



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทรอสโทไคตริตส์จากระบบนิเวศชายฝั่งทะเลจังหวัดจันทบุรี (ป่าชายเลน):
ความหลากหลายทางชีวภาพและการคัดแยก เพื่อจัดทำฐานข้อมูลและ
การนำไปใช้ประโยชน์

Thraustochytrids Along Coastal Ecosystem of Chanthaburi Province
(Mangrove): Biodiversity, Screening and Isolation for
Database and Utilities

สมถวิล จริตควร และ สุธาร์ตน์ สนวนจิตร

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) (อพ.สธ.)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 258363
สัญญาเลขที่ 186/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทรอสโตไคตริตส์จากระบบนิเวศชายฝั่งทะเลจังหวัดจันทบุรี (ป่าชายเลน):
ความหลากหลายทางชีวภาพและการคัดแยกเพื่อจัดทำฐานข้อมูลและการนำไปใช้ประโยชน์

Thraustochytrids Along Coastal Ecosystem of Chathaburi Province (Mangrove):
Biodiversity, Screening and Isolation for Database and Utilities

สมถวิล จริตควรร และ สุदारัตน์ สนวนจิตร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กุมภาพันธ์ 2562

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 186/2560 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณภาควิชาวาริชศาสตร์ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ขอขอบคุณคุณนฤมล ฐปบุชา คุณทิวพร ทองประสม และนิสิตภาควิชาวาริชศาสตร์ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่าง และช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สมถวิล จริตควร
สุदारัตน์ สวนจิตร

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้คัดแยกจุลินทรีย์ทะเลกลุ่มทรอสโทโคตริดส์จากใบไม้ป่าชายเลนที่ร่วงหล่น บริเวณป่าชายเลน 3 แห่ง ได้แก่สถานที่ที่ 1 แหลมแม่เหล็กแก้ว จังหวัดจันทบุรี สถานที่ที่ 2 ศูนย์ศึกษา การพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดจันทบุรี และสถานที่ที่ 3 สถานี พัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) จังหวัดจันทบุรี ได้ทั้งสิ้น 14 ชนิด จำนวน 1,525 ไอโซเลท ได้แก่ *Aurantiochytrium limacinum*, *Aurantiochytrium* sp.1, *Aurantiochytrium* sp.2, *Aurantiochytrium* sp.3, *Parietichytrium sarkarianum*, *Shizochytrium* sp.2, *Thraustochytriidae* sp.8, *Thraustochytriidae* sp.9, *Thraustochytriidae* sp.10, *Thraustochytriidae* sp.11, *Thraustochytriidae* sp.12, *Thraustochytriidae* sp.13, *Thraustochytriidae* sp.14, *Thraustochytriidae* sp.15 ในฤดูฝน มีความถี่ของการพบ (Frequency of Occurrence) อยู่ในช่วง 5-75 เปอร์เซ็นต์ โดย *Thraustochytriidae* sp.14 มีความถี่ของการพบสูงสุด (75 เปอร์เซ็นต์) ส่วนทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกในฤดูแล้งมีความถี่ของการ พบอยู่ในช่วง 5-85 เปอร์เซ็นต์ โดย *Aurantiochytrium* sp.1 กับ *Thraustochytriidae* sp.14 มีความถี่ของการพบสูงสุด (85 เปอร์เซ็นต์)

สำหรับกรดไขมันดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid) พบว่า *Aurantiochytrium limacinum* มีปริมาณเฉลี่ยสูงสุดในฤดูฝนเท่ากับ 145.91 ± 18.97 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (32.91 ± 2.57 % of total FA) สำหรับ ปริมาณเออาร์เอ (Arachidonic acid) และอีพีเอ (Eicosapentaenoic acid) พบสูงสุดใน *Schizochytrium* sp.2 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.35 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (5.21 ± 0.43 และ 5.74 ± 0.29 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (12.75 ± 0.40 % of total FA) ตามลำดับ ส่วนปริมาณดีพีเอ (Docosapentaenoic acid) พบเฉลี่ย สูงสุดใน *Thraustochytriidae* sp.9 เท่ากับ 34.38 ± 2.09 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (7.18 ± 0.29 % of total FA) ส่วนชีวมวลพบสูงสุดใน *Thraustochytriidae* sp.8 ($17.81-22.43$ กรัมต่อลิตร) จะ เห็นว่าทรอสโทโคตริดส์มีศักยภาพสูงในการเป็นแหล่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง โดยเฉพาะดีเอชเอที่ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรือเชิงพาณิชย์ต่อไป

คำสำคัญ: ป่าชายเลน, ทรอสโทโคตริดส์, กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง, ดีเอชเอ

ABSTRACT

Screening and isolation of thraustochytrids from fallen senescent mangrove leaves of 3 stations in Chanthaburi Province: Laem Mae Nok Kaew (S1), Kung Krabaen Bay Royal Development Study Center (S2), and Mangrove Resources Development Station 2 Tha Son (S3). A total of 1,525 thraustochytrid isolates were obtained, classified into 14 species, namely, *Aurantiochytrium limacinum*, *Aurantiochytrium* sp.1, *Aurantiochytrium* sp.2, *Aurantiochytrium* sp.3, *Parietichytrium sarkarianum*, *Schizochytrium* sp.2, Thraustochytriidae sp.8, Thraustochytriidae sp.9, Thraustochytriidae sp.10, Thraustochytriidae sp.11, Thraustochytriidae sp.12, Thraustochytriidae sp.13, Thraustochytriidae sp.14, Thraustochytriidae sp.15. Frequency of occurrence of thraustochytrids in the rainy season ranged from 5-75%, which Thraustochytriidae sp.14 had the highest as 75%. While thraustochytrids in the dry season had frequency of occurrence ranged from 5-85%, which *Aurantiochytrium* sp.1 and Thraustochytriidae sp.14 had the highest as 85%.

For fatty acid composition in thraustochytrids, the average content of DHA (Docosahexaenoic acid) was found in *Aurantiochytrium limacinum* which represented as 145.91 ± 18.97 mg/g dry weight (32.91 ± 2.57 % of total fatty acid). Arachidonic acid (ArA) and eicosapentaenoic acid (EPA) were highest in *Schizochytrium* sp.2 as 2.35 ± 0.20 mg/g dry weight (5.21 ± 0.43 % of total fatty acids) and 5.74 ± 0.29 mg/g dry weight (12.75 ± 0.40 % of total fatty acids), respectively. High content of Docosapentaenoic acid (DPA) were revealed in Thraustochytriidae sp.9 as 34.38 ± 2.09 mg/g dry weight (7.18 ± 0.29 % of total fatty acid). The highest biomass of Thraustochytriidae sp.8 were revealed as 22.49 g/L, followed by Thraustochytriidae sp.11 as 9.39-20.71g/L, respectively. It is indicated that thraustochytrids have high potential for the source of polyunsaturated fatty acids, especially DHA, as an applicable for aquaculture or further commercial uses.

Key words: mangrove forest, Thraustochytrids, Polyunsaturated fatty acid, Docosahexaenoic acid (DHA)

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่	
1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
สมมติฐานของงานวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	2
สถานที่ทำการทดลอง	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
ป่าชายเลน	3
ประเภทของป่าชายเลน	3
พืชในป่าชายเลน	3
ระบบนิเวศป่าชายเลน	4
ห่วงโซ่อาหารเบื้องต้นในป่าชายเลน	4
สถานภาพป่าชายเลนจังหวัดจันทบุรี	6
พันธุ์ไม้และลักษณะโครงสร้างป่าชายเลนจังหวัดจันทบุรี	6
ทรอสโทโคตริดส์	7
การแพร่กระจายทรอสโทโคตริดส์	8
การสืบพันธุ์ทรอสโทโคตริดส์	8
การจัดจำแนกทรอสโทโคตริดส์	11
กรดไขมัน (fatty acids)	24
ชนิดของกรดไขมัน	24
ความสำคัญของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3	26
แหล่งสำคัญของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3	27
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า	
3	วิธีดำเนินการวิจัย	32
	ตอนที่ 1 การคัดแยกและจำแนกเชื้อทออสโทโคทริดส์จากใบไม้ป่าชายเลนด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	34
	ตอนที่ 2 การตรวจคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสและ เซลลูเลสของทออสโทโคทริดส์ที่แยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน	39
	ตอนที่ 3 การจัดจำแนกทออสโทโคทริดส์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 18S rRNA	40
	ตอนที่ 4 ชีวมวลและการผลิตกรดไขมันของทออสโทโคทริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ ป่าชายเลน	42
4	ผลการศึกษา	44
	ชนิดของพันธุ์ไม้ป่าชายเลน	44
	ตอนที่ 1 การคัดแยกและจำแนกเชื้อทออสโทโคทริดส์จากใบไม้ป่าชายเลนด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	45
	ความหลากหลายและความชุกชุมของทออสโทโคทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี	45
	การจัดจำแนกชนิดทออสโทโคทริดส์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา	47
	จำนวนไอโซเลทและเปอร์เซ็นต์การพบทออสโทโคทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี	78
	ตอนที่ 2 การตรวจคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสและเซลลูเลส ของทออสโทโคทริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน	86
	ตอนที่ 3 การจัดจำแนกทออสโทโคทริดส์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 18S rRNA	90
	ตอนที่ 4 ศึกษาชีวมวลและกรดไขมันของทออสโทโคทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี	97
5	อภิปราย สรุป และข้อเสนอแนะ	107
	สรุปผลการทดลอง	112
	ข้อเสนอแนะ	113
	รายการอ้างอิง	114
	ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	122
	ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี รีเอเจนต์ บัฟเฟอร์	125
	ภาคผนวก ค ปริมาณกรดไขมันในทออสโทโคทริดส์	127
	ประวัตินักวิจัย	132

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การแพร่กระจายของทรอสโทโคทริดส์ที่แตกต่างกัน	9
3.1	สถานที่เก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี	34
3.2	ปัจจัยสิ่งแวดล้อมและอุปสรรคที่ใช้	35
3.3	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	40
4.1	พันธุ์ไม้ป่าชายเลนที่นำมาคัดแยกทรอสโทโคทริดส์ จังหวัดจันทบุรี	44
4.2	ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในบริเวณเก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน	45
4.3	จำนวนใบและร้อยละการพบทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกได้จากพันธุ์ไม้ป่าชายเลน	46
4.4	ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคลนทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี	73
4.5	ลักษณะของทรอสโทโคทริดส์ที่เจริญบนอาหารแข็งและอาหารเหลว GY เป็นเวลา 4 วัน	74
4.6	ลักษณะเซลล์ของทรอสโทโคทริดส์ในอาหารเหลว GY เป็นเวลา 4 วัน	77
4.7	ความถี่การพบของทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนแหลมแม่แก้ว จังหวัดจันทบุรี	79
4.8	ความถี่การพบของทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนศูนย์ศึกษาการ พัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี	80
4.9	ความถี่การพบของทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนสถานีพัฒนา ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) จังหวัดจันทบุรี	83
4.10	ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสและเอนไซม์เซลลูเลสของทรอสโทโค- ทริดส์ในฤดูฝน	88
4.11	ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสและเอนไซม์เซลลูเลสของทรอสโทโค- ทริดส์ในฤดูแล้ง	89
4.12	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ ไอโซเลท BUCAR2Am 10-3 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn	91
4.13	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ ไอโซเลท BUCAS3XM 12-3 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn	91
4.14	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ ไอโซเลท BUCAS3LR 17-1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn	91

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.15	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCCHAR2LR 3-2 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn	91
4.16	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCHAS1AA 10-1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn	92
4.17	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCCHAR1SA 19-1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn	92
4.18	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCHAS2LR 11-1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn	92
4.19	Distance matrix ของทรอสโทโคทริดส์ ไอโซเลท BUCCHAR2Am 10-3, BUCHAS3XM 12-3, BUCHAS3LR 17-1, BUCCHAR2LR 3-2, BUCHAS1AA 10-1, BUCHAS2LR 11-1 และ BUCCHAR1SA 19-1 ซึ่งวิเคราะห์ร่วมกับทรอสโทโคทริดส์สายพันธุ์อ้างอิง โดยใช้โปรแกรม MEGA 7	95
4.20	การจำแนกทรอสโทโคทริดส์จำนวน 7 ไอโซเลท ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA	96
4.21	ชีวมวลของทรอสโทโคทริดส์แต่ละชนิดที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนในฤดูฝน	98
4.22	ชีวมวลของทรอสโทโคทริดส์แต่ละชนิดที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนในฤดูแล้ง	99
4.23	ปริมาณกรดไขมันเฉลี่ยในทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนในฤดูฝน	101
4.24	ปริมาณกรดไขมันเฉลี่ยในทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนในฤดูแล้ง	102
	ตารางภาคผนวก ค ที่ 1 ปริมาณกรดไขมันทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนในฤดูฝน จังหวัดจันทบุรี	128
	ตารางภาคผนวก ค ที่ 2 ปริมาณกรดไขมันทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนในฤดูแล้ง จังหวัดจันทบุรี	130

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การแบ่งเขตของพรรณไม้ในป่าชายเลน	4
2.2	ห่วงโซ่อาหารเบื้องต้นในป่าชายเลน	5
2.3	ลักษณะภายในทลัสของทรอสโทโคตริดส์	7
2.4	วงจรการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction) ของทรอสโทโคตริดส์	10
2.5	วงจรชีวิตและเพอร์เฟอริสของ <i>Thraustochytrium</i> sp.	10
2.6	วงจรชีวิตของทรอสโทโคตริดส์ อะพลาโนโคตริดส์ ที่แสดงความแตกต่างใน รูปแบบของแบ่งทลัสและการสร้างซูโอสปอร์	12
2.7	วัฏจักรชีวิตของ <i>Thraustochytrium</i> sp.	13
2.8	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงกลุ่มเซลล์กำลังแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสองใน อาหาร-เอช (medium-H)	15
2.9	ลักษณะของของ <i>Schizochytrium sensu stricto</i>	16
2.10	ลักษณะเซลล์ของ <i>Oblongichytrium</i> sp. SEK 347.	17
2.11	ลักษณะของ <i>Aurantiochytrium</i> spp.	18
2.12	ลักษณะของ <i>Ulkenia</i> clade strains	19
2.13	ลักษณะของ <i>Sicyoidochytrium</i> clade strains	20
2.14	ลักษณะของ <i>Botryochytrium</i> clade strains	21
2.15	ลักษณะของ <i>Parietichytrium</i> clade strains	22
2.16	การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-6 และโอเมก้า-3	26
3.1	สถานที่เก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี	35
3.2	สถานที่เก็บตัวอย่างป่าชายเลนแหลมแม่แก้ว (สถานที่ 1)	36
3.3	สถานที่เก็บตัวอย่างป่าชายเลนคู้กระเบน (สถานที่ 2)	36
3.4	สถานที่เก็บตัวอย่างป่าชายเลนท่าสอน (สถานที่ 3)	36
4.1	ลักษณะเซลล์ของ <i>A. limacinum</i> ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	48
4.2	(ก) ลักษณะโคโลนีของ <i>Aurantiochytrium</i> sp.1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี <i>Aurantiochytrium</i> sp.1 ที่เจริญ บนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	49
4.3	ลักษณะเซลล์ของ <i>Aurantiochytrium</i> sp.1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่ อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.4	(ก) ลักษณะโคโลนีของ <i>Aurantiochytrium</i> sp.2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี <i>Aurantiochytrium</i> sp.2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	51
4.5	ลักษณะเซลล์ของ <i>Aurantiochytrium</i> sp.2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	52
4.6	(ก) ลักษณะโคโลนีของ <i>Aurantiochytrium</i> sp.3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี <i>Aurantiochytrium</i> sp.3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	53
4.7	ลักษณะเซลล์ของ <i>Aurantiochytrium</i> sp.3 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	54
4.8	(ก) ลักษณะโคโลนีของ <i>P. sarkarianum</i> ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี <i>P. sarkarianum</i> ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	55
4.9	ลักษณะเซลล์ของ <i>P. sarkarianum</i> ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	56
4.10	(ก) ลักษณะโคโลนีของ <i>Schizochytrium</i> sp.2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี <i>Schizochytrium</i> sp.2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	57
4.11	ลักษณะเซลล์ของ <i>Schizochytrium</i> sp.2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	58
4.12	(ก) ลักษณะโคโลนีของ <i>Thraustochytriidae</i> sp.8 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี <i>Thraustochytriidae</i> sp.8 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	59
4.13	ลักษณะเซลล์ของ <i>Thraustochytriidae</i> sp.8 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	60
4.14	ลักษณะเซลล์ของ <i>Thraustochytriidae</i> sp.9 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.15	ลักษณะเซลล์ของ Thraustochytriidae sp.10 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	62
4.16	(ก) ลักษณะโคโลนีของ Thraustochytriidae sp.11 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี Thraustochytriidae sp.9 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	63
4.17	ลักษณะเซลล์ของ Thraustochytriidae sp.11 เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	64
4.18	(ก) ลักษณะโคโลนีของ Thraustochytriidae sp.12 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี Thraustochytriidae sp.12 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	65
4.19	ลักษณะเซลล์ของ Thraustochytriidae sp.12 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	66
4.20	(ก) ลักษณะโคโลนีของ Thraustochytriidae sp.13 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี Thraustochytriidae sp.12 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	67
4.21	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี Thraustochytriidae sp.13 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	68
4.22	(ก) ลักษณะโคโลนีของ Thraustochytriidae sp.14 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี Thraustochytriidae sp.14 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	69
4.23	ลักษณะเซลล์ของ Thraustochytriidae sp.14 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	70
4.24	(ก) ลักษณะโคโลนีของ Thraustochytriidae sp.15 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน (ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี Thraustochytriidae sp.15 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	71
4.25	ลักษณะเซลล์ของ Thraustochytriidae sp.15 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน	72

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.26	ความถี่การพบชนิดของทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนแหลมแม่ นกแก้ว จังหวัดจันทบุรี	78
4.27	ความถี่การพบชนิดของทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนศูนย์ศึกษาการ พัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี	82
4.28	ความถี่การพบชนิดของทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนสถานี พัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) จังหวัดจันทบุรี	85
4.29	ลักษณะการปรากฏโซนใสรอบโคโลนีของทรอสโทโคตริดส์ ซึ่งบ่งชี้กิจกรรม เอนไซม์อะกาเรสบน Agarose medium ภายหลังจากย้อมด้วย Lugol's iodine	86
4.30	ลักษณะการปรากฏโซนใสรอบโคโลนีของทรอสโทโคตริดส์ ซึ่งบ่งชี้กิจกรรมเอนไซม์ เซลลูเลส บนอาหาร CMC medium ภายหลังจากย้อมด้วย 0.1 % Congo red	87
4.31	แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากสาหร่าย ทะเล จำนวน 7 ไอโซเลท ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 7 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA และใช้โมเดล p- distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของ แต่ละแตกซอน โดยมีหน่วยเป็นอัตราการแทนที่คู่เบสในแต่ละตำแหน่งบนยีน เครื่องหมายและทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยใช้วิธี Bootstrapping 1,000 ซ้ำ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิง วิวัฒนาการ มีจำนวนทั้งหมด 39 ข้อมูล โดยมี <i>Diplophrys mutabilis</i> (AB856527) เป็นแตกซอนนอกกลุ่ม	94
4.32	ปริมาณกรดไขมันเออาร์เอ อีพีเอ ดีพีเอและดีเอชเอ ในทรอสโทโคตริดส์แต่ละชนิด ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรีในฤดูฝน	103
4.33	ปริมาณกรดไขมันเออาร์เอ อีพีเอ ดีพีเอและดีเอชเอ ในทรอสโทโคตริดส์แต่ละชนิด ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรีในฤดูแล้ง	104
4.34	ปริมาณชีวมวลและปริมาณกรดไขมันของทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรีในฤดูฝน	105
4.35	ปริมาณชีวมวลและปริมาณกรดไขมันของทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรีในฤดูแล้ง	106

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสนใจในการบริโภคอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพกันมากขึ้น สำหรับอาหารที่ไม่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่นอาหารที่มีแป้ง น้ำตาลหรือไขมันสูง ผู้บริโภคส่วนใหญ่มักจะหลีกเลี่ยง โดยเฉพาะไขมันทรานส์ที่มีอยู่ในอาหารต่าง ๆ อาจมีโอกาสเสี่ยงสูงมากขึ้นในการเกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (coronary heart disease, CHD) ซึ่งไขมันทรานส์พบได้จากผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการไฮโดรจีเนชัน แครกเกอร์ ลูกกวาด คุกกี้ อาหารทอด เค้ก มัฟฟิน และขนมอบ (มารูจ ลิมปะวัฒนะ และ วรณวิมล คล้ายประดิษฐ์, 2552) นอกจากนี้ยังมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภค เช่น กรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 และกลุ่มโอเมก้า-6 ที่พบได้จากน้ำมันพืชต่าง ๆ ปลาและอาหารทะเล กรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ประกอบไปด้วยดีเอชเอ (docosahexaenoic acid, 22:6n-3) ดีพีเอ (docosapentaenoic acid, 22:5n-3) และอีพีเอ (eicosapentaenoic acid, 20:5n-3) เป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ให้ความยืดหยุ่นและมีผลต่อการป้องกันการเกิดภาวะหัวใจหยุดเต้นเฉียบพลัน และให้ความยืดหยุ่นต่อเยื่อหุ้มเซลล์สมองและระบบประสาท รวมทั้งเรตินาในการมองเห็น นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญต่อโภชนาการและสุขภาพ เช่น ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ ช่วยป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด เบาหวานและช่วยบรรเทาอาการโรคข้ออักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันดีเอชเอมีความสำคัญในการพัฒนาและการทำงานที่ของระบบประสาท ระบบสายตา และระบบสมองของทารก อีกทั้งยังช่วยพัฒนาการทำงานของสมองและจิตใจ เพิ่มสมาธิ ความจำระยะสั้นและทักษะในการอ่าน (Lemaitreal et al., 2009; Calder and Yaqoob, 2009) โดยแหล่งของกรดไขมันดีเอชเอได้จากปลาทะเลเป็นหลัก แต่ในด้านกระบวนการผลิตยังประสบปัญหาหลายประการ เช่น รสชาติ กลิ่นและกระบวนการสกัดที่ยุ่งยาก ทำให้กระบวนการผลิตกรดไขมันจากน้ำมันปลาทะเลมีค่าใช้จ่ายสูง การผลิตขนาดใหญ่ทำได้ค่อนข้างยาก (Huang et al., 2003; รุจิลาลัย พลูทวี, 2550) จากปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการค้นหาแหล่งทางเลือกใหม่จากจุลินทรีย์

ทรอสโทโคทริดส์เป็นจุลินทรีย์ทะเลที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอาหารต่าง ๆ โดยมีรายงานว่าพบกรดไขมันดีเอชเอมีสัดส่วน 30-40 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด (Lewis, Nichols and McMeekin, 1999; Huang et al., 2001; Jaritkhuang and Suanjit, 2018) ซึ่งทรอสโทโคทริดส์สามารถพบได้ทั่วไปในป่าชายเลน น้ำทะเล ดินตะกอน ภูเขาทะเล สาหร่ายทะเลและไซยาโนแบคทีเรีย (Raghukumar and Damare, 2011; พฤทธิกร ศุภพล และชุตติมา แก้วพิบูลย์, 2561) เนื่องจากทรอสโทโคทริดส์มีแหล่งที่อยู่ที่หลากหลาย และสามารถผลิตกรดไขมันดีเอชเอสูงและสามารถผลิตกรดไขมันได้ตลอดปี นอกจากนั้นยังควบคุมปัจจัยแวดล้อมและโภชนาการได้ดีกว่าทำให้ทรอสโทโคทริดส์มีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาเป็นทางเลือกใหม่ในการผลิตกรดไขมันเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อสำรวจและคัดแยกทรอสโทโคตริคส์จากใบไม้ป่าชายเลนชนิดต่าง ๆ จังหวัดจันทบุรี และจัดจำแนกทรอสโทโคตริคส์ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA
2. เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การพบและตรวจคัดกรองความสามารถในการผลิต เอนไซม์อะกาเรสและเซลลูเลสของทรอสโทโคตริคส์จากใบไม้ป่าชายเลน
3. เพื่อคัดเลือกทรอสโทโคตริคส์ที่มีการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจากใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี

สมมติฐานของงานวิจัย

1. ใบไม้ป่าชายเลนต่างชนิดกันมีจำนวนชนิดของทรอสโทโคตริคส์ต่างกัน
2. ใบไม้ป่าชายเลนต่างชนิดกันมีเปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทโคตริคส์ต่างกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ได้ทรอสโทโคตริคส์ที่เป็นสายพันธุ์ประเทศไทย มาเป็นแหล่งของกรดไขมันเชิงซ้อนกลุ่ม โอเมก้า-3 ที่มีความสำคัญได้แก่ อีพีเอ ดีพีเอและดีเอช และโอเมก้า-6 ได้แก่ เออาร์เอ
2. ได้องค์ความรู้ใหม่ด้านฐานข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพของ ทรอสโทโคตริคส์จากใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี เพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์และจัดการ ทรัพยากรอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน และสามารถนำไปใช้ในการวิจัยขั้นสูงและประยุกต์ใช้ใน อุตสาหกรรมและการเพาะเลี้ยงต่อไป

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาคชีววาริชศาสตร์ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ป่าชายเลน

ป่าชายเลน (mangrove forest) เป็นระบบนิเวศที่อยู่ในเขตน้ำขึ้นสูงสุดกับน้ำลงต่ำสุด ประกอบไปด้วยสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดทั้งพืชและสัตว์ ดำรงชีวิตร่วมกันในสภาพแวดล้อมที่เป็นดินเลน น้ำกร่อย และมีน้ำทะเลท่วมถึงอย่างสม่ำเสมอ เป็นระบบนิเวศที่มีความเฉพาะตัวและมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก ป่าชายเลนพบทั่วไปบริเวณชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ ทะเลสาบ และรอบเกาะแก่งต่าง ๆ นอกจากนี้ป่าชายเลนยังถือเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของสัตว์น้ำ เพราะมีอินทรีย์วัตถุที่ได้จากการย่อยสลายของซากสัตว์และซากพืชหรือเศษใบไม้ที่ร่วงหล่น

ประเภทของป่าชายเลน

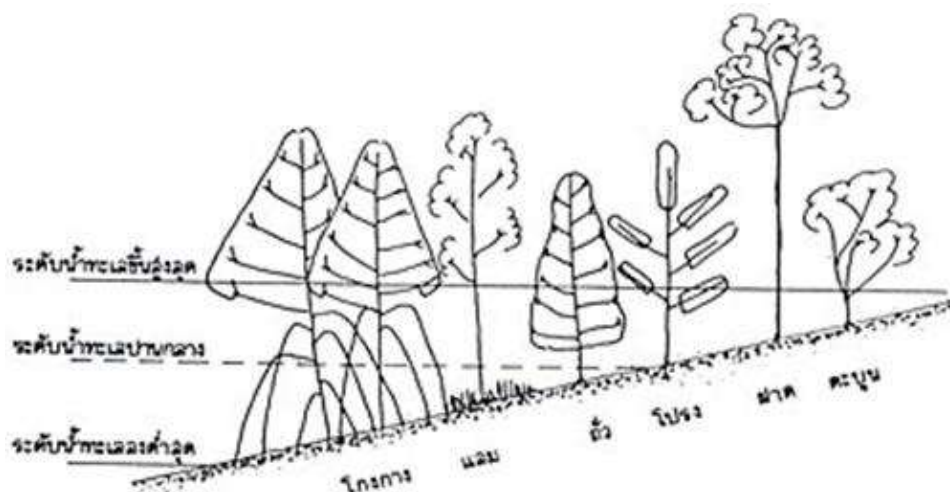
ป่าชายเลนสามารถแบ่งตามลักษณะสภาพแวดล้อมของพื้นที่ที่ป่าชายเลนขึ้นอยู่ได้ 2 ประเภท คือ

1. ป่าชายเลนที่อยู่บริเวณปากแม่น้ำหรือน้ำกร่อย เป็นป่าชายเลนที่ขึ้นอยู่ตามริมแม่น้ำและร่องน้ำที่ได้รับอิทธิพลจากน้ำจืดมาก โดยพื้นที่ป่าชายเลนด้านที่ติดกับทะเลมีต้นไม้ขึ้นอยู่หนาแน่น และมีจำนวนชนิดต้นไม้มากกว่าบริเวณที่ห่างจากทะเลขึ้นไป หรืออยู่ทางด้านต้นน้ำจืด ได้แก่ ป่าชายเลนปากแม่น้ำกั้นตัง และแม่น้ำปะเหลียน จังหวัดตรัง ป่าชายเลนในจังหวัดระนอง และจังหวัดพังงา เป็นต้น

2. ป่าชายเลนที่อยู่ริมทะเล เป็นป่าชายเลนที่พบตามบริเวณชายฝั่ง หรือปากแม่น้ำสายเล็กๆ ได้รับอิทธิพลจากน้ำจืดน้อย หรือมีน้ำจืดไหลลงสู่บริเวณป่าชายเลนในปริมาณน้อย น้ำในป่าชายเลนส่วนใหญ่เป็นน้ำทะเล พื้นที่ป่าชายเลนประเภทนี้ได้แก่ ป่าชายเลนที่พบขึ้นตามเกาะต่างๆ ซึ่งมีบริเวณขนาดเล็ก

พืชในป่าชายเลน

ป่าชายเลนประกอบไปด้วยพันธุ์ไม้หลากหลายชนิด เราสามารถพบเห็นได้ทั้งไม้ยืนต้น พืชกาฝาก เถาวัลย์ และสาหร่าย พันธุ์ไม้ป่าชายเลนเกือบทั้งหมดเป็นไม้ไม่ผลัดใบ และพืชเหล่านี้มีความทนทานต่อสภาพความเค็มได้ดี ประเทศไทยมีพันธุ์ไม้ในป่าชายเลน 74 ชนิด ซึ่งพันธุ์ไม้ที่เด่นและเป็นไม้ที่สำคัญในประเทศไทยได้แก่ โกงกาง แสม โปรง ถั่ว ลำพู ลำแพน และตะบูน เป็นต้น พันธุ์ไม้เหล่านี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสมดุลของระบบนิเวศป่าชายเลน (ภาพที่ 2.1) (สนิท อักษรแก้ว, 2542)



ภาพที่ 2.1 การแบ่งเขตของพรรณไม้ในป่าชายเลน (สนิท อักษรแก้ว, 2542)

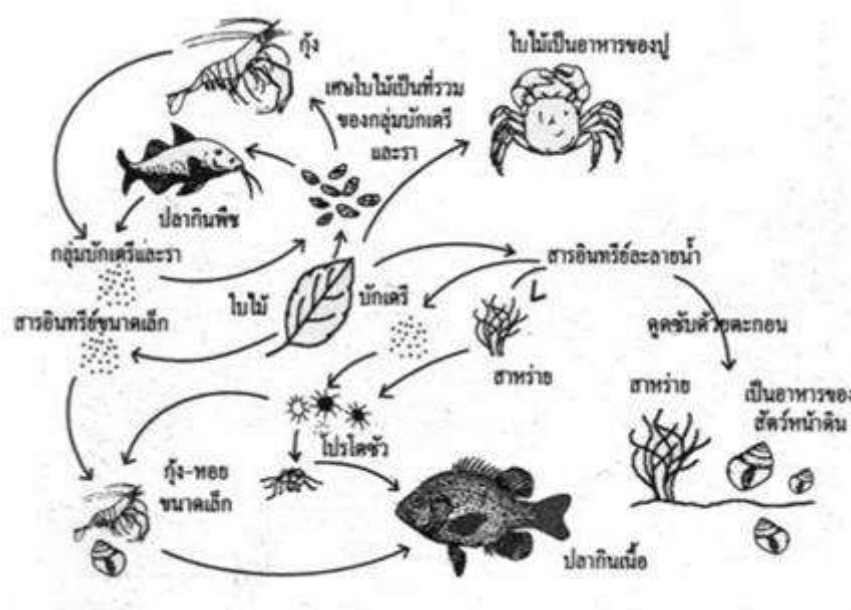
ระบบนิเวศป่าชายเลน

ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่มีความซับซ้อน ประกอบด้วยพืชและสัตว์ที่มีบทบาทร่วมกัน และเชื่อมโยงกันในเรื่องของความสัมพันธ์ในลำดับขั้นของการกินอาหาร (tropic relationship) การจำแนกสิ่งมีชีวิตออกตามระดับขั้น คือ

1. ผู้ผลิตขั้นต้น พืชถือเป็นผู้ผลิตขั้นต้นส่วนใหญ่ในป่าชายเลน โดยสร้างอาหารจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง
2. ผู้บริโภค ได้แก่ สัตว์ที่กินพืชเป็นอาหาร หรือสัตว์ที่กินสัตว์ เป็นต้น
3. ผู้ย่อยสลาย ได้แก่ แบคทีเรียและรา ทำหน้าที่ย่อยสลายซากพืชและสัตว์

ห่วงโซ่อาหารในป่าชายเลน

ป่าชายเลนมีสิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่จำนวนมาก ได้แก่ จุลินทรีย์ สาหร่าย แพลงก์ตอน สัตว์น้ำวัยอ่อน สัตว์ทะเลหน้าดิน ปลา นก และสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม เช่น ลิง นาก ค้างคาว เป็นต้น ความอุดมสมบูรณ์ของอาหารซึ่งได้จากการย่อยสลายของซากพืช ซากสัตว์ หรือเศษใบไม้ร่วงหล่นกลายเป็นแหล่งอาหารปฐมภูมิสำหรับผู้บริโภคขั้นต้นในห่วงโซ่อาหาร สารอาหารมีการถ่ายทอดไปตามลำดับขั้น โดยผู้บริโภคได้รับพลังงานจากผู้ผลิต โดยการกินต่อกันเป็นทอด ๆ กระบวนการนี้มีความสำคัญมากต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากอาหารที่ถูกกินเข้าไปจะถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ รวมทั้งกระบวนการทำงานต่าง ๆ ของร่างกาย (ภาพที่ 2.2) (สนิท อักษรแก้ว, 2542)



ภาพที่ 2.2 ห่วงโซ่อาหารเบื้องต้นในป่าชายเลน (สนิท อักษรแก้ว, 2542)

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีบทบาทสำคัญในการดำรงชีวิตของพืชและสัตว์ในป่าชายเลน มีดังนี้

1. ภูมิประเทศชายฝั่ง ป่าชายเลนโดยทั่วไปชอบขึ้นบริเวณชายฝั่งทะเลที่มีสภาพเป็นดินเลน และเป็นที่ยราบกว้าง มีน้ำทะเลท่วมถึงอย่างสม่ำเสมอ
2. ภูมิอากาศ ปัจจัยสภาวะแวดล้อมที่เกี่ยวกับภูมิอากาศที่สำคัญ ได้แก่ แสง อุณหภูมิ ฝน และลม ป่าชายเลนส่วนใหญ่ขึ้นอยู่ในเขตโซนร้อน เพราะมีสภาพภูมิอากาศเหมาะสม
3. น้ำขึ้นน้ำลง เป็นปัจจัยที่สำคัญในการกำหนดการแบ่งเขตการขึ้นอยู่ของพันธุ์ไม้ หรือสัตว์น้ำในป่าชายเลน ผลต่างของน้ำขึ้นน้ำลงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอกของพันธุ์ไม้ โดยเฉพาะระบบราก รากค้ำจุนและรากหายใจขนาดใหญ่และสูงจากผิวดินมากถ้าขึ้นอยู่ในพื้นที่ที่ผลต่างของน้ำขึ้นน้ำลงกว้าง
4. คลื่นและกระแสน้ำ ช่วยพัดพาฝักของไม้ป่าชายเลนไปสู่แหล่งต่าง ๆ นอกจากนี้คลื่นและกระแสน้ำ นอกจากจะเป็นตัวการที่สำคัญที่ทำให้มีการตกตะกอนบริเวณชายฝั่ง ซึ่งจะทำให้มีพันธุ์ไม้ป่าชายเลนมาขึ้นอยู่แล้ว ยังช่วยพัดพาธาตุอาหารจากป่าชายเลนออกไปสู่ชายฝั่งทะเล ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อสัตว์น้ำและการเพาะเลี้ยงชายฝั่งอย่างมาก
5. ความเค็มของน้ำและความเค็มของน้ำในดิน มีความสำคัญต่อการกระจายของพันธุ์ไม้และสัตว์น้ำในป่าชายเลน ที่ความเค็มของน้ำต่างกันจะพบพันธุ์ไม้และชนิดของสัตว์ต่างกัน
6. ออกซิเจนละลาย มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืชและสัตว์นานาชนิด ปริมาณออกซิเจนละลายมากหรือน้อยเป็นตัวจำกัดทั้งชนิด การเจริญเติบโตของพืช และการแพร่กระจายของ

สัตว์น้ำ นอกจากนี้กระบวนการย่อยสลายของเศษใบไม้หรืออินทรีย์สาร จะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำเป็นสำคัญ

7. ดิน เกิดจากการทับถมของตะกอนที่ไหลมากับน้ำจากแหล่งต่าง ๆ และการตกตะกอนของสารแขวนลอยในมวลน้ำ ตลอดจนการสลายตัวของอินทรีย์สารดินเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนในการจำกัดการเจริญเติบโต และการกระจายของพันธุ์ไม้และสัตว์ในป่าชายเลน เช่น ไม้โกงกางใบใหญ่ขึ้นได้ดีในดินเลนค่อนข้างลึก ไม้แสมทะเลและไม้พังกาหัวสุมขึ้นได้ดีในพื้นที่ดินเลนปนทราย

8. ธาตุอาหาร มีความจำเป็นในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต มีแหล่งที่มาจากภายนอกป่าชายเลนและจากป่าชายเลนเอง คือมาจากน้ำฝนน้ำที่ไหลผ่านแผ่นดิน จากดินตะกอน จากน้ำทะเล และจากการผุสลายของอินทรีย์วัตถุในป่าชายเลน จากสิ่งมีชีวิตที่ผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในการย่อยสลายจากแพลงก์ตอนพืช ไดอะตอม แบคทีเรีย สาหร่ายที่เกาะตามต้นไม้ รากไม้ และพืชชนิดอื่น ๆ ในป่าชายเลน ซากสัตว์ สิ่งขับถ่ายของสัตว์ หรือมาจากสารแขวนลอยในน้ำที่ไหลมาจากแหล่งน้ำลำธาร ซากพืชและซากสัตว์ที่อยู่บนฝั่งหรือในทะเล ขึ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ลมพัดพามา (สำนักอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน, 2556)

สถานภาพป่าชายเลนจังหวัดจันทบุรี

กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง ได้สำรวจสภาพการใช้ประโยชน์ที่ดินป่าชายเลนในเขตป่าสงวนแห่งชาติและนอกเขตป่าสงวนแห่งชาติ พบว่าจังหวัดจันทบุรีมีพื้นที่ป่าชายเลนทั้งหมด 219,563.65 ไร่ มีพื้นที่ป่าชายเลนในเขตป่าสงวนแห่งชาติทั้งหมด 42,297.08 ไร่ และมีพื้นที่ป่าชายเลน ในเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทั้งหมด 213.82 ไร่ (สำนักอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน, 2555)

พันธุ์ไม้และลักษณะโครงสร้างป่าชายเลนจังหวัดจันทบุรี

พันธุ์ไม้ป่าชายเลนจังหวัดจันทบุรี มีจำนวน 16 วงศ์ 14 สกุล และ 22 ชนิด แบ่งกลุ่มป่าชายเลนจากการสำรวจได้เป็น 2 กรณี ดังนี้

1. พื้นที่ที่มีความหนาแน่นของต้นไม้ป่าชายเลนสูง (เขตพิทักษ์ป่าชายเลนรักษีสัตว์น้ำ) ประมาณ 17,790 ไร่
2. พื้นที่ที่มีความหนาแน่นของต้นไม้ป่าชายเลนต่ำ (ป่าเสื่อมโทรม เป็นป่าชายเลนบริเวณคันนาทุ่ง และนาทุ่งเดิม) ประมาณ 55,920 ไร่

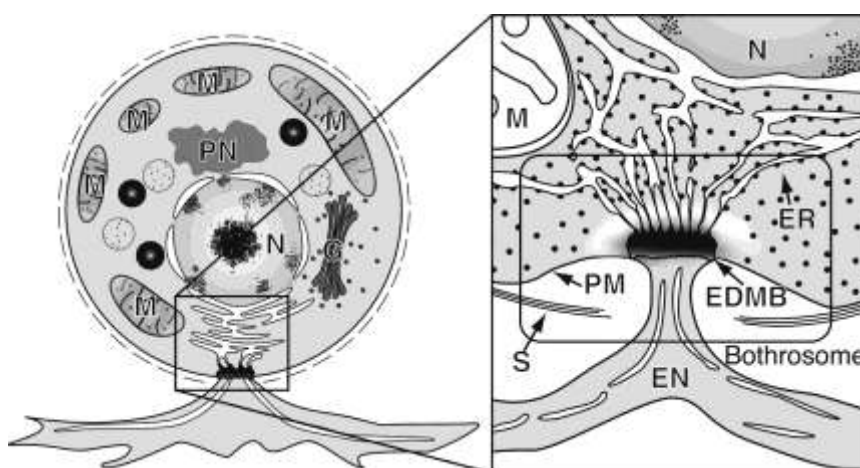
พื้นที่ป่าชายเลนที่มีความหนาแน่นสูง พบพันธุ์ไม้เพียง 4 ชนิด อยู่ในวงศ์ *Rhizophoraceae* และ *Avicenniaceae* มีความหนาแน่นเฉลี่ยรวมของต้นไม้ต่อพื้นที่ เท่ากับ 272 ต้น/ไร่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยและความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 14.41 เซนติเมตร และ 17.35 เมตร ตามลำดับ พันธุ์ไม้ที่มีค่าดัชนีความสำคัญ (Important Value Index) สูงที่สุด คือ โกงกางใบเล็ก มีค่าเท่ากับ 149.98 รองลงมา คือ โกงกางใบใหญ่, แสมขาว และแสมดำ มีค่าเท่ากับ 64.16, 47.45 และ 38.42 ตามลำดับ

พื้นที่ป่าชายเลนที่มีความหนาแน่นต่ำ พบพันธุ์ไม้ป่าชายเลนจำนวน 22 ชนิด มีความหนาแน่นเฉลี่ยรวมเท่ากับ 76.56 ต้น/ไร่ เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 7.96 เซนติเมตร และความ

สูงเฉลี่ยเท่ากับ 8.94 เมตร ตามลำดับ พันธุ์ไม้ที่มีค่าดัชนีความสำคัญ (Important Value Index) สูงที่สุด คือ โกงกางใบเล็ก มีค่าเท่ากับ 91.98 รองลงมา คือ ฝาดดอกขาว , ฝาดดอกแดง และแสมดำ มีค่าเท่ากับ 22.57, 22.48 และ 19.42 ตามลำดับ (สำนักอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน, 2555)

ทรอสโทโคตริตส์

ทรอสโทโคตริตส์ เป็นจุลินทรีย์ทะเลที่มีศักยภาพในการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง พบได้ในแหล่งน้ำเค็มและน้ำกร่อย โดยเฉพาะบริเวณป่าชายเลน เนื่องจากทรอสโทโคตริตส์มีบทบาทในการเป็นผู้ย่อยสลายที่สำคัญในระบบนิเวศ (Wong, Vrijmoed & Au, 2005; รุจิราลัย พลูทวี, 2550) พบกระจายได้ทั่วไปในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย ในสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น บริเวณชายฝั่งทะเล ปะการัง ปากแม่น้ำ หญ้าทะเล สาหร่ายทะเลและป่าชายเลน (Harel et al., 2008; Naganuma, Takasugi, & Kimura, 1998; Jaritkhuan, & Suanjit, 2018) ทรอสโทโคตริตส์เป็นจุลินทรีย์ทะเลที่มีรูปร่างเป็นทรงกลม มีเอกโตพลาสมิคเนท (ectoplasmic net) เป็นส่วนที่ยื่นยาวลักษณะเป็นร่างแหช่วยในการยึดเกาะกับสับสเตรทและดูดซึมธาตุอาหารและขนส่งเอนไซม์ไลติก (lytic) ไปยังสับสเตรท ซึ่งจะย่อยสลายดูดซึมสารอาหารเพื่อไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของทลีส (ภาพที่ 2.3) โดยเอกโตพลาสมิคเนทสร้างมาจากส่วนที่เรียกว่า ซาจิโนเจน (Sagenogen) (Alderman, Harrison, Bremer & Jones, 1974; Chilton, 1995; Honda, Yokochi, Nakahara, Erata & Higashihara, 1998) ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของทรอสโทโคตริตส์ ถึงแม้ว่าจะยังไม่สามารถยืนยันหน้าที่ของซาจิโนเจนได้ชัดเจน แต่คาดว่าน่าจะเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยในระบบการทำงานของเอกโตพลาสมิคเนท และช่วยป้องกันไม่ให้ออกแกนเนลภายในทลีสไหลไปยังเอกโตพลาสมิคเนท (Bowles, 1997)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะภายในทลีสของทรอสโทโคตริตส์ (EDMB, electron-dense material of the bothrosome; EN, ectoplasmic net; ER, endoplasmic reticulum; G, golgi body; M, mitochondria; N, nucleus; PM, plasma membrane; PN, paranuclear body; S, scales) (Iwata, 2017)

การแพร่กระจายของทอโรสโทโคตริคัส

ทอโรสโทโคตริคัสมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในสภาพแวดล้อมทางทะเลทั่วโลก เช่น ดินตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลและบริเวณปากแม่น้ำ อ่าว มหาสมุทรทั่วโลก (Chilton, 1995; Nakahara et al., 1996, Naganuma et al., 1998; Santangelo, Bongiorno, & Pignataro, 2000) หรือบริเวณป่าชายเลน โดยพบมากที่ใบไม้ป่าชายเลนที่ร่วงหล่นเน่าเปื่อย (Wong, Vrijmoed, & Au, 2005; Jaritkhuan, & Suanjit, 2018; ทิวาพร ทองประสม, 2561) สาหร่ายทะเล หญ้าทะเล รวมทั้งทะเลลึก (Raghukumar, 2002) และบางชนิดเป็นปรสิตของหอย หมึก และฟองน้ำ (Alderman & Jones, 1971; Porter, 1989) การแพร่กระจายของทอโรสโทโคตริคัสแต่ละชนิดมีการศึกษาดังตารางที่ 2.1

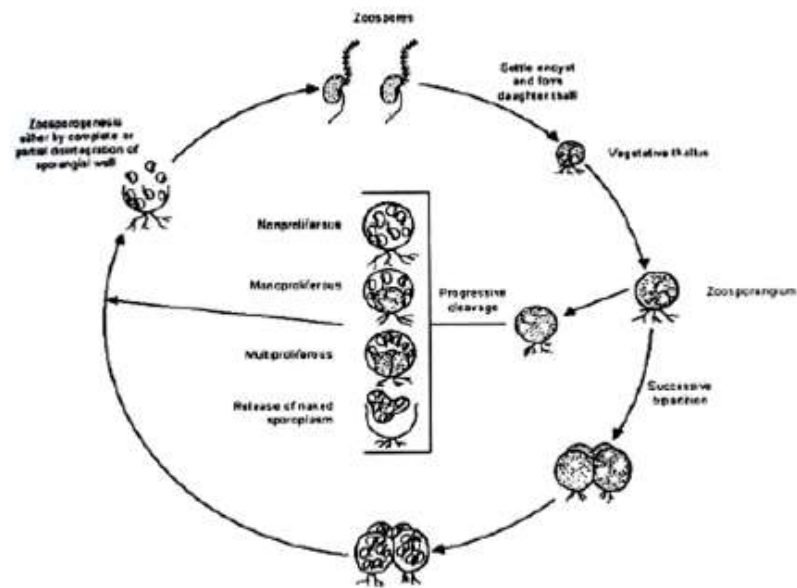
การสืบพันธุ์ของทอโรสโทโคตริคัส

การสืบพันธุ์ของทอโรสโทโคตริคัสเป็นแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยทั่วไปพัลลัสจะพัฒนาไปเป็นซุโอสปอร์แรงเจียม (zoosporangium) ลักษณะการแบ่งของซุโอสปอร์แรงเจียมแตกต่างกันในแต่ละสกุล เช่น แบ่ง bipartitioning หรือคลิเวท (cleavage) ภายในสปอร์แรงเจียม (sporangium) มีซุโอสปอร์ (zoospore) ซึ่งเกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ส่วนขนาดของซุโอสปอร์แรงเจียมอาจมีขนาดเล็กตั้งแต่ 5 ไมโครเมตรหรืออาจมีขนาดใหญ่ถึง 120 ไมโครเมตร การปล่อยซุโอสปอร์เกิดจากการเกิดช่อง รู หรือการฉีกขาด สูญสลายของผนังเซลล์ของซุโอสปอร์แรงเจียม (Alderman et al., 1974) จากนั้นซุโอสปอร์จะว่ายน้ำในระยะทางสั้นๆ เมื่อพบซับสเตรทที่เหมาะสม ซุโอสปอร์จะสลัดหางทิ้งก่อนลงเกาะซับสเตรทและเจริญเป็นเซลล์ปกติ (vegetative cell) และเข้าสู่วงจรชีวิตช่วงต่อไป (Bowles, 1997) (ภาพที่ 2.4)

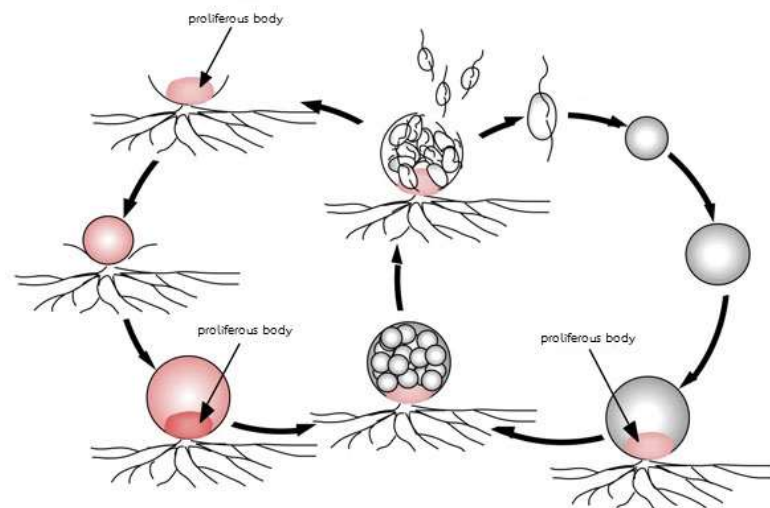
ทอโรสโทโคตริคัสแต่ละชนิดมีการสืบพันธุ์แตกต่างกัน เช่น *Thraustochytrium kinnei* เมื่อผนังเซลล์ซุโอสปอร์แรงเจียมแตกจะปล่อยซุโอสปอร์ออกมา แต่ยังเหลือส่วนที่เรียกว่า พรอลิเฟอรัสบอดี้ (proliferous body) ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นซุโอสปอร์แรงเจียมได้อีกครั้ง ลักษณะพิเศษเช่นนี้พบเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น และบางสายพันธุ์สามารถมีพรอลิเฟอรัสได้มากกว่าหนึ่ง เช่น *T. multirudimentale* ซึ่งการมีจำนวนพรอลิเฟอรัสเพิ่มมากขึ้นนั้นส่งผลต่อการพัฒนาไปเป็นสปอร์แรงเจียมมากขึ้นเช่นกัน (ภาพที่ 2.5)

ตารางที่ 2.1 การแพร่กระจายของทรอสโทโคตริดีที่แตกต่างกัน

ชนิด	ซับสเตรท	สถานที่	References
<i>Schizochytrium aggregatum</i>	น้ำทะเล	Long Island Sound, New Heaven, Connecticut, USA	Goldstein and Belsky (1964)
<i>Althonia crouchii</i>	หอยนางรม (<i>Ostrea edulis</i>)	Althorne Creek, River Crouch, Essex, UK	Jones and Alderman (1971)
<i>Thraustochytrium striatum</i> , <i>Schizochytrium mangrovei</i>	เมล็ดสน	Mangrove, Goa, India	Raghukumar (1992)
<i>Ulkenia visurgensis</i> , <i>Labyrinthuloid minuta</i>	สาหร่ายทะเล (<i>Sargassum cinereum</i>)	Dona Paula Jetty, Goa, India	Sharma et al. (1994)
<i>Schizochytrium limacinum</i>	น้ำทะเล	Mangrove area in, West pacific Ocean	Honda et al. (1998)
<i>Schizochytrium mangrovei</i> , <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Thraustochytrium</i> sp.	ใบไม้ป่าชายเลน	Panay island, Philippines	Leano (2001)
<i>Schizochytrium</i> sp. KF-1, <i>Schizochytrium mangrovei</i> (KF-2, KF- 7, KF-12) <i>Thraustochytrium striatum</i> KF-9, <i>Ulkenia</i> sp. KF-13	ใบรังกะแท้ (<i>Kandelia candel</i>)	Mai Po, Three Fathoms Cove and Ting Kok in Hong Kong	Fan, Vrijmoed and Jones (2002)
<i>Schizochytrium</i> strains (N-1, N-2, N- 5, N-6, N-9)	ใบรังกะแท้ (<i>Kandelia candel</i>)	mangrove in Hong Kong	Kamlangdee, N. and Fan, K.W. (2003)
<i>Aurantiochytrium</i> sp. SD116	ดินและใบไม้	mangrove ecosystem in Shuidong Bay, Guangdong Province, China	Gao, Song , Feng, Li and Cui (2013)
<i>Schizochytrium</i> spp.	โกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>)	ป่าชายเลน นครศรีธรรมราช	สุดารัตน์ แทนเนียม นิยม กำลังดี และภูวดล บางรักษ์ (2556)
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	น้ำทะเล	on the coast of King George Island	Caamano et al. (2017)
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	หญ้าทะเล สาหร่าย และ น้ำทะเล	หาดปากเมง จังหวัดตรัง	พญฐิติกร ศุภพล และชุตติ มา แก้วพิบูลย์. (2561).



