

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง GYP มีสูตรดังนี้

กลูโคส	1	กรัม
บีสต์สกัด	1	กรัม
เปปโตน	1	กรัม
วุ้น	10	กรัม
น้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดคนให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมน้ำปฏิชีวนะในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของคานามัยซิน เท่ากับ 300 มิลลิกรัม/ลิตร และสเตรปโตมัยซิน เท่ากับ 300 มิลลิกรัม/ลิตร

2. อาหารเหลว GY มีสูตรดังนี้

กลูโคส	60	กรัม
บีสต์สกัด	10	กรัม
น้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดคนให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูง ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ข
ยาปฏิชีวนะและบัฟเฟอร์

ยาปฏิชีวนะและบัฟเฟอร์

1. ยาปฏิชีวนะ(ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดเท่ากับ 300 กรัม/ลิตร)

คานามัยซิน (Kanamycin)	3	กรัม
สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin Sulfate)	3	กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	10	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดคนให้เข้ากัน จากนั้นทำการกรอง (Filter Sterile) ด้วยกระดาษกรอง ขนาดตา 0.23 μm แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Phosphate Buffer Saline (PBS)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.21	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.34	กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	1000	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน จากนั้นเก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก
การเตรียม Internal Standard

การเตรียม Internal Standard

Internal Standard (ความเข้มข้น 0.005 กรัม/มิลลิลิตร)

1. ชั่ง Standard fatty acid 19:0 (Nonadecanoic acid) ปริมาณ 0.025 กรัม ใส่ใน Volumetric flask ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
2. เติม hexane จนได้ปริมาตรเท่ากับ 5 มิลลิลิตร
3. ปิดฝาให้สนิท เขย่าเบาๆ จนเข้ากันดี

ภาคผนวก ง

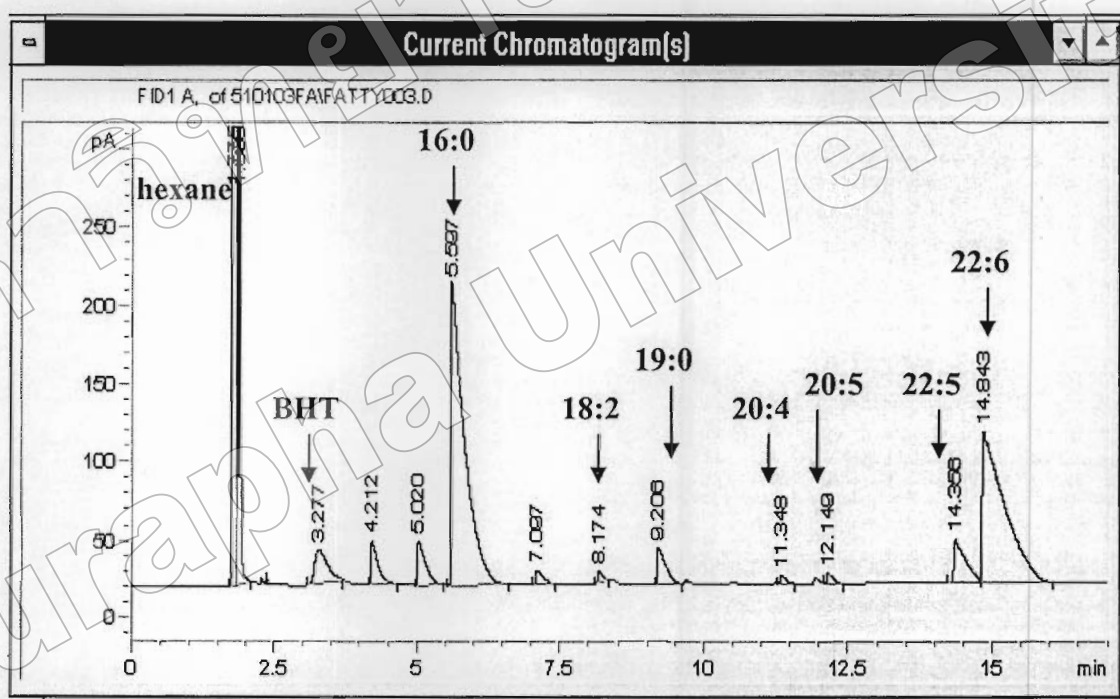
การคำนวณปริมาณกรดไขมัน

การคำนวณปริมาณกรดไขมัน

การคำนวณหาปริมาณกรดไขมัน คำนวณโดยใช้โครมาโตแกรมที่วิเคราะห์จากเครื่อง Gas Chromatography โดยคำนวณพื้นที่ใต้พีค (Peak Area) ของกรดไขมันที่ต้องการทราบ เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของกรดไขมันมาตรฐาน

การคำนวณครั้งนี้ใช้ตัวอย่างโครมาโตแกรมของ *Aurantiochytrium mangrovei* BUSSNF 191

ภาพภาคผนวกที่ ง-1 โครมาโตแกรมกรดไขมันของ *Aurantiochytrium mangrovei* BUSSNF 191 จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี



Area Percent Report

Sorted by Signal

Multiplier : 1.000000

Dilution : 1.000000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RT [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	1.775	BV	0.036	61483.79687	25518.86328	46.8001
2	1.868	HB S	0.016	62381.53906	60826.23047	47.4834
3	3.277	BB	0.197	349.58154	22.26982	0.2661
4	4.212	BB	0.106	245.69948	29.28735	0.1870
5	5.020	BB	0.119	277.85269	29.54943	0.2115
6	5.597	BB	0.207	3239.74634	194.02034	2.4660
7	7.097	BB	0.133	90.04618	9.62585	0.0685
8	8.174	BB	0.091	52.31910	8.48042	0.0398
9	9.206	VV	0.128	242.87796	24.35368	0.1849
10	11.348	VB	0.105	34.46411	4.78771	0.0262
11	12.149	VB	0.102	52.09215	6.84210	0.0397
12	14.356	BV	0.170	379.96075	27.56307	0.2892
13	14.843	VB	0.325	2545.47778	95.65680	1.9376

Totals : 131375.45313 86797.53125

*** End of Report ***

การคำนวณปริมาณกรดไขมัน

การคำนวณปริมาณกรดไขมัน คำนวณโดยใช้โครมาโตแกรมที่วิเคราะห์จากเครื่อง Gas Chromatography โดยคำนวณพื้นที่ใต้พีค (Peak Area) ของกรดไขมันที่ต้องการทราบ เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของกรดไขมันมาตรฐาน ปริมาณกรดไขมันคำนวณได้ดังนี้

น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง *A. mangrovei* BUSSNF 191 เท่ากับ 0.1329 กรัม น้ำหนักของ Internal Standard เท่ากับ 0.025 กรัม ละลายในเฮกเซนให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และใช้ปริมาณต่อตัวอย่างเท่ากับ 0.2 มิลลิลิตร ดังนั้นน้ำหนักของ Internal Standard ต่อตัวอย่างคำนวณได้ดังนี้

ปริมาณเฮกเซน 5 มิลลิลิตร มี Internal Standard ทั้งหมด 0.025 กรัม

ถ้าดูดเฮกเซน 0.2 มิลลิลิตร จะมี Internal Standard เท่ากับ $0.025 \times 0.2 = 0.001$ กรัม

5

หรือ Internal Standard มีน้ำหนักเท่ากับ 1 มิลลิกรัม

1. การคำนวณปริมาณดีเอสเอเป็น มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง (mg/g-Dry Weight)

$$= \frac{(\% \text{ Area ดีเอสเอ} \times \text{น้ำหนัก Internal Standard (mg)})}{(\% \text{ Area Internal Standard} \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)})}$$

$$= \frac{(1.9376 \times 1)}{(0.1849 \times 0.1329)} = 78.85 \text{ มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง}$$

