

## Some aspects in early life stage of sand goby, *Oxyeleotris marmoratus* Larvae

Thumronk Amornsakun<sup>1</sup>, Wasan Sriwatana<sup>2</sup> and  
Uraiwan Chamnanwech<sup>2</sup>

### Abstract

Amornsakun, T., Sriwatana, W. and Chamnanwech, U.

Some aspects in early life stage of sand goby, *Oxyeleotris marmoratus* Larvae

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 611-619

Larval sand goby were produced by controlled natural spawning. Fertilized eggs were incubated in an aquarium tank for hatching. Sampling of the newly-hatched larvae was done at 2-hour intervals, when 20 of them were randomly taken and preserved in 10% buffered formalin solution for later analysis to determine the time of final yolk absorption. Observation using a microscope revealed that newly hatched larvae were  $2.39 \pm 0.12$  mm in total length and had yolk sacs of  $55.32 \pm 14.85 \mu\text{m}^3$  volume. The yolk sacs were completely absorbed within 82 hr after hatching at a water temperature of  $27.0\text{--}30.5^\circ\text{C}$ .

Up until full mouth development (start of feeding), 2-hourly samplings of twenty newly hatched larvae were taken from the aquarium hatching tank for observation of the size of mouth opening. All the larvae had open mouths about 36 hr after hatching ( $2.86 \pm 0.97$  mm TL), with the mouths measuring  $332.29 \pm 17.76 \mu\text{m}$  in mouth height.

The start-of-feeding experiments were carried out using a 15-liter aquarium (water volume 10 liters) containing 1000 larvae aged 1.5 days post-hatching (just before the mouth opened). They were fed with

---

<sup>1</sup>Ph.D. (Aquaculture), Asst. Prof., Fisheries Technology Program, Department of Technology and Industries, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani Campus, Muang, Pattani 94000

<sup>2</sup>B.Sc. (Fisheries), Pattani Inland Fisheries Development Center, Yarang, Pattani 94160 Thailand.

Corresponding e-mail : thumronk@bunga.pn.psu.ac.th

Received, 2 January 2002

Accepted, 30 April 2002

rotifer at a density of 5-10 ind/ml. Twenty larvae were collected at random from the aquarium at 2-hourly intervals, preserved in 10% buffered formalin solution, and then dissected to determine the presence of rotifer in the digestive tract. Digestive tracts fixed 80 hr after hatching at water temperatures of 27.0-30.5 °C., had mouth height of  $549.69 \pm 47.94 \mu\text{m}$ . The average number of rotifer in the digestive tract at the start of feeding was 0.57 individual/larva.

A starvation experiment was carried out using a 15-liter aquarium (water volume 10 liters) with three replications. Two hundred newly hatched larvae of sand goby were kept without feeding. Larvae started to die at 84 hr and totally died within 130 hr after hatching at water temperature ranging from 27.0 to 30.5 °C.

**Key words :** yolk absorption, mouth development, start of feeding, starvation, sand goby, *Oxyeleotris marmoratus*

### บทคัดย่อ

อัมรรค์ ออมรสกุล<sup>1</sup> วสันต์ ศรีวัฒนะ<sup>2</sup> และ อุไรวรรณ ชำนาญเวช<sup>2</sup>

ลักษณะบางประการในระยะวัยอ่อนของลูกปลาทุพราย

ว. สงขลานครินทร์ วท. 2545 24(4) : 611-619

ลูกปลาทุพรายผลิตโดยทำการเพาะขยายพันธุ์ปลาโดยวิธีการเลียนแบบธรรมชาติโดยใช้บ่อดิน ไข่ที่ได้รับการผสมพันธุ์นำมาฟักในตู้กระจก สุ่มลูกปลาที่ฟักออกมาใหม่ จำนวน 20 ตัว ทุก ๆ 2 ชั่วโมง เก็บคองในบัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน 10% เพื่อใช้ทำการศึกษารูปร่างตัวของไข่แดง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลูกปลาที่ฟักออกมาใหม่มีความยาวเฉลี่ย  $2.39 \pm 0.12$  มม. ปริมาตรของไข่แดงเฉลี่ย  $55.32 \pm 14.85$  ลบ.ไมโครเมตร ไข่แดงยุบตัวอย่างสมบูรณ์ประมาณ 82 ชั่วโมง หลังจากฟักออกเป็นตัว ที่อุณหภูมิของน้ำ 27.0-30.5 °C

การพัฒนาของปาก สุ่มลูกปลาจำนวน 20 ตัวจากตู้กระจกที่ใช้สำหรับฟักไข่ ทุก ๆ 2 ชั่วโมง เพื่อทำการศึกษาลักษณะของปาก พบว่าที่ 36 ชั่วโมงหลังจากฟักออกเป็นตัว ( $2.86 \pm 0.97$  mm TL) ปากของลูกปลาเริ่มเปิด วัดความสูงของปากได้  $332.29 \pm 17.76$  ไมครอน

ศึกษาการเริ่มกินอาหารของลูกปลาทุพรายโดยใช้ตู้ปลาขนาดปริมาตร 15 ลิตร (ปริมาตรน้ำ 10 ลิตร) ใส่ลูกปลาอายุ 1.5 วันหลังจากฟักออกเป็นตัว (ระยะก่อนที่ปากจะเปิด) จำนวนตู้ละ 1000 ตัว โดยให้ลูกปลากินโรติเฟอร์เป็นอาหาร ในอัตราความหนาแน่น 5-10 ตัว/มล. สุ่มลูกปลาจำนวน 20 ตัว จากตู้ปลาที่ใช้ทำการศึกษา ทุก ๆ 2 ชั่วโมง เก็บคองใน บัฟเฟอร์ฟอร์มาลีน 10% พบว่าที่ 80 ชั่วโมงหลังจากฟักออกเป็นตัว ที่อุณหภูมิ 27.0-30.5 °C ความสูงของปากเฉลี่ย  $549.69 \pm 47.94$  ไมครอน ในระบบทางเดินอาหารปรากฏโรติเฟอร์เฉลี่ย 0.57 ตัว/ลูกปลา ซึ่งหมายความว่าความสูงของปากและการเริ่มกินอาหารของลูกปลา

ศึกษาการอดอาหารจนตายในลูกปลาทุพรายโดยใช้ตู้ปลาขนาดปริมาตร 15 ลิตร (ปริมาตรน้ำ 10 ลิตร) จำนวน 3 ตู้ ใส่ลูกปลาที่ฟักใหม่ จำนวนตู้ละ 200 ตัว เลี้ยงโดยไม่ให้อาหาร พบว่าลูกปลาทุพรายเริ่มตายที่ 84 ชั่วโมงหลังจากฟักออกเป็นตัว และตายหมดที่ 130 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 27.0-30.5 °C

<sup>1</sup> แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมง ภาควิชาเทคโนโลยีและการอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี 94000 <sup>2</sup> ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดปัตตานี อำเภอยะรัง จังหวัดปัตตานี 94160

Information on the early life history of fish such as yolk absorption, mouth and digestive tract development and starvation of the larvae is

needed for optimization of large-scale culture and ultimately for the management of the fish stocks. It is recognized that the critical period of

larval rearing begins at the time yolk absorption is completed. If some larvae do not begin to eat during that period, then they become weak and eventually die (Kosutaruk and Watanabe, 1984; Holm, 1986; Eda *et al.*, 1994 and Amornsakun and Hassan, 1996). Survival of fish larvae is determined by the interplay of various environmental factors, such as temperature, food supply with a suite of species-specific characteristics, egg and larval size, yolk and oil quantity and resorption rates, and time of onset of feeding and feeding behaviour (Blaxter, 1974 and May, 1974). Larvae can use a varying part of their yolk sac energy content for various activities.

Mouth size development is very important in the first feeding of larvae to match appropriate prey size. Mouth size at first feeding stage of various larval fish to encounter their prey size has been well documented for a number of cultured fish (Shirota, 1970; Nash *et al.*, 1974; Fukuhara, 1986; Doi and Singhagraiwan, 1993 and Eda *et al.*, 1994).

To date, no research on sand goby regarding the yolk absorption, mouth development in relation to feeding on rotifer and starvation has been undertaken.

The purpose of this study was to investigate the period of yolk absorption, the onset of first feeding, mouth development and starvation in larval sand goby. These may provide baseline information useful for optimization of large scale culture and ultimately for the culture management of this fish in future.

### Materials and Methods

Larvae of sand goby were produced by controlled natural spawning. The sexually mature fish were cultured in earthen ponds with stocking density of 2 fishes/m<sup>2</sup> and fed with fresh fish at 1% of body weight every second day. Concrete plates as fish nesting were prepared for spawning activities and egg observation at the plates was made once a day at 0800 hr. Fertilized eggs were transferred to an aquarium hatching tank. The water depth level in the spawning pond was 1.5

meter and 10% water replacement was carried out daily.

### Yolk absorption experiment

The time of yolk absorption and the size of yolk-sacs were determined using a profile projector. Twenty newly-hatched larvae were taken at random at 2 hourly intervals from the rearing aquarium until the yolk sacs were fully absorbed. Yolk volumes were calculated using the formula  $\frac{4}{3} \times \pi (R1/2)^2 \times R2/2$  (R1, minor axis; R2, major axis) (Fukuhara, 1986). The specimens were fixed in 10% buffered formalin solution.

### Mouth development experiment

Up until full mouth development (start of feeding), samples of twenty newly hatched larvae were taken every 2 hours from the rearing aquarium for observation of the size of mouth opening, and measurement of upper jaw length was done using a profile projector. The mouth height was calculated by multiplying the upper jaw length by  $\sqrt{2}$  (Shirota, 1970). Specimens were fixed in 10% buffered formalin solution.

### Start-of-feeding experiment

The experiment was carried out using 15-liter aquaria (water volume 10 liters) containing 1000 larvae aged 1.5 days post hatching (just before the mouth opened). They were fed with rotifer (100  $\mu$ m, width) at a density of 5-10 individual/ml. Twenty larvae were collected at random from the aquarium at 2-hourly intervals, and preserved in 10% buffered formalin solution. They were then dissected to determine the presence of rotifer in the digestive tract which would signal the time of the start of feeding (Pechmanee *et al.*, 1986). The procedure was carried out with three replications.

### Starvation experiment

A starvation experiment was carried out using a 15-liter aquarium (water volume 10 liters). Two hundred newly hatched larvae were kept without feeding and mortalities of starved larvae

were recorded at 2 hourly intervals until all had died (Fukuhara, 1987). The procedure was carried out in triplicate.

### Results

Newly hatched larvae were  $2.39 \pm 0.12$  mm in total length (mean  $\pm$  SD,  $n = 20$ ), and had yolk sacs of  $55.32 \pm 14.85 \mu\text{m}^3$  volume (mean  $\pm$  SD,  $n = 20$ ) (Figure 1 and Figure 2). The yolk sacs were completely absorbed within 82 hr (3.4

days) after hatching at water temperatures of  $27.0\text{--}30.5^\circ\text{C}$ . Observation of 20 larvae showed that after 36 hr the yolk size was about 54.68 % of initial size.

All larval mouths were open 36 hr after hatching but were not yet functioned ( $2.86 \pm 0.97$  mm TL), and measured  $332.29 \pm 17.76 \mu\text{m}$  in mouth height. At 80 hr after hatching, the fish started feeding on the rotifer at which time the yolk sac remained at 6.16 % of its initial volume. Some digestive tracts developed fully within

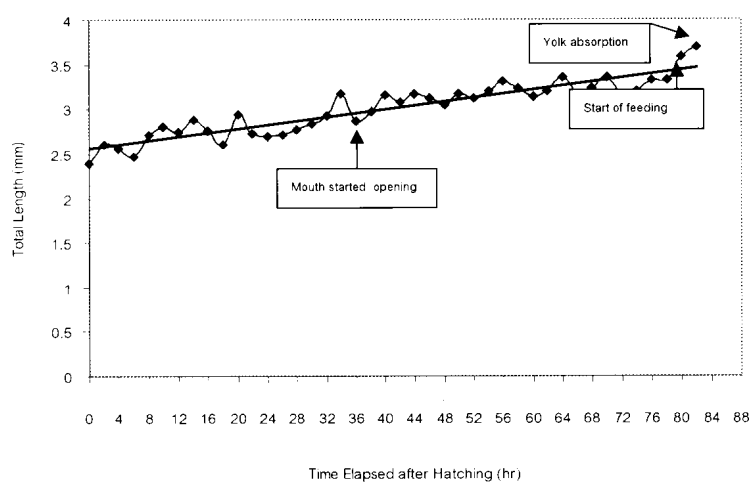


Figure 1. Increase in length of sand goby larvae at elapsed time after hatching

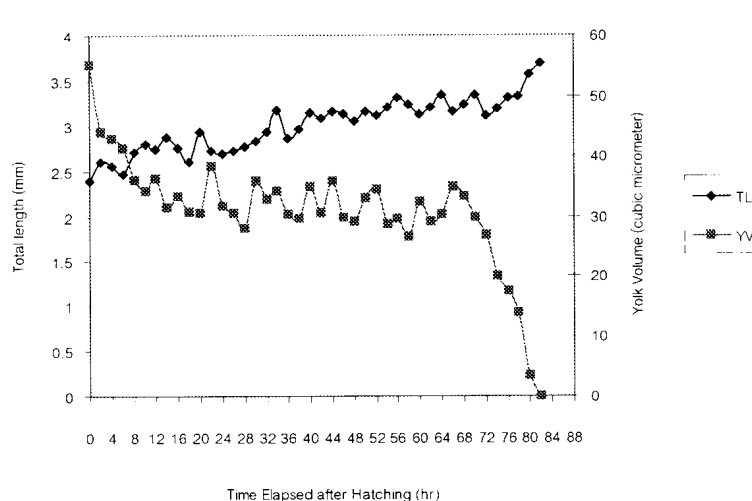


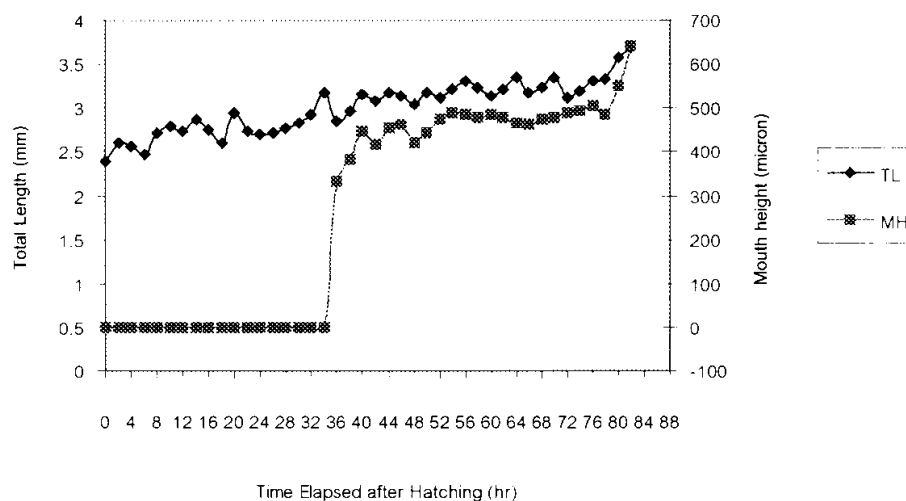
Figure 2. Total length (TL) and yolk absorption of larval sand goby at elapsed time after hatching. YV: Yolk volume



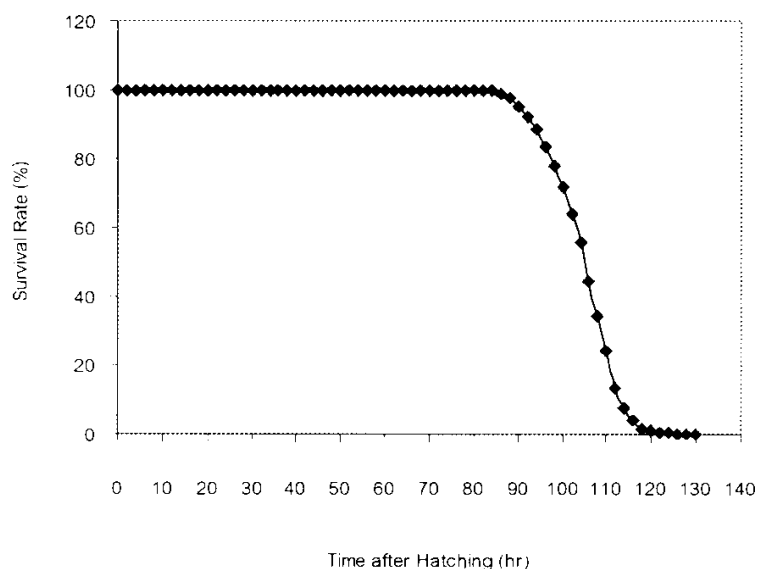
80 hr after hatching at water temperatures of 27.0-30.5 °C, measured  $549.69 \pm 47.94 \mu\text{m}$  in mouth height (Figure 3), and contained numbers of rotifer, indicating that feeding had commenced. Numbers of rotifer in the digestive tract per larva in replicates 1, 2 and 3 were 0.6 individual, 0.6 individual and 0.5 individual, respectively. Thus the average number of rotifer in the diges-

tive tract at the start of feeding was 0.57 individual/larva.

Without feeding, the larval sand goby started to die in all experiments at 84 hr and totally died within 130 hr (5.4 days) after hatching (Figure 4). Water temperature ranged from 27.0 to 30.5 °C.



**Figure 3. Total length (TL) and development of mouth opening of larval sand goby at elapsed time after hatching. MH: Mouth height**



**Figure 4. Survival rate of larval sand goby after hatching without feeding at 27.0-30.5 °C**

### Discussion

The yolk absorption period for newly-hatched larval sand goby (3.4 days after hatching) was found to be similar to that of a number of fish, both marine and freshwater types. Amornsakun *et al.* (1997) reported the yolk absorption of larval green catfish, *Mystus nemurus*, as being complete at 3 days after hatching at water temperatures of 25-30 °C. Houde *et al.* (1976) reported the yolk absorption of larval white mullet, *Mugil curema* Valenciennes, as being complete at 3.5 days after hatching at water temperatures of 26-27 °C. The yolk of larval milkfish, *Chanos chanos*, was completely absorbed in about 2.5 day-old larvae at water temperatures of 26.4-29.9 °C. (Chaudhuri *et al.*, 1978). The yolk absorption of larval freshwater catfish, *Clarias* sp., was completed 3-4 days after hatching (Tarnchalanukit *et al.*, 1982).

The larvae of rabbitfish, *Siganus guttatus*, have rapid development of the eye, mouth and alimentary tract during the yolk-sac stage which makes it possible for the larvae to feed before the yolk is completely absorbed (Bagarinao, 1986). Morphological investigations of the jaw and the digestive tract showed that larval cod, *Gadus morhua*, is able to absorb ingested food well before exhaustion of the yolk sac (Kjorsvik, *et al.*, 1991). In this study, through microscopic observation, it was found that after 36 hr about 54.68% of yolk remained and the mouths of all larval sand goby had already opened but were not yet functioning. The yolk sac remaining at the time first feeding of sand goby larvae was less than that in green catfish and red-tail catfish. The result of the present study reveals that sand goby larvae start to feed supplied rotifer at 80 hr after hatching (549.69±47.94 µm, mouth height) when their yolk sacs remain at 6.16% of its initial volume. Comparatively, Amornsakun *et al.* (1997) reported that the green catfish started feeding on *Moina* at 52 hr after hatching when the yolk sac remained at 31.20 % of its initial volume. The red-tail catfish started feeding on *Moina* at 64 hr after hatching at which time the yolk sac re-

mained at 13.03 % of its initial volume (Amornsakun, 1999). The larval grey mullet, *Mugil cephalus*, growth curve consisted of an increase on the first day, which coincided with rapid yolk absorption (Kuo *et al.*, 1973). Reduction of growth and poor swimming activity of unfed fish larvae after complete yolk absorption, led to a critical point for larval survival in association with yolk absorption in the larval life of the black sea bream (Fukuhara, 1987). The length of time from hatching to first feeding depends upon the nutrients stored in the yolk sac (Hodson and Blunt, 1986 and Ware, 1975) and environmental factors (Houde, 1974). Ishibashi (1974) reported the first feeding of the larval *Tilapia sparmanii* started later as the water temperature decreased, i.e. they took food on day 2 at 30 °C, on day 3 at 27 °C and on day 6 at 24 °C.

The size of the first live food, rotifer (100 µm width), was 18.7 % of mouth height (549 µm height) of the larval sand goby in this study (3.58±0.61 mm TL). It is close to the range 20-40 % of the mouth size in various fishes as reported by Ito and Suzuki (1977), Hunter (1980), Amornsakun *et al.* (1997) and Amornsakun (1999). Larval sand goby is considered as a fish species difficult to rear in early life stages since certain food organisms with appropriate size suitable to larval mouth (18.7 % of mouth height).

The start of feeding, with a mouth height (549 µm) of larval sand goby is similar to green catfish and red-tail catfish but the time of first feeding is later than in those fish. Green catfish and red-tail catfish started to feed on *Moina* when the mouth heights were 553 µm at 52 hr after hatching and 534 µm at 64 hr after hatching, respectively (Amornsakun *et al.*, 1997 and Amornsakun, 1999). On the contrary, the mouth height at first feeding of larval sand goby is greater than that of rabbitfish and grouper. Juario *et al.* (1985) reported that the mouth of the larval rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch), was about 125 µm wide when feeding started 2 days after hatching on rotifers. Maneewong *et al.* (1986) reported the mouth size of the larval grouper,

*Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider), was  $169.7 \pm 16.1 \mu\text{m}$  when it was first able to consume rotifers with size of 91-100  $\mu\text{m}$  width. Mouth size appears to be the limiting factor in juvenile fish feeding on both natural and pellet diets (Hyatt, 1979). Nash *et al.* (1974) reported the mouths of larval mullet, *Mugil cephalus*, open when the jaws are becoming ossified and eye pigment is sufficiently developed. Larvae with small mouths grew more slowly than those with larger ones (Shirota, 1970 and Arumugum and Geddes, 1987). The mouth height of the larval sand goby was linearly related to total length. The same relationship between mouth height and total length was also found in larval perch, *Perca fluviatilis* (Guma, 1978).

Rotifer could be a good live food for larval sand goby because of its suitable size and ease of culture. The number of rotifer in the digestive tract at the start of feeding was 0.57 ind/larva. This is less than reported in milkfish. Eda *et al.* (1990) reported that the gut of milkfish, *Chanos chanos*, larvae (3.57-3.81 mm, TL) was first found to contain rotifers 80 hr after hatch. The number of rotifers in the milkfish gut ranged from 1-4 individual/larva.

Without feeding, the larval sand goby become debilitated and eventually started to die off in all experiments at 84 hr after hatching. A catastrophic mortality by 50 % was observed at 106 hr after hatching and all died off within 130 hr after hatch at water temperatures of 27.0-30.5 °C. Larvae can tolerate feeding delay up to a certain point depending on the amount of yolk, temperature and other species-specific characteristics (May, 1974; Hunter, 1980 and Holm, 1986). Mortality of unfed sand goby larvae is similar to that of other starved fishes about 5 to 7 days after hatching, depending on the species. For example, in the northern anchovy, *Engraulis mordax*, mortality was observed on the sixth day after hatching (Lasker *et al.*, 1970), in the grey mullet, *Mugil cephalus*, on the seventh day after hatching (Kuo *et al.*, 1973), in the milk fish, *Chanos chanos*, on the sixth day after hatching

(Chaudhuri *et al.*, 1978), in the larval dragonets, *Repomucenus* sp., on the fifth to seventh day after hatching (Eda *et al.*, 1993) and in the seabass, *Lates calcarifer*, mortality was observed on the fifth day after hatching (Hassan and Amornsakun, 1996). Larval sand goby is able to slightly maintain its survival through starvation (5.4 days after hatching), shorter than red-tail catfish (8 days after hatching), possibly owing to its large yolk sac ( $1443.17 \mu\text{m}^3$ ) (Amornsakun, 1999 and Amornsakun, 2000). Ishibashi (1974) observed that the yolk sac of unfed *Tilapia sparmanii* larvae was absorbed faster than that of fed larvae. Larvae of sand goby are like other larvae in that after yolk is completely absorbed their mortality becomes pronounced, particularly 2 days after absorption. Lasker *et al.* (1970) experimented on delayed feeding period of *Engraulis mordax* and found in a catastrophic mortality after 2.5 days of complete absorption. The unfed larvae grow slowly, swim weakly, eventually falling to the bottom of the tank and dying.

### Acknowledgments

I am grateful to the National Research Council of Thailand (TEC 44035) for financial support of the field work. I also thank Mr. Charan Wanna and Mr. Leetawat Tresink for assistance in research.

### References

- Amornsakun, T. 1999. Some aspects in early life stages of larval red-tail catfish, *Mystus wyckioides*. Songklanakarin J. Sci. Technol., 21(4): 401-406.
- Amornsakun, T. 2000. Influences of initial delay of feeding on growth and survival of larval red-tail catfish, *Mystus wyckioides* Songklanakarin J. Sci. Technol., 22(1): 51-55.
- Amornsakun, T. and Hassan, A. 1996. Aspect in early life stage of larval red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsk.) Songklanakarin J. Sci. Technol., 18(1): 9-15.
- Amornsakun, T., Chiayvareesajja, S., Hassan, A., Ambak, A. and Jee, A. K. 1997. Yolk absorption

- and start of feeding of larval green catfish, *Mystus nemurus* (Cuv. & Val.). Songklanakarin J. Sci. Technol., 19(1): 117-122.
- Arumugum, P.T. and Geddes, M.C. 1987. Feeding and growth of golden perch larvae and fry, *Macquaria ambigua* Richardson. Trans. R. Soc. S. Aust., 111(1): 59-65.
- Bagarinao, T. 1986. Yolk resorption, onset of feeding and survival potential of larvae of three tropical marine fish species reared in the hatchery. Mar. Biol., 91: 449-459.
- Blaxter, J.H.S(ed). 1974. The Early Life History of Fish. New York: Springer-Verlag. 765 pp.
- Chaudhuri, H., Juario, J.V., Primavera, J.H., Samson, R. and Mateo, R. 1978. Observations on artificial fertilization of eggs and the embryonic and larval development of milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.). Aquaculture, 13: 95-113.
- Doi, M. and Singhagraiwan, T. 1993. Biology and culture of the red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. Thailand: The research project of fisheries resource development in the Kingdom of Thailand, Department of Fisheries. 51 pp.
- Eda, H., Fujiwara, T. and Takita, T. 1994. Embryonic, larval and juvenile development in laboratory-reared dragonets, *Repomucenus beniteguri*. Japan J. Ichthyol., 40(4): 465-473.
- Eda, H., Darwisito, S., Fujiwara, T. and Takita, T. 1993. Rearing of larval and juvenile dragonets, *Repomucenus* spp. Suisanzoshoku, 41(4): 553-558.
- Eda, H., Murashige, R., Eastham, B., Wallace, L., Bass, P., Tamaru, C.S. and Lee, C.S. 1990. Survival and growth of milkfish, *Chanos chanos* larvae in the hatchery. I. feeding. Aquaculture, 89: 233-244.
- Fukuhara, O. 1986. Morphological and functional development of Japanese flounder in early life stage. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52(1): 81-91.
- Fukuhara, O. 1987. Larval development and behavior in early life stages of black sea bream reared in the laboratory. Nippon Suisan Gakkaishi, 53(3): 371-379.
- Guma, S.A. 1978. The food and feeding habits of young perch, *Perca fluviatilis*, in Windermere. Freshwater Biol., 8: 177-187.
- Hassan, A. and Amornsakun, T. 1996. The influences of initial delay of feeding on survival and growth of the seabass, *Lates calcarifer*. In the 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society (January 29 - February 2, 1996), Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, p. 17.
- Hodson, P.V. and Blunt, B.R. 1986. The effect of time from hatch on the yolk conversion efficiency of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Fish. Biol., 29: 37-46.
- Holm, J.C. 1986. Yolk sac absorption and early food selection in Atlantic salmon feeding on live prey. Aquaculture, 54: 173-183.
- Houde, E.D. 1974. Effects of temperature and delayed feeding on growth and survival of larvae of three species of subtropical marine fishes. Mar. Biol., 26: 271-285.
- Houde, E.D., Berkeley, S.A., Klinovsky, J.J. and Schekter, R.C. 1976. Culture of larvae the white mullet, *Mugil curema* Valenciennes. Aquaculture, 8: 365-370.
- Hunter, J.R. 1980. The feeding and ecology of marine fish larvae. In Bardach, J.E., Magnuson, J.J., May, R.C. and Reinhart, J.M. (Editors) Fish Behaviour and Its Use in Capture and Culture of Fishes. ICLARM Conf. Proc., Manila, Philippine, pp. 287-330.
- Hyatt, K.D. 1979. Feeding strategy. In Hoar, W.S., Randall, D.J. and Brett, J.R. (eds) Fish Physiology, Vol. VIII. London: Academic Press. pp. 71-119.
- Ishibashi, N. 1974. Feeding, starvation and weight changes of early fish larvae. In Blaxter, J.H.S. (ed) The Early Life History of Fish. New York: Springer-Verlag, pp. 339-344.
- Ito, T. and Suzuki, R. 1977. Feeding habits of a cyprinid loach in the early stages. Bull. Freshwater Res. Lab., 27:85-94.
- Juario, J.V., Duray, M.N., Nacario, J.F. and Almen- dras, J.M.E. 1985. Breeding and larvae rearing of the rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). Aquaculture, 44: 91-101.
- Kjorsvik, E., Meerent, T., Kryvi, H., Arnfinnson, J. and Kvenseth, P.G. 1991. Early development of the digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. J. Fish. Biol., 38: 1-15.
- Kosutaruk, P. and Watanabe, T. 1984. Growth and survival of newly hatched larvae of seabass, *Lates calcarifer* in starved condition. Report of Thailand and Japan Join Coastal Aquaculture Research Project (April 1981-March 1984) No.1, September 1984. Thailand: National Institute of Coastal Aquaculture, pp. 81-82.

- Kuo, C.M., Shehadeh, Z.H. and Milisen, K.K. 1973. A preliminary report on the development, growth and survival of laboratory reared larvae of the grey mullet, *Mugil cephalus* L. J. Fish. Biol., 5: 459-470.
- Lasker, R., Feder, H.M., Theilacker, C.H. and May, R.C. 1970. Feeding, growth and survival of *Engraulis mordax* larvae reared in the laboratory. Mar. Biol., 5: 345-353.
- Maneewong, S., Akkayanont, P., Pongmaneerat, J. and Iizawa, M. 1986. Larval rearing and development of grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). Report of Thailand and Japan Join Coastal Aquaculture Research Project (April 1984-January 1986) No.2, April 1986. Thailand: National Institute of Coastal Aquaculture, pp. 39-52.
- May, R.C. 1974. Larval mortality in marine fishes and the critical period concept. In Blaxter, J.H. S. (ed.) The Early Life History of Fish. New York: Springer-Verlag, pp. 3-19.
- Nash, C.E., Kuo, C.M. and McConnel, S.C. 1974. Operational procedures for rearing larvae of the grey mullet, *Mugil cephalus* Linnaeus. Aquaculture, 3: 15-24.
- Pechmanee, T., Pongmaneerat, J. and Iizawa, M. 1986. Effect of food density on food consumption for larval seabass, *Lates calcarifer*. In Report of Thailand and Japan Join Coastal Aquaculture Research Project (April 1984 - January 1986) No. 2, April 1986. Thailand: National Institute of Coastal Aquaculture, pp. 1-11.
- Shirota, A. 1970. Studies on the mouth size of fish larvae. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 36(4): 353-368. (in Japanese with English abstract)
- Tarnchalanukit, W., Chuapoehek, W., Suraniranat, P. and Na Nakorn, U. 1982. Pla Duk Dan Culture. Thailand: Faculty of Fisheries, Kasetsart University. 58 pp. (in Thai)
- Ware, D.M. 1975. Relation between egg size, growth and natural mortality of larval fish. J. Fish. Res. Bd. Canada, 32: 2503-2512.



การบำบัดน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)  
แบบพัฒนาโดยใช้หอยตะไกรกรมขาว (*Crassostrea belcheri* Sowerby)

ประทีป สองแก้ว<sup>1</sup> สมหมาย เขียววารีสังจะ<sup>2</sup> และ เสาวภา อังสุพานิช<sup>3</sup>

Abstract

Songkeao, P.<sup>1</sup>, Chiayvareesajja, S.<sup>2</sup> and Angsupanich, S.<sup>3</sup>

Treatment of effluent from intensive culture of black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) by using oyster (*Crassostrea belcheri* Sowerby)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 621-631

This study examined the effect of using oysters (*Crassostrea belcheri* Sowerby) to treat effluent resulting from the intensive culture of black tiger shrimps (*Penaeus monodon* Fabricius) at the Marine Shrimp Research and Development Center, Songkhla Province. There were 8 treatments - 0 (control), 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 g oysters/l, with 3 replicates. The oysters, weighing 25±5 g each with a mean shell length of 5.2 cm, were placed in 30 × 60 × 30 cm-glass aquaria and placed outdoors with a static water system (no water exchange, but aeration provided throughout the experiment). Water quality was monitored for chlorophyll *a*, total ammonia nitrogen (TAN), nitrate, nitrite, phosphate, total suspended solids (TSS),

<sup>1</sup>Phangnga Agriculture and Technology College, Takua Thung, Phangnga 82130 <sup>2</sup>Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

<sup>1</sup>วท.ม. (วาริชศาสตร์) วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีพังงา อำเภอตะกั่วทุ่ง จังหวัดพังงา 82130 <sup>2</sup>Ph.D. (Fisheries and Allied Aquacultures) รองศาสตราจารย์ Ph.D. (Aquatic Environmental Science) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail : csommai@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 24 ตุลาคม 2544

รับลงพิมพ์ 8 พฤษภาคม 2545

BOD, salinity and temperature before adding the oysters and at 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 16 days afterward. It was found that the correlation coefficients between oyster density and concentrations of chlorophyll *a*, TSS and BOD were negative, but positive for the correlation between oyster density and TAN. Thirty g oyster/l at 4 days was the most efficient treatment based on the percentage decrease of chlorophyll *a*, TAN, TSS and BOD (86.54%, 15.56%, 47.26% and 79.35%, respectively), all of which values are in acceptable safety ranges for aquatic animals. With treatments longer than 4 days, or densities over 30 g oyster/l, the TAN concentration increased with time and BOD exceeded the safety standard. At 70 g oyster/l, the oyster mortality was greater than 10% after 16 days of the experiment, at which time the experiment was terminated.

**Key words :** *Crassostrea belcheri*, *Penaeus monodon*, shrimp pond effluent, treatment

### บทคัดย่อ

ประทีป สองแก้ว สมหมาย เชี่ยววารีสังจะ และ เสาวภา อังสุภาณิช  
การบำบัดน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) แบบพัฒนา  
โดยใช้หอยตะกรรรมขาว (*Crassostrea belcheri* Sowerby)

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(4) : 621-631

ศึกษาการบำบัดน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) แบบพัฒนาโดยใช้หอยตะกรรรมขาว (*Crassostrea belcheri* Sowerby) ใช้ น้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย จังหวัดสงขลา ทำการทดลองในระบบน้ำนิ่งที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำแต่ให้อากาศตลอดเวลา ใช้ตู้กระจกขนาด 30 × 60 × 30 ซม. วางกลางแจ้ง โดยใช้หอยขนาดน้ำหนักเปียกตัวละ 25±5 กรัม ความยาวเปลือกเฉลี่ยตัวละ 5.2 ซม. แบ่งการทดลองออกเป็น 8 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่ ชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่น 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 กรัม/ลิตร วิเคราะห์คุณภาพน้ำหาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ แอมโมเนียรวม ไนโตรเจน ไนไตรท์ ฟอสเฟต ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด บีโอดี ความเค็ม และอุณหภูมิของน้ำ ก่อนใส่หอย และหลังจากนั้น 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 16 วัน ผลปรากฏว่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของหอยกับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และบีโอดี เป็นไปในลักษณะแปรกลับกัน แต่สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของหอยกับปริมาณแอมโมเนียรวม เป็นไปในลักษณะแปรตามกัน ความหนาแน่นของหอย 30 กรัม/ลิตร หลังการทดลอง 4 วัน มีประสิทธิภาพการบำบัดน้ำได้ดีที่สุด เพราะปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ แอมโมเนียรวม ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และบีโอดีลดลงจากวันเริ่มต้น 86.54%, 15.56%, 47.26% และ 79.35% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่เหมาะสมต่อสัตว์น้ำ แต่เมื่อระยะเวลาเกิน 4 วัน หรือความหนาแน่นของหอยมากกว่า 30 กรัม/ลิตร พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียรวมเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการทดลองเพิ่มขึ้น และค่าบีโอดียังสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด และในวันที่ 16 ชุดการทดลองที่ใช้หอย 70 กรัม/ลิตร มีหอยตายมากกว่า 10% จึงยุติการทดลอง

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนานับเป็นอาชีพหนึ่งที่สำคัญของประเทศในปัจจุบัน เพราะสามารถผลิตกุ้งส่งออกไปขายต่างประเทศได้ปีละหลายล้านบาท อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศมากกว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบดั้งเดิม เนื่องจากการ

เลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาเป็นการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นใช้อาหารสำเร็จรูปเป็นหลักและให้อาหารสดเสริมในช่วงระยะเวลาเดือนสุดท้ายของการเลี้ยง รวมทั้งมีการใช้สารเคมีตลอดระยะเวลาการเลี้ยง (คณิต และคณะ, 2535) เช่น ยาฆ่าเชื้อและพาหะของโรค ยารักษาโรค สารปรับปรุง



ดิน สารฆ่าแมลงที่ตกค้างในพืช สารเบื่อปลา และปุ๋ย เป็นต้น (Primavera *et al.*, 1993) ดังนั้นหากการจัดการระบบการเลี้ยงไม่ดีจะมีผลทำให้อาหาร ของเสียที่ขับถ่ายออกจากตัวกุ้งและสารเคมีบางส่วนเหลือตกค้างอยู่บริเวณพื้นบ่อ (คณิตและคณะ, 2535) Briggs และ Funge-Smith (1994) รายงานว่า 31% ของไนโตรเจน และ 84% ของฟอสฟอรัสที่ใส่เข้าไปในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาของไทยจมลงไปอยู่ในตะกอนก้นบ่อและจะถูกย้ายออกจากบ่อภายหลังการจับกุ้งแต่ละรุ่น และ 35% ของไนโตรเจน และ 10% ของฟอสฟอรัสที่ถูกย้ายออกจากบ่อถูกปล่อยออกไปกับน้ำทิ้ง ทั้งนี้ผู้ประกอบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่มักปล่อยน้ำทิ้งสู่แหล่งน้ำธรรมชาติโดยตรง ไม่มีการบำบัดน้ำทิ้งแต่อย่างใด ก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางน้ำ ส่งผลให้ปริมาณสัตว์น้ำและคุณสมบัติของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว อาจก่อให้เกิดปรากฏการณ์สีปลาวาฬหรือน้ำเปลี่ยนสี (Red Tide) เนื่องจากแพลงก์ตอนในธรรมชาติได้รับสารอาหารจากน้ำทิ้งแล้วเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณมาก ส่งผลให้สัตว์น้ำในบริเวณนั้นตายเพราะขาดออกซิเจนและอาจมีสารพิษจากแพลงก์ตอนพืชสะสมในหอย (MacLean, 1991) ผลจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีการปล่อยน้ำทิ้งซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์มากเกินไปกว่าธรรมชาติจะรองรับได้ ทำให้รัฐบาลโดยการผลักดันของกรมประมงได้ออกประกาศกฎกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เกี่ยวกับการจดทะเบียนฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา สำหรับผู้ประกอบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาจะต้องขออนุญาตจากเจ้าหน้าที่กรมประมงก่อน ถ้ามีพื้นที่การเลี้ยงกุ้งมากกว่า 50 ไร่ จะต้องมีบ่อบำบัดน้ำทิ้งประมาณ 10% ของพื้นที่การเลี้ยงทั้งหมด และน้ำทิ้งที่ปล่อยออกจากบ่อเลี้ยงกุ้งสู่แหล่งน้ำธรรมชาติต้องมีค่าบีโอดีไม่เกิน 10 มก./ล. (คณิต และ ดุสิต, 2535)

นอกจากการบำบัดน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น สร้างบ่อพักน้ำแล้ว ยังมีการศึกษาวิธีการบำบัดน้ำทิ้งด้วยวิธีทางชีวภาพ เช่น Helfrich และคณะ (1995) ใช้หอยแมลงภู่ (*Elliptio complanata*) บำบัดน้ำทิ้งจากชุมชนในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าสามารถลดปริมาณของแข็งแขวนลอยในน้ำได้ 37% ในประเทศไทยก็มีการศึกษาวิธีการบำบัดน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

กุลาดำแบบพัฒนาโดยใช้หอยแมลงภู่ โดยธนินฐา (2537) รายงานว่าหอยแมลงภู่ (*Perna* sp.) สามารถลดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และของแข็งแขวนลอยในน้ำได้ 83.40% และ 27.49% ตามลำดับ ส่วนคณิตและดุสิต (2535) พบว่าหอยแมลงภู่ (*Mytilus* sp.) สามารถลดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ได้ถึง 98.73% นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีการใช้หอยนางรม (*Crassostrea virginica*) บำบัดน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้ง (*Penaeus vannamei*) ที่รัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา (Wang, 1990 อ้างโดย Phillips, 1995) กลไกที่ช่วยให้การบำบัดน้ำโดยใช้หอยสองฝามีประสิทธิภาพคือ หอยสองฝามีการกรองกินแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ สัตว์น้ำขนาดเล็กที่เน่าเปื่อย อนุภาคสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์เป็นอาหาร (Huner and Brown, 1985) โดยซี่เหงือก (gill filament) ทำหน้าที่เป็นแผ่นกรองในกลไกของการกินอาหาร และคัดเอาขนาดอนุภาคของอาหารที่เหมาะสมเข้าไปในระบบการย่อยอาหารเท่านั้น (Saleuddin and Wilbur, 1983)

การศึกษครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของหอยตะไกรกรมขาว (*Crassostrea belcheri*) ในการบำบัดน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา โดยเฉพาะการลดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของแข็งแขวนลอยในน้ำ และบีโอดี หากหอยตะไกรกรมขาวสามารถลดค่าเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพก่อนปล่อยน้ำทิ้งสู่แหล่งน้ำ ก็จะช่วยรักษาสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำธรรมชาติ และจะเป็นผลดีต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### น้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

เป็นน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย ต.พะวง อ.เมือง จ.สงขลา โดยเก็บน้ำทิ้งที่ปล่อยออกจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาบริเวณประตูระบายน้ำออกเมื่ออายุการเลี้ยงกุ้ง 118 วัน โดยสูบน้ำระดับกึ่งกลางของน้ำที่ระบายออกไปใส่ถังไฟเบอร์กลาสขนาดบรรจุ 1,000 ลิตร แล้วนำไปใส่ตุ้มทดลอง น้ำทิ้งที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำทิ้งที่ได้จากการเลี้ยงระบบพัฒนา พื้นที่บ่อขนาด 2 ไร่ เตรียมบ่อโดยการ

ตากบ่อให้แห้งประมาณ 1 เดือน ทำการไถพรวนด้วยรถไถเดินตามแล้วโรยปูนขาว 200 กก. เพื่อปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของดิน ใช้กากชา ปูนโดโลไมท์ ปุ๋ยอินทรีย์ และมูลไก่ในการเตรียมสื่อน้ำ 10 วัน ก่อนปล่อยลูกกุ้งระยะโพสท์ลาร์วา 15 (P15) อายุ 1 เดือน เลี้ยงในอัตราความหนาแน่น 30 ตัว/ตร.ม. มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำครั้งแรกเมื่อระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน โดยถ่ายน้ำออกประมาณ 40 ซม. จากระดับน้ำในบ่อ 1.5 เมตร แล้วเติมให้ได้ระดับเดิม หลังจากนั้นมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 7 วัน/ครั้ง หากคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงไม่เหมาะสม ก็จะมีการถ่ายน้ำถี่ขึ้น โดยมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำครั้งละ 30-60% ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปยี่ห้อสตาร์ฟีดเป็นหลักวันละ 5 มื้อ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง และให้อาหารเสริมแร่ธาตุจำพวกวิตามินซี และจุลินทรีย์สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

#### หอยตะไกรกรมขาว (*Crassostrea belcheri*)

ปรับสภาพของหอยตะไกรกรมขาวซึ่งรวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณบ้านบางพัฒนา ต.บางเตย อ.เมือง จ.พังงา โดยนำหอยใส่ในกระชังขนาด  $1.5 \times 1.5 \times 0.5$  เมตร ที่ปูด้วยอวนขนาดตา 1 นิ้ว ผูกวางไว้บริเวณกระชังเลี้ยงปลาเก่าที่บ้านหัวเขาแดง อ.สิงหนคร จ.สงขลา เนื่องจากบริเวณนี้มีความเค็มเท่ากับบริเวณที่รวบรวมหอยจากแหล่งน้ำธรรมชาติ คือ 28 ppt โดยเลี้ยงปรับสภาพเป็นระยะเวลามากกว่า 1 เดือน แล้วนำมาปรับสภาพความเค็มและอุณหภูมิในบ่อพักน้ำของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย ซึ่งมีความเค็มใกล้เคียงกับน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง ปรับสภาพอย่างน้อยเป็นระยะเวลา 7 วัน ก่อนการทดลอง

#### แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design; CRD) โดยนำหอยตะไกรกรมขาวมาปรับสภาพในบ่อพักน้ำ 7 วัน ก่อนทำการทดลอง ใช้หอยตะไกรกรมขาวน้ำหนักสดพร้อมเปลือกตัวละ  $25 \pm 5$  กรัม ขนาดความยาวเปลือกเฉลี่ย 5.2 ซม. ใส่ตะกร้าพลาสติกนำไปแขวนในตู้กระจกขนาด  $30 \times 60 \times 30$  ซม. ที่บรรจุน้ำทั้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ตัวละ 30 ลิตร โดยใช้ระบบน้ำนิ่งไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ แต่ให้อากาศตลอดเวลา

จำนวน 8 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ คือ

ชุดการทดลองที่ 1 ไม่ใช้หอยตะไกรกรมขาว (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ใช้หอยตะไกรกรมขาวอัตรา 10 กรัม/ลิตร เฉลี่ยข้าละ 11 ตัว

ชุดการทดลองที่ 3 ใช้หอยตะไกรกรมขาวอัตรา 20 กรัม/ลิตร เฉลี่ยข้าละ 21 ตัว

ชุดการทดลองที่ 4 ใช้หอยตะไกรกรมขาวอัตรา 30 กรัม/ลิตร เฉลี่ยข้าละ 32 ตัว

ชุดการทดลองที่ 5 ใช้หอยตะไกรกรมขาวอัตรา 40 กรัม/ลิตร เฉลี่ยข้าละ 43 ตัว

ชุดการทดลองที่ 6 ใช้หอยตะไกรกรมขาวอัตรา 50 กรัม/ลิตร เฉลี่ยข้าละ 55 ตัว

ชุดการทดลองที่ 7 ใช้หอยตะไกรกรมขาวอัตรา 60 กรัม/ลิตร เฉลี่ยข้าละ 65 ตัว

ชุดการทดลองที่ 8 ใช้หอยตะไกรกรมขาวอัตรา 70 กรัม/ลิตร เฉลี่ยข้าละ 77 ตัว

#### การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำจากตู้กระจกที่วันเริ่มต้นก่อนใส่หอย และระยะเวลา 1, 2, 4, 6, 8, 10, 16 และ 20 วันหลังจากใส่หอย โดยเก็บตัวอย่างน้ำในช่วงเวลา 08.00-09.00 น. เป็นประจำทุกวันๆ ละ 1 ลิตร เพื่อนำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำต่อไป วิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll *a*) แอมโมเนียรวม (total ammonia Nitrogen; TAN) ไนเตรท (Nitrate) ไนไตรท์ (Nitrite) และฟอสเฟต (Phosphate) ใช้วิธีของ Strickland และ Parsons (1972) วิเคราะห์หาค่าบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand; BOD) และปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solids; TSS) โดยใช้วิธีของ APHA และคณะ (1995) วัดความเค็ม โดยใช้ Salinorefractometer และวัดอุณหภูมิของน้ำโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์

#### อัตราการตาย

ตรวจสอบการตายของหอยตะไกรกรมขาวโดยการปิด-เปิดของเปลือกหอยและใช้วิธีการยกตะกร้าพลาสติกที่บรรจุหอยตรวจดูเป็นประจำทุกวัน หากหอยมีชีวิตรอด

แสดงการปิด-เปิดของฝาเมื่อยกตะกร้าพลาสติกขึ้นมาเหนือ น้ำ ถ้าหอยเปิดเปลือกฝาตลอดเวลาแสดงว่าหอยตาย เมื่อพบว่าหอยตายก็นำหอยออกไป หากหอยในหน่วยการทดลองใดตายถึง 10% ก็หยุดการทดลองทั้งหมด สำหรับ อัตราอดตายคำนวณ ดังนี้

$$\text{อัตราอดตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนหอยที่มีชีวิตเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนหอยที่มีชีวิตเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}$$

### การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์สหสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร คุณภาพน้ำต่างๆ กับความหนาแน่นของหอย โดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 7.5 และ Excel'97 ของบริษัท Microsoft Corporation Ltd.

### ผลการทดลอง

#### 1. คุณภาพน้ำที่บำบัดด้วยหอยตะไกรกรมขาว

##### 1.1 คลอโรฟิลล์ เอ

หลังการทดลอง 1 วัน ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลงจากวันเริ่มต้นน้อยที่สุด โดยชุดควบคุมลดลงน้อยที่สุด เท่ากับ 8.47% (จาก 365.42 ไมโครกรัม/ลิตร เหลือ 336.73 ไมโครกรัม/ลิตร) และชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่น 70 กรัม/ลิตร ลดลงมากที่สุดเท่ากับ 74.71% (จาก 353.95 ไมโครกรัม/ลิตร เหลือ 89.85 ไมโครกรัม/ลิตร) หลังการทดลอง 16 วัน ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลงจากวันเริ่มต้นมากที่สุด โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่น 70 กรัม/ลิตร ลดลงมากที่สุดถึง 99.21% (จาก 353.95 ไมโครกรัม/ลิตร เหลือ 2.80 ไมโครกรัม/ลิตร) รองลงมา คือชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่น 60 กรัม/ลิตร ลดลง 99.16% (จาก 313.93 ไมโครกรัม/ลิตร เหลือ 2.57 ไมโครกรัม/ลิตร) ทั้งนี้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ในทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการทดลองที่เพิ่มขึ้น (Figure 1)

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของหอยกับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เป็นไปในลักษณะแปรกลับกัน โดยพบว่าหลังการทดลอง 1, 2, 4 และ 6 วัน มีความ

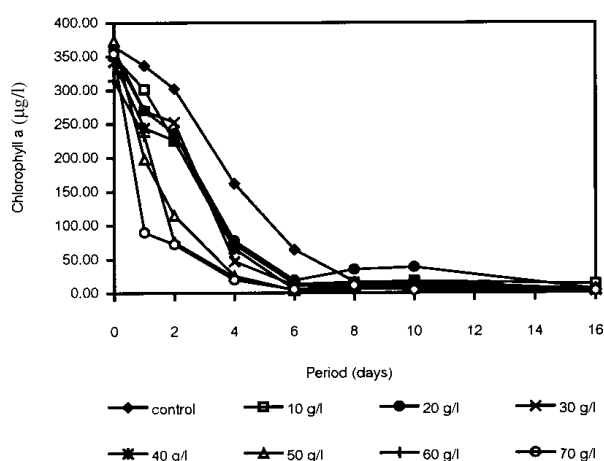


Figure 1. Mean chlorophyll *a* concentrations in the effluent from intensive culture of black tiger shrimp treated with 25-g oyster, 8 densities.

สัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) โดยหลังการทดลอง 4 วัน มีความสัมพันธ์กันมากที่สุด ( $r = -0.722$ ) (Table 1)

##### 1.2 แอมโมเนียรวม

หลังการทดลอง 1 วัน ปริมาณแอมโมเนียรวมในทุกชุดการทดลองลดลงจากวันเริ่มต้น ยกเว้นชุดที่หอยหนาแน่น 70 กรัม/ลิตร และช่วงระยะเวลาการทดลอง 4-8 วัน ปริมาณแอมโมเนียรวมเพิ่มขึ้นถึงจุดสูงสุด แล้วลดลงต่ำสุดหลังการทดลอง 10 วัน หลังจากนั้นก็เพิ่มขึ้นอีก สำหรับชุดควบคุมหลังจากผ่านไป 2 วัน ปริมาณแอมโมเนียรวมค่อนข้างคงที่และไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก (Figure 2)

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของหอยกับปริมาณแอมโมเนียรวม ตลอดระยะเวลาการทดลอง เป็นไปในลักษณะแปรตาม และพบว่าหลังการทดลอง 1, 2, 4 และ 6 วัน มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) โดยหลังการทดลอง 4 วัน มีความสัมพันธ์กันมากที่สุด ( $r = 0.815$ ) (Table 1)

##### 1.3 ไนเตรท

ในช่วง 6 วันแรก ทุกชุดการทดลองที่ใช้หอยมีปริมาณไนเตรทเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และค่าค่อนข้างคงที่ในชุดควบคุม หลังจากนั้นในช่วง 6-8 วัน ปริมาณไนเตรทในชุดการทดลองที่ใช้หอยเพิ่มขึ้นมาก หลังจากการทดลอง

Table 1. Correlation coefficients between oyster density and water quality.

| Parameter               | Period (days) |          |          |          |         |         |         |
|-------------------------|---------------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|
|                         | 1             | 2        | 4        | 6        | 8       | 10      | 16      |
| 1. Chlorophyll <i>a</i> | -0.671**      | -0.685** | -0.722** | -0.556** | -0.469* | -0.339  | -0.373  |
| 2. Ammonia              | 0.796**       | 0.768**  | 0.815**  | 0.755**  | 0.418*  | 0.348   | 0.484*  |
| 3. Nitrate              | 0.851**       | 0.767**  | 0.866**  | 0.784**  | 0.896** | 0.883** | 0.703** |
| 4. Nitrite              | 0.822**       | 0.882**  | 0.879**  | 0.905**  | 0.869** | 0.813** | 0.762** |
| 5. Phosphate            | 0.377         | 0.436*   | 0.583**  | 0.541**  | 0.543** | 0.541** | 0.592** |
| 6. TSS                  | -0.261        | -0.785** | -0.571** | -0.708** | -0.003  | 0.122   | -0.402  |
| 7. BOD                  | -0.637**      | -0.748** | -0.389   | -0.531** | -0.320  | -0.147  | -0.353  |

\* Correlations are significant at 5% ( $P < 0.05$ ) \*\* Correlations are significant at 1% ( $P < 0.01$ )

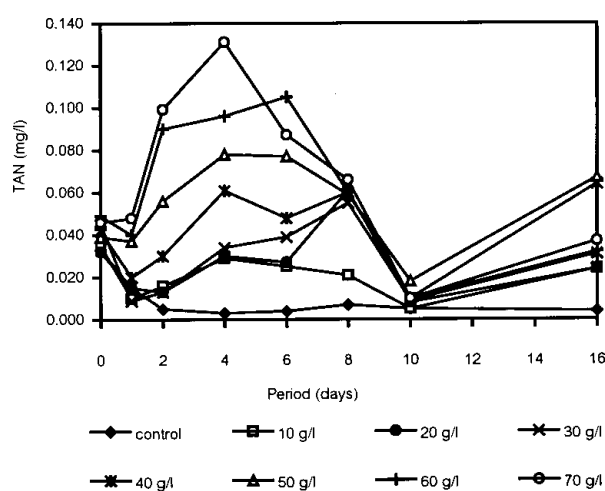


Figure 2. Mean total ammonia nitrogen (TAN) concentrations in the effluent from intensive culture of black tiger shrimp treated with 25-g oyster, 8 densities.

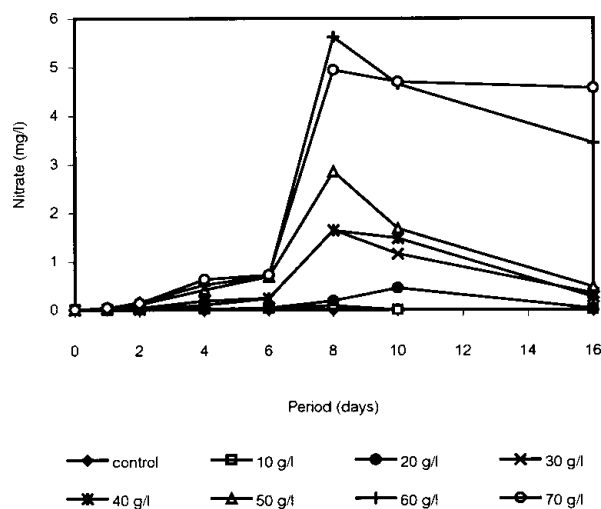


Figure 3. Mean nitrate concentrations in the effluent from intensive culture of black tiger shrimp treated with 25-g oyster, 8 densities.

ผ่านไป 8 วันปริมาณไนเตรทมีแนวโน้มลดลง (Figure 3) สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของหอยกับปริมาณไนเตรท ตลอดระยะเวลาการทดลองเป็นไปในลักษณะแปรตาม และมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) โดยหลังการทดลอง 8 วัน มีค่าความสัมพันธ์กันมากที่สุด ( $r = 0.896$ ) (Table 1)

#### 1.4 ไนไตรท์

ในช่วง 2 วันแรก ปริมาณไนไตรท์ในทุกชุดการทดลองมีค่าน้อยและไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก หลังจากนั้น

ปริมาณไนไตรท์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการทดลอง และในช่วงวันที่ 8-10 ปริมาณไนไตรท์ในทุกชุดการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่น 70 กรัม/ลิตร มีปริมาณไนไตรท์เพิ่มมากที่สุด ส่วนชุดการทดลองอื่นมีปริมาณไนไตรท์ลดลง (Figure 4)

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของหอยกับปริมาณไนไตรท์ ตลอดระยะเวลาการทดลองเป็นไปในลักษณะแปรตาม และมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) โดยหลังการทดลอง 6 วัน มีค่าความสัมพันธ์กัน

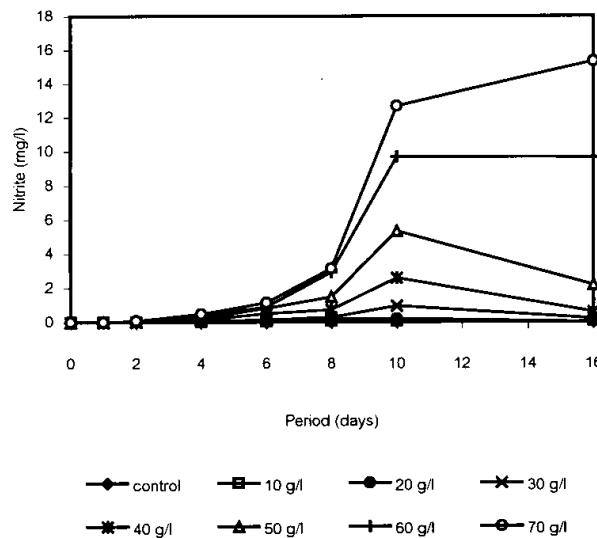


Figure 4. Mean nitrite concentrations in the effluent from intensive culture of black tiger shrimp treated with 25-g oyster, 8 densities.

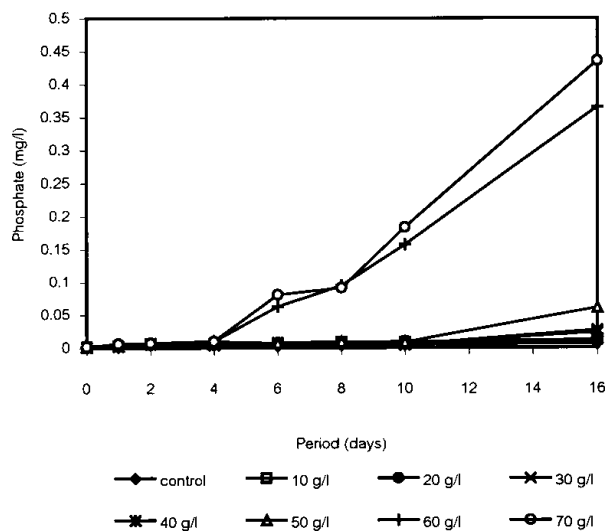


Figure 5. Mean phosphate concentrations in the effluent from intensive culture of black tiger shrimp treated with 25-g oyster, 8 densities.

มากที่สุด ( $r=0.905$ ) (Table 1)

#### 1.5 ฟอสเฟต

ในช่วง 10 วันแรก เกือบทุกชุดการทดลองมีปริมาณฟอสเฟตเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย หลังจากนั้นทุกชุดการ

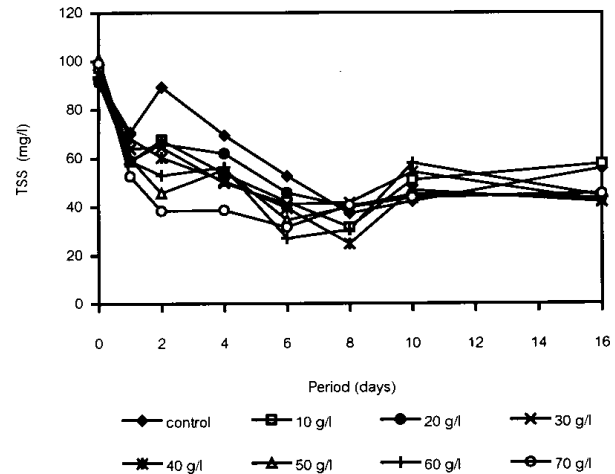


Figure 6. Mean total suspended solids (TSS) concentrations in the effluent from intensive culture of black tiger shrimp treated with 25-g oyster, 8 densities.

ทดลองมีปริมาณฟอสเฟตเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่น 60 และ 70 กรัม/ลิตร มีปริมาณฟอสเฟตเพิ่มมากกว่าชุดการทดลองอื่น (Figure 5)

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของหอยกับปริมาณฟอสเฟต เป็นไปในลักษณะแปรตามเกือบตลอดระยะเวลาการทดลอง และมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.01$ ) โดยหลังการทดลอง 16 วัน มีค่าความสัมพันธ์มากที่สุด ( $r = 0.592$ ) (Table 1)

#### 1.6 ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด

ในช่วงระยะเวลาเริ่มต้นการทดลองถึง 8 วัน ทุกชุดการทดลองมีปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดลดลงจากเริ่มต้นการทดลอง โดยเฉพาะหลังการทดลอง 1, 2 และ 4 วัน ชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่น 70 กรัม/ลิตร ลดลงมากกว่าชุดการทดลองอื่น หลังการทดลอง 8 วัน ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้น และลดลงอีกครั้งหลังการทดลอง 10 วัน ยกเว้นชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่น 10 กรัม/ลิตร มีค่าเพิ่มสูงขึ้นกว่าชุดการทดลองอื่น (Figure 6)

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของหอยกับปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดเป็นไปในลักษณะแปรกลับกัน ยกเว้นหลังการทดลอง 10 วัน และพบว่าหลังการทดลอง 2, 4 และ 6 วัน มีความสัมพันธ์กันน้อย

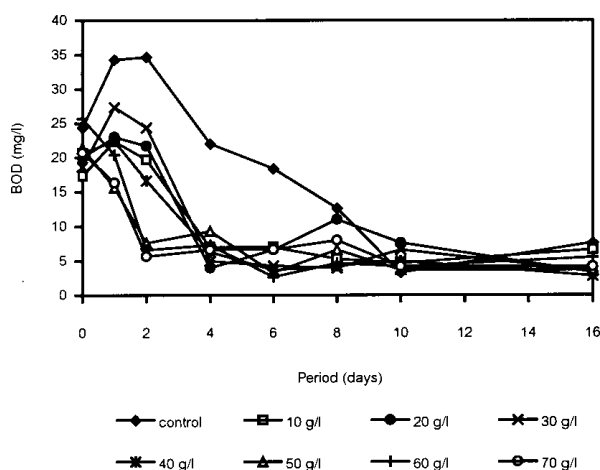


Figure 7. Mean BOD concentrations in the effluent from intensive culture of black tiger shrimp treated with 25-g oyster, 8 densities.

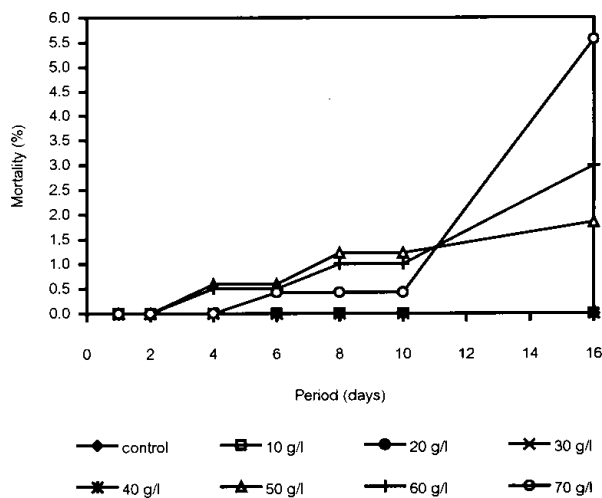


Figure 8. Mortality rate from 8 densities of 25 g-oysters used to treat effluent from intensive culture of black tiger shrimp.

มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) โดยหลังการทดลอง 2 วัน มีความสัมพันธ์กันมากที่สุด ( $r = -0.785$ ) (Table 1)

### 1.7 บีโอดี

ปริมาณบีโอดีในชุดควบคุมมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นเกือบตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยเพิ่มสูงสุดในวันที่ 2 แล้วจึงลดลงเรื่อยๆ จนมีค่าต่ำสุดในวันที่ 10 แล้วกลับเพิ่มขึ้นอีกในวันที่ 16 ส่วนชุดการทดลองที่ใช้หอยค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของบีโอดีมีแนวโน้มลดลงต่ำกว่าชุดควบคุม โดยในช่วงระยะเวลา 1-2 วัน มีค่าความเข้มข้นของบีโอดีเพิ่มสูงสุด ยกเว้นชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่นตั้งแต่ 50 กรัม/ลิตร ขึ้นไป มีค่าลดลงในวันที่ 1-2 แล้วเพิ่มขึ้นหลังวันที่ 4 ส่วนชุดการทดลองอื่นมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วหลังวันที่ 4 หลังจากนั้นค่าความเข้มข้นของบีโอดีเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก (Figure 7)

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของหอยกับค่าบีโอดีเป็นไปในลักษณะแปรกลับกัน และพบว่าหลังการทดลอง 1, 2 และ 6 วัน มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) โดยหลังการทดลอง 2 วัน มีความสัมพันธ์กันมากที่สุด ( $r = -0.748$ ) (Table 1)

ในระหว่างการศึกษาทดลอง ความเค็มและอุณหภูมิของน้ำในทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน ( $P > 0.05$ ) โดยความเค็มเริ่มต้นที่ 14 ppt แล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึง 22 ppt

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ส่วนอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 28.6-32.4 °C

### 2. อัตราการตายของหอยตะไกรกรมขาว

จากการทดลองปรากฏว่าหลังการทดลอง 16 วัน มีค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของหอยอยู่ในช่วง 0-5.56% โดยชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่น 10, 20, 30 และ 40 กรัม/ลิตร ไม่มีหอยตาย ส่วนชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่น 70 กรัม/ลิตร มีค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมมากที่สุดเท่ากับ 5.56% (อยู่ในช่วง 0-15.38%) รองลงมาคือชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่น 60 และ 50 กรัม/ลิตร มีค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสม 2.99% และ 1.85% ตามลำดับ (Figure 8) จึงยุติการทดลอง

### สรุปและวิจารณ์

หอยตะไกรกรมขาวสามารถบำบัดน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ของแขวนลอยทั้งหมดและบีโอดี ลดลง โดยกลไกสำคัญที่ช่วยให้การบำบัดน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาด้วยหอยตะไกรกรมขาวในระบบนี้มีประสิทธิภาพ คือ 1) การกรองกินอาหาร

ของหอย และ 2) ความหนาแน่นของหอยและระยะเวลาการทดลอง โดยความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของหอยกับปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เป็นไปในลักษณะแปรกลับกัน กล่าวคือเมื่อหอยมีความหนาแน่นมากขึ้นก็มีการกรองกินแพลงก์ตอนพืชมากขึ้น นอกจากนี้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ยังลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของคณิตและดุสิต (2535) ซึ่งพบว่าจากการใช้หอยแมลงภู่น้ำหนัก 400 กรัม/น้ำ 200 ลิตร บำบัดน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ สามารถลดปริมาณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ เอ ได้ 30.50%, 73.10%, 87.78% และ 98.73% ที่ระยะเวลาการทดลอง 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ และความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความหนาแน่นของหอยกับปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดในน้ำก็เป็นไปในลักษณะแปรกลับกัน สอดคล้องกับการทดลองของคณิตและดุสิต (2535) และ ธนิษฐา (2537) ที่ใช้หอยแมลงภู่น้ำหนัก 400 กรัม/น้ำ 200 ลิตร บำบัดน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

อัตราความหนาแน่นของหอยตะไกรกรมขาวที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำระบบนี้ คือ 30 กรัม/ลิตร และควรมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 4 วัน เนื่องจากคุณภาพน้ำทิ้งจากการบำบัดด้วยหอยตะไกรกรมขาวในช่วงระยะเวลาดังกล่าวลดลงอยู่ในระดับที่เหมาะสมและไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด โดยเฉพาะปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดในน้ำลดลงเหลือ 50.00 มก./ล. และบีโอดีลดลงเหลือ 3.83 มก./ล. ซึ่งเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อสัตว์น้ำคือปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดอยู่ในช่วง 25-80 มก./ล. และบีโอดีไม่เกิน 4 มก./ล. (คณิต และยงยุทธ, 2537) ซึ่งชุดการทดลองดังกล่าว หอยไม่ตายตลอดระยะเวลาการทดลอง หลังการทดลอง 16 วัน ชุดการทดลองที่ใช้หอยหนาแน่น 70 กรัม/ลิตร มีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 5.56% ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ลดลง 99.21% และปริมาณไนไตรท์เพิ่มขึ้น 1,696,525.71% (จาก 0.0009 มก./ล. เป็น 15.3278 มก./ล.) ปริมาณไนไตรท์ที่เพิ่มมากขึ้น อาจเนื่องจากหอยหนาแน่นที่สุด จึงขับถ่ายแอมโมเนียออกมามาก เหลือแพลงก์ตอนพืชที่จะดูดซับแอมโมเนียน้อย แอมโมเนียจึงอาจถูกแบคทีเรียเปลี่ยนรูปเป็นไนไตรท์ จนทำให้ไนไตรท์ในตู้ทดลองเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้ไนไตรท์เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ (Wetzel, 1975) ทำให้หอยตายได้ ซึ่งจากการทดลองของสุวัฒน์และคณะ (2541)

รายงานว่า การเลี้ยงหอยตะไกรกรมขาวขนาดความยาวเปลือก 3.47 ซม. ในกระบะขนาด 1 × 1 ตร.ม. ในแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีการหมุนเวียนของน้ำตลอดเวลา โดยทำความสะอาดหอยเดือนละครั้ง ปรากฏว่าที่ความหนาแน่น 25 ตัว/ตร.ม. มีอัตราการรอดตาย 85.6% และเมื่ออัตราความหนาแน่นเพิ่มขึ้นเป็น 200 ตัว/ตร.ม. มีอัตราการรอดตาย 68.6% แสดงให้เห็นว่าอัตราความหนาแน่นที่มากขึ้นทำให้อัตราการรอดตายต่ำลง

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้หอยตะไกรกรมขาวกับหอยชนิดอื่น ในอัตราที่ใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะการใช้หอยแมลงภู่น้ำหนัก (Elliptio complanata) บำบัดน้ำทิ้งจากชุมชนที่ประเทศสหรัฐอเมริกา หอยขนาดน้ำหนักตัวละ 123 กรัม ในอัตราความหนาแน่น 0.6 ตัว/ลิตร (หรือ 74 กรัม/ลิตร) ที่ระยะเวลาการทดลอง 1 วัน สามารถลดปริมาณของแข็งแขวนลอยในน้ำได้ 37% (Helfrich et al., 1995) ซึ่งประสิทธิภาพการกรองดีกว่าหอยตะไกรกรมขาวที่อัตราความหนาแน่นใกล้เคียงกัน กล่าวคือการใช้หอยตะไกรกรมขาวขนาดน้ำหนักตัวละ 25 กรัม อัตราความหนาแน่น 70 กรัม/ลิตร ที่ระยะเวลาการทดลอง 1 วัน สามารถลดปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมดได้ 46.47% และการใช้หอยแมลงภู่น้ำหนัก (Perna sp.) ขนาดน้ำหนักตัวละ 20 กรัม อัตราความหนาแน่น 7 กรัม/ลิตร บำบัดน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบน้ำนิ่ง ระยะเวลาการทดลอง 10 วัน สามารถลดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และของแข็งแขวนลอยทั้งหมดได้ 83.40% และ 27.49% ตามลำดับ (ธนิษฐา, 2537) ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำทิ้งของหอยแมลงภู่น้ำหนัก (Perna sp.) ดีกว่าการใช้หอยตะไกรกรมขาว ซึ่งที่อัตราความหนาแน่น 10 กรัม/ลิตร หลังการทดลอง 10 วัน สามารถลดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และของแข็งแขวนลอยทั้งหมดได้ 95.06% และ 46.86% ตามลำดับ ส่วนการใช้หอยแมลงภู่น้ำหนัก (Mytilus sp.) บำบัดน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบน้ำนิ่ง อัตราความหนาแน่น 400 กรัม/น้ำ 200 ลิตร (หรือ 2 กรัม/ลิตร) ที่ระยะเวลาการทดลอง 2 วัน สามารถลดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ได้ 98.73% (คณิตและดุสิต, 2535) มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้หอยตะไกรกรมขาวซึ่งที่อัตราความหนาแน่น 10 กรัม/ลิตร หลังการทดลอง 2 วัน สามารถลดปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ได้ 36.11% สาเหตุนอกจากความแตกต่างของแหล่ง

น้ำที่ใช้ ขนาดและความหนาแน่นของหอยที่ต่างกันแล้ว อาจเนื่องจากประสิทธิภาพการกรองอนุภาคอาหารของ หอยแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยหอยตะไกรมกรามขาว สามารถกรองกินอนุภาคอาหารที่มีขนาด 6-12 ไมโครเมตร ได้ดี (Hawkins et al., 1998) ในขณะที่หอยแมลงภู่ (*Dreissena polymorpha*) สามารถกรองอนุภาคอาหาร ขนาด 1.5 ไมโครเมตร ได้ดีที่สุด (Lei et al., 1996) และ หอยสองฝา (*Mercenaria mercenaria*) สามารถกรอง อนุภาคอาหารขนาด 3.5 ไมโครเมตร ได้ดีที่สุด (Jogenson, 1990)

การพัฒนาประสิทธิภาพการใช้หอยตะไกรมกราม ขาวบำบัดน้ำทิ้ง สามารถทำได้โดย

1) ใช้หอยตะไกรมกรามขาวหลายขนาดรวมกัน เพราะน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งมีอนุภาคของอาหารหลายขนาด และหอยแต่ละขนาดย่อมกรองกินอาหารที่ขนาดแตกต่างกัน ซึ่ง Spigel และคณะ (1997) ใช้หอยนางรม (*Crassostrea gigas*) บำบัดน้ำทิ้งจากการเลี้ยงปลาเกล็ดสีเสด ซีบรีม (*Sparus auratus*) ปรากฏว่าหอยขนาดน้ำหนักตัว ละ 22 กรัม ลดความขุ่นได้น้อยที่สุด (52%) หอยขนาด น้ำหนักตัวละ 7 กรัม ลดความขุ่นได้ 64% ส่วนการผสม หอยทั้ง 2 ขนาด ในอัตราส่วนที่เท่ากัน สามารถลดความ ขุ่นได้มากที่สุดถึง 66%

2) ใช้การบำบัดน้ำทิ้งแบบผสมผสาน เพราะว่าหอย ตะไกรมกรามขาวสามารถบำบัดน้ำบางพารามิเตอร์เท่านั้น โดยเฉพาะของแข็งแขวนลอย จึงควรมีบ่อกักน้ำเพื่อให้ ของแข็งแขวนลอยบางส่วนตกตะกอน เนื่องจากปริมาณ ของแข็งแขวนลอยทั้งหมดที่ถูกปล่อยออกจากบ่อเลี้ยงกุ้ง กูลาดำมีขนาดแตกต่างกัน โดยเฉพาะปริมาณของแข็ง แขวนลอยทั้งหมดที่มีขนาดใหญ่และหอยตะไกรมกรามขาว กรองกินไม่ได้จะตกตะกอนในบ่อนี้ แล้วนำน้ำผ่านมายัง ระบบบำบัดสารมลพิษต่างๆ ที่ละลายน้ำ เช่น ใช้สารร้าย ผมนาง ช่วยลดปริมาณแอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรท์ และ ฟอสฟอรัส ได้ (อภิรักษ์, 2536) จากนั้นจึงนำน้ำผ่าน มายังบ่อบำบัดด้วยหอยตะไกรมกรามขาว ซึ่งสามารถลด ปริมาณของคลอโรฟิลล์ เอ ของแข็งแขวนลอยทั้งหมดใน น้ำ และบีโอดี ได้เป็นอย่างดี

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ดร.จิราพร เกษรจันทร์ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาการเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย จ.สงขลา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ใน การทำวิจัย รวมทั้งนักวิชาการของศูนย์ฯ คือ คุณพิษณุ นอนันต์ คุณอุษณี เอกปณิธานพงศ์ และ ดร.พุทธ ส่องแสงจินดา ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือเป็นอย่างดี และ David Patterson อาจารย์พิเศษ ภาควิชาภาษาและ ภาษาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยตรวจแก้ภาษาอังกฤษ

## เอกสารอ้างอิง

- คณิต ไชยคำ และ ดุสิต ต้นวิไล. 2535. การทดลองใช้หอย แมลงภู่และสาหร่ายผมนางบำบัดน้ำทิ้งทางชีวภาพจาก บ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2535. สงขลา : สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- คณิต ไชยคำ และ ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร. 2537. แนวทาง การป้องกันเพื่อลดผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อมจากการ พัฒนาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. สงขลา : สถาบัน วิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวง เกษตรและสหกรณ์
- คณิต ไชยคำ พุทธ ส่องแสงจินดา และ ดุสิต ต้นวิไล. 2535. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำและแหล่งกักตุนพิษในบ่อ เลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2535. สงขลา : สถาบันวิจัย การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวง เกษตรและสหกรณ์
- ธนัฐา ธิรัชพันธ์. 2537. การทดลองการใช้หอยแมลงภู่เพื่อ ปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล
- สุวัฒน์ ธนานุภาพไพศาล สอริฐ มากบุญ และ รัชฎา ขาวหุ- นนา. 2541. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของหอย ตะไกรม (*Crassostrea belcheri*) ด้วยการใช้เลี้ยงแบบ ต่างๆ. รายงานการวิจัยปี 2541. สุราษฎร์ธานี : ศูนย์ พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสุราษฎร์ธานี กรม ประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- อภิรักษ์ จันทวงศ์. 2536. การบำบัดน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้ง กูลาดำ (*Penaeus monodon*) แบบพัฒนาโดยใช้ สาหร่ายผมนาง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



- APHA (American Public Health Association), American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19<sup>th</sup> edition. Washington, D.C. : American Public Health Association.
- Briggs, M.R.P. and Funge-Smith, S.J. 1994. A nutrient budget of some intensive marine shrimp ponds in Thailand. *Aquaculture and Fisheries Management* 25 : 789-811.
- Hawkins, A.J.S., Smith, R.F.M., Tan, S.H. and Yazin, Z.B. 1998. Suspension feeding behaviour in tropical bivalve molluscs : *Perna viridis*, *Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iradelei*, *Saccostrea cucullata* and *Pinctada margarifera*. *Marine Ecology Progress Series* 166 : 173-185.
- Helfrich, L.A., Zimmerman, M. and Weigmann, D.L. 1995. Control of suspended solids and phytoplankton with fishes and a mussel. *Water Resources Bulletin* 31 : 307-316.
- Huner, J.V. and Brown, E.E. 1985. Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States. Louisiana : Avi Publishing Company Inc.
- Joergensen, C.B. 1990. Bivalve Filter Feeding : Hydro-dynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Fredensborg : Olsen and Olsen.
- Lei, J., Payne, B.S. and Wang, S.Y. 1996. Filtration dynamics of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 53 : 29-37.
- MacLean, J.L. 1991. Red tides and Asian seafarming. Report on a Regional Study and Workshop on Fish Disease and Fish Health Management. Asian Development Bank, Manila, Philippines. No. 1. pp. 601-605.
- Phillips, M.J. 1995. Shrimp culture and environment. In *Towards Sustainable Aquaculture in South-east Asia and Japan*. (eds. T.U. Bagarinao and E.E.C. Flores). pp. 37-62. Iloilo : SEAFDEC Aquaculture Development.
- Primavera, J.H., Lavilla-Pitogo, C.R., Ladjá, J.M. and Pena, M.R.D. 1993. A survey of chemical and biological products used in intensive prawn farms in the Philippines. *Marine Pollution Bulletin* 26 : 35-40.
- Saleuddin, A.S.M. and Wilbur, K.M. 1983. The Mollusca. Vol. 5. New York : Academic Press Inc.
- Shpigel, M., Gasith, A. and Kimmel, E. 1997. A bio-mechanical filter for treating fish-pond effluents. *Aquaculture* 152 : 103-117.
- Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2<sup>nd</sup> edition. Ottawa : Fisheries Research Board of Canada.
- Wetzel, R.G. 1975. Limnology. Philadelphia : W.B. Saunders Company.