ภาพที่ 2.4 วงจรการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ของทรอสโทโคตริดส์ (Moss, 1986)



ภาพที่ 2.5 วงจรชีวิตและเพอริเฟอร์รัสของ *Thraustochytrium* sp. (ดัดแปลงจาก Honda, 2001)

การจัดจำแนกทอรัสโทโคตริคัส

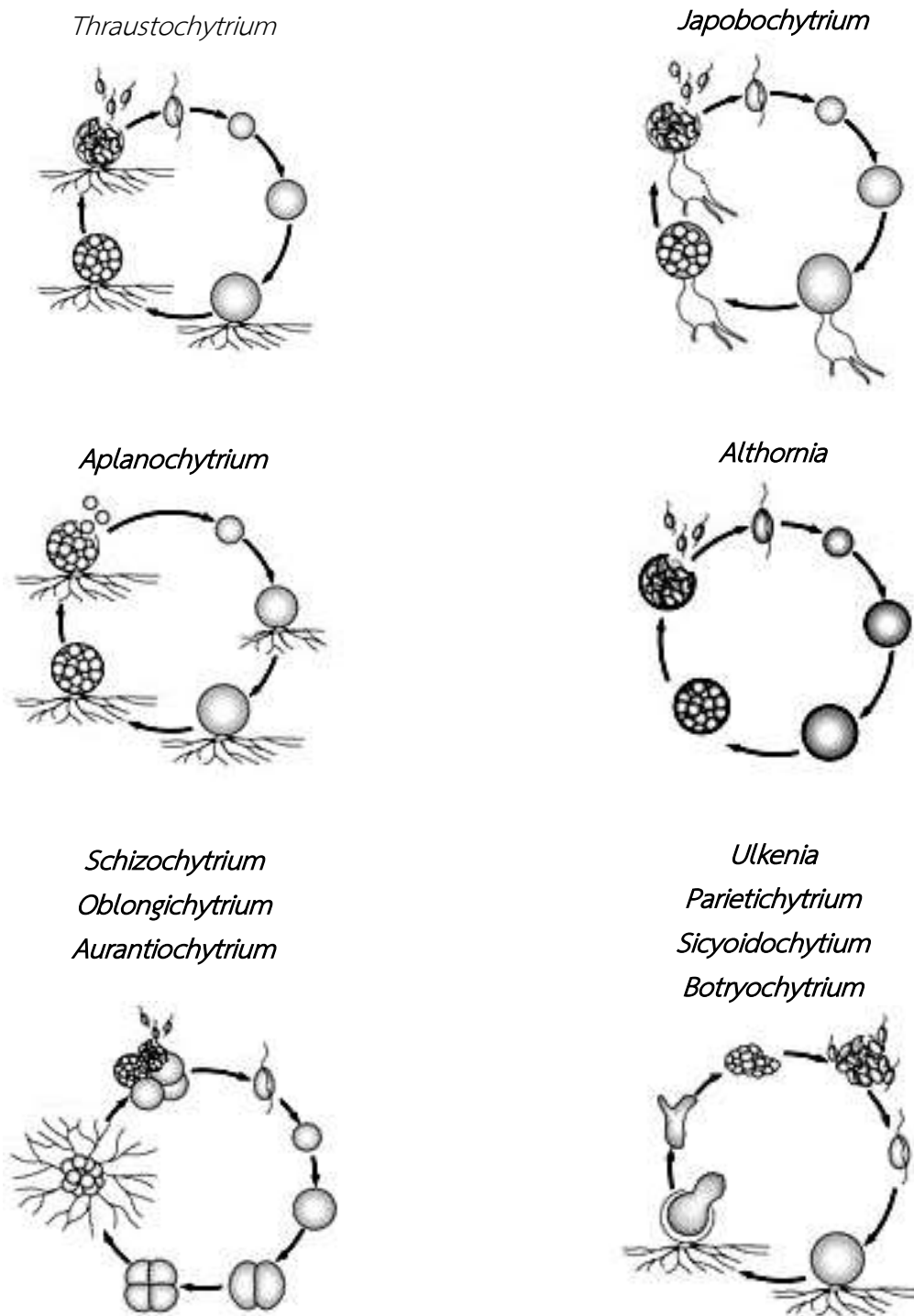
การจัดจำแนกทอรัสโทโคตริคัส เริ่มต้นจาก Sparrow ปี 1973 ได้จัดทอรัสโทโคตริคัสไว้ในกลุ่ม Oomycetes (Saprolegniales) โดยใช้ลักษณะซูโอสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่วและมีแฟลกเจลลา 2 เส้น และได้ให้คำจำกัดความไว้ว่า เป็นกลุ่มราทะเลที่มีความต้องการเกลือ ทัลลัสเมื่อเจริญพันธุ์บางส่วนจะพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (eucarpic) มีส่วนร่างแหภายนอกเซลล์หรือ เอคโตพลาสมิคเนต (ectoplasmic net) ซูโอสปอร์แรงเจียมประกอบไปด้วยผนังเซลล์หลายชั้นผลิต ซูโอสปอร์ ไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและการพักตัว (Alderman et al., 1974) ต่อมา Olive (1975) ได้จัดกลุ่มทอรัสโทโคตริคัสอยู่ในไฟลัม Labyrinthulidae โดยใช้พื้นฐานองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์และโครงสร้างภายในเซลล์เป็นตัวจัดจำแนก (Honda et al., 1998) การจัดจำแนกทอรัสโทโคตริคัสได้มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับช่วงระยะเวลารายละเอียดข้อมูลที่มีมากขึ้น ซึ่งการจัดจำแนกทอรัสโทโคตริคัสมีดังนี้ (ภาพที่ 2.6)

Marchan et al. (2017) รายงานว่าทอรัสโทโคตริคัสพบทั้งสิ้น 11 สกุล ดังนี้

1. *Thraustochytrium*
2. *Japonochytrium*
3. *Schizochytrium*
4. *Oblongichytrium*
5. *Aurantiochytrium*
6. *Ulkenia*
7. *Sicyoidochytrium*
8. *Botryochytrium*
9. *Parietichytrium*
10. *Monorhizochytrium*
11. *Althornia*

1. *Thraustochytrium* ทัลลัสมีรูปร่างกลมขนาดเล็ก ผนังเซลล์มีหลายชั้น ทัลลัสส่วนล่างมีส่วนของเอคโตพลาสมิคเนต ใช้ในการยึดติดกับซับสเตรท ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ ผลิตโดยซาจิโนเจน (Alderman et al., 1974; Porter, 1989) ภายในซูโอสปอร์แรงเจียมมีการสร้าง ผนังกันเรียกว่าพอรอลิเฟอรัส บอดี (proliferous body) ซึ่งถือเป็นลักษณะเด่นของสกุลนี้ ซึ่ง *Thraustochytrium* แต่ละชนิดจะมีจำนวนพอรอลิเฟอรัสแตกต่างกันไป เช่น *Thraustochytrium kinnei* พบเพียง 1 พอรอลิเฟอรัส แต่ *T. multirudimentale* พบพอรอลิเฟอรัสเป็นจำนวนมากและบางชนิดกลับไม่พบการสร้างพอรอลิเฟอรัสเลย เช่น *T. roesum* ซูโอสปอร์แรงเจียมของ *Thraustochytrium* ผลิตซูโอสปอร์ 50-100 ซูโอสปอร์ การปล่อยซูโอสปอร์เกิดจากแรงดันภายในทำให้ผนังเซลล์แตกออก (Alderman et al., 1974) โดยหลังการปล่อยซูโอสปอร์แล้ว พบว่าส่วนของพอรอลิเฟอรัสยังคงอยู่และสร้างซูโอสปอร์แรงเจียมขึ้นมาใหม่ (Honda, 2001) นอกจากนี้ Shabala

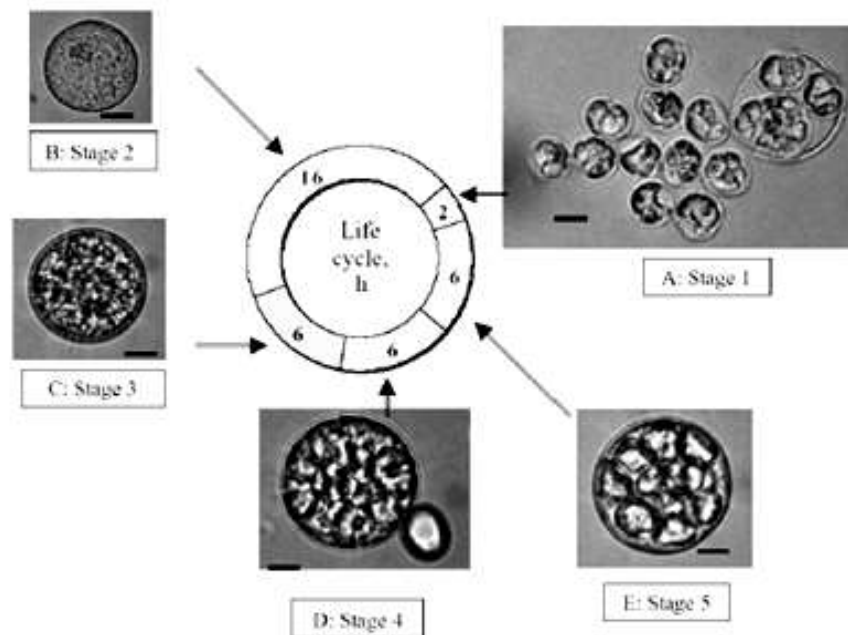
et al. (2001) ได้ทำการศึกษาวงจรการเจริญของ *Thraustochytrium* sp. โดยแบ่งการเจริญออกเป็น 5 ระยะ คือ



ภาพที่ 2.6 วงจรชีวิตของทรอสโทโคทริดส์ อะพลาโนโคทริดส์ ที่แสดงความแตกต่างในรูปแบบของแบ่งทลัสส์และการสร้างซูโอสปอร์ (ดัดแปลงจาก Beakes, Thines & Honda, 2015)

- (1) ระยะชูโอสปอร์มีขนาดค่อนข้างเล็ก โดยทั่วไปจะมีขนาดประมาณ 6-12 ไมโครเมตร
- (2) ระยะที่ชูโอสปอร์หยุดนิ่งไม่เคลื่อนไหว มีการสร้างซีสต์ (Cyst) และค่อย ๆ มีขนาดใหญ่ขึ้นจนเกิดเป็นโครงสร้างชูโอสปอร์
- (3) ระยะที่มองเห็นโครงสร้างของเม็ดไขมันภายในชูโอสปอร์ได้อย่างชัดเจน เริ่มมีการสร้างหุยดไขมัน รวมทั้งมีการพัฒนาของผนังเซลล์
- (4) ระยะที่เม็ดไขมันมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ทัลดัสมีการแผ่ขยายออกมากขึ้นมีการสร้างแคปซูลซึ่งมีผนังหนาขึ้นรอบ ๆ ชูโอสปอร์ และเริ่มมองเห็นร่องรอยของการแบ่ง (cleavage lines) ได้อย่างชัดเจน
- (5) ระยะที่มีการแบ่งตาม cleavage lines เพื่อแยกแต่ละ planonts ออกจากกันตามด้วยการแตกออกของผนังเซลล์ และปลดปล่อยชูโอสปอร์ออกมาสู่สิ่งแวดล้อม จากนั้นจะเข้าสู่ระยะที่ 1 ต่อไป

วัฏจักรทั้ง 5 ดังกล่าวเกิดขึ้นและเสร็จสิ้นสมบูรณ์ภายใน 28-40 ชั่วโมง ซึ่งระยะเวลาอาจแตกต่างกันออกไปขึ้นกับปริมาณสารอาหารและอัตราการให้อากาศ สอดคล้องกับรายงานของ Goldstein ในปี 1963 (ภาพที่ 2.7)

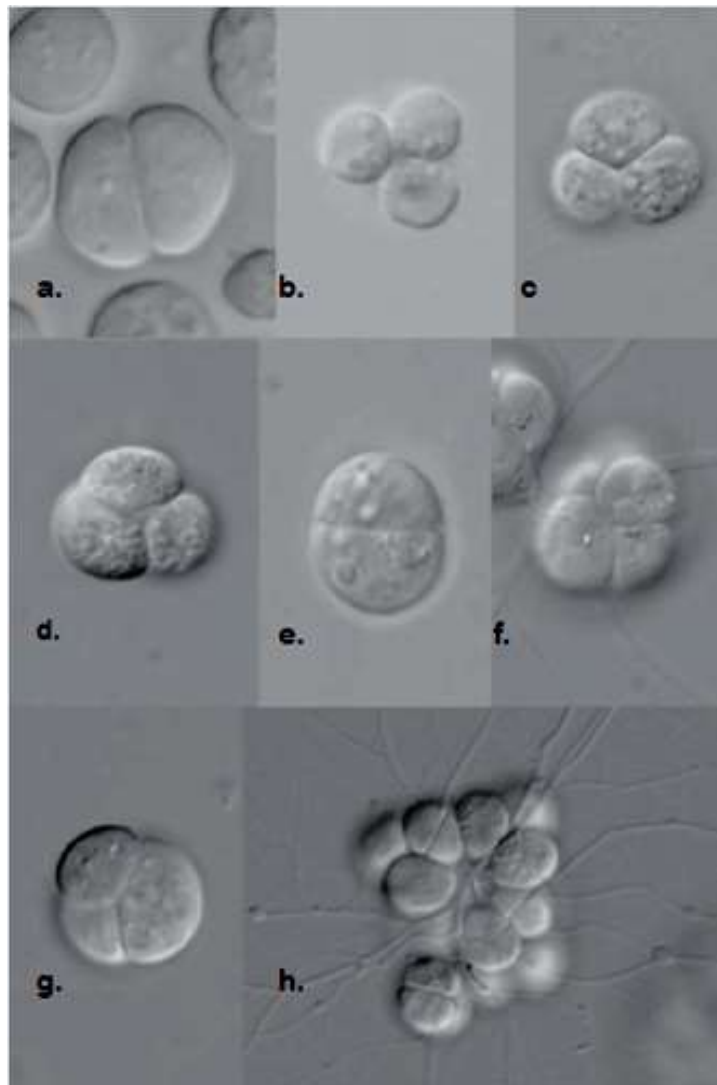


ภาพที่ 2.7 วัฏจักรชีวิตของ *Thraustochytrium sp.* (Shabala et al., 2001)

2. *Japonochytrium* เป็นสกุลที่คล้ายกับ *Thraustochytrium* โดยทัลลัสมีรูปร่างกลม ส่วนล่างยึดติดกับซับสเตรทโดยส่วนของเอกโตพลาสซึมเนทที่มีลักษณะบวมพองออก ถือเป็นลักษณะเด่นของสกุลนี้ และเรียกส่วนนี้ว่าอะโพฟิซิส (apophysis) ซูโอสปอร์แรงเจียมผลิตซูโอสปอร์ที่มีแฟลกเจลลา 2 เส้น การปล่อยซูโอสปอร์เกิดจากรูหรือช่องว่างของซูโอสปอร์แรงเจียม (Alderman et al., 1974)

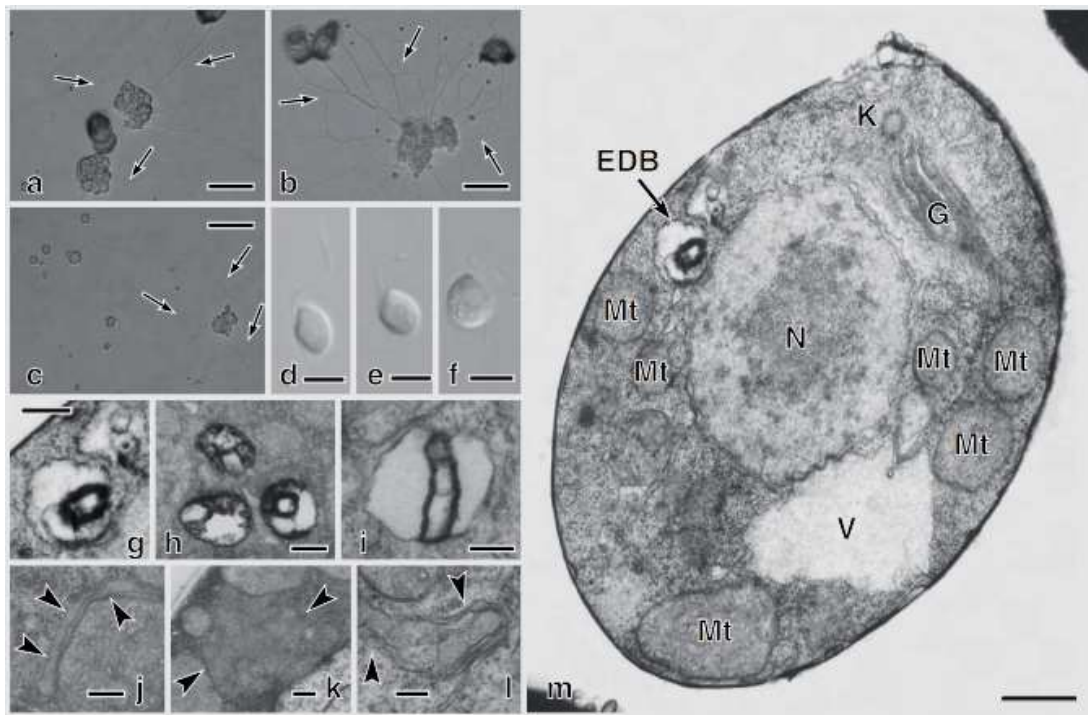
3. *Schizochytrium* ทัลลัสมีรูปร่างกลม ผนังบาง อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือหลายเซลล์เกาะรวมกันเป็นกลุ่ม มีส่วนของเอกโตพลาสซึมเนทยึดเกาะกับซับสเตรท (Raghukumar, 1988) ซูโอสปอร์แรงเจียมมีการแบ่งครึ่งเซลล์แบบทวิคูณ (successive binary division) จำนวน 4-5 ครั้ง ซึ่งแต่ละเซลล์จะผลิตซูโอสปอร์ และบางเซลล์มีลักษณะแบบอะมีบอยด์เซลล์ (amoeboid cell) คือเซลล์มีรูปร่างยาวขึ้น (elongate) และหดตัวเป็นทรงกลม ก่อนแบ่งตัวสร้างซูโอสปอร์ (Honda et al., 1998) ซูโอสปอร์มีรูปร่างรีหรือเกือบกลมมีแฟลกเจลลา 2 เส้นทางด้านข้าง การปล่อยซูโอสปอร์เกิดจากส่วนปลายของซูโอสปอร์แรงเจียมฉีกขาดออก (Alderman et al., 1974; Honda, 1998) ซึ่ง Yokoyama and Honda (2007) ได้จำแนกสกุล *Schizochytrium* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน และ carotenoids พบว่าสกุล *Schizochytrium* สามารถแยกออกได้เป็น 3 สกุล ได้แก่ *Schizochytrium sensu stricto* และสกุลใหม่อีก 2 สกุล คือ *Aurantiochytrium* และ *Oblongichytrium* (ภาพที่ 2.8) นอกจากนี้ยังพบว่า *Schizochytrium* มีโคโลนีสีเหลือง เนื่องจากมีการผลิต beta-carotene ส่วนเอกโตพลาสซึมเนทมีการพัฒนาดี และมีการผลิตกรดไขมันเออาร์เอได้ถึง 20% ของกรดไขมันทั้งหมด (ภาพที่ 2.9)

4. *Oblongichytrium* ทัลลัสมีรูปร่างกลม ผนังบาง โคโลนีสีขนาดใหญ่และมีการแบ่งเซลล์แบบ binary division มีเอกโตพลาสซึมเนทที่พัฒนาดี ซูโอสปอร์มีแฟลกเจลลา 2 เส้น และมีรูปร่างแบบรูปรีหรือรูปไข่ ไม่พบ resting spores (ภาพที่ 2.10) นอกจากนี้มีการผลิต beta-carotene และ canthaxanthin และสามารถผลิตกรดไขมันดีพีเอได้ในปริมาณที่สูง แต่ผลิตกรดไขมันเออาร์เอได้ปริมาณน้อยซึ่ง Yokoyama and Honda (2007) ได้รายงานไว้ว่า สกุล *Oblongichytrium* บางชนิดถูกแยกมาจากสกุล *Schizochytrium* เนื่องจากมีรูปร่างที่คล้ายกัน



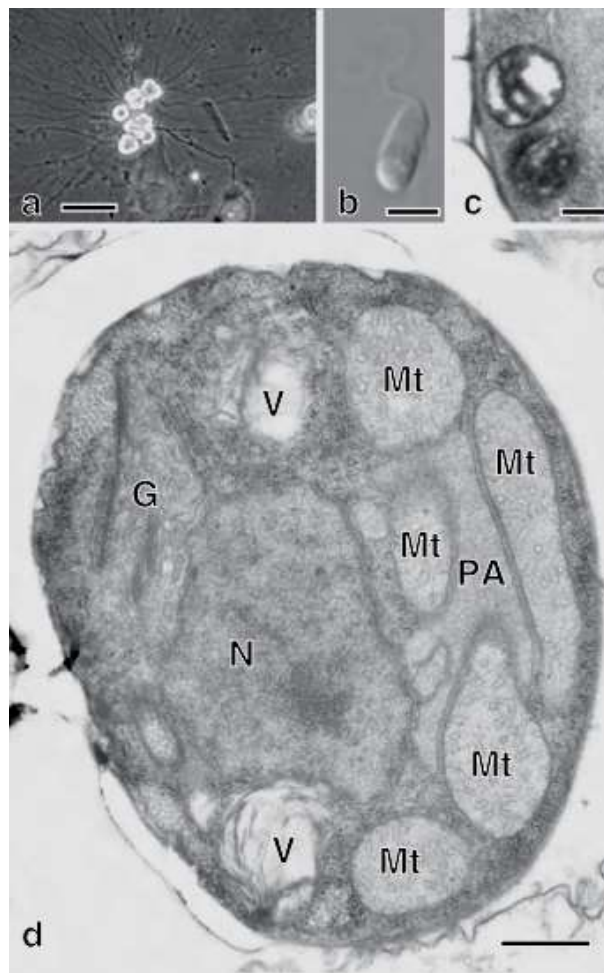
ภาพที่ 2.8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงกลุ่มเซลล์กำลังแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสองในอาหาร-เฮช (medium-H)

- | | |
|---|---|
| a. <i>Aurantiochytrium limacinum</i> ; | b. <i>Aurantiochytrium</i> sp. SEK 209; |
| c. <i>Aurantiochytrium</i> sp. SEK 217; | d. <i>Schizochytrium aggregatum</i> ; |
| e. <i>Schizochytrium</i> sp. SEK 210; | f. <i>Schizochytrium</i> sp. SEK 326; |
| g. <i>Oblongichytrium</i> sp. SEK 347; | h. <i>Oblongichytrium</i> sp. SEK 347 |
- (Yokoyama and Honda, 2007)



ภาพที่ 2.9 ลักษณะของของ *Schizochytrium sensu stricto*

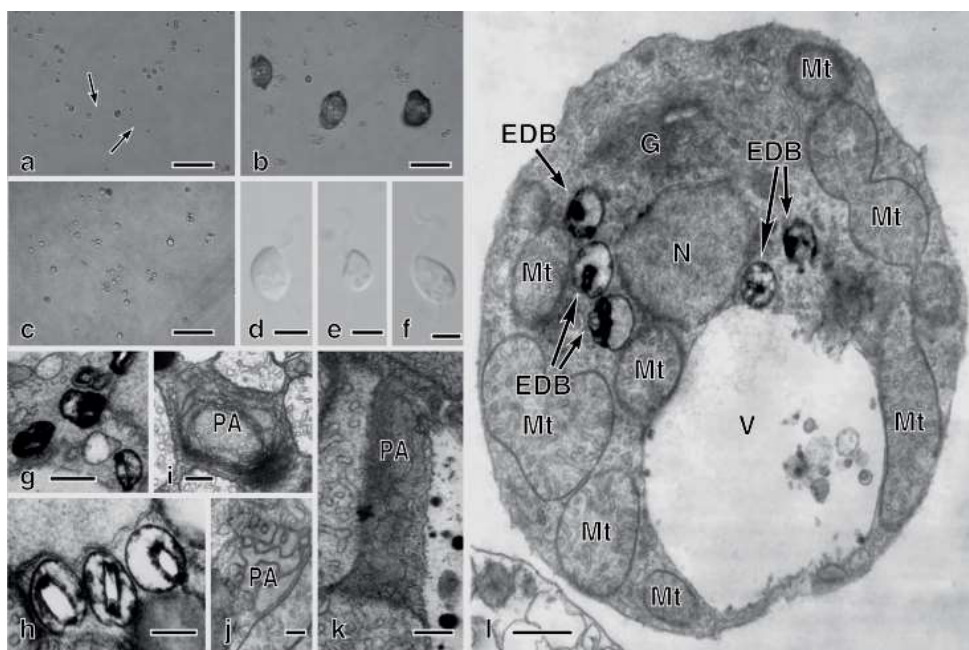
a-c ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงเซลล์ที่เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ เลี้ยงในน้ำทะเล และมี
 เอกโตพลาสมิคเนทที่พัฒนาดี (ลูกศร) d-f ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ แสดงซูโอสปอร์มี
 รูปร่างเป็นรูปไข่ g-m ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดง electron-dense
 body และ para-nuclear body (หัวลูกศร) ในเซลล์ปกติ
 (a, d, g, j, m *S. aggregatum* ATCC 28209; b, e, h, k *Schizochytrium* sp. SEK
 210; c, f, i, l *Schizochytrium* sp. SEK 346) EDB, electron-dense body; G,
 Golgi body; K, kinetosome; Mt, mitochondria; N, nucleus; V, vacuole
 (Yokoyama and Honda, 2007)



ภาพที่ 2.10 ลักษณะเซลล์ของ *Oblongichytrium* sp. SEK 347

a) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงเซลล์ที่เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ เลี้ยงในน้ำทะเล และมี
 เอคโตพลาสซึมที่พัฒนาดี (ลูกศร) b. ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดง ซูโอสปอร์มี
 รูปร่างเป็นรูปรี c. ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดง electron-dense body
 d. ภาพตัดขวางเซลล์ปกติ แสดง para-nuclear body. *G*, Golgi body;
Mt, mitochondria; *N*, nucleus; *PA*, para-nuclear body; *V*, vacuole.
 (Yokoyama and Honda, 2007)

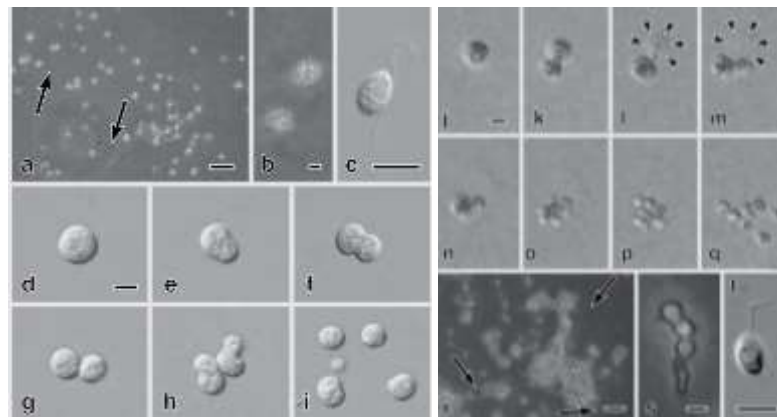
5. *Aurantiochytrium* เป็นสกุลที่แยกมาจาก *Schizochytrium* และ *Oblongichytrium* (Yokoyama and Honda, 2007) ทลัสมีรูปร่างกลม ผนังบาง เซลล์มักกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ โคลโลนีของสกุลนี้บางชนิดมีขนาดเล็ก สีส้ม เนื่องจากเซลล์มีการผลิต canthaxanthin, astaxanthin, phoenicoxanthin และ beta-carotene ในปริมาณสูง มีการแบ่งเซลล์แบบ Binary division เอกโทพลาสติกเนโทพัฒนาไม่ตี ซูโอสปอร์มีรูปร่างคล้ายกับซูโอสปอร์ของ *Schizochytrium* มีแฟลกเจลลา 2 เส้น และมีรูปร่างรีจนถึงทรงกลม และไม่พบ resting spores (ภาพที่ 2.11) นอกจากนี้พบกรดไขมันเออาร์เอในปริมาณน้อยแต่สามารถผลิตกรดไขมันดีเอสเอได้ในปริมาณสูง



ภาพที่ 2.11 ลักษณะของ *Aurantiochytrium* spp.

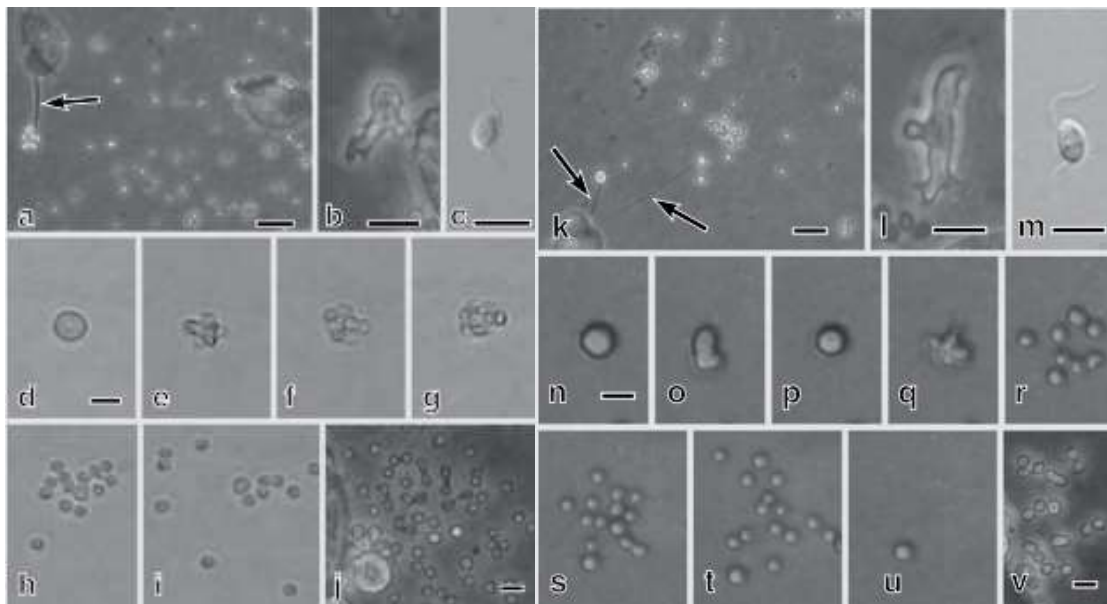
a-c ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดง เซลล์ที่เลี้ยงในน้ำทะเลและมีเอกโทพลาสติกเนโทน้อยมาก (ลูกศร) d-f ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดง ซูโอสปอร์มีรูปร่างเป็นรูปไข่ g-l ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดง electron-dense body และ para-nuclear body (PA) ในเซลล์ปกติ (a, d *A. limacinum* NIBC SR21; b, e, g, j, l *Aurantiochytrium* sp. SEK 209; c, f, h, i, k *Aurantiochytrium* sp. SEK 217) EDB, electron-dense body; G, Golgi body; Mt, mitochondria; N, nucleus; V, vacuole (Yokoyama and Honda, 2007)

6. *Ulkenia* ย้ายมาจากสกุล *Thraustochytrium* ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นอะมิบอยด์ มีโคโลนีขนาดเล็ก ทึบสีส้มขนาดและรูปร่างต่างกัน (subglobose, globose หรือ pear shape) ผนังเซลล์บาง การสืบพันธุ์เซลล์แม่จะพัฒนาเป็นอะมิบอยด์เซลล์ จากนั้นอะมิบอยด์เซลล์จะสร้างซุโอสปอร์ที่มีแฟลกเจลลา 2 เส้น เมื่อซุโอสปอร์เจริญเต็มที่จะดันผนังเซลล์แม่แตกออก (Hunt, 2000) ซึ่ง *Ulkenia* สามารถผลิต astaxanthin, phoenicoxanthin, echinenone และ beta-carotene และสามารถผลิตดีเอชเอได้ในปริมาณสูง นอกจากนี้ Yokoyama, Salleh & Honda (2007) ได้จำแนก *Ulkenia* โดยใช้ลักษณะที่พบระยะโปรโตพลาสต์ (Protoplast stage) ในช่วงชีวิต และได้ศึกษาในส่วนของ 18S rRNA พบว่า *Ulkenia* แบ่งออกเป็น 4 monophyletic groups ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันในส่วนของคุณสมบัติของกรดไขมันกับ carotenoid รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์และโคโลนี เช่นการคงเหลือของผนังเซลล์ (sporangial wall) ลักษณะการแบ่งเซลล์ (cell cleavage) การสร้างซุโอสปอร์และการพัฒนาของเอกโตพลาสมิกเนท และแบ่งสกุล *Ulkenia* ใหม่ออกเป็น 4 สกุล และได้สกุลใหม่ 3 สกุล ได้แก่ *Ulkenia sensu stricto*, *Botryochytrium*, *Parietichytrium* และ *Sicyoidochytrium* gen. nov. (ภาพที่ 2.12)



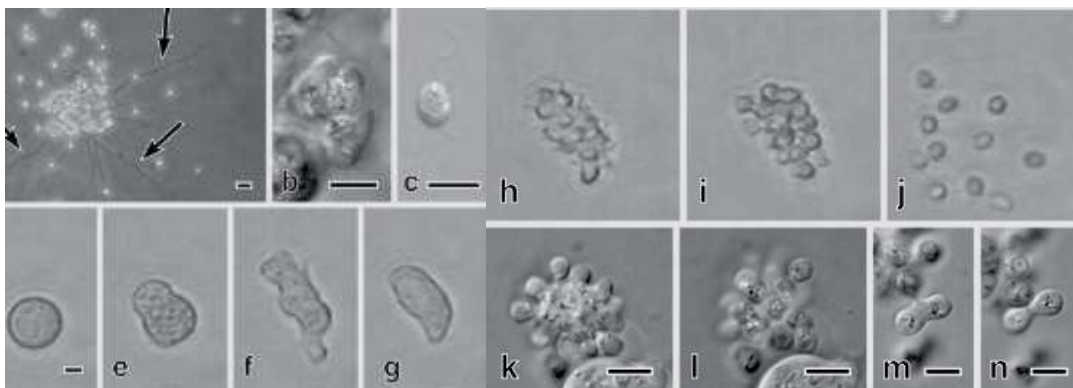
ภาพที่ 2.12 ลักษณะของ *Ulkenia* clade strains [a–r *U. amoeboides* SEK 214; s–u *Ulkenia* sp. (deposited as *Japanochytrium* sp.) ATCC 28207] a. เซลล์ที่เลี้ยงในน้ำทะเล และมีเอกโตพลาสมิกเนท (ลูกศร) b. อะมิบอยด์เซลล์ c. ซุโอสปอร์ d–i การแบ่งเซลล์ของอะมิบอยด์เซลล์ (d. เซลล์เป็นรูปทรงกลม; e. เซลล์มีรูปร่างอิสระ; f. binary cell division; g. two daughter cells; h binary cell divisions; i. four daughter cells) j–q. อะมิบอยด์เซลล์และการสร้างซุโอสปอร์ [j เซลล์ปกติ; k, l. protoplast ที่ออกมาจากผนังเซลล์); m. อะมิบอยด์เซลล์กำลังเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์; n. อะมิบอยด์เซลล์ที่อยู่กับที่; o. การแบ่งเซลล์; p. eight daughter cells; q. กำลังปล่อยซุโอสปอร์] r. เซลล์รวมกลุ่มกันในน้ำทะเลและมีเอกโตพลาสมิกเนทมาก (ลูกศร) s. อะมิบอยด์เซลล์ t. ซุโอสปอร์ (Yokoyama et al., 2007)

7. *Sicyoidochytrium* มีลักษณะคล้ายคลึงกับสกุล *Ulkenia* มีโคโลนีมีขนาดเล็ก เอกโตพลาสซึมไม่พัฒนา ในระยะเจริญพันธุ์ผนังเซลล์ deliquescing อย่างสมบูรณ์ โปรโตพลาสต์ไม่มีผนังหุ้มและเซลล์แบ่งตัวหลายครั้ง ในการแบ่งครั้งสุดท้ายซูโอสปอร์เกิดจากการยึดตัวและดึงตัว เซลล์มีการผลิต canthaxanthin, echinenone และ beta-carotene นอกจากนี้สามารถผลิตกรดไขมันดีเอชเอได้ปริมาณสูงแต่พบปริมาณเออาร์เอ็นเอ้น้อยมาก (Yokoyama et al., 2007) (ภาพที่ 2.13)



ภาพที่ 2.13 ลักษณะของ *Sicyoidochytrium* clade strains (a-j *S. minutum* SEK 354; k-v *S. minutum* NBRC 102975). a, k ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่เลี้ยงในน้ำทะเล และมีเอกโตพลาสซึมที่ไม่แตกแขนง (ลูกศร) b. อะมิบอยด์เซลล์ c., m. ซูโอสปอร์ d-i, n-u การสร้างซูโอสปอร์โดยการแบ่งเซลล์ [d. สปอร์แรงเจียมโตเต็มวัย; e. การแบ่งเซลล์; f. eight daughter cells; g. การแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องแบบ binary cell division ที่มีลักษณะเหมือนดัมเบล; h. 16 สปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่; i. ซูโอสปอร์ที่มีขนาด 2 เส้น และกำลังปล่อย; n. เซลล์ปกติ; o. อะมิบอยด์เซลล์; p. สปอร์แรงเจียมโตเต็มวัย รูปร่างกลม; q. การแบ่งเซลล์; r. eight daughter cells; s. การแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องแบบ binary cell division ที่มีลักษณะเหมือนดัมเบล; t. 16 สปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่; u. ซูโอสปอร์ที่มีขนาด 2 เส้น กำลังปล่อยและคงเหลือ proliferous body (หัวลูกศร)] j, v การแบ่งเซลล์แบบ binary cell division ที่มีลักษณะเหมือนที่ดัมเบล (Yokoyama et al., 2007)

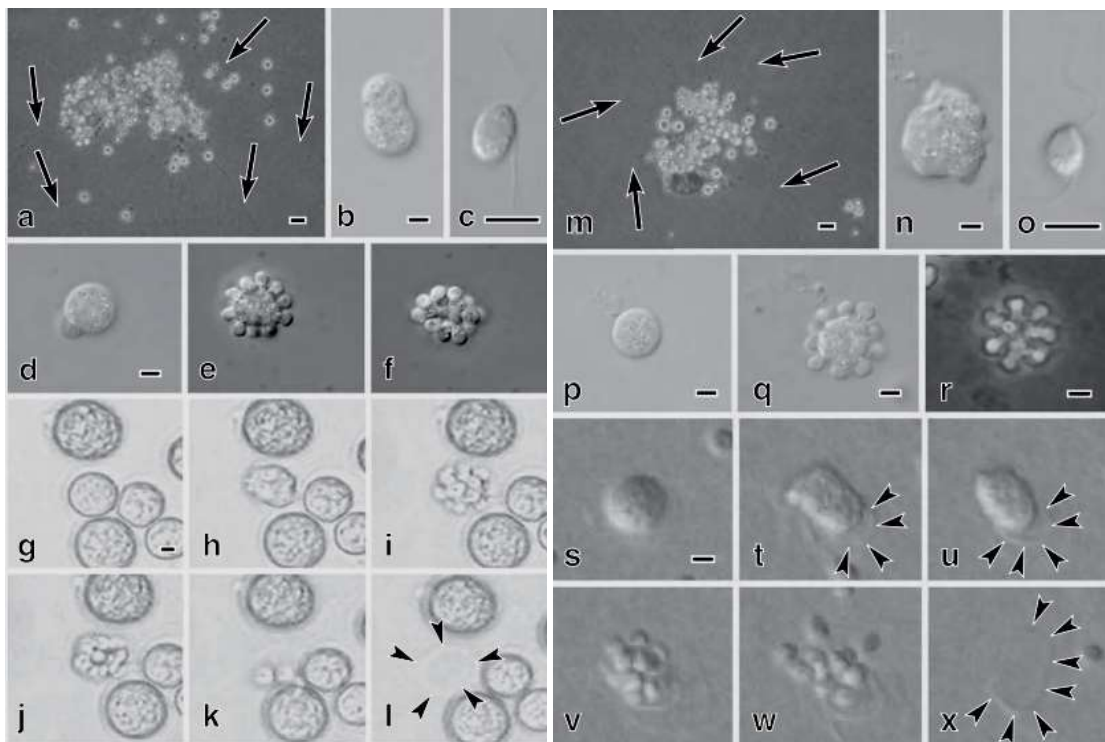
8. *Botryochytrium* โคลนีนี้มีขนาดใหญ่และเอกโตพลาสติกพัฒนาดีเมื่อเปรียบเทียบกับสกุล *Ulkenia* ซึ่งวงจรชีวิตมีความคล้ายคลึงกับสกุล *Ulkenia* มาก ในระยะเจริญพันธุ์ผนังเซลล์ deliquescing ทำให้โปรโตพลาสต์ไม่มีผนังหุ้มหรือมีการคืบคลานออกจากผนังสปอร์แรงเจียมทางรูเล็กๆที่อยู่ปลายบนของสปอร์แรงเจียม ทลัสส์พบทั้งที่เป็น epibiotic, endobiotic และ interbiotic ทลัสส์มีผนังบางในช่วงที่มีการเจริญมากๆ (rhizoidal system) มีรูปร่างทรงกลม กิ่งทรงกลมหรือลูกแพร์ มีขนาดที่แตกต่างกันมากในระหว่างพัฒนาการ หลังจากนั้นโปรโตพลาสต์พัฒนาขึ้นเป็น zoosporangium botryose (grape-shaped) ซึ่งจะปล่อยซูโอสปอร์ นอกจากนี้ *Botryochytrium* มีการผลิต canthaxanthin, echinenone และ beta-carotene และยังสามารถผลิตกรดไขมันดีเอสเอได้ในปริมาณที่สูง (ภาพที่ 2.14)



ภาพที่ 2.14 ลักษณะของ *Botryochytrium* clade strains (a–n *B. radiatum* SEK 353)

a) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดง เซลล์เลี้ยงในน้ำทะเล มีการรวมกลุ่มขนาดใหญ่ และมีเอกโตพลาสติกเนทที่พัฒนาดี (ลูกศร) b. อะมิบอยด์เซลล์ c. ซูโอสปอร์ d–j การสร้างซูโอสปอร์ [d. สปอร์แรงเจียมโตเต็มวัย; e. โปรโตพลาสต์ออกจากผนังเซลล์ต่างๆ ; f. อะมิบอยด์เซลล์เคลื่อนที่; g. สปอร์แรงเจียมโตเต็มวัย รูปร่างกลม h. การแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องแบบรัศมี (radiated cell division) และแตกหน่ออย่างมากมายบริเวณขั้ว (multipolar budding); i. ซูโอสปอร์พร้อมถูกปล่อย; j. ซูโอสปอร์ถูกปล่อยโดยไม่มีผนังเซลล์เหลืออยู่] k, l. แบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องแบบรัศมี (radiated cell division) และแตกหน่ออย่างมากมายบริเวณขั้ว (multipolar budding) m, n ซูโอสปอร์ถูกสร้างโดยการยัดตัวและการดึงตัว (pinching and pulling) (Yokoyama et al., 2007)

9. *Parietichytrium* โคลินีมีขนาดใหญ่ วงจรชีวิตมีความคล้ายคลึงกับ *Botryochytrium radiatum* มีเอดิโพลลาสมีคเนทพัฒนาดี ผนังเซลล์ยังคงเหลือหลังจากปล่อยโปรโตพลาสต์แล้ว โปรโตพลาสต์แบ่งตัวแบบ centripetal division ทำให้เกิดเป็นกลุ่มก้อน แล้วมีรูปร่างเป็นรูปดาว ก่อนที่จะสร้างซูโอสปอร์ มีการผลิตกรดไขมัน docosatetraenoic acid (22:4) ได้ในปริมาณสูง (10% ของกรดไขมันทั้งหมด) และยังมีผลิต beta-carotene (ภาพที่ 2.15)



ภาพที่ 2.15 ลักษณะของ *Parietichytrium* clade strains (a-l *P. sarkarianum* SEK 351; m-x *P. sarkarianum* SEK 364) a, m ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงเซลล์เลี้ยงในน้ำทะเล มีการรวมกลุ่ม และมีเอดิโพลลาสมีคเนทที่พัฒนาดี (ลูกศร) b, n อะมิบอยด์เซลล์ c, o. ซูโอสปอร์ d, p. สปอร์แรงเจียมโตเต็มวัย e, f, q, r. เซลล์แบ่งตัวแบบรัศมี (radiated cell division) g-l, s-x การสร้างซูโอสปอร์ [g. สปอร์แรงเจียมโตเต็มวัย; h. อะมิบอยด์เซลล์; i. การแบ่งเซลล์; j. สปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่; k. ซูโอสปอร์ถูกปล่อย; l. ผนังเซลล์ที่เหลือ (หัวลูกศร); s. สปอร์แรงเจียมโตเต็มวัย ; t. โปรโตพลาสต์ออกจากผนังเซลล์ที่หนา (หัวลูกศร) โดยเคลื่อนที่แบบ อะมิบอยด์; u. สปอร์แรงเจียมโตเต็มวัย รูปร่างกลม; v. เซลล์แบ่งตัวเป็นซูโอสปอร์; w. ซูโอสปอร์ถูกปล่อย x. ผนังเซลล์เหลือค้างอยู่ (หัวลูกศร)] (Yokoyama et al., 2007)

10. *Monorhizochytrium* เป็นสกุลล่าสุด (Doi and Honda, 2017) ซึ่งก่อนหน้านี้นี้คือ *Thraustochytrium globosum* จึงมีวิวัฒนาการชีวิตที่คล้ายคลึงกับ *Thraustochytrium* คือการพัฒนาของทัลลัสไปเป็นซูโอสปอร์แรงเจียม โดยไม่เหลือ residual basal body ส่วนการผลิตกรดไขมันและ carotenoid ยังไม่พบข้อมูลการศึกษาเพิ่มเติม

11. *Althornia* ซูโอสปอร์แรงเจียมมีรูปร่างกลมล่องลอยเป็นอิสระ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-120 ไมโครเมตร ไม่พบเคคโตพลาสซึมเนท ผนังเซลล์มีความหนา 3-8 ไมครอน (Alderman and Jones, 1971) ซูโอสปอร์แรงเจียมผลิตซูโอสปอร์ที่มีแฟลกเจลลา 2 เส้น จำนวน 10-100 ซูโอสปอร์ การปล่อยซูโอสปอร์เกิดจากการเสื่อมสลายของผนังเซลล์ ซูโอสปอร์แรงเจียมหลังจากปล่อยซูโอสปอร์ออกจากเซลล์แม่จะเคลื่อนที่เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 36 ชั่วโมง เมื่อพบสัปดาห์ที่เหมาะสมจะสลัดหางออกและเจริญเป็นเซลล์ปกติ ซึ่งสกุลนี้ไม่พบระยะลงเกาะ (Jones and Alderman, 1971)

นอกจากนี้ยังพบสกุลที่ใกล้เคียงกับทรอสโทโคตริตส์อีก 1 กลุ่ม คือ *Aplanochytrium* เป็นอีกกลุ่มที่ย้ายมาจากสกุล *Thraustochytrium* ทัลลัสมีรูปร่างกลม ซูโอสปอร์แรงเจียมสร้างซูโอสปอร์รูปร่างกลม ไม่พบส่วนของแฟลกเจลลา เรียกว่า อะพลาโนสปอร์ (aplanospore) จำนวน 50-100 สปอร์ ถือเป็นลักษณะเด่นของสกุลนี้ (Alderman et al., 1974)

นอกจากนี้ Honda (2001) ได้เสนอคีย์ที่ใช้ในการจัดจำแนกทรอสโทโคตริตส์ระดับสกุล ดังนี้

1. เซลล์รูปร่างยาวรีคล้ายกระสวย.....	<i>Labyrinthula</i>
1. เซลล์รูปร่างกลม.....	ดูข้อ 2
2. ไม่มีเคคโตพลาสซึมเนท.....	<i>Althornia</i>
2. มีเคคโตพลาสซึมเนท.....	ดูข้อ 3
3. สร้างสปอร์ที่ไม่มีแฟลกเจลลา.....	<i>Aplanochytrium</i>
3. สร้างสปอร์ที่มีแฟลกเจลลา.....	ดูข้อ 4
4. เคคโตพลาสซึมเนทมีลักษณะบวมพอง.....	<i>Japonochytrium</i>
4. เคคโตพลาสซึมเนทไม่บวมพอง.....	ดูข้อ 5
5. มีการแบ่งเซลล์แบบ Binary Division.....	<i>Schizochytrium</i>
5. ไม่มีมีการแบ่งเซลล์แบบ Binary Division.....	ดูข้อ 6
6. สร้างอะมิบอยด์เซลล์ก่อนสร้างซูโอสปอร์.....	<i>Ulkenia</i>
6. ไม่สร้างอะมิบอยด์เซลล์ก่อนสร้างซูโอสปอร์.....	ดูข้อ 7
7. มีพอลิเพอริส.....	<i>Thraustochytrium</i>
7. ไม่มีพอลิเพอริส.....	<i>Labyrinthuloides</i>

กรดไขมัน (fatty acids)

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน มีสูตรทั่วไปคือ $R - COOH$ ลักษณะสูตรโครงสร้างของกรดไขมันประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่าคาร์บอกซิล ($COOH$) ซึ่งธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจนรวมตัวกันอยู่ อีกส่วนหนึ่งเรียกว่า ห่วงโซ่คาร์บอน (R) โดยมีธาตุคาร์บอนยึดเหนี่ยวกันเป็นห่วงโซ่กรดไขมัน จัดเป็นไขมันที่พบมากที่สุดในร่างกายมนุษย์และพบอยู่ในรูปของอาหารที่รับประทาน กรดไขมันที่พบในธรรมชาติมีทั้งจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นจำนวนคู่ ระหว่าง 4-24 อะตอม และพบในรูปกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) เล็กน้อย แต่ส่วนใหญ่พบในรูปที่ละลายในไขมัน (saponifiable lipid)

ชนิดของกรดไขมัน

1. กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่ประกอบไปด้วยอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจนที่เชื่อมกันด้วยพันธะเดี่ยวทั้งหมด มีโมเลกุลโซ่คาร์บอนสั้น เนื่องจากไม่มีพันธะคู่ (double bond) จึงทำให้มีจุดหลอมเหลวสูง (มากกว่า 60 องศาเซลเซียส) ส่วนใหญ่จะพบในไขมันสัตว์ เช่น เนื้อหมู เนื้อวัวและไขมันจากกะทิ มะพร้าว เนยและไข่แดง การเรียกชื่อจึงเรียกตามการเพิ่มจำนวนคาร์บอนเข้าไปครั้งละ 2 อะตอม เช่น myristic acid (14:0), palmitic acid (16:0) และ stearic acid (18:0) เป็นต้น

2. กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีจำนวนพันธะคู่ (Double bond) ในสายคาร์บอนโดยมีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุลตั้งแต่ 1-6 คู่ และโซ่คาร์บอนยาว 18-22 คาร์บอน กรดไขมันกลุ่มนี้มีจุดหลอมเหลวต่ำ ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนคาร์บอนอะตอม จำนวนพันธะคู่ในโมเลกุลและตำแหน่งของพันธะคู่ (อัคนิตย์ อิทธิอาภา, 2541) กรดไขมันไม่อิ่มตัวสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือ

2.1 กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 คู่ในสายคาร์บอน มีจุดหลอมเหลวสูง พบได้ทั่วไปในอาหาร และพบมากมี 2 ชนิดคือ palmitoleic acid (16:1n-7) และ oleic acid (18:1n-9)

2.2 กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุลตั้งแต่ 2 คู่ขึ้นไป นอกจากนี้กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 20 คาร์บอนอะตอมขึ้นไปเรียกว่า highly polyunsaturated fatty acid (HUFA) โดยทั่วไปจะใช้เรียกกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 ดังนั้น โอเมก้า-3 HUFA จึงประกอบไปด้วย eicosatrienoic acid (20:3n-3), eicosatetraenoic acid (20:4n-3), eicosapentaenoic acid (20:5n-3) และ docosahexaenoic acid (22:6n-3)

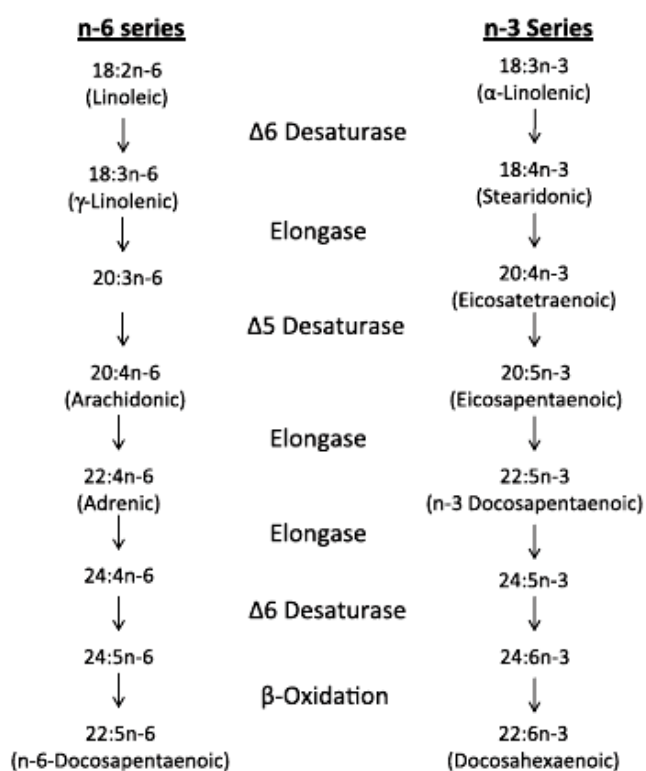
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ โดยอาศัยตำแหน่งของพันธะคู่พันธะแรกในสายคาร์บอนโดยนับจากปลายเมทิล (methyl end) ได้แก่

