมื่อผลแก่จะแตก ภายในมีเมล็ดลักษณะเป็นรูปกรวยคว่ำ (รูปที่ 14-16)

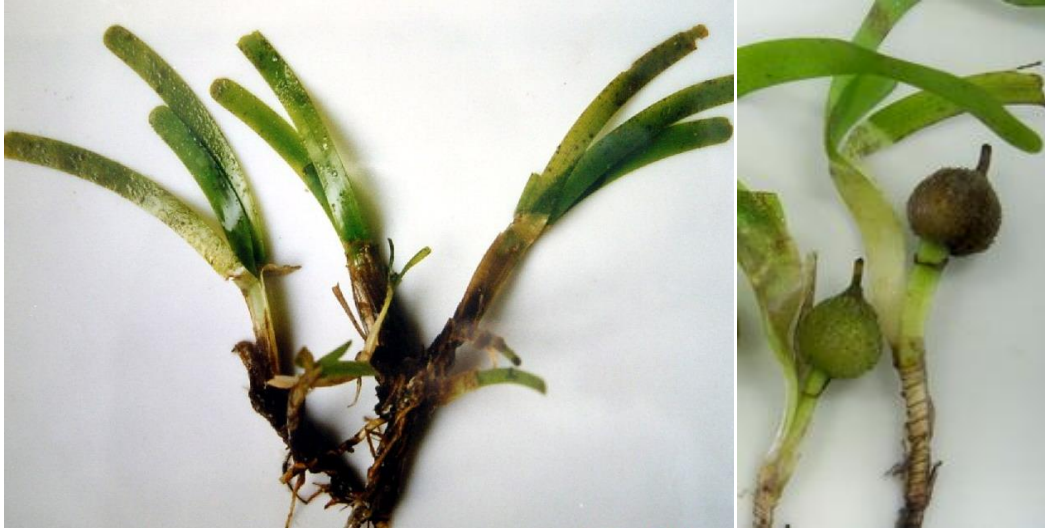
การฟอกฆ่าเชื้อ ฟอกฆ่าเชื้อส่วนผล โดยนำผลมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำไหล ใช้แปรงขัดส่วนผิวให้ปราศจากตะกอนทรายและอีพิไฟต์ และฟอกฆ่าเชื้อโดยการใช้คลอโรกซ์ ที่ระดับความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ในน้ำทะเลฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำทะเลฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง อย่างไรก็ตามเปลือกของผลอาจปริแตกได้ง่ายระหว่างขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อซึ่งจะทำให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างการฟอกฆ่าเชื้อและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ง่าย (รูปที่ 17) ส่วนยอดและต้นอ่อน สามารถฟอกฆ่าเชื้อได้ด้วยคลอโรกซ์ 15 เปอร์เซนต์ในน้ำทะเลฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที และฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วย คลอโรกซ์ 10 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 3 นาที ชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อจะถูกนำไปใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป



รูปที่ 14 ลักษณะทั่วไปของหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii*



รูปที่ 15 ผลหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* ฝังอยู่ใต้ดิน



รูปที่ 16 ส่วนต้นและผลที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



รูปที่ 17 ส่วนผลของ *Thalassia hemprichii* ที่ปริแตกออกเห็นส่วนเมล็ดซึ่งมีเนื้อเยื่อหุ้มอยู่

การศึกษารูปแบบและสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* จากการศึกษาวิจัยภายใต้โครงการก่อนหน้านี้ภายใต้โครงการ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล เต่าเพื่อการอนุรักษ์แหล่งหญ้าทะเล ปีที่ 1 (CORE University Program NRCT-JSPS) ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ พบสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะส่วนเมล็ด คือ อาหารเหลว หรืออาหารกึ่งแข็ง ที่เติม activated charcoal แต่ยังไม่สามารถเลี้ยงให้เนื้อเยื่อส่วนยอดและส่วนข้อของหญ้าทะเลชนิดนี้เจริญเติบโตได้ เนื้อเยื่อทั้งหมดจะแห้งและตายภายใน 1 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า สูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงส่วนยอดและส่วนข้อของต้นคืออาหารกึ่งแข็งที่ผสม activated charcoal เช่นเดียวกับการเพาะเมล็ด ขั้นตอนที่ควรให้ความสำคัญคือการทำ

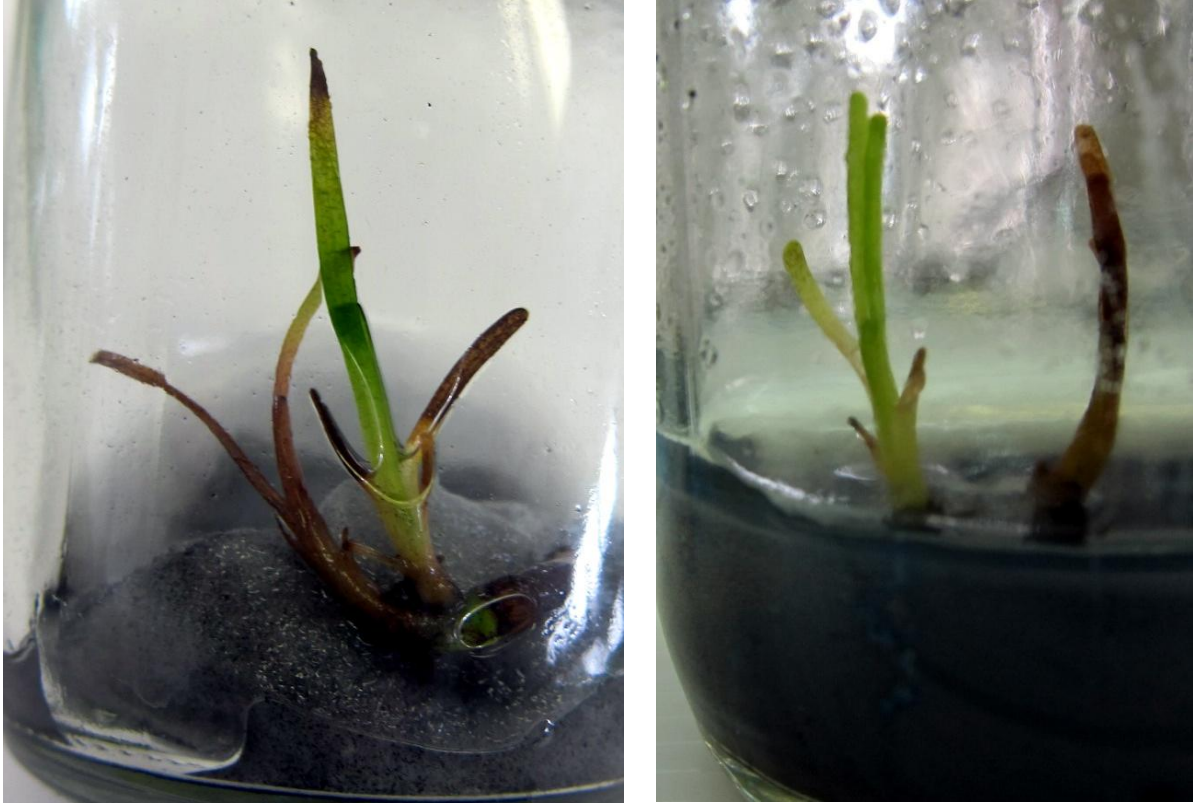
สะดวกขึ้นเนื้อเยื่ออย่างระมัดระวัง พยายามไม่ให้เนื้อเยื่อชำรุด เนื้อเยื่อสามารถเจริญได้ในอาหารสูตร MS โดยในขณะนี้ยังไม่มีการทดสอบการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในการกระตุ้นต้นอ่อนให้เกิดการแตกยอดเพิ่ม เนื่องจากการเจริญของต้นอ่อนค่อนข้างช้า ต้นอ่อนมีขนาดเล็ก โดยมีความยาวใบ 2-3 เซนติเมตร มีความกว้าง 1 มิลลิเมตร เมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 16 สัปดาห์ (รูปที่ 18-20)



รูปที่ 18 ต้นอ่อนหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว อายุ 8 สัปดาห์



รูปที่ 19 ต้นอ่อนหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* ที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์



รูปที่ 20 ต้นอ่อนหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* ที่เกิดจากส่วนปลายยอดของลำต้นใต้ดิน เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เป็นอาหารเหลว (ซ้าย) และ อาหารกึ่งแข็ง (ขวา) เป็นเวลา 16 สัปดาห์

ต้นอ่อนที่เกิดจากเมล็ดจะเกิด 1 ต้น ต่อ 1 เมล็ด ขณะที่ ต้นอ่อนที่เกิดจากข้อหรือปลายยอดต้นใต้ดิน สามารถแตกยอดออกเป็น 3 ต้น จากชิ้นเนื้อเยื่อ 1 ชิ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 16 สัปดาห์ ต้นอ่อนหญ้าทะเลมีลักษณะปลายใบเริ่มเน่า และแห้ง จึงได้ทดลองนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนำลงเลี้ยงในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ โดยขนาดหญ้าทะเลที่นำมาเลี้ยง มีความสูง 2-3 เซนติเมตร (ภาพที่ 21) ความกว้างใบน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร พบว่า ต้นอ่อนมีการตายเนื่องจากการติดเชื้อที่ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพเลียนแบบธรรมชาติภายในสัปดาห์ที่ 4 ของการเลี้ยง

เมื่อพิจารณาถึงศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* เพื่อพัฒนาสำหรับรองรับธุรกิจตู้ปลาทะเล พบว่ามีข้อเด่นข้อด้อยดังนี้

ข้อเด่น คณะนักวิจัยสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* ได้จากส่วนเมล็ด ส่วนปลายยอดลำต้นใต้ดิน และส่วนข้อ จนเกิดเป็นต้นอ่อนได้ และสามารถเพิ่มต้นอ่อนเป็น 3 ต้นจาก ข้อ หรือปลายยอดลำต้นใต้ดินได้ ดังนั้นหากสามารถพัฒนาเทคนิคการกระตุ้นให้ต้นอ่อนมีการผลิตยอดเพิ่มขึ้น จะมีโอกาสในการส่งเสริมให้นำหญ้าทะเลชนิดนี้ปลูกเลี้ยงในตู้ปลาทะเลสวยงาม เนื่องจากหญ้าทะเลชนิดนี้ มี

