

ความหลากหลายและกรดไขมันในทรอสโทโคไตรดส์ที่สกัดได้จากใบไม้ป่าชายเลนแหลมผักเบี้ย
จังหวัดเพชรบุรี

กนกสิณี ยิ้มชวน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

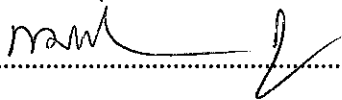
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา

มิถุนายน 2550

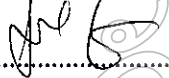
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ กนกกลีณี ยิ้มยวน ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

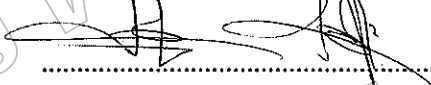

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมถวิล จริตควร)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภารัตน์ สวนจิตร)

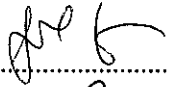
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธาน

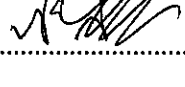
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมชาย ไกรรักษ์)


.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมถวิล จริตควร)


.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภารัตน์ สวนจิตร)


.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชาญ สว่างวงศ์)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา


.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประทุม ม่วงมี)

วันที่ 25 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2550

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมถวิล จริตควร ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ซึ่งคอยให้คำปรึกษา แก้ไขข้อบกพร่องในการปฏิบัติงาน ตลอดจนช่วยเหลือสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภารัตน์ สอนจิตร ที่กรุณาให้แนวทางในการค้นคว้าหาความรู้ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ รวมถึง รองศาสตราจารย์ ดร.วิญญิต มั่นทะจิตร ที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อมูลทางด้านสถิติ จึงขอกราบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่สาว ที่คอยสนับสนุนและให้คำปรึกษารวมทั้งเป็นกำลังใจในการศึกษาเสมอมา และขอขอบคุณ นาวาตรีจักรกฤษ ศรีรักษ์ คุณมยุรา ประยูรพันธ์ คุณลลิตา เชาวเรืองฤทธิ์ คุณทศวรรณ ข วาสีงาน คุณจุฬาลักษณ์ จันทบาล คุณปวีณา สิ้นคัทธา และคุณศทาวุธ สายสุวรรณ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา และภาควิชาสถิติทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ ตลอดจนสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

กนกสิณี ชัยชวน

47911200: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คำสำคัญ: ทรอสโทโคตริคส์/ กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง/ ใบไม้ป่าชายเลน

กนกสิณี ชัยชวน: ความหลากหลายและกรดไขมันในทรอสโทโคตริคส์ที่คัดแยกได้จาก ใบไม้ป่าชายเลนแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี (DIVERSITY AND FATTY ACID COMPOSITION IN THRAUSTOCHYTRIDS ISOLATED FROM MANGROVE LEAVES AT LEAM PAK BIA, PHETCHABURI PROVINCE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สมถวิล จริตกร, Ph.D., สุภารัตน์ สวนจิต, Ph.D. 108 หน้า. ปี พ.ศ. 2550.

คัดแยกทรอสโทโคตริคส์จากใบไม้ป่าชายเลนแหลมผักเบี้ย อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี จากพันธุ์ไม้ 3 ชนิด ในเดือนพฤษภาคมและเดือนกันยายน โดยเปอร์เซ็นต์การพบ ทรอสโทโคตริคส์เดือนกันยายนสูงกว่า (96.11%, 286 ไอโซเลท) เดือนพฤษภาคม (77.22%, 155 ไอโซเลท) และเปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทโคตริคส์ในเดือนพฤษภาคมพบ *Schizochytrium limacinum* สูงสุด (28.89%) รองลงมาคือ *Schizochytrium mangrovei* (27.22%), *Schizochytrium* sp.1 (8.33%), *Thraustochytrid* 1 (1.67%) และ *Schizochytrium* sp.2 (0.56%) เดือนกันยายนพบ *Schizochytrium limacinum* สูงสุด (59.44%) รองลงมาคือ *Schizochytrium mangrovei* (32.22%), *Schizochytrium* sp.2 (8.33%), *Ulkenia visurgensis* (1.67%) และ *Schizochytrium* sp.1 (0.56%) จากนั้นเลี้ยงในอาหารเหลว GYP (6%: 1%: 1%) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 4 วัน และวิเคราะห์กรดไขมันพบว่า ปริมาณดีเอชเอ็มมีค่าอยู่ในช่วง 0.98-243.19 มิลลิกรัม/ กรัมน้ำหนักแห้ง (0.55-49.47 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) อีพีเอ็มมีค่า อยู่ในช่วง 0.18-6.47 มิลลิกรัม/ กรัมน้ำหนักแห้ง (0.08-5.65 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) และ เออาร์เอ็มมีค่าอยู่ในช่วง 0.20-9.88 มิลลิกรัม/ กรัมน้ำหนักแห้ง (0.10-14.23 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมัน ทั้งหมด)

