รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

แผนงานวิจัย

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

Marine Microbes: As the New Source for Drug Agents and Food Supplements

รวิวรรณ วัฒนดิลก

ณิษา สิรนนท์ธนา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2557A10801018
สัญญาเลขที่ 134/2557

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

แผนงานวิจัย

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

Marine Microbes: As the New Source for Drug Agents and Food Supplements

รวิวรรณ วัฒนดิลก
ณิษา สิรนนท์ธนา
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 144/2557

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2558

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

รวิวรรณ วัฒนดิลก ณิษา สิรนนท์ธนา
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131

บทคัดย่อ

จากผลการดำเนินงานวิจัยทั้ง 6 โครงการย่อยในปีที่ 2 ซึ่งแต่ละโครงการวิจัยได้ดำเนินการวิจัยตามแผนงาน สรุปได้ดังนี้

ในปีที่ 2 ทำการเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลบริเวณหมู่เกาะเต่า อ. เกาะพงัน จ. สุราษฎร์ธานี ระหว่างวันที่ 24-21 เมษายน 2557 จำนวน 8 จุดสำรวจ พบมากที่สุด Order Haplosclerida (15 ชนิด(รองลงมาคือ Order Poecilosclerida โดยพบฟองน้ำ *Biemna trirhaphis* (Topsent, 1897) รายงานเป็นครั้งแรกในน่านน้ำไทย และฟองน้ำ *Cliona orientalis* Thiele, 1900, *Axinyssa mertoni* (Hentschel, 1912), *Cladocroce burapha* Putchakarn, de Weerdt, Sonchaeng & van Soest, 2004 รายงานเป็นครั้งแรกในพื้นที่หมู่เกาะเต่า จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเล พบว่าให้ผลที่น่าสนใจ

ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างจากดินตะกอนป่าชายเลนของจังหวัดชุมพร สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท 16 ไอโซเลต และเชื้อแอคติโนมัยซีท 24 ไอโซเลต ถูกแยกจากดินบริเวณป่าชายเลน ปากแม่น้ำพังราด จังหวัดระยอง จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและ การวิเคราะห์ผนังเซลล์ทางเคมีแอคติโนมัยซีทจากทั้งสองบริเวณอยู่ในแฟมิลี *Micromono sporaceae* ได้แก่ *Micromonospora, Salinispora, Spirilliplanes* และ *Virgisporangium* เป็นต้น ผลจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นด้วยเทคนิค cross streak กับเชื้อ MRSA, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* พบแอคติโนมัยซีท 2 ไอโซเลต และ 4 ไอโซเลต จากจังหวัดชุมพรและระยอง สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ ตามลำดับ ทำการปรับปรุงสายพันธุ์แอคติโนมับซีท 6 สายพันธุ์ (CH 54-8, A3-3, CP-PH 3-2, CP-PH 3-12, CH8-4A, และ RY 2-20) ด้วยการเหนี่ยวนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต พบส่วนมากแต่ละสายพันธุ์มีการสร้างสารออกฤทธิ์ได้มากขึ้นเพียงเล็กน้อย ยกเว้นแอคติโนมัยซีท RY 2-20 ที่สร้างสารลดลง และ CP-PH3-12 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารที่สกัดได้จากทั้งภายในเซลล์และที่สร้างออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้นกว่าเดิม 6 เท่า และ 2 เท่า ตามลำดับ ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสารสกัดของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลนของจังหวัดชุมพรและระยอง พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท 6 สายพันธุ์ แสดงฤทธิ์ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้แก่ CP-PH 3-2, CP-PH3-13, CP-PH 3-22, CP-PH 8-4B, CP3-1 และ RY2-20 โดยที่ CP-PH 3-22 มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด (IC_{50} 74.04$\pm$2.1 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร) ขณะที่สายพันธุ์ CP-PH 3-2, CP-PH 3-13, CP-PH3-22 และ RY2-20 ออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 63.3±6.9, 55.21±1.3, 74.04±2.1 และ 66.12±5.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ ได้แก่ เชื้อ CH54-5, A1-3 ซึ่งแยกได้จากดินป่าชายเลน จ. จันทบุรีและดินชายฝั่งทะเล จ. ชลบุรี แสดงฤทธิ์ที่รุนแรงต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* (inhibition zone 19.25, 19.64; 13.75,7.1 mm ตามลำดับ) ทำการแยกสาร antibiotic pigment จากสารสกัดเชื้อ A1-3 ผลอยู่ในระหว่างการแปลโครงสร้างและประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาชนิดกรดไขมันจากเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน จ. ชุมพร พบปริมาณรวมกรดไขมันสูงสุดในตัวอย่าง CP-PH 3-9 ปริมาณร้อยละ 41.96 กรดไขมันเป็นชนิดอิ่มตัว (SFAs: 37.63 %TFA) ชนิดกรดไขมันหลักที่พบ ได้แก่ Palmitic acid (C16:0) และ Stearic acid (C18:0) ส่วนกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) พบในปริมาณที่ต่ำโดยกรดไขมันชนิดจำเป็น Linoleic acid (C18:2n6) พบในตัวอย่าง CP-PH 8-8 ปริมาณ (0.86±0.03%TFA) และ α-linolenic acid (C18:3n3) พบในตัวอย่าง CP-PH 3-9 ในปริมาณ 0.29±0.02%TFA

จากการนำผลของการเลี้ยงยีสต์ *Pichia* sp. ไปประยุกต์ใช้ในการเตรียมอาหารปลาสูตรต่างๆ เพื่อการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลากะพงขาว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปรสิต*C. Irritans* ระยะ theront เชื้อตาย และยีสต์ *Pichia* sp. สามารถกระตุ้นให้ปลาตอบสนองต่อแอนติเจนโดยสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้น

ในปีที่ 2 นี้ได้ดำเนินการจัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียนต่างๆในเขตจังหวัดชลบุรี ได้แก่ โรงเรียนสาธิต "พิบูลบำเพ็ญ" มหาวิทยาลัยบูรพา โรงเรียนสิงห์สมุทร และโรงเรียนชลราษฎรอำรุง เป็นโครงการที่จัดขึ้นโดยคณะผู้วิจัยจากแผนวิจัย “จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร” ในช่วงเดือนสิงหาคม 2557 โดยมีวัตถุประสงค์สำคัญ 2 ประการ คือ 1) เพื่อถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเลสู่โรงเรียนระดับมัธยมศึกษาตอนปลายในเขตจังหวัดชลบุรี 2) เพื่อพัฒนาแนวคิดและทักษะด้านวิทยาศาสตร์ของนักเรียนระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โดยโครงการอบรมดังกล่าว กลุ่มเป้าหมายเป็นคณะครูและนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายสายวิทยาศาสตร์ จำนวน 450 คน ปรากฏว่ามีผู้เข้าร่วมโครงการจากโรงเรียนสาธิต "พิบูลบำเพ็ญ" จำนวน 62 คน โรงเรียนสิงห์สมุทร จำนวน 158 คน และโรงเรียนชลราษฎรอำรุง จำนวน 189 คน รวมทั้งสิ้น 409 คน คิดเป็นร้อยละ 90.89 ซึ่งถือว่าบรรลุผลได้ตามตัวชี้วัดด้านปริมาณที่กำหนดไว้ และจากการประเมินผลความพึงพอใจต่อการจัดโครงการอบรมเชิงปฏิบัติการ ปรากฏว่ามีผู้ตอบแบบประเมินจำนวน 346 คน คิดเป็นร้อยละ 84.59 ของผู้เข้าร่วม

โครงการอบรมฯ ซึ่งผลการประเมินความพึงพอใจอยู่ในระดับมากด้วยค่าคะแนนเฉลี่ย 4.07 ถือว่าบรรลุผลได้ตามตัวชี้วัดด้านผลตอบรับ ที่กำหนดระดับความพึงพอใจไว้ที่ระดับมาก

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
บทนำ	1
กรอบแนวความคิดของแผนวิจัย	7
การดำเนินการแผนงานวิจัย	8
ผลการดำเนินงานวิจัย	10
การถ่ายทอดองค์ความรู้และการนำผลงานไปเผยแพร่	16
สรุปผล	19
เอกสารอ้างอิง	21
ภาคผนวก	22

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ข้อมูลการใช้องค์ความรู้จากการศึกษาในปีที่ 2 ในการทำปัญหาพิเศษได้ผลิตบัณฑิตและนักวิจัยรุ่นใหม่	16
2	ข้อมูลการเข้าร่วมประชุมทางวิชาการและเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์/proceedings	17

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงจุดเก็บตัวอย่างในเขตพื้นที่หมู่เกาะเกาะเต่า อ. เกาะพงัน จังหวัดสุราษฎร์ธานี	10

บทนำ

การวิจัยค้นคว้าสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นยารักษาโรค และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมีมากมาย แต่ส่วนใหญ่แล้วเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท ยีสต์ และรา) บนแผ่นดิน การพัฒนาและการค้นพบผลิตภัณฑ์ใหม่ลดน้อยลงไปเรื่อยๆ เมื่อเทียบกับการเพิ่มขึ้นและการเปลี่ยนแปลงของโรค เกิดโรคอุบัติใหม่ต่างๆประกอบกับการดื้อยาของโรคต่างๆเหล่านี้ ทำให้เกิดภาวะคุกคามจนถึงแก่ชีวิตต่อคนไทยและประชากรโลก นักวิทยาศาสตร์ในหลายประเทศจึงมีความพยายามที่จะค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแหล่งใหม่ก็คือมหาสมุทรจะเป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ยิ่งใหญ่ เนื่องจากความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในทะเล โดยนักวิทยาศาสตร์ประมาณการว่าสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่มากถึง 5 แสนถึง 30 ล้านชนิด ทั้งจุลินทรีย์ที่ยังไม่สามารถประมาณการได้

ทำให้ในช่วงหลายทศวรรษตั้งแต่ปี 1950 ที่ผ่านมา นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจึงได้พยายามศึกษาเพื่อหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติตัวยาใหม่ๆจากสิ่งมีชีวิตในทะเล แต่ก็ยังไม่สามารถครอบคลุมถึงศักยภาพอันยิ่งใหญ่ของมหาสมุทร จุลินทรีย์ทางทะเลส่วนใหญ่จะกระจายอยู่ทั่วไปในมหาสมุทรประมาณ $3.6x10^{30}$ เซลล์ จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีขนาดน้อยกว่า 1 ไมครอน นอกจากนี้ยังมีความสำคัญยิ่งต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและการเผาผลาญของชีวิต แต่ความเข้าใจของเราต่อความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์และวิวัฒนาการของโครงสร้างประชากรในมหาสมุทรเป็นเพียงบางส่วนเท่านั้น แต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน แบคทีเรียทะเลรวมถึงส่วนที่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆเป็นแหล่งที่มีศักยภาพ เนื่องจากแบคทีเรียต้องแข่งขันกันเองภายใต้สภาวะที่รุนแรงต่างๆ เช่น ความเค็ม ออกซิเจน ความเป็นกรด-ด่าง แสงสว่าง ธาตุอาหาร อุณหภูมิ กระแสน้ำ และรวมไปถึงการแย่งถิ่นที่อยู่ของจุลินทรีย์ทะเลเหล่านี้ด้วย จึงพบว่าแบคทีเรียเป็นกลุ่มที่มีการสร้างสารไบโอแอคทีฟเมตาโบไลท์ที่มีความหลากหลายเพื่อความอยู่รอด ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ต่อทางการแพทย์และเภสัชวิทยา

จุลินทรีย์ทะเลเป็นแหล่งที่มาสำหรับสาร metabolites ที่ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นและมีจำนวนผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลที่มีศักยภาพที่น่าสนใจ ซึ่งอยู่ในขั้นการทดลองทางคลินิกเพิ่มมากขึ้นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลที่ได้จากแบคทีเรียจะถูกศึกษาในสองส่วน ส่วนแรกเกี่ยวกับแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น (symbiotic bacteria) และอีกส่วนหนึ่งคือจุลินทรีย์ทะเลที่ป็นสารตัวยาโดยทั่วไป นอกจากนี้ยังพบว่าสารออกฤทธิ์หลายตัวถูกสร้างมาจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน การวิจัยค้นคว้าสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นยารักษาโรคและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอย่างมากมาย ส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ พืช และจุลินทรีย์บนพื้นดิน ในขณะนี้นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจะตระหนักดีว่าฟองน้ำและสิ่งมีชีวิตในทะเลเป็นแหล่งของสารประกอบ

ธรรมชาติที่ยิ่งใหญ่และแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่น่าจะนำมาผลิตตัวยาได้ แต่ก็มักจะประสบปัญหาในการพัฒนาเนื่องจากฟองน้ำและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหายาก การเก็บก็ยากตลอดจนการเพาะเลี้ยงให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งนักวิทยาศาสตร์สามารถพัฒนาตัวยาได้โดยใช้สารประกอบที่สกัดได้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ตัวยาขึ้นมาได้ นอกจากนี้ยังมีอีกแนวทางที่ค้นพบเมื่อเร็วๆนี้คือ จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ทั้งในแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับเจ้าบ้าน หรืออยู่แบบให้ประโยชน์กับเจ้าบ้านตลอดจนสิ่งแวดล้อมในทะเล ไม่ว่าจะเป็นน้ำทะเล หรือตะกอนดินก็มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ แบคทีเรียและยีสต์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ และยีสต์ก็เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากยีสต์บางชนิดมีคุณสมบัติของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory properties) และบางชนิดเป็นแหล่งสารอาหาร โปรตีน ไขมัน และวิตามิน (Kutty และ Phillip, 2008) โดยนำมาใช้ในเทคนิต่างๆที่น่าสนใจ

ชายฝั่งทะเลของไทยก็นับได้ว่าประกอบไปด้วยระบบนิเวศต่างๆ ประเทศไทยจัดอยู่ในเขต Indo-Malayan ซึ่งเป็นเขตชีวภูมิศาสตร์ย่อยของเขต Indo-west Pacific เขตนี้ถือได้ว่าเป็นจุดศูนย์กลางการแพร่กระจายของสัตว์ทะเลทั้งหลายในโลกนี้ ซึ่ง Hooper (2002) ได้ประมาณว่าฟองน้ำทะเลในเขตชีวภูมิศาสตร์ย่อยนี้ น่าที่จะมีความหลากหลายทางชีวภาพและสมบูรณ์ถึงร้อยละ 10 ของโลกที่มีอยู่ อาทิเช่น ป่าชายเลน หาดเลน ที่อุดมสมบูรณ์ด้วยพันธุ์พืชและสัตว์นานาชนิดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ และมีความสำคัญต่อระบบนิเวศ มีหาดทราย หาดหิน และแนวปะการังที่สวยงามโดยมีผู้ประมาณการว่าทะเลไทยนั้นมีความความอุดมสมบูรณ์ทะเลจึงมีประโยชน์นานาประการ การค้นหาตัวยาใหม่ได้เกิดการแข่งขันในการวิจัยสูงมาก โดยเฉพาะทั้งยาต่อต้านไวรัส และต่อต้านมะเร็ง เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งฤทธิ์จะถูกเลือกเฉพาะที่ไม่ทำอันตรายสิ่งมีชีวิตนั้นด้วย ตัวยาใหม่บางตัวเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เป้าหมายในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมาคือ สิ่งมีชีวิตจากทะเล อาทิเช่น ฟองน้ำ กัลปังหา ปะการังอ่อน นับแต่นั้นมานักวิจัยทางเคมีและเภสัชกรรมได้หันมาสนใจผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลกันมากขึ้นเป็นลำดับ

เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียมีขนาดเล็กสารเมตาโบไลท์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แต่ละเซลล์จึงมีปริมาณน้อยตามขนาดเซลล์ การวิเคราะห์โครงสร้างสารแต่ละชนิดต้องใช้สารประมาณ 1-3 กรัม นั่นหมายความว่าต้องใช้ปริมาณสารสกัดหยาบต่อชนิดเชื้อที่อาจมากถึง 2-10 ล้านเท่าของน้ำหนักเซลล์โดยประมาณ หากจะคิดว่า 1 เซลล์ หนัก 1 μg ในแบคทีเรียอาจต้องเลี้ยงเชื้อ ถึง 20-25 ลิตร เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ 1 กรัม ในเชื้อบางชนิด สำหรับยีสต์จากทะเลเป็นราในกลุ่ม Ascomycetes หรือบางชนิดอยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes ซึ่งมีคุณค่าอาหารภายในเซลล์ และองค์ประกอบของเซลล์สูง มีทั้งโปรตีน กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามินบีหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ยีสต์ยังประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรท กรดนิวคลิอิค รวมทั้งไขมันอื่น ๆ ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะใช้สำหรับเป็นอาหารเสริม และในการเลี้ยงเซลล์ยีสต์นั้นใช้เวลาสั้น และสามารถเลี้ยงได้ โดยใช้วัตถุดิบที่อาจหาได้ง่าย เช่น

กากน้ำตาล มันสำปะหลัง หางนม (Whey) มารีนยีสต์หลายชนิดมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เช่น (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้ เป็นกรดไขมันที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริม และใช้ในทางการแพทย์ โดยเฉพาะกลุ่มไขมันโอเมกา 3 ควบคุมการทำงานในร่างกายรวมทั้งความดันโลหิต ป้องกันเลือดแข็งตัว การทำงานของระบบสมองและประสาท รวมทั้งยังนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ ปัจจุบันเรามีการผลิตยีสต์ทั้งที่เป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ ซึ่งผลิตได้โดยใช้ยีสต์หลายชนิด เช่น *Candida utilis* หรือ *Saccharomyces* sp. การใช้ยีสต์ในอาหารของคนนั้นมักใช้เพื่อปรุงแต่ง เพิ่มกลิ่นรสของอาหาร เช่น ใช้เติมในอาหารประเภทซุบ หรืออาจใช้เป็นสารสกัดจากยีสต์ใช้ทาขนมปัง ส่วนการใช้ยีสต์ในอาหารสัตว์นั้นส่วนใหญ่ใช้ในรูปอาหารเสริมโปรตีน และหากจะใช้เป็นอาหารของสัตว์ทะเลวัยอ่อน จะเลือกใช้ยีสต์ที่แยกได้จากทะเล หรือมารีนยีสต์ ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีกรดไขมันที่มี PUFA สูง และไม่ทำให้คุณภาพน้ำเสีย (เหมือนการใช้ยีสต์ทำขนมปัง) เพื่อให้สัตว์น้ำวัยอ่อนเจริญเติบโตได้ดี เพื่อเป็นแหล่งของอาหารที่มีคุณประโยชน์และมีคุณค่าอาหารสูงต่อสัตว์ทะเลที่เป็นห่วงโซ่อาหารลำดับต่อไป และเช่น เดียวกันการใช้ประโยชน์เพื่อการนี้ก็ต้องผลิตยีสต์เพื่อให้ได้เซลล์เป็นปริมาณมากอย่างเพียงพอ

จากแหล่งของตัวอย่างทั้งฟองน้ำทะเลและจุลินทรีย์ทะเลที่น่าสนใจ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพบางประการ เช่น ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น นอกจากนี้มีการศึกษาองค์ประกอบของอาหาร และองค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างเชื้อยีสต์ หรือแบคทีเรียทะเล/แอคติโนมัยซีท สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประมาณ 32,500 ชนิดมาจากแหล่งจุลินทรีย์ ซึ่งรวมถึงสารที่ได้จากจุลินทรีย์ทะเลด้วยประมาณ 100 ชนิด และมีสารต้านจุลชีพหลายตัวได้มาจาก marine actinomycetes (Batlz, 2008) ในปัจจุบันสองในสามของยาปฏิชีวนะจากธรรมชาติได้มาจากแบคทีเรียทะเล actinomycetes ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแหล่งทางเลือกของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆอีกด้วย

จุลินทรีย์ถูกนำมาใช้เป็นตัวกลางในการผลิตสารที่จำเป็นบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับทางการแพทย์และการรักษาโรค ด้านอุตสาหกรรม ด้านการเกษตร เป็นต้น ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในทางการแพทย์ เช่น ยีสต์ *Saccharomyces Cerevisiae* และแบคทีเรีย *E.coli* ใช้ผลิตสารอินซูลินซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญในการควบคุมปริมาณน้ำตาลในเลือด มีการนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ โดยใช้เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่า โปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) หรือใช้เป็นโปรไบโอติค (probiotic) ช่วยเสริมสุขภาพให้กับสัตว์เลี้ยง ทำให้สัตว์แข็งแรง ในการนำยีสต์ทะเลหรือปรสิตที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาใช้เสริมในอาหารสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาผลิตอาหารโดยวิธีการตรึงเซลล์ พบว่างานวิจัยด้านนี้ในประเทศไทยมีปริมาณน้อย การใช้ประโยชน์จากเทคนิควิธีการตรึงโดยทั่วไปมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะตรึงเซลล์หรือสารที่สำคัญไว้ภายใน ให้อยู่ในบริเวณที่ต้องการ และไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งหรือใช้ได้อย่างต่อเนื่อง มีความพยายามใช้เทคนิคการตรึงในการผลิตอาหารสำเร็จรูป เพื่อลดปริมาณ

การใช้อาหารมีชีวิตในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนในรูปแบบต่างๆ กระบวนการที่จะตรึงสาร อาหารไว้ภายในให้ได้มากที่สุดและให้ถูกปล่อยออกมาในระยะเวลาที่เหมาะสม รวมถึงการนำวัสดุที่ใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำมาทำการตรึงจะต้องมีการศึกษาทั้งเทคนิคในการตรึงและวัสดุที่จะนำมาตรึง

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

1. เพื่อค้นหาและพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ พัฒนาด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ คือ กรดไขมัน และชีวรงควัตถุ พัฒนาการผลิตวัคซีนสำหรับสัตว์น้ำ ตลอดจนการพัฒนาเพิ่มผลผลิตเซลล์จุลินทรีย์
2. เพื่อดำเนินการสนับสนุนติดตาม โครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัยฯ ให้สามารถดำเนินงานไปตามวัตถุประสงค์ รวมถึงการเผยแพร่ผลงาน และถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยไปสู่กลุ่มเป้าหมาย

วัตถุประสงค์รอง

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของฟองน้ำและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมฟองน้ำ ตลอดจนจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น แอคติโนมัยซิทีส และยีสต์ จากสภาพแวดล้อมทางทะเลในน้ำและดินตะกอน
2. เพื่อศึกษาและตรวจหาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ คือ กรดไขมัน และชีวรงควัตถุ
3. เพื่อพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการเฉพาะทางในการทดสอบสารทีมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ชีวรงควัตถุ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากทรัพยากรชีวภาพจากทะเล
4. เพื่อถ่ายทอดองค์ความรู้ในการศึกษาและแนวทางการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล

เป้าหมายเชิงยุทธศาสตร์ของแผนงานวิจัย

1. พัฒนาองค์ความรู้ในการพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสร้างความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม
2. พัฒนาการบริหารจัดการและการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนและเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพ
3. การนำเทคโนโลยีใหม่เพื่ออุตสาหกรรม การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีด้านอาหารและยาเพื่อเพิ่มคุณค่าและมูลค่าของผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพและความงาม
4. การผลิตวัคซีนและอาหารเสริมสำหรับสัตว์น้ำด้วยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากจุลินทรีย์ทะเลทดแทนการใช้สารเคมี

5. สามารถเผยแพร่ผลงาน และถ่ายทอดองค์ความรู้ วิจัยและพัฒนาสารตัวยาตั้งต้นไปใช้ประโยชน์ ผ่านการฝึกอบรม สัมมนาวิชาการและในรูปของเอกสารตีพิมพ์ระดับชาติและนานาชาติ

เป้าหมายของผลผลิต (output) และตัวชี้วัด

เป้าหมายของผลผลิตของชุดโครงการในปีที่ 2 โดยมีผลผลิตและตัวชี้วัดเป็น ข้อมูลเบื้องต้นทางด้าน การค้นหาสารออกฤทธิ์ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สารสีชีวรงควัตถุ และการตีพิมพ์และเผยแพร่ผลงานวิจัยระดับชาติและระดับนานาชาติ ตลอดจนการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการและแลกเปลี่ยนความรู้ทางวิชาการ สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีความชำนาญเฉพาะทาง

1. การเพิ่มความสามารถและพัฒนาองค์ความรู้ในการค้นหาประโยชน์ทางเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทรัพยากรชีวภาพจุลินทรีย์จากทะเลที่ยั่งยืน
2. การตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารสีชีวรงควัตถุ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จากฟองน้ำ ยีสต์ และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ เช่น สารตัวยาต้านมะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ กรดไขมัน รงควัตถุชีวภาพ
3. การถ่ายทอดองค์ความรู้จากวิจัยและพัฒนา ไปสู่เยาวชนและประชาชนผู้สนใจ

เป้าหมายของผลลัพธ์ (outcome) และตัวชี้วัด

เป้าหมายของผลลัพทธ์และตัวชี้วัดของชุดโครงการคือ พบสารตัวยาตั้งต้นที่มีฤทธิ์ชีวภาพ สารสีชีวรงควัตถุที่ใช้ประโยชน์ ได้ต้นแบบผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ได้วัคซีน และอาหารเสริมสำหรับสัตว์น้ำ นำไปพัฒนาหรือสังเคราะห์ใช้ประโยชน์ ผ่านเครือข่ายการวิจัย หน่วยงานและองค์กรต่างๆ ตลอดจนถ่ายทอดองค์ความรู้ผ่านการฝึกอบรม สัมมนาวิชาการและในรูปของเอกสารตีพิมพ์ระดับชาติ และระดับนานาชาติ และพัฒนาศักยภาพของคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเป้าหมายในปีที่ 2

1. สร้างเครือข่ายการศึกษาทางด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ในแต่ละหน่วยงานให้เกิดประโยชน์สูงสุด
2. สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ บุคคลากรในระดับโรงเรียนและอุดมศึกษาที่มีความชำนาญในการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติทางทะเลควบคู่กับการอนุรักษ์อย่างยั่งยืน

กรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

จากการที่จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน บางพวกอยู่อย่างเสริมกัน (Benevolent interaction) ขณะที่บางพวกอาจอยู่อย่างต่อต้านกัน (Antagonistic interaction) ส่วนอีกหลายพวกอยู่อย่างอิสระไม่เกี่ยวข้องกัน การที่จุลินทรีย์บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารที่ต้านการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆได้ เพื่อการแก่งแย่งอาหารและที่อยู่อาศัย เพื่อการดำรงชีวิต ทำให้มนุษย์นำปรากฏการณ์นี้มาใช้

ประโยชน์ สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นในช่วงที่เริ่มหยุดการเจริญจะมีประโยชน์ เพราะยับยั้งการสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่บางชนิดในเซลล์ได้จึงช่วยรักษาพลังงานส่วนหนึ่งไว้ นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์อื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นนี้จะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดลงได้ ประโยชน์ของยาปฏิชีวนะที่ดัดแปลงมาจากสารเมตาบอไลท์ที่จุลินทรีย์บางชนิดผลิตขึ้นนั้น จะมีอาการแพ้ยาหรือเป็นอันตรายต่อมนุษย์น้อยมาก สารเมตาบอไลท์เหล่านี้มีประโยชน์ในด้านต่างๆมากมายทั้งด้านอุปโภค บริโภค และอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการแพทย์อาจใช้รักษาโรคติดเชื้อ หรือรักษาโรคอื่น เช่น เพื่อรักษาโรคมะเร็ง หรือใช้ในงานวิจัยเพราะมีพิษสูงเกินกว่าที่จะใช้ในร่างกาย (มาลิน, 2540) ในการผลิตยาปฏิชีวนะที่จะนำมาใช้ได้นั้น จำเป็นต้องมีคุณสมบัติหลายประการ เช่น ไม่ควรมีพิษ ไม่ตกตะกอนโปรตีนในซีรั่ม ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัว ไม่ควรมีฤทธิ์ข้างเคียงหรือมีน้อยที่สุด ในปัจจุบันยังไม่มียาปฏิชีวนะใดที่มีคุณสมบัติดีทุกด้าน ทำให้งานการค้นหาตัวยาใหม่ๆยังมีความจำเป็น อย่างไรก็ตามการผลิตยาปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์มีข้อดี คือ 1. สามารถปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้ 2. สามารถปรับปรุงสภาแวดล้อมในการเจริญของจุลินทรีย์ 3. สามารถปรับปรุงและควบคุมสภาวะในการผลิตสารของจุลินทรีย์ เป็นต้น (มาลิน, 2540)

ตัวยาใหม่จากทะเลกว่า 10 ชนิด ได้เข้าสู่การทดลองใช้จริงทางการแพทย์ในขั้นคลีนิค มีหลายบริษัทสนใจซึ่งมีกิจกรรมหลักจะเน้นไปทางวิจัยพัฒนา การจัดหาวัตถุดิบ และส่วนผสมใหม่จากทะเลอยู่บนหลักการของการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนของทรัพยากรธรรมชาติทางทะเล เครือข่ายการวิจัยของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ได้แสดงผลให้เห็นถึงศักยภาพของการสร้างนวัตกรรมทางเคมีผลิตภัณฑธรรมชาติของทรัพยากรชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ฟองน้ำ และแบคทีเรียทะเลในอ่าวไทย อาทิเช่น Kijjoa และคณะ (2007) ได้รายงานถึงศักยภาพของสารประกอบที่สกัดจากฟองน้ำจากอ่าวไทยแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี และเมื่อเร็วๆนี้ Watanadilok., R. และคณะ (2007) ค้นพบสารประกอบ 2 ชนิดแยกได้จากฟองน้ำที่เก็บจากอ่าวไทยแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราและจุลินทรีย์อื่นได้ดีเช่นกัน นอกจากนี้ Rungprom และคณะ (2008) ได้รายงานถึงการค้นพบสารไซคลิกเปปไตด์ ชนิดใหม่ที่สกัดได้จากแบคทีเรียทะเล *Pseudoalteromonas* sp. ที่คัดแยกจากฟองน้ำ *Halisarca ectofibrosa* ที่เก็บจากอ่าวไทยเช่นกัน

สารกลุ่มปฏิชีวนะมีการศึกษาในกลุ่มของสารผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ มีเป็นส่วนน้อยที่ศึกษาสารกลุ่มชีวโมเลกุลที่เป็นโปรตีน ไกลคอโปรตีนโพลิแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคน พืช และสัตว์ (นันทวัน และคณะ 2544; และจากบทความของสถาพร (2544) สรุปว่ามีการศึกษาการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของสาหร่ายคลอเรลลา (*Cholrella* sp.) พบว่าคลอเรลลาสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ เช่น *Vibrio harveyi, Vibrio parahaemolvticus*และ *Vibrio penaeicida* ปี 1998 มีรายงานว่าแบคทีเรียในสกุลวิบริโอที่พบทั่วไปในบ่ออนุบาลลูกกุ้งสามารถสร้างสารในการยับยั้งไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในปลาได้

ดังนั้นเพื่อเป็นการศึกษาสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่ง ชุติวรรณ และคณะ (2541) ได้ศึกษาไว้ในส่วนของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เน้นในกลุ่มของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยใช้กระบวนการทางเคมี และพบแบคทีเรียจากทะเลหลายสายพันธุ์มีแนวโน้มสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำได้คือ *Vibrio anguilarum* จึงน่าที่จะได้มีการทดลองสกัดสารและกระบวนการทดสอบสารที่ได้โดยวิธีทางชีวเคมีควบคู่กันไปกับการศึกษาที่ผ่านมาด้วย ซึ่งเป็นการใช้วิธีการสกัดที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้สารกลุ่มใหม่ที่เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน แล้วทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยใช้แบคทีเรียมาตรฐานและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ อันจะทำให้ได้ข้อมูลใหม่หรือสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่มีประสิทธิ์ภาพสูงขึ้นหรือมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งแตกต่างจากข้อมูลที่ผ่านมา

นอกจากนี้แบคทีเรียสามารถผลิตรงควัตถุได้หลากหลาย ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลด้วย รงควัตถุนี้มีความสำคัญต่อสรีรวิทยาของเซลและการอยู่รอด สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้หลายตัวพบว่ามีคุณสมบัติเป็นยาต้านจุลชีพ ต้านมะเร็งและกดภูมิคุ้มกัน ส่วนใหญ่จุลินทรีย์ผลิตสารทุติยภูมิผ่านกลไก quorum sensing ซึ่งสารรงควัตถุเหล่านี้สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นๆได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ จากความหลากหลายของสารเหล่านี้และยังมีแนวโน้มที่ดีในการออกฤทธิ์ยับยั้งโรคต่างๆได้หลายโรค จึงมีบทบาทสำคัญทั้งในงานวิจัยทางการแพทย์และทางการเกษตร นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความก้าวหน้าทางวิทยาการในเรื่องการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลอย่างกว้างขวาง อีกทั้งส่งเสริมให้มีการค้นคว้าตัวยารักษาโรค ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารใหม่ๆ สาระสำคัญในเครื่องสำอาง จากการที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่องผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสิ่งมีชีวิตในทะเลมาอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่ปี 2529 เป็นต้นมา โดยในระยะแรกเน้นเฉพาะในเขตพื้นที่ชายฝั่งทะเลในบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออก เขตจังหวัดชลบุรี และจังหวัดระยอง และเน้นเฉพาะในเรื่องของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สารปฏิชีวนะ และความเป็นพิษต่อเซลล์จากฟองน้ำและสาหร่ายทะเล ต่อมาได้เพิ่มขอบเขตที่ศึกษาให้ครอบคลุมทั้งชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกและฝั่งอันดามัน และขยายขอบเขตการศึกษาในเรื่องของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย เช่น สารยับยั้งเนื้องอก สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง อีกทั้งแหล่งของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่โดยเฉพาะแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับสัตว์น้ำตามธรรมชาติ จึงน่าที่จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้จุลินทรีย์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมควบคุมหรือป้องกันโรคสัตว์น้ำที่เกิดจากจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน ประกอบกับช่วยลดปัญหาสารพิษตกค้าง ลดการใช้ยาและเคมีภัณฑ์ เพื่อศึกษาถึงศักยภาพของสิ่งมีชีวิตในทะเลและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วม ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตกับแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วม และปัจจัยต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวซึ่งจะมีจะมีความสัมพันธ์กันอย่างมาก เพื่อเสริมสร้างศักยภาพของประเทศไทยในการพึ่งพาตนเองให้มีทางเลือกใหม่ในการ ลดการนำเข้าตัวยา เคมีภัณฑ์และสารปฏิชีวนะ โดยอาศัยการผลิตจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ จะสามารถบ่งชี้หรือเป็นแนวต่อการนำทรัพยากรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่ใช้ประโยชน์จากผลการวิจัย

การวิจัยข้างต้นมีรูปแบบเป็นสหวิชาการ (Multidiplinary) เป็นเครือข่ายที่อาศัย ความร่วมมือจากผู้ชำนาญทางด้านชีววิทยา เคมี ชีวเคมี จุลชีววิทยา และเภสัชวิทยา ก่อให้เกิดประโยชน์ในหลายด้านซึ่งจะนำไปสู่การสร้างมูลค่าเพิ่มจากผลผลิต การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนและเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพ" เช่น พืชสมุนไพรในการผลิตอาหาร ยา และเครื่องสำอาง เป็นการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพจุลินทรีย์ทะเลอย่างยั่งยืนในชุมชน ตลอดจนทำให้เกิดการต่อยอดการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพของชุมชน สู่การสร้างและการพัฒนาสร้างนวัตกรรมใหม่ของประเทศ

- ทราบถึงสารประกอบทางเคมีหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากฟองน้ำหรือแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลซึ่งจะยังประโยชน์ต่อการแพทย์ ด้านวิทยาศาสตร์ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและอื่นๆ
- ได้สารตั้งต้นยาปฏิชีวนะ ข้อมูลหรือขั้นตอนการวิจัยที่เป็นประโยชน์สำหรับนำไปใช้ในการวิจัยต่อยอดในระดับสูงขึ้นและพัฒนาไปสู่การนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป
- ทราบถึงนวัตกรรมทางเคมีได้โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถนำไปใช้สังเคราะห์ตัวยาใหม่ที่สกัดแยกจากฟองน้ำหรือแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลหรือดินตะกอนที่พบในประเทศไทย ซึ่งจะยังประโยชน์ต่อการแพทย์ ด้านวิทยาศาสตร์
- ทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานของเภสัชวิทยาและฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) และสารสีรงควัตถุจากจุลินทรีย์ทะเลในประเทศไทย ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาด้านเภสัชกรรมต่อไป
- ข้อมูลหรือขั้นตอนการวิจัยสำหรับนำไปใช้ในการสอนวิชาเคมี ชีวเคมี จุลชีววิทยา เภสัชวิทยา และเทคโนโลยีชีวภาพ ระดับอุดมศึกษา
- ทำให้มีข้อมูลและสามารถถ่ายทอดความรู้เกี่ยวการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีอยู่ในท้องถิ่นแก่นักเรียน นิสิตนักศึกษา อาจารย์ นักวิจัยและผู้สนใจ ให้บรรลุผลตามวัตถุประสงค์และเวลาที่กำหนดไว้
- การถ่ายทอดองค์ความรู้จากวิจัยและพัฒนา ไปสู่เยาวชนและประชาชนผู้สนใจ

การดำเนินการแผนงานวิจัย

การดำเนินการแผนงานวิจัยในปีที่ 2

ในการศึกษาวิจัย เรื่อง จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็นชุดโครงการวิจัย ที่มีโครงการวิจัยย่อย 6 โครงการ มีคณะผู้วิจัยรับผิดชอบแต่ละโครงการย่อย

วิธีการดำเนินการวิจัยแต่ละโครงการแตกต่างกันไป แต่ทุกโครงการทำการวิจัยแบบมีส่วนร่วมวิธีการดำเนินการวิจัย ดังรายละเอียดดังนี้

1. การติดตามสนับสนุนเสริมนักวิจัย

- จัดประชุมคณะนักวิจัย เพื่อทำความเข้าใจวัตถุประสงค์ เป้าหมายและวางแผนการดำเนินการวิจัยให้บรรลุเป้าหมายที่วางไว้

- ติดตามการดำเนินงานของนักวิจัยในแต่ละโครงการย่อยทั้ง 6 โครงการ จัดประชุมรายงานความก้าวหน้าของแต่ละโครงการ เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ วิเคราะห์ปัญหาและหาแนวทางในการแก้ไขร่วมกัน เพื่อสรุปผลการดำเนินงานวิจัย และรวมถึงการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ของแต่ละโครงการวิจัย

- จัดเผยแพร่งานวิจัยให้การสนับสนุนการเผยแพร่ผลงานวิจัยทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

2. การวางแผนกำหนดพื้นที่สำรวจและเก็บตัวอย่าง

วางแผนร่วมกันทั้ง 6 โครงการย่อยในการกำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่าง ติดต่อประสานงานกับองค์กรต่างๆที่เกี่ยวข้อง และดำเนินการเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลและดินตะกอนป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนล่าง ครอบคลุมพื้นที่บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนกลาง บริเวณหมู่เกาะเต่า อ. เกาะพงัน จังหวัดสุราษฎร์ธานี

3. รวบรวมข้อมูลในการจัดทำรายงาน

ผลการดำเนินงานแผนงานวิจัยและอภิปรายผล

การดำเนินงานของแผนงานฯในปีที่ 2

ผลการวิจัย เรื่อง จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ประกอบด้วยโครงการวิจัยย่อยทั้งหมด 6 โครงการ ได้ดำเนินการวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลเป็นไปตามวัตถุประสงค์ ปรากฏผลการวิจัยสรุปได้ดังนี้

ข้อมูลการเก็บตัวอย่างฟองน้ำและดินตะกอน

1. วางแผนกำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่าง

ดำเนินการประชุมวางแผนกำหนดพื้นที่การสำรวจและเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศทางทะเลต่างๆ เช่น แนวปะการัง พื้นท้องทะเล บริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเล บริเวณหมู่เกาะเต่า อ.เกาะพงัน จ.สุราษฎร์ธานี ระหว่างวันที่ 21-24 เมษายน 2557 ทั้งสิ้น 8 จุดสำรวจ (ดังแสดงภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 แสดงจุดเก็บตัวอย่างในเขตพื้นที่หมู่เกาะเต่า อ. เกาะพงัน จังหวัดสุราษฎร์ธานี

สำรวจและเก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน ระหว่างวันที่ 20-21 เมษายน 2557 ทั้งสิ้น 3 จุดสำรวจ บริเวณบ้านหัวแหลม หมู่3 ได้แก่

จุดที่ 1. บ้านนาทบ อ. เมือง จ. ชุมพร ตำแหน่งพิกัด 10° 29′ 50.2″ N; 99° 14′ 02.9″ E เป็นพื้นทรายปนโคลน แสมทะเลและโกงกาง

จุดที่ 2. บ้านนาชะอัง อ. เมือง จ. ชุมพร ตำแหน่งพิกัด 10° 30′ 22.3″ N; 99° 14′ 52.3″ E เป็นพื้นทรายปนโคลน ปากคลองออกทะเล แสมทะเล

จุดที่ 3. ปากคลองอุทยานฯหมู่เกาะทะเลชุมพร อ. เมือง จ. ชุมพร ตำแหน่งพิกัด 10° 21′ 26.1″ N; 99° 13′ 49.3″ E บริเวณป่าโกงกางใบเล็ก พื้นดินเป็นโคลน

โดยได้ดำเนินการประสานงานด้านต่างๆ ดังนี้

- ประสานกับสถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน จังหวัดชุมพร ในการขออนุญาตให้บุคลากรตำแหน่งนักวิชาการประมงที่มีความรู้ความสามารถในการทำวิจัยเกี่ยวกับฟองน้ำทะเล มาร่วมสำรวจและเก็บตัวอย่าง
- ดำเนินการติดต่อกับองค์กรในพื้นที่ในการเข้าสำรวจและเก็บตัวอย่างร่วมกับชุมชนในพื้นที่เพื่อทำงานวิจัย

- ดำเนินการจัดประชุมโครงการวิจัย เพื่อติดตามผลการดำเนินงานในโครงการวิจัยทั้ง 6 โครงการ ซึ่งสามารถสรุปผลการดำเนินการวิจัย และความเชื่อมโยงในปีที่ 2 ได้ดังนี้

ข้อมูลทางความหลากหลายของฟองน้ำทะเล (จากโครงการวิจัยที่ 1)

“ความหลากหลายทางชนิดของฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนกลาง”

ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างความหลากหลายทางชนิดของฟองน้ำทะเล โดยการดำน้ำแบบเครื่องช่วยหายใจใต้น้ำ (Scuba diving) รวมทั้งสิ้น 8 จุดสำรวจ สามารถรวบรวมตัวอย่างและข้อมูลฟองน้ำทะเลได้ทั้งหมด 100 ข้อมูลและตัวอย่างที่นำมาทำการจำแนกชนิดเป็นหลักฐานอ้างอิง 68 ตัวอย่าง ได้แก่

จุดสำรวจที่ 1: TAO57-A วันที่ 21 เมษายน 2557 อ่าวม่วง เกาะเต่า ทิศเหนือ จังหวัดสุราษฎร์ธานี แนวปะการังบนพื้นทราย ชายฝั่งหาดหิน ปะการังรูปทรงแบบก้อน สมอง สามารถเก็บรวบรวมฟองน้ำทะเลได้ 13 ข้อมูล และตัวอย่างอ้างอิง 12 ตัวอย่าง