2.2.1 กลุ่มกรดโอเลอิก (oleic acid series) หรือกลุ่มโอเมก้า-9 กรดไขมันกลุ่มนี้ตำแหน่งของพันธะคู่พันธะแรกในสายคาร์บอนอยู่ที่คาร์บอนอะตอมที่ 9 เมื่อนับจากปลายเมทิล มีสารตั้งต้นเป็น oleic acid (18:1n-9) ซึ่งนิยมนำมาใช้สังเคราะห์กรดไขมันอื่น ๆ เช่น eicosenoic acid (20:1n-9) โดยทั่วไปพบมากในสัตว์บก เช่น น้ำมันหมูและน้ำมันวัว เป็นต้น

2.2.2 กลุ่มไลโนลีนิก (linoleic acid series) หรือกลุ่มโอเมก้า-6 มีตำแหน่งของพันธะคู่พันธะแรกในสายคาร์บอนอยู่ที่คาร์บอนอะตอมที่ 6 เมื่อนับจากปลายเมทิล มีสารตั้งต้นเป็น linoleic acid (18:2n-6) ซึ่งนำมาสังเคราะห์กรดไขมันชนิดอื่น ๆ เช่น γ -linolenic acid (18:3n-6), dihomo- γ -linolenic acid (20:3n-6) และ arachidonic acid (20:4n-6) เป็นต้น ในสัตว์น้ำบางชนิดมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ปลาน้ำจืด และปลาน้ำกร่อย ซึ่งบางชนิดสามารถสังเคราะห์ linoleic acid หรือสร้าง arachidonic acid ได้ ในขณะที่ปลาทะเล ต้องได้รับโดยตรงจากอาหารเท่านั้น (สุพิศ ทองรอด, 2535) โดยทั่วไปกรดไขมันกลุ่มนี้พบในน้ำมันพืชมากกว่าไขมันจากสัตว์ ซึ่งน้ำมันพืชส่วนใหญ่จะมี linoleic acid มากกว่า linolenic acid ถึง 87-99 เท่า (เวียง เชื้อโพธิ์หัก, 2542)

2.2.3 กลุ่มไลโนลีนิก (linolenic acid series) หรือกลุ่มโอเมก้า-3 มีตำแหน่งของพันธะคู่พันธะแรกในสายคาร์บอนอยู่ที่คาร์บอนอะตอมที่ 3 เมื่อนับจากปลายเมทิล มีสารตั้งต้นเป็น linolenic acid (18:3n-3) ซึ่งนำมาสังเคราะห์กรดไขมันชนิดอื่น ๆ เช่น stearidonic acid (18:4n-3), eicosatrienoic acid (20:3n-3), eicosatetraenoic acid (20:4n-3), eicosapentaenoic acid (20:5n-3) และ docosahexaenoic acid (22:6n-3) เป็นต้น ซึ่ง linolenic acid จะถูกใช้สังเคราะห์อีพีเอและดีเอชเอ ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของ n-3 PUFA ซึ่งพบมากในสาหร่ายและสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสัตว์ทะเล (marine oil) ได้แก่ น้ำมันปลา (fish oil) และน้ำมันตับปลา (fish liver oil) เป็นต้น (สุพิศ ทองรอด, 2535)

ในร่างกายมนุษย์สามารถเปลี่ยนกรดไขมันกลุ่ม linoleic acid และกลุ่ม linolenic acid ที่พบในผักสีเขียว น้ำมันพืช เมล็ดพืช เป็นกรดไขมันดีอีเอและดีเอชเอได้โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ คือ elongases เป็นการเพิ่มคาร์บอนทีละ 2 อะตอมและ desaturase เป็นการเติมพันธะคู่ที่มีอยู่ใน acyl chain ภายในไมโทคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม กลไกการเกิดปฏิกิริยาจะถูกกระตุ้นโดย Acyl-CoA desaturase ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่อะตอมของกรดไขมันชนิดเดียวกัน (ภาพที่ 2.16) แต่ถ้าในสภาวะร่างกายมีการสะสม linoleic acid มากกระบวนการเปลี่ยนแปลงกรดไขมันดีเอชเอจะลดลง เนื่องจาก linolenic acid และ linoleic acid มีความต้องการเอนไซม์ชนิดเดียวกัน (Hunt, 2000) โดยปกติร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันดังกล่าวให้เพียงพอต่อความต้องการได้ ดังนั้นกรดไขมันดีเอชเอส่วนมากจึงได้รับมาจากอาหารที่มนุษย์บริโภคเข้าไปนั่นเอง



ภาพที่ 2.16 การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนโอเมก้า-6 และโอเมก้า-3 (Galgani & Garcia, 2014)

ความสำคัญของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3

กรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 เป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร ถ้าขาดไปอาจก่อให้เกิดโรคหรืออาการผิดปกติ (บุญล้อม ชีวะอิสสระกุล, 2542) จึงเรียกได้ว่าเป็นกรดไขมันจำเป็น (essential fatty acid) สามารถพบได้ในไขมันจากพืชและสัตว์ในปริมาณที่แตกต่างกันไป

เออาร์เอ (arachidonic acid; 20:4n6) มีความสำคัญทั้งในเรื่องของการพัฒนาสมองและระบบต่างๆ ในร่างกาย นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการสร้างและเก็บความจำระยะยาวของทารกซึ่งเป็นพื้นฐานของการเรียนรู้ ช่วยเพิ่มความไวของการรับแสงในส่วนเรตินาของลูกตา และความสามารถในการมองเห็น เนื่องจากเออาร์เอคือกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ที่เป็นส่วนประกอบหลักของซินแนปส์ หรือจุดเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ประสาท และมีบทบาทเป็นตัวนำข้อมูลตรงรอยต่อของซินแนปส์และภายในเซลล์ โดยเออาร์เอยังช่วยเพิ่มความเร็วในการส่งสัญญาณประสาทระหว่างเซลล์ประสาทของทารกเพื่อนำข้อมูลมาเก็บไว้ในสมองซึ่งเป็นการช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพของกระบวนการเรียนรู้และความจำในระยะยาว

อีพีเอ (eicosapentaenoic acid; 20:5n-3) มีบทบาทลดการจับตัวของเกล็ดเลือดและสร้างสารที่ทำให้เส้นเลือดขยายตัวได้ดี จึงลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดได้ จากสมมติฐานทางการแพทย์ของการเกิดโรคหัวใจอุดตันพบว่า การเกิดลิ่มเลือด (thrombogenesis) เป็นสาเหตุหนึ่งของปัญหาโรคหัวใจและหลอดเลือด กลไกในการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดมีอยู่หลายประการโดยมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง 2 กลุ่มที่เกี่ยวข้องคือ กลุ่มโอเมก้า-6 และโอเมก้า-3 ซึ่งจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นของการสร้าง eicosanoid ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันมาก แต่โอโคซานอยด์ที่ได้จากกรดไขมันทั้งสองกลุ่มนี้มีหน้าที่ในทางตรงข้ามกัน เช่น การสร้าง thromboxanes a_2 จาก arachidonic acid ทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดซึ่งจะถูกยับยั้งด้วย thromboxanes a_3 ที่สร้างมาจากอีพีเอที่มีคุณสมบัติด้านการรวมตัวของเกล็ดเลือดบริเวณผนังหลอดเลือด (เดือนทิพย์ปิยรัตน์, 2538) ทำให้สามารถลดความหนืดของเลือดลง และช่วยเพิ่มระดับของเหลวในเมมเบรน ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถพบได้ในน้ำมันปลาชนิดต่าง ๆ โดยทั้งปลาน้ำจืดและปลาทะเลต่างมีอีพีเอเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง คิดเป็น 5.9 เปอร์เซ็นต์ และ 8.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นการบริโภคปลาเป็นประจำย่อมลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดได้

ดีเอชเอ (docosahexaenoic acid; 22:6 n-3) มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการเจริญเติบโต และการพัฒนาของระบบประสาทและสมอง รวมทั้งสายตาและการมองเห็น ดีเอชเอมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับอีพีเอ โดยเป็นองค์ประกอบเรตินาของดวงตาและผนังเซลล์ทั่วร่างกาย ทำให้เซลล์มีความไวต่อการรับสัญญาณประสาทและที่สำคัญที่สุดคือเป็นส่วนประกอบของเซลล์สมองซึ่งพบในปริมาณสูง (Bajpai et al., 1991a) ดีเอชเอที่เข้าไปในสมองจะเสริมสร้างการเจริญเติบโตของปลายประสาทที่เรียกว่าเดนไดรต์ (Dendrite) ซึ่งทำหน้าที่ถ่ายทอดสัญญาณและส่งผ่านข้อมูลระหว่างสมองด้วยกัน ทำให้เกิดการเรียนรู้และความจำ และพบว่าในสมองของทารกในครรภ์มีดีเอชเอเป็นส่วนประกอบอยู่ครึ่งหนึ่งก่อนคลอด ส่วนที่เหลือได้รับจากอาหารในช่วงปีแรก ดังนั้นดีเอชเอจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อสตรีในระยะตั้งครรภ์ และมารดาในระยะให้นมบุตร เนื่องจากในน้ำนมมารดามีดีเอชเอในปริมาณสูง จึงเชื่อว่าดีเอชเอมีผลต่อการพัฒนาสมอง การมองเห็นและการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ในช่วงที่เป็นทารก (Uauy et al., 2001) นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการเกิดโรคทางหัวใจและหลอดเลือด โดยมีผลในการป้องกันและรักษาโรค เช่น ความดันโลหิตสูง ภาวะหลอดเลือดแดงแข็งหรือยืดหยุ่นน้อยลง การเกิดลิ่มเลือดที่ทำให้หลอดเลือดอุดตัน รวมถึงภาวะซึมเศร้า ไซซ็อกเสบ หอบหืด อาการเบื่ออาหาร โรคมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งเต้านมและลำไส้ใหญ่ ลดอัตราเสี่ยงในการเกิดภาวะหลอดเลือดในสมองแตก (Gill and Valivety, 1997; Takahata et al., 1998; Horrocks and Yeo, 1999; รุจิราลัย พลุทวี, 2550) ช่วยบำบัดโรคที่เกี่ยวข้องกับความชราภาพ และมีผลทำให้การตั้งครรภ์และการคลอดบุตรเป็นไปโดยปกติ (ประสงค์ เทียนบุญ, 2543; วรณิพา วิเวโก, 2545)

แหล่งสำคัญของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3

น้ำมันปลา (fish oil) อุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่มโอเมก้า-3 ชนิดที่พบและมีความสำคัญคือ α -linolenic acid (ALA) อีพีเอและดีเอชเอ ไขมันที่มีอยู่ในเนื้อปลาคจะเป็นส่วนประกอบของเซลล์ต่าง ๆ โดยเฉพาะเซลล์สมอง มีส่วนช่วยป้องกันการแข็งตัวของไขมันในเส้นเลือด เนื่องจากปลาที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า-3 สูง ทำให้ไขมันปลาแตกต่างจาก

ไขมันสัตว์ชนิดอื่น ๆ คือ มีสภาพเป็นของเหลวที่อุณหภูมิต่ำ มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของปลาคงสภาพเป็นของเหลวอยู่ได้ในน้ำแข็ง ปลาจึงสามารถย่อยและดูดซึมไขมันไปใช้ได้ จึงทำให้ปลาทะเลยังคงมีระดับกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงมาก จากการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณอีพีเอและดีเอชเอในปลาชนิดต่าง ๆ กัน พบว่ามีปริมาณอีพีเอและดีเอชเอระหว่าง 4-37 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด (รัศมี ศุภศรี, 2536 อ้างอิงจาก Kinesella, 1986) ถึงแม้ว่าปลาทะเลจะได้ชื่อว่าเป็นแหล่งสำคัญของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม โอเมก้า-3 แต่ปริมาณกรดไขมันภายในตัวปลาก็มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ คือ ชนิดของปลา เพศ ฤดูกาล หรือแม้แต่แหล่งที่อยู่อาศัย อีกทั้งในธรรมชาติและการเพาะเลี้ยง (รัศมี ศุภศรี, 2536; Sargent et al., 1999) รวมทั้ง กลิ่น รส และคุณภาพที่ลดลงเนื่องจากน้ำมันปลาถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายจึงทำให้ไม่เป็นที่นิยมของผู้บริโภค

ต่อมาได้หันมาให้ความสนใจจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่มทรอสโทโคไตรดิสส์ เนื่องจากมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 โดยเฉพาะดีเอชเอมีปริมาณสูงถึง 30-40 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด เช่น *Thraustochytrium aureum* สายพันธุ์ ATCC 34304 และ *Thraustochytrium aureum* ATCC 28211 สามารถผลิตดีเอชเอสูงถึง 47.4 และ 52.3 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ (Bajpai et al., 1991a, 1991b, Bowles et al., 1999) และ *Schizochytrium mangrovei* สายพันธุ์ KF5 และ KF6 มีปริมาณดีเอชเอ 41.1 และ 40.5 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ (Fan et al., 2001)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทรอสโทโคไตรดิสส์พบแพร่กระจายได้ทั่วไปเช่น บริเวณชายฝั่ง ปะการัง ปากแม่น้ำและป่าชายเลน (Harel et al., 2008; Naganuma et al., 1998) ดินตะกอนและสับسترต่างๆ เช่น ใบไม้ป่าชายเลนที่ร่วงหล่นและเน่าเปื่อย แพลงค์ตอนพืช มูลสัตว์ (Porter, 1989; Chilton, 1995) พบกระจายได้ทั่วไปในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย ในสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น บริเวณชายฝั่ง ปะการัง ปากแม่น้ำ ห้วยทะเล สาหร่ายทะเลและป่าชายเลน (Harel et al., 2008; Naganuma, Takasugi, & Kimura, 1998; Jaritkhuan, & Suanjit, 2018)

Raghukumar (1988) พบทรอสโทโคไตรดิสส์ชนิดใหม่คือ *S. mangrovei* จากใบไม้ป่าชายเลนที่กำลังย่อยสลายจากป่าชายเลน Goa ในประเทศอินเดีย พบว่ามีแตกต่างจาก *Schizochytrium* ชนิดอื่น คือหลังจากเซลล์มีการแบ่งตัวแบบ binary division แต่ละเซลล์จะพัฒนาเป็นซูโอสปอร์ ในขณะที่ *S. minutum*, *S. octosprum* และ *S. aggregatum* หลังจากแบ่งเซลล์พบว่าแต่ละเซลล์จะพัฒนาเป็นซูโอสปอร์เรียงและผลิตซูโอสปอร์ 2-64 ซูโอสปอร์

Ranghukumar (1992) ได้ทำการแยก *Thraustochytrium striatum* และ *Schizochytrium mangrovei* จากใบโกงกางใบเล็กที่ร่วงหล่นบริเวณปากแม่น้ำบนเกาะ Charoa ประเทศอินเดีย ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าทรอสโทโคไตรดิสส์ถูกคัดแยกได้ง่าย โดยนำมาเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการและพบว่าเมื่อเลี้ยง *T. striatum* และ *S. mangrovei* ร่วมกับแบคทีเรียเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ สร้างอะมิบอยด์เซลล์เคลื่อนที่โดยใช้เท้าเทียม (pseudopodia) และกินแบคทีเรีย

เป็นอาหาร ซึ่งลักษณะเด่นนี้สอดคล้องกับโปรโตซัวอีกหลายชนิด ต่อมาในปี 1998 มีการศึกษาความแตกต่างของฤดูกาลต่อจำนวนการพบทรอสโทโคตริตส์ พบว่าการเพิ่มจำนวนของทรอสโทโคตริตส์จะเพิ่มจำนวนในช่วงต้นฤดูร้อนจนถึงต้นเดือนมิถุนายนโดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 22 องศาเซลเซียส แต่การเพิ่มจำนวนของทรอสโทโคตริตส์จะน้อยลงในช่วงฤดูที่มีอากาศร้อนจัดของปี (Bongiorni, 1998)

Leano (2001) เก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน 11 ชนิดจากป่าชายเลน Panay ประเทศฟิลิปปินส์ พบทรอสโทโคตริตส์ 85-100% จากตัวอย่างใบไม้ทุกชนิดที่ทำการศึกษา โดยชนิดทรอสโทโคตริตส์ที่พบสูงสุดคือ *S. mangrovei* (40-100% จากตัวอย่างใบไม้ทั้งหมด) และยังพบ *Thraustochytrium* sp. แต่คัดแยกได้เฉพาะจากใบตะบูนขาวและโกงกางใบเล็ก นอกจากนี้ Leano (2002) พบว่ากลุ่ม Straminipilous เป็นกลุ่มแรกที่เข้าทำการย่อยสลายใบไม้ป่าชายเลน หลังจากที่ย่อยลงน้ำและพบว่ามีความสัมพันธ์ทุกช่วงของการย่อยสลายใบไม้ (Bremer, 1995) เนื่องจากทรอสโทโคตริตส์ทนทานต่อสารฟีนอลิกที่ใบไม้ป่าชายเลนขับออกมาช่วงการย่อยสลาย และมีรายงานพบว่าทรอสโทโคตริตส์สามารถผลิตเอนไซม์ เซลลูเลส โพลีกาเลคทูโรเนส และอะไมเลสที่มีความสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในใบไม้ป่าชายเลน (Raghukumar et al., 1994) และ *S. mangrovei* เป็นทรอสโทโคตริตส์ชนิดที่พบมากที่สุดจากป่าชายเลนทั้งในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน (Leano, 2002)

Fan and Jones (2002) พบทรอสโทโคตริตส์ 8 สายพันธุ์คือ *Schizochytrium* sp. KF-1, *S. mangrovei* KF-12, KF-7, KF-12, *T. striatum* KF-9 และ *Ulkenia* KF-19 จากตัวอย่างใบไม้ที่ร่วงหล่นในป่าชายเลน ประเทศฮ่องกง

Wong et al. (2005) ได้ทำการศึกษาความอุดมสมบูรณ์ของทรอสโทโคตริตส์ที่พบจากใบรังกะแท้ (*Kandelia candel*) ที่มีลักษณะเน่าเปื่อยและดินตะกอนบริเวณป่าชายเลน โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนเมษายน มิถุนายน ตุลาคม 2004 และกุมภาพันธ์ 2005 จากการศึกษาพบว่า ความอุดมสมบูรณ์ของทรอสโทโคตริตส์ที่ได้จากใบไม้ป่าชายเลนเท่ากับ $4.8 \times 10^3 - 5.6 \times 10^5$ CFU g⁻¹ โดยมีค่าสูงกว่าในดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนที่มีค่าเท่ากับ $1.0 \times 10^2 - 1.6 \times 10^3$ CFU g⁻¹ และพบสูงสุดในเดือนตุลาคม (5.6×10^5 CFU g⁻¹)

Perveen, Ando, Ueno, Ito, Yamamoto, Yamada, Takagi, Kaneko, Kogame and Okuyama (2006) คัดแยกทรอสโทโคตริตส์จากป่าชายเลนที่โอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น แล้วนำสายพันธุ์ 12B มาเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีกลูโคส อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณไขมัน 58 % กรดไขมันชนิดดีเอชเอ 43 % ของกรดไขมันทั้งหมด โดยมีอัตราการเจริญ 0.38 / ชั่วโมง อัตราผลผลิตดีเอชเอ 2.8 ± 0.7 กรัม/ลิตร/วัน

จุฬาลักษณ์ จันทบาลและคณะ (2550) ทำการศึกษาความหลากหลายของทรอสโทโคตริตส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน 5 ชนิด บริเวณป่าชายเลนบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร โดยเก็บใบไม้สี่เหลี่ยมเปรียบเทียบกับใบไม้สี่เหลี่ยม พบทรอสโทโคตริตส์ 2 สกุล แบ่งเป็น 4 ชนิด พบว่าใบไม้สี่เหลี่ยมพบทรอสโทโคตริตส์ 79% สูงกว่าใบไม้สี่เหลี่ยม 49.28% เดือนพฤศจิกายนพบทรอสโทโคตริตส์สูงสุด 69.54% รองลงมาคือกรกฎาคม 64.50% (318 ไอโซเลท) และมีนาคมพบน้อยที่สุด

60% (241 ไอโซเลท) ต่อมามยรา ประยูรพันธ์ และคณะ (2551) คัดแยกทออสโทโคตริดส์จากใบไม้ป่าชายเลน 9 ชนิด จากป่าชายเลนบริเวณอำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ พบทออสโทโคตริดส์ 184 ไอโซเลท โดยโงก่างใบเล็กและพังกาหัวสุ่มดอกแดง เป็นพันธุ์ไม้ที่มีเปอร์เซ็นต์พบสูงสุด คือ 75% ขณะที่ปอทะเลพบทออสโทโคตริดส์ต่ำสุด 15% และจากการศึกษาพบทออสโทโคตริดส์ 1 สกุล 3 ชนิด คือ *Schizochytrium mangrovei* (41.44%), *S. limacinum* (10%) และ *Schizochytrium* sp.8 (1.11%) จะเห็นได้ว่า *S. mangrovei* เป็นชนิดที่พบสูงสุด และพบกรดไขมันดีเอชเอในปริมาณสูง (15.41-180.74 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง, 8.79-48.60 %กรดไขมันทั้งหมด) กรดไขมันอีพีเอ (0.25-7.42 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง, 0.15-6.17 %กรดไขมันทั้งหมด) และกรดไขมันเออาร์เอ (0.16-3.85 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง, 0.09-3.94 %กรดไขมันทั้งหมด)

Arafles et al. (2011) นำทออสโทโคตริดส์ 2 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากใบไม้ที่ร่วงหล่นในบริเวณป่าชายเลน เมือง Subic bay ประเทศฟิลิปปินส์ สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Thraustochytrium* sp. SB04 และ *Schizochytrium* sp. SB11 และได้ทำการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงและการผลิตกรดไขมัน พบว่าทออสโทโคตริดส์ทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญได้ดีโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลิตชีวมวลได้สูงที่สุดที่ความเข้มข้นของกลูโคสต่ำ (3-5% w/v) ส่วนการผลิตกรดไขมันจะเห็นได้ว่า *Thraustochytrium* sp. ผลิตกรดไขมัน oleic acid (18:1) ซึ่งเป็น monounsaturated fatty acid (MUFA) ได้มากถึง 71% ของกรดไขมันทั้งหมด ส่วน *Schizochytrium* sp. สามารถผลิตดีเอชเอได้ในปริมาณที่สูงถึง 22.5% ของกรดไขมันทั้งหมด นอกจากนี้ ยังพบว่าทออสโทโคตริดส์ทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่านั้น

สุดารัตน์ แทนเนียว นิยม กำลั้งดี และภูวดล บางรักษ์ (2556) คัดแยกจุลินทรีย์จากใบโงก่างใบเล็กที่มีสีน้ำตาลจากป่าชายเลนบริเวณที่มีน้ำขึ้นน้ำลงในพื้นที่ชายฝั่งอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช คัดแยกทออสโทโคตริดส์ได้ 7 ไอโซเลท คือ *Schizochytrium* spp. (ไอโซเลท PN-123, PN142, PN-152, BJ-11, BJ-21, BJ-51 และ BJ-61) นำมาศึกษาชีวมวลและการผลิตกรดไขมันของแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ พบว่าชีวมวลของทออสโทโคตริดส์ทั้ง 7 ไอโซเลท อยู่ระหว่าง 1.98 ถึง 3.06 กรัมต่อลิตร และไอโซเลท PN-152 มีชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 3.06 กรัมต่อลิตร ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันพบว่าไอโซเลท PN-123, PN142, PN-152, BJ-11, BJ-21, BJ-51 และ BJ-61 มีปริมาณกรดไขมันดีเอชเอเป็น 10.73, 1.53, 73.43, 11.83, 18, 3.07 และ 19.83 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ ซึ่งไอโซเลทที่มีปริมาณดีเอชเอสูงสุด คือ PN152 เท่ากับ 97.63 เปอร์เซ็นต์กรดไขมันทั้งหมด

ทิวาพร ทองประสม, สุดารัตน์ สอนจิตรและ สมถวิล จริตควร (2018) ศึกษาความหลากหลาย ความถี่ของการพบ และปริมาณกรดไขมันในทออสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนที่ร่วงหล่นจำนวน 12 ชนิดบริเวณป่าชายเลนทุ่งโปรงทอง จังหวัดระยองในฤดูแล้งและฤดูฝน พบทออสโทโคตริดส์ที่จำแนกได้ 3 สกุล (7 ชนิด) ได้แก่ สกุล *Aurantiochytrium* จำนวน 5 ชนิด (*Aurantiochytrium* sp.1, *Aurantiochytrium* sp.2, *Aurantiochytrium* sp.3, *Aurantiochytrium* sp.4 และ *Aurantiochytrium* sp.5) สกุล *Parietichytrium* จำนวน 1 ชนิด (*Parietichytrium* sp.) สกุล *Schizochytrium* จำนวน 1 ชนิด (*Schizochytrium* sp.2) และทออสโทโคตริดส์ที่ไม่สามารถจำแนก

ได้ 2 ชนิดคือ Thraustochytriidae 8 และ Thraustochytriidae 9 ความถี่ของการพบทรอสโทโคไตรดส์โดยเฉลี่ยตลอดการศึกษาพบร้อยละ 2.5-52.5 โดยฤดูฝนมีความถี่ของการพบมากกว่าฤดูแล้ง เมื่อพิจารณาจากชีวมวลของทรอสโทโคไตรดส์มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 15.63 ± 3.03 - 22.87 ± 0.80 กรัมต่อลิตร โดย *Aurantiochytrium* sp.1 มีชีวมวลเฉลี่ยสูงสุด สำหรับปริมาณกรดไขมันพบว่า *Aurantiochytrium* sp.1 มีปริมาณ เออาร์เอ (Arachidonic acid, 20:4 n-6, ARA) และอีพีเอ (Eicosapentaenoic acid, 20:5 n-3, EPA) เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.43 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (0.1 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) และ 1.67 ± 1.17 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (0.35 ± 0.20 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) ตามลำดับ ส่วน *Aurantiochytrium* sp.3 มีกรดไขมันดีพีเอ (Docosapentaenoic acid, 22:5 n-6, DPA) และดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid, 22:6 n-3, DHA) สูงสุดเท่ากับ 39.40 ± 6.17 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (8.06 ± 0.53 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) และ 137.23 ± 25.61 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (31.68 ± 2.72 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) ตามลำดับ สายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมต่อไปคือ *Aurantiochytrium* sp.1 และในปีเดียวกันนี้ Jaritkhuan and Suanjit (2018) ทำการคัดแยกทรอสโทโคไตรดส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่น บริเวณป่าชายเลนทั้ง 3 สถานี จังหวัดชลบุรี ซึ่งพบทรอสโทโคไตรดส์ทั้งสิ้น 10 สกุล คือ *Aurantiochytrium mangrovei*, *A. limacinum*, *Aurantiochytrium* sp.1, *Aurantiochytrium* sp.2, *Aurantiochytrium* sp.3, *Aurantiochytrium* sp.4, *Aurantiochytrium* sp.5, *Aurantiochytrium* sp.7, Unknown 1 และ Unknown 2 จะเห็นได้ว่าพบทรอสโทโคไตรดส์สูงที่สุด คือ *A. mangrovei* (57.50%) และ *A. limacinum* (28.75%) พบในใบแสมขาวและทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าวมีชีวมวลเท่ากับ 6.88-22.49 กรัมต่อลิตรและ 9.39-20.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการผลิตกรดไขมันดีเอชเอพบว่า *A. limacinum* และ *A. mangrovei* มีปริมาณเท่ากับ 1.43-29.67 และ 0.84-31.09 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไขมันทั้งหมด ตามลำดับ จากผลการศึกษาในครั้งนี้ช่วยเพิ่มฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของพืชในประเทศไทย และแสดงให้เห็นว่าปริมาณดีเอชเอในปริมาณสูงบางสายพันธุ์ ซึ่งมีศักยภาพในการใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรือการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์เก็บตัวอย่างภาคสนาม

1. เครื่องมือวัดความเค็ม (Refractometer) ATAGO S/ MILL-E ประเทศจีน
2. เครื่องมือวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) YSI 60 ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. เครื่องมือวัดออกซิเจนในน้ำ (DO meter) YSI 85 ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เทอร์โมมิเตอร์
5. ถังพลาสติก
6. สมุดจดบันทึก ปากกา
7. เหล็กเสียบใบไม้

สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. internal standard (กรดไขมัน 19:0, nonadecanoic acid) SIGMA ประเทศเยอรมันนี
2. กรดไขมันมาตรฐาน (Standard fatty acid)
3. กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) J.T. BAKER ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. กลูโคส (glucose) AJEX FINECHEM ประเทศออสเตรเลีย
5. โซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate) AJEX FINECHEM ประเทศออสเตรเลีย
6. บีเอชที (2,6-Di-tert-butyl-p-cresol; BHT) FLUKA ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. เปปโตน (peptone) HIMEDIA ประเทศอินเดีย
8. เมทานอล (methanol) RCI LABSCAN ประเทศไทย
9. ยาปฏิชีวนะ (antibiotic)
 - 9.1 เพนนิซิลิน จี (penicillin G) GENERAL DRUGS HOUSE CO., LTD ประเทศไทย
 - 9.2 สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (streptomycin sulfate) GENERAL DRUGS HOUSE CO., LTD ประเทศไทย
10. ยีสต์สกัด (yeast extract) HIMEDIA ประเทศอินเดีย
11. วุ้น (agar)
12. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline)
 - 12.1 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) AJEX FINECHEM ประเทศออสเตรเลีย
 - 12.2 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (dipotassium hydrogenphosphate)

AJEX FINECHEM ประเทศออสเตรเลีย

12.3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (potassium dihydrogen phosphate)

AJEX FINECHEM ประเทศออสเตรเลีย

13. เฮกเซน (hexane) J.T.BAKER ประเทศสหรัฐอเมริกา

วัสดุ อุปกรณ์

1. กระดาษกรองชนิด qualitative เบอร์ 1 (filter paper) เส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร WHATMAN ประเทศอังกฤษ
2. กระจกฉีดยา (disposable syringe) NIPRO ประเทศไทย
3. กระจกตวง (graduated cylinder) ขนาด 25, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร WITEG ประเทศเยอรมนี
4. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ZEISS ประเทศเยอรมนี
5. กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) ZEISS ประเทศเยอรมนี
6. ขวดที่มีฝาปิด ขนาด 15x45 และ 25x95 มิลลิเมตร KIMBLE ประเทศจีน
7. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร PYPEX ประเทศเยอรมันนี
8. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 1000 JENWAY ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) HEWLETT PACKARD/ HP 6890 SERIES ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง METTELER TOLEDO AG-285 ประเทศ สวิตเซอร์แลนด์
11. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) LYOLAB 3000 ประเทศอินเดีย
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) KUBOTA 6930 ประเทศญี่ปุ่น
13. จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาด 90x14.2 มิลลิเมตร PYREX ประเทศเยอรมนี
14. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (deep freezer) PUFFER HUBBARD ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker) GALLENKAMP ประเทศอังกฤษ
16. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) LABCONCO CORPORATION ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. ตู้อบ (oven) EYELA NDO-450ND ประเทศญี่ปุ่น
18. แท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร (magnetic bar)
19. ปีกเกอร์ ขนาด 50, 600, 1000, 2000 มิลลิลิตร

20. ที่กรองสารสำหรับไซริงค์ (syringe filter) ขนาดคัดกรอง 0.2 ไมโครเมตร
SARTORIUS ประเทศเยอรมันนี
21. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 1000 ไมโครลิตร FINPIPETTE ประเทศฟินแลนด์
22. หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) TOMY SS-325 ประเทศญี่ปุ่น
23. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) MEMMERT ประเทศเยอรมันนี

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงานแบ่งเป็น 4 ตอนดังนี้

ตอนที่ 1 การคัดแยกและจำแนกเชื้อทรอสโทโคทริคัสจากใบไม้ป่าชายเลนด้วยลักษณะทาง
สัณฐานวิทยา

ตอนที่ 2 การตรวจคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสและเซลลูเลส
ของทรอสโทโคทริคัสที่แยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน

ตอนที่ 3 การจัดจำแนกทรอสโทโคทริคัสโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

ตอนที่ 4 ชีวมวลและการผลิตกรดไขมันของทรอสโทโคทริคัสที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน

ตอนที่ 1 การคัดแยกและจำแนกเชื้อทรอสโทโคทริคัสจากใบไม้ป่าชายเลนด้วยลักษณะ

ทางสัณฐานวิทยา

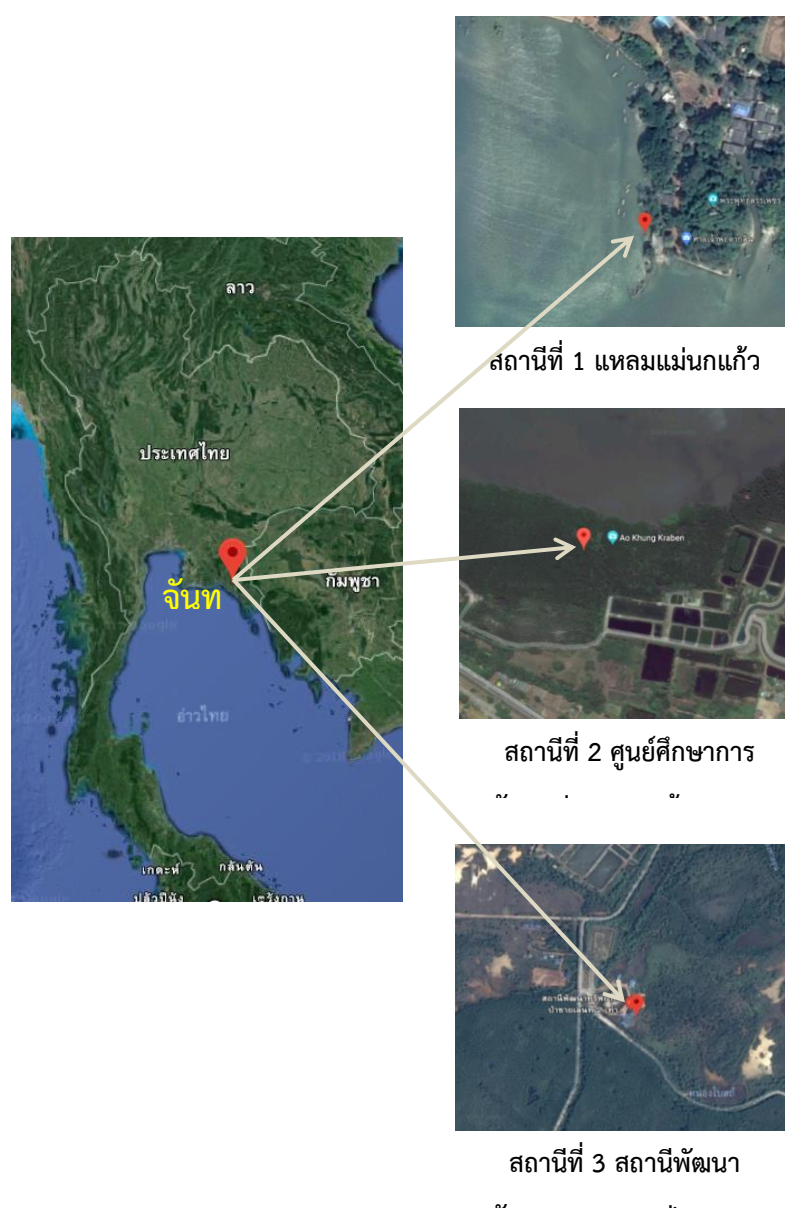
เก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนแต่ละชนิดบริเวณแหลมแม่เหล็กแก้ว (อำเภอนายายอาม) ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ (อำเภอท่าใหม่) และสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) (อำเภอขลุง) จังหวัดจันทบุรี (ตารางที่ 3.1 และภาพที่ 3.1-3.4) โดยสุ่มเก็บใบไม้ที่ร่วงหล่นมีลักษณะสีเหลืองอมน้ำตาลชนิดละ 20 ใบ เก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 2 ครั้ง (เดือนตุลาคม 2559 และเดือนมีนาคม-เมษายน 2560) และวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี

สถานี	สถานที่	พิกัด
1	แหลมแม่เหล็กแก้ว	12°40'46.6"N 101°48'37.8"E
2	ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ	12°34'26.6"N 101°53'53.3"E
3	สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน)	12°22'39.1"N 102°20'53.1"E

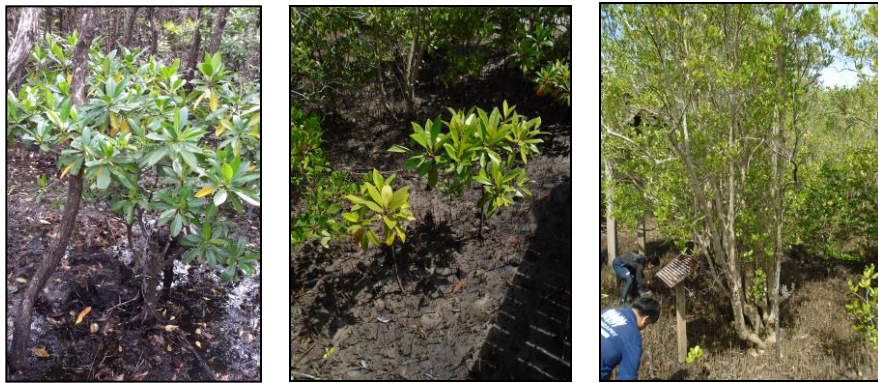
ตารางที่ 3.2 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมและอุปกรณ์ที่ใช้

ปัจจัยสิ่งแวดล้อม	อุปกรณ์
ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)	เครื่องวัดปริมาณออกซิเจน (DO meter)
ความเป็นกรด - ด่าง	เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เทอร์โมมิเตอร์
ความเค็ม (practical salinity unit, psu)	เครื่องวัดความเค็ม (refractometer)

ภาพที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างไปไม่ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี (<https://www.google.co.th/maps>)



ภาพที่ 3.2 สถานที่เก็บตัวอย่างป่าชายเลนแหลมแม่แก้ว (สถานีที่ 1)



ภาพที่ 3.3 สถานที่เก็บตัวอย่างป่าชายเลนคิ่งกระเบน (สถานีที่ 2)



ภาพที่ 3.4 สถานที่เก็บตัวอย่างป่าชายเลนท่าสอน (สถานีที่ 3)

วิธีการทดลอง

1. เตรียมอาหารแข็งกลูโคส: ยีสต์สกัด: เปปโตน (GYP) ให้ได้ความเข้มข้น 1:1:1 (ภาคผนวก ก)
 2. การคัดแยกเชื้อทรอสโทโคตริคัสจากใบไม้ป่าชายเลน
 - 2.1 นำตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนแต่ละชนิดล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ (ความเค็ม 15 psu) ประมาณ 2-3 ครั้ง
 - 2.2 ตัดใบไม้แต่ละชนิดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.5 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนำตัวอย่างใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีน้ำทะเลปราศจากเชื้อที่เตรียมยาปฏิชีวนะให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะเท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง
 - 2.3 สุ่มตัวอย่างใบไม้จากข้อ 2.2 จำนวน 9 ชิ้น มาปักลงในอาหารแข็ง GYP ปักใบไม้ทั้งหมด 3 เพลท โดยปักเพลทละ 3 ชิ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 27-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1-2 วัน
 - 2.4 ตรวจสอบเชื้อทรอสโทโคตริคัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคัดแยกเชื้อจากการปนเปื้อนสิ่งมีชีวิตอื่น โดยทำการแยกทรอสโทโคตริคัสด้วยวิธีขีดเชื้อแบบตัดกัน (cross streak) จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ (pure culture)
3. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การพบทรอสโทโคตริคัส (frequency of occurrence (%)) ของตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนทุกชนิดที่ทำการศึกษา

$$\text{เปอร์เซ็นต์การพบ} = \frac{\text{จำนวนใบไม้ที่พบทรอสโทโคตริคัส (แต่ละชนิด)} \times 100}{\text{จำนวนใบไม้ทั้งหมดของตัวอย่าง (แต่ละชนิด)}}$$

4. จัดจำแนกชนิดทรอสโทโคตริคัสที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี ลักษณะเซลล์ การแบ่งเซลล์ ลักษณะซูโอสปอร์แรงเจียมการสร้างซูโอสปอร์ และการปล่อยซูโอสปอร์โดยอาศัยวิธีที่ใช้ในการจัดจำแนกอันดับจิ้นัส (Honda, 2001; Goldstein & Belsky, 1964; Hunt, 2000; Alderman & Jones, 1971; Porter, 1989; Leander & Porter, 2000; Watson & Raper, 1957; Yokoyama et al., 2007 และ Yokoyama and Honda, 2007) ซึ่งวิธีของ Yokoyama et al. (2007) ประกอบในการจัดจำแนกอันดับครอบครัวและจิ้นัสของทรอสโทโคตริคัสอันดับ Labyrinthulales คลาส Labyrinthulomycetes ได้แก่

1. เซลล์ปกติ (vegetative cells) รูปร่างยาวรีคล้ายกระสวยและคิปลานภายในเส้นใย เอคโตพลาสซึม.....	Family Labyrinthaceae Single genus: <i>Labyrinthula</i>
1. เซลล์ปกติรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลมและไม่อยู่ภายในเส้นใยเอคโตพลาสซึม.....	Family <i>Thraustochytriaceae</i>
2. เซลล์ปกติใช้เวลาานจึงจะเคลื่อนที่ (migrate) และสร้างสปอร์ที่ไม่มีแฟลกเจลลา.....	<i>Aplanochytrium</i>
2. เซลล์ปกติถ้ามีการเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ตั้งแต่แรก.....	ข้อ 3
3. เซลล์ปกติไม่มีเส้นใยเอคโตพลาสซึม.....	<i>Althonia</i>
3. เซลล์ปกติมีเส้นใยเอคโตพลาสซึม.....	ข้อ 4
4. เซลล์ปกติมีเส้นใยเอคโตพลาสซึมที่มีลักษณะบวมพอง (apophysis).....	<i>Japonochytrium</i>
4. เซลล์ปกติมีเส้นใยเอคโตพลาสซึมที่มีลักษณะไม่บวมพอง (apophysis).....	ข้อ 5
5. เซลล์มีการแบ่งแบบ Binary Division.....	ข้อ 6
5. เซลล์พัฒนาเป็นซูโอสปอร์แรงเจียมเซลล์เดี่ยวๆ หรืออะมีบอยด์เซลล์.....	ข้อ 8
6. โคลนมีขนาดเล็ก เส้นใยเอคโตพลาสซึมไม่ค่อยพัฒนา.....	<i>Aurantiochytrium</i>
6. โคลนมีขนาดใหญ่ เส้นใยเอคโตพลาสซึมพัฒนาดี.....	ข้อ 7
7. ซูโอสปอร์รูปร่างรีและสร้างแคนต้าแซนธิน (canthaxanthin) และเบต้าแคโรทีน (β -carotene).....	<i>Oblongichytrium</i>
7. ซูโอสปอร์รูปร่างกลมและสร้างเพียงเบต้าแคโรทีน (β -carotene).....	<i>Shizochytrium</i>
8. เซลล์พัฒนาเป็นซูโอสปอร์แรงเจียมเซลล์เดี่ยวๆ.....	<i>Thraustochytrium</i>
8. เซลล์พัฒนาเป็นอะมีบอยด์เซลล์.....	ข้อ 9
9. โคลนมีขนาดเล็ก เส้นใยเอคโตพลาสซึมไม่ค่อยพัฒนา.....	ข้อ 10
9. โคลนมีขนาดใหญ่ เส้นใยเอคโตพลาสซึมพัฒนาดี.....	ข้อ 11
10. ซูโอสปอร์ถูกสร้างด้วยวิธีการบิดตัว (pinching) และดึงตัว (pulling).....	<i>Sicyoidochytrium</i>
10. ซูโอสปอร์ไม่ได้ถูกสร้างด้วยวิธีการบิดตัว (pinching) และดึงตัว (pulling)	<i>Ulkenia</i>
11. ยังคงเหลือผนังเซลล์ หลังจากปล่อยซูโอสปอร์.....	<i>Parietichytrium</i>
11. ผนังเซลล์สลายหมด หลังจากปล่อยซูโอสปอร์แล้ว.....	<i>Botryochytrium</i>

5. เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารแข็ง GYP (ภาคผนวก) ผิวเอียงที่เติมน้ำทะเลปราศจากเชื้อ (ความเค็ม 15 psu) ประมาณ 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 27-32 องศาเซลเซียส) ทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 2 เดือน

สำหรับการเรียกชื่อทรอสโทโคตริดส์ในการวิจัยนี้ มีหลักการตั้งชื่อดังนี้

1. ชื่อวิทยาศาสตร์ ประกอบด้วย จีนัส และชนิด เช่น *Aurantiochytrium limacenum*
 2. ชื่อย่อของมหาวิทยาลัยบูรพา เช่น BU (Burapha University)
 3. ชื่อย่อจังหวัดที่คัดแยกเชื้อ ได้แก่ CHA (Chantaburi Province)
 4. ชื่อย่อต้นไม้ป่าชายเลนเช่น RA (*Rhizophora apiculata*, ต้นโกงกางใบเล็ก)
 5. หมายเลขใบไม้ป่าชายเลนที่เก็บตัวอย่าง เช่น 10 หมายถึง ใบที่ 10
 6. ชั่วที่คัดแยกทรอสโทโคตริดส์ได้ เช่น 1 หมายถึง ชั่วที่ 1
- ตัวอย่างเช่น *Aurantiochytrium limacenum* BUCHARA 101

ตอนที่ 2 การตรวจคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสและเซลลูเลส ของทროสโทโคไตรดส์ที่แยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- CMC medium
- Agarose medium

สีย้อมและรีเอเจนต์

- 0.1% Congo red
- Lugol's iodine

สารเคมี

- Agarose (Omnipur®)
- Ammonium nitrate (Fluka)
- Congo red (ajax finechem)
- Di-potassium hydrogenphosphate (UNIVAR)
- Ferrous sulfate (MERCK, Germany)
- Iodine crystals
- Magnesium sulfate heptahydrate (Riedel – de Haën)
- Potassium chloride (MERCK, Germany)
- Potassium iodide
- Sodium carboxymethylcellulose
- Sodium chloride (MERCK, Germany)

วิธีการทดลอง

เพาะเลี้ยงทროสโทโคไตรดส์แต่ละไอโซเลทบนอาหาร GY agar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้เข็มแตะเชื้อแล้วนำมาลงเชื้อแบบ point inoculation บนอาหาร agarose medium และ carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสโดยการย้อมด้วย Lugol's iodine ทิ้งไว้ 3 – 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ทროสโทโคไตรดส์ที่ผลิตเอนไซม์อะกาเรสได้ จะพบโซนใสรอบโคโลนี ส่วนการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ทำโดยย้อมด้วย 0.1 % Congo red เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างออกด้วย 0.5 M NaCl ทროสโทโคไตรดส์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ จะแสดงลักษณะโซนใสรอบโคโลนี

ตอนที่ 3 การจัดทำแผนกทรอสโทโคตริตส์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

18S rRNA

Standard DNA Marker

- VC 100 bp Plus DNA ladder (Vivantis, Malaysia)

ชุดปฏิบัติการสำเร็จรูป

- DNAsecure Plant Kit (Tiangen, China)
- E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit (Omega, USA)

บัฟเฟอร์

- TE buffer, pH 8.0 (10 mM Tris-Cl, pH 8.0 + 1 mM EDTA, pH 8.0)
- 10X PCR buffer
- 6X Gel-loading buffer

ไพรเมอร์

ใช้คู่ไพรเมอร์ 18S001/18S13 สำหรับเพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA จากแบคทีเรีย (สุตารัตน์ สอนจิตร, 2559) ดังตารางที่ 3-3

เอนไซม์

- RNase A (10 mg/ml)
- Lysozyme (Tiangen, China)
- Taq DNA polymerase (Vivantis, Malaysia)

ตารางที่ 3.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Primer	Sequence (5' – 3')	Tm (C°)*	Amplicon
18S001	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGTA	66	1,800
18S13	CCT TGT TAG GAC TTC ACC TTC CTCT	72	

เครื่องมือ

- Autoclave (Tomy, Japan)
- Biological Safety Cabinet (NUAIRE, USA)
- Incubator (MEMMERT, Germany)
- NanoDrop OneC (Thermo SCIENTIFIC, USA)

- Water bath (GFL 1083, Germany)

อุปกรณ์

- Autopipette
- Tips
- จานเพาะเชื้อ
- ขวดดูแรน ขนาด 500 ml

วิธีการทดลอง

1. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงทროสโทโคไตรดิสบนอาหาร GY agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน เก็บเซลล์มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNasecure Plant Kit (Tiangen, China) นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพ โดยใช้เครื่อง NanoDrop™ OneC Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific, USA) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C

2. การเพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA ของทროสโทโคไตรดิส

เพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) และ NS8 (TCCGCAGGTTACCTACGGA) (White et al., 1990) หรือคู่ไพรเมอร์ 18S001 (AACCTGGTTGA TCCTGCCAGTA) และ 18S13 (CCTTGTTACGACTTCACCTTCCTCT) (Honda et al., 1999) โดยเตรียมสารละลายปฏิกิริยา (ปริมาตรรวม 50 µl) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังต่อไปนี้ 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM forward และ reverse primers, 2.5 Units Taq DNA polymerase (Vivantis, Malaysia) และ 50 ng DNA template นำหลอดที่ใส่สารละลายปฏิกิริยาไปใส่ในเครื่อง Thermocycler (Biometra™, Germany) และดำเนินปฏิกิริยาดังนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย Denaturation 94 °C 1 นาที, Annealing 55 °C 45 วินาที Extension 72 °C 2 นาที 10 วินาที จำนวน 35 รอบ และสุดท้ายเป็นขั้นตอน Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา แบ่งสารละลายจากปฏิกิริยา (5-10 µl) มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (1.2 % อะกาโรส, 1X TAE buffer) เพื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ เปรียบเทียบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (VC 100bp Plus DNA Ladder; Vivantis, Malaysia) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit (Omega, USA)

3. การอ่านและวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ส่งไปอ่านข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย โดยใช้คู่ไพรเมอร์ชุดเดียวกับที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน เพื่อเป็นไพรเมอร์สำหรับการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว

นำข้อมูลดังกล่าวมาตรวจสอบความถูกต้องเบื้องต้นของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank บน NCBI (National Center for Biotechnology Information) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากการอ่านด้วยไพรมอร์แต่ละเส้นมาสร้าง Contig เพื่อเชื่อมต่อข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม BioEdit นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เชื่อมต่อแล้วไป BLAST เปรียบเทียบข้อมูลกับข้อมูลในฐาน GenBank เพื่อระบุแทกซอนของทรอสโทโคตริดส์ที่ศึกษา โดยใช้ระดับความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ระดับ 95 % และ 99 % ในการระบุแทกซอนระดับจีโนสและสปีชีส์ ตามลำดับ

ตอนที่ 4 ชีวมวลและการผลิตกรดไขมันของทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้

ป่าชายเลน

ทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกได้จากการทดสอบการเจริญเบื้องต้น นำไปวิเคราะห์ผลผลิตชีวมวล โดยจะเลือกสปีชีส์ที่ต่างกันจากตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนที่ต่างชนิดกัน

1. นำทรอสโทโคตริดส์ไอโซเลทที่คัดเลือกแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว GY ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน
2. เก็บเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเซลล์ตกตะกอนเทส่วนใสที่อยู่ด้านบนออก
3. ล้างด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงในหลอดพลาสติกตัวอย่าง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนออก
4. นำตัวอย่างที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) จากนั้นชั่งน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง เพื่อนำไปวิเคราะห์กรดไขมันต่อไป

การวิเคราะห์กรดไขมัน (ดัดแปลงจาก Shimizu et al., 1988)

1. ชั่งตัวอย่างเซลล์แห้งของทรอสโทโคตริดส์ประมาณ 0.1 - 0.2 กรัม น้ำหนักแห้ง ใส่ในขวดปากเกลียวที่มีฝาปิดขนาด 25 x 95 มิลลิเมตร
2. เติม 2% v/v ซัลฟิวริก (sulfuric acid; H₂SO₄) ในเมทานอล ปริมาตร 6 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Internal standard 200 ไมโครลิตร ผ่านด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อไล่อากาศ นำไปต้ม อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3. นำตัวอย่างมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็น เติมเฮกเซน (ที่มี 10 ppm BHT) ปริมาตร 3 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งให้แยกชั้น ดูดของเหลวที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดทดลองกรองผ่านโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate; Na_2SO_4) เพื่อดูดความชื้นออก

4. เติมเฮกเซน (ที่มี 10 ppm BHT) 3 มิลลิลิตร ทำซ้ำ (ข้อ 3) เป็นจำนวน 4 ครั้ง

5. นำตัวอย่างใส่ในขวดปากเกลียวที่มีฝาปิดและผ่านด้วยแก๊สไนโตรเจนจนแห้ง เก็บใส่ตู้เย็น เพื่อรอการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

6. นำตัวอย่างกรดไขมัน (ข้อ 5) เติมเฮกเซน 200 ไมโครลิตร แล้วฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งมีสถานะเครื่องดังนี้

สถานะเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีใช้ Flame ionization detector เป็นเครื่องตรวจวัดสัญญาณและคอลัมน์ใช้ Capillary Column Agilent J&W DB-23 (60 m x 250 μm x 0.25 μm) อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 50 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้น 2 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 14 นาที โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สพา และใช้อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียสในส่วนของ Injector และ Detector

7. เปรียบเทียบชนิดของกรดไขมันกับกรดไขมันมาตรฐาน (standard fatty acid)

บทที่ 4 ผลการศึกษา

จากการศึกษาทรอสโทโคตริดส์ที่ตัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนที่ร่วนหล่นบริเวณป่าชายเลนจังหวัดจันทบุรีทั้ง 3 สถานี ได้แก่ สถานีที่ 1 แหลมแม่เหล็ก ตำบลช้างข้าม สถานีที่ 2 ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน และสถานีที่ 3 สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) ได้ผลการศึกษาดังนี้