## Chronic toxicity study of curcuminoids in rats

Pranee Chavalittumrong<sup>1</sup>, Songphol Chivapat<sup>2</sup>,  
Sadudee Rattanajarasroj<sup>3</sup>, Somkiat Punyamong<sup>4</sup>,  
Anchalee Chuthaputti<sup>5</sup>, and Chada Phisalaphong<sup>6</sup>

### Abstract

Chavalittumrong, P., Chivapat, S., Rattanajarasroj, S., Punyamong, S.,  
Chuthaputti, A., and Phisalaphong C.

**Chronic toxicity study of curcuminoids in rats**

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 633-647

A six-month chronic toxicity study of curcuminoids extracted from the powdered dried rhizome of *Curcuma longa* L. was performed in six groups of 15 Wistar rats of each sex. Water control group received 5 ml of water/kg BW/day, while tragacanth control group received 5 ml of 0.5% tragacanth suspension/kg BW/day orally. Three treatment groups were given the suspension of curcuminoids powder at the doses of 10, 50 and 250 mg/kg BW/day, which were 1, 5 and 25 times of the proposed therapeutic dose. The fourth treatment group, or the recovery group, also received 250 mg/kg BW/day of curcuminoids for six months, but two weeks of no curcuminoids treatment elapsed before the time of sacrifice. It was found that the growth rate of male rats receiving curcuminoids 50 mg/kg BW/day was significantly higher than that of the tragacanth control group. Curcuminoids did not produce any significant dose-related changes of hematological parameters. In the group of male animals receiving 250 mg/kg BW/day of curcuminoids, actual and relative liver weights and the level of alkaline phosphatase (ALP) were significantly higher than those of the two controls, but the ALP level was still within a normal range. There appeared to be a higher incidence of mild

<sup>1</sup>M.S. (Phytochemistry), <sup>2</sup>M.S. (Pathology), <sup>3</sup>M.S. (Pharmacology), <sup>4</sup>Cert. in Medical Science Technology,  
<sup>5</sup>Ph.D. (Pharmacology), <sup>6</sup>Ph.D. (Phytochemistry), Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical  
Sciences, Ministry of Public Health, Tiwanond Rd., Muang, Nonthaburi 11000 Thailand.

Corresponding e-mail : praneec@dmsc.moph.go.th

Received, 22 April 2002

Accepted, 27 June 2002

degree of liver fatty degeneration and adrenocortical fatty degeneration in this group of animals; however, the incidence was not significantly different from that of the two controls. The results indicated that long-term administration of curcuminoids at therapeutic dose (10 mg/kg BW/day) did not produce any toxicity in rats. However, at higher doses, it may affect the function and morphology of the liver in a reversible manner.

**Key words :** curcuminoids, toxicity

### บทคัดย่อ

ปราณี ขวลิตรำรง ทรงพล ชีวะพัฒน์ สดุดี รัตนจรัสโรจน์ สมเกียรติ ปัญญามัง

อัญชลี จูฑะพุทธิ และ ชญา พิศาลพงศ์

การศึกษาพิษเรื้อรังของเคอร์คิวมินอยด์ในหนูขาว

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(4) : 633-647

ผู้วิจัยได้ศึกษาพิษเรื้อรังนาน 6 เดือนของเคอร์คิวมินอยด์ในหนูขาวพันธุ์วistar 6 กลุ่ม ๆ ละ 15 ตัวต่อเพศ หนูกลุ่มควบคุมกลุ่มแรกได้รับน้ำ 5 มล./น้ำหนักตัว 1 กก./วัน (มล./กก./วัน) ทางปาก ส่วนกลุ่มควบคุมกลุ่มที่สองได้รับทรายาคำน 5 มล./กก./วัน หนูกลุ่มทดลอง 3 กลุ่มแรกได้รับน้ำยาแขวนตะกอนของเคอร์คิวมินอยด์ในทรายาคำน ในขนาด 10, 50 และ 250 มก./น้ำหนักตัว 1 กก./วัน (มก./กก./วัน) หรือเทียบเท่ากับ 1, 5 และ 25 เท่าของขนาดใช้ในคนต่อวัน ส่วนหนูกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ใช้ศึกษาว่าอาการพิษที่เกิดจากเคอร์คิวมินอยด์สามารถหายเป็นปกติได้หรือไม่หากไม่ได้รับสารนั้นแล้ว หนูกลุ่มนี้ได้รับเคอร์คิวมินอยด์ 250 มก./กก./วัน เช่นกัน แต่หลังจากได้รับสารครบ 6 เดือน ได้หยุดให้สารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนทำการผ่าซาก พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของหนูเพศผู้ที่ได้รับเคอร์คิวมินอยด์ 50 มก./กก./วัน สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับทรายาคำนอย่างมีนัยสำคัญ เคอร์คิวมินอยด์ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาใด ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารที่ให้ ในหนูเพศผู้ที่ได้รับเคอร์คิวมินอยด์ 250 มก./กก./วัน พบว่าน้ำหนักจริงและน้ำหนักสัมผัสของตับ และระดับของอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส สูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม แต่ระดับของอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ แม้ว่าหนูกลุ่มนี้ดูเหมือนจะมีอุบัติการณ์ของไขมันสะสมในตับและชั้นคอร์เท็กซ์ของต่อมหมวกไตสูง แต่อุบัติการณ์ดังกล่าวก็ไม่ได้แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าการให้เคอร์คิวมินอยด์ในขนาดที่ใช้ในคน (10 มก./กก./วัน) ติดต่อกันเป็นเวลานาน ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษในหนูขาว อย่างไรก็ตาม เคอร์คิวมินอยด์ในขนาดสูงอาจมีผลต่อการทำงานและโครงสร้างของตับได้ แต่เป็นการเปลี่ยนแปลงที่กลับเป็นปกติใหม่ได้เมื่อหยุดใช้เคอร์คิวมินอยด์

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

Turmeric is the dried rhizome of *Curcuma longa* L. of the family Zingiberaceae. It has long been used as a food-coloring agent and spice all over the world, especially in Asia. Based on the clinical study conducted in Thailand, turmeric is recommended by WHO and Thailand's Essential Drug List as an herbal medicine for the treatment of dyspepsia (Thamlikitkul, *et al.*, 1989, World Health Organization, 1999, National Drug Committee, 2000).

Chemically, turmeric contains curcuminoids, volatile oil, starch and resin. Curcuminoids refer to a group of compounds present in turmeric, which are chemically related to its principal constituent, curcumin (diferuloylmethane). Three main curcuminoids that can be isolated from turmeric are curcumin, desmethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. These curcuminoids are responsible for the yellow color of the herb (Department of Medical Sciences, 1998).

There are many reports on pharmacological and clinical studies of curcuminoids and the doses of curcuminoids used in those clinical studies varied from 500 mg to 1.2 g per day (Majeed, *et al.*, 1995, Soni and Kuttan, 1992). Recently it has been discovered that curcuminoids are potent antioxidant and possess chemopreventive activity (Selvam, *et al.*, 1995, Grinberg, 1996, Ramsewak, *et al.*, 2000, Huang, *et al.*, 1994, Limtrakul, *et al.*, 1997, Limtrakul, *et al.*, 2001). However, there appears to be only a few published articles on the toxicity of turmeric but none on the toxicity of curcuminoids (Bhavani, *et al.*, 1980, Sittisomwong, *et al.*, 1990, Qureshi, *et al.*, 1992). The present study was therefore conducted to determine toxicity of curcuminoids extract in rats in order to obtain scientific evidence about the safety of this group of compounds upon long-term consumption. The result of this study can be used to promote the safe use of curcuminoids in Thailand.

### Materials and Methods

#### Preparation of curcuminoids

Dried rhizomes of *Curcuma longa* L. were collected from local market and ground into powder. The turmeric powder was extracted with ethanol and then evaporated at low pressure to obtain ethanolic extract in the form of semisolid residue containing oil and curcuminoids. The oil part was then removed to give curcuminoid extract. The curcuminoid contents of the extract used in the experiment were 58-67% and the ratio of curcumin : demethoxycurcumin : bisdemethoxycurcumin was 1 : 0.4-0.5 : 0.2-0.3. The curcuminoid extract was suspended to the desired concentrations with 0.5% tragacanth suspension.

#### Treatment of the animals

Ninety male Wistar rats weighing 290-320 g and 90 female rats weighing 200-230 g from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom province, were used. The animals were housed in the animal facility of the Department of Medical Sciences.

The temperature in the animal room was kept at  $25 \pm 1$  °C with 60% relative humidity. The animals were allowed to have free access to food and clean water.

#### Six-months toxicity study

Ninety Wistar rats of each sex were randomly divided into 6 groups of 15 animals per sex. Group 1 (water control) received water 5 ml/kg BW/day orally and Group 2 (tragacanth control) received 0.5% tragacanth suspension 5 ml/kg BW/day. Groups 3-6 were given the curcuminoids suspended in 0.5% tragacanth suspension at the doses of 10, 50, 250 or 250 mg/kg BW/day, respectively. Body weight and food intake was measured weekly and the animals were observed for signs of abnormalities throughout the study. At the end of 6-month treatment period, the 1<sup>st</sup>-5<sup>th</sup> groups of rats were fasted for 18 hours, then anesthetized with ether and sacrificed by drawing blood samples from the inferior vena cava for hematological and biochemical examinations. The 6<sup>th</sup> group of rats, the recovery group, was allowed to have free access to food and water without curcuminoids administration for another 14 days before being sacrificed.

Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyzer (Cell dyne 3500, Abbott). Hematological parameters measured were white blood cell (WBC), %neutrophil, %lymphocyte, %monocyte, %basophil, %eosinophil, red blood cell (RBC), hemoglobin, hematocrit (Hct), platelet, plateletcrit (PCT), %reticulocyte, and reticulocyte.

Biochemical analysis of serum samples was performed using an automatic chemistry analyzer (Hitachi model 912). Biochemical parameters measured were aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), p-amylase, bilirubin, creatinine, blood urea nitrogen (BUN), cholesterol, triglyceride, total protein, albumin, uric acid, glucose, sodium, potassium, and chloride.

The positions, shapes, sizes and colors of internal organs, namely, brain, heart, both kidneys and lungs, trachea, esophagus, stomach, liver,

pancreas, intestine, spleen, bladder, and testis in male rats or ovary and uterus in female rats were visually observed for any signs of gross lesions. These organs were then collected, weighed to determine actual and relative organ weights, and preserved in 10% buffered formalin solution. Tissue slides were later prepared and stained with hematoxylin and eosin, and histopathological examinations were performed by a veterinary pathologist.

### Statistical analysis

Data were statistically analyzed using SPSS/PC program and statistically significant difference was set at  $p < 0.05$ . Food consumption, body weight, hematology, serum biochemistry and organ weight (absolute and relative) data analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test or Tamhane's test. Histopathological results were evaluated by Fisher exact test at  $p < 0.05$ .

## Results

### Effects of the curcuminoids on body weight and food intake

The body weights of male rats receiving 50 mg/kg/day of curcuminoids were significantly

higher than those of the tragacanth control group from the first week until the end of the study (Figure 1). The body weights of male rats receiving curcuminoids 10 mg/kg/day were significantly higher than those of the tragacanth control during the 3<sup>rd</sup>-5<sup>th</sup> weeks.

In female rats, the body weights of the group receiving curcuminoids 50 mg/kg/day were significantly higher than those of the water control during the 5<sup>th</sup> until the 8<sup>th</sup> weeks. The body weights of the group receiving curcuminoids 250 mg/kg/day were significantly higher than those of the water control between the 1<sup>st</sup> and 16<sup>th</sup> weeks. The body weights of tragacanth group were significantly higher than those of the water control group during the 1<sup>st</sup>-8<sup>th</sup> weeks (Figure 1).

The food intakes of both male and female rats receiving curcuminoids were significantly higher than those of the tragacanth controls on some weeks during the study (Figure 2).

### Effect of curcuminoids on actual organ weight and relative organ weight

Male rats treated with curcuminoids at the dose of 250 mg/kg/day had a higher actual weight and relative weight of the liver than the water and tragacanth control groups, and had a higher actual weight of the left kidneys than the tragacanth

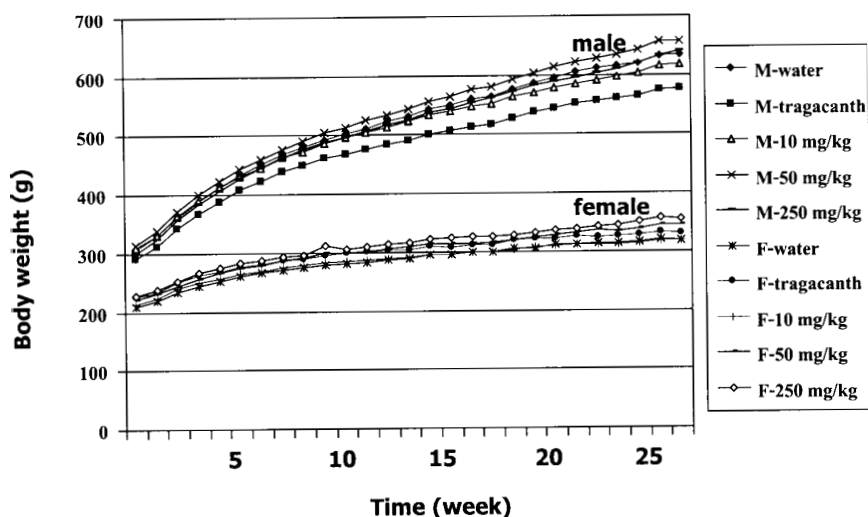


Figure 1. Growth curves of male and female rats receiving curcuminoids for 6 months.

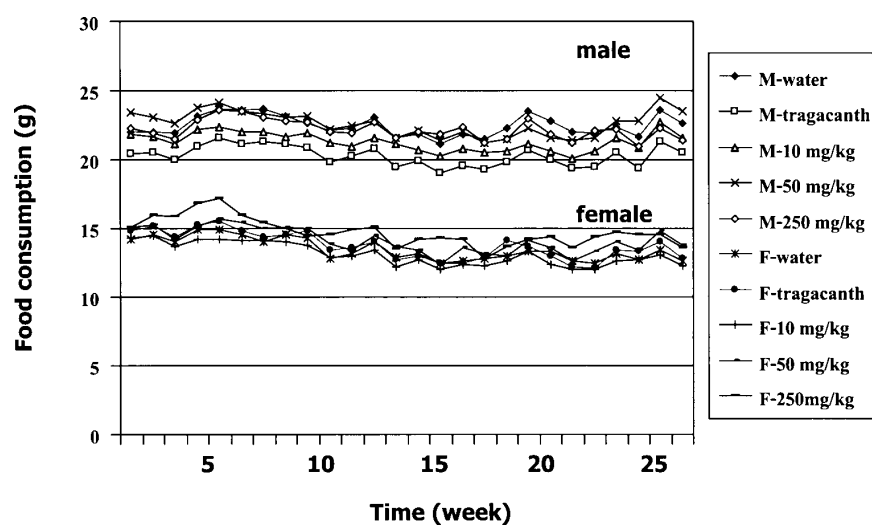


Figure 2. Food consumption of male and female rats receiving curcuminoids for 6 months.

control group. Male rats treated with curcuminoids at the dose of 50 mg/kg/day had a higher weight of the liver but a lower relative weight of the brain than the tragacanth control group. (Table 1 and Table 3).

Female rats treated with curcuminoids at the dose of 250 mg/kg had a higher actual weight of the liver than the water and tragacanth control groups. Female rats treated with curcuminoids at the dose of 50 mg/kg had a higher actual weight of the brain than the water control group. (Table 2 ).

#### Effect of curcuminoids on hematological parameters

Tables 5 and 6 showed that there was no difference of the number of white blood cells, %neutrophil, %lymphocyte, % monocyte, %basophil, %eosinophil, the number of red blood cells, hematocrit, platelet, PCT, or the number of reticulocytes between curcuminoids-treated groups and those of the water and tragacanth control groups of both male and female rats. The group of male rats receiving curcuminoids at the dose of 250 mg/kg/day had significantly lower hemoglobin level than the water control group. In the recovery group of male rats, the number of reticulocytes was significantly lower than that of

the water control group, while %hematocrit was significantly lower than those of the two control groups.

#### Effect of the curcuminoids on blood chemistry

In male and female rats, no difference in the serum levels of AST, ALT, P-amylase, bilirubin, creatinine, BUN, triglyceride, total protein, uric acid, glucose, sodium, potassium or chloride was found between all curcuminoids-treated groups and the water and tragacanth control groups. The group of male rats receiving curcuminoids at the dose of 250 mg/kg/day had significantly higher ALP than the tragacanth control group and had significantly higher albumin than the water and tragacanth control groups. The group of female rats receiving curcuminoids at the dose of 250 mg/kg/day had significantly higher cholesterol than the tragacanth control (Table 7-8).

#### Effect of curcuminoids on histopathology of internal organs

Upon gross examinations of internal organs, no abnormal signs were observed. Histopathological results indicated that some lesions were found in some groups or all groups of animals in the lung, heart, liver, kidney, spleen, intestine,

Table 1. Actual organ weight and body weight of male rats given curcuminoids orally for 6 months.

| Male                | Group of animals |             |                 |                 |                  |                    |
|---------------------|------------------|-------------|-----------------|-----------------|------------------|--------------------|
|                     | water            | tragacanth  | 10<br>mg/kg/day | 50<br>mg/kg/day | 250<br>mg/kg/day | 250-R<br>mg/kg/day |
|                     | N= 15            | N=15        | N=15            | N=14            | N=15             | N=15               |
| Initial body weight | 306±18           | 292±17      | 309±12          | 315±5**         | 300±15           | 301±24             |
| Final body weight   | 635±63           | 576±48      | 618±53          | 657±44**        | 640±76           | 670±68**           |
| Weight gain         | 329±51           | 285±35      | 309±51          | 342±42          | 340±67           | 368±59**           |
| Brain               | 2.08±0.075       | 2.10±0.063  | 2.11±0.067      | 2.11±0.070      | 2.14±0.120       | 2.14±0.043         |
| Heart               | 1.50±0.16        | 1.47±0.14   | 1.45±0.13       | 1.54±0.094      | 1.54±0.24        | 1.58±0.17          |
| Right kidney        | 1.37±0.11        | 1.31±0.10   | 1.31±0.11       | 1.40±0.12       | 1.60±0.60        | 1.49±0.17          |
| Left kidney         | 1.33±0.11        | 1.24±0.13   | 1.24±0.15       | 1.34±0.11       | 1.39±0.12**      | 1.42±0.18**        |
| Urinary bladder     | 0.143±0.032      | 0.143±0.021 | 0.153±0.022     | 0.169±0.030     | 0.145±0.034      | 0.148±0.031        |
| Liver               | 14.66±1.97       | 13.10±1.30  | 14.17±1.20      | 15.39±1.55**    | 17.05±2.03*,**   | 15.77±2.08**       |
| Spleen              | 1.10±0.13        | 1.04±0.15   | 1.14±0.15       | 1.12±0.14       | 1.15±0.17        | 1.11±0.16          |
| Stomach             | 2.19±0.20        | 2.04±0.22   | 2.18±0.20       | 2.23±0.17       | 2.23±0.21        | 2.29±0.25**        |
| Lung                | 1.87±0.28        | 1.70±0.18   | 1.87±0.22       | 1.72±0.14       | 1.83±0.13        | 1.92±0.18**        |
| R adrenal           | 0.035±0.066      | 0.033±0.054 | 0.030±0.051     | 0.036±0.055     | 0.034±0.068      | 0.034±0.055        |
| L adrenal           | 0.040±0.071      | 0.037±0.047 | 0.035±0.055     | 0.039±0.061     | 0.039±0.067      | 0.038±0.054        |
| Right testis        | 3.16±0.55        | 3.10±0.37   | 3.24±0.26       | 3.23±0.25       | 3.23±0.44        | 3.21±0.23          |
| Left testis         | 3.09±0.38        | 3.15±0.42   | 3.24±0.31       | 3.54±1.08       | 3.22±0.41        | 3.20±0.25          |

Each value represents mean±SD.

\* Significantly different from water control group ( $p < 0.05$ ).\*\* Significantly different from tragacanth control group ( $p < 0.05$ ).

thyroid gland, and testis (in male rats), or uterus and mammary gland (in female rats) (Table 9-10). Meanwhile, no lesion was found in the brain, pancreas, esophagus, and salivary gland in all groups of animals. The lesions found in all or some groups of both male and female animals were lymphoid proliferated peribronchioles, fatty degeneration of the liver, tubular cyst of the kidney, lymphoid hyperplasia of the spleen, and lymphoid aggregation in the submucosal layer of the intestine. However, the incidence of those changes

in the controls and curcuminoids-treated groups was not significantly different (Table 9-10).

Other histopathological findings in some groups of male rats treated with curcuminoids were focal myocardiosis, testicular atrophy, follicular hyperplasia of the thyroid gland. The incidence of those abnormalities was, however, neither dose-related nor significantly different from that of the controls (Table 9). Adrenocortical fatty degeneration were found in all groups of male rats with the highest incidence (10/15) in the



Table 2. Actual organ weight and body weight of female rats given curcuminoids orally for 6 months.

| Female              | Group of animals |             |                 |                 |                  |                    |
|---------------------|------------------|-------------|-----------------|-----------------|------------------|--------------------|
|                     | water            | tragacanth  | 10<br>mg/kg/day | 50<br>mg/kg/day | 250<br>mg/kg/day | 250-R<br>mg/kg/day |
|                     | N= 15            | N=15        | N=15            | N=15            | N=15             | N=15               |
| Initial body weight | 209±9            | 225±8*      | 214±14          | 221±11          | 227±17*          | 221±14             |
| Final body weight   | 318±29           | 330±24      | 318±31          | 345±31          | 356±37           | 364±55*            |
| Weight gain         | 110±25           | 105±19      | 104±24          | 124±27          | 130±31           | 143±47*,**         |
| Brain               | 1.91±0.066       | 1.94±0.099  | 1.94±0.088      | 1.99±0.066*     | 1.96±0.055       | 1.93±0.071         |
| Heart               | 0.91±0.090       | 0.95±0.099  | 0.91±0.049      | 0.97±0.059      | 1.00±0.095       | 0.98±0.117         |
| Right kidney        | 0.82±0.082       | 0.81±0.043  | 0.80±0.106      | 0.87±0.217      | 0.89±0.112       | 0.81±0.241         |
| Left kidney         | 0.78±0.072       | 0.78±0.058  | 0.76±0.092      | 0.76±0.119      | 0.85±0.087       | 0.80±0.092         |
| Urinary bladder     | 0.078±0.011      | 0.086±0.012 | 0.082±0.095     | 0.086±0.011     | 0.085±0.012      | 0.080±0.096        |
| Liver               | 6.94±0.74        | 6.98±0.55   | 6.78±0.73       | 7.44±0.65       | 8.47±1.55*,**    | 7.80±1.15          |
| Spleen              | 0.65±0.052       | 0.74±0.14   | 0.68±0.12       | 0.69±0.10       | 0.74±0.10        | 0.77±0.19          |
| Stomach             | 1.57±0.17        | 1.59±0.18   | 1.57±0.23       | 1.59±0.20       | 1.59±0.17        | 1.63±0.20          |
| Lung                | 1.33±0.11        | 1.33±0.13   | 1.28±0.11       | 1.32±0.11       | 1.34±0.11        | 1.33±0.098         |
| R adrenal           | 0.039±0.064      | 0.038±0.081 | 0.039±0.049     | 0.038±0.055     | 0.041±0.079      | 0.040±0.068        |
| L adrenal           | 0.043±0.058      | 0.040±0.080 | 0.039±0.055     | 0.043±0.044     | 0.042±0.089      | 0.041±0.065        |
| R ovary             | 0.065±0.014      | 0.062±0.017 | 0.062±0.013     | 0.060±0.014     | 0.062±0.016      | 0.084±0.116        |
| L ovary             | 0.063±0.017      | 0.064±0.097 | 0.068±0.019     | 0.067±0.014     | 0.068±0.019      | 0.058±0.011        |
| uterus              | 0.63±0.26        | 0.80±0.30   | 0.67±0.14       | 0.71±0.23       | 0.81±0.17        | 0.72±0.23          |

Each value represents mean±SD.

\* Significantly different from water control group ( $p < 0.05$ ).\*\* Significantly different from tragacanth control group ( $p < 0.05$ ).

group treated with curcuminoids 250 mg/kg, yet the incidence was not significantly different from controls (Table 9). An isolated case of renal cell carcinoma was detected in one male rat receiving curcuminoids 250 mg/kg

In female rats, tubular cast was found in the kidneys of all groups of animals and glandular hyperplasia of the mammary glands was found in some groups of animals, but the incidence was not dose-related or significantly different between

groups (Table 10). Glandular hyperplasia of the uterus and cervix was found in only one animal treated with 50 mg/kg curcuminoids, while congestion of the adrenal gland was found in only one animal in the water control group.

### Discussion

Even though it was found that the body weights of some groups of curcuminoids-treated

**Table 3. Organ weight relative to body weight @ (g/kg BW) of male rats given curcuminoids orally for 6 months.**

| Male                     | Group of animals |             |                 |                 |                  |                    |
|--------------------------|------------------|-------------|-----------------|-----------------|------------------|--------------------|
|                          | water            | tragacanth  | 10<br>mg/kg/day | 50<br>mg/kg/day | 250<br>mg/kg/day | 250-R<br>mg/kg/day |
|                          | N= 15            | N=15        | N=15            | N=14            | N=15             | N=15               |
| <b>Final body weight</b> | 635±63           | 576±48      | 618±53          | 657±44**        | 640±76           | 670±68**           |
| <b>Brain</b>             | 3.36±0.27        | 3.72±0.30*  | 3.51±0.32       | 3.28±0.21**     | 3.49±0.52        | 3.24±0.33**        |
| <b>Heart</b>             | 2.42±0.24        | 2.60±0.24   | 2.40±0.19       | 2.39±0.17       | 2.49±0.29        | 2.38±0.18          |
| <b>Right kidney</b>      | 2.20±0.18        | 2.33±0.23   | 2.16±0.15       | 2.18±0.24       | 2.56±0.81        | 2.25±0.18          |
| <b>Left kidney</b>       | 2.14±0.16        | 2.20±0.24   | 2.05±0.19       | 2.08±0.22       | 2.26±0.21        | 2.13±0.18          |
| <b>Urinary bladder</b>   | 0.23±0.054       | 0.26±0.032  | 0.25±0.048      | 0.26±0.050      | 0.24±0.049       | 0.22±0.048         |
| <b>Liver</b>             | 23.45±1.67       | 23.14±1.79  | 23.38±1.30      | 23.82±1.86      | 27.54±3.14*,**   | 23.66±1.76         |
| <b>Spleen</b>            | 1.76±0.17        | 1.83±0.24   | 1.88±0.20       | 1.74±0.23       | 1.86±0.26        | 1.68±0.21          |
| <b>Stomach</b>           | 3.53±0.32        | 3.60±0.26   | 3.60±0.33       | 3.46±0.33       | 3.61±0.44        | 3.46±0.34          |
| <b>Lung</b>              | 3.00±0.31        | 3.01±0.25   | 3.09±0.41       | 2.67±0.23       | 2.97±0.39        | 2.90±0.32          |
| <b>Right adrenal</b>     | 0.059±0.092      | 0.059±0.098 | 0.054±0.085     | 0.056±0.098     | 0.058±0.016      | 0.052±0.010        |
| <b>Left adrenal</b>      | 0.064±0.091      | 0.067±0.013 | 0.059±0.010     | 0.062±0.011     | 0.066±0.020      | 0.056±0.071        |
| <b>Right testis</b>      | 5.08±0.87        | 5.48±0.56   | 5.38±0.66       | 5.04±0.59       | 5.26±0.97        | 4.86±0.52          |
| <b>Left testis</b>       | 5.00±0.74        | 5.56±0.67   | 5.37±0.68       | 5.53±1.90       | 5.23±0.88        | 4.84±0.48          |

@ Organ weight relative to body weight is expressed as (g organ weight/g body weight) × 1000  
Each value represents mean ± SD.

\* Significantly different from water control group ( $p < 0.05$ ).

\*\* Significantly different from tragacanth control group ( $p < 0.05$ ).

rats were significantly higher than those of the controls on some weeks during the experimental period, this may in part be due to the initial body weights which were significantly higher than those of the controls from the beginning of the study. There was no difference of the hematological parameters between curcuminoids-treated groups and those of the control groups, except for male rats treated with high dose of curcuminoids that had significantly lower hemoglobin level than the water control group, but the higher hemoglobin level was still within the normal range (Gad, 1992)

Biochemical examinations of the serum showed that male rats receiving high dose of curcuminoids had a significantly higher ALP level than the tragacanth control, and a significantly higher albumin level than the two control groups (Table 7). However, both the ALP and albumin levels of this group of animals were still within the normal range (Gad 1992). In addition, these changes appeared to be reversible since the levels of both ALP and albumin in the recovery group were not different from those of the two controls. Female rats receiving high dose of cur-

**Table 4. Organ weight relative to body weight<sup>@</sup> (g/kg BW) of female rats given curcuminoids orally for 6 months.**

| Female                   | Group of animals |            |                 |                 |                  |                    |
|--------------------------|------------------|------------|-----------------|-----------------|------------------|--------------------|
|                          | water            | tragacanth | 10<br>mg/kg/day | 50<br>mg/kg/day | 250<br>mg/kg/day | 250-R<br>mg/kg/day |
|                          | N= 15            | N=15       | N=15            | N=15            | N=15             | N=15               |
| <b>Final body weight</b> | 318±29           | 330±24     | 318±31          | 345±31          | 356±37           | 364±55*            |
| <b>Brain</b>             | 6.14±0.53        | 6.03±0.51  | 6.25±0.45       | 5.94±0.55       | 5.65±0.53        | 5.48±0.79*         |
| <b>Heart</b>             | 2.94±0.28        | 2.96±0.32  | 2.92±0.16       | 2.87±0.20       | 2.88±0.23        | 2.75±0.34          |
| <b>Right kidney</b>      | 2.62±0.31        | 2.53±0.25  | 2.59±0.28       | 2.60±0.74       | 2.55±0.34        | 2.27±0.69          |
| <b>Left kidney</b>       | 2.50±0.29        | 2.44±0.27  | 2.45±0.22       | 2.26±0.35       | 2.45±0.26        | 2.25±0.30          |
| <b>Urinary bladder</b>   | 0.25±0.032       | 0.27±0.040 | 0.27±0.028      | 0.26±0.034      | 0.24±0.047       | 0.23±0.041**       |
| <b>Liver</b>             | 22.35±3.10       | 21.61±1.30 | 21.85±2.25      | 22.09±2.16      | 24.23±3.54       | 21.73±2.04         |
| <b>Spleen</b>            | 2.11±0.29        | 2.30±0.44  | 2.18±0.31       | 2.05±0.35       | 2.13±0.27        | 2.14±0.44          |
| <b>Stomach</b>           | 5.07±0.80        | 4.94±0.59  | 5.06±0.85       | 4.73±0.67       | 4.57±0.60        | 4.60±0.77          |
| <b>Lung</b>              | 4.27±0.49        | 4.12±0.52  | 4.12±0.33       | 3.94±0.50       | 3.87±0.45        | 3.76±0.52          |
| <b>Right adrenal</b>     | 0.13±0.019       | 0.12±0.029 | 0.13±0.020      | 0.12±0.017      | 0.12±0.020       | 0.11±0.016         |
| <b>Left adrenal</b>      | 0.14±0.028       | 0.12±0.026 | 0.13±0.020      | 0.13±0.016      | 0.12±0.023       | 0.12±0.024         |
| <b>Right ovary</b>       | 0.21±0.048       | 0.19±0.057 | 0.20±0.039      | 0.18±0.043      | 0.18±0.052       | 0.25±0.37          |
| <b>Left ovary</b>        | 0.20±0.052       | 0.20±0.032 | 0.22±0.054      | 0.20±0.033      | 0.20±0.051       | 0.17±0.041         |
| <b>Uterus</b>            | 2.01±0.81        | 2.50±0.92  | 2.19±0.55       | 2.13±0.70       | 2.35±0.58        | 2.04±0.73          |

<sup>@</sup> Organ weight relative to body weight is expressed as (g organ weight/g body weight) × 1000

Each value represents mean ± SD.

\* Significantly different from water control group (p &lt; 0.05).

\*\* Significantly different from tragacanth control group (p &lt; 0.05).

cuminoids had significantly higher cholesterol level than the tragacanth control; however, it appeared to be a reversible change because cholesterol level of the recovery group was not different from that of the tragacanth control (Table 8).

Histopathological examination of the internal organs of male rats receiving high dose of curcuminoids showed an apparently dose-related incidence of mild degree of fatty degeneration in the liver and adrenocortical fatty degeneration than that of the two controls. The incidence of

both histopathological findings in the recovery group, however, appeared to be lower than that of the high dose group and not significantly different from that of the controls suggesting that these observed pathological changes were reversible. Since there were no change of serum triglyceride or glucose levels in curcuminoids-treated male rats, the fatty degeneration of the two organs was not likely due to an increase of serum triglyceride or glucose levels. The reason for the fatty change in the two organs was not known.

Table 5. Hematological examination results of male rats given curcuminoids orally for 6 months.

| Male                      | Group of animals   |                    |                    |                    |                    |                     |
|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
|                           | water              | tragacanth         | 10<br>mg/kg/day    | 50<br>mg/kg/day    | 250<br>mg/kg/day   | 250-R<br>mg/kg/day  |
|                           | N= 15              | N=15               | N=15               | N=14               | N=15               | N=15                |
| WBC (K/uL)                | 6.73±2.14          | 5.33±1.27          | 5.76±1.32          | 5.92±1.27          | 5.20±1.51          | 6.37±1.26           |
| %Neutrophil               | 17.88±5.76         | 17.46±5.66         | 18.70±4.89         | 18.56±5.34         | 15.75±4.36         | 16.78±3.85          |
| %Lymphocyte               | 78.69±5.19         | 79.32±6.18         | 77.98±5.21         | 77.96±5.47         | 80.28±5.72         | 79.80±4.14          |
| %Monocyte                 | 1.32±1.43          | 1.22±1.66          | 1.04±1.27          | 1.06±1.07          | 1.78±1.91          | 0.99±0.89           |
| %Basophil                 | 0.64±0.24          | 0.55±0.26          | 0.56±0.29          | 0.64±0.47          | 0.66±0.27          | 0.70±0.31           |
| %Eosinophil               | 1.48±0.29          | 1.44±0.49          | 1.71±0.65          | 1.79±0.53          | 1.52±0.33          | 1.73±0.73           |
| RBC(×10 <sup>6</sup> /uL) | 9.01±0.39          | 8.79±0.32          | 8.77±0.39          | 8.90±0.39          | 8.74±0.45          | 8.43±0.74*          |
| Hemoglobin<br>(g/dL)      | 16.22±0.57         | 15.78±0.46         | 15.73±0.43         | 15.76±0.41         | 15.56±0.48*        | 15.87±0.55          |
| %Hematocrit               | 46.65±2.11         | 45.58±1.90         | 44.47±2.69         | 45.55±1.29         | 44.65±1.99         | 42.69±4.38*,**      |
| Platelet (K/uL)           | 929.87±111.73      | 869.10±115.16      | 908.23±58.07       | 905.07±73.06       | 900.43±103.50      | 906.80±125.08       |
| PCT (%)                   | 0.92±0.14          | 0.84±0.15          | 0.89±0.13          | 0.86±0.081         | 0.86±0.099         | 0.92±0.17           |
| %Reticulocyte             | 18.48±6.51         | 13.19±6.06         | 14.38±2.57         | 13.82±5.14         | 14.93±5.58         | 13.73±5.07          |
| Reticulocyte<br>(K/uL)    | 1676.53±<br>579.59 | 1158.93±<br>569.99 | 1260.00±<br>270.40 | 1223.21±<br>457.83 | 1312.86±<br>510.37 | 1133.07±<br>429.57* |

Each value represents mean ± SD.

\* Significantly different from water control group ( $p < 0.05$ ).\*\* Significantly different from tragacanth control group ( $p < 0.05$ ).

Therefore, if curcuminoids will be taken at a high dose for a long period of time, patients should be advised to observe themselves for any possible sign of liver toxicity, i.e. jaundice or yellowing of the skin or the eye, brown urine, nausea, vomiting, abdominal pain, light-colored stool, unusual tiredness, and loss of appetite. In addition, liver function test should also be performed periodically.

### Conclusion

Six-month chronic toxicity study of curcuminoids in Wistar rats indicated that curcuminoids at the doses of 10 and 50 mg/kg/day did not

produce any significant dose-related changes of organ weights, hematological parameters, serum chemistry, or pathology of the internal organs. Both male and female rats receiving curcuminoids 250 mg/kg/day had higher actual weights of the liver than those of the two control groups. Fatty degeneration of the liver occurred in a dose-dependent manner in male rats, while it was observed in 2 out of 15 female rats receiving the highest dose of curcuminoids. In addition, a dose-related adrenocortical fatty degeneration was also observed in curcuminoids-treated male rats but not in female rats. However, the incidence of these pathological changes was not significantly different between curcuminoids-

Table 6. Hematological examination results of female rats given curcuminoids orally for 6 months

| Female                     | Group of animals   |                    |                    |                   |                    |                    |
|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|                            | water              | tragacanth         | 10<br>mg/kg/day    | 50<br>mg/kg/day   | 250<br>mg/kg/day   | 250-R<br>mg/kg/day |
|                            | N= 15              | N=15               | N=15               | N=15              | N=15               | N=15               |
| WBC (K/uL)                 | 3.16±1.51          | 2.83±1.18          | 2.40±0.67          | 2.65±1.13         | 2.69±0.92          | 2.36±0.96          |
| %Neutrophil                | 19.91±8.37         | 21.36±11.16        | 22.06±6.65         | 23.19±4.60        | 21.33±5.71         | 21.93±6.80         |
| %Lymphocyte                | 75.56±9.62         | 75.49±11.12        | 73.54±7.70         | 72.31±5.55        | 73.40±6.31         | 73.22±8.05         |
| %Monocyte                  | 2.05±1.84          | 0.90±0.44          | 1.47±1.42          | 1.54±1.68         | 2.26±2.48          | 2.09±2.19          |
| %Basophil                  | 0.51±0.54          | 0.48±0.31          | 0.55±0.49          | 0.50±0.24         | 0.73±0.49          | 0.57±0.32          |
| %Eosinophil                | 3.10±4.28          | 1.77±0.61          | 2.37±0.92          | 2.46±1.11         | 2.29±0.62          | 2.19±0.84          |
| RBC(× 10 <sup>6</sup> /uL) | 8.00±0.48          | 7.77±0.56          | 7.86± 0.50         | 7.82±0.49         | 7.75±0.40          | 7.63±0.49          |
| Hemoglobin<br>(g/dL)       | 15.54±0.49         | 15.18±0.75         | 15.31±0.55         | 15.31±0.74        | 15.20±0.46         | 15.10±0.46         |
| %Hematocrit                | 44.38±2.59         | 43.16±1.75         | 43.74±2.62         | 43.79±2.26        | 43.24±1.93         | 42.40±2.10         |
| Platelet<br>(K/uL)         | 855.07±100.51      | 803.20±84.62       | 848.00±98.19       | 843.37±100.51     | 814.03±87.63       | 812.30±99.91       |
| PCT (%)                    | 0.84±0.12          | 0.76±0.073         | 0.80±0.11          | 0.81±0.11         | 0.76±0.069         | 0.78±0.09          |
| %Reticulocyte              | 16.72±6.57         | 17.49±5.13         | 15.47±5.70         | 12.81±5.85        | 15.81±4.72         | 16.59±5.36         |
| Reticulocyte<br>(K/uL)     | 1340.07±<br>535.38 | 1343.80±<br>337.44 | 1234.50±<br>493.81 | 983.73±<br>423.91 | 1223.07±<br>400.45 | 1268.14±<br>444.68 |

Each value represents mean ± SD.

\* Significantly different from water control group ( $p < 0.05$ ).

\*\* Significantly different from tragacanth control group ( $p < 0.05$ ).

treated animals and the two controls, and was lower in the recovery group suggesting a reversible nature of these changes. Taken together, the results suggested that long term administration of curcuminoids at a high dose might affect the liver of the rat morphologically and functionally in a reversible manner.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to Asst. Prof. Dr. Anuthep Rungseepipat of the Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, for histopathological examinations of tissue samples. We also

thank Dr. Reywadee Butraporn and the staffs of the Animal Facility of the Department of Medical Sciences for the animal care.

#### References

- Bhavani Shankar, T.N., Shantha, N.V., Ramesh, H.P., Murthy, I.A.S., and Murthy, V.S. 1980. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): Acute toxicity studies in rats, guineapigs & monkeys. *Indian J. Exp. Biol.* 18: 73-75.
- Department of Medical Sciences, 1998. Khamin Chan. *In Thai Herbal Pharmacopoeia*. Volume 1., Bangkok. p. 38-44.
- Gad, S.C. 1992. The Rat: Pathology. *In Animal Models in Toxicology* (Eds. S.C. Gad and C.P. Chengellis), Marcel Dekker, New York. p. 81.

Table 7. Blood chemistry results of male rats given curcuminoids orally for 6 months

| Male                    | Group of animals   |                    |                    |                    |                    |                      |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
|                         | water              | tragacanth         | 10<br>mg/kg/day    | 50<br>mg/kg/day    | 250<br>mg/kg/day   | 250-R<br>mg/kg/day   |
|                         | N= 15              | N=15               | N=15               | N=14               | N=15               | N=15                 |
| AST (U/L)               | 70.47±8.55         | 68.67±6.91         | 71.93±10.09        | 73.86±14.42        | 67.07±6.58         | 71.13±15.09          |
| ALT (U/L)               | 39.60±9.17         | 36.20±4.89         | 35.60±6.95         | 39.07±10.48        | 35.73±7.98         | 42.13±16.01          |
| ALP (U/L)               | 67.47±9.16         | 62.73±9.74         | 69.07±16.37        | 74.21±12.74        | 79.40±13.39**      | 68.13±12.67          |
| p-amylase               | 1960.87±<br>260.43 | 1833.73±<br>139.52 | 1884.60±<br>205.10 | 2099.36±<br>207.49 | 1992.73±<br>311.97 | 2063.60±<br>271.07   |
| Bilirubin<br>(mg/dL)    | 0.066±0.039        | 0.073±0.037        | 0.070±0.028        | 0.080±0.025        | 0.069±0.042        | 0.052±0.036          |
| Creatinine<br>(mg/dL)   | 0.67±0.062         | 0.68±0.045         | 0.65±0.061         | 0.65±0.041         | 0.65±0.063         | 0.67±0.041           |
| BUN (mg/dL)             | 18.64±1.55         | 19.19±3.16         | 18.28±2.38         | 17.64±2.05         | 17.80±2.04         | 17.63±1.83           |
| Cholesterol<br>(mg/dL)  | 89.31±<br>19.55    | 85.75±<br>16.37    | 91.71±<br>18.77    | 81.68±<br>15.80    | 104.47±<br>22.79   | 118.40±<br>24.20*,** |
| Triglyceride<br>(mg/dL) | 183.42±<br>72.53   | 139.42±<br>33.75   | 155.20±<br>30.13   | 149.90±<br>38.95   | 152.12±<br>54.28   | 253.94±<br>88.26**   |
| Total protein<br>(g/dL) | 6.95±0.31          | 6.83±0.19          | 6.91±0.29          | 6.94±0.23          | 6.94±0.29          | 7.15±0.31**          |
| Albumin (g/dL)          | 4.27±0.14          | 4.23±0.09          | 4.25±0.14          | 4.36±0.13          | 4.44±0.19*,**      | 4.24±0.17            |
| Uric acid<br>(mg/dL)    | 2.71±1.34          | 1.51±0.59          | 1.90±1.03          | 1.84±0.87          | 2.01±0.89          | 1.87±0.87            |
| Glucose<br>(mg/dL)      | 185.57±30.78       | 154.04±17.72*      | 165.93±21.81       | 169.66±22.36       | 171.07±28.88       | 172.28±19.04         |
| Sodium<br>(mmol/L)      | 146.47±2.26        | 146.80±1.82        | 147.33±1.84        | 147.86±1.66        | 148.20±1.90        | 147.13±1.25          |
| Potassium<br>(mmol/L)   | 6.54±1.37          | 5.69±0.81          | 5.65±0.37          | 5.44±0.48          | 5.65±0.43          | 5.93±0.75            |
| Chloride<br>(mmol/L)    | 109.80±2.43        | 111.27±1.87        | 111.40±1.55        | 111.57±1.83        | 111.87±2.26        | 112.73±2.31*         |

Each value represents mean±SD.

\* Significantly different from water control group (p &lt; 0.05).

\*\* Significantly different from tragacanth control group (p &lt; 0.05).

Table 8. Blood chemistry results of female rats given curcuminoids orally for 6 months

| Female                  | Group of animals   |                    |                    |                    |                    |                     |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
|                         | water              | tragacanth         | 10<br>mg/kg/day    | 50<br>mg/kg/day    | 250<br>mg/kg/day   | 250-R<br>mg/kg/day  |
|                         | N= 15              | N=15               | N=15               | N=15               | N=15               | N=15                |
| AST (U/L)               | 86.87±29.15        | 93.07±24.86        | 102.80±41.78       | 97.40±36.66        | 73.80±12.39        | 74.07±11.75         |
| ALT (U/L)               | 43.60±17.44        | 40.93±19.58        | 47.33±17.77        | 47.00±18.35        | 36.80±11.10        | 35.40±9.83          |
| ALP (U/L)               | 22.67±4.12         | 23.27±7.27         | 20.73±3.20         | 23.60±6.43         | 23.60±4.61         | 22.67±4.29          |
| p-amylase               | 1217.53±<br>299.96 | 1143.27±<br>170.25 | 1146.67±<br>178.65 | 1082.53±<br>212.42 | 1230.60±<br>167.27 | 1298.60±<br>238.92  |
| Bilirubin<br>(mg/dL)    | 0.097±0.037        | 0.096±0.051        | 0.099±0.040        | 0.080±0.052        | 0.112±0.059        | 0.074±0.035         |
| Creatinine<br>(mg/dL)   | 0.75±0.079         | 0.76±0.084         | 0.76±0.070         | 0.77±0.090         | 0.75±0.065         | 0.74±0.061          |
| BUN (mg/dL)             | 21.45±3.45         | 21.95±3.72         | 22.34±2.70         | 21.50±2.60         | 19.99±3.22         | 19.05±3.13          |
| Cholesterol<br>(mg/dL)  | 71.59±14.39        | 65.02±10.76        | 74.24±9.83         | 79.05±16.66        | 83.46±18.86**      | 72.53±16.38         |
| Triglyceride<br>(mg/dL) | 109.93±30.98       | 112.82±40.87       | 122.29±39.66       | 127.74±39.82       | 134.81±41.25       | 143.35±71.07        |
| Total protein<br>(g/dL) | 7.27±0.49          | 7.28±0.36          | 7.31±0.27          | 7.40±0.36          | 7.56±0.29          | 7.33±0.44           |
| Albumin<br>(g/dL)       | 5.00±0.31          | 5.00±0.35          | 5.09±0.21          | 5.12±0.25          | 5.28±0.22          | 5.05±0.27           |
| Uric acid<br>(mg/dL)    | 1.77±0.86          | 1.43±0.91          | 1.94±1.21          | 1.47±0.68          | 1.58±0.82          | 1.48±0.55           |
| Glucose<br>(mg/dL)      | 141.07±22.46       | 133.45±19.19       | 144.32±33.92       | 139.75±23.68       | 143.33±15.77       | 153.70±23.05        |
| Sodium<br>(mmol/L)      | 147.13±1.60        | 147.67±1.76        | 147.67±1.68        | 148.07±1.44        | 148.20±1.57        | 148.47±0.92         |
| Potassium<br>(mmol/L)   | 5.42±0.94          | 4.69±0.96          | 5.15±1.06          | 4.88±0.95          | 5.05±0.95          | 4.63±0.67           |
| Chloride<br>(mmol/L)    | 113.20±1.66        | 113.07±1.58        | 113.40±1.40        | 113.33±1.84        | 113.73±1.94        | 116.93±<br>1.87*,** |

Each value represents mean±SD.

\* Significantly different from water control group (p &lt; 0.05).

\*\* Significantly different from tragacanth control group (p &lt; 0.05).

**Table 9. Histopathological results of visceral organs in male rats given curcuminoids orally for 6 months**

| Organs        | Microscopic findings                  | Group of animals |            |                 |                 |                  |                    |
|---------------|---------------------------------------|------------------|------------|-----------------|-----------------|------------------|--------------------|
|               |                                       | water            | tragacanth | 10<br>mg/kg/day | 50<br>mg/kg/day | 250<br>mg/kg/day | 250-R<br>mg/kg/day |
| Lung          | Lymphoid proliferated peribronchioles | 4/14             | 6/14       | 8/15            | 4/14            | 3/15             | 8/15               |
| Heart         | Focal myocardiosis                    | 3/14             | 1/14       | 1/15            | 1/14            | 0/15             | 0/15               |
| Liver         | Fatty degeneration                    | 4/14             | 3/14       | 2/15            | 5/14            | 8/15             | 4/15               |
| Kidney        | Tubular cyst                          | 2/14             | 2/14       | 0/15            | 2/14            | 0/15             | 2/15               |
|               | Renal cell carcinoma                  | 0/14             | 0/14       | 0/15            | 0/14            | 1/15             | 0/15               |
| Spleen        | Lymphoid hyperplasia                  | 0/14             | 0/14       | 0/15            | 1/14            | 0/15             | 0/15               |
| Intestine     | Lymphoid aggregated submucosal layer  | 2/14             | 2/14       | 4/15            | 2/14            | 0/15             | 2/15               |
| Testis        | Atrophy                               | 1/14             | 2/14       | 0/15            | 0/15            | 1/15             | 0/15               |
| Adrenal gland | Cortical fatty degeneration           | 5/14             | 5/14       | 2/15            | 5/14            | 10/15            | 6/15               |
| Thyroid gland | Follicular hyperplasia                | 0/14             | 0/14       | 0/15            | 2/14            | 0/15             | 0/15               |

The results were expressed as the number of rats with pathological findings per total number of rats treated

**Table 10. Histopathological results of visceral organs in female rats given curcuminoids orally for 6 months**

| Organs            | Microscopic findings                  | Group of animals |            |                 |                 |                  |                    |
|-------------------|---------------------------------------|------------------|------------|-----------------|-----------------|------------------|--------------------|
|                   |                                       | water            | tragacanth | 10<br>mg/kg/day | 50<br>mg/kg/day | 250<br>mg/kg/day | 250-R<br>mg/kg/day |
| Lung              | Lymphoid proliferated peribronchioles | 4/15             | 5/14       | 6/14            | 2/15            | 2/15             | 6/15               |
| Heart             | Myocardial calcification              | 1/15             | 0/14       | 0/14            | 0/15            | 0/15             | 0/15               |
| Liver             | Fatty degeneration                    | 0/15             | 0/14       | 0/15            | 0/14            | 2/15             | 0/15               |
| Kidney            | Tubular cast                          | 5/15             | 3/14       | 4/14            | 7/15            | 6/15             | 5/15               |
|                   | Tubular cyst                          | 0/15             | 0/14       | 0/14            | 1/15            | 0/15             | 0/15               |
| Spleen            | Lymphoid hyperplasia                  | 0/14             | 0/14       | 0/15            | 1/14            | 0/15             | 0/15               |
| Intestine         | Lymphoid aggregated submucosal layer  | 2/15             | 2/14       | 1/14            | 0/15            | 0/15             | 3/15               |
| Uterus and cervix | Glandular hyperplasia                 | 0/15             | 0/14       | 0/14            | 1/15            | 0/15             | 3/15               |
| Mammary gland     | Glandular hyperplasia                 | 0/15             | 2/14       | 2/14            | 0/15            | 0/15             | 3/15               |
| Adrenal gland     | Congestion                            | 1/15             | 0/14       | 0/14            | 0/15            | 0/15             | 0/15               |

The results were expressed as the number of rats with pathological findings per total number of rats treated



- Grinberg, L.N., Shalev, O., Tonnesen H.H., and Rachmilewitz, E.A. 1996. Studies on curcumin and curcuminoids: XXVI. Antioxidant effects of curcumin on the red blood cell membrane. *Int. J. Pharmaceutics* 132: 251-257.
- Haung, M.T., Lou, Y.R., Ma, W., Newmark, H.L., Reuhl, K.R., and Conney, A.H. 1994. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 54: 5841-5847.
- Limtrakul, P., Lipigorngoson, S., Namwong, O., Apisariyakul, A., and Dunn, F.W. 1997. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.* 116: 197-203.
- Limtrakul, P., Anuchapreeda, S., Lipigorngoson, S., and Dunn F.W. 2001. Inhibition of carcinogen-induced c-Ha-ras and c-fos proto-oncogenes expression by dietary curcumin. *BMC Cancer* 1: 1.
- Majeed, M., Badmaev, V., and Murray, F. 1995. Turmeric and the healing curcuminoids. Keats Publishing, New Canaan, Connecticut. p. 26-27.
- National Drug Committee. 2000. Khamin Chan. **In** National List of Essential Drug A.D. 1999. (List of Herbal Medicine Products). Association of Thailand Agricultural Co-op Printing, Bangkok. p. 16-23.
- Qureshi, S., Shah, A.H., and Ageel, A.M. 1992. Toxicity Studies on *Alpinia galanga* and *Curcuma longa*. *Planta. Med.* 58: 124-127.
- Ramsewak, R.S., De Witt, D.L. and Nair, M.G. 2000. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins of curcumin I-III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine* 7: 303-308.
- Selvam, R., Subramanian, M., Gayathri, R., and Angayarkanni, N. 1995. The anti-oxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*). *J. Ethnopharmacol.* 47: 59-67.
- Sittisomwong, N., Leelasangaluk, V., Chivapat, S., Wangmad, A., Ragsaman, P. and Chuntarachaya, C. 1990. Acute and subchronic toxicity of turmeric. *Bull. Dept. Med. Sci.* 32(3): 101-111.
- Soni, K.B. and Kuttan, R. 1992. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. *Indian J. Physiol Pharmacol* 36(4): 273-275.
- Smith, J.E., 1995. Comparative hematology. **In** Williams Hematology 5<sup>th</sup> Edition (Eds. E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Collier and T.J. Kipps) McGraw-Hill, New York, p.77-85.
- Thamlikitkul, V., Bunyapraphatsara, N., Dechatiwongse, T., Theerapong, S., Chantrakul, C., Thanaveerasuwan, T., Nimitnon, S., Boonroj, P., Punkrut, W., Gingsungneon, V., *et al.* 1989. Randomized double blind study of *Curcuma domestica* Val. for dyspepsia. *J. Med. Assoc. Thai.* 72: 613-620.
- World Health Organization. 1999. Rhizoma Curcumae Longae. **In** WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. I. Malta. p. 115-124.



## Long-term consumption of polysaccharide gel from durian fruit-hulls in mice

Sunanta Pongsamart<sup>1</sup>, Achara Tawatsin<sup>3</sup>, and Suchada Sukrong<sup>2</sup>

### Abstract

Pongsamart, S., Tawatsin, A. and Sukrong, S.

**Long-term consumption of polysaccharide gel from durian fruit-hulls in mice**

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 649-661

Consumptive safety studies of durian polysaccharide gel were performed in mice. The polysaccharide gel, DF<sub>II</sub> and DF<sub>I</sub>, were given orally for 60 and 100 days to male and female groups, respectively. The oral doses of 0.25 g/kg/d of DF<sub>II</sub> or DF<sub>I</sub> or standard polysaccharide pectin or a high dose of 0.5 g/kg/d of DF<sub>II</sub>, were given to test groups. Food and water were given *ad libitum*. The results indicated that no toxic effect was induced in treated mice. Relative body weight gain profile in treated mice was not different ( $p>0.05$ ) from its control. However, the lowest mean values of relative weight gain were obtained at finale in male and female groups treated with 0.5 g/kg/d of DF<sub>II</sub>. Other pathological effects were examined by clinical analysis of animal blood and serum. Normal hematologic results and clinical data of glucose, cholesterol, creatinine and BUN in treated groups were found and was not significantly different ( $p>0.05$ ) from those of control and/or standard groups. However, mean values of serum cholesterol in DF<sub>II</sub>- and DF<sub>I</sub>- treated groups were rather low in comparison to their control and standard. The serum enzymes ALP, AST (SGOT) and ALT (SGPT) were examined for detection of any pathological changes of the liver. No significant elevation of these enzymes ( $p>0.05$ ) in DF<sub>II</sub>- and DF<sub>I</sub>- treated groups was observed in comparison

<sup>1</sup>Ph.D. (Medicinal Chemistry), Assoc. Prof., <sup>2</sup>M.Sc. (Pharmacognosy), Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, <sup>3</sup>M.S. (Microbiology), Asst. Prof., Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Phaya Thai, Bangkok 10330 Thailand.

Corresponding e-mail : sunanta.Po@chula.ac.th

Received, 28 April 2001

Accepted, 21 May 2002

to those of standard and control groups. This finding suggests that liver injury did not occur in treated mice. The relative liver weights of treated mice were not different ( $p>0.05$ ) from those of control male mice, while lower relative liver weights ( $p\leq 0.05$ ) were obtained in female treated and standard groups when compared to their control. Normal number and growth rate of offspring were obtained in DF<sub>II</sub>- and DF<sub>I</sub>- treated and control female groups. Subchronic toxicity in this study suggests that polysaccharide gel from fruit-hulls of durian at oral doses of 0.25 and 0.5 g/kg/d could be consumed safely for a long period of 60-100 days in male and female mice.

**Key words :** consumptive safety, toxic effects, durian polysaccharide gel, *Durio zibethinus*

### บทคัดย่อ

สุนันท์ พงษ์สามารณ<sup>1</sup> อัจฉรา รัชชิน<sup>2</sup> และ สุชาดา สุขหรั่ง<sup>1</sup>

การบริโภคเป็นเวลานานของโพลีแซคคาไรด์เจล สกัดจากเปลือกผลทุเรียนในหนูถีบจักร

ว. สงขลานครินทร์ วท. 2545 24(4) : 649-661

การศึกษาความปลอดภัยในการบริโภคสารโพลีแซคคาไรด์เจลจากเปลือกทุเรียนกับหนูถีบจักรเพศผู้และเพศเมียโดยให้โพลีแซคคาไรด์เจล DF<sub>II</sub> และ DF<sub>I</sub> ป้อนทางปากเป็นเวลานาน 60 และ 100 วัน กับหนูถีบจักรเพศผู้และเพศเมียตามลำดับ ให้ขนาดของ DF<sub>II</sub> DF<sub>I</sub> หรือสารมาตรฐานโพลีแซคคาไรด์เพคติน 0.25 กรัม/กก./วัน และให้ขนาดสูงของ DF<sub>II</sub> 0.5 กรัม/กก./วัน กับแต่ละกลุ่มทดลอง ให้อาหารและน้ำกินได้ตลอดเวลา ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไม่มีพิษเกิดขึ้นกับหนูถีบจักรที่ทดลอง ค่าของน้ำหนักเพิ่มสัมพัทธ์ในกลุ่มทดลองของหนูถีบจักรไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) เทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามในกลุ่มทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ให้อาหาร DF<sub>II</sub> ขนาด 0.5 กรัม/กก./วัน พบมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเพิ่มสัมพัทธ์อยู่ในระดับต่ำสุดกว่ากลุ่มอื่นเมื่อให้กินระยะยาว ผลทางพยาธิสภาพอื่น ๆ ทดสอบโดยการตรวจวิเคราะห์ทางคลินิกในเลือดและซีรัมของสัตว์ทดลอง พบค่าปกติต่าง ๆ ทางโลหิตวิทยาและการตรวจวิเคราะห์ทางคลินิกของกลูโคส โคเลสเตอรอล ครีโอดีน และ บิยูเอ็น ของกลุ่มทดลองและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) เทียบกับกลุ่มควบคุมและ/หรือกลุ่มมาตรฐาน อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยของระดับโคเลสเตอรอล ของกลุ่มที่ให้อาหาร DF<sub>II</sub> และ DF<sub>I</sub> จะค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มมาตรฐาน การตรวจสอบระดับเอนไซม์ในซีรัมของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) แอสพาเทอะมิโนทรานสเฟอเรส (AST หรือ SGOT) และอลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส (ALT หรือ SGPT) เพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงการเกิดพยาธิสภาพของตับ ไม่พบมีการเพิ่มระดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) ของเอนไซม์เหล่านี้ของกลุ่มที่ให้อาหาร DF<sub>II</sub> และ DF<sub>I</sub> เปรียบเทียบกับกลุ่มมาตรฐานและกลุ่มควบคุม การพบเช่นนี้เสนอแนะได้ว่าไม่มีการทำลายตับเกิดขึ้นในหนูถีบจักรที่ทดลอง ยังพบว่า ค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับไม่มีความแตกต่าง ( $p>0.05$ ) จากกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมในหนูถีบจักรเพศผู้ ขณะที่กลุ่มทดลองในหนูถีบจักรเพศเมียและกลุ่มมาตรฐานที่ให้อาหารเพคตินมีค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับที่ต่ำกว่า ( $p<0.05$ ) กลุ่มควบคุม ได้ผลค่าปกติของจำนวนลูกที่เกิดและอัตราการโตของลูกในกลุ่มทดลองหนูเพศเมียที่ให้อาหาร DF<sub>II</sub> และ DF<sub>I</sub> และกลุ่มควบคุม การทดลองการเกิดพิษถึงเรื้อรังในการศึกษาครั้งนี้ให้ข้อเสนอแนะได้ว่า สารโพลีแซคคาไรด์เจลจากเปลือกของผลทุเรียนสามารถให้บริโภคขนาด 0.25 และ 0.5 กรัม/กก./วัน ระยะยาวในช่วง 60-100 วัน ได้ปลอดภัยในหนูถีบจักรทั้งเพศผู้และเพศเมีย

<sup>1</sup> ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ <sup>2</sup> ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิทยาโท กรุงเทพมหานคร 10330

Polysaccharide gel isolated from fruit-hulls of durian (*Durio zibethinus* L.) has been found to be useful in preparation of jellies and jams, (Pongsamart *et al.*, 1989 a), and as excipient in pharmaceutical preparations such as tablet, suspension and emulsion (Umprayn *et al.*, 1990 abc; Pongsamart, 1989). The chemical composition and sugar components of polysaccharides in form of DF<sub>I</sub> (crude) and DF<sub>II</sub> (partially purified) were previously described (Pongsamart and Panmaung, 1998). Toxic effects of a high oral dose of polysaccharide gel were also investigated in mice and rats, with the results indicating that polysaccharide gel did not induce acute toxicity in mice and rats (Pongsamart *et al.*, 2001). Toxic effects did not occurred in subacute treatment at doses of 0.125, 0.25 and 0.5 g/kg/day for 10 days when compared with water and pectin which were used as a control and a standard polysaccharide, respectively (Pongsamart *et al.*, 1989 b). The purpose of this study was to determine in more detail the consumptive safety after long-term treatment in male and female mice with a dose of 0.25g/kg/day of DF<sub>I</sub>, DF<sub>II</sub> and pectin (a standard polysaccharide) as well as with a high dose of 0.5 g/kg/d of DF<sub>II</sub>. The pathological changes were characterized by observing the increment of the relative weight of internal organs especially liver weight and high levels of biochemical compositions in blood. The sign of liver damage was also characterized by the high levels of some enzymes in serum such as alkaline phosphatase (ALP) aspartate aminotransferase (AST; SGOT) and alanine aminotransferase (ALT; SGPT) (Fauci *et al.*, 1998).

### Materials and Methods

#### Animals

Female and male Swiss Albino mice, age 30-35 days (20-25 g) were obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University at Salaya. All animals were weighed and placed in individual stainless steel cages (8 × 10 in.). The animals were acclimatized for at least 3 days prior to the initiation of experi-

ments in an experimental room with a controlled temperature (25±1°C) and 50-60 % humidity. Animals were maintained on a commercial pellet diet (from F.E. Zuellig Co.) and tap water *ad libitum*. Animal weights were recorded every morning at 8-10 am. throughout the experimental period.

#### Polysaccharide gel extracts

The polysaccharide gel isolated from fruit-hulls of durian includes DF<sub>I</sub>, a crude extract, and DF<sub>II</sub>, a partially purified form of DF<sub>I</sub>. The method of isolation of DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>, and its properties were previously described (Pongsamart and Panmaung, 1998). A 5% polysaccharide gel in water was freshly prepared before use. Oral feeding with stainless steel stomach needle was performed at a volume of 10 ml/kg body weight. The dose of 0.25 g/kg of DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub> was given in test groups. A high dose of 0.5 g/kg of DF<sub>II</sub> was also performed in test groups of female and male mice.

#### Experimental protocol

Mice were housed singly in stainless steel cages, and given food and water *ad libitum*. Initial body weight of animals was recorded at day 0, the day on which experiment started. Two preparations of polysaccharide gel, DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub> (0.25 g/kg/d) were given to the treated groups whereas pectin (0.25 g/kg/d) and water (10 ml/kg/d) were given to the standard and control groups, respectively. A high dose of DF<sub>II</sub> (0.5g/kg/d) was also given to female and male test groups. Each group of 14-15 male or 8 female mice received polysaccharide gel and pectin everyday for 60 and 100 days, respectively. Each animal was weighed before feeding every morning, food and water intake was also observed through out the experimental period. After 4 weeks of treatment, the treated females were housed with normal untreated male for mating. The pregnancy rate, litter size, number of offspring, offspring growth rate and animal weight were determined for the following 70 days of treatment. Offspring weight was recorded every

day after birth for 4 weeks.

On the final day of treatment, treated animals were weighed and then anesthetized with diethyl ether, and blood withdrawn immediately from the inferior vena cava using a heparinized hematocrit tube and syringe. Serum was obtained following centrifugation at  $3,000 \times g$ , 5 min, and used for biochemical and clinical analyses. Immediately following collection of the blood sample, liver, heart, lung and kidneys were rapidly removed and weighed. The internal organs were examined grossly.

#### Assessment of clinical parameters

Hematological parameters of blood samples were analyzed for hematocrit and hemoglobin. Blood count of red blood cells, white blood cells and lymphocytes were examined (Dacie and Lewis, 1975). Clinical pathology was assessed according to biochemical analysis, i.e. the increment of serum concentrations of glucose, cholesterol, creatinine and blood urea nitrogen (BUN) by using spectrophotometric assay. The elevation of enzyme levels of alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST or SGOT), and alanine aminotransferase (ALT or SGPT) was determined to assess toxic liver injury and biological toxicity.