การเจริญเติบโต แบบการเจริญทดแทนใบโดยเนื้อเยื่อเจริญคู่ (di-meristematic leaf-replacing) (Short and Duarte, 2001) เมื่อนำลงปลูกเลี้ยง ต้นเดิมสามารถแตกใบใหม่ได้ ใบมีอายุประมาณ 30 วัน เมื่อใบแก่หลุดจะมีใบใหม่ขึ้นมาทดแทน ซึ่งแตกต่างกับหญ้าทะเลบางชนิดที่ไม่มีใบใหม่เจริญมาทดแทนที่ตำแหน่งต้นเดิม เมื่อสิ้นสุดโครงการในปีที่ 1 นักวิจัยจะดำเนินการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลชนิดนี้ต่อภายใต้โครงการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลเพื่อการอนุรักษ์แหล่งหญ้าทะเล ปีที่ 2 (CORE University Program NRCT-JSPS หมายเหตุ มีความล่าช้าในการสนับสนุนโครงการทำให้เว้นระยะจากปีที่ 1 เป็นเวลา 1 ปี) ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เช่นเดียวกัน

ข้อด้อย ต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน ดังนั้น การทดสอบอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง จึงใช้เวลานาน เกิดความก้าวหน้าในการศึกษาช้า



รูปที่ 21 ต้นอ่อนหญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดลำต้นใต้ดินเป็นเวลา 16 สัปดาห์ (ซ้าย) และนำลงเลี้ยงในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ (ขวา)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล *Halophila ovalis*

ลักษณะทั่วไป ต้นเกิดจากเหง้าอวบน้ำใต้ดินผ่านศูนย์กลาง 0.4-1.7 มม. แต่ละข้อมีช่วงห่าง 1.2-6.2 ซม. ต้นสูง 1.8-6.0 ซม. มีใบเกิดเป็นคู่ตรงข้อ รากมีจำนวนเพียง 1 เส้น ใบมีก้านใบ (petiole) ผอมยาว ความยาว 0.8-3.1 ซม. ตัวใบรีรูปไข่ ความยาว 0.8-2.9 ซม. ความกว้าง 4.0-13.0 มม. ปลายใบมนกลม ขอบใบเรียบมีเส้นกลางใบ 1 เส้น และเส้นขวางใบแยกจากเส้นกลางใบจำนวน 12-19 คู่ บางเส้นปลายแยกเป็น 2 แฉก ปลายของเส้นขวางใบยาวจรดเส้นขอบใบ บริเวณโคนใบมีใบเกล็ด (scale) รองรับ 1 คู่ ตัวใบมีสีเขียวหรือเขียวอมเหลือง ใบที่ยังอ่อนมีลักษณะบางใส เปราะหักง่าย (รูปที่ 22)



รูปที่ 22 ลักษณะของหญ้าทะเล *Halophila ovalis* ในธรรมชาติ

การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อหญ้าทะเล *Halophila ovalis* พบว่า ไม่สามารถฟอกฆ่าเชื้อส่วนปลายยอดลำต้นใต้ดิน และส่วนข้อ ด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 1 ได้ กรณีที่สามารถฟอกฆ่าเชื้อผ่าน ไม่มีการปนเปื้อน เนื้อเยื่อจะมีลักษณะขำและไม่สามารถเจริญพัฒนาต่อไปได้ (ตารางที่ 7) ดังนั้นคณะผู้วิจัย จึงได้ทดสอบความเป็นไปได้ในการนำหญ้าทะเลชนิดนี้จากธรรมชาติมาทดลองปลูกขยายในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ โดยใช้ส่วนยอดอ่อน และ ลำต้นใต้ดินลงปลูกในตู้ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 28 psu พบว่าหญ้าทะเล *Halophila ovalis* สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนใหม่ได้ เกิดรากจำนวนมากจากส่วนข้อเดิมและส่วนข้อลำต้นใต้ดินที่เกิดขึ้นใหม่ (รูปที่ 23) โดยมีอายุใบ 10-15 วัน ทั้งนี้ เมื่อเลี้ยงในสภาพเลียนแบบธรรมชาติเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่วนใบของหญ้าทะเลมีขนาดเล็กลง

เมื่อพิจารณาถึงศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญาทะเล *Halophila ovalis* เพื่อพัฒนาสำหรับรองรับธุรกิจตู้ปลาทะเล พบว่ามีข้อเด่นข้อด้อยดังนี้

ข้อเด่น สามารถใช้ส่วนลำต้นใต้ดินปลูกขยายได้ในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว

ข้อด้อย เนื่องจากหญาทะเลสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว มีการผลัดใบทิ้งทุก 15 วัน และการเจริญเติบโตของใบเป็นแบบการเจริญโดยเนื้อเยื่อเจริญเดี่ยวโดยไม่มีการเจริญทดแทนของใบ (monomeristematic non-leaf-replacing form) (Short and Duarte, 2001) ซึ่งไม่มีการงอกใหม่ที่ของเดิม ดังนั้นส่วนต้นใต้ดินจะงอกกินพื้นที่ออกไปแล้วเกิดต้นใหม่ไปข้างหน้า ซึ่งเมื่อมีการเจริญทั่วไปทั้งตู้แล้ว พื้นที่จะไม่เพียงพอต่อการงอก นอกจากนี้ ยังไม่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตั้งแต่ขั้นตอนแรก การนำมาเลี้ยงจะต้องเก็บตัวอย่างต้นพันธุ์จากธรรมชาติ จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการเลี้ยงในตู้ปลาทะเลสวยงาม

ตารางที่ 7 ผลการทดลองการฟอกฆ่าเชื้อของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อต่างๆของหอยทากชนิด *Halophila ovalis*

หมายเหตุ ส่วนที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ 1 = ข้อตันใต้ดิน 2 = ปลาขยอคตันใต้ดิน ✕ = ฟอกฆ่าเชื้อไม่ผ่าน เนื้อเยื่อมีการปนเปื้อน ☒ = ฟอกฆ่าเชื้อผ่าน ไม่มีการปนเปื้อน แต่เนื้อเยื่อไม่สามารถพัฒนาต่อได้

สารฟอกฆ่าเชื้อ	ระยะเวลา (นาทีก) ครั้งที่ 1+2	ส่วนที่นำมาใช้ศึกษา ฟอกฆ่าเชื้อ	
		1	2
คลอโรกซ์ 5%	5+0	✕	✕
คลอโรกซ์ 5%	5+5	✕	✕
คลอโรกซ์ 8%	2+0	✕	✕
คลอโรกซ์ 8%	5+0	✕	✕
คลอโรกซ์ 8%	5+5	✕	✕
คลอโรกซ์ 8%	10+0	✕	✕
คลอโรกซ์ 10%	2+0	✕	✕
คลอโรกซ์ 10%	5+0	✕	☒
คลอโรกซ์ 10%	5+5	✕	☒
คลอโรกซ์ 10%	10+0	☒	☒
คลอโรกซ์ 10%	10+5	☒	☒
คลอโรกซ์ 10%	15+0	☒	☒
คลอโรกซ์ 15%	5+0	☒	☒
คลอโรกซ์ 15%	5+5	☒	☒
คลอโรกซ์ 15%	10+0	☒	☒
คลอโรกซ์ 15%	10+5	☒	☒
คลอโรกซ์ 15%	15+0	☒	☒
คลอโรกซ์ 15% ครั้งที่ 1 และ 10% ครั้งที่ 2	5+5	☒	☒
เอทิลแอลกอฮอล์ 70%	5+0	✕	✕
เอทิลแอลกอฮอล์ 70%	10+0	✕	✕
เอทิลแอลกอฮอล์ 70% ครั้งที่ 1 และ คลอโรกซ์ 10% ครั้งที่ 2	1+2	✕	✕
เอทิลแอลกอฮอล์ 70% ครั้งที่ 1 และ คลอโรกซ์ 10% ครั้งที่ 2	1+5	✕	✕
เอทิลแอลกอฮอล์ 70% ครั้งที่ 1 และ คลอโรกซ์ 10% ครั้งที่ 2	1+10	✕	✕



รูปที่ 23 หญ้าทะเล *Halophila ovalis* ที่ปลูกในสภาพเลียนแบบธรรมชาติในห้องปฏิบัติการ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล *Cymodocea rotundata*

ลักษณะทั่วไป ต้นตั้งตรงขึ้นมาจากเหง้า แต่ละข้อของเหง้ามีช่วงห่าง 2-7 ซม. ความสูงของต้น 10-25 ซม. แต่ละต้นมีราก 1-3 เส้น มีใบ 2-5 ใบ ใบยาว 9-22 ซม. ใบตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย ปลายใบกลมมน ขอบใบเรียบ เส้นกลางใบไม่เด่นชัด เมื่อใบเน่าหรือหลุดร่วงไป กาบใบยังคงเหลือหุ้มต้นอยู่ (รูปที่ 24)



รูปที่ 24 ลักษณะของหญ้าทะเล *Cymodocea rotundata* ในธรรมชาติ

การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อหญ้าทะเล *Cymodocea rotundata* พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อส่วนผล (รูปที่ 25) สามารถฟอกฆ่าเชื้อผ่านโดยใช้คลอโรกซ์ 15% ในน้ำทะเลที่ปลอดเชื้อเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำทะเลฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำผลที่มีเปลือกแข็งมาแกะออก นำส่วนเมล็ดไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS พบว่าไม่มีการปนเปื้อน ระหว่างเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดไม่มีการพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อน และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ตารางที่ 8) ซึ่งนักวิจัยคาดว่าน่าจะเกิดจากความสมบูรณ์ของเมล็ด หรือวิธีการเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม ทั้งนี้ คาดว่าในธรรมชาติ หญ้าทะเลชนิดนี้น่าจะมีระยะพักตัว ซึ่งแตกต่างจากหญ้าทะเลชนิดอื่น เนื่องจากผลมีเปลือกแข็ง และฝังอยู่ใต้ดิน เมื่อต้นแก่หรือผลหลุดจากต้น อาจฝังตัวอยู่ใต้ดินเป็นเวลานานก่อนที่จะงอกออกมาจากเปลือก การแกะเปลือกออกก่อนกำหนด อาจทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญของต้นอ่อน ทั้งนี้จากการตรวจเอกสาร พบว่ายังไม่มีบทความทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงหญ้าทะเลชนิดนี้มาก่อน



