

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการศึกษาจุลินทรีย์ทะเลที่แยกจากตัวอย่างน้ำบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการังและตัวอย่างหญ้าทะเล ได้ผลดังนี้

1. จุลินทรีย์ทะเลที่แยกจากตัวอย่างน้ำบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง

1.1 ยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและเมือกจากก้อนปะการังจากสถานีต่างๆ มาแยกเชื้อยีสต์ในอาหาร yeast extract : malt extract agar ที่ 32 องศาเซลเซียส และบ่มเชื้อไว้ 24 - 48 ชั่วโมง พบยีสต์จากตัวอย่างน้ำทะเลที่เก็บจากเกาะมันใน 3 ไอโซเลท เกาะเต่า 1 ไอโซเลท และจากตัวอย่างเมือกที่ขูดจากก้อนปะการังพบยีสต์ 4 ไอโซเลท (ตารางที่ 4) และรูปร่างลักษณะของยีสต์ที่พบแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ยีสต์ที่พบจากตัวอย่างน้ำทะเลและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง

สถานที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งของตัวอย่าง	ชนิดของปะการัง	ชนิดของยีสต์ที่พบ
เกาะมันใน จังหวัดระยอง	ตัวอย่างน้ำทะเล		<i>Saccharomyces</i> sp.1
			<i>Kloeckera</i> sp.
			<i>Nadsonia</i> sp.
เกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี	ตัวอย่างน้ำทะเล		<i>Saccharomyces</i> sp.2
เกาะมันใน จังหวัดระยอง	เมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง	<i>Symphylia</i>	พบยีสต์ 2 ชนิด คือ <i>Zygosaccharomyces</i> sp.1 และ <i>Zygosaccharomyces</i> sp.2
		<i>Acropora</i>	พบยีสต์ 1 ชนิด คือ <i>Bullora</i> แต่ไม่สามารถเลี้ยงได้นาน
		<i>Pocillopora</i>	พบยีสต์ 1 ชนิด คือ <i>Saccharomyces</i> sp.3
		<i>Porites</i>	พบยีสต์ แต่ไม่สามารถเลี้ยงได้นาน
		<i>Favia</i>	ไม่พบยีสต์
		<i>Pavona</i>	ไม่พบยีสต์
		<i>Diploastrea</i>	ไม่พบยีสต์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	แหล่งของตัวอย่าง	ชนิดของปะการัง	ชนิดของยีสต์ที่พบ
เกาะค้างคาว จังหวัดชลบุรี	เมือกที่ขูดจาก ก้อนปะการัง	<i>Symphylia</i>	ไม่พบยีสต์
		<i>Acropora</i>	ไม่พบยีสต์
		<i>Porites</i>	ไม่พบยีสต์
		<i>Favia</i>	ไม่พบยีสต์
		<i>Pavona</i>	ไม่พบยีสต์
		<i>Diploastrea</i>	ไม่พบยีสต์

ตารางที่ 5 ลักษณะรูปร่างของยีสต์ที่พบ ณ สถานที่ต่างๆ

Species	Cells	Spores	Budding	Pseudomycelium or True mycelium
จากน้ำทะเล เกาะมันใน				
<i>Saccharomyces</i> sp.1	Ovoid, 3-4 μm	Round	Polar budding	-
<i>Kloeckera</i> sp.	Oval, 2-3 μm	-	Polar budding	-
<i>Nadsonia</i> sp.	Oval	Round	Polar budding	-
จากน้ำทะเล เกาะเต่า				
<i>Saccharomyces</i> sp.2	Spherical oval, 5-10 μm	Round	Lateral budding, multilateral budding, Binary fission sometimes, bud has ascospores	Short and long mycelium
จากเมือกปะการัง				
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.1	Spherical oval, 5-9 μm	Round	Lateral budding	-
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.2	Spherical oval, 4-9 μm	Round	Lateral budding, bud has ascospores	+ (sheet mycelium)
<i>Saccharomyces</i> sp.3	Oval, 6-10 μm	Round	Lateral budding, Binary fission sometimes,	-
<i>Bullora</i>	Rod shape	Ballistos pore	Ballistospore	Short pseudomycelium

1.1.1 การเจริญของยีสต์ในอาหาร glucose/nitrate agar และ glucose/yeast extract broth

จากการศึกษาการเจริญของยีสต์ในอาหาร glucose/nitrate agar และ glucose/yeast extract broth เพื่อตรวจสอบการใช้ในเตรทและตรวจสอบการหมักกลูโคสตามลำดับได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบการเจริญของยีสต์ในอาหาร glucose/nitrate agar และ glucose/yeast extract broth (w = weak, - = ไม่เจริญเติบโต, + = เจริญเติบโต)