#### Statistical method

Results are expressed as group mean values  $\pm$  SD in tables ; graphs were constructed using SigmaPlot Scientific Graphing Software for Windows, symbols and bars on graphs represent mean  $\pm$  SD. Means not having superscripts incommon are statistically different ( $p < 0.05$ ). Multiple means of the treatment, standard and control groups were examined by using SPSS for MS Windows program, and analysis undertaken using analysis of variance followed by Duncan's multiple range test or/and Post Hoc Tests to evaluate significant differences between groups. The limit for statistical significance ( $\alpha$ ) was set up at 0.05. Relative weight gain mean values were compared cross groups treated with different amounts and types of food at 10-day

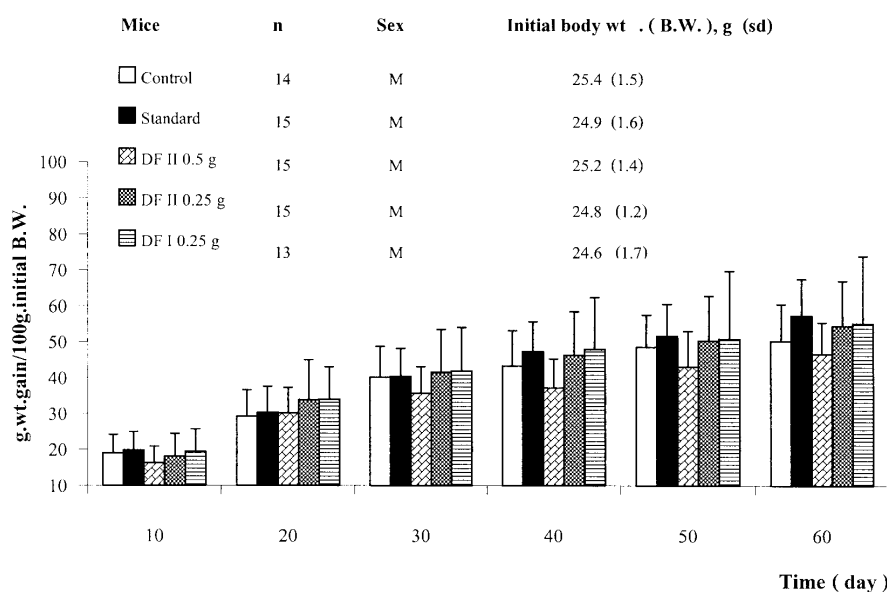
intervals for 60 and 100 days in male and female groups, respectively, and at 7-day intervals for 30 days in groups of offspring.

### Results and Discussion

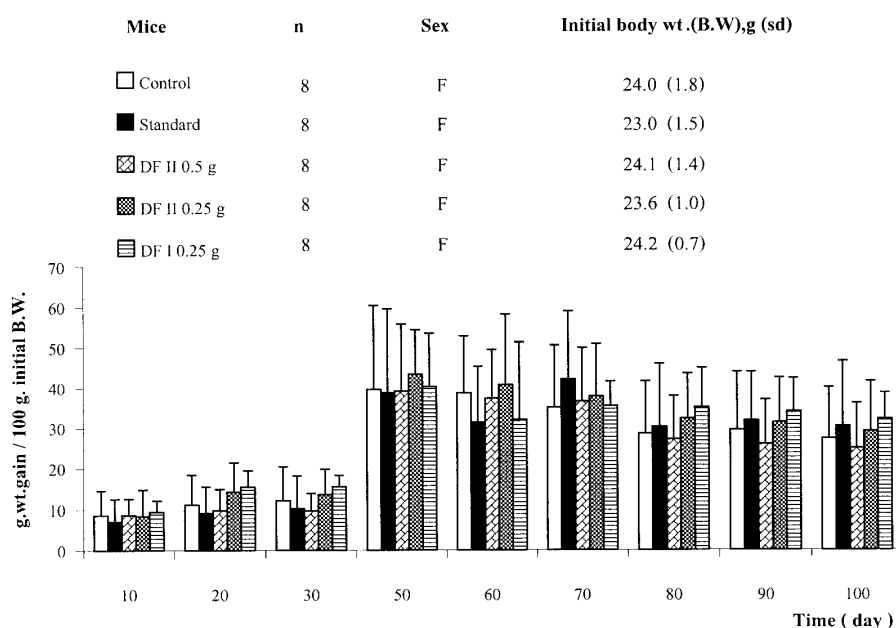
In a previous study, investigation of a high oral single dose (2 g/kg) of polysaccharide gel from fruit-hulls of durian indicated that no acute toxic effect was induced in mice and rats. Long-term treatment in mice with an oral dose of 0.25g/kg/d of DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub> was performed in this study; pectin and water were used as a standard polysaccharide and control, respectively. A high dose of DF<sub>II</sub> (0.5 g/kg/d) was also assessed. These doses were about 5-10 times or more than 20 times which would be consumed in the recipe of food or drug formula, respectively. Normal behavior of animals was observed. Food and water were taken normally in treated groups as well as in the control group. Soft feces were excreted normally in treated group as well as in the groups of control and standard. However, at the first 1-2 weeks of treatment, some animals of the treated groups excreted very soft feces. This result may suggest a mild laxative property of polysaccharide fiber (Spiller, *et al.*, 1979).

#### Effect of polysaccharide gel on body weight and internal organ weight

Initial body weight and relative weight gain in test male and female mice are illustrated in Figure 1 and Figure 2, respectively. Final body weights in test male and female are demonstrated in Table 1 and 2, respectively. Average body weights (Table 1) and the average weight gain profile in male groups (Figure 1) were not significantly different ( $p > 0.05$ ) from that of their control. However, the DF<sub>II</sub> at 0.5 g/kg/d treated group at final period of experiment showed the lowest average body weight. Figure 2 shows the profile of relative weight gain in female mice. The average weight gains of treated and control groups were not significantly different ( $p > 0.05$ ) at day 10 to 30 of treatment before mating period and at day 80 to 100 of treatment after lactation



**Figure 1.** Relative weight gain in male mice during 60 days treatment with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>. Each bar represents mean (sd). Mean values of treated groups at time illustrated are not significantly different from that of control ( $p > 0.05$ ). Control male mice were fed with water 10 ml/kg/d. Standard male mice were fed with pectin 0.25 g/kg/d, M = male, n = number of mice



**Figure 2.** Relative weight gain in female mice during 100 days treatment with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>. Each bar represents mean (sd). Mean values of treated groups at time illustrated are not significantly different from control ( $p > 0.05$ ). Control female mice were fed with water 10 ml/kg/d. Standard female mice were fed with pectin 0.25g/kg/d, F = treated female, n = number of mice.

**Table 1. Relative internal organ weight in test male mice after 60 days treatment with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>. NS = no significant difference between groups ( $p > 0.05$ ), a, b = significant difference between groups ( $p \leq 0.05$ ), M = male, n = number of mice.**

| Test animals<br>(mice)                                     | n, Sex | Weight (g)<br>Mean $\pm$ SD | Internal organ wt. (g)/100 g. body wt. Mean $\pm$ SD |                 |                       |                 |                       |
|------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------|------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
|                                                            |        |                             | Liver<br>NS                                          | Heart<br>NS     | Lung                  | Kidney          |                       |
|                                                            |        |                             |                                                      |                 |                       | Right<br>NS     | Left                  |
| Control group<br>water 10 ml/kg/d                          | 14,M   | 37.4 $\pm$ 2.9              | 5.07 $\pm$ 0.52                                      | 0.45 $\pm$ 0.04 | b<br>0.62 $\pm$ 0.05  | 0.95 $\pm$ 0.30 | a<br>0.86 $\pm$ 0.09  |
| Standard group<br>pectin 0.25g/kg/d                        | 15,M   | 38.4 $\pm$ 2.9              | 4.72 $\pm$ 0.31                                      | 0.45 $\pm$ 0.81 | ab<br>0.66 $\pm$ 0.10 | 0.91 $\pm$ 0.15 | ab<br>0.82 $\pm$ 0.10 |
| Test group DF <sub>II</sub><br>DF <sub>II</sub> 0.5g/kg/d  | 15,M   | 36.6 $\pm$ 1.8              | 4.39 $\pm$ 0.21                                      | 0.46 $\pm$ 0.05 | ab<br>0.67 $\pm$ 0.10 | 0.93 $\pm$ 0.19 | ab<br>0.83 $\pm$ 0.06 |
| Test group DF <sub>II</sub><br>DF <sub>II</sub> 0.25g/kg/d | 14,M   | 38.2 $\pm$ 3.1              | 4.89 $\pm$ 0.76                                      | 0.40 $\pm$ 0.13 | a<br>0.73 $\pm$ 0.09  | 0.94 $\pm$ 0.18 | b<br>0.78 $\pm$ 0.10  |
| Test group DF <sub>I</sub><br>DF <sub>I</sub> 0.25g/kg/d   | 13,M   | 38.8 $\pm$ 2.8              | 5.15 $\pm$ 0.45                                      | 0.44 $\pm$ 0.06 | a<br>0.73 $\pm$ 0.09  | 0.88 $\pm$ 0.10 | ab<br>0.81 $\pm$ 0.09 |

**Table 2. Relative internal organ weight in test female mice after 100 days treatment with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>. NS = no significant difference between groups ( $p > 0.05$ ), a, b = significant difference between groups ( $p \leq 0.05$ ), F = female, n = number of mice.**

| Test animals<br>(mice)                                     | n, Sex | Weight (g)<br>Mean $\pm$ SD | Internal organ wt. (g)/100 g. body wt. Mean $\pm$ SD |                 |                 |                       |                 |
|------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------|------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
|                                                            |        |                             | Liver                                                | Heart<br>NS     | Lung<br>NS      | Kidney                |                 |
|                                                            |        |                             |                                                      |                 |                 | Right                 | Left<br>NS      |
| Control group<br>water 10 ml/kg/d                          | 8,F    | 31.4 $\pm$ 2.7              | a<br>5.99 $\pm$ 0.70                                 | 0.57 $\pm$ 0.12 | 0.78 $\pm$ 0.12 | ab<br>0.71 $\pm$ 0.08 | 0.69 $\pm$ 0.03 |
| Standard group<br>pectin 0.25g/kg/d                        | 8,F    | 29.7 $\pm$ 2.8              | abc<br>5.73 $\pm$ 0.49                               | 0.52 $\pm$ 0.07 | 0.88 $\pm$ 0.11 | a<br>0.72 $\pm$ 0.05  | 0.70 $\pm$ 0.06 |
| Test group DF <sub>II</sub><br>DF <sub>II</sub> 0.5g/kg/d  | 8,F    | 29.7 $\pm$ 5.6              | cd<br>5.29 $\pm$ 0.58                                | 0.62 $\pm$ 0.02 | 0.83 $\pm$ 0.14 | a<br>0.73 $\pm$ 0.05  | 0.71 $\pm$ 0.07 |
| Test group DF <sub>II</sub><br>DF <sub>II</sub> 0.25g/kg/d | 8,F    | 31.1 $\pm$ 2.6              | bcd<br>5.31 $\pm$ 0.41                               | 0.53 $\pm$ 0.09 | 0.85 $\pm$ 0.13 | a<br>0.71 $\pm$ 0.07  | 0.70 $\pm$ 0.08 |
| Test group DF <sub>I</sub><br>DF <sub>I</sub> 0.25g/kg/d   | 8,F    | 33.3 $\pm$ 1.6              | d<br>5.09 $\pm$ 0.48                                 | 0.52 $\pm$ 0.12 | 0.83 $\pm$ 0.12 | b<br>0.65 $\pm$ 0.03  | 0.68 $\pm$ 0.07 |

ended. In this experiment, normal untreated male mice was housed with test females on day 28-42 (14 days). The average relative weight gain

during pregnancy period is not shown. Most of test female mice in treated and control groups became pregnant and gave birth by day 50-56.



The high relative weight gain profile on day 50-70 as shown in Figure 2 was observed during the lactation period. However, the average relative weight gain appeared to be the lowest in the DF<sub>II</sub> (0.5 g/kg/d) treated female group (Figure 2) on days 80-100 towards the end of the experiment and the lowest final body weight was also appeared in the DF<sub>II</sub> (0.5 g/kg) treated group as well as standard group (Table 2). These results suggest that long term feeding of DF<sub>II</sub> at an oral dose of 0.5 g/kg/d has potential to reduce weight gain in male and female mice.

The relative weights of liver, heart, lung and kidneys was determined at the end of the experiment in male and female mice. The results are shown in Table 1 and 2, respectively. Final body weight of the animals is also demonstrated. In the male groups (Table 1) the relative weights of internal organs were not significantly different ( $p>0.05$ ) from those of control groups, except for the lung and the left kidney; but these relative weights were not different ( $p>0.05$ ) from that of the standard group. Among females (Table 2) the relative weight of liver in treated groups was lower ( $p\leq 0.05$ ) than that of the control group; but not significantly different ( $p>0.05$ ) from that of

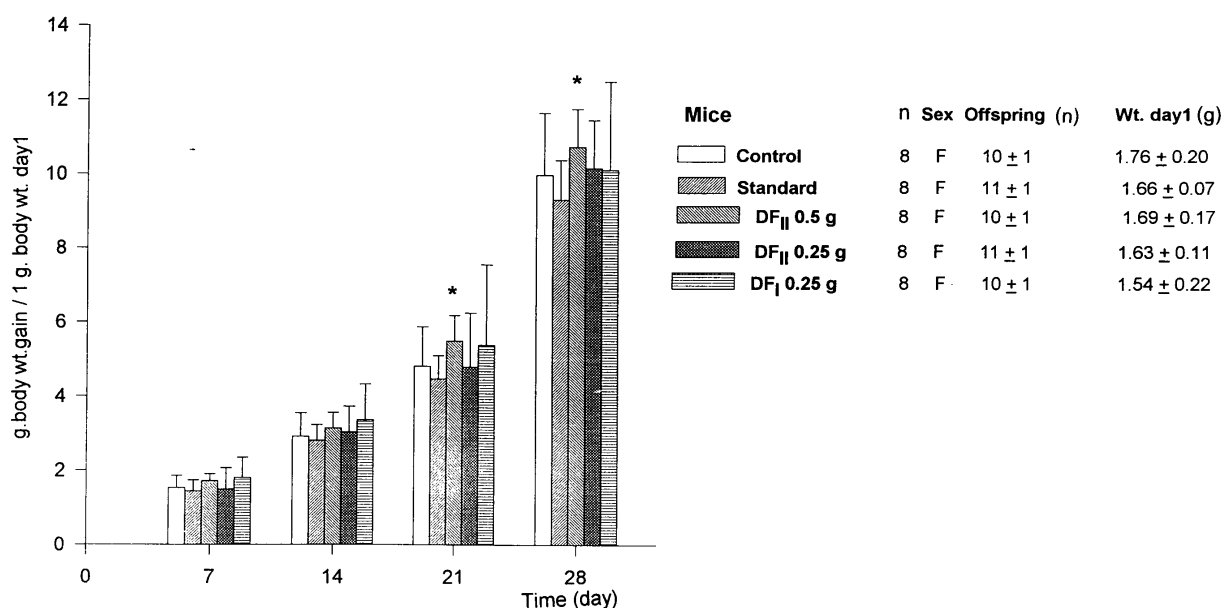
the standard group. Enlargement of liver was not observed in treated groups.

### Effect of polysaccharide gel on pregnancy and growth of offspring

The polysaccharide gel from fruit-hulls of durian did not affect pregnancy and offspring in treated female mice. The results are shown in Table 3 and Figure 3. Every female mouse in treated groups became pregnant normally after being housed with an untreated male mouse (within 14 days). Most females gave birth 22-28 days later. Table 3 shows that the number of offspring which was 10-11, the ratio of male : female of offspring was 1 : 1. The average weight at birth (day 1) of offsprings in treated groups was not different from that of control group. The average weight of offspring during 1-4 weeks is also demonstrated in Table 3. The relative weight gain profile of offspring is illustrated in Figure 3. The average relative weight gain of offspring was determined every week during the suckling period (about 3 weeks), and also the following week. Figure 3 shows that the relative weight gain of offspring from treated mother was not significantly different ( $p>0.05$ ) from their

**Table 3. Body weight, sex and number of offspring from test female mice treated with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>. Mean values of treated groups are not significantly different from control ( $p>0.05$ ). F = female, M = male, n = number of test female mice.**

| Test animals<br>(Mice)                                     | n, Sex | No. of offspring<br>Mean $\pm$ SD | F/M                    | Offspring average body weight (g), |                 |                 | Mean $\pm$ SD    |                  |
|------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
|                                                            |        |                                   |                        | Day 1                              | Day 7           | Day 14          | Day 21           | Day 28           |
| Control group<br>water 10 ml/kg/d                          | 8,F    | 10 $\pm$ 1                        | 4 $\pm$ 1<br>6 $\pm$ 1 | 1.76 $\pm$ 0.20                    | 4.47 $\pm$ 0.59 | 6.88 $\pm$ 1.13 | 10.71 $\pm$ 1.22 | 19.30 $\pm$ 2.94 |
| Standard group<br>pectin 0.25g/kg/d                        | 8,F    | 11 $\pm$ 1                        | 4 $\pm$ 1<br>7 $\pm$ 1 | 1.66 $\pm$ 0.07                    | 4.07 $\pm$ 0.49 | 6.31 $\pm$ 0.71 | 9.07 $\pm$ 1.05  | 17.08 $\pm$ 1.78 |
| Test group DF <sub>II</sub><br>DF <sub>II</sub> 0.5g/kg/d  | 8,F    | 10 $\pm$ 1                        | 5 $\pm$ 1<br>5 $\pm$ 1 | 1.69 $\pm$ 0.17                    | 4.61 $\pm$ 0.31 | 7.00 $\pm$ 0.72 | 10.95 $\pm$ 1.18 | 19.81 $\pm$ 1.71 |
| Test group DF <sub>II</sub><br>DF <sub>II</sub> 0.25g/kg/d | 8,F    | 11 $\pm$ 1                        | 5 $\pm$ 1<br>6 $\pm$ 1 | 1.63 $\pm$ 0.11                    | 4.06 $\pm$ 0.93 | 6.57 $\pm$ 1.13 | 9.44 $\pm$ 2.39  | 18.16 $\pm$ 2.11 |
| Test group DF <sub>I</sub><br>DF <sub>I</sub> 0.25g/kg/d   | 8,F    | 10 $\pm$ 1                        | 5 $\pm$ 2<br>5 $\pm$ 1 | 1.54 $\pm$ 0.22                    | 4.32 $\pm$ 1.01 | 6.71 $\pm$ 1.59 | 9.82 $\pm$ 3.51  | 16.99 $\pm$ 3.27 |



**Figure 3.** Relative weight gain of offspring during 4 weeks after birth from mother treated with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub> for 4 weeks before mating and during lactation. Each bar represents mean  $\pm$  SD. \* = significantly different from control ( $p \leq 0.05$ ). Control = offspring from mother receiving water 10 ml/kg/d. Standard = offspring from mother receiving pectin 0.25 g/kg/d. F = treated female mice. n = number of mice.

control and standard groups, except that of offspring at day 21 and day 28 in group of DF<sub>II</sub> (0.5 g/kg/d) treated mother, which showed higher relative weight gain profile ( $p < 0.05$ ) than that of offspring from control group. The hematological data of offspring of treated and control groups (Table 4) showed normal hematological parameters. These results suggest that polysaccharide gel did not affect the pregnancy and growth of offspring in mice. The growth rate of offspring from treated mothers was not low in comparison to controls.

### Biochemical and clinical analyses

Hematological data in Tables 5 and 6 demonstrate normal hematological parameters in treated male and female mice. The percentages of hematocrit, hemoglobin, lymphocytes, red blood cells and white blood cells count between treated and control male and female mice were not significantly different ( $p > 0.05$ ). However, white blood cells count in DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub> treated (at a

dose 0.25 g/kg/d) male mice was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than their controls but was not significantly different ( $p > 0.05$ ) from that of their standard group. The results indicate that polysaccharide gel DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub> at an oral dose of 0.25 g/kg/d and DF<sub>II</sub> at a high dose of 0.5 g/kg/d did not induce hematological changes in treated male and female mice. However, WBC count in treated male (Table 5) was higher than its control ( $p \leq 0.05$ ) but not significantly different ( $p > 0.05$ ) from standard group.

Serum concentrations of glucose, cholesterol, creatinine and blood urea nitrogen (BUN) in male and female mice are shown in Figures 4 and 6, respectively. The results of serum glucose, cholesterol, creatinine and BUN in treated male and female mice were not significantly different ( $p > 0.05$ ) from those of their standard and control groups. Data were compared among the test, standard and control groups by test for homogeneity of variance (Levene test) using ANOVA followed by Duncan's multiple range test, with

**Table 4. Hematological parameters in offspring from test female mice treated with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>. Data are expressed as mean  $\pm$ SD, M = male, F = female, n = number of test female mice**

| Test animals<br>(Mice)                                     | n, Sex | No. of offspring<br>Mean $\pm$ SD    | Hct (%)        |                | Hb (%)         |                | RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) |               | WBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) |               |
|------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------------|---------------|-----------------------------------|---------------|
|                                                            |        |                                      | F              | M              | F              | M              | F                                 | M             | F                                 | M             |
| Control group<br>water 10 ml/kg/d                          | 8,F    | 10 $\pm$ 1<br>4 $\pm$ 1<br>6 $\pm$ 1 | 45.9 $\pm$ 2.2 | 43.6 $\pm$ 2.6 | 13.5 $\pm$ 1.0 | 12.8 $\pm$ 1.0 | 7.9 $\pm$ 0.5                     | 7.6 $\pm$ 0.6 | 2.6 $\pm$ 1.1                     | 2.3 $\pm$ 0.8 |
| Standard group<br>pectin 0.25g/kg/d                        | 8,F    | 11 $\pm$ 1<br>4 $\pm$ 1<br>7 $\pm$ 1 | 43.7 $\pm$ 2.1 | 44.1 $\pm$ 1.9 | 13.1 $\pm$ 1.0 | 13.0 $\pm$ 1.2 | 7.6 $\pm$ 0.6                     | 7.6 $\pm$ 0.7 | 2.2 $\pm$ 0.9                     | 2.2 $\pm$ 1.3 |
| Test group DF <sub>II</sub><br>DF <sub>II</sub> 0.5g/kg/d  | 8,F    | 10 $\pm$ 1<br>5 $\pm$ 1<br>5 $\pm$ 1 | 45.4 $\pm$ 2.8 | 44.3 $\pm$ 1.5 | 13.1 $\pm$ 1.2 | 12.7 $\pm$ 1.3 | 7.8 $\pm$ 0.7                     | 7.4 $\pm$ 0.9 | 3.8 $\pm$ 1.6                     | 3.5 $\pm$ 1.1 |
| Test group DF <sub>II</sub><br>DF <sub>II</sub> 0.25g/kg/d | 8,F    | 11 $\pm$ 1<br>5 $\pm$ 1<br>6 $\pm$ 1 | 44.8 $\pm$ 2.5 | 44.3 $\pm$ 2.6 | 13.2 $\pm$ 0.9 | 12.9 $\pm$ 1.1 | 7.9 $\pm$ 0.6                     | 7.6 $\pm$ 0.6 | 2.9 $\pm$ 0.9                     | 3.4 $\pm$ 1.5 |
| Test group DF <sub>I</sub><br>DF <sub>I</sub> 0.25g/kg/d   | 8,F    | 10 $\pm$ 1<br>5 $\pm$ 2<br>5 $\pm$ 1 | 44.3 $\pm$ 3.5 | 44.4 $\pm$ 1.8 | 13.2 $\pm$ 1.4 | 13.1 $\pm$ 1.1 | 7.8 $\pm$ 0.8                     | 7.7 $\pm$ 0.7 | 2.5 $\pm$ 1.1                     | 2.4 $\pm$ 1.0 |

**Table 5. Hematological parameters in male mice after 60 days treatment with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>. Data are expressed as mean  $\pm$ SD, NS = no significant difference between groups ( $p > 0.05$ ), a, b = significant difference between groups ( $p \leq 0.05$ ), M = male, n = number of mice.**

| Test animals<br>(mice)                                      | n, Sex | Weight (g)<br>Mean $\pm$ SD | Hct %          | Hb %           | RBC $\times 10^6/\text{mm}^3$ | WBC<br>$\times 10^6/\text{mm}^3$ | PMN %       | Band % | Lymph %     | Mon % | Eos % | Baso % |
|-------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------|----------------|----------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------|--------|-------------|-------|-------|--------|
|                                                             |        |                             | NS             | NS             | NS                            | NS                               | NS          | NS     | NS          | NS    | NS    | NS     |
| Control group<br>water 10 ml/kg/d                           | 14,M   | 37.4 $\pm$ 2.9              | 43.6 $\pm$ 5.3 | 14.2 $\pm$ 1.9 | 9.1 $\pm$ 1.1                 | 1.9 $\pm$ 1.2                    | 20 $\pm$ 12 | -      | 79 $\pm$ 11 | 0-1   | 0-1   | -      |
| Standard group<br>pectin 0.25 g/kg/d                        | 15,M   | 38.4 $\pm$ 2.9              | 41.8 $\pm$ 1.5 | 14.7 $\pm$ 0.6 | 9.1 $\pm$ 0.2                 | 2.9 $\pm$ 1.8                    | 28 $\pm$ 10 | -      | 70 $\pm$ 10 | 0-1   | 0-2   | -      |
| Test group DF <sub>II</sub><br>DF <sub>II</sub> 0.5 g/kg/d  | 15,M   | 36.6 $\pm$ 1.8              | 44.2 $\pm$ 1.3 | 15.7 $\pm$ 1.5 | 10.1 $\pm$ 1.2                | 3.5 $\pm$ 1.3                    | 36 $\pm$ 15 | -      | 62 $\pm$ 16 | 0-2   | 0-2   | -      |
| Test group DF <sub>II</sub><br>DF <sub>II</sub> 0.25 g/kg/d | 14,M   | 38.2 $\pm$ 3.1              | 45.4 $\pm$ 4.2 | 15.2 $\pm$ 1.4 | 9.4 $\pm$ 0.7                 | 4.7 $\pm$ 1.1                    | 25 $\pm$ 4  | -      | 74 $\pm$ 4  | 0-1   | 0-1   | -      |
| Test group DF <sub>I</sub><br>DF <sub>I</sub> 0.25 g/kg/d   | 13,M   | 38.8 $\pm$ 2.8              | 44.0 $\pm$ 4.1 | 14.6 $\pm$ 1.2 | 9.5 $\pm$ 0.8                 | 4.3 $\pm$ 1.8                    | 23 $\pm$ 5  | -      | 76 $\pm$ 6  | 0-1   | 0-2   | -      |

**Table 6. Hematological parameters in female mice after 100 days treatment with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, NS = no significant difference between groups ( $p > 0.05$ ), a, b = significant difference between groups ( $p \leq 0.05$ ), F = female, n = number of mice.**

| Test animals<br>(mice)                                     | n, Sex | Weight (g)<br>Mean $\pm$ SD | Hct %<br>NS    | Hb %<br>NS     | RBC $\times 10^6/\text{mm}^3$<br>NS | WBC<br>$\times 10^6/\text{mm}^3$<br>NS | PMN %<br>NS    | Band % | Lymph %              | Mon % | Eos % | Baso % |
|------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------|----------------|----------------|-------------------------------------|----------------------------------------|----------------|--------|----------------------|-------|-------|--------|
| Control group<br>water 10 ml/kg/d                          | 8, F   | 31.4 $\pm$ 2.7              | 45.2 $\pm$ 2.4 | 13.9 $\pm$ 1.6 | 8.8 $\pm$ 0.9                       | 2.0 $\pm$ 0.9                          | 12.5 $\pm$ 3.9 | -      | ab<br>86.2 $\pm$ 4.6 | 0-1   | 0-2   | -      |
| Standard group<br>pectin 0.25 g/kg/d                       | 8, F   | 29.7 $\pm$ 2.8              | 42.8 $\pm$ 4.5 | 13.5 $\pm$ 2.1 | 8.4 $\pm$ 1.4                       | 1.5 $\pm$ 0.9                          | 13.0 $\pm$ 6.0 | -      | ab<br>86.2 $\pm$ 5.9 | 0-1   | 0-2   | -      |
| Test group DF <sub>II</sub><br>DF <sub>II</sub> 0.5 g/kg/d | 8, F   | 29.7 $\pm$ 5.6              | 43.2 $\pm$ 5.2 | 11.3 $\pm$ 2.9 | 7.2 $\pm$ 1.7                       | 1.3 $\pm$ 0.8                          | 11.2 $\pm$ 3.9 | -      | ab<br>88.2 $\pm$ 4.0 | -     | 0-2   | -      |
| Test group DF <sub>I</sub><br>DF <sub>I</sub> 0.25 g/kg/d  | 8, F   | 31.1 $\pm$ 2.6              | 43.8 $\pm$ 4.8 | 14.2 $\pm$ 4.2 | 7.8 $\pm$ 0.9                       | 1.8 $\pm$ 1.3                          | 8.7 $\pm$ 4.9  | -      | a<br>90.6 $\pm$ 4.7  | -     | 0-1   | -      |
| Test group DF <sub>I</sub><br>DF <sub>I</sub> 0.25 g/kg/d  | 8, F   | 33.3 $\pm$ 1.6              | 46.0 $\pm$ 2.0 | 14.3 $\pm$ 0.7 | 8.8 $\pm$ 0.5                       | 3.3 $\pm$ 1.9                          | 15.8 $\pm$ 6.1 | -      | a<br>81.0 $\pm$ 5.7  | 0-3   | 0-4   | -      |

$p \leq 0.05$  as the level of significance. Interestingly, average serum levels of cholesterol in DF<sub>II</sub> at 0.25 mg/kg/d treated male as well as female mice showed the lowest value in comparison to those of their control and standard groups (Figures 4 and 6). The results of normal values of BUN and creatinine obtained seem to indicate that polysaccharide gel did not produce kidney damage in treated animals (Wildman, 1984).

The pathological change and toxic effects are characterized by an increase in liver and kidney weights, as well as the high levels of biochemical substances especially some specific enzymes in serum, such as alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST; SGOT) and alanine aminotransferase (ALT; SGPT) (Fauci *et al.*, 1998; Wildman, 1984). In the present study, the serum levels of these enzymes in treated male and female mice were not markedly increased in comparison to their controls as shown in Figures 5 and 7, respectively. It is illustrated in Figure 5 that serum levels of ALP in treated male groups were lower than in the control group. The serum levels of AST (SGOT)  $< 100$  U/L and ALT (SGPT)  $< 20$  U/ were not significantly different ( $p > 0.05$ ) from those of their control group. The result of no increment of serum ALP in this study suggests that pathological changes of liver function had not occurred (Fauci *et al.*, 1998). The results of normal levels of AST (SGOT) and ALT (SGPT) in treated male mice also confirmed that pathological changes of liver, heart and muscle had not occurred (Fauci *et al.*, 1998). The serum levels of AST (SGOT)  $< 100$  U/L and ALT (SGPT)  $< 35$  U/L in treated female mice (Figure 7) were not markedly high and not significantly different ( $p > 0.05$ ) from their control. The results clearly indicate that pathological changes of liver, heart and muscle function had not occurred (Fauci *et al.*, 1998). The serum levels of ALP in DF<sub>II</sub> treated female group was not different ( $p > 0.05$ ) from those of control group and the serum ALP in DF<sub>I</sub> treated group was not different ( $p > 0.05$ ) from that of standard group. ALP levels in treated and control mice ( $< 90$  U/L) were not markedly

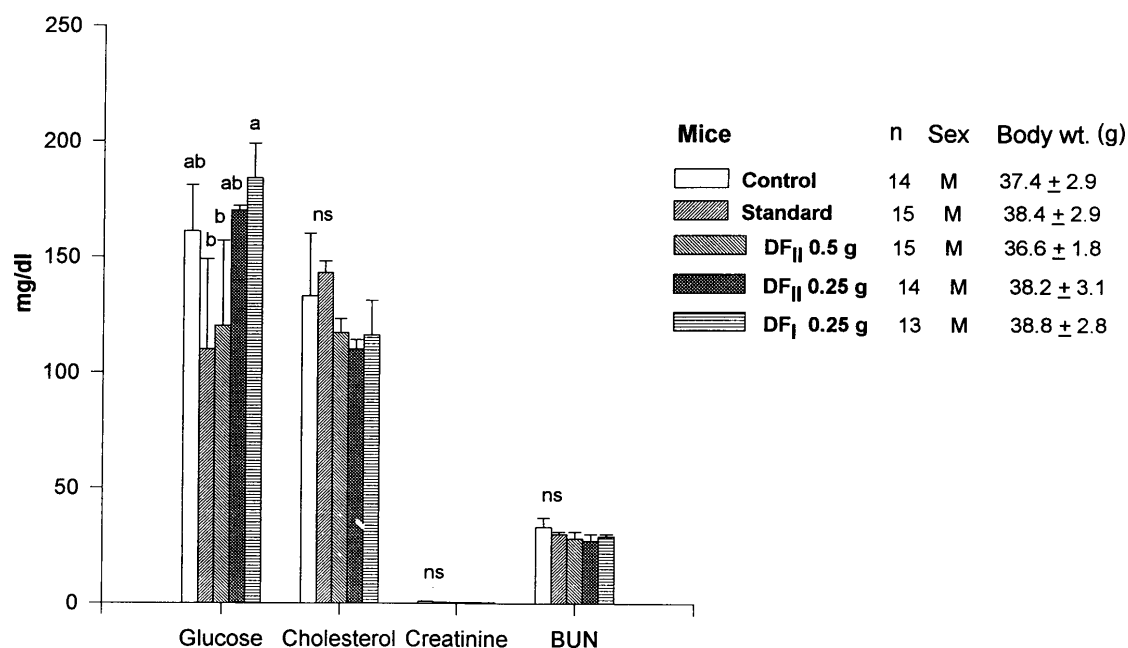


Figure 4. Biochemical analysis of serum in male mice after 60 days treatment with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>. Each bar represents mean ± SD, ns = no significant difference between groups ( $p > 0.05$ ), a, b = significant difference between groups ( $p \leq 0.05$ ). Control male mice were fed with water 10 ml/kg/d. Standard male mice were fed with pectin 0.25 g/kg/d. M = male, n = number of mice.

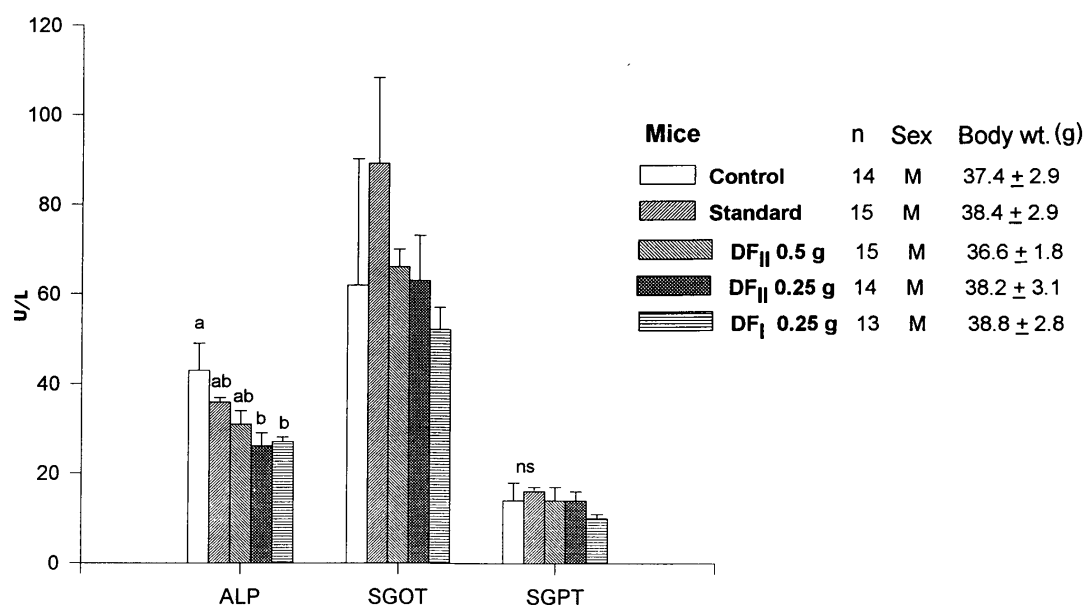


Figure 5. Levels of enzymes in serum in male mice after 60 days treatment with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>. Each bar represents mean ± SD, ns = no significant difference between groups ( $p > 0.05$ ), a, b = significant difference between groups ( $p \leq 0.05$ ). Control male mice were fed with water 10 ml/kg/d. Standard male mice were fed with pectin 0.25 g/kg/d. M = male, n = number of mice.

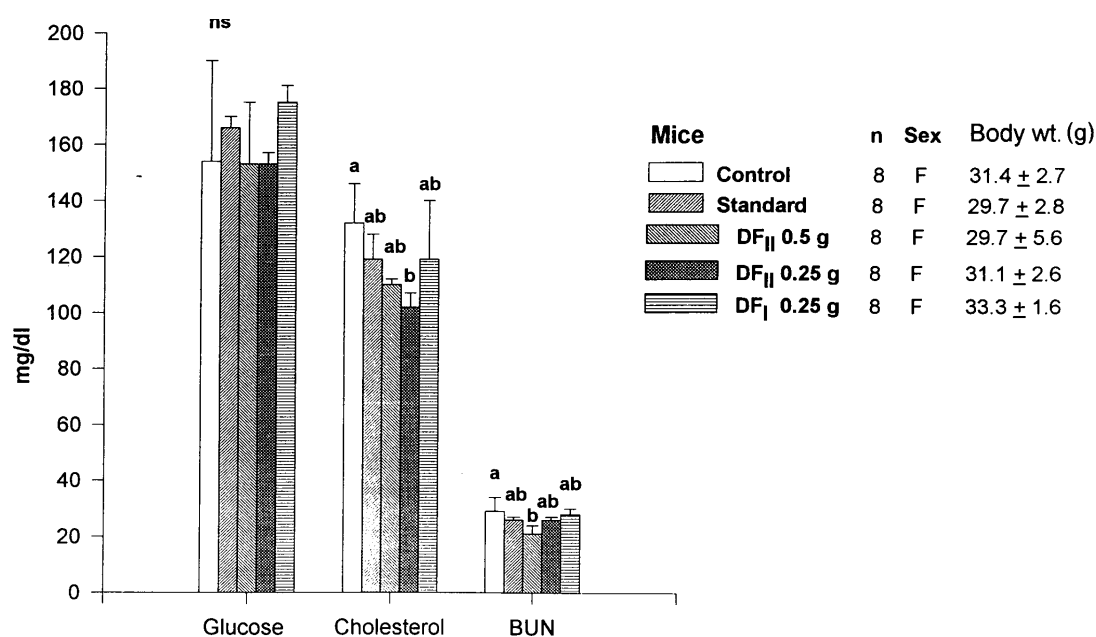


Figure 6. Biochemical analysis of serum in female mice after 100 days treatment with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>. Each bar represents mean ± SD, ns = no significant difference between groups ( $p > 0.05$ ), a, b = significant difference between groups ( $p \leq 0.05$ ). Control female mice were fed with water 10 ml/kg/d. Standard female mice were fed pectin 0.25 g/kg/d. F = female, n = number of mice.

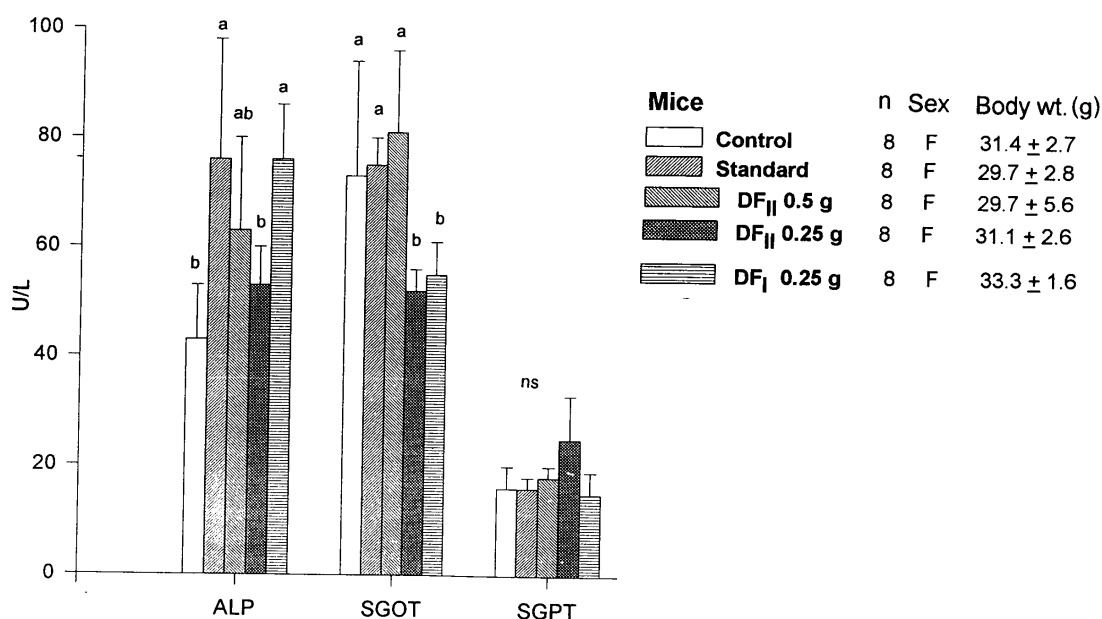


Figure 7. Levels of enzymes in serum in female mice after 100 days treatment with DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub>. Each bar represents mean ± SD, ns = no significant difference between groups ( $p > 0.05$ ), a, b = significant difference between groups ( $p \leq 0.05$ ). Control female mice were fed with water 10 ml/kg/d. Standard female mice were fed pectin 0.25 g/kg/d. F = female, n = number of mice.

higher than normal ALP level in female mice. The results of the present study suggest that polysaccharide gel, DF<sub>I</sub> and DF<sub>II</sub> at a dose 0.25g/kg/d and DF<sub>II</sub> at a high dose of 0.5 g/kg/d, could be consumed safely for long periods of 60 and 100 days in male and female mice, respectively. Interestingly, at a high oral dose (0.5 g/kg/d), DF<sub>II</sub> seems to induce low level of serum cholesterol and low body weight gain in male and female mice after long term treatment. These properties have also been observed with some other dietary fiber (Chandalia, *et al.*, 2000; Vahouny, *et al.*, 1988).

### Acknowledgment

This work was supported in part by Rachadapiseksompoach Research Funds, Chulalongkorn University.

### References

- Chandalia, M., Garg, A., Lutjohann, D., Bergmann, K. V., Grundy, S.M. and Brinkley, L.J. 2000. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 342(19) : 1392-1398.
- Dacie, J.V. and Lewis, S.M. 1975. *Practical Hematology* 4<sup>th</sup> ed., Churchill, Livingstone, London. pp 1-1180.
- Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L. 1998. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 14<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill Co. pp 1660-1704.
- Pongsamart, S., Sukrong, S. and Tawatsin, A. 2001. The determination of toxic effects at a high oral dose of polysaccharide gel extracts from fruit-hulls of durian (*Durio zibethinus* L.) in mice and rats. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 23(1) : 55-62.
- Pongsamart, S. and Panmaung, T. 1998. Isolation of polysaccharides from fruit-hulls of durian (*Durio zibethinus* Linn.). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 20(3) : 323-332.
- Pongsamart, S., Dhumma-upakorn, R. and Panmaung, T. 1989 a. The studies of carbohydrate from durian rind for pharmaceutical and food preparations. Research Report, Rachadapiseksompoach Research Funds, Chulalongkorn University.
- Pongsamart, S., Jesadanont, S.N. and Markman, N. 1989 b. The studies on safety and toxicity of the consumption of pectin-like substance isolated from durian rinds. Research Report, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.
- Pongsamart, S. 1989. The studies of carbohydrate extracts from durian rinds to use as suspending agent. Research Report, Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.
- Spiller, G. A., Shipley, E. A., Chernoff, M. C. and Cooper, W. C. 1979. Bulk laxative efficacy of a psyllium seed hydrocolloid and of a mixture of cellulose and pectin. *J. Clin. Pharmacol* 19 : 313
- Umprayn, K., Kaitmonkong, R., and Pongsamart, S. 1990 a. Evaluation of tablet disintegrating properties of durian rind extracts. NUS-JSPS Seminar, CHBA, JAPAN. Oct. 23-26, 1990.
- Umprayn, K., Chanpaparp, K. and Pongsamart, S. 1990 b. The studies of durian rind extracts as an aqueous binder : Evaluation of granule properties. *Th. J. Pharm. Sci.* 15(2) : 95-115.
- Umprayn, K., Chanpaparp, K. and Pongsamart, S. 1990 c. The studies of durian rind extracts as an aqueous binder I : Evaluation of Tablets Properties. *Th. J. Pharm. Sci.* 15(3) : 173-186.
- Vahouny, G. V., Satchithanandam, S., Chen, I., Tepper, S. A., Kritchevsky, D., Lightfoot, F. G. and Cassidy, M. M. 1988. Dietary fiber and intestinal adaptation : effects on lipid absorption and lymphatic transport in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.* 47 : 201-6
- Wildmann, F. K. 1984. *Clinical interpretation of Laboratory Tests*. 9<sup>th</sup> ed., F. A. Davis Co., P. G. Asian Economy Edition, P. G. Publishing Pte. Ltd. Singapore. pp. 246-250.





# Comparison of breaker height formulas using large-scale wave tanks

Winyu Rattanapitikon<sup>1</sup> and Thirapat Vivattanasirisak<sup>2</sup>

## Abstract

Rattanapitikon, W., and Vivattanasirisak, T.

Comparison of breaker height formulas using large-scale wave tanks

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 663-674

The breaker height is an essential requirement for design of coastal structures, as well as for the prediction of wave height transformation and beach deformation. Many formulas have been proposed to compute the breaker height. However, most of the existing breaker height formulas were developed based primarily on measured data from small-scale experiments. It is doubtful that those formulas are applicable in large-scale experimental conditions, which are more representatives of natural conditions. In this study, the predictive capability of 29 existing breaker height formulas is examined by comparison against measured data from the large-scale experiments of CRIEPI (1983) and SUPERTANK (1994). The comparison shows that the errors of the selected formulas vary from 8.7% to 69.4%. Overall, the formulas that give very good predictions are those by Ostendorf and Madsen (1979), Larson and Kraus (1989), Gourlay (1992), and Rattanapitikon and Shibayama (2000).

---

**Key words :** breaking index, breaking wave height, breaker height

---

<sup>1</sup>D.Eng. (Coastal Eng.), Assoc. Prof., <sup>2</sup>Master Student, Civil Engineering Program, Sirindhorn International Institute of Technology, Thammasat University, Pathum Thani 12121 Thailand.

Corresponding e-mail : winyu@siit.tu.ac.th

Received, 18 March 2002

Accepted, 13 June 2002

## บทคัดย่อ

วิญญู รัตนปิติกุล และ วีรพัฒน์ วิวัฒนศิริศักดิ์

การเปรียบเทียบสูตรคำนวณความสูงที่คลื่นแตกโดยใช้ข้อมูลจากรางวัดคลื่นขนาดใหญ่

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(4) : 663-674

ความสูงที่คลื่นแตกตัวเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อการออกแบบสิ่งก่อสร้างในทะเล และใช้ในการคำนวณการเปลี่ยนแปลงของคลื่นและชายหาด ในปัจจุบัน มีสูตรสำหรับคำนวณความสูงที่คลื่นแตกอยู่มากมายหลายสูตรด้วยกัน แต่สูตรเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้ถูกพัฒนามาจากผลการทดลองในการทดลองขนาดเล็ก จึงเป็นที่น่าสงสัยว่าสูตรเหล่านี้จะสามารถใช้ได้หรือไม่ สำหรับเงื่อนไขการทดลองขนาดใหญ่ซึ่งมีสภาพใกล้เคียงกับสภาพจริงตามธรรมชาติมากกว่าการทดลองขนาดเล็ก ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการเปรียบเทียบสูตรสำหรับคำนวณความสูงที่คลื่นแตกที่มีอยู่แล้ว 29 สูตร ข้อมูลผลการทดลองที่ใช้ในการเปรียบเทียบได้จากข้อมูลคลื่นจากรางวัดคลื่นขนาดใหญ่ของ CRIEPI (1983) และ SUPERTANK (1994) จากการเปรียบเทียบพบว่า ค่าความผิดพลาดของสูตรที่ใช้มีค่าตั้งแต่ 8.7% ถึง 69.4% และสูตรที่ทำนายได้ดีมากสำหรับกรณีทั่ว ๆ ไป คือ สูตรของ Ostendorf and Madsen (1979), Larson and Kraus (1989), Gourlay (1992) และ Rattanapitikon and Shibayama (2000)

สาขาวิชาวิศวกรรมโยธา สถาบันเทคโนโลยีนานาชาติสิรินธร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12121

The initiation of breaking wave height (or breaker height) has been a subject of study for a century due to its importance in design of coastal structures, as well as for the prediction of wave height transformation and beach deformation. During the past century, a number of studies and experiments have been carried out to develop the breaker height formulas. Owing to the complexity of wave breaking mechanism, any type of breaker height formula has to be based on empirical or semi-empirical formula calibrated with the experimental results. Therefore the validity of breaker height formulas may be restricted to the experimental conditions used in the calibration or verification. In order to confirm the validity of the formula, a wide range of experimental conditions should be used in the calibration or verification of the formula. As it is very difficult to measure the breaker height of each individual wave in the field, small-scale and large-scale experiments are the sources of quantitative information for verifying the breaker height formula.

Since most of the existing formulas were developed based on only the measured data from

small-scale experiments, it is doubtful whether those formulas are applicable in the large-scale experimental conditions, which are more representative of natural conditions. In spite of the great number of studies in the initiation of breaking, few have evaluated the validity of the existing formulas. Moreover, the few available comparisons are not based on the large-scale experiments. The aim of this study is to compare and find out proper breaker height formulas that predict well for large-scale experimental conditions.

This paper is divided into three main parts. The first part presents the existing breaker height formulas. The second part is a brief review of collected experiments used to examine the existing formulas. The third part is the examination of all formulas for identifying the proper ones.

### Existing breaker height formulas

Many different formulas for computing breaker heights have been proposed during the past century. Among the existing formulas, the breaker height formulas of Miche (1944) and Goda (1970) are widely mentioned. The majority of the existing formulas represent a relationship

between the breaker height ( $H_b$ ) and the variables at the breaking or deepwater conditions, i.e., still water depth at breaking ( $h_b$ ), wavelength at breaking ( $L_b$ ), local bottom slope ( $m$ ), deepwater wavelength ( $L_o$ ), and deepwater wave height ( $H_o$ ). From preceding studies, the following formulas have been suggested to compute the breaker height.

a) McCowan (1894), hereafter referred to as MC94, derived a limit of breaking wave in water of constant depth based on solitary wave theory and proposed that the breaking will occur when

$$H_b = 0.78h_b \quad (1)$$

b) Miche (1944), hereafter referred to as MI44, developed a semi-empirical breaking criterion for periodic waves in finite water depth and proposed the limiting wave steepness as a function of water depth to wavelength ratio.

$$H_b = 0.142L_b \tanh\left(\frac{2\pi h_b}{L_b}\right) \quad (2)$$

Danel (1952) suggested changing the coefficient from 0.142 to be 0.12 when applying to the horizontal bottom.

c) Munk (1949), hereafter referred to as MU49, derived a breaker height formula based on the solitary wave theory. The formula was proposed to be

$$H_b = 0.3H_o \left(\frac{H_o}{L_o}\right)^{-1/3} \quad (3)$$

d) Le Mehaute and Koh (1967), hereafter referred to as MK67, proposed an empirical formula based on three sources of the experimental data (Suquet, 1950; Iversen, 1952; and Hamada, 1963). The experiments cover a range of  $1/50 < m < 1/5$  and  $0.002 < H_o/L_o < 0.093$ .

$$H_b = 0.76H_o \left(\frac{H_o}{L_o}\right)^{-1/4} m^{1/7} \quad (4)$$

e) Galvin (1969), hereafter referred to as GA69, performed laboratory experiments with regular wave on plane beach and combined his data with the data of Iversen (1952) and McCowan (1894). The breaking criterion was developed by fitting empirical relationship between  $h_b/H_b$  and  $m$ .

$$H_b = h_b \frac{1}{1.40 - 6.85m} \quad \text{for } m \leq 0.07 \quad (5.1)$$

$$H_b = \frac{h_b}{0.92} \quad \text{for } m > 0.07 \quad (5.2)$$

f) Collins and Weir (1969), hereafter referred to as CW69, derived a breaking height formula from linear wave theory and empirically included the slope effect into the formula. The experimental data from three sources (Suquet, 1950; Iversen, 1952; and Hamada, 1963) were used to fit the formula.

$$H_b = h_b(0.72 + 5.6m) \quad (6)$$

g) Goda (1970), hereafter referred to as GO70, analyzed several sets of laboratory data on breaking waves on slopes obtained by several researchers (Iversen, 1952; Mitsuyasu, 1962; and Goda, 1964) and proposed a diagram presented criterion for predicting breaker height. Then Goda (1974) gave an approximate expression for the diagram as

$$H_b = 0.17L_o \left\{ 1 - \exp\left[-1.5 \frac{\pi h_b}{L_o} (1 + 15m^{4/3})\right] \right\} \quad (7)$$

h) Weggel (1972), hereafter referred to as WE72, proposed an empirical formula for computing breaker height from five sources of the laboratory data (Iversen, 1952; Galvin, 1969; Jen and Lin, 1970; Weggel and Maxwell, 1970; and Reid and Bretschneider, 1953). The experiments cover a range of  $1/50 < m < 1/5$ .

$$H_b = \frac{h_b g T^2 1.56 / [1 + \exp(-19.5m)]}{g T^2 + h_b 43.75 [1 - \exp(-19m)]} \quad (8)$$

i) Komar and Gaughan (1972), hereafter referred to as KG72, used linear wave theory to derive a breaker height formula from energy flux conservation and assumed a constant  $H_b/h_b$ . After calibrating the formula to the laboratory data of Iversen (1952), Galvin (1969), and unpublished data of Komar and Simons (1968), and the field data of Munk (1949), the formula was proposed to be

$$H_b = 0.56H_o \left( \frac{H_o}{L_o} \right)^{-1/5} \quad (9)$$

j) Sunamura and Horikawa (1974), hereafter referred to as SH74, used the same data set as Goda (1970) to plot the relationship between  $H_b / H_o$ ,  $H_o / L_o$  and  $m$ . After fitting the curve the following formula was proposed.

$$H_b = H_o m^{0.2} \left( \frac{H_o}{L_o} \right)^{-0.25} \quad (10)$$

k) Madsen (1976), hereafter referred to as MA76, combined the formulas of Galvin (1969) and Collins (1970) to be

$$H_b = 0.72h_b(1+6.4m) \quad \text{for } m < 0.10 \quad (11)$$

Black and Rosenberg (1992) found that the formula of Madsen (1976) gives good predictions for individual breaker height in laboratory and field experiments.

l) Battjes and Janssen (1978), hereafter referred to as BJ78, modified Miche (1944)'s criterion by including an adjustable coefficient  $\gamma/0.88$  into the formula. The formula calibration indicated that the coefficient  $\gamma=0.8$  gave the best prediction.

$$H_b = 0.142L_b \tanh \left( \frac{0.8}{0.88} \frac{2\pi h_b}{L_b} \right) \quad (12)$$

m) Ostendorf and Madsen (1979), hereafter referred to as OM79, modified the formula of Miche (1944) by including the beach slope in to the formula. After calibrating to the laboratory

data, the Miche (1944)'s formula was modified to be

$$H_b = 0.14L_b \tanh \left[ (0.8 + 5m) \frac{2\pi h_b}{L_b} \right] \quad \text{for } m \leq 0.1 \quad (13.1)$$

$$H_b = 0.14L_b \tanh \left[ (0.8 + 5(0.1)) \frac{2\pi h_b}{L_b} \right] \quad \text{for } m > 0.1 \quad (13.2)$$

n) Sunamura (1980), hereafter referred to as SU80, conducted an empirical formula based on an analysis of various laboratory data (Iversen, 1952; Bowen *et al.*, 1968; Goda, 1970; and Sunamura, 1980) and obtained the following formula.

$$H_b = 1.1h_b \left( \frac{m}{\sqrt{H_o/L_o}} \right)^{1/6} \quad (14)$$

o) Singamsetti and Wind (1980), hereafter referred to as SW80, conducted a laboratory experiment. The experiments cover a range of  $1/40 < m < 1/5$  and  $0.02 < H_o/L_o < 0.065$ . They proposed two empirical formulas based on their own data. The first formula is

$$H_b = 0.575H_o m^{0.031} \left( \frac{H_o}{L_o} \right)^{-0.254} \quad (15)$$

Equation (15) is referred to as SW80a hereafter. The second formula is

$$H_b = 0.937h_b m^{0.155} \left( \frac{H_o}{L_o} \right)^{-0.13} \quad (16)$$

Equation (16) is referred to as SW80b hereafter.

p) Ogawa and Shuto (1984), hereafter referred to as OS84, obtained the following formula from the same data sets as Goda (1970). The formula is limited to use for the range of  $1/100 < m < 1/10$  and  $0.003 < H_o/L_o < 0.065$ .

$$H_b = 0.68H_o m^{0.09} \left( \frac{H_o}{L_o} \right)^{-0.25} \quad (17)$$

q) Battjes and Stive (1985), hereafter referred to as BS85, modified the formula of Battjes and Janssen (1978) by relating the coefficient  $\gamma$  with  $H_o / L_o$  as

$$H_b = 0.142L_b \tanh \left\{ \left[ 0.5 + 0.4 \tanh \left( 33 \frac{H_o}{L_o} \right) \right] \frac{2\pi h_b}{0.88L_b} \right\} \quad (18)$$

r) Seyama and Kimura (1988), hereafter referred to as SK88, measured wave height deformation of individual wave of the irregular wave experiments and investigated the wave height to water depth ratio at wave breaking. The formula of Goda (1970) was modified to compute the individual wave breaking in irregular wave trains as

$$H_b = h_b \left\{ 0.16 \frac{L_o}{h_o} \left[ 1 - \exp \left[ -0.8\pi \frac{h_b}{L_o} (1 + 15m^{4/3}) \right] \right] - 0.96m + 0.2 \right\} \quad (19)$$

They also found that the individual waves of irregular waves tend to break before satisfying the breaking criterion for regular waves. The reduction of the wave height to water depth ratio at the breaking point was found to be about 20%. Therefore the coefficient of (19) when applying to regular wave breaking should be changed to be 1.25 as

$$H_b = 1.25h_b \left\{ 0.16 \frac{L_o}{h_o} \left[ 1 - \exp \left[ -0.8\pi \frac{h_b}{L_o} (1 + 15m^{4/3}) \right] \right] - 0.96m + 0.2 \right\} \quad (20)$$

s) Larson and Kraus (1989), hereafter referred to as LK89, developed a breaking criterion based on the large wave tank data of Kajima *et al.* (1983). The breaking height index  $H_b / h_b$  was related to the surf similarity parameter.  $m / \sqrt{H_o / L_o}$ . By using regression analysis, the breaker height formula was proposed to be

$$H_b = 1.14h_b \left( \frac{m}{\sqrt{H_o / L_o}} \right)^{0.21} \quad (21)$$

The correlation coefficient of Eq. (21) is 55%. Equation (21) is referred to be LK89a hereafter.

They also related the term  $H_b / H_o$  with the deepwater wave steepness ( $H_o / L_o$ ). The regression analysis was used to obtain the equation. The regression equation obtained is

$$H_b = 0.53H_o \left( \frac{H_o}{L_o} \right)^{-0.24} \quad (22)$$

The correlation coefficient of Eq. (22) is 80%. Equation (22) is referred to as LK89b hereafter.

t) Hansen (1990), hereafter referred to as HA90, used the laboratory data from Van Dorn (1978) and unpublished data of ISVA to plot the relationship between  $H_b / h_b$  and  $mL_b / h_b$  and proposed the following empirical formula.

$$H_b = 1.05h_b \left( m \frac{L_b}{h_b} \right)^{0.2} \quad (23)$$

u) Smith and Kraus (1990), hereafter referred to as SK90, proposed 2 empirical formulas based on the analysis of 11 sources of laboratory data performed on plane beach conditions. The experiments cover a range of  $1/80 < m < 1/10$  and  $0.001 < H_o / L_o < 0.092$ . The first formula is

$$H_b = h_b \left\{ \frac{1.12}{1 + \exp(-60m)} - 5.0[1 - \exp(-43m)] \frac{H_o}{L_o} \right\} \quad (24)$$

Equation (24) is referred to as SK90a hereafter. The second formula is

$$H_b = H_o (0.34 + 2.47m) \left( \frac{H_o}{L_o} \right)^{-0.30+0.88m} \quad (25)$$

Equation (25) is referred to as SK90b hereafter.

v) Kamphuis (1991), hereafter referred to as KA91, modified Miche (1944)'s formula by introducing the exponential form of the bottom slope into the formula and applied to compute the significant wave height of the irregular wave breaking. After calibrating to his irregular breaking wave data, the formula becomes

$$H_b = 0.095 \exp(4m) L_b \tanh \left( \frac{2\pi h_b}{L_b} \right) \quad (26)$$

He also found that the regular breaking height formula can be used for irregular wave to compute the significant wave height at the breaking but the coefficient have to be reduced to be about 0.75 of the proposed coefficient. Therefore the coefficient in Eq. (26) should be changed from 0.095 to be 0.127 when applying to the regular breaking waves as

$$H_b = 0.127 \exp(4m) L_b \tanh \left( \frac{2\pi h_b}{L_b} \right) \quad (27)$$

w) Gourlay (1992), hereafter referred to as GL92, proposed an empirical formula based on seven sources of laboratory data (Bowen *et al.*, 1968; Smith, 1974; Visser, 1977; Gourlay, 1978; Van Dorn, 1978; Stive, 1984; and Hansen and Svendsen, 1979). The experiments cover a range of  $1/45 < m < 1/10$  and  $0.001 < H_o / L_o < 0.066$ . The data was used to plot the relationship between  $H_b / H_o$  and  $H_o / L_o$ , the curve fitting yields

$$H_b = 0.478 H_o \left( \frac{H_o}{L_o} \right)^{-0.28} \quad (28)$$

x) Rattanapitikon and Shibayama (2000), hereafter referred to as RS00, proposed 3 empirical formulas based on the re-analysis of existing breaker height formulas. The published experimental data from 24 sources were used to calibrate the formulas. The experiments cover a range of  $0 < m < 0.44$  and  $0.001 < H_o / L_o < 0.10$ . The first formula is

$$H_b = (-2.06m^2 + 0.67m + 0.46) L_o \left( \frac{H_o}{L_o} \right)^{0.75} \quad (29)$$

Equation (29) is referred to as RS00a hereafter. The second formula is

$$H_b = 0.17 L_o \left\{ 1 - \exp \left[ \frac{\pi h_b}{L_o} (16.21m^2 - 7.07m - 1.55) \right] \right\} \quad (30)$$

Equation (30) is referred to as RS00b hereafter. The third formula is

$$H_b = 0.1L_o \tanh \left[ \left( -81.07m^2 + 35.27m + 7.88 \right) \frac{h_b}{L_o} \right] \quad (31)$$

Equation (31) is referred to as RS00c hereafter.

### Experimental data

Two sources of large-scale experiments have been collected to examine the existing breaker height formulas, i.e., experiments of CRIEPI (Kajima *et al.*, 1983) and SUPERTANK (Kraus and Smith, 1994). The collected experiments were performed over the movable bed conditions. The experiments cover a wide range of wave and bottom conditions ( $0.003 \leq H_o / L_o \leq 0.112$ , and  $0 \leq m \leq 0.29$ ). A total of 112 cases of

breaker height data are obtained from the experiments. Brief summary of each experiment is given below.

The experiment of CRIEPI was performed by Kajima *et al.* (1983) at Central Research Institute of Electric Power Industry (CRIEPI). The experiments were performed under the condition of regular wave and movable bed in a large wave flume (205 m long, 3.4 m wide and 6 m deep). Coarse sand ( $D_{50} = 0.47$  mm) and fine sand ( $D_{50} = 0.27$  mm) were used in the experiments. The wave heights were measured at various sections along the flume, covering both offshore and surf zone. Table 1 shows the CRIEPI experimental conditions that were used in this study. Run number in Table 1 is kept to be the same as the original.

The experiment of SUPERTANK Laboratory Data Collection Project (Kraus and Smith, 1994) was conducted to investigate cross-shore hydrodynamic and sediment transport processes,

**Table 1. Summary of collected experimental data used to examine the formulas.**

| Sources                              | Run No. | No. of cases | $H_o / L_o$        | $m$              |
|--------------------------------------|---------|--------------|--------------------|------------------|
| CRIEPI (Kajima <i>et al.</i> , 1983) | 2.1     | 6            | 0.028-0.030        | 0.06-0.21        |
|                                      | 2.2     | 7            | 0.006-0.007        | 0.00-0.09        |
|                                      | 2.3     | 6            | 0.046-0.052        | 0.00-0.03        |
|                                      | 3.1     | 5            | 0.007-0.011        | 0.08-0.23        |
|                                      | 3.2     | 7            | 0.017-0.022        | 0.06-0.18        |
|                                      | 3.3     | 8            | 0.003              | 0.06-0.16        |
|                                      | 3.4     | 9            | 0.105-0.111        | 0.05-0.29        |
|                                      | 4.1     | 5            | 0.016-0.020        | 0.02-0.03        |
|                                      | 4.2     | 7            | 0.031-0.039        | 0.03-0.17        |
|                                      | 4.3     | 9            | 0.103-0.112        | 0.00-0.28        |
|                                      | 5.1     | 5            | 0.006              | 0.00-0.02        |
|                                      | 5.2     | 10           | 0.052-0.058        | 0.00-0.18        |
|                                      | 6.1     | 6            | 0.043-0.045        | 0.15-0.21        |
|                                      | 6.2     | 2            | 0.013-0.014        | 0.10-0.11        |
| SUPERTANK (Kraus and Smith, 1994)    | STG0    | 5            | 0.046-0.064        | 0.08-0.12        |
|                                      | STH0    | 4            | 0.013-0.063        | 0.10-0.13        |
|                                      | STI0    | 11           | 0.004-0.008        | 0.08-0.11        |
| <b>Total</b>                         |         | <b>112</b>   | <b>0.003-0.112</b> | <b>0.00-0.29</b> |

during the period of August 5 to September 13, 1992, at Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA. A 76-m-long sandy beach was constructed in a large wave tank of 104 m long, 3.7 m wide and 4.6 m deep. The 20 major tests were performed and each major test consisted of several cases. Most of the major tests were performed under the irregular wave actions. However, 3 major tests were performed under regular wave actions, i.e., test No. STGO, STHO and STIO. The wave heights were measured at various sections along the flume, covering both offshore and surf zone. Table 1 shows the SUPERTANK experimental conditions that were used in this study. Run number in Table 1 is kept to be the same as the original.

The breaking point is determined from wave height profile. The breaking point is defined as the point where the wave height is maximum. The breaker height ( $H_b$ ) and depth ( $h_b$ ) are the wave height and still water depth at the breaking point. The local bottom slope ( $m$ ) is defined as the local slope measured seaward of the breaking point. If the bottom slope is adverse slope (negative value), it will be set to be zero.

### Formulas examinations

The objective of this section is to examine the accuracy of the 29 breaker height formulas mentioned in the first section. A straightforward way to examine a formula is to compare the computed breaker height with the measured data. In order to evaluate the accuracy of the computation, the examination results are presented in terms of root mean square (*rms*) relative error,  $ER$ , which is defined as

$$ER = 100 \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (H_{bci} - H_{bmi})^2}{\sum_{i=1}^n H_{bmi}^2}} \quad (32)$$

where  $i$  is the wave height number,  $H_{bci}$  is the computed breaker height of number  $i$ ,  $H_{bmi}$  is the measured breaker height of number  $i$ , and  $n$  is the total number of measured breaker height. Smaller values of  $ER$  correspond to a better

prediction.

According to the bottom slope conditions in Eq. (5) and Eq. (13), the group of bottom slope may be classified to be  $m \leq 0.07$ ,  $0.07 < m \leq 0.10$ , and  $m > 0.10$ . However some formulas (e.g., MK67, SH74, and SU80) are not valid for the bottom slope  $m = 0$ . Therefore, in this study, the bottom slope is classified into 4 groups, i.e., horizontal ( $m = 0$ ), gentle ( $0 < m \leq 0.07$ ), intermediate ( $0.07 < m \leq 0.10$ ), and steep ( $m > 0.10$ ). The total number of cases of the collected data for  $m = 0$ ,  $0 < m \leq 0.07$ ,  $0.07 < m \leq 0.10$  and  $m > 0.10$  are 4, 40, 24 and 44, respectively.

The computations of the breaker height formulas are carried out with 2 sources of collected data (see Table 1). Table 2 shows the *rms* relative error ( $ER$ ) of each formula for 4 groups of bottom slope and all cases. The examination results from Table 2 can be summarized as follows:

1) The errors  $ER$  shown in Table 2 vary from 7.6 to 84.0. The formula of RS00c gives the best prediction ( $ER = 7.6$ ) for the breaking wave on the bottom slope of  $0.07 < m \leq 0.10$  while the formula of CW69 gives the worst prediction ( $ER = 84.0$ ) for the breaking wave on the bottom slope of  $m > 0.10$ .

2) Some formulas are not valid for the horizontal slope ( $m = 0$ ), i.e., the formulas of MK67, SH74, SU80, SW80a, SW80b, OS84, LK89a, and HA90. The formulas that give very good prediction ( $ER < 12$ ) for the breaking wave on the horizontal slope are the formulas of MI44, GA69, CW69, MA76, SK88, LK89b and GL92.

3) The formulas that give very good prediction ( $ER < 12$ ) for the breaking wave on the gentle slope ( $0 < m \leq 0.07$ ) are the formulas of MI44, GO70, OM79, SW80a, LK89b, KA91, GL92, RS00b, and RS00c.

4) The formulas that give very good prediction ( $ER < 12$ ) for the breaking wave on the intermediate slope ( $0.07 < m \leq 0.10$ ) are the formulas of MK67, OM79, SW80a, OS84, LK89b, SK90a, SK90b, GL92, RS00a, RS00b, and RS00c.

5) Most of existing formulas seem to give unsatisfactory predictions for the breaking waves



**Table 2. The root mean square relative error (*ER*) of each formula for four groups of bottom slope and all cases.**

| Formulas       | $m = 0$ | $0 < m \leq 0.07$ | $0.07 < m \leq 0.10$ | $m > 0.10$ | All 112 cases |
|----------------|---------|-------------------|----------------------|------------|---------------|
| MC94 (Eq. 1)   | 13.1    | 31.2              | 29.2                 | 30.3       | 30.1          |
| MI44 (Eq. 2)   | 9.6     | 10.2              | 18.8                 | 25.8       | 20.7          |
| MU49 (Eq. 3)   | 34.5    | 28.6              | 24.7                 | 21.4       | 24.7          |
| MK67 (Eq. 4)   | N.A.*   | 19.8              | 8.2                  | 19.2       | 17.9**        |
| GA69 (Eq. 5)   | 9.9     | 46.0              | 41.7                 | 20.7       | 34.1          |
| CW69 (Eq. 6)   | 9.9     | 52.1              | 52.3                 | 84.0       | 69.4          |
| GO70 (Eq. 7)   | 16.3    | 10.7              | 12.6                 | 46.2       | 33.7          |
| WE72 (Eq. 8)   | 13.1    | 13.8              | 12.2                 | 13.7       | 13.5          |
| KG72 (Eq. 9)   | 16.0    | 17.3              | 15.6                 | 9.6        | 13.6          |
| SH74 (Eq. 10)  | N.A.*   | 18.1              | 16.9                 | 40.8       | 31.6**        |
| MA76 (Eq. 11)  | 9.9     | 46.6              | 44.4                 | 66.5       | 56.7          |
| BJ78 (Eq. 12)  | 12.9    | 13.6              | 24.5                 | 31.3       | 25.6          |
| OM79 (Eq. 13)  | 20.2    | 11.6              | 8.4                  | 11.6       | 11.4          |
| SU80 (Eq. 14)  | N.A.*   | 31.3              | 25.1                 | 19.3       | 24.6**        |
| SW80a (Eq. 15) | N.A.*   | 8.8               | 9.1                  | 13.2       | 11.3**        |
| SW80b (Eq. 16) | N.A.*   | 29.9              | 25.5                 | 19.9       | 24.4**        |
| OS84 (Eq. 17)  | N.A.*   | 13.8              | 8.7                  | 17.5       | 15.1**        |
| BS85 (Eq. 18)  | 16.4    | 25.4              | 37.3                 | 36.8       | 33.5          |
| SK88 (Eq. 20)  | 9.3     | 19.1              | 18.0                 | 14.8       | 16.7          |
| LK89a (Eq. 21) | N.A.*   | 28.3              | 24.1                 | 21.4       | 24.2**        |
| LK89b (Eq. 22) | 11.2    | 10.0              | 9.0                  | 7.9        | 8.8           |
| HA90 (Eq. 23)  | N.A.*   | 29.3              | 25.9                 | 24.6       | 26.3**        |
| SK90a (Eq. 24) | 24.0    | 15.0              | 8.5                  | 17.0       | 15.4          |
| SK90b (Eq. 25) | 32.3    | 18.1              | 9.5                  | 11.2       | 14.2          |
| KA91 (Eq. 27)  | 17.1    | 11.8              | 13.6                 | 55.4       | 40.1          |
| GL92 (Eq. 28)  | 10.9    | 7.9               | 11.6                 | 12.3       | 11.0          |
| RS00a (Eq. 29) | 17.5    | 14.4              | 8.9                  | 8.3        | 10.9          |
| RS00b (Eq. 30) | 14.5    | 9.7               | 8.7                  | 8.9        | 9.2           |
| RS00c (Eq. 31) | 13.9    | 9.2               | 7.6                  | 8.4        | 8.7           |

\* N.A. = Not Applicable

\*\* Exclude  $m = 0$ 

on the steep slope ( $m > 0.1$ ). The formulas that give very good prediction ( $ER < 12$ ) for the breaking wave on the steep slope are the formulas of KG72, OM79, LK89b, SK90b, RS00a, RS00b, and RS00c.

6) The formula that gives very good prediction ( $ER < 12$ ) for the four groups of bottom slope is the formula of LK89b.

7) The formulas that give very good prediction ( $ER < 12$ ) for all cases are the formulas of OM79, LK89b, GL92, RS00a, RS00b, and

RS00c. The formula of SW80a gives very good prediction for the breaking wave on the slope  $m > 0$ .

8) The formula of RS00c gives the best prediction ( $ER = 8.7\%$ ) over a wide range of experiments. However higher overall accuracy rating of a formula does not guarantee that the formula is superior to others under all conditions. The accuracy rating of a formula may vary depending on the bottom slope conditions. The best formulas for predicting the breaker heights on

the bottom slopes of  $m = 0$ ,  $0 < m \leq 0.07$ ,  $0.07 < m \leq 0.1$ , and  $m > 0.10$  are the formulas of SK88, GL92, RS00c, and LK89b, respectively.

The comparison between measured and computed breaker height from the RS00c formula is shown in Figure 1. The solid line in the figure is the line of perfect agreement.