รูปที่ 25 ลักษณะผลของ *Cymodocea rotundata* ผลมีเปลือกแข็ง ติดกับโคนต้นซึ่งฝังอยู่ใต้ดิน

เมื่อพิจารณาถึงศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล *Cymodocea rotundata* เพื่อพัฒนาสำหรับรองรับธุรกิจตู้ปลาทะเล พบว่ามีข้อเด่นข้อด้อยดังนี้

ข้อเด่น เป็นหญ้าทะเลที่มีความสวยงาม ลักษณะการแตกต้นเห็นได้ชัดเจน สามารถนำมาเลี้ยงในตู้ปลาทะเลได้ด้วยการนำส่วนลำต้นใต้ดินมาฝังใต้ทรายได้

ข้อด้อย สามารถฟอกฆ่าเชื้อส่วนเมล็ดได้ แต่ยังไม่สามารถพัฒนาให้เมล็ดเจริญเป็นต้นอ่อนได้ เมล็ดในธรรมชาติมีน้อยมาก การพบเมล็ดในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการพบเมล็ดเป็นครั้งแรกของคณะนักวิจัย ดังนั้น การเพาะเลี้ยงในเบื้องต้นจะต้องเก็บส่วนต้นใต้ดินจากธรรมชาติมาเพาะขยายพันธุ์ หากสามารถพัฒนาการเลี้ยงจากส่วนปลายยอดของลำต้นใต้ดิน และส่วนข้อ ให้ได้ในปริมาณมาก น่าจะเป็นพืชที่ได้รับความนิยมใช้ในตู้ปลาทะเล

ตารางที่ 8 ผลการทดลองการฟอกฆ่าเชื้อส่วนผลของหญ้าทะเลชนิด *Cymodocea rotundata*

หมายเหตุ ✕ = ฟอกฆ่าเชื้อไม่ผ่าน เนื้อเยื่อมีการปนเปื้อน ☒ = ฟอกฆ่าเชื้อผ่าน ไม่มีการปนเปื้อน แต่เนื้อเยื่อไม่สามารถพัฒนาต่อได้

สารฟอกฆ่าเชื้อ	ระยะเวลา (นาท) ครั้งที่ 1+2	ผลการฟอกฆ่าเชื้อ
คลอโรกซ์ 10%	5+0	✕
คลอโรกซ์ 10%	5+5	✕
คลอโรกซ์ 15%	5+0	☒
คลอโรกซ์ 15%	5+5	☒
คลอโรกซ์ 15%	10+0	☒
คลอโรกซ์ 15% ครั้งที่ 1 และ 10% ครั้งที่ 2	5+5	☒
เอทิลแอลกอฮอล์ 70% ครั้งที่ 1 และ คลอโรกซ์ 10% ครั้งที่ 2	1+5	✕
เอทิลแอลกอฮอล์ 70% ครั้งที่ 1 และ คลอโรกซ์ 10% ครั้งที่ 2	1+10	✕

2. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเล

การศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเลเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ในธุรกิจผู้ปลาทะเล ในปีที่ 1 ประกอบไปด้วยการหาเทคนิคในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อสาหร่ายทะเล การกระตุ้นให้สาหร่ายทะเลปล่อยสปอร์ โดยชนิดของสาหร่ายที่นำมาใช้ศึกษา มีความหลากหลายและไม่ได้เป็นชนิดเดียวกันตลอดการทดลอง เนื่องจาก สาหร่ายทะเลมีการแพร่กระจายตามฤดูกาลตามธรรมชาติ การเก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่ระยะเวลาต่างๆ จึงได้สาหร่ายที่มีความหลากหลายและมีระยะการสืบพันธุ์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม การหาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อสาหร่ายทะเล เป็นการกำจัดการปนเปื้อนที่ผิวของสาหร่าย โดยที่เซลล์สาหร่ายยังสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งโดยหลักการ ถึงแม้ว่าสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีความทนทานต่อความเข้มข้นของสารเคมีแตกต่างกัน จึงได้เลือกสารเคมีที่มีความเข้มข้นต่ำมาใช้ในการขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิด โดยมีผลการศึกษาดังนี้

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อสาหร่ายทะเล โดยนำสาหร่ายวุ้น ชนิด *Gracilaria fisheri* ซึ่งเป็นสาหร่ายทะเลสีแดงที่มีลักษณะทลัสส์เป็นทรงกระบอก ผิวเรียบ มีเส้นผ่านศูนย์กลางทลัสส์ 1.5 มิลลิเมตร มาใช้ในการศึกษา (รูปที่ 26) ตัดชิ้นส่วนของสาหร่ายวุ้นให้มีความยาว ชิ้นละ 1 เซนติเมตร นำไปฟอกฆ่าเชื้อในสารฟอกฆ่าเชื้อชนิดและระยะเวลาต่างๆ ดังตารางที่ 3 แล้วนำลงเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ทั้งที่เป็นอาหารกึ่งแข็ง และอาหารเหลว ผลการศึกษา พบว่า สามารถฟอกฆ่าเชื้อสาหร่ายด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และฟอกฆ่าเชื้อด้วยส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ Penicillin, Ampicillin และ Claraxim[®] อย่างละ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำทะเลความเค็ม 28 psu เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการรอดของชิ้นเนื้อเยื่อ 85 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม สาหร่ายที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่ามีโคอะตอมเกิดขึ้น เมื่ออายุ 3 สัปดาห์ เนื่องจากยาปฏิชีวนะไม่สามารถกำจัดโคอะตอมได้ ดังนั้น จึงได้เติม Germanium Dioxide ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมลงไปในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะเพื่อกำจัดโคอะตอมให้ลดลง (ตารางที่ 9) ในกรณีที่นำสาหร่ายไปทดสอบการฟอกฆ่าเชื้อด้วยส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ เป็นเวลา 56 ชั่วโมง พบว่า สาหร่ายทะเลมีอัตราการรอด 75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเหมาะต่อการใช้ฟอกฆ่าเชื้อสาหร่ายทะเลที่มีผิวไม่เรียบหรือมีรูปทรงที่มีรอยหยักเว้ามาก อย่างไรก็ตาม พบว่า สาหร่ายทะเลตามธรรมชาติ มักมีตะกอนและซากของสาหร่ายที่ตายแล้วเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 27) รูปร่างรูปทรงของสาหร่ายไม่เรียบเช่นเดียวกับสาหร่ายที่นำมาใช้ในการศึกษาคั้งนี้ ทำให้มีการสะสมของเชื้อแบคทีเรีย รา และโปรโตซัวจำนวนมาก หากนำสาหร่ายที่เก็บได้จากธรรมชาติมาฟอกฆ่าเชื้อในทันทีอาจทำได้ยาก จึงต้องนำมาทดลองเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (รูปที่ 28) โดยทำความสะอาดด้วยแปรง และลงเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ ในน้ำที่มีอาหารสูตร Provasoli เพื่อให้เกิดยอดใหม่ แล้วจึงนำยอดใหม่ที่เกิดขึ้นไปใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อต่อไป



รูปที่ 26 ลักษณะของสาหร่ายวุ้นสกุล *Gracilaria* ที่นำมาใช้ในการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อ

ตารางที่ 9 สารฟอกฆ่าเชื้อและระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อต่างๆ ของสาหร่ายทะเลสกุล *Gracilaria*

หมายเหตุ สารฟอกฆ่าเชื้อ 1= Alcohol 2= Sodium Hypochlorite 3= Penicillin 4= Ampicillin

5= Claraxim® 6= Germanium Dioxide ✕ = ฟอกฆ่าเชื้อไม่ผ่าน เนื้อเยื่อมีการปนเปื้อน ✓ = ฟอกฆ่าเชื้อผ่าน สามารถเลี้ยงต่อได้

วิธีที่	ชนิดสารฟอกฆ่าเชื้อ ความเข้มข้น (% หรือ mg/l) และระยะเวลาการฟอกฆ่าเชื้อ (min หรือ hr)						ผลการศึกษา
	1 (%: min)	2 (%: min)	3 (mg/l: hr)	4 (mg/l: hr)	5 (mg/l: hr)	6 (mg/l: hr)	
1	70/0.5	0.5/5	-	-	-	-	✕
2	70/0.5	0.5/10	-	-	-	-	✕
3	-	0.5/10	-	-	-	-	✕
4	-	0.5: 10	150: 12	150: 12	150: 12	-	✕
5	-	0.5: 10	150: 12	150: 12	150: 12	5: 12	✕
6	-	0.5: 10	150: 24	150: 24	150: 24	-	✕
7	-	0.5: 10	150: 24	150: 24	150: 24	5: 24	✕
8	-	0.5: 10	150: 48	150: 48	150: 48	-	✓ มีการเกิดไดอะตอม
9	-	0.5: 10	150: 48	150: 48	150: 48	5: 48	✓
10	-	0.5: 10	150: 56	150: 56	150: 56	-	✓ มีการเกิดไดอะตอม
11	-	0.5: 10	150: 56	150: 56	150: 56	5: 56	✓



รูปที่ 27 สาหร่ายทะเลที่เก็บจากธรรมชาติ มักมีตะกอนดินและซากสาหร่ายที่เน่าสลายติดกับทลัส



รูปที่ 28 การเลี้ยงสาหร่ายทะเลในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นแหล่งค้นพันธุ์ในการศึกษา