47911200: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M.Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: THRAUSTOCHYTRIDS/UNSATURATED FATTY ACID/
MANGROVE LEAVES

KHANOKSINEE YIMYUAN: DIVERSITY AND FATTY ACID COMPOSITION
IN THRAUSTOCHYTRIDS ISOLATED FROM MANGROVE LEAVES AT LEAM PAK BIA,
PHETCHABURI PROVINCE. ADVISORY COMMITTEE: SONTAWIN JARITKHUAN,
Ph.D., SUDARAT SUANJIT., Ph.D. 108 P. 2007.

Screening and isolation of thraustochytrids from fallen senescent leaves of 3 mangrove trees in May and September were carried out at Leam Pak Bia, Phetchaburi Province. It was found that the percentage of occurrence of thraustochytrids in May (96.11%, 286 Isolates) was higher than that in September (72.22%, 155 Isolates). The highest percentage of occurrence of thraustochytrids in May was *Schizochytrium limacinum* (28.89%), followed by *Schizochytrium mangrovei* (27.22%), *Schizochytrium* sp.1 (8.33%), Thraustochytrid 1 (1.67%) and *Schizochytrium* sp.2 (0.56%), respectively. While in September, the percentage of occurrence of *Schizochytrium limacinum* was 59.44%, followed by *Schizochytrium mangrovei* (32.22%), *Schizochytrium* sp.2 (8.33%), *Ulkenia visurgensis* (1.67%) and *Schizochytrium* sp.1 (0.56%), respectively. The culture of thraustochytrids in GYP (6%: 1%: 1%) at 25° C, 200 rpm for 4 days was carried on for fatty acid profiles. The results showed that docosahexaenoic acid (DHA) was the highest fatty acid as 0.98-243.19 mg/g dry weight (0.55-49.47% of Total Fatty Acid), while eicosapentaenoic acid and arachidonic acid were 0.18-6.47 mg/ g dry weight (0.08-5.65% of Total Fatty Acid) and 0.20-9.88 mg/ g dry weight (0.10-14.23% of Total Fatty Acid), respectively.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ณ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ลิพิด (Lipid)	4
กรดไขมัน (Fatty Acid)	5
อีพีเอ (Eicosapentaenoic Acid)	6
ดีเอชเอ (Docosahexaenoic Acid)	7
เออาร์เอ (Arachidonic Acid)	7
ทรอสโทไคตริคส์ (Thraustochytrids)	7
ป่าชายเลน (Mangrove Forest).....	14
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
วัสดุอุปกรณ์.....	24
วิธีการวิจัย.....	25
4 ผลการวิจัย.....	30
ชนิดของพันธุ์ไม้ป่าชายเลน.....	30
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกทรอสโทไคตริคส์.....	32

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
เปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทโคไตรดส์จากตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน.....	43
กรดไขมันในทรอสโทโคไตรดส์.....	52
5 อภิปรายและสรุปผล.....	68
ชนิดของพันธุ์ไม้ป่าชายเลนและการเก็บตัวอย่างใบไม้เพื่อทำการคัดแยก	
ทรอสโทโคไตรดส์.....	68
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกทรอสโทโคไตรดส์.....	68
เปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทโคไตรดส์จากตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน.....	70
กรดไขมันในทรอสโทโคไตรดส์.....	74
สรุปผลการวิจัย.....	77
ข้อเสนอแนะ.....	78
บรรณานุกรม.....	79
ภาคผนวก.....	85
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	86
ภาคผนวก ข ยาปฏิชีวนะและบัฟเฟอร์.....	88
ภาคผนวก ค การเตรียม Internal Standard.....	90
ภาคผนวก ง การคำนวณปริมาณกรดไขมัน.....	92
ภาคผนวก จ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปริมาณกรดไขมันของ	
ทรอสโทโคไตรดส์.....	97
ภาคผนวก ฉ กรดไขมันในทรอสโทโคไตรดส์.....	99
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	108