1. ชนิดของพันธุ์ไม้ป่าชายเลน

จากการสำรวจพันธุ์ไม้ป่าชายเลน พบพันธุ์ไม้ทั้งสิ้น 15 ชนิด โดยในแต่ละบริเวณมีชนิดพันธุ์ไม้ป่าชายเลนที่แตกต่างกัน โดยสถานีที่ 1 เก็บตัวอย่างจำนวน 4 ชนิด สถานีที่ 2 เก็บตัวอย่างจำนวน 12 ชนิด และสถานีที่ 3 เก็บตัวอย่างจำนวน 11 ชนิด ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 พันธุ์ไม้ป่าชายเลนที่นำมาตัดแยกทรอสโทโคตริดส์ จังหวัดจันทบุรี

พันธุ์ไม้ป่าชายเลน (ชื่อวิทยาศาสตร์, อักษรย่อ)	สถานีที่ 1	สถานีที่ 2	สถานีที่ 3
1. โกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i> , RA)	×	×	×
2. โกงกางใบใหญ่ (<i>Rhizophora mucronata</i> , RM)		×	×
3. ตะบูนดำ (<i>Xylocarpus moluccensis</i> , XM)			×
4. ปอทะเล (<i>Hibiscus tiliaceus</i> , HT)		×	×
5. ประดู่ทะเล (<i>Acrostichum aureum</i> , Aca)			×
6. โปรงแดง (<i>Ceriops tagal</i> , CT)		×	×
7. ฝาดดอกขาว (<i>Lumnitzera racemosa</i> , LR)		×	×
8. ฝาดดอกแดง (<i>Lumnitzera littorea</i> , LL)		×	×
9. พังกาหัวสุมดอกขาว (<i>Bruguiera gymnorrhiza</i> , BG)		×	×
10. พังกาหัวสุมดอกแดง (<i>Bruguiera sexangula</i> , BS)		×	×
11. โปทะเล (<i>Thespesia populnea</i> , TP)	×		
12. ลำพูทะเล (<i>Sonneratia alba</i> J., SA)	×	×	
13. ลำแพน (<i>Sonneratia ovate</i> , SO)		×	
14. แสมขาว (<i>Avicennia alba</i> , AA)	×	×	×
15. แสมทะเล (<i>Avicennia marina</i> , AM)		×	

หมายเหตุ สถานีที่ 1 แหลมแม่เหล็ก ตำบลช้างข้าม จังหวัดจันทบุรี
สถานีที่ 2 ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี
สถานีที่ 3 สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) จังหวัดจันทบุรี

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในบริเวณที่เก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน พบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในฤดูฝนและฤดูแล้งมีค่าอยู่ในช่วง 1.18-6.54 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสถานีที่ 3 ทั้งสองฤดูมีค่าใกล้เคียงกัน ในสถานีที่ 2 ฤดูแล้งมีค่าต่ำที่สุดและสถานีที่ 1 ฤดูแล้งมีค่าสูงที่สุด ค่าความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิน้ำทั้ง 3 สถานีมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 6.36-8.51 และ 26-29.9 องศาเซลเซียสตามลำดับ ส่วนความเค็มทั้งสองฤดูมีค่าอยู่ในช่วง 3.9-35 ส่วนในพันส่วน (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมในบริเวณเก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน

ปัจจัยสิ่งแวดล้อม	สถานีที่ 1		สถานีที่ 2		สถานีที่ 3	
	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง	ฤดูฝน	ฤดูแล้ง
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (mg/L)	4.34	6.54	5.27	1.18	5.57	5.53
ความเป็นกรด-เบส	7.38	8.51	7.40	6.36	7.23	7.28
อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)	26	28.3	28	27.8	28.8	29.9
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	14	30	23	35	35	3.9

หมายเหตุ สถานีที่ 1 แหลมแม่เหล็กแก้ว ตำบลช้างข้าม จังหวัดจันทบุรี
 สถานีที่ 2 ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี
 สถานีที่ 3 สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) จังหวัดจันทบุรี

ตอนที่ 1 การคัดแยกและจำแนกเชื้อทรอสโทโคตริคัสจากใบไม้ป่าชายเลนด้วยลักษณะ

ทางสัณฐานวิทยา

1. ความหลากหลายและความชุกชุมของทรอสโทโคตริคัสที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี

จากการศึกษาความหลากหลายของทรอสโทโคตริคัสที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนทุกชนิดพบว่าสถานีที่ 1 ฤดูฝนมีจำนวนใบที่พบอยู่ในช่วง 75-100 เพอร์เซ็นต์ และฤดูแล้งมีจำนวนใบที่พบ 100 เพอร์เซ็นต์ สถานีที่ 2 ฤดูฝนจำนวนใบที่พบอยู่ในช่วง 35-95 เพอร์เซ็นต์ และฤดูแล้งมีจำนวนใบที่พบอยู่ในช่วง 65-100 เพอร์เซ็นต์ ส่วนสถานีที่ 3 ฤดูฝนจำนวนใบที่พบอยู่ในช่วง 30-80 เพอร์เซ็นต์ และฤดูแล้งมีจำนวนใบที่พบอยู่ในช่วง 30-100 เพอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนฤดูแล้งมีการพบทรอสโทโคตริคัสสูงกว่าฤดูฝน (ตารางที่ 4.3)

เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยพบว่าสถานีที่ 1 พบทรอสโทโคตริคัสสูงกว่าสถานีอื่น อาจเนื่องมาจากพื้นที่บริเวณเก็บตัวอย่างสถานีที่ 1 มีน้ำขังทำให้บริเวณนั้นมีความชื้นและมีธาตุอาหารอยู่มากเมื่อเปรียบเทียบกับสถานีที่ 2 และสถานีที่ 3 ซึ่งมีระดับน้ำแห้งมากในบางพื้นที่ทำให้พบทรอสโทโคตริคัสน้อยกว่าสถานีที่ 1

ตารางที่ 4.3 จำนวนใบและร้อยละการพบทรอสโทโคตริคัสที่คัดแยกได้จากพันธุ์ไม้ป่าชายเลน

สถานี	พันธุ์ไม้	ฤดูฝน		ฤดูแล้ง		เปอร์เซ็นต์ การพบ เฉลี่ย
		จำนวนใบ ที่พบ	เปอร์เซ็นต์ การพบ	จำนวนใบ ที่พบ	เปอร์เซ็นต์ การพบ	
สถานีที่ 1	โกกงางใบเล็ก	15	75	20	100	87.5
	โพทะเล	20	100	20	100	100
	ลำพูทะเล	16	80	20	100	90
	แสมขาว	17	85	20	100	92.5
สถานีที่ 2	โกกงางใบเล็ก	8	40	20	100	70
	โกกงางใบใหญ่	13	65	16	80	72.5
	ปอทะเล	7	35	13	65	50
	โปรงแดง	16	80	14	70	75
	ฝาดดอกขาว	9	45	18	90	67.5
	ฝาดดอกแดง	17	85	16	80	82.5
	พังกาหัวส้มดอกขาว	19	95	14	70	82.5
	พังกาหัวส้มดอกแดง	17	85	19	95	90
	ลำพูทะเล	15	75	20	100	87.5
	ลำแพน	12	60	15	75	77.5
	แสมขาว	19	95	16	80	87.5
	แสมทะเล	16	80	19	95	87.5
	สถานีที่ 3	โกกงางใบเล็ก	14	70	19	95
โกกงางใบใหญ่		10	50	9	45	47.5
ตะบูนดำ		12	60	20	100	80
ปอทะเล		6	30	19	95	62.5
ปรงทะเล		15	75	6	30	52.5
โปรงแดง		8	40	13	65	52.5
ฝาดดอกขาว		8	40	19	95	67.5
ฝาดดอกแดง		10	50	20	100	75
พังกาหัวส้มดอกขาว		6	30	9	45	37.5
พังกาหัวส้มดอกแดง		14	70	20	100	85
แสมขาว		16	80	19	95	87.5

หมายเหตุ สถานีที่ 1 แหลมแม่เหล็กแก้ว ตำบลช้างข้าม จังหวัดจันทบุรี
 สถานีที่ 2 ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี
 สถานีที่ 3 สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) จังหวัดจันทบุรี

2. การจัดจำแนกชนิดทอรัสโทโคตริดส์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทอรัสโทโคตริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน 3 สถานี ได้แก่ สถานีที่ 1 แหลมแม่น้ำแก้ว ตำบลช้างข้าม จังหวัดจันทบุรี สถานีที่ 2 ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี และ สถานีที่ 3 สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) จังหวัดจันทบุรี พบทอรัสโทโคตริดส์ จำนวน 1,166 ไอโซเลท ซึ่งนำมาจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

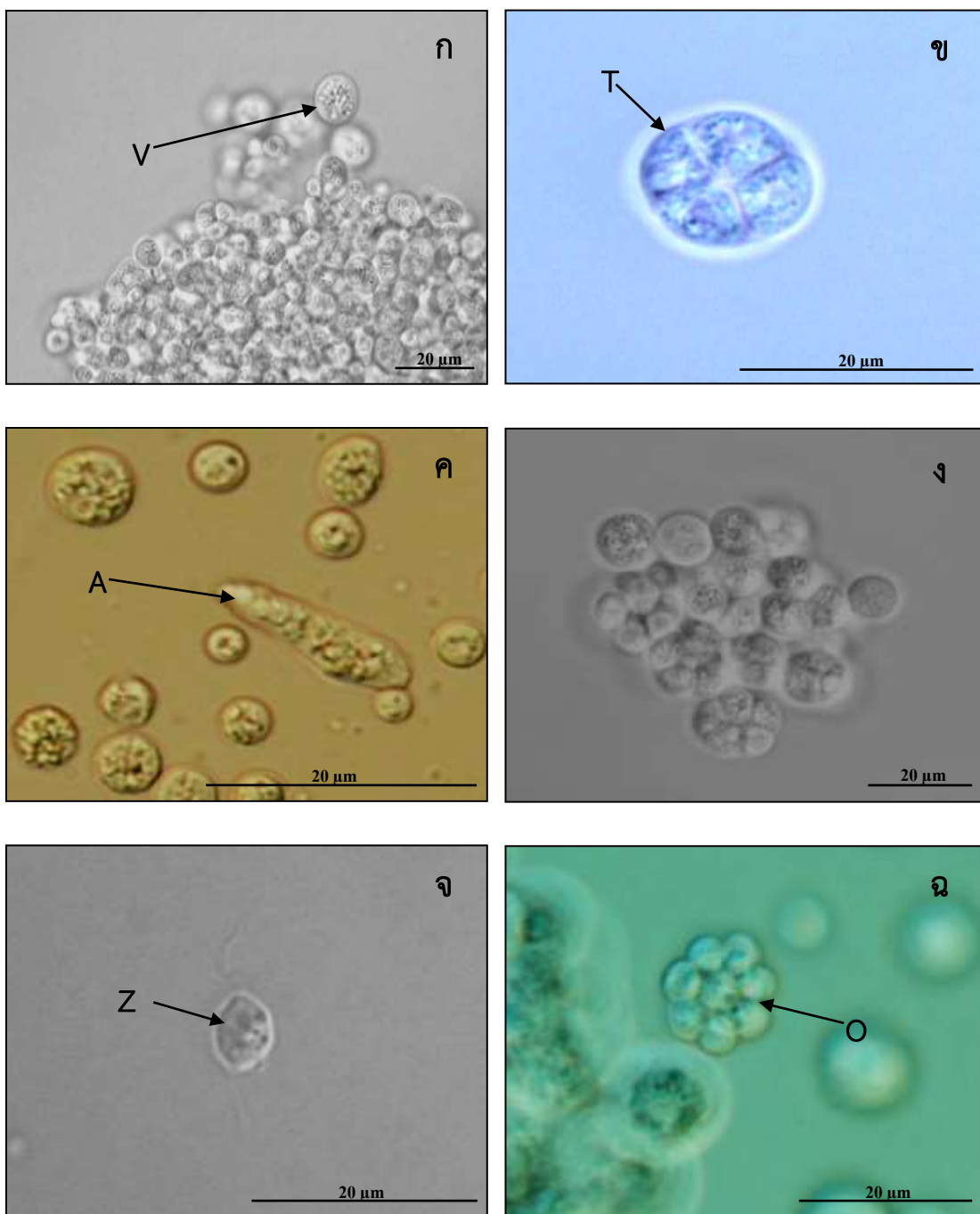
1. *Aurantiochytrium* sp. พบ 4 สปีชีส์ คือ
 - *Aurantiochytrium limacinum*
 - *Aurantiochytrium* sp.1
 - *Aurantiochytrium* sp.2
 - *Aurantiochytrium* sp.3
2. *Parietichytrium* sp. พบ 1 สปีชีส์ คือ *Parietichytrium sarkarianum*
3. *Schizochytrium* sp. พบ 1 สปีชีส์ คือ *Schizochytrium* sp.2
4. ทอรัสโทโคตริดส์ที่ไม่สามารถจัดจำแนกจิ้นส์ได้
 - Thraustochytriidae sp.8
 - Thraustochytriidae sp.9
 - Thraustochytriidae sp.10
 - Thraustochytriidae sp.11
 - Thraustochytriidae sp.12
 - Thraustochytriidae sp.13
 - Thraustochytriidae sp.14
 - Thraustochytriidae sp.15

ลักษณะสัณฐานวิทยาและวงชีวิตของทอรัสโทโคตริดส์ แต่ละชนิดมีรายละเอียด ดังนี้

1. *Aurantiochytrium limacinum*

ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีลักษณะค่อนข้างกลม สีขาวขุ่น โคโลนีโค้งนูนเล็กน้อย ขอบโคโลนีมีการแผ่กระจายของอะมิบอยด์เซลล์ มีการคืบคลานบนอาหารแข็งออกจากขอบโคโลนี มีลักษณะแผ่เป็นบริเวณกว้าง สามารถมองเห็นได้ชัดเจนเมื่อโคโลนีมีอายุตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป (ตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว GY พบว่า เมื่อระยะเวลา 4 วัน มีการลอยตัวของเซลล์เป็นคราบหนา สีครีมบริเวณผิวหน้าของอาหารเหลว เซลล์มีการแบ่ง binary division มีการเกาะกลุ่มบ้าง ส่วนใหญ่เซลล์มีการกระจาย เซลล์กลม มีขนาด 5-25 ไมโครเมตร ผลิตซูโอสปอร์ 8-32 ซูโอสปอร์ ซูโอสปอร์ มีรูปร่างรี (ภาพที่ 4.1 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



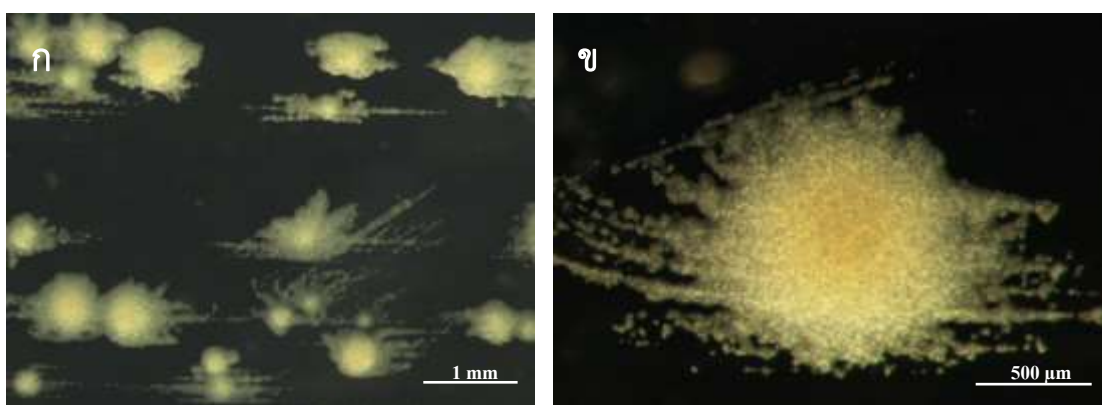
ภาพที่ 4.1 ลักษณะเซลล์ของ *A. limacinum* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY ป่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน

(A) Amoeboid cell (T) Tetrad (O) Ooctrad (V) Vegetative cell
(Z) Zoospore

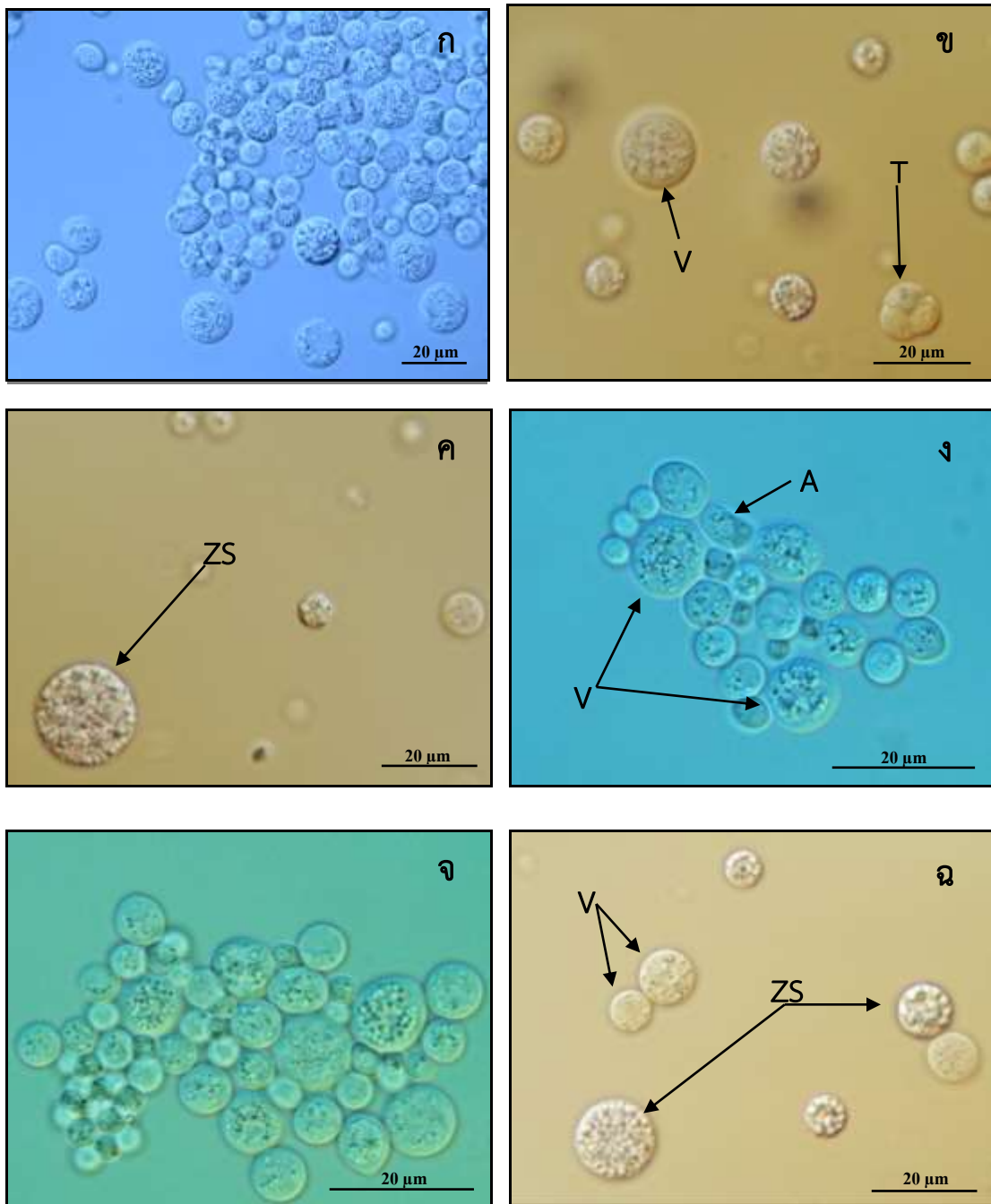
2. *Aurantiochytrium* sp.1

ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีสีครีมทึบแสง เนื้อโคโลนีคล้ายเนยเหลว โคโลนีแบนราบติดกับอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าโคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน พบอะมิบอยด์เซลล์เจริญแผ่ออกไปตามแนวซิดและกระจายเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 4.2 และตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อเลี้ยงอาหารเหลว GY พบว่าเซลล์มีการกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ มีเกาะกลุ่มเล็กน้อย vegetative cell มีรูปร่างกลม ขนาด 5-12.5 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 400 เท่า) ผนังเซลล์บาง ภายในเซลล์พบเกล็ดเล็ก ๆ กระจาย จากนั้นเกล็ดมีขนาดใหญ่ขึ้นจนเต็มเซลล์ และพัฒนาเป็นซูโอสปอร์แรงเจียม มีการแบ่งเซลล์แบบ binary division พบอะมิบอยด์เซลล์ (ภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



ภาพที่ 4.2 (ก) ลักษณะโคโลนีของ *Aurantiochytrium* sp.1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน
(ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี *Aurantiochytrium* sp.1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน



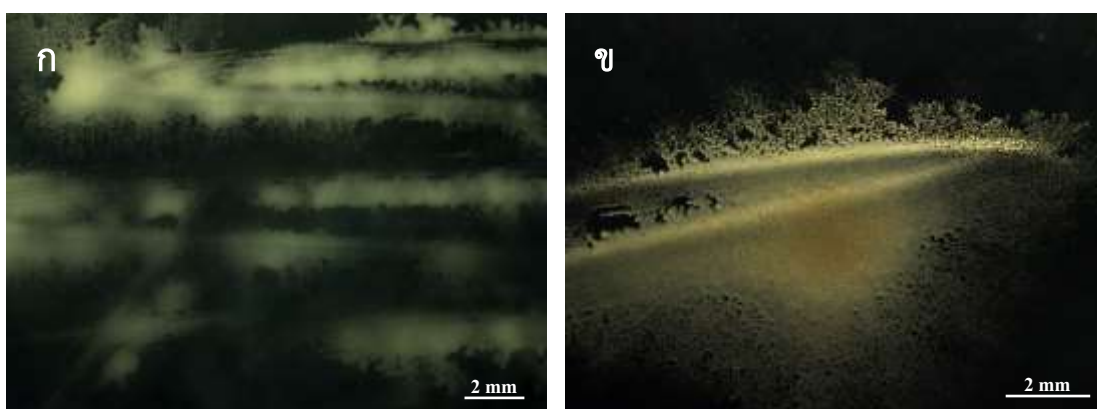
ภาพที่ 4.3 ลักษณะเซลล์ของ *Aurantiochytrium* sp.1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน

(A) Amoeboid cell (T) Tetard (V) Vegetative (ZS) Zoosporangium

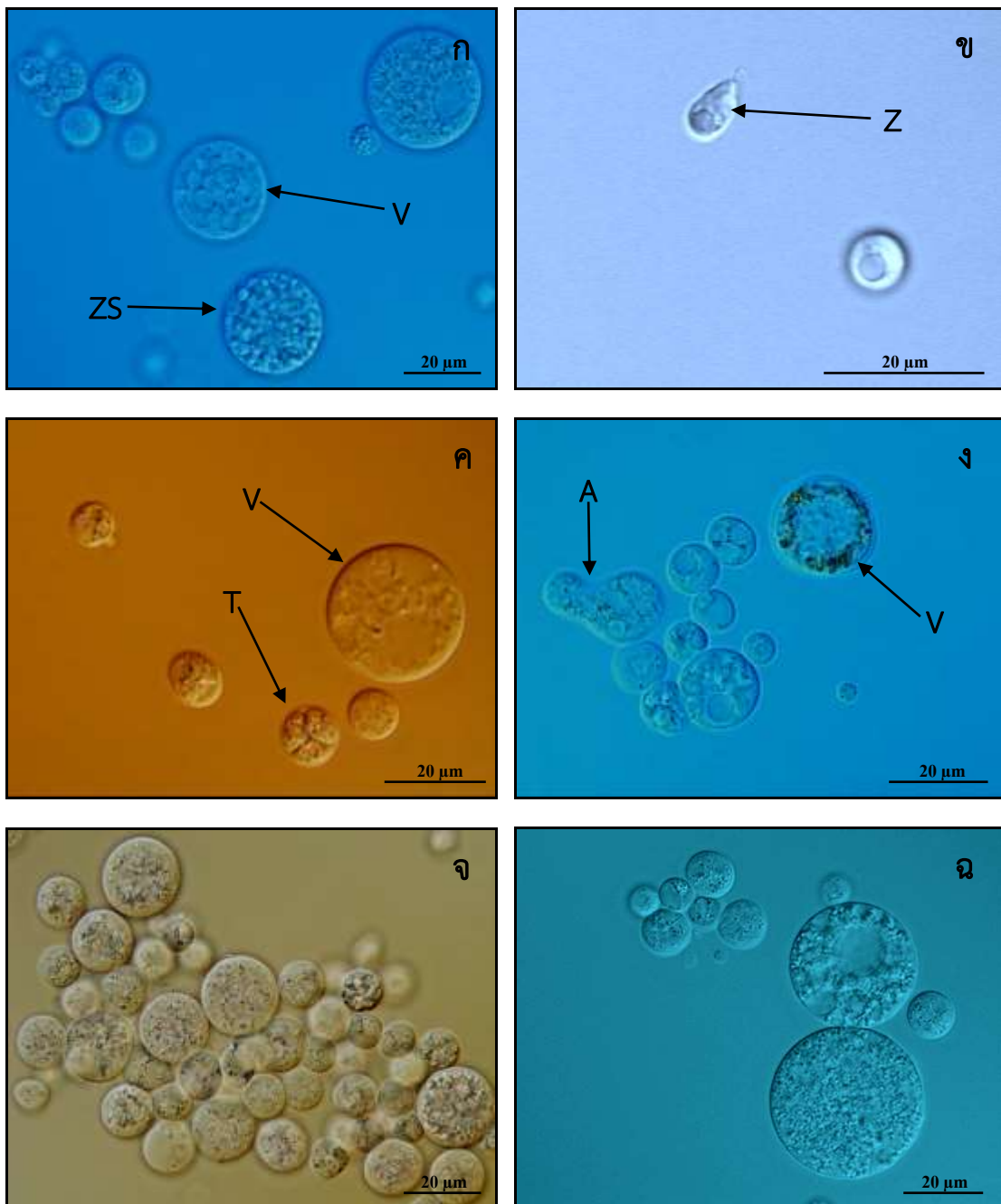
3. *Aurantiochytrium* sp.2

ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีสีครีมโปร่งแสง เนื้อโคโลนีคล้ายเนยเหลว โคโลนีบนราบติดผิวหน้าอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าโคโลนีมีรูปร่างไม่แน่นอน อะมิบอยด์เซลล์คืบคลานออกจากขอบโคโลนีแผ่เป็นวงกว้างจำนวนมากและเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 4.4 และตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อเลี้ยงอาหารเหลว GY พบว่าเซลล์มีการกระจายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ vegetative cell มีรูปร่างกลม ขนาด 7.5-15 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 400 เท่า) ผนังเซลล์บาง พบเกล็ดเล็ก ๆ กระจายอยู่ภายในเซลล์ จากนั้นเกล็ดมีขนาดใหญ่ขึ้นจนเต็มเซลล์และพัฒนาเป็นซูโอสปอร์แรงเจียม มีการแบ่งเซลล์แบบ binary division และพบอะมิบอยด์เซลล์ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4.5 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



ภาพที่ 4.4 (ก) ลักษณะโคโลนีของ *Aurantiochytrium* sp.2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน
(ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี *Aurantiochytrium* sp.2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

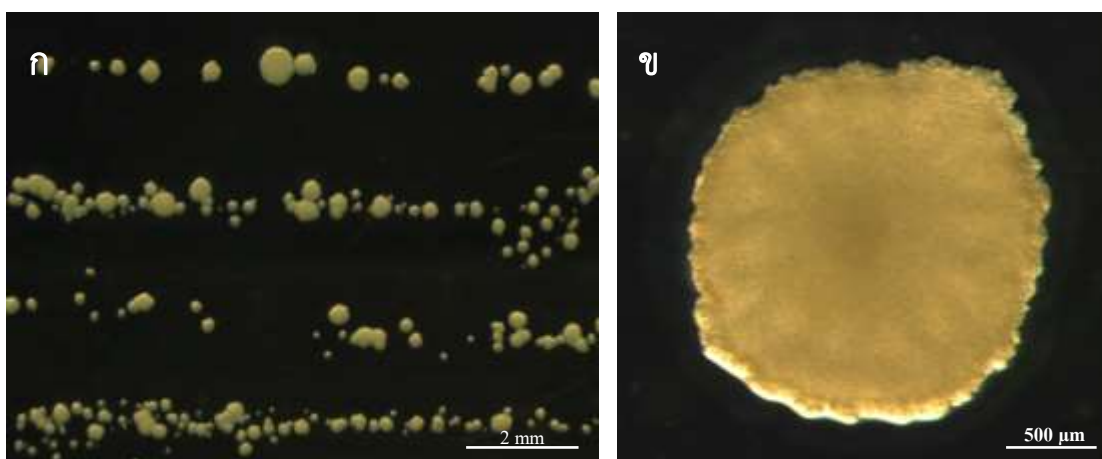


ภาพที่ 4.5 ลักษณะเซลล์ของ Thraustochytridae11 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน
 (A) Amoeboid cell (T) Tetard (V) Vegetative (Z) Zoospore
 (ZS) Zoosporangium

4. *Aurantiochytrium* sp.3

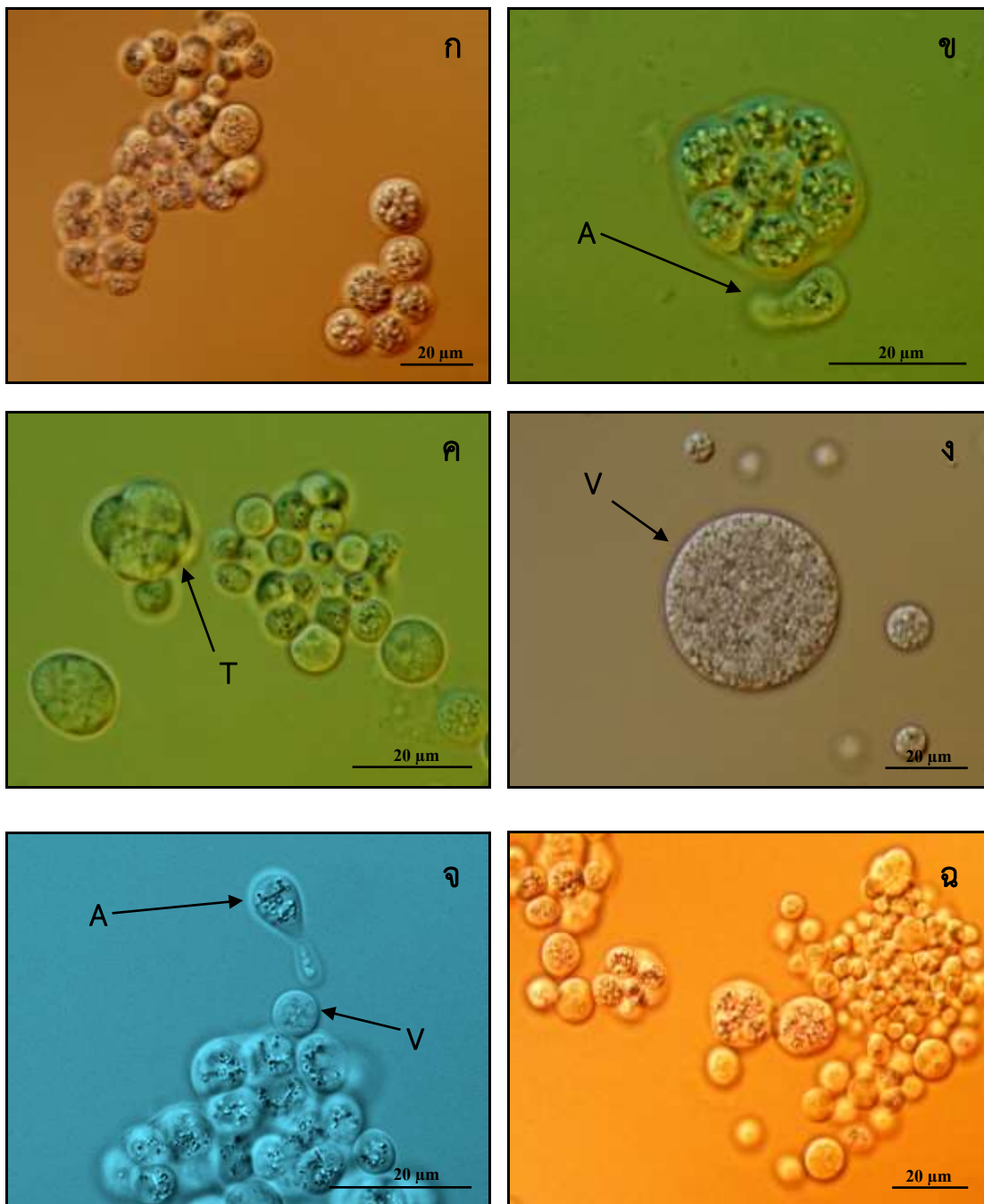
ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีสีครีมทึบแสง เนื้อโคโลนีจับกันเป็นก้อนแข็งเล็กน้อย โคโลนีหนาสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าโคโลนีมีรูปร่างกลม ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย บริเวณขอบโคโลนีพบเซลล์กลมขนาดเล็ก (ภาพที่ 4.6 และตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว GY พบว่าส่วนใหญ่มีการกระจายเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ มีเกาะกลุ่มเล็กน้อย vegetative cell มีรูปร่างกลมขนาด 5-12.5 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 400 เท่า) ผนังเซลล์บาง ภายในเซลล์มีแกลทูลกระจาย จากนั้นแกลทูลมีขนาดใหญ่ขึ้นจนเต็มเซลล์ มีการแบ่งเซลล์แบบ binary division พบอะมิบอยด์เซลล์ (ภาพที่ 4.7 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



ภาพที่ 4.6 (ก) ลักษณะโคโลนีของ *Aurantiochytrium* sp.3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

(ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี *Aurantiochytrium* sp.3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน



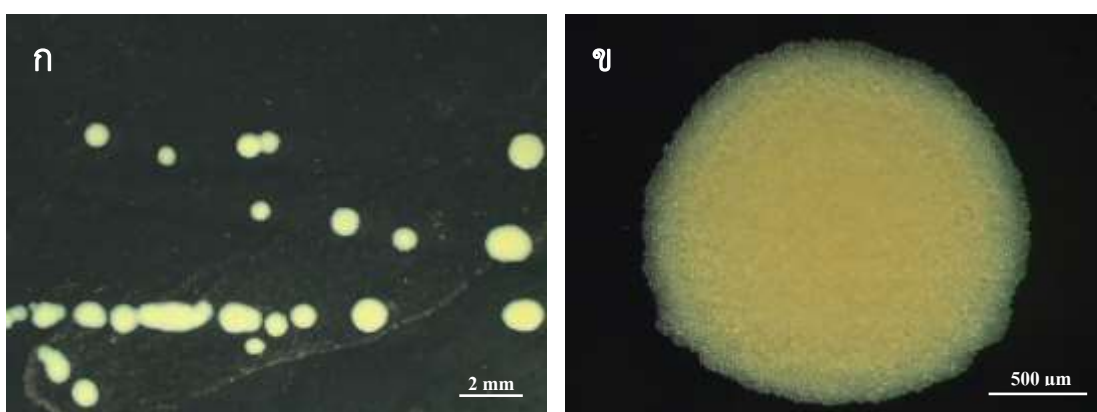
ภาพที่ 4.7 ลักษณะเซลล์ของ *Aurantiochytrium* sp.3 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 4 วัน

(A) Amoeboid cell (T) Tetard (V) Vegetative

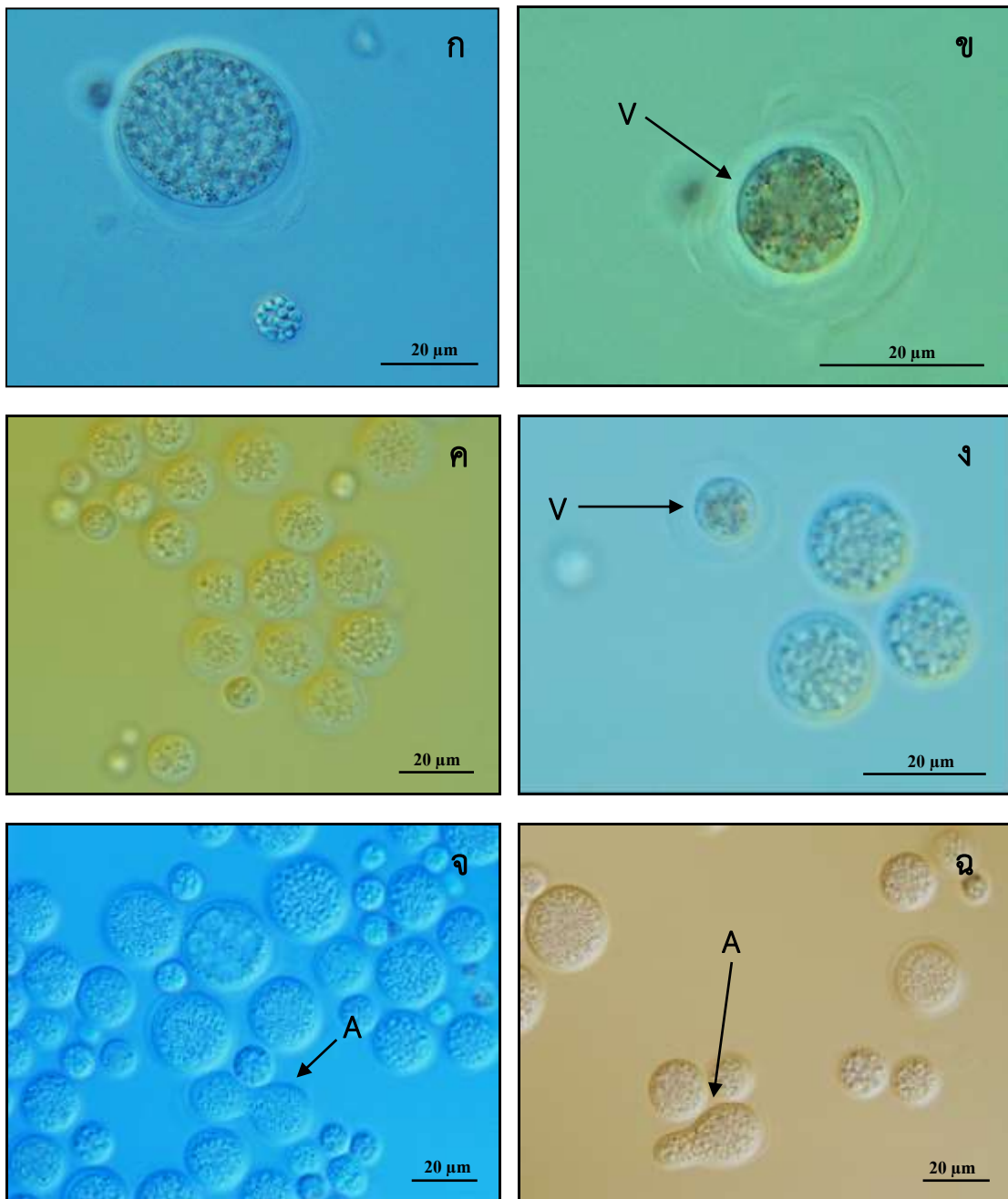
5. *Parietichytrium sarkarianum*

ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีสีครีมทึบแสง เนื้อโคโลนีคล้ายเนยเหลว โคโลนีหนา สูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าโคโลนีมีรูปร่างกลม ขอบโคโลนีเรียบ บริเวณของโคโลนีพบอะมิบอยด์เซลล์ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4.8 และตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อเลี้ยงอาหารเหลว GY พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่มีการกระจายตัว เกาะกลุ่มบ้างเล็กน้อย vegetative cell มีรูปร่างกลมขนาด 12.5-37.5 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 400 เท่า) ผนังเซลล์หนา ไม่พบการแบ่งตัวแบบ binary division ภายในเซลล์มีลักษณะเป็นแกลนูลเล็ก ๆ มองไม่ชัดเจน กระจายอยู่ภายในเซลล์จากนั้นแกลนูลภายในเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นจนเต็มเซลล์ เซลล์มีการพัฒนาเป็นซูโอสปอร์แรงเจียมโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์ไปเรื่อย ๆ พบอะมิบอยด์เซลล์เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 4.9 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



ภาพที่ 4.8 (ก) ลักษณะโคโลนีของ *Parietichytrium sarkarianum* ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน
(ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี *P. sarkarianum* ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน



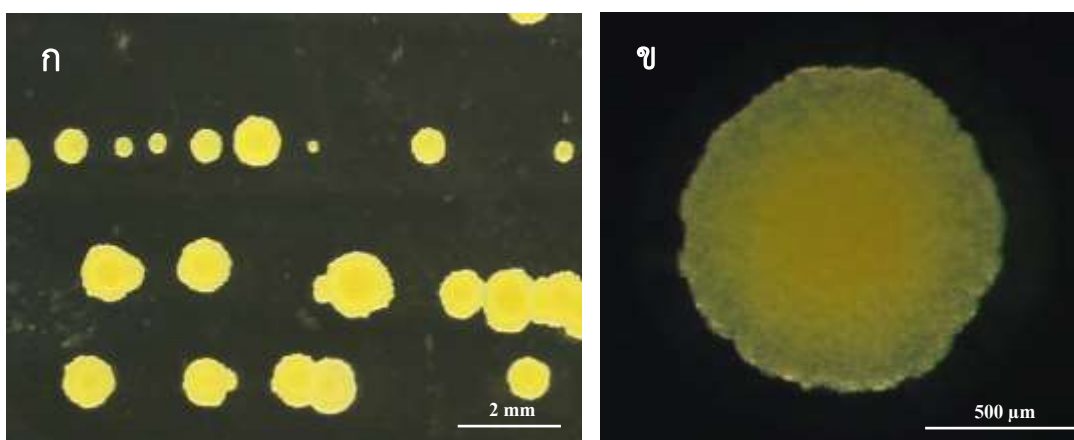
ภาพที่ 4.9 ลักษณะเซลล์ของ *P. sarkarianum* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GYป่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน

(A) Amoeboid cell (V) Vegetative Cell (ZS) Zoosporangium

6. *Schizochytrium* sp.2

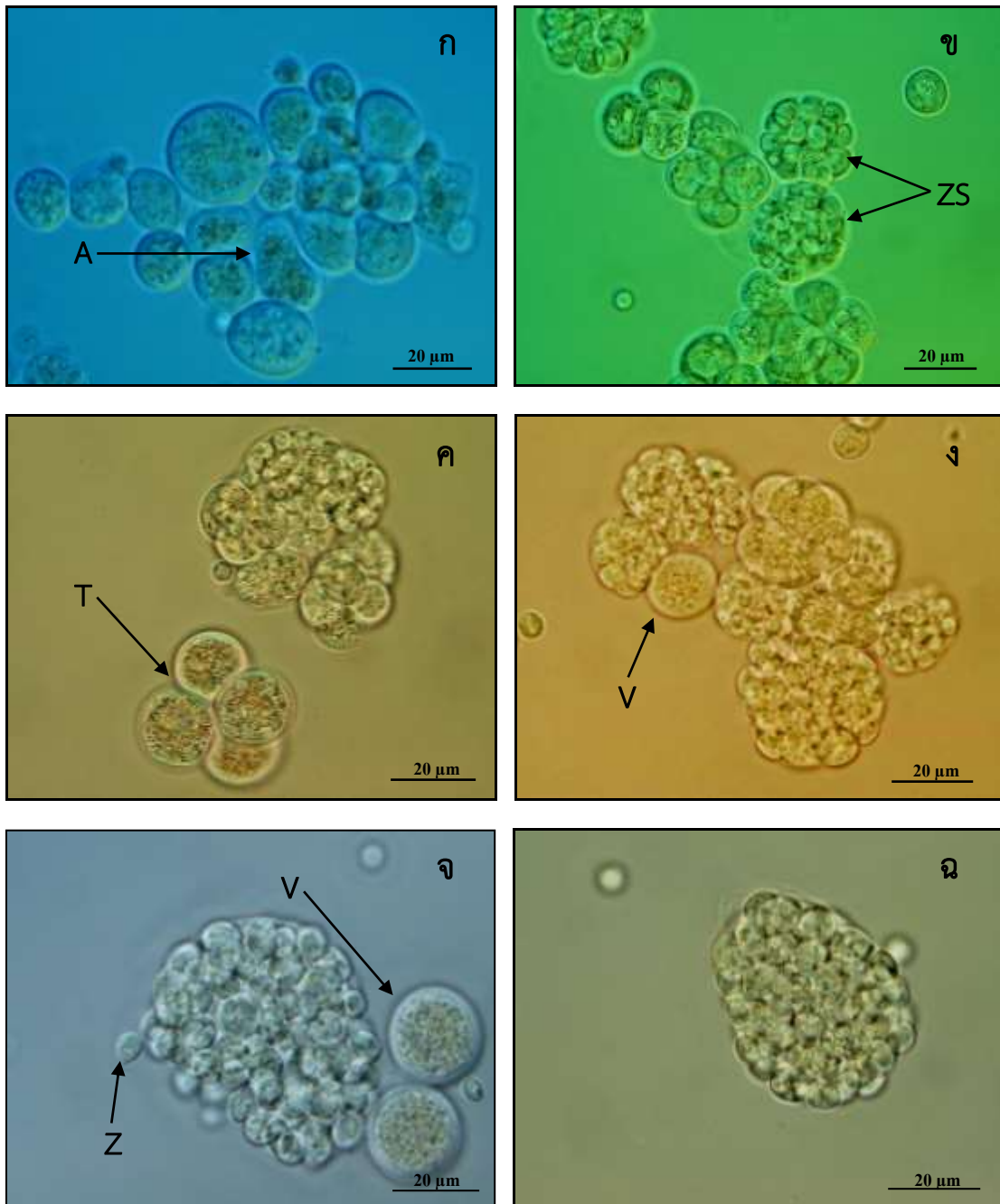
ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีสีเหลืองทึบแสง เนื้อโคโลนีเกาะกันแน่น โคโลนีบนราบติดอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าโคโลนีมีรูปร่างกลม ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย บริเวณขอบโคโลนีพบเซลล์ทับกัน (ภาพที่ 4.10 และตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อเลี้ยงอาหารเหลว GY พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่เกาะกันเป็นกลุ่มแน่น ไม่ค่อยพบเซลล์เดี่ยวๆ vegetative cell มีรูปร่างกลม ขนาด 12.5-25 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 400 เท่า) ผนังเซลล์บาง พบแกลนูลเล็ก ๆ กระจายอยู่ภายในเซลล์ จากนั้นแกลนูลมีขนาดใหญ่ขึ้นจนเต็มเซลล์ พบการแบ่งเซลล์แบบ binary division คือเซลล์จะแบ่งจาก 1 เป็น 2 ซึ่งแต่ละเซลล์จะแบ่งไปเรื่อย ๆ การปล่อยซูโอสปอร์รูปร่างรีมีการเคลื่อนที่ออกจากเซลล์แม้อย่างรวดเร็วไปในทิศทางต่าง ๆ โดยตำแหน่งที่ปล่อยซูโอสปอร์จากเซลล์แม่มีบริเวณเดียว จะปล่อยทีละ 1-2 ตัว จำนวน 1 - 50 ซูโอสปอร์ พบอะมิบอยด์เซลล์และพบเส้นใย ectoplasmic ค่อนข้างชัดเจนและพัฒนาดี (ภาพที่ 4.11 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



ภาพที่ 4.10 (ก) ลักษณะโคโลนีของ *Schizochytrium* sp.2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

(ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี *Schizochytrium* sp.2 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน



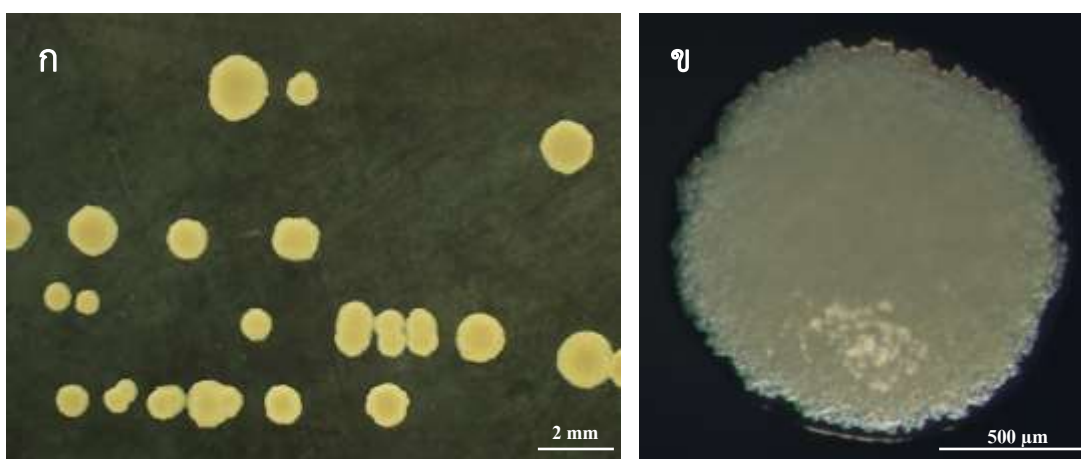
ภาพที่ 4.11 ลักษณะเซลล์ของ *Schizochytrium* sp.2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน

(A) Amoeboid cell (T) Tetard (V) Vegetative (Z) Zoospore
(ZS) Zoosporangium

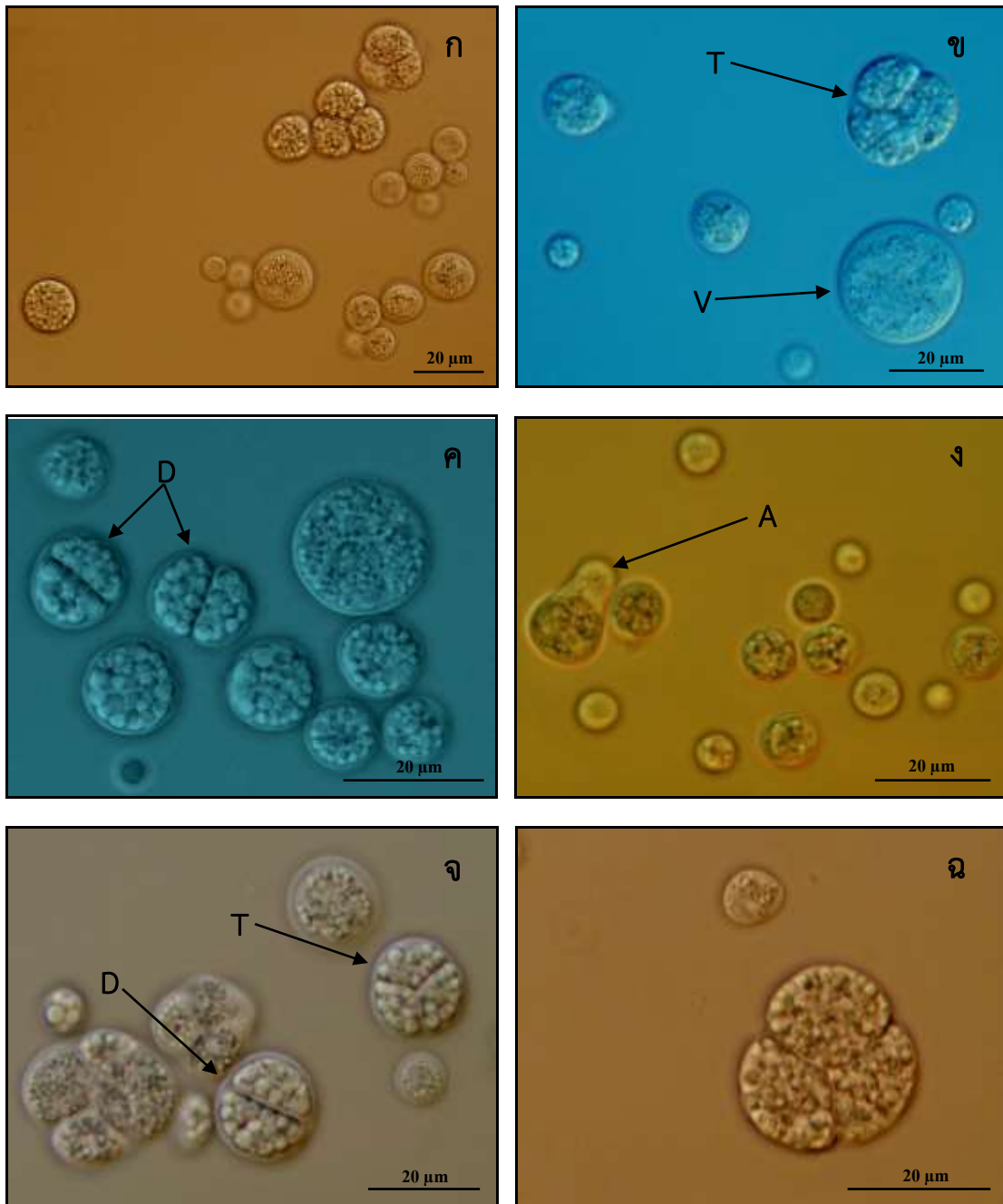
7. Thraustochytriidae sp.8

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GY มีสีครีมทึบแสง เนื้อโคโลนีคล้ายเนยเหลว โคโลนีหนาสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าโคโลนีมีรูปร่างกลม ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย บริเวณขอบโคโลนีมีลักษณะคล้ายแบ่งเซลล์ (ภาพที่ 4.12 และตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว GY พบว่าเซลล์มีการกระจายตัว มีเกาะกลุ่มบ้าง vegetative cell มีรูปร่างกลม ขนาด 7.5-17.5 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 400 เท่า) ผนังเซลล์บาง มีแกลนูลเล็ก ๆ กระจายอยู่ภายในเซลล์ จากนั้นแกลนูลมีขนาดใหญ่ขึ้นจนเต็มเซลล์และพัฒนาเป็นซูโอสปอร์แรงเจียม มีการแบ่งเซลล์แบบ binary division พบอะมิบอยด์เซลล์ จากลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่ามีความใกล้เคียงกับจีนิส *Aurantiochytrium* (ภาพที่ 4.13 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



ภาพที่ 4.12 (ก) ลักษณะโคโลนีของ Thraustochytriidae sp.8 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน
(ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี Thraustochytriidae sp.8 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน



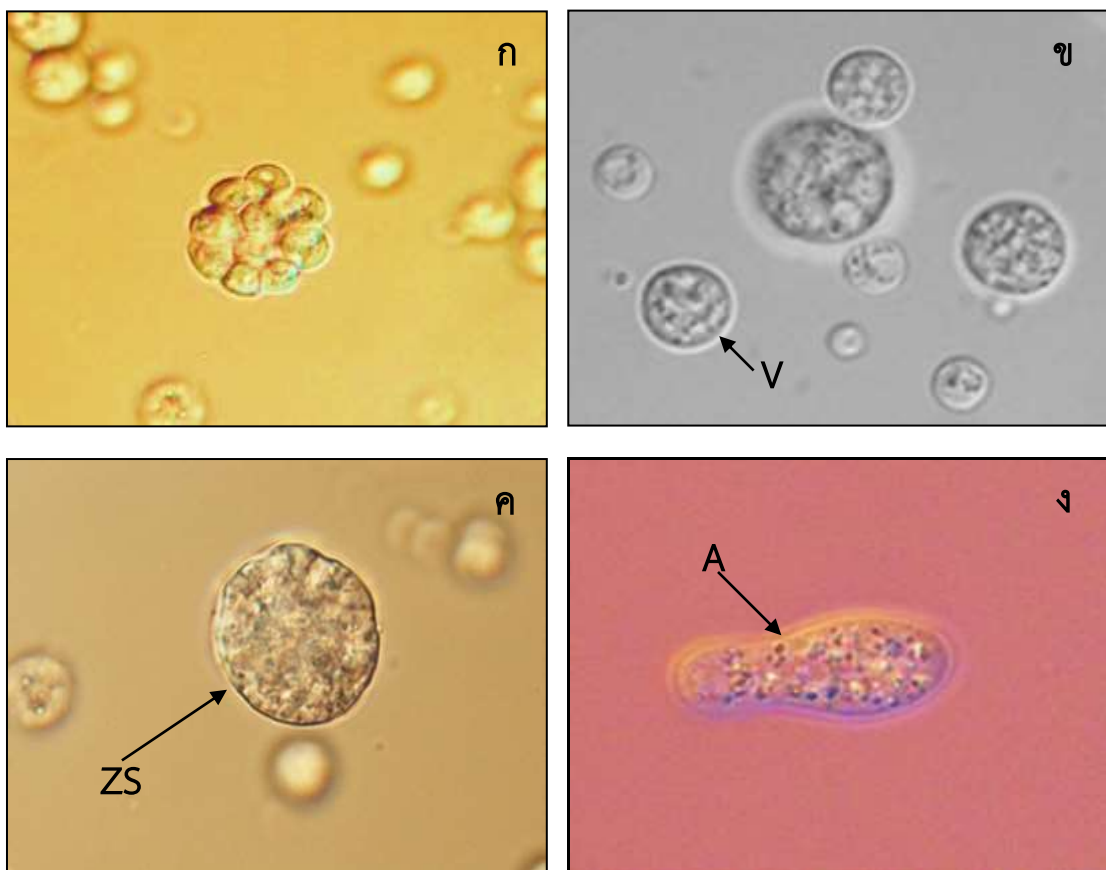
ภาพที่ 4.13 ลักษณะเซลล์ของ Thraustochytridae sp.8 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน

(A) Amoeboid cell (D) Diad (T) Tetrad (V) Vegetative

8. Thraustochytriidae sp.9

ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีสีขาวขุ่น เนื้อโคโลนีคล้ายเนยเหลว โคโลนีหนาสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าโคโลนีมีรูปร่างกลม ขอบโคโลนีโค้งเว้าเล็กน้อย (ตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว GY พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีการกระจายตัว เกาะกลุ่มบ้าง vegetative cell มีรูปร่างกลม ขนาด 5-12.5 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 400 เท่า) ไม่พบส่วนของแฟลกเจลลา ซูโอสปอร์นี้เรียกว่าอะพลาโนสปอร์ (aplanospore) ซูโอสปอร์แรงเจียมสร้างสปอร์ที่มีรูปร่างกลม เซลล์มีการแบ่งแบบ binary division มีการปล่อยซูโอสปอร์โดยขยายขนาดของสปอร์ จนผนังเซลล์แตกออก (ภาพที่ 4.14 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



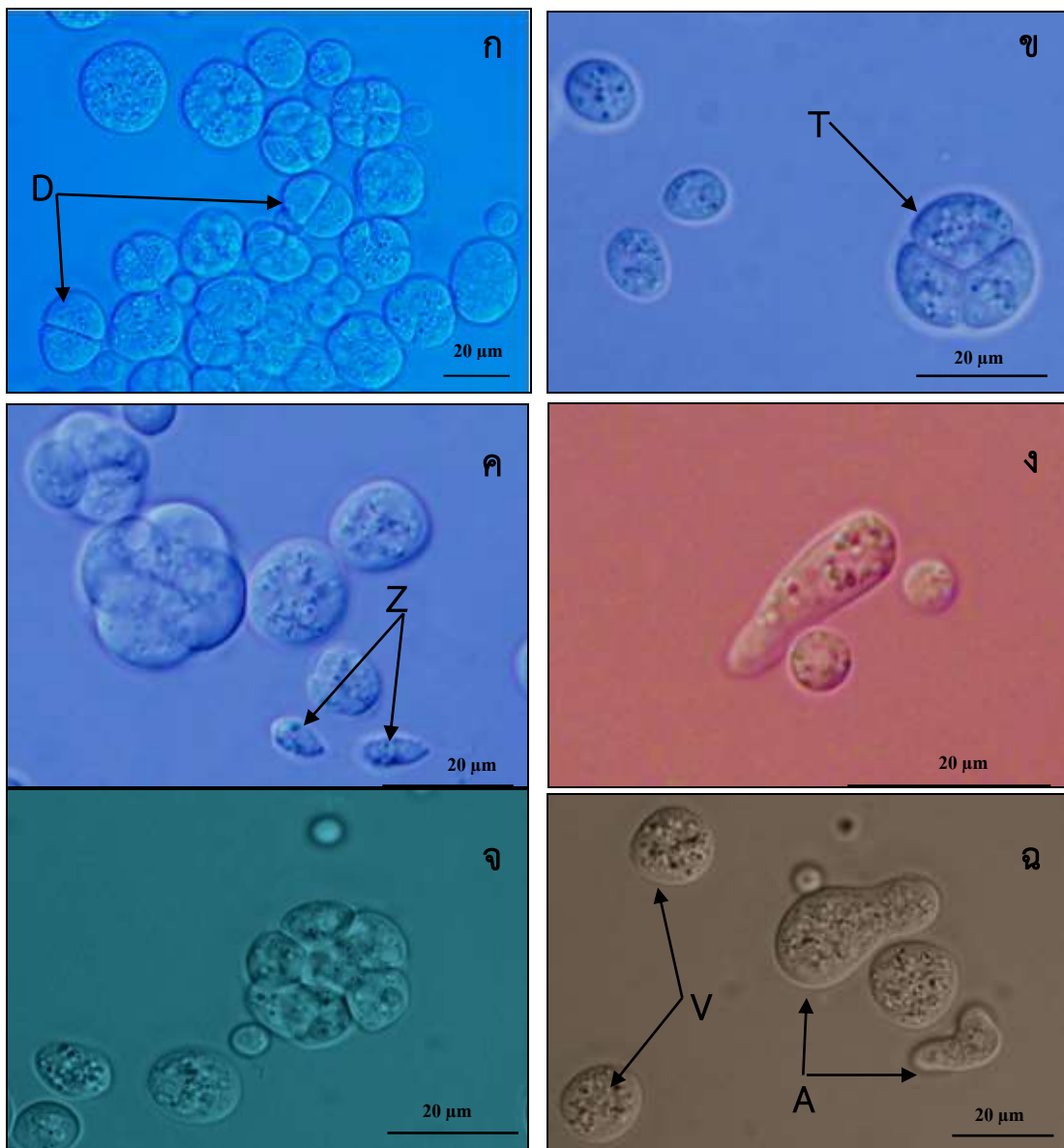
ภาพที่ 4.14 ลักษณะเซลล์ของ Thraustochytriidae sp.9 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน

(A) Amoeboid cell (V) Vegetative (ZS) Zoosporangium

9. Thraustochytriidae sp.10

ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีสีครีมทึบแสง เนื้อโคโลนีคล้ายเนยเหลว โคโลนีแบนราบติดกับอาหาร มีรูปร่างกลม ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย (ตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว GY พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่มีการกระจาย พบเกาะกลุ่มบ้าง vegetative cell มีรูปร่างกลมขนาด 5-12.5 ไมโครเมตร เซลล์แบ่งแบบ binary division ซูโอสปอร์จะถูกปล่อยจากซูโอสปอร์แรงเจียมที่จุดใดจุดหนึ่งตำแหน่งเดียว ซูโอสปอร์มีรูปร่างรี สามารถผลิตซูโอสปอร์ได้ 8-64 ซูโอสปอร์ พบอะมิบอยด์เซลล์ (ภาพที่ 4.15 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)

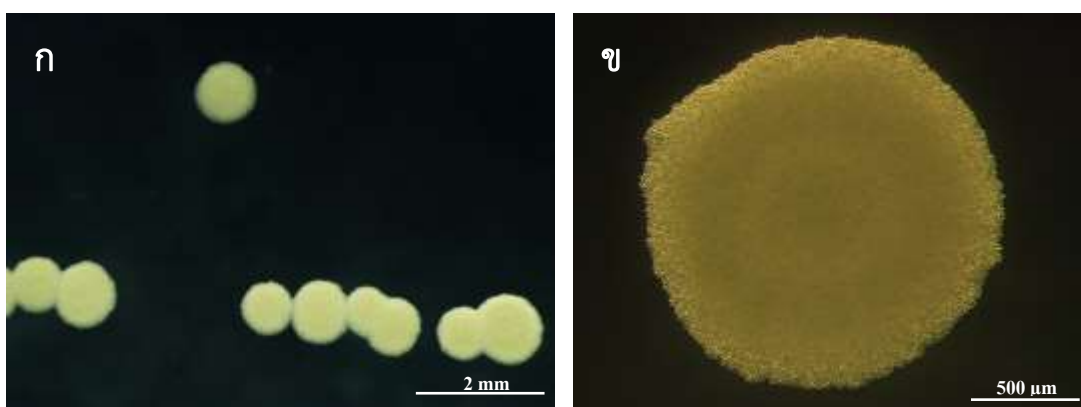


ภาพที่ 4.15 ลักษณะเซลล์ของ Thraustochytriidae sp.10 เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน (A) Amoeboid cell (D) Diad (T) Tetrad (V) Vegetative (ZS) Zoosporangium

10. Thraustochytriidae sp.11

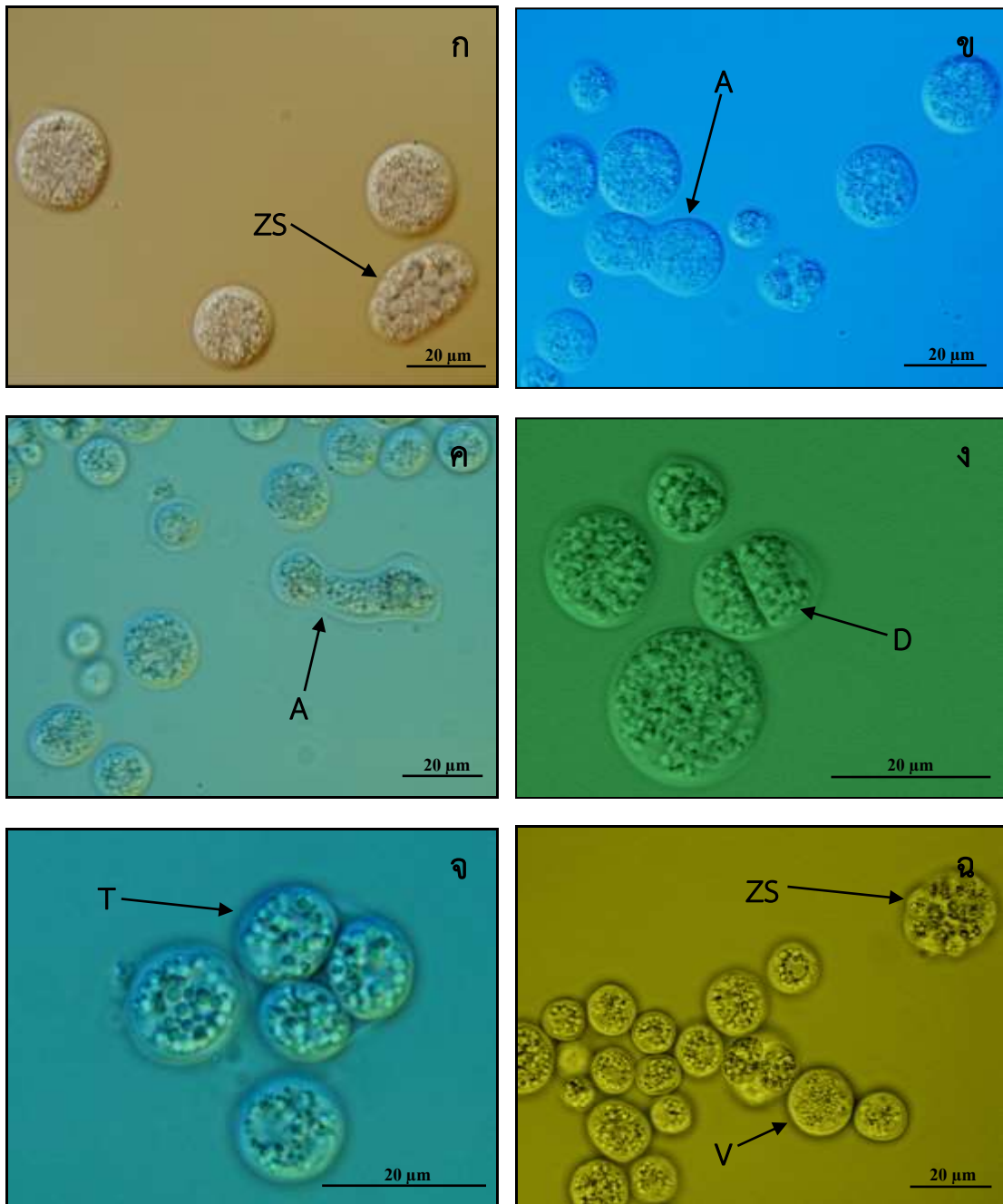
ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีสีครีมทึบแสง เนื้อโคโลนีคล้ายเนยเหลว โคโลนีบนราบติดผิวหน้าอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าโคโลนีมีรูปร่างกลม ขอบโคโลนีเรียบ บริเวณของโคโลนีพบเซลล์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ชัดเจน (ภาพที่ 4.16 และตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อเลี้ยงอาหารเหลว GY พบว่าเซลล์มีการกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ มีเกาะกลุ่มเล็กน้อย vegetative cell มีรูปร่างกลมขนาด 7.5-17.5 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 400 เท่า) ผนังเซลล์บาง พบเกล็ดขนาดเล็กกระจายภายในเซลล์ จากนั้นเกล็ดมีขนาดใหญ่ขึ้นจนเต็มเซลล์ และพัฒนาเป็นซูโอสปอร์แรงเจียม มีการแบ่งเซลล์แบบ binary division และพบอะมิบอยด์เซลล์ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4.17 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



ภาพที่ 4.16 (ก) ลักษณะโคโลนีของ Thraustochytriidae sp.11 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

(ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี Thraustochytriidae sp.11 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

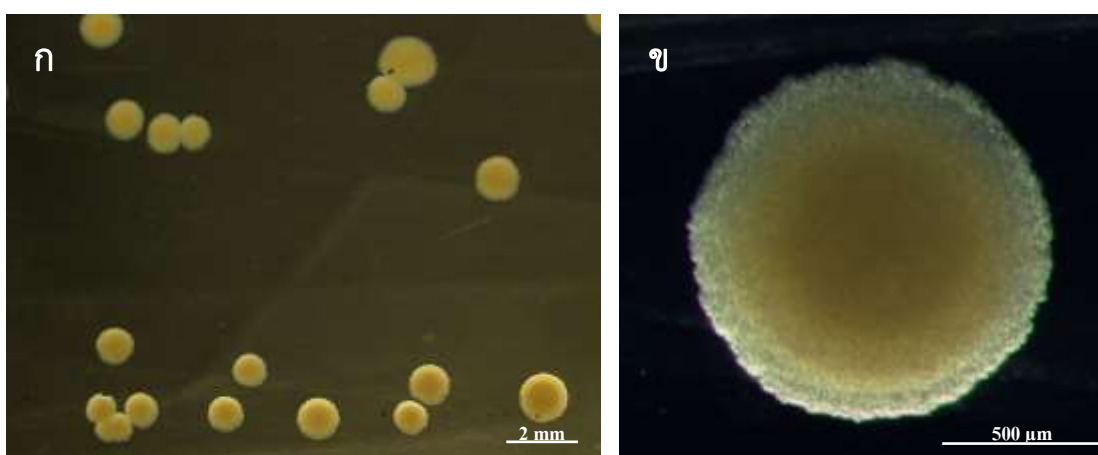


ภาพที่ 4.17 ลักษณะเซลล์ของ Thraustochytridae sp.11 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่ อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน
 (A) Amoeboid cell (D) Diad (T) Tetard (V) Vegetative
 (ZS) Zoosporangium

11. Thraustochytriidae sp.12

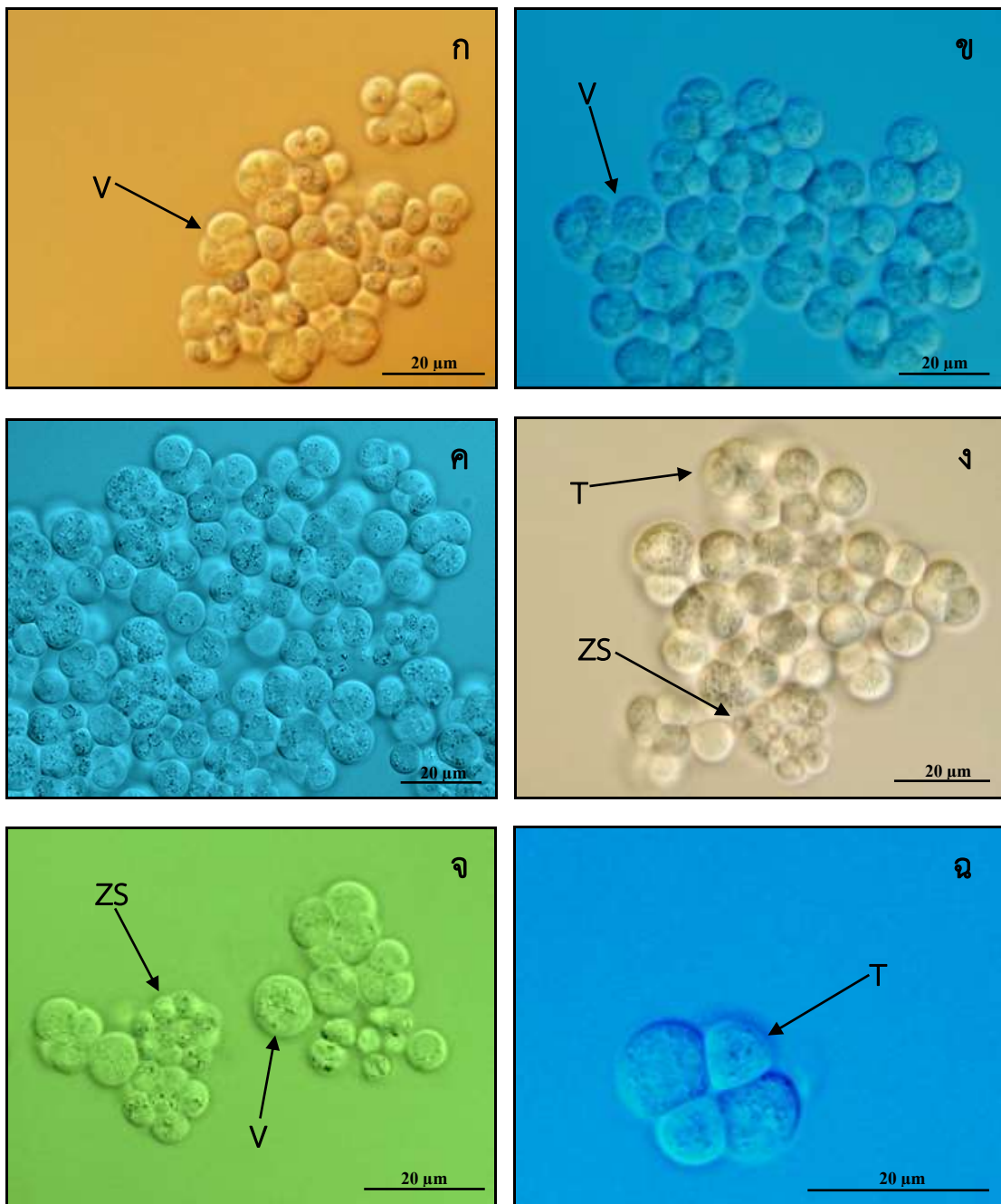
ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีสีส้มอ่อนทึบแสง เนื้อโคโลนีเกาะกันเป็นก้อน โคโลนีแบบราบติดผิวหน้าอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าโคโลนีรูปร่างกลม ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย บริเวณของโคโลนีพบเซลล์ขนาดเล็ก (ภาพที่ 4.18 และตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อเลี้ยงอาหารเหลว GY พบว่า เซลล์มีการเกาะกลุ่ม กระจายตัวบ้างเล็กน้อย vegetative cell มีรูปร่างกลม ขนาด 5-12.5 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 400 เท่า) ผนังเซลล์บาง พบแกลนูลเล็ก ๆ กระจายอยู่ภายในเซลล์ มีการแบ่งเซลล์แบบ binary division จากนั้นแกลนูลจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและเพิ่มจำนวนจนเต็มเซลล์ (ภาพที่ 4.19 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



ภาพที่ 4.18 (ก) ลักษณะโคโลนีของ Thraustochytriidae sp.12 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

(ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี Thraustochytriidae sp.12 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

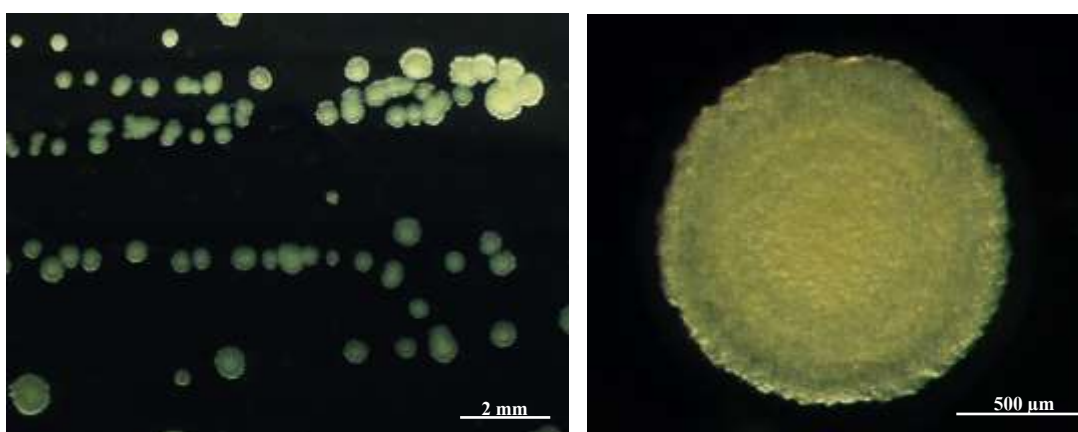


ภาพที่ 4.19 ลักษณะเซลล์ของ *Thraustochytridae* sp.12 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่ อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน
(T) Tetrad (V) Vegetative (ZS) Zoosporangium

12. Thraustochytriidae sp.13

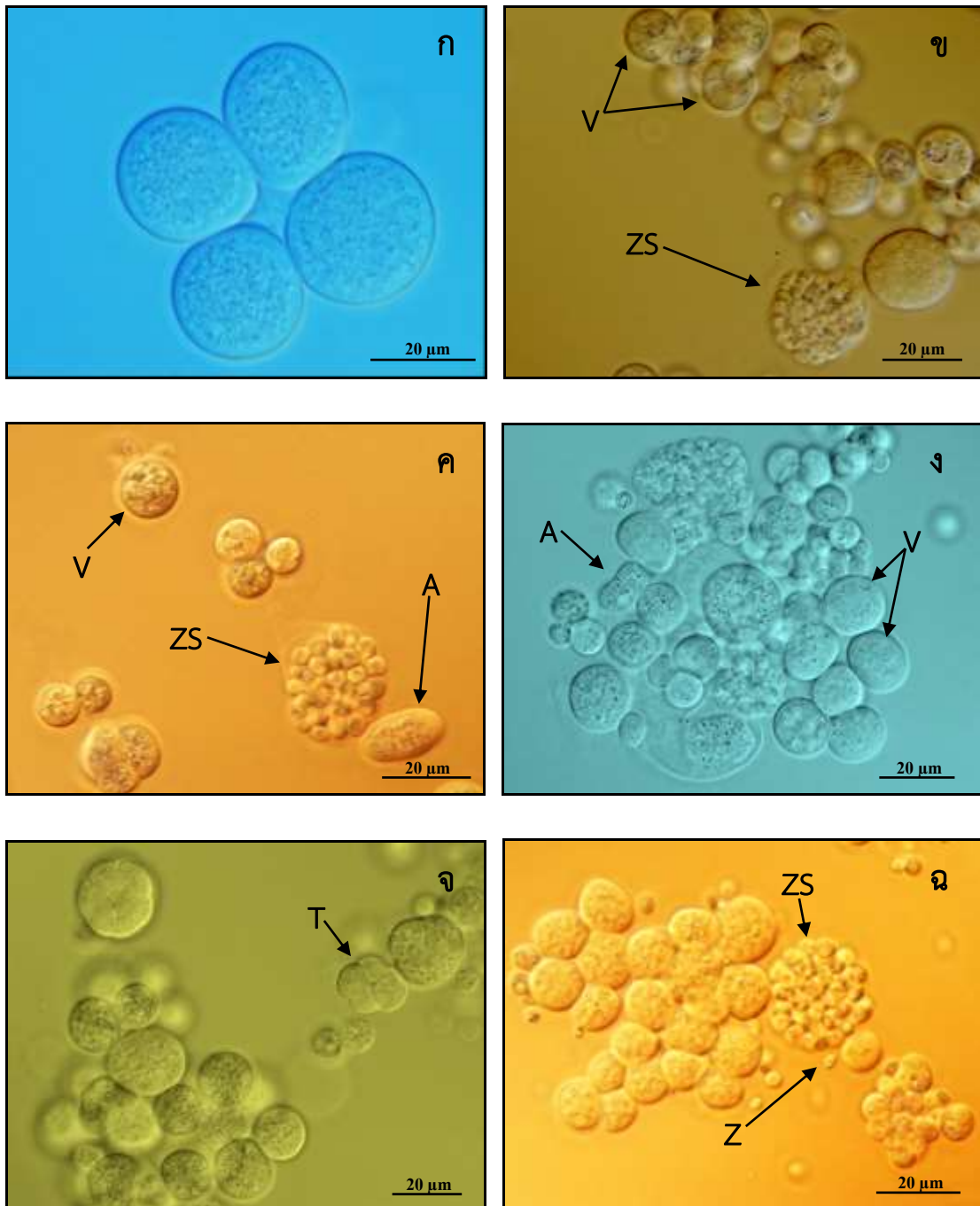
ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีสีขาวทึบแสง เนื้อโคโลนีเกาะกันแน่น โคโลนีแบนราบ ติดอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าโคโลนีมีรูปร่างกลม ขอบโคโลนีเป็นคลื่น โค้งเว้าเล็กน้อย บริเวณขอบโคโลนีพบเซลล์ทับกัน (ภาพที่ 4.20 และตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อเลี้ยงอาหารเหลว GY พบว่าลักษณะเซลล์มีการเกาะกลุ่ม vegetative cell มีรูปร่างกลม ขนาด 12.5-25 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 400 เท่า) ผนังเซลล์บาง พบแกลนูลเล็กๆ อยู่ภายในเซลล์ จากนั้นมีการแบ่งเซลล์แบบ binary division และพัฒนาเป็นซูโอสปอร์แรงเจียม พบอะมิบอยด์เซลล์ (ภาพที่ 4.21 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



ภาพที่ 4.20 (ก) ลักษณะโคโลนีของ Thraustochytriidae sp.13 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

(ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี Thraustochytriidae sp.13 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

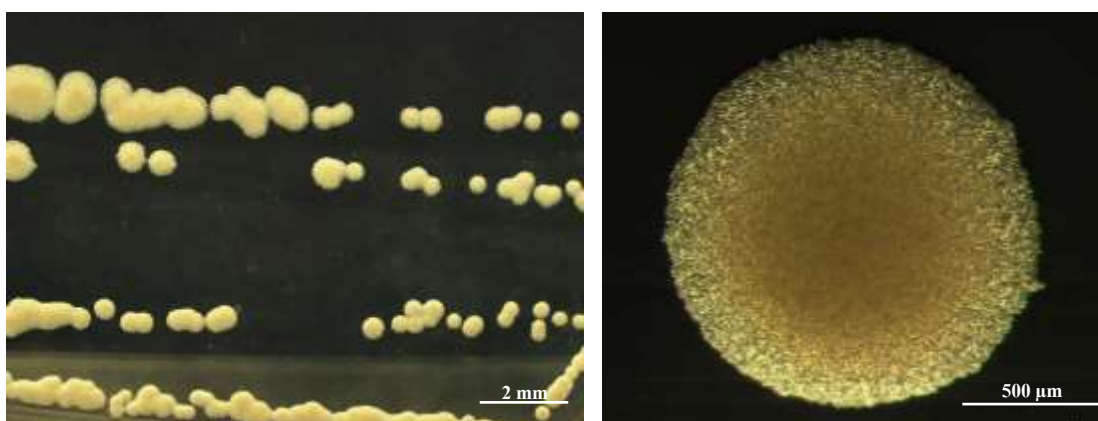


ภาพที่ 4.21 ลักษณะเซลล์ของ *Thraustochytridae* sp.13 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่ อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน
 (A) Amoeboid cell (T) Tetard (V) Vegetative cell (Z) Zoospore
 (ZS) Zoosporangium

13. Thraustochytriidae sp.14

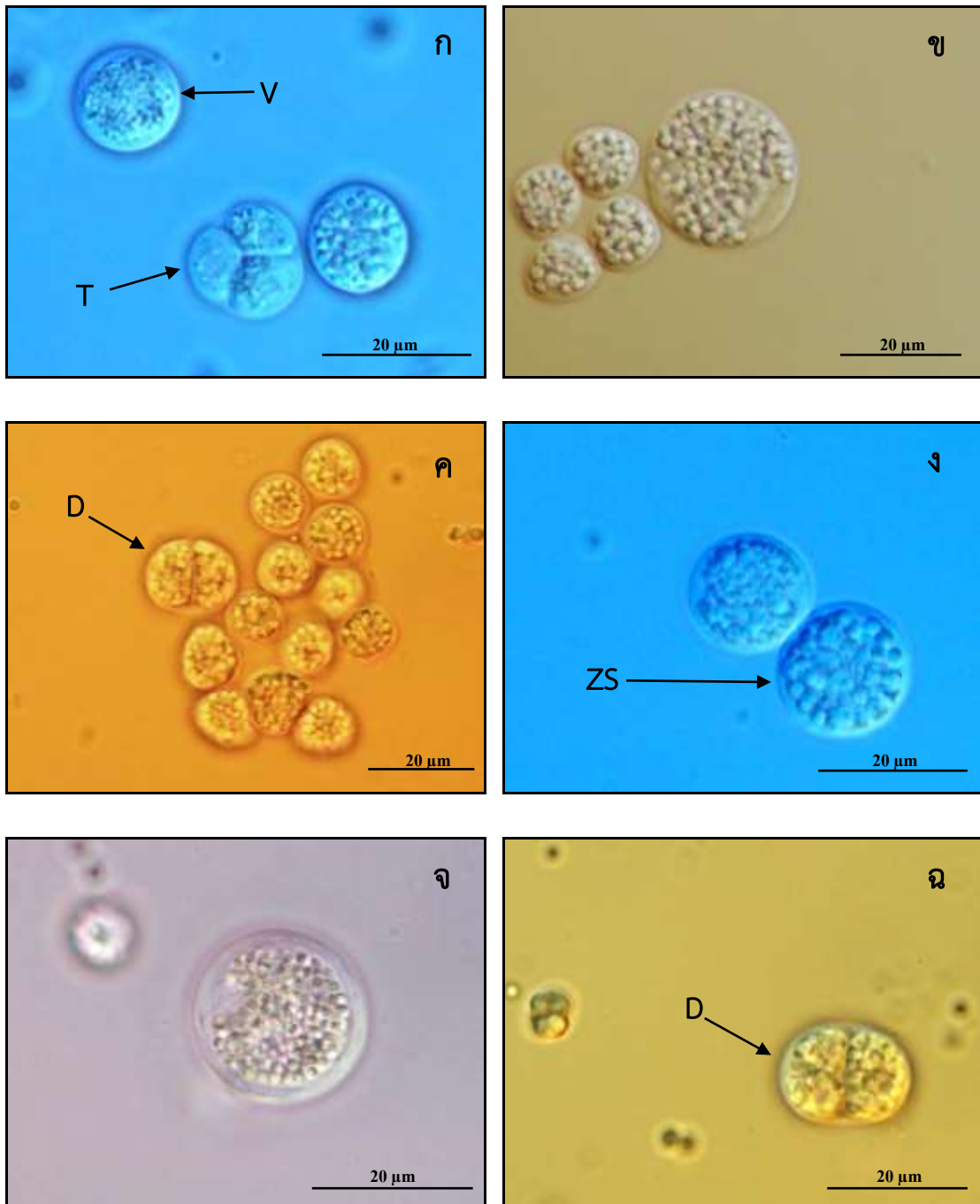
ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีสีครีมทึบแสง เนื้อโคโลนีคล้ายเนยเหลว โคโลนีบนราบติดผิวหน้าอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าโคโลนีมีรูปร่างกลม ขอบโคโลนีเรียบ บริเวณขอบโคโลนีเห็นเซลล์กลมชัดเจนแต่ไม่ใหญ่มาก (ภาพที่ 4.22 และตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อเลี้ยงอาหารเหลว GY พบว่าเซลล์มีการกระจายเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ vegetative cell มีรูปร่างกลมขนาด 7.5-17.5 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 400 เท่า) ผนังเซลล์บาง เซลล์มีลักษณะแตกต่างกันไป พบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายสามเหลี่ยมไม่เป็นทรงกลม ภายในเซลล์มีแกลนูลเล็ก ๆ กระจายอยู่ จากนั้นแกลนูลมีขนาดใหญ่ขึ้นจนเต็มเซลล์และพัฒนาเป็นซูโอสปอร์แรงเจียม มีการแบ่งเซลล์แบบ binary division พบอะมิบอยด์เซลล์ (ภาพที่ 4.23 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



ภาพที่ 4.22 (ก) ลักษณะโคโลนีของ Thraustochytriidae sp.14 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

(ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี Thraustochytriidae sp.14 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

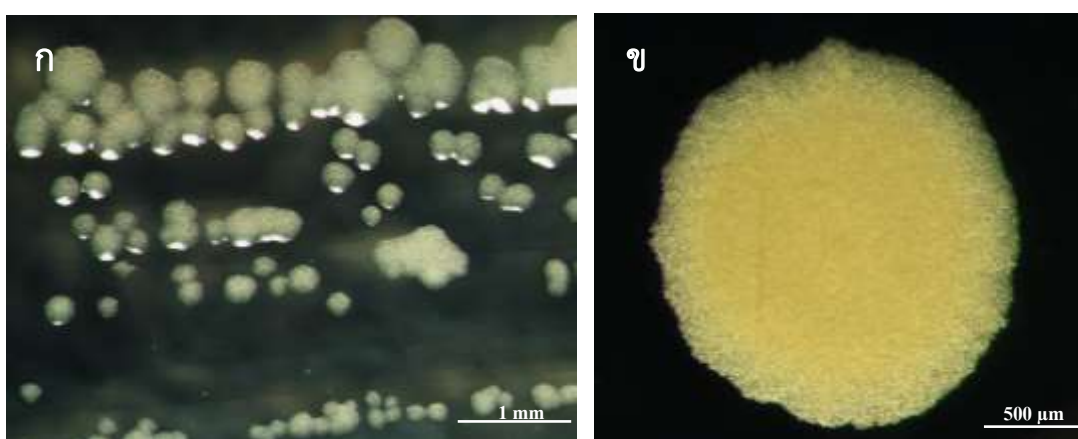


ภาพที่ 4.23 ลักษณะเซลล์ของ Thraustochytridae sp.14 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่ อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน
(D) Diad (T) Tetard (V) Vegetative cell (ZS) Zoosporangium

14. Thraustochytriidae sp.15

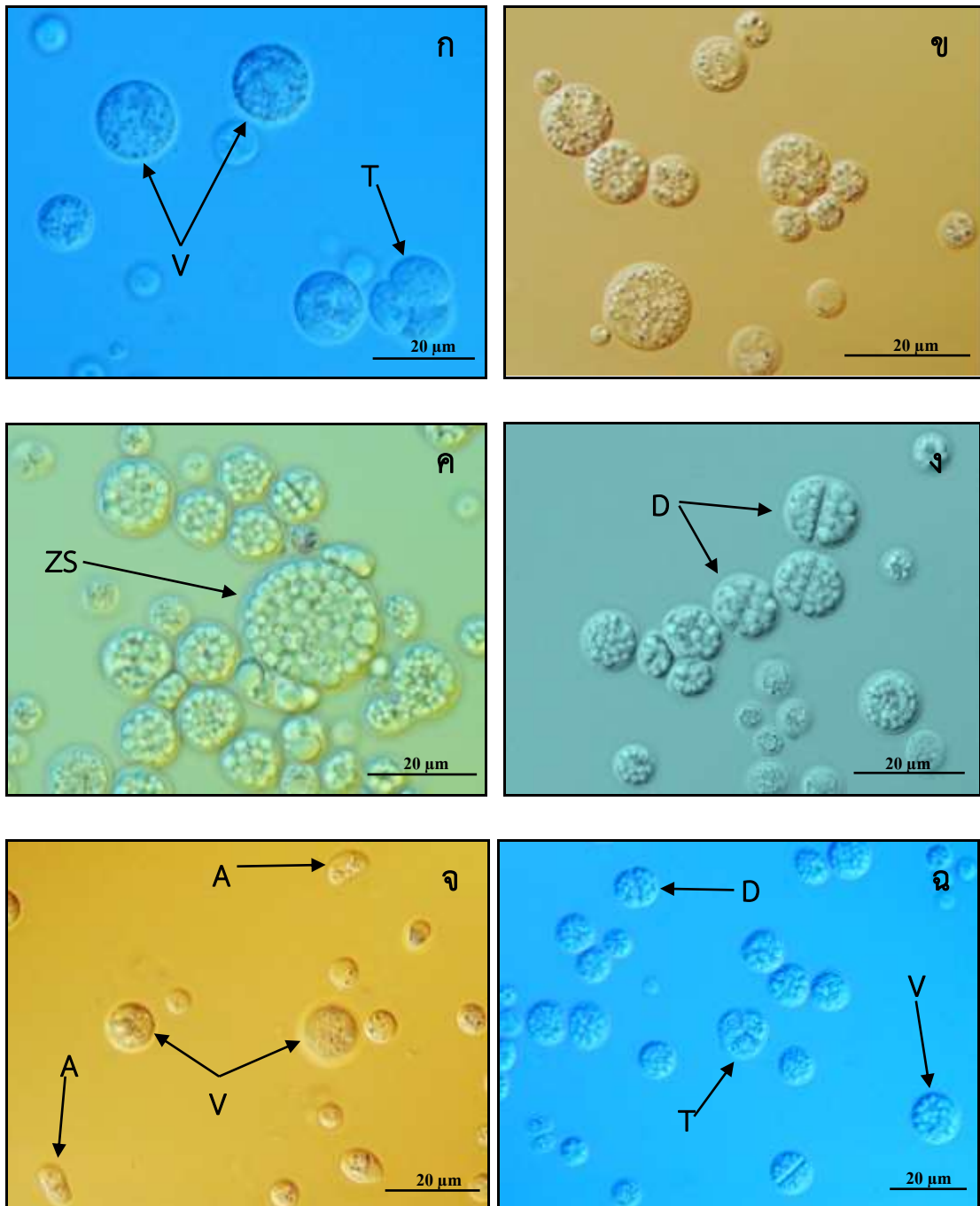
ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง GY มีสีครีมทึบแสง เนื้อโคโลนีคล้ายเนยเหลว โคโลนีบนรายติดผิวหน้าอาหาร เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ พบว่าโคโลนีมีรูปร่างกลม ขอบโคโลนีโค้งเว้าเล็กน้อย บริเวณขอบโคโลนีพบเซลล์เล็ก ๆ (ภาพที่ 4.24 และตารางที่ 4.4 และ 4.5)

เมื่อเลี้ยงอาหารเหลว GY พบว่าเซลล์มีลักษณะกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เกาะกลุ่มบ้างเล็กน้อย vegetative cell มีรูปร่างกลมขนาด 7.5-17.5 ไมโครเมตร (กำลังขยาย 400 เท่า) พบแกลนูลเล็ก ๆ กระจายอยู่ภายในเซลล์ จากนั้นแกลนูลมีขนาดใหญ่ขึ้นจนเต็มเซลล์ มีการแบ่งเซลล์แบบ binary division พบอะมิบอยด์เซลล์ (ภาพที่ 4.25 และตารางที่ 4.5 และ 4.6)



ภาพที่ 4.24 (ก) ลักษณะโคโลนีของ Thraustochytriidae sp.15 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

(ข) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโลนี Thraustochytriidae sp.15 ที่เจริญบนอาหารแข็ง GY ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน



ภาพที่ 4.25 ลักษณะเซลล์ของ *Thraustochytridae* sp.15 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY บ่มที่ อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 วัน
 (A) Amoeboid cell (D) Diad (T) Tetrad (V) Vegetative cell
 (ZS) Zoosporangium

ตารางที่ 4.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคลีนีทรอสโทโคทริคส์ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี

ทรอสโทโคทริคส์	สี	รูปร่าง	ขอบโคลีนี	ความสูง	เนื้อโคลีนี	อะมิบอยด์เซลล์บริเวณขอบโคลีนี
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	ขาวขุ่น ทึบแสง	กลม	อะมิบอยด์เซลล์กระจายรอบๆ	หนาสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร	คล้ายเนยเหลว	+
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	ครีม ทึบแสง	รูปร่างไม่แน่นอน	อะมิบอยด์เซลล์กระจายรอบๆ	แบนราบติดกับอาหาร	คล้ายเนยเหลว	+
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2	ครีม โปร่งแสง	รูปร่างไม่แน่นอน	อะมิบอยด์เซลล์กระจายรอบๆ	แบนราบติดกับอาหาร	คล้ายเนยเหลว	+
<i>Aurantiochytrium</i> sp.3	ครีม ทึบแสง	กลม	เป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย	หนาสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร	เกาะกันเล็กน้อย	-
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	ครีม ทึบแสง	กลม	เรียบ	หนาสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร	คล้ายเนยเหลว	+
<i>Schizochytrium</i> sp.2	เหลือง ทึบแสง	กลม	เป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย	แบนราบติดกับอาหาร	เกาะกันแน่น	-
<i>Thraustochytriidae</i> sp.8	ครีม ทึบแสง	กลม	เป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย	หนาสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร	คล้ายเนยเหลว	-
<i>Thraustochytriidae</i> sp.9	ครีม ทึบแสง	กลม	เป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย	หนาสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร	คล้ายเนยเหลว	-
<i>Thraustochytriidae</i> sp.10	ครีม ทึบแสง	กลม	เป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย	แบนราบติดกับอาหาร	คล้ายเนยเหลว	+
<i>Thraustochytriidae</i> sp.11	ครีม ทึบแสง	กลม	เรียบ	แบนราบติดกับอาหาร	คล้ายเนยเหลว	-
<i>Thraustochytriidae</i> sp.12	ส้มอ่อน ทึบแสง	กลม	เป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย	แบนราบติดกับอาหาร	เกาะกันเป็นก้อน	-
<i>Thraustochytriidae</i> sp.13	ขาว ทึบแสง	กลม	เป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย	แบนราบติดกับอาหาร	เกาะกันแน่น	-
<i>Thraustochytriidae</i> sp.14	ครีม ทึบแสง	กลม	เรียบ	แบนราบติดกับอาหาร	คล้ายเนยเหลว	-
<i>Thraustochytriidae</i> sp.15	ครีม ทึบแสง	กลม	เป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย	แบนราบติดกับอาหาร	คล้ายเนยเหลว	-

หมายเหตุ + หมายถึง พบอะมิบอยด์เซลล์
 - หมายถึง ไม่พบอะมิบอยด์เซลล์

ตารางที่ 4.5 ลักษณะของทรอสโทโคตริดส์ที่เจริญบนอาหารแข็งและอาหารเหลว GY เป็นเวลา 4 วัน

ลักษณะสัญญาณ	ทรอสโทโคตริดส์													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. สีโคโลนี														
1.1 ครีม ทึบแสง		✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓			✓	✓
1.2 ส้มอ่อน ทึบแสง											✓			
1.3 ขาว ทึบแสง	✓											✓		
1.4 ครีม โปร่งแสง			✓											
1.5 เหลือง ทึบแสง						✓								
2. รูปร่างโคโลนี														
2.1 รูปร่างกลม	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2.2 รูปร่างไม่แน่นอน		✓	✓											
3. ขอบโคโลนี														
3.1 เรียบ					✓					✓			✓	
3.2 เป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย				✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓
3.3 อะมิบอยด์เซลล์กระจายรอบๆ	✓	✓	✓											
หมายเหตุ	1 หมายถึง <i>Aurantiochytrium limacinum</i> , 5 หมายถึง <i>Parietichytrium sarkarianum</i> , 9 หมายถึง <i>Thraustochytriidae</i> sp.10, 13 หมายถึง <i>Thraustochytriidae</i> sp.14	2 หมายถึง <i>Aurantiochytrium</i> sp.1, 6 หมายถึง <i>Schizochytrium</i> sp.2, 10 หมายถึง <i>Thraustochytriidae</i> sp.11, 14 หมายถึง <i>Thraustochytriidae</i> sp.15	3 หมายถึง <i>Aurantiochytrium</i> sp.2, 7 หมายถึง <i>Thraustochytriidae</i> sp.8, 11หมายถึง <i>Thraustochytriidae</i> sp.12,	4 หมายถึง <i>Aurantiochytrium</i> sp.3, 8 หมายถึง <i>Thraustochytriidae</i> sp.9, 12 หมายถึง <i>Thraustochytriidae</i> sp.13,										

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ลักษณะพื้นฐาน	ทรอสโทโคตริดส์													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
4. ความหนูนของโคโลนี														
4.1 แบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร		✓	✓			✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓
4.2 หนาสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร	✓			✓	✓		✓	✓						
5. เนื้อโคโลนี														
5.1 แข็งเกาะกันเป็นก้อน											✓			
5.2 คล้ายเนยเหลว	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓			✓	✓
5.3 แข็งเกาะกันแน่น						✓						✓		
5.4 แข็งเกาะกันเล็กน้อย				✓										
6. เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า														
6.1 เซลล์กระจายตัวแบบเดี่ยวๆ			✓										✓	
6.2 เซลล์กระจายตัวแต่มีบางส่วนเกาะกลุ่ม	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓				✓
6.3 เซลล์เกาะกลุ่ม						✓						✓		
6.4 เซลล์เกาะกลุ่มแต่มีบางส่วนกระจาย											✓			
หมายเหตุ	1 หมายถึง <i>Aurantiochytrium limacinum</i> , 5 หมายถึง <i>Parietichytrium sarkarianum</i> , 9 หมายถึง Thraustochytriidae sp.10, 12 หมายถึง Thraustochytriidae sp.13,	2 หมายถึง <i>Aurantiochytrium</i> sp.1, 6 หมายถึง <i>Schizochytrium</i> sp.2, 10 หมายถึง Thraustochytriidae sp.11, 13 หมายถึง Thraustochytriidae sp.14	3 หมายถึง <i>Aurantiochytrium</i> sp.2, 7 หมายถึง Thraustochytriidae sp.8, 11 หมายถึง Thraustochytriidae sp.12, 14 หมายถึง Thraustochytriidae sp.15	4 หมายถึง <i>Aurantiochytrium</i> sp.3, 8 หมายถึง Thraustochytriidae sp.9,										

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ลักษณะพื้นฐาน	ทรอสโทโคตริดส์													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
7. ผนังเซลล์														
7.1 ผนังเซลล์บาง	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7.2 ผนังเซลล์หนา					✓									
8. การแบ่งตัว														
8.1 พบการแบ่งตัวแบบ binary division	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8.2 ไม่พบการแบ่งตัวแบบ binary division					✓									
9. ขนาดโคโลนี														
9.1 ขนาด 5-12.5 ไมโครเมตร	✓	✓		✓				✓	✓		✓			
9.2 ขนาด 7.5-17.5 ไมโครเมตร			✓				✓			✓			✓	✓
9.4 ขนาด 12.5-37.5 ไมโครเมตร					✓	✓						✓		
10. อะมิบอยด์เซลล์														
10.1 พบอะมิบอยด์เซลล์	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
10.2 ไม่พบอะมิบอยด์เซลล์											✓			
หมายเหตุ	1 หมายถึง <i>Aurantiochytrium limacinum</i> , 5 หมายถึง <i>Parietichytrium sarkarianum</i> , 9 หมายถึง Thraustochytriidae sp.10, 12 หมายถึง Thraustochytriidae sp.13,	2 หมายถึง <i>Aurantiochytrium</i> sp.1, 6 หมายถึง <i>Schizochytrium</i> sp.2, 10 หมายถึง Thraustochytriidae sp.11, 13 หมายถึง Thraustochytriidae sp.14	3 หมายถึง <i>Aurantiochytrium</i> sp.2, 7 หมายถึง Thraustochytriidae sp.8, 11 หมายถึง Thraustochytriidae sp.12, 14 หมายถึง Thraustochytriidae sp.15	4 หมายถึง <i>Aurantiochytrium</i> sp.3, 8 หมายถึง Thraustochytriidae sp.9,										

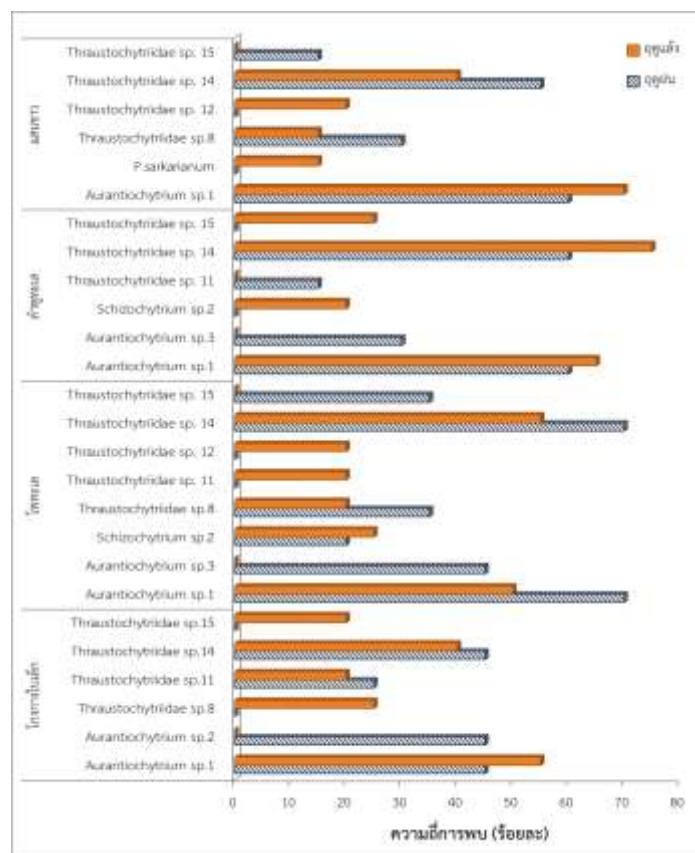
ตารางที่ 4.6 ลักษณะเซลล์ของทรอสโทโคตริคัสในอาหารเหลว GY เป็นเวลา 4 วัน

ทรอสโทโคตริคัส	ขนาดเซลล์ปกติ (ไมโครเมตร)	ผนังเซลล์	อะมิบอยด์ เซลล์	การแบ่งเซลล์แบบ Binary division
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	5-12.5	บาง	พบ	พบ
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	5-12.5	บาง	พบ	พบ
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2	7.5-15	บาง	พบ	พบ
<i>Aurantiochytrium</i> sp.3	5-12.5	บาง	พบ	พบ
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	12.5-37.5	หนา	พบ	ไม่พบ
<i>Schizochytrium</i> sp.2	12.5-25	บาง	พบ	พบ
Thraustochytriidae8	7.5-17.5	บาง	พบ	พบ
Thraustochytriidae9	5-12.5	บาง	พบ	พบ
Thraustochytriidae10	5-12.5	บาง	พบ	พบ
Thraustochytriidae11	7.5-17.5	บาง	พบ	พบ
Thraustochytriidae12	5-12.5	บาง	ไม่พบ	พบ
Thraustochytriidae13	12.5-25	บาง	พบ	พบ
Thraustochytriidae14	7.5-17.5	บาง	พบ	พบ
Thraustochytriidae sp.15	7.5-17.5	บาง	พบ	พบ

3. จำนวนไอโซเลทและความถี่ของการพบทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี

จากการศึกษาความถี่ของการพบทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนทั้ง 3 สถานี ในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝน พบว่าสถานีที่ 2 มีจำนวนไอโซเลทสูงสุดเท่ากับ 817 ไอโซเลท รองลงมาคือสถานีที่ 3 เท่ากับ 356 ไอโซเลท ส่วนสถานีที่ 1 เท่ากับ 352 ไอโซเลท สำหรับจำนวนชนิดของทรอสโทโคตริดส์พบสูงสุดที่สถานีที่ 2 เช่นกันเท่ากับ 11 ชนิด รองลงมาคือสถานีที่ 1 จำนวน 10 ชนิด ส่วนสถานีที่ 3 จำนวน 4 ชนิด