จุดสำรวจที่ 2: TAO57-B วันที่ 21 เมษายน 2557 อ่าวสอง เกาะนางยวน ทิศตะวันออก จังหวัดสุราษฎร์ธานี แนวปะการังบนพื้นทราย ชายฝั่งหาดหิน ปะการังรูปทรงแบบก้อน แผ่นใบเป็นชนิดเด่น สามารถเก็บรวบรวมฟองน้ำทะเลได้ 14 ข้อมูล และตัวอย่างอ้างอิง 6 ตัวอย่าง

จุดสำรวจที่ 3: TAO57-C วันที่ 22 เมษายน 2557 อ่าวเมา เกาะเต่า ทิศตะวันออก จังหวัดสุราษฎร์ธานี แนวปะการังบนพื้นทราย ชายฝั่งหาดหิน ปะการังรูปทรงแบบก้อน สมอง แผ่นใบเป็นชนิดเด่น สามารถเก็บรวบรวมฟองน้ำทะเลได้ 17 ข้อมูล และตัวอย่างอ้างอิง 9 ตัวอย่าง

จุดสำรวจที่ 4 : TAO57-D วันที่ 22 เมษายน 2557 อ่าวลึก ทิศเหนือ เกาะเต่า ทิศตะวันออกเฉียงใต้ จังหวัดสุราษฎร์ธานี แนวปะการังบนพื้นทราย ชายฝั่งหาดหิน ปะการังรูปทรงก้อน แบบกิ่ง สมองเป็นชนิดเด่น สามารถเก็บรวบรวมฟองน้ำทะเลได้ 7 ข้อมูล และตัวอย่างอ้างอิง 5 ตัวอย่าง

จุดสำรวจที่ 5: TAO57-E วันที่ 23 เมษายน 2557 กงทรายแดง (หินฉลาม) เกาะเต่า ทิศใต้ จังหวัดสุราษฎร์ธานี กองหินโผล่พ้นน้ำ หน้าผาใต้น้ำ แนวปะการังรอบกองหิน ปะการังรูปทรงแบบเคลือบ (*Galaxea* sp.) และก้อนเป็นชนิดเด่น สามารถเก็บรวบรวมฟองน้ำทะเลได้ 13 ข้อมูล และตัวอย่างอ้างอิง 13 ตัวอย่าง

จุดสำรวจที่ 6: TAO57-F วันที่ 23 เมษายน 2557 อ่าวแหลมเจตากัง (หาดจุลเจือ) เกาะเต่า ทิศตะวันออกเฉียงใต้ จังหวัดสุราษฎร์ธานี แนวปะการังบนพื้นทราย ชายฝั่งหาดทราย ปะการังรูปทรงแบบแผ่นใบ กิ่ง ก้อน สลับกับปะการังเห็ด เป็นชนิดเด่น สามารถเก็บรวบรวมฟองน้ำทะเลได้ 8 ข้อมูล และตัวอย่างอ้างอิง 6 ตัวอย่าง

จุดสำรวจที่ 7: TAO57-G วันที่ 24 เมษายน 2557 หินเขียว เกาะนางยวน ทิศเหนือ จังหวัดสุราษฎร์ธานี, แนวปะการังบนก้อนหิน พื้นทราย ปะการังรูปทรงแบบก้อน แผ่นใบเป็นชนิดเด่น สามารถเก็บรวบรวมฟองน้ำทะเลได้ 20 ข้อมูล และตัวอย่างอ้างอิง 9 ตัวอย่าง

จุดสำรวจที่ 8: TAO57-H วันที่ 24 เมษายน 2557 หาดทรายรี ทิศเหนือ เกาะเต่า ทิศตะวันตก จังหวัดสุราษฎร์ธานี แนวปะการังบนพื้นทราย ปะการังรูปทรงแบบแผ่นใบ สลับกับก้อน เป็นชนิดเด่น สามารถเก็บรวบรวมฟองน้ำทะเลได้ 8 ข้อมูล และตัวอย่างอ้างอิง 4 ตัวอย่าง

การเก็บรักษาตัวอย่าง

ตัวอย่างฟองน้ำทะเลที่เก็บแช่ด้วยเอธานอล 70 % เพื่อจำแนกชนิด ตรวจสอบลักษณะและขนาดของสปิคุล (Spicules) โดยประยุกต์จากวิธีของ Putchakarn และคณะ (2004) รวบรวมข้อมูลรายละเอียดสัณฐานวิทยาของตัวอย่างฟองน้ำที่ได้จากการสำรวจภาคสนามและห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์ข้อมูล และวินิจฉัยชื่อวิทยาศาสตร์ตัวอย่างฟองน้ำโดยการเปรียบเทียบเอกสารอ้างอิง จาก Hooper & Soest (2000) Systema Porifera และ เอกสารอ้างอิงต่างๆที่ได้เก็บรวบรวมไว้

ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่าง

1. รวบรวมตัวอย่างและข้อมูลฟองน้ำทะเลได้ทั้งหมด 100 ข้อมูล จำแนกชนิดโดยการเทียบเคียงตัวอย่างฟองน้ำกับเอกสารอ้างอิงและปรึกษากับนักวิจัยที่ปรึกษาพบฟองน้ำทะเลจำแนกชนิดได้ 38 ชนิด จาก 28 สกุล 21 วงศ์ 10 อันดับ

2. ฟองน้ำที่รายงานเป็นครั้งแรกในพื้นที่หมู่เกาะเต่า 3 ชนิด ได้แก่ *Cliona orientalis* Thiele, 1900, *Axinyssa mertoni* (Hentschel, 1912) และ *Cladocroce burapha* Putchakarn, de Weerdt, Sonchaeng & van Soest, 2004

3. กลุ่มของฟองน้ำที่พบมากที่สุดคือ Order Haplosclerida (15 ชนิด) รองลงมาคือ Order Poecilosclerida (8 ชนิด)

4. รูปทรงการเจริญแบบเคลือบเป็นฟองน้ำกลุ่มเด่น ฟองน้ำที่พบส่วนมากเป็นชนิดที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในอ่าวไทยและทะเลจีนใต้

ข้อมูลความหลากหลายของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกจากดินตะกอน

- ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินตะกอนป่าชายเลนของ อ. เมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี จาก 3 จุดสำรวจและดินป่าชายเลนภาคตะวันออก ปากแม่น้ำพังราด จังหวัดระยอง โดยแยกบนอาหาร

3 ชนิด คือ ISP2, SCA และ Actinomycete Isolation Agar พบแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน จ. สุราษฎร์ธานี ได้ 16 ไอโซเลต และพบแอคติโนมัยซีท 24 ไอโซเลต

- ทดสอบการสร้างสารแอนติไบโอติกเบื้องต้นด้วยวิธี cross streak พบว่าแอคติโนมัยซีทที่พบจากป่าชายเลนจังหวัดชุมพรให้สารยับยั้งจุลินทรีย์ 2 ไอโซเลต ขณะที่แอคติโนมัยซีทที่พบจากป่าชายเลน จังหวัดระยอง พบ 4 ไอโซเลต

- การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ผนังเซลล์ทางเคมี โดยตรวจสอบชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิค และน้ำตาลที่มีอยู่ในเซลล์ทั้งหมด พบว่าแอคติโนมัยซีทที่พบจากทั้งสองบริเวณ อยู่ในแฟมิลี *Micromonosporaceae* เหมือนกัน โดยจีนัสที่พบ ได้แก่ *Micromonospora, Salinispora, Spirilliplanes,* และ *Virgisporangium* เป็นต้น

- ปรับปรุงสายพันธุ์ ด้วยการเหนี่ยวนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ CH 54-8, A3-3, CP-PH 3-2, CP-PH 3-12, CH8-4A, และ RY 2-20 เป็นเวลา 15, 20 และที่ 25 นาที และคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่สร้างสารมากกว่าโคโลนีอื่นๆ ออกมาทดสอบการเลี้ยงปริมาณมาก พบว่าแต่ละสายพันธุ์มีการสร้างสารออกฤทธิ์ได้มากขึ้น ยกเว้นแอคติโนมัยซีท RY 2-20 ที่สร้างสารลดลง อย่างไรก็ดี แอคติโนมัยซีท CP-PH3-12 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารที่สกัดได้จากทั้งภายในเซลล์และที่สร้างออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ มากขึ้นกว่าเดิม 6 เท่า และ 2 เท่า ตามลำดับ

การศึกษาทางเคมีและการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทหรือยีสต์

การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทธิลอะซิเตทชั้นเซลล์และชั้นน้ำเลี้ยงจากแอคติโนมัยซีท 11 สายพันธุ์ ที่แยกจากดินตะกอนชายฝั่งและดินป่าชายเลนในเขตจังหวัดจันทบุรีและสุราษฎร์ธานี จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดหยาบชั้นน้ำเลี้ยงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าชั้นเซลล์

1. โดยในชั้นน้ำเลี้ยงมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ในช่วง 74.04$\pm$2.1–400 และ 55.21$\pm$1.3–400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดแอคติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้แก่ สายพันธุ์ CP-PH 3-2, CP-PH3-13, CP-PH 3-22, CP-PH 8-4B, CP3-1 และ RY2-20 โดยที่ CP-PH 3-22 มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด (IC_{50} 74.04$\pm$2.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่สายพันธุ์ CP-PH 3-2, CP-PH 3-13, CP-PH3-22 และ RY2-20 ออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 63.3$\pm$6.9, 55.21$\pm$1.3, 74.04$\pm$2.1 และ 66.12$\pm$5.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ CP-PH 3-13 ออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ดีที่สุด

2. ส่วนของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ ได้แก่ เชื้อ CH54-5, A1-3 ซึ่งแยกได้จากดินป่าชายเลน จ. จันทบุรีและดินชายฝั่งทะเล จ. ชลบุรี แสดงฤทธิ์ที่รุนแรงต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* โดยเชื้อ CH54-5 แสดงขอบเขตการ

ยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) 19.25, 19.64 มม. ขณะที่เชื้อแอคติโนมัยซีท A1-3 แสดง inhibition zone ที่ระยะ 13.75, 7.1 มม. ตามลำดับ

3. จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ได้ ทำการแยกสาร antibiotic pigment จากสารสกัดเชื้อ A1-3 ซึ่งผลอยู่ในระหว่างการแปลโครงสร้างและประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ

การศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันจากเชื้อแอคติโนมัยซีท/ยีสต์

กรดไขมันจากแอคติโนมัยซีท

การศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับสัตว์น้ำจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 22 ตัวอย่าง ที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และ จังหวัดชุมพร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ระยะเวลา 3-14 วัน เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาการเลี้ยงเชื้อสำหรับนำไปใช้ในการเตรียมสูตรอาหารสัตว์น้ำ

- ปริมาณรวมกรดไขมันสูงสุดในตัวอย่าง CP-PH 3-9 ปริมาณร้อยละ 41.96 กรดไขมันเป็นชนิดอิ่มตัว (SFAs: 37.63 %TFA) ชนิดกรดไขมันหลักที่พบ ได้แก่ Palmitic acid (C16:0) และ Stearic acid (C18:0) ส่วนกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) พบในปริมาณที่ต่ำโดยกรดไขมันชนิดจำเป็น Linoleic acid (C18:2n6) พบในตัวอย่าง CP-PH 8-8 ปริมาณ (0.86±0.03%TFA) และ **α**-linolenic acid (C18:3n3) พบในตัวอย่าง CP-PH 3-9 ในปริมาณ 0.29±0.02%TFA

กรดไขมันจากยีสต์

- ยีสต์ *Pichia* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยที่ความเค็ม 25 พีพีที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบการเจริญสูงสุดในระยะเวลาการเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง องค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างเซลล์ยีสต์ประกอบด้วย

กรดไขมันชนิดอิ่มตัว (SFAs) ปริมาณสูงสุด 29.34%TFA (4.99 mg/g wet wt. ; 14.18 mg/g dry wt) มี Palmitic acid (C16:0) เป็นกรดไขมันหลัก 24.48%TFA (4.19 mg/g wet wt.; 11.90 mg/g dry wt.)

กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) มีปริมาณ 22.51%TFA (4.45 mg/g wet wt.; 12.71 mg/g dry wt.) และ Linoleic acid (C18:2n6) เป็นกรดไขมันหลัก 18.40%TFA (3.62 mg/g wet wt, 10.33 mg/g dry wt.)

การวิเคราะห์คุณค่าอาหาร (Proximate analysis) มีค่าโปรตีนร้อยละ 42 ไขมันร้อยละ 0.22 ความชื้นร้อยละ 66 เถ้าร้อยละ 2

- ส่วนปริมาณกรดไขมันจากเม็ดเจลที่ตรึงเซลล์ยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตประกอบด้วย

กรดไขมันอิ่มตัว SFAs สูงสุด 32.61%TFA (0.08mg/g wet wt.; 0.87 mg/g dry wt.) มี Palmitic acid, C16:0 เป็นองค์ประกอบหลัก 21.20%TFA (0.033 mg/g wet wt; 0.380mg/g dry wt.)

กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (MUFAS) 20.36%TFA (0.04 mg/g wet wt.; 0.45 mg/g dry wt.) มี Oleic acid (C18:1n9) เป็นกรดไขมันหลัก 17.8%TFA (0.027 mg/g wet wt;0.314 mg/g dry wt.)

กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAS) 9.93%TFA (0.05 mg/g wet wt.; 0.54 dry wt.) โดยมี Linolenic acid (C18:3n3) เป็นกรดไขมันหลักในปริมาณ 6.79 %TFA (0.033 mg/g wet wt.; 0.372 mg/g dry wt.)

การพัฒนาและการประยุกต์ใช้เชื้อที่แยกได้

1. การเหนี่ยวนำแอคติโนมัยซีท ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ultra violet, UV)

การนำแอคติโนมัยซีทมาเหนี่ยวนำด้วยแสง UV เพื่อให้มีการกลายพันธุ์และมีการสร้างออกฤทธิ์ ได้มากขึ้น แม้ว่าผลที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยแสง UV นั้นจะส่งผลให้มีการสร้างสารเพิ่มมากขึ้นเป็นส่วนใหญ่ แต่ก็เป็นการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

วิธีการชักนำให้เชื้อกลายพันธุ์ด้วยแสง UV จะนำ สปอร์ของเชื้อมา expose ต่อแสง UV ในระยะ 30 ซม. ที่เวลา 15, 20 และ 25 นาที เลี้ยงบนจานอาหารที่เหมาะสมที่สุด (ISP2) หลังจากบ่มเชื้อให้เจริญที่ 32 °C สกัดสารเมตาโบไลท์ทั้งจากเซลล์และจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย methanol และ ethyl acetate ตามลำดับ

จากการเหนี่ยวนำเชื้อแอคติโนมัยซีท 6 สายพันธุ์ ได้แก่ CH 54-8, A3-3, CP-PH 3-2, CP-PH 3-12, CH8-4A, และ RY 2-20 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต พบส่วนมากแต่ละสายพันธุ์มีการสร้างสารออกฤทธิ์ได้มากขึ้นเพียงเล็กน้อย ยกเว้นแอคติโนมัยซีท RY 2-20 ที่สร้างสารลดลง และ CP-PH3-12 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารที่สกัดได้จากทั้งภายในเซลล์และที่สร้างออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้นกว่าเดิม 6 เท่า และ 2 เท่า ตามลำดับ

2. การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่ให้กินอาหารทดลองหลายสูตรต่อการต้านทานปรสิตชนิด *Cryptocaryon irritans* โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด อาหารทดลองประกอบด้วยอาหารเม็ดชนิดจมน้ำ 4 สูตร ได้แก่

อาหารสูตรที่ 1 อาหารชุดควบคุมประกอบด้วยสูตรอาหารปลากะพง

สูตรที่ 2 อาหารชุดควบคุมผสม *C. irritans* ระยะ theront เชื้อตาย

สูตรที่ 3 อาหารปลาชุดควบคุมผสมยีตส์ *Pichia* sp.

สูตรที่ 4 อาหารชุดควบคุมผสม Sodium alginate

ทุกสูตรมีปริมาณโปรตีน 49-51 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณไขมัน12-13 เปอร์เซ็นต์ ผลพบว่า

- ปลาที่กินอาหารที่มีปรสิตและยีสต์เป็นองค์ประกอบเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีแนวโน้มของระดับของแอนติบอดีสูงกว่าปลาที่กินอาหารชุดควบคุมและอาหารที่มีโซเดียมอัลจิเนตเป็นองค์ประกอบ
- ปริมาณโปรตีนในซีรั่มปลากะพงพบว่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงนานขึ้นโดยเฉพาะปลาที่กินอาหารสูตรที่ 2 3 และ 4
- เมื่อให้ปลาเผชิญเชื้อแล้วเป็นเวลา 3, 7 และ 14 วัน พบว่าแนวโน้มของระดับแอนติบอดีของปลาที่กินอาหารสูตรที่ 1 2 และ 3 สูงขึ้น ส่วนระดับแอนติบอดีของปลาที่กินอาหารสูตรที่ 4 ค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง
- ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่มี *C. irritans* ระยะ theront เชื้อตายเป็นส่วนผสมมีปริมาณโปรตีนในซีรั่มสูงกว่าในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม
- สรุปผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปรสิต*C. Irritans* ระยะ theront เชื้อตาย และยีสต์ *Pichia* sp. สามารถกระตุ้นให้ปลาตอบสนองต่อแอนติเจนโดยสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้น

การถ่ายทอดองค์ความรู้และการนำผลงานไปเผยแพร่

1. การถ่ายทอดองค์ความรู้และการสร้างนักวิจัยรุ่นเยาว์

จากการดำเนินการวิจัยของโครงการย่อย 6 โครงการในปีที่ 2 ได้ใช้องค์ความรู้จากการศึกษาในการทำปัญหาพิเศษ ได้ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่และบุคลากรที่อยู่ในโครงการได้เป็นที่ปรึกษา และที่ปรึกษาร่วมในระดับอุดมศึกษา 1 เรื่องจาก 1 โครงการวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 1 (เอกสารบทคัดย่อแสดงในภาคผนวก)

ตารางที่ 1 ข้อมูลการใช้องค์ความรู้จากการศึกษาในปีที่ 2 ในการทำปัญหาพิเศษ ได้ผลิตบัณฑิตและนักวิจัยรุ่นใหม่

โครงการวิจัย	คณะ/สาขา	ระดับ/จำนวน (คน)	เรื่องปัญหาพิเศษ
5	วิทยาศาสตร์/ เทคโนโลยีชีวภาพ	ป. ตรี / 2	ผลของรังสีอัลตราไวโอเลตต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท

2. การจัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ “การถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียนต่างๆในเขตจังหวัดชลบุรี”

นอกจากนี้ในปีที่ 2 ได้ดำเนินการจัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ “การถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัญจรสู่

โรงเรียนต่างๆในเขตจังหวัดชลบุรี” ได้แก่ โรงเรียนสาธิต "พิบูลบำเพ็ญ" มหาวิทยาลัยบูรพา โรงเรียนสิงห์สมุทร และโรงเรียนชลราษฎรอำรุง เป็นโครงการที่จัดขึ้นโดยคณะผู้วิจัยจากโครงการภายใต้แผนวิจัย “จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร” ในช่วงเดือนสิงหาคม 2557 โดยมีวัตถุประสงค์สำคัญ 2 ประการ คือ

1) เพื่อถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเลสู่โรงเรียนระดับมัธยมศึกษาตอนปลายในเขตจังหวัดชลบุรี

2) เพื่อพัฒนาแนวคิดและทักษะด้านวิทยาศาสตร์ของนักเรียนระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย

โดยโครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการดำเนินการจาก 5 โครงการย่อย ได้แก่ โครงการที่ 1 2 3 4 และ 5 ซึ่งมีกลุ่มเป้าหมายเป็นคณะครูและนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายสายวิทยาศาสตร์ จำนวน 400-450 คน (เอกสารโครงการและคู่มือการบรรยายและฝึกปฏิบัติดังแนบในภาคผนวก)

สรุปผลการประเมินความพึงพอใจของผู้เข้าร่วมการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ ปรากฏว่ามีผู้เข้าร่วมโครงการจากโรงเรียนสาธิต "พิบูลบำเพ็ญ" จำนวน 62 คน โรงเรียนสิงห์สมุทร จำนวน 158 คน และโรงเรียนชลราษฎรอำรุง จำนวน 189 คน รวมทั้งสิ้น 409 คน คิดเป็นร้อยละ 90.89 ซึ่งถือว่าบรรลุผลได้ตามตัวชี้วัดด้านปริมาณที่กำหนดไว้ และจากการประเมินผลความพึงพอใจต่อการจัดโครงการอบรมเชิงปฏิบัติการ ปรากฏว่ามีผู้ตอบแบบประเมินจำนวน 346 คน คิดเป็นร้อยละ 84.59 ของผู้เข้าร่วมโครงการอบรมฯ ซึ่งผลการประเมินความพึงพอใจอยู่ในระดับมากด้วยค่าคะแนนเฉลี่ย 4.07 ถือว่า บรรลุผลได้ตามตัวชี้วัดด้านผลตอบรับ ที่กำหนดระดับความพึงพอใจไว้ที่ระดับมาก โดยรายละเอียดสรุปการประเมินผลของแต่ละโรงเรียน (ดังเอกสารแนบในภาคผนวก)

การนำผลงานไปเผยแพร่

จากการดำเนินการวิจัยของโครงการย่อย 6 โครงการในปีที่ 2 ได้นำผลจากการศึกษาวิจัยในเบื้องต้นไปร่วมประชุมทางวิชาการและเข้าร่วมเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ทั้งสิ้น 5 เรื่องจาก 2 โครงการวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 2 (เอกสารบทคัดย่อ แสดงในภาคผนวก)

ตารางที่ 2 ข้อมูลการเข้าร่วมประชุมทางวิชาการและเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์/proceedings

โครงการวิจัย	การประชุม	สถานที่/ประเทศ	ชื่อเรื่อง
4	Burapha University International Conference 2015 (BUU2015), 10-12 July 2015	Bangsaen, Chonburi / Thailand	Effect of salinity on the growth and fatty acid composition of the marine yeast *Pichia* sp. cultured in sugarcane bagasse media (Poster/Proceedings)

โครงการวิจัย	การประชุม	สถานที่/ประเทศ	ชื่อเรื่อง
3 และ 5	Burapha University International Conference 2015 (BUU2015), 10-12 July 2015	Bangsaen, Chonburi / Thailand	Distribution of actinomycetes in Thai mangrove sediments (Poster/Proceedings)
5	25th Biennial Asian Association for Biology Conference, 13-16 October, 2014	Kuala Lumpur/Malaysia	Biodiversity of Antimicrobial Producing Actinomycetes in Coastal Marine Sediments
5	18th International Microscopy Congress, 7-12 September 2014	Praque, Czech Republic	Morphological study of antimicrobial actinomycete producing isolates from marine sediments
3 และ 5	International Seminar and Workshop on Marine Natural Products 2015, 15-17 September 2015	Tao-Tong Center Operation Hotel, Burapha University/Thailand	Antimicrobial Activity of Actinomycetes Isolated from Mangrove Sediments

สรุปผลการดำเนินงานและข้อเสนอแนะ

จากผลการดำเนินงานวิจัยทั้ง 6 โครงการย่อย ในปีที่ 2 แต่ละโครงการวิจัยสามารถดำเนินการวิจัยได้ตามแผนงาน ซึ่งสรุปได้ดังนี้

1. ตัวอย่างฟองน้ำทะเลที่เก็บจากหมู่เกาะเต่า อ. เกาะพงัน จ. สุราษฎร์ธานี จาก 8 จุดสำรวจ จำนวน 100 ตัวอย่าง โดย 68 ตัวอย่าง ทำการจำแนกชนิดเป็นหลักฐานอ้างอิง จำแนกได้ 38 ชนิด จาก 28 สกุล 21 วงศ์ 10 อันดับ กลุ่มฟองน้ำที่พบมากที่สุด คือ Order Haplosclerida (15 ชนิด) รองลงมาคือ Order Poecilosclerida (8 ชนิด) โดยพบฟองน้ำ *Biemna trirhaphis* (Topsent, 1897) รายงานเป็นครั้งแรกในน่านน้ำไทย และฟองน้ำ *Cliona orientalis* Thiele, 1900, *Axinyssa mertoni* (Hentschel, 1912), *Cladocroce burapha* Putchakarn, de Weerdt, Sonchaeng & van Soest, 2004 รายงานเป็นครั้งแรกในพื้นที่หมู่เกาะเต่า
2. ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินตะกอนป่าชายเลนของ อ. เมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี จาก 3 จุดสำรวจและดินป่าชายเลนภาคตะวันออก ปากแม่น้ำพังราด จังหวัดระยอง โดยแยกบนอาหาร 3 ชนิด คือ ISP2, SCA และ Actinomycete Isolation Agar พบแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน จ. สุราษฎร์ธานี 16 ไอโซเลต และ 24 ไอโซเลต ตามลำดับ พบว่าแอคติโนมัยซีทที่พบจากป่าชายเลนจังหวัดชุมพรให้สารยับยั้งจุลินทรีย์ 2 ไอโซเลต ขณะที่แอคติโนมัยซีทที่พบจากป่าชายเลน จังหวัดระยอง พบ 4 ไอโซเลต
3. โดยในชั้นน้ำเลี้ยงมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ในช่วง 74.04$\pm$2.1–400 และ 55.21$\pm$1.3–400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดแอคติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้แก่ สายพันธุ์ CP-PH 3-2, CP-PH3-13, CP-PH 3-22, CP-PH 8-4B, CP3-1 และ RY2-20 โดยที่ CP-PH 3-22 มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด (IC_{50} 74.04$\pm$2.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่สายพันธุ์ CP-PH 3-2, CP-PH 3-13, CP-PH3-22 และ RY2-20 ออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 63.3$\pm$6.9, 55.21$\pm$1.3, 74.04$\pm$2.1 และ 66.12$\pm$5.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ CP-PH 3-13 ออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ดีที่สุด เชื้อแอคติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ ได้แก่ เชื้อ CH54-5, A1-3 ซึ่งแยกได้จากดินป่าชายเลน จ. จันทบุรีและดินชายฝั่งทะเล จ. ชลบุรี แสดงฤทธิ์ที่รุนแรงต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* โดยเชื้อ CH54-5 แสดงขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) 19.25, 19.64 มม. ขณะที่เชื้อแอคติโนมัยซีท A1-3 แสดง inhibition zone ที่ระยะ 13.75, 7.1 มม. ตามลำดับ

4. การศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับสัตว์น้ำ จากเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 22 ตัวอย่าง ที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และ จังหวัดชุมพร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ระยะเวลา 3-14 วัน ปริมาณรวมกรดไขมันสูงสุดในตัวอย่าง CP-PH 3-9 ปริมาณร้อยละ 41.96 กรดไขมันเป็นชนิดอิ่มตัว (SFAs: 37.63 %TFA) ชนิดกรดไขมันหลักที่พบ ได้แก่ Palmitic acid (C16:0) และ Stearic acid (C18:0) ส่วนกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFAs) พบในปริมาณที่ต่ำโดยกรดไขมันชนิดจำเป็น Linoleic acid (C18:2n6)

ปัญหาและอุปสรรค

1. ปัญหาอุปสรรคที่สำคัญในการสำรวจวิจัยครั้งนี้คือ สภาพภูมิอากาศแปรปรวนก่อให้เกิดคลื่นลมในทะเลรุนแรงจนไม่สามารถออกเก็บตัวอย่างได้อย่างต่อเนื่องและไม่สามารถเข้าถึงจุดสำรวจตามแผนที่วางไว้ โดยเฉพาะทิศที่รับลมทำให้ขาดข้อมูลบางส่วนไป อีกทั้งงบประมาณในการสำรวจมีจำกัดทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถขยายระยะเวลาในการสำรวจได้มากนัก
2. สารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทมีประมาณน้อย และบางครั้งเกิดการปนเปื้อนทำให้การทดลองล่าช้า

งานที่จะดำเนินการต่อไปในปีที่ 3

- เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้จากดินตะกอนป่าชายเลน จังหวัดชุมพร
- จากโครงการที่ 3 จะดำเนินการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารรงควัตถุต่อในปีที่ 3
- วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากพื้นที่จังหวัดชุมพร
- โครงการวิจัยการพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรียในปีที่ 2 สามารถตรึงเซลล์ยีสต์และปรสิต *C. irritans* ระยะ theront ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต สำหรับนำไปใช้ในการผลิตอาหารสัตว์น้ำเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลาให้สามารถต้านเชื้อปรสิต *C. irritans* ที่ทำให้เกิดโรคจุดขาวน้ำเค็มในปีต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา รวิวรรณ วัฒนดิลก และสุเมตต์ ปุจฉาการ. 2541. การศึกษาสารไบโอแอกทีฟ เมตตาบอไลต์ จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำในประเทศไทย. รายงายฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

นันทวัน นันทวนิช วิมลมาศ ลิปิพันธ์ และสุนันท์ พงษ์สามารถ. 2544. ผลของสารโพลิแซคคาไรด์เจลจากเปลือกของผลทุเรียน ต่อการต้านแบคทีเรียในระดับหลอดทดลอง การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 27 หน้า 466.

มาลิน จุลศิริ (2540) ยาต้านจุลชีพ : ความรู้พื้นฐาน และการประยุกต์ โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน กรุงเทพฯ, 209 หน้า.

Baltz R.H., 2008. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol*., 8: 1-7.

Hooper J.N.A. & Soest R.W.M. 2002. *Systema Porifera*, Volume I. UK: Kluwier Publisher.

Imamura N., Adachi K., Nishijima M. and Sano H. 1993. Antibioticsproduces bymarine Bacteria. MBI Report 1992, Marine Biotechnology Institute co., LTD., Tokyo. Japan. p78-87.

Kijjoa A., Watanadilok R., Campos N., Nascimento M.S.J., Pinto M., and Herz W. 2007. Anticancer activity evaluation of Kuanoniamines A and C isolated from the marine sponge *Oceanapia sagittaria*, collected from the Gulf of Thailand. *Mar. Drugs*. 5: 6-22.

Kijjoa A., Watanadilok R., Sonchaeng P., Putchakarn S., Sawangwong P., and Herz W. 2003. Bromotyrosine derivatives from the marine sponge, *Suberea* aff. *praetensa*. *Bolletlino del Musei degli Instituti Biologici dell' Universita di Genova.* 68: 391-397.

Kutty, S.N. and Philip, R. 2008. Marine yeasts - a review. Yeast. 25:465-483.

Watanadilok R., Sawangwong P., Rodrigues C., Cidade H., Pinto M., Pinto E., Silva, A. and Kijjoa A. 2007. Antifungal Activity Evaluation of the Constituents of *Haliclona baeri* and *Haliclona cymaeformis*, Collected from the Gulf of Thailand. *Mar. Drugs*. 5: 40-51.

Srivibool R. and Sukchotiratana M. 2006. Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils. Songklanakarin J. Sci. Technol., 28(3): 493-499.

ภาคผนวก

โครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง "ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียน"

โดย คณะผู้วิจัยจากแผนวิจัย "จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร" สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ณ โรงเรียนในเขตจังหวัดชลบุรี

ระหว่างเดือนสิงหาคม ๒๕๕๗

.....

๑. หลักการและเหตุผล

การพัฒนางานด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลมีบทบาทสำคัญกับภูมิภาคแถบชายฝั่งทะเล ซึ่งเกี่ยวข้องกับ 3 กลุ่มหลักๆ ได้แก่ เทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงในน้ำ เทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลเพื่อตอบสนองความต้องการของภาคอุตสาหกรรมต่างๆ และเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งพัฒนาบุคลากรทางด้านวิทยาศาตร์และเทคโนโลยี อันเป็นกำลังสำคัญในการพัฒนาประเทศ โดยในปัจจุบันยังขาดแคลนบุคลากรทางด้านนี้ทำให้ข้อมูลและการประยุกต์ใช้ทรัพยากรทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลอย่างยั่งยืนโดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ทะเลมีจำนวนไม่เพียงพอ

จากแผนวิจัย"จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร" ซึ่งประกอบด้วย 6 โครงการย่อย ที่มุ่งเน้นการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ทะเลแหล่งต่างๆ โดยมีเป้าหมายเพื่อค้นหาสารตัวยาตั้งต้นที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ พัฒนาการเพิ่มผลผลิตเซลล์จุลินทรีย์ พัฒนาองค์ความรู้บนฐานความหลากหลายทางชีวภาพ พัฒนาด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ พัฒนาการผลิตวัคซีนสำหรับสัตว์น้ำ และเป็นแนวทางในการถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยและแนวทางการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลไปสู่เยาวชนและประชาชนผู้สนใจ โดย **โครงการถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและด้านเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลสัญจรสู่โรงเรียน** ถือเป็นการถ่ายทอดองค์ความรู้จากการศึกษาวิจัยของโครงการวิจัยสู่โรงเรียนในพื้นที่จังหวัดชลบุรี เป็นการดำเนินการที่สอดคล้องกับเป้าหมายของแผนงานวิจัยฯ กล่าวคือนักวิจัยสามารถนำผลงานวิจัยในปีที่ ๑ เกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล รวมถึงเทคนิคการสกัดสารประกอบประเภทต่างๆ เช่น สารสี กรดไขมัน และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆไปถ่ายทอดข้อมูลและความรู้ให้กับหน่วยงานสถาบันการศึกษาเพื่อกระตุ้นให้นักเรียน คิดค้น และมีวิธีการทำงานแบบวิทยาศาสตร์ ตลอดจนการรู้จักการวางแผน การปฏิบัติทดลอง การบันทึกข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล และการนำเสนอ ด้วยทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งจะทำให้เกิดการขยายกำลังการผลิตบุคลากร การพัฒนากำลังคนด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่อๆไปซึ่งประเทศไทยกำลังขาดแคลนการสร้างนักวิทยาศาสตร์และ

นักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีคุณภาพต้องได้รับการสนับสนุนจากภาคการศึกษาตั้งแต่ระดับเยาวชนเพื่อนำเข้าสู่กระบวนการพัฒนาอย่างถูกทางและเหมาะสมจึงต้องเร่งส่งเสริมและกระตุ้นให้เยาวชนหันมาสนใจและเพิ่มพูนทักษะทางวิทยาศาสตร์ตั้งแต่ระดับนักเรียน เด็กและเยาวชนของชาติเป็นทรัพยากรบุคคลที่มีบทบาทและส่วนสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งจะเป็นกำลังหลักในการพัฒนาประเทศ ปัจจุบันปริมาณนักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยมีจำนวนไม่เพียงพอ โดยพบสาเหตุว่าโครงการส่งเสริมการเป็นนักวิ ทยาศาสตร์และนักวิจัยมีน้อย โครงการถ่ายทอดองค์ความรู้นี้เป็นเพียงโครงการนำร่องที่อาจช่วยผลักดันให้นักเรียนหันมาสนใจหรือนำไปประยุกต์ใช้ในโครงงานวิทยาศาสตร์ทางด้านวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

๒. วัตถุประสงค์โครงการ

๑. เพื่อถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเลสู่โรงเรียนระดับมัธยมศึกษาตอนปลายในเขตจังหวัดชลบุรี

๒. เพื่อพัฒนาแนวคิดและทักษะด้านวิทยาศาสตร์ของนักเรียนระดับมัธยมศึกษาตอนปลายในเขตจังหวัดชลบุรี

๓. ผู้รับผิดชอบโครงการ

๑. คณะผู้วิจัยจากแผนงานวิจัย “จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร” สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ดำเนินงานโครงการ

- ดร. รวิวรรณ วัฒนดิลก หัวหน้าโครงการ
- นางณิษา สิรนนท์ธนา เลขานุการโครงการ

กรรมการโครงการ

- ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา
- ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
- ดร. สุพรรณี ลิโทชวลิต
- ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ
- นางสาวรัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์
- ดร. จารุนันท์ ประทุมยศ

๒. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

๓. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

๔. วิธีการฝึกอบรม

๑. บรรยายและปฏิบัติการ

๒. บอร์ดนิทรรศการ๔-๖บอร์ด

๕. ผู้เข้าร่วม

คณะครูและนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายสายวิทยาศาสตร์ของโรงเรียนสาธิต “พิบูลบำเพ็ญ” มหาวิทยาลัยบูรพา โรงเรียนชลราษฎรอำรุง และโรงเรียนสิงห์สมุทรจังหวัดชลบุรี จำนวน ๔๐๐-๔๕๐ คน

๖. ระยะเวลาดำเนินการ

ระยะเวลาดำเนินการโรงเรียนละ ๑ วัน รวม ๓ วัน ในเดือนสิงหาคม ๒๕๕๗

วันที่ ๑ สิงหาคม ๒๕๕๗ โรงเรียนสาธิต “พิบูลบำเพ็ญ” มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

วันที่ ๒๐ สิงหาคม ๒๕๕๗ โรงเรียนสิงห์สมุทร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

วันที่ ๒๗ สิงหาคม ๒๕๕๗ โรงเรียนชลราษฎรอำรุง อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

๗. สถานที่จัด

๑. โรงเรียนสาธิต “พิบูลบำเพ็ญ” อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

๒. โรงเรียนชลราษฎรอำรุง อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรีและ

๓. โรงเรียนสิงห์สมุทร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

๘. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

๑. ผลงานวิจัยที่ได้จากโครงการวิจัยของแผนวิจัยฯมาถ่ายทอด บรรยายและสาธิตถึงความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์และฟองน้ำทะเล และเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติให้แก่ครูและนักเรียนที่เข้าร่วม สามารถนำไปประกอบการเรียนการสอน หรือประยุกต์ใช้ในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์

๒. สามารถสร้างทักษะด้านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ให้แก่นักเรียนที่เข้าร่วม

๙. แผนการดำเนินงาน

กิจกรรม	เดือน ๒๕๕๗					
	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.
๑. ประสานงาน/ประชุมคณะทำงาน	←	→				
๒. สำรวจพื้นที่/ วางแผนดำเนินงาน			↔			
๓. จัดทำโครงการ			↔			
๔. เตรียมข้อมูลและรูปแบบการถ่ายทอดฯ			←	→		
๕. ดำเนินการถ่ายทอดองค์ความรู้ใน รูปแบบการบรรยายและปฏิบัติการ					↔	
๖. สรุปและประเมินผลกิจกรรม					←	→
๗. จัดทำรายงานการดำเนินโครงการ						↔

๑๐. การประเมินโครงการ

การตอบแบบสอบถาม และสังเกตโดยผู้เชี่ยวชาญจากการเข้าร่วมฟังบรรยายและการฝึกภาคปฏิบัติการของนักเรียน

๑๑. งบประมาณ

งบประมาณค่าใช้จ่ายโครงการจำแนกตามประเภทต่างๆ

รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
๑. งบบุคลากร	-
๒. งบดำเนินงาน	**๒๓,๗๐๐**
๒.๑ ค่าตอบแทน ใช้สอยและวัสดุ	
(๑) ค่าตอบแทนวิทยากรและผู้ช่วยวิทยากร (บรรยายพร้อมปฏิบัติการ ชั่วโมงละ ๖๐๐บาท จำนวน ๘ คนๆละ ๑.๓๐ ชั่วโมง เป็นเวลา ๓ วัน)	๒๑,๖๐๐
(๒) ค่าตอบแทนผู้เชี่ยวชาญประเมินโครงการฯ วันละ ๗๐๐ บาท เป็นเวลา ๓ วัน	๒,๑๐๐
๒.๒ ค่าใช้สอย	**๓๔,๕๐๐**
- ค่าเช่ารถยนต์อัตรา ๒,๔๐๐บาท/วัน/คัน	๙,๖๐๐
- ค่าน้ำมันเชื้อเพลิง	๒,๔๐๐
- ค่าอาหารจัดเลี้ยง จำนวนประมาณ ๔๕๐ คน	๑๓,๕๐๐
- ค่าจ้างเหมาเจ้าหน้าที่ช่วยงาน จำนวน ๘ คน	๘,๐๐๐
- ค่าจัดเตรียมสถานที่	๑,๐๐๐
๒.๓ ค่าวัสดุ	**๒๖,๘๐๐**
- ค่าอุปกรณ์ในการจัดกิจกรรม	๑๓,๕๐๐
- ค่าเอกสารประกอบการบรรยาย	๑๐,๐๐๐
- ค่าวัสดุอื่นๆ เช่น โปสเตอร์ วัสดุสำนักงาน	๓,๓๐๐
รวมค่าใช้จ่ายในโครงการ	**๘๕,๐๐๐**

หมายเหตุ ขอถัวเฉลี่ยจ่ายทุกรายการได้ตามความจำเป็น

.....

(นางรวิวรรณ วัฒนดิลก)

ผู้อำนวยการแผนวิจัยฯ/หัวหน้าโครงการฝึกอบรมฯ

กำหนดการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียน”

<u>วันที่ สิงหาคม๒๕๕๗</u>

เวลา	กิจกรรม
๐๘.๑๕ – ๐๘.๓๐น.	ลงทะเบียน
๐๘.๓๐– ๐๙.๐๐น.	เปิดการอบรมแนะนำแผนงานวิจัยฯและทีมงาน
๐๙.๐๐– ๑๐.๐๐น.	บรรยาย/สาธิต “การจำแนกชนิดตัวอย่างฟองน้ำทะเลอย่างง่ายๆ” โดย ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ
๑๐.๐๐– ๑๑.๐๐น.	บรรยาย “การแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลและการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้น” โดย ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา
๑๑.๐๐ – ๑๒.๐๐ น.	ฝึกปฏิบัติการ “การจำแนกชนิดตัวอย่างฟองน้ำทะเลอย่างง่ายๆ” และ“การแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลและการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ” โดย ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ / ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา และวิทยากรฝึกปฏิบัติ (นางณิษา สิรนนท์ธนา,ดร.จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, ดร. สุพรรณี ลีโทชวลิต และ ดร. จารุนันท์ ประทุมยศ)
๑๒.๐๐– ๑๓.๐๐ น.	พักรับประทานอาหารกลางวัน
๑๓.๐๐– ๑๔.๐๐ น.	บรรยาย “การแยกและการใช้ประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท” โดย นางสาวรัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์
๑๔.๐๐– ๑๕.๐๐ น.	บรรยาย “เทคนิคการสกัดสารสีและสกัดลิปิดจากแอคติโนมัยซีทและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ” โดย ดร. รวิวรรณ วัฒนดิลก
๑๕.๐๐ – ๑๖.๐๐ น.	ฝึกปฏิบัติการ “การแยกและการใช้ประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท” และ“เทคนิคการสกัดสารสีและสกัดลิปิดจากแอคติโนมัยซีทและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ” โดย นางสาวรัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์/ดร. รวิวรรณ วัฒนดิลก และวิทยากรฝึกปฏิบัติ (นางณิษา สิรนนท์ธนา, ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, ดร. สุพรรณี ลีโทชวลิต และ ดร. จารุนันท์ ประทุมยศ)
๑๖.๐๐ น.	ส่งแบบประเมินโครงการฯ

สาขาวิชา: เทคโนโลยีชีวภาพ; วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คำสำคัญ : สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ/ รังสีอัลตร้าไวโอเลต/ แอคติโนมัยซีท
54030291 รวิภา เมืองนา; 54030919 วิจิตรา แสนเทพ: ผลของรังสีอัลตร้าไวโอเลตต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพของแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท. อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์; อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์. จำนวนหน้า 38 หน้า. ปีการศึกษา 2557.

