สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัยเรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนของเพรียงหิน โดย แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในฟองน้ำและปะการังอ่อนของไทย

โดย

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

26 มี.ค. 2552
249185
เริ่มบริการ
31 มี.ค. 2552

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปี 2541 ผ่านทบวงมหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อ	
บทนำ	1
สำรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	7
ผลการทดลอง	9
อภิปรายผล	20
เอกสารอ้างอิง	22

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนของเพรียงหิน โดย แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในฟองน้ำและปะการังอ่อนของไทย

โดย

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา

บทคัดย่อ

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของแบคทีเรียทะเลต่อการลงเกาะของตัวเพรียงหินในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบกับฟิล์มของแบคทีเรียจำนวน 8 สายพันธุ์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์มาตรฐาน จากการทดสอบกับแบคทีเรีย 132 สายพันธุ์ที่แยกได้จากฟองน้ำ 24 ตัวอย่างและปะการังอ่อนจำนวน 3 ตัวอย่าง ที่เก็บจากบริเวณเกาะต่างๆ ในจังหวัดชลบุรี เมื่อนำฟิล์มแบคทีเรียที่ 24 ชั่วโมง ที่มีความหนาแน่น 10^6 – 10^7 เซลล์/ตร.ซม. ทดสอบกับตัวอ่อนเพรียงหินระยะลงเกาะ (cyprid) ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิและแสงนาน 24 ชั่วโมง พบว่าฟิล์มแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์คือสายพันธุ์ C 04-2 และ C14-4ที่แยกได้จากฟองน้ำ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการลงเกาะได้สูง

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

Study on Inhibitory Effect on Attachment of Barnacle Larvae by Bacteria Associated with Thai Sponges and Soft corals

by
Chutiwan Dechsakulwatana

Abstract

The anti-bacterial strains, 8 strains were selected from screening of anti-microbial activity from 132 strains which were isolated from sponges 24 and soft corals 3 samples collected from Islands in Chonburi Province. After 24 hours of exposure on barnacle cyprid larvae by 24 hours bacterial film exposure on barnacle cyprid larvae by 24 hours films of 8 active strains under control condition temperature and light in laboratory, it was found that 2 strains as C 04-2 and C 14-4 which were isolated from sponges showed strong inhibition on attachment.

Institute of Marine Science, Burrapha University, Chonburi 20131

บทนำ

นับเป็นเวลากว่าศตวรรษที่สิ่งมีชีวิตประเภทลงเกาะ (biofouling) บางชนิด อาทิเช่น เพรียง หอย สาหร่าย ได้ก่อปัญหาต่อการเดินเรือ และสิ่งก่อสร้างในทะเลทำให้เกิดการสิ้นเปลืองเชื้อเพลิงเพิ่มขึ้นถึง 30% และสูญเสียค่าใช้จ่ายในการป้องกัน หรือการกำจัดสิ่งมีชีวิตที่ลงเกาะ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ประเภท " เพรียง" (barnacle) ซึ่งก่อความเสียหายเป็นมูลค่าหลายหมื่นล้านกับประเทศที่มีชายฝั่ง ทะเล โดยเฉพาะในประเทศที่มีการพัฒนาการใช้พื้นที่ชายฝั่งเพื่อการอุตสาหกรรมและยังส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง วิธีการป้องกันการเกาะติด (antifouling) ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันนั้น ใช้สารประกอบโลหะหนัก copper, tri-butyltin หรือ TBT และสารอื่น ๆ ผสมสีเคลือบซึ่งสารเหล่านี้เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ โดยทั่วไปและค่อยๆ สลายตัวปนเปื้อนในน้ำก่อปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อมทางทะเล ซึ่งในปัจจุบันประเทศพัฒนาแล้ว ออกกฎหมายควบคุมห้ามใช้สารประกอบเหล่านี้กับเรือขนาดเล็ก 25 เมตร ที่เข้าใกล้บริเวณชายฝั่ง นักวิทยาศาสตร์ในหลายสาขาจึงพยายามค้นคว้าวิจัย หามาตรการควบคุมที่จะนำมาทดแทนสารพิษนั้น การศึกษาวิจัยค้นคว้าวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติ คือ สิ่งมีชีวิตในทะเลนั้น เป็นวิธีหนึ่งที่ได้มีการค้นคว้ากันอย่างแพร่หลาย กอปรทั้งมีการ ศึกษาที่ทราบว่าในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพวก ฟองน้ำ ปะการังอ่อน กัลปังหา จะไม่ค่อยพบพวกสิ่งที่มีชีวิตเกาะติด (biofouling) ดังนั้น จึงมีการสันนิษฐานว่าอาจเป็นไปได้ที่ ปะการังอ่อน ฟองน้ำ และกัลปังหา สามารถสร้างสารบางอย่างในการต่อต้านสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่จะมาเกาะติด (attach) ในระยะแรกก็ค้นพบว่าแบคทีเรียที่บริเวณผิวที่ถูกเกาะนั้นมีอิทธิพลในการกระตุ้น หรือยับยั้งการลงเกาะ