การกระตุ้นให้สาหร่ายทะเลปล่อยสปอร์ จากการสำรวจสาหร่ายทะเลตลอดการวิจัย พบสาหร่ายทะเลที่มีการสร้างสปอร์ในช่วงที่คณะผู้วิจัยออกเก็บตัวอย่างคือ สาหร่ายสีน้ำตาล สกุล *Sargassum* สาหร่ายสีแดง สกุล *Acanthophora* และ สาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบ สกุล *Neogoniolithon* กระตุ้นให้สาหร่ายปล่อยสปอร์ด้วยวิธีการต่างๆ และบันทึกการปล่อยสปอร์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

- สาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Sargassum* พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์บนอวัยวะที่เรียกว่า female receptacle (รูปที่ 29) จึงตัดส่วนที่เป็น female receptacle ออกจากฟิลลัส ทำความสะอาดด้วยฟู่กันอ่อนเบาๆ เพื่อกำจัดเศษตะกอนที่ติดกับสาหร่ายให้เหลือน้อยที่สุด เนื่องจากไม่สามารถฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วน female receptacle ได้ แล้วย่นำไปผึ่งแห้งภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20, 30 และ 40 นาที ตามลำดับ แล้วย่นำชิ้นสาหร่ายลงไปใส่ในน้ำทะเลที่ปลอดเชื้อซึ่งบรรจุไว้ในภาชนะหลุม หลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นับจำนวนอวูล (ovule) ที่ถูกปล่อยออกมาจากชิ้นสาหร่าย (รูปที่ 30) พบว่า สาหร่ายมีการปล่อยอวูล จำนวน 4.6 ± 2.4 , 13.8 ± 6.9 , 8.4 ± 6.3 และ 6.1 ± 4.7 อวูลต่อชิ้น ตามลำดับ



รูปที่ 29 ส่วน female receptacle ของสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Sargassum*

ดังนั้นการผึ่งแห้งชิ้นส่วน female receptacle เป็นเวลา 20 นาที จะช่วยให้สาหร่ายสามารถปล่อยอวูลได้มากที่สุด อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการปล่อยอวูลของสาหร่ายจะขึ้นกับความสมบูรณ์ของเซลล์สืบพันธุ์เช่นกัน โดยจะเห็นได้จากการผลิตเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิด *Sargassum naozhouense* โดย Xie et al (2013) เพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยไม่มีการกระตุ้นให้สาหร่ายปล่อยอวูล แต่ใช้วิธีเลี้ยงสาหร่ายที่มีอวัยวะสืบพันธุ์ในบ่อขนาดใหญ่ เป็นเวลากว่า 15 วัน จนกระทั่งสาหร่ายมีความสมบูรณ์ จึงปล่อยสปอร์ออกมาเอง ดังนั้น การเพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดนี้ จึงน่าจะทำได้โดยการปล่อยอวูลตามธรรมชาติ ซึ่งอวูลจะมีความพร้อมต่อการลงเกาะมากกว่าการกระตุ้นให้ปล่อย จากการศึกษา พบว่าอวูลที่ปล่อยออกมา จะยังเกาะติดกับ ชิ้นสาหร่าย โดยไม่ลงเกาะและไม่มีการงอก เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน ทั้งนี้เนื่องจากอวูลยังไม่มี

การผสมกับสเปิร์ม ดังนั้น ในการกระตุ้นให้สาหร่ายปล่อยอสุติในครั้งต่อไป ควรจะเก็บอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้มาใส่ไว้ในบ่อเลี้ยงร่วมกันก่อน เพื่อให้อสุติได้รับการผสมเมื่อปล่อยออกมา ซึ่งจะช่วยให้สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอและเจริญเป็นต้นอ่อนต่อไปได้



รูปที่ 30 ออวูลของสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Sargassum* ที่ปล่อยออกมาระหว่างการศึกษา

- สาหร่ายสีแดงสกุล *Acanthophora* พบการสร้างสปอร์รับนอวัยวะที่เรียกว่า branchlet (รูปที่ 31) โดย branchlet มีลักษณะพองออกมากกว่าปกติ เมื่อตัดชิ้น branchlet ไปตรวจสอบได้กลิ่นจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ พบว่ามีสปอร์อยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อนำ branchlet มาทำความสะอาดและกระตุ้นด้วยการฝั่ง



รูปที่ 31 ส่วน branchlet ที่มีสปอร์ของสาหร่ายสีแดงสกุล *Acanthophora*

แห้งภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20, 30 และ 40 นาที แล้วนำลงเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 28 psu และ กระตุ้นด้วยการลดความเค็มของน้ำเป็น 22 psu ตรวจสอบการปล่อยสปอร์ พบว่าสาหร่ายไม่มีการปล่อยสปอร์ จึงได้ทดลองผ่า branchlet ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และดึงแยกสปอร์ทีละ 1 สปอร์ แล้วนำมาเลี้ยงใน ถาดหลุมซึ่งบรรจุน้ำทะเล ความเค็ม 28 psu เป็นเวลา 2 สัปดาห์พบว่า สปอร์สาหร่ายไม่มีการพัฒนางอกขึ้นเป็นต้นอ่อน

- สาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบสกุล *Neogoniolithon* พบการสร้างสปอร์ในอวัยวะที่เรียกว่า tetrasporangial conceptacle (รูปที่ 32) โดยหากพบ tetrasporangial conceptacle แต่อาจไม่มีสปอร์ก็ได้ เนื่องจากมีการปล่อยสปอร์ไปแล้ว แต่โครงสร้างภายนอกซึ่งมีลักษณะแข็งและมีช่องเปิด ยังไม่สลายไป ดังนั้น เมื่อได้ตัวอย่างสาหร่าย จะต้องตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ โดยกะเพาะส่วนที่เป็นโครงสร้างแข็งดังกล่าวออก หากพบ สปอร์ซึ่งมีสีแดงเข้มอยู่ภายใน จึงกระตุ้นการปล่อยสปอร์ โดย ทำความสะอาดสาหร่ายด้วยแปรงขนอ่อนเพื่อกำจัดตะกอน และเศษเมือกต่างๆ ตัดชิ้นสาหร่ายที่มี tetrasporangial conceptacle ออกเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1-2 ตารางเซนติเมตร แล้วนำมาทดสอบการกระตุ้นการปล่อยสปอร์ ด้วยการผึ่งแห้งเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที แล้วนำชิ้นสาหร่ายลงไปใส่ในน้ำทะเลที่ปลอดเชื้อซึ่งบรรจุไว้ในถาดหลุม หลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ tetrasporangial conceptacle ที่มีการปล่อยสปอร์ (รูปที่ 33) พบว่า เปอร์เซ็นต์ tetrasporangial conceptacle ที่ปล่อยสปอร์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยการผึ่งแห้งเท่ากับ 13, 27, 60 และ 54 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น การผึ่งแห้งที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้สาหร่ายปล่อยสปอร์คือ 45-60 นาที ซึ่งข้อมูลนี้จะนำไปใช้ในการผลิตหินเป็นต่อไป



รูปที่ 32 ลักษณะของสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบ สกุล *Neogoniolithon* ที่มี tetrasporangial conceptacle มีลักษณะเป็นรูปโดม และมีรูเปิดตรงกลาง



รูปที่ 33 สปอร์ของสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบ สกุล *Neogoniolithon* ปล่อยสปอร์สีแดงเข้มออกจากช่องเปิด (Osteole)

จากการศึกษา คณะผู้วิจัยได้ประเมินข้อเด่นข้อด้อยต่อการนำสาหร่ายทะเลมาเลี้ยงเพื่อใช้ในตู้ปลาทะเลดังนี้

ข้อเด่น สามารถฟอกฆ่าเชื้อภายนอกขึ้นเนื้อเยื่อสาหร่ายทะเลเป็นผลสำเร็จ และขึ้นเนื้อเยื่อสามารถเจริญได้ดี เนื่องจากสาหร่ายทะเลมีความสามารถในการขยายพันธุ์ เจริญเติบโตได้จากขึ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งจะเหมาะต่อการนำมาใช้ในการขยายพันธุ์มากกว่าการใช้เซลล์สืบพันธุ์ อย่างไรก็ตาม จากการตรวจสอบเอกสาร Xie et al (2013) รายงานว่าสามารถทำให้สาหร่ายสกุล *Sargassum* ปล่อยสปอร์ได้ด้วยวิธีธรรมชาติ ซึ่งน่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อเนื่อง หากสามารถหาสาหร่ายที่มีอวัยวะสืบพันธุ์สมบูรณ์ได้ในโอกาสต่อไป

ข้อด้อย การศึกษาการกระตุ้นสาหร่ายให้ปล่อยสปอร์ขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายที่พบและมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงที่เก็บตัวอย่าง โดยอาจมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ 1-2 ครั้งเท่านั้น เมื่อเก็บตัวอย่างมาศึกษา จึงทำได้ช่วงเวลาสั้นๆ ซึ่งอาจไม่ต่อเนื่อง ในกรณีที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ไม่มากนัก ส่งผลให้ความแม่นยำและความละเอียดในการศึกษาไม่เพียงพอ

การทดสอบการลงเกาะเซลล์สืบพันธุ์สาหร่าย (รายงานในเรื่องการพัฒนาวัตถุยึดเกาะสาหร่าย หินเทียม ในหัวข้อการวิจัยถัดไป)

3. การพัฒนาวัตถุยึดเกาะสาหร่าย (หินเทียม) ที่มีความเหมาะสมต่อการใช้งานในตู้ปลาทะเล

หินเทียมเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับใช้ตกแต่งและบำบัดคุณภาพน้ำในตู้ปลาทะเล แต่มักทำจากปูนซีเมนต์ผสมเปลือกหอย ทำให้ได้หินเป็นที่มีสีไม่สวย น้ำหนักมาก มีความเป็นด่างสูง ใช้เวลานานในการกำจัดความเป็นด่าง สิ่งมีชีวิตใช้เวลาลงเกาะนาน มีรูพรุนน้อยซึ่งรูพรุนเหล่านี้เป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่บำบัดและจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการบำบัดคุณภาพน้ำลดลงไปด้วย คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาโดยอาศัยหลักการของเซรามิกริง (ceramic ring) ซึ่งเป็นวัสดุที่มีรูพรุนจำนวนมาก เหมาะสำหรับเป็นที่อยู่