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารปฏิชีวนะ มีบทบาทสำคัญในการรักษาทางการแพทย์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ที่ก่อให้เกิดโรค ประเภทของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะ ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรียแอคติโนมัยซีท และแบคทีเรียอื่นๆ โดยทั่วไปแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ มีประสิทธิภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะในปริมาณน้อย จึงได้ทำการศึกษาการชักนำแอคติโนมัยซีทด้วยรังสีอัลตร้าไวโอเลต (รังสียูวี) เพื่อให้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มาก และทำการจัดจำแนกแอคติโนมียซีท จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้สกุล *Micromonospora* 3 สายพันธุ์ และ สกุล *Streptomyces* 3 สายพันธุ์ ในการชักนำแอคติโนมัยซีท ใช้วิธีเดียวกันกับการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ทั่วไป โดยการฉายรังสียูวีบนเซลล์แขวนลอยเป็นเวลา 15, 20 และ 25 นาที คัดเลือกโคโลนีมาเลี้ยงบนอาหาร ISP2 พบว่าลักษณะโคโลนี และลักษณะสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีทภายหลังการฉายยูวีไม่แตกต่างไปจากเดิม แต่พบว่าแอคติโนมัยซีท สามารถสร้างสารชีวภาพเพิ่มมากขึ้นเกือบทุกสายพันธุ์ ยกเว้น RY2-20 และมีการสร้างสารชีวภาพใน 5 ลักษณะ คือ 1) สร้างสารไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม 2) สร้างสารออกมานอกเซลล์น้อยชนิดลง 3) สร้างสารออกมานอกเซลล์มากชนิดขึ้น 4) สร้างสารในเซลล์มากชนิดขึ้น และ 5) สร้างสารในเซลล์และสร้างสารออกมานอกเซลล์มากชนิดขึ้น การชักนำแอคติโนมัยซีทด้วยรังสียูวีมีผลต่อการสร้างสารชีวภาพมากขึ้นเป็นส่วนใหญ่ทั้งในแง่ปริมาณและจำนวนชนิด โดยสามารถผลิตสารชีวภาพได้ดังนี้ คือ CP-PH-3-2 ผลิตสารเพิ่มขึ้นร้อยละ 21.99, CP-PH-3-12 ผลิตสารเพิ่มขึ้นร้อยละ 256.60, CP-8-4-A ผลิตสารเพิ่มขึ้นร้อยละ 25.85, CH54-8 ผลิตสารเพิ่มขึ้นร้อยละ 46.62, A3-3 ผลิตสารเพิ่มขึ้นร้อยละ 5.75 และ RY2-20 ผลิตสารลดลงร้อยละ 26.63

MAJOR: Biotechnology; B.Sc. (Biotechnology)
KEYWORDS : Bioactive compound/ Ultraviolet ray/ Actinomycetes
54030291 Rawipha Muangna; 54030919 Wichittra Saentep: The effects of ultra-violet rays to create bioactive compounds by Actinomycetes bacteria.
ADVISOR: Rattanaporn Sriviboon, Co-ADVISOR: Assistant Professor Krongchan Rattanaphradit, Ph.D. 38 P. Academic Year 2014.

Bioactive compounds especially antibiotic was one of the major drugs in medical treatment. It have ability to disrupt bacterial growth, It have many type of microbes that can product antibiotic such as fungi, Actinomycetes bacteria and other bacteria, but most natural Actinomycetes can't generate antibiotics much enough for the manufacturing. So we desire to induce mutation in Actinomycetes by Ultraviolet treat for development bacterial strains to be able generate more antibiotics. From characteristic we can separate six strains of Actinomycetes to three strains of *Micromonospora* and three strains of *Streptomyces*. In mutation induction of Actinomycetes we use the common method by irradiated Ultraviolet ray to suspension cell for 15, 20 and 25 minute, then select bacterial colony to cultivate in ISP2 agar medium. The characteristic of Actinomyces after UV treat don't change from original strain, but almost Actinomycetes can generate more kind of bioactive compounds except for RY2-20, it can classification bioactive generation type to 5 type: 1) bioactive compounds still the same 2) decrease outer cell bioactive compounds 3) increase outer cell bioactive compounds 4) increase inner cell bioactive compounds 5) increase all bioactive compounds. Actinomycetes mutation induction by UV treat can made Actinomycetes produce more bioactive compounds both quantity and kind by Actinomycetes strain CP-PH-3-2 bioactive compounds production increase 21.99%, CP-PH-3-12 increase 256.60%, CP-8-4-A increase 25.85%, CH54-8 increase 46.62%, A3-3 increase 5.75% and RY2-20 increase 26.63%

Effect of salinity on the growth and fatty acid composition of the marine yeast *Pichia* sp. cultured in sugarcane bagasse media

Nisa Siranonthana, Janjarus Watanachote, Rattanaporn Srivibool and Jarunan Pratoomyot*

Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

*Corresponding author: Jarunan Pratoomyot

E-mail: jarunan@buu.ac.th

Abstract

Yeasts are used as live feeds in the culture zooplankton which are then fed to the larvae of a broad range of aquatic animals. Given the importance of yeasts in larviculture, it is imperative that the nutrient composition of each employed yeast is determined to ensure that the nutritional needs of the target aquaculture species are being met. In the present study, the growth and fatty acid composition of the marine yeast *Pichia* sp. cultured in sugarcane bagasse media (SM) adjusted to salinities of between 25-35 ppt over a period of 192 hours was determined. Salinity was found to influence the growth of the *Pichia* sp. with cultures grown in 25 ppt having a significantly ($p \leq 0.05$) higher cell density (cells ml^{-1}) than the cultures grown in salinities of 30 and 35 ppt. The growth of the *Pichia* sp. in the 25 and 30 ppt cultures peaked at 72 h, while those reared in 35 ppt peaked at 120 h post-inoculation. Determination of the fatty acid composition in sub-samples taken from each culture at peak growth found that the profiles were broadly similar and unaffected by salinity. There was, however, a significant difference ($p \leq 0.05$) in the production of palmitic acid (C16:0), which was higher in the *Pichia* cultures adjusted to a salinity of 35 ppt than in those of lower salinity. The essential fatty acid linoleic acid (C18:2n6) was found in high concentrations whilst linolenic acid (C18:3n3) was detected in only trace amounts; the concentration of each acid were similar in each culture. The study concludes that while salinity does affect the growth of the marine yeast *Pichia* sp., the fatty acid profile remains largely unchanged across the salinity range 25 to 35 ppt. Further work, however, is required to optimize the culture conditions of this yeast if it is to be used as a live feed for zooplankton within commercial scale aquaculture enterprises.

© 2015 Published by Burapha University.

Keywords: live feed; larviculture; monounsaturated fatty acids; polyunsaturated fatty acids; aquaculture

1. **Introduction**

Yeasts are ubiquitous and commonly occur within marine and estuarine ecosystems (Kandasamy et al., 2012) and have broad spectrum application within, for example, the biomedical, chemical and food industries, in agriculture and as biofuel (Kurtzman and Fell, 2000; Yanagida et al., 2002; Passoth and Schnürer, 2003; Nisiotou and Gibson, 2005; Hill et al., 2006; Bhadra et al., 2007; Nyanga et al., 2007; Lee et al., 2008; Liu et al., 2008; Matsushika et al., 2008; Rao et al., 2008; Chi et al., 2009; Barnett and Barnett, 2011), they also have an important application within aquaculture either as probiotics, or in the culture of rotifers which are used in the larval nutrition of many aquaculture species (Patterson and Burkholder, 2003; James et al., 2004; Czerucka et al., 2007). In larval nutrition, the essential fatty acids, i.e. those belonging to the n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid families and notably the n-3 highly unsaturated fatty acids, are considered vital nutrients for the development and growth of marine larvae (Sargent et al, 2002). If yeasts are to be used in the culture of zooplankton which are subsequently given as a live feed to the larvae of many mariculture species, it is judicious to determine the nutrient content of each yeast species that is used to ascertain whether their nutritive content meets the requirements of the target aquaculture species. The proximate composition of yeasts, as might be expected, is variable across the relative taxa and can be affected by local environmental factors including their culture media (Gutierrez and Silva, 1993; Rodríguez et al, 2012; Wang et al., 2012; Watanachote et al., 2012) and by salinity (Hunter and Rose, 1971; Urano et al., 2001).

Sugarcane bagasse, is the fibrous residual matter following the mechanical extraction of sucrose from sugar cane; the residue is typically rich in monosaccharides (Du Toit et al., 1984). Yeasts preferentially catabolize sugars, although they can utilize polyols, alcohols, organic acids and amino acids as carbon and sources of energy (Spencer and Spencer, 1997). Preliminary investigations by the current authors found that a marine yeast isolated from seawater, and subsequently identified as a strain belonging to the genus *Pichia* Hansen, 1904 (Saccharomycetaceae), was able to grow in sugarcane bagasse media; the proximate composition, however, was not determined within this earlier study. The current study investigates the growth and fatty acid composition of the same isolate of *Pichia* (coded BS6-2) cultured in sugarcane bagasse media adjusted to salinities of 25, 30 and 35 ppt.

2. **Materials and methods**

2.1 Preparation of the sugarcane bagasse media (SM)

Media was prepared by mixing autoclaved sugarcane bagasse cubes, obtained locally, with the relevant salinity (25-35 ppt) of artificial seawater (Oestmann and Lewis, 1995) in a ratio of 1:10 (w/v). The sugar content of the SM was 6 mg ml^{-1} as determined by quantification of the initial reduced sugar. The sugarcane bagasse preparations were soaked and pressed for 1 h before they were filtered; 125 ml of the filtrate was then transferred a glass flask and autoclaved at 121^{o}C for 15 min.

2.2 Yeast culture and sample preparation

The isolate of *Pichia* was originally recovered from a sample of seawater collected at Bang Saen beach, Chonburi Province, Thailand (13° 16’ 56.82” N, 100° 54’ 54.42” E), and held within the yeast collection maintained at the Institute of Marine Science, Burapha University, Thailand under the accession code BS 6-2. For the current study, the yeast was cultured in yeast malt (YM) media and the density of cells determined by a spectrophotometer at 600 nm and the stock culture adjusted until an optical density (OD) of 0.2 was obtained. To investigate the growth of the Pichia sp. at three different salinities, i.e. 25, 30 and 35 ppt, a series of 42 replicate 250 ml flasks were prepared, i.e. 14 flasks per salinity. Each flask contained 125 ml autoclaved sugarcane bagasse media made to the relative salinity (i.e. SM25, SM30 and SM 35) and then to each 1 ml of the Pichia sp. stock culture was added. Thereafter, the flasks were placed on a reciprocal shaker at 100 rpm at room temperature for a period of up to 192 h. Six flasks (two per salinity group) were removed at 24 h intervals to monitor the growth of each culture and to determine the fatty acid composition. Growth was determined by removing a 1 ml sample of culture from each flask and enumerating the density of cells. A further 60 ml was taken for the fatty acid analysis. On removal, the 60 ml sample was centrifuged at 2500 rpm 10oC for 20 min. Thereafter the supernatant was discarded and the residual pellet was washed twice with 40 ml of 0.85% NaCl and then subjected to a second round of

centrifugation under the same conditions. After decanting the supernatant, the pellet was allowed to dry out in a 60oC for 18 h.

2.3 Fatty acid analysis

Once dried, 0.1 g from the relative *Pichia* sp. sample was ultra-sonicated in 20 ml ice-cold chloroform:methanol (2:1, v/v) containing 0.1 % butylated hydroxytoluene for 20 min before the liquid fraction was transferred to a separating funnel. The residual matter was then subjected to a second round of extraction after which the liquid portion was transferred to the separating funnel. To separate the non-lipid phase, 0.88% (w/w) KCl (approx. 25% of the total sample volume) was then added into the separated funnel, agitated to mix the contents and then left until the solution separated into two layers. Total lipid was obtained by filtering the lower layer through anhydrous sodium sulfate before evaporating the collected fraction. Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared from the total lipid by subjecting samples to acid-catalysed transesterification by adding 1% sulphuric acid and then incubating them at 50ºC for 16 h (Christie, 1993). Gas-liquid chromatography (Agilent Technologies GC7820A, USA) was then used to determine the FAME, with individual FAMEs being identified by comparison to known standards (PUFA No. 3, menhaden oil, Supelco, USA). The FAMEs were split injected through a wall-coated capillary column (HP-Innowax column, 30 m × 0.25 mm id, 0.25 µm film thickness (Agilent J&W, USA) and detected via a flame ionization detector (FID). Helium gas was used as the carrier at a constant flow rate of 1.2 ml min^{-1}. The temperature program used was an initial 150°C for 0.5 min, increasing to 170ºC at a rate of 5ºC min^{-1}, hold at 170ºC for 10 min, then increasing to 190°C at a rate of 3°C min^{-1}, and, then hold at 190°C for 28 min. Temperatures at the injection and detection ports were 230ºC and 250ºC respectively.

2.4 Statistical analysis

All data are presented as the mean ± S.D. Differences between samples were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey HSD *post-hoc* testing SPSS 17 for Windows. Statistical significance was set at $p<0.05$.

3. **Results**

3.1 Growth of the marine yeast Pichia *sp.*

Throughout the culture period, the pH of the SM media in all test flasks ranged from pH 5-6. The results revealed that the *Pichia* sp. cultured in SM25, *i.e.* the media containing the lowest salinity considered in the current trial, significantly ($p\leq0.05$) had the greatest number of cells ml^{-1} at each time point over the 192 h trial but cell numbers were seen to peak at 72 h (Figure 1). Cell numbers in the SM30 also peaked at 72 h while those in SM35 peaked at 120 h (Figure 1).

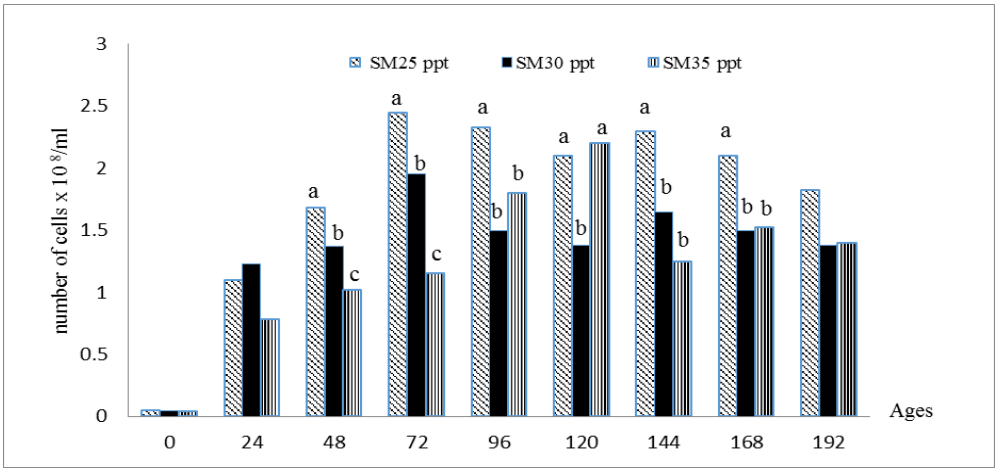


Figure 1. Growth of the marine yeast *Pichia* sp. cultured in sugarcane bagasse media adjusted to salinities of 25 (SM25), 30 (SM30) and 35 (SM35) ppt.

Given that the density of cells ml^{-1} *versus* time are important considerations in the production of live feeds for aquaculture, only the fatty acid composition of the samples taken at 72 h (*i.e.* peak of growth in SM25 and SM 30) and 120 h (*i.e.* peak growth in SM35) are presented here (Table 1). From the analysis of these, only palmitic acid (C16:0) was significantly affected ($p \leq 0.05$) by salinity where concentrations in SM35 were higher than those in SM25 and SM30. Although the concentration of saturated FA increased with rising salinity, while at the same time the amount of monounsaturated fatty acids (MUFAs) decreased with increased salinity, the differences between the tests groups were not significant (see Table 1). The concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), however, were consistent across the test samples. More generally, the FA compositions of all the cultures were similar: the monounsaturated fatty acids (MUFAs) were dominant representing 47-52% of the total fatty acid fraction (TFA), saturated FAs made up 31-37%, and, the polyunsaturated FAs (PUFAs) contributed about 17%. Within the MUFAs, the predominant FA was oleic acid (C18:1n9) which represented 42-47 % of the TFA; the dominant SFA was palmitic acid (C16:0) at 25-28 % of the TFA, and, linoleic acid (C18:2n-6) was the main PUFA representing approximately 17% of the TFA. The PUFA, linolenic acid (C18:3n-3), however, was only found in trace amounts (Table 1).

4. **Discussion**

The fatty acid composition of yeasts vary according to species and their source of nutrition and so alterations to local culture or environmental conditions will not only have an impact on growth but these changes may also effect modifications in their fatty acid composition (Gutierrez and Da Silva, 1993; Srivibool and Jaritkhuan, 2007; Chaung et al., 2012). A study conducted by Urano et al. (2001) working with halotolerant yeasts found that the number of yeast cells decreased with increasing salt concentrations but increased with higher levels of total organic carbon. This is supported by the findings from the current study where maximum cell density of the *Pichia* sp. cultured in either SM25 or SM30 peaked at 72 h, *i.e.* 48 h faster than that in SM35. Only the cell density of the SM25 culture, however, was significantly ($p \leq 0.05$) higher than that cultured in SM30 and SM35. When the fatty acid compositions of these cultures were compared, only the level of palmitic acid (C16:0) was significantly higher ($p \leq 0.05$); salinity had no other major effect on the FAs, which includes linoleic and linolenic acid, both of which are essential fatty acids for marine aquatic larvae. Essential fatty acids cannot be synthesised by marine aquatic animals and so these must be derived from their diet, *e.g.* the n-3 PUFAs - linolenic acid, eicosapentaenoic acid (C20:5n-3), docosahexaenoic acid (C22:6n-3), and the n-6 PUFAs - linoleic acid and arachidonic acid (C20:4n-6) (Sargent et al., 2002).

Table 1. The fatty acid composition of the marine yeast *Pichia* sp., expressed as percentages, that were cultured in a sugar cane bagasse based media adjusted to salinities of 25, 30 or 35 ppt salt. The yeast cultures were sampled at 72 h and 120 h when the growth of each test culture was at its peak.

Fatty acids	SM25 at 72 h	SM30 at 72 h	SM35 at 120 h
C14:0	0.71 ± 1.01	1.05 ± 0.38	0.59 ± 0.83
C16:0	24.25 ± 0.93[a]	25.06 ± 0.82[a]	28.24 ± 0.00[b]
C18:0	5.48 ± 0.20	4.67 ± 1.28	8.24 ± 1.66
C16:1n7	2.90 ± 0.93	3.94 ± 2.42	3.53 ± 1.66
C18:1n9	47.20 ± 6.35	44.86 ± 7.51	42.35 ± 1.66
C20:1n9	1.45 ± 0.46	2.44 ± 1.88	0.59 ± 0.83
C18:2n6	17.65 ± 2.72	17.60 ± 4.40	16.47 ± 1.66
C18:3n3	Tr	Tr	tr
SFA	30.44 ± 1.74	30.78 ± 1.72	37.06 ± 2.50
MUFA	51.91 ± 4.46	51.61 ± 2.68	46.47 ± 0.83
PUFA	17.65 ± 2.72	17.60 ± 4.40	16.47 ± 1.66

Data are the mean ± sd of three replicates. Different superscript letters in the same row highlight statistical differences at $p \leq 0.05$ between test groups. tr = less than 0.05.

The current trial found that the *Pichia* sp. possessed had high percentages of oleic, palmitic and linoleic acids and although linolenic acid was found in only trace amounts, the results suggest that it is possible to culture the marine yeast *Pichia* sp. in sugarcane bagasse as the yeast retains EFA in their cells. These three fatty acids were also found in *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A and in *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 cultured in sugarcane molasses (Gutierrez and Da Silva (1993) and in torula yeasts cultured in vinasse, a by-product of the sugar industry (Rodríguez et al., 2012). The fatty acid profiles manifested by yeasts subjected to increasing levels of salinity are species dependent and can result in either decrements or increments of a particular fatty acid. The salt-tolerant yeast Debaryomyces hansenii was reported to exhibit only minor changes in its fatty acid composition when grown at different salinities while the salt intolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* when placed under salt stress had markedly lower levels of linolenic acid with a concomitant increase in the production of linoleic acid (Adler and Lijenberg, 1981). Increasing the salt concentration in the culture media inoculated with the bacterium *Planococcus halophilus* NRCC 14033 resulted in a gradual increase in the amount of saturated, straight chain C16:0 and C18:0 also with increases in the production of the unsaturated FA C16:1n-9. At the same time, there was a decrease in the amount of saturated, branched chain ai-C15:0 and i-C16:0 and also in the unsaturated, straight chain C18:1 (Monteoliva-Sanchez and Ramos-Cormenzana 1987). In the present study, only the production of palmitic acid in the *Pichia* cultures were notably affected by an increased concentration of salt in the growth media. As lipids are an important structural component of cellular membranes, the increased production of palmitic acid in the SM35 cultures may be associated with changes in the membrane properties, such as fluidity and permeability, in response to increased levels of environmental salt.

In conclusion, the growth of the yeast *Pichia* sp. cultured in a sugar cane bagasse based media adjusted to 25 ppt salt (*i.e.* SM 25) peaked at 72 h when the cell density reached a maximum. Growth was significantly different ($p \leq 0.05$) from cultures grown in higher levels of salt (*i.e.* 30 and 35 ppt) but the production levels of the essential fatty acids linoleic and linolenic acid were unchanged. The study concludes that the species of *Pichia* investigated here could be cultured in SM25 and used as a live feed in the production of marine rotifers in the larval nutrition of many marine species. The mass culture of this marine yeast, however, requires further investigation and should be administered, as a feed, in conjunction with the use of microalgae to meet all the necessary nutritional requirements of the target aquaculture species.

5. **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the source of funding provided through an award from the National Research Council of Thailand administered through Burapha University.

6. **References**

Adler, L., Liljenberg, C., 1981. Sterol Content, Fatty Acid Composition of Phospholipids, and Permeability of Labeled Ethylene Glycols in Relation to Salt Tolerance of Yeasts. Physiologia Plantarum 53, p 368-374.

Barnett, J.A., Barnett, L., 2011. Yeast Research: a Historical Overview. American Society for Microbiology Press, 392 pp.

Bhadra, B., Sreenivas Rao, R., Naveen Kumar, N., Chaturvedi, P., Sarkar, PK, Shivaji, S., 2007. *Pichia cecembensis* sp. nov. Isolated from a Papaya Fruit (*Carica papaya* L., Caricaceae). FEMS Yeast Research 7, p. 579–584.

Chaung, K.C., Chu, C.Y., Su, Y.M., Chen, Y.M., 2012. Effect of Culture Conditions on Growth, Lipid Content, and Fatty Acid Composition of *Aurantiochytrium mangrovei* strain BL10. AMB Express, p. 42-53.

Chi, Z.M., Chi, Z., Zhang, T., Yue, L., Li, J., Wang, X., 2009. Production, Characterization and Gene Cloning of the Extracellular Enzymes from the Marine-derived Yeasts and Their Potential Applications. Biotechnology Advances 27, p. 236–255.

Christie, W. W., 2003. Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural. Analysis of Lipids. The Oily Press, Bridgewater, UK, 416 pp.

Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P., 2007. Review Article: Yeast as Probiotics – *Saccharomyces boulardii*. Alimentary Pharmacology Therapeutics 26, p. 767–778.

Du Toit, P.J., Olivier, S. P. and Van Biljon, P. L., 1984. Sugar Cane Bagasse as a Possible Source of Fermentable Carbohydrates. 1. Characterization of Bagasse with Regard to Monosaccharide, Hemicellulose, and Amino Acid Composition. Biotechnology and Bioengineering 26, p. 1071-1078.

Gutierrez, L. E., Da Silva, R. C. M., 1993. Fatty acid Acid Composition of Cane Molasses and Yeasts.
Sciagric,Piracicaba 50, p. 473-477.

Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffany, D., 2006. Environmental, Economic, and Energetic Costs and Benefits of Biodiesel and Ethanol Biofuels. Proceeding of the National Academy of Science 103, p. 11206–11210.

Hunter, k., Rose, A. H., 1971. Yeast Lipids and Membrane. The Yeast 2, p. 211 - 270.

James, C. M., Dias, P., Salman, E., 2004.The Use of Marine Yeast (*Candida* sp.) and Bakers' Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in Combination with *Chlorella* sp. for Mass Culture of the Rotifer *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia 147, p. 263-268.

Kandasamy, K., Alikunhi, N.M., Subramanian, M., 2012. Yeasts in Marine and Estuarine Environments. Journal of Yeast and Fungal Research 3, p. 74-82.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., 2000. The Yeasts: a Taxonomic Study, 4th Revised and Enlarged Edition. Elsevier, Amsterdam, pp 1–525.

Lee, C.F., Liu, C.H., Young, S.S., Chang, K.S. 2008. *Kazachstania jiainicus* sp. nov., an Ascomycetous Yeast Species Isolated from Soil in Taiwan. FEMS Yeast Research 8, p.114–118.

Liu, C.H., Young, S.S., Chang, T.C., Lee, C.F. 2008. *Candida dajiaensis* sp. nov., *Candida yuanshanicus* sp. nov., *Candida jianshihensis* sp. nov., and *Candida sanyiensis*sp. nov., Four Anamorphic, Ascomycetous Yeast Species Isolated from Soil in Taiwan. FEMS Yeast Research 8, p.815–822.

Matsushika, A., Watanabe, S., Kodaki, T., Makino, K., Sawayama, S., 2008. Bioethanol Production from Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae E*xpressing Xylose Reductase, NADP(+)-Dependent Xylitol Dehydrogenase, and Xylulokinase. Journal of Bioscience and Bioengineering 105, p. 296–299.

Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A., 1987. Cellular Fatty Acid Composition of *Planococcus halophilus* NRCC 14033 affected by Growth Temperature and Salt Concentration. Current Microbiology 15, p.133-136.

Nisiotou, A.A., Gibson, G.R., 2005. Isolation of Culturable Yeasts from Market Wines and Evaluation of the 5.8S-ITS rDNA Sequence Analysis for Identification Purposes. Letters in Applied Microbiology 41,p. 454–463.

Nyanga, L.K., Nout, M.J., Gadaga, T.H., Theelen, B., Boekhout, T., Zwietering, M.H., 2007. Yeasts and Lactic Acid Bacteria Microbiota from Masau (*Ziziphus mauritiana*) Fruits and Their Fermented Fruit Pulp in Zimbabwe. International Journal of Food Microbiology 120, p.159–166.

Oestmann, D.J., Lewis, D. H., 1995. A Method for Producing Microbe-free *Amyloodinium ocellatum* (Brown) with Percoll. Veterinary Parasitology 59, p. 169-175.

Passoth, V., Schnürer, J. 2003. Non-Conventional Yeasts in Antifungal Application. In "Functional genetics of industrial yeast" de Winde, J.H. Editor. Springer Verlag, Berlin, p. 297–319.

Patterson, J. A., Burkholder, K. M., 2003. Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production. Poultry Science 82, p. 627–631.

Rao, R.S., Bhadra, B., Shivaji, S. 2008. Isolation and Characterization of Ethanol-Producing Yeasts from Fruits and Tree Barks. Letters in Applied Microbiology 47, p. 19–24.

Rodríguez, B., Iben, C., Valdivié, M., Martínez. M., 2012. Profile of Fatty Acids from Torula Yeast (*Candida utilis*) Grown on Distiller's vinasse. Technical note. Cuban Journal of Agricultural Science 46, p.199-201.

Sargent, J. R., Tocher, D.R., Bell, J. G., 2002. The lipids. In "Fish Nutrition 3rd" Halver, J.E., Hardy, R.W. Editors. Academic Press, San Diego, pp. 188-257.

Spencer, J. F. T., Spencer. D.M., 1997. Yeasts in natural and artificial habitats. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.373 pp.

Srivibool, R., Jaritkhuan, S., 2007. "Marine Yeast: a New Alternative Source for Highly Unsaturated Fatty Acids." 2nd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. Khon Kaen, Thailand, p 4-3.

Urano, N., Yamazaki, M., Ueno, R., 2001. Distribution of Halotolerant and/or Fermentative Yeasts in Aquatic Environments. Journal of the Tokyo University of Fisheries 87, p. 23-29.

Wang, G.Y., Chi, Z., Song, B., Wang, Z.P., Chi, Z.M., 2012. High Level Lipid Production by a Novel Inulinase-Producing Yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. Bioresource Technology 14, p, 124:77-82.

Watanachote, J., Siranonthana, N., Watanadilok, R., Srivibool, R., 2012. "PUFAs in Marine Yeast Isolated from Coastal Water, Thailand". International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology. Khon Kaen, Thailand. p. 350- 356.

Yanagida, F., Kodama, K., Shinohara, T. 2002. Selection of Marine Yeast Stock for Making White Wine. Journal of the Brewing Society of Japan 97, p. 150–161.

Distribution of Actinomycetes in Thai Mangrove Sediments

Rattanaporn Srivibool[a,1,] Rawiwan Watanadilok[a]

[a]*Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand*

Abstract

Mangrove forest ecosystems are rich in microorganisms including actinomycetes. In this study, 24 sediment samples were collected from mangrove areas in Nakorn Si-Thammarat, Chumporn and Rayong provinces on the east coast and west coast of the Gulf of Thailand. Actnomycetes were isolated by several selective media, then were characterized and screened for antimicrobial and antioxidant activities. Actinomycetes were recovered in total 83 isolates from the 3 provinces, 55 from Nakorn Si-Thammarat, 16 from Chumporn and 12 from Rayong mangrove sediments. The actinomycetes recovered from Nakorn Si-Thamarat mangrove were rather diverse in different family, which were mainly *Streptomyces*, *Micromonospora, Nocardiopsis, Streptoalloteichus* and some unidentified genera; where as those found from Rayong and Chumporn mangroves were rather diverse mainly in same family in Actinoplanetes: *Virgisporangium, Micromonospora, Salinispora and Spirilliplanes* in which the colonies are small and in orange, brown or black which could differentiate to each other by chemotaxonomy and morphology studies. Although in Rayong and Chumporn mangrove areas did not obtain many anti-microbial producing strains as those obtained from Nakorn Si-Thammarat, we believed that by other method of antimicrobial investigation more antimicrobial producing strains would be found. Antioxidant activity by selected isolates from all areas reveal actinomycetes recovered from mangrove areas are potential source of lead antioxidant compounds.

© 2015 Published by Burapha University.

Keywords: Actinomycetes; mangrove sediments; antioxidant; antimicrobial

1. Introduction

Actinomycetes, gram positive bacteria with high G+C content, occur widely in both terrestrial and aquatic environments; many species are saprophytic and are important in soil ecology [Zhao et al., 2004]. As other soil microbes in sediment, actinomycetes play an important role in organic matters decomposition and mineral recycling. Importantly, they have contributed a wide range of biologically active compounds, notably antibiotics for clinical use and as therapeutic agents. Of the 3000+ microbial products possessing some biological activity as listed by the Antibiotic Literature Database (ABL) - Bioresearch Italia Database, the greatest contribution are made up of those isolated from actinomycetes [Lazzarini et al., 2000], many of which are from the genus *Streptomyce*s. The search for novel actinomycetes and the discovery of new antibiotics for use within the medical industry is driven by the development of resistance among a number of pathogens [Bernan and Grensteun, 2004] and the emergence of new disease conditions [Taylor et al., 2001]. However, over the last few decades, the rate of new compounds being discovered from common, soil-derived actinomycetes has declined and focus has shifted investigating the vast and largely unexplored marine environment. Several studies have indicated that a diverse community of actinomycetes occur within marine sediments, even at considerable depths [Jensen and Lauro, 2008; Maldonado et al., 2005b; Pathomaree et al., 2005; Bredholdt et al., 2007] and that these may provide a new source of novel antibiotic compounds [Fiedler et al., 2005; Hernandez et al., 2004; Hong et al., 2009; Imada, 2005]. The search for novel antibiotics is sustained by the challenges imposed by antibiotic resistant pathogens on human health [Bernan et al., 2004] and by the emergence of new diseases [Taylor et al., 2001]. The purpose of the current study was to conduct a preliminary search for the distribution of actinomycete isolates that have potential

* Corresponding author. Tel.: +66-38-391-671; fax: +66-38-391-674.
E-mail address: rattanap@buu.ac.th.

antimicrobial producing strains from mangrove sediments collected both sides the Gulf of Thailand and to evaluate their antibiotic and antioxidant activities.

2. Materials and Methods

2.1 Sampling of sample sediments

Sediment samples were collected from three main mangrove forests both east and west of the Gulf of Thailand in Nakorn Si-Thammarat, Chumporn (n=9, Ban Natung, Ban Nacha-ang, and Park Canal; Rayong (n=8) All sites being along the western and eastern margins of the Gulf of Thailand. From mangrove forest ecological systems connected to the sea, 24 samples were taken and kept in sterile plastic bags. In each case, the sediment sample was taken from the sediment surface close to rhizosphere of plants at the mangrove site with a spatula. The samples were then transferred to the Bangsaen Institute of Marine Science (BIMS) for processing and actinomycete isolation.

2.2 Isolation methods

Sediment samples were pretreated in two ways: heated for 1 h at 100ºC and/or 30 min treated with 1.5% phenol before isolation [Nonomura, 1988; Hayakawa, 1990; Hayakawa, et al., 1991; Hayakawa, 2008]. Each treated substratum sample was processed, diluted with natural sea-water at 10^{-1} and 10^{-2} of 10-fold dilution prior to inoculation on the selected isolation media. The selective media used were: starch casein agar (SCA), actinomycete isolation agar (AIA) and malt extract-yeast extract medium (ISP2) for samples from Nakorn Si- Thammarat- and Rayong-mangrove sediments; and SCA, M4 and humic acid vitamin agar (HV) for samples from Chumporn-mangrove sediments. An equal volume of natural seawater was added to all isolation media. All isolation media were supplemented with 25 µg/mL novobiocin and 50 µg/mL nystatin to prevent the growth of other Gram-negative bacteria and fungi. The isolation plates were then incubated at 30ºC and checked at regular intervals over a 4 week period for the appearance of actinomycete colonies. Actinomycete colonies appearing on the plates were subsequently purified and then kept on agar slants for subsequent investigation of antimicrobial and antioxidant activities and also in 20% glycerol which were then stored at -80ºC for longer term preservation.

2.3 Screening of antimicrobial activity

The antimicrobial activity of all isolates were tested against *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 517, MRSA22 and *Candida albicans* TISTR 5235 provided by Thailand Institute of Scientific and Technological Research, TISTR, using the cross streak technique**.** The actinomycete isolates were cultured for 4-6 days at one side of the cultured plates before the 18 h test strains, 0.5 McFaland, were perpendicular streaked across by sterile cotton buds and continued incubation for another 24 h period.

2.4 Screening of antioxidant activity

Some pigmented and/or antimicrobial producing isolates were selected to investigate for antioxidant activity. To achieve the amount of secondary bioactive metabolites using, the actinomycetes isolates were cultured in ISP2 medium for at least 3 L at 30º C and shaken at 110 rpm for 7-10 d. After a 7 or 10 day incubation period, the mycelium and culture broth were separated by centrifugation. Actinomycete cultured medium was extracted by ethyl acetate, in separating funnel, shaken for a few minutes, and then the solvent layers were evaporated under vacuum (Buchi RE111). The crude extracts were then transferred into small vials using sterile Pasteur pipettes and dried with N_2 gas. Antioxidant activities of the components were preliminary investigated by thin layer chromatography technique, by DPPH radical [Alessandra et al., 2002].

2.5 Morphological characteristics

The inclined coverslip technique [Williams et al., 1989] was used to observe the type of spore chains, the aerial and substrate mycelium that were produced by each actinomycete isolate from each sediment sample. Some of the antibiotic producing strains were selected for further examination by scanning electron microscopy to determine the ultrastructure of the spore chain morphology and the ornamentation of the spore surface.

2.6 Chemotaxonomical study

The isomeric forms of diaminopimelic acid (DAP) and diagnostic sugars in whole-cell hydrolysates were determined by thin layer chromatography as described by Lechevalier et al., 1973. The strains were identified to genera according to Williams et al. [1989] and Maldonado et al. [2005a].

3. Results and Discussion

Actinomycetes recovered from all areas were obtained in total 83 isolates, 55 from Nakorn Si-Thammarat, 16 from Chumporn and 12 from Rayong mangrove sediments. The mangrove area in Nakorn Si-Thammarat is located some distance in land and the sediments are wet and dry according to the high and low tide each day, anyway the soil sediment is rather fertile with more plant debris and materials than the mangrove in Chumporn and Rayong provinces in which the areas are next to the sea with sandy sediments. Actinomycetes found from Nakorn Si-Thammarat mangrove were diverse in Family and genera and *Streptomyces* were dominant, whereas those found in Chumporn and Rayong mangroves were mainly in Family *Micromonosporaceae* (Table 1).

Identification into genera of the recovered isolates were done by morphological study and chemical analysis of cell wall DAP, including sugar pattern in whole-cell hydrolysates (Fig 1). In this study in land mangrove area was inhabitant of some other rare actinomycete genera such as *Thermoactinomyces*, *Micromonospora*, *Nocaardia*, *Nocardiopsis*, *Streptoalloteichus* and some unidentified genera whereas the outer mangroves which connect to the sea less *Streptomyces* and many genera in Family *Micromonosporaceae* were found. In Chumporn mangrove, 2 isolates of potentially antibiotic producing *Streptomyces* were found among the rare actinomycetes, whereas all isolates recovered from Rayong mangrove were members of the Family *Micromonosporaceae*, but rather diverse in genera anyway (Table 1).

Out of 55 isolates recovered from Nakorn Si-Thammarat mangrove, 27 isolates were antimicrobial producing strains, mostly to gram positive bacteria, 4 isolates to both gram positive bacteria and *C. albicans* and 4 isolates to only *Candida albicans* (Table 2). On the other hand, those recovered from Chumporn and Rayong mangrove sediments rarely produced antimicrobial substances by cross streak investigation which might be the active metabolites were not water soluble or were still inside cell membranes.

Table 1. Some morphological and chemical studies of representative isolates recovered from all areas. (Williams, et al., 1989 and Maldonado, et al., 2005a)

Isolate ID	Aerial mycelium	Substrate mycelium	DAP type	Sugar Pattern	Identified
NS1-2	W	Bn	*Meso*-DAP	-	*Thermoactinomyces*
NS1-4	Gy	LO		Ara, Gal	Unidentified
NS1-5	W	Bn	*Meso*-DAP	-	*Thermoactinomyces*
NS1-6	none	DBn	*Meso*-DAP	-	*Micromonospora*
NS1-7	none	C	*Meso*-DAP	Xyl, Ara	*Micromonospora*
NS2-2	W	Bn	*Meso*-DAP	-	*Nocardiopsis*
NS2-3	Gy	Bn	*LL*-DAP	-	*Streptomyces*
NS2-5	Gy	Bn	*LL*-DAP	-	*Streptomyces*
NS3-1	W	DBn	*Meso*-DAP	Rhm, Man, Gal	*Streptoalloteichus*
NS3-2	W	YBn	*LL*-DAP	Gal	*Streptomyces*
NS3-3	W	YBn	*LL*-DAP	-	*Streptomyces*
NS3-5	W->Gy	BnBk	*LL*-DAP	-	*Streptomyces*
NS3-7	W->Gy	YBn	*LL*-DAP	-	*Streptomyces*
NS3-8	W	PkBn	*Meso*-DAP	-	*Nocardiopsis*
NS3-9	W	C	*Meso*-DAP	Ara, Gal	*Nocardia*
NS3-10	W	PkBn	*LL*-DAP	-	*Streptomyces*
NS3-11	W	Bn	*Meso*-DAP	-	*Thermoactinomyces*
NS3-12	none	Bn	*Meso*-DAP	Xyl, Ara	*Micromonospora*
NS4-1	WBn	LY	*LL*-DAP	-	*Streptomyces*

NS4-2	W	PkBn	*Meso*-DAP	Gal, Man, Rhm	*Streptoalloteichus*
NS4-4	Gy	WGy	*LL*-DAP	Gal, Man	*Streptomyces*
NS4-6	W->BnGy	Bn	*LL*-DAP	Gal	*Streptomyces*
NS4-8	Gy	Gy	*LL*-DAP	-	*Streptomyces*
NS5-1	LGy	Bn	*LL*-DAP	-	*Streptomyces*
NS5-3	LGy	Bn	*LL*-DAP	-	*Streptomyces*

Table 1. (continued)

Isolate ID	Aerial mycelium	Substrate mycelium	DAP type	Sugar Pattern	Identified
NS5-4	WBn	Bn	*LL*-DAP	Gal	*Streptomyces*
NS6-2	LGy	YBn	*LL*-DAP	-	*Streptomyces*
CP2-2	none	O	*Meso*-DAP	Xyl, Ara, Gal	*Salinispora*
CP3-1	none	LO	*Meso*-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	*Virgisporangium*
CP-PH3-2	none	O	*Meso*-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	*Virgisporangium*
CP-PH3-9	none	BkO	*Meso*-DAP	Xyl, Ara	*Micromonospora*
CP-PH3-12	none	BkO	*Meso*-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	*Virgisporangium*
CP-PH3-13	none	LO	*Meso*-DAP	Xyl, Ara,Man, Gal	*Salinispora*
CP-PH3-22	none	O	*Meso*-DAP	Xyl, Ara	*Micromonospora*
CP8-4 A	Bn	Bn	*LL*-DAP	-	*Streptomyces*
RY2-20	none	LBn	*Meso*-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	*Virgisporangium*
RY2-22	none	LBn	*Meso*-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	*Virgisporangium*
RY2-24	none	OBn	*Meso*-DAP	Xyl, Ara	*Micromonospora*
RY2-25	none	OBn	*Meso*-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	*Virgisporangium*
RY3-32	none	Bk	*Meso*-DAP	Ara, Gal, Xyl	*Salinispora*
RY3-37	none	BkBn	*Meso*-DAP	Gal, Xyl	*Spirilliplanes*
RY7-8	none	OBn	*Meso*-DAP	Gal, Xyl	*Spirilliplanes*
RY8-3	none	OBn	*Meso*-DAP	Gal, Xyl	*Spirilliplanes*
RY8-8	none	OBn	*Meso*-DAP	Gal, Xyl	*Spirilliplanes*

Note: NS = Nakorn Si-Thamarat; CP = Chumporn; RY = Rayong; Ara = arabinose; Gal = Galactose; Man = Mannose; Rhm = Rhamnose; Xyl = Xylose; Bk = black; BkBn = blackish brown; BkO = blackish orange;Bn = brown; BnGy= brownish gray; C = cream; DBn = dark brown; Gy = gray; LGy = light gray; LO = light orange; LY = light yellow; O = orange; OBn = orange brown; PkBn = pinkish brown; W = white; WGy = whitish gray; YBn = yellow brown.

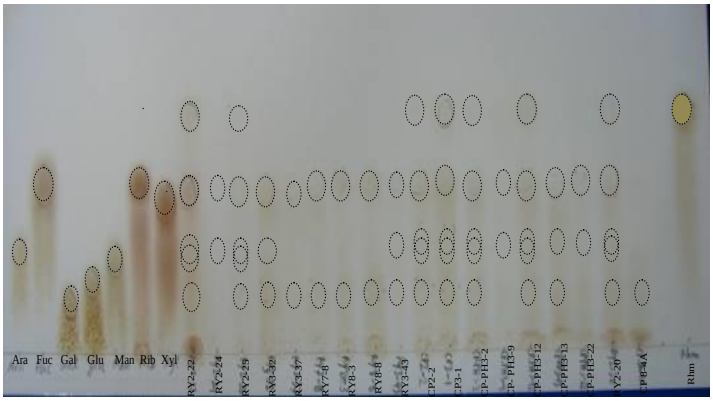


Fig 1. Chromatogram showed the diagnostic sugar pattern in some of isolates recovered from Rayong and Chumporn mangroves.