เมื่อเร็วนี้ก็มีการค้นพบเพิ่มเติมสามารถแยกและเลี้ยงแบคทีเรียบางชนิดที่อาศัยร่วมอยู่ในฟองน้ำ ปะการังอ่อน และกัลปังหานั้นซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตสารยับยั้งการลงเกาะได้ ดังนั้นศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์ของ

สิ่งมีชีวิตในทะเลโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียจากทะเลนั้นจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

ในปัจจุบันประเทศไทยได้พัฒนาพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกและภาคใต้ เพื่อเป็นท่าเรือและแหล่งอุตสาหกรรม ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการประมงและระบบนิเวศชายฝั่งอย่างแน่นอน ดังที่กล่าวมาแล้ว จึงน่าที่จะเร่งดำเนินการศึกษาในเรื่องนี้เพื่อเป็นการลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ และเป็นแนวทางในการป้องกันมลพิษทางทะเลที่อาจจะเกิดขึ้นในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1 เพื่อศึกษาแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในฟองน้ำ และปะการังอ่อนของไทยที่อาจมีอิทธิพลต่อการลง เกาะของตัวอ่อนเพรียง

2. เพื่อศึกษาทดสอบเบื้องต้นฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น

3.เพื่อศึกษาทดสอบเบื้องต้นในการยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงโดยฟิล์มแบคทีเรีย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษาครั้งนี้จะทำให้ทราบถึงแบคทีเรียจากฟองน้ำ และปะการังอ่อน ที่มีอิทธิพลต่อการยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียง นับว่าจะมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อการป้องกันมลพิษทางทะเล ซึ่งได้ รับผลกระทบจากการพัมนาพื้นที่ชายฝั่งทะเลของประเทศไทย จากการปนเปื้อนของสารพิษที่ใช้ผสมอยู่ในสีเคลือบ ถ้าหากทำการศึกษาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานก็จะได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้เป็น แนวทางในการหาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มาทดแทนสารพิษ และถ้าหากสามารถหาแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียง ได้แล้วก็ยังประโยชน์ต่อการควบคุม และป้องกันสภาวะแวดล้อมบริเวณชายฝั่งของประเทศไทยและนานาประเทศด้วย

สำรวจเอกสาร

Zo Bell และ Allen (1935) ; Bonar และคณะ (1986) ได้รายงานว่าฟิล์มแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมในทะเลนั้น มีอิทธิพลต่อการลงเกาะของสิ่งมีชีวิตที่ลงเกาะติด และการศึกษาส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปที่การหาความสัมพันธ์ระหว่างฟิล์มแบคทีเรีย และตัวอ่อนสิ่งมีชีวิตที่ลงเกาะ (Sessile invertebrates) จากนั้น Muler (1973) ได้อธิบายถึงแบคทีเรียทะเลกรัมลบมีผลต่อการกระตุ้นการลงเกาะของตัวอ่อนไฮโดรซัว *Hyracitrial echinata* Fitt และคณะ (1990) ได้ค้นพบ supernatants จากแบคทีเรีย *Alteromonas cowelliana* และ *Vibrio cholerae* ก็มีอิทธิพลต่อการลงเกาะของลูกหอยนางรม (*Crassostrea gigas*)

Standing (1984) เป็นบุคคลแรกที่ให้ข้อสันนิษฐานว่า แบคทีเรียที่อาศัยในปะการังอ่อน ที่ทำการศึกษาน่าจะมีส่วนร่วมต่อการสร้างสารยับยั้งการเกาะติดของตัวอ่อนเพรียง (*Balanus amphitrite*) จากรายงานนี้ Maki และคณะ (1988, 1990) ก็ได้รายงานถึงอิทธิพลของฟิล์ม แบคทีเรียทะเล และ exopolymer จากแบคทีเรียสามารถยับยั้งหรือกระตุ้นการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงได้ (*B. amphitrite*) จากการทดลองของ Maki และคณะ พบว่า ฟิล์มที่มีอายุมากกว่าของ *Deleya* (Pseudomonas) *marina* จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่า ซึ่งทำให้สันนิษฐานได้ว่า สาร extracellular จากแบคทีเรียน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องต่อขบวนการยับยั้ง

