กรดไขมันในแอคติโนมัยซีทจากดินและฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งของประเทศไทย

Fatty Acid in Actinomycetes Isolated from Soils and Marine Sponges Collected from the Coasts of Thailand

ณิษา สิรนนท์ธนา* จารุนันท์ ประทุมยศ จันทร์จรัส วัฒนะโชติ และ รวิวรรณ วัฒนดิลก

Nisa Siranonthana*, Jarunan Pratoomyot, Janjarus Watanachote and Rawiwan Watanadilok

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

Institute of Marine Science, Burapha University

Received : 8 January 2016

Accepted : 15 June 2016

Published online : 6 July 2016

บทคัดย่อ

จากการศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันในแอคติโนมัยซีทจำนวน 22 ไอโซเลต ที่คัดแยกจากดินและฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี จันทบุรี และนครศรีธรรมราช ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-เฟลมไอออไนเซชั่นดีเทคเตอร์ พบกรดไขมันอิ่มตัวชนิดกรดปาล์มมิติก [Palmitic acid (C16:0)] ในปริมาณสูงสุดถึงร้อยละ 22.92 ของกรดไขมันทั้งหมด ยกเว้นในไอโซเลต NS2-2 สกุล *Nocardiopsis*, NS4-6 สกุล *Streptomyces* และไอโซเลต WN-POR-02-1 สกุล *Micromonospora* พบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) โดยไอโซเลต NS2-2 พบ Linoleic acid (C18:2n6) และ**α**-Linolenic acid (C18:3n3) ในปริมาณสูงสุดถึงร้อยละ 37.38 ± 0.27 และ 4.07 ± 0.09 ของกรดไขมันทั้งหมด ซึ่งกรดไขมันทั้งสองเป็นกรดไขมันจำเป็น ที่เป็นสารเริ่มต้นของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 และโอเมก้า 6 ซึ่งสัตว์บกและสัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์ได้เองต้องได้รับจากอาหารที่กินเท่านั้น ดังนั้นควรนำแอคติโนมัยซีทไอโซเลต NS2-2, NS4-6 และ WN-POR-02-1 ไปพัฒนาเพื่อเป็นแหล่งกรดไขมันจำเป็น

คำสำคัญ : แอคติโนมัยซีท กรดไขมัน

Abstract

Twenty two isolates of actinomycetes from soil and marine sponge collected from the coast of Thailand at Chonburi, Chanthaburi, and Nakhon-Si Thammarat were determined for fatty acid composition by GC/FID. The study found that the SFAs was the main component in all isolates; C16:0 was found in the highest amount 22.92%TFA, except for three isolates “NS2-2” genus *Nocardiopsis*, “NS4-6” genus *Streptomyces* and “WN-POR-02-1” genus *Micromonospora* which the PUFAs was the main component. The highest levels of linoleic acid (C18:2n6) and **α**-linolenic acid (C18:3n3) were found in isolate NS2-2 at 37.38 ± 0.27% and 4.07 ± 0.09% total fatty acid respectively. These two PUFAs are the precursors of long chain omega-6 and omega-3 families which are essential fatty acids for both aquatic and terrestrial species, as these cannot be synthesized by certain species and thus these must be supplied within the diet. So the actinomycete isolates NS2-2, NS4-6 and WN-POR-02-1 should be develop as the sources for essential fatty acid productions.

Keywords: Actinomycetes, Fatty acid

***Corresponding author. E-mail :** nisas@buu.ac.th

บทนำ

กรดไขมันจำเป็น (Essential Fatty Acids) เป็นกรดไขมันที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพ ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริม และใช้ในทางการแพทย์ โดยเฉพาะกลุ่มn-3 α-Linolenic acid (C18:3n3) ใช้ป้องกันการเกิดโรคหัวใจและอัมพาต ลดการอักเสบ เพิ่มภูมิคุ้มกันในร่างกาย กลุ่มn-6 Linoleic acid (C18:2n6) ใช้ป้องกันการเกิดโรคหัวใจ ลดอัตราการเกิดโรคความดันโลหิตสูง ลดการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง ป้องกันโรคสมองเสื่อม รวมทั้งนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ โดยเฉพาะกรดไขมัน ที่ให้สัตว์น้ำกินมีบทบาทอย่างมากในการเพิ่มการรอดตายและการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำวัยอ่อน เนื่องจากสัตว์น้ำวัยอ่อนบางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวจำเป็นได้ จะต้องได้รับจากการกินอาหารเท่านั้น (Thongrod,1992) จากงานวิจัยพบว่าอาหารที่มีกรดไขมันชนิด n-3 สูงจะเพิ่มอัตราการอยู่รอดและลดความรุนแรงของเชื้อโรคที่เกิดตามธรรมชาติได้ (Ergas *et al.,* 2002; Simupoulos, 2002) เช่นเดียวกับงานวิจัยผลทางโภชนาการของกรดไขมันในการต่อต้านโรค (Autoimmune disease) ของ Harbige ในปี ค.ศ.1998 ที่กล่าวว่าอาหารที่มีกรดไขมันชนิด n-3 สูง จะเพิ่มอัตราการอยู่รอดและลดความรุนแรงของโรคในสัตว์ทดลอง และจากรายงานการใช้แบคทีเรีย *Rhodovulum sulfidophilum* ที่คัดแยกจากน้ำทะเลเป็นอาหารเสริมร่วมกับการใช้อาหารตามปกติพบว่าปลานิล *Oreochromis niloticus* มีอัตราการรอดตายและการเติบโตที่ดีกว่าการกินอาหารตามปกติ (Banerjee *et al.,* 1999) จากความต้องการบริโภคกรดไขมันเหล่านี้เพิ่มขึ้น ทำให้มีการค้นหาแหล่งกรดไขมันจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ กันอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญได้รวดเร็วในอาหารที่ไม่ซับซ้อน ใช้วัตถุดิบได้หลากหลายและราคาถูก การคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมจากธรรมชาติสามารถทำได้ง่าย เนื่องจากมีความหลากหลายสูง การปรับปรุงสายพันธุ์ก็สามารถทำได้ง่ายโดยอาจใช้วิธีเปลี่ยนแปลงระบบเอนไซม์หรือวิถีในการสังเคราะห์ ซึ่งสามารถนำมาทดแทนกรดไขมันจากน้ำมันปลาได้ ซึ่งในน้ำมันปลาอาจมีการปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงและโลหะหนัก ตลอดจนสารพิษในสิ่งแวดล้อม (Bernan *et al.,* 1997; Berge & Barnathan, 2005; Ratledge, 2004) มีรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบกรดไขมันในแอคติโนมัยซีทว่าส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัวสายตรง ตั้งแต่ C13-C18 โดยมีการพบกรดไขมันในแอคติโนมัยซีท genus *Nocardiopsis,* ที่คัดแยกจากตะกอนดินในเมือง Kunsan ประเทศเกาหลี (Chun *et al.,* 2000) และพบ Oleic acid (C18:1n9) และ Palmitic acid (C16:0) เป็นกรดไขมันหลักในผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินของ Mariana Trench (Pathom-aree *et al.,* 2014) มีรายงานว่าในฟองน้ำทะเลมากกว่า 30 ชนิดจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน พบฟองน้ำทะเลจำนวน 10 ชนิดเป็นแหล่งของแอคติโนมัยซีท (Cassler *et al.,* 2008) จากรายงานผลการวิจัยในช่วง 16 ปีที่ผ่านมา พบว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนอยู่ในสกุล *Shewanella, Colwellia, Moritella, Pseudomonas, Psychoroflexus* และ *Photobacterium* ซึ่งพบในลำไส้ปลิงทะเล ทะเลน้ำแข็งแอนตาร์ติก ตะกอนดิน หอย ต่อมหมึกของปลาหมึก ในทะเลลึกและในน้ำทะเลประเทศญี่ปุ่น (Nichol, 2003) และจากรายงานของ Nichol และ McMeekin ในปี 2002 พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Shewanella* และ *Colwellia* สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน เช่น 20:4n3 และ 22:6n3 ได้เช่นกัน

การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะหาชนิดและปริมาณกรดไขมันในแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินและฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี จันทบุรี และนครศรีธรรมราช ซึ่งแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา พบได้มากในสิ่งแวดล้อมทั้งทางบกและทางน้ำ (Zhao *et al.,* 2004) โดยในดินที่อุดมสมบูรณ์ 1 กรัมสามารถพบแอคติโนมัยซีทได้มากกว่า 1 ล้านเซลล์ (Srivibool, 2006) การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากฟองน้ำทะเลมีความน่าสนใจ เนื่องจากฟองน้ำทะเลเป็นสิ่งมีชีวิตที่เก่าแก่ที่สุดของสัตว์หลายเซลล์ สามารถดำรงชีวิตอยู่มาเป็นเวลายาวนาน โดยมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างน้อยมาก เพราะฟองน้ำสร้างกลไกป้องกันตัวเองอย่างมีประสิทธิภาพโดยการผลิตสารพิษหรือสารเคมีอื่นๆ สารเคมีที่ฟองน้ำผลิตมาเพื่อปกป้องตัวเองนี้เชื่อว่ามีส่วนที่วิวัฒนาการไปเป็นสารผลิตภัณฑ์

ธรรมชาติที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจ โดยเฉพาะสารกลุ่มไขมันซึ่งมีรายงานว่ากรดไขมันจากฟองน้ำทะเลจะมีความหลากหลายและมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ (Pravat *et al*.,2009) แอคติโนมัยซีทจัดเป็นแบคทีเรียที่มีคุณค่าและมีคุณประโยชน์มหาศาลต่อเศรษฐกิจ ต่องานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ชีวภาพจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง สารแอนติไบโอติก และสารเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน (Selvameenal *et al.,* 2009) มีรายงานกล่าวว่า *Streptomyces* เป็นแหล่งจุลินทรีย์ที่สำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ มีการนำมาใช้ประโยชน์ด้านยาสำหรับมนุษย์และนำมาใช้ทางการเกษตร (Watve *et al*.,2001) มีรายงานการวิจัยจำนวนมากเกี่ยวกับคุณค่าทางอาหารของแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ที่ ใช้เป็นอาหารสัตว์ (Volkman *et al.,* 1989; Brown *et al.,* 1997) แต่มีรายงานการวิจัยไม่มาก ทางด้านการเพาะเลี้ยงที่กล่าวถึงการนำแบคทีเรียมาเป็นอาหารสัตว์น้ำ (Brown *et al.,* 1996; Leonardo & Lucas, 2000; Intriago & Jones, 1993) ซึ่งข้อมูลกรดไขมันในแอคติโนมัยซีทที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะนำไปศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ปริมาณกรดไขมันชนิดจำเป็นมากขึ้น และนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สารกระตุ้นภูมิสำหรับสัตว์น้ำ ซึ่งจะเป็นทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินตะกอนบริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี จันทบุรี ในเดือนมีนาคม 2556 โดยเก็บเฉพาะส่วนผิวหน้าดินใส่ในถุงพลาสติกที่ปลอดเชื้อ ส่วนตัวอย่างฟองน้ำทะเล *Chalinula* sp. (WN-POR-02) และฟองน้ำ *Dysidea* sp. “grey” (WN-POR-06) เก็บจากเกาะวังนอก หมู่เกาะทะเลใต้ จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยวิธี Scuba diving ความลึก 5-12 เมตร จากนั้นแช่เย็น และนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา เพื่อคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

การคัดแยกแอคติโนมัยซีท

นำตัวอย่างดินมาปรับสภาพ (Pretreated) โดยอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เจือจางตัวอย่างลำดับส่วนแบบ10 เท่า ด้วยน้ำทะเลธรรมชาติแบบปลอดเชื้อจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-1} และ 10^{-2} ส่วนตัวอย่างฟองน้ำทะเลนำมาล้างด้วยน้ำทะเล คัดแยกสิ่งปนเปื้อนออก จากนั้นหั่นตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (Esin & Atac, 2012) นำมาบดด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ปิเปตตัวอย่างมาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง 3 ชนิด ได้แก่ Actinomycete isolation agar (AIA), Starch-Casein Agar (SCA) และ Malt extract-yeast extract medium (ISP2) เติม 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Novobiocin และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Nystatin เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อรา นำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จนกระทั่งปรากฏโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำโคโลนีดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงให้เจริญบนจานเพาะเชื้อ ในอาหารเหลว ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 7-14 วัน (Williams *et al*.,1989) จากนั้นเก็บเซลล์แอคติโนมัยซีทด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ รวบรวมเซลล์ที่ได้เพื่อรอการสกัดไขมัน

การจำแนกชนิดแอคติโนมัยซีท

จำแนกชนิดแอคติโนมัยซีทจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscrope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (scanning electron microscope) โดยพิจารณาจากเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ รูปทรงสปอร์ และพื้นผิวสปอร์ (Williams *et al.,*1989) และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ของเซลล์ โดยพิจารณาลักษณะของกรดไดอะมิโน พิเมลิกในผนังเซลล์ (diaminopimelic acid, DAP) และการวิเคราะห์น้ำตาลภายในเซลล์ที่ถูกย่อย โดยโครมาโทรกราฟีแบบผิวบาง (Ruan,1994)

การสกัดไขมันและการวิเคราะห์กรดไขมัน

ชั่งตัวอย่างเซลล์แอคติโนมัยซีท 0.5-1.0 กรัม น้ำหนักสด เติมสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2:1) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ผสมสารบีเอชที 0.01 % นำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิคเป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนใส่กรวยแยก และสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้นำมารวมกันในกรวยแยก เติมสารละลาย 0.88 % โพแทสเซียมคลอไรด์ ปริมาณ 1 ใน 4 ของปริมาตรสารละลาย ปล่อยไว้ให้แยกชั้น กรองสารละลายชั้นล่างผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำสารสกัดไขมันที่ได้ไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสารแบบสูญญากาศ (Folch *et al*., 1957) เพื่อทำทรานเอสเทอริฟิเคชั่นต่อไป

การทรานเอสเทอริฟิเคชั่น

นำตัวอย่างไขมันมาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น ด้วยการเติม10 มิลลิลิตร 1% กรดซัลฟูริกในเมทานอล นำไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง (Christie, 2003) นำสารละลายออกจากตู้อบทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายสารละลายใส่กรวยแยก จากนั้นเติมสารละลาย 5% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมเฮกเซนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก สกัดเก็บสารละลายชั้นเฮกเซน สกัดซ้ำ 2 ครั้ง เก็บรวบรวมส่วนเฮกเซนไว้ด้วยกัน เติมสารละลาย 2% โพแทสเซียมไบคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร เขย่าเล็กน้อย ปล่อยไว้ให้แยกชั้น เก็บส่วนของเฮกเซน กรองผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส จากนั้นระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสารแบบสูญญากาศและเป่าแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน นำตัวอย่างที่แห้งมาละลายด้วยเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วถ่ายลงในขวด Vial จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

การตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมัน

นำกรดไขมันที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-เฟลมไอออไนเซชั่นดีเทคเตอร์ Agilent Technologies 7820A GC system ประเทศสหรัฐอเมริกา สารมาตรฐานกรดไขมัน Supelco 37-Component FAME Mix, USA ใช้คอลัมน์ HP–INNOWAX ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร และเคลือบด้วย Polyethylene glycol หนา 0.25 ไมโครเมตร ปริมาตรที่ฉีด 1 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้ ฉีดด้วยระบบ Split ในอัตราการ Spit เท่ากับ 10: 1 อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม (แก๊สพา) 1.1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ ณ จุดฉีดสารเท่ากับ 240 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่อุปกรณ์ตรวจวัด (ดีเทคเตอร์) เท่ากับ 260 องศาเซลเซียส โปรแกรมอุณหภูมิวิเคราะห์เริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส คงอุณหภูมิไว้เป็นเวลา 0.50 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 170 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 5 องศาเซลเซียสต่อนาทีและคงอุณหภูมิไว้ 10 นาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 190 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 3 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ 15 นาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 210 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 2 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิไว้ 15 นาที รวมระยะเวลาทั้งหมดในการวิเคราะห์ 54 นาที

การแยกและการตรวจวัด

สำหรับการวิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันในตัวอย่าง ใช้การเปรียบเทียบเวลาที่พีคของสารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์เทียบกับเวลาของสารมาตรฐานซึ่งทราบแล้วว่าแต่ละพีคเป็นกรดไขมันชนิดใด ส่วนการหาปริมาณของกรดไขมัน ทำโดยใช้การเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของตัวอย่างกับพื้นที่ทั้งหมดการคำนวณ %กรดไขมันตามสูตร

$$\%\text{กรดไขมัน} = 100 \times \text{พื้นที่ใต้พีคของกรดไขมัน} / A$$

$$A = \text{พื้นที่ใต้พีคกรดไขมันทั้งหมด} - (\text{พื้นที่ใต้พีคเฮกเซน} + \text{พื้นที่ใต้พีค BHT})$$

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันในเซลล์แอคทีโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนจังหวัดจันทบุรี ชลบุรี และนครศรีธรรมราช จำนวน 22 ไอโซเลต เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 เป็นเวลา 7-14 วัน พบกรดไขมัน 7-12 ชนิด มีปริมาณแตกต่างกันไป กรดไขมันที่ตรวจพบได้แก่ C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C16:1n7, C17:0, C17:1, C18:0, C18:1n9, C18:3n3, C18:3n6 และ C18:2n6 ปริมาณกรดไขมันโดยรวมพบสูงสุดในไอโซเลต NS2-2 ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนจังหวัดนครศรีธรรมราช ในปริมาณร้อยละ 96.28 รองลงมาเป็น ไอโซเลต NS4-6 และ WN-POR- 02-1 ในปริมาณ ร้อยละ 87.94 และ 84.33 ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) ชนิดกรดไขมันที่ตรวจพบเป็นชนิดอิ่มตัว (SFAs) โดยพบ Palmitic acid (C16:0) ปริมาณสูงสุด (ร้อยละ19.39) ยกเว้น ไอโซเลต NS2-2, NS4-6 และ WN-POR-02-1 เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) (ภาพที่ 2) โดยพบ Linoleic acid (C18:2n6) ปริมาณสูงสุดร้อยละ 37.38, 36.26 และ 28.61 ของกรดไขมันโดยรวม ตามลำดับ (ภาพที่ 3) และพบ **α**-Linolenic acid (C18:3n3) สูงสุด ในไอโซเลต NS2-2, NS4-6 และ WN-POR- 02-1 เช่นกัน ในปริมาณร้อยละ 4.07, 2.75 และ 2.02 ของกรดไขมันโดยรวม (ตารางที่ 1) ซึ่งกรดไขมันทั้งสองเป็นกรดไขมันจำเป็น เป็นสารเริ่มต้นของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 และ โอเมก้า 6 ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะสอดคล้องกับการศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันในแอคติโนมัยซีท *Streptomonospora halophila* sp. ที่คัดแยกจากดินในจังหวัด Xinjiang ประเทศจีน พบองค์ประกอบกรดไขมันเป็น C16:0, C17:0, C18:0 (Cai *et al.,*2008) และจากการศึกษาของ Sobolevskaya และคณะ ในปี 2012 ที่ทำการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันอิสระในตัวอย่าง *Streptomyces* sp. KMM 7210 และ *Nocardiopsis umidischolae* KMM 7036 จาก Okhotsk Sea โดยเลี้ยงด้วย Potato starch และ Millet broth พบว่ามีการผลิตกรดไขมันชนิดอิ่มตัว และชนิดไม่อิ่มตัว และแบบ branched fatty acids และพบ *Streptomyces 7* สายพันธุ์ จีนีส *Streptomyces* ที่คัดแยกจากทะเลสาบ Baikal มีการผลิตกรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัว ชนิดไม่อิ่มตัว และแบบ branched fatty acids และจากการศึกษาของ Goodfellow และคณะในปี 2012 พบกรดไขมัน C16:0 ปริมาณร้อยละ 37.4 และ C17:1 ปริมาณร้อยละ 24.9 ในตัวอย่างแอคติโนมัยซีท *Verrucosispora fiedleri* sp. ที่คัดแยกจากดินตะกอนประเทศนอร์เวย์ จากรายงานของ Koval และคณะในปี 1980 กล่าวว่ารูปแบบของกรดไขมันในตัวอย่างแอคทีโนมัยซีทจะเป็นกรดไขมัน C13-C19 และขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการจำแนกแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ พบว่าไอโซเลต NS2-2 อยู่ในสกุล *Nocardiopsis* ไอโซเลต NS4-6 อยู่ในสกุล *Streptomyces* และไอโซเลต WN-POR-02-1 อยู่ในสกุล *Micromonospora* (Srivibool & Watanadilok, 2015) จากรายงานการศึกษาชนิดกรดไขมันในผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* จะพบกรดไขมัน C12-C17 กรดไขมันหลักจะเป็นกลุ่มC15:0 และC16:0 (Mellouli *et al.*,2011) ส่วนกรดไขมันในแอคติโนมัยซีทสกุล *Micromonospora* ส่วนใหญ่จะเป็น saturated unbranched, monomethyl และdimethyl branched กลุ่ม C15:0, C16:0, iso-C16:1 และ iso-17:0. (Jeroen *et al*., 2011; Trujillo *et al*., 2007) และจากรายงานของ Park และคณะในปี 1999 พบชนิดกรดไขมันหลักในแอคติโนมัยซีท *Nocardiopsis* จะเป็น branched fatty acids iso-C16:0

จากรายงานของ Dalsgaard และคณะในปี 2003 กล่าวว่ากรดไขมันในเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นชนิดอิ่มตัว (SFAs) และชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (MUFAs) ส่วนกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) จะพบน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ De Rosa และคณะ ในปี 2000 ที่ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำ *Dysidea fragilis* บริเวณทะเลดำ พบองค์ประกอบกรดไขมันเป็น C14:1 (ร้อยละ40.3) และ C16:0 (ร้อยละ18.4) ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด และจากการศึกษาของ Zheng และคณะในปี 2005 ที่ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลจากฟองน้ำ *Hymeniacidon perleve*

จากเกาะ Nanji ชายฝั่งทะเลประเทศจีน เป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัวร้อยละ 53.90 และชนิดไม่อิ่มตัวร้อยละ 44.60 โดยมีองค์ประกอบหลักคือ C16:1(ร้อยละ 36.64),C16:0 (ร้อยละ27.36) โดยผู้วิจัยกล่าวว่าองค์ประกอบกรดไขมันในแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม ได้แก่ แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ระยะการเจริญเติบโต และการให้และไม่ให้ออกซิเจนต่อองค์ประกอบกรดไขมันของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas nautica* strain IP 617 ผลการศึกษาสามารถแบ่งตามลำดับความสำคัญต่อการผลิตกรดไขมันดังนี้ แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ระยะการเจริญเติบโต ออกซิเจน (Doumenq *et al.,* 1999) และการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญเติบโต และการผลิตกรดไขมันของ De Rosa และคณะในปี 2003 ที่ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเล *Ircinia variabilis* ประเทศอิตาลี ความลึก 20 เมตร จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดลองได้แก่ Microfeast extract, Fish extract, Yeast extract และ Marine broth 2216 พบกรดไขมันเป็นชนิดอิ่มตัว โดยกรดไขมัน C18:2n6 พบในปริมาณสูงสุดในทุกอาหารที่ทำการศึกษา และพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อเจริญเติบโตได้ดีกว่า 18.5 องศาเซลเซียส อาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดคือ Microfeast extract ผสม Fish extract ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.6 เป็นเวลา 5 วัน

เมื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณกรดไขมันกับตัวอย่างแหล่งอื่นๆ พบว่าปริมาณ Linoleic acid (C18:2n6) ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบในปริมาณที่สูง แต่ **α**-Linolenic acid (C18:3n3) พบในปริมาณที่น้อยกว่า ดังเช่น จากรายงานชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กสีเขียว *Prasinophyceae* พบปริมาณกรดไขมัน **α**-Linolenic acid 16.17-16.67%, Linoleic acid 9.66-19.97% และในสาหร่าย *Chlorophyceae* พบกรดไขมัน **α**-Linolenic acid 20.02-30.63%, Linoleic acid 4.67- 20.61% ของกรดไขมันโดยรวม (Pratoomyot *et al.,* 2005) และจากการศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันในตัวอย่างปลาทะเลจำนวน 34 ชนิดจากทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ของ Ozogul และคณะ ในปี 2009 พบ Linoleic acid 0.06-3.48% และจากรายงานการศึกษาของ Kocatepe และ Turan ในปี 2012 ที่พบปริมาณของ Linoleic acid ในปลาเศรษฐกิจจากทะเลดำ 6 ชนิด ในปริมาณ 1.38-3.49% ของกรดไขมันโดยรวม ซึ่ง Linoleic acid เป็นกรดไขมันจำเป็นที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ แต่มีความจำเป็นต่อร่างกาย หากขาดจะทำให้ร่างกายขาดความสมดุล ความแข็งแรง รวมทั้งมีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการต่างๆ มีรายงานกล่าวว่าปลาที่ขาดกรดไขมัน Linoleic acid และ **α**-Linolenic acid ทำให้เจริญเติบโตช้า เซลล์ครีบหางตายตับซีด มีไขมันมาก ผิวขาวบรอนซ์ ท้องบวม เม็ดเลือดแดงแตก หายใจเร็วขึ้นกว่าปกติ (Lovell, 1998)

Linoleic acid (C18:2n6) เป็นสารตั้งต้นของโอเมก้า 6 สายยาว อันได้แก่ Arachidonic acid, ARA; 20:4n6 และDocosapentaenoic acid,DPA; 22:5n6ส่วน **α**-linolenic acid, ALA;18:3n3 เป็นสารตั้งต้นของ Eicosapentaenoic acid,EPA;20:5n3 และ Docosahexaenoic acid, DHA; 22:6n3 (Gill & Valivety,1997) จัดเป็นสารตั้งต้น (Precursors) ของ Eicosanoids (Prostaglandins, Leukotrienes, Thromboxanes) ในร่างกายซึ่งมีผลต่อระบบการทำงานต่างๆ ภายในร่างกาย เช่น ระบบหลอดเลือดและหัวใจ ระบบการขนส่งสารผ่านเส้นเลือด กลไกการแข็งตัวของเลือด การส่งผ่านของสารสื่อประสาทกระบวนการเมทาบอลิซึมของไขมัน กลไกการอักเสบ และระบบภูมิคุ้มกัน (Sayanova & Napier, 2004; Horrobin,1992; Funk, 2001; Jump, 2002) จากการศึกษาเมื่อนำเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Streptomyces* เป็นอาหารเสริมในการเลี้ยงปลาสวยงาม *Xiphophorus helleri*, *Poecilia reticulate* พบว่าปลามีอัตราการเจริญที่ดีและมีอัตราการรอดตายสูงขึ้น (Dharmaraj & Dhevendaran, 2010; Ghosh *et al*., 2008) และจากการศึกษาอัตราการรอดของปลาบู่ marble goby (*xyeleotris marmorata*) ระยะวัยอ่อน ซึ่งเป็นปลาที่เลี้ยงแพร่หลายในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่ามีการเจริญเติบโตและมีอัตราการรอดสูงขึ้น เมื่อกินอาร์ทีเมียและโรติเฟอร์ ที่เลี้ยงด้วย

เชื้อแบคทีเรีย *Rhodovulum sulfidophilum* ซึ่งเป็น phototrophic bacteria แทนการเลี้ยงด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก เพราะใน phototrophic bacteria จะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน PUFAs โดยจะมี DHA สูงกว่าในสาหร่าย (Loo *et al.,* 2013)

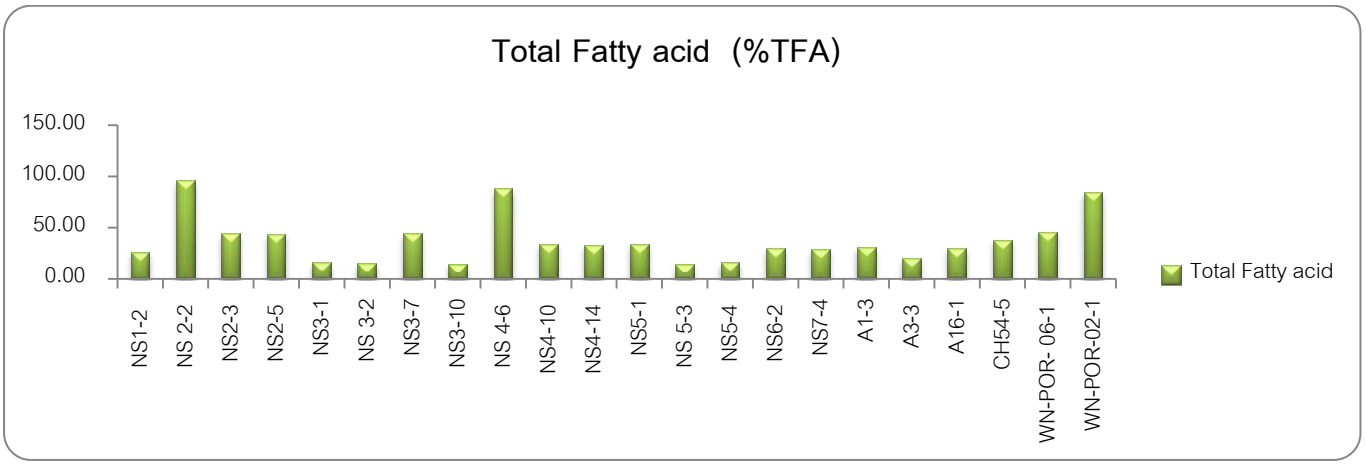
การศึกษาบทบาทของไขมันและกรดไขมันต่อภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (Calder, 2007) และสัตว์น้ำ (Balfry & Higgs, 2001) รายงานว่ากลไกการทำงานของกรดไขมันมีผลในการต้านทานโรคและมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำคล้ายคลึงกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และองค์ประกอบไขมันในอาหารมีผลต่อการต้านทานโรคโดยการผลิต eicosanoids จาก Arachidonic acid (C20:4n6), Eicosapentaenoic acid (C20:5n3), Docosahexaenoic acid (C22:6n3) (Balfry & Higgs, 2001) มีการศึกษาพบว่าไขมันในอาหารมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคของปลาและมีผลต่อการหมุนเวียนของแอนติบอดี้ในปลา (Blazer *et al*.,1989) ในการศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาว macrophage ของปลาเรนโบว์เทร้าในห้องปฏิบัติการ พบว่าประสิทธิภาพการทำลายเชื้อโรคลดลงเมื่อปลาเรนโบว์เทร้ากินอาหารที่ไม่มีกรดไขมัน แต่ปลาเรนโบว์เทร้าที่กินอาหารที่มี Linoleic acid (C18:2n6) และ n-3 HUFA มีผลให้ macrophage มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโรคได้ดีขึ้น (Kiron *et al*., 1995) จากรายงานดังกล่าวจะพบว่ากรดไขมันจำเป็นมีความสำคัญ ดังนั้นเพื่อให้ได้ปริมาณ α-Linolenic acid (C18:3n3) ที่มากขึ้นควรมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทซึ่งในปัจจุบันรายงานวิจัยของประเทศไทยเกี่ยวกับสภาวะการเลี้ยงแอคติโนมัยซีทยังไม่แพร่หลาย การได้มาของข้อมูลเหล่านี้มีความจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

สรุปผลการวิจัย

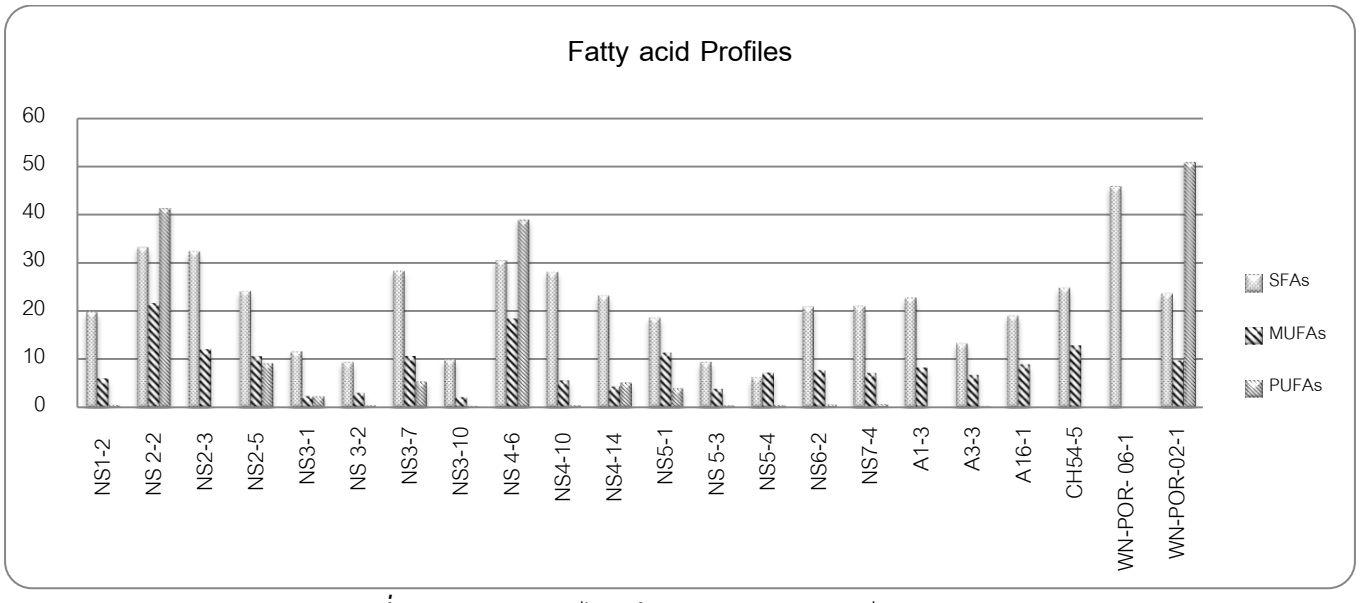
จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ากรดไขมันในแอคติโนมัยซีทไอโซเลต NS2-2, NS4-6 และ WN-POR-02-1 ที่คัดแยกจากดินและฟองน้ำทะเลจากชายฝั่งทะเลของประเทศไทยอยู่ในสกุล *Nocardiopsis, Streptomyces* และ *Micromonospora* ตามลำดับ มีการผลิตกรดไขมัน α-Linolenic acid และ Linoleic acid ที่เป็นสารเริ่มต้นของกรดไขมันโอเมก้า 3 และโอเมก้า 6 สายยาว แต่ปริมาณ α-Linolenic acid ที่ตรวจพบมีปริมาณน้อย ซึ่งกรดไขมันทั้งสองนี้มีความสำคัญต่อคนและสัตว์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น ดังนั้นควรมีการหาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณกรดไขมันจำเป็น α-Linolenic acid เพิ่มมากขึ้น เพื่อประโยชน์ทางด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สารกระตุ้นภูมิสำหรับสัตว์น้ำ ซึ่งจะเป็นทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อุตสาหกรรมยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

ตารางที่ 1 องค์ประกอบกรดไขมันในแอคติโนมัยซีทไอโซเลต NS2-2, NS4-6 และ WN-POR-02-1 (%TFA)

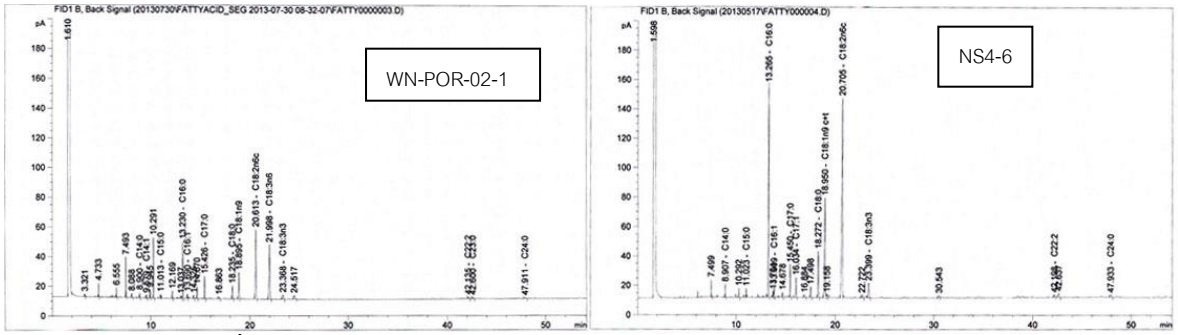
ชนิดกรดไขมัน	NS 2-2	NS 4-6	WN-POR-02-1
C10:0	nd	nd	nd
C12:0	nd	0.34 ± 0.02	nd
C13:0	nd	nd	nd
C14:0	nd	1.05 ± 0.02	1.03 ± 0.19
C14:1	nd	nd	0.60 ± 0.09
C15:0	1.72 ± 0.48	0.83 ± 0.07	0.86 ± 0.07
C15:1	nd	nd	nd
C16:0	18.69 ± 0.13	19.39 ± 0.07	12.11 ± 0.62
C16:1n7	2.41 ± 0.49	0.94 ± 0.08	1.03 ± 0.19
C17:0	3.03 ± 0.20	3.13 ± 0.06	5.60 ± 0.30
C17:1	2.21 ± 0.20	2.15 ± 0.01	nd
C18:0	9.79 ± 0.76	5.80 ± 0.08	4.04 ± 0.63
C18:1n9	16.97 ± 0.62	15.30 ± 0.23	8.15 ± 0.22
C18:2n6	37.38 ± 0.27	36.26 ± 0.88	28.61 ± 0.17
C18:3n6	nd	nd	20.29 ± 0.50
C18:3n3	4.07 ± 0.09	2.75 ± 0.14	2.02 ± 0.32
C20:0	nd	nd	nd
C20:1n9	nd	nd	nd
C20:2	nd	nd	nd
C20:3n6	nd	nd	nd
C20:4n6	nd	nd	nd
C20:5n3	nd	nd	nd
C22:0	nd	nd	nd
C22:1n9	nd	nd	nd
C22:2	nd	nd	nd
C23:0	nd	nd	nd
C24:0	nd	nd	nd
C22:6n3	nd	nd	nd
C24:1n9	nd	nd	nd
sum	96.28	87.94	84.33
SFAs	33.24	30.54	15.67
MUFAs	21.59	18.39	23.63
PUFAs	41.45	39.01	9.78



ภาพที่ 1 ปริมาณกรดไขมันโดยรวมในตัวอย่างแอคติโนมัยซีท (%TFA)



ภาพที่ 2 คุณลักษณะกรดไขมันในตัวอย่างแอคติโนมัยซีท



ภาพที่ 3 แสดงโครมาโทรแกรมของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต WN-POR-02-1 และ NS4-6

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผ่านงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพาประจำปี 2556-2558 และจำแนกชนิดเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยคุณรัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ พิสูจน์เอกลักษณ์ฟองน้ำทะเลโดยดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษจากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างมาก

เอกสารอ้างอิง

Balfry, S. K. & Higgs, D. A. (2001). Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. *In* Lim, C. and Webster, C.D. (eds.) *Nutritional and fish health.*(pp. 213-234). New York: The Haworth Press, Inc.

Banerjee, S., Azad, A., Vikineswary, S., Selvaraj, O.S., & Mukherjee,T.K. (1999). Phototrophic Bacteria as Fish Feed Supplement. *Microbial fish feed supplement*, 991-994.

Berge, J.P., & Barnathan, G. (2005). Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds and economical aspects. *Adv.Biochem Engin/ Biotechnol, 96*, 49-125.

Bernan, V.S.,Greenstein, M.,& Malese,W.M.(1997). Marine microorganism as a source of new natural products. *Applied Microbiology, 43,* 57-87.

Brown, M.R., Barrett, S.M., Volkman, J.K., Nearhos, S.P., Nell, J.A., & Allan, G.L. (1996). Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated ad food for bivalve aquaculture. *Aquaculture, 143,* 341-360.

Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., & Dunstan, G.A. (1997). Nutritional properties of microalgae for maricuture. *Aquaculture, 151*, 315-331.

Cai, M., Zhi, X.Y.,Tang, S.K., Zhang, Y.Q., Xu, L.H., & Li, W.J. (2008). *Streptomonospora halophile* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a hypersaline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58*,1556–1560.

Calder, P.C. (2007). Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, *77*, 327-335.

Cassler, M., Peterson, C.L., Ledger, A., Pomponi, S.A., Wright, A.E., Winegar, R., McCarthy, P.J., & Lopez, J.V. (2008). Use of real-time qPCR to quantify members of the unculturable heterotrophic bacterial community in a deep sea marine sponge, *Vetulina* sp. *Microb. Ecol., 55*, 384–394.

Christie, W.W. (2003). *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipid analysis: isolation, separation of lipids* (3rd ed.). (p.416). United Kingdom: The Oily press.

Chun, J., Bae, K.S., Moon, E.Y., Jung, S.O., Lee, H.K., & Kim, S.J. (2000). *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol, 50*, 1909-1913.

De Rosa, S., De Giulio, A., Tommonaro, G., Popov, S., & Kujumgiev, A. (2000). A β-amino acid containing tripeptide from a Pseudomonas-Alteromonas bacterium associated with a Black sea sponge. *J. Nat. Prod, 63*, 1454-1455.

De Rosa, S., Mitova, M., & Tommonaro, G. (2003). Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. *Biomol. Eng., 20*, 311-316.

Dalsgaard, J., St.John, M., Kattner, G., Muller-Navarra, D., & Hagen, W. (2003). Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv.Mar.Biol, 46*, 225-340.

Dharmaraj, S. & Dhevendaran, K. (2010) "Evaluation of Streptomyces as a probiotic feed for the growth of ornamental fish *Xiphophorus helleri*, *Food Technology and Biotechnology*, *48*(4), 497–504,

Doumenq, P., Acquaviva, M., Asia, L., Durbec, J.P., Dréau, Y.L., Mille, G., & Bertrand, J.C. (1999). The fatty acid changes in fatty acids of *Pseudomonas nautica*, a marine denitrifying bacterium, in response to n-eicosane as carbon source and various culture conditions. *FEMS Microbiology Ecology, 28*(2), 151–161.

Ergas, D., Eilat, E., Mendlovic, S., & Sthoeger, Z.M. (2002). n-3 Fatty acid and the immune system in autoimmunity. *Isr. Med. Assoc. J., 4*(1), 34-38.

Esin, E., Hames, K., & Atac, U. (2012). Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment sample. *Journal of Microbiological Method*, *88*, 342-347.

Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G.H., (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem., 226*, 497-509.

Funk, C.D. (2001). Prostaglandins and Leukotrienes: *Advances in eicosanoids biology Science, 294*, 1871-1875.

Ghosh, S., Sinha, A. & Sahu, C. (2008). Dietary probiotic supplementation on growth and health of live-bearing ornamental fishes. *Aquaculture Nutrition*, *14*(4), 289–299.

Gill, I., & Valivety, R. (1997). Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, *biological activities and application*. *Tibtech,15*, 401-409.

Goodfellow, M. (1989). Genus Rhodococcus *Zopf 1891 ,28*^{AL} .In Williams, Sharpe, and Holt (eds). *Bergey's Manual of Syatematic Bacteriology vol 4*. (pp.2362-2371). Williams and Wilkins. Baltimore.

Goodfellow, M., Brown, R., Ahmed, L., Pathom-aree, W., Bull, A.T., Jones, A.L., Stach, J.E.M., Zucchi, T.D., Zhang, L., & Wang, J. (2012). *Verrucosispora fiedleri* sp. nov., an actinomycete isolated from a fjord sediment which synthesizes proximicins. *Antonie van Leeuwenhoek, 101*, 185–193.

Harbige, L.S. (1998). Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. *Proc Nutr Soc., 57*(4), 555-62.

Horrobin, D.F. (1992). Nutritional and medical importance of γ-linolenic acid. *Prog Lipids Res, 31*, 167-194.

Intriago, P., & Jones, D.A. (1993). Bacteria as food for artemia. *Aquaculture, 113*, 115-127.

Jeroen, S.D., Bruns, H., & Riclea, R. (2011). Novel fatty acid methyl esters from the actinomycete *Micromonospora aurantiaca Beilstein J. Org. Chem, 7,* 1697–1712.

Jump, D.B. (2002). The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem, 277*, 8755- 8758.

Kiron, V., Fukuda, H., Takeuchi, T. & Watanabe, T.(1995). Essential fatty acid nutrition and defense mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative biochemistry and physiology*, *111A*, 361-367.

Kocatepe, D., & Turan, H. (2012). Proximate and fatty acid composition of some commercially important fish species from the Sinop region of the Black Sea. *Lipids, 47*(6), 635-641.

Koval'chuk, L.P., Donets, A.T., Burtseva, S.A., Ladovina, V.N., & Perepeli'tsa, E.D. (1980). Fatty acids of actinomycete phospholipids. *Mikrobiologiia, 49*(5), 746-750.

Leonardos, N., & Lucas, A.N.I. (2000). The use of larval fatty acids as an index of growth in *mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture, 184*, 155-166.

Loo, P.L., Chong, V.C., & Vikineswary, S. (2013). *Rhodovulum sulfidophilum*, a phototrophic bacterium, grown in palm oil mill effluent improves the larval survival of marble goby *Oxyeleotris marmorata* (Bleeker) *Aquaculture Research*, *44*, 495–507.

Lovell, R.T. (1998). *Nutrition and feeding of Fish*, Second edition. (p.267). Kluwer Academic Publishers. Massachusetts.

Mellouli, L. (2011). Taxonomy and antimicrobial activities of a new *Streptomyces* sp. TN17 isolated in the soil from an oasis in Tunis. *Arch. Biol. Sci., Belgrade, 63*(4), 1047-1056.

Nichol, D.S. (2003). Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. *FEMS Microbiology Letters, 219*, 1-7.

Nichol, D., & McMeekin, T.A. (2002). Biomarker techniques to screen for bacteria that produce polyunsaturated fatty acids. *Journal of Microbiological Methods, 48*, 161-170.

Nonomura, H., & Hayakawa, M. (1988). *New methods of the selective isolation of soil Actinomycetes*. In: Y. Okami, T. Beppu, H. Ogawara, Biology of Actinomycetes '88 ed. Japan: Scientific Societies Press.

Ozogul, Y., Ozogul, F., Ciçek, E., Polat, A., & Kuley, E. (2009). Fat content and fatty acid compositions of 34 marine water fish species from the Mediterranean Sea. *Int. J. Food Sci. Nutr, 60*(6), 464-475.

Park, Y.H., Yoon, J.H., Shin, Y.K., Kudo, S.K., Seino, A., Kim, H.J., Lee, J.S., & Lee, S.T. (1999). Classification of *Nocardioides fulvus'* IF0 14399 and *Nocardioides* sp. ATCC 39419 in *Kribbella* gen. nov., as *Kribbella flavida* sp. nov. and *Kribbella sandrarnycini* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *49*, 743-752.

Pathom-aree, W., Yuichi, N., Sutcliffe, I.C., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., & Goodfellow, M. (2014). *Williamsia marianensis* sp. A novel actinomycete isolated from the Mariana Trench. (Announcing a February 2014 special issue) in the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56*(5), 1123-1126.

Pratoomyot, J., Srivilas, P., & Noiraksar, T. (2005). Fatty acids composition of 10microalgal species. *Songklanakarin, J. Sci. Technol, 27*(6), 1179-1187.

Pravat, M.M., Aginampudi, S., Madhusmita, A., & Das, A.P. (2009). Fatty acid profiles and antibacterial screening of lipid of sponge Fasciospongia cavernosa (Schmidt) collected from the bay of Bengal. *J. Serb. Chem. Soc*., *74* (11), 1241–1248.

Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie, 86*(11), 807–815.

Ruan, J.S. (1994). Rapid isolation and identification of actinomycetes. In: *UNESCO Southeast Asia Regional Training Workshop-Rapid Method in Microbiology and Biotechnology*. (Ruan-29-Ruan-47). Bangkok.

Sayanova, O.V., & Napier, J.A. (2004). Eicosapentaenoic acid; Biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. *Phytochemistry, 65*, 147-158.

Selvameenal, L., Radhakrishnan, M., & Balagurunathan, R. (2009). Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. *Indian Journal of Pharmaceutical, 71*(5), 499-504.

Simupoulos, A.P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and Autoimmune diseases. *J.Am. Coll. Nutr*., *21*(6), 495-505.

Sobolevskaya, M., Shevchenko, L., Moiseenko, O., & Afiyatullov, S. (2012). Fatty-acid compositions of marine isolates of the actinobacteria Nocardiopsis umidischolae KMM 7036 and *Streptomyces* sp. KMM 7210. *Chemistry of Natural Compounds, 48*(2), 299-300.

Srivibool, R. (2006). *Actinomycete*. (pp.1). Chonburi. Success Advertising Design Partnership. (in Thai)

Srivibool, R & Watanadilok, R. (2015). Distribution of Actinomycetes in Thai Mangrove Sediments. In *Proceeding Burapha University International Conference*. (pp.944-952). Bangsaen Heritage.

Thongrod, S. (1992). The role of fat in fish feed. *Thai Fisheries Gazette, 45*(4), 943-950. (in Thai).

Trujillo, M.E., Kroppenstedt, R.M., Molinero, C.F., Schumann, P. & Molina, E.M. (2007). *Micromonospora lupini* sp*. nov.* and *Micromonospora saelicesensis* sp*. nov.,* isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57,* 2799–2804.

Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I., & Garland, C.D. (1989). Fatty acid and Lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp.Mar. Biol. Ecol., 128*, 219-240.

Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., & Bhole, B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Arch. Microbiol*., *176*, 386–390.

Williams, S.T., Sharpe, M.E. & Holt, J.G. (1989). *Bergey's Manual of Systematic bacteriology. Vol.4*, (pp.2314-2315). Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Zhao, H.Y., Kassama, M., Young, D.B., & Kell, R.G. (2004). Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of Fourier transform infrared spectroscopy,16S rRNA

sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique. *Applied and Environmental Microbiology, 70*, 679-682.

Zheng, L., Yan, X., Xu, J., Chen, H., & Lin, W. (2005). *Hymeniacidon perleve* associated bioactive bacterium *Pseudomonas* sp. NJ6-3-1. *Applied Biochemistry and Microbiology, 41*(1), 29-33.