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ความหนาแน่นของทรอสโคโคไตรดิส์ในแต่ละฤดูกาล.....	21
2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าปัจจัยสิ่งแวดล้อม.....	27
3 พันธุ์ไม้ป่าชายเลนที่พบบริเวณแหลมผักเบี้ย อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี.....	30
4 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมของบริเวณที่เก็บตัวอย่างในเดือนพฤษภาคมและเดือนกันยายน.....	44
5 เปอร์เซ็นต์การพบทรอสโคโคไตรดิส์ จากตัวอย่างใบไม้แต่ละจุดเก็บตัวอย่างในเดือนพฤษภาคมและเดือนกันยายน บริเวณแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี.....	44
6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การพบทรอสโคโคไตรดิส์ จากตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนแต่ละพันธุ์ไม้ และแต่ละเดือน.....	46
7 เปอร์เซ็นต์การพบทรอสโคโคไตรดิส์ แต่ละชนิดจากตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน 8 จุดเก็บตัวอย่างในเดือนพฤษภาคม 2549 และเดือนกันยายน 2549 บริเวณแหลมผักเบี้ย.....	48
8 ปริมาณเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด-สูงสุด) ของกรดไขมันของทรอสโคโคไตรดิส์ บางชนิดจำนวน 61 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้ในเดือนพฤษภาคม.....	53
9 ปริมาณเฉลี่ย (ค่าต่ำสุด-สูงสุด) ของกรดไขมันของทรอสโคโคไตรดิส์ บางชนิดจำนวน 88 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้ในเดือนกันยายน.....	55
10 ปริมาณดีเอชเอในทรอสโคโคไตรดิส์.....	77
11 โครมาโตแกรมกรดไขมันของ Schizochytrium Mangrovei BULBRA 131 จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี.....	94
12 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของทรอสโคโคไตรดิส์ ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี.....	98
13 กรดไขมันในทรอสโคโคไตรดิส์ แต่ละชนิดในเดือนพฤษภาคม.....	100
14 กรดไขมันในทรอสโคโคไตรดิส์ แต่ละชนิดในเดือนกันยายน.....	103