Holmstrom และคณะ(1992) รายงานว่า พบแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์จากจำนวนทั้งหมด 40 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผิวก้อนหินที่ระดับลึกต่างกัน และจากผิวตัวเต็มวัยเพรียงหัวหอม (*Ciona intestinalis*) นั้น มีอิทธิพลยับยั้งต้านการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงหิน *Balanus amphitrite* และ เพรียงหัวหอม *Ciona intestinalis* นอกจากนี้ยังพบว่า ฟิล์มแบคทีเรียสายพันธุ์ D 2 (กรัมลบ) ซึ่งแยกได้จากผิวของเพรียงหัวหอม *C. intestinalis* สามารถขับสารประกอบที่เป็นพิษออกมาในระยะ stationary phase และเมื่อเก็บฟิล์มแบคทีเรียนี้ให้นานมากขึ้น ก็จะทำให้พิษทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น และอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียแล้ว

(supernatant) 24 ชั่วโมง มีฤทธิ์ฆ่าตัวอ่อนเพรียงหิน(barnacle) และเพรียงหัวหอม (ascidian) ภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงหลังจากการทดสอบ

ชุติวรรณ (Dechsakulwatana et.al., 1994) รายงานว่า จากการศึกษาทดสอบแบคทีเรีย จำนวน 42 สายพันธุ์ที่แยกได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง พบว่าฟิล์มแบคทีเรีย จำนวน 10 สายพันธุ์ แสดงผลการยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียง *Balanus amphitrite* และอาหารที่เลี้ยงเชื้อ 20 ชั่วโมง ของแบคทีเรีย จำนวน 12 สายพันธุ์ แสดงผลการยับยั้งการลงเกาะในอัตราที่สูงมาก จากการทดสอบ คุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นของสารประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้พบว่ามีความทนต่อความร้อนสูง 70 °C และสามารถเก็บไว้ได้นาน 8 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยความสามารถในการยับยั้งการลงเกาะ มิได้ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งนั้น ส่วนใหญ่อยู่สกุล *Vibrio* และ *Alteteromonas*

นอกจากนี้ ชุติวรรณ และคณะ (Dechsakulwatana et.al, 1992) ได้รายงานว่าแบคทีเรียที่เจริญ ในฟิล์มวุ้นยังสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่เข้าหาแสง (phototaxis) ของตัวอ่อนของเพรียงหินได้หลายชนิด และแบคทีเรียบางสายพันธุ์ยังยับยั้งการว่ายน้ำของตัวอ่อนด้วย

แบบโครงสร้างการลำดับของการลงเกาะ (fouling sequence model)

สภาพแวดล้อมทางทะเลนั้นวัตถุที่เป็นของแข็งที่จุ่มอยู่ในน้ำทะเลโดยไม่มีอะไรป้องกันก็จะถูกเกาะติดโดยสิ่งต่างๆ รวมทั้งสิ่งมีชีวิตหลายชนิด จนเกิดลำดับของการจับกันของสิ่งมีชีวิตทางฟิสิกส์ เคมี และชีวทำให้เกิดเป็น complex layer แต่ในทางตรงกันข้ามก็มีการรักษาพื้นผิวลำตัวให้สะอาด(antifouling)

จากการศึกษาของ Martin Wahl (1989) ได้นำเสนอ fouling sequence model และต่อมา Abarzua และ Jakubowski มีการนำมาศึกษาอีก ในปี ค.ศ. 1995 ได้เสนอแบบโครงสร้างนี้ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนคือ biochemical condition, bacterial colonization, unicellular fouling และ multicellular eukaryont fouling

1. Biochemical condition เป็นขั้นตอนแรกจะมีการดูดซับสารประกอบเคมีที่ส่วนใหญ่เป็นพวกมีโมเลกุลขนาดใหญ่ โปรตีน glycoproteins proteoglucans

และ polysaccharides จากน้ำทะเล โดยขบวนการนี้จะเกิดเมื่อวัตถุเริ่มสัมผัสน้ำภายในเวลาไม่กี่นาที