อาศัยของ จุลินทรีย์เพื่อการบำบัดคุณภาพน้ำ ผลผลิตขึ้นจากองค์ประกอบหลักคือดินชนิดต่างๆผสมกับสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แกลบ (สนิท, 2556) ขี้เลื่อย (เลิศชาย, 2556) และขุยมะพร้าว นำไปเผาและใช้เทคนิคพิเศษสำหรับให้มีรูพรุนเพิ่มมากขึ้น โครงการวิจัยครั้งนี้ ได้มีแนวทางนำดินชนิดต่างๆมาเผาเป็นเซรามิก เช่นเดียวกับวัตถุดิบที่ผลิตเซรามิกจริง นำมาประยุกต์ใช้เพื่อผลิตหินเทียมที่มีโครงสร้างแข็ง สีสันสวย น้ำหนักเบา มีรูพรุน เหมาะแก่การใช้งานในตู้ปลาทะเล โดยมีผลการศึกษาดังนี้

ศึกษาเนื้อดินชนิดต่างๆสำหรับการผลิตหินเทียม

เลือกใช้ดิน 4 ชนิดสำหรับการศึกษา ดินเหนียวปากเกร็ด ดินขาวจีน ดินขาวลำปาง ดินผสมสิงห์บุรี เผาที่อุณหภูมิ 4 ระดับ (รูปที่ 34) ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพเบื้องต้นดังตารางที่ 10

ผลของการศึกษาพบว่า ดินปากเกร็ดหลังเผาในทุกระดับอุณหภูมิ มีสีส้มและน้ำตาล ไม่มีสีขาว มีความแข็งแรง เมื่อเผาที่อุณหภูมิสูงกว่า 1,000 องศาเซลเซียส การทดลองเผาดินขาวจีนพบว่า คุณสมบัติหลังจากการเผา มีสีขาวแต่จะมีความแข็งแรงเมื่อเผาในระดับอุณหภูมิ 1,200 องศาเซลเซียสเท่านั้น ดินขาวลำปางหลังจากเมื่อเผาทุกระดับอุณหภูมิมีสีขาวปนเทา และมีความแข็งแรงเมื่อเผาตั้งแต่อุณหภูมิ 1,000 องศาเซลเซียสขึ้นไป ดินผสมสิงห์บุรี เมื่อเผาที่ทุกระดับอุณหภูมิมีสีขาวครีม มีความแข็งแรงเมื่อเผาตั้งแต่อุณหภูมิ 1,000 องศาเซลเซียสเป็นต้นไป



รูปที่ 34 ดินชนิดต่างๆหลังจากการถูกเผา เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีต่อไป

ตารางที่ 10 ตารางเปรียบเทียบ คุณสมบัติทางกายภาพเบื้องต้นของดิน 4 ชนิดหลังจากเผาด้วยอุณหภูมิต่างกัน

ชนิดดิน/อุณหภูมิ	ลักษณะภายนอก	ทดสอบความแข็งด้วยการหัก	การเปลี่ยนแปลงหลังจากแช่น้ำ 24 ชั่วโมง
ดินปากเกร็ด			
600°C	สีส้ม ภายในยังเผาไหม้ไม่หมด มีสีดำ	สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความเปราะ สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า
800°C	สีส้มแดง ไม่มีเสียงกังวานเมื่อเคาะ	หักด้วยมือเปล่าได้ยากมาก	มีความคงทนหักด้วยมือเปล่าได้ยาก
1,000°C	สีน้ำตาลแดง มีเสียงกังวานเมื่อเคาะ	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน
1,200°C	สีน้ำตาลเข้ม มีเสียงกังวานเมื่อเคาะ	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน
ดินขาวจีน			
600°C	สีขาว	สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความเปราะ สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า
800°C	สีขาว	สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทนหักด้วยมือเปล่าได้ยาก
1,000°C	สีขาว	หักด้วยมือเปล่าได้ยากมาก	มีความคงทนหักด้วยมือเปล่าได้ยาก
1,200°C	สีขาว	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน
ดินขาวลำปาง			
600°C	สีขาวปนเทา	สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความเปราะ สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า
800°C	สีขาวปนเทา	สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทนหักด้วยมือเปล่าได้ยาก
1,000°C	สีขาวปนเทา	หักด้วยมือเปล่าได้ยากมาก	มีความคงทน
1,200°C	สีขาวปนเทา	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน
ดินผสมสิงห์บุรี			
600°C	สีขาวครีม	สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความเปราะ สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า
800°C	สีขาวครีม	สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทนหักด้วยมือเปล่าได้ยาก
1,000°C	สีขาวครีม	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน
1,200°C	สีขาวครีม	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน

เทคนิคการเพิ่มรูพรุนบนหินเทียม

เมื่อพิจารณาคุณสมบัติทางกายภาพเบื้องต้นของดินทั้ง 4 ชนิด (ตารางที่ 10) ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ดินผสมสิงห์บุรีในการศึกษาทดลองการเพิ่มรูพรุนให้หินเทียม เนื่องจากมีความคงทนเมื่อเผาตั้งแต่อุณหภูมิ 1,000 องศาเป็นต้นไป และหาซื้อได้ง่ายกว่าดินขาวลำปาง

ศึกษาการใช้ดินผสมสิงห์บุรีผสมกับสารอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดคือ ขุยมะพร้าว แกลบ และขี้เลื่อย อัตราส่วน 1: 0.05 โดยน้ำหนัก และเผาในอุณหภูมิ 2 ระดับ คือ 1,000 และ 1200 องศาเซลเซียส พบว่าลักษณะทางกายภาพดินผสมสิงห์บุรีเมื่อผสมสารอินทรีย์ทั้งสามชนิดและเผาที่ 2 ระดับอุณหภูมิ (ตารางที่ 11) ลักษณะดินหลังการเผาทุกชุดการทดลองไม่ละลายน้ำ และมีความแข็งไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า (รูปที่ 35) ชุดการทดลองที่ผสมแกลบจะเกิดรูพรุนมากที่สุด โดยพบว่าในชุดการทดลองใช้ขุยมะพร้าวผสมในเนื้อดิน เนื้อสัมผัสของขุยมะพร้าวมีลักษณะคล้ายฟองน้ำและมีอากาศอยู่จำนวนมาก เมื่อนำมานวดกับดิน ปริมาตรของขุยมะพร้าวยุบตัวจากแรงอัดที่เกิดจากการนวดดิน ทำให้ดินหลังการเผาเกิดรูพรุนน้อยกว่าการใช้แกลบ ส่วนการใช้ขี้เลื่อยเป็นส่วนผสม พบว่า ยังมีรูพรุนน้อยเช่นกันเนื่องจาก ขี้เลื่อยเป็นผลผลิตจากการเลื่อยไม้ มีน้ำหนักและความหนาแน่นมากกว่าสารอินทรีย์ชนิดอื่น เมื่อศึกษาและเปรียบเทียบโดยการใช้ น้ำหนักเท่ากับสารอินทรีย์ชนิดอื่น ส่วนการทดสอบความพรุนของดินที่ผสมขุยมะพร้าว แกลบ ขี้เลื่อย พบว่า มีค่าร้อยละของความพรุนเท่ากับ ร้อยละ 27.17 ± 3.35 , 32.88 ± 2.59 และ 23.58 ± 3.29 ตามลำดับ



รูปที่ 35 ลักษณะทางกายภาพ เบื้องต้น ของดินผสมสิงห์บุรีที่ผสมสารอินทรีย์ต่างชนิดกัน

ตารางที่ 11 คุณสมบัติทางกายภาพของหินเทียมที่ใช้ดินสิงห์บุรีกับสารอินทรีย์ 3 ชนิด และเผาในอุณหภูมิ 2 ระดับ

ชนิดดิน/อุณหภูมิ	ลักษณะภายนอก	ทดสอบความแข็งด้วยการหัก	การเปลี่ยนแปลงหลังจากแช่น้ำ 24 ชั่วโมง
ดินผสมสิงห์บุรี			
1,000 °C	สีขาวครีม เนื้อแน่น	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน
1,200 °C	สีขาวครีม เนื้อแน่น	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน
ดินผสมสิงห์บุรี+ขุยมะพร้าว			
1,000 °C	สีขาวครีม มีความพรุนน้อย	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน
1,200 °C	สีขาวครีม มีความพรุนน้อย	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน
ดินผสมสิงห์บุรี+แกลบ			
1,000 °C	สีขาวครีม มีความพรุนมาก	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน
1,200 °C	สีขาวครีม มีความพรุนมาก	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน
ดินผสมสิงห์บุรี+ขี้เถ้า			
1,000 °C	สีขาวครีม มีความพรุนน้อย	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน
1,200 °C	สีขาวครีม มีความพรุนน้อย	ไม่สามารถหักได้ด้วยมือเปล่า	มีความคงทน

การทดสอบการลงเกาะของสปอร์สาหร่ายบนหินเทียม

ทดสอบการลงเกาะของสปอร์สาหร่ายบนหินเทียม โดยการนำชิ้นส่วนสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Sargassum* ที่ผ่านการกระตุ้นให้ปล่อยสปอร์มาวางบนชิ้นหินเทียมในภาดหลุมซึ่งบรรจุน้ำทะเลลดเชื้อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งไม่มีหินเทียม พบว่าชิ้นสาหร่ายที่มีหินเทียมรองอยู่มีลักษณะดำ และตาย ในวันที่ 2 ของการศึกษา ในขณะที่ ชิ้นสาหร่ายที่ไม่มีหินเทียมรองรับ ยังคงมีลักษณะปกติแม้เวลาผ่านไป 7 วัน (รูปที่ 36) โดยนักวิจัยคาดว่าเกิดจาก ความเป็นกรดด่างของน้ำเปลี่ยนแปลงจากหินเทียมที่ผลิตขึ้นมา ดังนั้น จึงได้แก้ปัญหาดังกล่าวตามคำแนะนำของผู้ตรวจสอบทางวิชาการ โดยนำหินเทียมที่ผลิตได้ จำนวน 1 กิโลกรัมแช่ในน้ำประปา 20 ลิตร เปลี่ยนถ่ายน้ำทั้งหมดและวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปทุกวันจนกว่าค่าพีเอชจะคงที่ จึงจะสามารถนำมาใช้งานได้