Species	glucose/nitrate agar	glucose/yeast extract broth
<i>Saccharomyces</i> sp.1	-	W
<i>Kloeckera</i> sp.	-	W
<i>Nadsonia</i> sp.	-	W
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.1	-	W
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.2	+	+
<i>Saccharomyces</i> sp.2	W	-
<i>Bullora</i>	+	-
<i>Saccharomyces</i> sp.3	+	-

1.1.2 การเจริญในอาหารชนิดต่างๆ

จากการทดลองนำยีสต์ที่พบทุกชนิดมาเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB), Yeast and Mold (YM), Czapecdox Broth และ พบว่า *Saccharomyces* sp.1, *Kloeckera* sp., *Nadsonia* sp., *Zygosaccharomyces* sp.1, *Saccharomyces* sp.2, *Saccharomyces* sp.3 เจริญได้ดีในอาหาร Potato Dextrose Broth แต่เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ยีสต์ที่เจริญได้คือ *Saccharomyces* sp.1, *Kloeckera* sp., *Nadsonia* sp., *Saccharomyces* sp.2 ส่วนยีสต์ที่เจริญในอาหาร Sabourand Broth ได้แก่ *Kloeckera* sp., *Nadsonia* sp., *Zygosaccharomyces* sp.2, *Saccharomyces* sp.2, *Saccharomyces* sp.3 ส่วนยีสต์ที่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร Czapecdox Broth คือ *Saccharomyces* sp.1 และ *Kloeckera* sp. (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 การเจริญของยีสต์ในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB), Yeast and Mold (YM), Czapecdox Broth และ Sabourand Broth

Species	Potato Dextrose Broth (PDB)	Yeast and Mold (YM)	Czapecdox Broth	Sabourand Broth
<i>Saccharomyces</i> sp.1	+	+	W1	-
<i>Kloeckera</i> sp.	+	+	W2	+
<i>Nadsonia</i> sp.	+	+	-	+
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.1	+	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.2	-	-	-	+
<i>Saccharomyces</i> sp.2	+	+	-	+
<i>Bullora</i>	-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i> sp.3	+	-	-	+

หมายเหตุ *Bullora* sp. ที่แยกได้จากเปลือกของ *Acoropora* sp. มีชีวิตอยู่ได้ในระยะสั้นๆ ในห้องทดลอง

1.1.3 ปริมาณกรดไขมันที่พบในยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์กรดไขมันในยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน ได้ผลดังตารางที่ 8 จะเห็นว่า ยีสต์สามารถสร้างกรดไขมันได้หลากหลายชนิด กรดไขมันที่สามารถจำแนกได้ได้แก่ กรดไมริสตริก (myristic acid, C14:0), กรดปาล์มติก (palmitic acid, C16:0), กรดปาล์มโทเลอิก (palmitoleic acid, C16:1 n-7), กรดสเตียริก (stearic acid, C18:0), กรดโอเลอิก (oleic acid, C18:1 n-9), กรดไลโนเลอิก (linoleic acid, C18:2 n-6), กรดแกมมา-ไลโนเลนิก (γ -linolenic acid, C18:3 n-6) เป็นต้น ส่วนบางชนิดพบกรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (docosahexaenoic acid, C22:6 n-3, ดีเอชเอ) ซึ่งเป็นกรดไขมันกลุ่มเป้าหมาย มีประมาณ 0.55 - 2.38 % ของกรดไขมันทั้งหมด โดยพบสูงสุดใน *Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร YM โดยกรดไขมันดังกล่าวพบว่า C16:0; C18:1 n-9 และ C18:2 n-6 มีในปริมาณสูง ซึ่ง C16:0 พบสูงสุดใน *Kloeckera* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB (30.19% ของกรดไขมันทั้งหมด) C18:1 n-9 พบสูงสุดใน *Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB (47.73 % ของกรดไขมันทั้งหมด) และ C18:2 n-6 พบสูงสุดใน *Zygosaccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB (28.17 % ของกรดไขมันทั้งหมด) ส่วน C18:3 n-6 พบสูงสุดใน *Saccharomyces* sp.3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB (3.45 % ของกรดไขมันทั้งหมด) แต่ไม่พบกรดไขมันชนิดกรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid, C20:4 n-6) และกรดไอโคซะเพนตะอีโนอิก (ecosapentaenoic acid, C20:5 n-3) อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงยีสต์ชนิดเดียวกัน