2. Bacterial colonization ของพื้นผิวประกอบด้วย 2 ระยะคือ reversible approach phase (adsorbtion) และ nonreversible attachment phase (adhesion) (Marshall 1980; Wahl 1989) เช่นเดียวกับในขั้นตอนแรกจะเกิดการ adsorption ของกลุ่มแบคทีเรียที่อยู่ใกล้พื้นผิวโดยอาศัยแรงทางฟิสิกส์ Brownian motion electroslatic interaction, gravity, Van-der-waal forces (Dexter 1976, 1978; Fletcher & Loeb 1979) ปรากฏการณ์นี้ผันกลับได้ หมายความว่า สิ่งมีชีวิต สามารถที่จะหลุดออกจากพื้นผิวได้ในระยะนี้

ส่วนระยะ nonreversible attachment phase ในขบวนการนี้ผันกลับไม่ได้ สามารถเกิดโดยแบคทีเรียที่ลงเกาะจะผลิต extracellular bridging polymer ตัวอย่างเช่น polysacharide fibrils ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย glucose และ fructose เป็นที่รู้กันดีว่า polysacharide fibrils มีลักษณะเป็นเมือก จะยึดเกาะกับองค์ประกอบทางเคมีใน macromolecular film โดย lectins หรือ divalent cation Ca^{++}, Mg^{++}(Casterton et al., 1978) ร่วมกับมีการสร้าง covalent bond ระหว่าง glycocolix และ macromolecular film ระยะการดูดซับจะผสมผสานไปกับระยะยึดติด(slime film) (Wahl 1989) ทำให้เกิดการเกาะติดกัน การเจริญเติบของแบคทีเรียในชั้นนี้ประกอบไปด้วย เซลล์ที่ตายและมีชีวิตอยู่ซึ่งจะมีการหลั่งเมือกออกมาร่วมกับ macromolecular film เป็น primary film การรวมกลุ่มแบคทีเรียจะเกิดขึ้นหลังจากจมอยู่ในน้ำประมาณ 1 ชั่วโมง

3. Colonization by unicellular eukaryonts ประกอบด้วยกลุ่มของ yeasts diatoms, spores of macroalgae และ protozoa เป็นปริมาณมากโดดเด่นปรากฏให้เห็นต่อมา(Marshall et al., 1974; Cuba & Blake 1983) ระยะนี้เริ่มต้นเมื่อเวลาผ่านไปหลายวันหลังจากจุ่มน้ำ เช่นเดียวกับในกรณีของแแบคทีเรียเราอาจแบ่งแยกโครงสร้างเริ่มแรกกับที่สำเร็จในภายหลัง(Ferreira & Seeliger 1985)

หลังจากมีการพัฒนาของ primary film แบคทีเรียและไดอะตอมเป็น primary colonizer ส่วน spores of macroalgae and protozoa เป็น sccondary colonizers ในขบวนการของ

Microfouling ไม่สามารถจะแยกความชัดเจนระหว่าง microfouling และ macrofouling เพราะมีการคาบเกี่ยวกันอยู่ของ spore of macroalgac ซึ่งเป็น sccondary colonizcrs

4. Colonization by multicellular eukaryonts ตัวอ่อนของสัตว์ (larvac of macrofoulers) พวกลงเกาะติด (sessile marinc organism) เช่น เพรียงหัวหอม (tunicate), coelentcrate, bryozoans, เพรียง (barnacle), หอยสองฝา (mussel), polychaetes ซึ่งจัดเป็นกลุ่ม tertiary colonizcr เกาะกับ microfouling film

ระยะเวลาในการเกิดแบคทีเรียจะเกิดขึ้นมาภายหลัง ประมาณ 1-2 ชม. กลุ่มไดอะตอมภายใน 24 ชม. สปอร์ของมาโครแอลจี และโปโตซัว ภายใน 1 สัปดาห์ และตัวอ่อนของมาโครฟาวเลอร์ ระยะเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ นำไปสู่ทางเลือกในการป้องกันการลงเกาะของพวก biofouling สิ่งมีชีวิตในทะเลส่วนใหญ่จะผลิตสารเรียก biogcnic agcnt ซึ่งจะมีคุณสมบัติเป็น antibactcrial, antiagal, antifungal antiprotozoan and antimacrofouling