สาหร่ายในชุดควบคุม



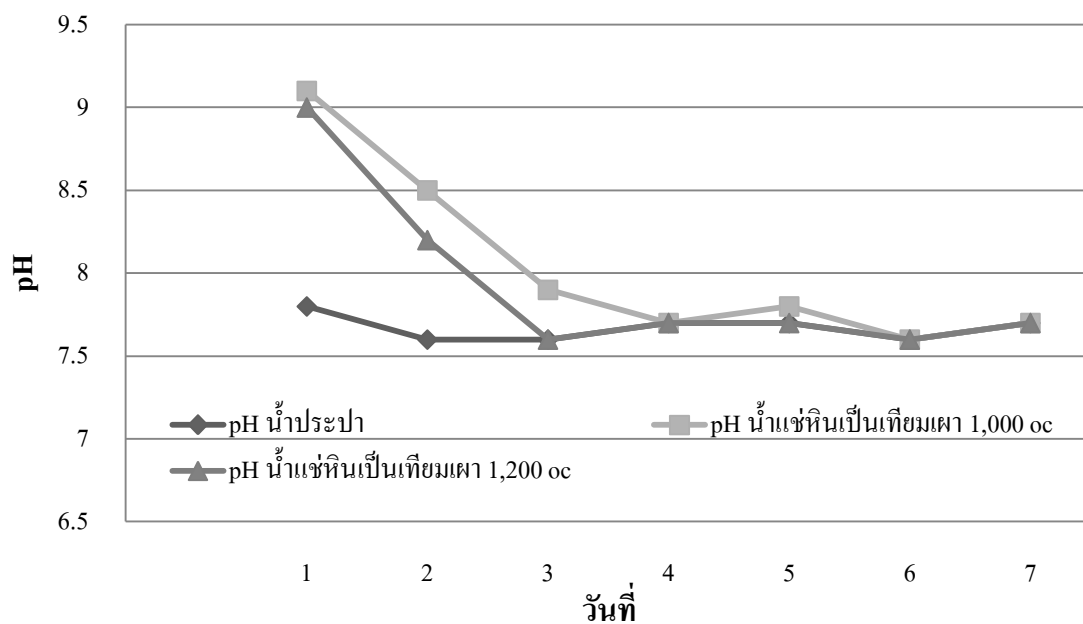
สาหร่ายในชุดที่มีหินเทียม

รูปที่ 36 ลักษณะสาหร่ายบนชุดควบคุมและชุดที่มีหินเทียมที่ได้จากการศึกษาก่อนผ่านการแช่น้ำเพื่อแก้ปัญหาค่าพีเอชที่สูงเกิน

คุณสมบัติทางเคมีของหินเทียมทดสอบด้วยการวัดค่าพีเอช เมื่อนำหินเทียมหลังจากการเผาแช่ในน้ำประปา บันทึกค่าพีเอชของน้ำประปาก่อนการทดลองและค่าพีเอชของน้ำที่แช่หินเทียมทั้ง 2 อุณหภูมิ หลังจากแช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าในวันที่ 1 มีค่าพีเอชสูงเท่ากับ 9 และมีค่าลดลงจนใกล้เคียงกับน้ำประปาปกติ ในวันที่ 4 และมีค่าคงที่อย่างต่อเนื่อง (ตารางที่ 12 และ รูปที่ 37) ดังนั้น ก่อนนำหินเทียมที่ผลิตขึ้นมาไปใช้ในการผลิตหินเป็น จะต้องนำหินเทียมไปแช่น้ำและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันในอัตรา หินเทียม 1 กิโลกรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร เป็นเวลาอย่างน้อย 4 วัน เพื่อให้สิ่งมีชีวิตที่จะลงเกาะ สามารถลงเกาะได้ภายในเวลาอันสั้น

ตารางที่ 12 ค่าพีเอชของน้ำประปา น้ำแช่หินเทียมเผา 2 อุณหภูมิ

วันที่	pH น้ำประปา	pH น้ำแช่หินเทียมเผา 1,000 °c	น้ำแช่หินเทียมเผา 1,200 °c
1	7.8	9.1	9
2	7.6	8.5	8.2
3	7.6	7.9	7.6
4	7.7	7.7	7.7
5	7.7	7.8	7.7
6	7.6	7.6	7.6
7	7.7	7.7	7.7



รูปที่ 37 กราฟแสดงค่าพีเอชของน้ำประปาและน้ำแช่หินเทียมเผาทั้งสองอุณหภูมิ

ศึกษาการบ่มขึ้นรูปหินเทียม

จากการข้างต้น คณะผู้วิจัยเลือกใช้ ดินผสมสังหรีเป็นวัตถุดิบหลักสำหรับการผลิตหินเทียม จากนั้นผสมแกลบเพื่อเพิ่มความพรุนให้กับเนื้อดินหลังการเผา บ่มขึ้นรูปให้ได้รูปทรงลักษณะคล้ายหินเทียม ในธรรมชาติ (รูปที่ 38) เผาในเตา (รูปที่ 39) ด้วยอุณหภูมิ 1,000 องศาเซลเซียส โดยใช้แท่งวัดอุณหภูมิของ เนอริตาเก้ โคน (รูปที่ 40) หินเทียมที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ มีสีขาว มีความพรุนและความแกร่งสูง จากนั้น

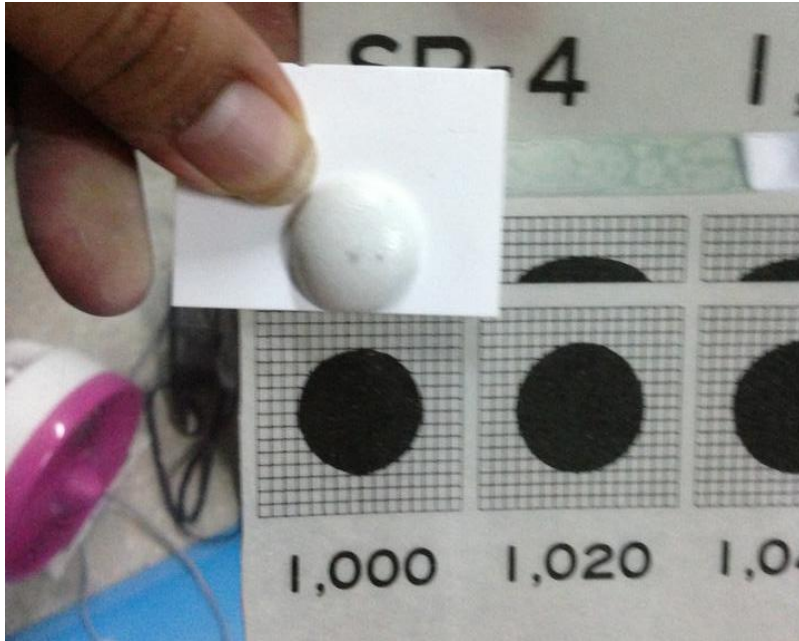
นำไปแช่น้ำประปาเป็นระยะเวลา 4 วันขึ้นไป จากนั้นสามารถนำไปใช้ในการรองรับสปอร์สาหร่ายหรือสัตว์
ได้ตามต้องการ (รูปที่ 41)



รูปที่ 38 ผสมดินกับแกลบปั้นขึ้นรูปให้มีลักษณะคล้ายหินเทียม



รูปที่ 39 เตาเผาหินเทียมจำเป็นต้องเพิ่มอากาศเพื่อให้การเผาไหม้ที่สมบูรณ์



รูปที่ 40 แท่งวัดอุณหภูมิละลายที่อุณหภูมิ 1,000 องศาเซลเซียส



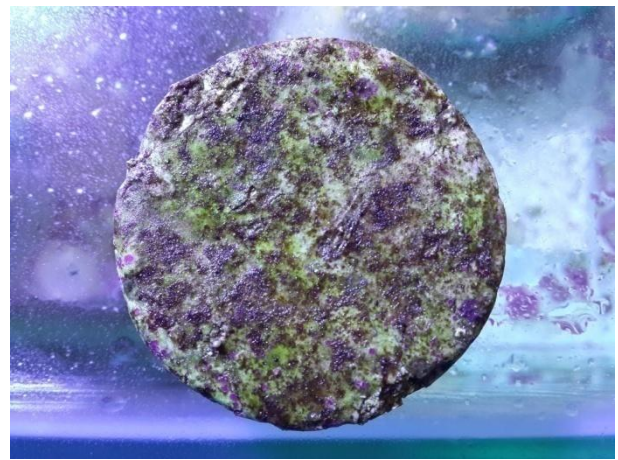
รูปที่ 41 ดินผสมเพื่อปั้นให้มีรูปคล้ายหินเทียมธรรมชาติและผ่านการเผาที่ 1,000 องศาเซลเซียส

4. การศึกษาการผลิตหินเป็น (เป็นการศึกษาเบื้องต้นซึ่งจะต่อเนื่องกับการศึกษาในปีที่ 2)