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 เซลล์ในระยะการเจริญ (Vegetative Cell) ของทรอสโทโคตริคส์.....	8
2 วงชีวิตของจุลินทรีย์ในไฟลัม Labyrinthulomycota.....	11
3 สายโซ่อาหารแบบ Detritus ในระบบนิเวศป่าชายเลน.....	17
4 ป่าชายเลนแหลมผักเบี้ย ตำบลแหลมผักเบี้ย อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี.....	25
5 แนวการเก็บตัวอย่างและพันธุ์ไม้หลักบริเวณป่าชายเลนแหลมผักเบี้ย อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี.....	26
6 พันธุ์ไม้และป่าชายเลนแหลมผักเบี้ยอำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี.....	32
7 ลักษณะโคโลนี <i>Schizochytrium limacinum</i> บนอาหารแข็ง GYP เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 5 วัน.....	35
8 ลักษณะเซลล์ของ <i>Schizochytrium limacinum</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GYP.....	35
9 ลักษณะ โคโลนี <i>Schizochytrium mangrovei</i> บนอาหารแข็ง GYP เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 5 วัน.....	37
10 ลักษณะเซลล์ของ <i>Schizochytrium mangrovei</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GYP ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (V) Vegetative Cell, (T) Tetrad, (ZS) Zoosporangium.....	37
11 ลักษณะ โคโลนี <i>Schizochytrium</i> sp.1 บนอาหารแข็ง GYP เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 5 วัน.....	38
12 ลักษณะเซลล์ของ <i>Schizochytrium</i> sp.1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GYP ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (V) Vegetative Cell, (T) Tetrad, (RZ) Release Zoospore.....	38
13 ลักษณะ โคโลนี <i>Schizochytrium</i> sp.2 บนอาหารแข็ง GYP เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 5 วัน.....	39
14 ลักษณะเซลล์ของ <i>Schizochytrium</i> sp.2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GYP ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (V) Vegetative Cell, (D) Diad, (T) Tetrad, (ZS) Zoosporangium.....	39
15 ลักษณะ โคโลนี <i>Ulkenia visurgensis</i> บนอาหารแข็ง GYP เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 5 วัน.....	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
16 ลักษณะเซลล์ของ <i>Ulkenia visurgensis</i> ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GYP.....	41
17 ลักษณะโคโลนี <i>Thraustochytrid</i> 1 บนอาหารแข็ง GYP เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 5 วัน.....	42
18 ลักษณะเซลล์ของ <i>Thraustochytrid</i> 1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GYP ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (V) Vegetative Cell, (A) Amoeboid Cell, (ZS) Zoosporangium.....	42
19 เปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทโคตริคส์ ในเดือนพฤษภาคมและเดือนกันยายน ของแนวการศึกษาที่ 1 และ 2.....	45
20 เปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทโคตริคส์ แต่ละชนิดจากตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน 3 ชนิด 8 จุดเก็บตัวอย่างในเดือนพฤษภาคม และเดือนกันยายน 2549 ซึ่งเก็บในเดือน พฤษภาคม 2549 และเดือนกันยายน 2549 บริเวณป่าชายเลน แหลมผักเบี้ย จังหวัด เพชรบุรี.....	47
21 เปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทโคตริคส์ แต่ละชนิดจากตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน 3 ชนิด ของแนวการเก็บตัวอย่างที่ 1 ในเดือนพฤษภาคม และเดือนกันยายน 2549.....	50
22 เปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทโคตริคส์ แต่ละชนิดจากตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน 3 ชนิด ของแนวการเก็บตัวอย่างที่ 2 ในเดือนพฤษภาคมและเดือนกันยายน.....	51
23 ปริมาณเออาร์เอของทรอสโทโคตริคส์ 61 ไอโซเลท ในเดือนพฤษภาคม.....	56
24 ปริมาณเออาร์เอของทรอสโทโคตริคส์ 88 ไอโซเลท ในเดือนกันยายน.....	57
25 ปริมาณอีพีเอของทรอสโทโคตริคส์ 61 ไอโซเลทในเดือนพฤษภาคม.....	58
26 ปริมาณอีพีเอของทรอสโทโคตริคส์ 88 ไอโซเลทในเดือนกันยายน.....	59
27 ปริมาณดีเอชเอของทรอสโทโคตริคส์ 61 ไอโซเลทในเดือนพฤษภาคม.....	60
28 ปริมาณดีเอชเอของทรอสโทโคตริคส์ 88 ไอโซเลทในเดือนกันยายน.....	61
29 ปริมาณเออาร์เอ (% ของกรดไขมันทั้งหมด) ของทรอสโทโคตริคส์ 61 ไอโซเลท ในเดือนพฤษภาคม.....	62
30 ปริมาณเออาร์เอ (% ของกรดไขมันทั้งหมด) ของทรอสโทโคตริคส์ 88 ไอโซเลท ในเดือนกันยายน.....	63
31 ปริมาณอีพีเอ (% ของกรดไขมันทั้งหมด) ของทรอสโทโคตริคส์ 61 ไอโซเลท ในเดือนพฤษภาคม.....	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
32 ปริมาณอีพีเอ (% ของกรดไขมันทั้งหมด) ของทรอสโทโคไตรดส์ 88 ไอโซเลท ในเดือนกันยายน.....	65
33 ปริมาณดีเอชเอ (% ของกรดไขมันทั้งหมด) ของทรอสโทโคไตรดส์ 61 ไอโซเลท ในเดือนพฤษภาคม.....	66
34 ปริมาณดีเอชเอ (% ของกรดไขมันทั้งหมด) ของทรอสโทโคไตรดส์ 88 ไอโซเลท ในเดือนกันยายน.....	67
35 โครมาโตแกรมกรดไขมันของ <i>Schizochytrium mangrovei</i> BULBRA 131 จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี.....	93