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำประการังอ่อน

1. การเก็บตัวอย่างฟองน้ำจะเก็บโดยนักดำน้ำแบบ SCUBA Diving ลงไปเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเล โดยตัดส่วนของฟองน้ำและปะการังอ่อน เก็บใส่ถุงที่ปิดสนิท พร้อมติดกระดาษบันทึกข้อมูล
2. ตัดเนื้อเยื่อฟองน้ำเพื่อชั่งน้ำหนักให้ได้ประมาณ 5 กรัม แล้วล้างฟองน้ำเพื่อกำจัดสิ่งเจือปน เช่น ตะกอนออกด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ
3. ทำการบดเนื้อเยื่อฟองน้ำ โดยใส่น้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 5 มิลลิลิตร จนละเอียด
4. ดูดส่วนที่เป็นน้ำที่ได้จากการบด 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI แล้วเกลี่ยเชื้อบนผิวหน้าอาหาร
5. ทำการเจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-3} ในน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้ว ต่อจากนั้นนำมาเกลี่ยกระจายเชื้อ โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 4
6. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 3-5 วัน ตรวจดูผล
7. นับจำนวนโคโลนีที่เจริญขึ้นในแต่ละจานเพาะเลี้ยง แล้วคำนวณค่าเป็น CFU/g
8. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันในแต่ละจานเพาะเชื้อของแต่ละตัวอย่างฟองน้ำ
9. นำโคโลนีที่เลือกมาทำให้บริสุทธิ์ (Purify) โดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีนั้นลงจานอาหาร เลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์เก็บรักษาสายพันธุ์ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI ที่มี agar 0.3%

2. การตรวจสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน (Antibacterial activity assay)

2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

- *Esscherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococus aureus* ATCC 25923
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Vibrio anguillarum* ORI

2.1.1 เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (Standard strain) ใน ORI slant บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.1.2 ทำการถ่ายเชื้อ

3. การเตรียมตัวอ่อนเพรียงหิน

เพรียง (*Balanus amphitrite*) ตัวเต็มวัยถูกเก็บจากชายฝั่งทะเลตะวันออกของญี่ปุ่นมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยให้ *Artemia* sp. เป็นอาหารทุกวัน จากนั้นก็จะเก็บตัวอ่อนเพรียงระยะแรก (nuaplius) ที่ฟักออกมาเลี้ยงในบิกเกอร์น้ำทะเลสะอาดความหนาแน่น 1000 ~ 2000 ตัวต่อลิตรให้ *Chaetoceros calcitran* 10^6 เซลล์/มล. เป็นอาหารทุกวัน โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°C ตัวอ่อนจะลอกคราบ 6 ครั้ง จนเข้าสู่ระยะลงเกาะ (cyprid) จึงเก็บเข้าตู้เย็นเป็นเวลา 4 วัน แล้วนำมาทดลอง

4. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียง

นำ micro plate ที่มีฟิล์มแบคทีเรีย ที่เตรียมไว้เทอาหารเลี้ยงแบคทีเรียทิ้ง แล้วเติมน้ำทะเลกรอง (0.22 /um) แล้วจึงนำตัวอ่อน (cyprid) อายุ 4 วัน ใส่จำนวน 20-30 ตัวต่อหลุมทำสามซ้ำ นำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28°C ให้แสง 15 ชม. มืด 9 ชม. รวม 24 ชม. แล้วจึงนำมาตรวจดูตัวอ่อนที่ลงเกาะ และไม่ลงเกาะ คิดเป็นเปอร์เซนต์การเกาะ

ส่วนของ supernatant นั้นได้จากการปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแล้วนำมาทดสอบเฉพาะส่วนของ supernatant ขั้นตอนตามที่กล่าวมาข้างต้น

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลและแยกเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเล

จากการทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างฟองน้ำทะเล 24 ตัวอย่าง และปะการังอ่อน 3 ตัวอย่าง จากบริเวณเกาะสาก เกาะครก เกาะริ้น เกาะล้าน และเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะสัณฐานวิทยา ของโคโลนีที่แตกต่างกันรวมทั้งสิ้น 132 สายพันธุ์ และแสดงเป็นค่าจำนวนโคโลนี ต่อกรัมของน้ำหนักเปียก (CFU/g) ดังตารางที่ 1

2. การตรวจสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน (Antibacterial activity assay)

จากการทดสอบเบื้องต้นแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำและปะการังอ่อนจำนวน 132 สายพันธ์ ในการยับยั้ง**แบคทีเรียมาตรฐาน,** *E. coli* ATCC 25922 *S. aureus* ATCC 25923 *B. subtilis* ATCC 6633 และ *V. anguillarum* ORI พบว่า มีแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำและปะการังอ่อนจำนวน 8 สายพันธุ์สามารถติอต้านแบคทีเรียมาตรฐานที่ทดสอบได้ ดังตารางที่ 2

3. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียง

เมื่อนำฟิล์มแบคทีเรียที่ได้ไปทดสอบกับตัวอ่อนเพรียงหินระยะ cyprid อายุ 4 วัน โดยทำสามซ้ำ ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ 28°C ให้แสง 15 ชม. มืด 9 ชม. รวม 24 ชม. แล้วจึงนำมาตรวจดูตัวอ่อนที่ลงเกาะ และไม่ลงเกาะ คิดเป็นเปอร์เซนต์การเกาะ พบว่ามีแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำ 2 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงได้ ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่1 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำและปะการังอ่อนจากเกาะต่างๆในบริเวณจังหวัดชลบุรี

ชนิดของตัวอย่างสัตว์	จำนวนแบคทีเรียที่พบจากตัวอย่าง (โคโลนี/กรัม)	จำนวนชนิดของโคโลนีที่แตกต่างกัน
C 01 ฟองน้ำสีฟ้า	3.9×10^5	7
C 02 ฟองน้ำฝังตัวสีส้ม	4.7×10^4	5
C 03 ฟองน้ำฝังตัวสีเหลือง	1.6×10^6	5
C 04 ฟองน้ำเคลือบหินม่วงขาว	3.7×10^6	8
C 05 ฟองน้ำเคลือบสีเหลืองหม่น	4.9×10^6	3
C 06 ฟองน้ำเคลือบสีเหลือง	7.3×10^5	4
C 07 ฟองน้ำเชือก	7.9×10^6	4
C 08 ฟองน้ำก้อนสีขาว	2.6×10^5	4
C 09 ฟองน้ำม่วง	9.6×10^5	4
C 10 ฟองน้ำเคลือบสีดำ	1.3×10^6	5
C 11 ฟองน้ำสีม่วงอ่อน	1.9×10^5	4
C 12 ฟองน้ำสีฟ้าขาว	4.1×10^5	7
C 13 ฟองน้ำดำม่วง	3.1×10^4	5
C 14 ฟองน้ำครก (นิ่ม)	1.4×10^6	3
C 15 ฟองน้ำเคลือบหินเหลือง	8.1×10^7	5
C 16 ฟองน้ำสีม่วง	2.5×10^6	5
C 17 ฟองน้ำสีม่วง	3.7×10^6	5
C 18 ปะการังอ่อนน้ำตาล	1.7×10^5	8
C 19 ฟองน้ำครก (นิ่ม)	3.2×10^6	5
C 20ฟองน้ำท่อสีม่วง	1.3×10^5	2
C 21 ปะการังอ่อนสีส้ม	1.2×10^5	3
C 22 ฟองน้ำเคลือบหินสีม่วงเข้ม	4.8×10^6	6
C 23 ฟองน้ำก้อนขาว	5.2×10^6	3
C 24 ปะการังอ่อนสีน้ำตาล	2.7×10^4	3
C 25 ฟองน้ำเคลือบหินแดง	4.1×10^6	6
C 26 ฟองน้ำสีน้ำเงิน	1.7×10^5	6
C 27 ฟองน้ำสีดำ	5.2×10^6	7

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นโดยแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากบริเวณต่าง ๆ จังหวัดชลบุรี : - = ไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง ; + = แสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง < 15 มม. ; ตัวเลข = ขนาดของบริเวณที่ยับยั้ง (มม. เฉลี่ยจากทำ 3 ซ้ำ) ; SA = ***Staphylococcus aureus*** ;

BS = Bacillus subtilis ; EC = *Escherichia coli* ; VA = *Vibrio anguillarum* ;