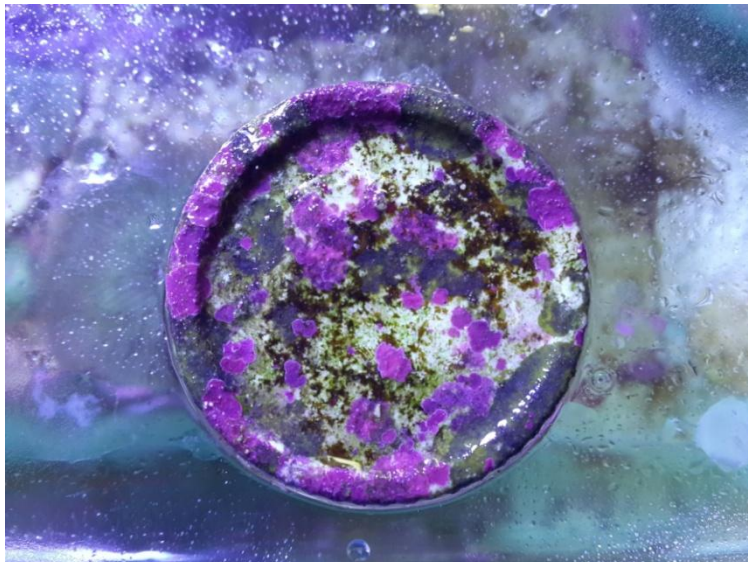
เมื่อนำหินเทียมที่ผลิตได้จากการศึกษาข้างต้นมาใช้ในการผลิตหินเป็น โดยคัดเลือกสาหร่ายสีแดง ที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบที่เก็บจากธรรมชาติและได้ตรวจสอบแล้วว่ามีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ นำมาผึ่งแห้งเป็นเวลา 45 นาที แล้วนำลงเลี้ยงในบ่อน้ำเค็มที่มีความเค็ม 28 psu นำก้อนหินเทียมวาง และตรวจสอบในเบื้องต้นด้วยตา พบว่า สาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบสามารถเจริญขึ้นบนหินเทียมได้ดี (รูปที่ 42) อย่างไรก็ตาม การเจริญของสาหร่ายสีแดงกลุ่มนี้ค่อนข้างช้า จึงศึกษาได้ในเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการดำเนินการในปีที่ 2 ต่อไป



หินเทียมเริ่มต้น



หินเป็นอายุ 1 เดือน



หินเป็นอายุ 3 เดือน

รูปที่ 42 หินเทียม และหินเป็นที่มีสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบเกาะที่อายุต่าง ๆ กัน

สรุปผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล

1. หญ้าทะเลที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อนำมาใช้ในธุรกิจตู้ปลาทะเลคือ *Enhalus acoroides* และ *Thalassia hemprichii* โดยหญ้าทะเลทั้ง 2 ชนิด มีวิธีการและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมถึงข้อเด่นข้อด้อยที่แตกต่างกัน ในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อ สารเคมีที่นำมาใช้คือ คลอโรกซ์ เนื่องจากหาซื้อได้ง่าย ราคาถูก และเนื้อเยื่อหญ้าทะเลสามารถพัฒนาเจริญต่อไปได้ ความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้มีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อ

2. *Enhalus acoroides* สามารถเพาะเลี้ยงจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อและต้นอ่อนสามารถเจริญได้ดีในสภาพเลียนแบบธรรมชาติเป็นเวลากว่า 4 เดือนได้ แต่ยังไม่สามารถพัฒนาให้เกิดการแตกยอดได้มากกว่า 1 ยอด

3. *Thalassia hemprichii* สามารถเพาะเลี้ยงจากเมล็ด ส่วนยอดและส่วนข้อของลำต้นใต้ดินได้ ต้นอ่อนจากเมล็ดไม่สามารถแตกยอดได้มากกว่า 1 ยอด ขณะที่ ส่วนต้นอ่อนที่เกิดจากยอดและข้อของลำต้นใต้ดิน สามารถพัฒนาจาก 1 ยอด เป็น 3 ยอดได้ แต่ต้นอ่อนมีขนาดเล็กเนื่องจากการเจริญเติบโตช้าในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อนำต้นอ่อนที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน มาเลี้ยงในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ พบว่าไม่สามารถเจริญได้เนื่องจากไม่สามารถทนต่อเชื้อราได้

4. *Halophila ovalis* และ *Cymodocea rotundata* คณะนักวิจัยยังไม่สามารถหาขั้นตอนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลทั้ง 2 ชนิดได้ แต่พบว่าสามารถเลี้ยงได้ในสภาพเลียนแบบธรรมชาติ โดยใช้ส่วนของลำต้นใต้ดินมาเลี้ยงซึ่งจะมีความเป็นไปได้ในการขยายพันธุ์มากกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเล

1. การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อสาหร่ายทะเลที่เหมาะสม ไม่ควรใช้สารเคมีเช่นเดียวกับการฟอกฆ่าเชื้อหญ้าทะเล เนื่องจากเนื้อเยื่อของสาหร่ายทะเลมีความบอบบาง สารที่เหมาะสมจะนำมาใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อคือ ยาปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นต่างๆ

2. สาหร่ายที่นำมาใช้ในการศึกษาการกระตุ้นการปล่อยสปอร์ด้วยการผึ่งแห้งและประสบความสำเร็จ คือ *Sargassum* และ *Neogoniolithon*

การพัฒนาวัสดุยึดเกาะสาหร่าย (หินเทียม) ที่มีความเหมาะสมต่อการใช้งานในตู้ปลาทะเล

วัสดุที่มีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการทำหินเทียมคือ ดินลึงห์บุรีผสมแกลบ ขึ้นรูปแล้วเผาที่อุณหภูมิ 1000 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทิ้งให้คลายความร้อน 24 ชั่วโมง เมื่อนำหินเทียมมาแช่ในน้ำประปา โดยมีอัตราส่วน หินเทียม 1 กิโลกรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน จึงจะนำไปใช้งานผลิตหินเป็นต่อไปได้

การศึกษาการผลิตหินเป็น

ในเบื้องต้น สามารถผลิตหินเป็นที่มีสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบ (*Neogoniolithon*) ขึ้นเคลือบได้ โดยนำสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบซึ่งมีเซลล์สืบพันธุ์จากธรรมชาติ ผึ่งแห้งเป็นเวลา 45 นาที แล้วนำลงเลี้ยงในบ่อน้ำเค็ม 28 psu นำหินเทียมที่ผลิตได้วางรองด้านล่าง เลี้ยงต่อไปประมาณ 1 เดือน จึงจะเริ่มเห็นสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบขึ้นเป็นจุดเล็กๆ บนหินเทียม ซึ่งควรจะมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้สามารถพัฒนาการผลิตหินเป็นและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้จริง

ข้อเสนอแนะ

1. เมื่อพิจารณาศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์ในธุรกิจตู้ปลาทะเล จากการศึกษาสรุปได้ว่า หญ้าทะเลที่มีศักยภาพ สามารถพัฒนาวิธีการศึกษาเพื่อนำมาใช้ในธุรกิจตู้ปลาทะเลได้ คือ หญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* และ *Thalassia hemprichii* ซึ่งควรจะมีการพัฒนาวิธีการในการขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากในห้องปฏิบัติการต่อไปอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เฉพาะการศึกษาการเพาะเลี้ยงหญ้าทะเลชนิด *Thalassia hemprichii* จะศึกษาต่อภายใต้โครงการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลเพื่อการอนุรักษ์แหล่งหญ้าทะเล ปีที่ 2 (CORE University Program NRCT-JSPS หมายเหตุ มีความล่าช้าในการสนับสนุนโครงการทำให้เว้นระยะจากปีที่ 1 เป็นเวลา 1 ปี) การศึกษาสาหร่ายที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ในตู้ปลาทะเล คือสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสามารถกระตุ้นให้ปล่อยสปอร์ได้ในห้องปฏิบัติการ และเมื่อนำหินเทียมที่ผลิตได้จากการศึกษามาวางให้สปอร์ลงเกาะ พบว่ามีการลงเกาะและเจริญได้ ซึ่งควรจะมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้อาจพัฒนาการผลิตหินเป็นและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้จริง
2. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในธุรกิจตู้ปลาทะเล รวมถึงการใช้ประโยชน์เพื่อการอนุรักษ์แหล่งหญ้าทะเล อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น การศึกษาที่ต้องอาศัยระยะเวลาในการพัฒนาเนื้อเยื่อในขั้นตอนต่างๆ ทำให้การศึกษาพัฒนาได้ไม่เร็วนัก หากมีการพัฒนาได้อย่างต่อเนื่อง จนได้ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเลสำเร็จ จะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ประโยชน์และการอนุรักษ์หญ้าทะเลในอนาคต
3. การวิจัยการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเล จะขึ้นกับชนิดของสาหร่ายทะเลที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ในธรรมชาติ ดังนั้น ในการเก็บตัวอย่าง อาจไม่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์สาหร่ายทะเลที่ต้องการ แต่อาจพบสาหร่ายทะเลชนิดอื่น ซึ่งผู้วิจัยควรสามารถปรับปรุงวิธีการวิจัยให้เหมาะสมต่อลักษณะของสาหร่ายแต่ละชนิด
4. การพัฒนาหินเทียมให้มีสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบยึดเกาะหรือมีสัตว์ต่างๆเกาะ (หินเป็น) เป็นการศึกษาที่ต้องอาศัยเวลาในการเลี้ยงเนื่องจากสาหร่ายกลุ่มนี้มีการเจริญเติบโตที่ช้ามาก โดย ก้อนสาหร่ายที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร อาจมีอายุกว่า 100 ปี ดังนั้น หากเก็บสาหร่ายดังกล่าวมาใช้เลี้ยงในตู้ปลาทะเล จะเป็นการทำลายสาหร่ายกลุ่มนี้ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถกักเก็บคาร์บอนจากน้ำทะเลให้อยู่ในรูปแคลเซียมคาร์บอเนต หากสามารถพัฒนาหรือเร่งการเลี้ยงสาหร่ายกลุ่มนี้ให้เกาะเคลือบหินเทียมซึ่งขึ้นรูปให้คล้ายกับหินเป็นธรรมชาติ หรือคล้ายกับก้อนสาหร่ายสีแดงที่มีหินปูนเป็นองค์ประกอบ จะช่วยลดการเก็บจากธรรมชาติและเพิ่มโอกาสในการนำสาหร่ายไปใช้ในธุรกิจตู้ปลาทะเลต่อไป