3.1 แหลมแม่่งแก้ว เก็บตัวอย่างพันธุ์ไม้มา 4 ชนิด คือ โกงกางใบเล็ก โพทะเล ลำพูทะเล และแสมขาว พบทรอสโทโคตริดส์ทั้งสิ้น 10 ชนิด โดยโพทะเลพบทรอสโทโคตริดส์สูงสุด 8 ชนิด และมีความถี่การพบสูงสุดในฤดูฝน ได้แก่ *Aurantiochytrium* sp.1 โดยพบที่ใบโพทะเลมีความถี่ของการพบร้อยละ 70 ส่วนฤดูแล้งมีความถี่การพบสูงสุด ได้แก่ *Thraustochytriidae* sp.14 ในลำพูทะเลพบร้อยละ 75 นอกจากนี้ยังพบว่าฤดูฝนและฤดูแล้งมีจำนวนไอโซเลทเท่ากับ 176 เท่ากันอีกด้วย (ตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.26)



ภาพที่ 4.26 ความถี่ของการพบชนิดของทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน แหลมแม่่งแก้ว จังหวัดจันทบุรี

ตารางที่ 4.7 ความถี่ของการพบของทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนแหลมแม่แก้ว จังหวัดจันทบุรี

พันธุ์ไม้	ทรอสโทโคตริดส์	ฤดูฝน		ฤดูแล้ง		เฉลี่ย ความถี่ของ การพบ
		จำนวนเชื้อ (ไอโซเลท)	ความถี่ของ การพบ	จำนวนเชื้อ (ไอโซเลท)	ความถี่ของ การพบ	
โกกงางใบเล็ก (<i>Rhizophora</i> <i>apiculata</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	10	45	15	55	50
	<i>Aurantiochytrium</i> sp.2	9	45	-	-	22.5
	Thraustochytriidae sp.8	-	-	5	25	12.5
	Thraustochytriidae sp.11	5	25	4	20	22.5
	Thraustochytriidae sp.14	13	45	13	40	42.5
	Thraustochytriidae sp.15	-	-	4	20	10
โพทะเล (<i>Thespesia</i> <i>populnea</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	16	70	16	50	60
	<i>Aurantiochytrium</i> sp.3	9	45	-	-	22.5
	<i>Schizochytrium</i> sp.2	5	20	6	25	22.5
	Thraustochytriidae sp.8	7	35	4	20	27.5
	Thraustochytriidae sp. 11	-	-	4	20	10
	Thraustochytriidae sp. 12	-	-	5	20	10
	Thraustochytriidae sp. 14	17	70	17	55	62.5
	Thraustochytriidae sp. 15	7	35	-	-	17.5
ลำพูทะเล (<i>Sonneratia</i> <i>alba</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	16	60	16	65	62.5
	<i>Aurantiochytrium</i> sp.3	6	30	-	-	15
	<i>Schizochytrium</i> sp.2	-	-	4	20	10
	Thraustochytriidae sp. 11	3	15	-	-	7.5
	Thraustochytriidae sp. 14	13	60	19	75	67.5
	Thraustochytriidae sp. 15	-	-	5	25	12.5
แสมขาว (<i>Avicennia</i> <i>alba</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	15	60	18	70	42.5
	<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	-	-	3	15	7.5
	Thraustochytriidae sp.8	6	30	3	15	22.5
	Thraustochytriidae sp. 12	-	-	5	20	10
	Thraustochytriidae sp. 14	16	55	10	40	47.5
	Thraustochytriidae sp. 15	3	15	-	-	7.5

หมายเหตุ จำนวนตัวอย่างใบไม้เก็บชนิดละ 20 ใบ

3.2 ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน เก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนมา 12 ชนิด คือ โกกงางใบเล็ก โกกงางใบใหญ่ ปอทะเล โปรงแดง ลำพูทะเล ลำแพน ฝาดดอกขาว ฝาดดอกแดง พังกาหัวสุมดอกขาว พังกาหัวสุมดอกแดง แสมขาวและแสมทะเล พบทรอสโทโคตริดส์ทั้งสิ้น 11 ชนิด โดยโกกงางใบเล็ก ลำพูทะเล และฝาดดอกแดงพบทรอสโทโคตริดส์สูงที่สุด 8 ชนิด ฤดูฝนชนิดที่มีความถี่ของการพบสูงสุด คือ Thraustochytriidae sp.14 โดยพบในฝาดดอกขาวมีความถี่ของการพบร้อยละ 75 ส่วนทรอสโทโคตริดส์ฤดูแล้งที่มีความถี่ของการพบสูงสุด คือ Thraustochytriidae sp. 14 และ *Aurantiochytrium* sp.1 ในโกกงางใบเล็กและฝาดดอกขาวมีความถี่ของการพบร้อยละ 85 นอกจากนี้จำนวนไอโซเลทฤดูฝน (187 ไอโซเลท) มีน้อยกว่าฤดูแล้ง (271 ไอโซเลท) (ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.27)

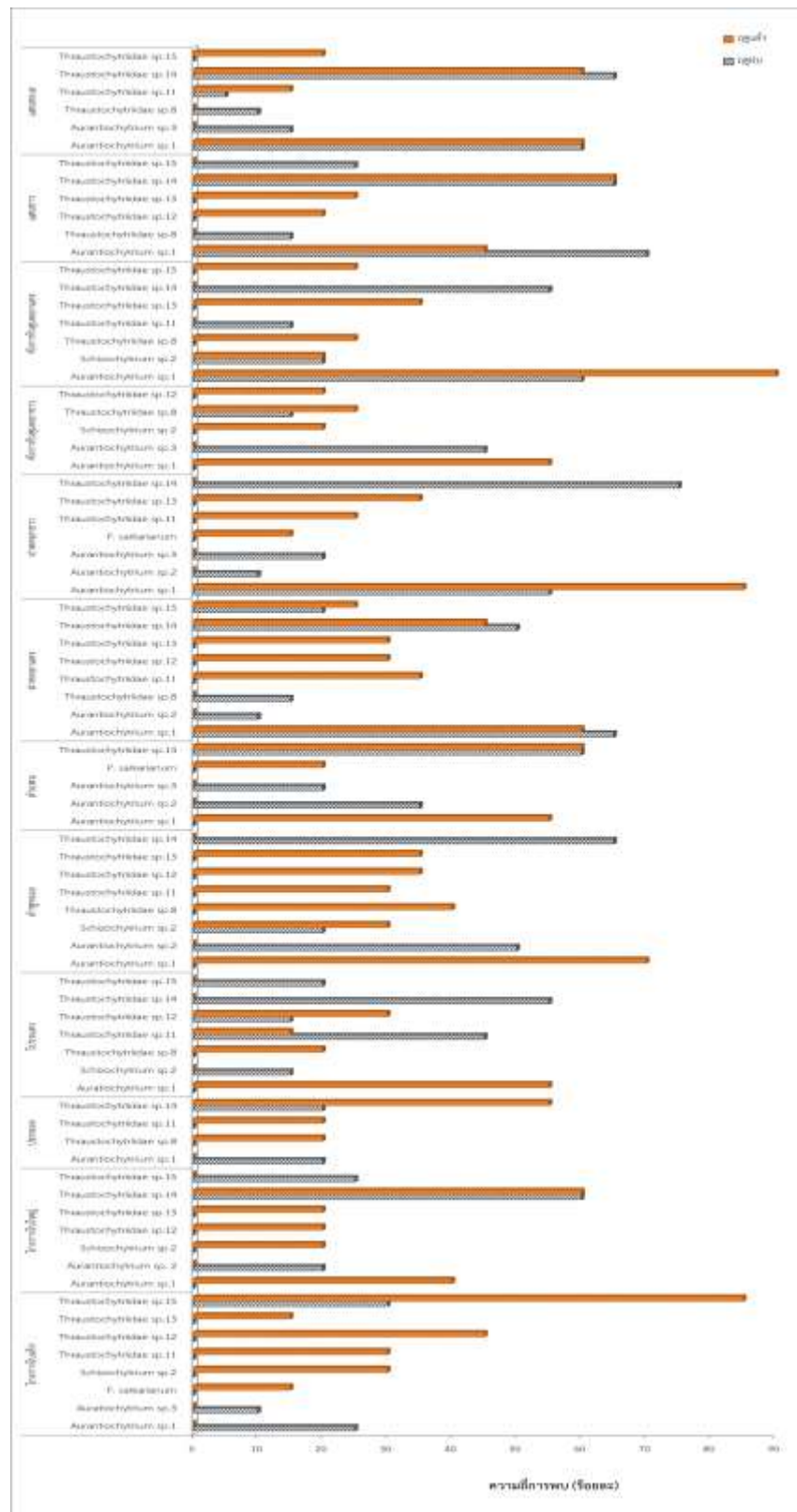
ตารางที่ 4.8 ความถี่ของการพบของทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนศูนย์ศึกษาการ
พัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

พันธุ์ไม้	ทรอสโทโคตริดส์	ฤดูฝน		ฤดูแล้ง		เฉลี่ย ความถี่ของ การพบ
		จำนวนเชื้อ (ไอโซเลท)	ความถี่ของ การพบ	จำนวนเชื้อ (ไอโซเลท)	ความถี่ของ การพบ	
โกกวางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	5	25	-	-	12.5
	<i>Auratiochytrium</i> sp.3	2	10	-	-	5.0
	<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	-	-	4	15	7.5
	<i>Schizochytrium</i> sp.2	-	-	6	30	15
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11	-	-	6	30	15
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.12	-	-	9	45	22.5
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.13	-	-	4	15	7.5
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.15	8	30	21	85	57.5
โกกวางใบ ใหญ่ (<i>Rhizophora mucronata</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	-	-	9	40	20
	<i>Aurantiochytrium</i> sp. 2	5	20	-	-	10
	<i>Schizochytrium</i> sp.2	-	-	4	20	10
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.12	-	-	4	20	10
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.13	-	-	4	20	10
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.14	16	60	16	60	60
ปอทะเล (<i>Hibiscus tiliaceus</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	4	20	-	-	10
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8	-	-	4	20	10
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11	-	-	4	20	10
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.14	6	20	15	55	37.5
โปรงแดง (<i>Ceriops tagal</i>)	<i>Auratiochytrium</i> sp.1	-	-	18	55	27.5
	<i>Schizochytrium</i> sp.2	3	15	-	-	7.5
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8	-	-	4	20	10
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11	11	45	3	15	7.5
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.12	4	15	6	30	22.5
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.14	1	55	-	-	27.5
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.15	4	20	-	-	10
ลำพูทะเล (<i>Sonneratia alba J.</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	-	-	16	70	35
	<i>Aurantiochytrium</i> sp.2	12	50	-	-	25
	<i>Schizochytrium</i> sp.2	4	20	6	30	25
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8	-	-	5	40	20
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11	-	-	6	30	15
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.12	-	-	7	35	17.5
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.13	-	-	7	35	17.5
<i>Thraustochytriidae</i> sp.14	17	65	-	-	32.5	
ลำแพน (<i>Sonnertia ovate</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	-	-	12	55	27.5
	<i>Aurantiochytrium</i> sp.2	7	35	-	-	17.5
	<i>Aurantiochytrium</i> sp.3	4	20	-	-	10
	<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	-	-	4	20	10
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.14	16	60	12	60	60

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

พันธุ์ไม้	ทรอสโทโคตริคส์	ฤดูฝน		ฤดูแล้ง		เฉลี่ย ความถี่ของ การพบ
		จำนวนเชื้อ (ไอโซเลท)	ความถี่ของ การพบ	จำนวนเชื้อ (ไอโซเลท)	ความถี่ของ การพบ	
ฝาดดอกแดง (<i>Lumnitzera littorea</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	17	65	15	60	62.5
	<i>Aurantiochytrium</i> sp.2	2	10	-	-	5.0
	Thraustochytriidae sp.8	3	15	-	-	7.5
	Thraustochytriidae sp.11	-	-	8	35	17.5
	Thraustochytriidae sp.12	-	-	6	30	15
	Thraustochytriidae sp.13	-	-	7	30	15
	Thraustochytriidae sp.14	14	50	11	45	47.5
Thraustochytriidae sp.15	4	20	5	25	22.5	
ฝาดดอกขาว (<i>Lumnitzera racemosa</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	14	55	26	85	70
	<i>Aurantiochytrium</i> sp.2	2	10	-	-	5.0
	<i>Aurantiochytrium</i> sp.3	3	20	-	-	10
	<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	-	-	3	15	7.5
	Thraustochytriidae sp.11	-	-	6	25	12.5
	Thraustochytriidae sp.13	-	-	8	35	17.5
	Thraustochytriidae sp.14	17	75	-	-	37.5
พังกาหัวสุม ดอกขาว (<i>Bruguiera gymnorhiza</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	-	-	13	55	27.5
	<i>Aurantiochytrium</i> sp.3	12	45	-	-	22.5
	<i>Schizochytrium</i> sp.2	-	-	4	20	10
	Thraustochytriidae sp.8	3	15	5	25	20
	Thraustochytriidae sp.12	-	-	4	20	10
พังกาหัวสุม ดอกแดง (<i>Bruguiera sexangula</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	19	60	20	90	75
	<i>Schizochytrium</i> sp.2	4	20	4	20	20
	Thraustochytriidae sp.8	-	-	5	25	12.5
	Thraustochytriidae sp.11	3	15	-	-	7.5
	Thraustochytriidae sp.13	-	-	7	35	17.5
	Thraustochytriidae sp.14	17	55	-	-	27.5
	Thraustochytriidae sp.15	-	-	5	25	12.5
แสมขาว (<i>Avicennia alba</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	18	70	10	45	57.5
	Thraustochytriidae sp.8	3	15	-	-	7.5
	Thraustochytriidae sp.12	-	-	5	20	10
	Thraustochytriidae sp.13	-	-	5	25	12.5
	Thraustochytriidae sp.14	16	65	15	65	65
	Thraustochytriidae sp.15	5	25	-	-	12.5
แสมทะเล (<i>Avicennia marina</i>)	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	15	60	19	60	60
	<i>Aurantiochytrium</i> sp.3	3	15	-	-	7.5
	Thraustochytriidae sp.8	2	10	-	-	5.0
	Thraustochytriidae sp.11	1	5	3	15	10
	Thraustochytriidae sp.14	17	65	15	60	62.5
	Thraustochytriidae sp.15	-	-	5	20	10

หมายเหตุ จำนวนตัวอย่างใบไม้เก็บชนิดละ 20 ใบ



ภาพที่ 4.27 ความถี่ของการพบชนิดของทรอสโทโคตริดีส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

3.3 สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) เก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนมา 11 ชนิด คือ โกงกางใบเล็ก โกงกางใบใหญ่ ตะบูนดำ ปอทะเล ประททะเล โปรงแดง ฝาดดอกขาว ฝาดดอกแดง พังกาหัวสุมดอกขาว พังกาหัวสุมดอกแดงและแสมขาว พบทรอสโทโคตริดส์ทั้งสิ้น 4 ชนิด โดยโกงกางใบเล็ก ตะบูนดำ ประททะเล พังกาหัวสุมดอกแดงและแสมขาว พบทรอสโทโคตริดส์สูงที่สุด 4 ชนิด ในฤดูฝนชนิดที่มีความถี่ของการพบสูงสุด คือ Thraustochytriidae sp.9 มีค่าร้อยละ 40 พบในโกงกางใบเล็กและแสมขาว ส่วนทรอสโทโคตริดส์ในฤดูแล้งที่มีความถี่ของการพบสูงสุด คือ *A. limacinum* มีความถี่ของการพบร้อยละ 85 ในโกงกางใบเล็ก นอกจากนี้ฤดูฝนมี 146 ไอโซเลท และฤดูแล้งมี 210 ไอโซเลท ซึ่งจำนวนไอโซเลทในฤดูฝนพบน้อยกว่าฤดูแล้งเช่นเดียวกับสถานีที่ 2 (ตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.28)

ตารางที่ 4.9 ความถี่ของการพบของทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนสถานีพัฒนา-
ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) จังหวัดจันทบุรี

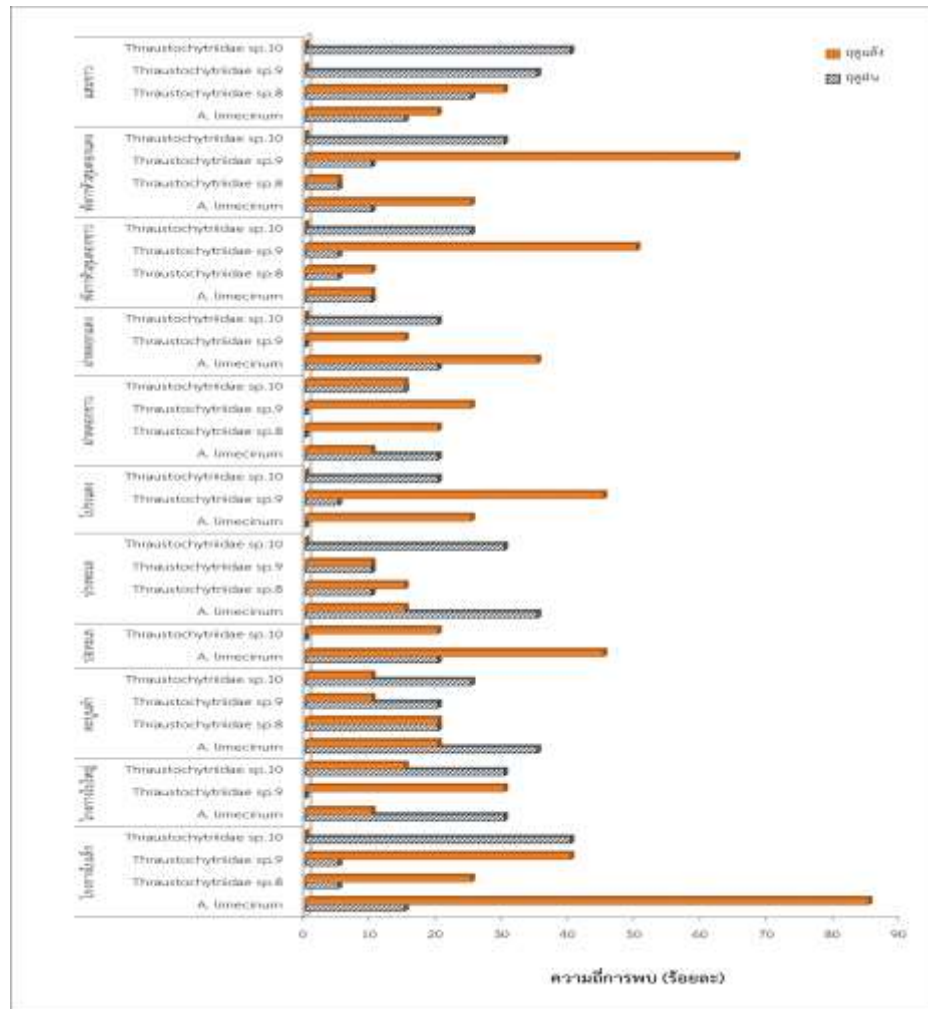
พันธุ์ไม้	ทรอสโทโคตริดส์	ฤดูฝน		ฤดูแล้ง		เฉลี่ย ความถี่ของ การพบ
		จำนวนเชื้อ (ไอโซเลท)	ความถี่ของ การพบ	จำนวนเชื้อ (ไอโซเลท)	ความถี่ของ การพบ	
โกงกางใบเล็ก (<i>Rhizophora apiculata</i>)	<i>A. limacinum</i>	3	15	37	85	50
	Thraustochytriidae sp.8	1	5	5	25	15
	Thraustochytriidae sp.9	1	5	13	40	22.5
	Thraustochytriidae sp.10	9	40	-	-	20
โกงกางใบใหญ่ (<i>Rhizophora mucronata</i>)	<i>A. limacinum</i>	6	30	2	10	20
	Thraustochytriidae sp.9	-	-	6	30	15
	Thraustochytriidae sp.10	6	30	3	15	22.5
ตะบูนดำ (<i>Xylocarpus moluccensis</i>)	<i>A. limacinum</i>	9	35	4	20	27.5
	Thraustochytriidae sp.8	5	20	4	20	20
	Thraustochytriidae sp.9	5	20	2	10	15
	Thraustochytriidae sp.10	6	25	2	10	17.5
ปอทะเล (<i>Hibiscus tiliaceus</i>)	<i>A. limacinum</i>	4	20	10	45	32.5
	Thraustochytriidae sp.10	-	-	5	20	10
ประททะเล (<i>Acrostichum aureum</i>)	<i>A. limacinum</i>	7	35	3	15	25
	Thraustochytriidae sp.8	2	10	3	15	12.5
	Thraustochytriidae sp.9	2	10	4	10	10
	Thraustochytriidae sp.10	8	30	-	-	15
โปรงแดง (<i>Ceriops tagal</i>)	<i>A. limacinum</i>	-	-	14	25	12.5
	Thraustochytriidae sp.9	1	5	14	45	25
	Thraustochytriidae sp.10	4	20	-	-	10

หมายเหตุ จำนวนตัวอย่างใบไม้เก็บชนิดละ 20 ใบ

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

พันธุ์ไม้	ทรอสโทโคตริดส์	ฤดูฝน		ฤดูแล้ง		เฉลี่ย ความถี่ของ การพบ
		จำนวนเชื้อ (ไอโซเลท)	ความถี่ของ การพบ	จำนวนเชื้อ (ไอโซเลท)	ความถี่ของ การพบ	
ฝาดดอกขาว	<i>A. limacinum</i>	4	20	2	10	15
(<i>Lumnitzera</i>	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8	-	-	4	20	10
<i>racemosa</i>)	<i>Thraustochytriidae</i> sp.9	-	-	6	25	12.5
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10	3	15	3	15	15
ฝาดดอกแดง	<i>A. limacinum</i>	5	20	7	35	27.5
(<i>Lumnitzera</i>	<i>Thraustochytriidae</i> sp.9	-	-	3	15	7.5
<i>littorea</i>)	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10	5	20	-	-	10
พังกาหัวสุมดอก	<i>A. limacinum</i>	2	10	2	10	10
ขาว	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8	1	5	2	10	12.5
(<i>Bruguiera</i>	<i>Thraustochytriidae</i> sp.9	1	5	15	50	27.5
<i>gymnorhiza</i>)	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10	5	25	-	-	12.5
พังกาหัวสุมดอก	<i>A. limacinum</i>	3	10	6	25	17.5
แดง	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8	1	5	1	5	5.0
(<i>Bruguiera</i>	<i>Thraustochytriidae</i> sp.9	2	10	18	65	37.5
<i>sexangula</i>)	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10	7	30	-	-	15
แสมขาว	<i>A. limacinum</i>	3	15	6	20	17.5
(<i>Avicennia</i>	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8	5	25	4	30	27.5
<i>alba</i>)	<i>Thraustochytriidae</i> sp.9	9	35	-	-	17.5
	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10	11	40	-	-	20

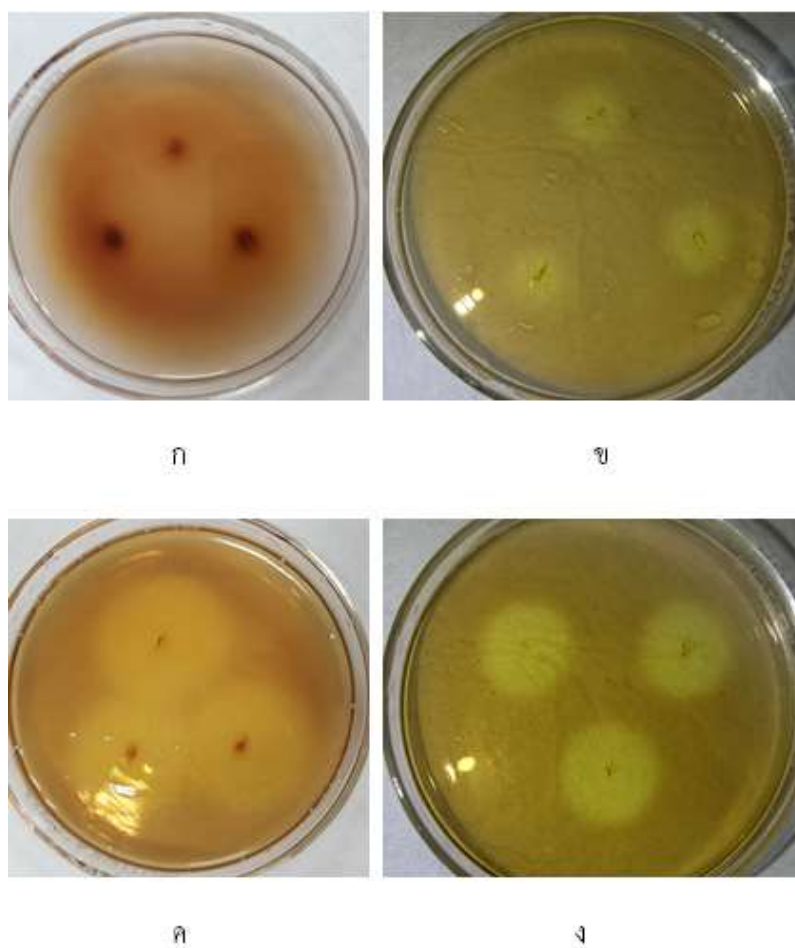
หมายเหตุ จำนวนตัวอย่างไปไม้เก็บชนิดละ 20 ใบ



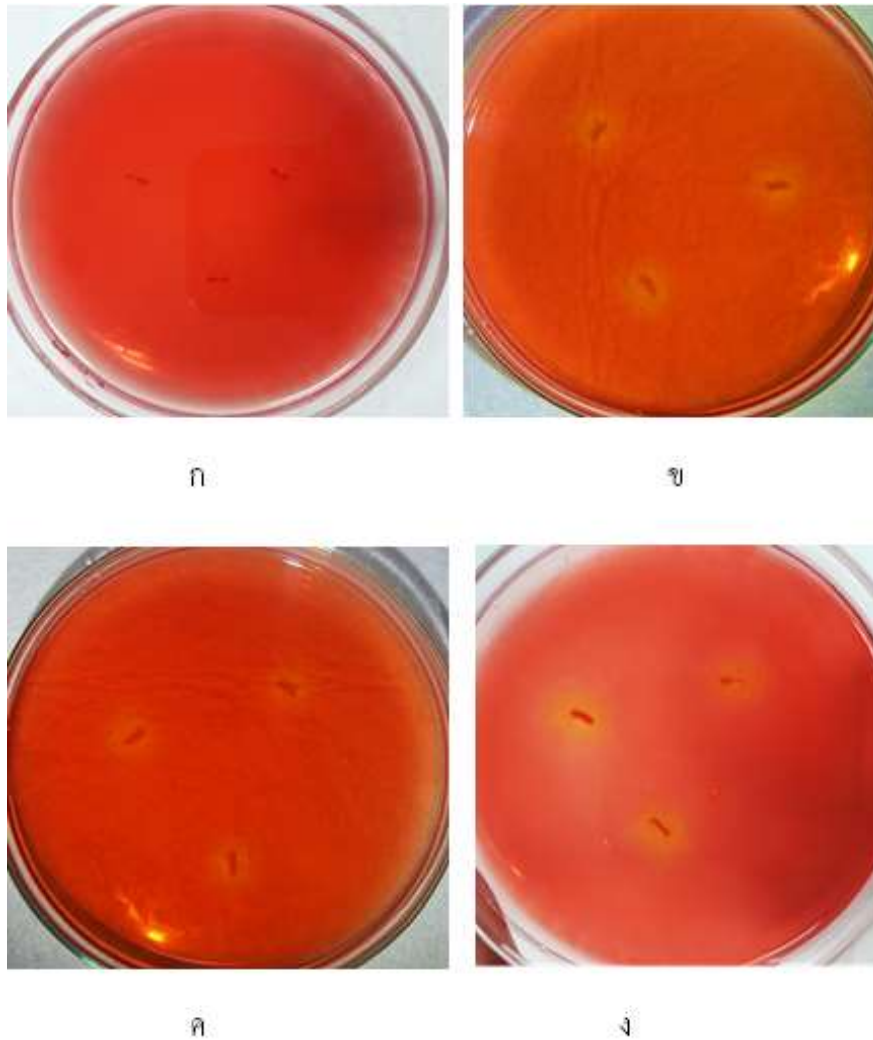
ภาพที่ 4.28 ความถี่ของการพบชนิดของทรอสโตโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนสถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) จังหวัดจันทบุรี

ส่วนที่ 2 การตรวจคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสและเซลลูเลสของทออสโทโคทริคส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน

จากการนำทออสโทโคทริคส์มาตรวจคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรส โดยใช้อาหาร Agarose medium แล้วย้อมด้วย Lugol's iodine รวมทั้งตรวจคัดกรองความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้อาหาร CMC medium แล้วย้อมด้วย 0.1 % Congo red ตรวจสอบการปรากฏของโซนใสรอบโคโลนีซึ่งบ่งชี้กิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด ทั้งฤดูฝนและฤดูแล้ง (ภาพที่ 4.29 และภาพที่ 4.30) พบว่ามีทออสโทโคทริคส์จำนวน 12 ไอโซเลท แสดงผลบวกต่อการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์อะกาเรส และทออสโทโคทริคส์แสดงผลบวกต่อการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสมีจำนวน 12 ไอโซเลทเช่นกัน (ตารางที่ 4.10 และ 4.11)



ภาพที่ 4.29 ลักษณะการปรากฏโซนใสรอบโคโลนีของทออสโทโคทริคส์ ซึ่งบ่งชี้กิจกรรมเอนไซม์อะกาเรสบน Agarose medium ภายหลังจากการย้อมด้วย Lugol's iodine
 (ก) ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรส
 (ข-ง) มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรส



ภาพที่ 4.30 ลักษณะการปรากฏโคโลนีของทรอสโทโคตริดส์ ซึ่งบ่งชี้กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส บนอาหาร CMC medium ภายหลังการย้อมด้วย 0.1 % Congo red
(ก) ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
(ข-ง) มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ตารางที่ 4.10 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสและเอนไซม์เซลลูเลสของทรอสโทโคตริดส์
ในฤดูฝน

เลขที่	ไอโซเลท	ความสามารถ ในการผลิต เอนไซม์ อะกาเรส	ค่าดัชนีเอนไซม์ อะกาเรส	ความสามารถใน การผลิตเอนไซม์ เซลลูเลส	ค่าดัชนีเอนไซม์ เซลลูเลส
1	<i>A. limacinum</i> BUCHA3BG 10-3	-	-	-	-
2	<i>A. limacinum</i> BUCHA3RA 7-1	-	-	-	-
3	<i>A. limacinum</i> BUCHA3 XM 12-2	-	-	-	-
4	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA1AA 5-1	-	-	-	-
5	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA2BG 7-3	-	-	-	-
6	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA2HT 5-2	-	-	-	-
7	<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA1RA 18-2	-	-	-	-
8	<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA2LR 3-2	-	-	-	-
9	<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA2SO 9-2	-	-	-	-
10	<i>Aurantiochytrium</i> sp.3BUCHA1SA 19-1	-	-	-	-
11	<i>Aurantiochytrium</i> sp.3BUCHA2LR 12-3/2	-	-	-	-
12	<i>Aurantiochytrium</i> sp.3BUCHA2SO 16-2	-	-	-	-
13	<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA1TP 1-3/2	+	10.36±0.46	+	9.29±1.05
14	<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA2CT 19-3/2	+	11.52±0.59	+	7.88±0.50
15	<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA2SA 15-1	+	6.88±0.78	+	8.00±2.00
16	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8BUCHA2AM 10-3	-	-	-	-
17	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8BUCHA2BS 12-2	-	-	-	-
18	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8BUCHA2SA 3-3/1	-	-	-	-
19	<i>Thraustochytriidae</i> sp.9BUCHA3BG 1-2	-	-	-	-
20	<i>Thraustochytriidae</i> sp.9BUCHA3RA 2-2	-	-	-	-
21	<i>Thraustochytriidae</i> sp.9BUCHA3XM 12-3	-	-	-	-
22	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10BUCHA3AA 5-3	-	-	-	-
23	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10BUCHA3AcA 13-1	-	-	-	-
24	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10BUCHA3XM 3-1	-	-	-	-
25	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11BUCHA1RA 1-1	-	-	-	-
26	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11BUCHA2BG 9-3/2	-	-	-	-
27	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11BUCHA2CT 19-1/2	-	-	-	-
28	<i>Thraustochytriidae</i> 15BUCHA1RA 19-3	-	-	-	-
29	<i>Thraustochytriidae</i> 15BUCHA2BS 3-1	-	-	-	-
30	<i>Thraustochytriidae</i> 15BUCHA2LR 20-1	-	-	-	-
31	<i>Thraustochytriidae</i> 16BUCHA2AA 14-3	-	-	-	-
32	<i>Thraustochytriidae</i> 16BUCHA2LL 8-2/1	-	-	-	-
33	<i>Thraustochytriidae</i> 16BUCHA2RM 4-3/2	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสหรือเซลลูเลส
+ หมายถึง มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสหรือเซลลูเลส

ตารางที่ 4.11 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสและเอนไซม์เซลลูเลสของทรอสโทโคตริตส์ใน
ฤดูแล้ง

เลขที่	ไอโซเลท	ความสามารถ ในการผลิต เอนไซม์ อะกาเรส	ค่าดัชนี เอนไซม์ อะกาเรส	ความสามารถ ในการผลิต เอนไซม์ เซลลูเลส	ค่าดัชนี เอนไซม์ เซลลูเลส
1	<i>A. limacinum</i> BUCHA3BG 2-1	-	-	-	-
2	<i>A. limacinum</i> BUCHA3CT 16-1	-	-	-	-
3	<i>A. limacinum</i> BUCHA3RA 4-2	-	-	-	-
4	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA1AA 10-1	-	-	-	-
5	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA2BG 5-3/1	-	-	-	-
6	<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA2LR 15-3	-	-	-	-
7	<i>Parietichytrium sarkarianum</i> BUCHA1AA 7-2	+	15.17±0.91	+	10.87±0.75
8	<i>Parietichytrium sarkarianum</i> BUCHA2LR 11-1	+	16.30±1.51	+	10.00±0.70
9	<i>Parietichytrium sarkarianum</i> BUCHA2RA 18-2/2	+	19.59±5.57	+	11.10±1.39
10	<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA2BS15-3	+	14.77±0.40	+	9.43±0.29
11	<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA2RA 2-2	+	12.83±3.31	+	9.44±1.19
12	<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA1TP 16-3	+	13.56±2.99	+	9.30±0.70
13	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8BUCHA2AM 10-3	-	-	-	-
14	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8BUCHA2BS 12-2	-	-	-	-
15	<i>Thraustochytriidae</i> sp.8BUCHA2SA 3-3/1	-	-	-	-
16	<i>Thraustochytriidae</i> sp.9BUCHA3AcA 4-1	-	-	-	-
17	<i>Thraustochytriidae</i> sp.9BUCHA3RA 13-2	-	-	-	-
18	<i>Thraustochytriidae</i> sp.9BUCHA3RM 10-3	-	-	-	-
19	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10BUCHA3AcA 4-1	-	-	-	-
20	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10BUCHA3RA 13-2	-	-	-	-
21	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10BUCHA3RM 10-3	-	-	-	-
22	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11BUCHA2LR 14-1	-	-	-	-
23	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11BUCHA2RA 10-2	-	-	-	-
24	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11BUCHA2SA 15-3	-	-	-	-
25	<i>Thraustochytriidae</i> sp.12BUCHA2BS 2-2	-	-	-	-
26	<i>Thraustochytriidae</i> sp.12BUCHA2LL 20-1	-	-	-	-
27	<i>Thraustochytriidae</i> sp.12BUCHA2RM 9-1/2	-	-	-	-
28	<i>Thraustochytriidae</i> sp.13BUCHA2BG 9-2	+	16.36±7.00	+	8.23±0.87
29	<i>Thraustochytriidae</i> sp.13BUCHA2RA 1-1/2	+	17.45±4.05	+	7.50±1.80
30	<i>Thraustochytriidae</i> sp.13BUCHA2SA 4-1	+	10.46±2.06	+	9.20±0.46
31	<i>Thraustochytriidae</i> sp.14BUCHA1SA 15-3	-	-	-	-
32	<i>Thraustochytriidae</i> sp.14BUCHA2AA 13-3	-	-	-	-
33	<i>Thraustochytriidae</i> sp.14BUCHA2HT 20-3	-	-	-	-
34	<i>Thraustochytriidae</i> sp.15BUCHA1RA 12-1	-	-	-	-
35	<i>Thraustochytriidae</i> sp.15BUCHA2AM 8-3	-	-	-	-
36	<i>Thraustochytriidae</i> sp.15BUCHA2BG 10-1	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสหรือเซลลูเลส
+ หมายถึง มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสหรือเซลลูเลส

ตอนที่ 3 การจัดจำแนกทรอสโทโคทริดส์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

18S rRNA

การเพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของทรอสโทโคทริดส์ จำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ BUCHAR2Am 10-3, BUCHAS3XM 12-3, BUCHAS3LR 17-1, BUCHAR2LR 3-2, BUCHAS2AA 13-3, BUCHAS1AA 10-1, BUCHA2LL 8-2/1, BUCHAS2BS 2-2, BUCHAS2SA 4-1, BUCHAS2LR 11-1 และ BUCHAR1SA 19-1 มาเพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA โดยใช้คู่มือไพรเมอร์ 18S001 และ 18S13 พบว่ามีทรอสโทโคทริดส์เพียง 7 ไอโซเลท คือ BUCHAR2Am 10-3, BUCHAS3XM 12-3, BUCHAS3LR 17-1, BUCHAR2LR 3-2, BUCHAS1AA 10-1, BUCHAS2LR 11-1 และ BUCHAR1SA 19-1 แสดงผลบวก โดยสามารถเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,800 bp ตรงตามที่คาดหมายไว้จากการใช้คู่มือไพรเมอร์ดังกล่าว เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของทรอสโทโคทริดส์ที่ไม่สามารถถูกเพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA ดังกล่าวข้างต้น (BUCHAS2AA 13-3, BUCHA2LL 8-2/1, BUCHAS2BS 2-2 และ BUCHAS2SA 4-1) มาดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA โดยใช้คู่มือไพรเมอร์ NS1-NS8 พบว่าคู่มือไพรเมอร์นี้ก็สามารถเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายได้จากทรอสโทโคทริดส์ทั้ง 4 ไอโซเลท ดังนั้นจึงมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของทรอสโทโคทริดส์เพียง 7 ไอโซเลทเท่านั้นที่ถูกนำไปอ่านและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการจัดจำแนกในลำดับต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน จำนวน 7 ไอโซเลท โดยใช้โปรแกรม blastn โดย 99-100 % ของข้อมูลถูกนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าไอโซเลท BUCHAR2Am 10-3, BUCHAS3XM 12-3, BUCHAS3LR 17-1, BUCHAR2LR 3-2, BUCHAS1AA 10-1 และ BUCHAR1SA 19-1 แสดงความคล้ายคลึงกับ *Aurantiochytrium limacinum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ประมาณ 90-98% (ตารางที่ 4.12-4.17) ในขณะที่ไอโซเลท BUCHAS2LR 11-1 แสดงความคล้ายคลึงมากกว่า 99.5% กับทรอสโทโคทริดส์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อยู่ในจีนัส *Parietichytrium* (ตารางที่ 4.18)

ตารางที่ 4.12 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCAR2Am 10-3 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

ลำดับ	Accession no.	Taxon	%Coverage	%Similarity
1	JN986842	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> isolate SL1101	99	91.81
2	HM042909	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC169	99	91.63
3	AB810940	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> NIBH SR21	99	91.57
4	HM042913	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC192	99	91.57

ตารางที่ 4.13 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCHAS3XM 12-3 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

ลำดับ	Accession no.	Taxon	%Coverage	%Similarity
1	AB810938	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> NIBH SR21	100	89.91
2	HM042910	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC174	100	89.90
3	JN986842	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> isolate SL1101	100	89.90
4	HM042913	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC192	100	89.84

ตารางที่ 4.14 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCHAS3LR 17-1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

ลำดับ	Accession no.	Taxon	%Coverage	%Similarity
1	JN986842	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> isolate SL1101	99	91.18
2	HM042909	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC169	99	91.05
3	AB810940	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> NIBH SR21	99	91.00
4	HM042913	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC192	99	91.00

ตารางที่ 4.15 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCAR2LR 3-2 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

ลำดับ	Accession no.	Taxon	%Coverage	%Similarity
1	JN986842	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> isolate SL1101	100	95.75
2	AB810939	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> NIBH SR21	100	95.64
3	HM042913	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC192	100	95.53
4	HM042909	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC169	100	95.53

ตารางที่ 4.16 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCHAS1AA 10-1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

ลำดับ	Accession no.	Taxon	%Coverage	%Similarity
1	JN986842	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> isolate SL1101	100	98.34
2	HM042913	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC192	100	98.24
3	AB810938	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> NIBH SR21	100	98.24
4	HM042910	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC174	100	98.24
5	HM042907	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC166	100	98.24

ตารางที่ 4.17 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCHAR1SA 19-1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

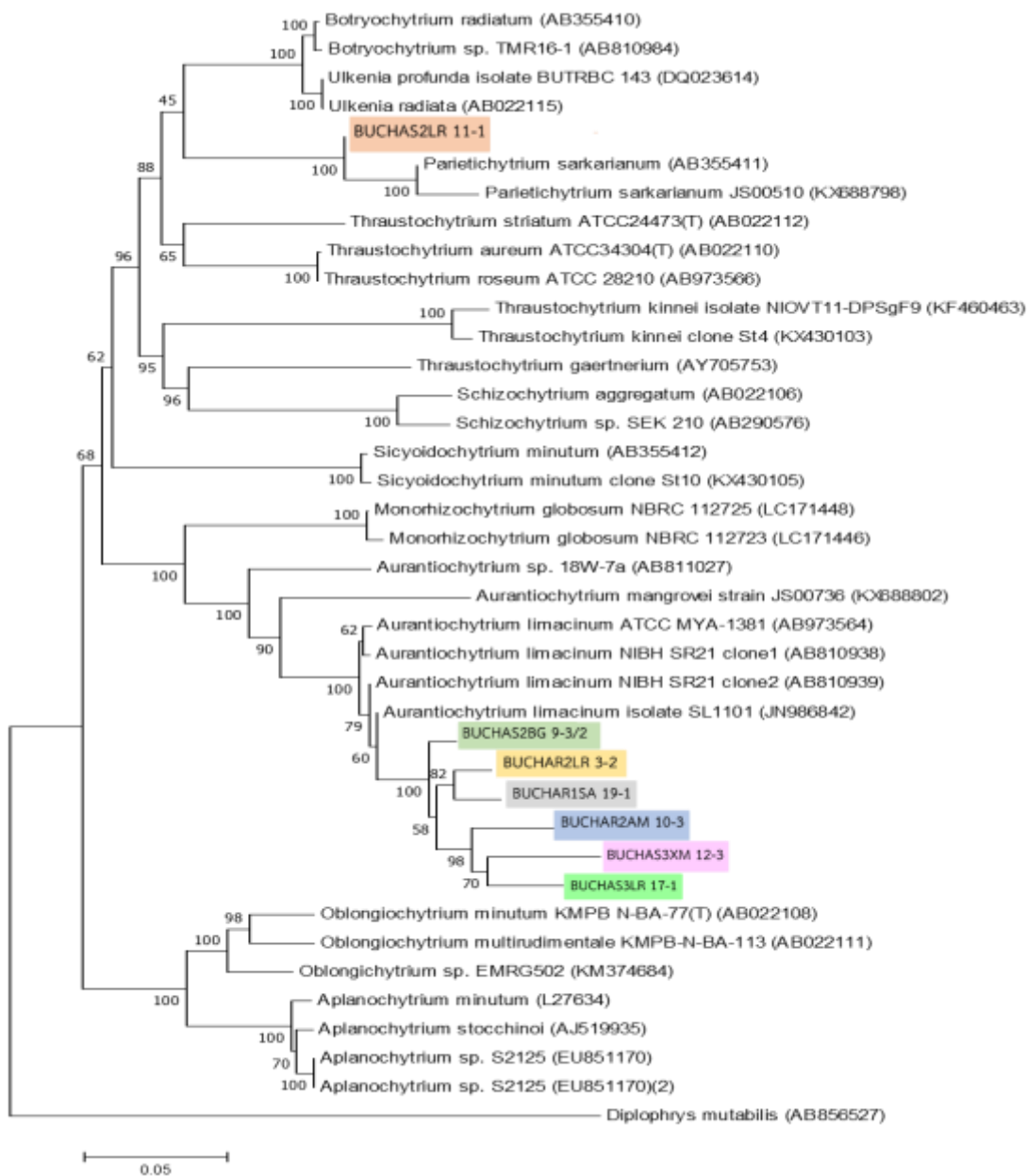
ลำดับ	Accession no.	Taxon	%Coverage	%Similarity
1	JN986842	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> isolate SL1101	99	96.62
2	AB810939	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> NIBH SR21	99	96.42
3	HM042906	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC109	99	96.42
4	HM042909	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC169	99	96.31
5	HM042911	<i>Schizochytrium limacinum</i> isolate OUC175	99	96.21

ตารางที่ 4.18 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA จากทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCHAS2LR 11-1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn

ลำดับ	Accession no.	Taxon	%Cov erage	%Similarity
1	AB810955	<i>Parietichytrium</i> sp. Tana-1	100	99.89
2	HQ228977	<i>Parietichytrium</i> sp. BAFCCult 3109	100	99.69
3	AB355411	<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	99	99.59
4	HQ228972	<i>Thraustochytrium</i> sp. BAFCCult 3512	94	91.55
5	KF460466	<i>Thraustochytrium kinnei</i> isolate NIOVT16-DPSgF14	93	88.17

การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของทรอสโทโคทริดส์

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของทรอสโทโคทริดส์ทั้ง 7 ไอโซเลท มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับทรอสโทโคทริดส์สายพันธุ์อ้างอิง ที่เป็นตัวแทนของจีंसต่าง ๆ ที่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลสากล ได้แก่ GenBank, European Molecular Biology Laboratory (EMBL) และ DNA Databank of Japan (DDBJ) เพื่อยืนยันสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCCHAR2Am 10-3, BUCHAS3XM 12-3, BUCHAS3LR 17-1, BUCCHAR2LR 3-2, BUCHAS1AA 10-1 และ BUCCHAR1SA 19-1 ถูกจัดวางอยู่ในเคลด (Clade) เดียวกับ *Aurantiochytrium limacinum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในขณะที่ทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCHAS2LR 11-1 มีสายวิวัฒนาการล่าสุดร่วมกับทรอสโทโคทริดส์ในจีंस *Parietichytrium* โดยแตกซอนในระดับสปีชีส์ที่ปรากฏบนฐานข้อมูลมีเพียงสปีชีส์เดียวคือ *Parietichytrium sarkarianum* (ภาพที่ 4.31) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลระยะห่างเชิงวิวัฒนาการที่สนับสนุนตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ของทรอสโทโคทริดส์ทั้ง 7 ไอโซเลท กล่าวคือ BUCCHAR2Am 10-3, BUCHAS3XM 12-3, BUCHAS3LR 17-1, BUCCHAR2LR 3-2, BUCHAS1AA 10-1 และ BUCCHAR1SA 19-1 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดกับ *Aurantiochytrium limacinum* ในขณะที่ทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCHAS2LR 11-1 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดกับ *Parietichytrium sarkarianum* (ตารางที่ 4.19)



ภาพที่ 4.31 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของทรอสโทคริทริดส์ที่คัดแยกจากสาหร่ายทะเลจำนวน 7 ไอโซเลท ซึ่งสร้างขึ้นด้วยวิธี Neighbor-Joining บนโปรแกรม MEGA 7 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA และใช้โมเดล p-distance ในการคำนวณระยะห่างทางวิวัฒนาการ ซึ่งปรากฏเป็นความยาวกิ่งของแต่ละแทกซอน โดยมีหน่วยเป็นอัตราการแทนที่คู่เบสในแต่ละตำแหน่งบนยีนเครื่องหมายและทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยใช้วิธี Bootstrapping 1,000 ซ้ำ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ มีจำนวนทั้งหมด 39 ข้อมูล โดยมี *Diplophrys mutabilis* (AB856527) เป็นแทกซอนนอกกลุ่ม

ตารางที่ 4.19 Distance matrix ของทรอสโทโคทริดส์ ไอโซเลท BUCAR2Am 10-3, BUCHAS3XM 12-3, BUCHAS3LR 17-1, BUCAR2LR 3-2, BUCHAS1AA 10-1, BUCHAS2LR 11-1 และ BUCAR1SA 19-1 ซึ่งวิเคราะห์ร่วมกับทรอสโทโคทริดส์ สายพันธุ์อ้างอิง โดยใช้โปรแกรม MEGA 7

Sequence	A1	A2	A3	A4	A6	A15	Ref_Al*	A12	Ref_Ps*	Ogr*
A1	-									
A2	0.064	-								
A3	0.059	0.038	-							
A4	0.054	0.064	0.067	-						
A6	0.051	0.049	0.057	0.027	-					
A15	0.064	0.057	0.062	0.030	0.024	-				
Ref_Al*	0.057	0.056	0.064	0.033	0.013	0.026	-			
A12	0.238	0.252	0.257	0.170	0.155	0.180	0.155	-		
Ref_Ps*	0.261	0.252	0.252	0.247	0.224	0.229	0.214	0.013	-	
Ogr*	0.265	0.260	0.265	0.246	0.235	0.243	0.228	0.189	0.235	-

* หมายเหตุ Ref_Al คือ *Aurantiochytrium limacinum* isolate SL1101 (JN986842), Ref_Ps คือ *Parietichytrium sarkarianum* (KX688798) และ Ogr คือ *Thraustochytrium kinnei* (KX430103) ซึ่งเป็นแทกซอนนอกกลุ่ม (Outgroup) (A1=BUCHAR2AM 10-3, A2= BUCHAS3XM 12-3, A3=BUCHAS3LR 17-1, A4=BUCHAR2LR 3-2, A6=BUCHAS1AA 10-1, A12=BUCHAS2LR 11-11, A15=BUCHAR1SA 19-1)

การระบุแทกซอนของทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

การระบุแทกซอนของทรอสโทโคทริดส์ในการศึกษานี้ใช้ข้อมูลสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับค่าความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18SrRNA โดยกำหนดค่า similarity cutoff สำหรับแทกซอนระดับจีโนสและสปีชีส์อยู่ที่ 95% และ 98% ตามลำดับ พบว่า จากทรอสโทโคทริดส์จำนวน 7 ไอโซเลท สามารถระบุแทกซอนระดับสปีชีส์ได้เพียง 2 ไอโซเลท คือ BUCHAS1AA 10-1 ระบุได้เป็น *Aurantiochytrium limacinum* และ BUCHAS2LR 11-11 ระบุได้เป็น *Parietichytrium sarkarianum* และมีทรอสโทโคทริดส์จำนวน 2 ไอโซเลท คือ BUCAR2LR 3-2 และ BUCAR1SA 19-1 ระบุแทกซอนได้ในระดับจีโนส โดยทั้งสองไอโซเลทนี้ถูกจัดอยู่ในจีโนสเดียวกันคือ *Aurantiochytrium* ส่วนทรอสโทโคทริดส์ที่เหลืออีก 3 ไอโซเลท (BUCHAR2AM 10-3, BUCHAS3XM 12-3 และ BUCHAS3LR 17-1) สามารถระบุแทกซอนได้เพียงระดับแฟมิลีเท่านั้น คือ Thraustochytriidae โดยแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดที่สุดกับ *Aurantiochytrium limacinum* โดยในการศึกษานี้ ระบุให้เป็น *Aurantiochytrium limacinum*-like species (ตารางที่ 4.20)

ตารางที่ 4.20 การจำแนกทรอสโทโคทริดส์จำนวน 7 ไอโซเลท ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

Isolate	Taxon identification	Closest taxon (accession no.)	% Similarity
A1	Thraustochytriidae sp. A1 (<i>Aurantiochytrium limacinum</i> -like A1)	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> isolate SL1101 (JN986842)	91.81
A2	Thraustochytriidae sp. A2 (<i>Aurantiochytrium limacinum</i> -like A2)	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> (AB810938)	89.91
A3	Thraustochytriidae sp. A3 (<i>Aurantiochytrium limacinum</i> -like A3)	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> isolate SL1101 (JN986842)	91.18
A4	<i>Aurantiochytrium</i> sp. A4	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> isolate SL1101 (JN986842)	95.75
A6	<i>Aurantiochytrium</i> sp. A6	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> isolate SL1101 (JN986842)	98.34
A12	<i>Parietichytrium sarkarianum</i> A12	<i>Parietichytrium sarkarianum</i> (AB355411)	99.59
A15	<i>Aurantiochytrium</i> sp. A15	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> isolate SL1101 (JN986842)	96.62

หมายเหตุ การระบุแทกซอนของทรอสโทโคทริดส์ใช้ข้อมูลสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับค่าความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18SrRNA (A1=BUCHAR2AM 10-3, A2= BUCHAS3XM 12-3, A3=BUCHAS3LR 17-1, A4=BUCHAR2LR 3-2, A6=BUCHAS1AA 10-1, A12=BUCHAS2LR 11-11, A15=BUCHAR1SA 19-1)

ส่วนที่ 4 ชีวมวลและกรดไขมันของทรอสโทโคตริคัสที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน จังหวัด จันทบุรี

1. ชีวมวลของทรอสโทโคตริคัสที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน

ชีวมวลของทรอสโทโคตริคัสแต่ละชนิดที่เก็บตัวอย่างทั้ง 3 สถานี เมื่อนำมาเลี้ยงด้วยอาหารเหลว GY (6% กลูโคส 1% ยีสต์สกัด ด้วยความเค็ม 15 พีเอสยู) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าในฤดูฝน *Thraustochytriidae* sp.8 มีชีวมวลสูงสุดอยู่ในช่วง 21.50-22.43 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ *Thraustochytriidae* sp.14 มีค่าอยู่ในช่วง 18.84-20.20 กรัมต่อลิตร ส่วน *Thraustochytriidae* sp.15, *Thraustochytriidae* sp.11, *Aurantiochytrium* sp.2, *Aurantiochytrium* sp.1, *Aurantiochytrium* sp.3 มีค่าอยู่ในช่วง 18.78-20.11, 17.25-19.52, 16.34-19.41, 10-67-16.53 และ 10.16-15.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และทรอสโทโคตริคัสที่มีค่าต่ำที่สุด คือ *Schizochytrium* sp.2 มีค่าอยู่ในช่วง 4.64-5.20 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.21)