ด้วยอาหารต่างชนิดกัน ผลปรากฏกว่ายีสต์สามารถผลิตกรดไขมันทั้งชนิดและปริมาณได้แตกต่างกัน คือ *Saccharomyces* sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร YM สามารถผลิตกรดไขมันชนิดโอเอไอได้ 2.38 % ของกรดไขมันทั้งหมด แต่ถ้าเลี้ยงด้วยอาหาร SB ไม่พบโอเอไอ ส่วน *Saccharomyces* sp.3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB สามารถผลิตกรดไขมันชนิด C22:6 n-3 (0.77 % ของกรดไขมันทั้งหมด) แต่ถ้าเลี้ยงด้วยอาหาร SB ไม่พบโอเอไอเช่นกัน ในขณะที่ *Saccharomyces* sp.1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร PDB ไม่สามารถผลิตกรดไขมันชนิดโอเอไอได้ ส่วน *Zygosaccharomyces* sp.2 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร PDB และ SB ไม่พบการสร้างกรดไขมันชนิดโอเอไอเช่นกัน

1.2 ทรอสโทรคิทริดที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณแนวปะการังและเมือกที่ขูดจากก้อนปะการัง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากสถานีต่างๆ และเมือกจากก้อนปะการัง โดยขูดเมือกจากปะการัง 5 ชนิดคือ *Acropora* sp., *Favia* sp., *Porites* sp., *Symphylia* sp. และ *Diploastrea* sp. มาแยกเชื้อทรอสโทรคิทริดทั้งในอาหารวุ้น glucose: yeast extract : peptone และยังใช้เกสรสนเป็นเหยื่อล่อ ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมในการล่อจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่มนี้ ผลปรากฏว่าไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids ที่เกาะมันในและเกาะค้ำคาว แต่ที่เกาะเต่าพบการเจริญของ Thraustochytrids 30 isolates จาก 150 ตัวอย่างที่ทำการแยก โดยพบที่สถานีที่ 1 จำนวน 10 isolates สถานีที่ 2 จำนวน 5 isolates สถานีที่ 3 จำนวน 10 isolates สถานีที่ 4 จำนวน 3 isolates และสถานีที่ 5 จำนวน 2 isolates โดยขนาดของ Thraustochytrids ที่พบมีขนาดเล็กมาก ประมาณ 5-8 ไมครอน เท่านั้น อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และเลี้ยงต่อได้ เนื่องจากเมื่อทำการ steak plate เชื้อ Thraustochytrids ไม่เจริญเติบโต ส่วนการตัดชิ้นวุ้นเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์พบว่าเซลล์แตกเสมอและตายในที่สุด

2. จุลินทรีย์ทะเลที่แยกจากตัวอย่างหล้าทะเล

จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids จากตัวอย่างใบหญ้าทะเลชนิด กุ้ยห่ายเข็ม และหล้าชะเงา โดยเก็บใบหญ้าทะเลที่มีสีเขียวอ่อน เขียวแก่ เขียวปนเทา เทาปนเขียว เทาอ่อน เทาแก่ เขียวปนน้ำตาล น้ำตาลปนเขียว น้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้ม และดำเริ่มเน่า ผลปรากฏว่าไม่พบจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids เลย

ตารางที่ 8 กรดไขมันในเยื่อที่เลี้ยงด้วยอาหารแตกต่างกัน

Fatty acid	Saccharomyces sp.1 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB		Saccharomyces sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB		Saccharomyces sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร YM		Saccharomyces sp.3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB	
	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid
14:0	0.69±0.07	3.26±0.05	0.13±0.02	0.28±0.04	2.36±1.27	5.10±0.23	0.72±0.11	1.51±0.03
16:0	6.17±0.71	29.33±0.81	6.07±0.60	12.51±1.19	12.71±4.84	28.69±3.78	9.32±1.01	19.81±1.24
16:1n-7	1.95±0.30	9.24±0.63	0.70±0.06	1.45±0.11	3.50±3.45	6.59±4.24	6.57±1.58	13.80±0.99
18:0	1.08±0.08	5.15±0.05	3.01±0.17	6.22±0.34	2.87±1.25	6.38±0.47	2.94±0.01	6.31±1.05
18:1 n-9	4.26±0.71	20.21±1.64	23.13±0.07	47.73±0.03	13.41±6.37	29.48±0.82	10.87±2.12	22.92±0.58
18:2 n-6	3.99±0.59	18.96±1.14	9.83±0.02	20.28±0.03	0.90±0.49	2.55±2.35	10.33±2.04	21.79±0.58
18:3 n-6	0.26±0.04	1.24±0.08	0.14±0.05	0.29±0.10	0.03±0.04	0.06±0.05	0.95±0.08	2.04±0.53
22:6 n-3	0	0	0	0	1.19±0.93	2.38±0.85	0.32±0.45	0.77±1.08
Others	2.61±0.67	12.61±4.30	5.45±0.81	11.25±1.71	8.83±5.23	18.77±2.04	5.30±1.71	11.04±1.78
Total	21.01±1.83	100.00	48.46±0.18	100.00	45.81±22.89	100.00	47.31±8.07	100.00

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Fatty acid	Saccharomyces sp.3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB		Kloeckera sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB		Nadsonia sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB		Nadsonia sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหาร CZD	
	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid
14:0	0.33±0.01	0.52±0.10	1.36±0.01	3.65±0.21	0.25±0.01	0.44±0.02	4.22±4.61	4.22±4.50
16:0	8.77±0.33	14.09±3.43	11.26±0.30	30.19±1.02	10.35±0.50	18.72±0.75	19.97±0.33	20.68±1.60
16:1n-7	3.99±0.06	6.38±1.22	3.43±0.37	9.16±0.43	3.54±0.29	6.39±0.46	2.10±0.11	2.18±0.25
18:0	5.66±0.56	8.97±0.98	1.99±0.13	5.35±0.68	3.71±0.65	6.71±1.12	6.40±0.46	6.61±0.08
18:1 n-9	14.50±0.44	23.29±5.49	6.88±0.94	18.36±1.40	19.41±0.62	35.11±0.81	26.79±0.88	27.74±2.59
18:2 n-6	13.84±0.93	22.01±3.08	6.95±0.71	18.59±0.77	8.48±0.74	15.34±1.21	20.51±0.08	21.22±1.37
18:3 n-6	2.37±2.07	3.45±2.53	0.53±0.06	1.42±0.24	0.34±0.20	0.61±0.36	0.31±0.44	0.33±0.47
22:6 n-3	0	0	0.21±0.03	0.55±0.10	0	0	0	0
Others	14.35±10.30	21.28±11.76	4.75±0.15	12.72±0.36	9.20±2.54	16.67±4.74	16.53±2.65	17.02±1.70
Total	63.80±13.16	100	37.35±2.26	100.00	55.27±0.48	100.00	96.83±5.89	100.00

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Fatty acid	Zygosaccharomyces sp.1 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB		Zygosaccharomyces sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร PDB		Zygosaccharomyces sp.2 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร SB	
	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid	mg/g dry wt.	% of total fatty acid
14:0	0.54±0.04	2.59±0.64	0.33±0.03	0.64±0.01	1.76±2.07	3.50±4.12
16:0	1.90±0.37	9.09±0.92	7.73±0.11	15.20±1.04	8.12±0.03	16.28±0.06
16:1 n-7	0.93±0.05	4.47±0.97	3.68±0.27	7.27±1.13	3.71±0.59	7.43±1.24
18:0	0.17±0.01	0.80±0.09	4.88±0.07	9.60±0.65	4.69±0.39	9.41±0.85
18:1 n-9	0.20±0.01	0.94±0.02	8.28±0.41	16.32±2.14	8.72±0.70	17.48±1.53
18:2 n-6	0.24±0.03	1.16±0.67	13.22±0.80	26.07±3.71	14.05±0.99	28.17±2.18
18:3 n-6	0.15±0.02	0.71±0.59	0.94±0.14	1.83±0.12	0.44±0.62	0.89±1.25
22:6 n-3	0	0	0	0	0	0
Others	16.74±3.45	80.23±2.074	11.94±5.33	23.07±8.55	8.40±1.54	16.83±2.98
Total	20.86±4.68	100	50.99±4.18	100	49.89±0.33	100

3. ปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง

จากการวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการ ได้แก่ ความเค็ม อุณหภูมิ ออกซิเจนที่ละลายน้ำและความเป็นกรด-เบส จากน้ำทะเลบริเวณแนวปะการังและแหล่งหญ้าทะเล ได้ผลดังตารางที่ 9 พบว่าคุณภาพน้ำต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ปกติ

ตารางที่ 9 คุณภาพน้ำทะเลบริเวณปะการังและแหล่งหญ้าทะเลในบริเวณที่ทำการศึกษา

บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	ความเค็ม	อุณหภูมิ	ออกซิเจนที่ละลายน้ำ	ความเป็นกรด-เบส
บริเวณปะการัง				
เกาะมันใน	28-30	28.5-29.7	5.77-6.67	8.02-8.18
เกาะค้ำควา	30	33.6	6.5	5.71
เกาะเต่า	31-33	31	6.5	8.39-8.44
แหล่งหญ้าทะเล				
อ่าวมะขามป้อม	31	30	6.4	7.6
อ่าวสัดหีบ	31	31	6.8	8.8
แสมสาร	33	31.4-32	6.42-6.95	7.6-8.0
คู้งกระเบน	33	27.8	6.45	7.5