บรรณานุกรม

- กาญจนภรณ์ ลีวโนมนต์, ชัชรี แก้วสุรลิขิต และธิดารัตน์ น้อยรักษา. 2548. สาหร่ายทะเลและหญ้าทะเลบริเวณเกาะครามและเกาะใกล้เคียง, หน้า 97-107. ใน *ประชุมวิชาการทรัพยากรไทย : สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว*, 18-21 ตุลาคม 2548. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, นครราชสีมา.
- กาญจนภรณ์ ลีวโนมนต์, ธิดารัตน์ น้อยรักษา, ชัชรี แก้วสุรลิขิต และฉนวนา สุขสุนทร. 2546. สาหร่ายสีแดงที่เป็นรายงานครั้งแรกของประเทศไทย, หน้า 89-96. ใน *ประชุมวิชาการทรัพยากรไทย: ธรรมชาติแห่งชีวิต*, 10-12 พฤษภาคม 2546. สำนักพระราชวัง พระราชวังดุสิต, กรุงเทพฯ.
- กาญจนภรณ์ ลีวโนมนต์, สุจินต์ ดีแท้ และวิทยา ศรีมโนภาย. 2534. อนุกรมวิธานและนิเวศวิทยาของหญ้าทะเลในประเทศไทย. เสนอต่อ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 77 หน้า.
- จริยวดี สุริยพันธุ์, ชัชรี แก้วสุรลิขิต, ชนัดดา เกตุมา, ชลอ ลีมสุวรรณ, นิตี ชูเชิด, สาธิต ประเสริฐศรี, เฉลนาท ทองพิทักษ์ และประยูร หงส์รัตน์. 2551. ผลของสาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva intestinalis* Linnaeus) ต่อสัตว์หน้าดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. หน้า 210-219. ใน *การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 56 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาประมง*. 28 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์ 2551. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ชนัดดา เกตุมา, ชัชรี แก้วสุรลิขิต, จริยวดี สุริยพันธุ์, ชลอ ลีมสุวรรณ, นิตี ชูเชิด, สาธิต ประเสริฐศรี, เฉลนาท ทองพิทักษ์ และประยูร หงส์รัตน์. 2551. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva intestinalis* Linnaeus) ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. หน้า 200-209. ใน *การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 56 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาประมง*. 28 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์ 2551. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ธิดารัตน์ น้อยรักษา, กาญจนภรณ์ ลีวโนมนต์, ชัชรี แก้วสุรลิขิต และฉนวนา สุขสุนทร. 2546. สาหร่ายทะเลที่เป็นรายงานการพบครั้งแรกในอ่าวไทย, หน้า 97-105. ใน *ประชุมวิชาการทรัพยากรไทย: ธรรมชาติแห่งชีวิต*, 10-12 พฤษภาคม 2546. สำนักพระราชวัง พระราชวังดุสิต, กรุงเทพฯ.
- เลิศชาย สถิตพนาวงศ์. 2556. การพัฒนาอิฐทนไฟ 1,300 องศาเซลเซียสจากดินบางปะหัน ดินขาว ทราบและขี้เลื่อย. แหล่งที่มา http://researchconference.kps.ku.ac.th/article_8/pdf/p_eng05.pdf. 20 สิงหาคม 2556.
- สนิท ปิ่นสกุล. 2556. การพัฒนาอิฐทนไฟฉนวนจากเถ้าแกลบ. แหล่งที่มา. http://research.psru.ac.th/~rdi/journal/ebook/v13no1_8.pdf. 20 สิงหาคม 2556.
- Abbott, I. A. and J. M. Huisman. 2004. Marine Green and Brown Algae of the Hawaiian Islands. Bishop Museum Press, Hawaii. 259 p.

- Andersen, R. A. and M. Kawachi. 2005. Traditional Microalgae Isolation Techniques. pp. 83-100 *In* R. A. Andersen. Algal Culturing Techniques. Elsevier, California.
- Arnaldos, T. L., R. Munoz, M. A. Ferrer and A. A. Calderon, 2001. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiol. Plantarum* 113: 315-322.
- Bird, K. T., J. R. Johnson and J. Jewett-Smith. 1998. In vitro culture of the seagrass *Halophila decipiens*. *Aquat. Bot.* 60: 377-387.
- Chamandoosti, F. 2010. The Relationship Between Plant Growth Regulators for Organogenesis and Phenolic Compound in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Asian Journal of Developmental Biology* 2: 16-22.
- den Hartog, C. 1970. The Sea-grasses of the World. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. 275 p.
- Durako M. J. and M. D. Moffler. 1987. Nutritional studies of the submerged marine angiosperm *Thalassia testudinum* I. Growth responses of axenic seedling to nutrient enrichment. *Am. J. Bot.* 74: 234-240.
- Egarod, L. 1974. Report on the marine algae collected on the Fifth Thai-Danish Expedition of 1966. *Botanica Marina* 17: 130-157.
- Egerod, L. 1975. Marine algae of the Andaman Sea Coast of Thailand: Chlorophyceae. *Botanica Marina* 18: 41-66.
- Gallegos, M. E., N. Marba and C. M. Duarte. 1992. Flowering of *Thalassia testudinum* Banks ex Konig in the Mexian Caribbean: age-dependence and interannual variability. *Aquat. Bot.* 43: 249-255.
- Heminga, M. A. and C. M. Duarte. 2000. Seagrass Ecology. Cambridge University Press, Cambridge. 297 p.
- Jewett-Smith, J. and C. McMillan. 1990. Germination and seedling development of *Halophila engelmannii* Aschers. (Hydrocharitaceae) under axenic conditions. *Aquat. Bot.* 36: 167-177.
- Kaewsuralikhit, C. 2011. Seagrasses in Thailand. pp. 38-47. *In* H. Ogawa, B. Japar Sidik and Z. Muta Harah (eds.). Seagrasses: Resource Status and Trends in Indonesia, Japan, Malaysia, Thailand and Vietnam. JSPS-AORI, Tokyo.
- Koch, E. W. and M. J. Durako. 1991. In vitro studies of the submerged angiosperm *Ruppia maritima*: auxin and cytokinin effects on plant growth and development. *Marine Biology* 110: 1-6.

- Kuo, J. and A. J. Mc Comb. 1989. Seagrass Taxonomy, Structure and Development. pp. 6-73. *In* A. W. D. Larkum, A. J. Mc Comb and S. A. Shepherd (eds). *Biology of Seagrasses: A Treatise on the Biology of Seagrasses with Speial Reference to the Australian Region*. Elsevier, Amsterdam.
- Lewmanomont. K. and H. Ogawa. 1995. *Common Seaweeds and Seagrasses of Thailand*. Bangkok: Integrated Promotion Technology. 163 p.
- Lewmanomont, K., L. Wongrat and C. Supanwanid. 1995. *Algae in Thailand*. Office of Environmental Policy and Planning, Bangkok.
- Littler. D. S. and M. M. Littler. 2000. *Caribbean Reef Plants*. Offshore Graphic, Washington, D.C. 542 p.
- Loques F., G. Caye and A. Meinesz. 1990. Axenic culture of selected tissue of *Posidonia oceanica*. *Aquat. Bot.* 37: 171-188.
- Lux-Endrich, A., D. Treutter and W. Feucht, 2000. Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 60: 15-21.
- Martens, G. von. 1866. Die Tange. *In Die Preussische Expedition nach Ost-Asien*. Bot. Theil. K. Geheime, Berlin.
- Munoz, J. T. 1995. Effects of some plant growth regulators on the growth of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Aquat. Bot.* 51: 311-318.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and Bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nakaoka, M. and C. Supanwanid. 2000. Quantitative estimation of the distribution and biomass of seagrasses at Haad Chao Mai National Park, Trang Province, Thailand. *Kasetsart Fishery Research Bulletin* 22: 10-22.
- Ozyigit, I. I., M. V. Kahraman and O. Ercan, 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Afr. J. Biotechnol.* 6: 3-8.
- Polne-Fuller, M. and A. Gibor. 1987. Tissue Culture of Seaweeds. pp. 219-240. *In* K. T. Bird and P. H. Benson (eds). *Seaweed Cultivation for Renewable Resources*. Elsvier, Amsterdam.
- Provasoli, L. 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. pp. 63-75. *In* A. Watanabe and A. Hattori (eds). *Cultures and Collection of Algae*. Proceedings of the US-Japan Conference, Japan Society of Plant Physiology, Hakone. September 1966.

- Schmidt, J. 1900-1916. *Flora of Koh Chang*. Contributions to the knowledge of the vegetation in the Gulf of Siam. Copenhagen.
- Short, F. T. and C. M. Duarte. 2001. Methods for the Measurement of Seagrass Growth and Production. pp. 155-182. In F. T. Short, R. G. Coles and C. A. Short (eds). *Global Seagrass Research Methods*. Elsevier, London.
- Trono, G. C., Jr. 1997. *Field Guide and Atlas of the Seaweed Resources of the Philippines*. Bookmark, Makati City. 306 p.
- Volpert, R., W. Osswald and E. F. Elstner, 1995. Effects of cinnamic acid derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase. *Phytochemistry* 38: 19-22.
- Wilson, J. G. and I. J. Bennett. 2008. Nutrient requirements of in vitro cultured *Halophila ovalis* and *Posidonia coriacea*: nitrogen source. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 92: 155-163.
- Womersley, H. B. S. 1994. *The Marine Benthic Flora of Southern Australia: Rhodophyta Part III A*. Australian Biological Resource Study, Canberra. 508 p.
- Womersley, H. B. S. 1996. *The Marine Benthic Flora of Southern Australia: Rhodophyta Part III B*. Australian Biological Resource Study, Canberra. 392 p.
- Womersley, H. B. S. 1998. *The Marine Benthic Flora of Southern Australia: Rhodophyta Part III C*. State Herbarium of South Australia, Richmond. 535 p.
- Womersley, H. B. S. 2003. *The Marine Benthic Flora of Southern Australia: Rhodophyta Part III D*. Australian Biological Resource Study and State Herbarium of South Australia, Canberra. 392 p.
- Xia, E. Y., D. C. Liue, C. Jia, X. L. Chen and B. Yang. 2013. Artificial seed production and cultivation of the edible brown alga *Sargassum naozhouense* Tsend et Lu. *J. Appl. Phycol.* 25: 513-522.