### Conclusions

A total of 112 cases from 2 sources of large-scale experimental results were used to examine 29 existing breaker height formulas. The experimental data cover a wide range of wave and bottom conditions ( $0.003 \leq H_o / L_o \leq 0.112$ , and  $0 \leq m \leq 0.29$ ). The examination results were presented in terms of root mean square relative error (ER). It was found that most previous formulas give a fair prediction for the breaking waves on the steep slope ( $m > 0.1$ ). Overall, the formulas that give very good predictions are those by OM79, LK89b, GL92, and RS00. The formula of RS00c gives the best prediction ( $ER = 8.7\%$ ) over a wide range of experiments. However higher overall accuracy rating

of a formula does not guarantee that the formula is superior to others under all conditions. The accuracy rating of a formula may vary depending on the bottom slope conditions. The best formulas for predicting the breaker heights on the bottom slopes of  $m = 0$ ,  $0 < m \leq 0.07$ ,  $0.07 < m \leq 0.1$ , and  $m > 0.10$  are the formulas of SK88, GL92, RS00c, and LK89b, respectively.

### References

- Battjes, J.A. and Janssen, J.P.F.M. 1978. Energy loss and set-up due to breaking of random waves, Proc. 16<sup>th</sup> Coastal Engineering Conf., ASCE: 569-587.
- Battjes, J.A. and Stive, M.J.F. 1985. Calibration and verification of a dissipation model for random breaking waves, J. Geophysical Research, 90: 9159-9167.
- Black, K.P. and Rosenberg, M.A. 1992. Semi-empirical treatment of wave transformation outside and inside the breaker line, Coastal Engineering, 16: 313-345.
- Bowen, A.J., Inman, D.L. and Simmons, V.P. 1968. Wave set-down and set-up, J. Geophysical Research, 73: 2569-2577.
- Collins, J.I. and Weir, W. 1969. Probabilities of wave characteristics in the surf zone, Tetra Tech. Report, TC-149, Pasadena, California, USA.
- Collins, J.I. 1970. Probabilities of breaking wave characteristics, Proc. 12<sup>nd</sup> Coastal Engineering Conf., ASCE: 399-414.
- Danel, P. 1952. On the limiting clapotis, Gravity Waves, U.S. Dept. of Commerce, National Bureau of Standards, Circular 521: 35-45.
- Galvin, C.J. 1969. Breaker travel and choice of design wave height, J. Waterways and Harbors Division, ASCE, 95:175-200.
- Goda, Y. 1964. Wave force on a vertical circular cylinder: Experiments and a proposed method of wave force computation, Rept. Port and Harbor Res. Inst., No. 8.
- Goda, Y. 1970. A synthesis of breaker indices, Trans. JSCE, 2: 227-230.
- Goda, Y. 1974. New wave pressure formula for composite breakwater, Proc. 14<sup>th</sup> Coastal Engineering Conf., ASCE: 1702-1720.
- Gourlay, M.R. 1978. Wave Generated Currents, Ph.D. Thesis, Dept. of Civil Eng., University of Queensland.

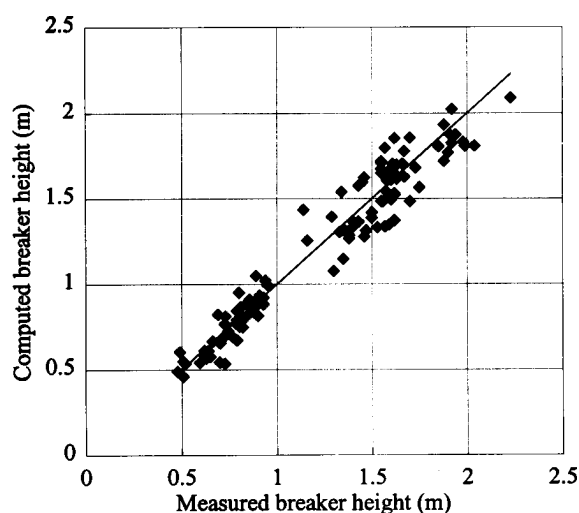


Figure 1. Comparison between measured and computed breaker heights from the RS00c formula (measured data from CRIEPI, 1983 and SUPERTANK, 1994).

- Gourlay, M.R. 1992. Wave set-up, wave run-up and beach water table: Interaction between surf zone hydraulics and groundwater hydraulics, *Coastal Engineering*, 17: 93-144.
- Hamada, T. 1963. Breakers and beach erosion, Port and Harbor Research Institute, Ministry of Transportation, Japan.
- Hansen, J.B. 1990. Periodic waves in the surf zone: Analysis of experimental data, *Coastal Eng.*, 14: 19-41.
- Hansen, J.B. and Svendsen, I.A. 1979. Regular waves in shoaling water experimental data, Series paper No. 21, Institute of Hydrodynamics and Hydraulic Eng., Technical University of Denmark, Denmark.
- Iversen, H.W. 1952. Laboratory study of breakers, *Gravity Waves*, Circular 52, US Bureau of Standards: 9-32.
- Jen, Y. and Lin, P.M. 1970. Plunging wave pressures on a semi-cylindrical tube, *Proc. 12<sup>nd</sup> Coastal Engineering Conf.*, ASCE: 1469-1490.
- Kajima, R., Shimizu, T., Maruyama, K. and Saito, S. 1983. On-offshore sediment transport experiment by using large scale wave flume, Collected data No. 1-8, Central Research Institute of Electric Power Industry, Japan (in Japanese).
- Kamphuis, J.W. 1991. Incipient wave breaking, *Coastal Engineering*, 15: 185-203.
- Komar, P.D. and Gaughan, M.K. 1972. Airy wave theory and breaker height prediction, *Proc. 13<sup>rd</sup> Coastal Eng. Conf.*, ASCE: 405-418.
- Kraus, N.C., and Smith, J.M. 1994. SUPERTANK Laboratory Data Collection Project, Technical Report CERC-94-3, U.S. Army Corps of Engineers, Waterways Experiment Station.
- Larson, M. and Kraus, N.C. 1989. SBEACH: Numerical model for simulating storm-induced beach change, Report 1, Tech. Report CERC-89-9, Waterways Experiment Station, US Army Corps of Engineers.
- Le Mehaute, B. and Koh, R.C.Y. 1967. On the breaking of waves arriving at an angle to the shore, *J. Hydraulic Research*, 5: 67-88.
- Madsen, O.S. 1976. Wave climate of the continental margin: Elements of its mathematical description, D.J. Stanley and D.J.P. Swift (Editors), *Marine Sediment Transport in Environmental Management*. Wiley, New York: 65-87.
- McCowan, J. 1894. On the highest waves of a permanent type, *Philosophical Magazine*, Edinburgh, Ser. 5, 38: 351-358.
- Miche, R. 1944. Mouvements ondulatoires des mers en profondeur constante ou décroissante, *Ann. des Ponts et Chaussées*, Ch.114: 131-164, 270-292, and 369-406.
- Mitsuyasu, H. 1962. Experimental study on wave force against a wall, Report of the Transportation Technical Res. Inst., No. 47 (in Japanese).
- Munk, W.H. 1949. The solitary wave theory and its application to surf problems, *Annals of the New York Academy of Sciences*, No. 51.
- Ogawa, Y. and Shuto, N. 1984. Run-up of periodic waves on beaches of non-uniform slope, *Proc. 19<sup>th</sup> Coastal Eng. Conf.*, ASCE: 328-344.
- Ostendorf, D.W. and Madsen, O.S. 1979. An analysis of longshore current and associated sediment transport in the surf zone, Report No. 241, Dept. of Civil Eng., MIT.
- Rattanapitikon, W. and Shibayama T. 2000. Verification and modification of breaker height formulas, *Coastal Eng. Journal*, JSCE, 2: 389-406.
- Reid, R.O. and Bretschneider, C.L. 1953. Surface waves and offshore structures, Technical Report No. 53-10, Texas A&M University.
- Seyama, A. and Kimura, A. 1988. The measured properties of irregular wave breaking and wave height change after breaking on slope, *Proc. 21<sup>st</sup> Coastal Engineering Conf.*, ASCE: 419-432.
- Singamsetti, S.R. and Wind, H.G. 1980. Characteristics of breaking and shoaling periodic waves normally incident on to plane beaches of constant slope, Report M1371, Delft Hydraulic Lab., Delft, The Netherlands.
- Smith, D.A. 1974. Radiation stress effects on wave set-up in the surf zone, M.Sc. Thesis, Dept. of Civil Eng., University of London, Imperial College.
- Smith, J.M. and Kraus, N.C. 1990. Laboratory study on macro-features of wave breaking over bars and artificial reefs, Technical Report CERC-90-12, WES, U.S. Army Corps of Engineers.
- Stive, M.J.F. 1984. Energy dissipation in wave breaking on gentle slopes, *Coastal Engineering*, 8: 99-127.
- Sunamura, T. 1980. A laboratory study of offshore transport of sediment and a model for eroding beaches, *Proc. 17<sup>th</sup> Coastal Eng. Conf.*, ASCE: 1051-1070.
- Sunamura, T. and Horikawa, K. 1974. Two-dimensional beach transformation due to waves, *Proc. 14<sup>th</sup> Coastal Eng. Conf.*, ASCE: 920-938.

- 
- Suquet, F. 1950. Experimental study on the breaking of waves, *La Houille Blanche*, No. 3, May to June.
- Van Dorn, W.G. 1978. Breaking invariance in shoaling waves, *J. Geophysical Research*, 83: 2981-2988.
- Visser, P.J. 1977. Wave set-up: experimental investigation on normally incident waves, Report No. 77-1, Laboratory of Fluid Mech., Dept. of Civil Eng., Delft University of Tech., Delft, The Netherlands.
- Weggel J. R. 1972. Maximum breaker height, *J. Waterways, Harbors and Coastal Eng. Div.*, 98: 529-548.
- Weggel, J.R. and Maxwell, W.H.C. 1970. Experimental study of breaking wave pressures, Second Annual Offshore Technology Conference, Texas, OTC-1244.

## ศักยภาพแหล่งทรายก่อสร้างในพื้นที่จังหวัดสงขลา

ดนุพล ตันนโยภาส<sup>1</sup> สมชัย ชัยเสน<sup>2</sup> และ กัลยาณี คุปตานนท์<sup>3</sup>

### Abstract

Tonnayopas, D., Chaisen, S. and Kooptarnond, K.

Potential building sand deposits in Songkhla province area

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 675-700

An investigation of potential building sand deposits in Songkhla province area subdivided them into four regions according to their accumulation in various alluvial plains, meanders throughout alluvial deposits and residual soils. Four selected deposits, were Rattaphum-Khuan Niang, U-Taphao river, Na Mom, and Chana-Thepha regions. Information obtained from these deposits revealed a good correlation between the geomorphological features as interpreted from aerial photographs and those identified from vertical electrical resistivity sounding results. Sand samples were analysed for their physical and chemical properties. Petrographic studies were also undertaken to characterize the composition types,

Department of Mining and Materials Engineering, Faculty of Engineering, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

<sup>1</sup> Ph.D. (Applied Geology) รองศาสตราจารย์ <sup>2</sup> วศ.ม. (วิศวกรรมเหมืองแร่) <sup>3</sup> ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมเหมืองแร่และวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112  
Corresponding e-mail : [tdanupon@ratree.psu.ac.th](mailto:tdanupon@ratree.psu.ac.th)

texture and shapes. An overview of the sand properties was used them to be within the acceptable limits for building sand. However, relatively high organic impurities and soundness were found in sand from Khuan Niang and Na Mom deposits. The result indicated a potential reconnaissance mineral resource of about 46 square kilometres.

A reserve evaluation for natural building sand was carried out by using Geographic Information System (GIS). Maps of the various parameters considered were constructed in digital database format with the aid of Arc/Info and ArcView software. Overlay mapping and buffer zone modules were performed to evaluate inferred resources of building sand. The key parameters of analysis included the distance from transportation, distance from streams, lithology and thickness of sand layers. The remaining inferred sand total was of about 386 million cubic metres or about 1,021 million metric tons was therefore estimated, of which 60 percent lies in the Rattaphum-Khuan Niang region and 40 percent in the other regions.

**Key words :** Engineering geology, sand deposit, Songkhla, GIS, geoelectric, buffer zone, overlay mapping

### บทคัดย่อ

دنۇفل دىننۇيولاس سىمىيىيى سىسەن ۋە گىلىيىمى قۇپداننىڭ

ئىگىيەتلىك تەلەپلەرگە ئاساسەن قىلىنغان قىياپەتلىك تەلەپلەرگە ئاساسەن

۱. سىمىيىيى سىسەن ۋە گىلىيىمى قۇپداننىڭ ۲۵۴۵ ۲۴(۴) : ۶۷۵-۷۰۰

การสำรวจศักยภาพแหล่งทรายก่อสร้างในพื้นที่จังหวัดสงขลา แบ่งได้เป็นสี่เขตตามลักษณะการสะสมตัวหลากหลายในที่ราบตะกอนน้ำพา ทางน้ำโค้งตัวจนถึงแหล่งสะสมตะกอนน้ำพา และดินตกค้าง พื้นที่แหล่งทรายทั้งสี่ที่ได้เลือกไว้ เรียกว่า เขตตรังภูมิ-ควนเนียง เขตคลองคูเต่า เขตนาหม่อม และเขตจะนะ-เทพา นอกจากนี้สารสนเทศของภาพลักษณ์ทางธรณีวิทยาฐานที่แปลจากรูปถ่ายทางอากาศและรูปพรรณสัณฐานจากการหยั่งด้วยความต้านทานไฟฟ้าแนวตั้งได้แสดงถึงสหสัมพันธ์กันเป็นอย่างดี การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตัวอย่างทราย ทางศิลปวรรณาก็ได้ตรวจถึงลักษณะรูปร่าง ผิวเนื้อ และ ส่วนประกอบแร่ โดยภาพรวมสมบัติของทรายอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานสำหรับทรายก่อสร้าง แม้ว่ามีปริมาณสารอินทรีย์เจือปนและค่าคงตัวที่พบในกลุ่มตัวอย่างจากแหล่งควนเนียงและนาหม่อมมีค่าค่อนข้างสูงเกินความเหมาะสม ผลการศึกษาระบุว่าพื้นที่ศักยภาพปริมาณสำรองของทรายสำรวจเบื้องต้นมีอยู่ประมาณ 46 ตร.กม.

การประเมินปริมาณสำรองแหล่งทรายก่อสร้างธรรมชาติด้วยการใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ ได้พิจารณาแผนที่หลายชนิดที่มีปัจจัยต่างกัน นำมาสร้างขึ้นในฐานข้อมูลเชิงตัวเลขด้วยโปรแกรม Arc/Info และ ArcView ด้วยชุดคำสั่งย่อยการทำแผนภาพเชิงซ้อนและเขตกันชน ได้ประเมินถึงปริมาณสำรองอนุมาณของทรายก่อสร้าง ปัจจัยสำคัญในการวิเคราะห์ประกอบด้วย ระยะห่างจากเส้นทางคมนาคม ระยะห่างจากทางน้ำ วิทยาหินและความหนาของแหล่งทราย อย่างไรก็ตามทรายที่อนุมาณไว้ทั้งหมดได้ประเมินคงเหลือประมาณ 386 ล้านลบ.เมตร หรือประมาณ 1,021 ล้านเมตริกตัน ซึ่ง 60% อยู่ในเขตตรังภูมิ-ควนเนียง และ 40% อยู่ในเขตที่เหลือ

จากประมาณการการใช้ทรายคิดมาจากอัตราส่วนการใช้ปูนซีเมนต์ของประเทศไทยในอดีต (กรมทรัพยากรธรณี 2538) พยากรณ์ว่าในช่วงปี พ.ศ. 2543-2546 มีความต้องการทรายเพิ่มขึ้นถึง 26.11% หรือเฉลี่ยอัตรา

8%/ปี คิดเป็นน้ำหนักได้ประมาณ 60 ล้านตัน หรือประมาณ 23 ล้านลบ.เมตร ซึ่งยังไม่รวมถึงทรายที่นำไปถม แต่เมื่อเกิดวิกฤติการณ์ทางด้านเศรษฐกิจเป็นต้นมา ปริมาณการก่อสร้างลดลงเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้อุปสงค์

ทรายในเวลาต่อมลดลงตามไปด้วย อย่างไรก็ตามคาด  
การณ์ว่าเมื่อสถานการณ์ทางเศรษฐกิจฟื้นตัวขึ้น ปริมาณ  
ความต้องการใช้ทรายก็จะคืนสู่เท่าเดิมหรือเพิ่มขึ้น

จังหวัดสงขลา เป็นศูนย์กลางทางด้านเศรษฐกิจที่  
สำคัญแห่งหนึ่งในภาคใต้ตอนล่าง โดยเฉพาะพื้นที่อำเภอ  
หาดใหญ่ที่เป็นศูนย์กลางทางการพาณิชย์และการท่องเที่ยว  
ที่สำคัญ มีอุปสงค์ทรัพยากรทรายธรรมชาติในการ  
ก่อสร้างสาธารณูปการมากขึ้นทุกปี ซึ่งในพื้นที่อื่นมีหลาย  
หน่วยงานได้ดำเนินการสำรวจและเก็บข้อมูลทรายอย่างเป็น  
ระบบ (ชิมชัยและรัศมี 2537; รังสีและโชติ 2540;  
อำไพ 2541) แต่สำหรับข้อมูลแหล่งทรายก่อสร้างในสงขลา  
(สมชัย, 2540) ยังขาดแคลน กระจัดกระจาย และจัดเก็บ  
ไม่เป็นระบบ จึงได้มีการศึกษาวิธีค้นหาอย่างเป็นระบบ  
นับตั้งแต่กลยุทธ์ค้นหา การสำรวจ การประเมิน ไปจนถึง  
ขั้นตอน แยกทรายก่อสร้าง (building sand) โดยเน้น  
ด้านธรณีวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการกำเนิดและลักษณะการ  
สะสมตัว ปริมาณสำรองและพื้นที่แหล่งใหม่ ซึ่งต้องอาศัย  
เทคนิคหลายด้านบูรณาการเป็นสหวิทยาการ (multidis-  
ciplinary) ได้แก่ การรับรู้จากระยะไกล (remote sens-  
ing) การสำรวจทางธรณีฟิสิกส์ การสำรวจทางธรณี  
หลักฐานวิทยาและธรณีวิทยาในภาคสนาม และ การ  
วิเคราะห์คุณภาพ (กายภาพและทางเคมี) ของทราย เป็นต้น  
โดยมีจุดมุ่งหมายจัดแบ่งชนิดหรือกลุ่มของทรายตามความ  
เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในภาคอุตสาหกรรม  
ก่อสร้างสูงสุด อันนำไปสู่การติดตั้งแผนที่ความคิด ในการ  
วางแผนการจัดการทรัพยากรธรรมชาติทรายอย่างยั่งยืน  
ในอนาคตและหาแนวทางจำกัดเขตพื้นที่ประกอบการให้มี  
ผลกระทบทางด้านสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด โดยวิเคราะห์  
ภูมิสารสนเทศที่กล่าวมา ด้วยโปรแกรมระบบสารสนเทศ  
ภูมิศาสตร์ของ Arc/Info และ ArcView

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

### 1. วัสดุอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์หลักที่จำเป็นอย่างยิ่งต่อการดำเนินงาน  
วิจัยครั้งนี้ประกอบไปด้วยดังนี้

1. รูปถ่ายทางอากาศ ขาวดำ มาตราส่วนประมาณ  
1:50,000 ของกรมแผนที่ทหาร ที่ถ่ายใช้ในโครงการ  
สำรวจการใช้ที่ดิน คลุมพื้นที่แอ่งสะสมตัวของทรายศึกษา  
ทั้งหมด (Table 1)

2. กล้องมองภาพสามมิติแบบกระจก (mirror  
stereoscope) พร้อมด้วยอุปกรณ์เสริม

3. แผนที่ภูมิประเทศของกรมแผนที่ทหาร มาตรา  
ส่วน 1:50,000 ลำดับชุด L7017 จำนวน 4 ระวัง คือ  
ระวัง 5023 II (อ.รัตภูมิ) 5022 I (อ.หาดใหญ่) 5122 I  
(อ.เทพา) และ 5122 IV (อ.จะนะ) (Figure 1)

4. แผนที่ธรณีวิทยาประเทศไทย มาตราส่วน 1:  
250,000 ระวัง NB 47-8, 5 (จ.นราธิวาส และ อ.ตากใบ)  
ระวัง 47-3 (จ.สงขลา) และระวัง NB47-7 (จ.สตูล) ของ  
กรมทรัพยากรธรณี (2528) และสำเนาชุดแผนที่ธรณีวิทยา  
ไม่พิมพ์เผยแพร่ มาตราส่วน 1:50,000 ได้แก่ ระวัง 5122  
IV อ.จะนะ (สมชายและสมชัย 2529) และระวัง 5122 I  
อ.เทพา (สมชายและคณะ 2531)

5. อุปกรณ์สำรวจทางธรณีและเก็บตัวอย่าง ได้แก่  
เข็มทิศและหมอนธรณีวิทยา พลั่ว ถูพลาสติกหนา และ  
ยางรัด พร้อมด้วยแผ่นกระดาษบันทึกข้อมูลระบุตัวอย่าง

6. เครื่องวัดสภาพความต้านทานไฟฟ้าหือ OYO  
รุ่น McOHM Mark-2 Model-2115A พร้อมชุด  
อุปกรณ์เสริม และคอมพิวเตอร์พร้อมโปรแกรมสำเร็จรูปที่  
ใช้แปลความชื่อ Resist version 1.0

7. อุปกรณ์หาพิกัดภูมิศาสตร์ด้วยดาวเทียม (Global

Table 1. The characteristics of the studied aerial photograph

| Location              | Run path | Number of photograph | Date of acquisition |
|-----------------------|----------|----------------------|---------------------|
| Rattaphum-Khuan Niang | 16 A     | 159-175              | 31 March 1995       |
|                       | 15 B     | 22-52                | 7 April 1995        |
| U-Taphao              | 17 A     | 16-18                | 7 April 1995        |
| Na Mom                | 19       | 212-216              | 11 April 1995       |
| Chana-Thepha          | 22       | 90-102               | 9 April 1995        |

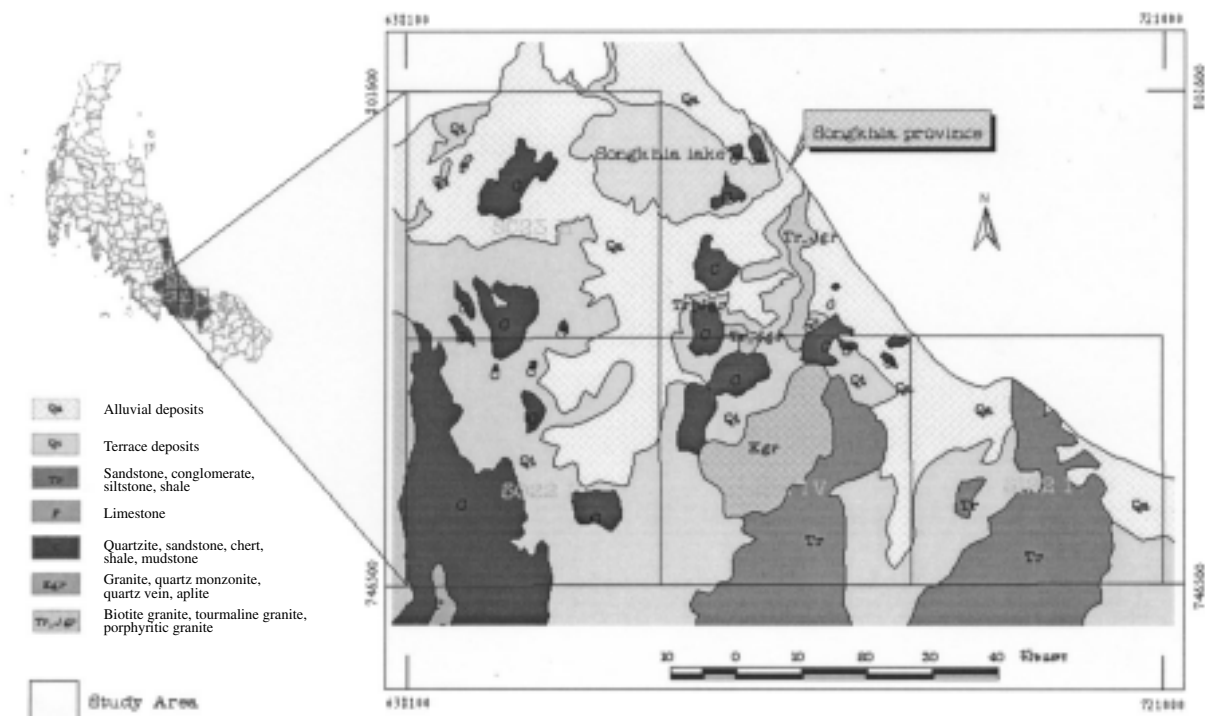


Figure 1. General geological map of study area

Positioning System- GPS) ยี่ห้อ Trimble Pathfinder รุ่น TDC1 พร้อมโปรแกรม Pathfinder Office version 1.10

8. กล้องขยายและกล้องจุลทรรศน์ ที่มีกำลังขยายต่างกัน พร้อมอุปกรณ์บันทึกภาพ

9. เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล หน่วยความจำชั่วคราว 128 MB หน่วยความจำถาวร 40 GB

10. อุปกรณ์นำเข้าข้อมูล เช่น เครื่องกวาดภาพ (scanner) เครื่องอ่านฟลิค (digitizer)

11. อุปกรณ์แสดงผล จอภาพ 20 นิ้ว เครื่องพิมพ์ และเครื่องวาดภาพ

12. โปรแกรมสำเร็จรูปที่ใช้ในการประมวลผล ได้แก่ Arc/Info รุ่น 3.5.2 และ ArcView รุ่น 3.1 โปรแกรม Pathfinder Community Base Station รุ่น 2.68I และ Pathfinder Office รุ่น 1.10 รวมทั้งโปรแกรมสนับสนุนการสร้างชั้นความหนา Surfer รุ่น 6.03

## 2. วิธีการ

การสำรวจศักยภาพแหล่งทรายจังหวัดสงขลา ดำเนินการครอบคลุมพื้นที่บางส่วนของอำเภอรัตภูมิ วนเนียง บางกล่ำ หาดใหญ่ นาหม่อม คลองหอยโข่ง นาทวี เทพา และ สะเดา พื้นที่รวมกันทุกระวางประมาณ 3,054 ตร.กม. (Figure 1)

ด้วยขนาดพื้นที่สำรวจค่อนข้างกว้าง กอปรกับต้องการสำรวจคุณภาพและปริมาณทรายนำไปใช้ในงานก่อสร้าง ฉะนั้นเพื่อให้ได้สารสนเทศที่ต้องการ จึงได้เลือกวิธีการสำรวจทางธรณีวิศวกรรม (engineering geological investigation) อันเป็นการผสมผสานความรู้ทั้งด้านธรณีวิทยาและวิศวกรรมโยธา (دنۇفل 2542) โดยใช้ อุปกรณ์และเทคนิคสำรวจทางอากาศ บนพื้นดินและใต้ดิน เพื่อนำสารสนเทศดังกล่าวมาบูรณาการเกิดผลที่ถูกต้องและทรงประสิทธิภาพสูงสุด ดังมีรายละเอียดวิธีการต่อไปนี้



## 2.1 การแปลธรณีวิทยาภาพถ่าย (photogeology - interpretation)

จากภาพลักษณะต่างๆ ที่ปรากฏบนรูปถ่ายอันเป็นเบื้องต้นในการแปลรูปถ่าย (دنفلและคณะ 2540) และได้ยึดถือแนวปฏิบัติแปลความสำรวจดิน (Campbell, 1978) เป็นเกณฑ์ในการค้นหาแหล่งทรายครั้งนี้ โดยแปลผ่านกล้องมองภาพสามมิติแบบกระจกชนิดประจำสำนักงานทำการคัดลอกข้อมูลใน GIS

## 2.2 การสำรวจด้านธรณีสัณฐานวิทยาและธรณีวิทยา

สำรวจภาคสนามเพื่อตรวจสอบข้อมูล หาลักษณะเพิ่มเติม และปรับปรุงแก้ไขงานแปลรูปถ่ายทางอากาศและข้อมูลแผนที่ธรณีวิทยาเดิม พร้อมทั้งวัดโครงสร้างธรณีวิทยาของหินต้นกำเนิดทรายและวางแผนกำหนดจุดสำรวจด้านธรณีไฟฟ้า เก็บตัวอย่างและป่อทรายทั้งที่ยังทำอยู่และป่อร้างจากเครื่องกำหนดพิกัดด้วยดาวเทียม (GPS)

## 2.3 การสำรวจด้านธรณีไฟฟ้า (geoelectric prospecting)

สำรวจในพื้นที่แหล่งทรายที่สามารถเข้าถึง และหลายจุดใกล้ป่อทรายที่ประกอบการอยู่ในปัจจุบันและที่ปล่อยทิ้งร้างไว้ เพื่อเปรียบเทียบผลการแปลชั้นความลึกกับสภาพชั้นทรายจริง ด้วยวิธีโครงแบบชลัมเบอร์เจอร์ (Schlumberger configuration) วัดสภาพความต้านทานไฟฟ้าจำเพาะปรากฏ (apparent resistivity) ของพื้นดินในแนวตั้ง (vertical electrical sounding-VES) ขยายระยะห่างของขั้วไฟฟ้าไกลสุดข้างละ 100 เมตร มีสถานีวัดทั้งหมด 47 จุด การแปลความลึกนั้น ได้นำเส้นโค้ง VES ที่ลงจุดความต้านทานจำเพาะกับระยะห่างขั้วไฟฟ้าในกราฟล็อกมาแปลความด้วยวิธีการจับคู่เส้นโค้งบางส่วน (partial curve matching method) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปชื่อ Resist version 1.0 ให้คำนวณจนเส้นโค้งคำนวณเข้าใกล้เส้นโค้งที่วัดจากภาคสนามมากที่สุด โดยพยายามให้มีค่าผิดพลาดรากยกกำลังสองเฉลี่ย (root mean square-RMS) ต่ำที่สุดเท่าที่เข้าสู่ได้ และในการแปลความลึกของแหล่งทรายครั้งนี้ ได้ยึดถือว่าเส้นโค้งที่ความชันผิดแผกไปจากเดิมมาก ระบุถึงจุดที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของชนิดชั้นตะกอน

## 2.4 การตรวจสอบสมบัติทรายและจำแนกทางวิศวกรรม

ตัวอย่างทรายที่เก็บมาในลักษณะเสียสภาพ (disturbed sample) และได้คัดขนาดก้อนหินมนใหญ่ (boulder) ถึงกรวดเล็ก (granule) ออก เนื่องจากมีปริมาณไม่มากถึงขั้นเป็นตัวแทนกลุ่ม ตัวอย่างเก็บมาทั้งหมด 18 แห่ง แห่งละ 2 ถุง แต่ละถุงหนัก 20-30 กก. นำมาตรวจสอบทางกายภาพและผลที่ได้เปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานอเมริกัน (The American Standards of Testing Materials-ASTM) เป็นหลัก

การลดปริมาณตัวอย่างจากสนามให้เป็นตัวอย่างทดสอบ (ASTM C 702) ได้ใช้เครื่องแบ่งตัวอย่าง (riffle sample splitter) โดยมุ่งตรวจสอบหลักของมวลรวมทรายที่ใช้งาน อันได้แก่ การคละขนาด (gradation) ของมวลรวม (ASTM C 136) ความถ่วงจำเพาะและการดูดซึมน้ำ (ASTM C 128) ปริมาณสารอินทรีย์ที่เจือปน (organic matter) (ASTM C 40) เทียบกับแผ่นแก้วสีมาตรฐาน (organic plate) ทดสอบการคงตัว (soundness) โดยใช้สารโซเดียมซัลเฟต (ASTM C 88) ตลอดจนตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเม็ดทรายภายใต้กล้องขยาย เช่น ผิวเนื้อ รูปร่าง (ASTM C 33) วัสดุองค์ประกอบทั้งแร่และเศษหิน (ASTM C 295) การจำแนกประเภทได้ยึดตามระบบการจำแนกดินเอกภาพ (unified soil classification-USC) และระบบกรมทางหลวงอเมริกา (ASSHTO)

## 2.5 การวิเคราะห์ทรายทางเคมี

วิเคราะห์ปริมาณส่วนประกอบออกไซด์ของซิลิกา ( $\text{SiO}_2$ ) ในทราย (ASTM C 146) เพื่อคำนึงถึงคุณภาพของทรายว่ามีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในงานอุตสาหกรรมประเภทใดมากที่สุด โดยยึดถือปริมาณซิลิกาที่น้อยกว่า 98.5% เป็นเกณฑ์ใช้ในอุตสาหกรรมก่อสร้าง เนื่องจากสภาพแวดล้อมธรณีวิทยาของพื้นที่ศึกษา ไม่พบแร่เป็นต้นกำเนิดให้เกลือ ที่อาจก่อให้เกิดปริมาณเกลือและคลอไรด์ละลาย (ASTM C 1218) ปนเปื้อนอยู่ในทรายถึงขั้นมีผลต่อวัสดุก่อสร้าง จึงไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์

## 2.6 วิเคราะห์ภูมิสารสนเทศ (Geo-Information Analysis)

จากข้อมูลการสำรวจศักยภาพแหล่งทรายจังหวัดสงขลา เป็นการนำเข้าข้อมูลศักยภาพแหล่งทราย ใน

ลักษณะจุด (point) เส้น (arc) และพื้นที่ (polygon) ทุกชนิดแปลงเป็นข้อมูลเชิงตัวเลข เข้าสู่ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ Arc/Info (Figure 2) โดยผ่านอุปกรณ์กวาดภาพและเครื่องกำหนดพิกัด และถ่ายโอนลงบนแผนที่ชนิดต่างๆ ของพื้นที่สงขลา พร้อมด้วยการกระจายของหินต้นกำเนิดที่เป็นไปได้ อาทิเช่น หินแกรนิต หินทราย ที่ได้แก้ไขมาจากแผนที่ธรณีวิทยาระวางและมาตราส่วนต่างๆ สร้างและลงจุดพิกัดฐานข้อมูลใช้งานและภูมิสารสนเทศแหล่งทราย ได้แก่ เหมืองทรายทั้งเล็กกิจการและทำอยู่ในปัจจุบัน จุดเก็บตัวอย่าง จุดสำรวจความต้านทานไฟฟ้าลงบนแผนที่ชั้นข้อมูลต่างๆ ดำเนินการประมวลผลพื้นที่แหล่งทราย ด้วยวิธีเชิงซ้อน (overlay) จัดแบ่งออกเป็นหมวดเชื่อมพื้นที่ (spatial join) เขตพื้นที่กันชน (buffer zone) การแยกภาพลักษณะ (feature extraction) การผนึกภาพลักษณะ (feature merging) (ESRI, 1998) เมื่อนำข้อมูลถ่ายโอนมายังโปรแกรม ArcView ไปพิจารณาพร้อมกับผลข้อมูลสำรวจความต้านทานไฟฟ้าทุกจุดที่ได้ประมวลผลความลึกของตะกอนแต่ละชั้น และหาความ

หนาชั้นทรายที่ระดับลึกไม่เกิน 50 เมตร นำเข้าประมวลในโปรแกรม Surfer สร้างชั้นความหนา (thickness of contour line) ด้วยการปรับระดับความหนาล่างสุดให้เริ่มศูนย์ กำหนดช่วงเส้นชั้นความหนาให้เหมาะสมกับความหนาของแหล่ง ก็จะได้แผนที่ชั้นความหนา (isopach map) ดังเช่น แหล่งทรายเขตรัตภูมิ-ควนเนียง และ เขตจะนะ-นาทวี สำหรับกรณีจุดสำรวจไม่กระจายครอบคลุมพื้นที่ก็ใช้ค่าความหนาเฉลี่ยของแหล่งทราย โดยพิจารณาจากความหนาที่แปลความได้จากจุดสำรวจความต้านทานไฟฟ้าทั้งหมดในแต่ละแหล่งนั้น นำมาคำนวณค่าเฉลี่ย ได้แก่ เขตอยู่ตะเภา และ นาหม่อม ดังนั้นการประเมินปริมาณสำรองศักยภาพแหล่งทรายที่อนุมาณก็ได้ดังนี้

ปริมาตรแหล่งทรายทั้งหมด = พื้นที่แหล่งทรายทั้งหมด  $\times$  ความหนาเฉลี่ยของชั้นทราย

ปริมาตรทรายในพื้นที่กันชน = พื้นที่กันชน  $\times$  ความหนาเฉลี่ยของชั้นทราย

ปริมาณสำรองศักยภาพแหล่งทราย = ปริมาตรแหล่งทรายทั้งหมด - ปริมาตรทรายในพื้นที่กันชน

## 2.6.1 ฐานข้อมูลภูมิสารสนเทศ (Geo-information database)

ประกอบด้วยข้อมูลสองชนิดคือ ข้อมูลปฐมภูมิ ได้แก่ ขอบเขตพื้นที่แหล่งทราย ได้จากการแปลรูปถ่ายทางอากาศ ตำแหน่งบ่อทรายทั้งที่เล็กกิจการและ/หรือประกอบการอยู่ตำแหน่งจุดสำรวจความต้านทานไฟฟ้าและเก็บตัวอย่าง ส่วนอีกชนิด คือ ข้อมูลทุติยภูมิ ได้แก่ แผนที่ภูมิประเทศครอบคลุมแหล่งทราย จัดแยกออกเป็นชั้นข้อมูลความสูง เส้นทางคมนาคม ทางน้ำ ขอบเขตชั้นลุ่มน้ำของกรมป่าไม้ ขอบเขตการปกครอง ที่ตั้งสาธารณะ (มัสยิด วัด สถานที่ราชการ) และขอบเขตชุดหินตามยุคจากแผนที่ธรณีวิทยา โดยข้อมูลดังกล่าวจัดทำอยู่ในแบบแผนที่เชิงตัวเลขของชั้นข้อมูล/ชั้นข้อมูลสืบขาว (layers/coverages) ที่ได้แยกเก็บไว้ในแต่ละประเภทแฟ้มข้อมูล (Figure 2)

## 2.6.2 การสร้างเขตกันชน (Buffer zone)

ปัจจัยที่พิจารณาสร้างเขตกันชนในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ แหล่งน้ำสาธารณะ เส้นทางคมนาคม และพื้นที่สาธารณะชุมชนท้องถิ่น โดยยึดตามหลักเกณฑ์พระราชบัญญัติแร่ พ.ศ. 2510 แก้ไขปรับปรุง พ.ศ. 2537

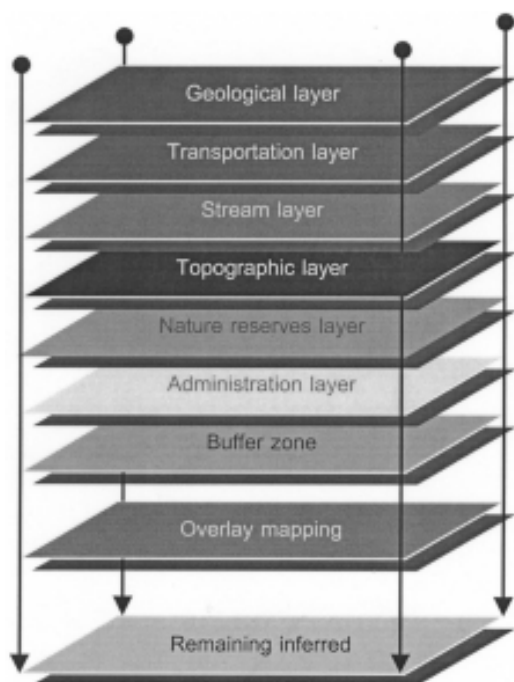


Figure 2. Flow chart of GIS processing data for potential sand deposit areas

เป็นหลัก (Table 6) แต่ผลสำรวจแหล่งทรายทุกแหล่งอยู่นอกเขตชุมชน จึงไม่นำมาพิจารณาและนำไปกำหนดค่าลงในคำสั่งการสร้างเขตกันชนในโปรแกรม Arc/Info

### 2.6.3 การทำแผนภาพเชิงซ้อน (Overlay mapping)

จากขอบเขตของพื้นที่แหล่งทรายแต่ละแห่ง ได้สร้างเขตกันชนของแต่ละองค์ประกอบขึ้นไว้ในชั้นข้อมูลเขตกันชนจนครบทุกปัจจัยก่อน จึงนำไปรวมกับชั้นข้อมูลเขตกันชนตัวอื่นจนครบ (union) และตัดขอบ (clip) พื้นที่ประกอบด้วยเขตกันชนทุกปัจจัยไปถ่ายลงในชั้นข้อมูลแผนที่เขตการปกครอง ผ่านคำสั่งสอบถาม (query) ในโปรแกรม ArcView จะได้พื้นที่ศักยภาพแหล่งทรายอนุมาณ

### 2.6.4 ปริมาณสำรอง

การแผ่ขยายของพื้นที่แหล่งทรายทั้งสิ้นเขตนั้น ล้วนได้เก็บตัวอย่างตรวจสอบและจุดสำรวจต่างๆ ได้มาจากแผนที่ธรณีวิทยา รูปถ่ายทางอากาศขาวดำ และสังเกตการณ์ภาคสนาม (دنفل وککنة 2544) ส่วนความหนาทรายก่อสร้างเฉลี่ยของแต่ละพื้นที่ย่อย ได้รับมาจากการเฉลี่ยค่าความหนาที่วัดในทรายโผล่และในบ่อทราย และพิจารณาร่วมกับผลแปลความหนาจากการสำรวจทางธรณีไฟฟ้า (Table 2) ความหนาที่นำมาพิจารณาคำนวณในแต่ละพื้นที่ย่อยแหล่งทรายจะไม่นำค่าความหนาหน้าดินมารวมด้วย เช่นเดียวกันชั้นทรายที่บางแหล่งความหนา

ไม่คุ้มในแง่เศรษฐศาสตร์ (< 2.0 เมตร) และหากมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏ (facies changes) ในลักษณะการคัดขนาดทรายธารน้ำพา (fluvial sand grading) ไปสู่ทรายแป้ง (silt) และดินเหนียว ก็ไม่พิจารณาเช่นกัน

สำหรับข้อมูลความหนากระจายเพียงพอ ได้สร้างแผนที่ชั้นความหนาของทราย และคำนวณตามวิธีนิยม มีสูตรคำนวณดังนี้

$$V = (A_1 + 2A_2 + 2A_3 + \dots + 2A_{n-1} + A_n) \times (L/2) \quad (1)$$

โดยที่ V = ปริมาตร หน่วยเป็น ลบ.เมตร

$A_n$  = พื้นที่หน้าตัดของระนาบเส้นชั้นความหนาที่ระดับ n หน่วยเป็น ตร.เมตร

L = ค่าความต่างของระนาบแต่ละชั้นความหนา หน่วยเป็น เมตร

ปริมาณสำรองคิดเป็นปริมาตรหน่วยลบ.เมตร และน้ำหนักเป็นล้านเมตริกตัน ซึ่งความถ่วงจำเพาะของแหล่งทรายทุกแหล่งค่อนข้างคงตัว อยู่ราว 2.64-2.65 (Table 4)

## ผลการศึกษา

ศักยภาพแหล่งทรายก่อสร้างในสงขลาสะสมอยู่ในลักษณะธรณีสัณฐานหลากหลาย อันเป็นผลมาจากการ

Table 2. Summary of potential building sand deposits in Songkhla province area

| Feature of deposits     | Rattaphum-Khuan Niang    | U-Taphao                    | Na Mom               | Chana-Thepha                 |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------|------------------------------|
| Aerial appearance       | light gray, fine texture | variable gray tones, smooth | light to medium gray | white to light gray, mottled |
| Drainage pattern        | dendritic                | dendritic and parallel      | dendritic            | dendritic                    |
| Stream stage            | maturity to old          | old                         | youth to maturity    | youth                        |
| Topography              | hilly with granite knob  | flood plain, oxbow lake     | valley and hill      | irregular hill and ridges    |
| Area, km <sup>2</sup> . | 21.02                    | 8.42                        | 2.78                 | 13.86                        |
| Grain shape             | angular to subrounded    | well rounded                | angular to round     | very angular to subrounded   |
| Source rocks            | granite, sandstone       | sandstone-shale             | granite              | granite, sandstone-shale     |

กระทำของตัวกลาง ซึ่งเป็นธารน้ำเป็นหลัก และคุณภาพทรายก็ขึ้นกับหินต้นกำเนิด ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย หินทราย หินดินดานและหินแกรนิต มีรายละเอียดดังนี้

### 1. การแปลภาพธรณีวิทยา

การกระจายของแหล่งทรายในบริเวณพื้นที่ต่างๆ ของจังหวัดสงขลา (Figure 3-6) ได้ล้อมกรอบเน้นสำรวจเฉพาะแหล่งทรายน้ำจืด (fresh water sand deposits) หรือทรายบก ไม่รวมถึงแหล่งทรายภาคพื้นสมุทร (marine sand deposits) ซึ่งต้องผ่านการล้างและไม่นิยมนำมาใช้ก่อสร้าง อีกทั้งส่วนใหญ่อยู่ตามชายฝั่งในเขตหวงห้ามตามกฎหมายด้านสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย ลักษณะโดดเด่นของแต่ละแหล่งทราย ซึ่งแปลความได้สรุปไว้ใน Table 2

ผลแปลภาพธรณีวิทยาของแหล่งทรายในเขตรัตภูมิ และควนเนียง พบว่ามีลักษณะเนื้อภาพละเอียด-ปานกลาง วรรณะสี (tone) บริเวณที่ราบและริมทางน้ำสีเทาอ่อน ส่วนบริเวณลานตะพักลำน้ำสีเข้มและลักษณะยอดขรุขระ และเรียบของเขาคันทรงและเขาหินทรายและหินดินดาน สีเทาปานกลาง ปรากฏธารประสานสายชัดเจน (Figure 3)

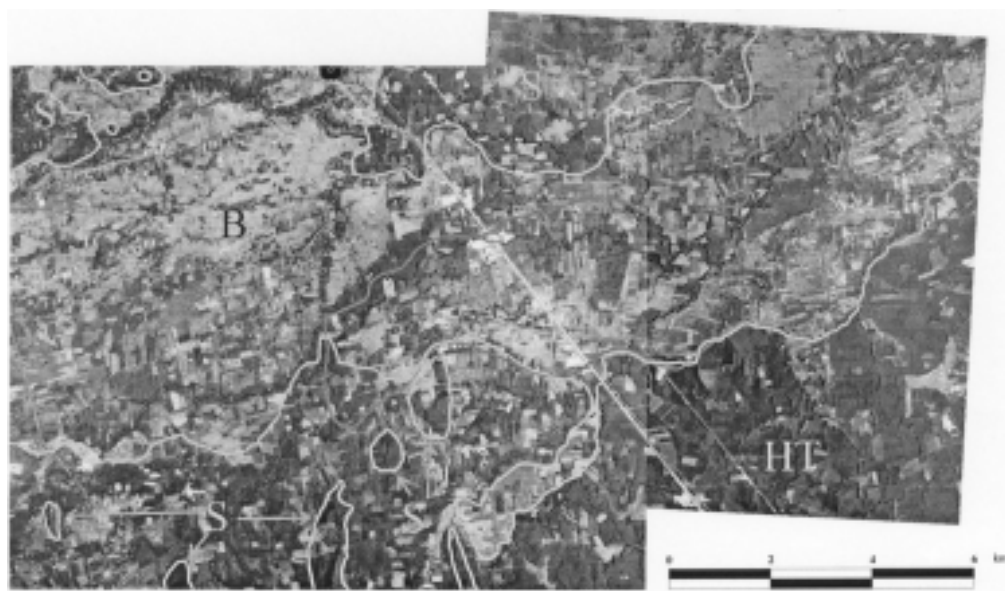
ส่วนในเขตคลองอู่ตะเภา วรรณะสีเทาแปรปรวน เรียบทางน้ำไหลแบบกึ่งไม้และขนาน ภูมิประเทศเป็นทางน้ำโค้งวัด ทะเลสาบรูปแอกและที่ราบน้ำท่วมถึง (Figure 4) ส่วนเขตนาหม่อม เนื้อภาพปานกลางถึงหยาบ จะมีวรรณะสีเข้มในบริเวณเป็นเขายอดแหลม ส่วนสีเทาถึงเทาอ่อน บริเวณสะสมกรวดทราย (Figure 5) แหล่งทรายเขตจะนะ-เทพา ในที่ราบและที่ลุ่มเนื้อภาพละเอียดถึงปานกลาง สีเทาอ่อนถึงขาว ส่วนบริเวณที่เป็นเขาสูงชัน มีเนื้อภาพปานกลางถึงหยาบ วรรณะสีเทา รวดรามาากมาย (Figure 6)

### 2. การกระจายของศักยภาพแหล่งทรายก่อสร้าง

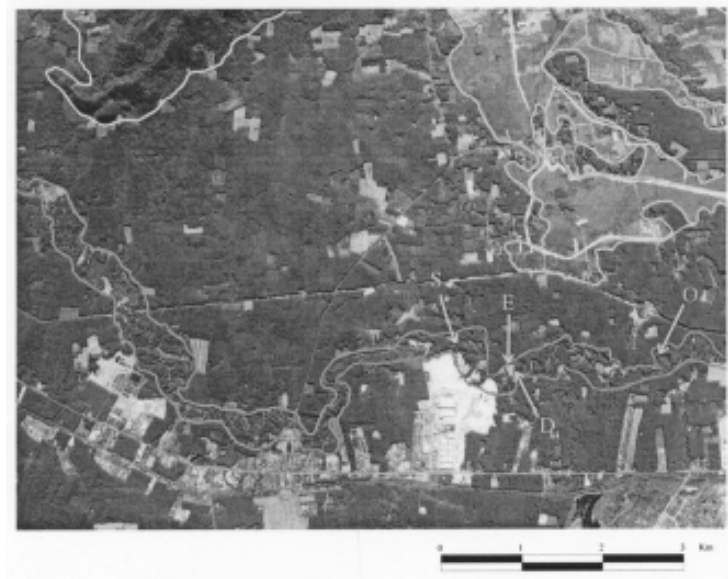
ผลการสำรวจศักยภาพแหล่งทรายแบ่งออกได้เป็น 8 พื้นที่ย่อย อยู่ใน 4 เขต คือ เขตรัตภูมิ-ควนเนียง เขตคลองอู่ตะเภา เขตนาหม่อม และ เขตจะนะ-เทพา ดังรายละเอียดต่อไปนี้

#### 2.1 เขตรัตภูมิ-ควนเนียง

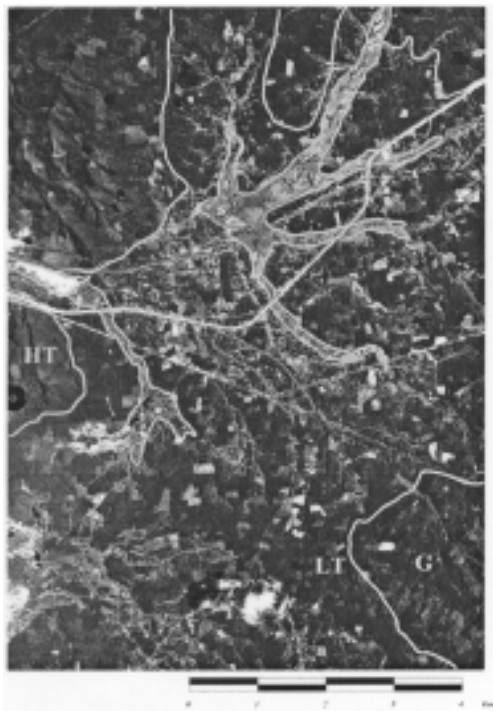
พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นที่ราบ ที่ราบลุ่มริมฝั่งทะเลสาบสงขลา มีทั้งเนินเตี้ยและภูเขาที่ไม่สูงมากนัก กระจายอยู่ห่างกัน ส่วนปากตะวันตกของพื้นที่ มีเทือกเขาทอด



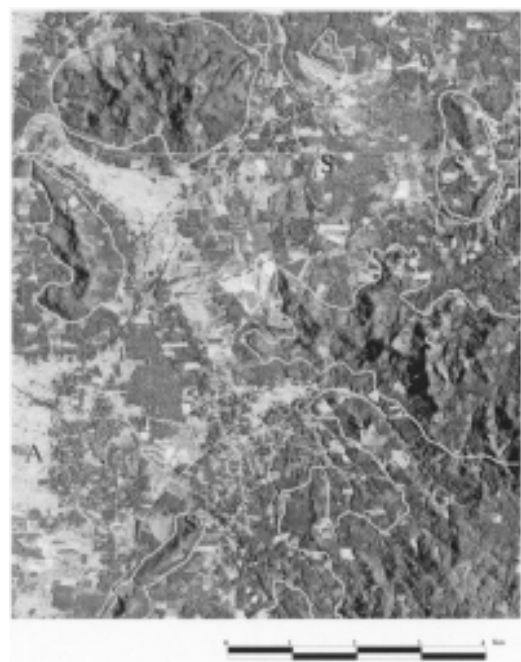
**Figure 3.** Aerial photograph showing feature of braided drainage pattern deposits (B) including , natural levee deposits, flood plain deposits, part of an alluvial high terrace (HT) and surrounded by limestone and sandstone-shale rocks (S) in Rattaphum-Khuan Niang deposit.



**Figure 4.** Aerial photograph showing features of a flood plain along U-Taphao. Erosion is taking place at (E) and deposition at (D). Meander scars and scrolls are seen at point (S). The oxbow lake at (O) is being filled by overflow sediments and by peat.



**Figure 5.** Aerial photograph showing view of alluvial plain (A) of Na Mom sand deposit. The small lower terraced fields (LT) are on the residual granite (G).



**Figure 6.** Aerial photograph showing view of an alluvial plain (A) and granite wash (GW) developed on the slope of mountain range of granite (G) and sandstone-shale (S) in Chana-Thepa deposit.

วางตัวอยู่ในแนวตะวันตกเฉียงเหนือ-ตะวันออกเฉียงใต้ และเป็นเขาหินปูนโดด อยู่บริเวณที่ราบตะวันตกเฉียงเหนือของ ะวางแผนที่

### 2.1.1 แบบรูปทางน้ำและลักษณะแอ่งสะสม

ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ราบและเนินเตี้ยๆ มีทางน้ำแบบรูปกิ่งไม้ (dendritic pattern) อยู่ในระยะ มีขมิ้มวัยถึงปัจฉิมวัย มีทิศทางการไหลจากทิศตะวันตกไปยังทิศตะวันออกโดยประมาณ ลงสู่ทะเลสาบสงขลา ทางน้ำสายหลัก ได้แก่ คลองภูมิหรือคลองรัตภูมิ คลองเขาร้อน เป็นต้น

พื้นที่อำเภอรัตภูมิและอำเภอควนเนียง เป็นส่วนหนึ่งของขอบด้านทิศตะวันตกของแอ่งลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา (ดอนพลและคณะ 2543) ดังนั้นตะกอนน้ำพามาจึงสะสมตัวน้อยทางตะวันตกและสะสมหนาขึ้นทางทิศตะวันออกของแหล่ง ซึ่งหินต้นกำเนิดตะกอนที่สำคัญ ได้แก่ แนวเทือกหินแกรนิตกลาง (central granite belt) ในเทือกเขาบรรทัดที่รอยต่อกับจังหวัดสตูล เป็นหินยุคปลายไทรแอสซิก-จูแรสซิก (Triassic-Jurassic period) นอกจากนี้หินตะกอนเนื้อประสม (clastic sedimentary rocks) ยุคไซลูเรียน (Silurian) ดีโวเนียน (Devonian) และคาร์บอนิเฟอรัส (Carboniferous) ได้แก่ หินทรายและหินกรวดมน เป็นต้น สะสมในลักษณะสิ่งทับถมร่องน้ำ (channel deposits) และสิ่งทับถมขอบร่องน้ำ (channel margin deposits)

### 2.1.2 ธรณีวิทยาแหล่งทราย

พบว่ามึลักษณะการสะสมตัวของตะกอนแหล่งนี้อยู่ในพื้นที่ที่เป็นที่ราบและที่ลุ่มต่ำ โดยเฉพาะบริเวณที่อยู่ใกล้เคียงกับคลองเขาร้อนและคลองรัตภูมิ ในกำแพงเพชรและบางเหริยง อ.รัตภูมิ มีบ่อทรายเปิดดำเนินการอยู่และบ่อทรายเก่ากระจายอยู่เป็นหย่อมๆ บ่อทรายส่วนใหญ่มีน้ำท่วมขังอยู่ตลอดเวลา อันเป็นอุปสรรคแก่การตรวจดูชั้นหน้าทราย อย่างไรก็ตามสามารถแบ่งแหล่งทรายทางธรณีวิทยาออกได้เป็น 2 พื้นที่ย่อย (Figure 7) คือ

1) แหล่งทรายแรก มีตำแหน่งพิกัดยูทีเอ็ม 785622 เหนือ 643285 ตะวันออก ในแผนที่ภูมิประเทศ ะวาง 5023 II มีการสะสมตัวของตะกอนกรวดทราย ทรายแป้ง และดินเหนียว มีความหนาแน่นทั้งหมดประมาณ 14 เมตร (Figure 8) ชั้นหน้าดิน (top soil)

เป็นดินเหนียวปนทรายแป้งสีเทา-น้ำตาลแกมเหลือง แทรกสลับด้วยชั้นบางๆ ของทรายขนาดเม็ดละเอียดถึงปานกลาง สีเทาขาว ลึกลงไปเป็นชั้นตะกอนทรายขนาดละเอียดถึงปานกลาง ที่สลับอยู่กับชั้นตะกอนทรายขนาดปานกลางถึงหยาบมากและมีกรวดปนอยู่บ้างหนา 1-5 เมตร ในชั้นล่างของทรายส่วนนี้มีซากต้นไม้ขนาดใหญ่ แทรกอยู่เป็นจำนวนมาก ชั้นหินดาน (bed rock) เป็นหินดินดาน (shale) สีเทา-เทาแกมเหลือง ที่มีความผุสูง นอกจากนี้ยังพบแร่ไฟไรต์และมัสโคไวต์ปะปนอยู่ โดยหินดานวางตัว S18 °E / 40 °S จัดอยู่ในหินยุคคาร์บอนิเฟอรัส

2) แหล่งทราย มีตำแหน่งพิกัดยูทีเอ็ม 788174 เหนือ 647503 ตะวันออก มีความหนาแน่นจากหน้าเหมืองที่เปิดให้เห็นอยู่ ที่ความลึกประมาณ 17 เมตร ยังไม่พบชั้นหินดาน ชั้นหน้าดินที่ปิดทับ เป็นทรายแป้งปนทรายละเอียด ดินเหนียวปนสีขาว เทาจนถึงน้ำตาลจาง มีพีต (peat) ปนมากในส่วนบน ชั้นถัดมาเป็นตะกอนทรายขนาดละเอียดถึงปานกลาง สีเทาถึงเหลืองอ่อน โดยมีชั้นทรายที่จับตัวกันแข็งประสานด้วยเหล็กออกไซด์สีน้ำตาลเข้ม เรียกว่า ชั้นดานเหล็ก (iron pan) ลึกลงไปเป็นชั้นทรายเม็ดขนาดปานกลางจนถึงกรวดขนาดใหญ่ ซึ่งมีสีขาวแกมเทาถึงเทา เหลืองซีด การคัดขนาดปานกลางถึงเลว (moderately to poor graded) แสดงลักษณะการวางชั้นเฉียงระดับ (cross bedding) และที่ระดับความลึก 8-12 เมตร ปรากฏชั้นทรายละเอียดแทรกสลับกับพีตอยู่ถึง 8 ชั้นด้วยกัน นอกจากนี้ที่ระดับความลึกประมาณ 15 เมตร ก็ยังปรากฏมีพีตอยู่เช่นกัน แต่มีขนาดและปริมาณน้อยกว่าตอนบนที่ได้กล่าวมา

### 2.2 เขตคลองอู่ตะเภา

คลองอู่ตะเภา เป็นลำน้ำสายหลักที่ใหญ่ที่สุดในบริเวณลุ่มน้ำหาดใหญ่-สะเดา ที่วางตัวในแนวเหนือ-ใต้ มีธารน้ำขนาดเล็กหลายสายที่ไหลมาบรรจบกัน คลองสายนี้เริ่มจากบริเวณอำเภอสะเดา ไหลลัดเลาะมาทางทิศเหนือผ่านอำเภอคลองหอยโข่ง หาดใหญ่ บางกล่ำ แล้วไหลออกสู่ทะเลสาบสงขลา ด้านทิศตะวันออกของคลองอู่ตะเภาหรือขอบแอ่งหาดใหญ่ด้านทิศตะวันออก เป็นบริเวณเนินสูง-ต่ำ ที่มีความกว้างไม่มากนัก โดยมีความลาดชันได้ระดับขึ้นไปจนถึงบริเวณภูเขา มีริ้วธาร (rill) ไหลจากทิศตะวันออกมายังทิศตะวันตก ส่วนด้านทิศตะวันตก

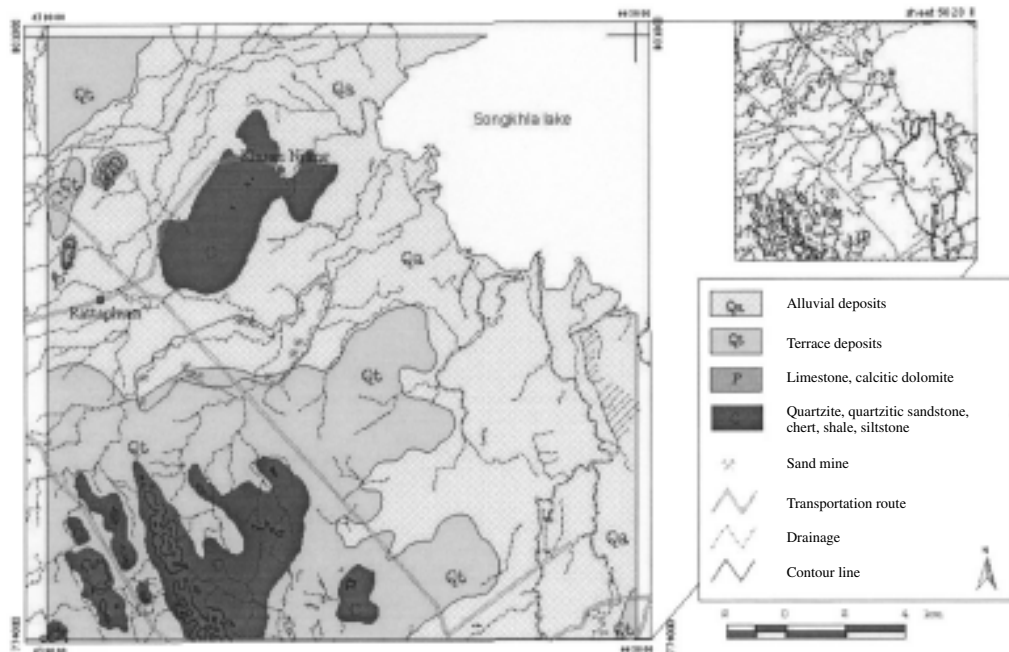


Figure 7. Geology, sand distribution and mine localities in Rattaphum-Khuan Niang area (modified from geological map 1:250,000)

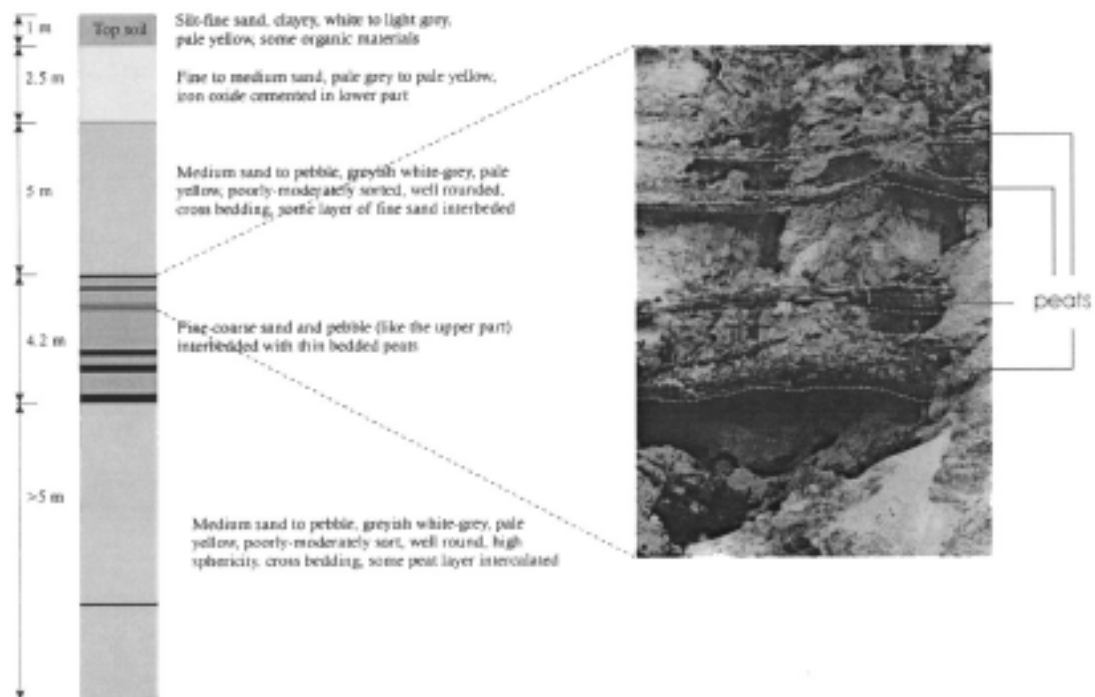


Figure 8. Litho-stratigraphic column of a) Rattaphum-Khuan Niang sand deposit and b) profile of sand deposit at a sand pit.

ของคลองอยู่ตะเภา เป็นที่ราบกว้างใหญ่สลับด้วยเนินและลาดชันสูงขึ้นเมื่อเข้าไปใกล้เทือกเขาสูง ที่อยู่ห่างจากคลองอยู่ตะเภาไม่น้อยกว่า 15 กม.

### 2.2.1 แบบรูปทางน้ำและลักษณะแอ่งสะสม

แอ่งหาดใหญ่-สะเดา วางตัวเป็นแนวยาวเหนือ-ใต้ มีภูเขาสูงและเนินขนาบทั้งสองข้าง ทางน้ำที่เกิดอยู่ในพื้นที่นี้จึงประกอบด้วย ร่องธาร (gully) อยู่มากมาย ทั้งสองข้างของแอ่ง ในบางบริเวณมีแบบรูปทางน้ำกึ่งไม่ผสมกับแบบรูปทางน้ำขนาน ทางน้ำทั้งหมดของสองฝั่งแอ่งหาดใหญ่-สะเดา ไหลมารวมเข้ากับคลองอยู่ตะเภา ซึ่งกว้างประมาณ 15-30 เมตร มีลักษณะทางน้ำโค้งตัว (meander) และ รอยทะเลสาบรูปแอก (oxbow scar) นอกจากนี้การหักมุมของแนวคลองอยู่ตะเภาในบางบริเวณที่ขนานกับทางน้ำสาขา แสดงถึงแนวโครงสร้างทางธรณีวิทยา ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นรอยเลื่อน (fault) ระดับท้องถิ่น มีแนวอยู่ในทิศประมาณ N45°E (ดนูพลและคณะ 2540)

จากการติดตามลักษณะทางน้ำโค้งตัว อยู่ตัว (entrenched meander) ของคลองอยู่ตะเภา ด้วยแผนที่ภูมิประเทศ ปี พ.ศ. 2511 และ ปี พ.ศ. 2530 กับรูปถ่ายทางอากาศ พ.ศ. 2538 พบว่ามีลักษณะเป็นทางน้ำโค้งตัวงอก (ingrown meander) ความคดโค้งของลำน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาจนเกิดคอคอด โดยเฉพาะในบริเวณส่วนปลายสายน้ำ จนทำให้การกวาดทรายทับถมเกิดรอยทางน้ำโค้งตัว (meander scar) จำกัดอยู่ภายในเขตทางน้ำโค้งตัว (meander belt) มีความกว้าง 130-520 เมตร และมีความยาวตลอดสายน้ำประมาณ 25 กม.

### 2.2.2 ธรณีวิทยาแหล่งทราย

แหล่งทรายเขตนี้ทับถมอยู่ในรอยทะเลสาบรูปแอก ทางน้ำโค้งตัว และเนินตะกอนน้ำพา จากแหล่งทรายที่เปิดดำเนินการอยู่บริเวณสองฝั่งคลองอยู่ตะเภา (Figure 9) พบว่าลักษณะตะกอนทราย ชั้นหน้าดินเป็นทรายละเอียด ทรายแป้ง และบางแห่งมีดินเหนียวปนเล็กน้อย มีความหนาจากผิวดินอยู่ในช่วง 2-7 เมตร ชั้นล่างถัดลงไปเป็นชั้นทรายละเอียดถึงทรายหยาบปนกรวด ความลึกไม่เกิน 12 เมตรจากผิวดิน ในชั้นทรายนี้บางบริเวณจะพบซากต้นไม้ปนอยู่ด้วย เช่น พื้นที่ตำบลบ้านพรุ ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับในเขตรัตถภูมิ-ควนเนียง หินต้นกำเนิดทราย ได้แก่ หินทราย แทรกสลับด้วยหินทรายปนกรวด

และหินทรายแป้งของหมวดหินสะเดา ยุคเทอร์เชียรี (Tertiary) และหมวดหินนาทวี ยุคไทรแอสซิก (ดนูพล 2540)

### 2.3 เขตนาหม่อม

มีลักษณะภูมิฐานเป็นหุบเขาที่รายล้อมด้วยภูเขาสูงและเนิน พื้นที่ในหุบเขาส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเนินเตี้ยๆ โดยมีที่ราบแคบในบริเวณสองฝั่งของทางน้ำสายเล็กๆ อันได้แก่ คลองหะ และคลองม่วง ที่ไหลมาบรรจบรวมกันก่อนไหลออกจากหุบเขามาทางทิศตะวันตก

#### 2.3.1 แบบรูปทางน้ำและลักษณะแอ่งสะสม

เป็นแหล่งทรายขนาดเล็กที่แยกกระจายแยกกันอยู่ 3 พื้นที่ย่อย (Figure 5) ครอบคลุมพื้นที่รวมทั้ง 2,791 ตร.กม. ซึ่งมีลักษณะดังนี้

1) พื้นที่แหล่งแรก อยู่บริเวณใกล้เคียงบ้านนาทองสุข ตำบลทุ่งขมิ้น ที่เป็นแหล่งทรายที่อยู่ใกล้ทางน้ำขนาดเล็กของคลองท่าทวนและคลองปลักโก ที่มีขอบเขตแหล่งทรายคล้ายรูปตัว "C" กว้างไม่เกิน 300 เมตร ครอบคลุมพื้นที่ 0.854 ตร.กม.

2) พื้นที่แหล่งที่สอง อยู่ทิศตะวันออกของอำเภอนาหม่อม ประกอบด้วย 2 แหล่งย่อย คือแหล่งล่างบริเวณสองฝั่งคลองหะ อยู่ในเขตตำบลทุ่งขมิ้นและตำบลคลองหรีง มีศักยภาพแหล่งทรายครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 0.792 ตร.กม. ยาว 2.1 กม. กว้างประมาณ 400 เมตร ส่วนแหล่งบนอยู่ในบริเวณที่ราบสองฝั่งทางน้ำขนาดเล็กใกล้เคียงบ้านพลีควาย ในพื้นที่ตำบลนาหม่อมและตำบลพิจิตร พื้นที่ศักยภาพแหล่งทราย มีรูปคล้ายตัว "T" ครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมด 1.135 ตร.กม.

#### 2.3.2 ธรณีวิทยาแหล่งทราย

พื้นที่แหล่งกวาดทรายทับถมในบริเวณตะพักลำน้ำคลองหะ (Figure 10) และทับถมจากการกร่อนแบบผิวแผ่น (slope wash) และทับถมริมทางน้ำปัจจุบันในหุบเขา (Figure 11) ในบริเวณส่วนล่างใกล้บ้านนาทองสุข เป็นแหล่งทรายที่อยู่ใกล้กับทางน้ำที่พัดพาตะกอนจากภูเขาด้านทิศใต้เป็นระยะทางไม่เกิน 5 กม. ธรณีสัณฐานส่วนใหญ่เป็นเนินที่มีที่ราบแคบอยู่บนสองฝั่งธารน้ำขนาดเล็ก ตะกอนไม่หนา มีปริมาณกรวดขนาดใหญ่ปนอยู่สูง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแร่ควอร์ตซ์ และมีกรวดของหินทราย หินควอร์ตไซต์ หินเชิร์ต เป็นต้น มีรูปทรงกลมมน ผลสำรวจในบริเวณที่เปิดทำเหมืองพบว่าชั้นหน้าดินเป็นทราย



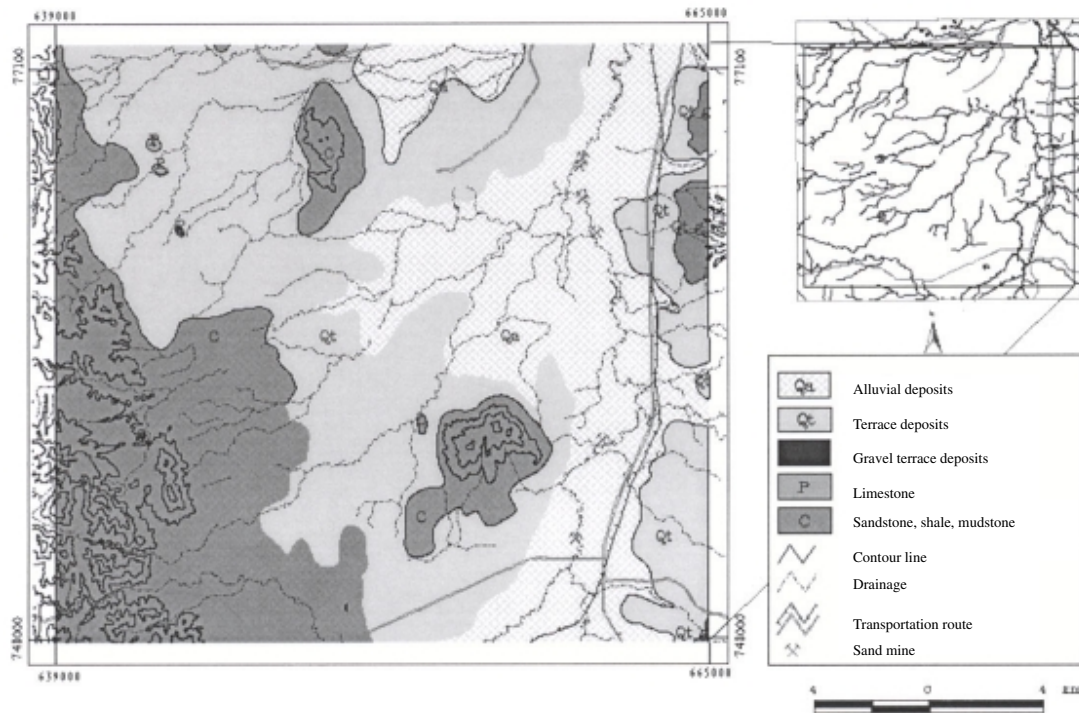


Figure 9. Geology, sand distribution and mine localities in U-Taphao area (modified from geological map 1:250,000)



Figure 10. Terrace gravel with erosion along road from Hat Yai to Na Mom.

ปนกรวดและมีชั้นดินเหนียวสลับที่ หนาประมาณ 0.5 เมตร ถัดลงไปเป็นชั้นกรวดทราย ที่มีการกระจายขนาดค่อนข้างสม่ำเสมอมาก โดยทั่วไปสีค่อนข้างขาว สีน้ำตาลอ่อน มีความหนาประมาณ 1.5-3.0 เมตร บางบริเวณมีชั้นดาน

ดินเหนียว (claypan) สีดำ ซึ่งหนาประมาณ 1 เมตร แทรกสลับอยู่กับชั้นกรวดทรายดังกล่าวเช่นกัน

#### 2.4 เขตจะนะ-เทพา

พื้นที่ด้านทิศเหนือจรดอ่าวไทย มีลักษณะเป็นที่ราบ ที่ราบลุ่ม หาด และมีภูเขาขนาดเล็กถึงใหญ่กระจายอยู่ทั่วไป ด้านทิศใต้มีทั้งภูเขาโดดและเทือกเขาซับซ้อนมาก วางตัวอยู่ในแนวประมาณเหนือ-ใต้ เป็นที่ราบ ที่ราบลุ่ม และลานหินพัง (scree) มีรูปร่างหลายทิศทางที่ไหลลงมาตามเทือกเขา พัดพาตะกอนมาสะสมสู่เบื้องล่าง ก่อนที่จะไปรวมกับทางน้ำหลัก อันได้แก่ คลองสะกอม และแม่น้ำเทพา ที่ไหลลงสู่อ่าวไทยทางทิศเหนือ

##### 2.4.1 แบบรูปทางน้ำและลักษณะแอ่งสะสม

บรรดารูปร่างได้พาตะกอนกรวด ทราย มาสะสมตัว มีลักษณะทางน้ำแบบกึ่งไม้ โดยฝั่งเขตอำเภอจะนะมีทิศทางการไหลไปทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือก่อนย้อนกลับไปทางทิศเหนือ รวมกับทางน้ำสายหลักไหลลงสู่อ่าวไทย ตะกอนสะสมตัวอยู่ใน 2 พื้นที่ย่อยที่ต่อเนื่องกัน (Figure 6) คือ

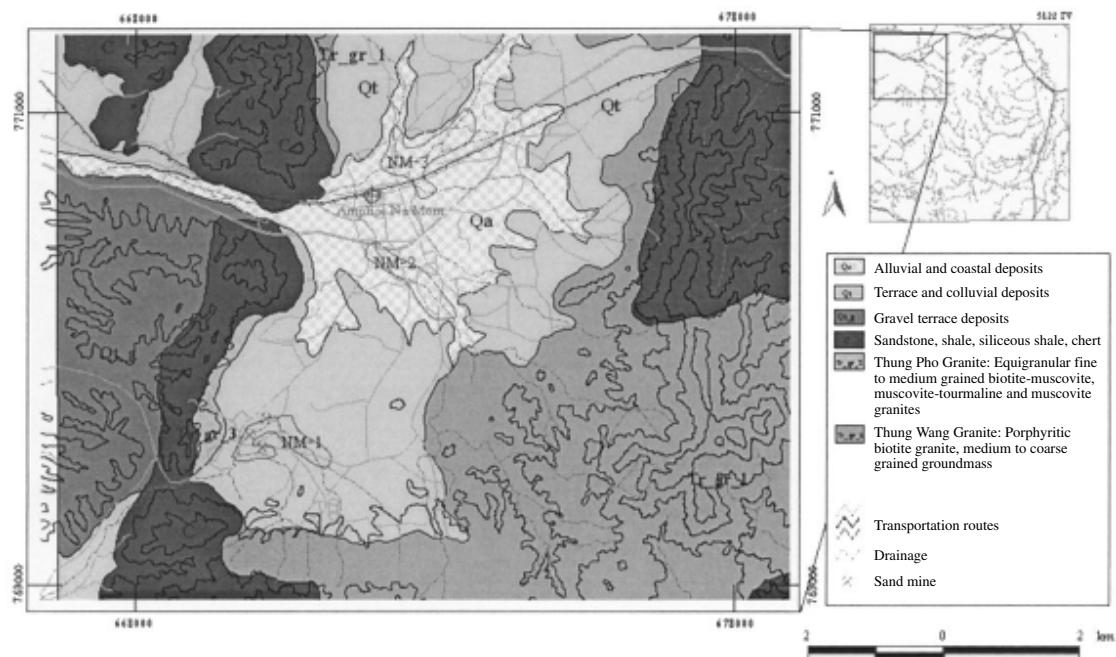


Figure 11. Geology, sand distribution and mine localities in Na Mom area (after Nakapadungrat and Chaisen, 1986)

1) พื้นที่ย่อยแรก อยู่ที่ลาดชันติดกับภูเขาที่เป็นต้นกำเนิดของตะกอน ลักษณะธรณีสัณฐานเริ่มเปลี่ยนจากที่ราบทางด้านทิศตะวันตกมาเป็นเนินเตี้ยทางด้านทิศตะวันออก ได้แก่ บริเวณบ้านสะพานไม้แก่นตกและสะพานไม้แก่นกลาง

2) ส่วนพื้นที่ย่อยที่สอง เป็นพื้นที่ราบและที่ราบลุ่มที่ต่อเนื่องมาจากทางทิศเหนือ มีธารประสาณสาย (braided stream) ปรากฏอยู่ เป็นพื้นที่นาและปล่อยทิ้งร้างไว้ บางบริเวณมีน้ำขังอยู่ ทางทิศตะวันออกของควนล้านและควนจำศีล อันเป็นพื้นที่รอยต่อระหว่างอำเภोजะนะกับอำเภอกะทรา

#### 2.4.2 ธรณีวิทยาแหล่งทราย

ศักยภาพแหล่งทรายมีการสะสมจากการกร่อนแบบผิวแผ่น และลานหินพัง (Figure 12) ในพื้นที่นี้มีบ่อทรายเปิดดำเนินการอยู่ 1 แห่ง (ทรายทั้งจากการทำเหมืองตึก) และบ่อเก่า 2 แห่ง ซึ่งอยู่ใกล้กันในบริเวณที่ราบลุ่มทางด้านทิศตะวันออกของควนจำศีล อ.จะนะ ซึ่งเป็นบริเวณส่วนเหนือของพื้นที่ศักยภาพแหล่งทรายที่ได้จากการแปลความรูปร่างทางอากาศ บ่อทรายจะมีน้ำขัง

อยู่มาก จึงเป็นอุปสรรคแก่การเก็บข้อมูลลักษณะชั้นทรายที่ไม่สามารถทำได้มากนัก

ในบริเวณที่เปิดบ่อเป็นที่ราบลุ่ม ชั้นหน้าดินเป็นทรายละเอียด ทรายแป้ง มีดินเหนียวปน สีเทาถึงเทาดำ หนาไม่เกิน 1 เมตร มีพืชน้ำ ถัดลงไปเป็นชั้นทรายหยาบปนกรวด โดยทั่วไปสีค่อนข้างขาวถึงเหลือง ในบางจุดระหว่างชั้นนี้กับหน้าดิน มีชั้นดานเหล็ก สีน้ำตาล ซึ่งหนาไม่เกิน 30 ซม. ทรายในชั้นถัดลงไปอยู่ลึกประมาณ 5-15 เมตร

สำหรับตะกอนที่สะสมตัวเป็นเนินเตี้ยนั้น เมื่อดตะกอนทรายมีขนาดหยาบถึงหยาบมาก คละอยู่กับทรายละเอียด (Table 2) จากการสังเกตหินโผล่ที่ถนนตัดผ่านและริมตลิ่งธารน้ำ พบว่าเป็นตะกอนพัดพาอยู่ไม่ไกลจากหินต้นกำเนิดมากนัก เนื่องจากพบว่ามีหินไบโอไทต์แกรนิตและทัวร์มาลีน-ไบโอไทต์แกรนิต โผล่อยู่บริเวณภูเขาด้านทิศตะวันออก มีทั้งเนื้อขนาดเดียวและเนื้อออก (สมชัย และคณะ, 2539) ซึ่งอยู่ในแนวเทือกหินแกรนิตกลางของยุคไทรแอสซิก

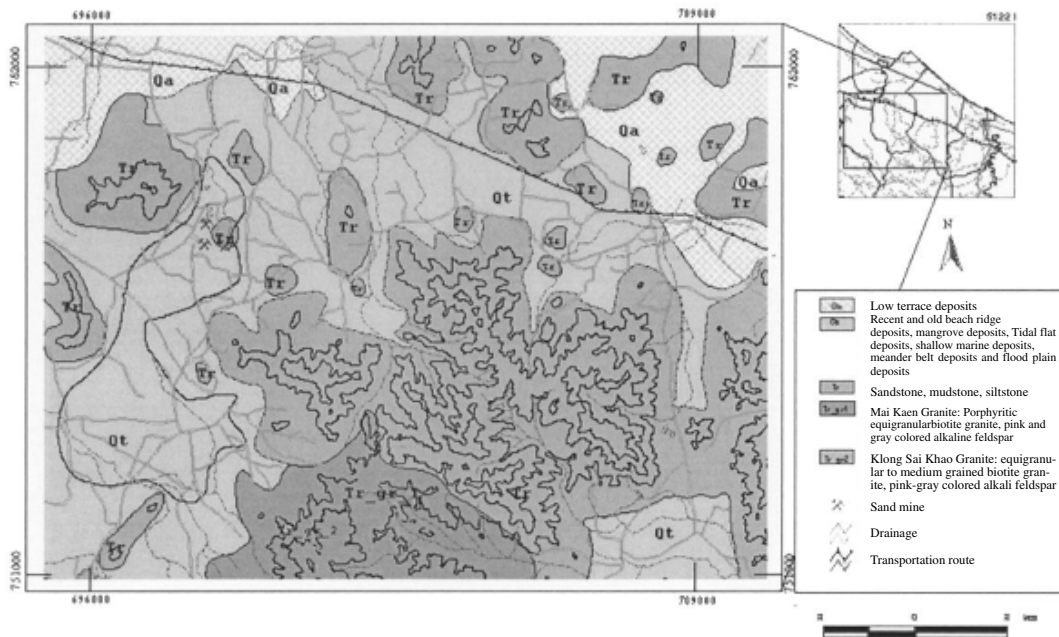


Figure 12. Geology, sand distribution and mine localities in Chana-Thepha area (after Nakapadungrat *et al.*, 1988)

### 3. ผลสำรวจด้านธรณีไฟฟ้า

การแปลผลได้สังเกตลักษณะรูปร่างเส้นโค้งความต้านทานจำเพาะสัมพันธ์ที่เปลี่ยนแปลงมากเป็นหลัก เนื่องจากลักษณะธรณีวิทยาบริเวณทับถมตะกอนไม่มีความซับซ้อนของกำเนิดและโครงสร้างก่อกับเป็นตะกอนที่โดดเด่นในแหล่งทรายซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มได้เพียง 2-3 ชนิดเท่านั้น ค่าความต้านทานจำเพาะปรากฏและความหนาของชั้นต่างๆ พบว่าโดยทั่วไปมีชั้นใต้ดินแบ่งออกได้ 3 ชั้น (Table 3) ชั้นหน้าดินมีความหนาในช่วง 0.5-12.6 เมตร มีค่าความต้านทานไฟฟ้าเฉลี่ยอยู่ในช่วงระหว่าง >166- >1,011 โอห์ม-เมตร ลึกลงไปเป็นชั้นกรวดทรายหนาในอยู่ช่วง 1.5-45.4 เมตร มีค่าความต้านทานไฟฟ้าเฉลี่ยอยู่ในช่วงระหว่าง 41-694 โอห์ม-เมตร และความลึกชั้นหินดานผุ และ/หรือหินดานพบว่าเส้นโค้งความต้านทานจะโค้งบิดงออย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับเส้นโค้งของชั้นตะกอนต่างๆ ที่วางอยู่ตอนบน (Figure 13) มีค่าความต้านทานไฟฟ้าเฉลี่ย ในพิสัย 6-36 โอห์ม-เมตร เส้นโค้งที่คำนวณหาบัพกับค่าที่วัดจากในสนามนั้น มีค่าผิดพลาดรายกกำลังสองเฉลี่ยในพิสัย 2-4

### 4. คุณภาพทรายก่อสร้าง

การจำแนกคุณภาพในที่นี้เน้นตามการประยุกต์ในงานถม ปูนปลาสเตอร์และมอร์ตาร์ และคอนกรีตเป็นหลัก มีปริมาณส่วนน้อยนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น เชื้อถลุง ในการหลอม และงานหล่อโลหะ เป็นต้น

#### 4.1 ทิศาวรรณ

ภายใต้กล้องกำลังขยาย พบว่ารูปทรงของเม็ดทรายกลมมนนั้นพบแต่เฉพาะในแหล่งคลองอู่ตะเภาเท่านั้น แหล่งอื่นนอกนั้นค่อนข้างเป็นเหลี่ยมถึงกึ่งมน (Table 2) มีข้อสังเกตว่าเป็นแหล่งอยู่ใกล้หินต้นกำเนิด วัสดุองค์ประกอบในทรายที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ แร่ควอร์ตซ์ เฟลด์สปาร์ มีปนเล็กน้อย ได้แก่ ทัวร์มาลีน ไมกา (Table 5) ถึงแม้ว่าแร่ไพไรต์ มัสโคไวต์และไบโอไทต์มีผลเสียต่อคอนกรีต ปูนปลาสเตอร์และมอร์ตาร์ แต่ก็มีปริมาณต่ำกว่า 3% อันไม่ก่อความเสียหาย (SABS 1083, SABS 1090) นอกจากนี้ยังพบเศษหินเชิร์ต หินทราย หินดินดาน หินโคลน (mudstone) หินทรายแป้ง และฟิต

Table 3. Summary of the average vertical electrical sounding depth of sand deposits

| Thickness of formations, m | Rattaphum-Khuan Niang | U-Taphao   | Na Mom     | Chana-Thepha |
|----------------------------|-----------------------|------------|------------|--------------|
| Overburden, m.             | 0.0-9.4               | 0.0-12.6   | 0.0-6.9    | 0.0-4.3      |
| Gravel-sand bed, m.        | 1.2-36.0              | 1.1-51.9   | 0.5-14.1   | 1.3-11.9     |
| Weathered bed rocks, m.    | >7.0->25.5            | >6.8->51.9 | 0.8-36.5   | >6.1-21.6    |
| Bed rocks, m               | > 16.9                | -          | >5.3->36.5 | >16.0->21.6  |

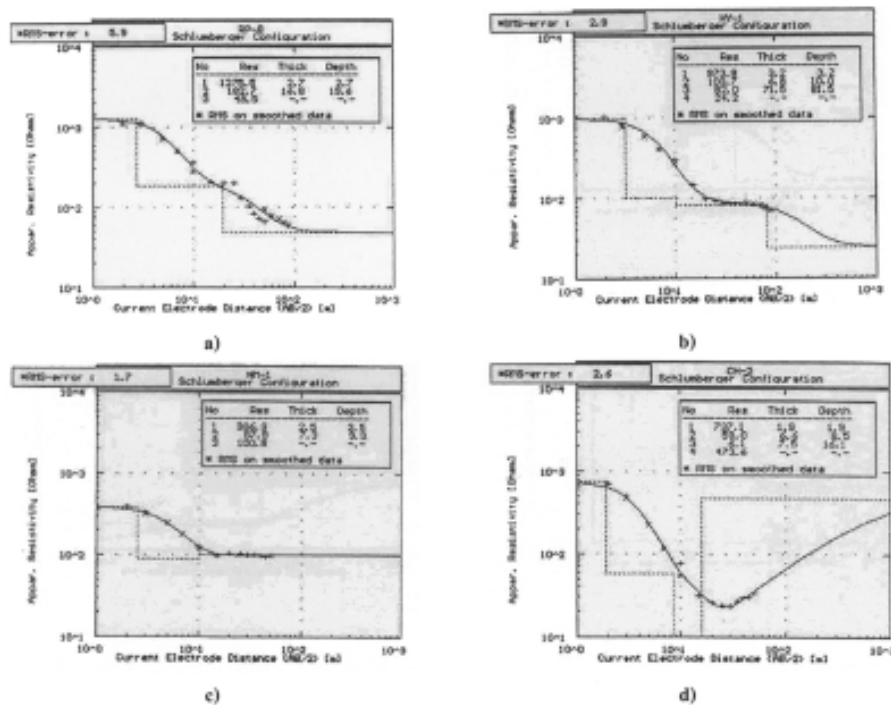


Figure 13. Geoelectrical layers interpretation of sand deposits in region of a) Rattaphum-Khuan Niang, (RP-8) b) U-Taphao (UT-1), c) Na Mom (NM-1) and d) Chana-Thepa (CH-2).

#### 4.2 การทดสอบและจำแนกประเภท

จากการวิเคราะห์ลักษณะการกระจายขนาดของเม็ดทรายชนิดเม็ดละเอียด พบว่าทรายทั้งหมดค่อนข้างอยู่ในเกณฑ์กำหนดของ ASTM C 33 (Figure 14) ค่าโมดูลัสความละเอียดอยู่ในพิสัย 2.40-3.70 เฉลี่ย 2.98 มีความเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.40 แม้ว่าค่านี้ไม่ป้องกันการคละ แต่ก็ยังเป็นปัจจัยมีประโยชน์ระบุถึงความแปรผันน้อยในการคัดขนาดของทรายจากแหล่งเดียวกัน บรรดาวัสดุที่ขนาดเล็กกว่า 75 ไมโครเมตร (ทรายแป้งและดินเหนียว) มีเพียง 0.2-3.78% เกินกว่ามาตรฐาน 3% เล็กน้อย จัดว่า

เหมาะสม ตัวอย่างทรายทั้งหมดจำแนกกลุ่มตาม AASHTO พบว่าอยู่ในกลุ่ม A-1-b (Table 4) นั่นคือ มีการคละขนาดดีประกอบด้วย กรวด ทรายหยาบ ทรายละเอียดและปราศจากดินที่มีสภาพพลาสติกหรือมีเล็กน้อยปนอยู่ และหากจำแนกตามระบบดินเอกภาพ พบว่าแบ่งออกได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม SP (ทรายสะอาดที่มีการคละขนาดเลว ทรายปนกรวด มีส่วนละเอียดปนเล็กน้อยหรือไม่มี) จำนวน 13 ตัวอย่าง และกลุ่ม SW (ทรายสะอาดที่มีการคละขนาดดี ทรายปนกรวด มีส่วนละเอียดปนเล็กน้อยหรือไม่มี) จำนวน 5 ตัวอย่าง

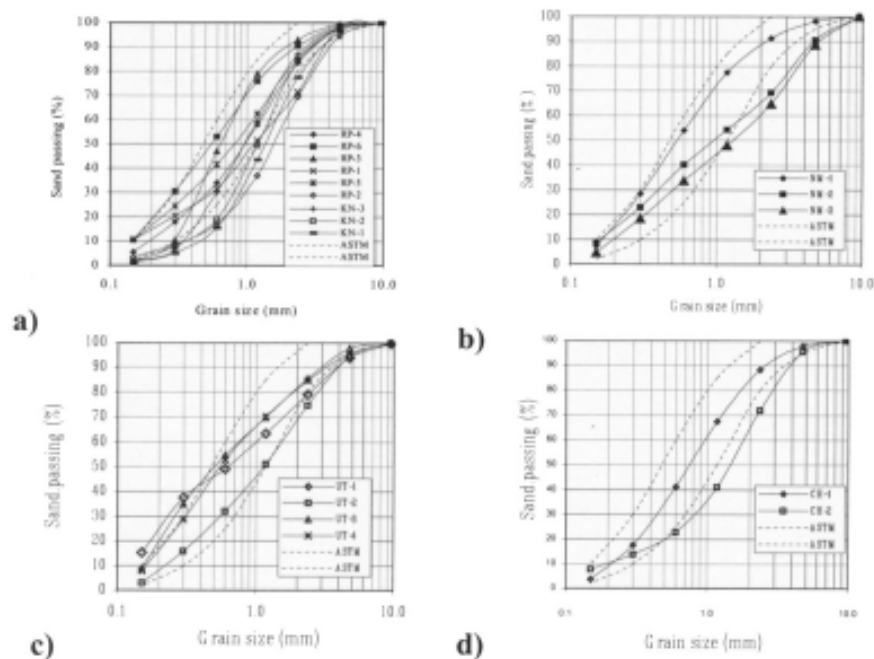


Figure 14. Grain size distribution curves of the sand samples from region of a) Rattaphum-Khuan Niang, b) U-Taphao, c) Na Mom and d) Chana-Thepha superimposed on grading of ASTM required upper and lower limits for fine aggregates.

Table 4. Results of physical and chemical properties on the sand samples of Songkhla province

| Region                | Sample number | S.G. | Absorption , % | Soundness | Fineness Modulus | AASHTO | USC |
|-----------------------|---------------|------|----------------|-----------|------------------|--------|-----|
| Rattaphum-Khuan Niang | RP-1          | 2.63 | 0.68           | 4.06      | 3.07             | A-1-b  | SW  |
|                       | RP-2          | 2.65 | 0.80           | 2.53      | 3.70             | A-1-b  | SP  |
|                       | RP-3          | 2.64 | 0.51           | 5.09      | 2.69             | A-1-b  | SP  |
|                       | RP-4          | 2.64 | 0.39           | 6.49      | 3.00             | A-1-b  | SW  |
|                       | RP-5          | 2.64 | 0.72           | 10.01     | 2.92             | A-1-b  | SW  |
|                       | RP-6          | 2.65 | 0.78           | 6.28      | 2.40             | A-1-b  | SP  |
|                       | KN-1          | 2.64 | 0.69           | 12.54     | 3.60             | A-1-b  | SP  |
|                       | KN-2          | 2.64 | 0.44           | 14.76     | 3.39             | A-1-b  | SP  |
|                       | KN-3          | 2.65 | 0.41           | 12.05     | 3.14             | A-1-b  | SP  |
| U-Taphao              | UT-1          | 2.65 | 0.39           | 3.34      | 2.62             | A-1-b  | SP  |
|                       | UT-2          | 2.64 | 0.19           | 3.03      | 3.29             | A-1-b  | SP  |
|                       | UT-3          | 2.64 | 0.18           | 5.37      | 2.84             | A-1-b  | SP  |
|                       | UT-4          | 2.64 | 0.28           | 11.68     | 2.60             | A-1-b  | SP  |
| Na Mom                | NM-1          | 2.67 | 1.00           | 10.64     | 2.44             | A-1-b  | SP  |
|                       | NM-2          | 2.64 | 0.64           | 11.68     | 3.14             | A-1-b  | SP  |
|                       | NM-3          | 2.64 | 0.65           | 15.46     | 3.42             | A-1-b  | SW  |
| Chana-Thepha          | CH-1          | 2.64 | 0.59           | 11.38     | 2.84             | A-1-b  | SP  |
|                       | CH-2          | 2.66 | 1.12           | 7.73      | 2.47             | A-1-b  | SW  |

Table 5. Mineral composition and silica oxide contents

| Region                | Sample number | Essential particles                  | Organic impurities | SiO <sub>2</sub> (%) |
|-----------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------|----------------------|
| Rattaphum-Khuan Niang | RP-1          | Smoky quartz, milky quartz and       | 2                  | 91.36                |
|                       | RP-2          | rock crystal more than 85 % of       | 2                  | 94.32                |
|                       | RP-3          | composition, feldspar and rock       | 1                  | 94.99                |
|                       | RP-4          | fragments of chert, peat and         | 2                  | 92.72                |
|                       | RP-5          | trace elements of tourmaline,        | 2                  | 93.05                |
|                       | RP-6          | biotite and muscovite                | 1                  | 92.45                |
|                       | KN-1          |                                      | 3                  | 95.28                |
|                       | KN-2          |                                      | 4                  | 95.13                |
|                       | KN-3          |                                      | 2                  | 93.31                |
| U-Taphao              | UT-1          | Quartz, feldspar, small amount       | 1                  | 97.12                |
|                       | UT-2          | of tourmaline and rock frag-         | 2                  | 97.80                |
|                       | UT-3          | ments of chert, sandstone,           | 2                  | 97.48                |
|                       | UT-4          | shale, mudstone, and siltstone       | 3                  | 97.63                |
| Na Mom                | NM-1          | Quartz, feldspar, small amount       | 5                  | 91.12                |
|                       | NM-2          | of tourmaline and muscovite          | 5                  | 89.93                |
|                       | NM-3          |                                      | 1                  | 94.12                |
| Chana-Thepha          | CH-1          | Mainly milky quartz to rock crystal, | 1                  | 94.89                |
|                       | CH-2          | feldspar, few biotite and tourmaline | 5                  | 96.29                |

Table 6. Requirements for buffer zone and nature reserves for evaluation of building sand deposits in this study

| List of items                           | Information feature | Buffer zone distance |
|-----------------------------------------|---------------------|----------------------|
| 1. Mineral Statutory 1967 modified 1994 | line                |                      |
| 1.1 Transportations                     |                     |                      |
| - Principle road                        |                     | 100 m                |
| - Minor road                            |                     | 50 m                 |
| 1.2 Drainage or sources                 | line                | 50 m                 |
| 2. Nature reserve                       | area                | -                    |
| 3. Republic area                        | point               | -                    |

#### 4.3 ความถ่วงจำเพาะและการดูดซึมน้ำ

ค่าความถ่วงจำเพาะของทรายมีค่าสูงสุด 2.67 ของแหล่งนาหม่อม ค่าต่ำสุด 2.63 ของแหล่งวัดภูมิ-ควนเนียง ซึ่งค่าเฉลี่ยทุกแหล่ง 2.64 ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.09 และ ค่าการดูดซึมน้ำสูงสุดเป็น 1.12% ของแหล่งจะนะ-เทพา ค่าต่ำสุดเป็น 0.18% ของแหล่งคลองอู่ตะเภา (Table 4) มีค่าเฉลี่ยทุกแหล่งอยู่ที่จำนวน 0.58% ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.26% ซึ่งค่าการดูด

ซึมน้ำของมวลรวมละเอียดไม่ควรเกิน 3% เพราะจะมีผลต่อความสามารถเทได้ (workability) ของส่วนผสมและกำลังอัดของคอนกรีต (Collis and Fox, 1985)

#### 4.4 สารอินทรีย์ การคงตัว และ ปริมาณซิลิกา-ออกไซด์

ตัวอย่างทรายทั้งหมดมีปริมาณสารอินทรีย์ที่เจือปนถึงขั้นเป็นสารอันตรายต่อคอนกรีต (deleterious substances) มีค่าเกิน 3 (ค่ามาตรฐาน) อยู่จำนวน 4

ตัวอย่าง (Table 4) ส่วนผลตรวจวัสดุมีความหนาแน่นต่ำ คือ พีต ที่พบปนในตัวอย่างจากแหล่งรัตนภูมิ-ควนเนียง และแหล่งคลองอุตะเกา บางครั้งเกินเกณฑ์ 1.0% (ASTM C 33) ค่าการคงตัวอยู่ในช่วง 2.53-15.46 % (Table 4) โดยแหล่งควนเนียงและนาหม่อมมีค่าค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตาม ค่าเฉลี่ยทั้งหมดอยู่ในระดับปานกลาง เมื่อเทียบกับที่ยอมให้สูญหายได้ไม่เกิน 10% สำหรับมวลรวมละเอียด (ASTM C 33) ส่วนปริมาณของซิลิกาต่ำกว่า 98.5% คือ มีค่าอยู่ระหว่าง 89.93-97.8% (Table 4) ซึ่งจัดเป็น ทรายก่อสร้างได้ นอกจากนี้นำไปเป็นเชื้อถลุงในการหลอม และในงานหล่อโลหะได้เช่นกัน

## 5. ประมวลพื้นที่แหล่งทราย

จากฐานข้อมูลศักยภาพแหล่งทรายธรรมชาติเพื่อการก่อสร้างในสงขลา ที่ได้จากการแปลรูปถ่ายทางอากาศเป็นหลัก (دنۇللىلىلىلى 2544) ที่อยู่ในระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ Arc/Info นำเข้าพิจารณาพร้อมกับฐานข้อมูลของพื้นที่ต้องกันออก ได้แก่ ทางน้ำสาธารณะ ทางคมนาคม พื้นที่สาธารณะชุมชน ถึงจะได้พื้นที่คงเหลือ (Figure 2) เพื่อประกอบการพิจารณาทำเหมืองทรายต่อไป ดังมีรายละเอียดในแต่ละแหล่งดังนี้

### 5.1 เขตรัตนภูมิ-ควนเนียง

ในพื้นที่ย่อย 2 แหล่ง พื้นที่ศักยภาพแหล่ง ทรายมีทั้งหมด 21.024 ตร.กม. (Table 7) และมีพื้นที่ อาจได้รับผลกระทบจากการพัฒนาทำเหมืองทรายเป็น บริเวณ 5.326 ตร.กม. ดังนั้นคงเหลือพื้นที่ศักยภาพแหล่ง ทรายอยู่ 15.697 ตร.กม. (Figure 15)

### 5.2 เขตคลองอุตะเกา

พื้นที่ศักยภาพแหล่งทรายเขตคลองอุตะเกา มี ทั้งหมด 8.421 ตร.กม. (Table 7) ส่วนใหญ่อยู่ในเขตสอง ริมฝั่งและที่ราบน้ำท่วมถึง จึงประเมินว่ามีพื้นที่ได้รับผล กระทบจากการพัฒนาทำเหมืองทรายเป็นบริเวณ 3.925 ตร.กม. ดังนั้นคงเหลือพื้นที่ศักยภาพแหล่งทรายอยู่ประมาณ 4.496 ตร.กม. (Figure 16)

### 5.3 เขตนาหม่อม

มีพื้นที่ย่อยศักยภาพอยู่ 3 บริเวณ เป็นหย่อม อยู่ในหุบแอ่งนาหม่อม มีทั้งหมด 2.780 ตร.กม. (Table 7) จึงมีพื้นที่อาจได้รับผลกระทบจากการพัฒนาทำเหมืองทราย เป็นบริเวณ 1.445 ตร.กม. ดังนั้นคงเหลือพื้นที่ศักยภาพ แหล่งทรายอนุมานอยู่ 1.335 ตร.กม. (Figure 17)

### 5.4 เขตจะนะ-เทพา

พื้นที่ย่อยทั้งสองแห่งเป็นหย่อมอยู่ในเขตจะนะ- เทพา ทั้งหมด 13.859 ตร.กม. (Table 7) จึงมีพื้นที่อาจ ได้รับผลกระทบจากการพัฒนาทำเหมืองทรายเป็นบริเวณ 3.852 ตร.กม. ดังนั้นคงเหลือพื้นที่ศักยภาพแหล่งทรายอยู่ เพียง 10.007 ตร.กม. (Figure 18)

## 6. ประเมินความหนาและปริมาณสำรองแหล่งทราย

ผลการสำรวจความลึกตามบ่อทรายและด้วยวิธีความ ดันทานไฟฟ้าพออนุมานความหนาได้จากทั้งเส้นชั้นความ หนาและความหนาเฉลี่ย มีรายละเอียดแต่ละแหล่ง ดังนี้

### 6.1 เขตรัตนภูมิ-ควนเนียง

จุดสำรวจความลึกแหล่งนี้ทั้งหมด 13 จุด (Table 3) กระจายคลุมพื้นที่ จากความหนาชั้นทรายที่

Table 7. Summary of buffer zone and remaining sand areas by ArcView processing

| Subarea               | Buffer zone (km <sup>2</sup> ) |          |              | Total buffer zone area (km <sup>2</sup> ) | Remaining resources (km <sup>2</sup> ) |
|-----------------------|--------------------------------|----------|--------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|
|                       | Transportation                 | Drainage | Public zones |                                           |                                        |
| Rattaphum-Khuan Niang | 2.773                          | 2.653    | 0.050        | 5.326                                     | 15.697                                 |
| U-Taphao              | 0.430                          | 3.642    | 0.044        | 3.925                                     | 4.496                                  |
| Chana-Thepha          | 2.728                          | 1.189    | 0.125        | 3.852                                     | 10.007                                 |
| Na Mom-1              | 0.175                          | 0.309    | -            | 0.433                                     | 0.421                                  |
| Na Mom-2              | 0.360                          | 0.206    | 0.009        | 0.467                                     | 0.325                                  |
| Na Mom-3              | 0.175                          | 0.450    | -            | 0.545                                     | 0.590                                  |

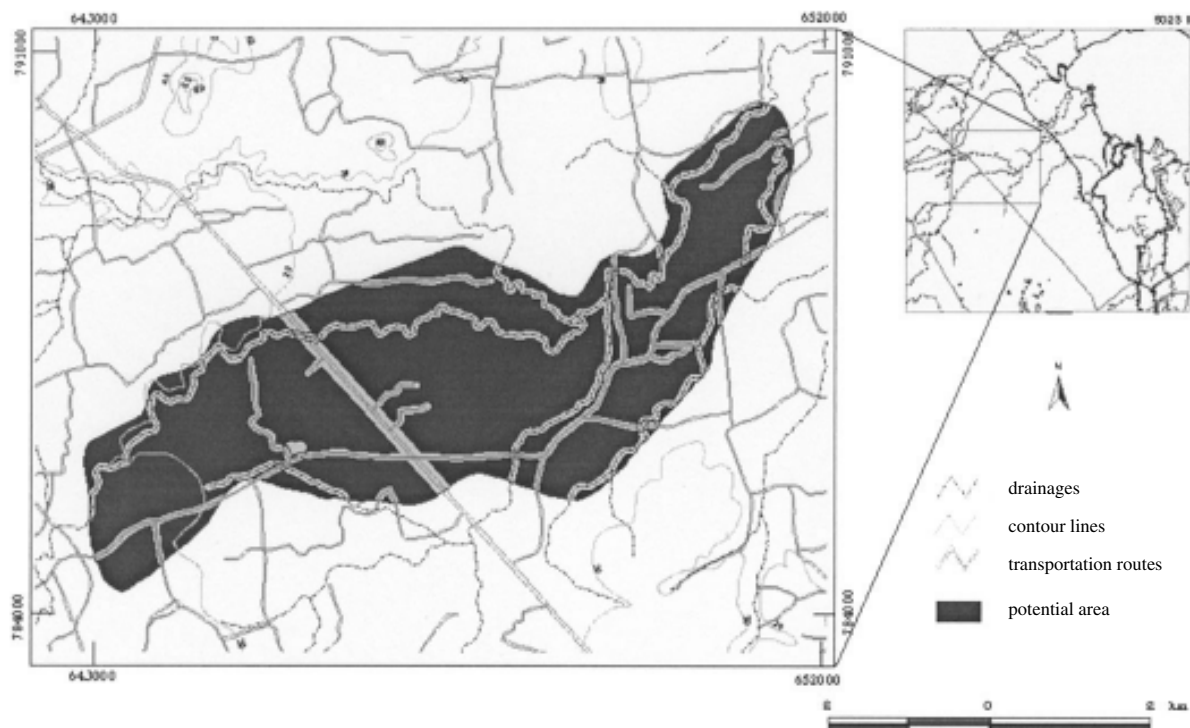


Figure 15. Rattaphum-Khuan Niang potential building sand deposit and buffer zone areas.

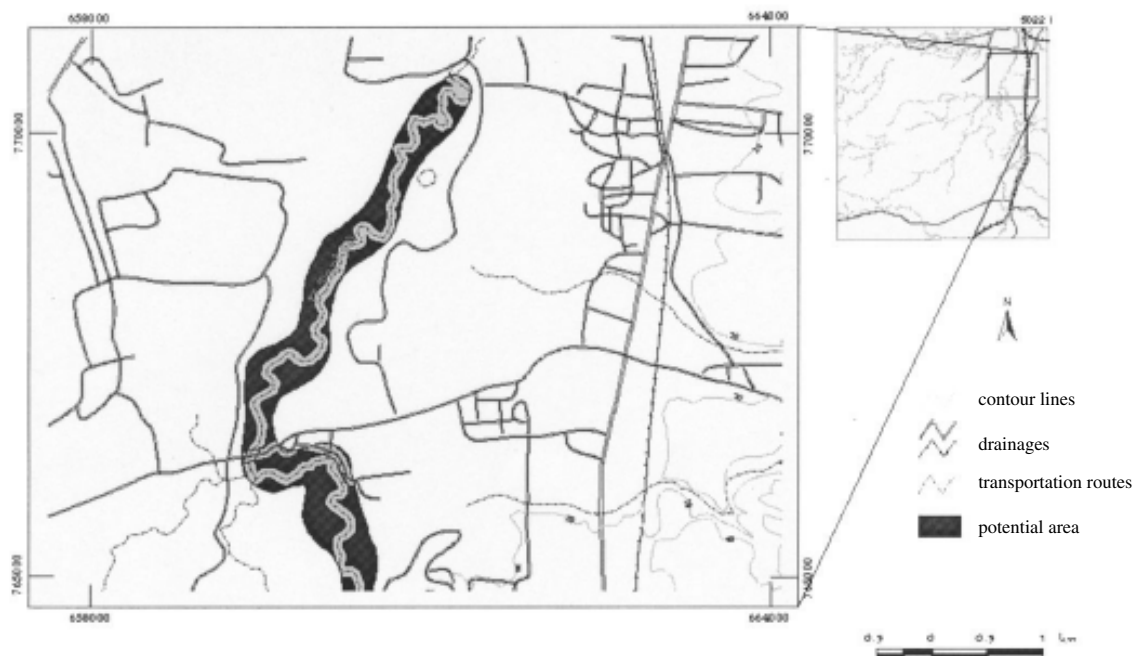


Figure 16. Some U-Taphao potential building sand deposit with buffer zone areas.



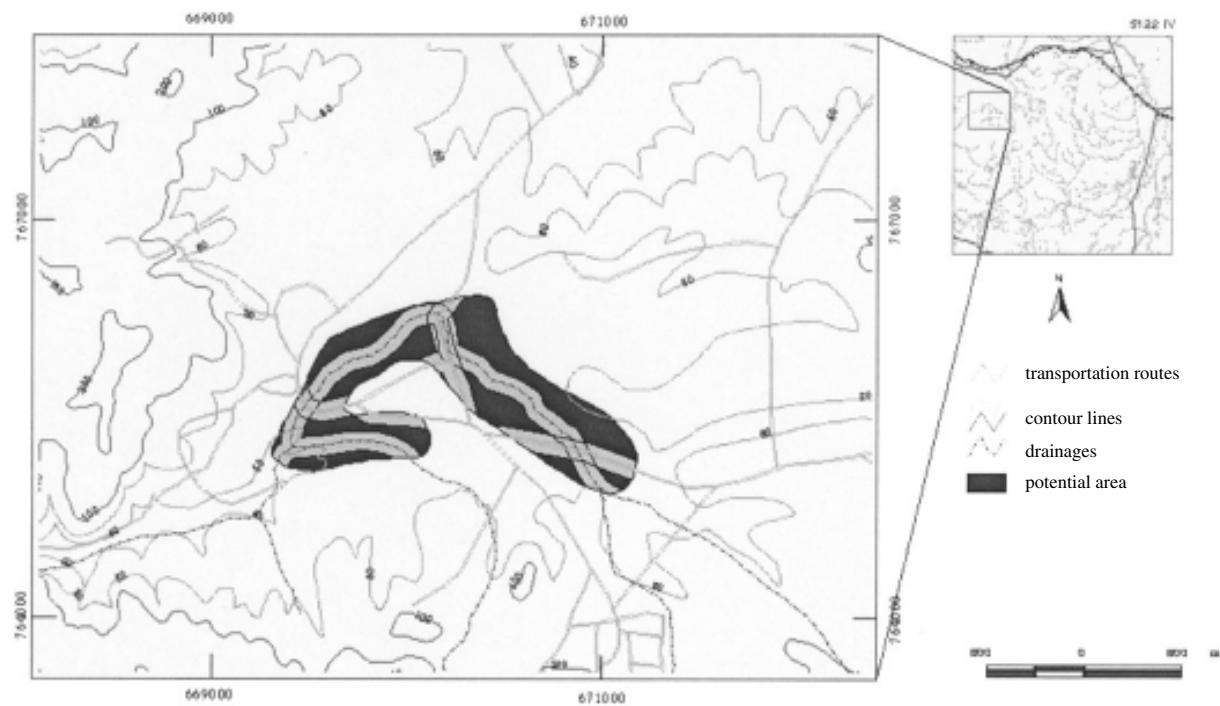


Figure 17. Na Mom potential building sand deposit with buffer zone areas.

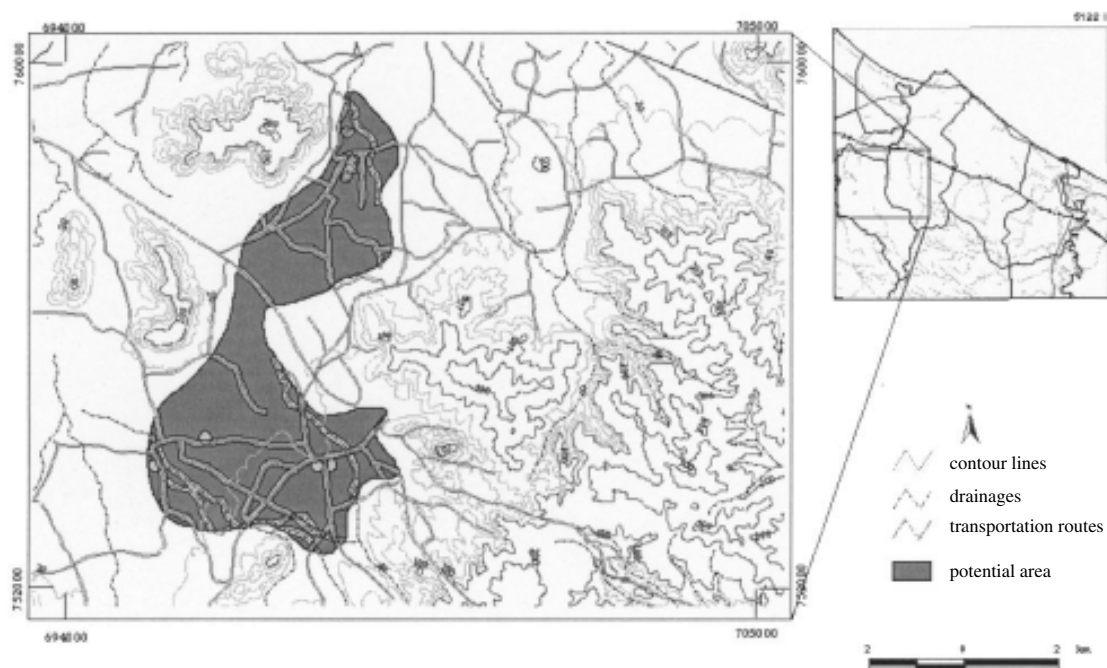


Figure 18. Chana-Thepha potential building sand deposit with buffer zone areas.

แปลผลจากความต้านทานไฟฟ้าในแต่ละจุดสำรวจ สร้างแผนที่ความหนา (Figure 19a) มีชั้นความหนาตั้งแต่ 0-28 เมตร (Table 9) ได้ปริมาณสำรอง 305,713,097 ลบ.เมตร และในส่วนปริมาตรของพื้นที่กันชนได้ใช้ความหนาเฉลี่ย 14.34 เมตร (Table 8) คูณกับพื้นที่กันชน (Table 7) ออกมาได้เป็น 76,373,314 ลบ.เมตร คงเหลือพื้นที่ศักยภาพแหล่งทราย จำนวน 229,332,389 ลบ.เมตร หรือ 605.35 ล้านเมตริกตัน (Table 10)

## 6.2 เขตคลองอยู่ตะเภา

ลักษณะภูมิสังฐานของแหล่งทรายนี้อ่อนช้งแคบและสะสมไปตามความยาวคลองอยู่ตะเภา กว้างประมาณ 130-520 เมตร ดังนั้นบรรดาจุดสำรวจความลึกจากความต้านทานไฟฟ้าแหล่งนี้ทั้งหมด 13 จุด (Table 3) จึงกระจายไปตามความยาวของคลอง ไม่สามารถสร้างความหนาชั้นทรายในรูปแผนที่ชั้นความหนาที่น่าเชื่อถือได้ ความหนาชั้นทรายที่ความลึกไม่เกิน 50 เมตร มีค่าอยู่ในช่วง 5.7-45.4 เมตร เฉลี่ยความหนา 16.92 เมตร (Table 8) มาคำนวณกับปริมาณพื้นที่ได้จากการประมวลด้วย ArcView ได้แหล่งทรายนี้นี้ทั้งหมด 8,420,843 ตร.เมตร พื้นที่กันชน 3,924,866 ตร.เมตร พื้นที่ทรายคงเหลือ 4,495,977 ตร.เมตร (Table 7) นั้น คือปริมาณสำรองแหล่งทรายที่อนุมาณคงเหลือ 76,071,931 ลบ.เมตร หรือประมาณ 200.83 ล้านเมตริกตัน (Table 10)

## 6.3 เขตนาหม่อม

ความหนาชั้นทรายที่แปลผลจากความต้านทานไฟฟ้าในแต่ละจุดสำรวจที่มีจำนวนน้อยและพบว่าแหล่ง NM-2 นั้นความหนาไม่เหมาะสมในเชิงพาณิชย์ จึงพิจารณาเฉพาะความหนาเฉลี่ยของแหล่ง NM-1 และ NM-3 ได้ 3.95 และ 5.95 เมตร ตามลำดับ (Table 8) เมื่อคูณกับพื้นที่แหล่งทรายคงเหลือ (Table 7) ก็จะได้เป็นปริมาณสำรองแหล่งทรายอนุมาณของ NM-1 และ NM-3 เป็นปริมาตรประมาณ 1,661,611 และ 5,172,641 ลบ.เมตร หรือประมาณ 4.4 และ 9.3 ล้านเมตริกตัน ตามลำดับ (Table 10)

## 6.4 เขตจะนะ-เทพา

ครอบคลุมพื้นที่ 13.8 ตร.กม. (Table 7) จากความหนาชั้นทรายที่แปลผลจากความต้านทานไฟฟ้าในจุดสำรวจความลึกไม่เกิน 50 เมตร ทั้งหมด 11 จุด มีความหนาอยู่ในพิสัย 4.6-10.0 เมตร มีความหนาเฉลี่ย 7.34 เมตร (Table 8) แบ่งชั้นความหนาตั้งแต่ 0-9 เมตร (Figure 19b) ผลคำนวณจากแผนที่ความหนา (Table 9) ได้ปริมาณสำรอง 104,361,364 ลบ.เมตร และในส่วนปริมาตรของพื้นที่กันชนได้ใช้ความหนาเฉลี่ยคูณกับพื้นที่กันชน (Table 7) ได้เป็น 28,274,025 ลบ.เมตร ดังนั้นประมาณการปริมาณสำรองศักยภาพแหล่งทรายอนุมาณ

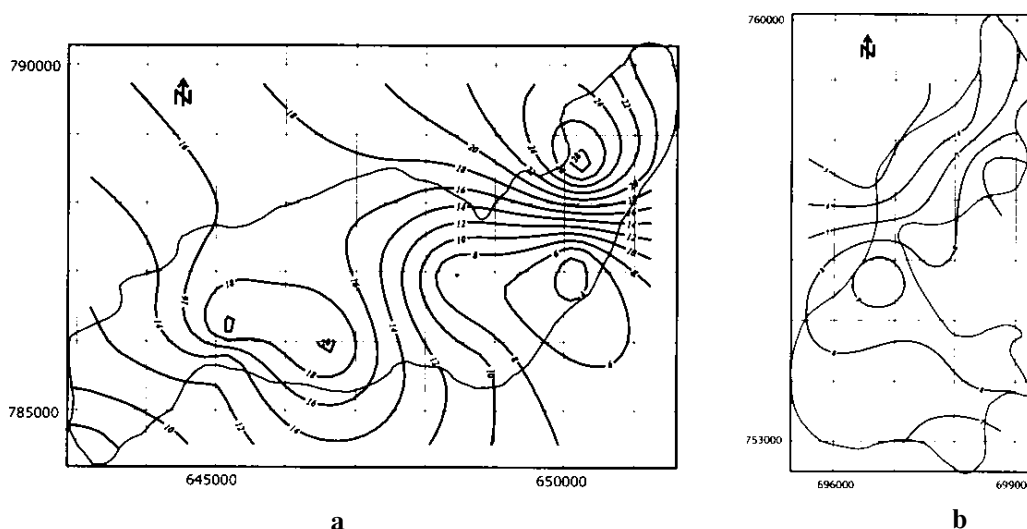


Figure 19. Isopach map of potential building sand deposit area at region of a) Rattaphum-Khuan Niang and b) Chana-Thepha

**Table 8. Overview of total thickness of natural sand deposits in Songkhla province**

| Rattaphum-Khuan Niang |               | U-Taphao |               | Na Mom  |               | Chana-Thepha |               |
|-----------------------|---------------|----------|---------------|---------|---------------|--------------|---------------|
| Station               | Thickness (m) | Station  | Thickness (m) | Station | Thickness (m) | Station      | Thickness (m) |
| RP-1                  | 7.2           | UT-1     | 6.8           | NM-1    | 7.3           | CH-1         | 5.5           |
| RP-2                  | 11.4          | UT-2     | 17.08         | NM-2    | 5.1           | CH-2         | 6.6           |
| RP-3                  | 12.5          | UT-3     | 25.0          | NM-3    | 1.9           | CH-3         | 4.6           |
| RP-4                  | 20.7          | UT-4     | 20.2          | NM-4    | 1.5           | CH-4         | 7.6           |
| RP-5                  | 20.6          | UT-5     | 5.7           | Ave.    | 3.95          | CH-5         | 9.5           |
| RP-6                  | 12.9          | UT-6     | 12.0          | NM-5    | 1.0           | CH-6         | 8.5           |
| RP-7                  | 16.1          | UT-7     | 29.1          | NM-6    | Error         | CH-7         | 7.2           |
| RP-8                  | 16.8          | UT-8     | 15.6          | NM-7    | 1.9           | CH-8         | 7.7           |
| RP-9                  | 5.8           | UT-9     | 45.4          | Ave     | none          | CH-9         | 7.3           |
| KN-1                  | 10.8          | UT-10    | 10.0          | NM-8    | -             | CH-10        | 10.0          |
| KN-2                  | 3.0           | UT-11    | 12.3          | NM-9    | 7.4           | CH-11        | 6.2           |
| KN-3                  | 19.1          | UT-12    | 8.6           | NM-10   | 4.5           | Ave.         | 7.34          |
| KN-4                  | 29.5          | UT-13    | 12.3          | Ave.    | 5.95          |              |               |
| Ave.                  | 14.34         | Ave.     | 16.92         |         |               |              |               |

**Table 9. Calculated area of total reserves from thickness map at Rattaphum-Khuan Niang and Chana-Thepha regions**

| Rattaphum-Khuan Niang |                        | Chana-Thepha      |                        |
|-----------------------|------------------------|-------------------|------------------------|
| Contour Level (m)     | Area (m <sup>2</sup> ) | Contour Level (m) | Area (m <sup>2</sup> ) |
| 0                     | 21,023,730             | 0                 | 13,859,275             |
| 2                     | 21,023,730             | 1                 | 13,859,275             |
| 4                     | 21,023,730             | 2                 | 13,859,275             |
| 6                     | 21,023,730             | 3                 | 13,859,275             |
| 8                     | 20,710,022             | 4                 | 13,859,275             |
| 10                    | 18,245,395             | 5                 | 13,825,129             |
| 12                    | 15,781,011             | 6                 | 12,846,191             |
| 14                    | 13,257,714             | 7                 | 10,231,876             |
| 16                    | 9,157,223              | 8                 | 4,634,208              |
| 18                    | 3,260,362              | 9                 | 914,445                |
| 20                    | 2,242,307              |                   |                        |
| 22                    | 1,453,928              |                   |                        |
| 24                    | 897,113                |                   |                        |
| 26                    | 400,266                |                   |                        |
| 28                    | 49,004                 |                   |                        |

คงเหลือประมาณ 76,087,339 ลบ.เมตร หรือประมาณ  
201.63 ล้านเมตรกตัน (Table 10)

### สรุปผลและวิจารณ์

ศักยภาพแหล่งทรายก่อสร้างที่สำคัญของจังหวัด  
สงขลา จัดเป็นทรายภาคพื้นทวีปของยุคควอเทอร์นารี พบ

Table 10. Inferred reserves of building sand deposits in various regions of Songkhla province

| Region                | Inferred resources total (m <sup>3</sup> ) | Resources in buffer zone (m <sup>3</sup> ) | Remaining inferred resources m <sup>3</sup> | t × 10 <sup>6</sup> |
|-----------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------|
| Rattaphum-Khuan Niang | 305,713,097                                | 76,373,314                                 | 229,339,783                                 | 605.35              |
| U-Taphao              | 142,480,000                                | 66,408,733                                 | 76,071,931                                  | 200.83              |
| Na Mom, NM-1          | 3,372,119                                  | 1,443,894                                  | 1,661,611                                   | 4.40                |
| NM-3                  | 6,753,101                                  | 3,247,520                                  | 3,511,029                                   | 9.30                |
| Chana-Thepha          | 104,361,364                                | 28,274,025                                 | 76,087,339                                  | 201.63              |
| <b>Total</b>          | <b>1,337,726,156</b>                       | <b>406,698,253</b>                         | <b>386,671,693</b>                          | <b>1021.51</b>      |

กระจายอยู่ในหลายพื้นที่ ในลักษณะที่ราบตะกอนน้ำพาในทางน้ำโค้งตัวหรือบริเวณรอยทะเลสาบรูปแอก และเนินตะกอนน้ำพารูปพัด หินต้นกำเนิดที่สำคัญ ได้แก่ หินแกรนิตยุคไทรแอสซิก ยุคปลายไทรแอสซิก-จูแรสซิก หินทราย หินกรวดมน ยุคไซลูเรียน-ดีโวเนียน คาร์บอนิเฟอรัส ไทรแอสซิกและเทอร์เชียรี

ถึงแม้ว่าแหล่งทรายชนิดละเอียดเพื่อการก่อสร้าง (คอนกรีต มอร์ตาร์ ปลาสเตอร์) ส่วนมากของพื้นที่สงขลาได้ผลิตอยู่ในเขตรัฐภูมิ-ควนเนียง คลองอู่ตะเภา นาหม่อม และจะนะ-เทพา แต่ก็ยังมีศักยภาพแหล่งทรายก่อสร้างเขตอื่นอีกเช่นกัน เพียงแต่มีบางแหล่งและบางส่วนของปริมาณสำรองทรายเหล่านั้น ที่คุ้มทุนแก่การประกอบการทำเหมืองภายใต้สภาวะเศรษฐกิจปัจจุบันได้เท่านั้น นอกจากนี้ศักยภาพแหล่งที่ไม่ได้พิจารณาในการศึกษานี้คือ แหล่งลานตะพักก่อนกรวด (gravel terrace) แหล่งเศษหินเชิงเขา (colluvial deposit) และตะกอนน้ำหลากจากการกร่อนแบบผิวแผ่น ที่พบอยู่ตามขอบแอ่งหาดใหญ่-นาหม่อม (Figure 9) ก็สามารถนำมาใช้เป็นมวลรวมหยาบได้ แต่ต้องล้างดินและเศษวัสดุอื่นที่เกาะติดออก

ในแหล่งรัฐภูมิ-ควนเนียง มีศักยภาพของแหล่งทรายเป็นอันดับต้น เนื่องจากการกระจายตัวของแหล่งสะสมค่อนข้างกว้าง ชั้นทรายหยาบอยู่ในระดับที่ตื้นและมีความหนาค่อนข้างมาก นั่นคือ มากกว่า 15 เมตร ส่วนพื้นที่น่าสนใจรองลงมาคือ แหล่งจะนะ-เทพา ที่มีแอ่งสะสมตัวของทรายแผ่กว้างพอสมควร แต่ความหนาของชั้นทรายโดยเฉลี่ยไม่มากนัก โดยทรายสะสมตัวในที่ราบตะกอนน้ำพาและลานหินพัง ส่วนพื้นที่ริมคลองอู่ตะเภา

เป็นบริเวณที่ชั้นตะกอนมีความหนาแน่น แต่ก็มีชั้นหน้าดินเป็นทรายละเอียดค่อนข้างหนา ชั้นทรายหยาบมีน้อย และพื้นที่สะสมตัวของตะกอนแคบ การผลิตทรายในพื้นที่นี้ ปัจจุบันดำเนินการอยู่บริเวณริมตลิ่งของคลองอู่ตะเภา จึงมีผลให้เกิดตะกอนขุ่นขึ้นในลำน้ำ ซึ่งเป็นแหล่งน้ำดิบที่บ่อน้ำเพื่อการผลิตน้ำประปาของอำเภอหาดใหญ่ สำหรับแหล่งทรายนาหม่อมสะสมตัวในบริเวณแคบ ริมฝั่งทางน้ำมีความหนาแน่นและแผ่กระจายครอบคลุมพื้นที่ไม่มากนัก ซึ่งมีศักยภาพของแหล่งต่ำกว่าแหล่งอื่นทั้งหมด อย่างไรก็ตามแหล่งทรายบางแห่ง เช่น ทรายในทางน้ำโบราณทางตะวันออกของเขตนาหม่อม ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างน้อย ควรเสริมการสำรวจรายละเอียดมากขึ้น เพื่อสามารถกำหนดการแผ่ขยายและความหนาแน่นคง

การแปลรูปถ่ายทางอากาศช่วยให้ลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการสำรวจภาคสนามไปได้มาก อย่างไรก็ตามการใช้หากว่ามีมาตราส่วนขนาดใหญ่ประมาณ 1:10,000 ขึ้นไป ก็จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแปลได้อีกมากสำหรับความลึกและความหนาของแหล่งทรายที่แปลความจากการสำรวจด้วยเครื่องวัดความต้านทานไฟฟ้า พบว่าแยกหินดานกับชั้นทรายและชั้นที่มีพีตได้ชัดเจน แหล่งคลองอู่ตะเภาในบางแห่งมีชั้นทรายได้ถึง 2 ชั้น (Table 4) อย่างไรก็ตามควรตระหนักด้วยว่า ค่าเหล่านี้อาจมีความคลาดเคลื่อนอยู่พอสมควร จากโปรแกรมที่ใช้แปลและระเบียบวิธีโครงแบบสำรวจ ซึ่งหากต้องการสำรวจชั้นในรายละเอียดเสนอแนะว่าควรใช้วิธี dipole-dipole อันจะได้หน้าตัดการวางตัวของชั้นทรายยาวตลอดแนวสำรวจถึงกระนั้นก็ควรเสริมด้วยการตรวจสอบกับข้อมูลในภาค

สนามอย่างอื่นด้วย เช่น บ่อทรายเก่าหรือหลุมเจาะข้างเคียง หน้าตัดข้างของชั้นดินที่โผล่ หรือหินโผล่ข้างถนน เป็นต้น

ประเด็นการคละขนาดจัดอยู่ในเกณฑ์และใกล้เคียง กับมาตรฐานมวลรวมละเอียดผสมปูนปลาสเตอร์ มอร์ตาร์ และคอนกรีต ซึ่งบางแหล่งในอำเภอรัตภูมิ-ควนเนียง อาจต้องปรับปรุงการคละขนาดที่มีขนาดทรายหยาบหรือละเอียด เกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนด สำหรับวัสดุขนาดเล็กกว่า 75 ไมโครเมตร (ASTM C 142) และวัสดุอนุภาคที่หุดตัวสูง จนเป็นสาเหตุรอยร้าว และสามารถนำไปสู่พังทลายของ โครงสร้างมีอยู่น้อย สำหรับเกลือมีผลต่อการขยายตัวของ คอนกรีต หรือปูนปลาสเตอร์ และคลอไรด์ที่มีผลต่อเหล็ก เสริม ( $< 0.03\%$ ) และรอยขีดเกลือในปูนปลาสเตอร์ ล้วน เชื่อว่ามีปริมาณไม่เกินเกณฑ์กำหนด แต่ถึงหากว่ามีสูงก็ สามารถล้างน้ำหรือผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพอย่าง ง่ายได้ อย่างไรก็ตามหากให้ความมั่นใจควรสุ่มทดสอบ ก่อนนำไปใช้ก็เพิ่มความปลอดภัยไว้ก่อนแก่การทำงาน ส่วน ปริมาณสารอินทรีย์เจือปนในอัตราที่เป็นอันตรายและค่า ความคงตัวของทรายพบในแหล่งนาหม่อม ควนเนียง และ จะนะ ปริมาณซิลิกาในทรายทุกแหล่งไม่เกิน 98.5% จึง เหมาะสมสำหรับใช้ในงานอุตสาหกรรมก่อสร้าง โดยมุมมองภาพรวมปริมาณสำรองแร่สำรวจเบื้องต้น (reconnaissance mineral resource) ทรายก่อสร้างชนิดละเอียด เหล่านี้สามารถนำไปใช้งานได้ โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ ล้างและปรับปรุงมาก

ในการประเมินปริมาณสำรองศักยภาพแหล่งทราย ก่อสร้างที่น่าเชื่อถือได้อย่างสมเหตุสมผลนั้นพื้นที่ศักยภาพ แหล่งทรายที่ควรตัดทิ้งไป หากพบว่าจุดข้อมูลสำรวจ ชั้นทรายน้อย และรวมถึงแหล่งอยู่ในเขตอนุรักษ์ธรรมชาติ ด้วยเหตุนี้ปริมาณทรายสำรองจึงค่อนข้างยุ่งยากแก่การ ประเมิน แต่กระนั้นก็พอวิเคราะห์ได้จากภูมิสารสนเทศ ของแหล่งทรายที่มีอยู่ด้วยระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ ชั้น ข้อมูลตัวประกอบต่างๆ ที่ได้นำมาพิจารณาแต่ละเขต จึง ทำให้การประเมินแหล่งทรายสำรองอนุมาณอย่างสมเหตุ สมผล ปริมาณสำรองศักยภาพแหล่งทรายของเขตรัตภูมิ-ควนเนียงคิดเป็นประมาณอัตรา 60% ของปริมาณสำรอง อนุมาณทั้งหมดประมาณ 386 ลบ.เมตร หรือประมาณ 1,021 ล้านเมตริกตัน อนึ่งปริมาณสำรองครั้งนี้ไม่ได้คำนึง แหล่งก้อนกรวดลานตะพัก (terrace gravel) ซึ่งสามารถ

ทำเป็นทรายย่อย (crusher sand) รวมถึงแหล่งทรายแก้ว เช่นกัน

งานวิจัยครั้งนี้ได้ยืนยันผลปริมาณสำรองอนุมาณ เป็นส่วนใหญ่หากว่าในบางพื้นที่มีการทำบ่อทรายหนาแน่น เช่น เขตรัตภูมิ มีข้อมูลพอเพียงก็สามารถแสดงปริมาณ สำรองแหล่งทรายคงเหลือได้ถึงระดับชั้นปริมาณสำรองที่ วัดผล (measured mineral resources) หรือปริมาณ สำรองที่ระบุ (indicated mineral resources) ได้เช่นกัน

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชา วิศวกรรมเหมืองแร่และวัสดุ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ กรมทรัพยากรธรณี ผ่านสำนักงานทรัพยากรธรณีเขต 1 สงขลา ที่ได้ให้ทุน สนับสนุนในการดำเนินการศึกษาค้นคว้า และขอขอบคุณ บรรดาเจ้าของและคนงานของบ่อทรายทุกแห่ง ที่ได้ อนุญาตให้เข้าไปตรวจจุดทรายที่โผล่และได้ให้ข้อมูลที่มี ประโยชน์เกี่ยวกับทรายแหล่งนั้น ตลอดจนเจ้าหน้าที่กรม ทรัพยากรธรณีเขต 1 ทุกท่านที่ได้ร่วมออกสำรวจภาค สนาม และ ศูนย์รีโมทเซนซิงและระบบสารสนเทศ ภูมิศาสตร์ภาคใต้ สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ยืมรูปถ่ายทาง อากาศและเื่ออำนวยความสะดวก และ ผศ.ดร.อำนาจ สิทธิเจริญชัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลเชิงตัวเลขของ แผนที่ภูมิประเทศระวางจังหวัดสงขลา

### เอกสารอ้างอิง

- กรมทรัพยากรธรณี 2538. สัมมนาอุตสาหกรรมปูนซีเมนต์ : สถานการณ์และแนวโน้ม การประชุมทางวิชาการกรม ทรัพยากรธรณี ปี 2538, กรมทรัพยากรธรณี  
ชิมชัย เศรษฐพรหมณ์ และ รัตมี สุวรรณวีระกำจร. 2537. ภาพจากดาวเทียมเพื่อการค้นหาและติดตามแหล่งทราย ก่อสร้าง จุลสารดาวเทียม ฉบับที่ 49 หน้า 1-5  
دنุพล ดันนโยภาส. 2539. ศิลาบรรณสำหรับวิศวกร พิมพ์ ครั้งที่ 1 ภาควิชาวิศวกรรมเหมืองแร่และโลหะ วิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หน้า 221  
دنุพล ดันนโยภาส. 2540. การประกันคุณภาพฐานรากเขื่อน สะเดา การประชุมวิชาการวิศวกรรมโยธาแห่งชาติ ครั้งที่ 3 โรงแรมเจบี อ.หาดใหญ่ 16-18 มค. พ.ศ. 2540

- หน้า GTE 5-1-GTE 5-10.
- دنوفل ตันนโยภาส. 2541. การรับรู้จากระยะไกลเบื้องต้น เอกสารประกอบการสอน ภาควิชาวิศวกรรมเหมืองแร่ และโลหวิทยา คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ หน้า 89-90.
- دنوفل ตันนโยภาส. 2542. หลักการธรณีวิศวกรรม พิมพ์ ครั้งที่ 2 ภาควิชาวิศวกรรมเหมืองแร่และวัสดุ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หน้า 211-235
- دنوفل ตันนโยภาส กัลยาณี คุปตานนท์ และ สมชัย ชัยเสน. 2544. ธรณีวิทยาภาพถ่ายและระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์สำหรับการสำรวจแหล่งทรายในจังหวัดสงขลา การประชุมวิชาการด้านเหมืองแร่ โลหกรรมและปิโตรเลียม ครั้งที่ 6 24-26 ตุลาคม 2544 โรงแรมแมนดาริน กรุงเทพฯ หน้า 1-22 -1-30.
- دنوفل ตันนโยภาส วิวัฒน์ รุ่งเรือง และ อานันต์ คำภีระ. 2540. การสำรวจโครงสร้างและธรณีเทคนิคของแอ่ง หาดใหญ่โดยวิเคราะห์ภาพ รายงานการประชุมวิชาการ เรื่อง การประยุกต์ใช้ธรณีฟิสิกส์ในงานสำรวจแหล่ง ทรัพยากรธรรมชาติ งานวิศวกรรม และสิ่งแวดล้อม ครั้งที่ 1. 31 มี.ค. -1 เม.ย. 2540 โรงแรมรีเจนท์ หาดใหญ่ หน้า 67-79.
- دنوفล ตันนโยภาส พรศิลป์ ผลพันธ์ิน เขาวิน ยงเฉลิมชัย อานันต์ คำภีระ และ สุชาดา ยงสถิตศักดิ์. 2543. การ จัดทำระบบข้อมูลสารสนเทศเพื่อการจัดการคุณภาพ น้ำบริเวณทะเลสาบสงขลาตอนล่าง รายงานวิจัยฉบับ สมบูรณ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หน้า 18-32.
- รังสิโรจน์ วงศ์พรหมเมฆ และ โชติ ตราชู. 2540. ทรายใน ทะเลแหล่งทรายสำรองของประเทศในอนาคต เอกสาร การสัมมนาเรื่อง การจัดการทรัพยากรทรายของ ประเทศไทย กรมทรัพยากรธรณี 24 ก.ค. 2540 หน้า 13-31
- สมชาย นาคะผดุงรัตน์ และ สมชัย ชัยเสน. 2529. ชุด แผนที่ธรณีวิทยา ระบาย 5122 V อำเภอจะนะ (มาตรา ส่วน 1:50,000) กรมทรัพยากรธรณี (ไม่พิมพ์เผยแพร่)
- สมชาย นาคะผดุงรัตน์ นรรัตน์ บุญกันภัย อภิชาติ จินกุล เสริมศักดิ์ ดิยพันธ์ และนราเมศวร์ วีระรังสิกุล. 2531. ชุดแผนที่ธรณีวิทยา ระบาย 5122 I อำเภอเทพา (มาตราส่วน 1:50,000) กรมทรัพยากรธรณี (ไม่พิมพ์ เผยแพร่)
- สมชัย ชัยเสน. 2540. รายงานการสำรวจธรณีวิทยาเบื้องต้น แหล่งทรายก่อสร้าง สำนักงานทรัพยากรธรณีเขต 1 สงขลา กรมทรัพยากรธรณี หน้า 38-43
- สมชัย ชัยเสน สุนทร เพื่องทอง และ กัมพล มณีประพันธ์. 2539. รายงานสำรวจธรณีวิทยาเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบ ศักยภาพแหล่งหินประดับ ชนิดหินแกรนิต บริเวณ ตำบลวังใหญ่ อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา สำนักงาน ทรัพยากรธรณีเขต 1 สงขลา กรมทรัพยากรธรณี 27 หน้า (ไม่พิมพ์เผยแพร่)
- อำเภอ ทองภัญญะชัย. 2540. แหล่งทรายในจังหวัดภูเก็ตและ ชุมพร เอกสารการสัมมนาเรื่องการจัดการทรัพยากร ทรายของประเทศไทย กรมทรัพยากรธรณี 24 ก.ค. 2540 หน้า 51-67
- ASTM C 33 Standard specification for concrete aggregates, C 33-99.
- ASTM C 40 Standard test method for organic impurities in fine aggregates for concrete, C40-98.
- ASTM C 88 Standard test method for soundness of aggregates by use of sodium sulfate or magnesium sulfate, C88-90.
- ASTM C 128 Standard test method for specific gravity and absorption fine aggregate, C128-97.
- ASTM C 136 Standard test method for sieve analysis of fine and coarse aggregates, C136-96.
- ASTM C 142 Standard test method for clay lumps and friable particles in aggregates C142-97
- ASTM C 146 Standard test method for chemical analysis of glass sand, C146 REVA.
- ASTM C 295 Practice for petrographic examination of aggregates for concrete, C295-79.
- ASTM C 702 Standard practice for reducing samples of aggregates testing size, C702-93.
- ASTM C 1218 Standard test method for water-soluble chloride in mortar and concrete, C 1218M-99
- Campbell K.V. 1978. Air photo interpretation laboratory manual, AIT., pp. 108-115.
- Collis L. and Fox R.A. 1985. Aggregates-sand, gravel and crushed rock aggregates for construction purposes, Geol. Soc. Eng. Geol. Spec. Publ 1, 220 p.
- ESRI 1998. Introduction to ArcView GIS, Version 3.1
- SABS 1083 Standard specification for aggregates from natural sources. Report of Council of the South African Bureau of Standards, SABS 1083-1976, Pretoria, 37 p.
- SABS 1090 Standard specification for sand for plaster and mortar. Report of Council of the South African Bureau of Standards, SABS 1090-1976, Pretoria, 17 p.

## Recycled gloves as a filler

Orasa Patarapaiboolchai<sup>1</sup>, Tulyapong Tulayapitak<sup>2</sup>, and  
Ittisak Sriwang<sup>2</sup>

### Abstract

Patarapaiboolchai, O., Tulayapitak, T. and Sriwang, I.  
**Recycled gloves as a filler**  
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 701-706

Glove rejects can be loaded as filler in the formula (NR 100, ZnO 5, stearic acid 1, MBT 1, S 2.5, BHT 1 and calcium carbonate 40 phr) up to 100 phr to give good properties such as cure time, tensile strength, 300% modulus, elongation at break, tear strength, crack growth and abrasion index. However, scorch time and extrusion quality show a shorter time and rougher surface with higher loading, respectively. A recommended quantity for obtaining good properties in scorch time and extrusion process by garvey die is 40 phr. Powder gloves show a different cure time and scorch time from chlorinated gloves but show no significant changes in physical properties.

---

**Key words :** recycled gloves, scrap rubber, devulcanization

---

<sup>1</sup>P.h.D. (Polymer Science), <sup>2</sup>B.Sc. (Rubber Technology), Department of Rubber Technology and Polymer Science, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani, 94000 Thailand.

Corresponding e-mail : [porasa@bunga.pn.psu.ac.th](mailto:porasa@bunga.pn.psu.ac.th)

Received, 30 March 2001

Accepted, 13 August 2002

## บทคัดย่อ

อรสา ภัทรไพบลุย์ชัย ตุลยพงษ์ ตุลยพิทักษ์ และ อธิธิศักดิ์ ศรีวัง

การนำลู้งมือยางกลับมาใช้ในฐานะเป็นสารตัวเติม

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(4) : 701-706

ลู้งมือที่ถูกคัดทิ้งสามารถนำกลับมาใช้เป็นสารตัวเติมได้ถึง 100 ส่วน ในสูตรที่ประกอบด้วยยางธรรมชาติ 100 ซิงค์ออกไซด์ (Zinc oxide, ZnO) 5 กรดสเตียริก (Stearic acid) 1 สารตัวเร่งเอ็ม บี ที (MBT) 1 กำมะถัน 2.5 สารป้องกันการเสื่อม บี เฮช ที (BHT) 1] โดยที่ยังคงมีสมบัติที่ดีในส่วนของเวลาในการทำให้ยางสุก (Cure time) ความต้านทานต่อแรงดึง 300% โมดูลัส (Modulus) การยืดตัวของยางจนขาด (Elongation at break) ความต้านทานต่อการฉีกขาด (Tear strength) การขยายตัวของรอยแตก (Crack growth) และความต้านทานต่อการสึกหรอ (Abrasion index) ยกเว้นเวลาในการอบสุกของยางก่อนกำหนด (Scorch time) และกระบวนการดันยางผ่านหัวไดน์ (Extrusion) ก็จะใช้เวลาน้อยกว่า และให้ผิวที่หยาบกว่าตามลำดับ เมื่อใส่ปริมาณสารตัวเติมเพิ่มขึ้น การเติม 40 ส่วนเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการรักษาสมบัติที่ดีในด้านเวลาในการอบสุกของยางก่อนกำหนดและกระบวนการดันยางผ่านหัวไดน์ ชนิด Gravey ลู้งมือชนิดนี้มีแป้งมีค่าเวลาในการทำให้ยางสุก และเวลาในการอบสุกของยางก่อนกำหนด แตกต่างกับลู้งมือชนิดคลอรีนแต่สมบัติทางกายภาพของลู้งมือทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

ภาควิชาเทคโนโลยียางและพอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปัตตานี 94000

Nowadays, people produce tons of scrap rubber every year, for example in the United State alone 170,000 tons of factory scrap are produced annually. In addition, Americans discard 250 million used tires every year. A number of rubber technologists have tried to solve this major waste problem. One of the most common is to burn the scrap rubber as fuel but it generates new air pollution problems. Therefore, the best prospect for recycling scrap rubber is to reuse it in new rubber products. In this way, instead of being a disposal problem, the scrap becomes a raw material. The simplest approach is to use this scrap rubber as filler in new rubber products.

Thailand is one of the biggest glove producers. Each day, there are rejected gloves created about 2-10% in the process depends on the manufacturers individually. Only 7% of the total daily rejects leading to a serious problem for the industry in producing the mountain of black gold. With this result, if one can reuse the rejects by putting them into a virgin compound, the saving costs would be considerable.

The degradation of glove rejects resulting

from mechanical treatment is sufficient for them to be used as a recyclate. This process is known as devulcanization that cleaves totally or partially, the poly-di-, and monosulphide crosslinks formed during the initial vulcanization (Warner, 1994). The disposal/utilization of scrap latex rejects can be approached in many ways. The first example is to reclaim or remove the crosslinks (Phadke, *et al*, 1983) in the scrap rubber and then use it as a raw material. The second example is to reuse it as an impact modifier in brittle plastics like polystyrene (Rajalingam and Sharpe, 1993; Pittolo and Burford, 1985) by solution or melt blending techniques. The last one is to reuse it as a filler in polyolefin (Oliphant and Baker, 1993).

Two kinds of glove rejects were studied in this research, one was powder gloves the other was chlorinated gloves. Both gloves were used as a filler in the compounds used as shown in Table 1. The influence of filler loading on the physical properties included cure characteristic (scorch time,  $t_2$  and cure time,  $t_{90}$ ) and the extrusion quality was compared and presented.



**Table 1. Formulations**

| phr               | Ingredients |     |     |     |     |     |
|-------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                   | 1           | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |
| STR 20            | 100         | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| ZnO               | 5           | 5   | 5   | 5   | 5   | 5   |
| Stearic acid      | 1           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| BHT               | 1           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| CaCO <sub>3</sub> | 40          | 40  | 40  | 40  | 40  | 40  |
| MBT               | 1           | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| Sulphur           | 2.5         | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| Loaded glove      | 0           | 20  | 40  | 60  | 80  | 100 |

**Table 2. Steps of mixing**

| Step         | Ingredients          | Mixing time (min.) |
|--------------|----------------------|--------------------|
| 1            | STR 20               | 8                  |
| 2            | Zinc oxide           | 2                  |
| 3            | Stearic acid         | 2                  |
| 4            | Ground glove rejects | 4                  |
| 5            | Calcium carbonate    | 10                 |
| 6            | BHT                  | 1                  |
| 7            | MBT                  | 1                  |
| 8            | Sulphur              | 1                  |
| 9            | Make sheet           | 1                  |
| <b>Total</b> |                      | <b>30</b>          |

### Materials and Methods

All the chemicals used are shown in Table 1. The basic material used in this work was natural rubber grade STR 20 (Standard Thai Rubber), manufactured by a local manufacturer. The glove rejects were supplied by Safeskin Co-operation (Songkhla, Thailand) Ltd.. Other compound ingredients were of reagent grade and obtained from rubber chemical suppliers.

Both powder and chlorinated gloves used as a filler were prepared by passing the rejects through a two-roll mill six times in a friction ratio 1: 1.2, after which they were made into a

sheet form. The steps in preparing compounds are shown in Table 2. All the ingredients were mixed with a two-roll mill at 45 °C for 30 minutes. Then, the compounds were analyzed for scorch time and cure time by Rheometer 2000 at 150 °C. In addition, the compounds were prepared for testing tensile strength, modulus and elongation at break, following ISO 37-1977(E), but tear strength followed ASTM 624-86 (using Universal Testing Machine, Tensometer), crack growth followed ASTM 1052-85 (using Ross Flexing Machine) and abrasion index followed BS: 903: part A (using Akron Abrasion Machine). In addition, the compounds were extruded with 2 inches sample strip through garvey die of cold feed extruder with a speed of 45 rpm at temperature of 110±15 °C and 70±10 °C for die and barrel, respectively, which followed ASTM D2230-93.

### Results and Discussion

The scorch time and cure time were found to decrease as powder gloves were loaded. This can be explained by the presence of unreacted accelerator used in the glove rejects (Mathew, *et al*; 2001) leading to decreases in scorch time and cure time with loading filler. Chlorinated gloves showed opposite results in scorch time and cure time when they were loaded over 40 phr because the amount of chlorine from the gloves generated an acid to delay the reaction with loading filler. These results are presented in Figures 1, 2, 3 and 4. Both scorch time and cure time from loaded powder gloves are lower than those from loaded chlorinated gloves. The extruded surface from loaded powder and chlorinated gloves are shown in Figures 5 and 6. It was found that the more loaded the glove rejects, the rougher the surface of the extruded product of both powder and chlorinated gloves, with the extruded edge showing a better result (without obtaining rug edge). In addition, it could be seen that the latter could not be obtained when extruded through a garvey die with powder or chlorinated gloves loaded more than 60 phr

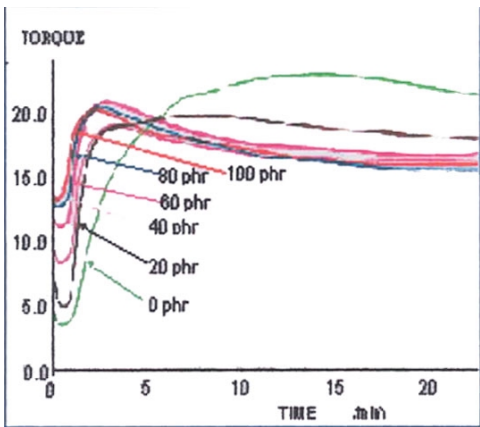


Figure 1. Cure characteristics of powder glove

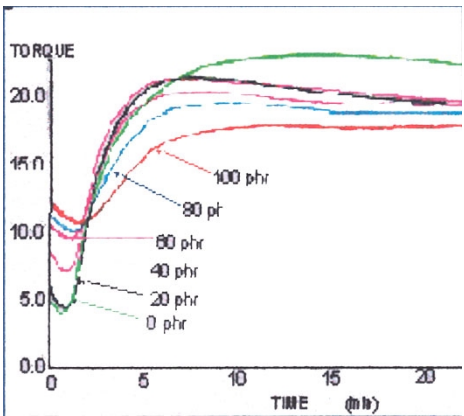


Figure 2. Cure characteristics of chlorinated glove

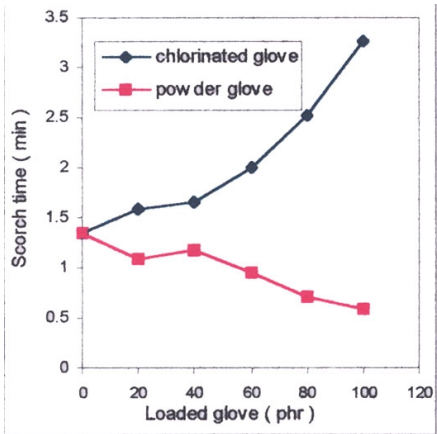


Figure 3. Effect of loaded glove on scorch time

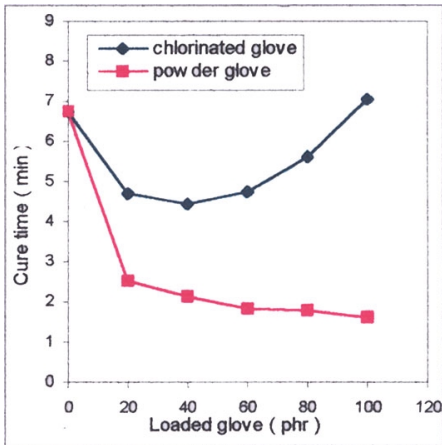


Figure 4. Effect of loaded glove on cure time

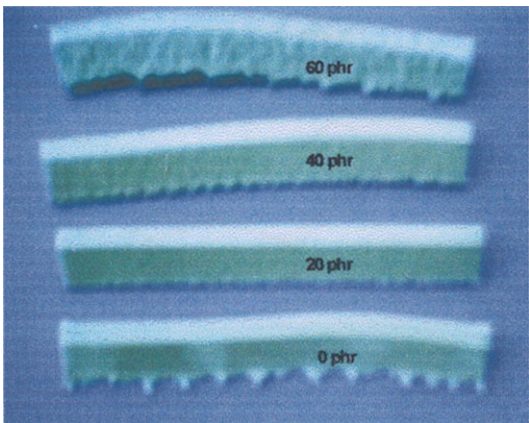


Figure 5. Extruded surface from loaded powder glove

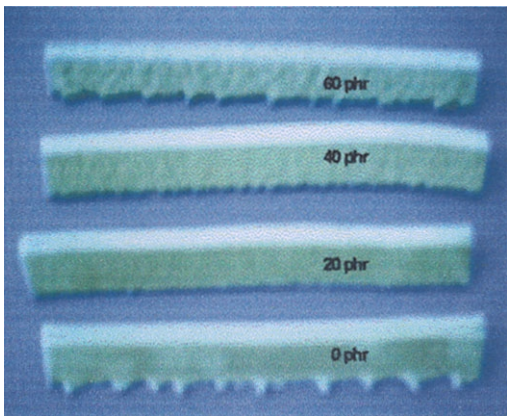


Figure 6. Extruded surface from loaded chlorinated glove

because the compound is scorched during the process. Moreover, the extruded surface starts to get very rough when powder or chlorinated gloves are loaded at over 40 phr. These results can be explained by the higher concentration of unreacted accelerator used in the glove rejects to cause the scorching (Mathew, *et al.*; 2001). In the case of physical properties such as tensile strength (Figure 7), 300% modulus (Figure 8), elongation at break (Figure 9), tear strength (Figure 10), % crack growth (Figure 11) and abrasion index (Figure 12), it was observed that the properties tend to decrease insignificantly as powder or chlorinated gloves are loaded for tensile strength (Scott, 1994), 300% modulus, elongation at break and abrasion index but tear strength and %crack growth tend to increase insignificantly. Furthermore, physical properties are not significantly different between powder and chlorinated gloves.

(Figure 10), % crack growth (Figure 11) and abrasion index (Figure 12), it was observed that the properties tend to decrease insignificantly as powder or chlorinated gloves are loaded for tensile strength (Scott, 1994), 300% modulus, elongation at break and abrasion index but tear strength and %crack growth tend to increase insignificantly. Furthermore, physical properties are not significantly different between powder and chlorinated gloves.

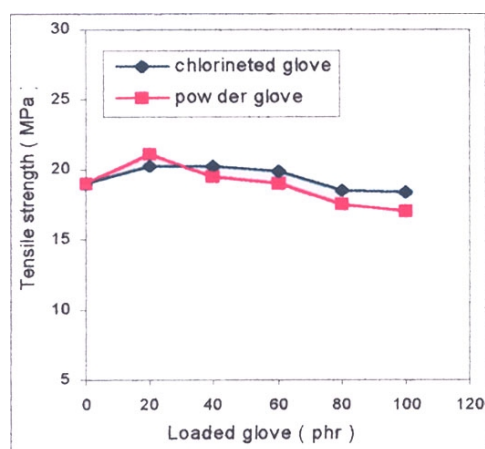


Figure 7. Effect of loaded glove on tensile strength

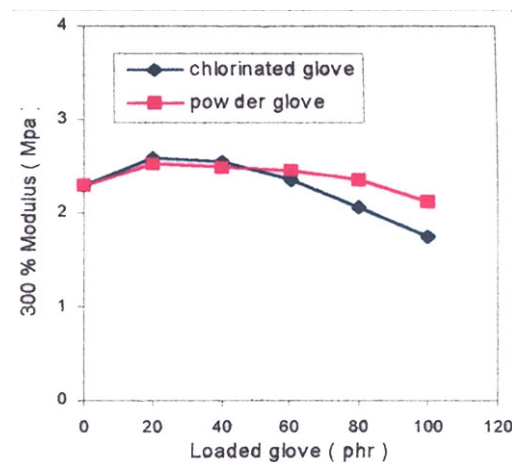


Figure 8. Effect of loaded glove on 300% modulus

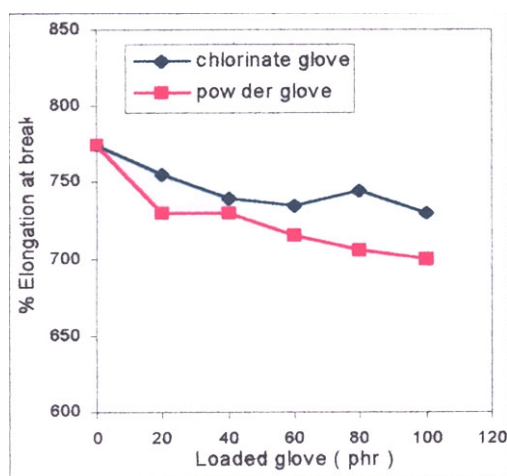


Figure 9. Effect of loaded glove on elongation at break

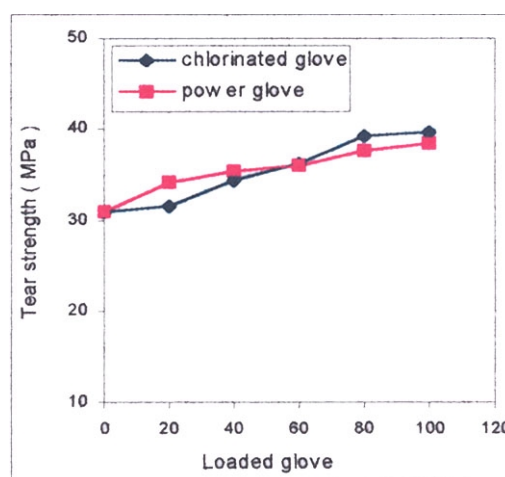


Figure 10. Effect of loaded glove on tear strength

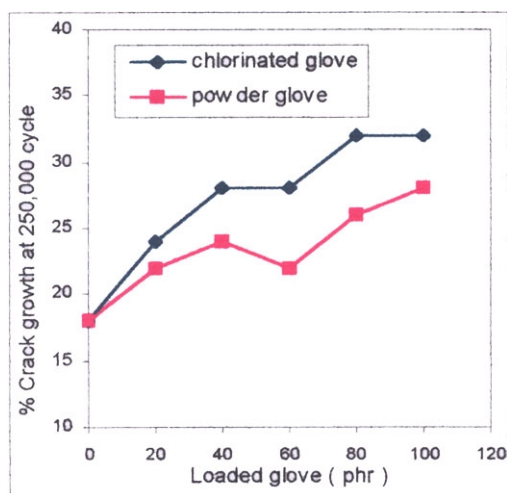


Figure 11. Effect of loaded glove on crack growth

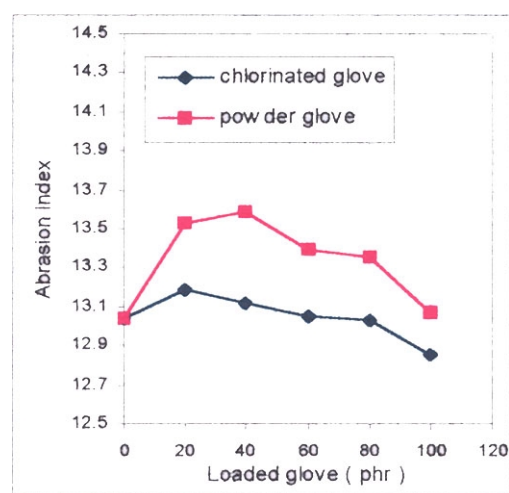


Figure 12. Effect of loaded glove on abrasion index

### Conclusion

The utilization of latex glove rejects as a potential filler in natural rubber compounding deserves much attention. It has been observed that as the filler contents increase, the curing characteristics like scorch time and cure time decrease for powder gloves but not for chlorinated gloves. In addition, for the compound with calcium carbonate as a base filler, the physical properties (tensile strength, 300% modulus, elongation at break, tear strength, % crack growth and abrasion index) change insignificantly with loading glove rejects. Furthermore, 40 phr of glove rejects loading is a recommended quantity for obtaining good properties and extrusion quality.

### Acknowledgment

My profound thanks and gratitude go to Safeskin Cooperation (Thailand) Ltd. for sponsoring both types of glove rejects for this research.

### References

- Mathew, G., Singh, R.P., Nair, N.R., and Thomas, S. 2001. Recycling of natural rubber latex waste and its interaction in epoxidation natural rubber, *Polymer*, 42: 2137.
- Oliphant, K. and Baker, W.E. 1993. The use of cryogenically ground rubber tires as a filler in polyolefin blends, *Polym. Eng. Sci.*, 33(3): 166.
- Phadke, A.A., Bhattacharya, A.K., Chakraborty, S.K. 1983. Studies of vulcanization of reclaimed rubber, *Rubber Chem. Technol.*, 56: 726.
- Pittolo, M. and Burford, R. P. 1985. Recycled rubber crumb as a toughener of polystyrene, *Rubber Chem. Technol.*, 58: 97.
- Rajalingam, P. and Sharpe, J. 1993. Ground rubber tire/ thermoplastic composites: effect of different ground rubber tires, *Rubber Chem. Technol.*, 66: 664.
- Scott, J.R. 1994. *Transaction of Institute of Rubber Industry*, 20: 53.
- Warner, W.C. 1994. Method of devulcanization, *Rubber Chem. Technol.*, 67: 559.

## จำนวนโครโมโซมของพืชมีดอกบางชนิด

ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์<sup>1</sup> สายใจ จรเอียด<sup>2</sup> จุฑารัตน์ จันทรัสชัย<sup>3</sup> รุ่งอรุณ วรทิกกร<sup>4</sup> และ  
คะนิงนิตย์ ผลพฤกษา<sup>5</sup>

### Abstract

Eksomtramage, L., Jornead, S., Junsui, C., Varitikorn, R. and Pholphrugsa, K.  
**Chromosome numbers of some flowering plants**  
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 707-716

Somatic chromosome numbers in the root tips of 22 species in 8 genera of Amaryllidaceae, Anthericaceae, Asphodelaceae, Convallariaceae, Palmae and Poaceae were examined. All showed a wide range of chromosome numbers between  $2n = 14$  to  $72$ . The species of *Brachiaria decumbens* ( $2n = 48$ ) and *Pennisetum purpureum* (two varieties,  $2n = 26, 22$ ) are different in chromosome numbers from earlier reports. The chromosome numbers of *Aloe juvenna* ( $2n = 28$ ), *A. prinslooii* ( $2n = 14$ ) and *Brachiaria ruziziensis* ( $2n = 18$ ) have not previously been reported.

**Key words :** chromosome numbers, flowering plants

Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

<sup>1</sup>วท.ม. (พฤกษศาสตร์) รองศาสตราจารย์ <sup>2</sup>กศ.บ. (ชีววิทยา) <sup>3,4,5</sup>วท.บ. (ชีววิทยา) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย  
สงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail : eladda@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 23 พฤษภาคม 2545

รับลงพิมพ์ 26 มิถุนายน 2545

## บทคัดย่อ

ลัดดา เอกสมตราเมษฐ์ สายใจ จรเอียด จุฑารัตน์ จันทร์สุย รุ่งอรุณ วรวิจิตร และ  
คะนิงนิตย์ ผลพุกษา

จำนวนโครโมโซมของพืชมีดอกบางชนิด

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(4) : 707-716

ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากของพืชมีดอก จำนวน 22 ชนิด 8 สกุล ในวงศ์ Amaryllidaceae ,  
Anthericaceae, Asphodelaceae, Convallariaceae, Palmae และ Poaceae พบว่ามีจำนวนโครโมโซมระหว่าง  $2n =$   
14-72 โดย *Brachiaria decumbens* ( $2n = 48$ ) และ *Pennisetum purpureum* (2 สายพันธุ์ ,  $2n = 26, 22$ ) มี  
จำนวนโครโมโซมแตกต่างจากผู้ศึกษามาก่อน และ *Aloe juvenna* ( $2n = 28$ ) *A. prinslooii* ( $2n = 14$ ) *Brachiaria*  
*ruziziensis* ( $2n = 18$ ) ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

โดยทั่วไปสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีจำนวนและรูปร่าง  
โครโมโซมคงที่ เนื่องจากความแตกต่างของโครโมโซม  
ทำให้เกิดลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphology) ของสิ่งมี  
ชีวิตแตกต่างกัน ดังนั้นข้อมูลโครโมโซมจึงมีความสำคัญ  
ทางด้านอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ด้านปรับปรุงพันธุ์  
รวมทั้งการศึกษาสายสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด  
(Stebbins, 1971) การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมส่วนใหญ่  
ศึกษากับพืชในต่างประเทศ ส่วนในประเทศไทยซึ่งพบพืช  
มีดอกมากถึง 248 วงศ์ 8,657 ชนิด (จำลอง, 2532) แต่มี  
ผู้ศึกษาโครโมโซมไม่มากนักมีประมาณ 21 วงศ์ และใน  
แต่ละวงศ์ศึกษาเพียงบางชนิด ได้แก่ Larsen (1963 ;  
1969), กันยารัตน์ (2532), ลัดดาและกัญญา (2538),  
Eksomtramage et al. (1996 ; 2001), Soontornchai-  
nakseng & Chaiyasut (1996 ; 1999) และ สาวิตรีและ  
ลัดดา (2541) ในการศึกษาครั้งนี้ นับจำนวนโครโมโซม  
พืชทั้งที่เป็นสมุนไพร พืชที่นิยมปลูกเป็นไม้ประดับรวมทั้ง  
พืชมหัศจรรย์อาหารสัตว์ จำนวน 6 วงศ์ 8 สกุล 22 ชนิด เพื่อ  
นำข้อมูลมาช่วยสนับสนุนการจัดจำแนกและด้านปรับปรุง  
พันธุ์ รวมทั้งบันทึกใน Chromosome Atlas ของพืชที่  
พบในประเทศไทยต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

## 1. พืช :

ตัวอย่างพืชที่ศึกษาทั้งหมดเก็บรวบรวมจากที่พบ  
ในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และนำมาปลูกที่เรือน

เพาะชำของภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยปลูกในดินร่วนผสม  
ทราย อัตราส่วน 2:1 เพื่อให้รากที่งอกใหม่เจริญได้ดี และ  
มีความสะดวกในการเก็บราก พืชตัวอย่างแห้งและดอง  
ของพืชที่ศึกษาครั้งนี้เก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืช มหาวิทยาลัย  
สงขลานครินทร์

2. การเตรียมเซลล์ระยะเมทาเฟส จากเซลล์ปลายรากด้วย  
วิธี Feulgen squash (ดัดแปลงจาก Sharma and  
Sharma, 1980) :

เลือกปลายรากที่มีลักษณะขาวใสปลายชุ่นเล็กน้อย  
ตัดรากยาวประมาณ 1-2 ซม. ใส่ในสารละลายอิมมัว  
 $\alpha$ -Bromonaphthalene เก็บที่อุณหภูมิ  $10^{\circ}\text{C}$  นาน 24  
ชั่วโมง หลังจากนั้นตรึงรากในน้ำยาฟิกเซทีฟ (fixative)  
ที่ประกอบด้วย ethyl alcohol 95% กับ glacial acetic  
acid ในอัตราส่วน 3 : 1 เก็บที่อุณหภูมิ  $10^{\circ}\text{C}$  นาน  
24 ชั่วโมง ล้างรากด้วย ethyl alcohol 95% จำนวน 1-  
2 ครั้ง และเก็บรากไว้ใน ethyl alcohol 70% เมื่อต้องการ  
ศึกษาโครโมโซม ให้นำรากมาไฮโดรไลซิส (hydrolysis)  
ในกรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  นาน  
4-7 นาที ขึ้นกับชนิดพืช หลังจากนั้นล้างรากด้วยน้ำและ  
ย้อมสีรากด้วย Carbol fuchsin นาน 3-6 ชั่วโมง ตัด  
เฉพาะปลายรากที่ติดสีม่วงเข้มวางบนสไลด์ ปิดด้วยแผ่น  
แก้วปิด ใช้ปลายดินสอเคาะบนแผ่นแก้วปิดเพื่อให้เซลล์  
กระจายออกจากกัน เลือกเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในระยะ  
เมทาเฟสที่มีโครโมโซมกระจายดี และนับจำนวนโครโมโซม

อย่างน้อย 10 เซลล์ แล้วนำเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายดี มาถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายภาพที่เลนส์ ใกล้เคียงกำลังขยาย 40 และ 100 เท่า

#### ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการนับจำนวนโครโมโซมในระยะเมทาเฟสจาก เซลล์ปลายราก (somatic number,  $2n$ ) ของพืชจำนวน 6 วงศ์ 8 สกุล 22 ชนิด พบว่ามีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่  $2n = 14 - 72$  ดัง Table 1 และ Figures 1 - 27

จำนวนโครโมโซมที่ศึกษา มีทั้งดิพลอยด์ (diploid) และ พอลิพลอยด์ (polyploid) การเกิดพอลิพลอยด์มีความสำคัญกับการเกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ในพืชสกุล *Agropyron* พบว่า แต่ละชนิดมีจำนวนโครโมโซมเป็นทวีคูณของ 7 คือ  $2n = 14, 28, 42, 56$  และ 70 นอกจากนี้พืชสกุลเดียวกันอาจมีจำนวนโครโมโซมใน 1 ชุดที่ไม่ซ้ำกัน (basic number,  $x$ ) ได้หลายค่า เช่น *Crepis* มี  $x = 3, 4, 5$  และ 6 (Stebbins, 1971)

**Amarylilidaceae :** ศึกษา 2 สกุล 4 ชนิด คือ *Haemanthus multiflorus*,  $2n = 18$  ซึ่งตรงกับการศึกษาพืชนี้แถบอาฟริกาใต้ และเนื่องจากพืชสกุลนี้มีค่า  $x = 9$  (Darlington & Wylie, 1955) จึงอาจเป็นไปได้ว่า พืชนี้เป็นพืชดิพลอยด์ ( $2n = 2x = 18$ ) และ *Hippeastrum* 3 ชนิด พบว่าทั้งหมดมีจำนวน  $2n = 22$  ซึ่งตรงกับการศึกษาของ ดวงเดือน (2544) รายงานว่า *Hippeastrum* ชนิดดอกสีขาว มีจำนวน  $2n = 22$  เช่นกัน และพืชสกุลนี้ ในต่างประเทศพบว่าส่วนใหญ่ มี  $2n = 22$  ( $x = 11$ ) และ พบบ้างที่มี  $2n = 33$  และ 44 (Darlington & Wylie, 1955) แสดงว่าพืชสกุลนี้มีทั้งดิพลอยด์และพอลิพลอยด์ แต่ชนิดที่ศึกษาครั้งนี้พบเฉพาะดิพลอยด์

**Anthericaceae :** ศึกษา 1 สกุล 2 ชนิด 4 สายพันธุ์ คือ *Chlorophytum bichettii* 2 สายพันธุ์  $2n = 16$  และ *C. comosum* 2 สายพันธุ์,  $2n = 28$  ซึ่งตรงกับการศึกษาในพืชสกุลนี้พบว่ามีค่า  $2n = 14, 16, 28$  และ 32 ( $x = 7, 8$ ) (Darlington & Wylie, 1955 ; Soontorn-chainaksaeng & Chaiyasut, 1996 ; Goldblatt & Johnson, 1991 ; 1994) จากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าพืช ที่มี  $2n = 16$  เป็นดิพลอยด์ ( $2n = 2x = 16$ ) ส่วน  $2n =$

28 อาจเป็นพอลิพลอยด์ชนิดเทตระพลอยด์ (tetraploid,  $2n = 4x = 28$ )

**Asphodelaceae :** ศึกษา 1 สกุล 9 ชนิดคือสกุล *Aloe* พบว่า 8 ชนิดมีจำนวนโครโมโซม  $2n = 14$  และ 1 ชนิดมี  $2n = 28$  ซึ่งตรงกับการศึกษาในพืช *Aloe* พบว่าส่วนใหญ่มีจำนวน  $2n = 14$  และพบบ้างที่มี  $2n = 28$  และ 42 ( $x = 7$ ) (Darlington & Wylie, 1955 ; Goldblatt, 1985 ; Goldblatt & Johnson, 1991 ; 1994 ; 1996) จากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าพืช  $2n = 14$  จัดเป็นดิพลอยด์ ส่วน *A. juvenna* มี  $2n = 28$  น่าจะเป็นพอลิพลอยด์ ( $2n = 4x = 28$ ) และเป็นการรายงานครั้งแรก เมื่อสังเกตลักษณะภายนอกของพืช พบว่า *A. juvenna* มีลักษณะภายนอกแตกต่างจาก *Aloe* ทั้ง 8 ชนิด คือ มีลำต้นทอดนอน (procumbent) เจริญยืดยาวเป็นทรงสูง ขณะที่พืชทั้ง 8 ชนิด มีลำต้นตั้งตรง ทรงกระจุยเตี้ย

**Convallariaceae :** ศึกษา 1 สกุล 2 ชนิด 5 สายพันธุ์ คือ *Ophiopogon jaburan* 3 สายพันธุ์ มีค่า  $2n = 36$  และ *O. japonicus* 2 สายพันธุ์ มีค่า  $2n = 72$  ซึ่งตรงกับการรายงานของ Darlington & Wylie (1955), Goldblatt (1988) และ Goldblatt & Johnson (1994) คือ *O. jaburan* มี  $2n = 36$  และ *O. japonicus* มี  $2n = 72$  นอกจากนี้ Larsen (1963) ศึกษาพืชสกุลนี้ในประเทศไทยจำนวน 3 ชนิด แต่เป็นคนละชนิดกับการศึกษาครั้งนี้พบว่าทั้งหมดมี  $2n = 36$  ( $x = 18$ ) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า *O. jaburan* เป็นดิพลอยด์ และ *O. japonicus* เป็นเทตระพลอยด์

**Palmae (Arecaceae) :** ศึกษา 1 ชนิด 3 แบบ (type) คือ แบบดुरา (Dura) เทเนอร่า (Tenera) และพิสิเฟอร่า (Pisifera) พบว่าทั้งสามแบบมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 32 แท่ง ซึ่งตรงกับการศึกษาปาล์มน้ำมันแบบ เทเนอร่าจากต่างประเทศ มีค่า  $2n = 32$  ( $x = 16$ ) (Madon et al., 1998) ปาล์มน้ำมันที่ศึกษาครั้งนี้จัดเป็นพืชดิพลอยด์

**Poaceae :** ศึกษา 2 สกุล 4 ชนิด คือ *Brachiaria decumbens*, *B. mutica* และ *B. ruziziensis* มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 48, 36$  และ 18 ตามลำดับ ส่วน *Pennisetum purpureum* 2 สายพันธุ์มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 26$  และ 22

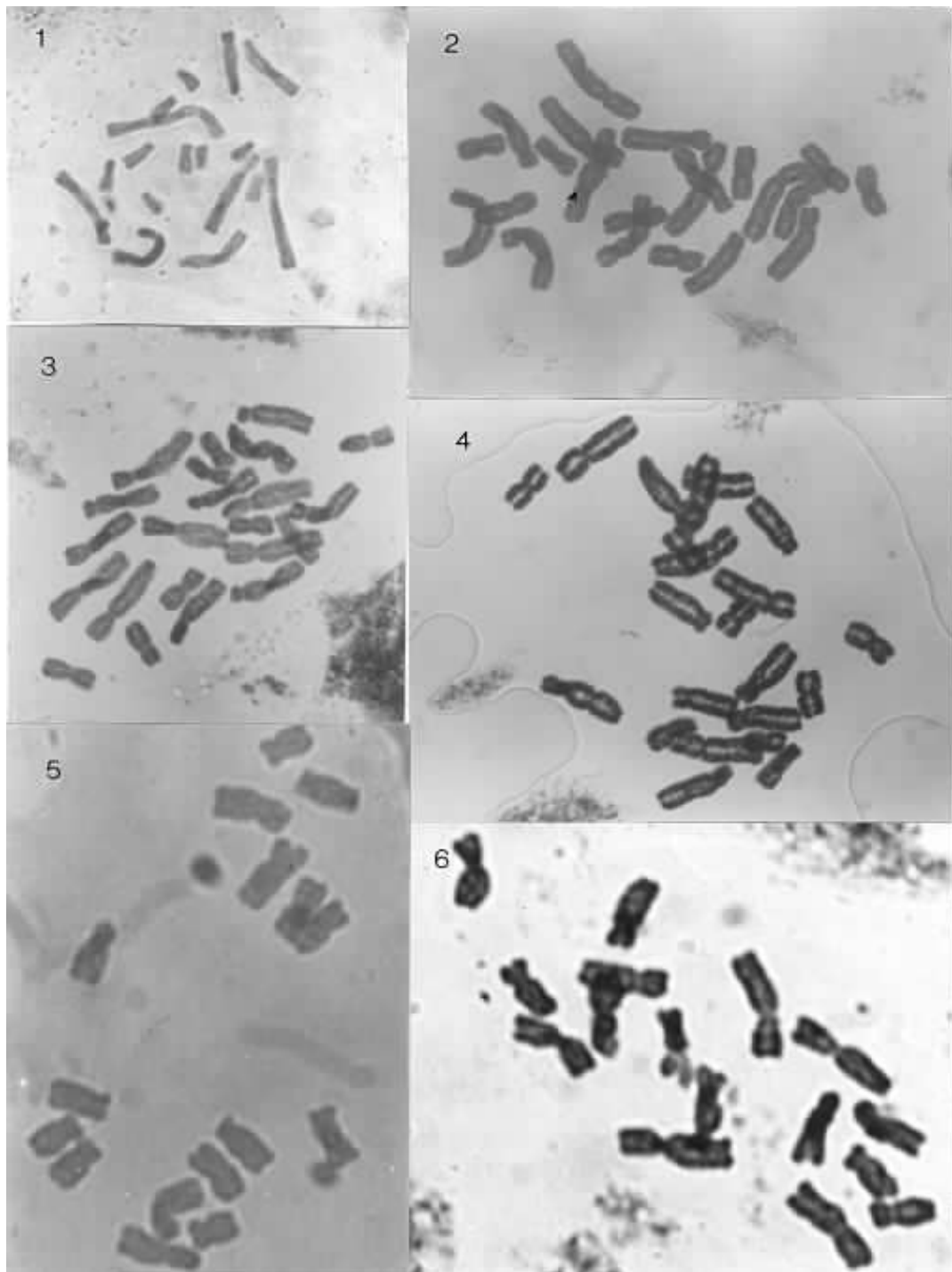
จำนวนโครโมโซมของสกุล *Brachiaria* มีจำนวน

Table 1. Chromosome numbers (2n) in 22 species from 8 genera of 6 families.

| Family and Species                                                 | Thai name              | 2n   |
|--------------------------------------------------------------------|------------------------|------|
| <b>Amaryllidaceae</b>                                              |                        |      |
| <i>Haemanthus multiflorus</i> (Tratt.) Martyn                      | ว่านแสงอาทิตย์         | 18   |
| <i>Hippeastrum puniceum</i> (Lam.) Urban                           | ว่านสีทศดอกสีส้ม       | 22   |
| <i>Hippeastrum reticulatum striatifolium</i> Herb.                 | ว่านรางเงิน            | 22   |
| <i>Hippeastrum</i> sp.                                             | ว่านสีทศดอกสีแดง       | 22   |
| <b>Anthericaceae</b>                                               |                        |      |
| <i>Chlorophytum bichettii</i> (Karrer) Becker cv. St. Bernard Lily | เศรษฐีเรือนนอก         | 16   |
| <i>C. bichettii</i> (Karrer) Becker                                | เศรษฐีเรือนเขียว       | 16   |
| <i>C. comosum</i> (Thunb.) Jacques cv. Spider plant                | เศรษฐีเรือนใน          | 28   |
| <i>C. comosum</i> (Thunb.) Jacques cv. Milky way                   | เศรษฐีเรือนในไล่เหลือง | 28   |
| <b>Asphodelaceae</b>                                               |                        |      |
| <i>Aloe aristata</i> Roem & Schult.                                | -                      | 14   |
| <i>A. brevifolia</i> Mill.                                         | -                      | 14   |
| <i>A. juvenna</i> Brandham & S. Carter                             | -                      | 28*  |
| <i>A. prinslooii</i> Verdoorr & Hardy                              | -                      | 14*  |
| <i>A. vera</i> (L.) Burm. f.                                       | ว่านหางจระเข้          | 14   |
| <i>Aloe</i> sp.1                                                   | บัวแก้ว                | 14   |
| <i>Aloe</i> sp.2                                                   | มัลลาลาย               | 14   |
| <i>Aloe</i> sp.3                                                   | -                      | 14   |
| <i>Aloe</i> sp.4                                                   | -                      | 14   |
| <b>Convallariaceae</b>                                             |                        |      |
| <i>Ophiopogon jaburan</i> (Kunth) Lodd.cv. White Lily Turf         | เศรษฐีเรือนแก้ว        | 36   |
| <i>O. jaburan</i> (Kunth) Lodd. cv. Variegatus                     | เศรษฐีเซ่งฮอน          | 36   |
| <i>O. jaburan</i> (Kunth) Lodd.                                    | เศรษฐีทอดทรัพย์        | 36   |
| <i>O. japonicus</i> L.f. cv. Snake's Bread                         | เศรษฐีญี่ปุ่น          | 72   |
| <i>O. japonicus</i> L.f. cv. Kyoto Dwarf                           | หนวดปลาตกกระ           | 72   |
| <b>Palmae (Arecaceae)</b>                                          |                        |      |
| <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.                                     | ปาล์มน้ำมัน            |      |
| Tenera type                                                        |                        | 32   |
| Dura type                                                          |                        | 32   |
| Pisifera type                                                      |                        | 32   |
| <b>Poaceae (Gramineae)</b>                                         |                        |      |
| <i>Brachiaria decumbens</i> Stapf                                  | หญ้าขี้ฉား             | 48** |
| <i>B. mutica</i> (Forssk.) Stapf                                   | หญ้าขน                 | 36   |
| <i>B. ruziziensis</i> Germain & Everard                            | หญ้ารูซี่              | 18*  |
| <i>Pennisetum purpureum</i> Schumach.                              | หญ้าเนเปียร์ธรรมดา     | 26** |
| <i>P. purpureum</i> Schumach. cv. Mott                             | หญ้าเนเปียร์แคระ       | 22** |

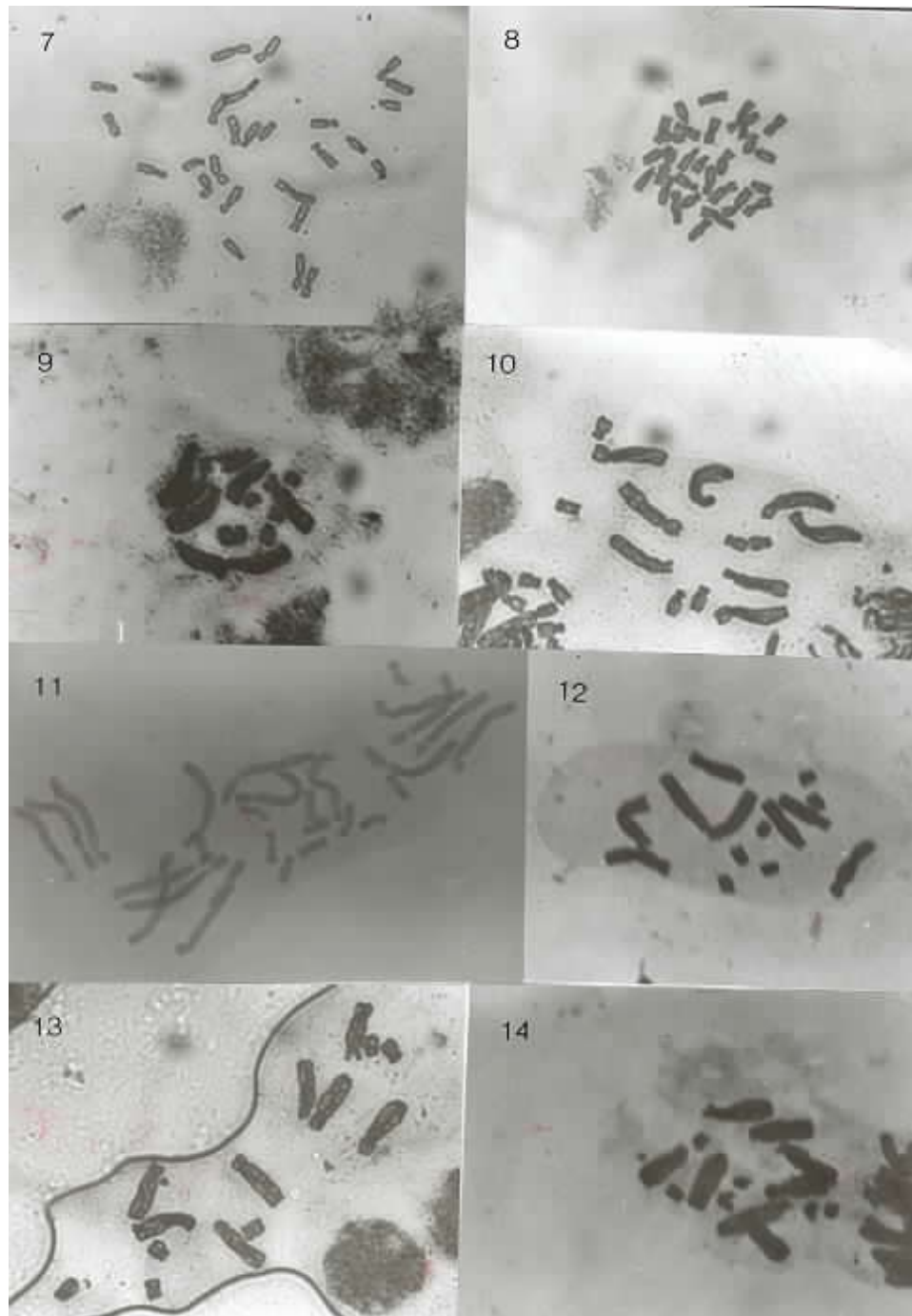
\* new record \*\* different from previous reports





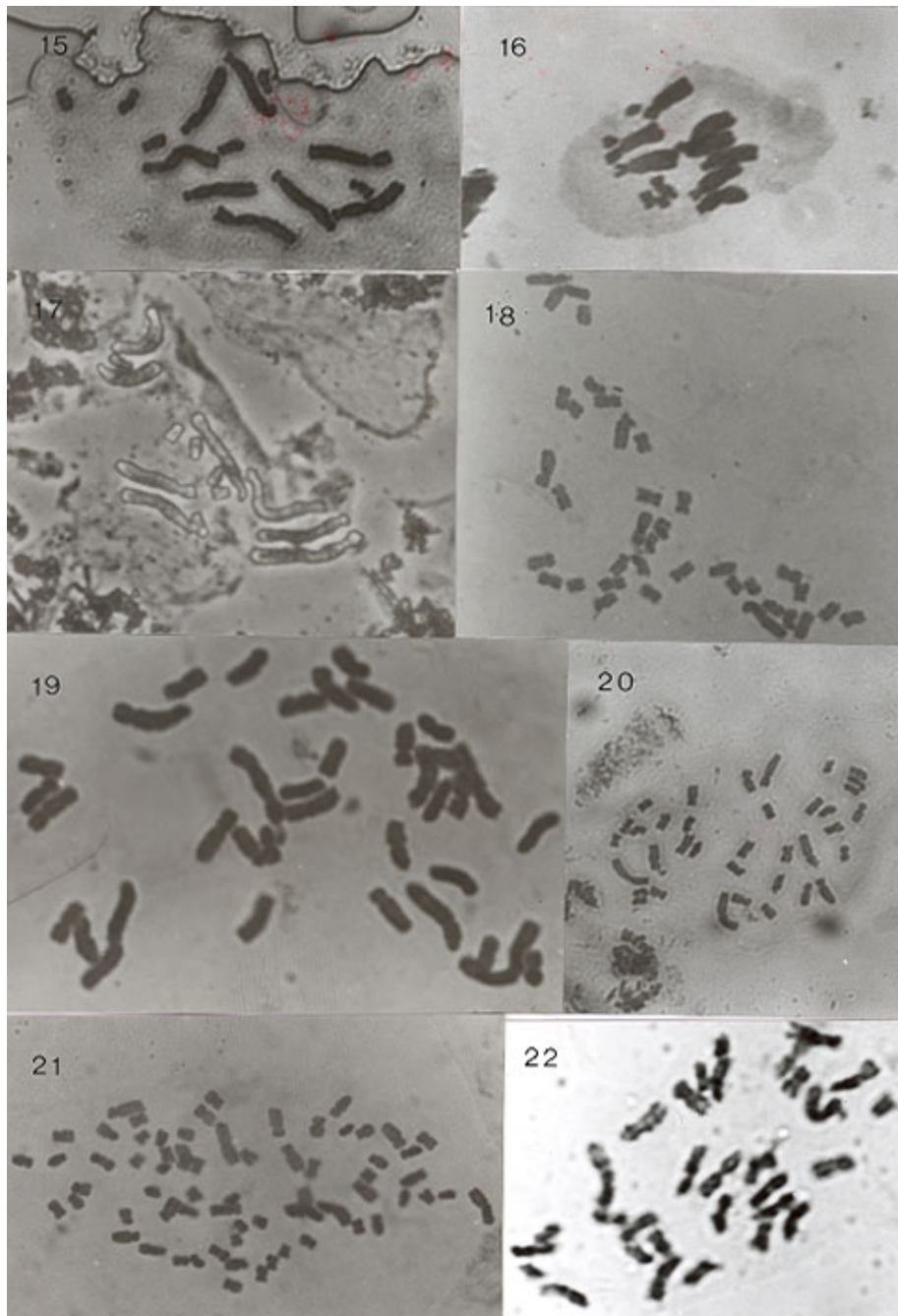
**Figure 1-6. Mitotic chromosomes from root tips.**

- |                                                                             |                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 1. <i>Haemanthus multiflorus</i> , $2n = 18$ (700x)                         | 2. <i>Hippeastrum puniceum</i> , $2n = 22$ (900x) |
| 3. <i>H. reticulatum striatifolium</i> , $2n = 22$ (900x)                   | 4. <i>H. sp.</i> , $2n = 22$ (900x)               |
| 5. <i>Chlorophytum bichettii</i> cv. St. Bernard 's Lily, $2n = 16$ (1800x) | 6. <i>C. bichettii</i> , $2n = 16$ (1800x)        |



**Figure 7-14. Mitotic chromosomes from root tips.**

- |                                                                   |                                                      |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 7. <i>Chlorophytum comosum</i> cv. Spider plant, $2n = 28$ (700x) | 8. <i>C. comosum</i> cv. Milky way, $2n = 28$ (700x) |
| 9. <i>Aloe aristata</i> , $2n = 14$ (700x)                        | 10. <i>A. brevifolia</i> , $2n = 14$ (700x)          |
| 11. <i>A. juvenna</i> , $2n = 28$ (700x)                          | 12. <i>A. prinslooii</i> , $2n = 14$ (700x)          |
| 13. <i>A. vera</i> , $2n = 14$ (700x)                             | 14. <i>A. sp. 1</i> , $2n = 14$ (700x)               |



**Figure 15-22. Mitotic chromosomes from root tips.**

15. *Aloe* sp. 2,  $2n = 14$  (700x)

17. *A.* sp. 4,  $2n = 14$  (700x)

19. *O. jaburan* cv. Variegatus,  $2n = 36$  (1800x)

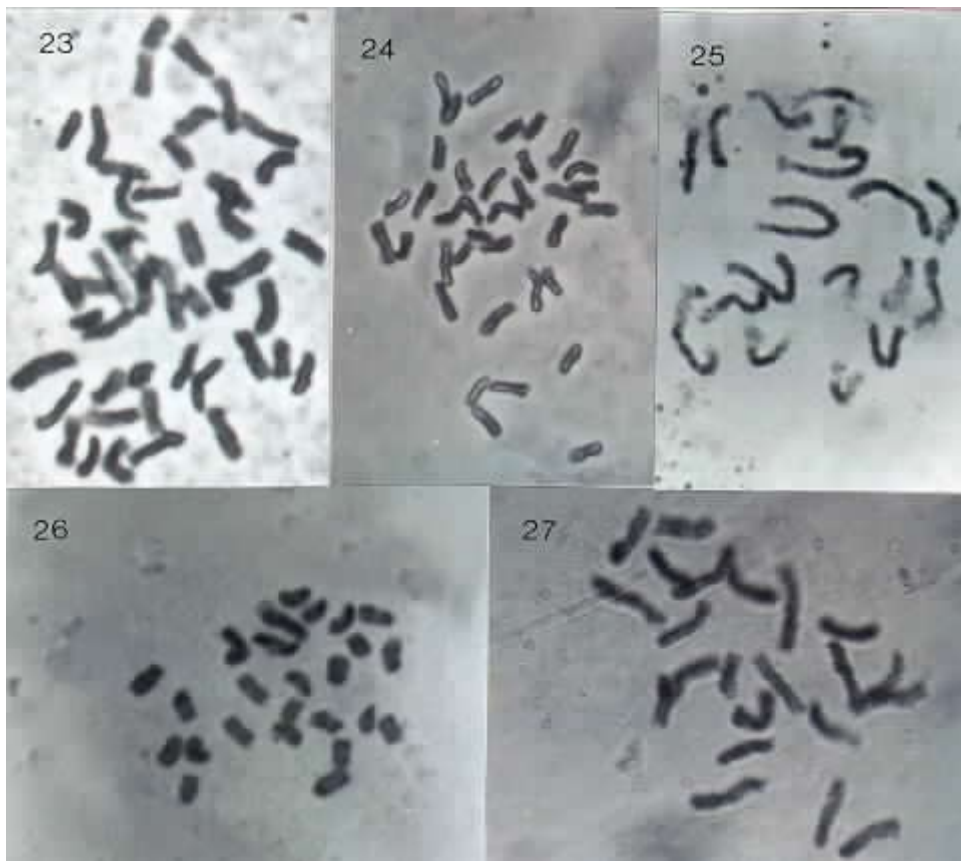
21. *O. japonicus* cv. Snake's Bread,  $2n = 72$  (1250x)

16. *A.* sp. 3,  $2n = 14$  (700x)

18. *Ophiopogon jaburan* cv. White Lily Turf,  
 $2n = 36$  (1250x)

20. *O. jaburan*,  $2n = 36$  (700x)

22. *Elaeis guineensis* Tenera type,  $2n = 32$  (1800x)



**Figure 23-27. Mitotic chromosomes from root tips.**

23. *Brachiaria decumbens*,  $2n = 48$  (1200x)

25. *B. ruziziensis*,  $2n=18$  (1200x)

27. *P. purpureum* cv. Mott,  $2n = 22$  (1200x)

24. *B. mutica*,  $2n = 36$  (1200x)

26. *Pennisetum purpureum*,  $2n = 26$  (1200x)

แตกต่างกัน ซึ่ง Larsen (1963) ได้ศึกษาพืชสกุลนี้แต่ต่างชนิดกันในประเทศไทย คือ *B. milliformis* ( $2n = 54-56$ ) กับ *B. subquadrifera* ( $2n=72$ ) และ Darlington & Wylie (1955) รายงานว่าพืชสกุลนี้มีค่า  $2n = 14, 18, 28, 36, 42$  และ  $54$  โดยมี  $x = 7$  และ  $9$  แสดงว่าพืชสกุลนี้แต่ละชนิดอาจมีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์หรือพอลิพลอยด์ สำหรับ *B. decumbens* ( $2n = 48$ ) ในการศึกษาครั้งนี้ มีจำนวนโครโมโซมไม่ตรงกับการศึกษาของ Zerpa (1952 อ้างโดย Darlington & Wylie, 1955) ซึ่งศึกษาพืชนี้แถบเขตร้อนของอเมริกา พบว่ามี  $2n = 36$  การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากปลูกต่างสถานที่กัน ซึ่งตรงกับ Larsen (1963) รายงานว่าพืชวงศ์นี้ของไทยชนิด

*Panicum notatum* เก็บจากที่ราบภูกระดึงมี  $2n = 36$  ขณะที่เก็บจากดอยสุเทพบริเวณที่ลาดเอียงมี  $2n = 82-84$  จากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่า *B. ruziziensis* เป็นดิพลอยด์ ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ส่วน *B. decumbens* และ *B. mutica* อาจจะเป็นพอลิพลอยด์

สกุล *Pennisetum purpureum* 2 สายพันธุ์มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากันคือ  $2n = 26$  และ  $22$  ซึ่งตรงกับการศึกษาของพืชวงศ์นี้ในไทย สกุล *Ischaemum* 2 สายพันธุ์ พบว่ามีค่า  $2n = 36$  และ  $54$  (Larsen, 1963) และ Darlington & Wylie (1955) รายงานพืชชนิดนี้ที่ศึกษาแถบเขตร้อนของแอฟริกา พบว่ามีค่า  $2n = 27, 28$  และ  $56$  เนื่องจากพืชสกุลนี้มีค่า  $x = 5, 7, 9$  (Rao

et al., 1993) จึงอาจเป็นไปได้ว่าพืชที่ศึกษาครั้งนี้ จำนวน  $2n = 26$  อาจเกิดมาจากพืชเริ่มต้นทริพลอยด์ (triploid)  $2n = 3x = 27$  ( $x = 9$ ) เมื่อพืชนี้สร้างเซลล์สืบพันธุ์จะมีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ จึงทำให้ลูกที่เกิดขึ้นมีจำนวนได้หลายค่า ตั้งแต่  $2n = 18-36$  หรือ อาจเกิดจากเริ่มต้นพืช  $n = x = 7$  ในธรรมชาติมีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 2 เท่า (doubling) แต่ผลที่เกิดขึ้นอาจได้  $n = 13, 14$  หรือ  $15$  (Stebbins, 1971) จึงทำให้ได้ลูก  $2n = 26$  กรณีสายพันธุ์ที่มี  $2n = 22$  ก็เช่นกันอาจเกิดจากสาเหตุดังกล่าว หรืออาจเกิดจาก  $2n = 3x = 21$  ( $x = 7$ ) และเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมเกิดขึ้น จึงทำให้ได้ลูก  $2n = 22$  แต่ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาต่อไป เกี่ยวกับการเข้าสู่ของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสหนึ่งของไมโอซิส โดยสังเกตจำนวนไบวาเลนต์ (bivalent) ไตรวาเลนต์ (trivalent) และ ยูนิวาเลนต์ (univalent) เป็นต้น เพื่อจะช่วยให้ยืนยันความถูกต้อง

### สรุปผลการทดลอง

ศึกษาจำนวนโครโมโซมระยะเมทาเฟสจากเซลล์ปลายรากของพืชมีดอก จำนวน 6 วงศ์ 8 สกุล 22 ชนิด คือ วงศ์ Amaryllidaceae ศึกษา 2 สกุล พบว่า *Haemanthus multiflorus* มี  $2n = 18$  และ *Hippeastrum* 3 ชนิด คือ *H. puniceum*, *H. reticulatum striatifolium* และ *Hippeastrum* sp. มี  $2n = 22$  ซึ่งทั้งหมดจัดเป็นดิพลอยด์วงศ์ Anthericaceae ศึกษา 1 สกุล คือ *Chlorophytum* 2 ชนิด มีทั้งดิพลอยด์และพอลิพลอยด์ คือ *C. bichettii* มีจำนวน  $2n = 16$  และ *C. comosum* มี  $2n = 28$  วงศ์ Asphodelaceae ศึกษา 1 สกุล 9 ชนิด พบว่า *Aloe* 8 ชนิดเป็นดิพลอยด์ ( $2n = 14$ ) และ หนึ่งชนิดเป็นพอลิพลอยด์ ( $2n = 28$ ) วงศ์ Convallariaceae ศึกษา 1 สกุล 2 ชนิด คือ *Ophiopogon jaburan* มี  $2n = 36$  และ *O. japonicus* มี  $2n = 72$  พืชสกุลนี้มีทั้งดิพลอยด์และพอลิพลอยด์ วงศ์ Palmae (Arecaceae) ศึกษาเฉพาะ *Elaeis guineensis* มี  $2n = 32$  ซึ่งเป็นดิพลอยด์ และวงศ์ Poaceae ศึกษา 2 สกุล คือ *Brachiaria* 3 ชนิด คือ *B. decumbens*, *B. mutica* และ *B. ruziziensis* มีค่า  $2n = 48, 36$  และ  $18$  ตามลำดับ มีทั้งดิพลอยด์และ

พอลิพลอยด์ และ *Pennisetum purpureum* 2 สายพันธุ์ มีค่า  $2n = 26$  และ  $22$  จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวนโครโมโซมของ *Brachiaria decumbens* ( $2n = 48$ ) และ *Pennisetum purpureum* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ( $2n = 26, 22$ ) แตกต่างจากผู้ศึกษามาก่อน และ *Aloe juvenna* ( $2n = 28$ ), *A. prinslooii* ( $2n = 14$ ) และ *Brachiaria ruziziensis* ( $2n = 18$ ) เป็นการรายงานครั้งแรก

### เอกสารอ้างอิง

- กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานพืชสกุล *Zephyranthes*. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จำลอง เฟื่องคล้าย. 2532. พืชใบเลี้ยงคู่ในประเทศไทย. ใน : ความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย. การสัมมนาชีววิทยา ครั้งที่ 7 โรงแรมเชียงใหม่ภูคำ เชียงใหม่ 16-17 ตุลาคม 2532 หน้า 117-122.
- เต็ม สมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม). บริษัทประชาชนจำกัด กรุงเทพมหานคร.
- ดวงเดือน สุวรรณจินดา. 2544. คาริโอไทป์และแถบซีในว่านสีทศดอกสีขาว. โครงการทางชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์ และ กัญญา บุญธรรม. 2538. การนับจำนวนโครโมโซมพืชวงศ์ขิง. ว. สงขลานครินทร์ 17(3) : 291-297.
- วิทย์ เทียงบุญธรรม. 2530. พจนานุกรมไม้ดอกไม้ประดับในเมืองไทย. โอ.เอส.พรินต์ติ้งเฮาส์. กรุงเทพฯ.
- สาวตรี เขมวงศ์ และ ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2541. จำนวนโครโมโซมของพืชสกุล *Heliconia*. ว. สงขลานครินทร์ 20(4) : 489-495.
- Becker, C.A. 1968. Flora of Java, Vol. III. The Auspices of the Rijksherbarium, Leyden.
- Darlington, C.D. and Wylie, A.P. 1955. Chromosome Atlas of Flowering Plants. Ruskin House Museum Street, London.
- Eksomtrame, L., Sirirugsa, P. and Mayakul, S. 1996. Chromosome numbers of some Thai Zingiberaceae. Songklanakarin. J. Sci. Technol., 18(2) : 153-159.
- Eksomtrame, L., Sirirugsa, P., Sawangchote, P., Jornead, S., Saknimit, T. and Leeratiwong, C. 2001. Chromosome numbers of some monocot species from Ton-Nga-Chang wildlife Sanctuary, Southern Thailand. Thai For. Bull. (Bot.), 29 : 63-71.

- Fau, P. 2000. [www.desert-tropical.com/plants/Asphodelaceae/Aloe](http://www.desert-tropical.com/plants/Asphodelaceae/Aloe).
- Goldblatt, P. 1985. Index to plant chromosome numbers 1982-1983. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden No. 13.
- Goldblatt, P. 1988. Index to plant chromosome numbers 1984-1985. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden No. 23.
- Goldblatt, P. and Johnsons, D.E. 1991. Index to plant chromosome numbers 1988-1989. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden No. 40.
- Goldblatt, P. and Johnson, D.E. 1994. Index to plant chromosome numbers 1990-1991. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden No. 51.
- Goldblatt, P. and Johnson, D.E. 1996. Index to plant chromosome numbers 1992-1993. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden No. 58.
- Larsen, K. 1963. Studies in the Flora of Thailand 14. Dansk Botanisk Forening, Copenhagen.
- Larsen, K. 1969. Cytology of Vascular Plants III. A study of Thai Aroids. Studies in the Flora of Thailand 54.
- Madon, M., Clyde, M.M. and Chean, S.C. 1998. Cytological analysis of *Elaeis guineensis* and *E. oleifera* chromosome. Abstract Journal of Oil Palm Research (formerly known as *Elaies*) vol. 10 No. 1 : <http://www.mpob.gov.my/home-page96/pubela.html>.
- Rao, Y.S., Rao, S.A. and Mengesha, M.H. 1993. Pachytene analysis in the genus *Pennisetum*. Cytologia 58 :155-160.
- Sharma, A.K. and Sharma, A. 1980. Chromosome Techniques ; Theory and Practice ; Third edition, Butterworth & Co.Ltd., London.
- Soontornchainaksaeng, P. and Chaiyasut, K. 1996. Cytogenetic study of some Thai species of flowering plants. Thai For. Bull. (Bot.) 24 : 50-61.
- Soontornchainaksaeng, P. and Chaiyasut, K. 1999. Cytogenetic investigation of some Euphorbiaceae in Thailand. Cytologia 64 : 229-234.
- Stebbins, G.L. 1971. Chromosome Evolution in Higher Plants. Edward Arnold (Publ.) Ltd., London.

## **5-aminolevulinic acid from photosynthetic bacteria and its applications**

**Amornrat Tangprasittipap<sup>1</sup> and Poonsuk Prasertsan<sup>2</sup>**

### **Abstract**

Tangprasittipap, A. and Prasertsan, P.

**5-aminolevulinic acid from photosynthetic bacteria and its applications**

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 717-725

This paper gives an overview on ALA production by photosynthetic bacteria concerning biosynthesis and regulation as well as its application as herbicide, insecticide and growth stimulator. Recent medical applications in the field of photodynamic therapy, cancer treatment, tumor diagnosis and other clinical uses are described.

---

**Key words :** 5-aminolevulinic acid, photosynthetic bacteria, ALA production, application

---

<sup>1</sup>Ph.D. Student in Biotechnology, <sup>2</sup>Ph.D. (Biotechnology), Assoc. Prof., Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

Corresponding e-mail : ppoonsuk@ratree.psu.ac.th

Received, 28 February 2002

Accepted, 5 June 2002

5-Aminolevulinic acid (ALA) or 5-amino-4-oxo-pentanoic acid, is an aliphatic precursor of tetrapyrrole biosynthesis present in all living cells. ALA is the natural photodynamic compound effective as a biodegradable herbicide and insecticide harmless for crops, humans and animals (Sasikala *et al.*, 1994) as well as having promotive effect on the growth and photosynthesis of crops and vegetables (Sasaki *et al.*, 1993). Further applications of ALA are now in the area of medicine and pharmacy products (Levy, 1995).

Commercial ALA is produced by chemical synthesis, which involves many complex reactions

and causes of high expenditure. Biological production of ALA by algae, anoxygenic photosynthetic bacteria and chemotrophic bacteria (Table 1) is an alternative approach as it is a less expensive method than chemical synthesis. Anoxygenic phototrophic bacteria (APB) can accumulate and excrete high concentration of ALA into the medium, hence it is suitable for commercial exploitation (Sasikala *et al.*, 1994) and it now commercially produces from *Rhodobacter sphaeroides*.

This paper gives an overview on the biosynthesis and regulation of ALA by photosynthe-

**Table 1. Production of ALA by different groups of microorganisms**

| Microorganisms                              | Carbon and nitrogen source                          | LA | ALA (μM) | References                    |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----|----------|-------------------------------|
| <b>Phototrophs</b>                          |                                                     |    |          |                               |
| <b>Algae</b>                                |                                                     |    |          |                               |
| <i>Agmemnillum quadruplicatum</i>           | Glutamate                                           | +  | 0.225    | Kipe-Nolt and Steven, 1980    |
| <i>Cyanidium caldarium</i>                  | Glutamate                                           | +  | 0.483    | Jugenson <i>et al.</i> , 1976 |
| <b>Bacteria, oxygenic phototrophic</b>      |                                                     |    |          |                               |
| <i>Anacystis nidulans</i>                   | Glutamate                                           | +  | 0.38     | Anderson <i>et al.</i> , 1983 |
| <i>Anabaena variabilis</i>                  | Glutamate                                           | +  | 0.019    | Avisser <i>et al.</i> , 1983  |
| <b>Bacteria, anoxygenic phototrophic</b>    |                                                     |    |          |                               |
| <i>Rhodobacter. sphaeroides</i>             | Succinate and glycine                               | +  | 0.75     | Anderson <i>et al.</i> , 1983 |
| <i>R. sphaeroides</i>                       | Succinate and glycine                               | +  | 2-4      | Sasaki <i>et al.</i> , 1991   |
| <i>R. sphaeroides</i>                       | Succinate and glycine                               | +  | 160.0    | Ishii <i>et al.</i> , 1990    |
| <i>R. sphaeroides</i>                       | Swine waste (VFA)                                   | +  | 4200     | Sasaki <i>et al.</i> , 1990   |
| <i>R. sphaeroides</i>                       | Mandarin orange peel (modern synthetic waste water) | +  | 16000    | Sasaki <i>et al.</i> , 1993   |
| <i>R. sphaeroides</i>                       | Sewage sludge                                       | +  | 9300     | Tanaka <i>et al.</i> , 1983   |
| <i>Chlorobium limicola</i>                  | Glutamate                                           | +  | 3,950    | Anderson <i>et al.</i> , 1983 |
| <b>Chemotrophic bacteria</b>                |                                                     |    |          |                               |
| <b>Aerobes</b>                              |                                                     |    |          |                               |
| <i>Pseudomonas riboflavina</i>              | L-alanine                                           | +  | 0.2      | Rhee <i>et al.</i> , 1987     |
| <i>Propionibacterium shermanii</i>          | Succinate and glycine                               | +  | 0.04     | Menon and Shemin, 1967        |
| <b>Anaerobes</b>                            |                                                     |    |          |                               |
| <i>Clostridium thermoaceticum</i>           | Glucose and L-lysine                                | +  | 155.0    | Sjoji <i>et al.</i> , 1989    |
| <i>Methanosarcina barkeri</i>               | Methanol, 2-oxoglutarate                            | +  | 0.4      | Lin <i>et al.</i> , 1989      |
| <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> | H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>                    | +  | 0.2      | Lin <i>et al.</i> , 1989      |

VFA : Volatile Fatty Acid ; LA : Levulinic acid ; + : Addition

Source : Sasikala *et al.*, 1994



tic bacteria as well as its application as herbicide, insecticide and growth stimulator and in the medical fields.

### Biosynthesis of ALA

The biosynthesis of ALA can be formed via two distinct metabolic pathways (Figure 1).

#### 1. C<sub>4</sub> pathway (Shermin pathway)

Shermin pathway is observed in mammalian cell, yeast, fungi and very common among the purple non-sulfur photosynthetic group and a few chemotrophs (Sasaki *et al.*, 1990). The key enzyme involved in the C<sub>4</sub> pathway of ALA formation is ALA synthetase (EC 2.3.1.37) catalyzing the condensation of succinyl-CoA and glycine. The ALA synthetase activity was highest from cells harvested at the logarithmic phase of growth (Sato *et al.*, 1985).

The culture conditions have high influence on the synthesis of ALA synthetase and changing the culture condition from aerobic to micro-aerobic increased the ALA synthetase activity by 2-4 fold (Sandy *et al.*, 1985). On the other hand, the enzyme synthesis in light was repressed by oxygen and the effect could be overcome upon the restoration of anaerobic condition (Viale *et al.*, 1983).

#### 2. C<sub>5</sub> pathway

The C<sub>5</sub> pathway is present in higher plants, algae and several bacteria, (Kajiwar *et al.*, 1994), indicating the purple and green sulfur bacteria (Sasikala and Ramana, 1995). In C<sub>5</sub> pathway, ALA is formed from glutamate or the  $\alpha$ -ketoglutarate via a path that does not involve the ALA synthetase reaction. The purification of the C<sub>5</sub> pathway enzyme indicates that glutamate is reduced to ALA in three steps (Sasikala *et al.*, 1994).

- a) Ligation of t-RNA to glutamate catalyzed by glutamyl-t-RNA synthetase
- b) Reduction of glutamyl-t-RNA to generate glutamate-1-semialdehyde (GSA) catalyzed by glutamyl-t-RNA reductase (EC 6.1.1.17)
- c) Transamination of GSA to generate ALA catalyzed by GSA aminotrans-

ferase (GSA-AT, EC 5.4.3.8)

Two catalytic mechanisms (Figure 2) have been proposed for the GSA conversion to ALA (Grimm *et al.*, 1991). ALA is formed by accepting and releasing amino group at position 5 and 4 of GSA, respectively (Figure 2a) or two molecules of GSA oriented head to tail formation to amino-hemiacetal dimer, which converted into a double Schiff base and rearranged into the amino-hemiacetal (exchange amino groups) and subsequently dissociate into two molecules of ALA (Figure 2b) (Sasikala *et al.*, 1994).

### Regulation of 5-aminolevulinic acid production in photosynthetic bacteria

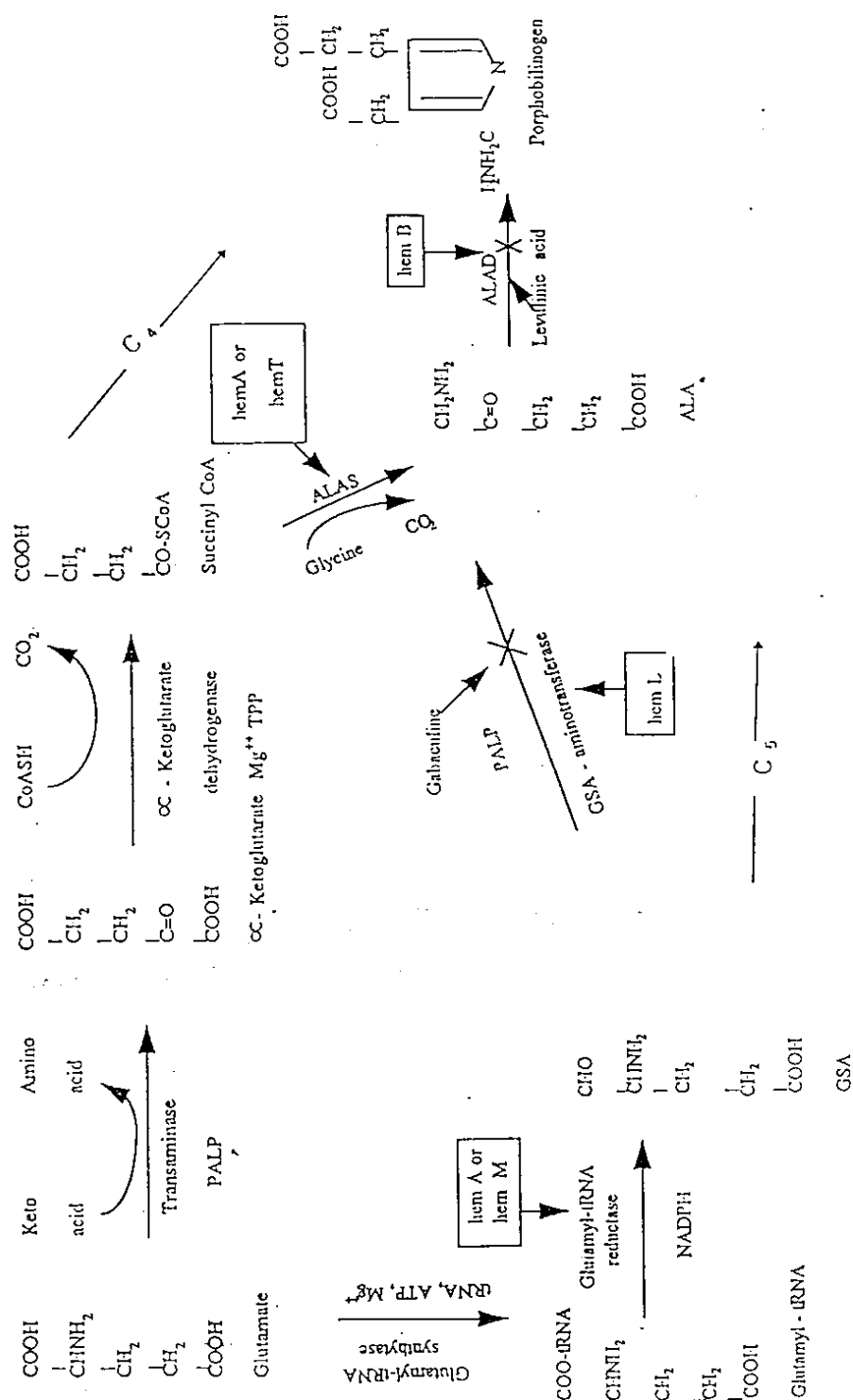
#### 1. Carbon and nitrogen sources

Although glutamate is the carbon and nitrogen source for ALA production by many microorganisms, ALA production can also be produced with other carbon sources (Sasikala *et al.*, 1994). Glucose had the advantage of being an inexpensive source for the industrial production of ALA. In the batch fermentation of mutant strain of *R. sphaeroides* CR606 accumulated ALA to level of 20 mM after 18 h with the production rate was 1.1 mMh<sup>-1</sup> and the yield coefficient for ALA was 40% (mol/mol) of glucose (Nishikawa *et al.*, 1999).

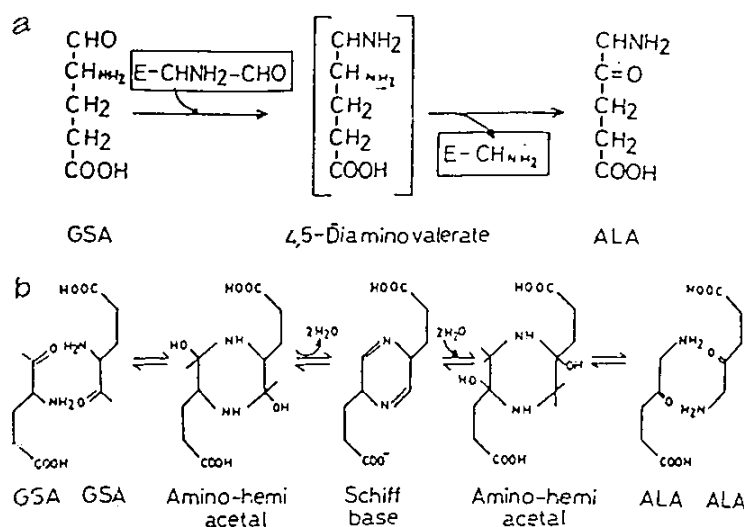
*R. sphaeroides* can utilize volatile fatty acid (VFA) such as acetic, propionic and butyric acid as carbon and energy sources (Sasaki *et al.*, 1987). In addition, VFAs produced from the anaerobic digestion liquor of sewage sludge was reported to be the carbon source for production of ALA, up to 9.2 mM, by *R. sphaeroides* with repeated addition of the glycine and glutamic acid as the organic nitrogen source (Tanaka *et al.*, 1994). The effluent of anaerobic mandarin orange peel (Tinpi) supplemented with glycine could be used to produce 5-aminolevulinic acid from *R. sphaeroides* (Sasaki *et al.*, 1993).