Isolated Strain no.	Bacteria											
	SA			BS			EC			VA		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
C 01-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 01-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 01-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 01-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 01-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 01-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 01-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 02-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 02-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 02-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 02-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 02-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 03-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 03-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 03-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 02-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Isolated Strain no.	Bacteria											
	SA			BS			EC			VA		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
C 03-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 04-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 04-1	-	-	-	17.0	17	17	-	-	-	16	16.2	16.2
C 04-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 04-3	-	-	-	19	20	20	-	-	-	-	-	-
C 04-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 04-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 04-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 05-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 05-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 05-3	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
C 06-1	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
C 06-2	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
C 06-2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C 06-4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Isolated Strain no.	Bacteria											
	SA			BS			EC			VA		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
C 07-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 07-2	-	-	-	15	16	16	-	-	-	-	-	-
C 07-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 07-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 08-1	-	-	-	15	16	16	-	-	-	-	-	-
C 08-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 08-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 08-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 09-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 09-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 09-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 09--4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 10-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 10-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 10-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 10-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Isolated Strain no.	Bacteria											
	SA			VA			EC			VA		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
C 10-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 11-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 11-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 11-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 11-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 12-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 12-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 12-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 12-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 12-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 12-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 12-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 13-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 13-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 13-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 13-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 12-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Isolated Strain no.	Bacteria											
	SA			BS			EC			VA		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
C 14-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 14-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 14-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 14-4	16.5	17	17	16	16.2	16.2	-	-	-	-	-	-
C 14-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 14-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 14-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 14-8	-	-	-	18	18	18	-	-	-	-	-	-
C 15-1	-	-	-	-	.	-	-	-	-	-	-	-
C 15-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 15-2	-	-	-	-	.	-	-	-	-	-	-	-
C 15-4	-	-	-	-	.	-	-	-	-	-	-	-
C 15-5	-	-	-	17	18	18	-	-	-	-	-	-
C 16-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 15-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 16-3	-	-	-	-	.	-	-	-	-	-	-	-
C 15-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Isolated Strain no.	Bacteria											
	SA			BS			EC			VA		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
C 16-5	-	-	-	18	18.5	18.5	-	-	-	-	-	-
C 17-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 17-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 17-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 17-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 17-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 18-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 18-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 18-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 18-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 18-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 17-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C19-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 19-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 19-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 20-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 20-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Isolated Strain no.	Bacteria											
	SA			VA			EC			VA		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
C 21-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 21-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 21-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 22-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 22-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 22-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 22-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 22-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 22-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 23-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C23-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 23-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 24-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 24-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 24-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 23-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 25-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Isolated Strain no.	Bacteria											
	SA			BS			EC			VA		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
C 25-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 25-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 25-5	-	-	-	17	17.5	17.5	-	-	-	-	-	-
C 25-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 26-1	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
C 26-1	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
C 26-3	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
C 26-4	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
C 26-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 26-6	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
C 27-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 27-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 27-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 27-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 27-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 27-6	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
C 27-7	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบการยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนระยะ cypris ของเพรียงหิน โดยฟิล์มแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	ความหนาแน่นของแบคทีเรีย (x 10^7 cells/cm^2)	จำนวนตัวอ่อน (ตัว)	ตัวอ่อนที่ลงเกาะ คิดเป็นร้อยละ	
C 04-2	7.1	30	23.3	
C 07-2	7.1	30	66.6	
C 14-4	0.6	30	16.6	
C 14-8	7.1	30	60.0	
C 15-5	0.98	30	66.6	
C 16-5	2.3	30	40.0	
C 25-5	2.3	30	60.0	
C 26-1	1.0	30	53.3	

อภิปรายผล

จากการศึกษาที่ผ่านมา ZoBell & Allen (1935) และ Young & Mitchell (1973) ได้ค้นพบว่าฟิล์มแบคทีเรียมีอิทธิพลต่อการกระตุ้น หรือยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียง (cyprid) รวมทั้งในสัตว์ชนิดอื่นอาทิเช่น polychaete *Janua* (*Dexiospira*) *brasiliensis* (Kirchman et.al. 1982)

ในเบื้องต้นได้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมาตรฐานเพื่อปูนแนวทางในการคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำไปทดสอบการยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียง (cyprid) พบว่า จากการทดสอบแบคทีเรียทะเลจำนวน 132 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากฟองน้ำและปะการังอ่อน มีถึง 8 สายพันธุ์ที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมาตรฐานคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ/หรือ *Staphylococus aureus* ATCC 25923 หรือ *Vibrio anguillarum* ORI และเมื่อนำแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นทั้ง 8 สายพันธุ์มาทดสอบหาแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียง(cyprid) ในครั้งนี้พบฟิล์มแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมงของสายพันธุ์ C 04-2 และ C 14-4 ที่ระดับความหนาแน่น 7.1×10^7 และ 0.6×10^7 เซลล์/ตร.ซม.ตามลำดับ สามารถแสดงผลยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียง ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Maki และคณะ (1988) ที่พบผลการยับยั้งของแบคทีเรียทะเลที่ 10^7 เซลล์/ตร.ซม. แบคทีเรียทะเลที่ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการลงเกาะทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถแยกได้จากฟองน้ำ ที่เก็บจากบริเวณเกาะสาก และเกาะล้าน จังหวัดชลบุรี ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาของ Kon-ya และคณะ (1995) ก็พบแบคทีเรียทะเลแยกได้จากฟองน้ำ *Halichondria okadai* จาก Numazu area ประเทศญี่ปุ่น โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ kkl 0304 สามารถยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียง *Balanus amphitrite* วิ่งสารประกอบที่สกัดได้เป็นสารประกอบ Ubiquinone-8 แบคีเรียนี้จำแนกชนิดได้เป็นกลุ่ม *Alteromonas* sp. นอกจากฟองน้ำแล้วยังมีเพรียงหัวหอม Ciona intestinalis ที่ James (1999) สามารถแบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการลงเกาะของสิ่งมีชีวิตอื่นทีชอบลงเกาะเช่น สาหร่าย ไดอะตอม รา และ แบคทีเรียอื่นๆได้เช่นเดียวกัน และฤทธิ์ในการยับยั้งการลงเกาะจะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในระยะ stationary phase

นอกจากนี้ Holmstrom และคณะ (1992)ยังได้รายงานว่าฟิล์มแบคทีเรียที่มีอายุมีฤทธิ์ในการยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียง และยังมีฤทธิ์มากขึ้นเมื่อฟิล์มแบคทีเรียมีอายุมากขึ้นจนถึง 120 ชั่วโมง แต่หลังจากนั้นก็จะลดลงเรื่อยๆซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fletcher และ Marshall (1982) ที่กล่าวว่า extracellular polymers นั้นเกี่ยวข้องกับการลงเกาะของแบคทีเรียและสารประกอบเหล่านี้อาจเป็นโปรตีนหรือโพลีแซคคาไรด์ก็ได้(Satherland 1983)

จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงแนวโน้มความเป็นไปได้ ที่จะนำผลิตผลจากแบคทีเรียจากทะเลโดยเฉพาะจากสัตว์ทะเลชนิดต่างๆ มาทดแทนสารประกอบโลหะหนักที่เป็นอันตรายที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน และน่าที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเป็นแนวทางการป้องกันการเกาะของ biofouling ในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Bakus, G., Targett, N.M., and Schulte, B. 1986 Chemical ecology of marine organisms: an overveiw. J chem. Ecol. 12: 107-111.

Bonar, D.B., R.M. Weiner, and R.R. Colwell. 1986. Microbial-invertebrates interactions and potential for biotechnology. Microb. Ecol., 12 : 101-110.

Cuba, T.R., and Blake, N.J. 1983. The initial development of a marine fouling assemblage on a natural substrate in a subtropical estuary. Botanica mar. 26: 259-264.

Dechsakulwatana, C., K. Ohwada, and U. Simidu. 1992. Inhibitory Effect of Marine Bacteria on Larval Movements of Several Barnacle Species Using Phototaxis Assay. Abstracts of the Sixth. International Symposium on Microbial Ecology, Sept. 6-11, 1992, p. 90, Barcelona, Spain.

Dechsakulwatana, C. 1994. Inhibitory Effect of Marine Bacteria on Barnacle Larvae. A dissertation submitted in purtial fulfilment of requirements for a Ph.D., The University of Tokyo, tokyo Japan, 126 p.

Dexter, S.C. 1976. Influence of substrate wettabililty on the formation of bacterial slime films on solid surfaces immersed in natural sea water. Proc. 4th. int. Cong. Mar Corr. Foul., Boulogne, France 1977, p. 137-144.

Ferreira, S., Seeliger, U. 1985. The colonization process of algal epiphytes on Ruppia maritima L. Botanica mar. 28: 245-249.

Fletcher, M. and Loeb, G.I. 1976. The Influence of substratum surface properties on the attachment of marine bacterium. In: Kerker, M.(ed.) Colloid and interface science. Vol.3, Academic Press Inc., New York, p. 459-469.

Standing, J., I.R. Hooper, and J.D. Costlow. 1982. Inhibition and induction of barnacles settlement by natural products present in octocorals. J. Chem. Ecol., 10 : 823-834.

Sutherland, J.P., and Karlson, R.H. 1977. Development and stability of the fouling community at Beaufort, North Carolina. Ecol. Monogr. 47: 425-446.

Wahl, M. 1989. Marine Epibiosis. I. Fouling and Antifouling: some basic aspects. Mar. Ecol. Prog. Ser., 58: 175-189.

ZoBell, C.E. and C. Allen. 1935. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. J. Bact., 29 : 239-251.