Table 2. Antimicrobial and antioxidant activities (IC_{50}) in some of the isolates recovered from Nakhon SI- Thammarat, Chumporn and Rayong mangroves.

Isolate ID	Color of spore mass	Color of substrate	Antibiosis to (Distance of inhibition zone, *mm*)				IC_{50} DPPH scavenging (*µg/mL*)
			B. subtilis	MRSA21	MRSA22	*C. albicans*	
NS1-2	C	RO	15.0	5.0	-	-	NA
NS1-4	Gy	O	26.0	22.0	15.0		NA
NS1-5	W	Bn	12.0	-	-	-	NA
NS1-9	Gy	Y	20.0	-	-	-	NA
NS2-2	W	Bn	-	5.0	3.0	-	337.3±34.2
NS2-3	Gy	Bn	-	5.0	3.0	-	56.6±0.4
NS2-5	Gy	Bn	5.0	5.0	5.0	-	64.8±1.2
NS3-1	W	DY	20.0	-	20.0	-	>400
NS3-2	W	Y	22.0	-	16.0	-	>400
NS3-3	W	YBn	30.0	-	-	5.0	NA
NS3-5	BkBn	YBn	-	-	-	28.0	NA
NS3-7	Gy	YBn	-	-	-	2.0	>400
NS3-8	W	P	-	-	20.0	-	NA
NS3-9	W	C	15.0	-	-	-	NA
NS3-10	W	PY	-	-	22.0	-	NA
NS4-1	Bn	LY	-	-	-	28.0	NA
NS4-4	Gy	WGy	15.0	-	-	12.0	>400
NS4-6	W..>BnGy	Bn	20.0	15.0	10.0	2.0	329.9±57.5
NS5-1	Bn	Bn					>400
NS5-3	WGy	Bn	19.0	15.0	-	-	190.3±5.9
NS5-4	LBn	Bn	32.0	20.0	-	-	>400
NS6-2	Gy	YBn	-	-	-	3.0	>400
CP-PH3-2	none	O	-	-	-	-	133.1±4.0
CP-PH3-9	none	BkO	-	-	-	-	329.9±7.9
CP8-4A	Bn	Bn	15.0	13.0	13.0	8.0	>400
RY2-20	none	LBn	-	-	-	-	294.23±7
Ascorbic acid							2.8±0.11

Note: **-** = inactive; NA = Not applicable; NS = Nakorn Si Thammarat; Bn = brown; Bk = black; BkBn = blackish brown; BkO = blackish orange; BnGy= brownish gray; C = cream; DY = dark yellow; Gy = gray; LY = light yellow; LBn= light brown; O = orange; P= pink; PY = pinkish yellow; RO = red orange; W = white; WGy= whitish gray; YBn = yellow brown;.

The DPPH radical scavenging assay is commonly employed in evaluating the ability of antioxidants to scavenge free radicals. The more rapidly the absorbance decreases, the more potent the antioxidant activity of the extract due to its hydrogen atom donating ability. Among the isolated of actinomycetes were screened for antioxidant activity using 1,1, diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) stable radical scavenging. The ethyl acetate extracts of NS2-3 and NS2-5 exhibited strong DPPH radical scavenging activity at the IC_{50} value of 56.6±0.4 and 64.8±1.2 µg/mL, respectively. The extracts of CP-PH3-2 and NS5-3 showed good antioxidant activity whereas the five extracts of NS2-2, NS4-6, CP-PH3-9, CP-PH3-13 and RY2-20 were less active. However, the scavenging activity of extracts was less than that of standard ascorbic acid (IC_{50} 2.8±0.11 µg/mL). The result of this study indicated that the crude extracts have the proton-donating ability and they are potential source for isolation of lead antioxidant compounds to reduce free radical induced tissue injury.

It has been estimated that the actinobacteria usually found only a small fraction of the bacteria flora in the marine [Goodfellow and Williams, 1985], but consequently, it was found up to 9% in marine sediments [Bull et al., 2005]. In this finding, more different genera and more diverse of actinomycete morphology were found in the inland mangrove sediments than those found in marine sediments. There was convincing evidence that actinomycetes were adapted to marine habitats [Moran, et al., 1995; Mincer et al., 2002]. From our finding, in marine sediments, *Streptomyces* were scarce whereas members of *Micromonosporaceae* were abundant and often found. Although the isolates in member of *Micromonosporaceae* did not show the ability of antimicrobial metabolites by cross streak, other methods of investigation are necessary as many reports found novel active compounds from this group of actinomycetes [Romero, et al., 1997; Fiedler et al., 2008, Williams, et al., 2005 and Jensen et al, 2007]. However, these results revealed that Thai mangrove sediments are a good source to search for both active antimicrobial and antioxidant compounds from both rare and non-rare species.

4. Acknowledgements

This work was supported by the Research Grant of Burapha University through Nation Research Council of Thailand (Grant no. 2557A10803041 and 2556A10801006).

5. References

Alessandra, B., Chandra, S., Matteo, P., Lvano, M., Jeannete, M., 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*, Journal of Ethnopharmacology 79, p. 379.

Bull, A.T., Stach, J. E., Ward, A. C. and Goodfellow, M. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions, *Antonie van Leeuwenhoek* 87, p. 65.

Bernan, V.S., Grensteun, M., Carter, G.T., 2004. Mining marine microorganisms as a source of new antimicrobial and antifungals, Current Medical Chemical-Anti-Infective Agents 3, p.18.

Bredholdt, H., Galatenko, O.A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L.P., Zotchev, S.B., 2007. Rare actinomycetes bacteria from the shallow water sediments from of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity, Environmental Microbiology 9, p. 2756.

Fiedler, H.P., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C., Mihm, G., 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. Antonie van Leeuwenhoek 87, p.37.

Goodfellow, M., and Williams, S. T. 1983. Ecology of actinomycetes. Annu Rev Microbiol 37, p. 189.

Hayakawa, M., 1990. Studies on selective isolation methods and distribution of soil Actinomycetes, Actinomycetology 4, p. 103.

Hayakawa, M., Tamura, T., Nonomura, H., 1991. Selective isolation of *Actinoplanes* and *Dactylosporangium* from soil by using γ-collidine as the chemoattractant, Journal Ferment Bioengineering 72, p. 426.

Hayakawa, M., 2008. Studies on the isolation of rare actinomycetes in soil, Actinomycetol 22, p. 12-19.

Hernandez, I.L.C., Macedo, M.L., Berlinck, R.G.S., Ferreira, A.G., Godinho, M.J.L., 2004. Dipeptide metabolites from the marine derived bacterium *Streptomyces acrymicini*, Journal of The Brazillian Chemical Society 1, p. 441.

Hong, K., Gao, A-H., Xie, Q-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H-P., Yu, H-P. , Yao, S-H., Goodfellow, M., Ruan, J-S., 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China, Marine Drugs 7, p. 24.

Imada, C., 2005. Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes, *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, p. 59.

Jensen, P.R., Williams, P.G., Oh, D.C., Zeigler, L., Fenical, W. 2007. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*, Journal of Applied Environtal Microbiology 73, p. 1146

Jensen, P.R., Lauro, F.M., 2008. An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment, Antonie van Leeuwenhoek 94, p. 51.

Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., Marinelli, F., 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics, Antonie van Leeuwenhoek78, p. 399.

Lechevalier, M.P., Lechevlier, H., Horan, A.C., 1973. Chemical characteristic and classifications of Nocardiae, Canadian Journal of Microbiology 19, p. 965.

Maldonado, L.A., Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Mincer, T. J., Ward, A. C., Bull, A. T., Goodfellow, M. 2005a. *Salinispora arenicola* gen. Nov., sp. Nov. And *Salinispora tropica* sp. Nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae,* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, p 1759.

Maldonado, L.A., Stach, J.E.M., Pathomaree, W., Ward, A.C., Bull, A.T., Goodfellow, M., 2005b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments, Antonie van Leeuwenhoek 87, p. 11.

Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2002. Widespread and persistent population of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. Journal of Applied Environmental Microbiology 68, p. 5005.

Moran, M.A., Rutherford, L. T., Hodson, R. E. 1995. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. Journal of Applied Environmental Microbiology 6, p. 3695.

Nonomura, H., Hayakawa, M., 1988. New methods of the selective isolation of soil Actinomycetes. In: Y. Okami, T. Beppu, H. Ogawara, Biology of Actinomycetes '88 ed. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p. 288.

Pathomaree, W., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., Goodfellow, M., 2005. Diversity of actinomycetes isolated from the challenger deep sediment (10898 m) from the Mariana Trench. Extremophiles 10, p. 181.

Romero, F., Espliego, F., Bas, J. P., Quesada, T. G., Gravalos, D., Calle, F., Fernandez-Puentes, J. L. 1997. Thiocoralline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*, Journal of Antibiotics 50, p.734.

Taylor, L.H., Latham S.M., Woodhouse, M.E.J., 2001. Risk factors from human disease emergence, Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B 356, p. 983.

Williams, S.T., Sharpe, M.E., Holt, J.G., (eds), 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4, Williams & Wilkins, Baltimore, P. 2333.

Williams, P.G., Buchanan, G.O., Feling, R.H., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2005. New cytotoxic salinosporamides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*, Journal of Organic Chemistry, 70, p. 6196.

Zhao, H. Y., Kassama, M., Young, D. B. Kell, R. G., 2004. Differentiation of *Micromonospora i*solates from a coastal sediment in Wales on the basis of fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique, Applied and Environmental Microbiology 70, p. 6619.

Biodiversity of Antimicrobial Producing Actinomycetes in Coastal Marine Sediments

[1]Rattanaporn SRIVIBOOL, [2]Trisukon MALI and [1]Rawiwan WATANADILOK
Email: rattanap@buu.ac.th
([1]Research Division,Institute of Marine Science, Burapha University, Thailand
[2]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University)

Abstract

Coastal mangrove sediments were collected and isolated for antimicrobial producing actinomycetes. The study areas were in Chachoengsao, Chonburi and Nakhon Si Thammarat Provinces. Out of 12 samples, 5 from Chachoengsao, Chonburi and 7 from Nakhon Si Thamarat gave a total of 102 isolates, 47 from Chachoengsao and Chonburi and 55 from Nakhon Si Thamarat. It was found that 7 actinomycetes recovered from Chachoengsao and Chonburi were active to either *Candida albicans* or Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) tested while there were 27 active isolates from those recovered from Nakhon Si Thamarat. By chemical analysis of wall diaminopimelic acid and sugar pattern including morphological studies revealed that the active isolates were moderately diverse in genera level and were more diverse in species level from both areas.

Keywords: Antimicrobial, actinomycetes, mangrove

Type of presentation: N/A

Morphological study of antimicrobial actinomycete producing isolates from marine sediments

Srivibool Rattanaporn. -.[1]

[1]Institute of marine Science, Burapha University, Chonburi. 20131. Thailand

Email of the presenting author: rattanap@buu.ac.th

Actinomycetes are gram positive bacteria in which many bioactive compounds are generally produced. Over past decade information on the diversity of actinobacteria in marine habitats has grown considerably. In this study, morphological and chemical characteristics of wall chemotype were investigated for a rapid method of basically classification. The location of sediment sampling areas were in Chonburi and Bang-pakong mangrove forests in the east and Nakhon Si-thamarat mangrove in the west of the Gulf of Thailand, including marine shallow water coastal area in the east coast. The sediment samples were pre-treated with dry heat at 100o C for 1 h before dilution and spreading on selective medium plates, incubated at 30o C for 4 weeks. Morphological study was observed both under light microscope and scanning electron microscopy. The results revealed that most active isolates from Chonburi mangrove area were Streptomyces with rectiflexibile, spiral and hook spore chain types, while the isolates from Bang-pakong and the west side of the Gulf manifested various different morphological types. The active isolates from marine sediments mostly produced single spore chain type on short or long sporophores or produced in a bundle of Micromonospora and Salinispora, respectively; including a few white spore mass Streptomyces. The electronmicrographs of many isolates could reveal more different morphological detail to consider they were same or different species. Apart of morphological and chemical characteristic studies, some of representative actinomycetes were selected to identified by 16S rRNA gene sequencing. The active isolates from mangrove and marine sediments are moderately diverse in genera, but clearly shown they are morphologically diverse and are rich sources to screen for valuable bioactive compounds.

Acknowledgement: Acknowledgements: The financial support from the NRCT through the Burapha University budget was gratefully acknowledged.

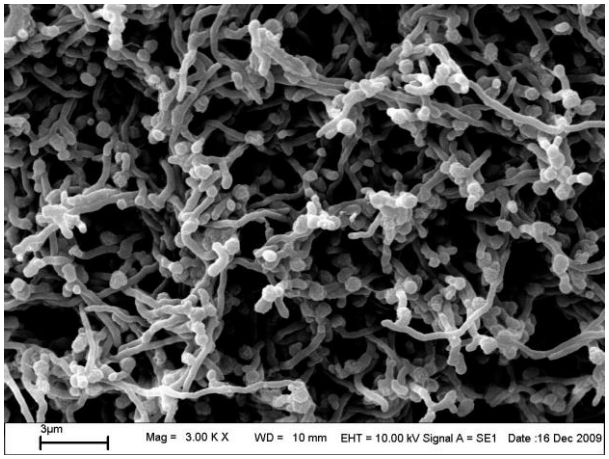


Fig. 1: Single spores are formed on short sporophores of hyphae of Micromonospora from marine days old, 3000X.

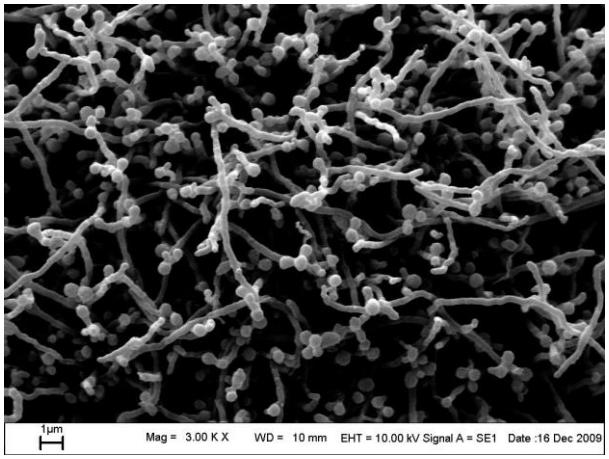


Fig. 2: Single spores are formed on short sporophores of substrate substrate hyphae of Micromonospora on ISP2 medium, 7 sediment on ISP2 medium, 7 days old, 3000X.

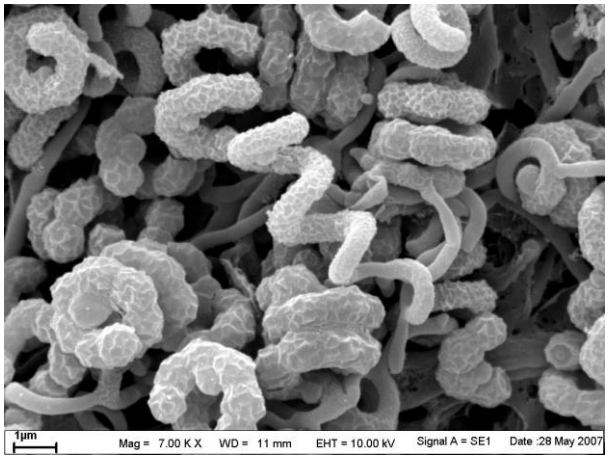


Fig. 3: Spiral spore chain type, rugose, of Streptomyces on ISP2 medium, 7 days old, 7000X.

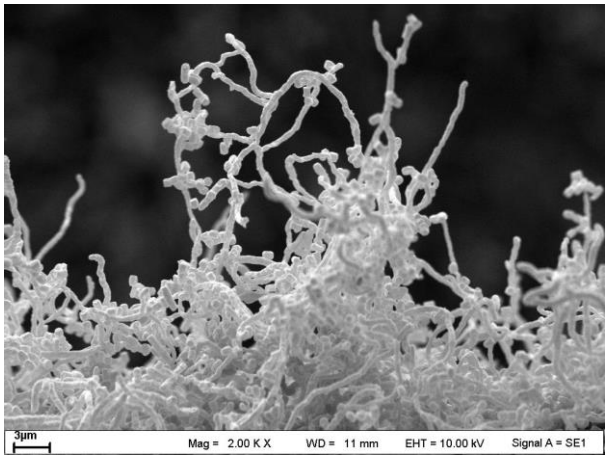


Fig. 4: Rectiflexibile and hook spore chains are formed on arial mycelia of Streptomyces isolated from mangrove sediment,7 days old, 2000X.

Antimicrobial Activity of Actinomycetes Isolated from Mangrove Sediments.

Rattanaporn Srivibool* and Rawiwan Watanadilok

Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi 20131 Thailand

Abstract

Sixteen actinomycete isolates were isolated using three types of media, SCA, HA and M4, from mangrove sediment collected at different locations from Chumporn province. All the isolates were screened for antibacterial activity by cross streak method. While the antioxidant activity of the crude extract was assessed by DPPH scavenging activity. It was found that isolates CP 8-4A and CP 8-4B were active against *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus*, MRSA 22 and *Candida albicans*. The isolates CP-PH3-2 showed good antioxidant activity with the IC_{50} value of 133.1±4.0 µg/mL while the inhibition of the standard antioxidant ascorbic acid showed strong inhibition with the IC_{50} value of 1.9.1±0.16 µg/mL.

Keywords : Actinomycete, antioxidant activity, antimicrobial activity

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

สรุปผลการประเมินผลความพึงพอใจและความคิดเห็นผู้เข้าร่วมฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง “ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียน”
วันที่ ๑ เดือนสิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๗
ณ โรงเรียนสาธิต "พิบูลบำเพ็ญ" มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

จากการสอบถามความพึงพอใจและความคิดเห็นของผู้เข้าร่วมโครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง“ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียน”วันที่ ๑ เดือนสิงหาคม ๒๕๕๗ ณ โรงเรียน "สาธิตพิบูลบำเพ็ญ" มหาวิทยาลัยบูรพาเก็บข้อมูลจากผู้เข้าร่วมโครงการจำนวนทั้งสิ้น **๖๒** คนตอบแบบสอบถามจำนวน **๔๐** คนคิดเป็นร้อยละ **๖๔.๕๒** สรุปข้อมูลได้ดังนี้

เกณฑ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลมีระดับคะแนนดังนี้

๑. มีความพึงพอใจมากที่สุดระดับคะแนนเท่ากับ ๕
๒. มีความพึงพอใจมากระดับคะแนนเท่ากับ ๔
๓. มีความพึงพอใจปานกลางระดับคะแนนเท่ากับ ๓
๔. มีความพึงพอใจน้อยระดับคะแนนเท่ากับ ๒
๕. มีความพึงพอใจน้อยที่สุดระดับคะแนนเท่ากับ ๑

การหาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับเกณฑ์การประเมินค่าเฉลี่ยของบุญชมศรีสะอาด 2532: 111

ค่าเฉลี่ยระดับ ๔.๕๑ – ๕.๐๐ มีความพึงพอใจมากที่สุด
ค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ มีความพึงพอใจมาก
ค่าเฉลี่ยระดับ ๒.๕๑ – ๓.๕๐ มีความพึงพอใจปานกลาง
ค่าเฉลี่ยระดับ ๑.๕๑ – ๒.๕๐ มีความพึงพอใจน้อย
ค่าเฉลี่ยระดับ ๑.๐๐ – ๑.๕๐ มีความพึงพอใจน้อยที่สุด

ตอนที่ ๑ ผลการวิเคราะห์สถานภาพทั่วไปของผู้ตอบแบบประเมิน

ตารางที่ ๑ แสดงจำนวนร้อยละของเพศผู้ตอบแบบประเมิน

เพศ	จำนวน(คน)	ร้อยละ
ชาย	๑๒	๓๐
หญิง	๒๘	๗๐
รวม	๔๐	๑๐๐

**********จากตารางที่ ๑ พบว่าผู้ตอบแบบประเมินเป็นเพศหญิงมากกว่าเพศชาย โดยเพศชายคิดเป็นร้อยละ ๓๐ ส่วนเพศหญิงคิดเป็นร้อยละ ๗๐

ตอนที่ ๒ ผลการวิเคราะห์ระดับความพึงพอใจในการเข้าร่วมฝึกอบรม

ตารางที่ ๒ แสดงระดับความพึงพอใจเกี่ยวกับการฝึกอบรมด้านวิทยากรบรรยาย ด้านสถานที่ ระยะเวลา อาหาร ด้านความรู้ความเข้าใจ ด้านการนำความรู้ไปใช้ ด้านการฝึกปฏิบัติการ ด้านการจัดนิทรรศการ

ข้อ	รายการประเมิน	ระดับความพึงพอใจ					ค่าเฉลี่ยระดับ $(\overline{X})$	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)	ระดับความพึงพอใจ	ร้อยละ	อันดับที่
		มากที่สุด (5)	มาก (4)	ปานกลาง (3)	น้อย (2)	น้อยที่สุด (1)					
ด้านวิทยากร											
๑.	ความเหมาะสมของเนื้อหากับวัตถุประสงค์การอบรม	๑๓	๒๒	๕	๐	๐	๔.๒๐	๐.๔๖๐๒	มาก	๘๔.๐	๖
๒.	ความเชื่อมโยงของเนื้อหาในการอบรม	๑๐	๒๓	๗	๐	๐	๔.๐๗	๐.๖๗๘๓	มาก	๘๑.๔	๘
๓.	ความรู้ของวิทยากรที่บรรยายในแต่ละหัวข้อ	๒๖	๑๐	๔	๐	๐	๔.๕๕	๐.๖๖๘๙	มากที่สุด	๙๑.๐	๒
๔.	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากร	๑๖	๑๗	๗	๐	๐	๔.๒๒	๐.๗๕๒๗	มาก	๘๔.๔	๕
๕	การเปิดโอกาสให้ผู้เข้าอบรมแสดงความคิดเห็น	๑๙	๑๕	๖	๐	๐	๔.๓๒	๐.๗๕๐๐	มาก	๘๖.๔	๔
๖	การตอบข้อซักถามตรงประเด็น เข้าใจง่าย	๑๔	๒๐	๖	๐	๐	๔.๒๐	๐.๖๗๘๒	มาก	๘๔.๐	๖
ด้านสถานที่/ระยะ/อาหาร											
๑.	สถานที่สะอาดและมีความเหมาะสม	๒๖	๑๔	๐	๐	๐	๔.๖๕	๐.๔๗๖๘	มากที่สุด	๙๓.๐	๑
๒.	ความพร้อมของอุปกรณ์โสตน์ทัศนูปกรณ์	๒๐	๒๐	๐	๐	๐	๔.๕๐	๐.๕๐	มาก	๙๐.๐	๓
๓.	ระยะเวลาในการอบรม	๑๐	๑๖	๑๑	๑	๓	๓.๘๐	๐.๙๒๗๓	มาก	๗๖.๐	๑๔
๔.	อาหารมีความเหมาะสม	๙	๒๖	๕	๐	๐	๔.๑๐	๐.๕๘๓๐	มาก	๘๒.๐	๗
ด้านความรู้ความเข้าใจ											
๑	ความรู้ ความเข้าใจในหัวข้อบรรยายต่างๆ ก่อน การอบรม	๑	๑๒	๑๓	๙	๕	๒.๘๘	๑.๐๓๙๕	ปานกลาง	๕๗.๖	๑๖
๒	ความรู้ ความเข้าใจในหัวข้อบรรยายต่างๆ หลังการอบรม	๑๑	๑๙	๙	๑	๐	๔.๐๐	๐.๗๗๔๕	มาก	๘๐.๐	๑๑
ด้านการนำความรู้ไปใช้											
๑	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประกอบการเรียน	๖	๒๕	๖	๓	๐	๓.๘๕	๐.๗๕๙๙	มาก	๗๗.๐	๑๒
๒	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดทำโครงงานวิทยาศาสตร์	๑๑	๑๙	๑๐	๐	๐	๔.๐๓	๐.๖๙๕๗	มาก	๘๐.๖	๑๐
๓	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปสร้างทักษะด้านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์	๑๑	๑๙	๑๐	๐	๐	๔.๐๓	๐.๖๙๕๗	มาก	๘๐.๖	๑๐
ด้านการฝึกปฏิบัติการ											
๑	สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการเรียน	๘	๑๗	๑๒	๓	๐	๓.๗๕	๐.๘๕๘๗	มาก	๗๕.๐	๑๕
๒	สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์	๘	๒๐	๙	๓	๐	๓.๘๒	๐.๘๕๕๙	มาก	๗๖.๔	๑๓

ด้านการจัดนิทรรศการ											
๑	ความเชื่อมโยงของนิทรรศการกับหัวข้อการอบรม	๑๒	๑๘	๑๐	๐	๐	๔.๐๕	๐.๗๓๙๙	มาก	๘๑.๐	๙
๒	รูปแบบและเนื้อหานิทรรศการอ่านเข้าใจง่าย	๑๓	๑๘	๘	๐	๑	๔.๐๕	๐.๘๖๔๕	มาก	๘๑.๐	๙
รวม							๔.๐๕	-	มาก	๘๑.๑	-

จากตารางที่ ๒ พบว่าผู้เข้ารับการอบรมมีระดับความพึงพอใจในโครงการอยู่ในระดับมาก (ค่าเฉลี่ย ๔.๐๕) คิดเป็นร้อยละ ๘๑.๑ และเมื่อพิจารณาในแต่ละด้าน พบว่าในรายการประเมิน**ด้านวิทยากร**ในหัวข้อ “ความรู้ของวิทยากรที่บรรยายในแต่ละหัวข้อ” ความพึงพอใจอยู่ในระดับมากที่สุด (๔.๕๕) คิดเป็นร้อยละ ๙๑.๐๐ รองลงมาในหัวข้อต่างๆความพึงพอใจอยู่ในระดับมากเท่ากันหมดดังแสดงในตารางที่ ๒ ส่วนรายการประเมิน**ด้านสถานที่/ระยะเวลา/อาหาร** ในหัวข้อ “สถานที่สะอาดและมีความเหมาะสม” ความพึงพอใจอยู่ในระดับมากที่สุด (๔.๖๕) คิดเป็นร้อยละ ๙๓.๐๐ รองลงมาในหัวข้ออื่นอยู่ในระดับมาก ส่วนรายการประเมิน**ด้านความรู้ความเข้าใจ** ในหัวข้อ “ความรู้ความเข้าใจในหัวข้อบรรยายต่างๆหลังการอบรม” ความพึงพอใจอยู่ในระดับมาก (๔.๐๐) คิดเป็นร้อยละ ๘๐.๐๐ ส่วนในหัวข้อ“ความรู้ความเข้าใจในหัวข้อบรรยายต่างๆก่อนการอบรม” ความพึงพอใจอยู่ในระดับปานกลาง (๒.๘๘) คิดเป็นร้อยละ ๕๗.๖๐ ส่วนรายการประเมิน**ด้านการนำความรู้ไปใช้ด้านการฝึกปฏิบัติการและด้านการจัดนิทรรศการ** พบว่าในทุกหัวข้อ ความพึงพอใจอยู่ในระดับมาก

<u>ตอนที่ ๓</u> ข้อเสนอแนะอื่นๆ

1. ข้อเสนอแนะ ติชม ในการอบรมครั้งนี้ได้แก่
   - ระยะเวลานานเกินไป
   - การอบรมไม่สนุก
   - วิทยากรพูดฟังแล้วค่อนข้างง่วงเสียงเบามาก
   - ไม่ตรงกับข้อสอบโรงเรียน
   - ไม่ใช่เรื่องสอบเอ็นทรานซ์
   - ควรมีกิจกรรมให้นักเรียนมีส่วนร่วมมากกว่าการทำ lab
   - ควรทำ lab หลังจากการบรรยายในแต่ละหัวข้อ
   - ศัพท์บางคำเข้าใจยาก
   - เนื้อหาเยอะเกินไป สอนละเอียดและลงลึกจนเข้าไม่ถึง
   - อยากให้วิทยากรมีมุกตลกด้วยจะได้ไม่น่าเบื่อ
2. หัวข้อที่ท่านอยากให้จัดอบรมครั้งต่อไป ได้แก่
   - ปิโตเลียม
   - จิตวิทยาและพฤติกรรม
   - ดาราศาสตร์ และอวกาศ
   - ฉลาม
   - สัตว์ทะเลที่ไม่ค่อยรู้จัก
   - ปลาทะเล
   - เรื่องการทดลองและสิ่งประดิษฐ์ทางวิทยาศาสตร์
   - โรคที่เกิดจากจุลินทรีย์และแบคทีเรีย

<u>ตอนที่ ๓</u>ข้อเสนอแนะอื่นๆ ในส่วนของข้อเสนอแนะติชมผู้เข้ารับการอบรมส่วนใหญ่มีข้อเสนอแนะที่ต่างกันไป ทั้งในด้านวิทยากรที่บรรยาย ด้านสถานที่ อาหาร ระยะเวลาการจัดอบรม เนื้อหาและรายละเอียดที่อบรม ความเกี่ยวข้องกับการนำไปใช้ในการเรียน เป็นต้น และในส่วนของหัวข้อที่อยากให้จัดอบรมในครั้งต่อไปก็มีหลายเรื่อง ดังนั้นจึงขึ้นอยู่กับผู้จัดว่ามีความพร้อมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องหรือไม่ รวมทั้งแนวนโยบายในการจัดกิจกรรมของทั้งโรงเรียน และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลซึ่งเป็นหน่วยงานต้นสังกัดว่าจะมีทิศทางและนโยบายอย่างไรในอนาคต

สรุปผลการประเมินผลความพึงพอใจและความคิดเห็นผู้เข้าร่วมฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง “ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียน”
วันที่ ๒๐เดือนสิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๗
ณ โรงเรียนสิงห์สมุทร อำเภอสัตหีบจังหวัดชลบุรี

จากการสอบถามความพึงพอใจและความคิดเห็นของผู้เข้าร่วมโครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง“ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียน”วันที่ ๒๐ เดือนสิงหาคม ๒๕๕๗ ณ โรงเรียนสิงห์สมุทร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เก็บข้อมูลจากผู้เข้าร่วมโครงการจำนวนทั้งสิ้น **๑๕๘** คนตอบแบบสอบถามจำนวน **๑๓๙** คน คิดเป็นร้อยละ **๘๗.๙๗** สรุปข้อมูลได้ดังนี้

เกณฑ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลมีระดับคะแนนดังนี้

๑. มีความพึงพอใจมากที่สุดระดับคะแนนเท่ากับ ๕
๒. มีความพึงพอใจมากระดับคะแนนเท่ากับ ๔
๓. มีความพึงพอใจปานกลางระดับคะแนนเท่ากับ ๓
๔. มีความพึงพอใจน้อยระดับคะแนนเท่ากับ ๒
๕. มีความพึงพอใจน้อยที่สุดระดับคะแนนเท่ากับ ๑

การหาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับเกณฑ์การประเมินค่าเฉลี่ยของบุญชมศรีสะอาด 2532 : 111

ค่าเฉลี่ยระดับ ๔.๕๑ – ๕.๐๐ มีความพึงพอใจมากที่สุด
ค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ มีความพึงพอใจมาก
ค่าเฉลี่ยระดับ ๒.๕๑ – ๓.๕๐ มีความพึงพอใจปานกลาง
ค่าเฉลี่ยระดับ ๑.๕๑ – ๒.๕๐ มีความพึงพอใจน้อย
ค่าเฉลี่ยระดับ ๑.๐๐ – ๑.๕๐ มีความพึงพอใจน้อยที่สุด

ตอนที่ ๑ ผลการวิเคราะห์สถานภาพทั่วไปของผู้ตอบแบบประเมิน

ตารางที่ ๑ แสดงจำนวนร้อยละของเพศผู้ตอบแบบประเมิน

เพศ	จำนวน(คน)	ร้อยละ
ชาย	๖๐	๔๓.๑๗
หญิง	๗๙	๕๖.๘๓
รวม	๑๓๙	๑๐๐

*********จากตารางที่ ๑ พบว่าผู้ตอบแบบประเมินเป็นเพศหญิงมากกว่าเพศชายโดยเพศชายคิดเป็นร้อยละ ๔๓.๑๗ ส่วนเพศหญิง คิดเป็นร้อยละ ๕๖.๘๓

<u>ตอนที่ ๒</u> ผลการวิเคราะห์ระดับความพึงพอใจในการเข้าร่วมฝึกอบรม

ข้อ	รายการประเมิน	ระดับความพึงพอใจ					ค่าเฉลี่ยระดับ $(\overline{X})$	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)	ระดับความพึงพอใจ	ร้อยละ	อันดับที่
		มากที่สุด	มาก	ปานกลาง	น้อย	น้อยที่สุด					
ด้านวิทยากร											
๑.	ความเหมาะสมของเนื้อหากับวัตถุประสงค์การอบรม	๔๓	๘๕	๙	๑	๑	๔.๒๑	๐.๖๔๒๓	มาก	๘๔.๒	๕
๒.	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “การจำแนกชนิดฟองน้ำทะเลอย่างง่ายๆ”	๓๕	๗๐	๑๙	๒	๐	๓.๗๑	๑.๓๖๘๗	มาก	๗๔.๒	๑๕
๓.	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “การแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลและการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้น”	๔๒	๖๕	๓๐	๒	๐	๔.๐๖	๐.๗๔๓๒	มาก	๘๑.๒	๙
๔.	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “การแยกและการใช้ประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท”	๓๓	๖๙	๓๑	๖	๐	๓.๙๓	๐.๗๘๒๗	มาก	๗๘.๖	๑๒
๕	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “เทคนิคการสกัดสารสีและสกัดลิปิดจากแอคติโนมัยซีทและการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ”	๔๗	๖๘	๒๐	๔	๐	๔.๑๔	๐.๗๔๒๓	มาก	๘๒.๘	๘
๖	ความเชื่อมโยงของเนื้อหาในการอบรม	๓๔	๗๐	๓๒	๓	๐	๓.๙๗	๐.๗๕๕๐	มาก	๗๙.๔	๑๑
๗	ความเหมาะสมของเอกสารการอบรม	๕๗	๕๖	๒๑	๕	๐	๔.๑๙	๐.๘๐๓๓	มาก	๘๓.๘	๗
๘	การเปิดโอกาสให้ผู้เข้าอบรมแสดงความคิดเห็น	๖๓	๕๗	๑๔	๔	๑	๔.๒๗	๐.๘๒๙๔	มาก	๘๕.๔	๓
๙	หลังจากการอบรมท่านได้รับความรู้เพิ่มในระดับใด	๓๒	๖๖	๓๒	๙	๐	๓.๘๗	๐.๘๔๐๕	มาก	๗๗.๔	๑๓
ด้านสถานที่/ระยะ/อาหาร											
๑.	ความเหมาะสมของสถานที่จัดอบรม	๖๙	๖๑	๗	๒	๐	๔.๔๒	๐.๖๓๗๒	มาก	๘๘.๔	**๑**
๒.	ความพร้อมของอุปกรณ์โสตน์ทัศนูปกรณ์	๖๓	๖๐	๑๖	๐	๐	๔.๓๔	๐.๖๖๑๖	มาก	๘๖.๘	**๒**
๓.	ความเหมาะสมของระยะเวลาในการอบรม	๓๖	๕๗	๓๘	๘	๐	๓.๘๗	๐.๘๖๕๘	มาก	๗๗.๔	**๑๓**
๔.	ความเหมาะสมของอาหาร	๔๘	๕๗	๓๐	๒	๒	๔.๐๖	๐.๘๕๑๔	มาก	๘๑.๒	**๙**
ด้านการนำความรู้ไปใช้											
๑	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประกอบการเรียน	๓๙	๖๙	๒๘	๓	๐	๔.๐๔	๐.๗๓๑๑	มาก	๘๐.๘	**๑๐**
๒	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดทำโครงงานวิทยาศาสตร์	๔๖	๗๐	๒	๑	๑	๓.๗๓	๑.๖๐๗๓	มาก	๗๔.๖	**๑๔**

๓	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปสร้างทักษะด้านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์	๕๕	๖๒	๒๐	๒	๐	๔.๒๒	๐.๗๕๖๘	มาก	๘๔.๔	**๔**
ด้านการฝึกปฏิบัติการ											
๑	สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการเรียน	๔๖	๖๖	๑๒	๔	๐	๓.๘๗	๑.๓๓๖๒	มาก	๗๗.๔	**๑๓**
๒	สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์	๕๔	๖๑	๒๒	๒	๐	๔.๒๐	๐.๗๕๘๘	มาก	๘๔.๐	**๖**
รวม							๔.๐๙		มาก	๘๑.๒	-

จากตารางที่ ๒พบว่าผู้เข้ารับการอบรมมีระดับความพึงพอใจในโครงการอยู่ใน**ระดับมาก (ค่าเฉลี่ย ๔.๐๙) คิดเป็นร้อยละ ๘๑.๒** และเมื่อพิจารณาในแต่ละด้าน พบว่าในรายการประเมิน**ด้านวิทยากร** พบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้ออยู่ในระดับมาก คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยที่หัวข้อ “การเปิดโอกาสให้ผู้เข้าอบรมแสดงความคิดเห็น” มีค่าร้อยละ๘๕.๔ ซึ่งอยู่ในอันดับที่ ๑ ของด้าน รองลงมาคือหัวข้อ “ความเหมาะสมของเนื้อหากับวัตถุประสงค์การอบรม”มีค่าร้อยละ๘๔.๒ ซึ่งอยู่ในอันดับที่ ๒ ของด้าน ส่วน**ด้านสถานที่/ระยะเวลา/อาหาร** พบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้อก็ยังคงอยู่ในระดับมาก คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยมีหัวข้อ “ความเหมาะสมของสถานที่จัดอบรม” มีค่าร้อยละ ๘๔.๔ ซึ่งมากที่สุดในด้านนี้ รองลงมาคือหัวข้อ “ความพร้อมของอุปกรณ์โสตน์ทัศนูปกรณ์”**ส่วนด้านการนำความรู้ไปใช้** พบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้ออยู่ในระดับมากเช่นกัน คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยหัวข้อ “สามารถนำความรู้ที่ได้ไปสร้างทักษะด้านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์” มีค่าร้อยละ ๘๔.๔ ซึ่งมากที่สุดในด้านนี้ **ด้านการฝึกปฏิบัติการ** จากการประเมินยังคงพบว่าพบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้ออยู่ในระดับมาก คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยที่หัวข้อ“สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์” มีค่าร้อยละ ๘๔.๐ ซึ่งมากที่สุดในด้านนี้

<u>ตอนที่ ๓</u> ข้อเสนอแนะอื่นๆ

1. ข้อเสนอแนะ ติชม ในการอบรมครั้งนี้ได้แก่

- ควรมี Video มาฉายประกอบให้น่าสนใจ (๒)
- ได้ความรู้เข้าใจดี
- ควรให้นักเรียนได้มีโอกาสทดลองทุกคน
- วิทยากรพูดได้สนุกดี
- ง่วงมากไม่มีบันเทิงมาแทรก
- ควรมีเกมส์และพูดให้ดึงดูด
- จัดได้เยี่ยม
- วิทยากรบรรยายเสียงเบา
- วิทยากรการบรรยายน่าเบื่อ
- เร่งเวลาและทำกิจกรรมมากเกินไป
- ไม่ควรบรรยายหรือทำกิจกรรมเกินเวลา
- ไม่มีกิจกรรมให้เล่นทำให้ง่วงนอน(๒)
- ควรมีเกมส์
- วิทยากรควรพูดให้ตลกบ้าง
- อยากให้มีเวลามากกว่านี้(๒)
- อยากให้มีการทดลองทุกครั้งหลังจากการบรรยาย(๒)

- การบรรยายดีแต่อยากให้ใช้ภาษาง่ายกว่านี้
- อยากทำกิจกรรมครบทุกฐาน และควรเพิ่มระยะเวลา ๒ วัน
- วิทยากรมีความสนใจดี
- อุปกรณ์แจกไม่ทั่วถึง
- วิทยากรพูดเร็วสรุปเกินไป
- ควรอธิบายให้สั้นลง และขยายเวลาการจัดกิจกรรม
- อธิบายเร็วเกินไป ไม่เข้าใจเนื้อหาครบถ้วน
- เพิ่มเทคนิคและวิธีการนำเสนอให้น่าสนใจ
- ควรจัดเวลาให้เหมาะสมมากกว่านี้
- วิทยากรถ่ายทอดความรู้ได้ดี ผู้ฟังสามารถรับรู้ได้
- ควรเพิ่มความน่าสนใจเพื่อให้นักเรียนสนใจมากขึ้น
- เวลาทำกิจกรรมน้อยเกินไป อยากให้มีการทดลองมากขึ้น
- ควรพูดถึงการอนุรักษ์บ้าง
- การนำเสนอเนื้อหาย่อเกินไป ควรขยายเวลามากกว่านี้บางตอนสรุปแล้วยังไม่เข้าใจ
- ปฏิบัติการบางส่วนมากเกินไป/บางบทปฏิบัติการน่าสนใจมาก
- ควรจัดกิจกรรมหลายๆวัน/ควรมีกิจกรรมคลายเคลียดและสนุกให้ทำ
- วิทยากรพูดเข้าใจง่ายแต่มีบางท่านพูดเหมือนดูถูก ต้องเข้าใจว่าเพิ่งมาฟังเรื่องนี้ยังไม่มีความรู้ ถามจะตอบได้อย่างไร
- อยากให้มีเนื้อหาสาระแน่นและไม่เร็วเกินไป
- เวลาเตรียมตัวน้อย
- วิทยากรอธิบายเร็วตามไม่ทัน
- ควรมีกิจกรรมคลายเครียดบ้างเนื้อหาอย่างเดียวรู้สึกเบื่อและนั่งนานเกินไป
- พูดไม่ชัดเจนเข้าใจบ้าง ไม่เข้าใจบ้าง
- เรื่องแบคทีเรียไม่เข้าใจ ยาวมาก ทำให้เบื่อ

2. หัวข้อที่ท่านอยากให้จัดอบรมครั้งต่อไป ได้แก่

- ปิโตรเลียม (๔) /ดาวนอกโลก /สัตว์น้ำชนิดต่างๆ /เกี่ยวกับจักรวาร /สัตว์น้ำลึก /สัตว์โลก /สมองสัตว์ / ประสาทสัมผัส /ปะการัง (๓) /ฟองน้ำ /จุลภาพของสิ่งมีชีวิต /วิธีทำผลิตภัณฑ์และวิธีหาสารธรรมชาติมาทำผลิตภัณฑ์บำรุงผิว /สิ่งมีชีวิตที่หายากในทะเล /ผ่าปลาหรือสัตว์อื่นเพื่อศึกษาอวัยวะภายใน /การผสมพันธุ์ปลา /ปลาทะเลชนิดต่างๆ / ชีวโมเลกุล (๒) /เซลล์ต่างๆแบบเจาะลึก /ป่าชายเลน /ดอกไม้ทะเล /เทคโนโลยีกับสิ่งแวดล้อมและการประยุกต์เทคโนโลยี /ชีววิทยา /สัตว์แปลกทั่วโลก /สิ่งมีชีวิตใต้ทะเลลึก /สารสกัดจากสาหร่ายทะเล /ทุกๆหัวข้อ /การสกัดสารต่างๆเกี่ยวกับพืชหรือสัตว์ทะเลหรือเกี่ยวกับชีวเคมี /การอนุรักษ์ทรัพยากรทางทะเล /การทำปะการังเทียม /ระบบนิเวศใต้ทะเลลึก / ดุลยภาพ และการแบ่งเซลล์ /ระบบภูมิคุ้มกัน /ระบบร่างกาย /สัตว์ทะเล สัตว์น้ำ และสิ่งแวดล้อมที่น่าสนใจ /สิ่งประดิษฐ์จากธรรมชาติในแบบภูมิปัญญาท้องถิ่นไทย

<u>ตอนที่ ๓</u>ข้อเสนอแนะอื่นๆ ในส่วนของข้อเสนอแนะติชมผู้เข้ารับการอบรมส่วนใหญ่มีข้อเสนอแนะที่หลากหลาย แต่ส่วนใหญ่จะเสนอแนะเกี่ยวกับเรื่องของวิธีการนำเสนอและรูปแบบของการนำเสนอบางหัวข้อยังไม่เข้าใจและยากเกินไป

มีศัพท์ภาษาอังกฤษฟังไม่เข้าใจ ระยะเวลาในการจัดอบรมน้อยไป ไม่มีกิจกรรมนันทนาการหรือเกมส์มาประกอบ รวมทั้งการทำปฏิบัติการในแต่ละฐานทำได้ไม่ครบทุกคนและในส่วนของหัวข้อที่อยากให้จัดอบรมในครั้งต่อไปมีหลากหลายมาก ดังนั้นจึงขึ้นอยู่กับผู้จัดว่ามีความพร้อมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องหรือไม่ รวมทั้งแนวนโยบายในการจัดกิจกรรมของทั้งโรงเรียน และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลว่าจะมีทิศทางไปทางใดในอนาคต

สรุปผลการประเมินผลความพึงพอใจและความคิดเห็นผู้เข้าร่วมฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง “ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียน”
วันที่ ๒๗ เดือนสิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๗
ณ โรงเรียนชลราษฎรอำรุง อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี

จากการสอบถามความพึงพอใจและความคิดเห็นของผู้เข้าร่วมโครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง“ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียน”วันที่ ๒๗ เดือนสิงหาคม ๒๕๕๗ ณ โรงเรียนชลราษฎรอำรุง อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เก็บข้อมูลจากผู้เข้าร่วมโครงการจำนวนทั้งสิ้น **๑๘๙** คนตอบแบบสอบถามจำนวน **๑๖๗** คนคิดเป็นร้อยละ **๘๘.๓๖** สรุปข้อมูลได้ดังนี้

เกณฑ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลมีระดับคะแนนดังนี้

๑. มีความพึงพอใจมากที่สุดระดับคะแนนเท่ากับ ๕
๒. มีความพึงพอใจมากระดับคะแนนเท่ากับ ๔
๓. มีความพึงพอใจปานกลางระดับคะแนนเท่ากับ ๓
๔. มีความพึงพอใจน้อยระดับคะแนนเท่ากับ ๒
๕. มีความพึงพอใจน้อยที่สุดระดับคะแนนเท่ากับ ๑

การหาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับเกณฑ์การประเมินค่าเฉลี่ยของบุญชมศรีสะอาด 2532 : 111

ค่าเฉลี่ยระดับ ๔.๕๑ – ๕.๐๐ มีความพึงพอใจมากที่สุด
ค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ มีความพึงพอใจมาก
ค่าเฉลี่ยระดับ ๒.๕๑ – ๓.๕๐ มีความพึงพอใจปานกลาง
ค่าเฉลี่ยระดับ ๑.๕๑ – ๒.๕๐ มีความพึงพอใจน้อย
ค่าเฉลี่ยระดับ ๑.๐๐ – ๑.๕๐ มีความพึงพอใจน้อยที่สุด

ตอนที่ ๑ ผลการวิเคราะห์สถานภาพทั่วไปของผู้ตอบแบบประเมิน

ตารางที่ ๑ แสดงจำนวนร้อยละของเพศผู้ตอบแบบประเมิน

เพศ	จำนวน(คน)	ร้อยละ
ชาย	๑๓๘	๘๒.๖๓
หญิง	๒๙	๑๗.๓๗
รวม	๑๖๗	๑๐๐

**********จากตารางที่ ๑ พบว่าผู้ตอบแบบประเมินเป็นเพศหญิงมากกว่าเพศชายโดยเพศชายคิดเป็นร้อยละ ๘๒.๖๓ เพศหญิงคิดเป็นร้อยละ ๑๗.๓๗

<u>ตอนที่ ๒</u> ผลการวิเคราะห์ระดับความพึงพอใจในการเข้าร่วมฝึกอบรม

ข้อ	รายการประเมิน	ระดับความพึงพอใจ					ค่าเฉลี่ยระดับ ($\overline{X}$)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)	ระดับความพึงพอใจ	ร้อยละ	อันดับที่
		มากที่สุด	มาก	ปานกลาง	น้อย	น้อยที่สุด					
ด้านวิทยากร											
๑.	ความเหมาะสมของเนื้อหากับวัตถุประสงค์การอบรม	๖๓	๙๐	๑๒	๑	๐	๔.๒๖	๐.๗๕๙๕	มาก	๘๕.๒	๒
๒.	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “การจำแนกชนิดฟองน้ำทะเลอย่างง่ายๆ”	๔๙	๙๔	๒๑	๒	๑	๔.๑๓	๐.๖๘๕๖	มาก	๘๒.๖	๕
๓.	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “การแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลและการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้น”	๔๓	๘๕	๓๖	๒	๑	๔.๐๐	๐.๗๕๘๒	มาก	๘๐.๐	๑๑
๔.	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “การแยกและการใช้ประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท”	๔๗	๘๐	๓๕	๓	๒	๔.๐๐	๐.๘๑๘๙	มาก	๘๐.๐	๑๑
๕	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “เทคนิคการสกัดสารสีและสกัดลิปิดจากแอคติโนมัยซีทและการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ”	๔๔	๙๐	๒๘	๔	๑	๔.๐๓	๐.๗๖๑๒	มาก	๘๐.๖	๑๐
๖	ความเชื่อมโยงของเนื้อหาในการอบรม	๔๐	๙๕	๓๑	๑	๐	๔.๐๔	๐.๖๘๐๓	มาก	๘๐.๘	๙
๗	ความเหมาะสมของเอกสารการอบรม	๕๕	๗๐	๓๕	๖	๑	๔.๐๓	๐.๗๓๗๒	มาก	๘๐.๖	๑๐
๘	การเปิดโอกาสให้ผู้เข้าอบรมแสดงความคิดเห็น	๗๕	๗๑	๑๙	๒	๐	๔.๓๑	๐.๗๒๕๐	มาก	๘๖.๒	๑
๙	หลังจากการอบรมท่านได้รับความรู้เพิ่มในระดับใด	๓๕	๘๒	๔๖	๓	๑	๓.๘๘	๐.๗๗๓๕	มาก	๗๗.๖	๑๔
ด้านสถานที่/ระยะ/อาหาร											
๑.	ความเหมาะสมของสถานที่จัดอบรม	๖๓	๗๕	๒๘	๐	๑	๔.๑๙	๐.๗๕๘๗	มาก	๘๓.๘	๓
๒.	ความพร้อมของอุปกรณ์โสตน์ทัศนูปกรณ์	๖๕	๖๕	๒๗	๙	๑	๔.๑๐	๐.๙๐๘๑	มาก	๘๒.๐	๖

๓.	ความเหมาะสมของระยะเวลาในการอบรม	๕๑	๖๖	๓๙	๑๓	๐	๓.๙๖	๐.๘๓๐๔	มาก	๗๙.๒	๑๒
๔.	ความเหมาะสมของอาหาร	๖๑	๖๖	๓๖	๒	๒	๔.๐๙	๐.๘๕๒๖	มาก	๘๑.๘	๗
ด้านการนำความรู้ไปใช้											
๑	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประกอบการเรียน	๔๐	๗๓	๓๙	๑๓	๑	๓.๘๑	๐.๘๘๕๑	มาก	๗๖.๒	๑๕
๒	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดทำโครงงานวิทยาศาสตร์	๕๗	๗๐	๓๔	๕	๑	๔.๐๖	๐.๘๔๕๐	มาก	๘๑.๒	๘
๓	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปสร้างทักษะด้านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์	๕๓	๘๖	๒๘	๐	๐	๔.๑๕	๐.๖๗๘๓	มาก	๘๓.๐	๔
ด้านการฝึกปฏิบัติการ											
๑	สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการเรียน	๔๖	๗๑	๔๕	๔	๑	๓.๙๔	๐.๘๓๑๘	มาก	๗๘.๘	๑๓
๒	สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์	๕๐	๘๑	๓๓	๒	๑	๔.๐๖	๐.๗๗๐๙	มาก	๘๑.๒	๘
รวม							๔.๐๖	-	มาก	๘๑.๒	-

ตารางที่ ๒ แสดงระดับความพึงพอใจเกี่ยวกับการฝึกอบรมด้านวิทยากรบรรยาย ด้านสถานที่ ระยะเวลา อาหาร ด้านความรู้ความเข้าใจ ด้านการนำความรู้ไปใช้ ด้านการฝึกปฏิบัติการ

จากตารางที่ ๒พบว่าผู้เข้ารับการอบรมมีระดับความพึงพอใจในโครงการอยู่ใน**ระดับมาก (ค่าเฉลี่ย ๔.๐๖) คิดเป็นร้อยละ ๘๑.๒** และเมื่อพิจารณาในแต่ละด้าน พบว่าในรายการประเมิน**ด้านวิทยากร**พบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้ออยู่ในระดับมาก คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยที่หัวข้อ “ความเหมาะสมของเนื้อหากับวัตถุประสงค์การอบรม” มีค่าร้อยละ๘๕.๒ ซึ่งอยู่ในอันดับที่ ๑ ของด้านนี้ส่วน**ด้านสถานที่/ระยะเวลา/อาหาร** พบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้อก็ยังคงอยู่ในระดับมาก คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยมีหัวข้อ “ความเหมาะสมของสถานที่จัดอบรม” มีค่าร้อยละ ๘๓.๘ ซึ่งมากที่สุดในด้านนี้ **ส่วนด้านการนำความรู้ไปใช้** พบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้ออยู่ในระดับมากเช่นกัน คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยหัวข้อ “สามารถนำความรู้ที่ได้ไปสร้างทักษะด้านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์” มีค่าร้อยละ ๘๓.๐ ซึ่งมากที่สุดในด้านนี้ **ด้านการฝึกปฏิบัติการ**จากการประเมินยังคงพบว่าพบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้ออยู่ในระดับมาก คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยที่หัวข้อ“สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์” มีค่าร้อยละ ๘๑.๒ ซึ่งมากที่สุดในด้านนี้

ตอนที่ ๓ ข้อเสนอแนะอื่นๆ

1. ข้อเสนอแนะ ติชม ในการอบรมครั้งนี้ได้แก่

เนื้อหาค่อนข้างยากเกินไป/ ความรู้เกินตัวไปหน่อยทำให้ไม่อยากฟัง/ เนื้อหาประกอบการบรรยายดีมาก/ การบรรยายกับภาพที่แสดงสับสนควรปรับปรุง/ ปรับคำให้ถูกต้อง เช่น ปาราสิต เป็น ปรสิต/สถานที่มีจอภาพขนาดเล็กไม่สามารถสื่อให้ผู้ฟังเห็นชัดเจน/ เสียงไมค์เบาเกินไป/ อุปกรณ์ไม่พร้อม เช่น หน้าจอโทรทัศน์ทำให้คนอยู่ข้างหลังมองไม่เห็น/ ตัวหนังสือเล็กไป/ควรมีตัวอย่างให้ดู/ เป็นการอธิบายที่ดี เข้าใจ/ น่าจะมีสิ่งที่สนุกกว่านี้/ มองไม่เห็น พูดเบาไป/

วิทยากรควรพูดให้สนุกกว่านี้/ ควรพูดให้สนุก ไม่น่าเบื่อ/ วิทยากรควรมีความสามารถให้อธิบายให้เข้าใจง่ายกว่านี้/ขนมปังอร่อยดี เอามาเยอะๆเลย/ ของว่างอร่อยดี/ ควรให้เวลามากกว่านี้/ ดีมากแต่เนื่องจากระยะเวลาสั้นจึงทำให้เกิดการสับสนได้ เพราะการดำเนินเรื่องเร็ว/ มีการจัดเวลาค่อนข้างดี/ วิทยากรมีความรู้ทางด้านนี้มากสามารถอธิบายความรู้ให้เข้าใจได้ แต่การนำเสนอมีการมุ่งที่เนื้อหามากเกิน อาจทำให้รู้สึกเบื่อหน่ายและบางเนื้อหาเป็นภาษาอังกฤษและไม่มีความหมายที่แน่นอน/ ควรมี break หรือ พักมากกว่านี้ และควรมี entertain นักเรียนให้น่าสนใจกว่านี้/ ของว่างอร่อยมากอยากกินอีก/ วิทยากรควรมีกิจกรรมขั้นระหว่างบรรยาย ไม่ให้การบรรยายน่าเบื่อและเต็มไปด้วยความสนุกสนานและเป็นแรงจูงใจให้นักเรียนตั้งใจฟังยิ่งขึ้น/ ระยะเวลาในการจัดบรรยายยาวนานเกินไป ควรมีเบรคพักของแต่ละหัวข้อ/ ควรมีเนื้อหาที่เกี่ยวข้องกับ ม.ปลายด้วย หรือมีมากกว่านี้และควรให้มีความน่าสนใจในการฟัง/ วิทยากรให้ความรู้อย่างดี ข้อมูลแน่น/ มีการยกตัวอย่างที่ดี ควรมีวีดีโอประกอบด้วย/ เนื้อหายากเกินไป อธิบายแล้วไม่เข้าใจ ไม่เหมาะกับวัย และคุณวุฒิ/ พูดช้าๆหน่อยครับ/ คนที่หนึ่งสอนดีมาก คนที่สอง สามพูดเสียงเบาทำให้ไม่น่าสนใจและควบคุมนักเรียนไม่อยู่ คนที่สี่สอนดีมาก/ ควรทำสื่อการสอนที่น่าสนใจมากกว่านี้ มีเทคนิคการสอนที่ดีกว่านี้ เพื่อดึงดูดความสนใจของผู้ฟังให้มากกว่านี้/ อยากให้เพิ่มความคมชัดของภาพประกอบคำบรรยายในเอกสารทุกฉบับ/ ควรใช้ภาษาที่ฟังเข้าใจง่ายกว่านี้/ อาหารว่างมาช้ามาก/ งงกับเอกสารมากๆ ไม่เข้าใจเลย อ่านไม่ออก/ ทำไมต้องจัดตรงกับวันเรียน รด./ ควรนำเสนอความรู้ที่สามารถนำไปประกอบโครงงานได้/ ผู้นำเสนอตั้งใจนำเสนอ/ ไม่ได้ทำ lab/ อาหารน้อย/ น่าเบื่อ/ เนื้อหามีความยาก และวิทยากรบางท่านเสียงไม่ค่อยดัง และผู้รับฟังแม้นไม่เข้าใจก็ไม่กล้าถาม/ การใช้ศัพท์วิทยาศาสตร์ทำให้เด็กไม่เข้าใจ บางคนไม่ได้เข้าร่วมการทดลอง ควรจัดเวลาให้ดีกว่านี้/ อุปกรณ์ไม่ค่อยเพียงพอ อยู่ไกลทำให้มองไม่เห็น เพื่อนในกลุ่มส่งเสียงดังทำให้การฟังถดถอย/ ควรอบรมให้เปิดกว้างกว่านี้ ไม่ควรนำเสนอข้อมูลให้ช้าเกินไป เด็กง่วงนอน/ ดีแล้วครับ แต่ควรมีมอนิเตอร์ด้านหลังให้ข้างหลังมองเห็นด้วย/ อาหารน้อยเกินไป ควรมีให้กินทุกๆชั่วโมง/ ครูคนแรกพูดติดคำว่า “นะครับ” มากเกินไป/ ของว่างอร่อย /ขยายตัวอักษรบนจอให้ใหญ่หน่อย/ ต้องพูดดึงดูดความสนใจให้มากกว่านี้/ สื่อการบรรยายบางเรื่องไม่ค่อยดีมองเห็นตัวหนังสือไม่ชัด/ ควรจัดเวลาให้ดีกว่านี้และควรสอดแทรกมุกตลกไว้ด้วย และควรจัดเอกสารการเรียนให้กะทัดรัด/ ควรเพิ่มเวลาให้มากขึ้น บรรยายให้เข้าใจง่ายอย่าใช้ศัพท์ยากเกินไปควรอธิบายความหมายด้วย/ ให้สอนให้ช้ากว่านี้/ ข้อมูลเยอะดีฟังไม่เบื่อเลยครับ/ เนื้อหามาก พูดเร็ว/ แอร์หนาวมาก ควรสอนให้มีชีวิตชีวา/ ควรเลือกวันอื่นที่ไม่ใช่วันพุธ/ เนื้อหาสาระ ม.4 ยังไม่ได้เรียน ควรเลือก ม.5-6 เข้าเรียนจะได้ประโยชน์มากกว่านี้/ อยากให้ทำหนังสือการอบรมดีกว่านี้/ ควรจัดกิจกรรมแบบนี้ให้รุ่นต่อๆไปได้เข้าร่วม/ อาจารย์ทุกท่านอบรมได้เข้าใจดี อยากให้ lab สนุกๆแบบนี้อีก/ อบรมครั้งนี้ดีมากทำให้เข้าใจเรื่องที่ไม่เคยรู้มาก่อน ด้านความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล เป็นเรื่องที่น่าสนใจ ควรถ่ายทอดให้คนรุ่นต่อๆไปได้รับรู้

2. หัวข้อที่ท่านอยากให้จัดอบรมครั้งต่อไป ได้แก่

จักรวาล/ Genetic/ ความผิดปกติของโรคทางพันธุกรรม/ ประเภทของสิ่งมีชีวิต /ดาราศาสตร์และอวกาศ/ ฉลาม/ วาฬ/ หมึก/ จุลชีวิทยา/ สิ่งมีชีวิตลึกลับ/ ปลา/ พลาสติกชีวภาพ/ หัวข้อเดิม/ เซลล์/ การศึกษาการดำรงชีวิตของเซลล์เดียว/ กระบวนการต่างๆในการดำรงชีวิต/ สัตว์โลกใต้ทะเลลึกที่สำคัญในมหาสมุทร/ การดำรงชีพกลางทะเล/ หลักสูตรการปฏิบัติการทางทะเล/ สัตว์ทะเล/ ความสามารถและความแตกต่างของสัตว์ทะเลน้ำลึกกับสัตว์ทะเลน้ำตื้น/

เกี่ยวกับฮอร์โมนของสัตว์/ การปะทุของภูเขาไฟ/ ระบบสุริยะจักรวาล/ อวกาศ/ เทคโนโลยีทางทะเล/ การกำจัดเพลี้ยโดยวิธีทางชีววิทยา/ สกัดพิษของแมงมุม/ สัตว์โลกน่ารัก/ การทำโครงงาน/ ความหลากหลายของทะเลด้านต่างๆ/ ความหลากหลายของปลาในทะเล/ เรื่องที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในชั้นเรียนของผู้เข้าฟัง/ เรื่องที่เป็นปัจจุบันใกล้ตัวและเกี่ยวข้องกับนักเรียนมากที่สุด/ กระบวนการผลิตยารักษาโรคต่างๆ/ พัฒนาศักยภาพของการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ประเภทวิจัยประยุกต์/ แบคทีเรียและเชื้อแอคติโนมัยซีทในเชิงลึก/ ชีววิทยาทางทะเลและระบบนิเวศวิทยาทางทะเล

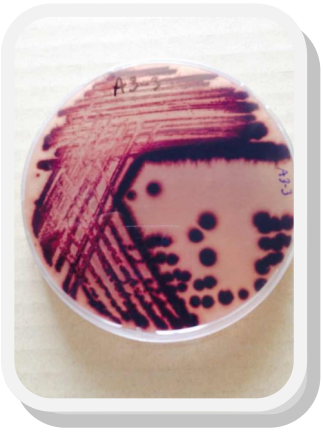
<u>ตอนที่ ๓</u> ข้อเสนอแนะอื่นๆ ในส่วนของข้อเสนอแนะติชมผู้เข้ารับการอบรมส่วนใหญ่มีข้อเสนอแนะที่หลากหลายแต่ส่วนใหญ่จะเสนอแนะเกี่ยวกับเรื่องของวิธีการนำเสนอและรูปแบบของการนำเสนอบางหัวข้อยังไม่เข้าใจและยากเกินไป มีศัพท์ภาษาอังกฤษฟังไม่เข้าใจ ระยะเวลาในการจัดอบรมน้อยไป ไม่มีกิจกรรมนันทนาการหรือเกมส์มาประกอบ รวมทั้งการทำปฏิบัติการในแต่ละฐานทำได้ไม่ครบทุกคนและในส่วนของหัวข้อที่อยากให้จัดอบรมในครั้งต่อไปมีหลากหลายมากดังนั้นจึงขึ้นอยู่กับผู้จัดว่ามีความพร้อมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องหรือไม่ รวมทั้งแนวนโยบายในการจัดกิจกรรมของทั้งโรงเรียน และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลว่าจะมีทิศทางไปทางใดในอนาคต

เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ

ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพ และเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเล และฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียน

โดย คณะผู้วิจัยจากแผนงานวิจัย...

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร



วันที่ 20 สิงหาคม 2557

ณ โรงเรียนสิงห์สมุทร

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ

“ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพ และเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเล และฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียน”

แผนงานวิจัย

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

- ความหลากหลายทางชนิดของฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนกลาง
- ศักยภาพของแบคทีเรียทะเล: แหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร
- การค้นหารงควัตถุที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ทะเล

แผนงานวิจัย

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

- ศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งกรดไขมันชนิดจำเป็น
- การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทและการผลิตเซลล์ปริมาณมาก
- การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย

แผนงานวิจัยต่อเนื่องระยะเวลา3 ปี(พ.ศ. 2556-2558)

- คณะดำเนินงานวิจัย

  หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 1 ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ

  หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 2 ดร. ชุติวรรณ เตชสกุลวัฒนา

  หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 3 ดร. รวิวรรณ วัฒนดิลก

  หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 4 นางณิษา สิรนนท์ธนา

  หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 5 นางสาวรัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์

  หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 6 ดร. สุพรรณี ลีโทชวลิต

ความสำคัญและที่มา

- การวิจัยค้นคว้าสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นยารักษาโรค และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร
- ส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท ยีสต์ และรา) บนแผ่นดิน จึงค้นหาสารตัวยาใหม่ ๆจากสิ่งมีชีวิตในทะเล
- จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ตลอดจนในน้ำทะเลหรือตะกอนดิน เป็นแหล่งของสารประกอบธรรมชาติที่ยิ่งใหญ่ และมีความหลากหลายของฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าจะนำมาผลิตตัวยาได้

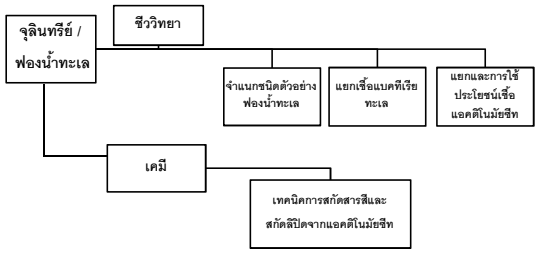
วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัย

- ค้นหาสารตัวยาตั้งต้นที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial
- พัฒนาด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ได่แก่ กรดไขมัน และชีวรงควัตถุ
- พัฒนาการผลิตวัคซีนสำหรับสัตว์น้ำ
- พัฒนาการเพิ่มผลผลิตเซลล์จุลินทรีย์
    - ถ่ายทอดองค์ความรู้ในการศึกษาผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล

ผลสำเร็จจากงานวิจัยปีที่1

- ทราบถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเล
- ทราบถึงสารตั้งต้นที่น่าสนใจเพื่อเป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง
- องค์ความรู้ที่สนับสนุนการเรียนการสอนและการผลิตบัณฑิต
- สร้างเยาวชนที่มีองค์ความรู้และความตระหนักในการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรชีวภาพทางทะเลอย่างยั่งยืนด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

อบรมเชิงปฏิบัติการ



Phylum Porifera (ฟองน้ำ:Sponges)

สุเมตต์ ปุจฉาการ
Sumaitt Putchakarn
งานวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
Marine Biodiversity Research Unit
Institute of Marine Science, Burapha University

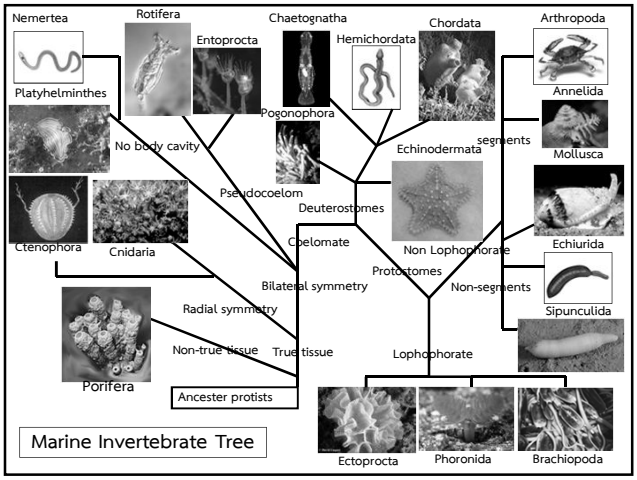
งานวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล ฝ่ายวิจัย

ภารกิจ

1. ทำงานวิจัยเกี่ยวข้องกับความหลากหลายทางชีวภาพในทะเล
2. ทำหน้าที่เก็บรวบรวมและจำแนกชนิดตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเล เพื่อจัดแสดงในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มและพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์ทางทะเล
3. ดูแลรักษาและจัดการฐานข้อมูลตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์อ้างอิง
4. บริการวิชาการเกี่ยวข้องกับความหลากหลายทางชีวภาพในทะเล

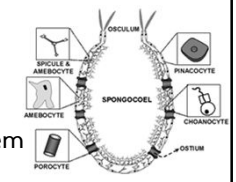
ทะเลไทย

- ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อน (Tropical Zone)
- ชายฝั่งทะเล มากกว่า 2,600 km และเกาะมากกว่า 800 เกาะ
- 2 มหาสมุทร 1 ประเทศ คือ มหาสมุทรอินเดียและมหาสมุทรแปซิฟิค
- ตั้งอยู่บนเปลือกที่เก่าแก่และมั่นคง (Sundra Plate)
- ความหลากหลายทางชีวภาพสูง!!!!

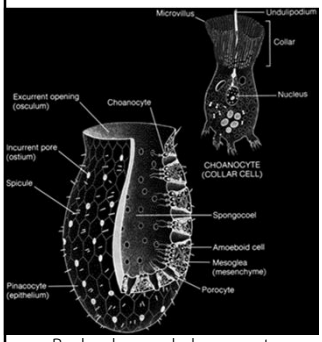


ชีววิทยาของฟองน้ำ

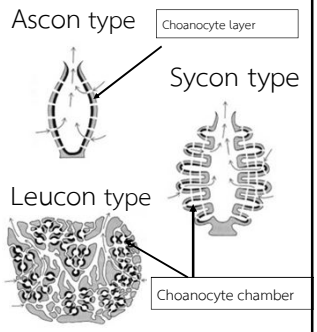
- Multi-cellular animal (Metazoa)
- No true tissue (parazoa), no organs, no nervous system
- Three types of water canal system
- Filter feeder
- Spicules and/or Spongin fiber are main skeleton
- Sexual and Asexual reproduction
- ~ 8,000 are extent species and more 900 genera are fossils



สัณฐาณวิทยา



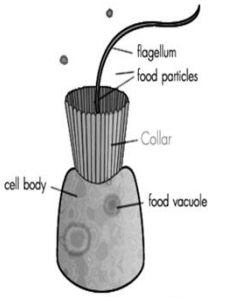
Body plan and choanocyte



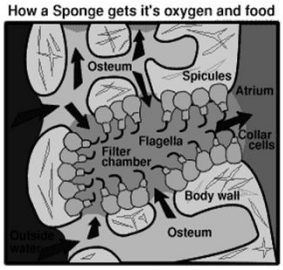
Aquiferous system

Sources: http://geo.columbia.edu/dees/ees/ life/slides/phyla/sponge.gif; http://corona.eps.pitt.edu/www_GPS/courses/GEO 1200/lab3/structure.htm

หน้าที่ของเซลฟองน้ำ

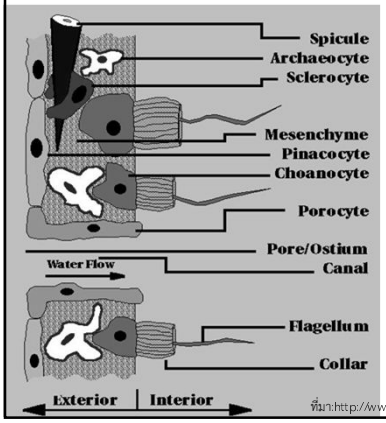


อนุภาคของอาหาร (food particles) จะเข้าไปในเซลล์คอลลาร์ (collar cell) แล้วถูกกลืนโดยตัวเซลล์ (cell body) และจะถูกย่อยโดยฟูดแวคิวโอล (food vacuole)



ที่มา: http://www.mesa.edu.au/friends/seashores/sponges1.html

ผนังลำตัวและเซลฟองน้ำที่สำคัญ

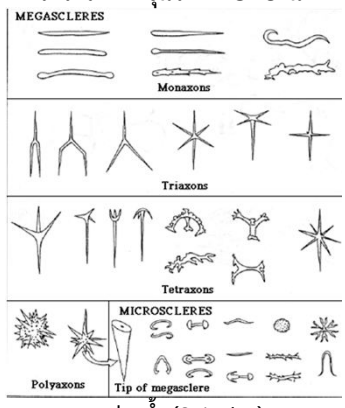


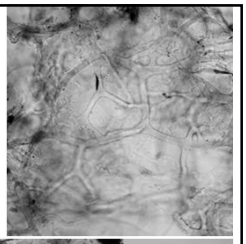
ที่มา:http://www.ucmp.berkeley.edu:80/porifera/pororg.html

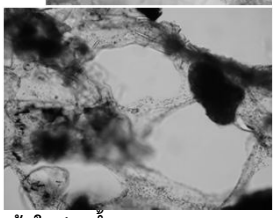
Totipotency

= การเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเซล

โครงร่างค้ำจุนร่างกายฟองน้ำ



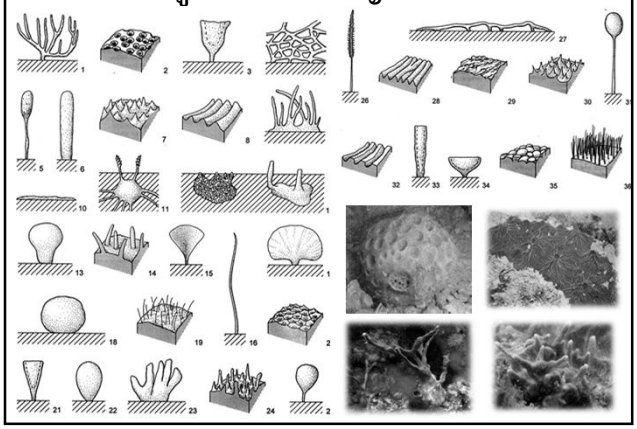




หนามฟองน้ำ (Spicules)

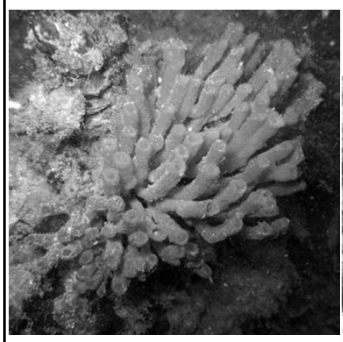
เส้นใยฟองน้ำ (Spongin fibers)

รูปทรงการเจริญเติบโต



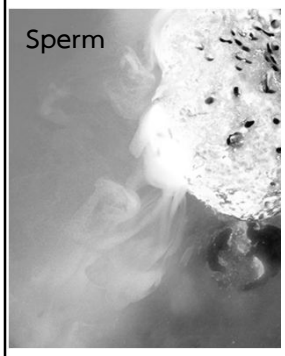
การสืบพันธุ์ (Reproduction)

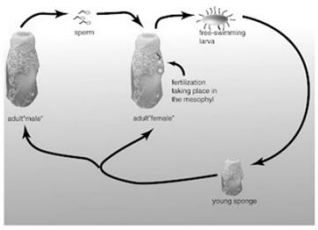
- Asexual reproduction – budding, gemmules



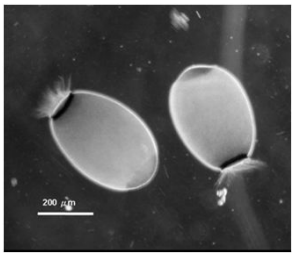
การสืบพันธุ์ (Reproduction)

- Sexual reproduction

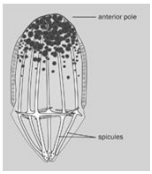




Life cycle: วงชีวิต



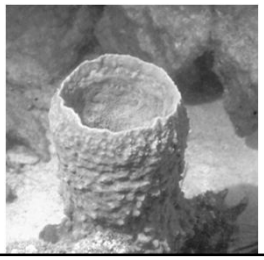
Parenchymella larva



Trichimella of Hexaactinellida

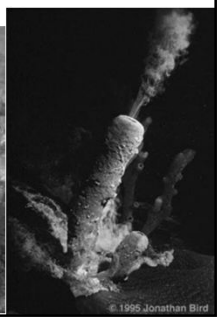
นิเวศวิทยาของฟองน้ำ

- สัตว์เกาะติด (Sessile animal) – Solitary or Colony
- พบทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม, ตั้งแต่ชายฝั่งทะเลถึงทะเลลึก
- บางระบบนิเวศพบฟองน้ำทะเลเป็นสัตว์ชนิดเด่น
- เจริญเติบโตช้าและอายุยืน อาจจะถึง 5,000 ปี



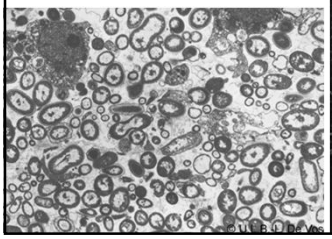
บทบาทในระบบนิเวศ

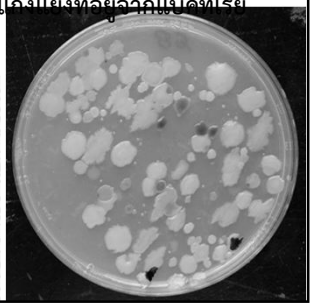
- ลดปริมาณตะกอนในน้ำทะเลโดยการกรอง
- เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยให้กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ



The first farmer in the sea: เกษตรกรยุคแรกของโลก

ฟองน้ำบางชนิดทำการเลี้ยงแบคทีเรียไว้เป็นอาหารของตนเองแล้วสร้างสารต้านจุลชีพขึ้นมาเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารของตนถูกทำร้ายหรือถูกแก่งแย่งที่อยู่จากแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่พึงประสงค์

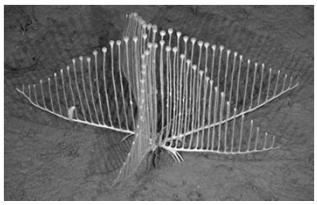




ฟองน้ำผู้ล่า Carnivorous sponges

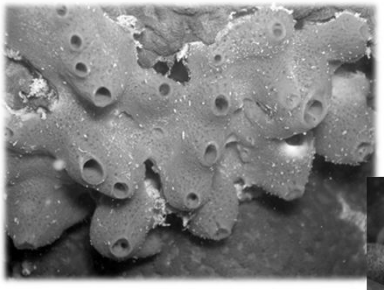
Vacelet & Boury-Esnault, 1995

Asbestopluma hypogea



Chondrocladia lyra

ฟองน้ำเป็นแหล่งอาหารของสัตว์ทะเล



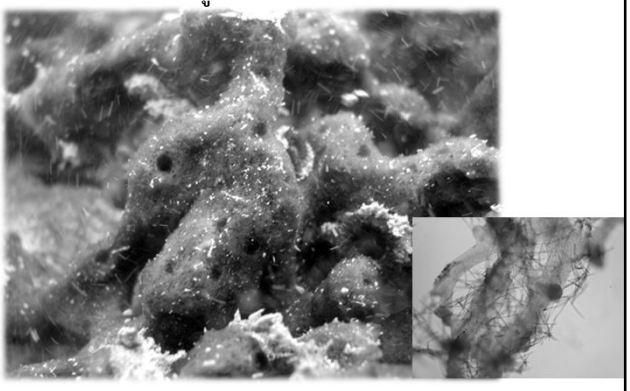
Blue sponge, *Neopetrosia* sp. "blue"

Joruna funebris

ฟองน้ำเป็นแหล่งอาหารของสัตว์ทะเล

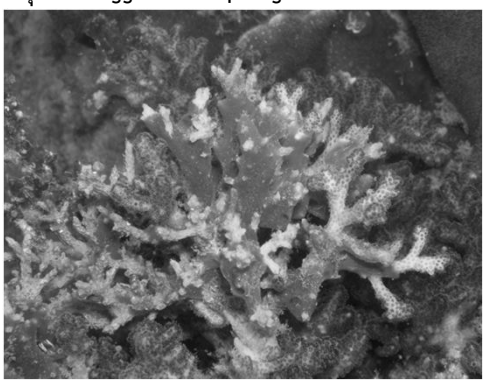
Leather sponge, *Chondrosia reticulata* (Carter)

ฟองน้ำที่เป็นมิตร : อยู่ร่วมกับสาหร่ายทะเล



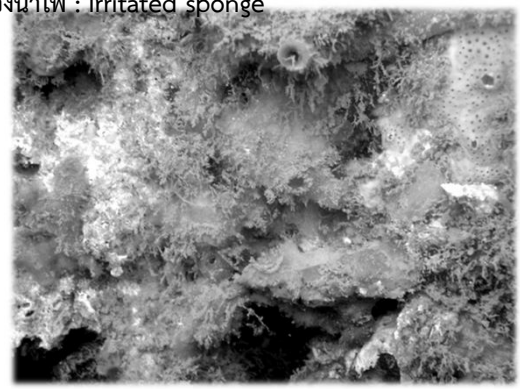
Green sponge, *Haliclona (Gellius) cymaeformis*

ฟองน้ำรุกราน Aggressive sponges



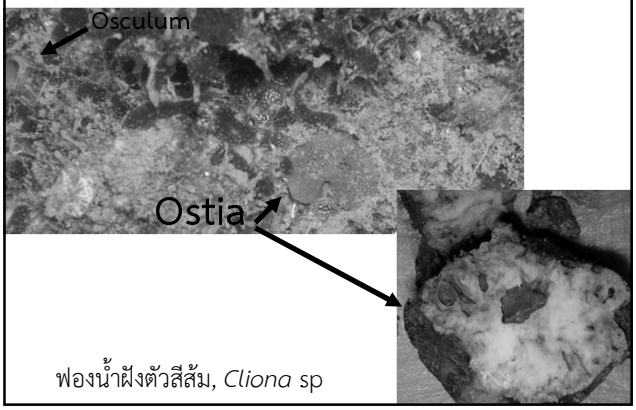
Purple sponge, *Haliclona (Reniera)* sp

ฟองน้ำไฟ : Irritated sponge



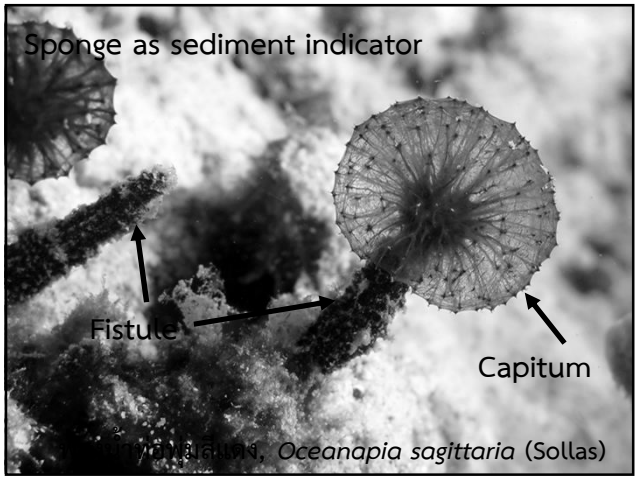
Fire sponge, *Biemna tubulata* (Dendy)

ฟองน้ำฝังตัว (Bio-erosion sponges)



ฟองน้ำฝังตัวสีส้ม, *Cliona* sp

Sponge as sediment indicator

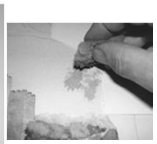


ฟองน้ำก้านสี่แฉก, *Oceanapia sagittaria* (Sollas)

การใช้ประโยชน์จากฟองน้ำ (Sponges as human use values)

ฟองน้ำถูตัว

ผ้าอนามัยสมัยโรมัน

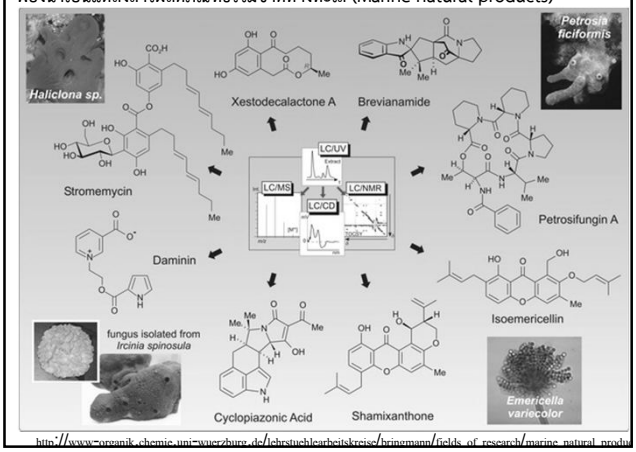


งานศิลป์และการตกแต่ง

ฟองน้ำเป็นแหล่งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (Marine natural products)

http://www-organik.chemie.uni-wuerzburg.de/lehrstuehlearbeitskreise/bringmann/fields_of_research/marine_natural_produc

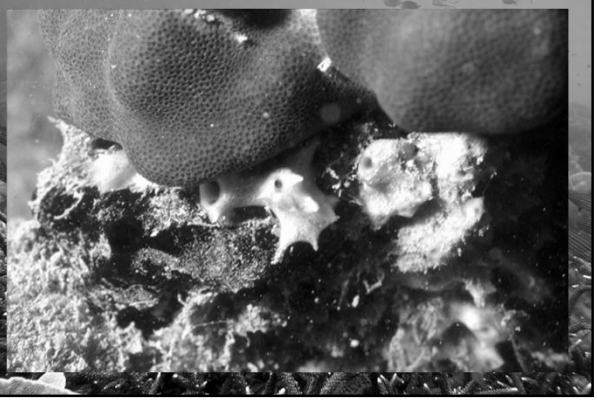
ฟองน้ำเป็นแหล่งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (Marine natural products)



http://www-organik.chemie.uni-wuerzburg.de/lehrstuehlearbeitskreise/bringmann/fields_of_research/marine_natural_produ

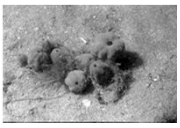
แหล่งศึกษาคือ ระบบนิเวศทางทะเลที่สำคัญ ได้แก่ หาดทราย หาดหิน ป่าชายเลน แหล่งหญ้าทะเล แนวปะการัง พื้นท้องทะเล นอกชายฝั่ง และสิ่งก่อสร้างที่มนุษย์สร้างขึ้น รวมถึงตลาดท่าเทียบเรือประมง

แหล่งศึกษาฟองน้ำ : แนวปะการัง

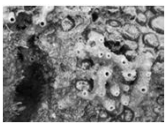


แหล่งศึกษาฟองน้ำ

แหล่งหญ้าทะเล

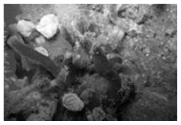


หาดทราย

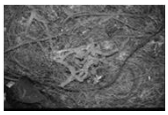


หาดหิน

เสาสะพานเทียบเรือ



สะพานปลา



ท่าขึ้นเรืออวนปู

การสำรวจและเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

- ฟองน้ำเป็นสัตว์เกาะติดอยู่กับที่ (Sessile animal)
- พบทั่วไปตั้งแต่ชายฝั่งในเขตน้ำขึ้นน้ำลง จนถึงพื้นท้องทะเลลึก
- ในเขตร้อนพบมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก
- มีความเด่นอยู่ในทุกระบบนิเวศของทะเล
- มีพฤติกรรมหลากหลาย เช่น อยู่ร่วมกับสัตว์อื่น (Associated) ชอบแสง (Expose) ไม่ชอบแสง (Cryptic) เจริญขึ้นอยู่บนพื้นดิน (Excavated) ฝังตัว (Burrowing) ฯลฯ

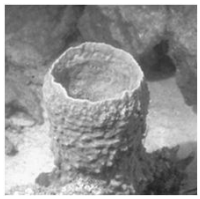
การสำรวจต้องพยายามให้ครอบคลุมพื้นที่ให้มากที่สุด!!

การสำรวจและเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

แบบเคลือบผิว (Encrusting)

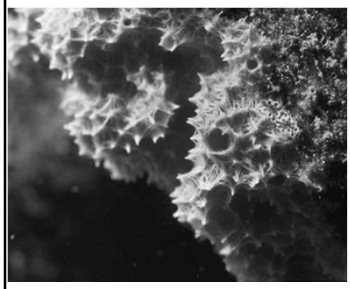
การสำรวจและเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

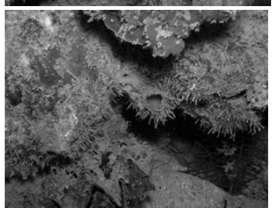
แบบชอบแสง (Expose)



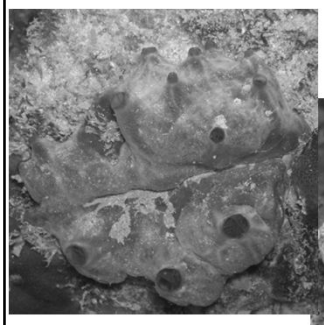
การสำรวจและเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

แบบไม่ชอบแสง (Cryptic)





ฟองน้ำ (Sponges) กับเพรียงหัวหอม (Ascidians)

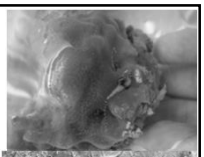
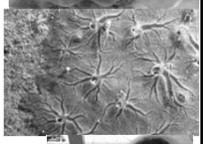


การเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

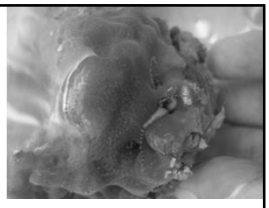
- อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง
  - มีดสำหรับตัดฟองน้ำ ค้อนและสิ่ว
  - ถุงซิบ
  - กระดาษเลเบลตัวอย่าง
  - ถุงมือยาง
  - กล้องถ่ายรูป
  - แอลกอฮอล์ 70%
  - สมุดบันทึก

การเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

- พยายามเก็บตัวฟองน้ำมาให้ได้ทั้งก้อนฟองน้ำ
- ให้ตัวอย่างฟองน้ำอยู่ในน้ำทะเลตลอดเวลา
- แยกฟองน้ำแต่ละตัวอย่างในถุงซิปเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสปิคูล
- ถ่ายรูปฟองน้ำและถิ่นที่อยู่อาศัย

การบันทึกข้อมูลตัวอย่างฟองน้ำ



Data notes:

- Date & Time, GPS
- *in situ* photography
- Habitats: depths, types of habitat, substrate
- light exposing, etc
- External morphology: growth forms, surface features, oscule distribution, consistency, coloration, etc

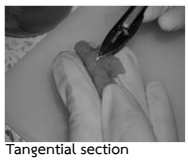
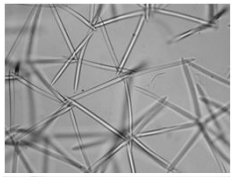
ดองตัวอย่างฟองน้ำในแอลกอฮอล์ 70%

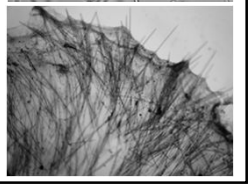
Data

งานในห้องปฏิบัติการ

Microscopic studies

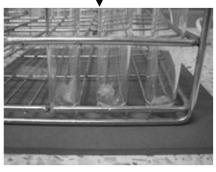
- Tangential and perpendicular sections through sponge tissue



Tangential section

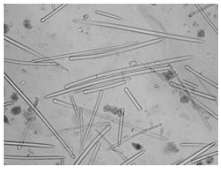
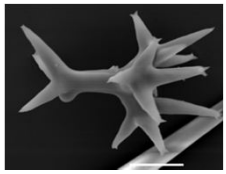

Perpendicular section

งานในห้องปฏิบัติการ

- Spicules preparation: cook in conc

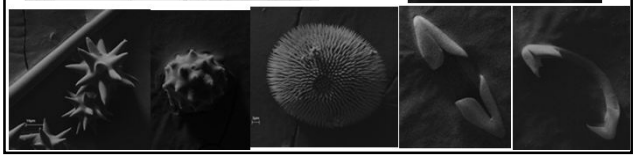

conc. nitric acid

Washed and centrifuged in distilled water and 50% alcohol, and suspended in 95% alcohol

งานในห้องปฏิบัติการ

กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscopy, SEM)



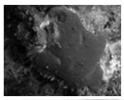
การจำแนกชนิดฟองน้ำ

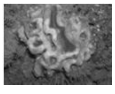
Sample

At Order, Family and Genus level based on Hooper & Van Soest, 2002 and Rützler, 1997 for *Systema Porifera* and Termology and glossary of Boury-Esnault & Rützler, 1997 *Thesaurus of sponge morphology.*

At species level based on collecting references

การจำแนกกลุ่มฟองน้ำ





Porifera

1 Symplasma — Hexactinellida – ฟองน้ำแก้ว

2 Cellularia

3 — Calcarea – ฟองน้ำหินปูน

5 — Homoscleromorpha (ฟองน้ำตับไก่)

4 — Demospongiae

- Rock sponges (Lithistida)
- Freshwater sponges

Systematics of Porifera

1= silica spicules; hexactine; syncytium; sycon or leucon type

2 = porocytes; transport of sperm to egg via choanocyte

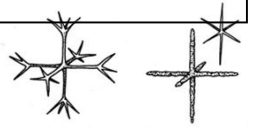
3 = calcareous spicules; no silica spicules; 3 types of water canal

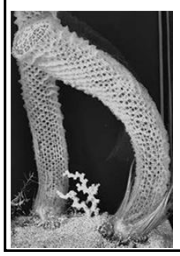
4 = silica spicules; tetraxon; spongocytes&spongin fiber; leucon type

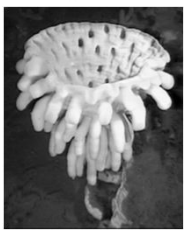
5 = silica spicules; no megasclere

http://www.biology.ualberta.ca/courses.hp/zool250/Clades/clade03-Porifera.htm

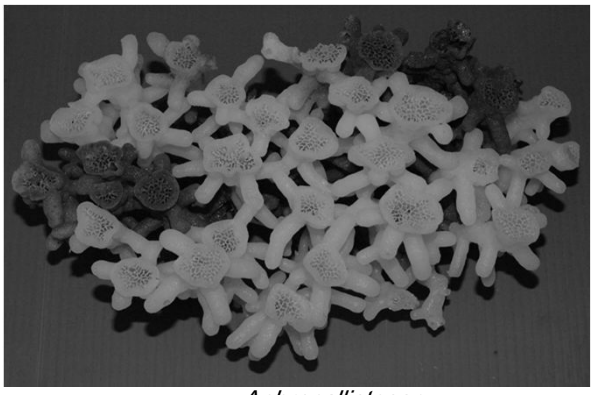
Class Hexactinellida: ฟองน้ำแก้ว (Glass sponges)







Deep water glass sponge from the Andaman Sea



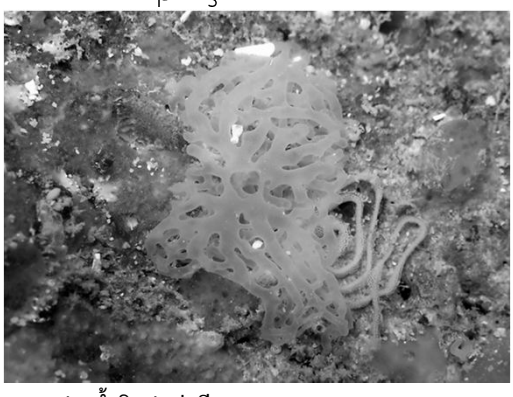
Aphrocallistes sp.

Class Calcarea: ฟองน้ำหินปูน (calcarous sponges)

ฟองน้ำหินปูนแจกันสีขาว, *Sycon* sp. "white"

Class Calcarea

Calcarous sponges

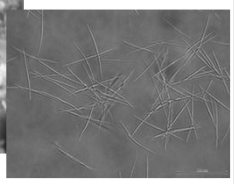


ฟองน้ำหินปูนท่อสีขาว, *Clathrina* sp. "white"

Class Homoscleromorpha

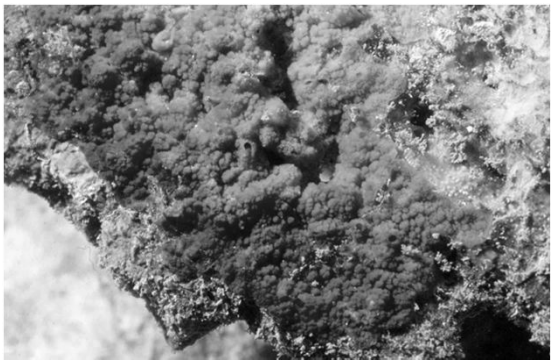
Order Homosclerophorida, Family Plakinidae

ฟองน้ำตับไก่, *Plakortis communis*



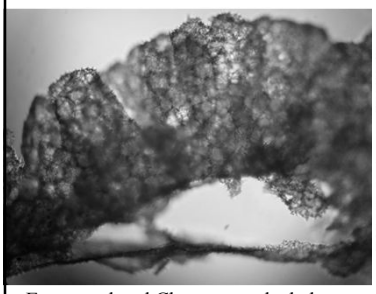
Diods

Order Homosclerophorida, Family Plakinidae

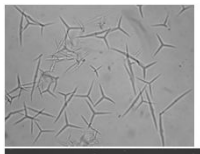


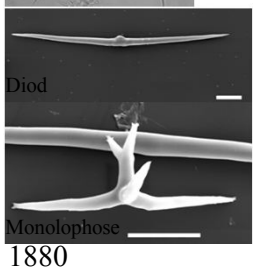
Plakina monolopha Schulze, 1880

Order Homosclerophorida, Family Plakinidae



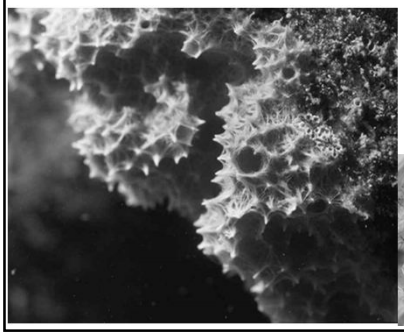
Ectosomal and Choanosomal skeleton

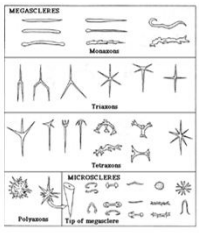


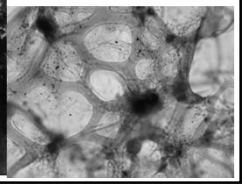


Plakina monolopha Schulze, 1880

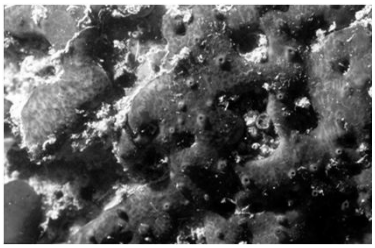
Class Demospongiae: Demosponge



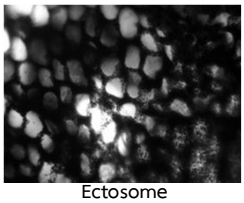




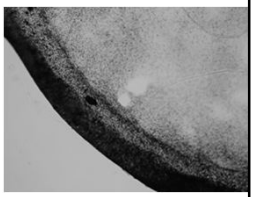
Order Chondrosida,
Family Chondrillidae



Chondrosia reticulata (Sar

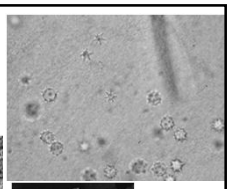


Ectosome

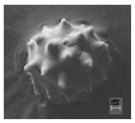


Cross section

Order Chondrosida,
Family Chondrillidae



oxyaster

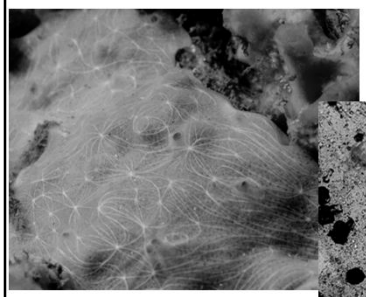


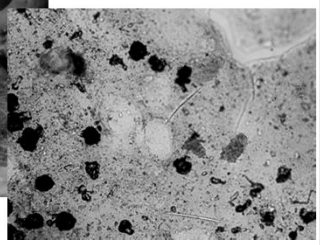
Spheraster

Chondrilla australiensis (Carter, 1873)

Order Chondrosida, Family Halisarcidae

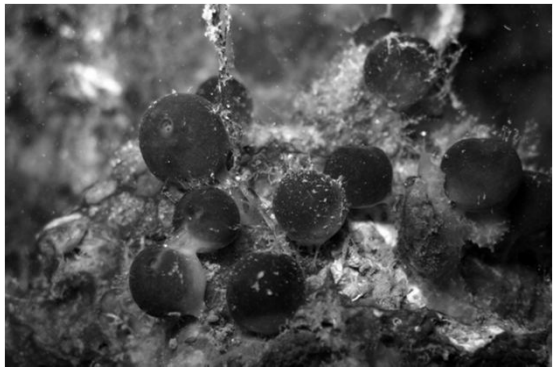
- Choanocyte chambers tubular and branched





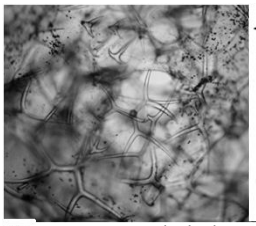
Halisarca ectofibrosa Vancelet et al., 1976

Order Astrophorida, Family Ancorinidae



Stelletta clavosa (Ridley, 1884)

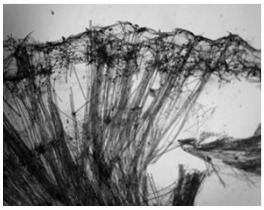
Order Astrophorida, Family Ancorinidae



Dichotriaene

Ectosomal skeleton

Oxea



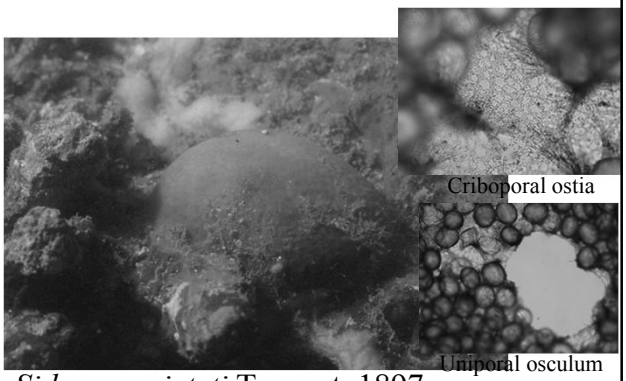
Choanosomal skeleton

Anatriaene

Tylaster

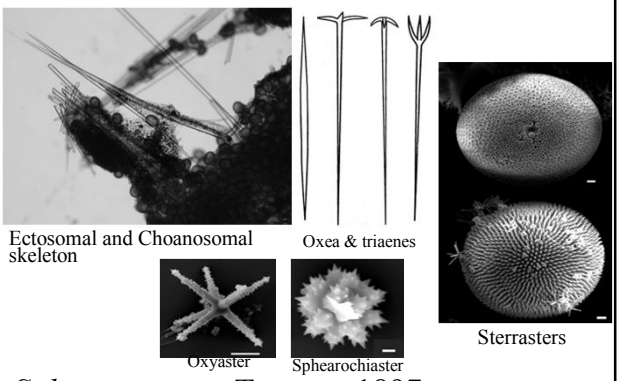
Stelletta clavosa (Ridley, 1884)

Order Astrophorida, Family Geodiidae



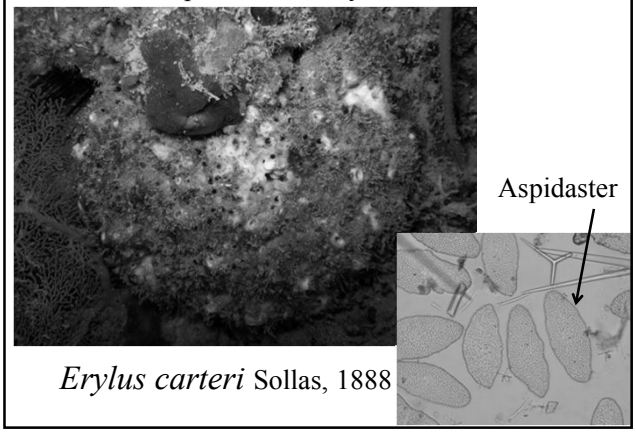
Sidonops picteti Topsent, 1897

Order Astrophorida, Family Geodiidae



Sidonops picteti Topsent, 1897

Order Astrophorida, Family Geodiidae

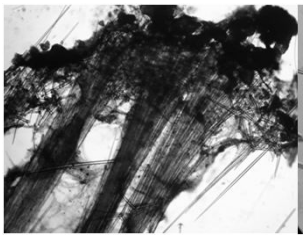


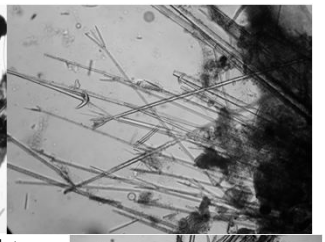
Erylus carteri Sollas, 1888

Order Spirophorida, Family Tetillidae

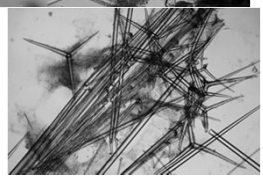
Paratetilla bacca (Selenka, 1867)

Order Spirophorida, Family Tetillidae





Ectosomal and Choanosomal skeleton

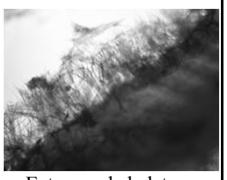


Calthrops-like shorted-sharp triaenes

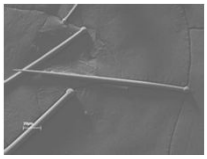
Paratetilla bacca (Selenka, 1867)

Order Hadromerida,
Family Suberitidae

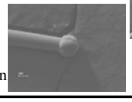
Terpios granulosa Bergquist, 1967



Ectosomal skeleton



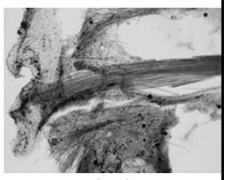
Tylostyles



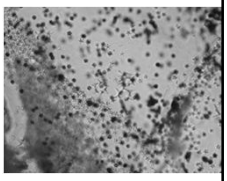
Tylostyle base with quadrilobate condition

Order Hadromerida,
Family Tethyidae

Tethya seychellensis (Wright, 1881)

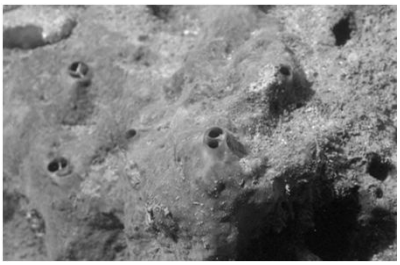


Ectosomal and
Choanosomal skeleton



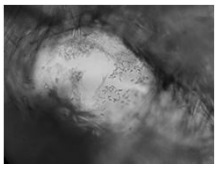
Ectosomal spicules

Order Hadromerida,
Family Clionaidae



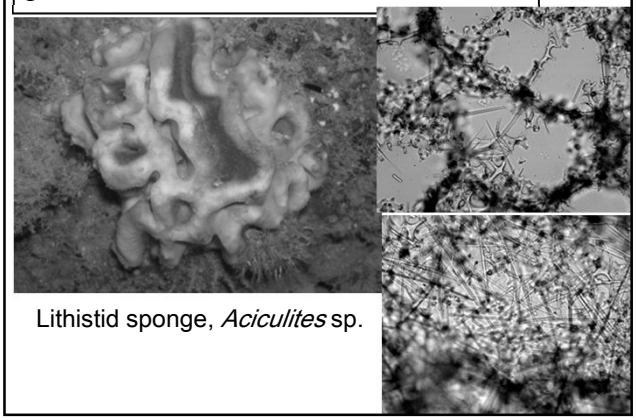
Spheciospongia congenera (Ridley, 1884)

Ectosomal and
Choanosomal skeleton



Ectosomal spicules

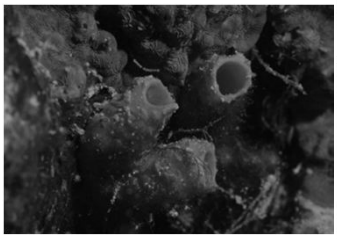
Order Lithistida : ฟองน้ำก้อนหิน

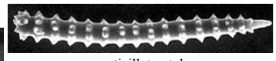


Lithistid sponge, *Aciculites* sp.

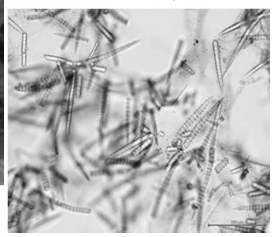
Order Agelasida Hartman, 1980, Family Agelasidae Verrill, 1907

- contains 2 families with 6 valid genera.
- reticulation of spongin fibres cored and echinated by verticillate styles, occasionally including verticillate oxeas.





verticillate style

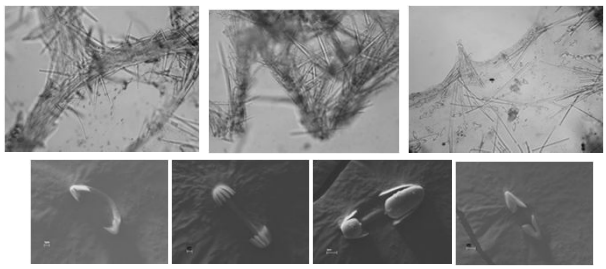


Agelas ceylonica Dendy, 1905

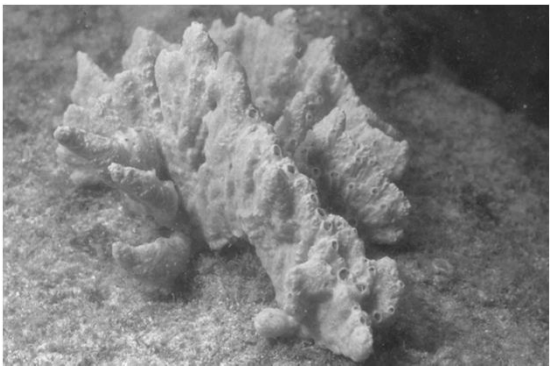
Order Poecilosclerida Topsent, 1928

- main skeleton composed of megascleres and spongin fibers in various stages of development
- microscleres chelae and sigmas and other diverse forms

4 suborders with 20 families, 129 genera and 50 subgenera; highest diversity, more than three thousand species

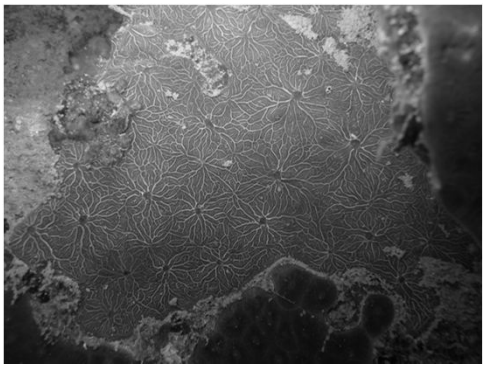


Suborder Microcionina, Family Microcionidae



Clathria (Thalysias) reinwardti Vosmer, 1880

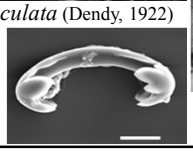
Suborder Microcionina, Family Microcionidae



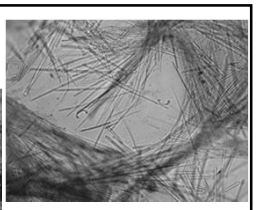
Clathria (Thalysias) toxifera (Hentschel, 1912)

Suborder Myxillina,
Family Crambeidae

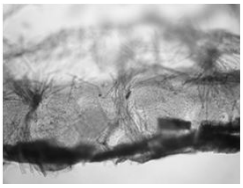
Monanchora unguiculata (Dendy, 1922)



unguiferate anchorate isochelae

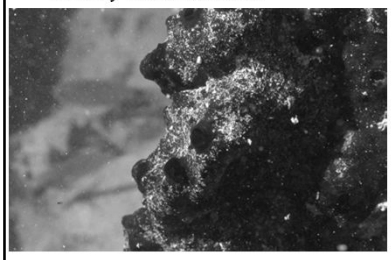


Ectosomal skeleton

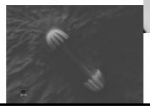


Choanosomal skeleton

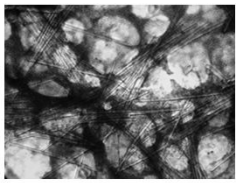
Suborder Myxillina,
Family Iotrochotidae



Iotrochota baculifera Ridley, 1884



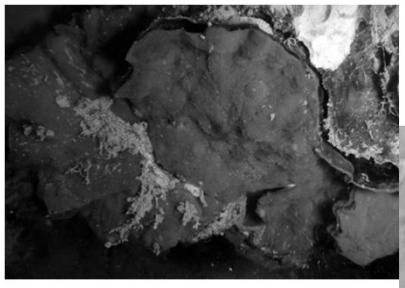
Birotula isochelae



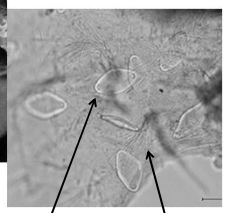
Ectosomal skeleton

Choanosomal skeleton

Suborder Mycalina, Family Merliidae Kirkpatrick, 1908



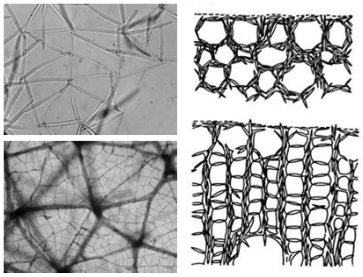
Merlia sp. "orange"



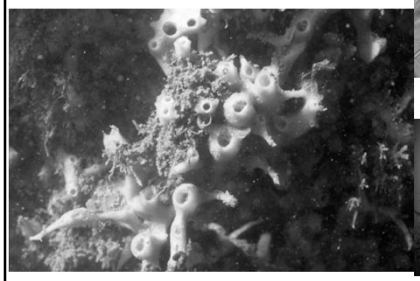
Clavidisc and subtylostyle

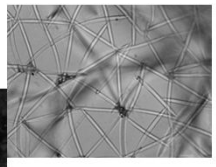
Order Haplosclerida Topsent, 1928

- Aniso-or isotropic reticulation
- Megascleres: shorted fusiform oxeas
- Microsclere: sigmas, toxas or trichodragmata

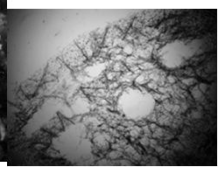


Suborder Haplosclerina, Family Chalinidae





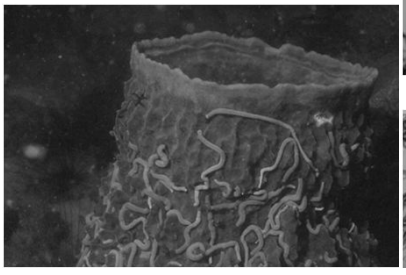
Ectosomal skeleton



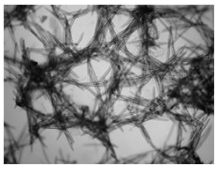
Choanosomal skeleton

Cladocroce burapha Putchakarn, *et al*., 2004

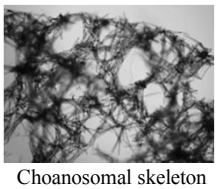
Suborder Petrosina, Family Petrosiidae



Xestospongia testudinaria (Lamarck, 1815)

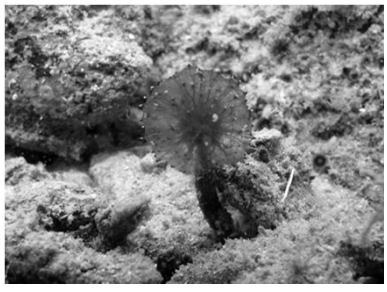


Ectosomal skeleton



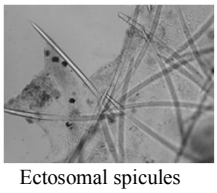
Choanosomal skeleton

Suborder Petrosina, Family Phloeodictyidae



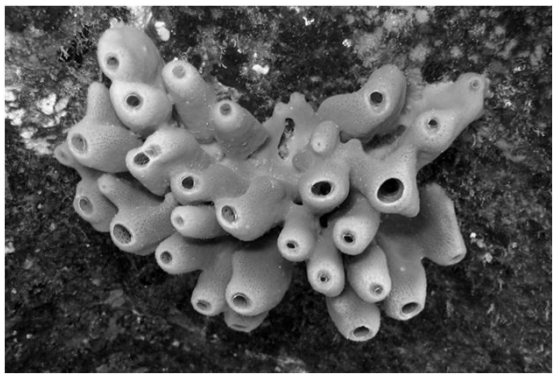
Oceanapia sagittaria (Sollas, 1902)

Ectosomal skeleton



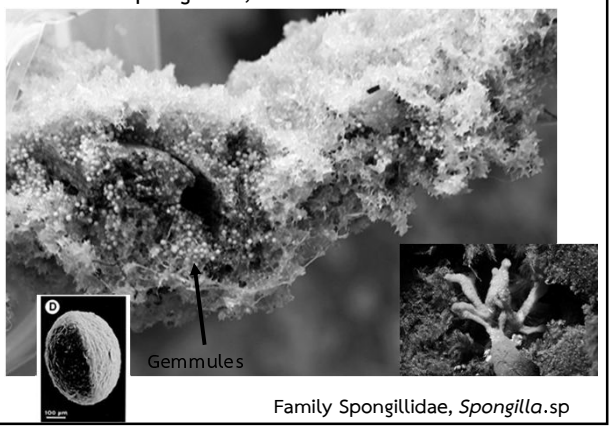
Ectosomal spicules

Suborder Petrosina, Family Petrosiidae



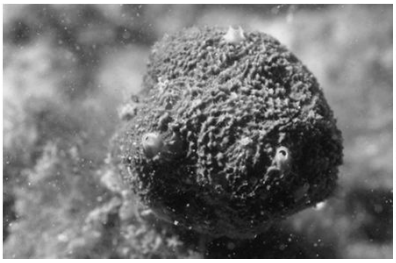
Neopetrosia sp. "blue"

Suborder Spongillina, ฟองน้ำน้ำจืด

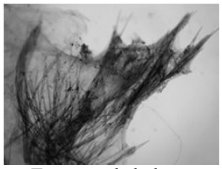


Family Spongillidae, *Spongilla*.sp

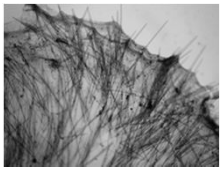
Order Halichondrida,
Family Halichodriidae



Axinyssa aplysinoides (Dendy, 1922)

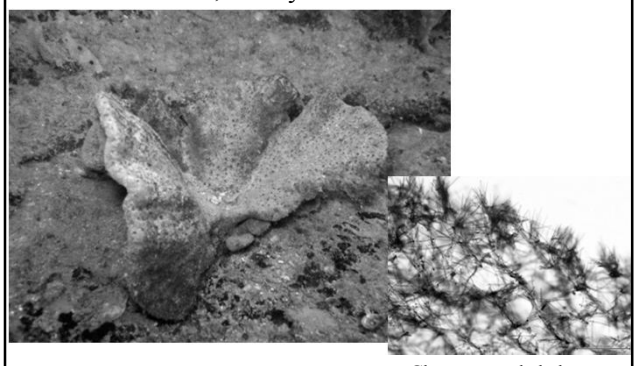


Ectosomal skeleton



Choanosomal skeleton

Order Halichondrida, Family Axinellidae

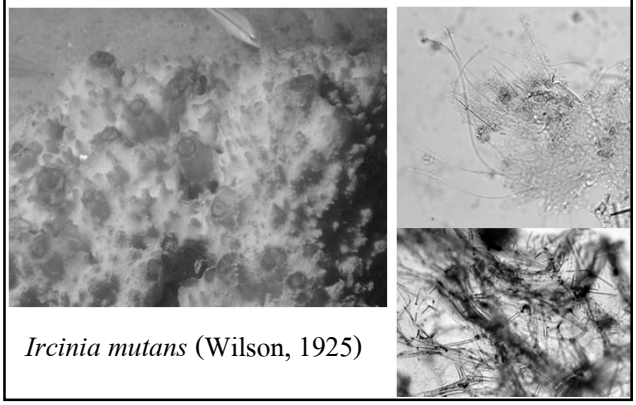


Choanosomal skeleton

Phakellia ceylonensis Dendy, 1905

Order Dictyoceratida, Family Irciniidae

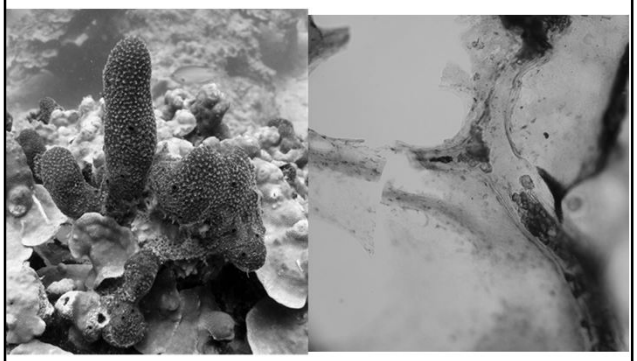
- Fine collagenous filaments present in addition to the fibre skeleton



Ircinia mutans (Wilson, 1925)

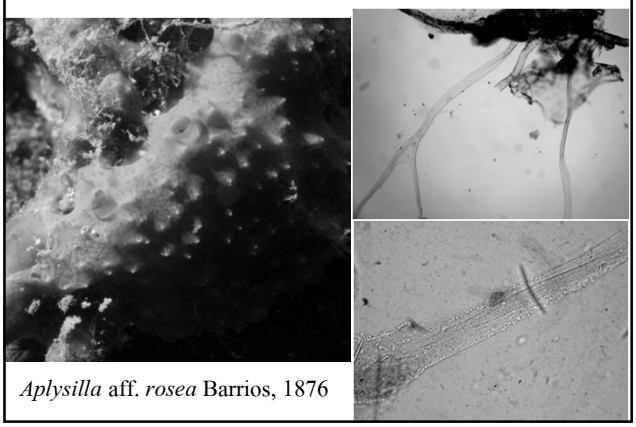
Order Dictyoceratida, Family Thorectidae

- Fibres marked laminations, Choanocyte chambers small, spherical



Hyrtios erectus Keller, 1889)

Order Dendroceratida, Family Darwinellidae



Aplysilla aff. *rosea* Barrios, 1876

Thank you very much for your attention

Sponge love you!!!

บทปฏิบัติการ
การสกัดหนามฟองน้ำ (Spicules) และจำแนกชนิดฟองน้ำอย่างง่าย

โดย ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ

งานวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

1. ขั้นตอนการปฏิบัติการสกัดหนามฟองน้ำและจำแนกชนิดฟองน้ำในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย

1. นำชิ้นตัวอย่างฟองน้ำออกจากขวดดอง วางลงบนถาดตัวอย่าง ตรวจรูปทรงการเจริญเติบโตของฟองน้ำว่ามีลักษณะเป็นรูปทรงแบบใด **ตามแผ่นภาพที่ 1**

2. ใช้กรรไกรผ่าตัดหรือมีดผ่าตัด ตัดชิ้นฟองน้ำให้มีขนาดประมาณ 3X3X3 มิลลิเมตร นำมาวางลงบนสไลด์

3. ใช้หลอดดูดดูดสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) หรือคลอร๊อก (Clorox) หรือสารฟอกขาว (Bleaching) เข้มข้น 5-10 % มาหยดลงบนชิ้นฟองน้ำพอให้ท่วมตัวอย่าง

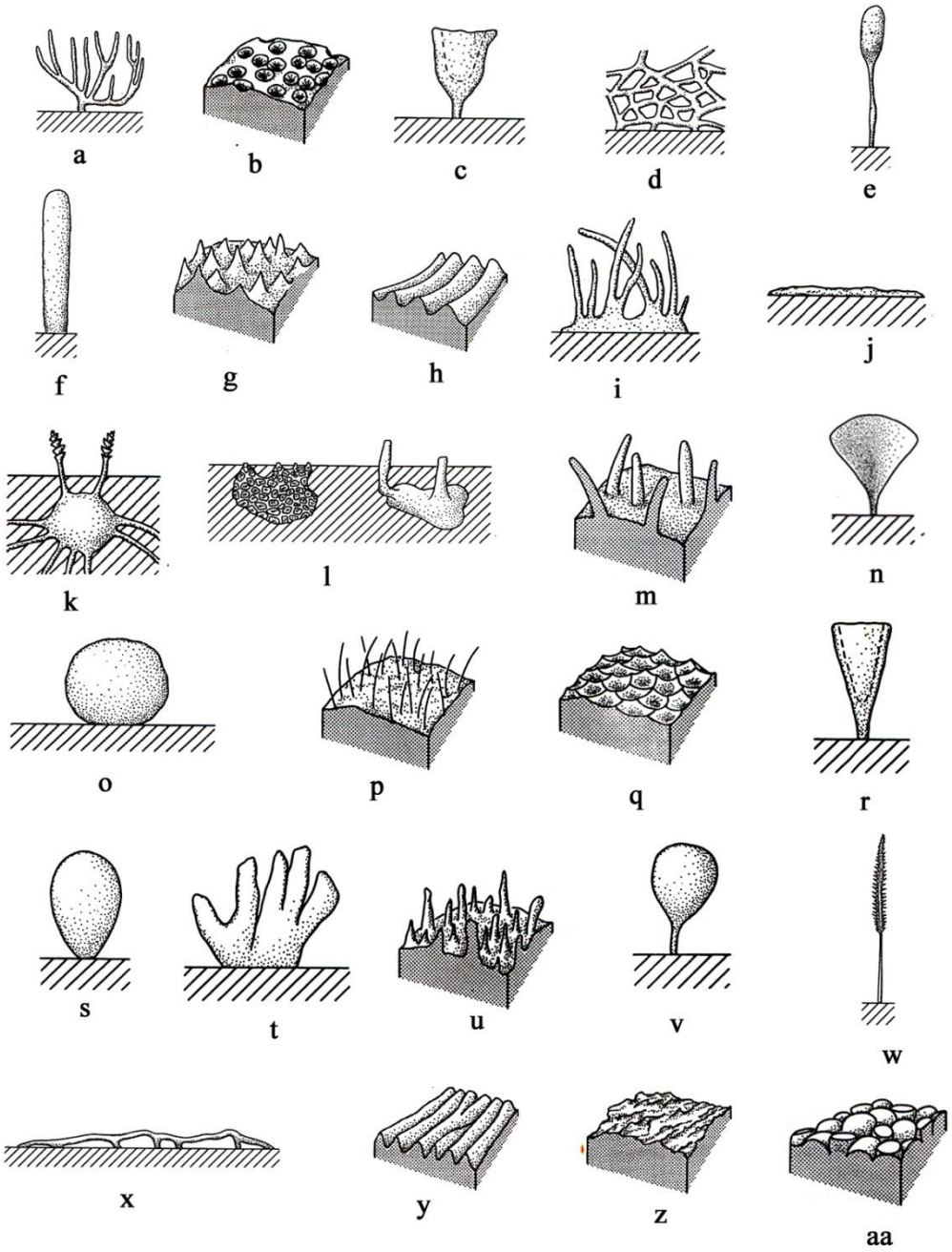
4. วางทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาประมาณ 5 นาที ในบริเวณอากาศถ่ายเทสะดวก ไม่ควรสูดดมสารละลายเนื่องจากมีฤทธิ์กัดกร่อนเนื้อเยื่อ สารละลายจะย่อยสลายเนื้อเยื่อออกไปเหลือแต่เพียงหนามฟองน้ำ สังเกตจากฟองอากาศเริ่มลดจำนวนลง

5. หยดน้ำกลั่นลงบนตัวอย่างฟองน้ำเบาๆและพอประมาณให้ท่วมตัว ค่อยๆใช้หลอดดูดดูดน้ำและสารละลายออก และล้างน้ำซ้ำอีก 1-2 ครั้ง ใช้เข็มเขี่ยขยี้ตัวอย่างเบาๆและเกลี่ยให้ตะกอนที่เหลืออยู่กระจายตัวออก

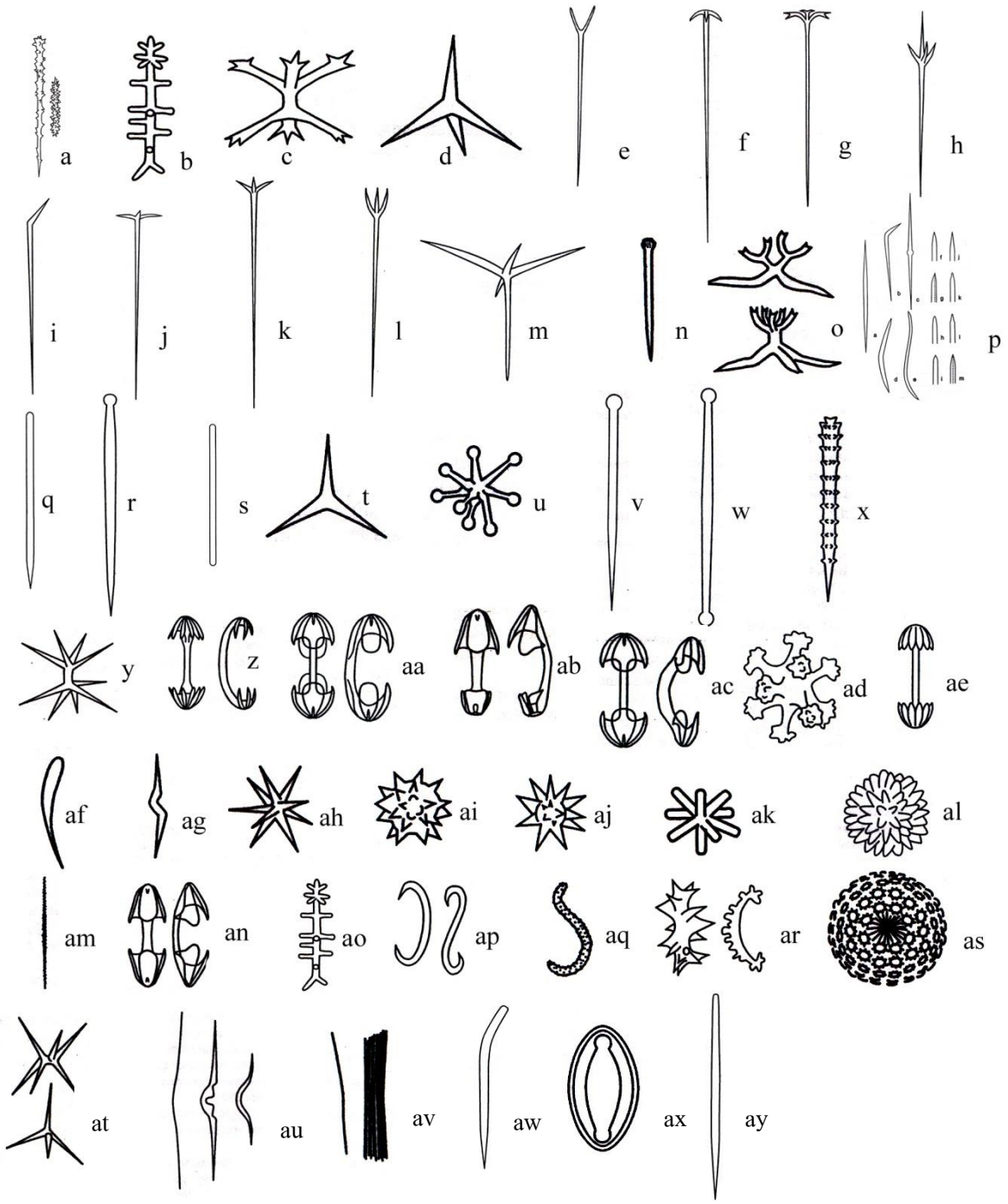
6. หยดน้ำกลั่นลงบนตัวอย่าง 1-2 หยด วางแผ่นปิดสไลด์ นำสไลด์มาส่องตรวจหนามหนามฟองน้ำ ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายขนาดต่างๆ

7. บันทึกลักษณะของหนามฟองน้ำที่พบในสไลด์ **ตามแผ่นภาพที่ 2**

ตารางบันทึกผลการทดลองหนามฟองน้ำที่พบ



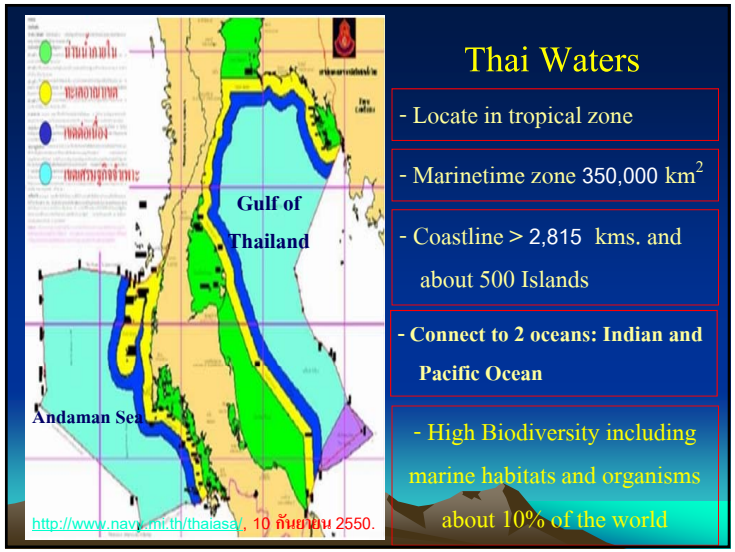
แผ่นภาพที่ 1 ลักษณะรูปทรงการเจริญและผนังลำตัวของฟองน้ำใน Class Demospongiae: a) Arborescent; b) Areolated; c) Caliculate; d) Clathrate; e) Clavate; f) Columnar; g) Conulose; h) Corrugated; i) Digitate; j) Encrusting; k) Endopsammic; l) Excavating; m) Fistule; n) Flabellate; o) Flagelliform; p) Hispid; q) Honeycombed; r) Infundibuliform; s) Ovate; t) Palmate; u) Papilla; v) Pedunculate; w) Pinnate; x) Repent; y) Ribbed; z) Rugose; aa) Verrucose. (ดัดแปลงจาก Boury-Esnault & Rützler, 1997)

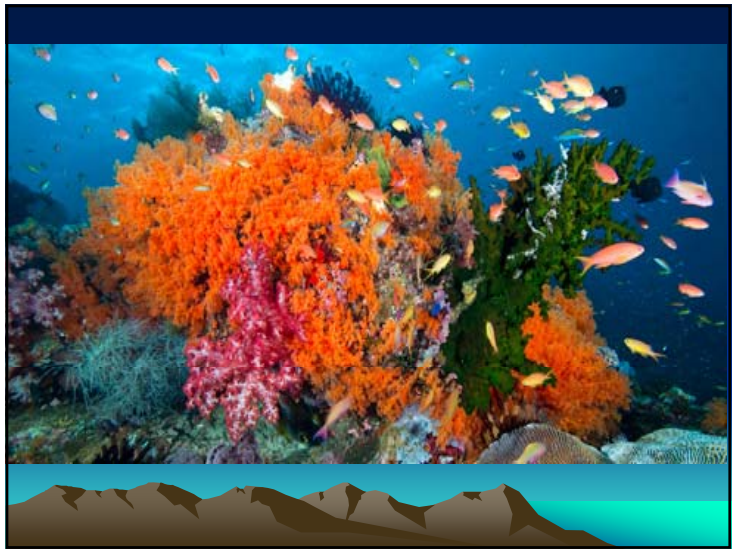


แผ่นภาพที่ 2 หนามฟองน้ำ (Spicules) ของฟองน้ำ Class Demospongiae: a) Acantho; b) Sanidaster; c) Amphitriaene; d) Calthrop; e) Diaene; f) Anatriaene; g) Dichotriaene; h) Mesotriaene; i) Monaene; j) Orthotriaene; k) Plagiotriaene; l) Protriaene; m) Centrotriaene; n) Exotyl; o) Lophocalthrop; p) Oxea; q) Style; r) Subtylostyle; s) Strongyle; t) Triod; u) Tylaster; v) Tylostyle; w) Tylote; x) Verticillate; y) Amphiaster; z) Anchorate chela; aa) Anchorate chela; ab) Anisochela; ac) Arcuate chela; ad) Anthaster; ae) Birotula; af) Commata; ag) Diod; ah) Oxyaster; ai) Spheraster; aj) Spheroxyaster; ak) Strongylaster; al) Truncaster; am) Onychaete; an) Palmate chela; ao) Sanidaster; ap) Sigma; aq) Sigmaspire; ar) Spiraster; as) Sterraster; at) Plesiaster; au) Toxa; av) Raphide, Trichodragmata; aw) Rhabdostyle**;** ax) Clavidisc **;** ay) Strongyloxea (ดัดแปลงจาก Boury-Esnault & Rützler, 1997)

ทะเล..นานาพันธุ์ สู่ผลิตภัณฑ์มีประโยชน์

ดร. ชุติวรรณ เตชสกุลวัฒนา
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
รร. สิงห์สมุทร ๒๐ สิงหาคม ๒๕๕๗





การใช้ประโยชน์ลักษณะทางกายภาพ

- แหล่งอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ
- แหล่งอุตสาหกรรม และแหล่งที่อยู่อาศัย
- แหล่งท่องเที่ยว
- การทำนาเกลือ
- การคมนาคม
- การทำเหมืองแร่ทะเล
- การทำนาเกลือ
- แหล่งเพาะเลี้ยงชายฝั่งทะเล

Drugs & Cosmetics from the Seas

การใช้ประโยชน์ลักษณะทางชีวภาพ

- แหล่งอาหาร ทรัพยากรประมง
- แหล่งอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ
- แหล่งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

Phylum	World record species	Estimated species in Thailand	Known species in Thailan
Porifera	7,000	700	100
Cnidaria	9,000	1,000	401
Platyhelminthes	15,000	1,500	66
Nemertea	750	75	ND
Aschelminthes	12,000	1,200	157
Entoprocta	60	10	ND
Ectoprocta	3,300	330	ND
Brachiopoda	250	25	1
Echiurida	60	6	1
Mollusca	100,000	10,000	1,618
Annelida	12,000	1,200	84
Arthropoda	75,000	7,500	1,098
Echinodermata	7,000	700	370
Chaetognatha	50	5	ND
Urochordata	1,600	160	6

มูลค่าผลประโยชน์แห่งชาติทางทะเล	หน่วย: ล้านบาท	%
1.มูลค่าจากทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง		
1.1 ทรัพยากรมีชีวิต	234,608.85	3.15
1.2 ทรัพยากรไม่มีชีวิต	499,069.12	6.71
2.มูลค่าจากกิจกรรมการใช้ทะเล		
2.1 พาณิชยนาวี	6,120,901.00	82.24
2.2 อุตสาหกรรมต่อเนื่องต่าง ๆ	341,061.30	4.58
2.3 การท่องเที่ยว	197,390.30	2.65
2.4 อื่น ๆ	49,786.60	0.67
รวมมูลค่าผลประโยชน์แห่งชาติทางทะเล	7,442,817.17	100
3.มูลค่าผลกระทบจากกิจกรรมการใช้ทะเล		
3.1 การกัดเซาะ	4,657.00	
3.2 น้ำมันรั่ว ไหล	1,919.11	
3.3 สีนามิ	85,084.17	
รวม	91,660.28	

หมายเหตุ เป็นมูลค่าที่รวบรวมได้เท่าที่มีการประเมินโดยการศึกษาวิจัยยังไม่ใช่มูลค่าที่แท้จริงทั้ง หมด

เผดิมศักดิ์ จารยะพันธ์ และคณะ 2550. "ผลประโยชน์แห่งชาติทางทะเลสถานการณ์ และ ข้อเสนอ"

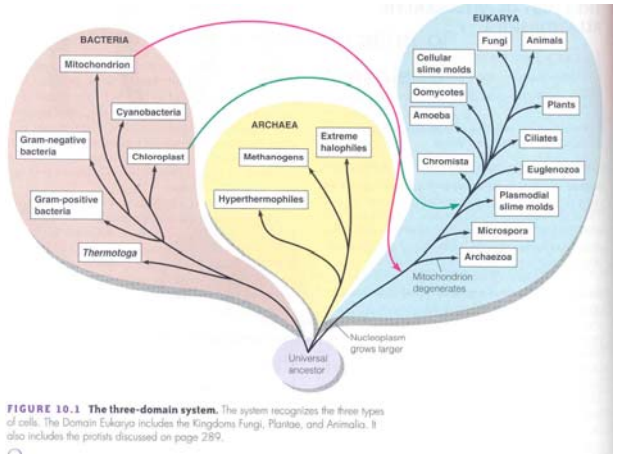


FIGURE 10.1 **The three-domain system.** The system recognizes the three types of cells. The Domain Eukarya includes the Kingdoms Fungi, Plantae, and Animalia. It also includes the protists discussed on page 289.

From: Tortora, Funke. Case, 2007

จุลินทรีย์คืออะไร ?

- จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ประกอบด้วยเซลล์เดียว (Unicellular) หรือหลายเซลล์ (Multicellular) แต่เซลล์เหล่านั้นเป็นเซลล์ชนิดเดียวกันและมีรูปร่างเหมือนกัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อทำหน้าที่เฉพาะเหมือนในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง

ประเภทของจุลินทรีย์ (ตามประเภทของเซลล์)

1) พวกโปรคารีโอต ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ลักษณะเฉพาะของกลุ่ม คือ นิวเคลียสไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ (Nuclear membrane)
2) พวกยูคารีโอต ได้แก่ เชื้อรา โปรโตซัว และสาหร่ายต่างๆ ยกเว้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ลักษณะเฉพาะของกลุ่มนี้ คือ นิวเคลียสมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส

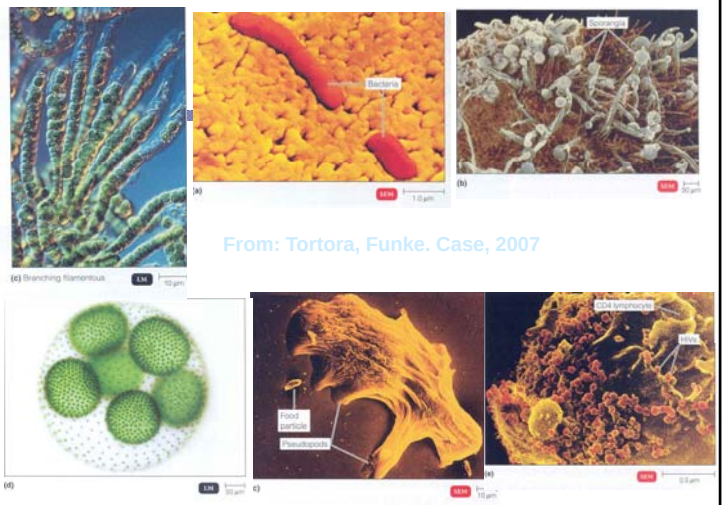
การจัดหมวดหมู่ของจุลินทรีย์

ในปี ค.ศ. 1866 Haeckel นักสัตววิทยาชาวเยอรมันได้เสนอแนะให้จัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตใหม่ โดยแยกสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ (lower organisms) ออกมาตั้งอาณาจักรใหม่ เรียกว่า Protistaโดยอาศัยลักษณะร่างกายที่ประกอบด้วยเซลเดียว (unicellular) หรือหลายเซล (multicellular)

Procaryotic cell เป็นกลุ่มที่เซลมีความแตกต่างน้อยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ นิวเคลียส์ไม่มีเยื่อห่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) ทำให้สารพันธุกรรม (genetic material) อยู่อย่างกระจัดกระจายในไซโตปลาสซึม จุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ แบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

Eucaryotic cell เป็นกลุ่มที่เซลมีความแตกต่างมากกว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มนิวเคลียสมีเยื่อห่อหุ้ม ทำให้สารพันธุกรรมอยู่รวมกลุ่มกันในไซโตปลาสซึม จุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้แก่ ฟังใจ โปรโตซัว และสาหร่ายอื่นๆ

Chutiwan Dechsakulwatana, Institute of Marine Science



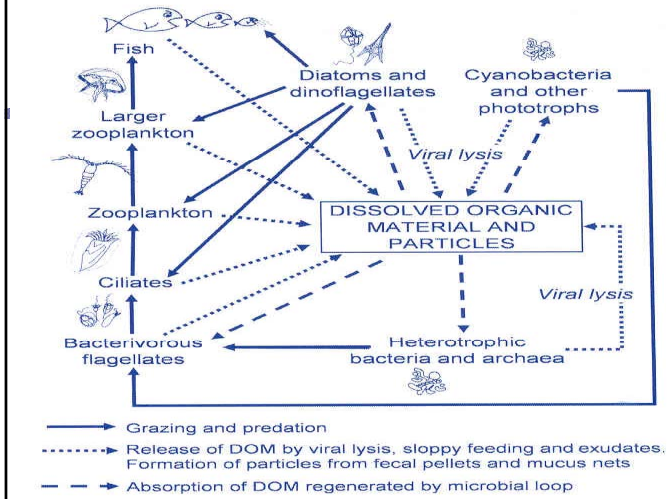
From: Tortora, Funke. Case, 2007

การดำเนินชีวิตของจุลินทรีย์

- อุณหภูมิ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (20^{o}-45^{o}C) แต่บางชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (ต่ำกว่า 0^{o}-15^{o}C) บางชนิดเจริญที่อุณหภูมิสูง (มากกว่า45^{o}C)
- แก๊สออกซิเจน จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาพที่มีแก๊สออกซิเจน บางชนิดเจริญได้ในที่มีแก๊สออกซิเจนน้อย บางชนิดเจริญได้ใน ที่ที่ไม่มีออกซิเจน
- ปริมาณเกลือแกง ความเป็นกรดเบส และความดัน จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดี เมื่อมีปริมาณเกลือมากกว่า 13 %
- ความเป็นกรดเบสค่อนข้างเป็นกลาง (pH 6-7)
- และจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ที่ความดันมากกว่า 9,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

บทบาทและหน้าที่ของจุลินทรีย์

1. ทำให้เปลี่ยนแปลงของวัฏจักรสารต่างๆในดิน เพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน
2. ช่วยย่อยสลายสารอินทรียวัตถุในดินที่มีโมเลกุลซับซ้อน เช่น เซลลูโลส (เพิ่มสารประกอบคาร์บอนแล ไนโตรเจนในดิน และช่วยให้ดินมีคุณสมบัติอุ้มน้ำได้ดีขึ้น)
3. เกิดกิจกรรมการย่อยสลายอินทรียวัตถุในดินที่เป็นกรด (ฟังไจเจริญได้ดี)
4. ทำให้เกิดกระบวนการหมัก
5. ผลิตยาปฏิชีวนะต่างๆ
6. ทำให้เกิดโรคกับมนุษย์ สัตว์และพืช



แบคทีเรีย

- แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดในดินทั้งชนิดและจำนวน
- มีทั้งพวกที่เป็น autotroph และ Heterotroph
- แบคทีเรียเหล่านี้เจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย
- แบคทีเรียที่พบในดินจะมีชนิดและปริมาณแตกต่างกันไปตามอินทรียสารในดิน
  - ในดินที่มีการเพาะปลูกพืชจะมีแบคทีเรียมากกว่าในดินที่ไม่มีการเพาะปลูก
  - แบคทีเรียที่พบในดินส่วนมากได้แก่ สกุล *Agrobacterium, Bacillus, Clostridium, Flavobacterium, Pseudomonas, Sarcina* และ *Xanthomonas*

Figure 3.4 Staining cells for microscopic observation.

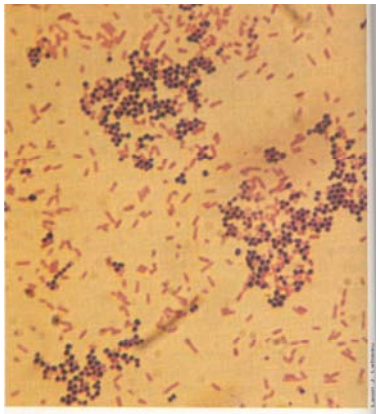


Figure 3.5 The Gram stain. (a) Steps in the Gram stain procedure. (b) Photomicrographs of bacteria which are Gram-positive (blue) and Gram-negative (red). The species are *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, respectively.

Brock and Madigan, 1991

Community Ecology & Benefits

ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ

1. neutralism : (0, 0) แบบเป็นกลาง เป็นการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด ที่ทั้งสองฝ่ายไม่ได้ประโยชน์หรือเสียประโยชน์
2. competitin : (-, -) แบบแก่งแย่งกัน แบบนี้ทั้งสองฝ่ายต่างแก่งแย่งแข่งขันกันโดยตรง เช่น แก่งแย่งกันในเรื่องของอาหาร และที่อยู่อาศัย
3. anensalism : (0/+, -) แบบนี้ฝ่ายหนึ่งไม่ได้รับ หรือเสียผลประโยชน์ แต่อีกฝ่ายเสียผลประโยชน์
4. predation : (+, -) แบบนี้ฝ่ายหนึ่งจะเป็นผู้ล่า (*predater*) ส่วนอีกฝ่ายหนึ่งจะเป็นอาหารหรือเหยื่อ (*prey*)
5. symbiosis : แบบพึ่งพาอาศัยกัน เป็นการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด โดยฝ่ายหนึ่งเป็นผู้อาศัย (*symbiont*) และอีกฝ่ายหนึ่งเป็นผู้ถูกอาศัย หรือจำเป็น (host) ซึ่งยังสามารถแบ่งความสัมพันธ์แบบนี้ออกตามการได้รับหรือเสียผลประโยชน์ดังนี้

เทคโนโลยีชีวภาพ

การนำความรู้วิทยาศาสตร์ และวิศวกรรม หรือเทคนิคใด ๆ ที่ใช้ทรัพยากรมีชีวิต หรือบางส่วน เพื่อที่จะทำ หรือปรับปรุงผลผลิต ทำให้พืช หรือสัตว์ดีขึ้น หรือพัฒนาจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ที่ต้องการ

Research, Development และ Engineering (R & D and E)

วิจัย, พัฒนา และวิศวกรรม

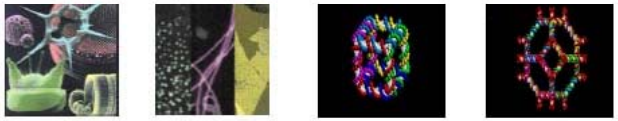
เทคโนโลยีชีวภาพคลาสสิค (Classic or Intermediate biotechnology)

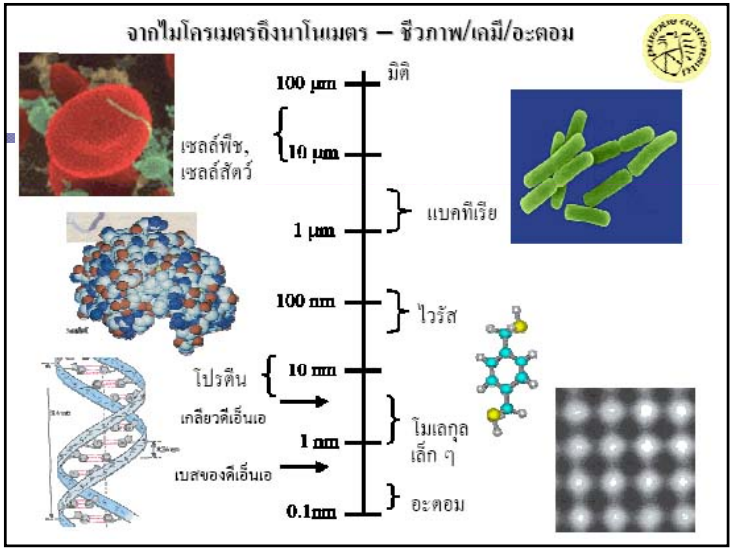
เป็นเทคโนโลยีพื้นฐาน การจัดการทรัพยากรที่มีชีวิตรวมทั้งเทคโนโลยีการหมัก

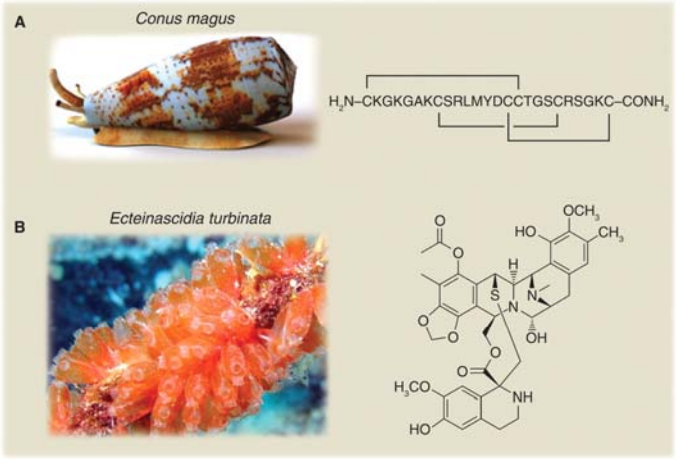
เทคโนโลยีชีวภาพก้าวหน้า (Modern or Advanced biotechnology)

นาโนไบโอเทคโนโลยีคืออะไร?

เป็นนาโนเทคโนโลยีแขนงหนึ่ง
ซึ่งรวมสหวิทยาการทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เคมี
และวิศวกรรมศาสตร์ เข้าด้วยกัน เพื่อใช้ในการตรวจสอบ ควบคุม
ดัดแปลง หรือสังเคราะห์
ชีวโมเลกุลขึ้นใหม่เพื่อให้มีคุณสมบัติตามต้องการ







ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล

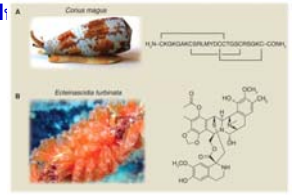
การวิจัยผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิตในทะเล เรื่องอาหาร ยา สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ วัสดุทางการแพทย์ และวัตถุดิบที่ใช้ประโยชน์ด้านอื่นนั้นมีการศึกษา และพัฒนาเป็นลำดับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2512 (ค.ศ. 1969)

- ***พ.ศ. 2520 - 2528 มีรายงานผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกว่า 1,700 ชนิด ได้มาจากทะเล**
- ***พ.ศ. 2528 - 2536 มีรายงานผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกว่า 5,000 ชนิด ได้มาจากทะเล**
- ***พ.ศ. 2536 สามารถแยกสารประกอบทางทะเลที่แตกต่างจากทะเลเกือบ 7,000 ชนิด**

พ.ศ. 2512 - 2538 สารประกอบจากทะเลได้จดสิทธิบัตรกว่า 200 ชนิด

อาหาร ยา สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ วัสดุทางการแพทย์ และเครื่องสำอาง

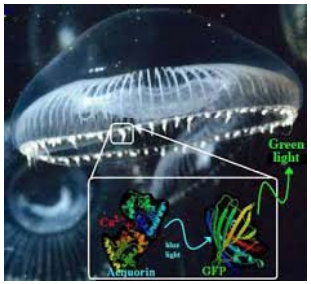
* ยาปฏิชีวนะ จากจุลินทรีย์ สาหร่าย ฟองน้ำ เพรียงหัวหอม
* ยารักษามะเร็ง และโรคติดเชื้อไวรัส(HIV) จากฟองน้ำเพรียงหัวหอม ไบรโอซัว
* สารชีวพิษ ได้แก่ พิษจากปลาปักเป้า หอยเต้าปูน ให้พิษ **tetrodotoxin** และ **saxitoxin** สำหรับการศึกษาเซลล์ประสาท
* โครงสร้างเทียมที่เป็นสารประกอบแคล เซี่ยมคาร์บอเนตจากปะการังและหอยมุก
* สารต้านการอักเสบ
*สารเลคติน(สาร**shemaagglutinins**)
*อาหารเสริมเช่น **-lenoleic acid** จากสาหร่ายสไปรูไลนา
*สารต่อต้านอนุมูลอิสระ(**antioxidants**) จากสาหร่าย ฟองน้ำ จุลินทรีย์*
*วุ้น(**agar**) คุณภาพสูงจากสาหร่ายใช้เป็
*Alginate fiber ใช้ทำผ้าพันแผล
* รงควัตถุชีวภาพ หรือสารสี



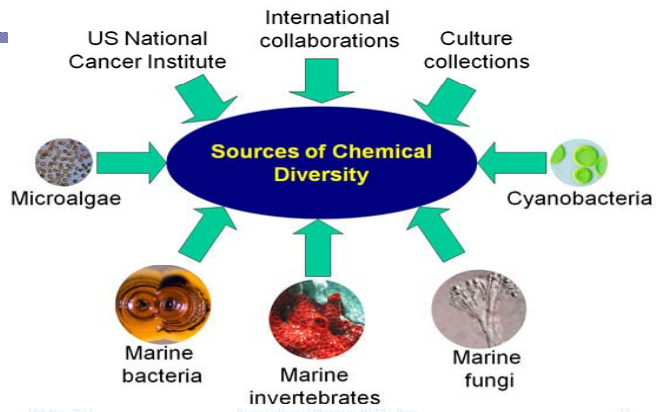
ฤทธิ์ทางชีวภาพ

- ต่อต้านแบคทีเรีย รา ไวรัสHIV
- ต่อต้านปาราสิต
- ต่อต้านเนื้องอก และมะเร็ง
- สารปรับภูมิคุ้มกัน
- ต่อต้านมาเลเรีย
- ต่อต้านวัณโรค
- ต้านการอักเสบ
- ต่อต้านสาหร่าย
- ความเป็นพิษต่อเซลล์
- ต้านอนุมูลอิสระ
- ต้านการลงเกาะของสิ่งมีชีวิต

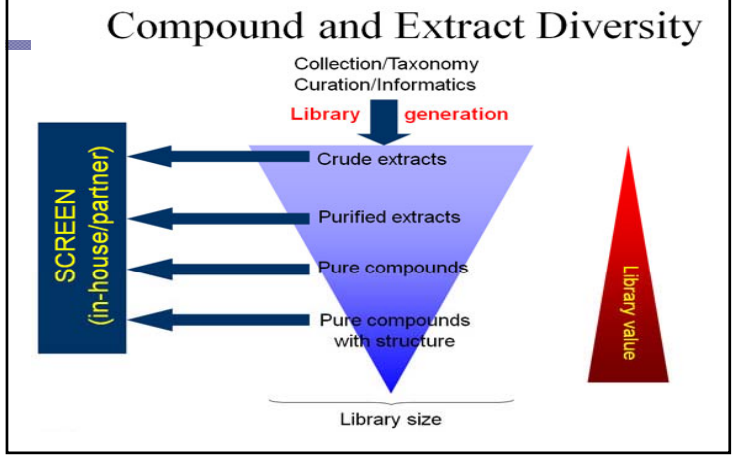
Cryptotethya crypta ***Aequora victoria***



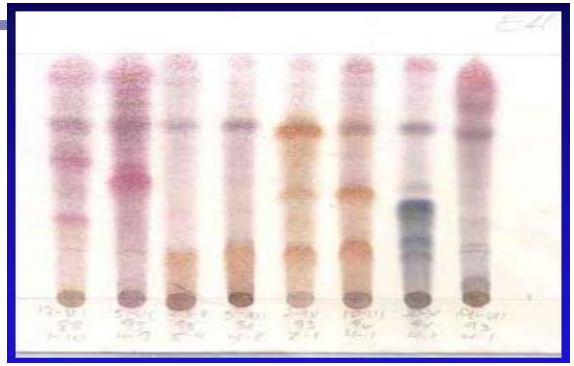
Sources of Chemical Diversity



Generating Chemical Diversity



Extracts are Complex Mixtures of Marine Products



Marine Natural Products on the market (January, 2004, http\:www. เข้าถึงเมื่อ)

Product	Chemical Class	Application	Original Source	Method of Production	References
Aequorin		Bioluminescent calcium indicator	**Bioluminescent jellyfish** *Aequora victoria*	Recombinant protein	Shimomura et al., 1962; Chiesa et al, 2001
Ara-A, (Vidarabine)	**Nucleoside** (Amino-6 Beta-D-Arabinofuranosyl-9 9h-Purine)	Antiviral drug (herpes infections)	**Marine sponge** *Cryptotethya crypta*	Microbial fermentation of analog	Bergmann & Feeney, 1951; McConnell et al., 1994
Ara-C, (Cytosar-U, Cytarabine) Is cell-phase specific, acting in the S phase to kill cells undergoing DNA synthesis(commerc:1972)	**Nucleoside** (4-amino-1-bêta-D-arabinofuranosyl-2(1H)-pyrimidinone)	Anticancer drug (leukemia and non-Hodking's lymphoma)	**Marine sponge** *Cryptotethya crypta*	Chemical synthesis of analogue	Bergmann & Feeney, 1951; McConnell et al., 1994
Calyculin A (AG Scientific)	**Polyketide**	Molecular probe: selective inhibitor of protein phosphatase 1	**Sponge** *Discodermia calyx*	Extracted fron the sponge	Kobayashi M., 2000
Cephalosporins (commercialisation: 1965)	**ß -lactam**	Antibiotic (antibacterial by inhibition of mucopeptide synthesis)	**Marie fungus** *Cephalosporium acremonium*	Semisynthetic antibiotic derivatives of cephalosporin C	Newton & Abraham 1955.
Formulaid® (Martek Biosciences)	**Fatty acids**	Fatty acids (additive in nutritional supplement)	**Marine microalgae**	Cell culture	ESPGAN, 1991
Green Fluorescent Protein (GFP)	**Protein**	Reporter gene	**Bioluminescent jellyfish** *Aequora victoria*	Recombinant protein	Chalfie et al.,1994
Kainic acid (commercialisation: Early 1900s)	**Amino acid**	Anthelmintic, Insecticide, neuroexcitatory and neurotoxic activity	**Red alga** *Digenea simplex*	Extracted from Digenea simplex, found mainly near Japan and Taiwan. (2) Chemical synthesis	Baslow, M. H. 1969
Limulus Amebocyte Lysate (BioWhittaker , EndoAlert)		Detection of endotoxins associated with Gram-negative bacteria	**Horseshoe crab** *Limulus polyphemus*	Amebocytes of the horseshoe crab	Levin, J. and F.B. Bang, 1968

ความหลากหลายจุลินทรีย์จากทะเล : แหล่งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ชุติวรรณ เตชสกุลวัฒนา, ปรีชา ภูวไพรศิริศาล, รวิวรรณ วัฒนดิลก และ วิชัย ริ้วตระกูล
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา,
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยมหิดล

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารต่อต้านจุลินทรีย์, สารต่อต้านการแบ่งเซลล์ สารที่มีพิษต่อเซลล์จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียทะเล
3. เพื่อศึกษาโครงสร้างของสารประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

Sponge

- High Biodiversity, Bioactive compounds were isolated 10,000 species of sponges
- Sponges are filter feeder organisms, their feature are secure habitat for other symbionts
- The related compounds from sponge revealed the relationship between sponges and their symbionts

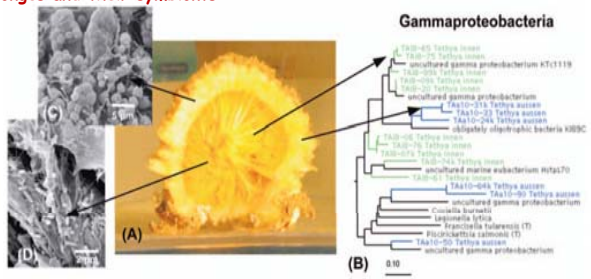
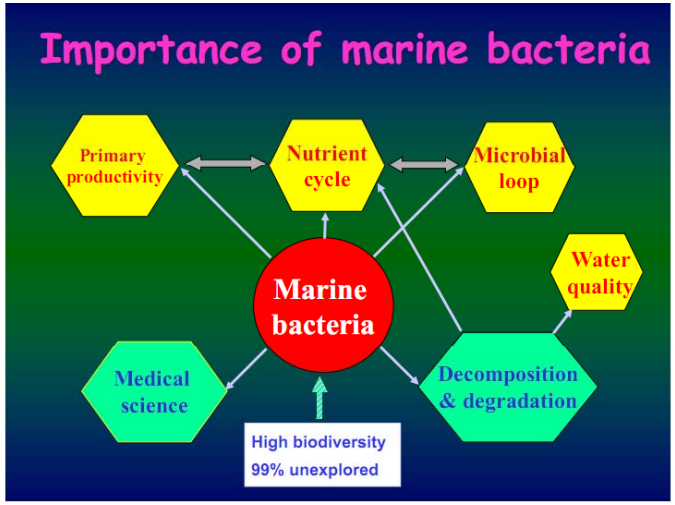


Figure 3: (A) Cross section of the marine sponge Tethya aurantium (Sea-orange), (B) The phylogenetic tree of gammaproteobacteria demonstrates specific association of different bacteria with the interior (shown in green) and the exterior (shown in blue) cell tissue of the sponge, (C) + (D) electron microscopic exposures (REM) of interior (D) and exterior (C) parts of the sponge.

Electron Microscope: Symbiotic bacteria-sponge

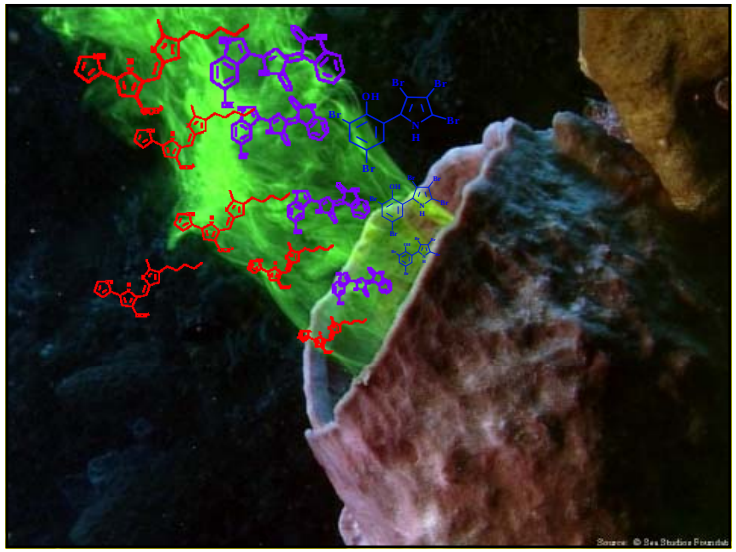
4

Importance of marine bacteria

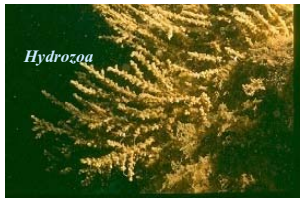


Existing strength: largest collection in great China

- Center for Marine Bioactive Substances
- > 6000 bacterial isolates
- Purified and partially characterized >2600 strains
- Input information of >1500 strains' into database
- A password protected database
- Transferred > 1600 "species" into liquid nitrogen



การเก็บตัวอย่างโดย Scuba Diving



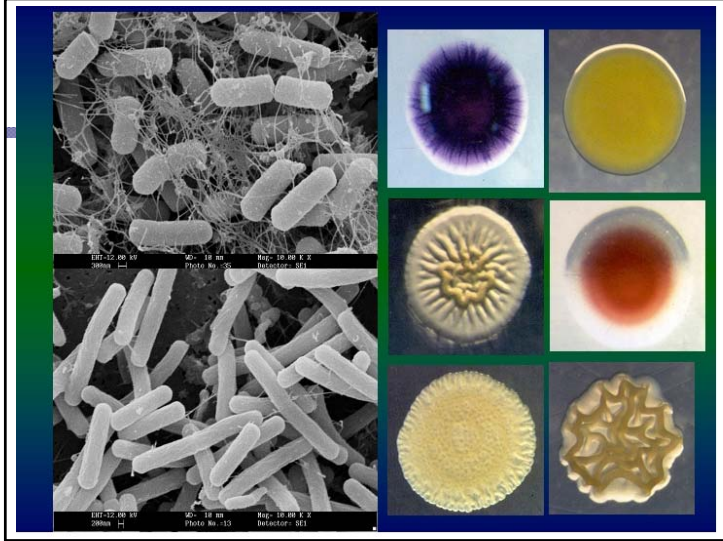
ทำการบดตัวอย่าง 5 กรัม- เจือจางด้วยน้ำทะเล

การแยกเชื้อแบคทีเรีย

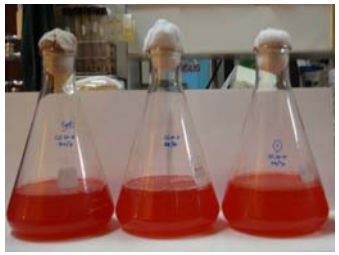
เกลี่ยเชื้อบนORI medium plates (yeast extract 0.1 % , proteose peptone no.3 0.1 % , phytone peptone 0.05 % , Na - thiosulphate 0.02 % , Na - Sulfite 0.005 % , Fe - citrate 0.004 % , 90 % Sea water , and adjust to pH 7.6)

เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 C 5-7 วัน

การแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์



แบคทีเรียทะเลจากฟองน้ำ



แบคทีเรีย

แยกจากสิ่งมีชีวิตหรือน้ำทะเล

เลี้ยงบนอาหารแบคทีเรีย 3-7 วัน

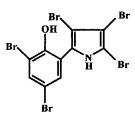
เซลล์ 25-30 ก. จากที่เลี้ยง 10 ลิตร

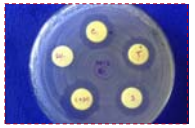
สกัดด้วย $CHCl_3$/MeOH (1:2)
แยกชั้น ด้วย EtOAc/H_2O

EtOAc H_2O

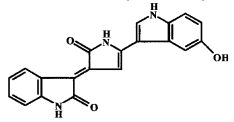
SiO2 column(CHCl3/MeOH, 9:1 - 1:1)

Pentapseudiline (0.0002%, wet wt.)

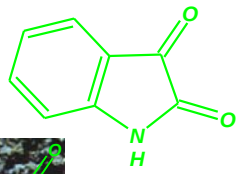


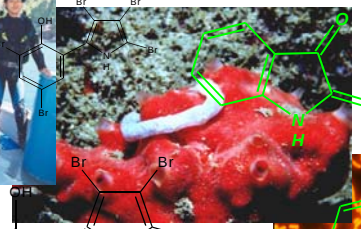


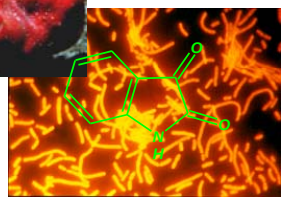
Violacein (0.005%)

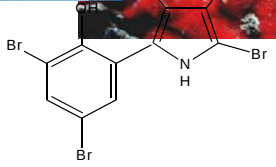


ผลการวิจัย

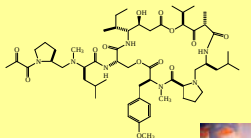




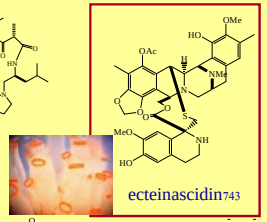




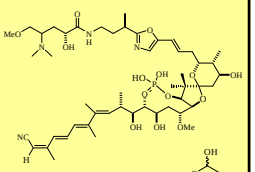
Marine natural product entered in clinical trials



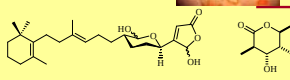
Dehydrodidemnin B



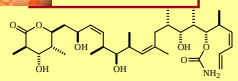
ecteinascidin743



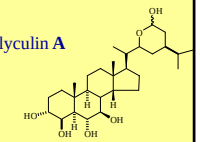
Calyculin A



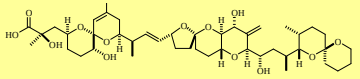
Manoalide



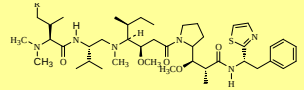
Discodermolide



Contignasterol



Okadaic acid



Dolastatin 10 (R=H) Symplostatin 1 (R= CH_3)

Drug from the sea (N.Fusetani(Editor)Kargel, Basel 2000

Marine Natural Products under clinical trial (January 2004)

Compound name	Origin	Supply	Discovered	Developed by	Biological Activity	Clinical Phase
APIDINE Depsipeptide	*Aplidiuim albicans* Tunicate	Chemical Synthesis	Univ. of Illinois (USA) PharmaMar	PHARMAMAR(Spain)	Cytotoxic	Phase II
YONDELIS™ (Ecteinascidin-743) Alkaloid	*Ecteinascidia turbinate* Tunicate	Aquaculture /Chemical semisynthesis	Univ. of Illinois (USA)	PHARMAMAR(Spain)	Cytotoxic	Phase II-III
BRYOSTATIN Macrocyclic lactone	*Bugula neritina* Bryozoan (Pos. bacterial origin)	Recollection/ Aquaculture (Bacterial	Arizona State Univ. (USA)	GPC Biotech(Germany) -therapy trials	Antitumor(modulator of protein kinase C-PKC activity)	Phase II Esophageal cancer and
DISCOVERMOLIDE Polyketide	*Discodermia* sp. Sponge	Chemical Synthesis	Harbor Branch (USA)	NOVATIS(USA)	Antitumor	Phase I
ET 389	*Axinella* sp. Sponge		Arizona State Univ. (USA)	NCI-Approved California Cancer Consortium(USA)EISAIInc.Japan	Antitumor	Phase I
HTI-286 (Synthetic Analogue of the Tripeptide Hemiaste rlin)	Various species of marine sponges	Synthesis	Univ. of British Columbia(Cana	WYETH(Spain)	Antitumor	Phase I-II Non-small cell lung cancer
IPL-576092 (Connasterol synt. anal.) Steroid	*Petrosia contignata* Sponge	Chemical Synthesis	Univ. of British Columbia(Canada)	INFLAZYME PHARMACEUTICALS (Canada) AVENTIS(France)	Anti-inflamatory	Phase II Oral asthma therapy
KRN7000 (alphagalactosylceramide)(Agelasphin synt. anal.)Glycosphingolipi	*Agelas mauritianus* Sponge	Chemical Synthesis	Univ. of Ryukyus (Japan) Kinrin Co (Japan)	KIRIN BREWERY CO (Japan)	Antitumor (Immunomodulatory no cytotoxic)	Phase II Pancreatic cancer, Solid tumors.

Marine Drugs & Cosmetics

ปัญหาในการใช้ทรัพยากรธรรมชาติจากทะเล

-การเก็บเกี่ยวทรัพยากรจากทะเลโดยตรงจากธรรมชาติ
-การใช้ทรัพยากรเกินกำลังผลิต
-การลดจำนวนของทรัพยากรที่มีประโยชน์เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมและโครงสร้างทางนิเวศวิทยา
-การใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัชกรรม
-พื้นที่แนวปะการัง แหล่งหญ้าทะเลและป่าชายเลนลดลง
-การสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตที่รู้จักและยังไม่รู้จัก

การใช้ประโยชน์จากทรัพยากรทางทะเลอย่างยั่งยืน

-การศึกษาและค้นพบการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรทางทะเลเพิ่มขึ้น
-การเข้าใจถึงการเกิดสารประกอบและสูตรโครงสร้าง
-การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์หรือสารเคมีทดแทนการเก็บเกี่ยวจากธรรมชาติ
-การพัฒนาเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพเพื่อทดแทนการเก็บเกี่ยวจากธรรมชาติ
-ศึกษาถึงความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตและสารประกอบตลอดจนนิเวศวิทยาเพื่อเข้าใจถึงบทบาททางชีวภาพของสารประกอบนั้น
-ศักยภาพในการเก็บตัวอย่างและกระบวนการค้นพบ
-การอนุรักษ์ทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมทางทะเลควบคู่กับการใช้ประโยชน์

กิติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานต่างๆที่ให้ความอนุเคราะห์จนปฏิบัติงานได้ตามวัตถุประสงค์ได้แก่

1. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
3. นิสิต มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ร่วมวิจัย
3. ทีมดำน้ำ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล

เอกสารอ้างอิง

1.Dietzman, G.R. 1997. The marine environmentas discoveryresource.

.Faulkner, D.J. 1984-2000. Natural

2.Product Reports.

3.McAllister, D.E. 1998. The Crises in Marine Biodiversity and Key Knowledge.

4. Blunt. et al., 2005; 2006

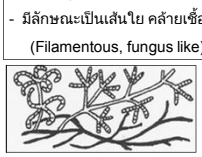
การแยกและการใช้ประโยชน์จากแอคติโนมัยซีท(จากป่าชายเลน)

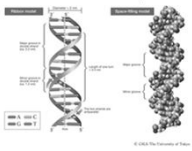
รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์
Rattanaporn Sriviboo

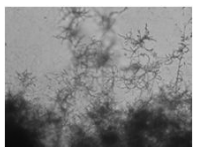
Institute of Marine Science, Burapha University

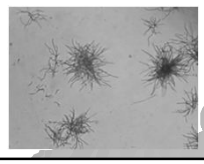
แอคติโนมัยซีท คืออะไร
What is actinomycete?

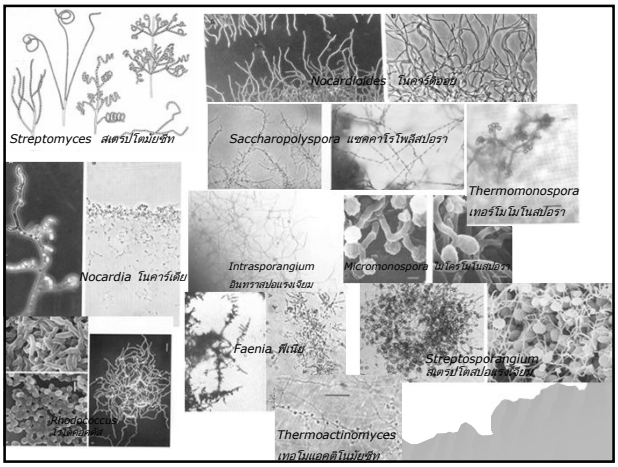
- เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ ของ G+C สูง
  Gram positive bacteria having high G+C content.
- มีลักษณะเป็นเส้นใย คล้ายเชื้อรา
  (Filamentous, fungus like)











ทำไมต้องเป็นแอคติโนมัยซีท
Why Actinomycetes?

- เป็นแหล่งของสารแอนติไบโอติก สารที่นำมาทำเป็นยารักษาโรค
- Source of antibiotics, pharmaceutical agents.
- สารแอนติออกซิแดนซ์ Antioxidants.
- สาร ไซเดอโรฟอร์
- รงควัตถุ (pigments), แคโรทีนอยด์ (carotenoid), เมลานอยด์ (melanoid), (anthracycline).
- เอ็นไซม์ต่าง ๆ:Enzymes α –mannanase, β-(1,3)glucanase, proteinase, β-glucosidase, chitinase, dextranase, keratinase, Xylanase.

สารแอนติไบโอติก
Antibiotics

จำนวนสารทุติยภูมิ โดยประมาณ ที่สร้างจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จนถึง ปี ค.ศ. 1994 (Hopwood et a2000)

แหล่งที่สร้าง	สารแอนติไบโอติก	สารออกฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆ	รวมทั้งหมด	สารทุติยภูมิที่ไม่ออกฤทธิ์
แบคทีเรียอื่น ๆ	1400(12%)	240 (9%)	1640 (11%)	2000-5000
แอคติโนมัยซีท	7900* (66%	1220* (40%)	9120* (61%)	8000-10,000
รา	2600 (22%)	1540 (51%)	4140 (28%)	15,000-25,000
รวมทั้งหมด	11,900 (100%	3000 (100%)	14,900(100%)	25,000-40,000

สาร Antibiotics ที่แอคติโนมัยซีทสร้าง

ตัวอย่างของสารแอนติไบโอติกที่สร้างจาก แอคติโนมัยซีท

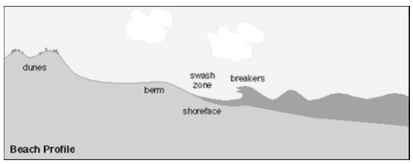
สาร Antibiotics	สร้างจาก
-Streptomycin	*Streptomyces*
-Kanamycin	*Streptomyces*
-Vancomycin	*Amycolatopsis*
-Rifampicin	*Streptomyces*
-Gentamicin	*Micromonospora*

References: Miyadoh,1997; Williams *et al.*, 1989

แอคติโนมัยซีทพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ : ดิน น้ำ (แม่น้ำ ทะเล ตะกอนก้นทะเล) ดินป่าไม้ รากพืช ธรรมชาติอื่น ๆ ทั่วไป

Mangrove forest Chantaburi

3 ใน 4 ส่วนของผิวโลก เป็นพื้นน้ำ แต่ยิ่งไกลจากชายฝั่งก็ยิ่งพบแอคติโนมัยซีทน้อยลง



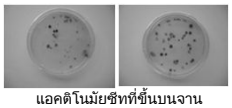
วิธีการแยกเชื้อ

- นำดินตัวอย่างมาอบที่ 100 °C, ชั่วโมง เพื่อลดจำนวนแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ และกระตุ้นสปอร์ของแอคติโนมัยซีท.
- นำดินที่อบแล้วนี้มา เจือจาง(10 fold Dilutions) น้ำเกลือ 0.85% (Normal saline)
- 1 ml 1 ml 1 ml
- เขย่า เขย่า เขย่า เขย่า
- เกลี่ยลงบนจานเพาะเชื้อ Starch Casein Agar

อาหาร SCA อาหาร HV อาหาร SCA อาหาร HV

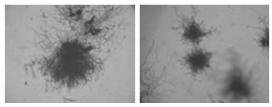
บ่มเชื้อที่ 32 °C-for weeks

การตรวจสอบแอคติโนมัยซีทที่ขึ้นบนจาน

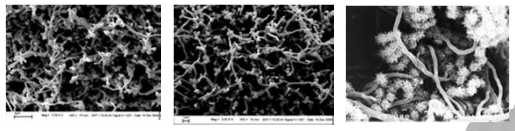


แอคติโนมัยซีทที่ขึ้นบนจาน

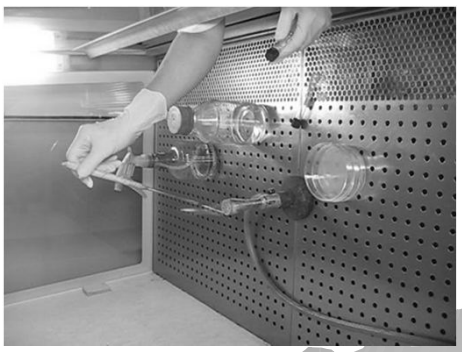
ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์



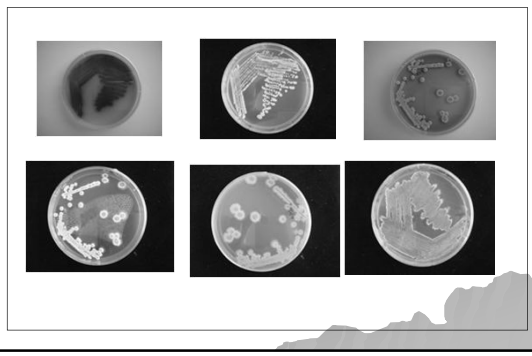
ตรวจสอบด้วยกล้อง Scanning electron microscope SEM



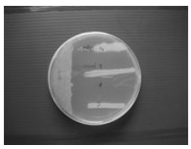
วิธีการ เลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเชื้อ (Streak plate)



Actinomycetes ที่ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้วบนจานเพาะเชื้อ



วิธีทดสอบการสร้างสารแอนติไบโอติกของเชื้อ



แบคทีเรีย (bacterial test strains)

- *Micrococcus luteus* TISTR
- *Staphylococcus aureus* TISTR
- Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*815 (MRSA 815)
- *Pseudomonas aeruginosa* TISTR

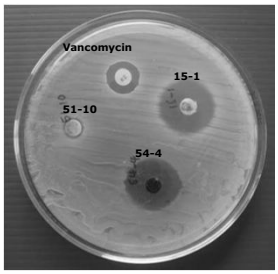
ยีสต์ Yeast strain

- *Candida albicans* TISTR

การเลี้ยงเชื้อปริมาณมากเพื่อสร้างสารแอนติไบโอติก/สารที่มีฤทธิ์อื่น

เพาะเชื้อให้เจริญบนจานอาหารที่เหมาะสม

สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์



Anti-MRSA

การใช้ประโยชน์จากแอคติโนมัยซีท

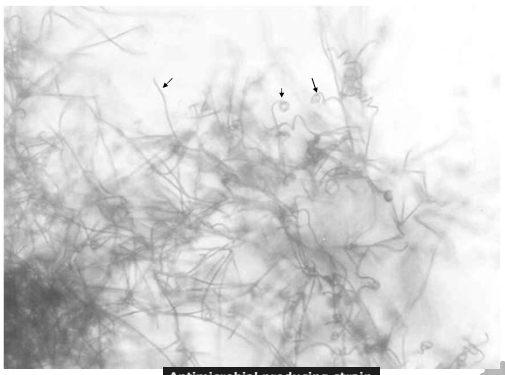
-สารแอนติไบโอติก- ประโยชน์ทางการแพทย์ และเภสัชวิทยา สารต้านจุลินทรีย์ ต้านเซลล์มะเร็ง

-รงควัตถุ สีต่าง ๆ สามารถนำมาทำสีย้อมผ้า

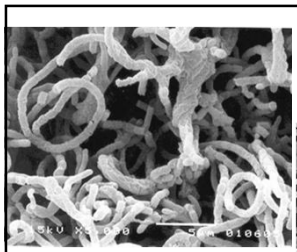
- สารแอนติออกซิแดนท์ (สารต้านอนุมูลอิสระ) / สารแอนติออกซิแดนท์ ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์ อาหารเสริม

การใช้ประโยชน์จากรงควัตถุ (pigment) ที่แอคติโนมัยซีทสร้างขึ้น

- สารสกัดที่เป็นรงควัตถุใช้ทำสีย้อมผ้า
- ส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น สบู่ เครื่องสำอางค์
- สีที่ไม่เป็นอันตราย เช่น สารแคโรทีนอยด์ ใช้ผสมอาหารได้

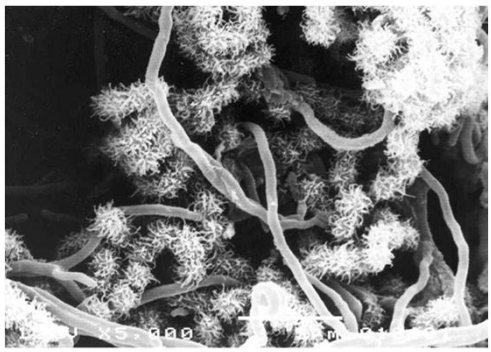


Antimicrobial producing strain



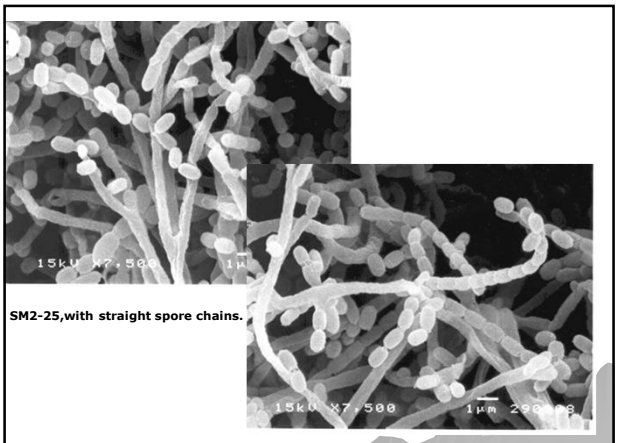
SM 15-1,
5,000X

SM17-4, loop spore chains.

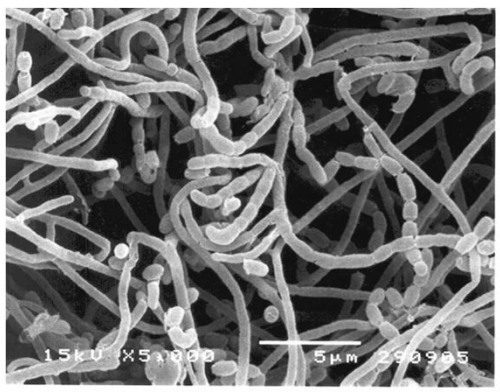


SM9-8, with spiral spore chains.

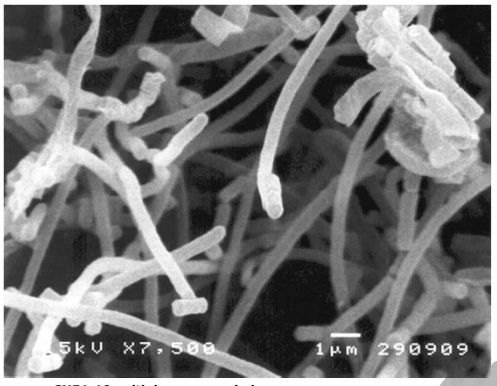
CH 51-10 ,with loop spore chains.



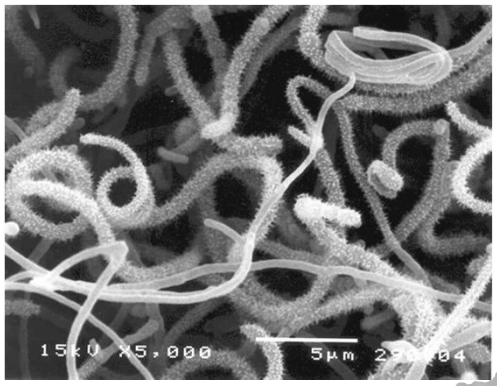
SM2-25,with straight spore chains.



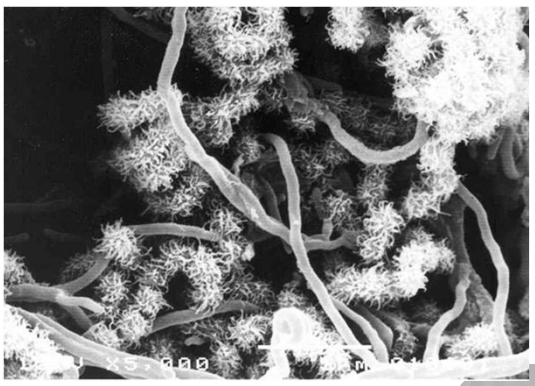
SM17-1, with loop spore chains.



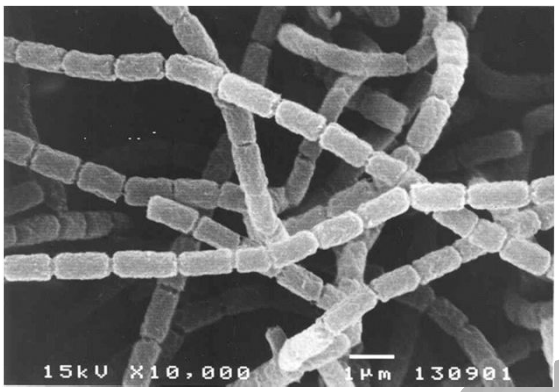
CH51-10, with loop spore chains.



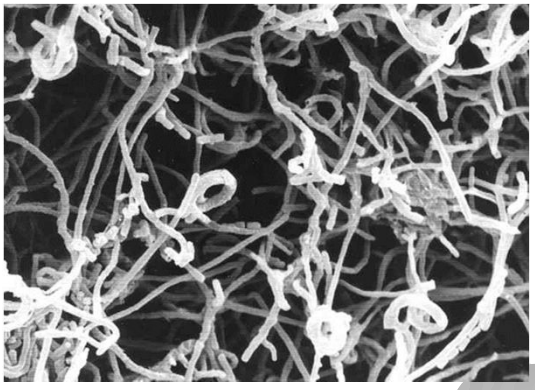
CH54-4 with straight and loop spore chains.



SM9-8, with spiral spore chains.

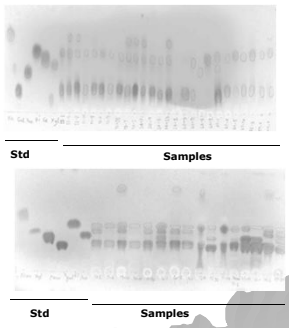


CH51-12, with straight spore chains.



CH56-4, with loop spore chains.

DAP Determination and Sugar Analysis



บทปฏิบัติการ การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

วิธีการแยกเชื้อ เก็บตัวอย่าง และการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

1. *การเก็บตัวอย่าง* : เก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลนชายฝั่งในจังหวัดจันทบุรี หรือจังหวัดใกล้เคียง โดยเก็บจากผิวหน้าดินลึกลงไปประมาณ 5 cm ดินบริเวณที่ใกล้รากพืช และดินที่มีเศษซากใบไม้ เพื่อนำมาแยกเชื้อหา Actinomycetes (ที่หายาก)

2. การแยกเชื้อ Actinomycetes จากดิน

2.1นำตัวอย่างดินมาโดยแบ่งเป็น 2 ส่วน นำส่วนที่ 1 มา pre-treatment โดยอบที่อุณหภูมิ 100องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และชั่งตัวอย่างดินแห้ง 1 กรัม ผสมลงในน้ำ sterile 9 ml. เขย่าให้เข้ากัน และปิเปตสารละลายตัวอย่างดินจากหลอดที่1 ปริมาตร 1 ml. ลงในหลอดที่ 2 ที่มีน้ำ sterile 9 ml. ทำ dilution 10^{-1} ถึง 10^{-5}

2.2ดินส่วนที่ 2 มาเติม 0.6 % yeast extract และ 0.05% SDS และนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีและชั่งตัวอย่างดินแห้ง 1 กรัม ผสมลงในน้ำ sterile 9 ml. เขย่าให้เข้ากัน และปิเปตสารละลายตัวอย่างดินจากหลอดที่1 ปริมาตร 1 ml. ลงในหลอดที่ 2 ที่มีน้ำ sterile 9 ml. ทำ dilution 10^{-1} ถึง 10^{-5}

3.3 นำสารละลายทั้ง 2 ส่วนโดยเลือกความเข้มข้นที่10^{-1} - 10^{-3}มา spread plate บนอาหาร Strarch Casein Agar และ Humic Acid-Vitamin Agar โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายมา 0.1 ml.

4.4 นำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-28 วัน

5.5 เมื่อเชื้อเจริญเลือกโคโลนีที่ทึบแสง ผิวและขอบขรุขระมา streak ลงบนอาหาร Starch Casein Agar เพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน

6.6 คัดเลือกโคโลนีที่สร้างเส้นใย ทึบแสงสีขาว หรือ เทา น้ำเงิน ม่วง แดง แดงเข้ม สีส้ม สีน้ำตาลหรือสีเหลืองที่มีลักษณะคล้าย กำมะหยี่ หรือ คล้ายหนังสัตว์หรือโคโลนีที่ผิวหน้าย่น ที่ขึ้นบนจานอาหารมาทำให้บริสุทธิ์และถ่ายเชื้อลงบนอาหารวุ้นเอียง Starch Casein Agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วันเก็บรักษาไว้ ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อการตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3. การทดสอบทางสัณฐานวิทยา

3.1 การศึกษาลักษณะของเส้นใย และสปอร์ของเชื้อ Actinomycetes

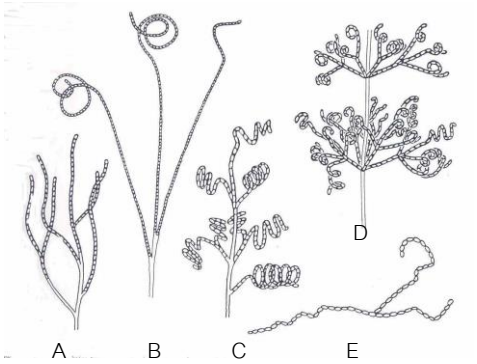
1. ใช้ loop เขี่ยเชื้อ Actinomycetes นำมา streak ลงบนอาหาร ISP2 (Actinomycete Isoaltion Agar) ให้ทั่ว

2. ใช้กระจกปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ววางเสียบลงไปบนอาหารทำมุม 45 องศา เซลเซียส

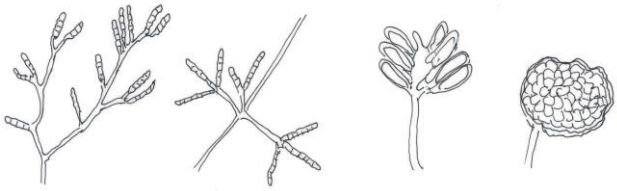
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน

4. นำกระจกปิดสไลด์ที่เสียบไว้มาย้อมแกรม แล้วนำไปตรวจดูลักษณะของเส้นใยและเส้นสายสปอร์ ลักษณะของสปอแรงเจียม (ถ้ามี) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2 หรือ สามารถส่องดู โคโลนี เซลล์ เส้นสายสปอร์ เส้นใย ได้โดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 1 สปอร์ที่สร้างเป็นเส้นสายยาวลักษณะต่าง ๆ A. Rectiflexibiles, B. Retinaculiaperti, C. Spirales, D. Verticillati, E. aerial hypha ที่แตกหักเป็นท่อน ที่มา: Miyadoh (1997)



ภาพที่ 2 ก้านชูสปอร์ (sporophores) และก้านชูอับสปอร์ (sporangiophores), A. ก้านชูสปอร์ที่แตกแขนงของ *Microtetraspora*, B. ก้านชูสปอร์ชนิด umbellate monoverticillate ของ *Streptoverticillium*, C. ก้านชูอับสปอร์ของ *Planomonospora*, D. ก้านชูอับสปอร์เดี่ยว ๆของ *Actinoplanes* (วาดลายเส้นโดยรัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์)

Reference:

Miyado, S., Hamada, M.,Hotta, K., Kudo, T., Seino, A., Vobis,G and Yokata, A. 1997. Atlas of Actinomycetes. Asakura Publishing Co., Ltd. Tokyo. 223 p.

เทคนิคการสกัด (Extraction)

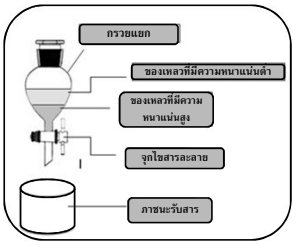
โดย ดร. รวิวรรณ วัฒนดิลก

เทคนิคการสกัด

- เทคนิคการสกัด แบ่งย่อยได้ตาม**สถานะของตัวทำละลายที่**ใช้สกัดสารดังนี้
  - เทคนิค liquid extraction สารสกัดเป็นของเหลว
  - เทคนิค liquid-solid extraction หรือเทคนิค solid phase extraction, (SPE) สารสกัดเป็นของแข็ง
  - เทคนิค gas extraction สารสกัดเป็นก๊าซ

การสกัดด้วยตัวทำละลาย

- ทำได้โดยใช้ตัวทำละลายของเหลวชนิดหนึ่ง สกัดตัวถูกละลายออกจากของเหลวอีกชนิดหนึ่ง เรียกการสกัดนี้ว่า liquid-liquid extraction



Liquid-liquid extraction

การป้องกัน การเกิดสภาวะอิมัลชัน (Emulsion)

- หลีกเลี่ยงการเขย่าเพื่อสกัดสารอย่างรุนแรง
- ใช้สารละลายเนื้อผสม ในการสกัด
- เติมสารประกอบเกลือที่เป็นกลาง (เช่น เกลือโซเดียมคลอไรด์) เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของน้ำ และเปลี่ยนแปลงแรงตึงผิว

สารสี (Pigment)

- สารสีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลาย ๆ ชนิดถูกสร้างมาจากแบคทีเรียทะเลหลายชนิด ซึ่งแยกได้จากดินตะกอน น้ำทะเล สาหร่าย และสัตว์ทะเล
- สีที่ใช้มีทั้งสีสังเคราะห์และสีธรรมชาติ สีจากจุลินทรีย์จัดเป็นสีที่ได้จากธรรมชาติชนิดหนึ่งที่นิยมใช้

- สารสีแดงของ Prodiginines ที่แยกจากแบคทีเรียทะเลมีความหลากหลายในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.
  - ✓ antibacterial
  - ✓ antifungal
  - ✓ antimalarial
  - ✓ antibiotic

- สารสีม่วง violacein ที่แยกจากแบคทีเรียทะเล :
  - ✓ antiviral
  - ✓ antibacterial
  - ✓ anticancer

สีธรรมชาติและสีสังเคราะห์ ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร เสื้อผ้า ของใช้ เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์อื่น ๆอีกมากมาย

การสกัดตัวอย่างฟองน้ำทะเล

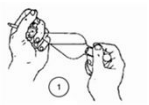
ทำความสะอาดฟองน้ำเอาสิ่งมีชีวิตอื่นออก → ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แช่ด้วย Methanol ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง → กรองผ่านกระดาษกรอง (ทำ 3 ครั้ง)

นำไประเหย เอาตัวทำละลายออก → ชั่งน้ำหนัก

การสกัดสารสีจากแอคติโนมัยซีท

เซลล์แอคติโนมัยซีท → สกัดด้วยเมทานอล 6 mL ด้วยเครื่องคลื่นความถี่สูง → กรอง, สกัด 3 ซ้ำ → รวมสารละลายเมทานอล

ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารสูญญากาศ

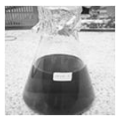


สกัดแยกส่วน ระหว่างน้ำ-เอธิลอะซิเตท 1:1 (v/v)

ตั้งทิ้งไว้ แยกชั้น → รวมชั้นเอทธิลอะซิเตท → ระเหยให้แห้ง → ทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน

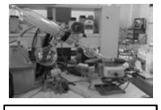
ชั่งน้ำหนัก

การสกัดน้ำเลี้ยงของแอคติโนมัยซีท



น้ำเลี้ยงของแอคติโนมัยซีท → สกัดด้วยเอทธิลอะซิเตท 1:1 (v/v)3 ครั้ง → ตั้งทิ้งไว้ แยกชั้น

รวมชั้นเอทธิลอะซิเตท → ระเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสารสูญญากาศ



ทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน

ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ

การสกัดลิปิด(Lipid extraction)

จากเชื้อแอคติโนมัยซีท

ลิปิด (Lipid)

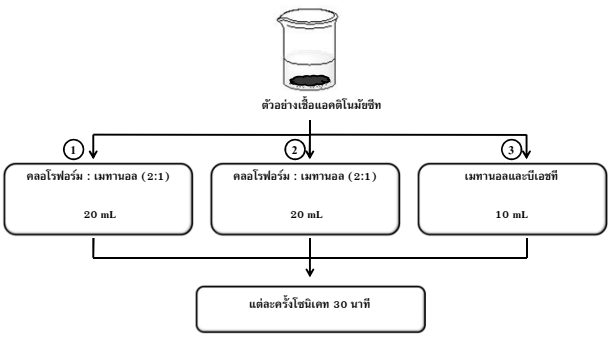
- ความก้าวหน้าด้านลิปิดเทคโนโลยีชีวภาพ (lipid biotechnology) เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว
- ความต้องการใช้ผลิตภัณฑ์ลิปิดเพิ่มขึ้นตามจำนวนประชากรโลก โดยได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพต่าง ๆ
  - ด้านพลังงาน อาหาร อาหารสัตว์ เครื่องสำอาง
  - ผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพและผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในชีวิตประจำวัน

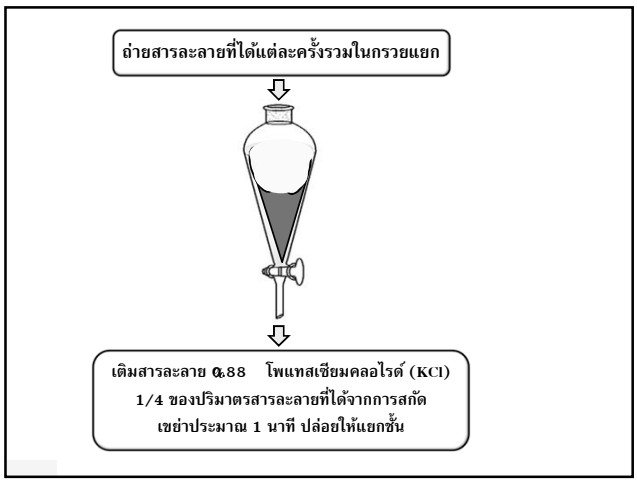
การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์ หรือที่เรียกว่า Single Cell Oils (SCO)

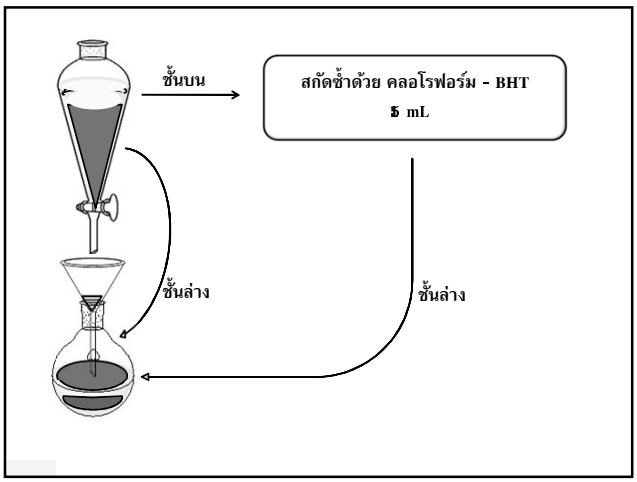
การผลิตลิปิดนั้นมีปัจจัยที่ต้องคำนึงหลายประการ :

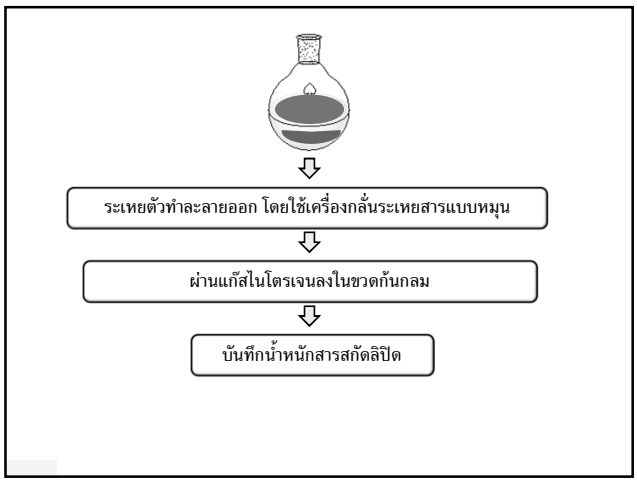
- การคัดแยกและเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์
- ชนิดและปริมาณของกรดไขมันและลิปิดภายในเซลล์
- สภาวะการเพาะเลี้ยง
- **วิธีการสกัดลิปิด**
- การวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ลิปิด
- ต้นทุนในการผลิต

การสกัดลิปิด




ถ่ายสารละลายที่ได้แต่ละครั้งรวมในกรวยแยก
เติมสารละลาย 0.88 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
1/4 ของปริมาตรสารละลายที่ได้จากการสกัด
เขย่าประมาณ 1 นาที ปล่อยให้แยกชั้น


ชั้นบน
สกัดซ้ำด้วย คลอโรฟอร์ม - BHT
5 mL
ชั้นล่าง
ชั้นล่าง

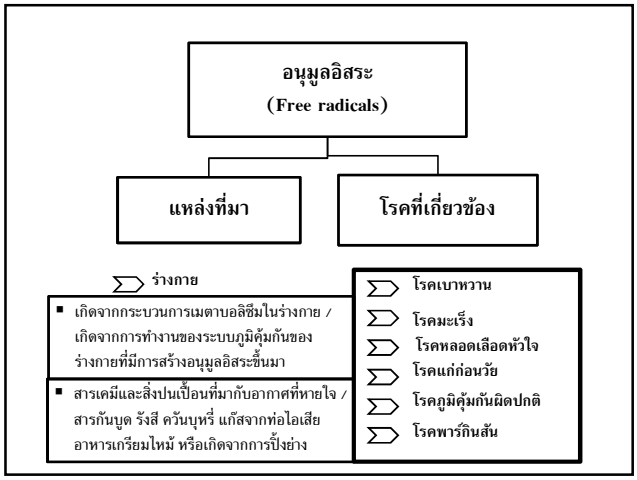

ระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน
ผ่านแก๊สไนโตรเจนลงในขวดก้นกลม
บันทึกน้ำหนักสารสกัดลิปิด

การวิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

(DPPH radical scavenging assay)

อนุมูลอิสระ (Free radical)

- อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็คตรอนอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล ว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา
- โดยรับอิเล็คตรอนจากสารอื่น ๆใกล้เคียง ทำให้ตนเองเสถียรขึ้น
- ขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็คตรอนไปนั้นมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ จนอาจกลายเป็นสารที่มีความรุนแรงได้



อนุมูลอิสระ

- อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็คตรอนอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล ว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา
- โดยรับอิเล็คตรอนจากสารอื่น ๆใกล้เคียง ส่งผลให้ตนเองเสถียรขึ้น
- ขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็คตรอนไปนั้นมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ จนอาจกลายเป็นสารที่มีความรุนแรงได้

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

- อนุมูลอิสระสามารถถูกกำจัดหรือลดความรุนแรงด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ
- สารต้านอนุมูลอิสระสามารถจับกับอนุมูลอิสระ แล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรกว่า ส่งผลให้หยุดวงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ได้

โครมาโทรกราฟี (Chromatography)

- เป็นเทคนิคการแยกสารอีกวิธีหนึ่งที่อาศัยหลักการละลายของสารในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับได้ไม่เท่ากัน ทำให้สารเคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน
- สารต่างชนิดกันจะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคนิ่ง (stationary phase หรือตัวดูดซับ และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase หรือตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน
- สารต่างชนิดกันจึงเดินทางผ่านวัฏภาคนิ่งออกมากับวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ไม่พร้อมกันจึงเกิดการแยกขึ้น

ตัวดูดซับ (Adsorbent)

- ตัวดูดซับแต่ละชนิดมีความสามารถในการดูดซับสารไว้บนพื้นผิวได้ต่างกัน

ตัวดูดซับมีขั้วสามารถดูดซับสารมีขั้วได้ดีกว่าสารไม่มีขั้ว

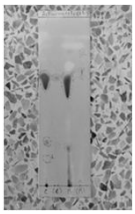
สารไม่มีขั้วจึงถูกชะออกมาก่อนสารมีขั้ว

ตัวชะ (Eluent)

- ตัวชะ ทำหน้าที่ละลายสารออกจาก Stationary Phase
- ตัวชะมีความสามารถในการชะสารด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน
- ตัวชะที่มีขั้วสูงจะพาสารเกือบทุกชนิดเคลื่อนที่ไปได้เร็ว
- ขณะที่ตัวชะที่มีขั้วต่ำจะพาสารที่ถูกดูดซับน้อยออกมาก่อน

ประเภทของโครมาโตกราฟี

- โครมาโตกราฟี แบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography or TLC
- โครมาโตกราฟี แบบคอลัมน์ (Column Chromatography
- โครมาโตกราฟี แบบกระดาษ (Paper chromatography



การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น (DPPH)

หยดสารสกัดแอคติโนมัยซีทลงแผ่น TLC

ใช้ตัวชะ
คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (98:)

ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm

พ่นด้วยสารละลาย0.2 % DPPH
เก็บไว้ที่มืด30 นาที

ที่มา: ดัดแปลงจาก Alessandra และคณะ, 2002

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

- สารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระจะปรากฏเป็นจุดสีเหลืองอยู่บนพื้นหลังสีม่วงบนแผ่น TLC

บทปฏิบัติการ
การสกัดสาร โครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

โดย ดร. รวิวรรณ วัฒนดิลก นางณิษา สิรนนท์ธนา ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
งานวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแยกสารผสมด้วยวิธีการสกัดและโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC)
2. ศึกษาการพิสูจน์สารตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบค่า R_f และศึกษาบทบาทของ mobile phase ที่มีต่อการแยกสาร
3. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วย DPPH

หลักการของการสกัดคือ การใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสม และ Chromatography เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสม การทำสารให้บริสุทธิ์และพิสูจน์สารเหล่านั้นได้ด้วย เปนเทคนิคเกี่ยวข่องกับการกระจายของสาร ระหว่างภาคอยู่กับที่ (stationary phase) เป็นตัวดูดซับที่เคลือบอยูบนแผนแก้วหรือแผนพลาสติก และภาคที่เคลื่อนที่ได้ (mobile phase) ที่เคลื่อนผานตัวดูดซับ ในการแยกสารโดยวิธี chromatography จึงอาศัยหลักที่ว่า สารจะเคลื่อนที่ออกจากกันบน stationary phase เนื่องจากอิทธิพลของ mobile phase และเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วต่างกัน โดยสารที่ละลายได้ดีใน mobile phase และถูกดูดซับได้น้อยโดย Stationary phase จะเคลื่อนที่ได้เร็ว

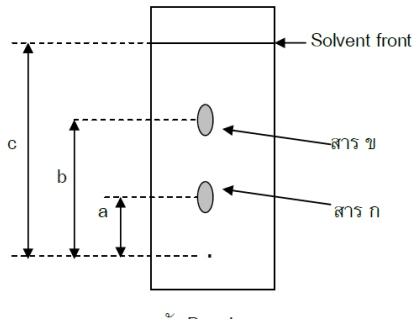
Solid-liquid adsorption chromatography จะมี stationary phase เป็นของแข็ง เรียกว่าตัวดูดซับ เช่น อลูมินา หรือ ซิลิกาเจล ส่วน mobile phase อาจเป็นก๊าซหรือของเหลวก็ได้ การแยกเกิดเนื่องจากสารแต่ละชนิดถูกดูดซับไว้โดยตัวดูดซับในอัตราที่ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของตัวดูดซับ ตัวอย่างของโครมาโทกราฟี แบบนี้คือ Thin layer chromatography (TLC) และ Column chromatography (CC)

Thin Layer Chromatography เป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว สามารถใช้ได้กับสารเกือบทุกชนิด จึงเป็นที่นิยมใช้กันมาก โดยทั่วไปแล้วนิยมใช้ TLC ในการแยกสารพิสูจน์ชนิดของสาร และตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น โดยเฉพาะในกรณีที่สารเป็นสารระเหยยาก หรือมีจำนวนน้อย

การหาค่า R_f ของสาร

ค่า R_f หรือค่า “rate of flow” คือ อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ในกรณีที่ใช้ตัวดูดซับเดียวกัน ใช้ระบบตัวทำละลายเดียวกัน และระบบที่ศึกษาอยู่ในสภาวะเดียวกัน สารหนึ่งๆ จะมีค่า R_f คงที่เสมอ ถ้าระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดศูนย์กลางวงกลมของตำแหน่งสารที่ปรากฏ เป็นระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้และระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึง solvent front เป็นระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ จะได้ว่า

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$



การทดลอง

<u>สารเคมี</u>

1. methanol
2. chloroform / hexane
3. ตัวอย่างสารสกัด และสารมาตรฐาน
4. สารละลาย 0.2% DPPH

<u>อุปกรณ์</u>

1. หลอดแคปปิลลารี (capillary tube)
2. บีกเกอร์ / flask ขนาด 250 cm^3
3. แผ่น TLC
4. TLC tank
5. กรวยสกัด

<u>ตอนที่ 1 การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย</u>

1. นำตัวอย่างใส่กรวยสกัด เพื่อทำการสกัดแยกส่วนระหว่าง น้ำ และตัวทำละลายที่เหมาะสม ในปริมาตร 1:1 (v/v)
2. เขย่ากรวยสกัดเบาๆ เปิดไล่แรงดัน และตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
3. สังเกตสีของตัวอย่างในชั้นตัวทำละลาย บันทึกผลสีที่ได้ ไขเก็บชั้นตัวทำละลายของตัวอย่าง นำไปแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟฟี

<u>ตอนที่ 2 การแยกสารตัวอย่าง</u>

1. หยดสารสกัดตัวอย่างและสารมาตรฐานลงบนแผ่น TLC รอให้สารแห้ง

2. นำแผ่น TLC ตามข้อ 1 ใส่ลงใน TLC tank ซึ่งบรรจุตัวชะที่เตรียมไว้ ปิดฝา รอจนกระทั่ง mobile phase เคลื่อนที่ถึง solvent front
3. นำแผ่น TLC ออกจาก tank ปล่อยให้ mobile phase ระเหย แล้วสังเกตผล
4. วัดระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดศูนย์กลางของสารทุกชนิด และจากจุดเริ่มต้นถึง solvent front แล้วคำนวณค่า R_f ของแต่ละจุด เปรียบเทียบค่าที่ได้กับสารมาตรฐาน

ตอนที่ 3 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

1. นำแผ่น TLC ที่ได้จากการแยกสารข้างต้น ระบุตำแหน่งสารที่ปรากฏด้วยตาเปล่า และภายใต้แสง UV
2. สเปรย์สาร 0.2% DPPH ลงบนแผ่น TLC ให้ทั่วแผ่น (ระวังอย่าให้สารสัมผัสผิวหนัง) นำไปห่อกระดาษฟอยด์ เก็บในที่มืด นาน 15-30 นาที สังเกตและบันทึกผลที่เกิดขึ้น