#### 2. Precursors

The addition of precursors (succinate and glycine) in the range of 20-60 mM into the digestion liquor medium resulted in the positive effect to ALA production of *R. sphaeroides* IFO



**Figure 1. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid (ALA) via C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub> pathway**  
**PALA : pyridoxyl phosphate ; TPP : thiamine pyrophosphate ; ALAS : ALA synthetase ; ALAD: ALA dehydratase ;**  
**GSA : glutamate 1-semialdehyde**  
**Source : Sasikala *et al.*, 1994**



**Figure 2. Mechanism of the conversion of glutamate 1-semialdehyde to ALA**

Source : Grimm *et al.*, 1991

12203, but above 80 mM of precursors resulted in a negative effect on ALA formation. The supply of succinate is sufficient but the glycine supply might limit ALA formation in this culture system (Sasaki *et al.*, 1990). ALA synthetase and ALA dehydratase activities in the cells are not influenced by the simultaneous addition of precursors compared with these activities in the control (no addition of precursor) but the growth is excessively suppressed by the addition of glycine (Sasaki *et al.*, 1991).

The growth and ALA production of *Chlorella* sp. strain 4S is enhanced by glutamate addition, whereas the addition of succinate and glycine suppresses both (Sasaki *et al.*, 1995). However, the addition of glutamate to the heterotrophic medium culture of *Chlorella regularis* YA-603 does not enhance ALA production and Sherrin pathway is suggested to contribute to ALA production of this strain (Ano *et al.*, 1999).

### 3. Levulinic acid

Levulinic acid (LA), analog of ALA, is an inhibitor of ALA dehydratase which enhances extracellular ALA formation (Sasaki *et al.*, 1987). In photoheterotrophic culture of *R. sphaeroides*, repeated addition of LA results in moderate cell growth suppression while extracellular ALA is

not produced during the cultivation without the addition of LA. The amount of LA should be as small as possible since LA is expensive compared with glycine and 30 mM LA are recommended for use to save cost (Sasaki *et al.*, 1990). At LA concentration over 50 mM, growth ceased completely and ALA was not excreted (Sasaki *et al.*, 1987).

### 4. Metal ions

Metal ions particularly  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  are important elements for regulating tetrapyrrole biosynthesis in *R. sphaeroides*. ALA synthetase is regulated by heme compound as feedback inhibition or repression under iron-sufficient conditions. Therefore, ALA production medium should contain neither cobalt nor iron to enhance ALA accumulation (Sasikala *et al.*, 1994).

### 5. Light intensity

Light intensity is an important factor for enhancing ALA formation. Growth of photosynthetic bacteria is found to be independent of light intensity (1-5 klux), while the amount of ALA is reached the maximum value at 3 klux. High illumination (over 5 klux) was not effective for ALA production and low illumination (below 1 klux) produced quite a low growth rate and virtually no formation of ALA (Sasaki *et al.*,

1987).

## 6. Aeration

Oxygenation is one of the important factors affecting ALA synthetase activity in the loss of pigmentation due to the decrease in the ALA synthetase activator, cysteine trisulfide and glutathione trisulfide (Sandy *et al.*, 1985). Changing the culture conditions from aerobic to micro-aerobic increased the activity of ALAS by 2-4 folds. The biosynthesis of ALA synthetase under light condition was repressed by oxygen and the effect could be overcome upon the restoration of anaerobic conditions (Viale *et al.*, 1983).

## 7. pH

The effect of pH (6.0-8.0) of the VFAs culture medium is studied on ALA production by *R. sphaeroides*. At neutral pH (6.8 and 7.0) extracellular ALA production is up to 16 mM. Under controlled pH  $6.8 \pm 1$ , intracellular ALA synthetase activity is significantly enhanced after adding LA, while ALA dehydratase is inhibited to low level. At higher pH (8.0) ALA synthetase activity was low and ALA dehydratase is relatively high (Sasaki *et al.*, 1993). The inhibitory effect of LA for ALA dehydratase activity of *R. sphaeroides* is strongly dependent on the pH value of the GM medium. At pH 5.5, 5 mM LA inhibited 85% of ALA dehydratase activity (*in vitro*), while 100 mM LA decreased 45% of ALA dehydratase activity at pH 7.5 (Sasaki *et al.*, 1997).

## 8. Others factors

Biotin was needed for ALA synthetase activity in the formation of ALA which is the intermediate of bacteriochlorophyll synthesis. Thiamine is the substrate of the coenzyme thiamine pyrophosphate which converts  $\alpha$ -oxoglutarate to the C<sub>4</sub>-intermediate of Shemin pathway (Lascelles, 1956).

Low molecular weight sulfur compounds of cysteine or glutamine, cysteine trisulfide (CySSSCy), glutathione trisulfide (GSSSG), glutathione and cysteine trisulfide (GSSSCy) and trisulfanedisulfonate ( $S_5O_6^{2-}$ ) regulated the activity of ALA synthetase *in vivo*. Poly (sulfane) disulfonate ( $-O_3S-Sn-SO_3^-$ ) and R-Sn-R' (R and R' are organic or inorganic group) with  $n > 3$  are

exhibited as the activators of ALA synthetase. LA requires the presence of an exogenous thio, such as 2-mercaptoethanol or dithioerythritol to maintain catalytic activity while nitrite in the growth medium inhibited ALA production (Sasikala *et al.*, 1994).

## Application of 5-aminolevulinic acid

5-aminolevulinic acid converts molecular oxygen into singlet oxygen when excited by the absorption of light. ALA is potentially useful in agriculture as a herbicide and can be used as an antimicrobial drug. The important reason is that it is nontoxic to mammals, is readily biodegradable, and has no adverse effects on the environment (Tanaka *et al.*, 1992). ALA can also be applied as photodynamic therapy for malignant skin tissue tumors.

### 1. Herbicide

ALA has photodynamic herbicide properties under appropriate treatment conditions. An immediate dark-incubation period after spraying ALA is an essential step to accumulate tetrapyrrole within the plants. ALA serves as a building block of tetrapyrrole accumulation, while a group of modulators, *O*-phenanthroline, ethyl nicotinate and 2,2'-depyridyl (DP), have affected to the pattern of tetrapyrrole accumulation and act in concert with ALA. DP is a cheap chemical then it is selected to mix with ALA to enhance the accumulation of tetrapyrrole. During the daylight period, the excess tetrapyrrole produces active oxygen (singlet oxygen) which oxidizes the unsaturated fatty acid on the cell surface (lipoprotein component), thus setting in motion a greatly damaging free-radical chain reaction. The cell membranes become leaky and this in turn results in a rapid and severe dehydration, bleaching and collapse of the leaf and/or hypocotyl tissue (Rebriz *et al.*, 1984). Within 24 h the green plant tissue turns into a brownish desiccated mass of dead tissue (Rebriz *et al.*, 1990). On the other hand, treated plants kept for the same period of time in darkness were unaffected.

The accumulation of tetrapyrrole in plant leaves causes very severe photodynamic

damage and the leave die within a few of hours while the cotyledons, stem and growing point remain unaffected. Dicotyledonous weeds such as redroot pigweed, purslane and lambquarter are highly susceptible to the tetrapyrrole induced photodynamic damage. Monocots such as core, wheat, oats and barley were not adversely affected by the spray (Rebriz *et al.*, 1984). The death of plants depended on the ages of plant, ALA concentration, type of modulators, ratio of ALA and modulator, light intensity and kinds of plant treated (Kobayashi and Haque, 1971).

## 2. Insecticide

Rebriz and his co-worker (1988) developed a novel porphyrin insecticide consisting of modulator of porphyrin, 3.0 mM of ALA plus 30 mM of DP at pH 3.5. When this solution was sprayed on the larvae of *Trichoplusia ni* (Hubner insects) ALA induced the massive accumulation of protoporphyrin IX causing death in darkness via an unknown mechanism and in the light probably via singlet oxygen formation. Besides the advantages of ALA being nontoxic to non-target organisms, such as other crops, animals and human, it is also difficult for insects to develop resistance against ALA.

## 3. Growth stimulator

Besides having herbicidal property, ALA is a very good growth simulator when used at low concentrations (Sasikala and Ramana, 1995). ALA has promotive effect on the growth and yield of several crops and vegetables, enhancing photosynthesis, stimulating fixation of CO<sub>2</sub> in light. The ALA also suppresses the respiration and the release of CO<sub>2</sub> under dark (Hotta *et al.*, 1997). The appropriate applications of ALA showed 10-60% promotive effect over the control on radish, kidney beans, barley, potatoes, garlic, rice and corn (Sasikala *et al.*, 1994). In addition, the culture medium from ALA production by *R. sphaeroides* could be directly used as a fertilizer having herbicide activity (Sasaki *et al.*, 1990).

## 4. Photodynamic therapy

Photodynamic therapy (PDT) involves the use of photosensitizers (light-sensitive

molecules) that are activated by light caused the formation of active forms of oxygen which is resulted in the killing of cell in which the photosensitizers are present, while sparing the normal surrounding tissue (Levy, 1995).

Kennedy *et al* (1990) proposed the use of tropically ALA based PDT for selected cutaneous disease. The cosmetic results of ALA-PDT treatment are very good and with a minimal effect on the normal skin (Sveanberg *et al.*, 1994). Promising clinical results have been obtained in photosensitizing superficial skin tumors. In contrast, non-superficial and tumors of morpheaform histologic pattern have shown minor response rates only (Martin *et al.*, 1995, Szeimies *et al.*, 1994).

## References

- Anderson, T., Briseid, T., Nesbakken, T., Ormerod, J., Sirevaag, R. and Thorud, M. 1983. Mechanism of synthesis of 5-aminolevulinic acid in purple, green and blue-green bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 19 : 303-306.
- Ano, A., Watanabe, K., Tanake, T., Hotta, Y. and Nagai, S. 1999. Effect of glycine on 5-aminolevulinic acid biosynthesis in heterotrophic culture of *Chlorella regularis* YA-603. J. Ferment. Bioeng. 88 : 57-60.
- Avissar, Y.J. 1980. Biosynthesis of 5-aminolevulinate from glutamate in *Anabaena variabilis*. Biochem. Biophys. Acta. 613 : 220-228.
- Grimm, B., Bull, A. and Breu, V. 1991. Structural genes of glutamate 1-semialdehyde aminotransferase for porphyrin synthesis in cyanobacterium and *Escherichia coli*. Mol. Genet. 225 : 1-10.
- Hotta, Y., Tanaka, T., Takaoka, H., Takeuchi, Y. and Konnai, M. 1997. New physiological effect of 5-aminolevulinic acid in plants : the increase of photosynthesis chlorophyll and plant growth. Biosci. Biotech. Biochem. 61 : 2025-2028.
- Ishii, K., Hiraishi, A., Arai, T. and Kitamura, H. 1990. Light dependent porphyrin production by suspended and immobilized cells of *Rhodospirillum rubrum*. J. Ferment. Bioeng. 60 : 26-32.

- Kajiwaru, M., Mizutani, M., Matauda, R., Hara, K. and Kojima, I. 1994. A new biosynthetic pathway of porphyrin from isopropanol. *J. Ferment. Bioeng.* 77 : 626-629.
- Kennedy, J.C., Pottier, R.H. and Pross, D.C. 1990. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX : basic principles and present clinical experience. *J. Photochem. Photobiol. B.* 6 : 143-148.
- Kipe-Holt, J.A. and Stevens S.E. 1980. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid from glutamate in *Agmenellum quadruplicatum*. *Plant. Physiol.* 65 : 126-128.
- Kobayashi, M. and Haque, M.Z. 1971. Contribution of nitrogen fixation and soil fertility by photosynthetic bacteria. *Plant. Soil.* 443-456.
- Lascelles, J. 1956. The synthesis of porphyrins and bacteriochlorophyll by cell suspension of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochem. J.* 62 : 79-93.
- Levy, J.G. 1995. Photodynamic therapy. *TIBTECH.* 13 : 14-17.
- Lin, D., Nishio, H. and Nagai, S. 1989. Production of 5-aminolevulinic acid by methanogen. *J. Ferment. Bioeng.* 68 : 88-91.
- Martin, A., Tope, W.D., Greveling, J.M., Starr, J.C., Fewkes, J.L., Hotte, T.J. Deutsch, T.F. and Andersson, R.R. 1995. Lack of selectivity of protoporphyrin IX fluorescence for basal cell carcinoma after topical application of 5-aminolevulinic acid: implication for photodynamic treatment. *Arch. Dermatol. Res.* 287 : 665-674.
- Menon, I.A. and Shemin, D.J. 1967. Concurrent decrease of enzyme activities concerned with the synthesis of co-enzyme B12 and of propionic acid in *Propionibacteria*. *Arch. Biochem. Biophys.* 121 : 304-310.
- Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T., Miyashir, N. and Murock, Y. 1999. *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark condition. *J. Biosci. Bioeng.* 87 : 798-804.
- Rebriz, C.A., Montazer-Zouhour, A., Hoppen, H. and Wu, S.M. 1984. Photodynamic herbicides I : Concept and phenomenology. *Enzyme. Microbiol. Technol.* 6 : 390-401.
- Rebriz, C.A., Jucick, J.A. and Rebriz, C.C. 1988. Porphyrin insecticide 1. Concept and phenomenology. *Pestic. Biochem. Physist.* 30 : 11-27.
- Rebriz, C.A., Reddy, K.N., Navdihall, V.B. and Velo, J. 1990. Tetrapyrrole-dependent photodynamic herbicides. *Photochem. Photobiol.* 52 : 1099-1117.
- Rhee, H.I., Murata, K. and Kimura, A., 1987. Formulation of the herbicide 5-aminolevulinic acid from L-alanine and 4,5 dioxovalerate by *Pseudomonas riboflavin*. *Agric. Biol. Chem.* 51 : 1701-1702.
- Sandy, J.D., Davies, R.C. and Neuberger, A. 1985. Control of 5-aminolevulinic synthetase activity in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. A role of trisulphides. *Biochem. J.* 150 : 245-257.
- Sasaki, K., Ikeda, S., Nishizawa, Y. and Hayashi, M. 1987. Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *J. Ferment. Technol.* 65 : 511-515.
- Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y. and Hayashi, Y. 1990. Production of herbicide, 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent of swine wastes from an anaerobic digester. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 : 727-731.
- Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y. and Hayashi, M. 1991. Enhanced production of 5-aminolevulinic acid by repeated addition of levulinic acid and supplement of precursors in photoheterotrophic culture of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Ferment. Bioeng.* 71 : 403-406.
- Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y. and Nagai, S. 1993. Effect of pH on the extracellular production of 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* from volatile fatty acid. *Biotechnol. Lett.* 15 : 859-864.
- Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., Hotta, Y. and Nagai, S. 1995. 5-Aminolevulinic acid production by *Chlorella* sp. during heterotrophic cultivation in the dark. *World. J. Microbial. Biotechnol.* 11 : 361-362.
- Sasaki, K., Watanabe, M. and Nishio, N. 1997. Inhibition of 5-aminolevulinic acid (ALA) dehydratase by undissociated levulinic acid during ALA extracellular formation by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotech. Lett.* 19 : 421-424.

- Sasikala, Ch., Ramana, Ch.V. and Rao, P.R. 1994. 5-Aminolevulinic acid : A potential herbicide/insecticide from microorganism. *Biotechnol. Prog.* 10 : 451-459.
- Sasikala, Ch. and Ramana, Ch.V. 1995. Biotechnological potential of anoxygenic phototrophic bacteria II. biopolyester, biopesticide, biofuel and biofertilizer. New York : Academic Press.
- Sato, K. Ishida, K., Mutsushika, O. and Shimizu, S. 1985. Purification and some properties of  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase from *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Agri. Biol. Chem.* 49 : 3415-3421.
- Shoji, K.A., Nishio, N. and Nagai, S. 1989. Production of extracellular 5-aminolevulinic acid by *Clostridium thermoaceticum* grown in minimal medium. *Biotech. Lett.* 11 : 567-572.
- Sveanberg, K., Andersson, T., Killander, D., Wang, I., Stenrum, U., Andersson-Engles, S., Berg, R., Johansson, J. and Svanberg, S. 1994. Photodynamic therapy of non-melanoma malignant tumours of the skin using topical  $\delta$ -aminolevulinic acid sensitization and laser irradiation. *Br. J. Dermatol.* 130 : 743-751.
- Szeimies, R., Sassay, T. and Lanthaler, M. 1994. Penetration potency of topical applied  $\delta$ -aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. *Photochem. Photobiol.* 59 : 73-76.
- Tanaka, T., Takahashi, K., Hotta, T., Takeuchi, Y. and Konnai, M. 1992. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on yield of several crops. *Proc. 19<sup>th</sup> Annual Meeting of Plant Growth Regulator Society of America*, San Francisco, USA. 1992 : 237-241.
- Tanaka, T., Watanabe, B., Watanabe, K., Nishikawa, S. and Hotta, Y. 1993. Cultivation method of bacteria and manufacture of tetrapyrrole by the method. *Jpn. Kokai Tokko Koho JP 05224937*.
- Tanaka, T., Sasaki, K., Noparatnaraporn, N. and Nishio, N. 1994. Utilization of volatile fatty acids from the anaerobic digestion liquor of sewage sludge for 5-aminolevulinic acid production by photosynthetic bacteria. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 10 : 667-680.
- Viale, A.A., Wider, E.A. and Battle, A.M.C. 1983. Some properties of the 5-aminolevulinic acid synthetase from *Rhodospseudomonas pulustris*. *Rev. Argent. Microbiol.* 15 : 233-238.





## **Yogurt: The fermented milk**

**Nathanon Trachoo**

Yogurt has been known to mankind for over 6,000 years. The word “yogurt” is possibly derived from the Turkish word “jugurt” which first appeared in the 8<sup>th</sup> century (Rasic and Kurmann, 1978) but today various names are used to refer to yogurt or similar products. These names include Dahi or Dahee in India, Roba in Iraq, and Fiili in Finland (Tamime and Deeth, 1980; Tamime and Robinson, 1985) and several others. It is likely that yogurt originated in the Middle East where there was a limited availability of milk due to the desert environment. Ancient Turks who lived as nomads possibly introduced yogurt to village people as a preserved milk product (Akin and Rice, 1994; Rasic and Kurmann, 1978; Tamime and Robinson, 1985). Popularity of yogurt is greatly attributed to Professor Elie Metchnikoff of the Pasteur Institute in Paris, who shared the Nobel Prize in Physiology and Medicine in 1908 and authored the book, “The Prolongation of Life” in which he

advocated the health benefits of yogurt.

Yogurt was first introduced to the U.S. in the early 20<sup>th</sup> century and gained significant consumer popularity during the 1960's and 1970's. Sales in the U.S. increased from 141 million kg in 1974 to 616 million kg in 1995 (Anon, 1996). Yogurt has now become a popular subject for researchers nationwide as it has been claimed to be a healthy food.

During the past decade, full fat yogurt consumption has declined due to changes in dietary habits of consumers, in particular, reduction in milkfat consumption. Many modifications in yogurt manufacturing have therefore been developed to reduce milkfat content in yogurt resulting in the availability of nonfat and lowfat yogurt.

### **Definition of yogurt**

According to the Code of Federal Regulations of the FDA (FDA, 1996c), yogurt is defined

---

Ph.D. (Food Science and Technology), Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Mahasarakham 44000 Thailand.

Corresponding e-mail: [nathanon.t@msu.ac.th](mailto:nathanon.t@msu.ac.th)

Received, 15 February 2002

Accepted, 25 June 2002

as the “food produced by culturing one or more of the optional dairy ingredients (cream, milk, partially skimmed milk, and skim milk) with a characterizing bacteria culture that contains the lactic acid-producing bacteria, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*”. Other descriptions are included as follows. “To increase the nonfat solids content of the food, other optional ingredients (concentrated skim milk, nonfat dry milk, buttermilk, whey, lactose, lactalbumins, lactoglobulins and modified whey) may also be added and shall be included in the culturing process. Yogurt, before the addition of bulky flavors, contains not less than 3.25% milkfat and not less than 8.25% milk solids not fat, and has a titratable acidity of not less than 0.9%, expressed as lactic acid. Yogurt may be heat treated after fermenting to destroy viable microorganisms for a longer shelf life of the food”.

Lowfat yogurt and nonfat yogurt are similar in description to yogurt but contain 0.5 to 2% and less than 0.5% milkfat, respectively (FDA, 1996a; FDA, 1996b).

In many other countries, regulatory agents follow the definition of yogurt defined by Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). The FAO/WHO Codex Alimentarius Commission defines yogurt as “a coagulated milk product obtained by lactic acid fermentation through the action of *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *St. thermophilus* from milk (pasteurized or concentrated milk) with or without additions (milk powder, skim milk powder, etc.). The microorganisms in the final product must be viable and abundant” (Mareschi and Cuff, 1989; Rasic, 1987).

### Manufacture of yogurt

Although, yogurt was accidentally discovered in ancient times through natural processes, yogurt manufacturing procedures are now highly developed. Before yogurt bacteria were discovered, no one knew what caused milk to coagulate. Yogurt was traditionally made from boiled milk inoculated with yogurt from the previous day. In-

oculated milk was kept overnight at room temperature (Tamime and Deeth, 1980; Tamime and Robinson, 1985). Since the first commercial production of yogurt by Danone in Spain in 1922, yogurt manufacturing has expanded dramatically and quality has improved. Some guidelines for yogurt manufacturing have been described by Norling (1979) and White (1995).

**Raw materials.** Yogurt was traditionally made from milk with no added ingredients. To improve yogurt texture, milk or skim milk was fortified with other materials such as nonfat dry milk (NDM), whey protein concentrate (WPC) and some other dairy or plant-based ingredients. Milk from at least nine different species is used commercially; cow, mare, ass, goat, buffalo, yak, ewe, reindeer and camel (Kehagias and Dalles, 1984; Kroger *et al.*, 1989; Rasic and Kurmann, 1978; Tamime and Robinson, 1985). These milks differ in composition from each other, which considerably affects yogurt qualities. For example, yogurt made from milk of ewe, buffalo, yak or reindeer is high in fat (6.5 to 11.0%) and has better consistency than that made from milk of cow, goat and ass (1.4 to 4.0% fat) (Rasic and Kurmann, 1978).

Preparation of yogurt mix often involves addition to milk of milk powder, sweet buttermilk powder (BMP), whey powder, WPC, casein powder or plant protein, and concentration by evaporation, reverse osmosis or ultrafiltration (Broome *et al.*, 1982; Bundgaard *et al.*, 1972; Chapman *et al.*, 1974; Jepsen, 1979; Kolar *et al.*, 1979; Mistry and Hassan, 1992; Norling, 1979; Tamime and Deeth, 1980; Tamime and Robinson, 1985; White, 1995). The addition of 3 to 4% of NDM to yogurt mix is common to increase total solids (TS) for lowfat, nonfat and low calorie yogurt (Morris and Ghaleb, 1995; Tamime *et al.*, 1994). Researchers (Harwalkar and Kalab, 1986) found that yogurt with a higher TS content was less susceptible to syneresis and had shorter casein particle chains. Modler *et al.* (1983) compared the physical and sensory properties of yogurt fortified with casein-based proteins (sodium caseinate, ultrafiltered milk and NDM) and whey proteins concentrated

by three different methods (ultrafiltration, ion exchange and electrodialysis/lactose crystallization) to increase protein content by 0.5 and 1.0% in yogurt mixes. It was found that yogurts with added casein-based proteins had a coarser texture than those with added WPC. To increase gel strength and reduce syneresis of yogurt, sodium caseinate was the most effective supplement. However, they did not recommend the use of WPC as a replacement for starch and hydrocolloids because of excessive syneresis (Modler and Kalab, 1983; Modler *et al.*, 1983).

Nonfat and lowfat yogurt can also be made from plant-based ingredients such as soybean milk. However, such yogurt has a beany flavor and produces flatulence. Soybean yogurt mix with added NDM, evaporated milk or whey-based ingredients can reduce beany flavor and flatulence due to improved fermentation by yogurt cultures (Buono *et al.*, 1990; Granata and Morr, 1996; Karleskind *et al.*, 1991). Sufficient yogurt flavor intensity cannot be obtained in soy milk-based yogurt (Lee *et al.*, 1990). To increase amounts of nutrients such as vitamin A, C and dietary fiber, Collins *et al.* (1991) used milk with added sweet potato as raw material for yogurt production. This yogurt received a mean score of 7.7 out of 10 for flavor. Soy protein isolates have also been investigated to replace NDM in yogurt manufacturing to improve viscosity and reduce syneresis (Kolar *et al.*, 1979).

A scientist in Cornell University's Food Science and Technology Department (Kosikowski, 1979) used diluted ultrafiltered skim milk for low-lactose yogurt production. The yogurt flavor was flat, thus BMP and/or sodium citrate were added to improve lactic acid fermentation. Becker and Puhan (1989) reported that using ultrafiltered milk in yogurt manufacturing could increase the nutritional value of yogurt because of higher protein, calcium and phosphorus content in the product.

**Homogenization.** Homogenization breaks down fat into smaller globules which prevents the formation of a cream line. This improves the consistency and viscosity of yogurt, thus a greater

stability to syneresis can be obtained (Rasic and Kurmann, 1978; Tamime and Deeth, 1980; Tamime and Robinson, 1985). Furthermore, homogenization of yogurt mix breaks up powdered ingredients resulting in uniform distribution of the ingredients (Vedamuthu, 1991). According to Schmidt and Bledsoe (1995), homogenization has an adverse impact on yogurt with a lower fat content; it increases syneresis or reduces water-holding capacity due to empty spaces between casein matrices, and lack of native milkfat globule membrane (FGM) (Schmidt and Bledsoe, 1995). In higher fat yogurts clusters of fat globules can fill up these spaces, thus syneresis can be minimized. Darling and Butcher (1978) studied FGM in homogenized cream and reported that caseins and whey proteins were adsorbed on the fat-serum interface. The whey proteins in unpasteurized cream could be easily removed from the interface, but after pasteurization they strongly bonded and were more difficult to remove.

**Heat treatment.** The objectives of heat treatment of yogurt mix are to kill pathogenic microorganisms, to minimize spoilage microorganisms and to inactivate lipase and hence to prevent lipolysis (Rasic and Kurmann, 1978). Yogurt mix is normally heated at a higher temperature and longer time than normal pasteurization, ranging from 90 to 95°C for 5 to 10 min, to help improve product consistency through whey protein denaturation (Mottar *et al.*, 1989; Rasic and Kurmann, 1978; Tamime and Deeth, 1980; Tamime and Robinson, 1985). The degree of denaturation depends on the intensity of heat applied. Low TS yogurt may require more whey protein denaturation than high TS yogurt (Rasic and Kurmann, 1978). Whey proteins which participate in casein aggregation in yogurt are  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -LA) and  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG). The former has a denaturation temperature of 62°C and the latter, 78°C (Wong *et al.*, 1988). Denaturation of whey proteins is determined not only by heat treatment but also by other conditions. For example, the removal of calcium prevents  $\alpha$ -LA redensaturation. The native tertiary structure of heat treated  $\alpha$ -LA can be recovered

upon cooling because of its high affinity to calcium. Thus calcium aids in reconstruction of the tertiary structure of  $\alpha$ -LA (Bernal and Jelen, 1984).  $\beta$ -LG accounts for 50% of whey proteins in skim milk or 9% of total protein, two times more than  $\alpha$ -LA, therefore it plays an important role in casein aggregation (Wong *et al.*, 1988). When  $\kappa$ -casein is heated in the presence of  $\beta$ -LG,  $\kappa$ -casein -  $\beta$ -LG complex is formed via disulfide bonds (Davies *et al.*, 1978; Elfagm and Wheelock, 1978; Long *et al.*, 1963; Tessier and Rose, 1964).  $\beta$ -LG could also react with  $\alpha$ -LA during heating (Elfagm and Wheelock, 1978; Elfagm and Wheelock, 1978; Tamime and Deeth, 1980; Tamime and Robinson, 1985). Mottar *et al.* (1989) indicated that the ratio of  $\beta$ -LG to  $\alpha$ -LA at micellar surface and the level of heat treatment affected yogurt texture. Rasic and Kurmann (1978) indicated that during heat treatment there were two possible events depending on heat intensity; very high heat treatment such as 90°C for 10 min induces both  $\alpha$ -LA and  $\beta$ -LG to participate in protein aggregation resulting in less susceptibility to syneresis in yogurt, but a lower heat treatment (vat pasteurization) causes  $\beta$ -LG to participate rather than  $\alpha$ -LA because 80 to 90% of denatured  $\alpha$ -LA is reversible after heating (Wong *et al.*, 1988). Incorporation of  $\beta$ -LG at the micellar surface gives a long chain casein micelle linked by a finely flocculated protein resulting in a loose structure and an increase in syneresis (Modler and Kalab, 1983).

### Microbiology of yogurt

Early investigations of yogurt microorganisms were conducted by a number of scientists such as Metchnikoff (1904, 1907), Grigoroff (1905), Maze (1905) and Guerbet (1906). They found rod and coccal-shaped bacteria, yeasts and molds in yogurt (Rasic and Kurmann, 1978; Tamime and Robinson, 1985). Much of the credit for the study of yogurt bacteria was contributed to Orla-Jensen. Yogurt bacteria are now characterized as lactic acid bacteria belong to the *Lactobacillaceae* and *Streptococcaceae* genera. Generally, yogurt cultures are *L. delbrueckii* subsp.

*bulgaricus* and *S. thermophilus*, which are thermotolerant, homofermentative lactic acid bacteria (Tamime and Deeth, 1980). Some other strains such as *L. helveticus*, *L. jugurti*, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. are also sometimes used as adjuncts.

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* can ferment glucose, fructose, galactose and lactose to lactic acid. It produces D (-)-lactic acid up to 1.7% in milk and has a growth temperature of 22 to 60°C (Rasic and Kurmann, 1978) with an optimum growth temperature of 40 to 50°C (Mayra-Makinen and Bigret, 1993). The growth temperature for *St. thermophilus* ranges from 20 to 50°C with an optimum of 40 to 45°C. It can ferment glucose, fructose, lactose and saccharose and produces L (+)-lactic acid up to 0.7 to 0.8% in milk. It can grow in the presence of bile salts, but is very sensitive to antibiotics. Both yogurt organisms are non-motile. The average size of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* is 0.8 to 1.0  $\times$  4 to 6  $\mu$ m, and that of *S. thermophilus* is 0.7 to 0.9  $\mu$ m in diameter (Rasic and Kurmann, 1978).

When a single strain of either *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* or *S. thermophilus* is used, lactic acid and acetaldehyde production is lower compared with that in a mixed culture (Hamdan *et al.*, 1971; Rasic and Kurmann, 1978). There are two stages involved in yogurt fermentation. In the first stage, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* stimulates the growth of *S. thermophilus* by liberating essential amino acids from casein by proteolytic activity (Sandine and Elliker, 1970). In this stage, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grows slowly because it is microaerophilic (Vedamuthu, 1991). At the end of the first stage, the growth of *S. thermophilus* is slowed down because of the high lactic acid concentration. When *S. thermophilus* produces enough formic acid, which stimulates growth of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, the second stage begins. By this symbiotic action, the desirable acidity of the final yogurt can be achieved (Rasic and Kurmann, 1978). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* are proteolytic bacteria. The former has a higher proteolytic activity.

Slocum *et al.* (1988) reported that in yogurt with 10.0 to 17.5% total solid (TS) maximum proteolysis occurred at 14.5% TS.

Although, there is no regulatory requirement in the U.S. regarding the number of viable *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus*, it has been established with respect to therapeutic properties that yogurt should contain live lactic acid bacteria (Roberts and Maust, 1995). In countries such as Japan, South Korea and Poland, legislation requires viable lactic acid bacteria in the final product ranging from  $10^6$  to  $10^8$  cells/g (Hamann and Marth, 1984; Orihara *et al.*, 1992).

**Media for rods and cocci.** Media for differentiation of rods and cocci in yogurt have been studied. Lee *et al.* (1974) differentiated rod and coccus colonies based on the capability for saccharose utilization of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus*. In the presence of saccharose in a basal media with added bromocresol purple indicator, referred to as Lee's media, *S. thermophilus* ferments both saccharose and lactose and lowers pH to change the color of the bromocresol purple indicator, and thus forms yellow colonies. Although *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* is a stronger acid producer, it can ferment lactose but not saccharose. Thus, it produces less acid, and forms white colonies in this media. Matalon and Sandine (1986) modified Elliker's lactic agar by addition of 0.1% Tween 80 and 7.0% sterile reconstituted NDM. This media was referred to as Yogurt Lactic Agar. As *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* can produce more lactic acid, its larger colonies have cloudy zones, which result from casein precipitation, whereas colonies of *S. thermophilus* in the same media are smaller and lack cloudy zones.

#### Acetaldehyde production in yogurt

Generally yogurt flavor, other than lactic acid, consists of acetaldehyde, acetone, acetoin and a small amount of diacetyl (Sandine and Elliker, 1970). Among these, acetaldehyde is believed to be responsible for typical yogurt flavor (Bottazzi and Dellaglio, 1967). *Lactobacillus*

*delbrueckii* subsp. *bulgaricus* is more capable in both acid and acetaldehyde production compared to *S. thermophilus* (Singh and Sharma, 1982). Acetaldehyde is mainly produced from glucose via pyruvate catabolism (Keenan and Bills, 1968; Lees, 1969; Lees and Jago, 1978). Yogurt bacteria also have threonine aldolase, which converts threonine to acetaldehyde and glycine. *Streptococcus thermophilus* may be responsible for increased acetaldehyde production as its threonine aldolase is stimulated by the addition of threonine (Wilkins *et al.*, 1986). Marranzini *et al.* (1989) used ultrafiltration to deplete free amino acids in the skim milk in their study. Lactose and standard free amino acids except threonine and glycine were added to skim milk. They found that threonine aldolase activities of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* were reduced in the high glycine and low threonine media, but increased in high threonine and low glycine media. Threonine and glycine concentrations did not affect yogurt bacteria growth and acid production. Marshall and El-Bagoury (1986) increased acetaldehyde level in goat's milk yogurt by adding 0.1% threonine to yogurt mix made by ultrafiltered milk.

#### Textural properties of yogurt

Textural properties for yogurt include viscosity, firmness and syneresis. Measuring viscosity of yogurt is challenging because it is non-Newtonian, i.e. viscosity changes as shear stress changes (Charm, 1971). Therefore, in order to report on the apparent viscosity of yogurt, one has to precisely specify the measurement conditions used.

Viscosity of yogurt is affected by composition, type of starter cultures, heat treatment and stabilizer. As the TS increase, viscosity and firmness increase (Becker and Puhon, 1989; Guirguis *et al.*, 1984). Ropy strains of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* have been studied and used to produce smooth and viscous yogurt (Hess *et al.*, 1997; Vedamuthu, 1991). These bacteria, often called slime-producing bacteria, produce exopolysaccharides, which help increase

viscosity.

Heat treatment affects textural properties of yogurt. Labropoulos *et al.* (1981) indicated that yogurt made from UHT-treated milk (149°C, 3.3 s) had lower viscosity than that made from vat-treated milk (63°C and 82°C, 30 min). This was confirmed by Salji *et al.* (1984). When less intense heat treatment was used (Schmidt *et al.*, 1985), yogurt made from UHT-treated milk (138°C, 3 to 6 s) had lower viscosity and firmness but less syneresis than that made from vat-treated milk (82°C, 20 min). Whey protein denaturation was believed to be responsible for this phenomenon.

Becker and Puhon (1989) noted that yogurt fortified with ultrafiltered milk had higher viscosity and firmness compared to yogurt fortified with NDM and evaporated milk with similar composition. Susceptibility to syneresis of 2.0% fat and 5.0% protein yogurts fortified with various dairy ingredients including NDM, BMP, sodium caseinate and WPC (35 to 75% protein) were studied by Guinee *et al.* (1995). They reported that BMP yogurt yielded the least syneresis.

During cold storage of milk that has been contaminated by psychrotrophic bacteria,  $\kappa$ -casein is subjected to break down by proteolysis. This causes the yogurt made from such milk to be firmer, more viscous and sensitive to syneresis; however, sensory qualities of the yogurt were not reported (Gassem and Frank, 1991).

### Microstructure of yogurt

Microstructure of yogurt is usually studied by transmission electron microscopy (TEM) of thin section and scanning electron microscopy (SEM) (Kalab *et al.*, 1983). Sample preparation for TEM is time consuming but it allows for the visualization of casein aggregation, whereas with SEM sample preparation is easier and aids in the study of gel structure (Kalab and Harwalkar, 1973). Skriver *et al.* (1995) used SEM to differentiate the microstructure of yogurt made with ropy and nonropy strains of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus*. Harwalkar and Kalab (1986) found that an increase in TS increased the density of yogurt matrices which

resulted in decreased syneresis. Interestingly, casein particles of 30% TS yogurt were finer than those of 10% TS yogurt. Yogurt made by fermentation to pH 3.85 was more porous and firmer than that made by fermentation to pH 4.5.

Heat treatment of a yogurt mix causes changes in the microstructure of finished product. As previously mentioned, denaturation of whey proteins is responsible for the changes in gel formation. Protein micelles in yogurt mix when heated at 90°C for 10 min have appendages which are complexes of whey proteins and  $\kappa$ -casein, but without casein fusion (Davies *et al.*, 1978). During the fermentation process, these appendages inhibit casein fusion resulting in a loose structure (Davies *et al.*, 1978; Mottar *et al.*, 1989). Davies *et al.* (1978) noted that not only temperature of heat treatment but holding time was also an important factor influencing the appendage formation on the micelle surface. Mistry and Hassan (1992) studied the use of high milk protein powder (18.9% protein) in the production of nonfat yogurts (5.04 to 7.39% protein). They indicated that a high protein yogurt (7.39%) yielded a less porous structure and had lower syneresis than lower protein yogurts.

The existence of FGM in reconstituted BMP and yogurt made from such powder was confirmed by TEM (Kalab, 1980). Tamime *et al.* (1989) noted that FGM of large fat globules (5  $\mu$ m) in Labneh (6.8 to 8.2% protein and 9.2 to 10.5% fat) were broken by homogenization, whereas FGM of small fat globules were intact but they could not conclude if incorporation of FGM improved yogurt quality (Tamime *et al.*, 1991). Aguilera and Kinsella (1991) reported that recombined fat globules with diameters < 1.26  $\mu$ m increased the compression stress of a gel consisting of 8.3% NDM, 3% whey protein isolate (92.7% protein) and 4.4% fat.

In a recent development, confocal scanning laser microscopy was used to study the microstructure of yogurt during fermentation in real time without sample preparation (Hassan *et al.*, 1995). It was noted that there were three stages involved in yogurt fermentation: lag phase, ag-

gregation and contraction of milk proteins.

### Nonfat and lowfat yogurt

Nonfat and lowfat yogurts were introduced to meet consumer needs. During the past decade, many attempts have been made to produce nonfat and lowfat yogurts which are similar in quality to full fat yogurt. In order to be able to state "nonfat" or "lowfat" on the label, a yogurt manufacturer must produce yogurt conforming to fat content requirements. Roberts and Maust (1995) measured fat content in nonfat, 1% and 1.5% fat yogurts and reported that 50% of these commercial yogurts did not meet the requirements for fat content.

To manufacture reduced fat yogurt, proper ingredient selection is important such as use of skim milk and NDM. However the consequences can be undesirable. Adding NDM increases caloric value of yogurt and acid production as about 50% of NDM is lactose (Kalab *et al.*, 1983). A powdery flavor can be detected in yogurt fortified with too much NDM (Tamime and Robinson, 1985). Using fat replacers is another effort to reduce fat content in yogurt. Farooq and Haque (1992) reported that nonfat low calorie yogurt produced by adding a sugar ester as a fat substitute, aspartame as a sweetener and a cream-like substance as a flavor enhancer had a better mouthfeel and texture compared with yogurt without the fat substitute. Microstructure of yogurt containing whey protein-based fat substitute, Simplese 100<sup>TM</sup>, or anhydrous milkfat were compared by Tamime *et al.* (1995). Both the fat substitute with 0.1 to 3  $\mu\text{m}$  diameter and the anhydrous milkfat interacted with protein matrices, but yogurt with the fat substitute was softer and more susceptible to syneresis. In a study on the effect of seven different starch-based fat substitutes on nonfat yogurt (0.1% fat) firmness of yogurt increased with the substitutes, but flavor and mouthfeel worsened (Tamime *et al.*, 1996). Lowfat yogurt (1.5% fat) made with oils from olive, groundnut, sunflower and maize differed in flavor and aroma from yogurt made with anhydrous milkfat but the oils did not affect lactic

acid bacteria (Barrantes *et al.*, 1996; Barrantes *et al.*, 1996).

Nonfat yogurt is normally low in TS (10 to 12%) and consequently suffers from whey separation or syneresis (Harwalkar and Kalab, 1986; Schellhaass and Morris, 1985). To reduce syneresis, thickening agents such as gelatin, starch, cellulose derivatives, alginates and carrageenan can be legally added (FDA, 1996b). Gelatin and carrageenan result in the clustering of casein micelles (Kalab *et al.*, 1983), therefore potentially reducing syneresis (Modler *et al.*, 1983). As indicated earlier, yogurt texture may also be improved by the utilization of ropy strains of yogurt bacteria (Hess *et al.*, 1997; Tegatz and Morris, 1990).

### Summary

Yogurt manufacturing has long been known to mankind. Yogurt gained its popularity from health-concerned consumers worldwide. Due to the presence of cholesterol in milkfat, nonfat and lowfat yogurt were invented. Similar to Bulgarian milk, other nutritive and therapeutic properties are of significance.

### References

- Aguilera, J. M., and Kinsella, J. E. 1991. Compression strength of dairy gels and microstructural interpretation. *J. Food Sci.* 56: 1224-1228.
- Akin, N., and Rice, P. 1994. Main yogurt and related products in Turkey. *Cult. Dairy Prod. J.* 29: 23, 25-26, 28-29.
- Anon. 1996. Milk facts. Milk Industry Foundation, Washington, DC.
- Barrantes, E., Tamime, A. Y., Sword, A. M., Muir, D. D., and Kalab, M. 1996. The manufacture of set-type natural yoghurt containing different oils- 1: compositional quality, microbiology evaluation and sensory properties. *Int. Dairy J.* 6: 811-826.
- Barrantes, E., Tamime, A. Y., Sword, A. M., Muir, D. D., and Kalab, M. 1996. The manufacture of set-type natural yoghurt containing different oils- 2: rheological properties and microstructure. *Int. Dairy J.* 6: 827-837.

- Becker, T., and Puhon, Z. 1989. Effect of different process to increase the milk solids non-fat content on the rheological properties of yoghurt. *Milchwissenschaft* 44: 626-629.
- Bernal, V., and Jelen, P. 1984. Effect of calcium binding on thermal denaturation of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *J. Dairy Sci.* 67: 2452-2454.
- Bottazzi, V., and Dellaglio, F. 1967. Acetaldehyde and diacetyl production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococci. *J. Dairy Res.* 34: 109-113.
- Broome, M. C., Willman, N., Roginski, H., and Hickey, M. W. 1982. The use of cheese whey protein concentrate in the manufacture of skimmilk yoghurt. *Aust. J. Dairy Technol.* 37: 139-142.
- Bundgaard, A. G., Olsen, O. J., and Madsen, R. F. 1972. Ultrafiltration and hyperfiltration of skim milk for production of various dairy products. *Dairy Indus.* 37: 539-546.
- Buono, M. A., Setser, C., Erickson, L. E., and Fung, D. Y. C. 1990. Soymilk yogurt: sensory evaluation and chemical measurement. *J. Food Sci.* 55:528-531.
- Chapman, H. R., Bines, V. E., Glover, F. A., and Skudder, P. J. 1974. Use of milk concentrated by ultrafiltration for making hard cheese, soft cheese and yoghurt. *J. Soc. Dairy Technol.* 27: 151-155.
- Charm, S. E. 1971. Flow of fluid foods, p. 54-56, *The Fundamentals of Food Engineering*, 2<sup>nd</sup> ed. AVI Publishing Co., Inc., Westport, CT.
- Collins, J. L., Ebah, C. B., Mount, J. R., Demott, B. J., and Draughon, F. A. 1991. Production and evaluation of milk-sweet potato mixtures fermented with yogurt bacteria. *J. Food Sci.* 56: 685-688.
- Darling, D. F., and Butcher, D. W. 1978. Milk-fat globule membrane in homogenized cream. *J. Dairy Res.* 45: 197-208.
- Davies, F. L., Shankar, P. A., Brooker, B. E., and Hobbs, D. G. 1978. A heat-induced change in the ultrastructure of milk and its effect on gel formation in yoghurt. *J. Dairy Res.* 45: 53-58.
- Elfagm, A. A., and Wheelock, J. V. 1978. Heat interaction between  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and casein in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 61: 159-163.
- Elfagm, A. A., and Wheelock, J. V. 1978. Interaction of bovine  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin during heating. *J. Dairy Sci.* 61: 28-32.
- Farooq, K., and Haque, Z. U. 1992. Effect of sugar esters on the textural properties of nonfat low calorie yogurt. *J. Dairy Sci.* 75: 2676-2680.
- FDA. 1996a. Lowfat yogurt. 21CFR 131.203, Code of Federal Regulations. U.S. Dept. of Health and Human Services, Washington, DC.
- FDA. 1996b. Nonfat yogurt 21 CFR 131.206, Code of Federal Regulations. U.S. Dept. of Health and Human Services, Washington, DC.
- FDA. 1996c. Yogurt. 21 CFR 131.200, Code of Federal Regulations. U.S. Dept. of Health and Human Services, Washington, DC.
- Gassem, M. A., and Frank, J. F. 1991. Physical properties of yogurt made from milk with proteolytic enzymes. *J. Dairy Sci.* 74: 1503-1511.
- Granata, L. A., and Morr, C. V. 1996. Improved acid, flavor and volatile compound production in a high protein and fiber soymilk yogurt-like product. *J. Food Sci.* 61: 331-336.
- Guinee, T. P., Mullins, C. G., Reville, W. J., and Cotter, M. P. 1995. Physical properties of stirred-curd unsweetened yoghurts stabilised with different dairy ingredients. *Milchwissenschaft* 50: 196-200.
- Guirguis, N., Broome, M. C., and Hickey, M. W. 1984. The effect of partial replacement of skim milk powder with whey protein concentrate on the viscosity and syneresis of yoghurt. *Aust. J. Dairy Technol.* 39: 33-35.
- Hamann, W. T., and Marth, E. H. 1984. Survival of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in commercial and experimental yogurts. *J. Food Prot.* 47: 781-786.
- Hamdan, I. Y., Kunsman, J., and Deane, D. D. 1971. Acetaldehyde production by combined yogurt cultures. *J. Dairy Sci.* 54: 1080-1082.
- Harwalkar, V. R., and Kalab, M. 1986. Relationship between microstructure and susceptibility to syneresis in yogurt made from reconstituted nonfat dry milk. *Food Microstruct.* 5: 287-294.
- Hassan, A. N., Frank, J. F., Farmer, M. A., Schmidt, K. A., and Shalabi, S. I. 1995. Formation of



- yogurt microstructure and three-dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy. *J. Dairy Sci.* 78: 2629-2636.
- Hess, S. J., Roberts, R. F., and Ziegler, G. R. 1997. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer system. *J. Dairy Sci.* 80: 252-263.
- Jepsen, S. 1979. Membrane filtration in the manufacture of cultured milk products, yogurt, cottage cheese. *Cult. Dairy Prod. J.* 14: 5-8.
- Kalab, M. 1980. Possibilities of an electron-microscopic detection of buttermilk made from sweet cream in adulterated skim milk. *Scanning Electron Microscopy* 3: 645-651.
- Kalab, M., Allen-Wojtas, P., and Phipps-Todd, B. E. 1983. Development of microstructure in set-style nonfat yoghurt - a review. *Food Microstruct.* 2: 51-66.
- Kalab, M., and Harwalkar, V. R. 1973. Milk gel structure. I. Application of scanning electron microscopy to milk and other food gels. *J. Dairy Sci.* 56: 835-842.
- Karleskind, D., Laye, I., Halpin, E., and Morr, C. V. 1991. Improving acid production in soy-based yogurt by adding cheese whey proteins and mineral salts. *J. Food Sci.* 56: 999-1001.
- Keenan, T. W., and Bills, D. D. 1968. Metabolism of volatile compounds by lactic starter culture microorganism: A review. *J. Dairy Sci.* 51: 1561-1567.
- Kehagias, C. H., and Dalles, T. N. 1984. Bacteriological and biochemical characteristics of various types of yogurt made from sheep's and cow's milk. *J. Food Prot.* 47: 760-761.
- Kolar, C. W., Cho, I. C., and Watrous, W. 1979. Vegetable protein application yogurt, coffee creamer and whip toppings. *J. Oil Chemists' Soc.* 56: 389-391.
- Kosikowski, F. V. 1979. Low lactose yogurt and milk beverage by ultrafiltration. *J. Dairy Sci.* 62: 41-46.
- Kroger, M., Kurmann, J. A., and Rasic, J. L. 1989. Fermented milks - past, present, and future. *Food Technol.* 43: 92-99.
- Labropoulos, A. E., Lopez, A., and Palmer, J. K. 1981. Apparent viscosity of milk and cultured yogurt thermally treated by UHT and vat systems. *J. Food Prot.* 44: 874-876.
- Lee, S.-Y., Morr, C. V., and Seo, A. 1990. Comparison of milk-based and soymilk-based yogurt. *J. Food Sci.* 55: 523-536.
- Lee, S. Y., Vedomuthu, E. R., and Washam, C. J. 1974. An agar medium for the differential enumeration of yogurt starter bacteria. *J. Milk Food Technol.* 37: 272-276.
- Lees, G. L. 1969. Methods for the estimation of acetaldehyde in cultured dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.* 18: 181-185.
- Lees, G. L., and Jago, G. R. 1978. Role of acetaldehyde in metabolism : A review. 1. Enzymes catalyzing reactions involving acetaldehyde. *J. Dairy Sci.* 61: 1205-1215.
- Long, J. E., Winkle, Q. V., and Gould, I. A. 1963. Heat-induced interaction between crude  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 46: 1329-1334.
- Mareschi, J.-P., and Cuff, A. 1989. Essential characteristics of yogurt and its regulation around the world, p. 11-28. **In** Chandan, R. C. (ed.), *Yogurt: Nutritional and Health Properties*. National Yogurt Assoc., McLean, VA.
- Marranzini, R. M., Schmidt, R. H., Shireman, R. B., Marshall, M. R., and Cornell, J. A. 1989. Effect of threonine and glycine concentrations on threonine aldolase activity of yogurt microorganisms during growth in a modified milk prepared by ultrafiltration. *J. Dairy Sci.* 72: 1142-1148.
- Marshall, V., and El-Bagoury, E. 1986. Use of ultrafiltration and reverse osmosis to improve goats' milk yogurt. *J. Soc. Dairy Technol.* 39: 65-66.
- Matalon, M. E., and Sandine, W. E. 1986. Improved media for differentiation of rods and cocci in yogurt. *J. Dairy Sci.* 69: 2569-2576.
- Mayra-Makinen, A., and Bigret, M. 1993. Industrial use and production of lactic acid bacteria. **In** Salminen, S. and Wright, A. v. (ed.), *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker, New York.

- Mistry, V. V., and Hassan, H. N. 1992. Manufacture of nonfat yogurt from a high milk protein powder. *J. Dairy Sci.* 75: 947-957.
- Modler, H. W., and Kalab, M. 1983. Microstructure of yogurt stabilized with milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66: 430-437.
- Modler, H. W., Larmond, M. E., Lin, C. S., Froehlich, D., and Emmons, D. B. 1983. Physical and sensory properties of yogurt stabilized with milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66: 422-429.
- Morris, H. A., and Ghaleb, H. A. 1995. A comparison of yogurts fortified with nonfat dry milk and whey protein concentrates. *Cult. Dairy Prod. J.* 30: 2-4.
- Mottar, J., Bassier, A., Joniau, M., and Baert, J. 1989. Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. *J. Dairy Sci.* 72: 2247-2256.
- Norling, A. 1979. Yoghurt manufacture-some technical aspects. *Cult. Dairy Prod. J.* 14: 24-29.
- Orihara, O., Sakuchi, I., and Nakazawa, Y. 1992. Types and standards for fermented milks and lactic drink, p. 1-16. In Nakazawa, Y. and Hosono, A. (ed.), *Functions of Fermented Milk : Challenges for the Health Sciences*. Elsevier Sci. Publ. Co., Inc., New York, NY.
- Rasic, J. L. 1987. Yogurt and yogurt cheese manufacture. *Cult. Dairy Prod. J.* 22: 6-8.
- Rasic, J. L., and Kurmann, J. A. 1978. *Yoghurt: Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparation*. Technical Dairy Publishing House, Berne, Switzerland.
- Roberts, R. F., and Maust, J. M. 1995. Composition and number of viable *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. in refrigerated non-fat and low fat yogurts available at retail outlets. *Cult. Dairy Prod. J.* 30: 2-6.
- Salji, J. P., Sawaya, W. N., Saadi, S. R., and Safi, W. M. 1984. The effect of heat treatment on quality and shelf life of plain liquid yoghurt. *Cult. Dairy Prod. J.* 19: 10-14.
- Sandine, W. E., and Elliker, P. R. 1970. Microbiology induced flavors and fermented foods: flavor in fermented dairy products. *J. Agric. Food. Chem.* 18: 557-562.
- Schellhaass, S. M., and Morris, H. A. 1985. Rheological and scanning electron microscopic examination of skim milk gels obtained by fermenting with ropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria. *Food Microst.* 4: 279-287.
- Schmidt, K., and Bledsoe, K. 1995. Effects of homogenization pressure on physical and sensory characteristics of low fat yogurt. *Cult. Dairy Prod. J.* 30: 7-10.
- Schmidt, R. H., Vargas, M. M., Smith, K. L., and Jezeski, J. J. 1985. The effect of ultra-high temperature milk processing on yogurt texture. *J. Food Proc. Preserv.* 9: 235-240.
- Singh, J., and Sharma, D. K. 1982. Yoghurt starters in skim milks. 1. acid and flavour production and proteolytic activity by yoghurt starters. *Cult. Dairy Prod. J.* 17: 22-25.
- Skriver, A., Buchheim, W., and Qvist, K. B. 1995. Electron microscopy of stirred yoghurt: ability of three techniques to visualize exo-polysaccharides from ropy strains. *Milchwissenschaft* 50: 683-686.
- Slocum, S. A., Jasinski, E. M., and Kilara, A. 1988. Processing variables affecting proteolysis in yogurt during incubation. *J. Dairy Sci.* 71: 596-603.
- Tamime, A. Y., Barclay, M. N. I., Davies, G., and Barrantes, E. 1994. Production of low-calories yogurt using skim milk powder and fat-substitute. 1. A review. *Milchwissenschaft* 49: 85-88.
- Tamime, A. Y., Barrantes, E., and Sword, A. M. 1996. The effect of starch based fat substitutes on the microstructure of set-type yogurt made from reconstituted skimmed milk powder. *J. Soc. Dairy Technol.* 49: 1-10.
- Tamime, A. Y., and Deeth, H. C. 1980. Yogurt: technology and biochemistry. *J. Food Prot.* 43: 939-977.
- Tamime, A. Y., Kalab, M., and Davies, G. 1989. Rheology and microstructure of strained yoghurt (Labneh) made from cow's milk by three different methods. *Food Microstruct.* 8: 125-135.
- Tamime, A. Y., Kalab, M., Davies, G., and Mahdi, H. A. 1991. Microstructure and firmness of Labhen (high solids yoghurt) made from cow's, goat's and sheep's milk by a traditional method

- or by ultrafiltration. *Food Struct.* 10: 37-44.
- Tamime, A. Y., Kalab, M., Muir, D. D., and Barrantes, E. 1995. The microstructure of set-style, natural yogurt made by substituting microparticulate whey protein for milk fat. *J. Soc. Dairy Technol.* 48: 107-111.
- Tamime, A. Y., and Robinson, R. K. 1985. *Yoghurt: Science and Technology*. Pergamon Press Ltd., Oxford, UK.
- Teggatz, J. A., and Morris, H. A. 1990. Changes in the rheology and microstructure of ropy yogurt during shearing. *Food Struct.* 9: 133-138.
- Tessier, H., and Rose, D. 1964. Influence of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin on the heat stability of skimmilk. *J. Dairy Sci.* 47: 1049-1091.
- Vedamuthu, E. R. 1991. The yogurt story-past, present and future. I. *Dairy Food Environ. San.* 11: 202-203.
- White, C. H. 1995. Manufacture of high quality yogurt. *Cult. Dairy Prod. J.* 30: 18-19, 21, 23-24, 26.
- Wilkins, D. W., Schmidt, R. H., Shireman, R. B., Smith, K. L., and Jezeski, J. J. 1986. Evaluating acetaldehyde synthesis from L-[ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ] threonine by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 69: 1219-1224.
- Wong, N. P., Jenness, R., Keeney, M., and Marth, E. H. 1988. *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 3<sup>rd</sup> ed. Van Nostrand Reinhold Co. Inc., New York, NY.



## สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา

ชนกันต์ จิตมนัส

### Abstract

Chitmanat, C.

#### Fish immunostimulants

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 739-747

Fish immunostimulants are important substances useful to control infectious fish diseases and are substantially beneficial to the aquaculture business and environment.

This literature review covers the results of using fish immune modulators, including bacteria and bacterial derivatives, adjuvants, chitin, glucan, vitamin, and other synthetic materials. These immunostimulants enhance the activities of phagocytotic cells, stimulate the immunological cells to create more lysozymes and more antibodies, enhance the complement efficiency in fish and eventually increase the abilities to prevent bacterial infection. These responses are able to prevent fish from succumbing to various infectious diseases.

---

**Key words :** fish immunostimulant, fish immunity, fish diseases

---

Department of Fisheries Technology, Faculty of Agricultural Product, Maejo University, Sansai, Chiang Mai 50290 Thailand.

---

M.S. (Fisheries) และ M.S. (Medical Microbiology) ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้  
อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

Corresponding e-mail : chanagun@hotmail.com

รับต้นฉบับ 26 มีนาคม 2545      รับลงพิมพ์ 29 กรกฎาคม 2545

## บทคัดย่อ

ชนกันต์ จิตมนัส

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(4) : 739-747

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) มีความสำคัญในการควบคุมป้องกันโรคปลา เป็นประโยชน์ต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อม บทความนี้จะเป็นการรวบรวมผลของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียและส่วนประกอบของเซลล์แบคทีเรีย แอดจูแวนท์ ไคติน กลูแคน วิตามินและสารสังเคราะห์ต่าง ๆ โดยสารกระตุ้นเหล่านี้ส่วนใหญ่จะช่วยเพิ่มการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic cell) ช่วยกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทำให้มีการเพิ่มการผลิตไลโซไซม์ (lysozyme) และปริมาณของแอนติบอดี (antibody) รวมทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (complement) และเพิ่มการยับยั้งการเกิดโรคจากการติดเชื้อแบคทีเรียในปลา ปรากฏการณ์เหล่านี้จะมีผลช่วยให้ปลาเพิ่มความต้านทานโรคติดเชื้อต่าง ๆ

อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอุตสาหกรรมทางการเกษตรที่มีความสำคัญและมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นทุก ๆ ปี เกษตรกรได้พัฒนาการเลี้ยงแบบหนาแน่นเพื่อให้ได้ผลผลิตต่อพื้นที่สูงขึ้น ซึ่งในสภาพดังกล่าวอาจส่งผลกระทบในทางลบต่อสุขภาพสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำเป็นโรคง่ายขึ้น การจัดการที่ดีในส่วนของการให้อาหาร การควบคุมคุณภาพของน้ำและการคัดเลือกสายพันธุ์เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ธุรกิจนี้ดำเนินการไปได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน แม้ว่า การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการป้องกันและรักษาโรคเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีในปริมาณที่ไม่เหมาะสมติดต่อกันนาน แบคทีเรียจะมีการพัฒนาสายพันธุ์ที่ดื้อยา ทำให้การป้องกันและรักษาโรคปลาในครั้งต่อไปไม่ได้ผล นอกจากนี้ Kruse and Sorum (1994) รายงานว่า ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเหล่านี้อาจส่งผ่านไปยังแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในผู้บริโภคได้ ทำให้การใช้ยาในมนุษย์ใช้ไม่ได้ผลในอนาคต รวมทั้งปัญหาสารตกค้างจากการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ และสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาสำคัญที่มีผลกระทบทางเศรษฐกิจของชาติอยู่ในขณะนี้ จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้นำไปสู่การคิดค้นแนวทางในการลดการใช้ผลิตภัณฑ์น้ำเข้าพวกสารเคมีและยาปฏิชีวนะ การให้วัคซีนน่าจะเป็นวิธีการ

หนึ่งในการลดปัญหาดังกล่าว แม้จะมีการยอมรับว่าวัคซีนที่ป้องกันโรคในปลาแชลมอนใช้ได้ผลดีในต่างประเทศ แต่สำหรับการใช้วัคซีนสำหรับปลาในประเทศไทยยังไม่แพร่หลาย อาจเนื่องมาจากความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียที่พัฒนาปรับตัวเพื่อหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ เป็นผลให้วัคซีนมีประสิทธิภาพต่ำในการป้องกันโรค รวมทั้งต้นทุนในการผลิตวัคซีนสำหรับปลาน้ำจืดค่อนข้างสูง ในขณะที่ราคาต่อตัวของปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยยังมีราคาต่ำเมื่อเทียบกับปลาแชลมอน ซึ่งแม้ว่า กุ้งจะนำรายได้เข้าสู่ประเทศปริมาณมาก แต่กุ้งไม่มีภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ การผลิตวัคซีนสำหรับกุ้งไม่น่าจะเป็นไปได้ จึงไม่ได้มีแรงดึงดูดให้นักวิชาการไทยได้คิดค้นวัคซีนปลาอย่างจริงจัง ประกอบกับมีข้อจำกัดด้านความรู้เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ

การหาแนวทางในการเพิ่มความต้านทานโรค โดยเฉพาะการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (nonspecific immunity) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ จะเห็นได้ว่าการพัฒนาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลายตัวมาใช้ในเชิงพาณิชย์แล้ว จุดประสงค์ของการเขียนบทความนี้เพื่อรวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลาและเป็นองค์ความรู้พื้นฐานให้ผู้สนใจได้ค้นคว้าวิจัยเพิ่มเติมต่อไป

## ระบบภูมิคุ้มกันของปลา

เพื่อให้เข้าใจผลของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา ควรทราบถึงความรู้พื้นฐานของระบบภูมิคุ้มกันปลา ก่อน ภูมิคุ้มกันของปลามีลักษณะทั่วไปคล้ายกับสัตว์เลื้อยลูกตัวนม (Sakai *et al.* 1999 และ Vadstein 1997) Vadstein (1997) กล่าวว่า ภูมิคุ้มกันปลามีการพัฒนาที่ไม่ดี ส่วนใหญ่สุขภาพของปลาจะขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (nonspecific immunity) ซึ่งภูมิคุ้มกันชนิดนี้ไม่จำเป็นต้องได้รับแอนติเจนหรือเชื้อโรคก่อนที่จะเกิดการตอบสนอง ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะถือเป็นด่านแรกในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคต่างๆ และมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคหลากหลายชนิด นักวิทยาศาสตร์ท่านนี้ยังได้ตั้งข้อสังเกตว่า ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะอาจจะเป็นภูมิคุ้มกันหลักในการป้องกันการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในปลาวัยอ่อน แม้ว่าภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) มีการพัฒนาช้ากว่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในการป้องกันการติดเชื้อในครั้งแรก แต่จะมีความจำ (immunological memory) ทำให้ปลาสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นอย่างรวดเร็วและประสิทธิภาพสูงมาก หากได้สัมผัสกับแอนติเจนหรือเชื้อโรคเดียวกันในครั้งต่อไป อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถแยกภูมิคุ้มกันทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันอย่างสิ้นเชิงเพราะภูมิคุ้มกันทั้งสองระบบมีการทำงานที่ร่วมกัน

ภูมิคุ้มกันทั้งสองชนิดยังแบ่งได้ตามลักษณะการทำงาน ได้ 2 ชนิด คือ ภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ (cell-mediated immunity) และภูมิคุ้มกันสารน้ำ (humoral immunity) ภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ จะประกอบด้วยเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytotic cell) ได้แก่ มาโครฟาจ (macrophage) และนิวโตรฟิล (neutrophil) Evans and Jaso-Friedmann (1992) กล่าวว่า ปลาสามารถผลิตเซลล์ที่เรียกว่า nonspecific cytotoxic cell (NCC) ซึ่งทำหน้าที่คล้ายกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีความสามารถในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสหรือเซลล์มะเร็ง [natural killer (NK) cell] นอกจากนี้ปลายังผลิตเซลล์เม็ดเลือดขาวจำพวก T และ B lymphocytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนสำหรับภูมิคุ้มกันที่เป็นของเหลวในน้ำเลือดหรือภูมิคุ้มกัน

สารน้ำ (humoral immunity) มีหลายชนิด เช่น (1) คอมพลีเมนต์ (complement) ทำหน้าที่ช่วยในการทำให้เชื้อแบคทีเรียและไวรัสง่ายต่อการถูกทำลายโดยจะช่วยเสริมการทำงานการกลืนกินของเซลล์ (phagocytosis) ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า opsonization คอมพลีเมนต์ยังทำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียอีกด้วย (2) ไลโซไซม์ (lysozyme; N-acetylmuramide glycanhydrolase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย (Dalmo *et al.* 1997) (3) สารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จำพวก transferrin และโปรตีน C-reactive (CRP) ที่อยู่ในซีรัมทำหน้าที่ร่วมกับคอมพลีเมนต์ในการช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (4) ไซโตไคน์ (cytokine) เป็นกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณในการกระตุ้นและยับยั้งการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ

ดังนั้น ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา น่าจะใช้ตัวบ่งชี้ความสำเร็จดังต่อไปนี้

1. การศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์กลืนกิน (phagocytic cell) ซึ่งตรวจสอบได้จากความสามารถในการทำลายสิ่งแปลกปลอมและการผลิตสารเคมีต่างๆ ออกมา ทำให้มีผลต่อการทำลายและการบุกรุกของเชื้อโรค
2. การเพิ่มความสามารถในการฆ่าเชื้อโรคของเซลล์มาโครฟาจและนิวโตรฟิล วิธีการทำลายเชื้อโรคมักได้หลายวิธีซึ่งอาจจะขึ้นอยู่กับออกซิเจนหรือไม่ก็ได้ การทำลายเชื้อโดยอาศัยออกซิเจน ได้แก่ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสามารถตรวจสอบโดยวิธีการเรืองแสงทางเคมี (chemiluminescence) และการย้อมสี (nitroblue tetrazolium; NBT)
3. การเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte proliferation) และเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงในเลือด
4. การเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ที่สูงขึ้น
5. ระดับและการทำงานของไลโซไซม์
6. การกระตุ้นการทำงานของเซลล์ NCC โดยพิจารณาจากความสามารถของเซลล์ดังกล่าวในการทำลายเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (killer cell activity)
7. หากต้องการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อเสริม

ประสิทธิภาพของวัคซีนให้สูงขึ้น อาจใช้ผลผลิตของแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้นเป็นตัวบ่งชี้ความสำเร็จ รวมถึงความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคและการตายจากการติดเชื้อ (challenge test)

#### การทดลองใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา

นักวิทยาศาสตร์หลายท่านให้ความสนใจในการใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์จากแหล่งต่างๆ เพื่อช่วยกระตุ้นการ

ทำงานของระบบภูมิคุ้มกันซึ่งเป็นประโยชน์ในการป้องกันโรคปลา (Table 1) อันได้แก่

#### 1) การใช้แบคทีเรียและส่วนประกอบของแบคทีเรีย (bacterial derivative)

โดยปกติภูมิคุ้มกันจะถูกกระตุ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอม โดยเฉพาะพวกเชื้อโรคต่างๆ เข้าสู่ร่างกาย แต่การกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้อ่อนกำลังลง (attenuation) ซึ่งทำได้โดยการใช้ความร้อนหรือการใช้

Table 1. Fish immunostimulant

| Fish immunostimulant                                  | Fish species                                    | Administration                      | Results                                                                                                                                 | References                                                               |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Bacteria and derivative products                      | Rainbow trout<br>Channel catfish<br>Coho salmon | immersion<br>immersion<br>injection | Increase resistance to <i>Streptococcus</i> sp.<br>stimulate B lymphocyte proliferation<br>Increase resistance to <i>A. salmonicida</i> | Sakai (1999)<br>Clem <i>et al.</i> (1985)<br>Oliver <i>et al.</i> (1985) |
| Adjuvants                                             | Turbot<br>Trout                                 | injection<br>injection              | Increase antibody<br>Increase resistance to <i>V. anguillarum</i>                                                                       | Estevez <i>et al.</i> (1994)<br>Kijita <i>et al.</i> (1992)              |
| Chitin                                                | Rainbow trout<br>Yellowtail                     | injection<br>injection              | Enhance macrophage activities and increase resistance to <i>V. anguillarum</i><br>Increase resistance to <i>P. piscicida</i>            | Sakai <i>et al.</i> (1992)<br>Kawakami <i>et al.</i> (1998)              |
| Glucan                                                | Channel catfish<br>Atlantic salmon              | injection<br>mixed feed             | Increase resistance to <i>E. ictaluri</i><br>Increase resistance to <i>V. anguillarum</i>                                               | Chen and Ainsworth (1992)<br>Jenney and Anderson (1993)                  |
| Vitamin C                                             | Channel catfish                                 | mixed feed                          | Increase resistance to <i>E. tarda</i>                                                                                                  | Li and Lovell (1985)                                                     |
| Vitamin E                                             | Atlantic salmon                                 | mixed feed                          | Increase resistance to <i>A. salmonicida</i>                                                                                            | Hardie <i>et al.</i> (1990)                                              |
| <i>Spirulina</i> sp.                                  | Channel catfish                                 | mixed feed                          | Increase in phagocytotic cells                                                                                                          | Duncan and Klesius (1996b)                                               |
| <i>Psidium guajava</i><br><i>Momordica charantina</i> | <i>In vitro</i> test                            |                                     | Inhibit <i>A. hydrophila</i> growth <i>in vitro</i>                                                                                     | Direkbusarakom (1998)                                                    |
| Growth hormone                                        | Rainbow trout                                   | injection                           | Increase resistance to <i>V. anguillarum</i>                                                                                            | Sakai (1997)                                                             |
| Levamisole                                            | Rainbow trout                                   | injection                           | Increase resistance to <i>V. anguillarum</i>                                                                                            | Kajita <i>et al.</i> (1990)                                              |



ฟอร์มาลินเพื่อพัฒนาวัคซีน โดยยังคงให้แบคทีเรียมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันนั้นอาจส่งผลเสียต่อปลาเนื่องจากเชื้อดังกล่าวอาจจะเปลี่ยนสภาพเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงและก่อให้เกิดโรคได้ รวมทั้งปลาที่ให้วัคซีนอาจเป็นพาหะนำเชื้อโรคไปยังปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่ไม่มีประวัติการระบาดของเชื้อโรคนั้นๆ อย่างไรก็ตาม มีรายงานความสำเร็จของการใช้วัคซีนสำหรับปลาในต่างประเทศเป็นต้นว่า Sakai (1999) กล่าวว่า วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio anguillarum* (*Vibrio bacterin*) เป็นวัคซีนที่ได้ผลดีมากที่สุดสำหรับปลาแซลมอน ไม่ว่าจะเป็นการให้โดยการฉีด การให้ทางปากและการจุ่ม เขาได้รายงานต่อไปว่า ปลาแรนโบว์เทรทท์ (*Oncorhynchus mykiss*) ที่จุ่มในวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *V. anguillarum* ยังสามารถเพิ่มความต้านทานต่อการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. จากเหตุการณ์นี้แสดงให้เห็นว่า วัคซีนนอกจากจะกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะแล้วยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะด้วยการกระตุ้นดังกล่าวอาจเกิดจากส่วนของผนังเซลล์แบคทีเรีย การใช้ส่วนประกอบเพียงบางส่วนของแบคทีเรียเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันนี้จะช่วยลดปัญหาการแปรสภาพของแบคทีเรียที่อ่อนกำลังไปเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงได้ ตัวอย่าง เช่น Clem และคณะ (1985) กล่าวว่า LPS (lipopolysaccharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ B lymphocyte อันเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดี และ LPS ยังกระตุ้นการเพิ่มผลผลิตของโปรตีนที่มีลักษณะคล้าย interleukin 1 จากเซลล์โมโนไซต์ (monocyte) ของปลาคอดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) Sakai (1999) รายงานว่า Muramyl dipeptide (MDP; N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) จากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Mycobacterium* สามารถกระตุ้นมาโครฟาจเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี (B lymphocyte) และ alternative pathway ของคอมพลีเมนต์ในหนู Oliver *et al.* (1985) รายงานว่า ปลาโคโฮแซลมอน (*Oncorhynchus kisutch*) ที่ได้รับการส่วนผสมของ MDP ใน Freund's incomplete adjuvant มีการเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *A. salmonicida* ถึง 47 เท่า

## 2) สารเสริมปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหรือแอดจูแวนท์ (adjuvant)

Anderson (1996) กล่าวว่า แอนจูแวนท์ทำหน้าที่เป็นที่เก็บแอนติเจน (antigen reservoir) โดยแอดจูแวนท์จะไปจับกับแอนติเจนให้มือนุภาคใหญ่ขึ้น ทำให้แอนติเจนอยู่ในร่างกายได้นานขึ้น แล้วค่อยๆ ปล่อยออกมากระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ ดังนั้นจึงนิยมใช้แอดจูแวนท์เป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพวัคซีน ตัวอย่างของแอดจูแวนท์ ได้แก่ alum (aluminium hydroxide), Freund's complete adjuvant (FCA; เชื้อตายของ *Mycobacterium* ใน water-in-oil emulsion) Estévez และคณะ (1994) รายงานว่า ปลาข้างเดียว (turbot; *Scophthalmus maximus*) ที่ฉีดด้วยวัคซีนที่เตรียมจาก *V. anguillarum* ผสมกับ FCA จะช่วยเพิ่มปริมาณแอนติบอดีของปลาดังกล่าว โดยที่ไม่จำเป็นต้องมีการฉีดวัคซีนซ้ำ (boost) อย่างไรก็ตาม Kawakmai *et al.* (1998) กล่าวว่า ปลา yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) ที่ฉีดด้วย FCA อย่างเดียว ไม่ได้เพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ *Pasteurella piscicida* แม้ว่า FCA จะช่วยเสริมประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันแบคทีเรียในปลาดังกล่าว

## 3) ไคตินและไคโตซาน (chitin and chitosan)

ไคตินเป็น polysaccharide ที่เป็นส่วนประกอบพื้นฐานในเปลือกกุ้งและแมลง รวมทั้งเป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ของสาหร่ายบางชนิด Sakai และคณะ (1992) รายงานว่า ปลาแรนโบว์เทรทท์ที่ฉีดไคติน 100 มก./น้ำหนักปลา 1 กก มีการกระตุ้นเซลล์ macrophage และเพิ่มความต้านทานในการติดเชื้อ *V. anguillarum* นอกจากนี้ยังพบว่า ปลาหางเหลือง (yellowtail; *Seriola quinqueradiata*) ที่ฉีดด้วยไคตินสามารถเพิ่มความต้านทานโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *P. piscicida* หลังจากได้รับเชื้อในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 45 วัน (Kawakami *et al.* 1998)

ไคโตซาน (de-N-acetylated chitin) มีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเช่นกัน ดังที่พบตัวอย่างในงานวิจัยของ Anderson และคณะ (1995) ซึ่งรายงานว่าการฉีดหรือจุ่มในไคโตซานมีการเพิ่มขึ้นของระบบภูมิคุ้มกันโรค โดยสังเกตได้จาก ความสามารถในการ

การฆ่าของเซลล์ (potential killing activity) และปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินรวม (total Ig concentration)

#### 4) กลูแคน (glucan)

ผลของการใช้กลูแคนที่ได้จากผนังเซลล์ยีสต์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลาย Chen และ Ainsworth (1992) รายงานว่า ปลาตกตออเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) ที่ฉีดด้วยกลูแคนจากยีสต์มีปริมาณของแอนติบอดีโตเตอร์สูงขึ้นและเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Edwardsiella ictaluri* Jenney และ Anderson (1993) ให้กลูแคนผสมอาหารแก่ปลา Atlantic salmon ในอัตราส่วน 1 กรัม/อาหาร 1 กก. เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ปลาดังกล่าวมีความสามารถในการต้านทานการตายจากการติดเชื้อ *V. anguillarum* และ *V. salmonicida* แต่เมื่อ Duncan and Klesius (1996a) ได้ทดลองให้ยีสต์กลูแคนแก่ปลาดังกล่าว โดยการผสมอาหารในอัตรา 2.7% เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ พบว่าไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว แสดงว่า วิธีการในการให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีผลต่อการตอบสนองของปลา วิธีการให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เป็นไปได้ในทางปฏิบัติสำหรับสัตว์น้ำ คือการให้โดยการผสมอาหาร การจุ่มหรือการแช่ วิธีดังกล่าวช่วยลดความเครียดของปลา และสามารถปฏิบัติได้กับปลาปริมาณมาก อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองการใช้กลูแคนยังคงให้ผลไม่คงที่ กล่าวคือ Thompson และคณะ (1995) ได้ใช้ยีสต์กลูแคนฉีดให้ปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่า ปลาดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มความต้านทานในการติดเชื้อ *Vibrio anguillarum* ในขณะที่ Sung และคณะ (1994) กล่าวว่า กุ้งกุลาดำที่จุ่มในยีสต์กลูแคน (0.5 และ 1.0 มก/ลิตร) สามารถเพิ่มความต้านทานต่อการเกิดโรคจาก *V. vulnificus* อย่างไรก็ตาม เนื่องจากกุ้งไม่มีภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากการใช้สารดังกล่าวในกุ้งจึงน่าจะเป็นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ยีสต์กลูแคนยังมีความสามารถในการเสริมภูมิคุ้มกัน (adjuvant effect) Aakre *et al.* (1994) กล่าวว่า การใช้วัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *A. salmonicida* ควบคู่ไปกับการใช้ยีสต์กลูแคนในปลาแอตแลนติกแซลมอน มีการเพิ่มการตอบสนองของแอนติบอดี Jeney และ Anderson (1993) รายงานว่า ปลาเทราท์ (ขนาด 20-30 กรัม) ที่ฉีด

100 ไมโครกรัมของกลูแคนเข้าช่องท้องหรือแช่ด้วยกลูแคน 100 ไมโครกรัม/มล เป็นเวลา 30 นาทีร่วมกับวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *Yersinia* เพิ่มความต้านทานโรคแบบไม่จำเพาะ โดยพบว่าจำนวนของเม็ดเลือดขาวมีปริมาณสูงขึ้นและความสามารถในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมสูงขึ้น

#### 5) วิตามินและพีชชนิดต่าง ๆ

มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในการใช้วิตามินซีในการผสมอาหารเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและป้องกันโรคในสัตว์น้ำ Li and Lovell (1985) รายงานว่า ปลาตกตออเมริกันที่ให้อาหารที่มีระดับของวิตามินซี 3,000 มก/มล เป็นเวลา 13 สัปดาห์ มีอัตราการตายจากโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Edwardsiella tarda* น้อยลง ในขณะที่ Hardie และคณะ (1991) กล่าวว่า การให้อาหารปลาที่มีวิตามินซีสูง (มากกว่า 1,000 มก/มล) สามารถเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ โดยพบว่า ปลามีการทำงานของคอมพลีเมนต์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น วิตามินอีเป็นสารสำคัญอีกตัวหนึ่งที่มีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา Hardie และคณะ (1990) รายงานว่า ปลาแอตแลนติกแซลมอนที่ให้อาหารที่ไม่มีวิตามินอีเพียงพอ มีอัตราการตายเนื่องจากการติดเชื้อ *A. salmonicida* มากกว่าอาหารสำเร็จรูปปกติ Wise และคณะ (1993) กล่าวว่า ปลาตกตออเมริกันที่ได้รับวิตามินอีในปริมาณสูงจะเพิ่มประสิทธิภาพในการ phagocytosis ของเม็ดเลือดขาว ต่อมา Wahli *et al.* (1998) ทดลองให้อาหารผสมวิตามินซีและอี ในอัตราส่วน 2000:800 ppm แก่ปลาเทราท์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าจำนวนของเม็ดเลือดขาวของปลาเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากมีการกระตุ้นด้วย Concanavalin A และปลา มีอัตราการตายลดลงหลังจากมีการทดลองให้ปลาติดเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค VHS (viral hemorrhagic septicemia)

Duncan and Klesius (1996b) ได้ทดลองใช้สาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina* sp.) 2.7% ผสมอาหารให้ปลาตกตออเมริกันนาน 7 วัน พบว่าปลามีการตอบสนองในส่วนของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่สูงขึ้น โดยสังเกตจากความสามารถในการจับสิ่งแปลกปลอมของเซลล์สูงขึ้น แต่ปริมาณแอนติบอดีไม่แตกต่างกับปลาในชุดควบคุมหลังจากให้วัคซีนเชื้อตายของ *Edwardsiella ictaluri*

Direkbusarakom และคณะ (1998) รายงาน

ว่า สารสกัดจากไบโพรังและมะระขี้นก มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดจากไบโพรัง คือ 0.625 มก/มล ในขณะที่ค่า MIC ของสารสกัดจากมะระขี้นก คือ 1.25 มก/มล

#### 6) ฮอโมนเร่งการเจริญเติบโต (growth hormone)

Kajita *et al.* (1992) รายงานว่า ฮอโมนเร่งการเจริญเติบโตมีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา โดยเฉพาะการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ NCC Sakai (1997) ทดลองฉีดฮอโมนเร่งการเจริญเติบโตให้กับปลาเรนโบว์เทราท์ พบว่า ปลามีความสามารถในการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. anguillarum* สูงขึ้น

#### 7) สารสังเคราะห์ทางเคมี (synthetic chemicals)

Levamisole เป็นยากำจัดพยาธิในสัตว์บกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ยานี้จะเพิ่มความสามารถในการจับและแปลกปลอมโดยวิธีการกลืนกินของเซลล์ (phagocytosis) ของเซลล์นิวโตรฟิล และเพิ่มจำนวนของเซลล์กลืนกิน (phagocyte) จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวและระดับของ lysozyme ในเลือด รวมทั้งมีผลต่อภูมิคุ้มกันโรคมะเร็งปลาโคโฮแซลมอนที่ฉีดด้วย levamisole 0.1-0.5 มก/กก ผสมกับแอดจูแวนท์ (Freund's complete adjuvant) จะเพิ่มความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. salmonicida* (Olivier และคณะ 1985) Kajita และคณะ (1990) รายงานว่า ปลาเรนโบว์เทราท์ที่ฉีด levamisole จะเพิ่มการป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio anguillarum* โดยสารดังกล่าวจะไปเพิ่มการสร้างภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ Baba และคณะ (1993) รายงานว่า ปลาคาร์พที่ฉีดใน levamisole 10 ไมโครกรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และเพิ่มความสามารถในการ phagocytosis ผลการใช้ levamisole ในการกระตุ้นปลาอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ แต่ยังขาดการตรวจสอบถึงความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Sakai 1999)

Jorgensen *et al.* (2001) รายงานว่า ส่วนของดีเอ็นเอที่สร้างขึ้น (synthetic oligodeoxynucleotides) ซึ่งมีลำดับเบสไซโตซีนตามด้วยกัวนีน (CpG) สามารถกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลา Atlantic salmon ให้

สร้างไซโตคายน์ที่มีความสามารถในการทำลายเชื้อไวรัส

### สรุปและวิจารณ์

ปัจจุบันมีรายงานการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลามากขึ้น โดยปลาที่ได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสามารถป้องกันตนเองจากโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย อันได้แก่ *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *A. salmonicida* และ *Streptococcus* sp. รวมถึงโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส เช่น Infectious hematopoietic necrosis (IHN) แต่สารเหล่านี้ไม่สามารถป้องกันปลาจากการติดเชื้อทุกชนิดได้ (Sakai 1999) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียจำพวก *Renibacterium salmonarum* และ *E. ictaluri* ที่มีความสามารถที่จะหลบหลีกจากการจับกินของเซลล์กลืนกินสิ่งแปลกปลอม

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเหล่านี้ยังมีผลดีต่อสัตว์น้ำอย่างอื่นด้วย เช่น Sung และคณะ (1994) กล่าวว่า กุ้งกุลาดำจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น เมื่อจุ่มในกลูแคนความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 มก/มล เมื่อปลามีความแข็งแรงแล้วจะเห็นได้ว่า ปลามีความสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่แปรปรวนเพิ่มขึ้น ดังรายงานของ Boonyaratpalin และคณะ (1995) ที่ใช้ peptidoglycan ผสมอาหารให้กุ้งกุลาดำ แล้วพบว่า กุ้งกุลาดำสามารถทนต่อการปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่ลดลง ความเค็มและความเครียดได้มากขึ้น

ระยะเวลาที่ควรจะใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และระยะเวลาในการป้องกันสัตว์น้ำจากการติดเชื้อหลังสิ้นสุดการให้สารกระตุ้น เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน กล่าวคือ การให้สารกระตุ้นเหล่านี้ควรกระทำก่อนการเกิดระบาดของเชื้อโรค Matsuo และ Miyazano (1993) รายงานว่า ปลาเรนโบว์เทราท์ที่ให้กิน peptidoglycan เป็นเวลา 56 วันไม่สามารถป้องกันการตายจากการติดเชื้อ แม้ว่าปลาที่ให้ peptidoglycan จำนวน 28 วัน จะสามารถเพิ่มความสามารถในการป้องกันโรคก็ตาม จากปรากฏการณ์ดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ว่า สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจะมีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเป็นหลัก ทำให้ไม่มีระบบความจำ นอกจากนี้ Sakai และคณะ (1999) กล่าวว่า การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเหล่านี้ในปริมาณที่มากเกินไป (overdose) และ

ยาวนานเกินไปจะมีประสิทธิภาพดังกล่าวลดลง โดยอาจมีผลทำให้เกิดภาวะการไม่ตอบสนองต่อแอนติเจนนั้นๆ ในภายหลัง (immunological tolerance)

แม้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีมีส่วนสำคัญอย่างมากในการควบคุมการเกิดโรคสัตว์น้ำ การให้วัคซีน การใช้โพรไบโอติก (probiotics) และการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน น่าจะปลอดภัยกว่า ควบคุมโรคโดยใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่วมกับการใช้วัคซีนเพื่อทำให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคของวัคซีนสูงขึ้นเป็นสิ่งจำเป็นในการพัฒนาวัคซีนปลา การพัฒนาความรู้ด้านภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ ช่วยสร้างความกระจ่างในข้อจำกัดและกลไกการทำงานของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่างๆ ที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ความรู้เหล่านี้จะนำไปสู่เครื่องมือที่สำคัญในการควบคุมโรคสัตว์น้ำ หวังว่า งานเขียนชิ้นนี้จะช่วยจุดประกายให้นักวิจัยได้ร่วมมือกันในการหาแนวทางในการศึกษาวิจัยเรื่องนี้อย่างจริงจัง เพื่อให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้คงอยู่ยั่งยืน โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค

#### เอกสารอ้างอิง

- Aakre, R., Wergeland, H.I., Aasjord, P.M., and Endersen, C. 1994. Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing  $\beta$ -1, 3-M-glucan as adjuvant. *Fish and Shellfish Immunology* 4: 47-61.
- Anderson, D.P. 1996. Environmental factors in fish health: immunological aspects. The fish immune system: organism, pathogen, and environment. Academic Press, INC.: 289-310
- Anderson, D.P., Siwicki, A.K., and Rumsey, G.L. 1995. Injection or immersion delivery of selected immunostimulants to trout demonstrate enhancement of nonspecific defense mechanisms and protective immunity. In: Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), Diseases in Asian Aquaculture Vol 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 413-426.
- Baba, T., Watase, Y., and Yoshinaga, Y. 1993. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 301-307.
- Boonyaratpalin, S., Boonyaratapalin, M., Supamttaya, K., and Toride, Y. 1995. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune responses, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In: Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), Diseases in Asian Aquaculture Vol 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 469-477.
- Chen, D. and Ainsworth, A.J. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. *J. of Fish Diseases* 15: 295-304.
- Clem, L.W., Sizemore, R.C., Ellsaesser, C.F., and Miller, N.W. 1985. Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Developmental and Comparative Immunology* 9: 803-809.
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K. and Bogwald, J. 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J. of Fish Diseases* 20: 241-273.
- Direkbusarakom, S., Ezura, Y., Yoshimizu, M., and Herunsalee, A. 1998. Efficacy of Thai traditional herb extracts against fish and shrimp pathogenic bacteria. *Fish Pathology* 33: 437-441
- Duncan, P.L. and Klesius, P.H. 1996a. Dietary immunostimulants nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. *J. of Aquatic Animal Health*. 8: 241-248.
- Duncan, P.L. and Klesius, P.H. 1996b. Effects of feeding *Spirulina* on specific and nonspecific immune responses of channel catfish. *J. of Aquatic Animal Health* 8: 308-313.
- Estevez, J., Leiro, J., Toranzo, A.E., Barja, J.L. and Ubeira, F.M. 1994. Kinetics of antibody production against *Vibrio anguillarum* antigens in turbot. *Aquaculture* 123: 191-196.
- Evans, D.L. and Jaso-Friedmann, L. 1992. Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 109-121.

- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., and Secombes, C.J. 1990. The effect of dietary Vitamin E on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 87: 1-13.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., and Secombes, C.J. 1991. The effect of dietary Vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 95: 201-214.
- Jeney, G. and Anderson, D.P. 1993. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 116: 315-329.
- Jorgensen, J.B., Johansen, A., Stenersen, B., and Sommer, A.I. 2001. CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 313-321.
- Kajita, Y., Sakai, M., and Kobayashi, M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathology* 25: 93-98.
- Kajita, Y., Sakai, M., Kobayashi, M., and Kawauchi, H. 1992. Enhancement of nonspecific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, injected with growth hormone. *Fish and Shellfish Immunology* 2: 155-157.
- Kawakami, H., Hiratsuka, M., and Dosako, S. 1998. The nonspecific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin or Freund's complete adjuvant in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* to *Pasteurella piscicida* infection. *Fish Pathology* 33: 287-292.
- Kruse, H. and Sorum, H. 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied Environmental Microbiology* 60: 4015-4021.
- Li, Y. and Lovell, R.T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. of Nutrition* 115: 123-131.
- Matsuo, K. and Miyazano, I. 1993. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 1377-1379.
- Oliver, G., Evelyn, T.P.T, and Lallier, R. 1985. Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. *Developmental and Comparative Immunology* 9: 419-432.
- Sakai, M., Kamiya, H., Ishii, S., Atsuta, S., and Kobayashi, M. 1992. The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). In: Shariff, M., Subasighe, R.P. Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Phillippines*, pp. 413-417.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172: 63-92.
- Secombes, C.J., Hardie, L.J., and Daniels, G. 1996. Cytokines in fish: an update. *Fish and Shellfish Immunology* 6: 291-304.
- Sung, H.H., Kou, G.H., and Song, Y.L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* 29: 11-17.
- Thompson, K.D., Cachos, A., and Inglis, V. 1995. Immunomodulating effects of glucans and oxytetracycline in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) on serum lysozyme and protection. In: Shariff, M., Subasighe, R.P. Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines*, pp. 433-439.
- Vadstein. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture* 155: 401-417.
- Wahli, T., Verlhac, V., Gabaudan, J., Schuep, W., and Meier, W. 1998. Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. of Fish Diseases* 21: 127-137.
- Wise, D.J., Tomasso, J.R., Schwedler, T.E., Blazer, V.S., and Gatlin, D.M. III. 1993. Effect of vitamin E on the immune responses of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. *J. of Aquatic Animal Health* 5: 183-188.



กองบรรณาธิการ ขอแจ้งข่าวการพัฒนาวารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (วท.) 2 ประการ คือ 1. การปรับปรุงวารสารให้เป็นวารสาร ราย 2 เดือน (6 ฉบับ/ปี) และ 2. การจัดทำเป็นวารสารอิเล็กทรอนิกส์ (E-journal) และ ลงพิมพ์ข้อคิดเห็นทางวิชาการของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไตรภพ ผ่องสุวรรณ ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งมีความเห็นต่อบทความ **เรื่อง การศึกษาสารกัมมันตรังสีของหินชนิดต่าง ๆ ในจังหวัดปัตตานี ด้วยรังสีแกมมาสเปกโตรมิเตอร์** โดยกองบรรณาธิการ ได้ส่งข้อคิดเห็นดังกล่าวไปยังผู้แนะนำเสนอบทความแล้ว เมื่อวันที่ 31 กรกฎาคม 2545 แต่กองบรรณาธิการ ยังไม่ได้รับการชี้แจงจากผู้แนะนำเสนอบทความ เมื่อกองบรรณาธิการ ได้รับการชี้แจงจากผู้แนะนำเสนอบทความ หรือประเด็นอื่นๆ จากผู้อ่านเพิ่มเติม กองบรรณาธิการ จะพิจารณานำเสนอตีพิมพ์ในวารสาร ฉบับต่อไป กองบรรณาธิการ มุ่งหวังว่า การมีความเห็นของผู้อ่านต่อบทความ และการชี้แจงของผู้เสนอบทความจะเป็นแนวทางในการสร้างวัฒนธรรมทางวิชาการให้เกิดขึ้นในสังคมวิชาการของประเทศไทย ทำให้เห็นถึงการเคลื่อนไหวทางวิชาการ ซึ่งจะนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ต่อไปได้

สำหรับประเด็นการพัฒนาวารสาร 2 ประการ ซึ่งกล่าวถึงข้างต้น มีรายละเอียด ดังนี้

1. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้เริ่มจัดทำวารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวท. มาตั้งแต่ พ.ศ. 2520 จนถึงปัจจุบันเป็นปีที่ 24 แล้ว จากการดำเนินงานที่ผ่านมา วารสารสงขลานครินทร์ ฯ ได้รับการพัฒนามาเป็นที่ยอมรับในวงการวิชาการมากขึ้น ดังผลการวิจัยของ รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ฤทธิ์ สมบัติสมภพ และคณะ จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ธนบุรี ซึ่งได้รับทุนวิจัยจาก สกว. พบว่า วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวท. เป็น 1 ใน 4 ของวารสารวิชาการภายในประเทศที่ได้รับการอ้างอิงอย่างต่อเนื่อง และปรากฏค่าดัชนีผลกระทบการอ้างอิงทุกปี (ณรงค์ฤทธิ์ สมบัติสมภพ และคณะ. 2544. ดัชนีผลกระทบการอ้างอิงของวารสารวิชาการภายในประเทศ : ตอนที่ 1 รายงานผลการวิจัยเบื้องต้น ว.วิจัยและพัฒนา มจร. 24(3) : 355-370) และยังพบว่า วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวท. เป็นวารสาร 1 ใน 2 ฉบับที่มีค่าดัชนีความเร็วของบทความที่ถูกนำไปอ้างอิงในจำนวน 4 ปี ของในรอบ 5 ปี ที่ทำการศึกษา (ณรงค์ฤทธิ์ สมบัติสมภพ และคณะ. 2545. ดัชนีผลกระทบการอ้างอิงของวารสารวิชาการภายในประเทศ : ตอนที่ 2 ความเร็วของบทความที่ถูกนำไปอ้างอิง ว.วิจัยและพัฒนา มจร. 25(1) : 87-95)

จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้มีผู้สนใจส่งต้นฉบับมายังกองบรรณาธิการ เพื่อให้พิจารณาตีพิมพ์เป็นจำนวนมาก เป็นผลให้บทความที่ผ่านการพิจารณาตีพิมพ์ตามกระบวนการตรวจสอบของกองบรรณาธิการ แล้ว ต้องรอเวลานานกว่าจะได้ลงตีพิมพ์เผยแพร่ เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว กองบรรณาธิการ จึงกำหนดระยะเวลาการตีพิมพ์วารสารใหม่ ซึ่งปัจจุบันกำหนดระยะเวลาการตีพิมพ์เป็นวารสาร ราย 3 เดือน (quarterly) หรือ 4 ฉบับ/ ปี **โดยกำหนดใหม่ให้เป็นวารสารราย 2 เดือน (bimonthly) หรือ 6 ฉบับ/ ปี** โดยจะเริ่มตีพิมพ์ฉบับแรกในปี พ.ศ. 2546 คือ ฉบับปีที่ 25 ฉบับที่ 1 (มกราคม - กุมภาพันธ์ 2546) ซึ่งกองบรรณาธิการ หวังว่าจะทำให้ต้นฉบับที่ผ่านการพิจารณาตีพิมพ์ตามกระบวนการตรวจสอบของวารสารแล้ว ได้รับการตีพิมพ์เร็วขึ้น

2. เพื่อให้วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวทท. ได้รับการเผยแพร่อย่างกว้างขวางและสะดวกมากยิ่งขึ้น กองบรรณาธิการ จึงได้จัดทำเป็นวารสารอิเล็กทรอนิกส์ (E-journal) ซึ่งปัจจุบันได้จัดทำแล้ว 4 ฉบับ คือ ฉบับปีที่ 24 เล่มที่ 1-3 และฉบับพิเศษ (ฉบับปาล์มน้ำมัน) ซึ่งผู้ใช้บริการสามารถอ่านบทความของวารสารฯ ทั้ง 4 ฉบับ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เข้า Website มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คือ <http://www.psu.ac.th/> หรือ

<http://www.psu.ac.th/psuroot2>

2. กด (click) เลือกหัวข้อ PSU E-Journals จะปรากฏหน้า Website ของวารสารสงขลานครินทร์ฯ เนื้อหาที่ปรากฏจะมีรายละเอียดตามหัวข้อ ดังนี้

**หัวข้อ Editorial Office** - แนะนำกองบรรณาธิการฯ โดยผู้สนใจสามารถติดต่อ

หัวหน้ากองบรรณาธิการ คือ รองศาสตราจารย์ ดร.ชาคริต ทองอุไร

ผ่านทาง e-mail : [tchakrit@ratree.psu.ac.th](mailto:tchakrit@ratree.psu.ac.th) และติดต่อ

สำนักงานวารสารฯ ผ่าน e-mail : [ksasiton@ratree.psu.ac.th](mailto:ksasiton@ratree.psu.ac.th)

**หัวข้อ Instructions to Authors** - คำแนะนำสำหรับผู้เขียนที่จะส่งบทความมาลงตีพิมพ์

**หัวข้อ Manuscript Status** - สำหรับการสืบค้นสถานภาพของบทความ ใช้สำหรับผู้ที่จะส่งบทความมาลงตีพิมพ์ ซึ่งจะมีรหัสบทความที่กองบรรณาธิการฯ ให้ไว้สำหรับสืบค้น

**หัวข้อ Published Articles** - จะพบสารบัญ เล่มที่ เลขที่ (Volume, Number) และเนื้อหาของบทความแต่ละฉบับ และผู้ใช้สามารถ download บทความที่ต้องการได้

**หัวข้อ Subscription** - เป็นใบบอกรับเป็นสมาชิก ผู้สนใจสามารถ download ได้

**หัวข้อ Acrobat reader for download** - โปรแกรมสำหรับอ่านไฟล์สกุล .pdf

**หัวข้อ Current Volume** - บทความในเล่มปัจจุบัน

กองบรรณาธิการฯ จะกำหนดระยะเวลาการนำเสนอบทความในวารสารอิเล็กทรอนิกส์ ไว้ 5 ปี (20 ฉบับ) เมื่อจัดทำฉบับใหม่ก็จะลบฉบับแรกออกไป โดยกองบรรณาธิการฯ จะจัดทำย้อนหลังจากปีที่ 24 ลงไปถึงปีที่ 20

สำหรับการพัฒนาในขั้นต่อไป กองบรรณาธิการฯ จะพยายามให้ผู้ใช้บริการมีความสะดวกในการสืบค้นมากยิ่งขึ้น โดยผู้อ่านสามารถสืบค้น (search) บทความจากชื่อผู้เขียน หรือจากคำสำคัญ (key words) ได้ เมื่อพัฒนาโปรแกรมดังกล่าวแล้วเสร็จ กองบรรณาธิการฯ จะแจ้งให้ทราบต่อไป

หากท่านผู้อ่านมีข้อเสนอให้กองบรรณาธิการฯ เพื่อพัฒนา ปรับปรุง หรือ แก้ไข ในประเด็นใด สามารถเสนอความเห็นมายังกองบรรณาธิการฯ ได้ตลอดเวลา ตาม e-mail ข้างต้น



(รองศาสตราจารย์ ดร.ชาคริต ทองอุไร)

หัวหน้ากองบรรณาธิการวารสารสงขลานครินทร์

ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี





## บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ   ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ โทร. 074-288761

ที่               วันที่ 22 กรกฎาคม 2545

เรื่อง   สอบถามข้อสงสัยในนิพนธ์ต้นฉบับ ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(2)

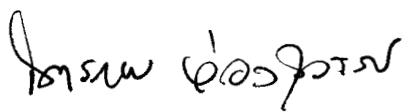
เรียน   บรรณาธิการ ว.สงขลานครินทร์ วทท.

ผมได้อ่านนิพนธ์ต้นฉบับเรื่อง “การวิเคราะห์ปริมาณ ยูเรเนียม ทอเรียมและโพแทสเซียม ของหินใน จังหวัดนราธิวาส ด้วยเกมมาสเปกโตรเมตรี” ที่ลงตีพิมพ์ใน ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(2) : 293-303 แล้วเกิดมีข้อสงสัยบางประการ จึงใคร่ขอเรียนถามท่านผู้ทำวิจัย เพื่อความกระจ่างดังต่อไปนี้

1. เนื่องจาก รังสีแกมมาภูมิหลัง (background gamma-ray) ในธรรมชาติก็มีพลังงานสูงเช่นกัน เพราะมีต้นกำเนิดมาจากไอโซโทปชนิดเดียวกับไอโซโทปที่กำลังวิเคราะห์ (K-U-Th) และแม้ว่าจะใช้กำบังตะกั่วล้อมหุ้มแล้วก็ตาม ก็ยังคงมีรังสีเข้าสู่หัววัดอยู่ระดับหนึ่ง ผู้วิจัยจึงน่าจะแสดงข้อมูลของภูมิหลังพร้อมรูปสเปกตรัม และตัวอย่างสเปกตรัมของตัวอย่างหินที่วัดมา 1-2 ตัวอย่าง
2. เนื่องจากจำนวนตัวอย่างหินที่ตรวจสอบไม่ได้มีจำนวนมากจนเกินไป จึงเห็นว่าควรเพิ่มเติมตารางแสดงผลการวิเคราะห์สเปกตรัมของภูมิหลังและของตัวอย่างหินแต่ละตัวอย่าง ได้แก่ Background count rates in K-, U-, Th-Channels; Uncorrected count rates in K-, U-, Th-Channels ของตัวอย่างหินที่วัด และ Corrected count rates in K-, U-, Th-Channels และผลการวิเคราะห์หาปริมาณ K-U-Th ของตัวอย่างหินแต่ละตัว
3. ไม่ทราบว่าผู้วิจัยได้ทำการปรับแก้คอมพ์ตัน (Compton Correction) ของระบบวัดหรือไม่?? เนื่องจากการใช้หัววัด NaI(Tl) ซึ่งมีกำลังแยกพลังงานต่ำ จำเป็นต้องปรับแก้คอมพ์ตันที่เกิดจากการ scattering ของ higher  $\gamma$ -ray energies (ของ Tl-208, Bi-214) แล้วไปตกอยู่ใน lower energy channels (ของ Bi-214 และ K-40) หากผู้วิจัยได้ทำแล้ว ก็น่าจะแสดงค่า Compton Correction Coefficients ของระบบวัดที่ใช้ด้วย
4. กราฟเปรียบเทียบมาตรฐานที่ผู้วิจัยได้แสดงไว้นั้น ในความเห็นของผม คงใช้ได้กับกรณีตัวอย่างที่มีไอโซโทปเดียวของ K-40 หรือ Bi-214 หรือ Tl-208 เท่านั้น แต่คงไม่สามารถใช้ได้กับกรณีของตัวอย่างหิน ที่มีทั้ง 3 ไอโซโทปประกอบอยู่ เนื่องจากจะต้องมีการปรับแก้ Compton ของระบบวัดเสียก่อน

จึงเรียนถามมาผ่านท่านบรรณาธิการ เพื่อขอให้ท่านผู้วิจัยกรุณาตอบเพื่อให้เกิดความกระจ่างแก่ผู้อ่าน และน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านพัฒนาการด้านการศึกษาวิจัยกัมมันตภาพรังสีในธรรมชาติ ให้มีมาตรฐานทัดเทียมต่างประเทศ

ขอแสดงความนับถือ



(ผศ.ดร.ไตรภพ ผ่องสุวรรณ)

ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



**ประกาศเกียรติคุณผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาต้นฉบับ  
วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
ปีที่ 24 (ฉบับที่ 1-4) พ.ศ. 2545 และฉบับพิเศษ (ปาล์มน้ำมัน)**

ด้วยวารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ 24 (ฉบับที่ 1-4) ประจำปี 2545 และฉบับพิเศษ (ปาล์มน้ำมัน) ได้รับความกรุณาจากผู้ทรงคุณวุฒิหลายท่าน จากหลายหน่วยงาน โดยการสละเวลาและความคิดในการตรวจต้นฉบับบทความประเภทต่างๆ ด้วยความอุตสาหะ ยังผลให้วารสารสงขลานครินทร์ฯ ดำเนินการไปด้วยความสมบูรณ์ยิ่ง ซึ่งนอกจากเป็นการดำรงไว้ซึ่งมาตรฐานทางวิชาการแล้ว ยังก่อให้เกิดคุณูปการทางวิชาการ อีกทั้งได้ร่วมสร้างบรรยากาศทางวิชาการ และเป็นการเผยแพร่ ชื่อเสียงของมหาวิทยาลัยด้วย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จึงใคร่ขอขอบพระคุณและประกาศเกียรติคุณผู้ทรงคุณวุฒิ ดังรายนามต่อไปนี้ไว้ ณ ที่นี้

**ก. ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย**

**1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**

|                                  |                |
|----------------------------------|----------------|
| 1. ศ.ดร.ขวัญชัย สมบัติศิริ       | คณะเกษตร       |
| 2. ศ.ดร.จรัญ จันทลักขณา          | คณะเกษตร       |
| 3. รศ.ดร.จรัสพงษ์ จันทร์เจริญสุข | คณะเกษตร       |
| 4. ศ.ดร.ทักษิณีย์ อัดตะนันท์     | คณะเกษตร       |
| 5. ศ.ดร.ธรรมศักดิ์ สมมาตย์       | คณะเกษตร       |
| 6. ศ.ดร.พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์    | คณะเกษตร       |
| 7. ศ.ดร.สายัณห์ ทัดศรี           | คณะเกษตร       |
| 8. ศ.ดร.สุรนนต์ สุภัทรพันธุ์     | คณะเกษตร       |
| 9. รศ.ดร.อรดี สหวัชรินทร์        | คณะเกษตร       |
| 10. รศ.ดร.อภิพรพรณ พุกภักดี      | คณะเกษตร       |
| 11. ผศ.ดร.นนทวิทย์ อารีชน        | คณะประมง       |
| 12. ศ.ลัดดา วงศ์รัตน์            | คณะประมง       |
| 13. ศ.ดร.ลีปสิน สนธิรัตน์        | คณะประมง       |
| 14. รศ.ดร.บุญเกื้อ วัชรเสถียร    | คณะวิทยาศาสตร์ |
| 15. ศ.ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ         | คณะวิทยาศาสตร์ |

- |                                  |                    |
|----------------------------------|--------------------|
| 16. รศ.ดร.สาวิตรี ลิ้มทอง        | คณะวิทยาศาสตร์     |
| 17. รศ.ดร.สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล  | คณะวิทยาศาสตร์     |
| 18. รศ.ดร.กรกฎ วัฒนวิเชียร       | คณะวิศวกรรมศาสตร์  |
| 19. ผศ.ดร.ปฐมภรณ์ ศรีผดุงธรรม    | คณะวิศวกรรมศาสตร์  |
| 20. รศ.ดร.พิภพ ลลิตาภรณ์         | คณะวิศวกรรมศาสตร์  |
| 21. รศ.ดร.วินัย เลียงเจริญสิทธิ์ | คณะวิศวกรรมศาสตร์  |
| 22. รศ.ดร.สุรศักดิ์ สงวนพงษ์     | คณะวิศวกรรมศาสตร์  |
| 23. รศ.ดร.สุคนธ์ชื่น ศรีงาม      | คณะอุตสาหกรรมเกษตร |
| 24. ดร.เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ      |                    |

## 2. มหาวิทยาลัยขอนแก่น

- |                               |                   |
|-------------------------------|-------------------|
| 1. ศ.ดร.บุญฤา วิไลพล          | คณะเกษตรศาสตร์    |
| 2. รศ.ดร.สนั่น จอกลอย         | คณะเกษตรศาสตร์    |
| 3. รศ.มนตรี บุญเสนอ           | คณะเทคโนโลยี      |
| 4. ผศ.ดร.พรเทพ ขอบข่ายเกียรติ | คณะวิศวกรรมศาสตร์ |
| 5. รศ.พัชรี หอวิจิตร          | คณะวิศวกรรมศาสตร์ |
| 6. ศ.ดร.เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล | คณะสัตวแพทยศาสตร์ |

## 3. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- |                                      |                            |
|--------------------------------------|----------------------------|
| 1. รศ.ศิริชัย พงษ์วิชัย              | คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี |
| 2. รศ.จันทน์ อธิพานิชพงศ์            | คณะแพทยศาสตร์              |
| 3. รศ.นพ.อนันต์ ศรีเกียรติขจร        | คณะแพทยศาสตร์              |
| 4. รศ.ดร.กาญจน์พิมล ฤทธิเดช          | คณะเภสัชศาสตร์             |
| 5. รศ.กัญญา บุญเกียรติ               | คณะวิทยาศาสตร์             |
| 6. รศ.ดร.กันยารัตน์ ไชยสุต           | คณะวิทยาศาสตร์             |
| 7. รศ.ดร.ครรชิต ธรรมศิริ             | คณะวิทยาศาสตร์             |
| 8. รศ.ดร.จักษ์ อัสวานันท์            | คณะวิทยาศาสตร์             |
| 9. ผศ.ดร.เจริญ นิตธรรมยง             | คณะวิทยาศาสตร์             |
| 10. ศ.ดร.ทศพร วงศ์รัตน์              | คณะวิทยาศาสตร์             |
| 11. รศ.นันทนา อังกนันท์              | คณะวิทยาศาสตร์             |
| 12. รศ.ณัฐรัตน์ ปภาวสิทธิ์           | คณะวิทยาศาสตร์             |
| 13. ผศ.ดร.สมชาย นาคะผดุงรัตน์        | คณะวิทยาศาสตร์             |
| 14. รศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรดิวิรรกุล | คณะวิทยาศาสตร์             |
| 15. รศ.อัปสรสุดา ศิริพงศ์            | คณะวิทยาศาสตร์             |
| 16. ผศ.ดร.จิรพัฒน์ เภาประเสริฐวงศ์   | คณะวิศวกรรมศาสตร์          |
| 17. อ.ไชยา แซ่มซ้อย                  | คณะวิศวกรรมศาสตร์          |

- |                                   |                                |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| 18. รศ.นเรศร์ จันทน์ขาว           | คณะวิศวกรรมศาสตร์              |
| 19. รศ.ดร.ภิญโญ มีชำนะ            | คณะวิศวกรรมศาสตร์              |
| 20. ศ.ดร.วิวัฒน์ ตัณฑพานิชกุล     | คณะวิศวกรรมศาสตร์              |
| 21. ดร.สัญญา นิลสุวรรณโฆสิต       | คณะวิศวกรรมศาสตร์              |
| 22. รศ.นสพ.ดร.จิโรจ ศศิปรียจันทร์ | คณะสัตวแพทยศาสตร์              |
| 23. รศ.ดร.สุเมธ ชวเดช             | วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี |
| 24. ดร.เพียรพรอค ทศคร             | สถาบันทรัพยากรพลังงาน          |

**4. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**

- |                                 |                    |
|---------------------------------|--------------------|
| 1. รศ.เกศินี ระมิงวงศ์          | คณะเกษตรศาสตร์     |
| 2. รศ.ดร.บุญล้อม ชีวะอิสระกุล   | คณะเกษตรศาสตร์     |
| 3. รศ.ดร.บุญเสริม ชีวะอิสระกุล  | คณะเกษตรศาสตร์     |
| 4. รศ.ดร.พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์   | คณะเกษตรศาสตร์     |
| 5. รศ.ดร.อำไพ ปันทอง            | คณะแพทยศาสตร์      |
| 6. รศ.ดร.บุญสม เหลียวเรืองรัตน์ | คณะเภสัชศาสตร์     |
| 7. ศ.ดร.ทวี ตันมศิริ            | คณะวิทยาศาสตร์     |
| 8. รศ.ไพฑูรย์ เล็กสวัสดิ์       | คณะวิทยาศาสตร์     |
| 9. รศ.วิยะดา ตันวัฒนากุล        | คณะวิทยาศาสตร์     |
| 10. รศ.เสาวภา สนธิไชย           | คณะวิทยาศาสตร์     |
| 11. รศ.ดร.เบญจวรรณ รัตนเสถียร   | คณะวิทยาศาสตร์     |
| 12. รศ.ดร.ศุวศา กานตวนิชกุล     | คณะวิศวกรรมศาสตร์  |
| 13. รศ.ดร.สมใจ กาญจนวงศ์        | คณะวิศวกรรมศาสตร์  |
| 14. ผศ.ดร.อมรินทร์ บุญตัน       | คณะวิศวกรรมศาสตร์  |
| 15. รศ.ดร.เอกชัย แสงอินทร์      | คณะวิศวกรรมศาสตร์  |
| 16. รศ.ดร.นัยทัศน์ ภูธรณย์      | คณะอุตสาหกรรมเกษตร |
| 17. รศ.ดร.เรณู ปันทอง           | คณะอุตสาหกรรมเกษตร |

**5. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ธนบุรี**

- |                                 |                    |
|---------------------------------|--------------------|
| 1. ศ.ดร.จุลละพงศ์ จุลละโพธิ์    | คณะพลังงานและวัสดุ |
| 2. รศ.ดร.ณรงค์ฤทธิ์ สมบัติสมภพ  | คณะพลังงานและวัสดุ |
| 3. รศ.ดร.รัตนา จิระรัตนานนท์    | คณะวิศวกรรมศาสตร์  |
| 4. ผศ.ดร.วีระ โลหะ              | คณะวิศวกรรมศาสตร์  |
| 5. ผศ.ดร.สุภาภรณ์ เชื้อประเสริฐ | คณะวิศวกรรมศาสตร์  |

**6. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี**

- |                           |                            |
|---------------------------|----------------------------|
| 1. ศ.ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ | สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร |
|---------------------------|----------------------------|

**7. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์**

1. ดร.ชัยณรงค์ อิงคากุล
2. ผศ.ดร.กฤติยา เลิศโกยะสมบัติ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
คณะวิศวกรรมศาสตร์

**8. มหาวิทยาลัยนเรศวร**

1. รศ.ปริญญ์นันท์ แสนโกชน์
2. รศ.ดร.สุมาลี สุทธิประดิษฐ์

คณะวิทยาศาสตร์  
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

**9. มหาวิทยาลัยบูรพา**

1. รศ.ดร.วราวิทย์ ชีวาพร
2. ผศ.ดร.วิโรจน์ เรืองประเทืองสุข

คณะวิทยาศาสตร์  
คณะวิศวกรรมศาสตร์

**10. มหาวิทยาลัยมหิดล**

1. รศ.ดร.พิมพ์พิชญา ปัทมสิริวัฒน์
2. รศ.ดร.นันทวัน บุญยประภัสร์
3. ผศ.ดร.จิตต์ลัดดา ศักดาภิพาณีย์
4. ผศ.ดร.ชาคริต สิริสิงห์
5. รศ.ดร.ประมวล ตั้งบริบูรณ์รัตน์
6. ศ.ดร.ยงศ์วิมล เลณบุรี
7. รศ.ดร.วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด

คณะเทคนิคการแพทย์  
คณะเภสัชศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์

**11. มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์**

1. ศ.ดร.วินัย ประถมพกาญจน์
2. ดร.วรรณา ชูฤทธิ์
3. รศ.ดร.อนุชิต ชินาจริยวงศ์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร  
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร  
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

**12. มหาวิทยาลัยศิลปากร**

1. ผศ.ดร.ชาคร วิภูษณวนิช
2. รศ.ดร.สืบสกุล อยู่ยืนยง
3. ดร.อารีย์ ทองภักดี

คณะวิทยาศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์

**13. สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย**

1. ศ.ดร.สุภัทท์ วงศ์วิเศษสมใจ

สำนักวิชาวิศวกรรมโยธา

**14. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง**

1. รศ.ดร.รณชัย ลิทธิไกรพงษ์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

2. รศ.ดร.สุมิตรา ภู่วโรดม
3. รศ.ดร.อิทธิสุนทร นันทกิจ
4. รศ.ดร.กิตติ ไพฑูรย์วัฒนกิจ
5. ดร.ประกอบ กิจไชยา

คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
คณะวิศวกรรมศาสตร์  
คณะวิศวกรรมศาสตร์

#### 15. สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ

1. ผศ.ดร.สมพร จงศ์คำ

#### 16. นักวิชาการอิสระ

1. รศ.ธงชัย พึ่งรัมย์

#### 17. กรมประมง

1. ดร.กมลพร ทองอุไทย
2. นายคณิต ไชยาคำ
3. ดร.จกณีย์ แซ่มช้าง
4. ดร.จวบดี พงศ์มณีรัตน์
5. ดร.พุทธร ส่องแสงจินดา
6. นายไพโรจน์ สิริมนตาภรณ์
7. นายวุฒิชัย เจนการ
8. ดร.สุพิศ ทองรอด
9. ดร.อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล

สำนักวิชาการ  
กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง  
ศูนย์พัฒนาประมงทะเล อ่าวไทยตอนบน  
กองควบคุมและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำ  
ศูนย์วิจัยกุ้งทะเล จ.สงขลา  
สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง  
สถาบันวิจัยชีววิทยาและประมงทะเล  
กองควบคุมและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำ  
สถาบันวิจัยสัตว์สวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ

#### 18. กรมวิชาการเกษตร

1. ดร.จินดา จันท์อ่อน
2. นายมนตรี จิรสรัตน์
3. นายสุวัฒน์ จันท์ปรณิก

สถาบันวิจัยพืชไร่  
กองกัญและสัตววิทยา  
ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี

#### 19. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ

1. ดร.สมนึก ศิริสุนทร
2. ดร.อศิรา เฟื่องฟูชาติ
3. ดร.ศุภฤกษ์ อัครวิทยาพันธ์

#### 20. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

1. ดร.เฉลิมพล เกติมณี
2. ดร.รุจ วัลยะเสวี

**21. ศูนย์วิจัยและบันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้**

1. สพญ.ช้องมาศ อันตรเสน

**บ. ผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย****1. คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม**

1. ดร.ปาริชาติ ทวีบุรุษ
2. รศ.ณรงค์ ภู เชียงใหม่
3. รศ.ดร.โรจน์จรรย์ย์ ด้านสวัสดิ์

**2. คณะทรัพยากรธรรมชาติ**

1. รศ.พัลลภา กฤษณียไพบูลย์
2. ผศ.ดร.เสียง กฤษณียไพบูลย์
3. รศ.ดร.สุรไกร เพิ่มคำ
4. รศ.ดร.ชัยรัตน์ นิลนนท์
5. ดร.ปราโมทย์ แก้ววงศ์ศรี
6. ผศ.ดร.จรัสศรี นวลศรี
7. ผศ.ดร.ประวิตร โสภโณตร
8. รศ.ดร.สมปอง เตชะโต
9. รศ.ดร.สายัณห์ สดุดี
10. ผศ.ดร.อภิรักษ์ กำนัลรัตน์
11. ผศ.ดร.ชุติมา ตันติกิตติ
12. รศ.ดร.สมหมาย เขียววารีสังจะ
13. ผศ.ดร.วันวิสาข์ งามผ่องใส
14. รศ.ดร.ศิริชัย ศรีพงษ์พันธุ์
15. รศ.นสพ.สุรพล ชลดำรงกุล
16. ผศ.ดร.สุรศักดิ์ คชภักดี
17. สพญ.อุษา เชษฐานนท์

ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช  
 ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช  
 ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช  
 ภาควิชาธรณีศาสตร์  
 ภาควิชาธรณีศาสตร์  
 ภาควิชาพืชศาสตร์  
 ภาควิชาพืชศาสตร์  
 ภาควิชาพืชศาสตร์  
 ภาควิชาพืชศาสตร์  
 ภาควิชาพืชศาสตร์  
 ภาควิชาพืชศาสตร์  
 ภาควิชาสัตวศาสตร์  
 ภาควิชาสัตวศาสตร์  
 ภาควิชาสัตวศาสตร์  
 ภาควิชาสัตวศาสตร์  
 ภาควิชาสัตวศาสตร์  
 ภาควิชาสัตวศาสตร์  
 ภาควิชาสัตวศาสตร์

**3. คณะแพทยศาสตร์**

1. รศ.นพ.วิญญู มิตรานันท์
2. ดร.อุไรรัตน์ คงเมือง

ภาควิชาพยาธิวิทยา  
 ภาควิชาพยาธิวิทยา

**4. คณะเภสัชศาสตร์**

1. รศ.ดร.วันทนา เจริญมงคล
2. ผศ.ดร.นิวัติ แก้วประดับ

ภาควิชาเภสัชกรรมคลินิก  
 ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์



#### 5. คณะวิทยาศาสตร์

- |                               |                    |
|-------------------------------|--------------------|
| 1. รศ.ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา  | ภาควิชาเคมี        |
| 2. ผศ.ดร.อรรพรรณ ศิริโชติ     | ภาควิชาเคมี        |
| 3. อ.กัลยา นิตีเรืองจรัส      | ภาควิชาคณิตศาสตร์  |
| 4. ผศ.อภิญญา วงศ์กิตาการ      | ภาควิชาคณิตศาสตร์  |
| 5. รศ.ดวงพร คันธโชติ          | ภาควิชาจุลชีววิทยา |
| 6. ผศ.ดร.สุทธี ภูวนาถ         | ภาควิชาจุลชีววิทยา |
| 7. ผศ.ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ | ภาควิชาชีวเคมี     |
| 8. รศ.ดร.คำณูณ กาญจนภูมิ      | ภาควิชาชีววิทยา    |
| 9. รศ.ดร.จุฬามาศ ผลพันธ์      | ภาควิชาชีววิทยา    |
| 10. ผศ.ดร.ไตรภพ ผ่องสุวรรณ    | ภาควิชาฟิสิกส์     |
| 11. ผศ.มาลินี วงศ์นาวา        | ภาควิชาเภสัชวิทยา  |

#### 6. คณะวิศวกรรมศาสตร์

- |                          |                                  |
|--------------------------|----------------------------------|
| 1. ดร.จรัญ บุญกาญจน์     | ภาควิชาวิศวกรรมเคมี              |
| 2. ผศ.ไพบุลย์ อินนาจิตร  | ภาควิชาวิศวกรรมเคมี              |
| 3. ดร.สุธรรม สุขมณี      | ภาควิชาวิศวกรรมเคมี              |
| 4. ดร.อุดมผล พิชนไพบุลย์ | ภาควิชาวิศวกรรมโยธา              |
| 5. รศ.ดร.ดนุพล ตันนโยภาส | ภาควิชาวิศวกรรมเหมืองแร่และวัสดุ |
| 6. รศ.ดร.เล็ก สีคง       | ภาควิชาวิศวกรรมเหมืองแร่และวัสดุ |

#### 7. คณะอุตสาหกรรมเกษตร

- |                               |                                  |
|-------------------------------|----------------------------------|
| 1. ดร.ทิพย์รัตน์ หงษ์ศิริ     | ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม |
| 2. รศ.ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ  | ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม |
| 3. ผศ.ดร.อรรณ หันพงศ์กิตติกุล | ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม |

#### 8. วิทยาลัยชุมชนภูเก็ต

- |                            |                         |
|----------------------------|-------------------------|
| 1. ดร.รัตนา เวทย์ประสิทธิ์ | สาขาวิทยาการคอมพิวเตอร์ |
|----------------------------|-------------------------|

ประกาศ ณ วันที่ 25 ตุลาคม 2545



(รศ.ดร.ประเสริฐ ชิตพงศ์)

อธิการบดีมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



# Authors Index

## Songklanakarin J. Sci. Technol., Vol. 24

### A

Abdul Rashid Mohd Shariff ; 24(2) : 321-328  
Achara Tawatsin ; 24(4) : 649-661  
Adisorn Ratanaphan ; 24(3) : 509-531  
Aimmanas Attawish ; 24(1) : 39-51  
Aimrun Wayayok ; 24(2) : 321-328  
Alongkoad Tanomtong ; 24(3) : 473-479  
Amornrat Tangprasittipap ; 24(4) : 717-725  
Anan Polthanee ; 24(2) : 197-207  
Anchalee Chuthaputti ; 24(1) : 39-51 ; 24(4) : 633-647  
Apichart Lawpetchara ; 24(4) : 595-600 ; 24(4) : 601-610  
Ashara Pengnoo ; 24(1) : 1-8  
Assa-aree Sama-ae ; 24(3) : 451-466

### B

Bodee Khamseekhiew ; 24(2) : 209-216  
Boonsom Siribumrungsukha ; 24(2) : 273-281

### C

Chada Phisalaphong ; 24(4) : 633-647  
Chaiya Pounsawai ; 24(2) : 227-234  
Chakrit Tongurai ; 24(2) : 255-271  
Chanagun Chitmanat ; 24(4) : 739-747  
Charun Bunyakan ; 24(1) : 67-75 ; 24(2) : 255-271  
Charun Maknoi ; 24(2) : 311-319  
Cheunjit Kaewkunya ; 24(3) : 371-380  
Chitnarong Sirisathitkul ; 24(2) : 305-310  
Chittima Pairat ; 24(2) : 227-234

Choi Chee Wong ; 24(2) : 209-216

Chongmas Antarasena ; 24(2) : 329-340 ; 24(3) : 391-397  
Chureerat Satjipanon ; 24(4) : 579-585 ; 24(4) : 587-593  
Chusak Limsakul ; 24(2) : 177-188  
Chutarat Junsui ; 24(4) : 707-716

### D

Danupon Tonnayopas ; 24(4) : 675-700  
Darunee Bhongsuwan ; 24(1) : 89-106  
Doungporn Chunchit ; 24(2) : 235-242  
Dusit Nakachart ; 24(3) : 399-411  
Dzulkify Mat Hashim ; 24(3) : 431-438 ; 24(3) : 439-450

### H

Haroom Hemsuree ; 24(1) : 149-157  
Haruthai Longkullabutra ; 24(2) : 305-310

### I

Ittisak Sriwang ; 24(4) : 701-706

### J

Jaruwan Boonsiri ; 24(4) : 569-578  
Jiraporn Petcharat ; 24(3) : 467-472  
John Gregg ; 24(2) : 305-310  
Juan Boo Liang ; 24(2) : 209-216

### K

Kalayanee Kooptarnond ; 24(4) : 675-700

Kamnnoon Kanchanapoom ; 24(2) : 283-291 ; 24(3) : 357-364

Kamol Lertrat ; 24(4) : 555-560

Kanokrat Naweean ; 24(2) : 235-242

Katawut Chaiyathape ; 24(1) : 15-30

Khanuengnit Pholphrugsa ; 24(4) : 707-716

Kidchakan Supamattaya ; 24(3) : 399-411

Krailas Kiyothong ; 24(4) : 579-585 ; 24(4) : 587-593

## L

Ladda Eksomtramage ; 24(2) : 311-319 ; 24(4) : 707-716

Ladda Trongwongsa ; 24(2) : 329-340

Laddawan Moosikapala ; 24(2) : 217-225

Laemthong Chuenchom ; 24(2) : 235-242

Lakhana Egobol ; 24(1) : 131-138

## M

Mana Kanjanamaneesathian ; 24(1) : 1-8

Mohd Soom Mohd Amin ; 24(2) : 321-328

Mohd Musa Hanafi ; 24(2) : 321-328

## N

Nantawan Nantawanit ; 24(1) : 31-38

Naree Wongwongaree ; 24(2) : 177-188 ; 24(2) : 189-195

Narongrit Sombatsompop ; 24(1) : 53-66

Naruepol Phromkuntod ; 24(2) : 329-340 ; 24(3) : 391-397

Nathanan Trachoo ; 24(4) : 717-725

Nawarat Prakailertlak ; 24(1) : 67-75

Nisakorn Koedsub ; 24(1) : 1-8

## O

Opas Rodchompoo ; 24(4) : 579-585

Orasa Patarapaiboolchai ; 24(4) : 701-706

Orawan Sirichote ; 24(2) : 235-242

## P

Pakamas Prayuenyong ; 24(3) : 493-507

Panote Thavarungkul ; 24(2) : 283-291

Panupong Nuchum ; 24(3) : 365-369

Panya Kheanumkeaw ; 24(1) : 107-115

Pimpaporn Pholsen ; 24(4) : 587-593

Piphol Suksaithaichana ; 24(1) : 131-138

Poonsuk Prasertsan ; 24(2) : 341-356 ; 24(3) : 413-420 ; 24(3) : 421-430

Poonsuk Prasertsan ; 24(4) : 717-725

Porntip Prommuang ; 24(2) : 329-340 ; 24(3) : 391-397

Praison Prommuang ; 24(2) : 329-340 ; 24(3) : 391-397

Praiwan Kirdtongmee ; 24(2) : 305-310

Pranee Chavalittumrong ; 24(1) : 39-51 ; 24(4) : 633-647

Prasert Jivanit ; 24(2) : 311-319

Prasit Chutichudet ; 24(3) : 381-390

Prateep Songkeao ; 24(4) : 621-631

Puangpen Sirirugsa ; 24(2) : 311-319

Puangtip Kaewtubtim ; 24(1) : 117-122 ; 24(1) : 149-157 ; 24(2) : 293-303

## R

Rapee Puertpan ; 24(1) : 77-87

Ratchada Tatreeemontreechai ; 24(1) : 67-75

Rattapant Pattanarungson ; 24(3) : 473-479

Rerm-a-run Rugpheug ; 24(4) : 561-568

Romanee Karunchintadit ; 24(1) : 139-148

Roong-aroon Varitikorn ; 24(4) : 707-716

Russly Abd Rahman ; 24(3) : 431-438 ; 24(3) : 439-450

## S

Sadudee Rattanajarasroj ; 24(1) : 39-51 ; 24(4) : 633-647

Saeed Mohamed Eltaib ; 24(2) : 321-328

Said Aslam ; 24(2) : 305-310

Saijai Jornead ; 24(4) : 707-716

Saithong Kaewchai ; 24(3) : 413-420 ; 24(3) : 421-430

Samatchar Naksombut ; 24(4) : 569-578

Sanan Subhadhirasakul ; 24(2) : 227-234

Sanun Jogloy ; 24(4) : 555-560

Saowakon Malakarn ; 24(2) : 255-271

Saowakon Wattanachant ; 24(3) : 431-438 ; 24(3) : 439-450

Saowapa Angsupanich ; 24(4) : 621-631

Sayan Sdoodee ; 24(1) : 9-14 ; 24(2) : 177-188 ; 24(2) : 189-195

Sayan Tudsri ; 24(3) : 371-380

Sharifah Kharidah Syed Muhammad ; 24(3) : 431-438 ; 24(3) : 439-450

Siriwat Wasiksiri ; 24(3) : 509-531

Somchai Chaisen ; 24(4) : 675-700

Somjate Patcharaphun ; 24(1) : 53-66

Somjit Rujikwan ; 24(2) : 329-340

Somkiat Punyamong ; 24(1) : 39-51 ; 24(4) : 633-647

Somkiat Saithanoo ; 24(4) : 595-600 ; 24(4) : 601-610

Sommaichang ; 24(1) : 117-122 ; 24(1) : 149-157 ; 24(2) : 293-303

Sommaichaiyavareesajja ; 24(4) : 621-631

Sompong Te-chato ; 24(2) : 217-225 ; 24(3) : 365-369 ; 24(4) : 561-568 ; 24(4) : 569-578

Songphol Chivapat ; 24(1) : 39-51 ; 24(4) : 633-647

Sopone Wongkaew ; 24(4) : 555-560

Suchada Sukrong ; 24(4) : 649-661

Sujin Simaraks ; 24(1) : 159-167 ; 24(3) : 473-479

Sunanta Pongsamart ; 24(1) : 31-38 ; 24(4) : 649-661

Supanee Chanaweewarawan ; 24(1) : 9-14

Suparoek Watanasit ; 24(1) : 15-30  
 Supasarote Muensit ; 24(1) : 107-115  
 Surakrai Permkam ; 24(1) : 15-30 ; 24(3) : 533-544  
 Surapol Choldumrongkul ; 24(4) : 595-600 ; 24(4) : 601-610  
 Surasak Kochapakdee ; 24(4) : 595-600 ; 24(4) : 601-610  
 Surasak Treesuwan ; 24(2) : 273-281

**T**

Tanongkiat Kiatsiriroat ; 24(2) : 243-253  
 Thinnakorn Kormsa-art ; 24(4) : 555-560  
 Thirapat Vivattanasirisak ; 24(4) : 663-674  
 Thumrongrat Amornraksa ; 24(1) : 77-87  
 Thumronk Amornsakun ; 24(4) : 611-619  
 Tipparat Hongpattarakere ; 24(3) : 481-491  
 Tripob Bhongsuwan ; 24(1) : 89-106  
 Tulyapong Tulayapitak ; 24(4) : 701-706

**U**

Udomphon Puetpaiboon ; 24(1) : 123-129  
 Uraiwan Chamnanwech ; 24(4) : 611-619  
 Uthen Kuntha ; 24(2) : 243-253

**V**

Vidhaya Tre-loges ; 24(2) : 197-207  
 Vimolmas Lipipun ; 24(1) : 31-38

**W**

Wanna Innajitara ; 24(2) : 235-242  
 Wanna Leowarin ; 24(1) : 1-8  
 Wantana Reanmongkol ; 24(2) : 227-234  
 Warit Madmarn ; 24(2) : 341-356  
 Wasan Sriwatana ; 24(4) : 611-619  
 Wichada Sunpui ; 24(3) : 357-364  
 Winai Pralomkarn ; 24(4) : 595-600 ; 24(4) : 601-610  
 Winyu Rattanapitikon ; 24(1) : 139-148 ; 24(4) : 663-674  
 Wiparat Choochare ; 24(2) : 227-234  
 Witool Chaiparkdee ; 24(4) : 561-568  
 Wittaya Tongsongsom ; 24(2) : 273-281  
 Worapol Aengwanich ; 24(1) : 159-167 ; 24(3) : 473-479  
 Wu Quisong ; 24(3) : 467-472  
 Wuttiorn Phromkunthong ; 24(3) : 399-411

**X**

Xu Zaifu ; 24(3) : 467-472

**Y**

Yuttapong Jitphatthanakul ; 24(3) : 399-411

**Z**

Zainal Aznam Jalan ; 24(2) : 209-216  
 Zeng Ling ; 24(3) : 467-472  
 Zhang Weiqiu ; 24(3) : 467-472

# Key words Index

## Songklanakarin J. Sci. Technol., Vol. 24

### A

activated carbons ; 24(2) : 235-242  
adventitious shoot ; 24(3) : 357-364  
agricultural waste ; 24(1) : 1-8  
agromyzid leaf miner ; 24(3) : 467-472  
agronomic traits ; 24(4) : 555-560  
air pollution ; 24(1) : 67-75  
ALA production ; 24(4) : 717-725  
5-aminolevulinic acid ; 24(4) : 717-725  
*Andropogon gayanus* ; 24(4) : 579-585  
Anglo-Nubian ; 24(4) : 595-600 ; 24(4) : 601-610  
anthurium ; 24(4) : 569-578  
antibodies ; 24(3) : 391-397  
anti-microbial ; 24(1) : 31-38  
antinociceptive activity ; 24(2) : 227-234  
applied currents ; 24(2) : 283-291  
*Arachis hypogaea* ; 24(4) : 555-560  
*Arachis pintoi* ; 24(2) : 209-216  
arthropod ; 24(1) : 15-30  
Asia Mining ; 24(2) : 273-281  
auxin ; 24(2) : 283-291  
avian reovirus ; 24(2) : 329-340

### B

baby corn ; 24(3) : 381-390  
bacterial cells ; 24(3) : 421-430  
bactericide ; 24(1) : 31-38

bagasse ; 24(2) : 235-242  
bioconversion, 24(2) : 341-356  
biodesulfurization ; 24(3) : 493-507  
biofloculant ; 24(3) : 413-420 ; 24(3) : 421-430  
biosorption ; 24(3) : 421-430  
blood cell characteristics ; 24(3) : 473-479  
boiling ; 24(2) : 243-253  
bottom sediment ; 24(1) : 89-106  
bounded function ; 24(3) : 451-466  
BRCA1 ; 24(3) : 509-531  
breaker height ; 24(4) : 663-674  
breaking index ; 24(4) : 663-674  
breaking wave height ; 24(4) : 663-674  
breast cancer ; 24(3) : 509-531  
buck effect ; 24(4) : 595-600  
buffer zone ; 24(4) : 675-700  
butterfly ; 24(3) : 533-544

### C

calcium carbonate ; 24(1) : 117-122  
callus formation ; 24(4) : 561-568 ; 24(4) : 569-578  
cefotaxime ; 24(4) : 561-568  
CELi cells ; 24(2) : 329-340  
cellulases ; 24(3) : 481-491  
chicken ; 24(1) : 159-167 ; 24(2) : 329-340  
chlorophyll ; 24(1) : 9-14  
chromosome number ; 24(2) : 311-319 ; 24(4) : 707-716

*Cissus quadrangularis* Linn. ; 24(1) : 39-51  
 coal ; 24(3) : 493-507  
 coconut shell ; 24(2) : 235-242  
 commercial starch ; 24(3) : 439-450  
 consumptive safety ; 24(4) : 649-661  
 continuous function ; 24(3) : 451-466  
 correlation ; 24(4) : 555-560  
*Crassostrea belcheri* ; 24(4) : 621-631  
 crosslinking ; 24(3) : 431-438 ; 24(3) : 439-450  
 curcuminoids ; 24(4) : 633-647  
 cutting height ; 24(3) : 371-380 ; 24(4) : 587-593  
 cutting time ; 24(4) : 579-585 ; 24(4) : 587-593  
 cytokinins ; 24(3) : 357-364

**D**

decolorization ; 24(3) : 413-420  
 degradability ; 24(2) : 209-216  
 devulcanization ; 24(4) : 701-706  
 DGPS ; 24(2) : 321-328  
 digital watermarking ; 24(1) : 77-87  
 dissipation model ; 24(1) : 139-148  
 dose response ; 24(1) : 117-122  
 dry classification ; 24(2) : 273-281  
 dual-modification ; 24(3) : 431-438  
 durian polysaccharides ; 24(1) : 31-38  
 durian polysaccharide gel ; 24(4) : 649-661  
 durian-rind extracts ; 24(1) : 31-38  
*Durio zibethinus* ; 24(1) : 31-38 ; 24(4) : 649-661  
 dwarf napier ; 24(3) : 371-380  
*Dyera costulata* ; 24(2) : 227-234

**E**

emission ; 24(2) : 255-271  
 endangered birdwing butterflies ; 24(3) : 533-544  
 energy dissipation ; 24(1) : 139-148  
 Engineering geology ; 24(4) : 675-700  
 enteritis ; 24(1) : 131-138  
 esophagitis ; 24(1) : 131-138  
 evaporation ; 24(1) : 67-75 ; 24(2) : 255-271  
 extremophilic ; 24(3) : 481-491

**F**

fat-soluble vitamins ; 24(3) : 399-411  
 feldspar classification ; 24(2) : 273-281  
 fermented milk ; 24(4) : 717-725  
 fertilizer placement ; 24(2) : 197-207  
 fine-grained mineral classification ; 24(2) : 273-281  
 fish diseases ; 24(4) : 739-747  
 fish immunity ; 24(4) : 739-747  
 fish immunostimulant ; 24(4) : 739-747

flowering plants ; 24(4) : 707-716  
 formalin test ; 24(2) : 227-234

**G**

gamma ray spectrometer ; 24(1) : 149-157 ; 24(2) : 293-303  
 geoelectric ; 24(4) : 675-700  
 geostatistics ; 24(2) : 321-328  
 GIS ; 24(4) : 675-700  
 gnetum ; 24(3) : 365-369  
 green catfish ; 24(3) : 399-411  
 green manure ; 24(3) : 381-390  
 Greenspan Sapflow Sensors ; 24(2) : 177-188  
 guano ; 24(1) : 15-30

**H**

heat stress in chickens ; 24(1) : 159-167  
 heat-pulse method ; 24(2) : 189-195  
 heat-pulse sapflow sensors ; 24(2) : 177-188  
 heavy metal ; 24(1) : 89-106 ; 24(3) : 421-430  
 hematology ; 24(3) : 473-479  
 hemicellulases ; 24(3) : 481-491  
 heritability ; 24(4) : 555-560  
 Herpesvirus ; 24(1) : 131-138  
 hexadecanol ; 24(1) : 67-75  
 HI test ; 24(3) : 391-397  
 hydroxypropylation ; 24(3) : 431-438 ; 24(3) : 439-450  
 hyperthermophilic ; 24(3) : 481-491

**I**

image averaging ; 24(1) : 77-87  
 image processing ; 24(1) : 77-87  
 improved technique ; 24(2) : 217-225  
 indirect fluorescent antibody test ; 24(2) : 329-340  
 interferometer ; 24(1) : 107-115  
 intranuclear inclusion body ; 24(1) : 131-138  
 irregular wave model ; 24(1) : 139-148  
 irrigation ; 24(1) : 123-129  
 isolation protoplasts ; 24(2) : 217-225

**J**

Japanese encephalitis virus ; 24(3) : 391-397

**K**

kanamycin ; 24(4) : 561-568

**L**

Langmuir adsorption isotherm ; 24(2) : 235-242  
 larval parasitoids ; 24(3) : 467-472  
 leaf water potential ; 24(2) : 189-195

leucaena ; 24(3) : 371-380  
 limestone cave ; 24(1) : 15-30  
*Liriomyza* ; 24(3) : 467-472  
*Liriomyza* 's parasitoid ; 24(3) : 467-472  
 lithium niobate ; 24(1) : 107-115  
 locally bounded function ; 24(3) : 451-466  
 longkong ; 24(1) : 9-14 ; 24(2) : 177-188 ; 24(2) : 189-195  
 Lorentz force ; 24(2) : 305-310

**M**

magnetoresistance ; 24(2) : 305-310  
 mangosteen ; 24(2) : 217-225 ; 24(4) : 561-568  
 marine shells ; 24(1) : 117-122  
 mass transfer coefficient ; 24(1) : 67-75 ; 24(2) : 255-271  
 megachiroptera ; 24(1) : 15-30  
 mesocarp fiber of oil palm ; 24(1) : 1-8  
 microchiroptera ; 24(1) : 15-30  
 micropropagation of anthurium ; 24(4) : 569-578  
 modified starch ; 24(3) : 431-438 ; 24(3) : 439-450  
 mortality rate ; 24(4) : 601-610  
 mouth development ; 24(4) : 611-619  
 mutation ; 24(3) : 509-531  
*Mystus nemurus* ; 24(3) : 399-411

**N**

Narathiwat province ; 24(2) : 293-303  
 $\text{NH}_3\text{N}$  ; 24(2) : 209-216  
 nitrogen ; 24(1) : 9-14  
 N-mineralization ; 24(1) : 1-8  
 non-destructive method ; 24(1) : 9-14

**O**

oestrus during pregnancy ; 24(4) : 595-600  
 oil palm ; 24(2) : 283-291  
 oil palm frond ; 24(2) : 209-216  
 organogenesis ; 24(3) : 357-364  
 overlay mapping ; 24(4) : 675-700  
*Oxyeleotris marmoratus* ; 24(4) : 611-619

**P**

Painted Stork (*Mycteria leucocephala*) ; 24(3) : 473-479  
 palm oil mill effluent (POME) ; 24(3) : 413-420  
*Penaeus monodon* ; 24(4) : 621-631  
 pericarp of rubber fruit ; 24(2) : 235-242  
*Phaeoisariopsis personata* ; 24(4) : 555-560  
 photosynthetic bacteria ; 24(4) : 717-725  
 piezoelectric ; 24(1) : 107-115  
 pigeon ; 24(1) : 131-138  
 pigs ; 24(3) : 391-397

plantlet regeneration ; 24(4) : 561-568  
 point kriging ; 24(2) : 321-328  
 polar transport ; 24(2) : 283-291  
 polymer ; 24(1) : 53-66 ; 24(3) : 421-430  
 pressure drop ; 24(2) : 243-253  
 preweaning ; 24(4) : 601-610  
 propagation of gnetum ; 24(3) : 365-369  
 PSU-TTSF ; 24(2) : 177-188  
 PZT ; 24(1) : 107-115

**R**

R-22 alternatives ; 24(2) : 243-253  
 radioactive elements ; 24(1) : 149-157 ; 24(2) : 293-303  
 rambutan ; 24(1) : 9-14  
 recycled gloves ; 24(4) : 701-706  
 regeneration ; 24(3) : 357-364  
 rock ; 24(1) : 149-157 ; 24(2) : 293-303  
 ruzi ; 24(3) : 371-380

**S**

sago starch ; 24(3) : 431-438 ; 24(3) : 439-450  
*Saintpaulia ionantha* ; 24(3) : 357-364  
 sand deposit ; 24(4) : 675-700  
 sand goby ; 24(4) : 611-619  
 sap flow ; 24(2) : 177-188 ; 24(2) : 189-195  
*Sclerotium rolfsii* ; 24(1) : 1-8  
 scrap rubber ; 24(4) : 701-706  
 screening ; 24(3) : 413-420  
 seafood, 24(2) : 341-356  
 seed quality ; 24(4) : 579-585 ; 24(4) : 587-593  
 seed yield ; 24(4) : 579-585 ; 24(4) : 587-593  
 semivariogram ; 24(2) : 321-328  
 sequence space ; 24(3) : 451-466  
 sequential cropping ; 24(2) : 197-207  
 serum biochemistry ; 24(3) : 473-479  
 shear heating ; 24(1) : 53-66  
 shrimp pond effluent ; 24(4) : 621-631  
 silicon membrane ; 24(2) : 305-310  
 soaking seed ; 24(2) : 197-207  
 Songkhla ; 24(4) : 675-700  
 Songkhla Lake ; 24(1) : 89-106  
 southern border of Thailand ; 24(2) : 329-340 ; 24(3) : 391-397  
 soybean ; 24(2) : 197-207  
 spacing ; 24(3) : 371-380  
 SPAD-502 ; 24(1) : 9-14  
 spatial variability ; 24(2) : 321-328  
 starch characterisation ; 24(3) : 439-450  
 starch properties ; 24(3) : 431-438 ; 24(3) : 439-450  
 start of feeding ; 24(4) : 611-619



starvation ; 24(4) : 611-619  
stomatal conductance ; 24(2) : 189-195  
*Stylosanthes guianensis* CIAT 184 ; 24(4) : 587-593  
subchronic toxicity ; 24(1) : 39-51  
sulfur ; 24(3) : 493-507  
superposition operator ; 24(3) : 451-466  
surfactant ; 24(2) : 255-271

**T**

Taiwan A25 ; 24(3) : 371-380  
temperature profiles ; 24(1) : 53-66  
temperature sensor ; 24(1) : 53-66  
Thai goat ; 24(4) : 595-600 ; 24(4) : 601-610  
Thai Zingiberaceae ; 24(2) : 311-319  
thermotolerant ; 24(3) : 421-430  
thermotolerant bacteria ; 24(3) : 413-420  
tissue culture technique ; 24(2) : 283-291 ; 24(3) : 365-369  
toxic effects ; 24(4) : 649-661  
toxicity ; 24(4) : 633-647  
treatment ; 24(4) : 621-631  
tumor suppressor gene ; 24(3) : 509-531

**V**

Vertical Air Classifier ; 24(2) : 273-281  
VFA ; 24(2) : 209-216  
vitamin A ; 24(3) : 399-411  
vitamin D ; 24(3) : 399-411  
vitamin E ; 24(3) : 399-411  
vitamin K ; 24(3) : 399-411  
VOC ; 24(1) : 67-75 ; 24(2) : 255-271

**W**

wastes, 24(2) : 341-356  
wastewater from hospital ; 24(1) : 123-129  
wastewater reuse ; 24(1) : 123-129  
water deficit ; 24(2) : 189-195  
writhing test ; 24(2) : 227-234

**Y**

yield ; 24(3) : 371-380  
yogurt ; 24(4) : 717-725  
yolk absorption ; 24(4) : 611-619