2. การคำนวณร้อยละกรดไขมันดีเอสเอต่อกรดไขมันทั้งหมด (% of Total Fatty Acid)

$$= \frac{\text{ปริมาณกรดไขมันดีเอสเอ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)} \times 100}{\text{ปริมาณกรดไขมันรวมทั้งหมด (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)*}}$$

$$= \frac{78.85 \times 100}{214.2781} = 36.79\%$$

*ปริมาณกรดไขมันรวมทั้งหมด (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) คำนวณได้โดย

$$= \frac{(\% \text{ Area ไขมันทั้งหมด**} \times \text{น้ำหนัก Internal Standard (mg)})}{(\% \text{ Area Internal Standard} \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)})}$$

$$= \frac{(5.2655 \times 1)}{(0.1849 \times 0.1329)} = 214.2781 \text{ มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง}$$

**% Area กรดไขมันทั้งหมดคำนวณได้โดย

= ผลรวมของ % Area กรดไขมันทั้งหมด

= $(2.466 + 0.0398 + 0.0262 + 0.0397 + 0.2892 + 1.9376 + 0.467)$

= 5.2655

3. จำนวนผลผลิตกรดไขมันดีเอสเอ (มิลลิกรัม/ลิตร)

= ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ในอาหารเหลว 50 มิลลิกรัม เทียบกับ 0.9045 กรัม

= ปริมาณกรดไขมันดีเอสเอ (มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง) x ชีวมวล

(กรัม/ลิตร)

= $\frac{78.85 \times 0.9045 \times 1000}{50} = 1426.39$ มิลลิกรัม/ลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก จ
ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน

ตารางภาคผนวกที่ จ-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การพบทอสปโตไคตริคส์

Dependent Variable: THRAUSTOCHYTRIDS

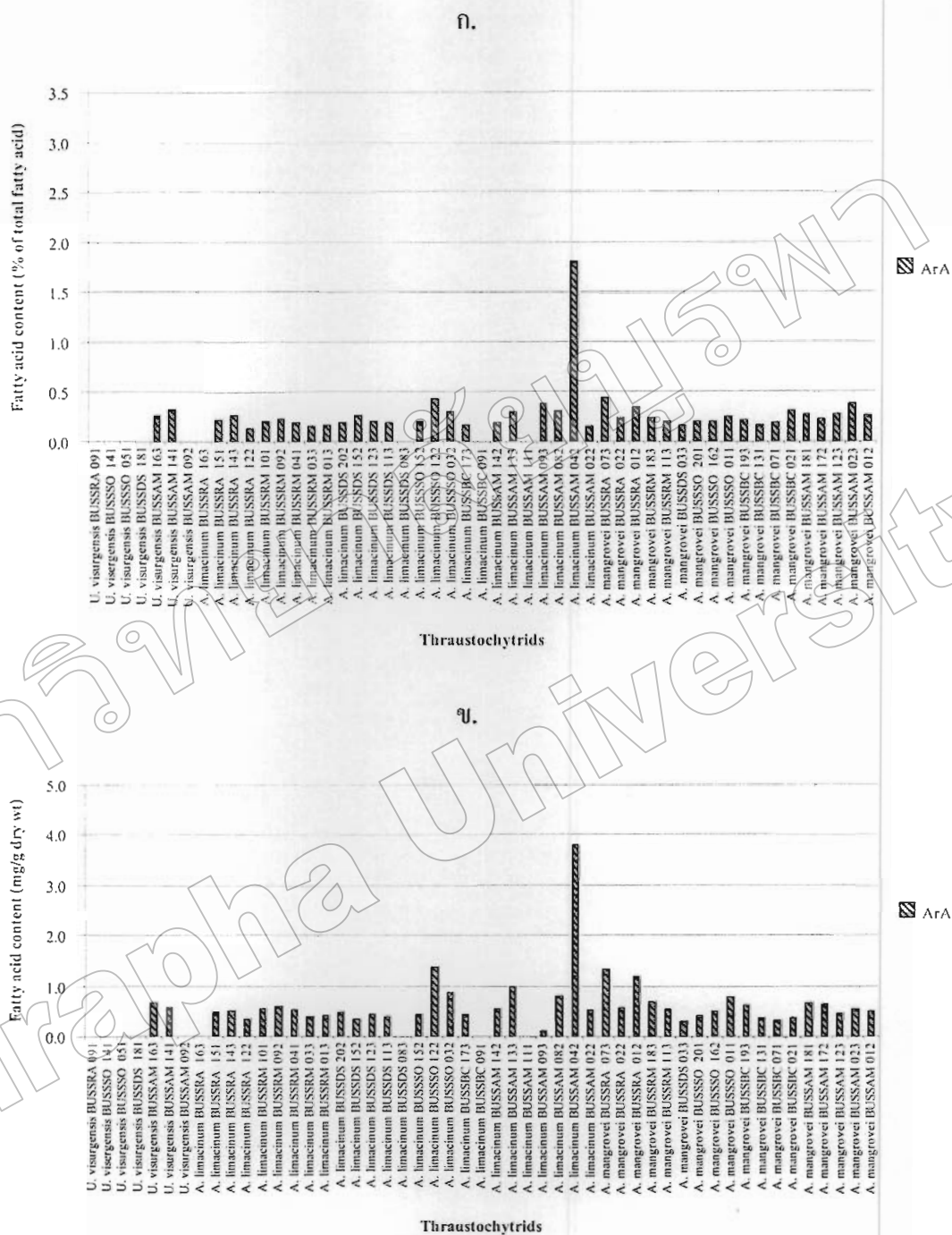
Source	Type III Sum		Mean Square	F	Sig.
	of Squares	df			
Corrected Model	70460.000(a)	29	2429.655	36.445	.000
Intercept	201640.000	1	201640.000	3024.600	.000
MONTH	5420.000	2	2710.000	40.650	.000
PLANT	36960.000	9	4106.669	61.600	.000
MONTH * PLANT	28080.000	18	1560.000	23.400	.000
Error	4000.000	60	66.669		
Total	276100.000	90			
Corrected Total	74460.000	89			

a R Squared = .946 (Adjusted R Squared = .920)

* $p < 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

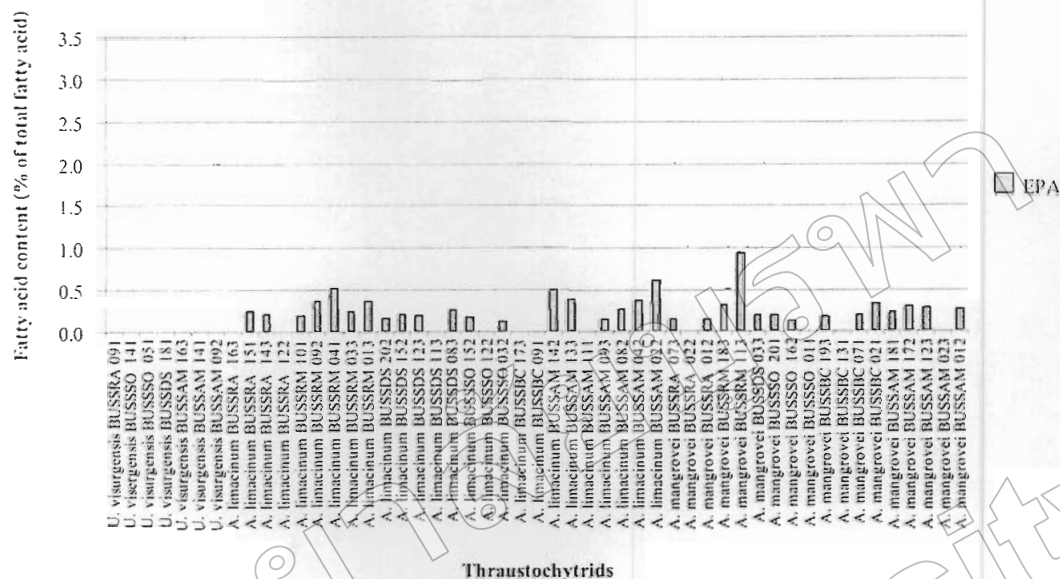
มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ข
กรดไขมันในทรอสโทโคไตรดส์