เมื่อพิจารณาชีวมวลในฤดูแล้ง พบว่า *Thraustochytriidae* sp.8, *Thraustochytriidae* sp.11 และ *Aurantiochytrium* sp.3 มีค่าใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 17.81-20.34, 17.53-21.06 และ 18.88-20.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน *Thraustochytriidae* sp.15, *Aurantiochytrium* sp.1, *Thraustochytriidae* sp.12, *P. sarkarianum* และ *Schizochytrium* sp.2 มีชีวมวลอยู่ในช่วง 14.08-18.70, 8.59-11.77, 6.47-8.61, 3.18-7.26 และ 4.66-5.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และชีวมวลที่น้อยที่สุดคือ *Thraustochytriidae* sp.13 มีค่าอยู่ในช่วง 2.24-2.67 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.22)

จากการศึกษาชีวมวลของทรอสโทโคตริคัสทั้งฤดูฝนและฤดูแล้ง จะเห็นได้ว่าฤดูฝนมีชีวมวลสูงกว่าฤดูแล้ง อาจเนื่องมาจากสภาพอากาศของแต่ละฤดูและปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน จึงทำให้พบปริมาณชีวมวลของทรอสโทโคตริคัสแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.21 ชีวมวลของทราสโตไคตริดส์แต่ละชนิดที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนในฤดูฝน

ทราสโตไคตริดส์	ชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	ทราสโตไคตริดส์	ชีวมวล (กรัมต่อลิตร)
<i>A. limacinum</i> BUCHA3BG 10-3	20.17	Thraustochytriidae sp.9BUCHA3BG 1-2	17.34
<i>A. limacinum</i> BUCHA3RA 7-1	12.70	Thraustochytriidae sp.9BUCHA3RA 2-2	17.51
<i>A. limacinum</i> BUCHA3XM 12-1	18.56	Thraustochytriidae sp.9BUCHA3XM 12-3	16.43
<i>A. limacinum</i> BUCHA3AcA 2-1	17.26	Thraustochytriidae sp.9BUCHA3AU 9-2	15.20
<i>A. limacinum</i> BUCHA3BS 8-2	21.37	Thraustochytriidae sp.9BUCHA3CT 1-1	15.89
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA1AA 5-1	14.87	Thraustochytriidae sp.10BUCHA3AA 5-3	16.38
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA2BG 7-3	16.26	Thraustochytriidae sp.10BUCHA3AcA 13-1	19.85
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA2HT 5-2	16.53	Thraustochytriidae sp.10BUCHA3XM 3-1	16.63
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA1SA 2-3	10.67	Thraustochytriidae sp.10BUCHA3LL 8-1	15.07
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA2RA 11-1/2	13.13	Thraustochytriidae sp.10BUCHA3CT 4-1	14.59
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA1RA 18-2	19.41	Thraustochytriidae sp.11BUCHA1RA 1-1	19.38
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA2LR 3-2	17.60	Thraustochytriidae sp.11BUCHA1SA 13-2	17.25
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA2RM 18-1	16.87	Thraustochytriidae sp.11BUCHA2AM 8-1	16.15
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA2SA 6-3	16.34	Thraustochytriidae sp.11BUCHA2BG 9-3/2	19.52
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA2SO 9-2	17.81	Thraustochytriidae sp.11BUCHA2CT 19-1/2	17.38
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA1SA 19-1	15.99	Thraustochytriidae sp.14BUCHA1AA 10-2/1	19.61
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA1TP 3-1	11.78	Thraustochytriidae sp.14BUCHA1RA 19-3	21.1
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA2LR 12-3/2	11.78	Thraustochytriidae sp.14BUCHA2BS 3-1	19.75
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA2RA 4-1/2	10.16	Thraustochytriidae sp.14BUCHA2HT 14-3	18.84
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2BUCHA2SO 16-2	13.70	Thraustochytriidae sp.14BUCHA2LR 20-1	20.20
<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA1TP 1-3/2	4.68	Thraustochytriidae sp.15BUCHA1TP 20-2	19.37
<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA1TP 17-3/2	4.82	Thraustochytriidae sp.15BUCHA2AA 14-3	19.74
<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA2BG 8-1	4.64	Thraustochytriidae sp.15BUCHA2CT 12-1	18.78
<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA2CT 19-3/2	5.20	Thraustochytriidae sp.15BUCHA2LL 8-2/1	20.11
<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA2SA 15-1	4.98	Thraustochytriidae sp.15BUCHA2RM 4-3/2	19.73
Thraustochytriidae sp.8BUCHA1TP 3-3	21.67		
Thraustochytriidae sp.8BUCHA2AA 20-3	21.93		
Thraustochytriidae sp.8BUCHA2AM 13-1	21.50		
Thraustochytriidae sp.8BUCHA2BS 10-3/1	22.27		
Thraustochytriidae sp.8BUCHA2LL 12-2	22.43		

ตารางที่ 4.22 ชีวมวลของทอรอสโทโคตริคส์แต่ละชนิดที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนในฤดูแล้ง

ทอรอสโทโคตริคส์	ชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	ทอรอสโทโคตริคส์	ชีวมวล (กรัมต่อลิตร)
<i>A. limacinum</i> BUCHA3BG 2-1	18.72	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10BUCHA3LR 11-3	16.89
<i>A. limacinum</i> BUCHA3CT 16-1	17.00	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10BUCHA3XM 20-1	16.34
<i>A. limacinum</i> BUCHA3RA 4-2	16.86	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10BUCHA3RM 19-1	16.87
<i>A. limacinum</i> BUCHA3AcA 9-1	16.61	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10BUCHA3LR 9-2	14.25
<i>A. limacinum</i> BUCHA3HT 5-2	16.55	<i>Thraustochytriidae</i> sp.10BUCHA3RM 4-2	15.22
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA1AA 10-1	11.77	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11BUCHA31TP 2-2	17.53
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA2BG 5-3/1	9.25	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11BUCHA32LR 5-1/1	14.65
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA2CT 14-3	8.98	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11BUCHA32LR 14-1	17.91
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA2LR 15-3	9.33	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11BUCHA32RA10-2	20.38
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1BUCHA2SO 1-2	8.59	<i>Thraustochytriidae</i> sp.11BUCHA32SA 15-3	21.06
<i>P.sarkarianum</i> BUCHA1AA 7-2	5.27	<i>Thraustochytriidae</i> sp.12BUCHA1TP 15-3	6.02
<i>P.sarkarianum</i> BUCHA2LR 11-1	7.26	<i>Thraustochytriidae</i> sp.12BUCHA2AA 6-2	5.46
<i>P.sarkarianum</i> BUCHA2LR 20-3	2.73	<i>Thraustochytriidae</i> sp.12BUCHA2BS 2-2	8.61
<i>P.sarkarianum</i> BUCHA2RA 18-2/2	4.14	<i>Thraustochytriidae</i> sp.12BUCHA2LL 20-1	7.12
<i>P.sarkarianum</i> BUCHA2SO 12-1	3.18	<i>Thraustochytriidae</i> sp.12BUCHA2RM 9-1/2	6.47
<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA1SA 2-1/1	5.08	<i>Thraustochytriidae</i> sp.13BUCHA2BG 9-2	2.49
<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA1TP 16-3	5.13	<i>Thraustochytriidae</i> sp.13BUCHA2LL 11-3	2.24
<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA2BS 15-3	5.09	<i>Thraustochytriidae</i> sp.13BUCHA2LR 17-2	2.38
<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA2RA 2-2	4.66	<i>Thraustochytriidae</i> sp.13BUCHA2RA 1-1/2	2.42
<i>Schizochytrium</i> sp.2BUCHA2RM 11-3	4.66	<i>Thraustochytriidae</i> sp.13BUCHA2SA 4-1	2.67
<i>Thraustochytriidae</i> sp.8BUCHA1AA 18-2	17.81	<i>Thraustochytriidae</i> sp.14BUCHA1SA 15-3	20.61
<i>Thraustochytriidae</i> sp.8BUCHA2AM 10-3	19.67	<i>Thraustochytriidae</i> sp.14BUCHA1TP 1-2	20.62
<i>Thraustochytriidae</i> sp.8BUCHA2BS 12-2	19.27	<i>Thraustochytriidae</i> sp.14BUCHA2AA 13-3	20.98
<i>Thraustochytriidae</i> sp.8BUCHA2HT 6-1	18.90	<i>Thraustochytriidae</i> sp.14BUCHA2HT 20-3	18.88
<i>Thraustochytriidae</i> sp.8BUCHA2SA 3-3/1	20.34	<i>Thraustochytriidae</i> sp.14BUCHA2S) 3-2	19.20
<i>Thraustochytriidae</i> sp.9BUCHA3RM 10-3	13.84	<i>Thraustochytriidae</i> sp.15BUCHA1RA 12-1	14.88
<i>Thraustochytriidae</i> sp.9BUCHA3RA 13-2	21.06	<i>Thraustochytriidae</i> sp.15BUCHA1SA 19-2	14.08
<i>Thraustochytriidae</i> sp.9BUCHA3XM 3-3	13.76	<i>Thraustochytriidae</i> sp.15BUCHA2Am 8-3	18.70
<i>Thraustochytriidae</i> sp.9BUCHA3HT 4-1	16.01	<i>Thraustochytriidae</i> sp.15BUCHA2BG 10-1	16.66
<i>Thraustochytriidae</i> sp.9BUCHA3AcA 4-2	14.85	<i>Thraustochytriidae</i> sp.15BUCHA2LL 20-3	17.71

2. กรดไขมันในทรอสโทโคไตรดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน

กรดไขมันในทรอสโทโคไตรดส์แต่ละชนิดทั้งฤดูฝนและฤดูแล้ง พบหลากหลายชนิดทั้งกรดไขมันที่อิ่มตัวและกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว โดยกรดไขมันในทรอสโทโคไตรดส์พบปริมาณสูงสุดคือ กรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) นอกจากนี้ทรอสโทโคไตรดส์สามารถผลิตกรดไขมันสำคัญ ได้แก่ เออาร์เอ (Arachidonic acid, ARA, C20:4) อีพีเอ (Eicosapentaenic acid, EPA, C20:5) ดีพีเอ (Docosahexaenoic acid, DPA, C22:5) และดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid, DHA, C22:6)

ปริมาณกรดไขมันในฤดูฝน พบว่าดีเอชเอเป็นกรดไขมันที่มีปริมาณสูงกว่ากรดไขมันสำคัญชนิดอื่น โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 12.42-145.49 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (11.34-32.91 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) ดีพีเอมีปริมาณอยู่ในช่วง 0.57-43.63 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (1.26-7.18 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) อีพีเอมีปริมาณอยู่ในช่วง 0.73-5.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (0.17-11.80 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) และเออาร์เอพบปริมาณน้อยที่สุดอยู่ในช่วง 0.33-1.86 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (0.07-4.11 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) ซึ่งทรอสโทโคไตรดส์ที่พบปริมาณดีเอชเอสูงที่สุดคือ *A. limacinum* (ตารางที่ 4.23 และภาพที่ 4.32)

ในขณะที่ปริมาณกรดไขมันในฤดูแล้ง พบว่าดีเอชเอมีปริมาณอยู่ในช่วง 4.47-136.93 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (5.46-32.40 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) ดีพีเอมีปริมาณอยู่ในช่วง 0.45-30.51 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (1.64-6.38 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) อีพีเอมีปริมาณอยู่ในช่วง 0.77-5.74 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (0.19-12.75 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) และเออาร์เอเป็นกรดไขมันสำคัญที่พบปริมาณน้อยที่สุดอยู่ในช่วง 0.11-2.35 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (0.02-5.21 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) ส่วนทรอสโทโคไตรดส์ที่พบปริมาณดีเอชเอสูงที่สุดคือ *Thraustochytriidae* sp.11 (ตารางที่ 4.24 และภาพที่ 4.33)

ปริมาณกรดไขมันทั้งสองฤดูจะเห็นได้ว่าปริมาณกรดไขมันทรอสโทโคไตรดส์ที่คัดแยกในฤดูฝนมีปริมาณสูงกว่าในฤดูแล้ง เนื่องจากสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศในฤดูแล้งอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญและความสามารถในการผลิตกรดไขมันของทรอสโทโคไตรดส์ ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าทรอสโทโคไตรดส์มีชีวมวลและปริมาณดีเอชเอค่อนข้างสูง จึงมีศักยภาพที่จะนำไปศึกษาหรือใช้ประโยชน์ต่อไปได้ (ภาพที่ 4.34 – 4.35)

ตารางที่ 4.23 ปริมาณกรดไขมันเฉลี่ยในทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนในฤดูฝน

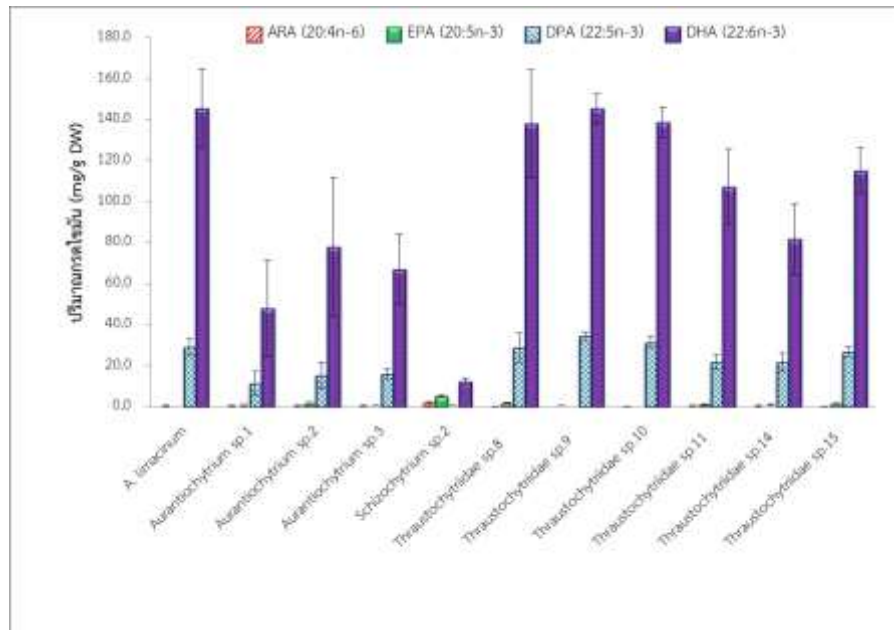
Thraustochytrids	ARA (C20:4 n-6)		EPA (C20:5 n-3)		DPA (C22:5 n-3)		DHA (22:6 n-3)	
	mg/g DW	% of total FA	mg/g DW	% of total FA	mg/g DW	% of total FA	mg/g DW	% of total FA
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	0.38±0.05	0.09±0.01	ND	ND	28.99±4.16	6.57±0.67	145.49±18.97	32.91±2.57
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	0.37±0.16	0.09±0.05	0.73±0.44	0.17±0.10	11.43±5.91	2.70±1.30	48.01±23.26	11.34±5.18
<i>Aurantiochytrium</i> sp.2	0.40±0.05	0.08±0.01	1.51±0.66	0.33±0.16	15.34±6.55	3.30±1.47	77.99±33.67	16.73±7.46
<i>Aurantiochytrium</i> sp.3	0.36±0.18	0.11±0.06	0.95±0.11	0.30±0.03	16.17±2.45	5.01±0.52	67.11±17.16	20.66±4.18
<i>Schizochytrium</i> sp.2	1.86±0.38	4.11±0.69	5.11±0.46	11.80±3.26	0.57±0.12	1.26±0.19	12.42±1.54	28.25±6.87
Thraustochytriidae sp.8	0.34±0.03	0.08±0.01	1.73±0.11	0.39±0.06	28.88±7.09	6.35±0.80	137.90±26.20	30.50±1.99
Thraustochytriidae sp.9	0.46±0.04	0.10±0.00	ND	ND	34.38±2.09	7.18±0.29	145.31±7.37	30.38±1.59
Thraustochytriidae sp.10	0.39±0.03	0.08±0.01	ND	ND	31.34±2.71	6.71±0.85	138.82±7.51	29.69±2.59
Thraustochytriidae sp.11	0.37±0.05	0.09±0.01	1.28±0.59	0.32±0.14	21.60±3.51	5.41±0.85	107.52±18.28	26.88±3.83
Thraustochytriidae sp.14	0.43±0.28	0.11±0.08	0.81±0.17	0.22±0.04	21.72±4.39	5.81±0.92	81.92±17.16	21.90±3.56
Thraustochytriidae sp.15	0.33±0.03	0.07±0.00	1.50±0.18	0.30±0.03	26.75±2.30	5.74±0.50	115.28±11.26	23.09±2.01

หมายเหตุ ND มีปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจวัดได้

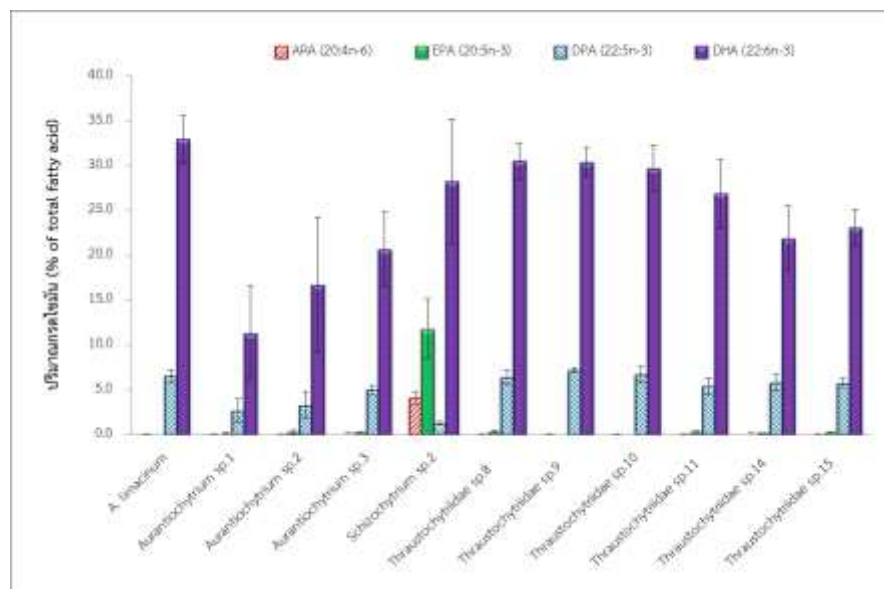
ตารางที่ 4.24 ปริมาณกรดไขมันเฉลี่ยในทรอสโทโคตริคส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนในฤดูแล้ง

Thraustochytrids	ARA (C20:4 n-6)		EPA (C20:5 n-3)		DPA (C22:5 n-3)		DHA (22:6 n-3)	
	mg/g DW	% of total FA	mg/g DW	% of total FA	mg/g DW	% of total FA	mg/g DW	% of total FA
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	0.11±0.13	0.02±0.03	ND	ND	16.53±6.47	3.94±1.25	88.30±33.51	21.00±6.44
<i>Aurantiochytrium</i> sp.1	0.30±0.25	0.08±0.07	0.77±0.11	0.19±0.03	11.96±2.17	2.99±0.57	47.98±10.43	12.01±2.85
<i>P. sarkarianum</i>	1.08±0.44	1.46±0.29	0.92±0.64	1.20±0.67	4.92±2.66	6.38±2.52	4.22±2.31	5.46±2.27
<i>Schizochytrium</i> sp.2	2.35±0.20	5.21±0.43	5.74±0.29	12.75±0.40	0.74±0.08	1.64±0.16	14.61±1.11	32.40±1.16
Thraustochytriidae sp.8	0.29±0.07	0.07±0.02	1.34±0.18	0.30±0.05	25.47±3.49	5.67±0.59	119.34±16.86	26.63±3.38
Thraustochytriidae sp.9	0.25±0.17	0.06±0.04	ND	ND	24.04±12.10	5.93±2.75	96.57±37.3	23.83±7.01
Thraustochytriidae sp.10	0.19±0.09	0.04±0.02	ND	ND	18.95±10.05	4.31±3.81	88.60±9.95	20.01±9.48
Thraustochytriidae sp.11	0.42±0.06	0.10±0.01	1.84±0.26	0.41±0.04	27.17±3.01	6.12±0.39	136.93±18.00	30.84±2.92
Thraustochytriidae sp.12	0.37±0.11	0.35±0.05	1.04±0.42	0.97±0.24	5.61±1.96	5.24±0.42	13.70±5.71	12.56±1.55
Thraustochytriidae sp.13	1.27±0.58	5.07±1.24	2.38±0.80	9.72±2.0	0.45±0.28	1.72±0.71	4.47±1.84	18.01±5.06
Thraustochytriidae sp.14	0.33±0.10	0.08±0.02	1.43±0.16	0.36±0.03	30.51±3.84	7.71±0.40	113.22±13.94	28.61±1.05
Thraustochytriidae sp.15	0.38±0.03	0.08±0.01	1.69±0.16	0.34±0.03	28.29±2.38	5.74±0.50	113.89±9.79	23.09±2.01

หมายเหตุ ND มีปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจวัดได้

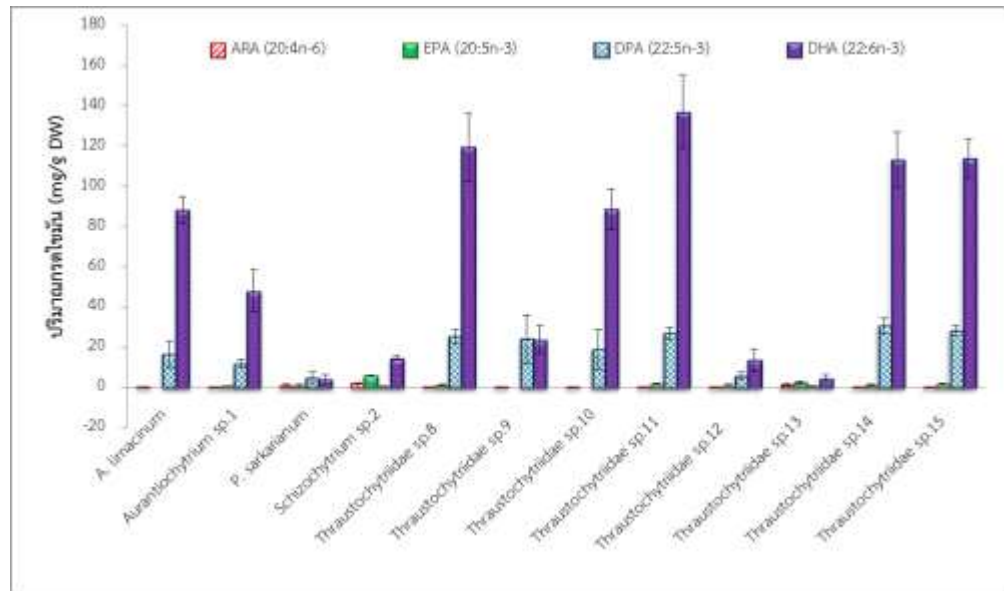


ก.

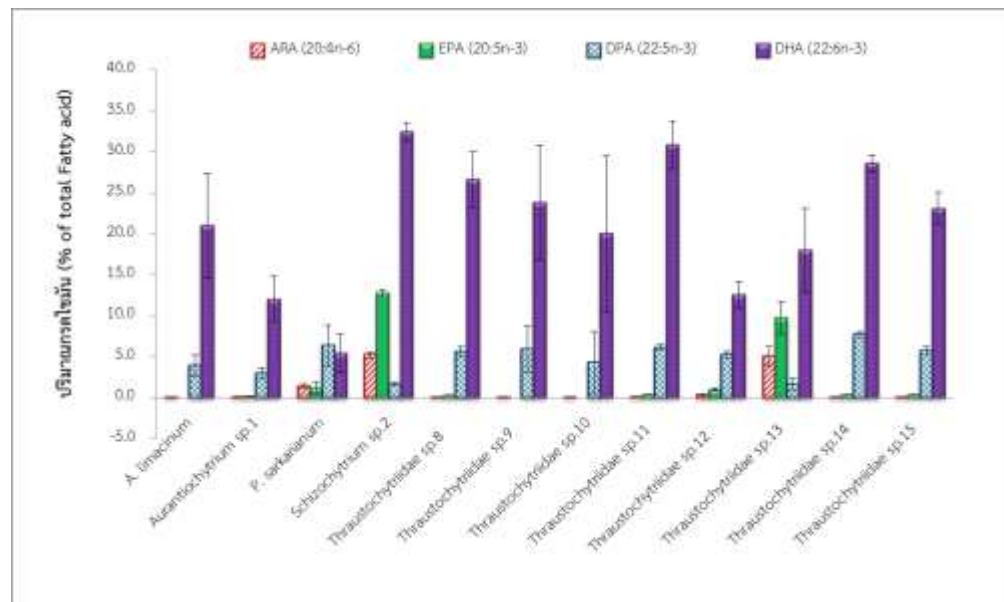


ข.

ภาพที่ 4.32 ปริมาณกรดไขมันเออาร์เอ อีพีเอ ดีพีเอและดีเอชเอ ในมรอสโทโคทริคส์แต่ละชนิดที่คัดแยกได้จากไปไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรีในฤดูฝน
 ก. มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ข.เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด

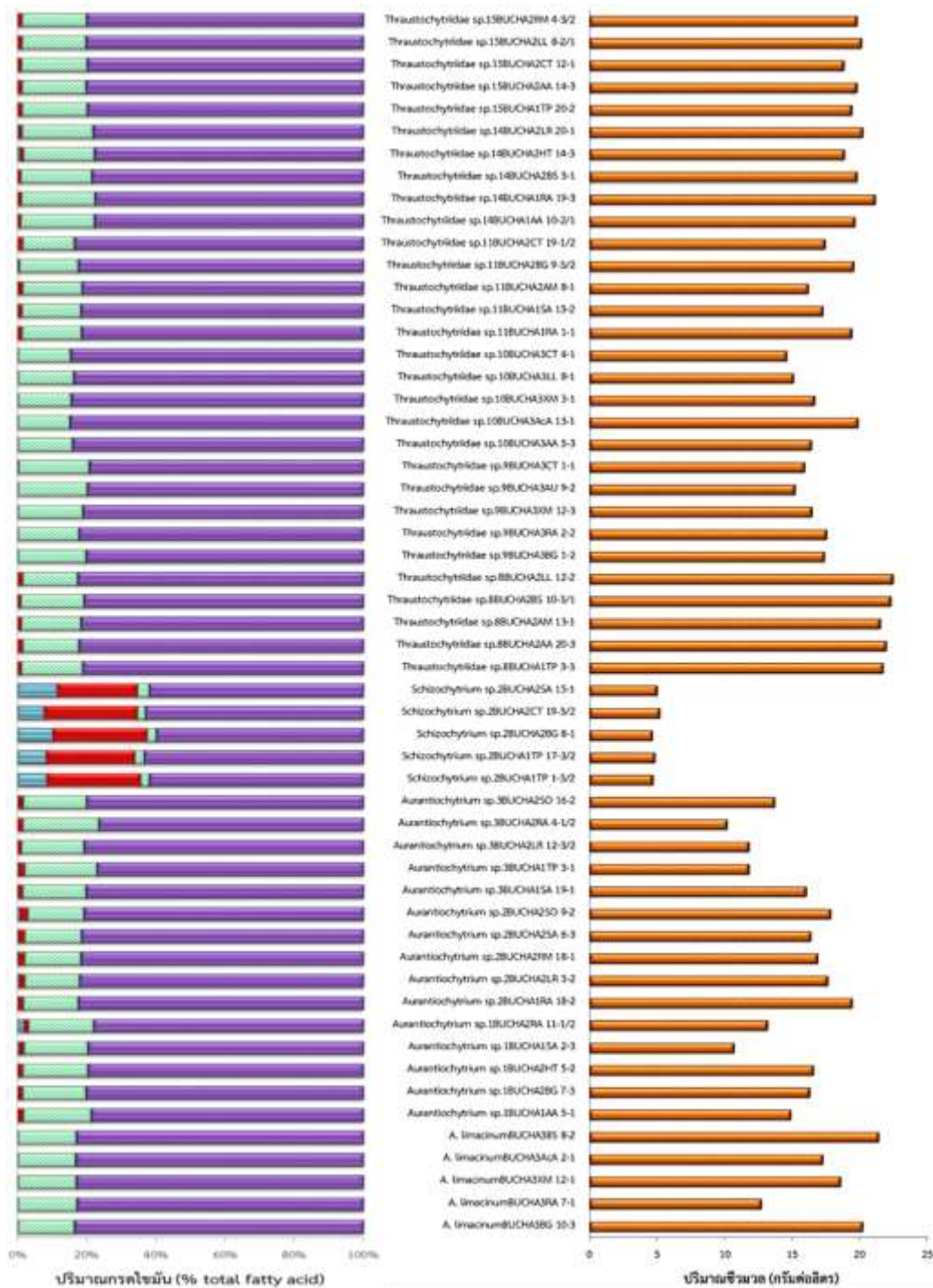


ก.



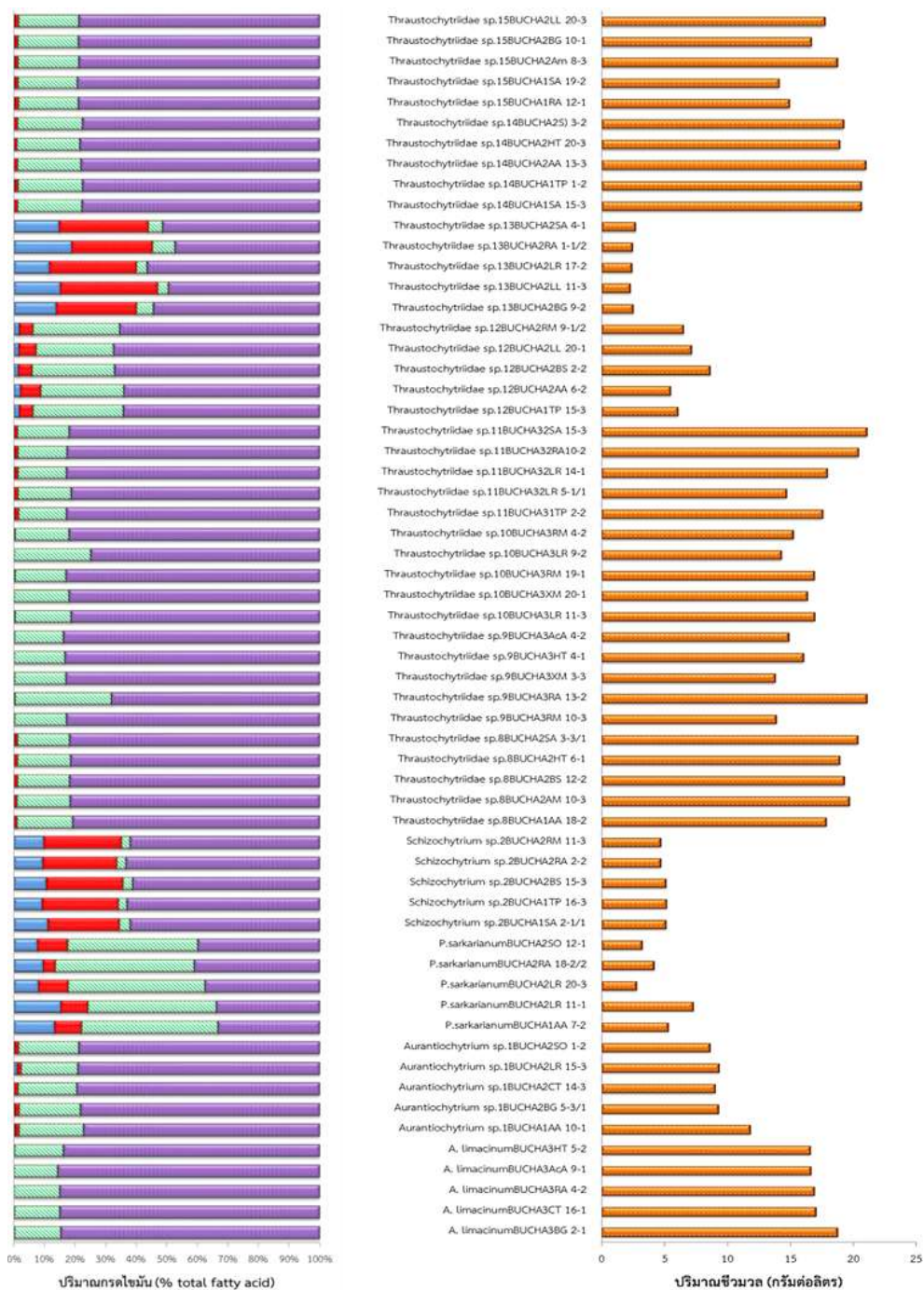
ข.

ภาพที่ 4.33 ปริมาณกรดไขมันเออาร์เอ อีพีเอ ดีพีเอและดีเอชเอ ในมรอสโทโคทริดส์แต่ละชนิดที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรีในฤดูร้อน
 ก. มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ข.เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด



■ Arachidonic acid (ARA)
 ■ Eicosapentaenoic acid (EPA)
 ■ Docosapentaenoic acid (DPA)
■ Docosahexaenoic acid (DHA)
 ■ Biomass (g/L)

ภาพที่ 4.34 ปริมาณชีวมวลและปริมาณกรดไขมันของทรอสโทโคไตรดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรีในฤดูฝน ก.) สัดส่วนกรดไขมันเออาร์เอ อีพีเอ ดีพีเอและดีเอชเอ ข.) ปริมาณชีวมวล



ภาพที่ 4.35 ปริมาณชีวมวลและปริมาณกรดไขมันของทรอสโทโคไตรดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรีในฤดูแล้ง
 ก.) สัดส่วนกรดไขมันเออาร์เอ อีพีเอ ดีพีเอและดีเอชเอ ข.) ปริมาณชีวมวล

บทที่ 5

อภิปราย สรุปและข้อเสนอแนะ

1. ความหลากหลายและความชุกชุมของทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี จากการศึกษาสามารถคัดแยกทรอสโทโคตริดส์จากบริเวณป่าชายเลนทั้ง 3 สถานี จังหวัดจันทบุรีได้ทั้งสิ้น 14 ชนิด จำนวน 1,525 ไอโซเลท ได้แก่ *A. limacinum*, *Aurantiochytrium* sp.1, *Aurantiochytrium* sp.2, *Aurantiochytrium* sp.3, *P. sarkarianum*, *Shizochytrium* sp.2, *Thraustochytriidae* sp.8, *Thraustochytriidae* sp.9, *Thraustochytriidae* sp.10, *Thraustochytriidae* sp.11, *Thraustochytriidae* sp.12, *Thraustochytriidae* sp.13, *Thraustochytriidae* sp.14, *Thraustochytriidae* sp.15 ซึ่งในการศึกษารั้งนี้พบว่า ลักษณะโคโลนีที่เลี้ยงในอาหารแข็งมีบทบาทสำคัญในการจำแนกทรอสโทโคตริดส์ เช่น สี ลักษณะเนื้อโคโลนี ความสูง ขอบโคโลนี อีกทั้งยังอาศัยลักษณะของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวร่วมด้วย เช่น การกระจายตัวของเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งการศึกษาโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกทรอสโทโคตริดส์นั้น สามารถจำแนกได้ชัดเจนคือมีการแบ่งเซลล์แบบทวีคูณอย่างต่อเนื่อง (successive binary division) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของทรอสโทโคตริดส์จีโนส *Aurantiochytrium*, *Shizochytrium* และ *Oblongichytrium* (Yokoyama and Honda, 2007) สำหรับการคัดแยกครั้งนี้ทรอสโทโคตริดส์เกือบทุกกลุ่มมีการแบ่งเซลล์แบบ binary division แต่สปีชีส์มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป คือ *A. limacinum* กับ *Aurantiochytrium* sp.1 มีลักษณะการกระจายของอะมิบอยด์เซลล์แผ่ออกไปนอกแนวที่ขีด เนื่องจากมีอะมิบอยด์เซลล์คืบคลานเป็นจำนวนมาก ส่วน *Aurantiochytrium* sp.2 มีลักษณะคล้ายกับสปีชีส์ *A. limacinum* แต่มีลักษณะเซลล์ที่มีขนาดใหญ่และมีโคโลนีโปร่งแสง สำหรับ *Aurantiochytrium* sp.3 มีความแตกต่างกับสปีชีส์ที่กล่าวมาคือมีรูปร่างกลมและพบเซลล์ขนาดเล็กบริเวณขอบโคโลนี

นอกจากนี้ยังพบการแบ่งตัวแบบ binary division ในทรอสโทโคตริดส์ที่ไม่สามารถระบุจีโนสได้คือ *Thraustochytriidae* sp.8, *Thraustochytriidae* sp.9, *Thraustochytriidae* sp.10, *Thraustochytriidae* sp.11, *Thraustochytriidae* sp.12, *Thraustochytriidae* sp.14 และ *Thraustochytriidae* sp.15 มีลักษณะสัณฐานคล้ายกับจีโนส *Auratiochytrium* ซึ่งจะแตกต่างกันเล็กน้อย ทรอสโทโคตริดส์สปีชีส์ *Thraustochytriidae* sp.8 ขอบเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย มีความหนูนสูงแตกต่างจากสปีชีส์อื่น ๆ ส่วน *Thraustochytriidae* sp.9 กับ *Thraustochytriidae* sp.10 คล้ายกับ *A. limacinum* แต่โคโลนีมีรูปร่างกลม สำหรับ *Thraustochytriidae* sp.11 กับ *Thraustochytriidae* sp.14 มีขนาดเซลล์ที่ใหญ่และพบเซลล์กลมบริเวณขอบโคโลนี ซึ่ง *Thraustochytriidae* sp.11 มีขนาดเซลล์ที่บริเวณขอบโคโลนีใหญ่และทึบกว่าและ *Thraustochytriidae* sp.12 กับ *Thraustochytriidae* sp.15 มีขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย พบเซลล์เล็ก ๆ บริเวณขอบโคโลนีและ *Thraustochytriidae* sp.13 มีสีโคโลนีส้มอ่อน

Shizochytrium sp.2 พบเซลล์ขนาดใหญ่กว่าจีโนส *Auratiochytrium* เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม มีเอกโตพลาสมีคเนทพัฒนาดี ส่วน *Thraustochytriidae* sp.14 มีลักษณะคล้าย *Shizochytrium* sp.2 แต่โคโลนีมีสีขาว และ *P. sarkarianum* ไม่พบการแบ่งเซลล์แบบ binary division เซลล์มีขนาดใหญ่ ผันงเซลล์หนาและมีหลายชั้น

ในการศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่พบทรอสโทโคตริดส์ที่มีลักษณะคล้ายกับจีนัส *Auratiochytrium*, *Shizochytrium* และ *P. sarkarianum* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Unagul et al. (2017) ที่คัดแยกทรอสโทโคตริดส์ในประเทศไทย ส่วนใหญ่พบ *A. limacinum*, *Schizochytrium*, *Parietichytrium* และ *Thraustochytrium* ในขณะที่ Fan and Jones (2002) พบทรอสโทโคตริดส์ 8 สายพันธุ์ คือ *Schizochytrium* sp. KF-1, *S. mangrovei* KF-12, KF-7, KF-12, *T. striatum* KF-9 และ *Ulkenia* KF-19 จากตัวอย่างใบไม้ที่ร่วงหล่นในป่าชายเลน ประเทศฮ่องกง ส่วน จุฬาลักษณ์ จันทบาลและคณะ (2550) พบ *Schizochytrium mangrovei*, *S. limacinum*, *Schizochytrium* sp.2 และ *Ulkenia visurgensis* โดยพบ *Schizochytrium mangrovei* เป็นชนิดเด่นบริเวณป่าชายเลนบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร) และ มยุรา ประยูรพันธ์ และคณะ (2551) คัดแยกทรอสโทโคตริดส์จากใบไม้ป่าชายเลน อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ พบทรอสโทโคตริดส์ 184 ไอโซเลท โดยโงกทางใบเล็กและฟังกาหัวสุ่มดอกแดง เป็นพันธุ์ไม้ที่มีความถี่ของการพบสูงสุด 75% ขณะที่ปอทะเลพบทรอสโทโคตริดส์ต่ำสุด 15% และพบทรอสโทโคตริดส์ 1 สกุล 3 ชนิด คือ *Schizochytrium mangrovei* (41.44%), *S. limacinum* (10%) และ *Schizochytrium* sp.8 (1.11%) โดย *S. mangrovei* เป็นชนิดที่พบสูงสูด นอกจากนี้ สударัตน์ แท่นเนี่ยว นิยม กำลั้งดี และภูวดล บางรักซ์ (2556) คัดแยกทรอสโทโคตริดส์จากใบโงกทางใบเล็กจากป่าชายเลน อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ได้ 7 ไอโซเลท คือ *Schizochytrium* spp. (ไอโซเลท PN-123, PN142, PN-152, BJ-11, BJ-21, BJ-51 และ BJ-61) ทิวาพร ทองประสม, สударัตน์ สวนจิตรและสมถวิล จริตควร (2018) พบทรอสโทโคตริดส์บริเวณป่าชายเลนทุ่งโปรงทอง จังหวัดระยองในฤดูแล้งและฤดูฝน ได้ 3 สกุล (7 ชนิด) ได้แก่ สกุล *Aurantiochytrium* จำนวน 5 ชนิด (*Aurantiochytrium* sp.1, *Aurantiochytrium* sp.2, *Aurantiochytrium* sp.3, *Aurantiochytrium* sp.4 และ *Aurantiochytrium* sp.5) สกุล *Parietichytrium* จำนวน 1 ชนิด (*Parietichytrium* sp.) สกุล *Schizochytrium* จำนวน 1 ชนิด (*Schizochytrium* sp.2) และทรอสโทโคตริดส์ที่ไม่สามารถจำแนกได้ 2 ชนิดคือ Thraustochytriidae 8 และ Thraustochytriidae 9 ส่วน Jaritkhuan and Suanjit (2018) พบทรอสโทโคตริดส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่นบริเวณป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี พบทั้งสิ้น 10 สกุล คือ *Aurantiochytrium mangrovei*, *A. limacinum*, *Aurantiochytrium* sp.1, *Aurantiochytrium* sp.2, *Aurantiochytrium* sp.3, *Aurantiochytrium* sp.4, *Aurantiochytrium* sp.5, *Aurantiochytrium* sp.7, Unknown 1 และ Unknown 2

2. การจัดจำแนกทรอสโทโคตริดส์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

จากรายงานการศึกษาจนถึงปัจจุบัน การจำแนกทรอสโทโคตริดส์อาศัยลักษณะของวงชีวิต สัณฐาน โครงสร้างต่าง ๆ สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและลักษณะทางชีวเคมี (รูปแบบของ PUFA และ carotenoids) ซึ่งจัดแบ่งทรอสโทโคตริดส์ออกเป็น 9 จีนัส กล่าวคือ *Thraustochytrium* (Sparrow, 1936), *Japonochytrium* (Kobayashi & Ookubo, 1953), *Schizochytrium* (Goldstein & Belsky, 1964), *Ulkenia* (Gaertner, 1977), *Aurantiochytrium* (Yokoyama & Honda, 2007), *Sicyoidochytrium*, *Parietichytrium* และ *Botryochytrium* (Yokoyama et al., 2007) และ *Monorhizochytrium* (Doi and Honda, 2017) โดยมี 2 จีนัสซึ่งมีความใกล้เคียงกันมากกับทรอสโทโคตริดส์คือ *Oblongichytrium* (Yokoyama and Honda, 2007) และ *Althornia* (Jones and Alderman, 1971) ซึ่งเคยมีตำแหน่งทางอนุกรมวิธานอยู่ในแฟมิลีเดียวกันคือ Thraustochytridae แต่ในปัจจุบันไม่ได้ถูกจัดวางอยู่ในแฟมิลีนี้อีกต่อไป

ทรอสโทโคทริดส์จิ้นส์ต่าง ๆ ดังกล่าวพบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในระบบนิเวศทางทะเล โดยเฉพาะป่าชายเลน ซึ่งมีการทับถมของสารอินทรีย์ต่าง ๆ ทั้งที่อยู่ภายในระบบนิเวศเองและสารอินทรีย์ที่มีจากภายนอก ทำให้ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่มีความอุดมสมบูรณ์ ในการศึกษานี้ได้คัดแยกทรอสโทโคทริดส์จากใบไม้ที่ร่วงหล่นในป่าชายเลน จังหวัดจันทบุรี ในการจัดจำแนกนอกจากอาศัยลักษณะด้านสัณฐานและวงชีวิตแล้ว ผู้วิจัยยังได้คัดเลือกบางไอโซเลทที่มีลักษณะที่แตกต่างกันมาจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

การจัดจำแนกทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนำรหัสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) เป็นวิธีมาตรฐานทางอนุพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการจัดจำแนกจุลินทรีย์กลุ่มยูคาริโอตโดยทั่วไป ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ยีน 18S rRNA เป็นยีนเป้าหมาย โดยใช้คู่ไพรเมอร์ไพรเมอร์ยูนิเวอร์ซัล 2 คู่ คือ 18S001/18S13 (White et al., 1990) และ NS1/NS8 (Honda et al., 1999) อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ทั้งสองคู่ดังกล่าวนี้สามารถเพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA ได้จากทรอสโทโคทริดส์เพียง 7 ไอโซเลท จากทั้งหมด 11 ไอโซเลท ที่คัดเลือกมาศึกษา ทำให้คาดว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของทรอสโทโคทริดส์ 4 ไอโซเลท ซึ่งไม่สามารถถูกเพิ่มปริมาณได้นั้น อาจมีความแปรผันไปจากลำดับเบสอนุรักษ์ที่ปรากฏอยู่โดยทั่วไป อันเป็นผลสืบเนื่องมาจากกระบวนการทางวิวัฒนาการในรูปแบบต่าง ๆ เช่น เช่น การแทนที่คู่เบส (base-pair substitution) การเพิ่มหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ (insertion/deletion) ทั้งนี้อาจจำเป็นต้องมีการออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่ หรือทดลองจากคู่ไพรเมอร์อื่น ๆ ที่มีรายงานว่าสามารถนำมาใช้เพิ่มปริมาณยีน 18S rRNA ได้ (Marchan, et al., 2017)

ทรอสโทโคทริดส์ที่ในงานวิจัยนี้สามารถเพิ่มปริมาณยีนเครื่องหมาย 18S rRNA และวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้นั้นมีจำนวน 7 ไอโซเลท คือ BUCAR2Am 10-3, BUCAS3XM 12-3, BUCAS3LR 17-1, BUCAR2LR 3-2, BUCAS1AA 10-1, BUCAS2LR 11-1 และ BUCAR1SA 19-1 การระบุแทกซอนของทรอสโทโคทริดส์ในการศึกษานี้ใช้ข้อมูลสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับค่าความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18SrRNA โดยกำหนดระดับ similarity cutoff สำหรับแทกซอนระดับจิ้นส์และสปีชีส์อยู่ที่ 95% และ 98% ตามลำดับ พบว่า BUCAR2Am 10-3, BUCAS3XM 12-3, BUCAS3LR 17-1, BUCAR2LR 3-2, BUCAS1AA 10-1, และ BUCAR1SA 19-1 มีสายวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมากกับ *Aurantiochytrium limacinum* อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากเกณฑ์การระบุแทกซอนดังกล่าวข้างต้น มีเพียงไอโซเลท BUCAS1AA 10-1 ที่สามารถระบุแทกซอนระดับสปีชีส์ได้ว่าเป็น *Aurantiochytrium limacinum* ในขณะที่ไอโซเลท BUCAR2LR 3-2 และ BUCAR1SA 19-1 ระบุแทกซอนได้ในระดับจิ้นส์ คือ *Aurantiochytrium* ส่วนทรอสโทโคทริดส์ที่เหลือในกลุ่มนี้อีก 3 ไอโซเลท (BUCAR2Am 10-3, BUCAS3XM 12-3 และ BUCAS3LR 17-1) สามารถระบุแทกซอนได้เพียงระดับแฟมิลีเท่านั้น คือ Thraustochytriidae แต่เนื่องจากทรอสโทโคทริดส์ทั้ง 3 ไอโซเลทนี้มีสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดที่สุดกับ *Aurantiochytrium limacinum* ในการศึกษาจึงระบุแทกซอนชั่วคราวให้เป็น *Aurantiochytrium limacinum*-like species ซึ่งเมื่อพิจารณาแผนภูมิต้นไม้ที่แสดงสายวิวัฒนาการแล้ว BUCAR2Am 10-3, BUCAS3XM 12-3 และ BUCAS3LR 17-1 ก็มีลักษณะเชิงวิวัฒนาการที่เริ่มแยกตัวออกจากบรรพบุรุษร่วมเมื่อไม่นานมานี้ปรากฏให้เห็นอยู่เช่นกัน ในอีกทางหนึ่ง การจำแนกทรอสโทโคทริดส์ไอโซเลท BUCAS2LR 11-1 สามารถระบุได้เป็น *Parietichytrium sarkarianum*

ยีน 18S rRNA ถึงแม้จะถูกยอมรับและนำมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายมาตรฐานสำหรับจัดจำแนกทรอสโทโคทริดส์ แต่ข้อด้อยของยีนนี้คือมีลักษณะที่อนุรักษ์สูงมาก ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้จึงอาจมีประสิทธิภาพในการบ่งชี้ความแตกต่างได้ไม่มากเท่าที่ควร ในโอกาสต่อไปจึงควรมีการนำยีนหรือดีเอ็นเอเครื่องหมายอื่น ๆ ที่มีลักษณะของการวิวัฒนาการที่เร็วกว่า เช่น Internal transcribed spacer (ITS) หรือ D1/D2 domain ของยีน rRNA มาวิเคราะห์ร่วมกับยีน 18S rRNA เพื่อทำให้การจัดจำแนกทรอสโทโคทริดส์ที่มีความใกล้เคียงกันมาก ๆ มีประสิทธิภาพมากขึ้น

3. ความถี่ของการพบทรอสโทโคทริดส์จากใบไม้ป่าชายเลน

จากการศึกษาความถี่ของการพบทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนทั้ง 3 สถานี ในช่วงฤดูแล้งและฤดูฝน พบว่าสถานีที่ 2 มีจำนวนไอโซเลทสูงสุดเท่ากับ 817 ไอโซเลท รองลงมาคือสถานีที่ 3 เท่ากับ 356 ไอโซเลท ส่วนสถานีที่ 1 เท่ากับ 352 ไอโซเลท สำหรับจำนวนทรอสโทโคทริดส์พบสูงสุดที่สถานีที่ 2 เช่นกันเท่ากับ 11 ชนิด รองลงมาคือสถานีที่ 1 จำนวน 10 ชนิด ส่วนสถานีที่ 3 จำนวน 4 ชนิด ซึ่งทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกในฤดูฝนมีความถี่ของการพบอยู่ในช่วง 5-75 เปอร์เซ็นต์ โดย *Thraustochytriidae* sp.14 มีความถี่ของการพบสูงสุด (75 เปอร์เซ็นต์) ส่วนทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกในฤดูแล้งมีความถี่ของการพบอยู่ในช่วง 5-85 เปอร์เซ็นต์ โดย *Aurantiochytrium* sp.1 กับ *Thraustochytriidae* sp.14 มีความถี่ของการพบสูงสุด (85 เปอร์เซ็นต์) และสถานีที่พบทรอสโทโคทริดส์สูงที่สุดคือ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี อย่างไรก็ตาม จุฬาลักษณ์ จันทบาล (2550) พบทรอสโทโคทริดส์ทั้งหมด 893 ไอโซเลท จำแนกได้ 2 สกุล 4 ชนิดจากป่าชายเลนจังหวัดกรุงเทพมหานคร โดยเดือนพฤศจิกายนพบทรอสโทโคทริดส์สูงสุด 69.54 % (334 ไอโซเลท) รองลงมาคือเดือนกรกฎาคม 64.50% (318 ไอโซเลท) และเดือนมีนาคมพบน้อยที่สุด 60% (241 ไอโซเลท) ซึ่งพบสูงสุดในเดือนพฤศจิกายน ส่วน Leano (2001) เก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลน 11 ชนิดจากป่าชายเลน Panay ประเทศฟิลิปปินส์ พบทรอสโทโคทริดส์ 85-100% จากตัวอย่างใบไม้ทุกชนิดที่ทำการศึกษา โดยชนิดที่พบสูงสุดคือ *S. mangrovei* (40-100% จากตัวอย่างใบไม้ทั้งหมด) นอกจากนี้ยังพบ *Thraustochytrium* sp. แต่คัดแยกได้เฉพาะจากใบตะบูนขาวและโก่งกางใบเล็ก และ Chatdumrong, Yongmanitchai, Limtong and Worawattanamatekul (2004) พบทรอสโทโคทริดส์ 257 ไอโซเลท จากการเก็บตัวอย่างใบไม้ป่าชายเลนตลอดชายฝั่งทะเลประเทศไทย ประกอบด้วย 120 ไอโซเลท จากป่าชายเลนฝั่งอันดามัน 83 ไอโซเลทจากฝั่งอ่าวไทย และ 62 ไอโซเลทจากเขตภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

พันธุ์ไม้ป่าชายเลนแต่ละชนิดมีความถี่ของการพบแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับลักษณะใบไม้ ได้แก่ ใบอวบน้ำ เช่น โก่งกางใบเล็ก โก่งกางใบใหญ่ ฝาดดอกขาว ใบแสม เป็นต้น หรือแบนบาง เช่น ใบโพทะเล ปอทะเล รวมทั้งความชื้นของใบที่พบว่าใบที่มีความชื้นมากจะมีความถี่ของการพบมากกว่าใบที่แห้ง ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างใบไม้จึงควรเก็บใบไม้เปียกชื้น นอกจากนี้ฤดูกาลมีผลต่อชนิดและความถี่ของการพบทรอสโทโคทริดส์ โดยส่วนใหญ่พบชนิดของทรอสโทโคทริดส์และความถี่ของการพบในฤดูแล้งมากกว่าฤดูฝน สอดคล้องกับ Ranghukumar and Geartner (1992) ที่พบว่าฤดูหนาวมีความถี่ของการพบทรอสโทโคทริดส์ในน้ำทะเลน้อยกว่าฤดูร้อน แต่ความถี่ของการพบทรอสโทโคทริดส์ในดินตะกอนทั้งในฤดูหนาวและฤดูร้อนไม่แตกต่างกัน

3. กรดไขมันในทออสโทโคตริดส์

ชีวมวลของทออสโทโคตริดส์แต่ละชนิดที่คัดแยกในฤดูฝนมีค่าอยู่ในช่วง 4.00-22.43 กรัมต่อลิตร โดย *Thraustochytriidae* sp.8 มีชีวมวลสูงที่สุด ส่วนฤดูแล้งมีชีวมวลอยู่ในช่วง 3.18-21.06 กรัมต่อลิตร และ *Thraustochytriidae* sp.11 มีชีวมวลสูงสุด

ปริมาณกรดไขมันในทออสโทโคตริดส์ที่คัดแยกในฤดูฝน พบว่า *Schizochytrium* sp.2 มีปริมาณกรดไขมันเออาร์เอและอีพีเอสสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 1.86 ± 0.38 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (4.11 ± 0.69 % of total FA) และ 5.11 ± 0.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (11.80 ± 3.26 % of total FA) ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดไขมันดีพีเอพบเฉลี่ยสูงสุดใน *Thraustochytriidae* sp.9 เท่ากับ 34.38 ± 2.09 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (7.18 ± 0.29 % of total FA) และดีเอชเอพบว่า *A. limacinum* มีปริมาณกรดไขมันเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 145.91 ± 18.97 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (32.91 ± 2.57 % of total FA)

ส่วนฤดูแล้งพบว่า *Schizochytrium* sp.2 มีปริมาณเออาร์เอและอีพีเอสเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.35 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (5.21 ± 0.43 % of total FA) และ 5.74 ± 0.29 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนปริมาณดีพีเอพบเฉลี่ยสูงสุดใน *Thraustochytriidae* sp.14 เท่ากับ 30.51 ± 3.84 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (7.71 ± 0.40 % of total FA) และ *Thraustochytriidae* sp.11 มีปริมาณดีเอชเอเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 136.93 ± 18.00 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (30.84 ± 2.92 % of total FA) สอดคล้องกับมยุรา ประยูรพันธ์และคณะ (2549) พบกรดไขมันดีเอชเอในปริมาณสูง (15.41 - 180.74 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง, 8.79 - 48.60 %กรดไขมันทั้งหมด) กรดไขมันอีพีเอ (0.25 - 7.42 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง, 0.15 - 6.17 %กรดไขมันทั้งหมด) และกรดไขมันเออาร์เอ (0.16 - 3.85 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง, 0.09 - 3.94 %กรดไขมันทั้งหมด) Bowles (1997) รายงานการพบดีเอชเอในทออสโทโคตริดส์ 17 สายพันธุ์ มีค่าอยู่ในช่วง 2.78 - 37.95 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด และ Fan *et al.* (2001) พบว่าทออสโทโคตริดส์ 9 สายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหาร GY สามารถผลิตกรดไขมันอีพีเออยู่ในช่วง 1.4 - 12.5 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด และดีเอชเอ 4.0 - 41.1 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด แต่เมื่อนำทออสโทโคตริดส์มาเพาะเลี้ยงใน Okara Medium พบว่าปริมาณกรดไขมันลดลง คืออีพีเอมีค่าอยู่ในช่วง 0 - 1.8 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด และดีเอชเอ 0.5 - 4.9 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ส่วน Kamlangdee and Fan (2003) รายงานปริมาณกรดไขมันจาก *Schizochytrium* 5 สายพันธุ์ (N - 1, N - 2, N - 5, N - 6 และ N - 9) มีปริมาณดีเอชเอเท่ากับ 174.9 , 203.6 , 186.1 , 171.3 และ 157.9 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การสะสมกรดไขมันของทออสโทโคตริดส์อาจเปลี่ยนแปลงได้ ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะของการเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม หรือความเป็นกรด-เบส เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

1. ทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนที่รวงหล่น บริเวณป่าชายเลนจังหวัดจันทบุรีทั้ง 3 สถานี พบทั้งหมด 1,525 ไอโซเลท จัดจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 14 สปีชีส์ ได้แก่ *A. limacinum*, *Aurantiochytrium* sp.1, *Aurantiochytrium* sp.2, *Aurantiochytrium* sp.3, *P. sarkarianum*, *Schizochytrium* sp.2, *Thraustochytriidae* sp.8, *Thraustochytriidae* sp.9, *Thraustochytriidae* sp.10, *Thraustochytriidae* sp.11, *Thraustochytriidae* sp.12, *Thraustochytriidae* sp.13, *Thraustochytriidae* sp.14, *Thraustochytriidae* sp.15 ซึ่งทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกในฤดูฝนมีความถี่การพบอยู่ในช่วง 5-75 เปอร์เซ็นต์ โดย *Thraustochytriidae* sp.14 มีความถี่การพบสูงสุด (75 เปอร์เซ็นต์) ส่วนทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกในฤดูแล้งมีความถี่การพบอยู่ในช่วง 5-85 เปอร์เซ็นต์ โดย *Aurantiochytrium* sp.1 กับ *Thraustochytriidae* sp.14 มีความถี่การพบสูงสุด (85 เปอร์เซ็นต์) และสถานที่พบทรอสโทโคตริดส์สูงสุดคือ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

2. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะกาเรสและเซลลูเลสของทรอสโทโคตริดส์ พบว่า *P. sarkarianum*, *Schizochytrium* sp.2 และ *Thraustochytriidae* sp.13 แสดงผลบวกต่อการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์อะกาเรสและกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ส่วน *A. limacinum*, *Aurantiochytrium* sp.1, *Aurantiochytrium* sp.2, *Aurantiochytrium* sp.3, *Thraustochytriidae* sp.8, *Thraustochytriidae* sp.9, *Thraustochytriidae* sp.10, *Thraustochytriidae* sp.11, *Thraustochytriidae* sp.12, *Thraustochytriidae* sp.14, *Thraustochytriidae* sp.15 ไม่พบความสามารถในการการผลิตเอนไซม์อะกาเรสและเซลลูเลส

3. ชีวมวลของทรอสโทโคตริดส์แต่ละชนิดที่คัดแยกในฤดูฝนมีค่าอยู่ในช่วง 4-22.43 กรัมต่อลิตร โดย *Thraustochytriidae* sp.8 มีชีวมวลสูงสุด ส่วนฤดูแล้งมีค่าอยู่ในช่วง 3.18-21.06 กรัมต่อลิตร และ *Thraustochytriidae* sp.11 มีชีวมวลสูงสุด

4. ปริมาณกรดไขมันในทรอสโทโคตริดส์ที่คัดแยกในฤดูฝน พบ *Schizochytrium* sp.2 มีปริมาณกรดไขมันเออาร์เอและอีพีเอเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1.86 ± 0.38 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (4.11 ± 0.69 % of total FA) และ 5.11 ± 0.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (11.80 ± 3.26 % of total FA) ตามลำดับ ส่วนปริมาณดีพีเอพบสูงสุดใน *Thraustochytriidae* sp.9 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 34.38 ± 2.09 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (7.18 ± 0.29 % of total FA) และ *A. limacinum* มีปริมาณดีเอเอเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 145.49 ± 18.97 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (32.91 ± 2.57 % of total FA) สำหรับฤดูแล้งพบว่า *Schizochytrium* sp.2 มีปริมาณเออาร์เอและอีพีเอเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.35 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (5.21 ± 0.43 % of total FA) และ 5.74 ± 0.29 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (12.75 ± 0.40 % of total FA) ส่วนปริมาณดีพีเอมีค่าเฉลี่ยสูงสุดใน *Thraustochytriidae* sp.14 เท่ากับ 30.51 ± 3.84 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (7.71 ± 0.40 % of total FA) และดีเอเอพบว่า *Thraustochytriidae* sp.11 มีปริมาณเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 136.93 ± 18.00 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (30.84 ± 2.92 % of total FA) จะเห็นว่าทรอสโทโคตริดส์มีศักยภาพสูงในการเป็นแหล่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง โดยเฉพาะดีเอเอที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรือเชิงพาณิชย์ต่อไป

5. ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในส่วนของชีวมวลและกรดไขมันอีพีเอ ได้แก่ *Schizochytrium* sp.2BUCHA2SA 15-1 และ *Schizochytrium* sp.2BUCHA2CT 19-3/2 ส่วนไอโซเลทที่มี

มวลชีวภาพและดีเอชเอสูงได้แก่ Thraustochytriidae sp.8 BUCHA2LL 12-2 และ Thraustochytriidae sp.8 BUCHA2BS 10/3-1

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาความหลากหลายของทรอสโทโคทริตส์จากแหล่งอื่น ๆ เช่น น้ำทะเล และสัตว์ทะเล เพื่อเป็นฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย
2. ควรนำยีนหรือดีเอ็นเอเครื่องหมายอื่น ๆ ที่มีลักษณะของการวิวัฒนาการที่เร็วกว่า เช่น Internal transcribed spacer (ITS) หรือ D1/D2 domain ของยีน rRNA มาวิเคราะห์ร่วมกับยีน 18S rRNA เพื่อให้การจัดจำแนกทรอสโทโคทริตส์ที่มีความใกล้เคียงกันมาก ๆ มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ผลผลิต

1. อุทุมพร อู่ยยก สุดารัตน์ สวนจิตร และ สมถวิล จริตควร. (2562). ทรอสโทโคทริตส์จากใบไม้ป่าชายเลน พัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (ท่าสอน) จังหวัดจันทบุรี. *วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์*, 11(1) 162-171.
2. ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในส่วนของชีวมวลและกรดไขมันอีพีเอ ได้แก่ *Schizochytrium* sp.2BUCHA2SA 15-1 และ *Schizochytrium* sp.2BUCHA2CT 19-3/2 ส่วนไอโซเลทที่มีมวลชีวภาพและดีเอชเอสูงได้แก่ Thraustochytriidae sp.8 BUCHA2LL 12-2 และ Thraustochytriidae sp.8 BUCHA2BS 10/3-1

รายการอ้างอิง

- จุฬาลักษณ์ จันทบาล. (2550). *ความหลากหลายของทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลน บางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร*. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขา วาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เดือนทิพย์ ปิยรัตน์. (2538). การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 จาก สาหร่ายน้ำเค็มขนาดเล็ก. *วารสารวิทยาศาสตร์*, 24, 14-20.
- ทิวาพร ทองประสม, สุดารัตน์ สอนจิริต และสมถวิล จริตควร. (2561). ความหลากหลายของทรอส- โทโคทริดส์ที่แยกจากใบไม้ป่าชายเลนทุ่งโปรงทอง จังหวัดระยอง. *วารสารวิทยาศาสตร์ บูรพา*. 23(2), 737-752.
- บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. (2542). *ชีวเคมีทางสัตวศาสตร์*. เชียงใหม่: ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะ เกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พฤทธิกร ศุภพล และชุติมา แก้วพิบูลย์. (2561). สภาวะสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมวล เซลล์และโอเมก้า-3 จากทรอสโทโคทริดส์. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 26(8), 1348-1364.
- มยุรา ประยูรพันธ์ สมถวิล จริตควร สุดารัตน์ สอนจิริต และวิภูษิต มั่นทะจิตร. (2551). กรดไขมันใน ทรอสโทโคทริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ. ประชุมวิชาการ “วิจัยบูรพา ครบรอบวันสถาปนา 53 ปี” 7 กรกฎาคม 2551. มหาวิทยาลัยบูรพา. หน้า 74.
- มารุจ ลิ้มปะวัฒน์ และ วรณวิมล คล้ายประดิษฐ์. (2552). ไขมันทรานส์: ข้อมูลบนฉลากโภชนาการ ที่ควรรู้. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม*, 4(1), 11-15.
- รัศมี ศุภศรี. (2536). ไขมันและบทบาทของ omega-3 fatty acid กับ การดูดตันของหลอดเลือด อาหาร, 23 (4). ม.ป.ท. 242-245.
- รุจิราลัย พูลทวี.(2550). *การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตดีเอชเอและแอสตาแซนทินโดย Thraustochytrids จากป่าชายเลน*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. บัณฑิต วิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เวียง เชื้อโพธิ์หัก. (2542). *โภชนศาสตร์สัตว์น้ำและการให้อาหารสัตว์น้ำ*. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 255 หน้า.
- ศิริลักษณ์ ปากพั่น. (2543). ป่าชายเลน...ความอุดมสมบูรณ์ริมฝั่งทะเลไทย. *วารสารปารีชาติ*, 12(2), 44-48.
- สนิท อักษรแก้ว. (2542). *ป่าชายเลน...นิเวศวิทยาและการจัดการ* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุดารัตน์ แทนเนี่ยว นิยม กำลังดี และภูวดล บางรักษ์. (2556). การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดโดโค ซาเฮกซาอีโนอิกจากป่าชายเลน นครศรีธรรมราช. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง*, 7(1), 35-44.
- สุพิศ ทองรอด. (2535). ความสำคัญของไขมันในอาหารสัตว์น้ำ. *วารสารการประมง*, 45(5), 943-

950.

- สำนักอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน. (2556). *คู่มือความรู้เรื่องป่าชายเลน* (พิมพ์ครั้งที่ 5). กรุงเทพฯ: บริษัท พลอยมีเดีย จำกัด.
- สำนักอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน. (2555). ทรัพยากรป่าชายเลนจังหวัดจันทบุรี. แหล่งเข้าถึง <https://www.dmcr.go.th/detailLib/145> เข้าถึงวันที่ 20 กันยายน 2561
- อัคนิตย์ อิทธิอาภา. (2541). *การหาปริมาณไขมันและเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม โอเมก้า-3 ในปลาทะเลโดยเทคนิคแก๊สลิควิดโครมาโตกราฟี*. ปัญหาพิเศษภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Alderman, D. J., & Jones, E. B. G. (1971). Physiological requirement of two marine Phycomycetes, *Althornia crochii* and *Ostracoblabe implexa*. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(2), 213-225.
- Alderman, D. J., Harrison, J. L., Bremer, G. B., & Jones, E. B. G. (1974). Taxonomic revisions in the marine biflagellate fungi: The ultrastructural evidence. *Marine Biology*, 25, 345-357.
- Arafiles, K.H.V., Alcantara, J.C.O., Cordero, P.R.F., Baton, J.A.L., Galura, F.S., Leano, E.M., & Dedeles G.R. (2011). Cultural optimization of thraustochytrids for biomass and fatty acid production. *Mycosphere*, 2(5), 521-531.
- Bajpai, P. K., Bajpai, P., & Ward, O. P. (1991a). Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *Journal of the American oil Chemists Society*, 68, 509-514.
- Bajpai, P., Bajpai, K., & Ward, P. O. (1991b). Production of docosahexaenoic acid By *Thraustochytrium aureum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 706-710.
- Beakes, G.W., Thines, M., & Honda, D. (2015). Straminipile “Fungi” –Taxonomy. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001984>.
- Bongiorni, L. (1998). Seasonal changes and species assemblage of a mediterranean thraustochytrids community. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 19th Annual Meeting.
- Bowles, R. D. (1997). *Production of n-3 Polyunsaturated fatty acids by thraustochytrids*. Doctoral Dissertation, Physiology and optimization, University of Portsmouth.

- Bowles, R. D., Hunt, A. E., Bremer, G. B., Duchars, M. G., & Eaton, R. A. (1999). Long chain n-3 Polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the Thraustochytrids: screening of isolates and optimization of docosahexaenoic acid production. *Journal of Biology*, *70*, 193-202.
- Bremer, G. B. (1995). Lower marine fungi (Labyrinthulomycetes) and the decay of mangrove leaf litter. *Hydrobiologia*, *295*, 89-95.
- Caamano, E., Loperenab, L., Hinzpeterc, L., Pradeld, P., Gordillo, F., Corsini, G., Tello, M., Lavin, P., Gonzalez, A. R. (2017). Isolation and molecular characterization of Thraustochytrium strain isolated from Antarctic Peninsula and its biotechnological potential in the production of fatty acids. *Brazilian Journal of Microbiology*. *48*, 671-679.
- Calder, P.C. and Yaqoob, P. (2009). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *Biofactors*. *35*(3):266-272. doi: 10.1002/biof.42
- Chilton, P. M. (1995). *An investigation into the use of marine protest Thraustochytrium aureum as a dietary supplement providing Omega-3 polyunsaturates*. Doctoral Dissertation, Biological Science, University of Portsmouth
- Doi, K. & Honda, D. (2017) Proposal of *Monorhizochytrium globosum* gen. nov., comb. nov. (Stramenopiles, Labyrinthulomycetes) for former *Thraustochytrium globosum* based on morphological and phylogenetic relationships. *Phycological Research*, *65*, 188-201.
- Fan, K. W., Chen, F. J., Jones, E. B. G., & Vrijmoed, L. P. (2001). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrids. *Journal of Industrial and Biotechnology*, *27*, 199-202.
- Fan, K.W., Vrijmoed, L.L.P., & Jones, E.B.G. (2002). Physiological Studies of Subtropical Mangrove Thraustochytrids. *Botanica Marina*. *45*, 50-57.
- Gaertner, A., (1977). Revision of the Thraustochytriaceae (lower marine fungi). I. *Ulkenia* nov. gen., with description of three new species. In: Veröffentlichungen des Institutes für Meeresforsch. *Bremerhaven*, *16*, 139-157.
- Galgani, J.E., & Garcia, D. (2014). Role of saturated and polyunsaturated fat in obesity-related Inflammation. *Inflammation, Advancing Age and Nutrition*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397803-5.00025-3>.
- Gill, I. and R. Valivety. (1997). Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *TIBTECH*. *15*, 401-409.

- Gao, M., Song, X., Feng, Y., Li, W. & Cui, Q. (2013). Isolation and characterization of *Aurantiochytrium* species: high docosahexaenoic acid (DHA) production by the newly isolated microalga, *Aurantiochytrium* sp. SD116. *Journal of Oleo Science*, 62(3), 143-151.
- Goldstein, S. & Belsky, M. (1964). Axenic culture studies of a new marine phycomycete possessing an unusual type of asexual reproduction. *American Journal of Botany*, 51, 72-78.
- Harel, M., Ben-Dov, E., Rasoulouniriana, D., Siboni, N., Kramarsky-Winter, E., Loya, Y., Barak, Z., Wiesman, Z., & Kushmaro, A. (2008). A new thraustochytrid, strain Fng1, isolated from the surface mucus of the hermatypic coral *Fungia Granulosa*. *FEMS Microbiology Ecology*, 64, 378-387.
- Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Erata, M. & Higashihara, T. (1998). *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean. *Mycological Research*, 102(4), 439-448.
- Honda, D. (2001). Phylogeny and taxonomy of labyrinthulids. *Aquabiology*, 132(23), 7-18.
- Horrocks, L.A. and Y.K. Yeo. (1999). Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological Research*, 40, 211-222.
- Huang, J., Aki, T., Hachidaa, K., Yokochi, T., Kawamoto, S., Shigetaa, S., Ono, K. and Suzukia, O. (2001). Profile of Polyunsaturated Fatty Acids Produced by *Thraustochytrium* sp. KK17-3. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6). 605-610.
- Huang, J., Aki, T., Yokochi, T., Nakahara, T., Honda, D., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K. and Suzuki, O. (2003). Grouping Newly Isolated Docosahexaenoic Acid-Producing Thraustochytrids Based on Their Polyunsaturated Fatty Acid Profiles and Comparative Analysis of 18S rRNA Genes. *Marine Biotechnology*, 5(5), 450 – 457.
- Hunt, E. A. (2000). *The production of n-3 polyunsaturated docosahexaenoic acid by member of the marine protistan group the thraustochytrids*. Doctoral Dissertation, Biology science, University of Portsmouth.
- Iwata, I. Kimurac, K., Tomarud, Y., Motomurae, T., Koikef, K., Koikeg, K. & Honda, D. (2017). Bothrosome formation in *Schizochytrium aggregatum* (Labyrinthulomycetes, Stramenopiles) during zoospore settlement. *Protist*, 168, 206-219.
- Jaritkhuan, S., & Suanjit, S. (2018) Species Diversity and polyunsaturated fatty acid content of thraustochytrids from fallen mangrove leaves in Chon Buri Province, Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, 52(1), 24-32.

- Jones, E. B. G., & Alderman, D. J. (1971). *Althonia crouchii* gen. et. sp. nov., A marine biflagellate fungus. *Nova Hedwigia*, 21, 381–399.
- Kamlangdee, N. & Fan, K.W. (2003). Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp. isolated from mangrove. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 25(5), 643-650.
- Kobayashi, Y., Ookubo, M., 1953. Studies on the marine Phycomycetes. In: *Bulletin of the Tokyo Science Museum*, 33, 53–65.
- Leano, M. (2001). Straminipilous organism from fallen mangrove leaves from Panay Island, Philippines. *Fungal Diversity*, 6, 75-80.
- Leano, E. M. (2002). Ecology of straminipiles from mangrove habitats. *Fungal Diversity Research Series*, 7, 111-134.
- Lemaitre, R.N., King, I.B., Sotoodehnia, N., Rea, T.D., Raghunathan, T.E., Rice, K.M., Lumley, T.S., Knopp, R.H., Cobb, L.A., Copass, M.K. and Siscovick, D.S. (2009). Red blood cell membrane alpha-linolenic acid and the risk of sudden cardiac arrest. *Metabolism*, 58(4), 534–540.
- Lewis, T.E., Nichols, P.D. and McMeekin, T.A. (1999). The biotechnological potential of Thraustochytrids. *Marine Biotechnology*, 1, 580-587.
- Marchan, L. F., Chang, K. J. L., Nichols, P. D., Mitchell, W. J., Polglase, J. L., & Gutierrez, T. (2017). Taxonomy, ecology and biotechnological applications of thraustochytrids: a review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 26-46.
- Moss, S. T. (1986). The biology of the Thraustochytriales and Labyrinthuloides. In S. T. Moss (ed.), *The Biology of Marine Fungi*. np.
- Nakahara, T., Yokochi, T., Higashihara, T., Tanaka, S., Yaguchi, T., & Honda, D. (1996). Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap Islands. *Journal of the American oil Chemists Society*, 73(11), 1421-1426.
- Naganuma, T., Takasugi, H., & Kimura, H. (1998). Abundance of thraustochytrids in coastal plankton. *Marine Ecology Progress Series*, 162, 105-110.
- Perveen, Z.; Ando, H.; Ueno, A.; Ito, Y.; Yamamoto, Y.; Yamada, Y.; Takagi, T.; Kaneko, T.; Kogame, K. and Okuyama, H. (2006). Isolation and characterization of a novel thraustochytrid-like microorganism that efficiently produces docosahexaenoic acid. *Biotechnology Letters*, 28, 197-202.
- Porter, D. (1989). Handbook of protozoa: Phylum Labyrinthulomycota net slime mold. n.p.

- Raghukumar, S. (1988). *Schizochytrium mangrovei* sp. nov., a thraustochytrid from mangroves in India. *Transactions of the British Mycological Society*, **94**(4), 627-631.
- Raghukumar, S. (1992). Bacterivory: a novel dual role for thraustochytrid in the sea. *Marine Biology*, **113**, 165-169.
- Raghukumar, S. (2002). Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids). *European Journal of Protistology*, **38**, 127-145.
- Raghukumar, S., Sharma, S., Raghukumar, C., Sathe-Pathak, V., & Chandramohan, D. (1994). Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. IV. Laboratory studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora apiculata* Blume. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **183**, 113-131.
- Raghukumar, S., and Damare, V.S. (2011). Increasing evidence for the important role of Labyrinthulomycetes in marine ecosystems. *Botanica Marina*, **54**(1), 3-11.
- Santangelo, G., Bongiorni, L., & Pignataro, L. (2000). Abundance of thraustochytrids and ciliated protozoans in a Mediterranean sandy shore determined by an improved, direct method. *Aquatic Microbial Ecology*, **23**, 55-61.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., & Estevez, A. (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, **177**, 191-199.
- Shabala, L., Shabala, S., Ross, T. & McMeekin, T. (2001). Membrane transport activity and ultradian ion flux oscillation associated with cell cycle of *Thraustochytrium* sp. *Australian Journal of Plant Physiology*, **28**, 87-99.
- Sharma, S., Raghukumar, C., Raghukumar, S., Sathe-pathak, V. & Chandramohan, D. (1994). Thraustochytrid and fungal component of marine detritus II. Laboratory studies on decomposition of the brown alga *Sargassum cinereum* J. Ag. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **175**(2), 227-242.
- Sparrow, F.K. (1936). Biological observations on the marine fungi of Woods Hole waters. *The Biological Bulletin Publications-Marine Laboratory (Woods Hole)*, **70**, 236-263.
- Takahata, K., K. Monobe., M. Tada. and P.C. Weber. (1998). The benefits and risks of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **62**(1), 2079-2085.

- Unagul, P., Suetrong, S., Preedanon, S., Klaysuban, A., Gundool, W., Suriyachadkun, C. and Sakayaroj, J. (2017). Isolation, fatty acid profiles and cryopreservation of marine thraustochytrids from mangrove habitats in Thailand. *Botanica Marina*, 60(4), 363–379
- Uauy, R., D.R. Hoffman, P. Peirano, D.G. Birch and E.E. Birch. (2001). Essential fatty acids in visuak and brain development. *Lipids*, 36, 885-895.
- Wong, M.K.M., Vrijmoed, L.L.P., Au, D.W.T. (2005). Abundance of thraustochytrids on fallen decaying leaves of *Kandelia candel* and mangrove sediments in Futian National Nature Reserve, China. *Botanica Marina*, 48, 374-378.
- Yokoyama, R., & Honda, D. (2007). Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* Gen. Nov. *Mycoscience*, 48(4), 199-211.
- Yokoyama, R. Salleh, B., & Honda, D. (2007). Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and Erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* Gen. Nov. *Mycoscience*, 48, 329-341.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง GYP

กลูโคส	1	กรัม
ยีสต์สกัด	1	กรัม
เปปโตน	1	กรัม
วุ้น	10	กรัม
น้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมนยาปฏิชีวนะในอัตรา 1 มิลลิลิตร ต่อ อาหาร 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเพนนิซิลิน จี เท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และสเตรปโตมัยซิล ซัลเฟต เท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. อาหารแข็ง GY

กลูโคส	1	กรัม
ยีสต์สกัด	1	กรัม
วุ้น	10	กรัม
น้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมนยาปฏิชีวนะในอัตรา 1 มิลลิลิตร ต่อ อาหาร 1 ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเพนนิซิลิน จี เท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และสเตรปโตมัยซิล ซัลเฟต เท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. อาหารเหลว GY

กลูโคส	20	กรัม
ยีสต์สกัด	10	กรัม
น้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูง ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

4. Agarose medium

Ammonium nitrate	0.3	กรัม
Dipotassium hydrogenphosphate	1	กรัม
Magnesium sulfate heptahydrate	0.5	กรัม
Potassium chloride	0.5	กรัม
Ferrous sulfate	0.003	กรัม
Sodium chloride	30	กรัม
Agarose	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นให้ความร้อนจน
วุ้นละลายและนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15
ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Carboxymethylcellulose (CMC) Agar

Sodium carboxymethylcellulose (CMC)	5	กรัม
Ammonium nitrate	0.3	กรัม
Dipotassium hydrogenphosphate	1	กรัม
Magnesium sulfate heptahydrate	0.5	กรัม
Potassium chloride	0.5	กรัม
Ferrous sulfate	0.003	กรัม
Sodium chloride	30	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ยกเว้น CMC และวุ้น ผสมให้เข้ากัน
จากนั้นค่อยๆ เติม CMC และเติมวุ้นให้ความร้อนจนวุ้นละลายและนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน
สูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี รีเอเจนต์ บัฟเฟอร์

1. ยาปฏิชีวนะ (ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดเท่ากับ 300 กรัมต่อลิตร)

เพนนิซิลิน จี (Penicillin G)	3	กรัม
สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต (Streptomycin Sulfate)	3	กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	10	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการกรองด้วยที่กรองสารสำหรับไซริงค์ (Syringe filter) ที่มีขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 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

ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นเก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

3. 0.1% Congo red

Congo red	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย congo red ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

4. Lugol's iodine

Potassium iodide	10	กรัม
Iodine crystals	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสม potassium iodide ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ iodine crystals ผสมจนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman) เก็บใส่ขวดสีชา

5. Internal Standard (ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร)

Standard fatty acid 19:0 (Nonadecanoic acid)	0.025	กรัม
เฮกเซน	5	มิลลิลิตร

ชั่ง Standard fatty acid 19:0 ใส่ในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเฮกเซนจนได้ปริมาตรเท่ากับ 5 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท เขย่าเบาๆ จนเข้ากันดี

ภาคผนวก ค
ปริมาณกรดไขมันในทรอสโทโคไตรดส์

ตารางภาคผนวก ค ที่ 1 ปริมาณกรดไขมันทรานส์ไอโคไตรดส์ที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนในฤดูฝน จังหวัดจันทบุรี

Fatty acid	<i>A.limacinum</i>		<i>Aurantiochytrium</i> sp.1		<i>Aurantiochytrium</i> sp.2		<i>Aurantiochytrium</i> sp.3		<i>Shizochytrium</i> sp.2		Thraustochytriidae sp.8	
	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA
12:0	0.55±0.09	0.12±0.02	0.95±0.19	0.23±0.05	0.79±0.25	0.16±0.04	0.48±0.04	0.15±0.02	0.04±0.01	0.09±0.03	0.74±0.13	0.17±0.01
13:0	0.33±0.10	0.07±0.02	1.68±0.12	0.40±0.03	1.68±0.32	0.35±0.05	2.26±0.15	0.70±0.06	1.66±0.48	3.62±0.71	1.26±0.14	0.29±0.07
14:0	17.04±1.83	3.83±0.36	24.86±1.63	5.97±0.86	23.02±4.37	4.84±0.59	13.05±1.32	4.05±0.07	0.27±0.04	0.62±0.19	20.47±3.05	4.55±0.18
14:1	ND	ND	0.38±0.22	0.09±0.05	0.34±0.22	0.07±0.04	0.56±0.32	0.17±0.10	ND	ND	1.18±0.33	0.26±0.05
15:0	17.68±2.75	3.99±0.47	27.29±1.21	6.53±±0.69	24.46±3.78	5.16±0.50	14.51±2.10	4.51±0.63	3.54±0.30	8.15±2.19	15.7±13.02	3.47±0.16
15:1	0.08±0.02	0.02±0.00	0.13±0.09	0.03±0.02	0.09±0.12	0.02±0.02	0.07±0.10	0.02±0.03	ND	ND	0.05±0.05	0.01±0.01
16:0	214.57±15.33	48.41±3.01	265.64±29.39	63.31±6.68	303.815±3.52	64.07±7.68	180.83±20.19	56.09±2.80	3.84±0.28	8.89±2.58	220.82±29.34	49.20±2.52
16:1	1.20±0.17	0.27±0.04	0.39±0.36	0.09±0.09	0.61±0.69	0.12±0.14	0.61±0.09	0.19±0.03	0.06±0.02	0.13±0.03	0.89±0.13	0.20±0.03
17:0	4.92±0.44	1.11±0.08	6.30±0.81	1.50±0.09	5.23±0.68	1.11±0.16	4.40±0.53	1.37±0.19	2.67±0.33	6.05±1.45	4.31±0.84	0.95±0.05
17:1	ND	ND	0.16±0.14	0.04±0.03	0.15±0.27	0.03±0.05	0.14±0.20	0.04±0.06	0.37±0.18	0.92±0.51	0.21±0.34	0.05±0.10
18:0	6.71±0.48	1.51±0.11	6.46±0.57	1.54±0.08	7.74±1.40	1.64±0.24	5.13±0.50	1.60±0.13	0.21±0.07	0.51±0.25	5.80±1.05	1.28±0.06
18:1	0.09±0.08	0.02±0.02	0.31±0.31	0.07±0.07	0.16±0.16	0.04±0.03	0.34±0.06	0.11±0.02	0.54±0.16	1.21±0.43	0.61±0.26	0.13±0.04
18:3n-6	0.19±0.06	0.04±0.01	0.32±0.25	0.08±0.06	0.18±0.14	0.04±0.03	0.22±0.14	0.07±0.04	0.40±0.19	0.96±0.58	0.28±0.15	0.06±0.02
18:3n-3	0.26±0.19	0.06±0.04	0.23±0.17	0.06±0.04	0.53±0.36	0.11±0.07	0.26±0.28	0.08±0.09	0.04±0.10	0.12±0.27	0.38±0.10	0.08±0.01
20:0	1.02±0.06	0.23±0.02	1.07±0.23	0.26±0.08	1.11±0.40	0.24±0.08	0.86±0.29	0.27±0.10	0.18±0.05	0.39±0.08	0.90±0.26	0.20±0.03
20:1n-9	ND	ND	0.31±0.31	0.07±0.07	ND	ND	ND	ND	0.02±0.03	0.02±0.04	ND	ND
20:2n-6	ND	ND	0.05±0.10	0.01±0.03	ND	ND	ND	ND	0.66±0.09	1.49±0.31	ND	ND
21:0	ND	ND	0.05±0.08	0.01±0.02	ND	ND	0.02±0.05	0.01±0.02	0.13±0.08	0.33±0.20	ND	ND
20:3n-6	0.48±0.04	0.11±0.01	0.25±0.12	0.06±0.03	0.37±0.10	0.08±0.02	0.55±0.46	0.17±0.15	0.02±0.03	0.04±0.09	0.49±0.15	0.11±0.02
20:4n-6 (ARA)	0.38±0.05	0.09±0.01	0.37±0.16	0.09±0.05	0.40±0.05	0.08±0.01	0.36±0.18	0.11±0.06	1.86±0.38	4.11±0.69	0.34±0.03	0.08±0.01
20:3n-3	ND	ND	DDND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22:0	0.48±0.35	0.11±0.08	0.55±0.09	0.13±0.02	0.38±0.36	0.08±0.08	0.82±0.21	0.26±0.07	0.13±0.07	0.28±0.20	0.35±0.34	0.07±0.07
20:5n-3 (EPA)	ND	ND	0.73±0.44	0.17±0.10	1.51±0.66	0.33±0.16	0.95±0.11	0.30±0.03	5.11±0.46	11.80±3.26	1.73±0.11	0.39±0.06
22:1n-9	2.28±0.20	0.51±0.02	0.02±0.05	0.01±0.01	ND	ND	ND	ND	2.01±0.21	4.56±1.00	ND	ND
22:2	ND	ND	0.09±0.13	0.02±0.03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22:5n-3 (DPA)	28.99±4.16	6.57±0.67	11.43±5.91	2.70±1.30	15.34±6.55	3.30±1.47	16.17±2.45	5.01±0.52	0.57±0.12	1.26±0.19	28.88±7.09	6.35±0.80
24:1n-9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22:6n-3 (DHA)	145.49±18.97	32.91±2.57	48.01±23.26	11.34±5.18	77.99±33.67	16.73±7.46	67.11±17.16	20.66±4.18	12.42±1.54	28.25±6.87	137.90±26.20	30.50±1.99
Other			23.58±36.23	5.20±7.53	6.76±4.08	1.39±0.73	12.64±6.22	4.07±2.20	10.66±17.60	16.18±20.19	7.14±0.94	1.60±0.15
Total			421.61±48.12	100.00±0.00	472.63±45.11	100.00±0.00	322.32±30.01	100.00±0.00	47.41±18.90	100.00±0.00	450.45±69.38	100.00±0.00

หมายเหตุ ND มีปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางภาคผนวก ค ที่ 1 (ต่อ)

Fatty acid	Thraustochytriidae sp.9		Thraustochytriidae sp.10		Thraustochytriidae sp.11		Thraustochytriidae sp.14		Thraustochytriidae sp.15	
	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA
12:0	0.55±0.06	0.11±0.01	0.56±0.14	0.12±0.02	0.59±0.30	0.15±0.08	0.41±0.30	0.11±0.08	1.36±0.10	0.27±0.02
13:0	0.38±0.08	0.08±0.02	0.49±0.04	0.10±0.03	1.49±0.09	0.38±0.05	1.24±0.07	0.33±0.03	1.43±0.34	0.29±0.08
14:0	17.11±0.76	3.58±0.15	18.31±2.95	3.91±0.52	17.79±2.15	4.45±0.35	9.00±0.48	2.43±0.19	37.06±1.88	7.44±0.31
14:1	ND	ND	ND	ND	1.02±0.10	0.26±0.02	0.18±0.18	0.05±0.05	0.11±0.10	0.02±0.02
15:0	21.29±0.59	4.45±0.21	22.62±1.87	4.86±0.58	19.12±1.54	4.79±0.35	13.31±6.48	3.54±1.69	22.62±0.96	4.55±0.25
15:1	0.09±0.01	0.02±0.00	0.09±0.02	0.02±0.00	0.09±0.06	0.02±0.01	0.06±0.04	0.02±0.01	0.04±0.02	0.01±0.00
16:0	239.89±11.69	50.12±1.51	235.91±21.76	50.48±2.40	204.54±19.73	51.23±3.56	213.84±3.44	57.69±3.72	274.84±12.04	55.20±1.02
16:1	1.14±0.18	0.24±0.04	1.09±0.23	0.23±0.04	0.85±0.17	0.22±0.05	0.54±0.33	0.15±0.09	0.55±0.09	0.11±0.01
17:0	5.38±0.52	1.12±0.11	5.45±0.44	1.17±0.11	4.89±0.59	1.23±0.18	7.65±0.60	2.07±0.22	4.35±0.16	0.87±0.04
17:1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.05±0.10	0.01±0.03	0.27±0.37	0.05±0.07
18:0	7.39±0.48	1.54±0.07	7.46±0.63	1.60±0.06	3.93±1.89	0.97±0.46	7.12±0.18	1.92±0.11	4.87±0.19	0.98±0.03
18:1	0.07±0.06	0.01±0.01	0.13±0.08	0.03±0.04	1.21±2.38	0.32±0.63	0.34±0.08	0.09±0.02	ND	ND
18:3n-6	0.31±0.02	0.06±0.00	0.23±0.01	0.05±0.00	0.17±0.03	0.04±0.01	0.14±0.09	0.04±0.02	0.29±0.01	0.06±0.00
18:3n-3	0.46±0.03	0.10±0.01	0.44±0.16	0.09±0.00	0.14±0.01	0.04±0.00	0.58±0.39	0.16±0.11	0.13±0.01	0.03±0.00
20:0	1.25±0.08	0.26±0.01	1.30±0.08	0.28±0.02	0.57±0.06	0.14±0.02	0.73±0.24	0.20±0.06	0.44±0.03	0.09±0.01
20:1n-9	ND	ND	ND	ND	0.43±0.24	0.11±0.06	ND	ND	ND	ND
20:2n-6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21:0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02±0.05	0.01±0.01	ND	ND
20:3n-6	0.60±0.04	0.13±0.00	0.49±0.04	0.10±0.01	0.43±0.04	0.11±0.01	0.94±0.57	0.25±0.15	0.45±0.03	0.09±0.00
20:4n-6 (ARA)	0.46±0.04	0.10±0.00	0.39±0.03	0.08±0.01	0.37±0.05	0.09±0.01	0.43±0.28	0.11±0.08	0.33±0.03	0.07±0.00
20:3n-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22:0	0.31±0.38	0.07±0.08	0.18±0.28	0.04±0.09	0.38±0.23	0.09±0.06	0.65±0.31	0.18±0.09	ND	ND
20:5n-3 (EPA)	ND	ND	ND	ND	1.28±0.59	0.32±0.14	0.81±0.17	0.22±0.04	1.50±0.18	0.30±0.03
22:1n-9	2.17±0.18	0.45±0.02	1.99±0.20	0.43±0.08	0.32±0.72	0.08±0.19	ND	ND	ND	ND
22:2	ND	ND	ND	ND	0.22±0.17	0.05±0.04	ND	ND	ND	ND
22:5n-3 (DPA)	34.38±2.09	7.18±0.29	31.34±2.71	6.71±0.85	21.60±3.51	5.41±0.85	21.72±4.39	5.81±0.92	26.75±2.30	5.36±0.25
24:1n-9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22:6n-3 (DHA)	145.31±7.37	30.38±1.59	138.82±7.51	29.69±2.59	107.52±18.28	26.88±3.83	81.92±17.16	21.90±3.56	115.28±11.26	23.11±1.33
Other					10.46±2.14	2.62±0.50	9.98±6.89	2.73±2.00	5.46±0.74	1.10±0.17
Total					399.39±30.19	100.00±0.00	371.65±19.85	100.00±0.00	498.14±25.29	100.00±0.00

หมายเหตุ ND มีปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางภาคผนวก ค ที่ 2 ปริมาณกรดไขมันทรานส์ไฮโดรจีเนตที่คัดแยกจากใบไม้ป่าชายเลนในฤดูแล้ง จังหวัดจันทบุรี

Fatty acid	<i>A. limacinum</i>		<i>Aurantiochytrium</i> sp.1		<i>P. sarkarianum</i>		<i>Shizochytrium</i> sp.2		Thraustochytriidae sp.8		Thraustochytriidae sp.9	
	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA
12:0	0.68±0.03	0.17±0.01	0.64±0.09	0.16±0.02	0.01±0.01	0.02±0.01	0.04±0.01	0.09±0.02	0.78±0.10	0.17±0.01	0.67±0.03	0.17±0.02
13:0	2.73±0.06	0.69±0.05	1.44±0.06	0.36±0.02	0.89±0.42	1.19±0.38	0.67±0.11	1.48±0.19	1.14±0.22	0.26±0.05	2.5±0.12	0.64±0.07
14:0	19.61±0.39	4.98±0.34	23.45±2.66	5.83±0.38	0.49±0.38	0.72±0.49	0.24±0.03	0.53±0.05	21.63±2.51	4.81±0.12	18.28±0.69	4.65±0.49
14:1	ND	ND	0.31±0.13	0.08±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	1.09±0.20	0.24±0.04	ND	ND
15:0	23.87±1.67	5.99±0.42	27.30±1.05	6.81±0.34	10.72±5.03	13.63±3.40	3.72±0.31	8.25±0.31	17.79±2.65	3.94±0.16	22.65±1.33	5.77±0.70
15:1	0.03±0.02	0.01±0.01	0.01±0.03	0.00±0.01	0.00±0.01	0.01±0.02	0.02±0.03	0.05±0.07	0.06±0.03	0.01±0.01	0.08±0.02	0.02±0.01
16:0	230.98±15.80	58.96±6.85	268.34±26.17	66.72±3.44	14.60±7.65	19.97±5.79	3.84±0.48	8.51±0.70	239.71±37.82	53.09±3.73	213.23±8.69	54.39±7.09
16:1	1.04±0.16	0.26±0.05	0.57±0.09	0.14±0.02	0.62±0.47	0.92±0.64	0.08±0.02	0.18±0.05	0.90±0.13	0.20±0.01	1.10±0.14	0.28±0.04
17:0	5.38±0.34	1.36±0.11	6.41±0.17	1.60±0.09	8.05±3.55	10.27±2.59	3.07±0.34	6.80±0.50	4.89±0.86	1.08±0.08	5.69±0.24	1.45±0.15
17:1	ND	ND	ND	ND	9.24±3.95	11.97±2.35	0.53±0.27	1.16±0.57	0.04±0.08	0.01±0.02	0.02±0.04	0.00±0.01
18:0	6.32±0.45	1.61±0.18	6.66±0.44	1.66±0.05	1.86±1.81	2.81±2.41	0.26±0.05	0.58±0.09	6.50±1.16	1.44±0.12	6.17±0.13	1.57±0.17
18:1	0.70±0.21	0.17±0.05	0.16±0.04	0.04±0.01	4.05±3.41	6.93±7.18	0.78±0.08	1.74±0.17	0.65±0.10	0.14±0.01	0.78±0.13	0.20±0.03
18:3n-6	0.15±0.04	0.04±0.01	0.12±0.02	0.03±0.01	1.47±0.67	1.89±0.47	0.48±0.17	1.08±0.43	0.22±0.03	0.05±0.01	0.26±0.11	0.06±0.02
18:3n-3	0.28±0.08	0.07±0.01	0.16±0.02	0.04±0.01	ND	ND	0.00±0.00	0.00±0.00	0.33±0.04	0.07±0.01	0.39±0.13	0.10±0.03
20:0	1.03±0.12	0.27±0.03	1.10±0.04	0.28±0.02	0.24±0.20	0.32±0.18	0.24±0.04	0.52±0.07	1.02±0.20	0.23±0.03	1.24±0.06	0.32±0.04
20:1n-9	ND	ND	0.06±0.13	0.01±0.03	0.04±0.06	0.07±0.11	0.07±0.00	0.16±0.02	0.18±0.25	0.04±0.06	ND	ND
20:2n-6	ND	ND	ND	ND	0.23±0.53	0.29±0.65	0.38±0.33	0.82±0.69	ND	ND	ND	ND
21:0	ND	ND	ND	ND	0.07±0.09	0.07±0.10	0.16±0.15	0.36±0.33	ND	ND	ND	ND
20:3n-6	0.20±0.17	0.04±0.04	0.17±0.26	0.04±0.07	0.29±0.21	0.37±0.15	0.14±0.03	0.30±0.07	0.44±0.06	0.10±0.01	0.37±0.23	0.09±0.06
20:4n-6 (ARA)	0.11±0.13	0.02±0.03	0.30±0.25	0.08±0.07	1.08±0.44	1.46±0.29	2.35±0.20	5.21±0.43	0.29±0.07	0.07±0.02	0.25±0.17	0.06±0.04
20:3n-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.00±0.00	0.00±0.00	ND	ND	ND	ND
22:0	0.62±0.05	0.16±0.01	0.45±0.41	0.11±0.10	2.09±1.09	2.66±1.10	0.13±0.07	0.28±0.16	0.48±0.29	0.11±0.06	0.55±0.31	0.14±0.08
20:5n-3 (EPA)	ND	ND	0.77±0.11	0.19±0.03	0.92±0.64	1.20±0.67	5.74±0.29	12.75±0.40	1.34±0.18	0.30±0.05	ND	ND
22:1n-9	1.01±0.39	0.24±0.08	ND	ND	0.28±0.29	0.33±0.35	2.50±0.37	5.53±0.56	ND	ND	1.34±0.62	0.33±0.14
22:2	ND	ND	ND	ND	0.43±0.16	0.59±0.07	0.00±0.00	0.00±0.00	ND	ND	ND	ND
22:5n-3 (DPA)	16.53±6.47	3.94±1.25	11.96±2.17	2.99±0.57	4.92±2.66	6.38±2.52	0.74±0.08	1.64±0.16	25.47±3.49	5.67±0.59	24.04±12.10	5.93±2.75
24:1n-9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.00±0.00	0.00±0.00	ND	ND	ND	ND
22:6n-3 (DHA)	88.30±33.51	21.00±6.44	47.98±10.43	12.01±2.85	4.22±2.31	5.46±2.27	14.61±1.11	32.40±1.16	119.34±16.86	26.63±3.38	96.57±37.3	23.83±7.01
Other			3.34±1.03	0.83±0.25	8.30±4.24	10.47±4.06	4.29±1.39	9.59±3.24	6.00±0.84	1.33±0.12		
Total			401.69±24.14	100.00±0.00	75.09±29.00	100.00±0.00	45.08±2.71	100.00±0.00	450.30±55.81	100.0±0.00		

หมายเหตุ ND มีปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางภาคผนวก ค ที่ 2 (ต่อ)

Fatty acid	Thraustochytriidae sp.10		Thraustochytriidae sp.11		Thraustochytriidae sp.12		Thraustochytriidae sp.13		Thraustochytriidae sp.14		Thraustochytriidae sp.15	
	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA	mg/g dry wt.	% of total FA
12:0	0.58±0.05	0.14±0.02	0.83±0.05	0.19±0.02	0.12±0.17	0.11±0.13	0.08±0.03	0.35±0.11	0.23±0.08	0.06±0.02	1.26±0.12	0.26±0.02
13:0	2.44±0.07	0.61±0.11	1.86±0.30	0.42±0.08	3.09±0.87	3.01±0.91	2.02±2.35	7.28±6.41	1.15±0.19	0.29±0.05	1.78±0.14	0.36±0.03
14:0	17.89±1.26	4.33±0.61	19.09±1.05	4.31±0.06	3.77±3.55	3.14±1.67	0.23±0.11	0.96±0.32	8.03±2.03	2.01±0.33	33.97±2.89	6.88±0.42
14:1	ND	ND	0.77±0.75	0.17±0.17	0.05±0.05	0.06±0.08	0.01±0.02	0.06±0.06	0.37±0.13	0.09±0.02	0.41±0.39	0.08±0.08
15:0	22.24±1.56	5.60±0.90	20.04±1.01	4.53±0.30	36.96±14.74	34.37±5.76	2.22±0.53	9.47±2.57	13.66±1.65	3.46±0.17	24.66±1.07	5.00±0.15
15:1	0.07±0.03	0.02±0.01	0.12±0.02	0.03±0.00	0.07±0.06	0.08±0.09	0.00±0.00	0.01±0.02	0.02±0.04	0.00±0.01	0.07±0.01	0.01±0.00
16:0	244.92±12.82	60.17±9.94	210.41±12.96	47.53±2.76	18.09±11.34	16.31±4.91	4.13±1.32	17.33±4.42	204.18±20.79	51.70±1.25	269.16±14.54	54.55±2.21
16:1	0.91±0.12	0.22±0.03	0.80±0.22	0.18±0.04	0.07±0.04	0.08±0.05	0.07±0.05	0.32±0.18	0.52±0.10	0.13±0.01	0.51±0.08	0.10±0.02
17:0	6.64±0.47	1.67±0.26	4.99±0.34	1.13±0.11	11.22±2.34	11.01±2.74	1.29±0.36	5.45±1.58	7.09±0.60	1.81±0.20	4.84±0.14	0.98±0.02
17:1	ND	ND	0.03±0.06	0.01±0.01	0.05±0.05	0.05±0.06	0.46±0.14	1.98±0.79	0.00±0.00	0.00±0.00	0.14±0.30	0.03±0.06
18:0	7.35±0.46	1.80±0.24	4.02±1.90	0.92±0.44	0.49±0.33	0.46±0.19	0.18±0.10	0.72±0.30	7.22±0.67	1.83±0.17	5.40±0.15	1.10±0.04
18:1	0.60±0.18	0.14±0.04	0.18±0.06	0.04±0.01	0.03±0.08	0.02±0.05	0.28±0.12	1.16±0.44	0.37±0.07	0.09±0.02	0.04±0.03	0.01±0.01
18:3n-6	0.16±0.09	0.04±0.02	0.21±0.03	0.05±0.01	0.27±0.49	0.18±0.28	0.21±0.05	0.90±0.26	0.18±0.03	0.05±0.01	0.30±0.01	0.06±0.00
18:3n-3	0.33±0.17	0.08±0.04	0.14±0.08	0.03±0.02	0.06±0.07	0.05±0.04	0.01±0.01	0.02±0.04	0.32±0.03	0.08±0.01	0.22±0.17	0.04±0.03
20:0	1.25±0.09	0.31±0.05	0.36±0.23	0.08±0.05	0.05±0.12	0.03±0.07	0.11±0.02	0.45±0.12	0.41±0.24	0.10±0.06	0.45±0.25	0.09±0.05
20:1n-9	ND	ND	0.43±0.26	0.09±0.06	0.06±0.06	0.05±0.03	0.01±0.01	0.04±0.08	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
20:2n-6	ND	ND	0.00±0.00	0.00±0.00	0.03±0.07	0.04±0.09	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
21:0	ND	ND	0.00±0.00	0.00±0.00	0.09±0.08	0.09±0.09	0.08±0.05	0.34±0.20	0.12±0.17	0.03±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00
20:3n-6	0.30±0.22	0.07±0.05	0.45±0.02	0.10±0.01	0.11±0.04	0.10±0.02	0.01±0.02	0.04±0.08	0.57±0.09	0.14±0.01	0.53±0.05	0.11±0.01
20:4n-6 (ARA)	0.19±0.09	0.04±0.02	0.42±0.06	0.10±0.01	0.37±0.11	0.35±0.05	1.27±0.58	5.07±1.24	0.33±0.10	0.08±0.02	0.38±0.03	0.08±0.01
20:3n-3	0.03±0.00	0.01±0.00	0.38±0.85	0.09±0.19	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
22:0	0.72±0.14	0.18±0.02	0.08±0.18	0.02±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0.06±0.04	0.28±0.18	0.13±0.28	0.03±0.06	0.43±0.75	0.09±0.15
20:5n-3 (EPA)	0.01±0.00	ND	1.84±0.26	0.41±0.04	1.04±0.42	0.97±0.24	2.38±0.80	9.72±2.01	1.43±0.16	0.36±0.03	1.69±0.16	0.34±0.03
22:1n-9	1.19±0.51	0.27±0.11	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.57±0.33	2.61±1.49	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
22:2	ND	ND	0.11±0.16	0.03±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
22:5n-3 (DPA)	18.95±10.05	4.31±20.8	27.17±3.01	6.12±0.39	5.61±1.96	5.24±0.42	0.45±0.28	1.72±0.71	30.51±3.84	7.71±0.40	28.29±2.38	5.74±0.50
24:1n-9	ND	ND	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
22:6n-3 (DHA)	88.60±45.50	20.01±9.48	136.93±18.00	30.84±2.92	13.70±5.71	12.56±1.55	4.47±1.84	18.01±5.06	113.22±13.94	28.61±1.05	113.89±9.79	23.09±2.01
Other			11.54±2.25	2.61±0.49	12.68±13.83	11.63±10.64	3.77±1.12	15.73±2.84	5.24±0.59	1.33±0.14	4.97±0.82	1.01±0.18
Total			443.17±23.93	100.0±0.00	108.08±40.67	100.00±0.00	24.37±6.95	100.00±0.00	395.27±42.38	100.00±0.00	493.38±14.84	100.00±0.00

หมายเหตุ ND มีปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจวัดได้