การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำทะเลบางชนิดบริเวณเกาะล้านและเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

Screening of antibacterial activity with lectin from crude extracts of some marine sponges from Lan Island and Srichang Island, Chonburi province

ห้องสมุด
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

เยี่ยมลักษณ์ พิศวงษ์

โครงงานทางชีววิทยานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มีนาคม 2549

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูประการ

ปัญหาทางทางชีววิทยาฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้ดีเนื่องจากได้รับความกรุณาให้คำปรึกษาและช่วยแนะนำแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ อย่างดียิ่งจาก ดร.ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษา คุณจันทร์จรัส วัฒนะโชติ นักวิทยาศาสตร์สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อาจารย์สุนีย์ สุขศรีงาม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และผศ. ดร. วิสาตรี คงเจริญสุนทร คณะกรรมการสอบปากเปล่าที่ให้ข้อเสนอแนะในการแก้ไขปรับปรุงปัญหาทางชีววิทยาฉบับนี้จนถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณคุณสุเมตต์ ปุจฉาการ ที่ได้กรุณาเก็บตัวอย่างฟองน้ำ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณทุกท่านอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา และนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ รวมทั้งข้อเสนอแนะและเป็นกำลังใจในการทำปัญหาทางทางชีววิทยาฉบับนี้

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่สนับสนุนทุนในการวิจัยผ่านแผนงานวิจัย "สารตัวอย่างและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ จากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย" ประจำปี 2548-2549

ขอขอบพระคุณ ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้อนุเคราะห์เลือดที่นำมาใช้ในการทดสอบเลคติน

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา คณาจารย์ที่ให้ความรู้และการอบรมเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่สนับสนุนและส่งเสริมในด้านการศึกษาจนประสบความสำเร็จรวมทั้งพี่ๆ และเพื่อนๆทุกคนที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจอย่างดีในการทำปัญหาทางชีววิทยาฉบับนี้จนสำเร็จ

เยี่ยมลักษณ์ พิศวงษ์

มีนาคม 2549

วันที่ลงทะเบียน 21 ก.ค. 2549
เลขทะเบียน วท003700
เลขหมู่ 2549

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อาจารย์ผู้ควบคุมโครงงานทางชีววิทยาและคณะกรรมการสอบปากเปล่าได้พิจารณาโครงงานทางชีววิทยาของนางสาวเยี่ยมลักษณ์ พิศวงษ์ ฉบับนี้แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

อาจารย์ผู้ควบคุมโครงงานทางชีววิทยา

.....ประธาน

(ดร.ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา)

.....กรรมการ

(นางจันทร์จรัส วัฒนะโชติ)

.....กรรมการ

(อาจารย์สุนีย์ สุขศรีงาม)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

(ดร.ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา)

.....กรรมการ

(นางจันทร์จรัส วัฒนะโชติ)

.....กรรมการ

(อาจารย์สุนีย์ สุขศรีงาม)

.....กรรมการ

(ผศ. ดร.วิสาตรี คงเจริญสุนทร)

ภาควิชาชีววิทยาอนุมัติให้รับโครงงานทางชีววิทยาฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

.....หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา

(ผศ. สมสุข มัจฉาชีพ)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2549

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หัวข้อวิจัย	การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำทะเลบางชนิดบริเวณเกาะล้านและเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี Screening of antibacterial activity with lectin from crude extracts of some marine sponges from Lan Island and Sriehang Island, Chonburi province
ชื่อผู้วิจัย	นางสาวเยี่ยมลักษณ์ พิศวงษ์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	ชีววิทยา
ภาควิชา	ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ชุติวรรณ เคชสกุลวัฒนา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	1. นางจันทร์จรัส วัฒนะโชติ 2. อาจารย์สุนีย์ สุขศรีงาม
ปีการศึกษา	2548

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทคัดย่อ

เลคติน คือ โปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่จับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต และไม่ได้สร้างจากระบบภูมิคุ้มกัน เลคตินสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม และ/หรือ ตกตะกอนโมเลกุลที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบได้ จากการตรวจหาเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ 4 ชนิดที่เก็บบริเวณเกาะล้าน ได้แก่ *Spheciospongia congenera* , *Haliclona (Reniera)* sp. *Callyspongia* (*Euplacella*) *joubini* , *Hyrtios erecta* และฟองน้ำที่เก็บบริเวณเกาะสีชัง 1 ชนิด ได้แก่ *Chondrilla australiensis* พบว่าสิ่งสกัดจาก *Hyrtios erecta* สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ และเอบี เกาะกลุ่มได้ดีที่สุด 2^3 2^8 2^5 และ 2^{11} ไตเตอร์ และจากการศึกษาบทบาทของเลคตินในการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า เลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำทั้ง 5 ชนิด สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ ได้แก่ *Vibrio alginolyticus* *V. fluvialis* *V. harveyi* *V. mimicus* *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ได้ร้อยละ 0-99 และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนได้แก่ *Staphylococcus aureus* , *Micrococcus luteus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ร้อยละ 9-83 และจากการศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำในการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าเชื้อแบคทีเรีย LKRK05-1 และ LKRK05-2 ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Haliclona (Reniera)* sp. สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุดคือร้อยละ 0-93 และ1-95

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
รายการอักษรย่อ	ญ
1. บทนำ	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	1
สมมติฐานการวิจัย	1
ขอบเขตการวิจัย	2
สถานที่ทำการวิจัย	2
ระยะเวลาทำการวิจัย	2
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
รูปร่างลักษณะที่สำคัญของฟองน้ำ	3
ความหมายของเลคติน	7
คุณสมบัติของเลคติน	7
ประโยชน์ของเลคติน	8
เลคตินจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง	9
การศึกษาเลคตินจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในประเทศไทย	11
การศึกษาสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ	11
3. วิธีการดำเนินการวิจัย	13
อุปกรณ์และสารเคมี	13
เลือดที่ใช้ทดสอบเลคติน	14
แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต	14
การเตรียมตัวอย่างสิ่งสกัดจากฟองน้ำทะเล	15
การวิเคราะห์ปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำทะเลโดยทดสอบ	17
ความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (Haemagglutination test)	17

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม..... 17

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดจากฟองน้ำโดยวิธีของ Bradford..... 19

การทดสอบสิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย 21

4. ผลและอภิปรายผลการทดลอง..... 23

ความสามารถของเลคตินจากฟองน้ำทะเลในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม 23

ความสามารถของสิ่งสกัดโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม..... 24

ความสามารถของเลคตินจากฟองน้ำและเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย..... 25

5. สรุปและข้อเสนอแนะ 45

สรุป..... 45

ข้อเสนอแนะ..... 45

บรรณานุกรม..... 46

ภาคผนวก..... 48

ประวัติย่อของผู้วิจัย..... 51

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	เลคตินจากพืชที่จำเพาะต่อหมู่เลือด	9
3-1	การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน	20
4-1	ความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ และเอบี เกาะกลุ่ม	23
4-2	ความสามารถของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ และเอบี เกาะกลุ่ม	24
4-3	ผลการทดสอบเลคตินจากฟองน้ำ *Haliclona* (*Reniera*) sp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	26
4-4	ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียLKRK05-1จากฟองน้ำ *Haliclona* (*Reniera*) sp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	27
4-5	ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียLKRK05-2จากฟองน้ำ *Haliclona* (*Reniera*) sp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	28
4-6	ผลการทดสอบเลคตินจากฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	29
4-7	ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียLANT05-2จากฟองน้ำ*Spheciospongia congenera* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	30
4-8	ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียLANT05-3จากฟองน้ำ*Spheciospongia congenera* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	31
4-9	ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียLANT05-4จากฟองน้ำ*Spheciospongia congenera* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	32
4-10	ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียLANT05-5จากฟองน้ำ*Spheciospongia congenera* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	33
4-11	ผลการทดสอบเลคตินจากฟองน้ำ *Hyrtios erecta* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	34
4-12	ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียLNOL07-2จากฟองน้ำ *Hyrtios erecta* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	35
4-13	ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียLNOL07-3จากฟองน้ำ *Hyrtios erecta* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	36
4-14	ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียLNOL07-7จากฟองน้ำ *Hyrtios erecta* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	37

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4-15	ผลการทดสอบเลคตินจากฟองน้ำ *Collyspongia* (*Euplacella*)*joubini* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	38
4-16	ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียLSAB02-1จาก ฟองน้ำ*Collyspongia* (*Euplacella*)*joubini* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	39
4-17	ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียLSAB02-4จาก ฟองน้ำ *Collyspongia* (*Euplacella*)*joubini* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	40
4-18	ผลการทดสอบเลคตินจากฟองน้ำ *Chondrilla australiensis* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	41
4-19	ฟองน้ำที่เหมาะสำหรับศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย	43
4-20	แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำที่เหมาะสำหรับศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย	44

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ภาพโครงสร้างของฟองน้ำ	5
2-2	ภาพโครงสร้างของฟองน้ำแบบตัดขวาง	5
2-3	ลักษณะการจับกันของเซลล์โดยมีเลคตินเป็นตัวเชื่อมจับจำเพาะกับน้ำตาลที่ผิวเซลล์ของแต่ละเซลล์เข้าด้วยกัน	8
3-1	ฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* ที่ใช้ศึกษาเลคติน	15
3-2	ฟองน้ำ *Haliciona* (*Reniera*) sp. ที่ใช้ศึกษาเลคติน	16
3-3	ฟองน้ำ *Callyspongia* (*Euplacella*) *joubini* ที่ใช้ศึกษาเลคติน	16
3-4	ฟองน้ำ *Hyrtios erecta* ที่ใช้ศึกษาเลคติน	16
3-5	ฟองน้ำ*Chondrilla australiensis* ที่ใช้ศึกษาเลคติน	16
3-6	กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	18
3-7	การทดสอบความสามารถของสิ่งสกัดในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม	21

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

รายการอักษรย่อ

มก.	มิลลิกรัม
มล.	มิลลิลิตร
AU	Absorbent unit
BSA	Bovine serum albumin
M	Molar
mg	Miligram
ml	Milliliter
mM	Millimolar
TBS	Tris-HCL buffer saline
TSB	Tryptic soy broth

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

บทที่ 1
บทนำ

ฟองน้ำจัดเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังดึกดำบรรพ์ที่สุดกลุ่มหนึ่งของโลก เป็นสัตว์ชั้นต่ำที่ไม่มีสมอง หรือระบบประสาทแบบพัฒนา แต่ตลอดระยะเวลาหลายร้อยล้านปี ขณะที่สัตว์อื่นที่มีการพัฒนาการสูงกว่าได้สูญพันธุ์ไป แต่ฟองน้ำยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้มาจนถึงปัจจุบัน เมื่อพิจารณาจากระบบภูมิคุ้มกันของฟองน้ำซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันมาแต่กำเนิด อาจเป็นไปได้ว่าฟองน้ำน่าจะมีวิธีการป้องกันตนเองทางชีวภาพ โดยการสร้างสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีน หรือกิจกรรมอื่นๆ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาสมบัติของเลคตินจากฟองน้ำทะเล ซึ่งในประเทศไทยส่วนใหญ่มีการศึกษาจากพืชชั้นสูงและสัตว์ ส่วนข้อมูลเลคตินจากฟองน้ำทะเลพบรายงานการวิจัยน้อยมาก อย่างไรก็ตามจากข้อมูลของเลคตินจากสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังที่มีการตรวจพบเลคตินทำให้มีความเป็นไปได้สูงที่จะตรวจพบสมบัติของเลคตินจากฟองน้ำทะเลในการยับยั้งจุลชีพ

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเลคตินที่สกัดได้จากฟองน้ำทะเลบริเวณเกาะสีชังและเกาะล้าน จังหวัดชลบุรี โดยทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ หรือ เอบีเกาะกลุ่ม
2. เพื่อศึกษาความสามารถของเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำทะเลในการยับยั้งแบคทีเรีย
3. เพื่อศึกษาความสามารถโปรตีนในสิ่งสกัดจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำในการยับยั้งแบคทีเรีย

สมมติฐานการวิจัย

ฟองน้ำในธรรมชาติมีความสามารถในการปรับตัวให้อยู่รอดจากการรบกวนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในระบบนิเวศ เช่น จุลินทรีย์ที่ให้โทษ อาจเป็นไปได้ว่าฟองน้ำมีวิธีการป้องกันตนเองทางชีวภาพ โดยการสร้างสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีน หรือไกลโคโปรตีนที่เรียกว่าเลคตินซึ่งทำหน้าที่คล้ายแอนติบอดีในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม ดังนั้นฟองน้ำทะเลซึ่งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่สนใจศึกษาอาจจะมีเลคตินที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม รวมทั้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ขอบเขตการวิจัย

1.ฟองน้ำที่นำมาศึกษาได้แก่ ฟองน้ำ 5 ชนิดที่นำมาจากบริเวณเกาะล้านและเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

2.เซลล์เม็ดเลือดแดงที่นำมาใช้ทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ และเอบี

3. ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้โดยนำมาศึกษาในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่แบคทีเรีย *Micrococcus luteus* TISTR No.884, *Staphylococcus aureus* TISTR No.517, และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR No.1647และ *Vibrio* จากบ่อเลี้ยงกุ้ง จังหวัดระยอง

สถานที่ทำการวิจัย

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ระยะเวลาทำการวิจัย

10 เดือน เริ่มวันที่ 1 เมษายน 2548 ถึงวันที่ 31 มกราคม 2549

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 รูปร่างลักษณะที่สำคัญของฟองน้ำ

การจัดอนุกรมวิธานของฟองน้ำ

Kingdom Plantae

Phylum Porifera

Class Demospongiae

ลักษณะทั่วไปของฟองน้ำ (บพิธ และนันทพร.2545)

ฟองน้ำจัดเป็นสัตว์หลายเซลล์ที่โบราณที่สุด ซึ่งจัดอยู่ในระดับการรวมตัวของโพรโทพลาซึม (protoplasmic grade) ไม่มีเนื้อเยื่อที่แท้จริง ไม่มีอวัยวะ การประสานงานน้อยมาก สถานะในสายวิวัฒนาการสูงกว่าโพรโทซัวที่เป็นโคโลนี แต่ยังไม่ได้เป็นเมทาซัวที่แท้จริง

ฟองน้ำเป็นสัตว์กลุ่มเดียวที่มีการเรียงจัดตัวของเซลล์ล้อมรอบระบบรู (pore system) ช่องทางผ่านของน้ำและโพรงภายในหรือแชมเบอร์ (chamber) ทำให้น้ำไหลผ่านเข้าและออกจากตัวอย่างต่อเนื่อง รูที่มีอยู่มากมายกระจายไปทั่วตัวเป็นที่มาของชื่อไฟลัม ขนาดของรูเล็กมากต้องดูจากกล้องจุลทรรศน์ และมีจำนวนมากเป็นพัน ๆ รู ช่องทางที่น้ำออกจากตัวจะเป็นรูที่มีขนาดใหญ่เห็นได้ด้วยตาเปล่า เรียกว่า ออสคูลัม (osculum)

เซลล์ทุกเซลล์ของฟองน้ำเป็นอิสระต่อกันในการรับออกซิเจน คายคาร์บอนไดออกไซด์ และขับถ่ายของเสียไนโตรเจนโดยการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ชั้นเซลล์ที่ห่อหุ้มอยู่ด้านนอกของฟองน้ำมีการเรียงตัวคล้ายเนื้อเยื่อ แต่ไม่มีการสร้างเยื่อฐาน (basal lamina) ดังที่พบในเมทาซัว และพบว่ามีการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ (intercellularjunction) อยู่เพียงไม่กี่แห่ง ดังนั้นชั้นของเซลล์ทั้งสองชั้นจึงยังไม่เป็นเนื้อเยื่อที่แท้จริง แต่เซลล์ของฟองน้ำมีลักษณะเด่นที่มีแนวโน้มเป็นเซลล์ประเภทโททิโพเทนต์ (totipotent) คือ เป็นเซลล์ที่สามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์อื่น และสามารถเคลื่อนที่ได้ดี

รูปร่างแบบพื้นฐานของฟองน้ำมีลักษณะเป็นท่อ หรือคล้ายโอ่ง หรือรูปร่างแบบแจกัน ดูเหมือนกับจะเป็นสมมาตรรัศมี แต่ตำแหน่งของรูและทางผ่านของน้ำทำให้ไม่เป็นสมมาตรรัศมีอย่างสมบูรณ์ และฟองน้ำส่วนใหญ่เจริญแผ่ออกปกคลุมวัตถุที่เกาะ หรืออาจเป็นปุ่มปมบนที่เกาะหรือเป็นก้อน หรือแตกแขนง จึงไม่สมมาตร (asymmetry) แม้ว่าฟองน้ำแต่ละชนิดมีลักษณะ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เฉพาะตัว แต่การเติบโตไม่มีรูปแบบที่แน่นอน การเติบโตแผ่ขยายออกไปอย่างต่อเนื่องได้รับอิทธิพลจากวัตถุที่ยึดเกาะและกระแสน้ำที่ผ่านตัวฟองน้ำ ดังนั้นฟองน้ำชนิดเดียวกันแต่เกาะกับวัตถุที่ต่างกันและอยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างกัน จึงมีรูปร่างที่ต่างกันมาก ฟองน้ำทะเลพบได้ทุกระดับความลึก บริเวณชายฝั่งที่สะอาดพบฟองน้ำได้มากชนิด ฟองน้ำส่วนใหญ่เติบโตปกคลุมอยู่ตามวัตถุแข็งโดยเฉพาะก้อนหิน และเปลือกหอย ฟองน้ำตามชายฝั่งเป็นฟองน้ำที่แผ่ไปกับวัตถุไม่เป็นแบบทรงสูง และมักมีสีสดใส ส่วนฟองน้ำที่อยู่ตามแนวปะการังมักเป็นแบบทรงสูง อาจแตกแขนงคล้ายพืชหรือมีลักษณะเป็นรูปถ้วยทรงสูง ฟองน้ำบางชนิดอาจสูงถึง 1 เมตร

ระบบท่อของฟองน้ำ(บพิธ และนันทพร,2545)

ฟองน้ำเป็นสัตว์เกาะติด(sessile animal) การดำรงชีวิตในน้ำไม่ว่าจะเป็นการกินอาหาร การสืบพันธุ์ต้องอาศัยการหมุนเวียนเอาน้ำรอบตัวเข้าไปแล้วไหลเวียนออกภายนอกอย่างต่อเนื่อง เกิดระบบท่อภายในในการหมุนเวียนน้ำ ฟองน้ำที่มีพื้นที่ผิวภายในน้อย(จำนวนโคเอนไซม์น้อย) ย่อมจะใช้ประโยชน์จากน้ำที่ไหลเวียนเข้าไปไม่ได้เต็มที่ การเติบโตจึงจำกัด การพัฒนาของฟองน้ำจึงเป็นการพัฒนาในเรื่องของการได้รับอาหารโดยการเพิ่มพื้นที่ผิวในการกินอาหารให้มากขึ้น ทำให้เกิดระบบท่อที่ซับซ้อนขึ้นเพื่อให้น้ำอยู่ภายในตัวได้มากขึ้นและนานขึ้น และน้ำจะสัมผัสกับพื้นที่ผิวในการกินอาหารได้มากขึ้น ระบบท่อของฟองน้ำมีรูปแบบพื้นฐานอยู่ 3 แบบ คือ

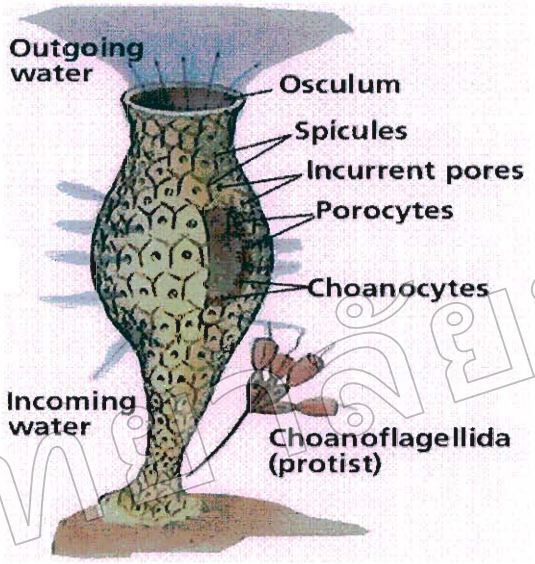
แบบแอสโคนอยด์ ฟองน้ำที่มีระบบท่อแบบแอสโคนอยด์ เรียกว่า ฟองน้ำแอสโคนอยด์ (asconoid sponge) เป็นฟองน้ำที่ซับซ้อนน้อยที่สุด ตัวอย่างที่รู้จักทั่วไป คือ *Leucosolenia* โดยเมื่อตัดผ่านผนังตัวจะพบพอโรไซต์กระจายอยู่ระหว่างพินาโคไซต์ที่เรียงตัวเป็นชั้นเซลล์ปกคลุมด้านนอก เมื่อน้ำและสารแขวนลอยที่ผ่านรูของพอโรไซต์ที่เรียกว่า ออสเทีย (ostia) ได้จะตรงเข้าสู่โพรงกลางตัวที่เรียกว่า สปันโกซิล (spongocoel) ที่บุด้วยโคเอโนไซต์แฟลเจลลัมของโคเอโนไซต์ทำให้เกิดแรงในการดึงน้ำเข้าและขับน้ำออกไปทางออสคูลัม

แบบไซโคนอยด์ ฟองน้ำที่มีระบบท่อแบบไซโคนอยด์เรียกว่า ฟองน้ำไซโคนอยด์ (syconoid sponge) ซึ่งมีความซับซ้อนมากกว่าฟองน้ำแอสโคนอยด์ ผนังตัวปูดออกในแนวรัศมีเกิดแขนงคล้ายนิ้วมือหลายร้อยถุง ยื่นออกไปจากโพรงลำตัวจึงเรียกว่า ท่อรัศมี (radial canal) หรือห้องรัศมี(radial chamber) ภายในถุงบุด้วยโคเอโนไซต์จำนวนมาก ภายในท่อเต็มไปด้วยแฟลเจลลัมจึงเรียกว่า ท่อแฟลเจลลัม (flagellated canal) หรือ ห้องแฟลเจลลัม (flagellate chamber) ท่อรัศมีเปิดเข้าสปันโกซิล เมื่อรวมพื้นที่ผิวของท่อรัศมีทั้งหมดจะมีพื้นที่มากกว่าพื้นที่ผิวของโพรงกลางตัว เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการหมุนเวียนและดักจับอาหาร

แบบลิวโคนอยด์ ฟองน้ำที่มีระบบท่อแบบลิวโคนอยด์เรียกว่า ฟองน้ำลิวโคนอยด์ (leuconoid sponge) ซึ่งมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากกว่าฟองน้ำแอสโคนอยด์กับฟองน้ำไซโคนอยด์

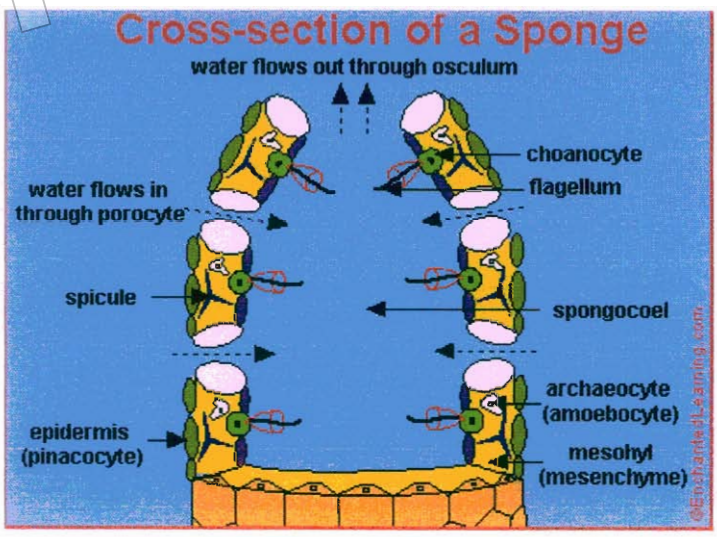
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โดยมีท่อหรือห้องขนาดเล็ก(small chamber) จำนวนมากที่ปูดออกไปรอบท่อรัศมี พื้นที่ผิวของโคเอโนไซต์จึงเพิ่มมากขึ้นอีกมาก



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างของฟองน้ำ

ที่มา: http://gened.emc.maricopa.edu/bio/BIO181/BIOBK/BioBookDiversity_7.html,วันที่ค้นข้อมูล 25 มกราคม 2549.



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างของฟองน้ำแบบตัดขวาง

ที่มา: www.enchantedlearning.com, วันที่ค้นข้อมูล 25 มกราคม 2549.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Class Demospongiae (บพิธ และนันทพร,2545)

ฟองน้ำที่รู้จักแล้วประมาณร้อยละ 95 เป็นฟองน้ำใน Class Demospongiae ชื่อของชั้นแปลว่า ฟองน้ำที่รวมกันด้วยสิ่งยึดเหนี่ยว ซึ่งหมายถึงเส้นคอลลาเจนหรือสปันจินที่เป็นโครงร่างของฟองน้ำถูตัวที่พบในทะเลเมดิเทอร์เรเนียน บริเวณอ่าวเม็กซิโกแถบคาริบเบียน และในแหล่งอื่นอีกไม่กี่แหล่ง ฟองน้ำถูตัวไม่มีสปิคูล นักประดาน้ำจะเก็บเกี่ยวเอาฟองน้ำขึ้นมาจากทะเล เมื่อเซลล์ต่างๆตายและสลายไปจะเหลือแต่ก้อนโครงร่างสปันจินซึ่งเมื่อนำไปฟอกล้างเซลล์ออกแล้วจะเป็นก้อนฟองน้ำที่ยืดหยุ่นได้ดีจึงนุ่มและอุ้มน้ำสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

ดีโมสปัน (demosponge) เป็นฟองน้ำลิวโคนอยด์ ส่วนใหญ่มีสปิคูลซิลิกอนที่เกาะเกี่ยวกันด้วยคอลลาเจนคอลลาเจนอาจเล็กมากจนไม่อาจเห็นได้นอกจากจะดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แต่ฟองน้ำบางชนิดก็มีขนาดใหญ่พอที่จะเห็นจากกล้องจุลทรรศน์ทั่วไป นอกจากฟองน้ำถูตัวใน วงศ์ Spongidae แล้ว ยังมีดีโมสปันอีกหลายสกุลที่ไม่มีสปิคูล และอีกอย่างน้อย 2 สกุลที่ไม่มีทั้งสปิคูลและคอลลาเจน คือ *Oscarella* และ *Harisarca* เป็นฟองน้ำที่นักสัตววิทยาเชื่อว่าโบราณที่สุดและไม่มีโครงร่าง สำหรับ *Spheciospongia* (cake-shaped loggerhead sponge) จากอ่าวเม็กซิโก และ *Porteion* (urn-like Neptune`s globlet) เป็นฟองน้ำขนาดใหญ่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางและความสูง 1-2 เมตร สปิคูลแบบแท่งเดี่ยวทั้งหมด สปิคูลของดีโมสปันมีรูปแบบต่างๆกัน และมีขนาดต่างกันชัดเจน 2 ขนาด สปิคูลของดีโมสปันไม่มีแบบหกแฉก จึงสามารถแยกออกจากฟองน้ำใน Class Hexactinellida ได้ง่าย

ฟองน้ำดีโมสปันในทะเลจะดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรียม ซูโอแซนเทลลีกลุ่มไดโนแฟลเจลเลต แบคทีเรีย และจุลชีพอื่นๆ สำหรับแบคทีเรียจะอยู่ภายในเซลล์อะมีโบไซต์ ส่วนไซยาโนแบคทีเรียมและซูโอแซนเทลลีจะอยู่นอกเซลล์ในมีโซฮิล

การสืบพันธุ์ของฟองน้ำ

การสืบพันธุ์ของฟองน้ำ คือ สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (sexual and asexual reproductions) แบบอาศัยเพศฟองน้ำแต่ละเพศสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ปล่อยออกไปผสมพันธุ์กันในน้ำทะเลหรือบางชนิดปล่อยสเปิร์มว่ายเข้าไปผสมกับไข่ของอีกตัวหนึ่ง ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะเจริญเป็นตัวอ่อนที่มีขนสั้นว่ายน้ำได้ ดำรงชีวิตเป็นแพลงค์ตอนชั่วคราว แล้วจึงจมลงเกาะวัตถุในน้ำเจริญเป็นฟองน้ำตัวใหม่ที่เกาะกับที่ตลอดไป อีกวิธีหนึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยมีกลุ่มเซลล์ของร่างกายเจริญงอกออกไปเป็นตัวใหม่ที่ยังคงติดกับตัวเดิม ทำให้ได้ฟองน้ำที่อยู่รวมกันเป็นโคโลนี แผ่คลุมพื้นที่มันอาศัยอยู่เป็นบริเวณกว้าง (สุรินทร์, 2532)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 ความหมายของเลคติน

เลคตินคือโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่จับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต และต้องไม่ได้สร้างจากระบบภูมิคุ้มกันหรือเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตที่จับอยู่ (Kocourek, and Horejsi. 1981) เลคตินสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มและ/หรือตกตะกอนโมเลกุลที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบ และการเกาะกลุ่มของเซลล์โดยเลคตินสามารถยับยั้งได้โดยน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (Goldstein *et al*., 1980)

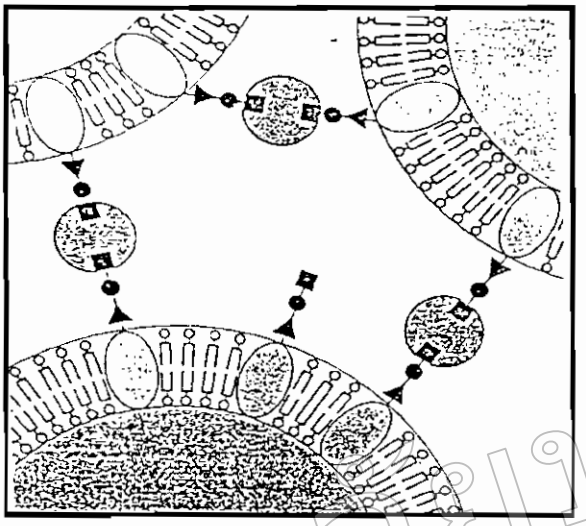
เลคตินสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือตกตะกอนคาร์โบไฮเดรตได้ เพราะโมเลกุลของเลคตินมีบริเวณจับคาร์โบไฮเดรตอย่างน้อยที่สุด 2 บริเวณ จึงสามารถเชื่อมเซลล์กับเซลล์ไว้ด้วยกันโดยการจับกับน้ำตาลที่ผิวเซลล์ (Singh *et al*., 1999) ความสามารถเหล่านี้ยับยั้งได้โดยน้ำตาลจับจำเพาะกับเลคติน (Liener *et al*., 1986)

2.3 คุณสมบัติของเลคติน

การเกาะกลุ่มของเซลล์และการจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรตของเลคติน

เลคตินสามารถจับจำเพาะคาร์โบไฮเดรตอย่างเฉพาะเจาะจงด้วยแรงอย่างอ่อนไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ และการจับนั้นสามารถผันกลับได้จึงเหมือนการจับแอนติบอดีกับแอนติเจน หรือการจับเอนไซม์กับตัวยับยั้ง (จารณี, 2538) ซึ่งเลคตินสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มได้ โดยอาศัยการจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต จึงสามารถเชื่อมเซลล์กับเซลล์ไว้ด้วยกัน การเกาะกลุ่มของเซลล์เกิดขึ้นได้เมื่อการจับของเลคตินกับเซลล์ทำให้เกิดสะพานเชื่อมระหว่างเซลล์หลายๆสะพานอย่างเหมาะสม ดังแสดงในภาพที่ 2-3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-3 ลักษณะการจับกันของเซลล์โดยมีเลคตินเป็นตัวเชื่อมจับจำเพาะกับน้ำตาลที่เซลล์ของแต่ละเซลล์เข้าด้วยกัน (ที่มา : Sharon, 1977)

2.4 ประโยชน์ของเลคติน

เลคตินได้รับการประยุกต์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในงานวิจัย และการแพทย์ เลคตินมีหลายชนิด และแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตต่างกัน รวมทั้งเลคตินมีเสถียรภาพสูง การจับของเลคตินกับคาร์โบไฮเดรต หรือเซลล์ผันกลับได้โดยแซคคาไรด์โมเลกุลเล็กและสารชีวโมเลกุลที่จับจำเพาะ เลกตินต้องมีส่วนคาร์โบไฮเดรตอยู่ในโมเลกุล ดังนั้นการจับของเลคตินจึงใช้เป็นหลักฐานแสดงว่าตัวต้อนรับที่ผิวเซลล์สำหรับฮอร์โมน สารเร่งการเจริญเติบโต สารสัญญาณประสาท หรือสารพิษ เป็นโมเลกุลที่มีส่วนคาร์โบไฮเดรตเชื่อมอยู่โดยการประยุกต์ใช้มีในด้านต่างๆ ดังนี้

การแยกเซลล์

กลุ่มของเซลล์โดยทั่วไปไม่ว่าเซลล์สัตว์ เซลล์พืช หรือเซลล์จุลินทรีย์ สามารถแบ่งเป็นเซลล์กลุ่มย่อยโดยเลคตินได้ เมื่อเซลล์เหล่านั้นมีความแตกต่างของน้ำตาลที่ผิวเซลล์ทำให้สามารถแยกเซลล์ที่ไม่จับเลคตินออกจากเซลล์ที่จับเลคติน และเนื่องจากการจับของเลคตินกับเซลล์ผันกลับได้เมื่อเติมน้ำตาลจำเพาะลงไป ทำให้นำเซลล์ที่จับเลคตินกลับคืนมาได้ในสภาพที่มีชีวิตสมบูรณ์ และไม่ถูกทำลาย

การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

เลคตินทำให้แบคทีเรียเกาะกลุ่มได้จึงถูกใช้ในการบ่งชี้คุณลักษณะจำเพาะของเชื้อนั้นได้ ตัวอย่างเช่น *Bacillus antracis* เป็นแบคทีเรียที่ตรวจสอบได้ยากในคลีนิคแต่สามารถบ่งชี้ได้ง่าย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อเกิดการเกาะกลุ่มโดยเลคตินจากถั่วเหลืองและไม่เกาะกลุ่มโดยเลคตินจากหอยทาก ในปัจจุบันเลคตินใช้บ่งชี้คุณลักษณะจำเพาะของแบคทีเรียได้หลายสกุล เช่น *Bacillus*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* และ *Lagionella* เป็นต้น

การตรวจหมู่เลือด

เนื่องจากเลคตินบางชนิดมีความจำเพาะต่อหมู่เลือดในระบบเอบีโอ และระบบเอ็มเอ็น จึงสามารถใช้เลคตินในการตรวจหมู่เลือดได้โดยเฉพาะในกรณีของเลือดหมู่โอสามารถตรวจได้รวดเร็วกว่าวิธีการตรวจด้วยแอนตีซีรัม นอกจากนี้เลคตินยังสามารถเตรียมได้ง่ายและเก็บได้นานกว่าแอนติซีรัมด้วย

ตารางที่ 2-1 เลคตินจากพืชที่จำเพาะต่อหมู่เลือด (ดารารัตน์, 2536)

Blood group	source
A	*Phaseolus limensis*, *Vicia cracca*, *Crotalaria aegyptiaca*, *Dolichos biflorus*
B	*Griffonia simplicifolia* (b_4), *Marasmius orcades*
A + B	*Saphora japonica*, *Calpurina aurea*
O (H)	*Lotus tetragonolobus*, *Ulex europeus*, *Cytisus sessilifolius*, *Laburnum alpinum*
N	*Vicia graminea*, *Bauhinia purpurea*
M	*Lris amara*

2.5 เลคตินจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

เลคตินตรวจพบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทุกประเภททั้ง ปู กุ้งก้ามกราม หอย ฟองน้ำ ปะการังอ่อน และแมลง ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของของเหลวในร่างกายหรือน้ำเมือกของ สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง(Olafsen, 1988) ข้อมูลของเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์และศึกษาไว้อย่างละเอียดแล้วได้แก่เลคตินจากหอยทาก(*Helix pomatia*) และเลคตินจากแมดาทะเล (*Limulus polyphemus*) เป็นต้น

หน้าที่ทางชีวภาพของเลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

เลคตินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีมากในน้ำเหลืองเลือด เนื่องจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไม่มีแอนติบอดีจึงอาจเป็นไปได้ว่าเลคตินในน้ำเหลืองเลือดอาจทำหน้าที่เหมือนแอนติบอดีในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมผ่านทางสารน้ำและเซลล์ นอกจากหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมแล้วเลคตินยังมีบทบาททางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการกินอาหารการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิตแบบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ซิมไบโอซิส การลงเกาะของตัวอ่อน และการสืบพันธุ์ เป็นต้น (Maki and Mitchell, 1986 and Vasta, 1991)

การศึกษาเลคตินจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเริ่มศึกษาจากแมงดาทะเลในสกุล *Limulus* (Singh และคณะ, 1999)

ในปี ค.ศ.1986 Hisao และคณะ ได้ทำการศึกษาและทำการแยกเลคตินจากฟองน้ำ *Phyllospongia foliascens* ด้วยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี คอลัมน์ acid-treated เชื่อมกับ Sepharose 4B พบว่า สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนและกระต่ายเกาะกลุ่มได้ และการเกาะกลุ่ม จะถูกยับยั้งด้วยน้ำตาล Lactose, N-acetyl-D-galactosamine, D-galacturonic acid และ N-acetyl-neuraminic acid

ในปี ค.ศ. 2002 Rajagopalan และคณะได้ทำการแยกเลคตินจากน้ำเลือดกุ้งขาว โดยใช้เทคนิคแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี คอลัมน์ N-acetylglucosamine-Sepharose 6B และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชันด้วยเครื่อง HPLC และอิเล็คโตรโฟรีซีส พบว่าเลคตินมีมวลโมเลกุล 200 kDa ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยๆที่เหมือนกันมีขนาด 27 kDa และเลคตินนี้ไม่ต้องการโลหะไอออนเพื่อช่วยในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

ในปี ค.ศ. 2002 Ivana และคณะ ได้ทำการสกัดเลคตินจากฟองน้ำ *Haliclona eratera* โดยวิธีการแลกปลี่ยนไอออน และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน พบว่าเลคตินมีมวลโมเลกุล 29 kDa และเลคตินสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคน หมู่เอ บี โอ เอบี และเม็ดเลือดแดงแกะที่ไม่มีการปรับปรุงด้วยเอนไซม์เกาะกลุ่มได้ และเลคตินนี้ไม่ต้องการโลหะไอออนเพื่อช่วยในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

ในปี ค.ศ.2004 Alexander และคณะ ได้ทำการศึกษาและแยกเลคตินจากหอยสองฝา *Ruditapes philippinarum* โดยใช้วิธีแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟีที่มีมิวซิน เชื่อมกับ Sepharose พบว่าเลคตินมีมวลโมเลกุล 138 kDa และจากการแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีขนาด 74 34 และ 30 kDa ซึ่งในการทำงานของเลคตินจากหอยสองฝาไม่สามารถยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่สามารถยับยั้งได้โดย N-acetyl-D-galactosamine และ α-l-acid glycoprotein

2.6 การศึกษาเลคตินจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในประเทศไทย

อู่แก้ว ประกอบไวทยกิจ บีเวอร์ (2534) ได้มีการศึกษาเลคตินในหอยน้ำจืด 4 ชนิด และหอยทะเล 1 ชนิด และได้มีการทดสอบเลคตินจากแต่ละส่วนของหอยเชอรี่ หรือ *Ampullarius*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

canaliculata (Larmarck) ได้แก่ เนื้อเยื่อทั้งตัว ไข่ และน้ำเมือกผสมปนกับ haemolymph พบว่าเลคตินจากสองส่วนหลังมีความจำเพาะต่อน้ำตาล raffinose และmucin

งามจิตร วังศรี (2547) ได้ศึกษาสมบัติบางประการของเลคตินจากปะการังอ่อน พบว่าการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเลคตินที่สกัดจากปะการังอ่อน (*Sinularia erecta*) โดยศึกษาการเกาะกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดง พบว่ามิวคัสสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่เอ บี เอบี และโอเกาะกลุ่มได้ 2^{7}, 2^{9},2^{8} และ2^{5} ไตเตอร์ตามลำดับ และการทดสอบกับเม็ดเลือดแดงสัตว์ได้แก่ หนูแรท หนูขาว หนูตะเภา ไก่ ห่าน ม้า หมู พบว่าสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ 2^{3}, 2^{5},2^{7}, 2^{8}, 2^{6}, 2^{8} และ 2^{4} ไตเตอร์ตามลำดับ และการเกาะกลุ่มนี้ถูกยับยั้งได้โดยน้ำตาลโมเลกุลเล็ก และไกลโคโปรตีน ได้แก่ N-Acetyl-D-Galactosamine, Raffinose, D-Galactose, Melibiose และMucin และจากการศึกษาบทบาทของเลคตินจากมิวคัสของปะการังอ่อนในการเกาะกลุ่มของเซลล์จุลินทรีย์โดยวิธีการสเมียร์ พบว่าสามารถทำให้เซลล์ของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC25923 กับ *Vibrio harveyi* เกาะกลุ่มและยับยั้งการเจริญได้ 85.71% และ 31.25% ณ เวลา 1 ชั่วโมง

เทียมจิตร ไชยชนะ (2543) ได้ศึกษาเลคตินในปะการังอ่อนจากชายฝั่งทะเล ภาคตะวันออกของประเทศไทย จากปะการังอ่อนที่นำมาตรตรวจหาเลคติน 9 ชนิด พบว่าโปรตีนในสิ่งสกัดจากปะการังอ่อน 6 ชนิด สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนหรือสัตว์เกาะกลุ่มได้ในช่วง 2-2^{7} ไตเตอร์ โดยที่สิ่งสกัดจากปะการังอ่อน *Sinularia* sp. ทำให้เม็ดเลือดแดงหนูตะเภาเกาะกลุ่มได้มากที่สุด 2^{7} ไตเตอร์ และยังสามารถทำให้จุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* เกาะกลุ่มได้

2.7 การศึกษาสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ

ในปี ค.ศ. 1994 Oclarit และคณะ ได้ศึกษาสารสกัดจากฟองน้ำทะเลที่เก็บแถบชายฝั่งของ Oshima Island ของประเทศญี่ปุ่น เพื่อทดสอบสารสกัดที่ได้นั้นผลิตมาจากฟองน้ำทะเล หรือแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำ โดยคัดแยกแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลของแต่ละสายพันธุ์เลี้ยงใน marine medium และศึกษาคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี filter-paper disc diffusion technique พบว่า M22-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำ *Hyatella* sp. นั้นมีคุณสมบัติในการต้าน *Bacillus subtilis* และเมื่อนำสารนั้นมาทดสอบทางเคมีพบว่าเป็นสารประเภท peptide antibiotic คือ andimide เป็นสารชนิดเดียวกับที่ฟองน้ำนั้นหลั่งออกมา เมื่อนำแบคทีเรียไปจัดจำแนกชนิดทางชีวเคมี ปรากฏว่าเป็นเชื้อ *Vibrio* sp. จึงสันนิษฐานว่าสารที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟองน้ำทะเลที่หลั่งออกมานั้น อาจสร้างขึ้นมาจากแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำ

ชุติวรรณ และคณะ (2544) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำบางชนิดในจังหวัดชลบุรี แบคทีเรีย 194 สายพันธุ์ แยกได้จากฟองน้ำ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

34 ตัวอย่าง ที่เก็บจากบริเวณเกาะสาก เกาะครก เกาะล้าน เกาะแสมสาร เกาะขาม เกาะริ้น จังหวัดชลบุรี โดยการเกลี่ยกระจายบนอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย (ORI medium) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โดยใช้วิธี Agar Disc Diffusion Assay พบว่ามี 9 สายพันธุ์แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีต่อ *Stapphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, และ/หรือ *Vibrio anguilrum* คือ IMS 233-7 , IMS 234-2 , IMS 238-3 , IMS 238-4 , IMS 242-2 , IMS 245-2 , IMS 261-3 , IMS 267-2 , และ IMS 267-4 เป็นแบคทีเรียกรัมลบ รูปท่อน แต่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน เมื่อเลือกสายพันธุ์ IMS 233-7 ที่มีประสิทธิภาพดี และคงที่มาเพาะเลี้ยง และทำการสกัดส่วนเซลล์ด้วยสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (1:2) ทำการแยกด้วยเอธิลอะซิเตตและน้ำ ส่วนอาหารที่เลี้ยงสกัดด้วยเอธิลอะซิเตต พบว่า สารสกัดส่วนของเซลล์และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* ได้ดีตั้งแต่ระดับ 50 ไมโครกรัมต่อดิสก์

เนื้อทิพย์ (2541) ได้ทำการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากเมือกหอยทากยักษ์ (*Achatina fulica* Bowdich 1822) โดยการแยกส่วนที่เป็นเมือก (mucus) จากหอยทากยักษ์ด้วย DEAE – Cellulose ion exchange สามารถแยกสารออกได้เป็น 5 ส่วน โดยที่ส่วนที่สองมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Stapphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด และเมื่อนำส่วนที่สองทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Gel filtration ใช้ Sephadex G-150 ได้พีคของโปรตีน 5 พีค และมีเพียง 1 พีคเท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ และพบว่าเป็นสารไกลโคโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุล 130,000 ดาลตัน เมื่อใช้ SDS-PAGE ได้แถบของโปรตีน 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 64,000 ดาลตัน แสดงว่าสารที่สามารถยับยั้งเชื้อได้มี 2 หน่วยย่อย มีสมบัติในการเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยสามารถฆ่าเชื้อ *Stapphylococcus aureus* ค่า MIC ของสารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีค่า 4 ไมโครกรัม/มล. นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนของเมือกมีโปรตีเอสแต่ไม่ย่อยสารปฏิชีวนะ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

ชื่ออุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
API 20E	Biomerieux. U.S.A
Autoclave, Model HV-110	Hirayama, Japan
Centrifuge refrigerated, Model CD-100R	Tomy Seiko, Japan
Centrifuge high speed refrigerated, Model RS -18 III	Tomy Seiko, Japan
Compound Microscope. Model BH-2	Olympus, Japan
Drying Oven Model DS-62	Yamato, Japan
Microtiter plate, V-shape	Brand, Germany
pH meter	Mettler Toledo,Switzerland
Ultrasonic processor Model UP-420A	Sonicor, U.S.A.
UV-Visible Speetrophotometer, Type UV 310	Unicam, United Kingdom

สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	
Bovine serum albumin	Sigma, U.S.A.
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck, Germany

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Bacto-Tryptone	Difco, U.S.A.
Bacto-Soytone	Difco, U.S.A.
Bacto-Agar	Difco. U.S.A.
Glucose	Fluka. Switzerland
Sodium chloride	Merck. Germany
Dipotassium phosphate	Merck. Germany

สารเคมีอื่นๆ

Ethanol, absolute	Merck. Gennany
Magnesium chloride hexahydrate	BDH. England
Manganese (II) chloride tetrahydrate	BDH. England
Phosphoric acid, 85%	BDH. England
Sodium chloride	Merck. Germany
di-Sodium Ethylenediaminetetraacetic acid	BDH. England

3.2 เลือดที่ใช้ทดสอบเลคติน

เลือดที่นำมาใช้ทดสอบเลคตินคือ เลือดคน โดยเลือดคนเป็นเลือดหมู่เอ บี โอ และเอบี ที่ได้รับบริจาคจากศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี เลือดที่ได้เป็นเลือดหมดอายุไม่เกิน 1 เดือน มีอายุการใช้งานในช่วงเวลาประมาณ 20-30 วันหลังจากได้รับเลือด

3.3 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต

Micrococcus luteus TIRTR No. 884	แกรมบวก
Staphylococus aureus TISTR No.517	แกรมบวก
Pseudomonas aeruginosa TISTR No.1467	แกรมลบ
Vibrio จากบ่อเลี้ยงกุ้ง จังหวัดระยอง	แกรมลบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.4 การเตรียมตัวอย่างสิ่งสกัดจากฟองน้ำทะเล

3.4.1. ฟองน้ำทะเลที่ใช้ศึกษา

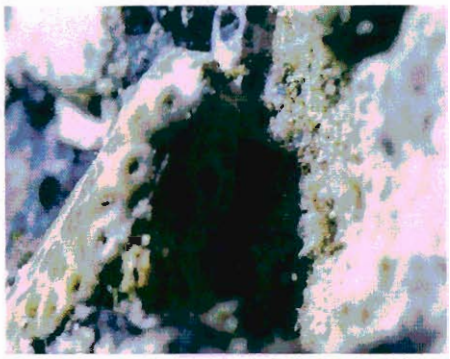
ตัวอย่างฟองน้ำทะเลต่างๆแสดงในภาพที่ 3-1 ถึง ภาพที่ 3-5 เก็บตัวอย่างโดยใช้อุปกรณ์ดำน้ำ (scuba) จากเกาะล้านและเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี เก็บฟองน้ำสดใส่ถุงพลาสติกใต้น้ำทะเล โดยใส่น้ำทะเลให้ท่วมฟองน้ำปิดปากถุงให้แน่น วางถุงที่มีตัวอย่างที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นขนส่งตัวอย่างจากฝั่งมายังห้องปฏิบัติการโดยแช่ถุงตัวอย่างในน้ำแข็ง

เมื่อถึงห้องปฏิบัติการล้างทำความสะอาดฟองน้ำด้วยน้ำทะเลแล้วแยกออกเป็นสองส่วนส่วนแรกนำมาทำการสกัดโดยตัดเนื้อเยื่อฟองน้ำเพื่อชั่งน้ำหนักให้ได้ประมาณ 5-10 กรัม แล้วล้างฟองน้ำเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ เช่น ตะกอนออก จากนั้นทำการบดเนื้อเยื่อฟองน้ำโดยใส่น้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 5 มิลลิลิตร จนละเอียด ดูดส่วนที่เป็นน้ำที่ได้จากการบด 1 มิลลิลิตรทำการเจือจางตัวอย่างจากการบดให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการในน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้ว

อีกส่วนหนึ่งแช่ในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ไว้สำหรับจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธานซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากดร.Leen van Ofwegen จาก National Museum of Natural History ประเทศเนเธอร์แลนด์

ภาพที่3-1 ตัวอย่างของฟองน้ำ
Spheciospongia congenera (LANT-05)
ภาพตัวอย่างโดย คุณสุเมตต์ ปุจฉาการ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่3-2 ตัวอย่างของฟองน้ำ

Haliclona (Reniera) sp.(LKRK-05)

ภาพตัวอย่างโดย คุณสุเมตต์ ปุจฉาการ

ภาพที่3-3 ตัวอย่างของฟองน้ำ

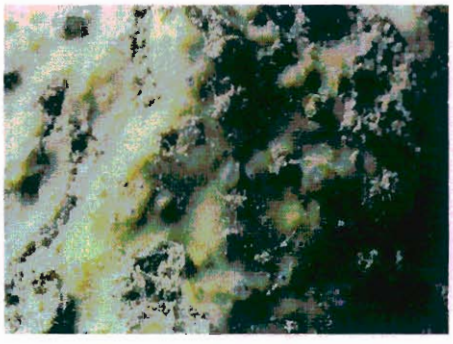
Callyspongia(Euplacella) joubini (LNOL-07)

ภาพตัวอย่างโดย คุณสุเมตต์ ปุจฉาการ

ภาพที่3-4 ตัวอย่างของฟองน้ำ

Hyrtios erecta (LNOL-07)

ภาพตัวอย่างโดย คุณสุเมตต์ ปุจฉาการ



ภาพที่3-5 ตัวอย่างของฟองน้ำ

Chondrilla australiensis(SICA-04)

ภาพตัวอย่างโดย คุณสุเมตต์ ปุจฉาการ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.4.2. การวิเคราะห์ปริมาณเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำทะเลโดยทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (Haemagglutination test)

1. การเตรียม 4% เม็ดเลือดแดง

การเตรียมสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์

ชั่ง NaCl หนัก 8.50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

การเตรียม 4% เม็ดเลือดแดง

นำเลือดใส่ลงในหลอดเหวี่ยงที่มีขีดบอกปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 40 มิลลิลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์ถ่วง ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำเลือดส่วนบนทิ้ง ล้างเม็ดเลือด โดยเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในตะกอน คน และหมุนเหวี่ยง ล้างเม็ดเลือดดังนี้ 3 ครั้ง และครั้งสุดท้ายอ่านปริมาตรของเม็ดเลือดที่ได้เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงเป็น 4 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่างเช่น อ่านปริมาตรเม็ดเลือดแดงหลังการล้างครั้งสุดท้ายได้ปริมาตรเป็น 2.0 มิลลิลิตร ต้องเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์จนได้ปริมาตรเป็น 50.0 มิลลิลิตร

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

การวิเคราะห์ทำในแผ่นไมโครไตเตอร์ (microtiter plate) ชนิด 8X12 หลุม ลักษณะก้นหลุมเป็นรูปตัววี มีความจุหลุมละ 300 ไมโครลิตร ตามขั้นตอนดังนี้

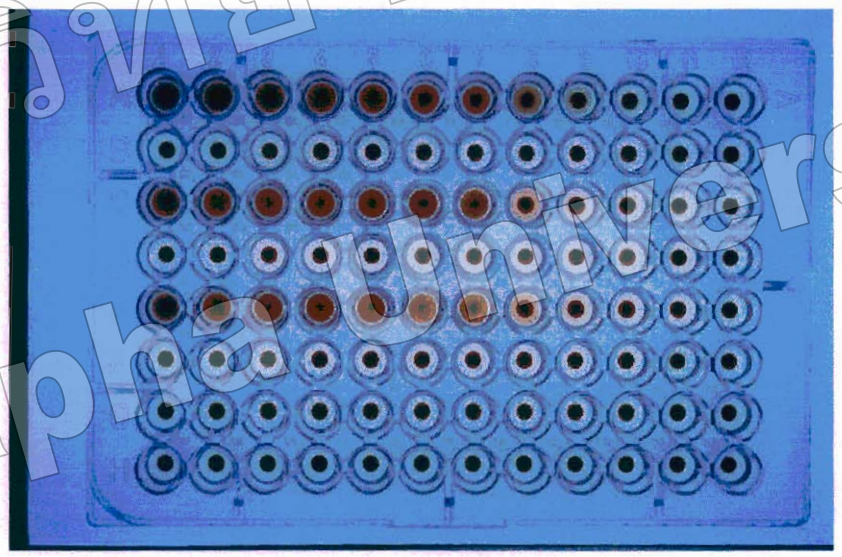
เติมสารละลาย 0.01 M TBS ลงไปทุกหลุมหลุมละ 50 ไมโครลิตร

ปิเปตสิ่งสกัดจากฟองน้ำปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุมที่หนึ่ง ปิเปตสารละลายจากหลุมที่หนึ่งมา 50 ไมโครลิตร ผสมในหลุมที่สอง ปิเปตสารละลายในหลุมที่สองขึ้นมา 50 ไมโครลิตร ผสมในหลุมที่สาม ทำดังนี้เป็นลำดับตั้งแต่หลุมบนซ้ายไปขวา (A1 ถึง B12) และจากบนลงล่างสรุปขณะนี้ทุกหลุมมีเลคตินที่เจือจางต่างกันในปริมาตร 50 ไมโครลิตร จำนวน 24 หลุม จากนั้นเติม 2% เม็ดเลือดแดงลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ทำการทดสอบดังนี้ 3 ชุด แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงสังเกตการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและบันทึกผล หลุมที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงแผ่กระจายเป็นวงกลมขนาดใหญ่ที่ก้นหลุม ส่วนหลุมที่เม็ดเลือดแดงไม่เกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงกองรวมเป็นจุดเล็ก ๆ อยู่กลางก้นหลุม และนับจำนวนหลุมทั้งหมดที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1 การคำนวณปริมาณเลคติน

จากผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มหาปริมาณเลคตินอย่างคร่าวๆ ได้จากค่าการเจือจางมากที่สุดที่เลคตินยังสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มมีค่าเป็น 2^n เมื่อ n คือ จำนวนหลุมที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ตัวอย่างเช่น จากภาพ 3-3 สิ่งสกัดจากฟองน้ำสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มถึงหลุมที่ 7 จึงมีปริมาณเลคตินเท่ากับ 2^7 หรือเท่ากับ 128 ไตเตอร์ต่อปริมาตรสิ่งสกัดได้ 50 ไมโครลิตร หรือ 2,560 ไตเตอร์/มิลลิลิตร



ภาพที่ 3-6 ตัวอย่างการทดสอบความสามารถของสิ่งสกัดในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม สารละลายที่ใช้ทดสอบ คือ สิ่งสกัดจากฟองน้ำทะเล การทดสอบทำ 3 ชุด ชุดละ 24 หลุม (1A-12B, 1C-12D และ1E-12F) และชุดควบคุม ได้แก่ 1G-12H

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดจากฟองน้ำโดยวิธีของ Bradford

การเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.02% BSA ชั่ง Bovine serum albumin หนัก 0.2500 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนแล้วเติมน้ำจนได้ปริมาตร 25.00 มิลลิลิตรเป็นสารละลาย1.0% BSA จากนั้นปิเปต 1.0% BSA ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม TBS จนได้ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย Coomassie ชั่ง Coomassie Brilliant Blue G-250 หนัก 0.025 กรัม ละลายใน 95% เอธานอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม 85% กรดฟอสฟอริก 50 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร สารละลาย Coomassie ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน 0.02% BSA ปริมาตรต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2 เติม 0.01 โมลาร์ TBS จนได้สารละลายโปรตีนปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย Coomassie ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ผสมแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำมาเขียนกราฟกับปริมาณโปรตีนที่เติมลงไป จะได้กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 3-7

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ

ปิเปตสารตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Coomassie 5.0 มล. ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปอ่านปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานและคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง (Bradford, 1976)

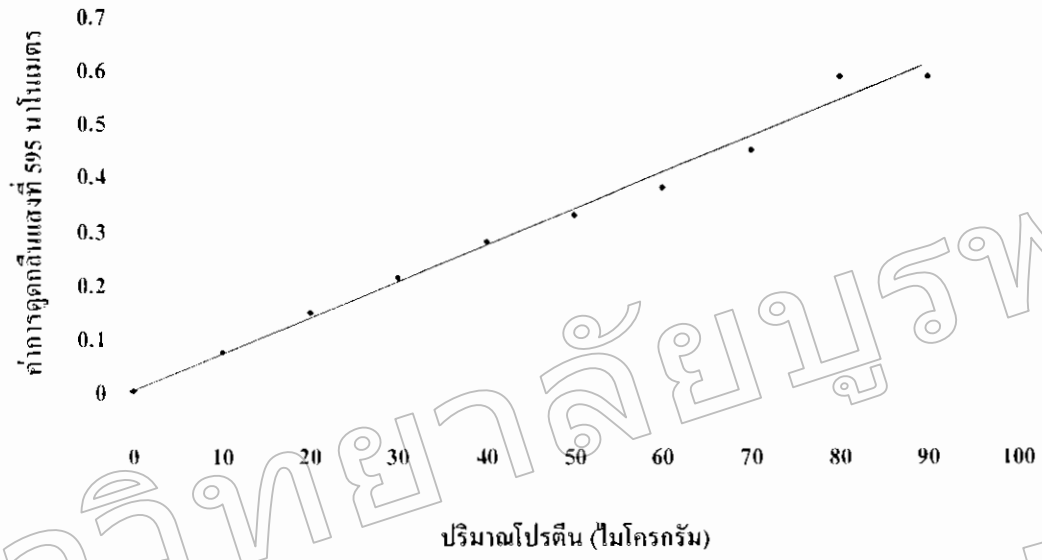
ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดฟองน้ำ ปิเปตสิ่งสกัดจากฟองน้ำที่เจือจาง 20 เท่า ด้วย 0.85% NaCl ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.364 นำไปอ่านปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานได้ 57.847 ไมโครกรัม แล้วคำนวณปริมาณโปรตีนในสิ่งสกัดจากฟองน้ำได้ 57.847 x 20ไมโครกรัมในสิ่งสกัด500ไมโครลิตร หรือ 1156.94 มิลลิลิตร/มิลลิกรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตาราง 3-1 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

หลอด	0.02% BSA (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลาย Coomassie (มล.)	การดูดกลืนแสง ที่ 595 นาโนเมตร	ปริมาณ โปรตีน (ไมโครกรัม)
blank	0	500	5.0	0.000	0
1	50	450	5.0	0.072	10
2	100	400	5.0	0.146	20
3	150	350	5.0	0.212	30
4	200	300	5.0	0.277	40
5	250	250	5.0	0.328	50
6	300	200	5.0	0.377	60
7	350	150	5.0	0.447	70
8	400	100	5.0	0.585	80
9	450	50	5.0	0.585	90
สิ่งสกัด	500	-	5.0	0.598	

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3-8 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

4. การทดสอบสิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำทะเลและเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

4.1 การทดสอบเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

ศึกษาเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำทะเลในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน ทำการทดสอบบนอาหารเหลว TSB ปิเปตสิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำทะเลได้แก่ฟองน้ำ *Chondrilla australiensis* (SICA-04) ฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* (LANT-05) ฟองน้ำ *Haliclona (Reniera)* sp. (LKRK-05) ฟองน้ำ *Callyspongia (Euplacella) joubini* (LSAB-02) ฟองน้ำ *Hyrtios erecta* (LNOL-07) 80 ไมโครลิตรผสมกับเซลล์แบคทีเรีย 20 ไมโครลิตร โดยทำควบคู่กับชุดควบคุมเปรียบเทียบโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์แทนสิ่งสกัดซึ่งจะทำการปิเปตน้ำเกลือปริมาตร 80 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างทุกๆ 1 ชั่วโมง โดยทำการเจือจางตัวอย่างตามความเข้มข้นตามที่ต้องการ แล้วปิเปตตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เพื่อทำการสเปรดเพลท (spread plate) บนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง(% inhibition) และค่า Attractive unit

4.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำและการทดสอบสิ่งสกัดโปรตีนจากฟองน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

นำฟองน้ำตัวอย่างมาตัดเนื้อเยื่อฟองน้ำ จากนั้นทำการบดเนื้อเยื่อฟองน้ำโดยใส่น้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ 5 มล. ดูดส่วนที่เป็นน้ำทำการเจือจางตัวอย่างแบบอนุกรมให้ได้ความเข้มที่ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} ตามลำดับในน้ำทะเลปราศจากเชื้อที่เตรียมไว้ จากนั้นดูดน้ำตัวอย่างที่เจือจางได้ความเข้มข้น 10^{-3} และ 10^{-4} ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Modified Zobell plate แล้วเกลี่ยเชื้อบนผิวอาหาร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน และทำการนับจำนวนโคโลนีที่เจริญขึ้นในแต่ละจานเพาะเลี้ยง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันในแต่ละจานเพาะเชื้อของฟองน้ำมาทำให้บริสุทธิ์ (purification) โดยการเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่เลือกลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 1-2 วัน เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์นำไปเก็บรักษาสายพันธุ์ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell

การเลี้ยงแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำเพื่อศึกษาโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โดยนำเชื้อที่บริสุทธิ์เลี้ยงในอาหารเหลว Modified Zobell 2.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว Modified Zobell 150 มล.บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที จะได้ส่วนตะกอนและส่วนใส นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียซึ่งมีวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.1 โดยทำการปิเปตสิ่งสกัดโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำแทนสิ่งสกัดจากฟองน้ำ

สูตรการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) และค่า Attractive unit

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{No. of colonies (control-test)}}{\text{No. of colonies control}} \times 100$$

$$\text{Attractive unit} = \frac{\text{No. of colonies control}}{\text{No. of colonies sample}}$$

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ความสามารถของเลคตินจากฟองน้ำทะเลในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

จากการนำเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำทั้ง 5 ชนิดที่เก็บจากบริเวณเกาะล้าน ได้แก่ ฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* (LANT-05), ฟองน้ำ *Haliclona (Reniera)* sp. (LKRK-05), ฟองน้ำ *Callyspongia (Euplacella)joubini* (I.SAB-02), ฟองน้ำ*Hyrtios erecta* (LNOL-07) และจากเกาะสีชัง ได้แก่ ฟองน้ำ *Chondrilla australiensis* (SICA-04)มาทดสอบการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม โดยทดสอบกับเม็ดเลือดแดงคนหมู่ เอ บี โอ และเอบี ได้ผลดังแสดงในตารางที่4-1 จากความสามารถของเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่ เอ บี โอ และเอบีเกาะกลุ่มได้ 8, 512, 32 และ 2048 ไตเตอร์ โดยการทดสอบสิ่งสกัดที่ผ่านการต้มแล้วเป็นเวลา 30 นาที พบว่าสิ่งสกัดจากฟองน้ำทั้ง 5 ชนิดไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้ แสดงว่าการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเกิดจากโปรตีน เมื่อโปรตีนเสียสภาพในความร้อนจึงไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้

ตารางที่ 4-1 ความสามารถของเลคตินจากฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่ม

ฟองน้ำ	ความสามารถของเลคตินในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (ไตเตอร์)			
	A	B	O	AB
Hyrtios erecta	8	512	32	2048
Spheciospongia congenera	64	64	16	16
Callyspongia (Euplacella)joubini	8	8	128	16
Haliclona (Reniera) sp.	0	4	128	2
Chondrilla australiensis	256	32	16	8

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.2 ความสามารถของสิ่งสกัดโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่ม

ในการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม โดยทดสอบกับเม็ดเลือดแดงคนหมู่ เอ บี โอ และเอบี ได้ผลดังแสดงในตารางที่4-2 พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทุกชนิดไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่มได้

ตารางที่ 4-2 ความสามารถของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงคนเกาะกลุ่ม

ตัวอย่าง	ความสามารถของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (ไตเตอร์)			
	A	B	O	AB
ฟองน้ำLKRK-05				
เชื้อLKRK05-1	0	0	0	0
เชื้อLKRK05-2	0	0	0	0
ฟองน้ำLANT-05				
เชื้อLANT05-2	0	0	0	0
เชื้อLANT05-3	0	0	0	0
เชื้อLANT05-4	0	0	0	0
เชื้อLANT05-5	0	0	0	0
ฟองน้ำLNOL-07				
เชื้อLNOL07-2	0	0	0	0
เชื้อLNOL07-3	0	0	0	0
เชื้อLNOL07-7	0	0	0	0
ฟองน้ำLSAB-02				
เชื้อLSAB02-1	0	0	0	0
เชื้อLSAB02-4	0	0	0	0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.3 ความสามารถของเลคตินจากฟองน้ำและเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

จากการศึกษาความสามารถของเลคตินในสิ่งสกัดจากฟองน้ำและโปรตีนในสิ่งสกัดจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำฟองน้ำ นำสิ่งสกัดมาทดสอบการมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus M. luteus P. aeruginosa V. alginolyticus V. fluvialis V. harveyi V. mimicus V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* จากนั้นนับจำนวนโคโลนีมาคำนวณค่า Attractive unit และค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (% inhibition) ได้ผลการทดลองดังดังตารางที่4-3 ถึง ตารางที่4-18

โดยจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของฟองน้ำทั้ง 5 ชนิด พบว่า

ฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 3-91 และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ร้อยละ 9-69

ฟองน้ำ *Haliclona* (*Reniera*) sp. สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 16-99 และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ร้อยละ 42-83

ฟองน้ำ *Collyspongia* (*Euplacella*) *joubini* สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 52-77 และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ร้อยละ 34-38

ฟองน้ำ *Hyrtios erecta* สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 29-76 และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ร้อยละ 26-43

ฟองน้ำ *Chondrilla australiensis* สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 0-68 และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ร้อยละ 41-80

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าฟองน้ำ *Haliclona* (*Reniera*) sp. สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ดีที่สุด

ฟองน้ำ *Haliclona* (*Reniera*) sp. สามรถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 16-99 ซึ่งเชื้อที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำดังกล่าว ได้แก่ LKRK05-1 และ LKRK05-2 สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ร้อยละ 0-93 และ 1-95 โดยที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-3 ผลการทดสอบเลคตินจากฟองน้ำ *Haliclona* (*Reniera*) sp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนเติมเลคติน	หลังเติมเลคติน	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	44	1	44	98
V. cholerae	164	96	1.71	41
V. fluvialis	82	68.5	1.2	16
V. harveyi	70	13	5.38	81
V. mimicus	50	34	1.47	32
V. parahaemolyticus	286	3.5	81.71	99
M. luteus	346	61.5	5.63	82
P. aeruginosa	228	131.5	1.73	42
S. aureus	80	14	5.71	83

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-4 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย LKRK05-1ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Haliclona* (*Reniera*) sp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนใส่แบคทีเรีย	หลังใส่แบคทีเรีย	Attractive unit	%Inhibition
V. alginolyticus	80	44	1.82	45
V. cholerae	79	107	0.74	0
V. fluvialis	151	119.5	1.26	21
V. harveyi	181	20.5	8.83	89
V. mimicus	318	21.5	14.79	93
V. parahaemolyticus	123	13	9.46	89
M. luteus	240	94.5	2.54	61
P. aeruginosa	80	42	1.9	48
S. aureus	327	42.5	7.69	87

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4- 5 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย LKRK05-2 ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำ*Haliclona* (*Reniera*) sp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนใส่แบคทีเรีย	หลังใส่แบคทีเรีย	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	80	18	4.44	78
V. cholerae	79	140.5	0.56	0
V. fluvialis	151	87	1.74	42
V. harveyi	181	9.5	19.05	95
V. mimicus	318	71.5	4.45	78
V. parahaemolyticus	123	122	1.01	1
M. luteus	240	103.5	2.32	57
P. aeruginosa	80	72.5	1.1	9
S. aureus	327	56	5.84	83

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-6 ผลการทดสอบเลคตินจากฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
ทดสอบ	ก่อนเติมเลคติน	หลังเติมเลคติน	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	44	6.5	6.77	85
V. cholerae	164	100.5	1.63	3
V. fluvialis	82	7	11.71	91
V. harveyi	70	17.5	4	75
V. mimicus	50	21	2.38	58
V. parahaemolyticus	286	127	2.25	56
M. luteus	346	120	2.88	65
P. aeruginosa	228	208.5	1.09	9
S. aureus	80	24.5	3.27	69

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4- 7 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย LANT05-2 ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนใส่แบคทีเรีย	หลังใส่แบคทีเรีย	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	80	107.5	0.74	0
V. cholerae	79	166.5	0.47	0
V. fluvialis	151	106	1.42	30
V. harveyi	181	188	0.96	0
V. mimicus	318	157	2.03	51
V. parahaemolyticus	123	158	0.78	0
M. luteus	240	105.5	2.27	56
P. aeruginosa	80	71.5	1.12	11
S. aureus	327	192	1.7	41

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-8 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย LANT05-3 ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนใส่แบคทีเรีย	หลังใส่แบคทีเรีย	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	80	89	0.9	0
V. cholerae	79	231	0.34	0
V. fluvialis	151	74	2.04	51
V. harveyi	181	130.5	1.39	28
V. mimicus	318	105.5	3.01	67
V. parahaemolyticus	123	134	0.92	0
M. luteus	240	160.5	1.5	33
P. aeruginosa	80	87	0.92	0
S. aureus	327	153	2.14	53

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-9 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย LANT05-4 ที่อยู่รวมกับฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนใส่แบคทีเรีย	หลังใส่แบคทีเรีย	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	80	120.5	0.66	0
V. cholerae	79	175.5	0.45	0
V. fluvialis	151	58.5	2.58	61
V. harveyi	181	247	0.73	0
V. mimicus	318	56	5.68	82
V. parahaemolyticus	123	92	1.34	25
M. luteus	240	123.5	1.94	49
P. aeruginosa	80	109	0.73	0
S. aureus	327	190.5	1.72	42

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-10 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย LANT05-5ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนใส่แบคทีเรีย	หลังใส่แบคทีเรีย	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	80	108	0.74	0
V. cholerae	79	210	0.38	0
V. fluvialis	151	43	3.51	72
V. harveyi	181	130	1.39	28
V. mimicus	318	8	39.75	97
V. parahaemolyticus	123	202	0.61	0
M. luteus	240	232.5	1.03	3
P. aeruginosa	80	75	1.07	6
S. aureus	327	181.5	1.8	44

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-11 ผลการทดสอบเลคตินจากฟองน้ำ *Hyrtios erecta* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนเติมเลคติน	หลังเติมเลคติน	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	44	18	2.44	59
V. cholerae	164	39	4.21	76
V. fluvialis	82	24	3.42	71
V. harveyi	70	33	2.12	53
V. mimicus	50	35.5	1.41	29
V. parahaemolyticus	286	124	2.31	57
M. luteus	346	256.5	1.35	26
P. aeruginosa	228	129.5	1.76	43
S. aureus	80	46	1.74	43

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-12 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย LNOL07-2 ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Hyrtios erecta* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนใส่แบคทีเรีย	หลังใส่แบคทีเรีย	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	80	96	0.83	0
V. cholerae	79	295	0.27	0
V. harveyi	181	158	1.15	13
V. mimicus	318	163	1.95	49
V. parahaemolyticus	123	157.5	0.78	0
M. luteus	240	105	2.29	56
P. aeruginosa	80	60	1.33	25
S. aureus	327	305	1.07	7

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-13 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย LNOL07-3 ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Hyrtios erecta* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนใส่แบคทีเรีย	หลังใส่แบคทีเรีย	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	80	81	0.99	0
V. cholerae	79	111.5	0.71	0
V. harveyi	181	224.5	0.81	0
V. mimicus	318	108	2.94	66
V. parahaemolyticus	123	137	0.9	0
M. luteus	240	198	1.21	18
P. aeruginosa	80	252.5	0.32	0
S. aureus	327	101.5	3.22	69

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-14 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย LNOL07-7 ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Hyrtios erecta* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนใส่แบคทีเรีย	หลังใส่แบคทีเรีย	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	80	38	2.11	53
V. cholerae	79	152	0.52	0
V. harveyi	181	146.5	1.24	19
V. mimicus	318	102	3.12	68
V. parahaemolyticus	123	116	1.06	6
M. luteus	240	35.5	6.76	85
P. aeruginosa	80	389	0.21	0
S. aureus	327	331	0.99	0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ **4- 15** ผลการทดสอบเลคตินจากฟองน้ำ *Callyspongia (Euplacella) joubini* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนเติมเลคติน	หลังเติมเลคติน	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	44	10	4.4	77
V. cholerae	164	76	2.16	54
V. fluvialis	82	19.5	4.21	76
V. harveyi	70	35	2	50
V. mimicus	50	25.5	1.96	49
V. parahaemolyticus	286	136	2.1	52
M. luteus	346	215.5	1.61	38
P. aeruginosa	228	150.5	1.51	34
S. aureus	80	52	1.54	35

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-16 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย LSAB02-1 ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Callyspongia (Euplacella) joubini* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนใส่แบคทีเรีย	หลังใส่แบคทีเรีย	Attractive unit	%Inhibition
V. alginolyticus	80	57.5	1.39	28
V. cholerae	79	124.5	0.63	0
V. fluvialis	151	103	1.47	32
V. harveyi	181	95.5	1.9	47
V. mimicus	318	52	6.12	84
V. parahaemolyticus	123	205	0.6	0
M. luteus	240	202.5	1.19	16
P. aeruginosa	80	97	0.82	0
S. aureus	327	133	2.46	59

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-17 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรีย LSAB02-4 ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Callyspongia (Euplacella) joubini* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนใส่แบคทีเรีย	หลังใส่แบคทีเรีย	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	80	68	1.18	15
V. cholerae	79	114	0.69	0
V. fluvialis	151	79.5	1.9	47
V. harveyi	181	127.5	1.42	30
V. mimicus	318	20.5	15.51	94
V. parahaemolyticus	123	160	0.77	0
M. luteus	240	185	1.3	23
P. aeruginosa	80	129.5	0.62	0
S. aureus	327	312	1.05	5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-18 ผลการทดสอบเลคตินจากของฟองน้ำ *Chondrilla australiensis* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย(โคโลนี)		ค่า	
	ก่อนเติมเลคติน	หลังเติมเลคติน	Attractive unit	% Inhibition
V. alginolyticus	44	10	4.4	77
V. cholerae	164	151	1.09	8
V. fluvialis	82	7.5	10.93	91
V. harveyi	70	34	2.06	51
V. mimicus	50	42.5	1.18	15
V. parahaemolyticus	286	267	1.07	7
M. luteus	346	161.5	2.14	53
P. aeruginosa	228	171.5	1.33	25
S. aureus	80	13	6.15	84

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของฟองน้ำ 5 ชนิด พบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำได้ร้อยละ 0-99 และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ร้อยละ 9-83 ดังตารางที่ 19 โดยที่ฟองน้ำ *Haliclono* (*Reniara*) sp. สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ดีที่สุด ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำดังกล่าว ได้แก่ LKRK05-1และLKRK05-2 สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ดีที่สุดคือร้อยละ 0-93 และ0-95 ดังตารางที่ 20

ซึ่งตรงกับรายงานการวิจัยหลายฉบับที่ศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียทะเลที่สร้างสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตอื่นได้ เช่น แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ สามารถสร้างสาร diketopiperrazines และสารปฏิชีวนะพวก phenazine alkaloid 2 ชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญแบคทีรียแกรมบวก (Jayatilake และคณะ. 1996) และยังพบว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับหอยงาช้างญี่ปุ่น สามารถผลิตสาร surugatoxin ได้ แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับปลาปักเป้าสามารถสร้างสาร tetrodotoxin ได้ (Stierle และคณะ. 1988)

จากประโยชน์ของสารเมตาโบไลท์ทุติยภูมิที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพชนิดอื่น และการดื้อยาของแบคทีเรียบางชนิดซึ่งมีลักษณะการดื้อยาได้ตั้งแต่กำเนิด หรือเกิดการดื้อยาได้ภายหลังที่เชื้อเคยไวต่อยาแล้วเปลี่ยนเป็นดื้อขึ้น ทำให้การรักษาที่เคยได้ผลกลับขาดประสิทธิภาพไป ข้อมูลการศึกษาสารปฏิชีวนะที่เป็นโปรตีน ไกลคอโปรตีน หรือเพปไทด์ จากจุลชีพที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำในครั้งนี้ เป็นแนวทางในการคัดเลือกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดี เพื่อนำไปแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติเพิ่มเติม สำหรับการผลิตเป็นยารักษาโรคในคนและสัตว์ทะเล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่4-19 ผลการทดสอบฟองน้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

ฟองน้ำ / แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	% Inhibition				
	Spheciospongia congenera	*Haliclona* (*Reniera*) sp.	*Callyspongia* (*Euplacella*) *joubini*	*Hyrtios erecta*	*Chondrilla australiensis*
V. alginolyticus	85	98	77	59	66
V. cholerae	3	41	54	76	55
V. fluvialis	91	16	76	71	52
V. harveyi	75	81	50	53	68
V. mimicus	58	32	49	29	0
V. parahaemolyticus	56	99	52	57	57
P. aeruginosa	9	42	34	43	46
M. luteus	65	82	38	26	41
S. aureus	69	83	35	43	80
ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	0.1598	0.3049	0.0828	0.6511	0.4249

Burapha University

ตารางที่4-20 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

ฟองน้ำ / แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	% inhibition										
	Haliclona sp.		*Spheciospongia congenera*				*Hyrtios erecta*			*Callyspongia (Euplacella)joubini*	
	LKRK05-1	LKRK05-2	LANT05-2	LANT05-3	LANT05-4	LANT05-5	LNOL07-2	LNOL07-3	LNOL07-7	LSAB02-1	LSAB02-4
V. alginolyticus	45	78	0	0	0	0	0	0	53	28	15
V. cholerae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V. fluvialis	21	42	30	51	61	72	0	0	0	32	47
V. harveyi	89	95	0	28	0	28	13	0	19	47	30
V. mimicus	93	78	51	67	82	97	49	66	68	84	94
V. parahaemolyticus	89	1	0	0	25	0	0	0	6	0	0
P. aeruginosa	48	9	11	0	0	6	25	0	0	0	0
M. luteus	61	57	56	33	49	3	56	18	85	16	23
S. aureus	87	83	41	53	42	44	7	69	0	59	5

Burapha University

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. จากการเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลทั้ง 5 ชนิดพบว่า ฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* ฟองน้ำ *Haliclona (Reniera)*sp. ฟองน้ำ *Callyspongia (Euplacella) joubini* ฟองน้ำ *Hyrtios erecta* และฟองน้ำ *Chondrilla australiensis* สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงคนหมู่เอ บี โอ และเอบี เกาะกลุ่ม ได้แสดงว่าสิ่งสกัดมีเลคติน

2. โปรตีนในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ 5 ชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ ได้แก่ *Vibrio alginolyticus V. fluvialis V. harveyi V. mimicus V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ได้ร้อยละ 8-99 โดยที่ฟองน้ำ *Haliclona (Reniera)* sp. สามารถยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอ คือ *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด ร้อยละ 99

3. โปรตีนในสิ่งสกัดจากฟองน้ำ 5 ชนิด สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *Staphylococus aureus Micrococcus luteus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ร้อยละ 9-84 โดยที่ฟองน้ำ *Chondrilla australiensis* สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococus aureus* ได้ดีที่สุด คือ ร้อยละ 84

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ฟองน้ำที่ควรนำมาศึกษาเลคตินเพิ่มเติม คือ ฟองน้ำ *Hyrtios erecta* โดยทำการแยกเลคตินออกจากโปรตีนชนิดอื่น ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ได้แก่ แอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี และวิธีเจลฟิลเตรชัน แล้วศึกษาสมบัติและคุณลักษณะของเลคตินที่แยกได้

2. ฟองน้ำที่น่าสนใจสำหรับศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ คือ ฟองน้ำ *Haliclona (Reniera)* sp. ส่วนฟองน้ำที่ควรศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคน คือ ฟองน้ำ *Haliclona (Reniera)* sp. เช่นกัน

3. เชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ ที่ควรนำมาศึกษาเพิ่มเติม คือ เชื้อ LANT 05-5 ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Spheciospongia congenera* วิธีการศึกษาเริ่มจากการทำโปรตีนให้เข้มข้นขึ้น โดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วตามด้วยเทคนิคการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโทกราฟี ได้แก่ โครมาโทกราฟีแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) และเจลฟิลเตรชัน จากนั้นจึงนำโปรตีนที่แยกได้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอีกครั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เอกสารอ้างอิง

งามจิต วังศรี. (2547). *สมบัติบางประการของเลคตินปะการังอ่อน*. ชลบุรี: สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ชุดิวรรณ เดชสกุลวัฒนา, สิรินุช จินตสุนทรจุไร และสุเมตต์ ปุจฉาการ. (2544). บทคัดย่อ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำบางชนิดในจังหวัดชลบุรี การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 27 หน้า 464.

ดารารัตน์ ทองขาว. (2536). *เลคติน: โปรตีนจับจำเพาะกับคาร์โบไฮเดรต*. เชียงใหม่ : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เทียมจิต ไชยชนะ. (2543). *การศึกษาเลคตินในปะการังอ่อนจากชายชั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย*. ชลบุรี: สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เนื้อทิพย์ ดำรงไชย (2541) การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากเมือกหอยทากยักษ์, *Achatina fulica* Bowdich 1822 วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น 81 หน้า.

บพิธ จารุพันธุ์ และนันทาพร จารุพันธุ์. (2545). *สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง II โพรโทซัว ถึง ทาร์ดิกราดา*. กรุงเทพ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ มัจฉาชีพ. (2532). *สัตว์ชายฝั่งทะเลไทย*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ: แพร่พิทยา.

อู่แก้ว ประกอบไวทยกิจ บีเวอร์. (2534). บทคัดย่อ เลคตินในหอยบางชนิด การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 17 หน้า 506.

Alexander, A.B.. Bulgakov, A.A., Kyung-Il, P., Kwang-Sik, C., Hee-Kyoung, L., and Moonjae C. (2004). Purification and characterization of a lectin isolate from Manila clam *Ruditapes philippinarum* in. Korea. *Fish & Shllfish Immunology*. 16: 487-489.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitivemethod for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing thc principle of protein dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254.

Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Momsigny, M., Osawa,T. and Sharon, N. (1980). What should be call a lectin. *Nature*. 285: 66.

Hisao, K., Koji, M., Takaharu, H., Masatoshi, Y., and Uday., R. (1986). A haemagglutinin in Sponge *Phyllospongia foliascens*:Isolation and Characterization. 52:12.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Hisao. K., Koji. M., Takaharu, H., Masatoshi. Y., and Uday., R. (1986). A haemagglutinin in Sponge *Phyllospongia foliascens*:Isolation and Characterization. 52:12.

Ivana. P., Zoran. K., Nikola, D., Dusan, S., Zorica. J., and Miroslav, J.G. (2002). A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity.132:213-221

Jayatilake, G.,S., Thornton, M.P., Leonard, A.C., Grim wade, J.E. and Baker, B.J. (1996) Metabolites from an Antartic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. Journal Natural Product. 59 : 293 - 296.

Kocourek, J. and Herejsi, V. (1981). Defining a lectin. *Nature*. 290: 188.

Liener, J.E., Sharon, N. and Goldstein, I.J. (1986). The lectin: Properties, function and applications in biology and medicine, Academic press, *Oriando*. 35-360.

Maki, J.S. and Mitchell, R. (1986). The function of lectin in interactions among marine bacteria, invertebrates, and algae. In Mirelman, D. ed. *Microbial lectins and agglutinins*. John Wiley and Sons. Inc. U. S. A.

Oclarit, M.J., Ohta. S., Kanimura, K., Yamacka, Y. and Ikegami, S. (1994) Production of an antibacterial agent, O-Aminophenol, by bacterium isolated from the marine sponges *Adosia* sp. Fisheries Science. 60 : 559 - 562.

Olafsen, J. A. 1988. Role of lectin in invertebrate humoral defense. Am. Fish.Soc. Spec. Publ. 18: 189-205.

Rajagopalan, M., Periasamy, M. and Manusamy, A. (2002). Isolation and Characterization of an acetyl group-recognizing agglutinin from the serum of the Indian White shrimp Fenneropenaeus indicus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 402(2002). 65-67.

Sharon, N. (1977). Lectins . *American Scientist*. 236: 108-119.

Singh, R.S., Tiwary, A.K. and Kenedy, I.F. (1999). Lectin : sources . activities and application. *Critical Reviews In Biotechnology*. 19(2) : 145-178.

Stierle, A.c., Cardellina, J.H. and Singleton, F.L. (1988) A marine Micrococcus produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis* Experimentia. 44 : 1021.

http://gened.emc.maricopa.edu/bio/BIO181/BIOBK/BioBookDiversity_7.html, วันที่ค้นข้อมูล 25 มกราคม 2549.

www. Enchantedlearning. Com,วันที่ค้นข้อมูล 25 มกราคม 2549.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

การเตรียมอาหาร Tryptic Soy Broth

Bacto-Torptone	17 กรัม
Bacto-Soytone	3 กรัม
Glucose	2.5 กรัม
Sodium chloride	5 กรัม
Dipotassium phosphate	2 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น7.3± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหาร Tryptic Soy Agar

Bacto-Torptone	15 กรัม
Bacto-Soytone	5 กรัม
Sodium chloride	5 กรัม
Bacto-Agar	15 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น7.3± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหาร Modified Zobell

Proteose peptone	1 กรัม
Yeast extract	1 กรัม
Phytone(BBL)	0.5 กรัม
Sod Thiosulfate	0.2 กรัม
Sod Sulfite	0.05 กรัม
Fe-citrate 2%	1 มิลลิลิตร
Agar	15 กรัม
Sea water	900 มิลลิลิตร
Distilled water	100 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น7.5-7.6 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การเตรียม 0.01 โมล่าร์ ทริส – ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่มี 0.15 โมล่าร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โซเดียมคลอไรด์ ปิเปต 0.1 โมล่าร์ ทริส – ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 10 มล. และ 0.15 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 10 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มล.

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	เยี่ยมลักษณ์ พิศวงษ์
วัน เดือน ปีเกิด	25 ธันวาคม 2526
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 197 หมู่2 ถนนสุรินทร์-สังขะ ตำบลนอกเมือง อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ 32000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2538	ประถมศึกษาโรงเรียนอนุบาลสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์
พ.ศ. 2541	มัธยมศึกษาตอนต้นโรงเรียนสิรินธร จังหวัดสุรินทร์
พ.ศ. 2544	มัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนสิรินธร จังหวัดสุรินทร์
พ.ศ. 2548	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University