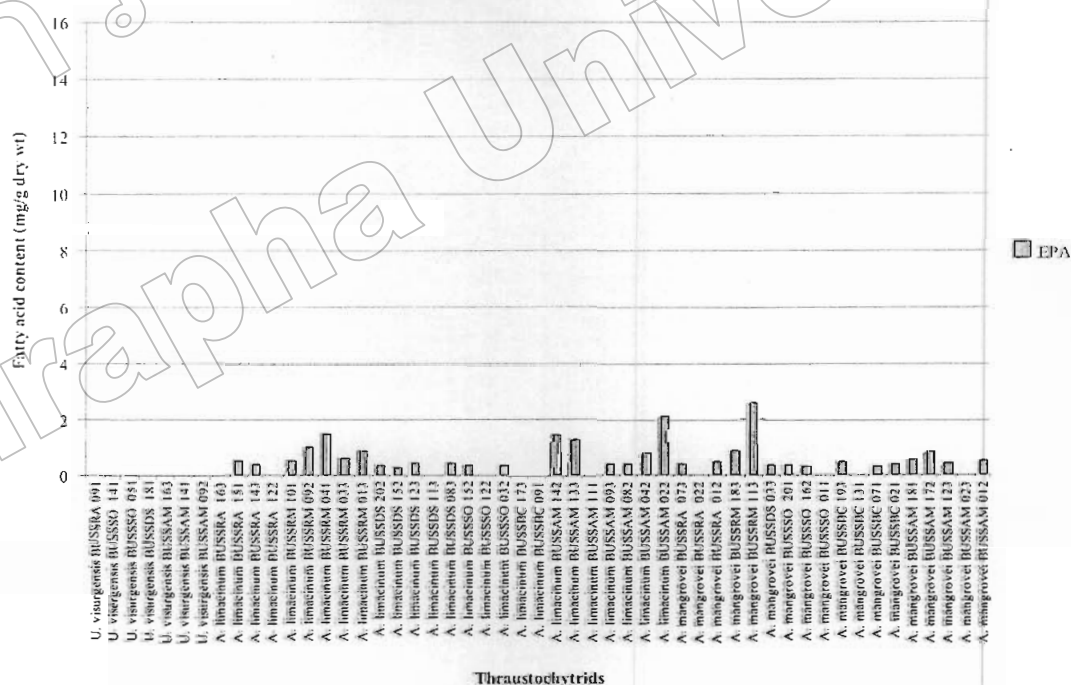


ภาพภาคผนวกที่ ฉ-1 ปริมาณกรดไขมันเออาร์เอ ในทรอสโทโคตริคส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่นของ
พันธุ์ไม้ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสาคร (เดือนธันวาคม 2550)
(ก. มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ข. เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)

ก.

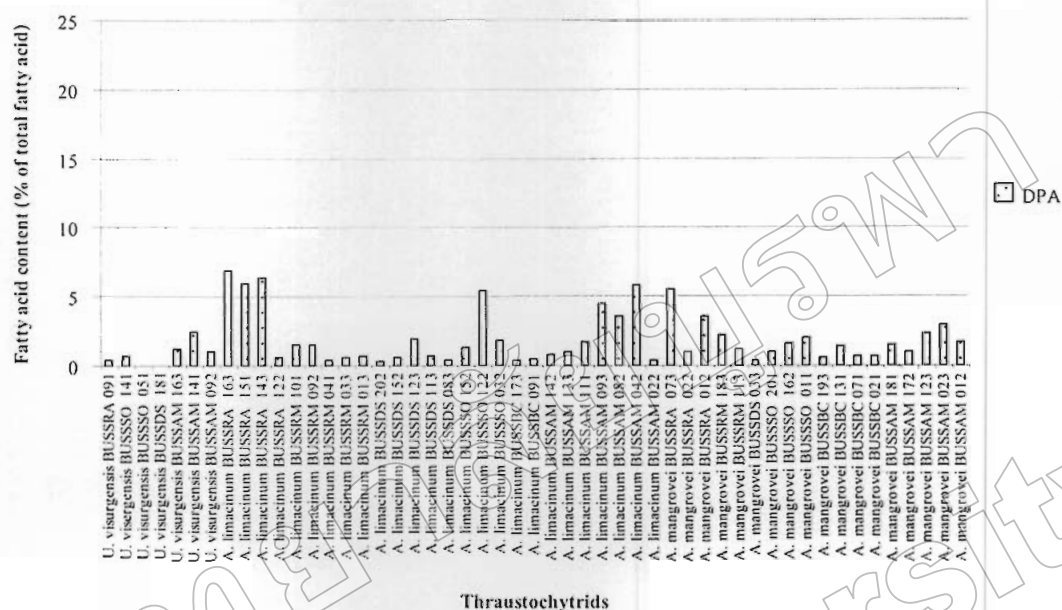


ข.

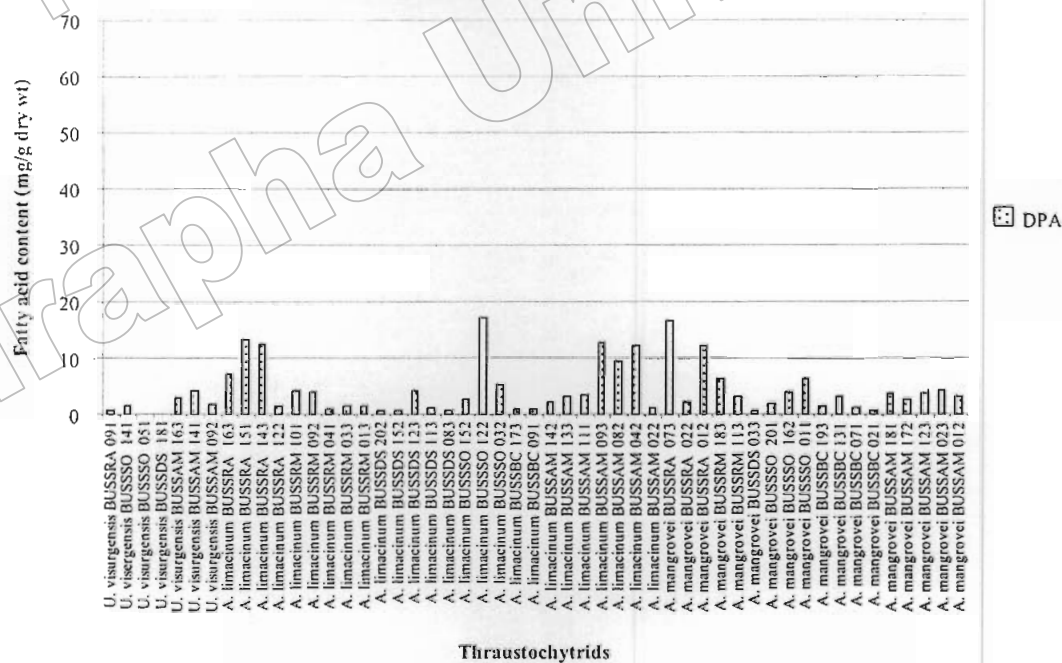


ภาพภาคผนวกที่ ก-2 ปริมาณกรดไขมันอีพีเอ ในทรอสโทโคไตรดส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่นของ
พันธุ์ไม้ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสาคร (เดือนธันวาคม 2550)
(ก. มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ข. เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)

ก.

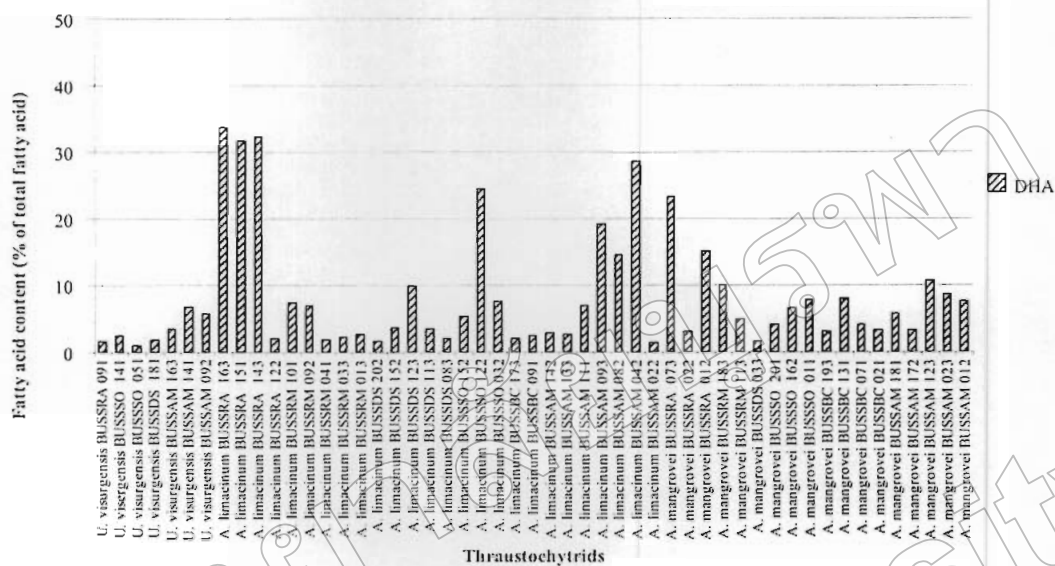


ข.

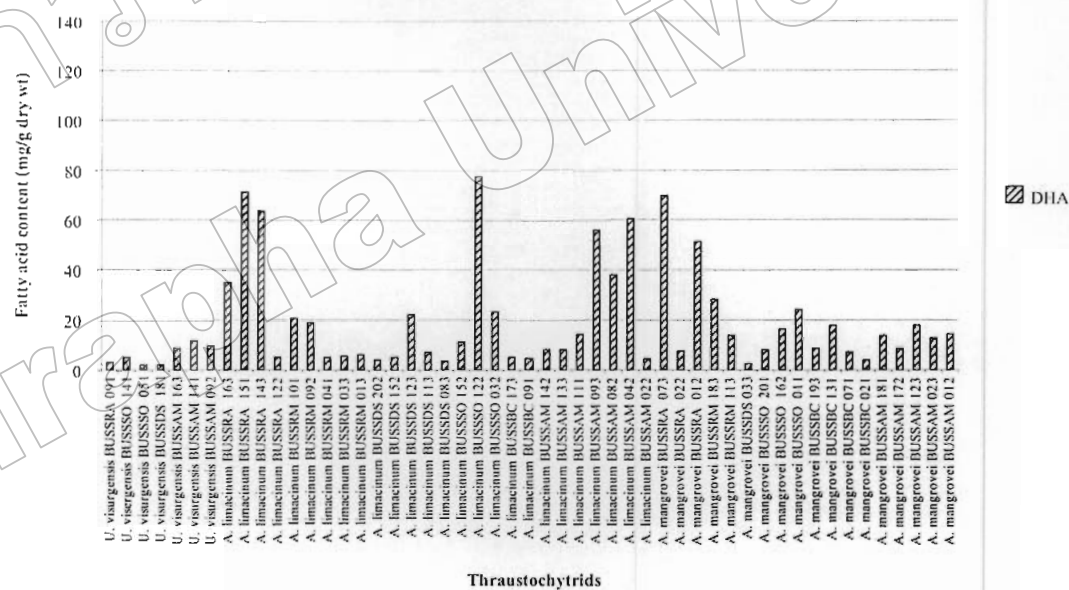


ภาพภาคผนวกที่ ๓-3 ปริมาณกรดไขมันดีพีในทรอสโทโคตริคส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่นของ
พันธุ์ไม้ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสาคร (เดือนธันวาคม 2550)
(ก. มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ข. เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)

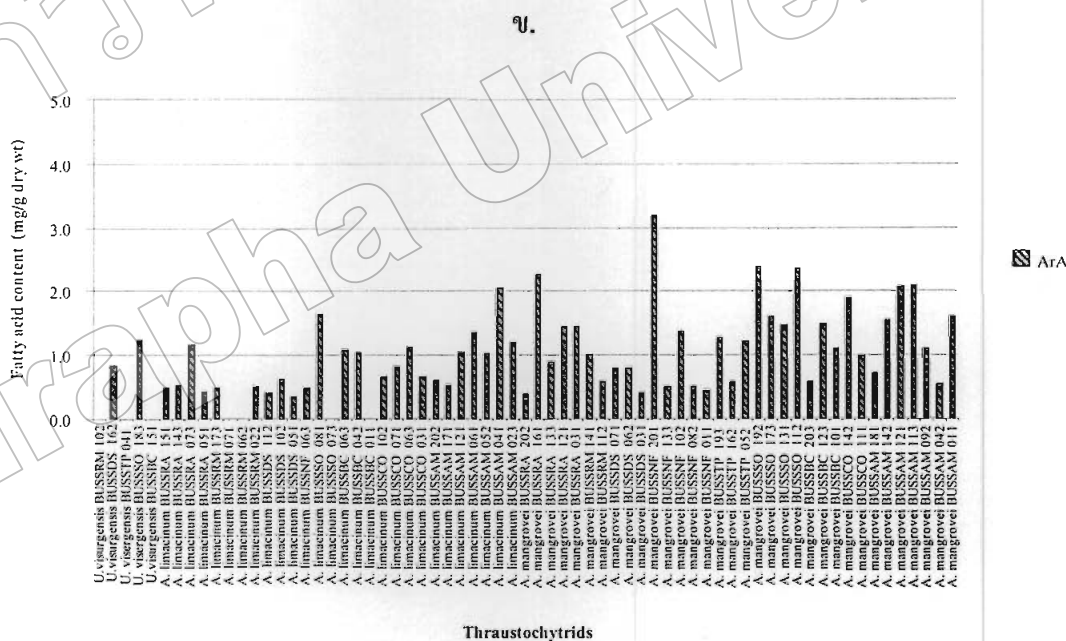
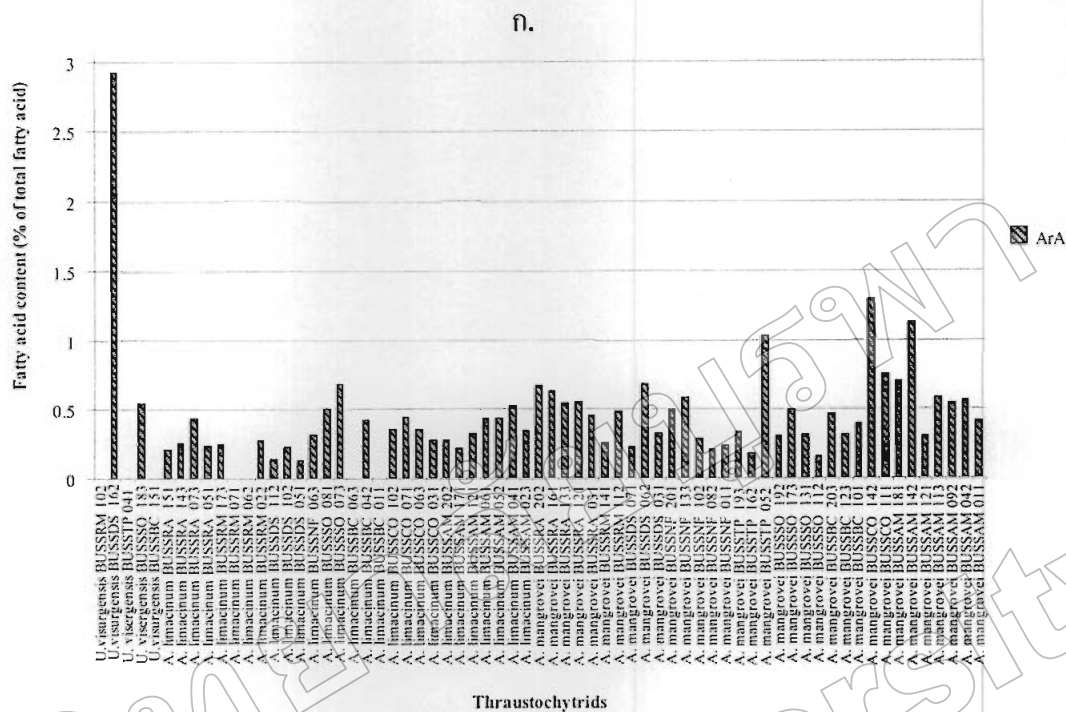
ก.



ข.

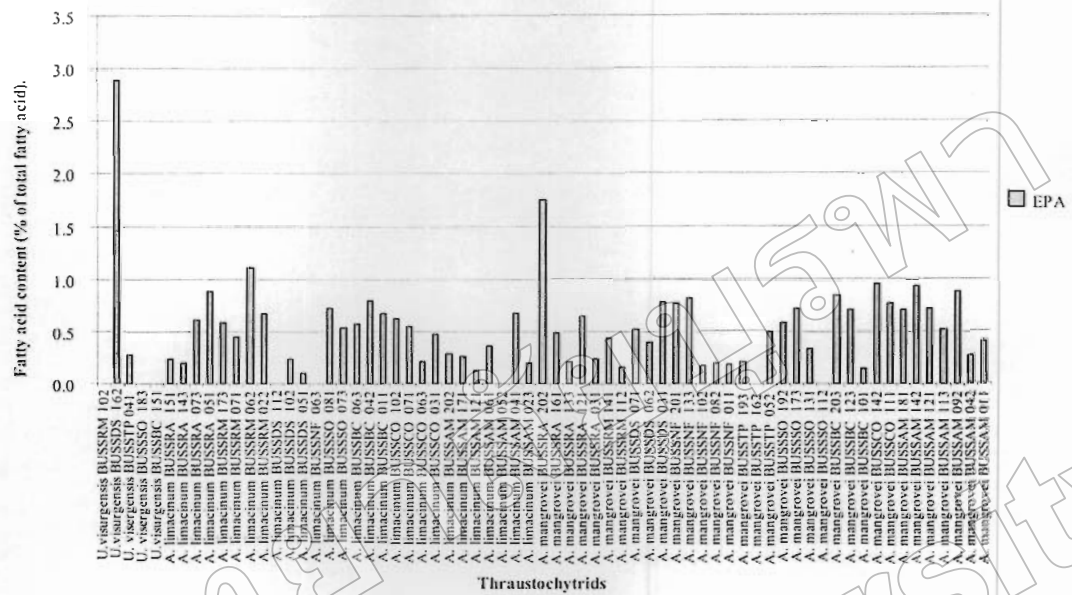


ภาพภาคผนวกที่ จ-4 ปริมาณกรดไขมันดีเอชเอ ในทราสโตไคทริคส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่นของ
พันธุ์ไม้ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสาคร (เดือนธันวาคม 2550)
(ก. มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ข. เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)

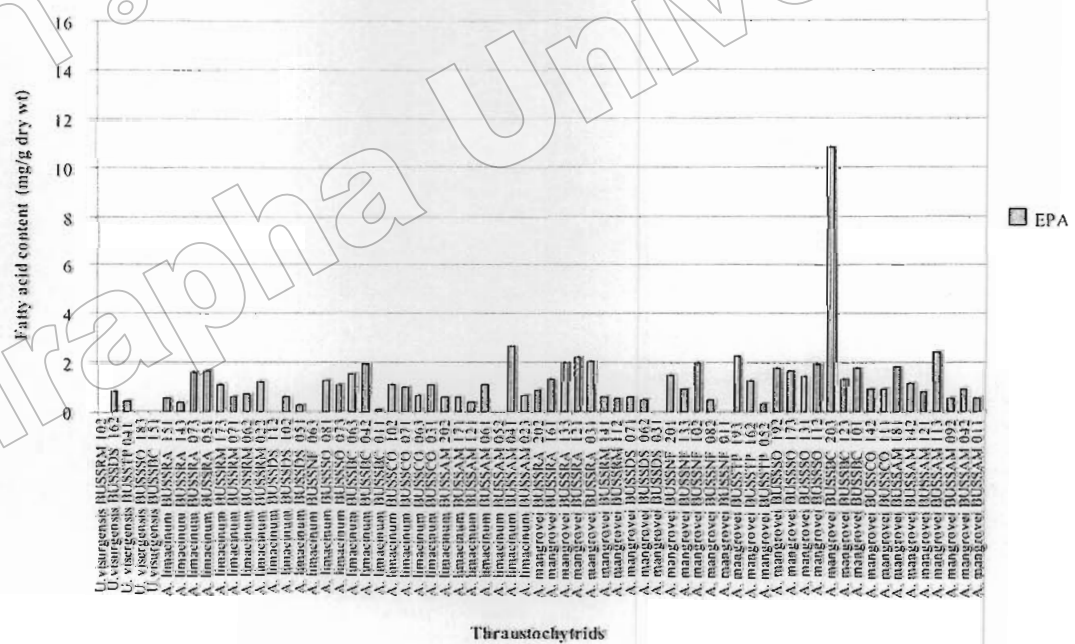


ภาพภาคผนวกที่ ฉ-5 ปริมาณกรดไขมันเออาร์เอ ในทรอสโทโคตริคส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่นของ
พันธุ์ไม้ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสาคร (เดือนเมษายน 2551)
(ก. มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ข. เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)

ก.

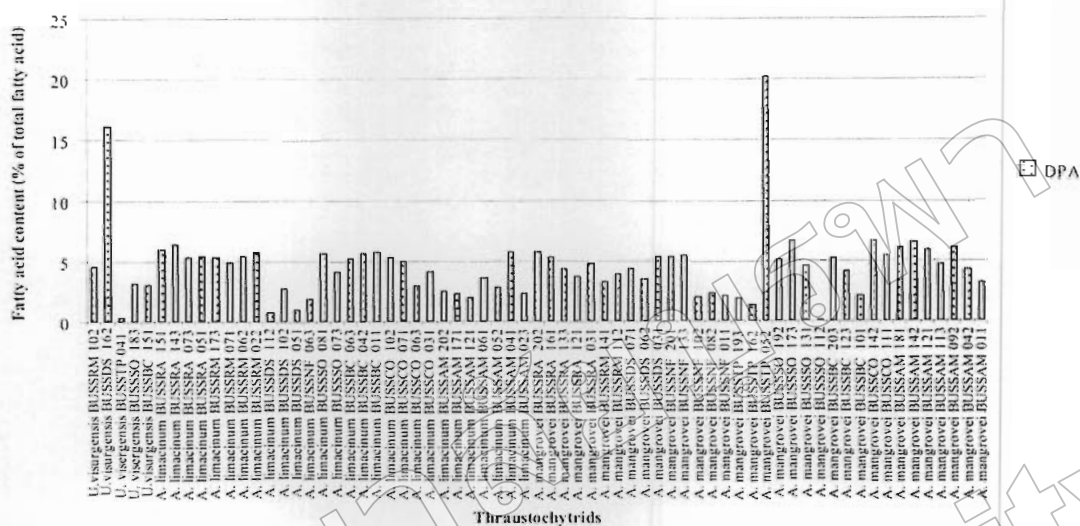


ข.

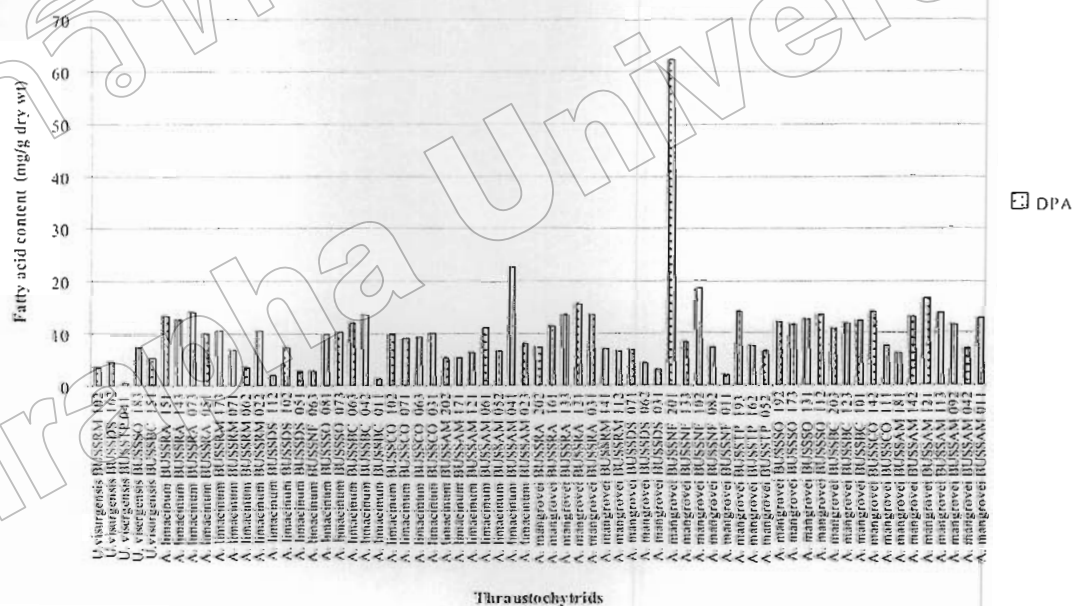


ภาพภาคผนวกที่ ฉ-6 ปริมาณกรดไขมันอีพีเอ ในทราสโตไคดริคส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่นของ
พันธุ์ไม้ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสาคร (เดือนเมษายน 2551)
(ก. มีสติกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ข. เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)

ก.

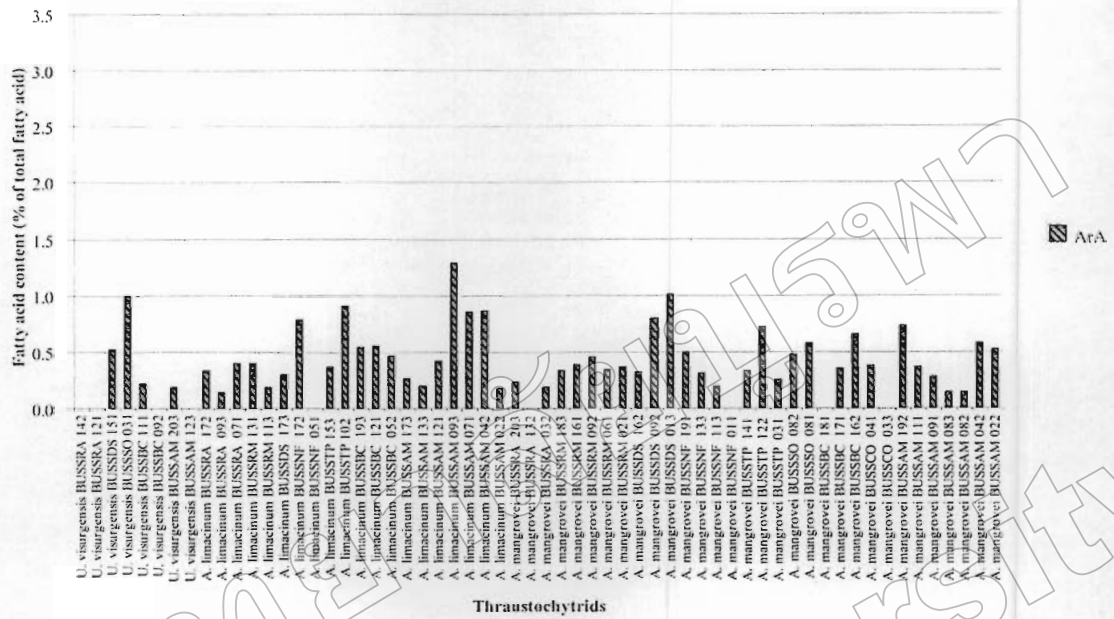


ข.

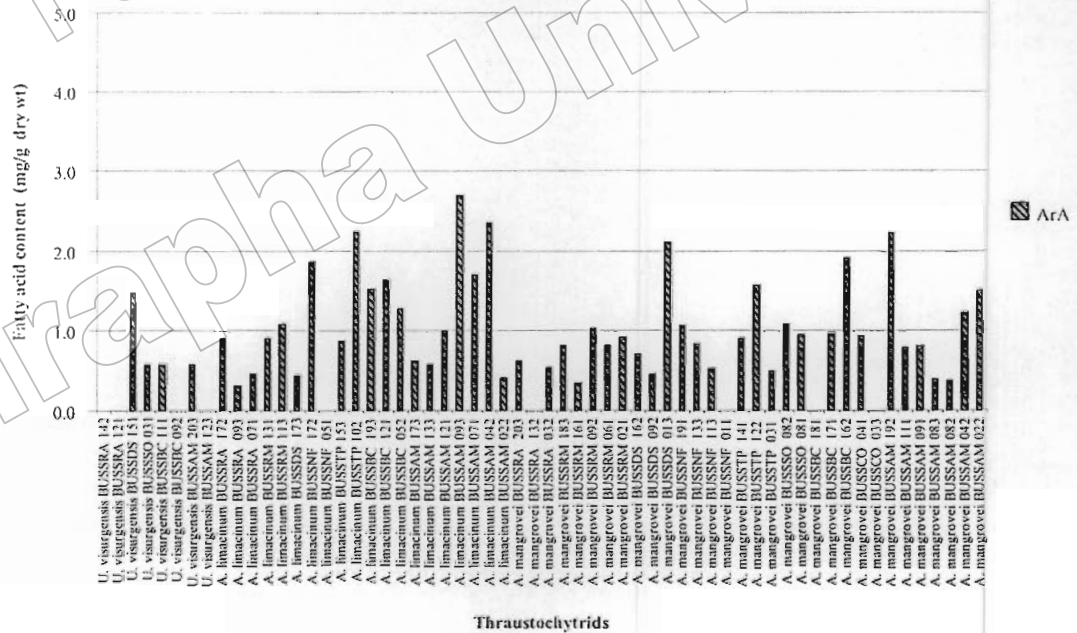


ภาพภาคผนวกที่ จ-7 ปริมาณกรดไขมันดีฟิเอ ในทรอสโทโคไตรดส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่นของ
พันธุ์ไม้ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสาคร (เดือนเมษายน 2551)
(ก. มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ข. เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)

ก.

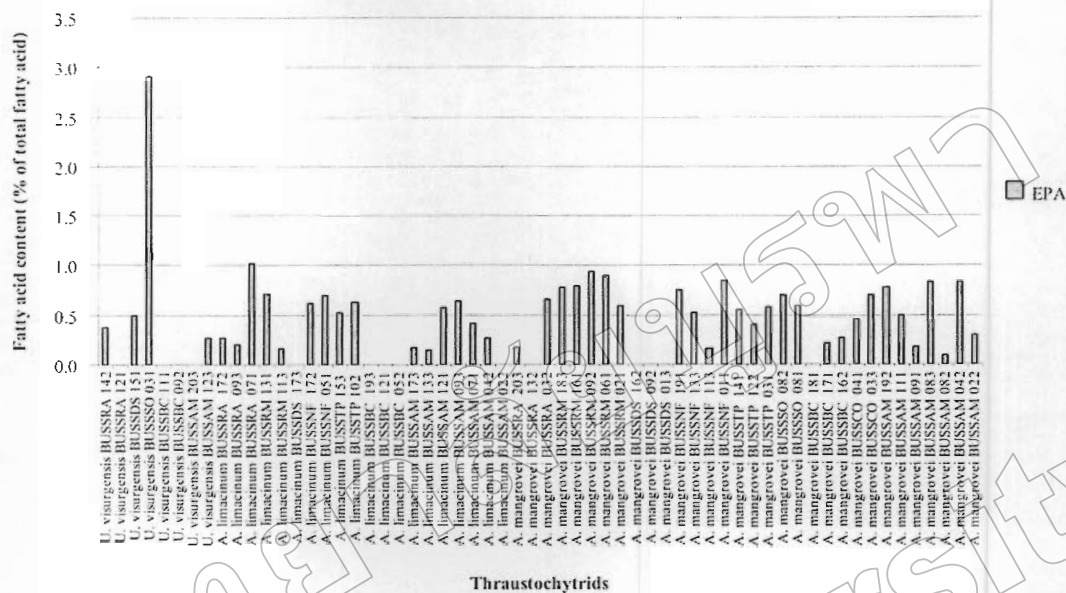


ข.

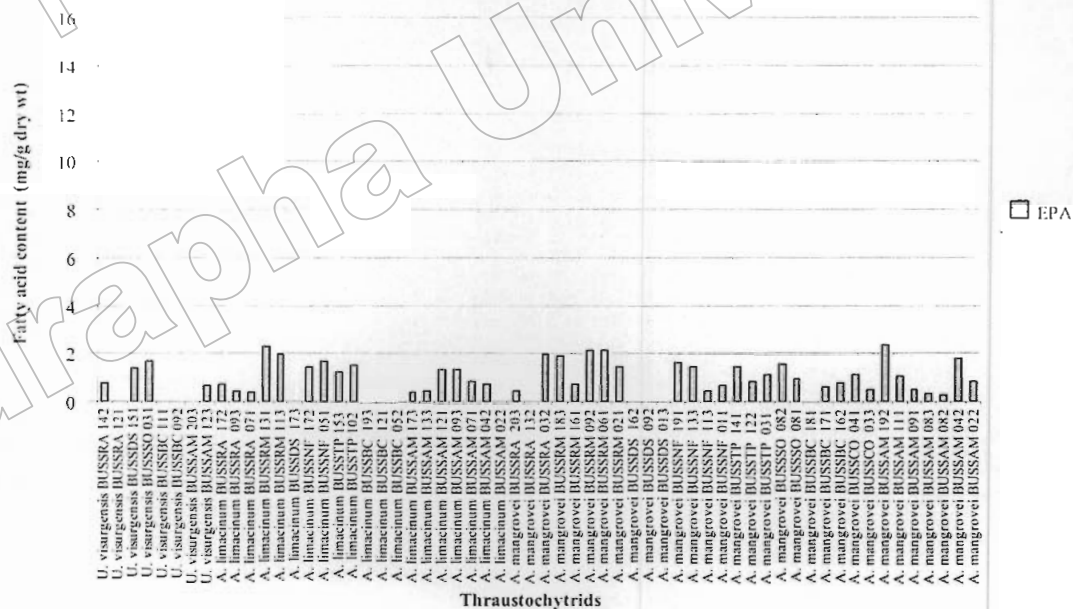


ภาพภาคผนวกที่ จ-9 ปริมาณกรดไขมันเออาร์เอ ในทรอสโทโคดริตส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่นของ
พันธุ์ไม้ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสาคร (เดือนสิงหาคม 2551)
(ก. มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ข. เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)

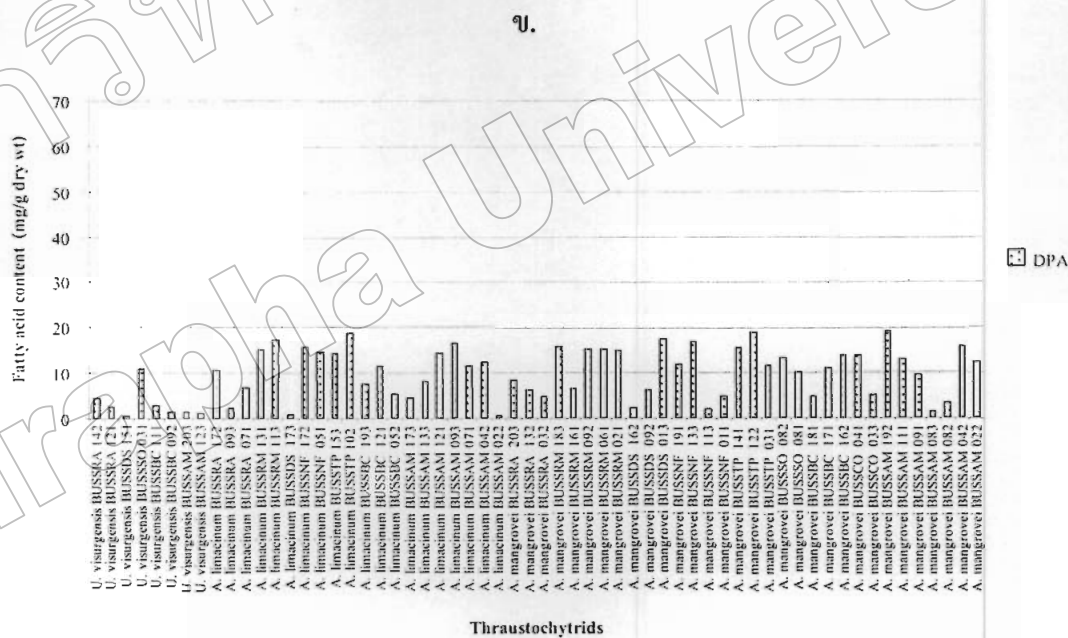
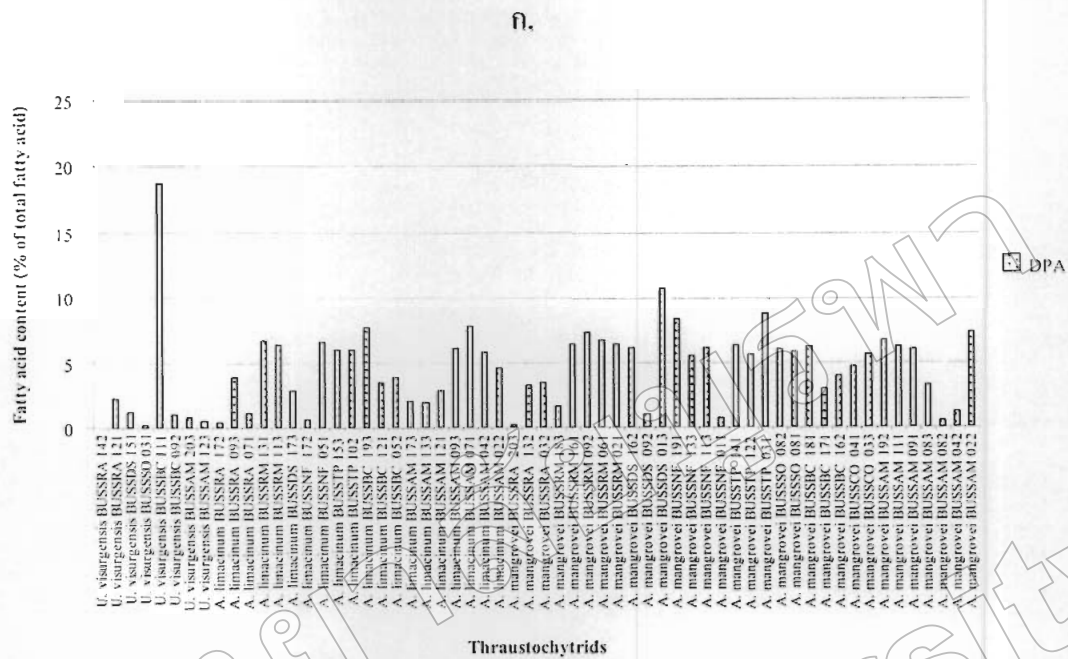
ก.



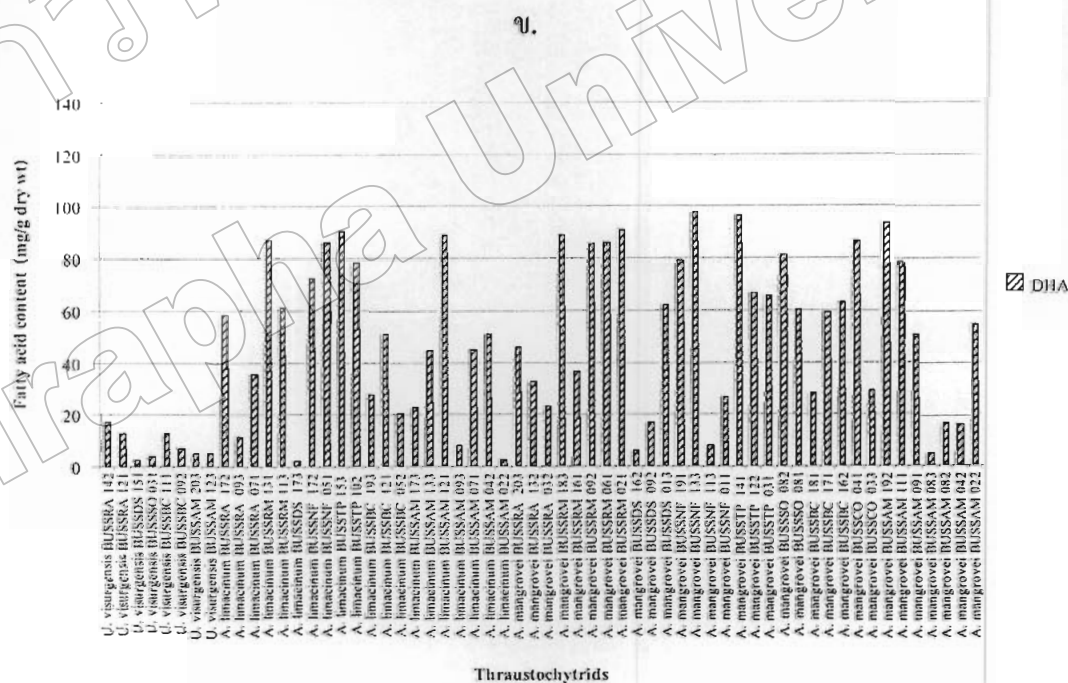
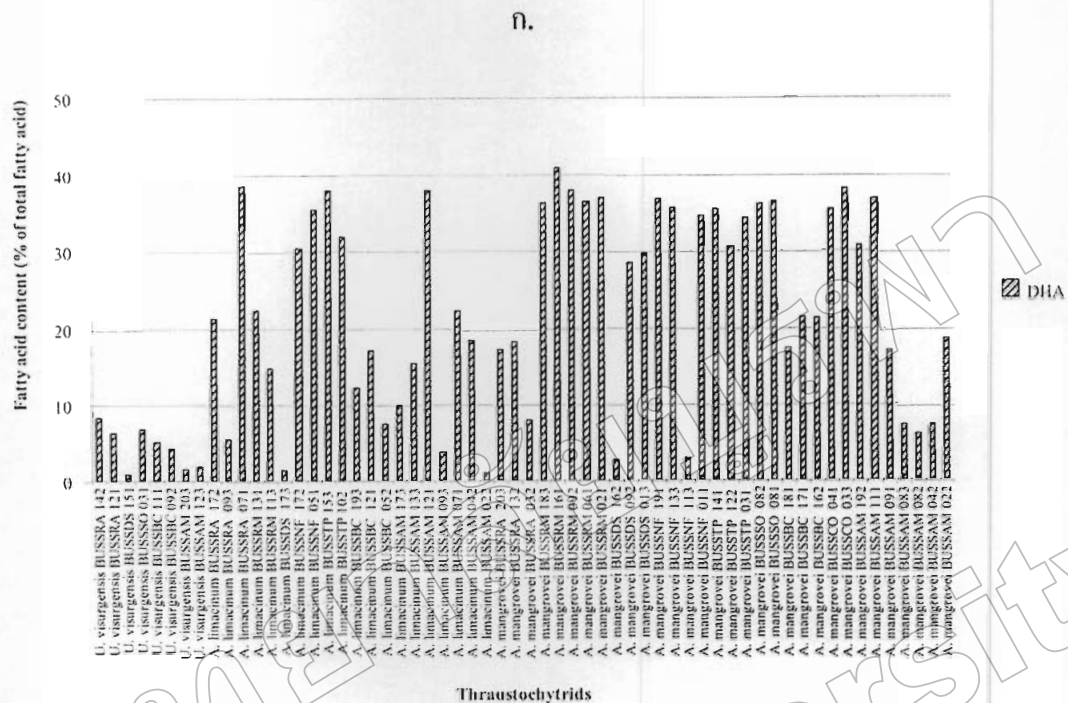
ข.



ภาพภาคผนวกที่ จ-10 ปริมาณกรดไขมันอีพีเอ ในทรอสโทโคดริคส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่นของ
 พันธุ์ไม้ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสาคร (เดือนสิงหาคม 2551)
 (ก. มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ข. เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)



ภาพภาคผนวกที่ จ-11 ปริมาณกรดไขมันดีฟิเอ ในทรอสโทโคดริคัสจากใบไม้ที่ร่วงหล่นของ
พันธุ์ไม้ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสาคร (เดือนสิงหาคม 2551)
(ก. มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ข. เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)



ภาพภาคผนวกที่ ก-12 ปริมาณกรดไขมันดีเอชเอ ในทรอสโทโคตริคส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่นของ
พันธุ์ไม้ป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสาคร (เดือนสิงหาคม 2551)
(ก. มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ข. เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด)