

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเซลล์เดียวจัดอยู่ในอาณาจักรโมเนรา (Monera) ตีวชั้นไซโฟไฟตา หรือยูแบคทีเรีย (Division Schizophyta & Eubacteria) รูปร่างโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ รูปแท่ง (rod – shaped, bacillus) รูปกลม (round, coccus) และรูปเกลียว (spiral, spirillum) ไซโทพลาซึมถูกล้อมรอบด้วยผนังเซลล์ นิวเคลียสมีกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (DNA) แต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้ยางค์เรียกว่า แฟลกเจลลัม สืบพันธุ์โดยการแบ่งตัวแบบไมโทซิส แต่อาจเกิดการผสมพันธุ์แบบสังยุค (Conjugation : การส่งผ่านกรดนิวคลีอิกระหว่างเซลล์) (The Concise Columbia Electronic Encyclopedia, 1994)

โดยทั่วไปแบคทีเรียถูกแบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ ดังนี้

1. แบคทีเรียที่สามารถสร้างอาหารเองได้ (autotrophic bacteria) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1.1 แบคทีเรียที่สร้างอาหารโดยวิธีการสังเคราะห์แสง (photosynthetic bacteria) ซึ่งจะใช้พลังงานแสงอาทิตย์และคลอโรฟิลล์ เพื่อให้ได้สารอินทรีย์ แบคทีเรียที่สร้างอาหารโดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (chemosynthetic bacteria หรือ chemo-autotrophic bacteria) ซึ่งได้พลังงานจากสารประกอบเคมี เช่น สารประกอบซัลไฟด์ (ไฮโดรเจนซัลไฟด์และซัลไฟด์ในรูปแบบอื่น ๆ) สารประกอบเหล็กหรือมีเทน เป็นต้น

1.2 แบคทีเรียที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ (heterotrophic bacteria) จัดเป็นพวกย่อยสลายอินทรีย์สารได้สารอินทรีย์และก๊าซที่ละลายน้ำ ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับพืชและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

แบคทีเรียทะเล

แบคทีเรียทะเลแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ แบคทีเรียที่ถูกพัฒนามาจากแหล่งอื่นและแบคทีเรียที่มีถิ่นกำเนิดในทะเลในบริเวณนั้นๆ แบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้อาศัยอยู่ที่ผิวน้ำ, ในชั้นของน้ำและอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น *Pseudomonas insolita* พบอยู่ในฟองน้ำคลาสเดโมสปองเจีย (class demosponges) ชนิด *Halichondria panicea* (Austin, 1988) แบคทีเรียบางชนิดอาศัยอยู่ในลำไส้ และทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล เช่น *Clostridium welchii*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tetani* พบในทางเดินอาหารของปลา ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ทำให้ปลาได้รับสารอาหารในการเจริญเติบโต (ปัญญูติ สุขศรีงาม, 2534)

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียทะเล (Rheinheimer, 1985) แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลส่วนมากเป็นพวกทนเกลือ (halophilic microorganisms) ต้องการโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2.5–4 เปอร์เซ็นต์ ในการเจริญเติบโตและจะไม่เจริญ หรือเจริญได้น้อยมาก ในอาหารที่ไม่มีเกลือ ความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียทะเลคือ 3.5 เปอร์เซ็นต์ (Rheinheimer, 1985) แบคทีเรียที่พบในทะเล 75–85 เปอร์เซ็นต์ เคลื่อนที่ได้เพราะมีแฟลกเจลลัม แต่ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่เป็นพวกที่อาศัยอยู่ได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) มีน้อยชนิดที่ชอบอาศัยในที่ไม่มีออกซิเจน (obligate anaerobe) ส่วนมากเป็นพวกที่มีวงกวัดและแบคทีเรียแกรมลบ ปัจจัยควบคุมการแพร่กระจายของแบคทีเรียทะเลคือ ปริมาณสารอาหาร ความเค็ม ความลึก และพีเอช (pH) เป็นต้น พบการแพร่กระจายของแบคทีเรียประมาณ 1,000 ถึง 100,000 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (Austin, 1988)

แบคทีเรียที่มีถิ่นกำเนิดในทะเลและแบคทีเรียที่พบในทะเลตัวอย่างเช่น *Acromobacter*, *Acromonas*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Occanospirillum*, *Pseudomonas* และ *Photobacterium* เป็นต้น (Austin, 1988) ซึ่งแสดงลักษณะของแบคทีเรียบางสกุลดังนี้

ลักษณะของแบคทีเรียสกุล *Flavobacterium* เป็นแท่งเรียงขนานกันขนาด 0.5 X 1–3 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต และเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลักษณะโคโลนีมีวงกวัดสีเหลืองหรือส้ม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1–2 มิลลิเมตร พบแพร่กระจายในดิน น้ำ นม และอาหาร (Palleroni, 1989)

ลักษณะของแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* รูปร่างแท่งตรงและแท่งโค้ง ขนาด 0.5–1 X 1.5–5 ไมโครเมตร เซลล์ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่ได้โดยใช้โพลีแฟลกเจลลา (polar

flagella) หลายอัน แบคทีเรียสกุลนี้ไม่ต้องการสารอินทรีย์เป็นปัจจัยในการเจริญเติบโต พบทั่วไปในธรรมชาติ บางชนิดก่อโรคในคน สัตว์ และพืช (Palleroni, 1989)

ลักษณะของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* มีรูปร่างเป็นแท่งตรงและแท่งโค้ง ขนาดกว้าง 0.5–0.8 ไมโครเมตร และยาว 1.4–2.6 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่โดยใช้โพลีแฟลกเจลลา สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบได้ทั้งในทะเลและน้ำกร่อย และในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล บางชนิดพบในน้ำจืด บางชนิดก่อโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล และบางชนิดก่อโรคต่อมนุษย์ (Palleroni, 1989)

ลักษณะของแบคทีเรียสกุล *Chromobacterium* รูปร่างเป็นแท่ง มีขนาด 0.6–0.9 X 1.5–3.5 ไมโครเมตร อยู่แบบเดี่ยว คู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ ติดสีแกรมลบ ใช้โพลีแฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ โคโลนีมีรงควัตถุสีม่วง เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่บางชนิดเจริญได้ในอุณหภูมิที่แตกต่างกันออกไป พบแพร่กระจายในดินและน้ำ (Palleroni, 1989)

ลักษณะของแบคทีเรียสกุล *Photobacterium* รูปร่างแท่งตรง อ้วน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8–1.5 ไมโครเมตร ความยาว 1.8–2.4 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่โดยใช้โพลีแฟลกเจลลา บางชนิดไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 18–25 องศาเซลเซียส ต้องการโซเดียมไอออน (Na^+) ในการเจริญเติบโต บางชนิดสามารถเรืองแสงได้ พบแพร่กระจายอยู่ในทะเลบนผิวสัตว์ทะเล และบางชนิดอาศัยร่วมกับอวัยวะเรืองแสงของปลาทะเล (Palleroni, 1989)

ลักษณะของแบคทีเรียสกุล *Alteromonas* รูปร่างเป็นแท่งตรง แท่งโค้ง มีขนาด 0.7–1.5 X 1.8–3.0 ไมโครเมตร เชลล์ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่ได้โดยใช้ โพลีแฟลกเจลลา แบคทีเรียในกลุ่มนี้ต้องการน้ำทะเลในการเจริญเติบโต บางชนิดต้องการสารอินทรีย์ในการเจริญ และเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียในกลุ่มนี้อาศัยอยู่ตามชายฝั่งและทะเลเปิด (Palleroni, 1989)

ลักษณะแบคทีเรียสกุล *Aeromonas* รูปร่างเป็นแท่งตรงและทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3–1.0 ไมโครเมตร ความยาว 1.0–3.5 ไมโครเมตร พบอยู่เดี่ยว คู่ และเป็นสายสั้น ๆ ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่ได้โดยใช้ โพลีแฟลกเจลลา อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 22–28 องศาเซลเซียส สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบตามท่อน้ำทิ้ง ในน้ำ ก่อโรคในกบ ปลา และมนุษย์ (Palleroni, 1989)

ประโยชน์ของแบคทีเรียทะเล

1. แบคทีเรียทะเลมีประโยชน์ต่อระบบนิเวศทางทะเล โดยช่วยให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุ ทำให้แหล่งน้ำมีความอุดมสมบูรณ์

2. แบคทีเรียเป็นแหล่งอาหารให้กับสัตว์น้ำวัยอ่อน เช่น เป็นอาหารให้สิ่งมีชีวิตในกลุ่มไบรโอซัว (bryozoans) และโพลีชีต (polychaetes) เป็นต้น (Gasselin & Yuan, 2000)

3. แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสร้างสาร ซึ่งมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาทางเภสัชวิทยา สารที่สร้างจากแบคทีเรียเรียกว่าสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หลายชนิด ดังแสดงในตาราง 1 (Jensen & Fenical, 1994) และเป็นเครื่องมือในการศึกษาวิจัยด้านอื่น (Haygood, Schmidt, Davidson & Faulkner, 1999)

ตารางที่ 1 แสดงแบคทีเรียทะเลจากแหล่งต่าง ๆ และการออกฤทธิ์ของโมเลกุลอินทรีย์ของแบคทีเรีย (Jensen & Fenical, 1994)

แบคทีเรีย	แหล่ง	การออกฤทธิ์ต่อสิ่งมีชีวิตของโมเลกุลอินทรีย์
<i>Chaina purpuregena</i>	ตะกอนดิน	สารต่อต้านมะเร็ง, ยาปฏิชีวนะ
<i>Streptomyces tenjimariensis</i>	ตะกอนดิน	ยาปฏิชีวนะ
<i>Streptomyces griseus</i>	ตะกอนดิน	ยาปฏิชีวนะ
<i>Streptomyces sioyaensis</i>	ตะกอนดิน	สารต่อต้านมะเร็ง
<i>Actinomycete</i> sp.	ปะการังอ่อน	สารต่อต้านมะเร็ง, ยาปฏิชีวนะ
<i>Streptomyces</i> sp.	ฟองน้ำ	ยาปฏิชีวนะ
<i>Pseudomonas bromoutilis</i>	หญ้าทะเล	ยาปฏิชีวนะ
<i>Chromobacterium</i> sp.	น้ำทะเล	ยาปฏิชีวนะ
unidentified gram-positive species	ตะกอนดินในน้ำทะเลลึก	สารต่อต้านมะเร็ง, สารต้านไวรัส
<i>Alteromonas</i> sp.	น้ำทะเล	สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
<i>Alteromonas</i> sp.	ฟองน้ำ	สารต้านจุลชีพ
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	เพรียงหัวหอม	สารต้านจุลชีพ

ตารางที่ 1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	แหล่ง	การออกฤทธิ์ต่อสิ่งมีชีวิตของโมเลกุลอินทรีย์
<i>Pseudomonas</i> sp	ริมทะเล	ยาปฏิชีวนะ
<i>Vibrio anguillarum</i>	ปลา	ไม่มีรายงาน
<i>Thermococcus</i>	น้ำพุร้อน	สารต่อต้านเชื้อรา
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ฟองน้ำ	สารต้านจุลชีพ

บทบาทของแบคทีเรียในสังคมสิ่งมีชีวิตประเภทลงเกาะติด ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียในสังคมสิ่งมีชีวิตประเภทลงเกาะติด มีลักษณะการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกันหรือได้ประโยชน์ร่วมกัน แบคทีเรียมีบทบาทสำคัญต่อการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิตที่ลงเกาะติด จากการศึกษาของโอบเบลเมื่อปี ค.ศ.1943 เมื่อวางวัสดุใด ๆ ลงในน้ำระยะเวลาหนึ่ง จะปรากฏเมือกสีน้ำตาล พบว่าเมือกนั้นคือ ชั้นของไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และโพลีแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) โดยมีจุลินทรีย์ผลิตสารออกมานอกเซลล์ เพื่อการเจริญเติบโตและเกิดการยึดเกาะกัน (O'Conner & Richardson, 1996; Baier, 1984; Egan, 1987) กลายเป็นแผ่นฟิล์มที่เกาะติดกันเรียกว่า ไบโอฟิล์ม (biofilm) และมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดมาลงเกาะ ทำให้กลายเป็นโครงสร้างซับซ้อนและมีขนาดใหญ่ขึ้นเรียกว่า โครงสร้างสังคมสิ่งมีชีวิตประเภทลงเกาะติด (fouling sequence model) (Wahl, 1989; Abarzua & Jekubowski, 1995)

โครงสร้างสังคมสิ่งมีชีวิตประเภทเกาะติด (Wahl, 1989; Abarzua & Jekubowski, 1995)

รูปแบบโครงสร้างสังคมสิ่งมีชีวิตประเภทเกาะติดประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังนี้

1. การสะสมสารอินทรีย์เช่น โปรตีน โปรตีโกลแคน (proteoglycan) และโพลีแซ็กคาไรด์ กระบวนการนี้เรียกว่า สภาวะทางชีวเคมี (biochemical condition) เกิดขึ้นเมื่อวางวัสดุใด ๆ ลงในน้ำภายในระยะเวลา 1 นาที

2. การตั้งถิ่นฐานของแบคทีเรีย (bacterial colonization) การลงเกาะของกลุ่มแบคทีเรียที่อยู่ใกล้พื้นผิว อาศัยการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน (Brownian motion) การเหนี่ยวนำทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) แรงดึงดูดของโลก (gravity) และแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waal forces) แบคทีเรียที่ลงเกาะในระยะนี้ สามารถหลุดออกจากพื้นผิวได้ และแบคทีเรีย

จะสร้างไฟบริล (fibril) ซึ่งเป็นสารโพลีแซ็กคาไรด์ออกมาภายนอกเซลล์ ประกอบด้วยกลูโคส และฟรุกโตส มีไอวาเลนแคทไอออน (divalent cation) คือ แคลเซียมไอออนและแมกนีเซียมไอออน (Ca^{2+} , Mg^{2+}) สร้างพันธะไอวาเลนต์ ยึดเกาะกับโมเลกุลโครงสร้างของแผ่นฟิล์มเรียกว่า เลคติน (Lectin) ทำให้เกิดการเกาะติดกัน ในขั้นนี้ประกอบด้วยเซลล์ที่ตายและมีชีวิตอยู่ การลงเกาะของแบคทีเรียเกิดภายในระยะเวลาประมาณ 1 - 2 ชั่วโมง

3. การลงเกาะของสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวอื่น ๆ (unicellular fouling) เช่น ไดอะตอม, สปอร์ของสาหร่าย และโปรโตซัว เรียกการลงเกาะของแบคทีเรียและไดอะตอมว่าเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ตั้งถิ่นฐานอันดับแรก (primary colonizer) เกิดในระยะเวลา 24 ชั่วโมง การลงเกาะของสปอร์ของสาหร่ายและโปรโตซัว (secondary colonizer) เกิดขึ้นเป็นลำดับต่อมาภายในระยะเวลาหนึ่งสัปดาห์

4. การลงเกาะของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ (multicellular eukaryont fouling) เช่น เพรียงหัวหอม ในดาเรีย (cnidaria) ไบโอะซัว (bryozoans) เพรียงหิน (acorn barnacle) หอยสองฝา จัดเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตลำดับสาม (tertiary colonizers) เกิดขึ้นภายในระยะเวลาประมาณสองถึงสามสัปดาห์ สรุปขั้นตอนการลงเกาะในภาพที่ 1

ไบโอฟิล์มมีบทบาทสำคัญต่อการลงเกาะของตัวอ่อนสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ก่อนที่จะมีการบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (metamorphosis) (Lappin-Scott, Costerton, & Marrie, 1992) กลไกการลงเกาะของตัวอ่อนเกิดจากสารประกอบโพลีแซ็กคาไรด์ จากการศึกษาของโคเวลล์พบว่า (Colwell, Pariser., & Sinsker., 1984, Bonar, Weinter, & Colwell, 1986) แบคทีเรีย *Alteromonas colwelliana* ที่พบในถังเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) ผลิตสาร L-3, 4-dihydroxyphenyllalanine (L-DOPA) ชักนำให้ตัวอ่อนหอยนางรมสร้างสารโพลีแซ็กคาไรด์ช่วยในการยึดเกาะติดตัวสุดแข็ง ซึ่งเป็นประโยชน์ในงานเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

การลงเกาะของสิ่งมีชีวิตประเภทลงเกาะติดเป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเทคโนโลยีทางทะเล เทคโนโลยีที่ใช้ในการต่อต้านสิ่งมีชีวิตประเภทลงเกาะติดในปัจจุบัน คือการใช้สารประกอบของไตรบิวทิลทิน (Tributyltin, TBT) ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง กลไกการทำงานของสารจะไปยับยั้งขบวนการสร้างและสลายสารอาหารของสิ่งมีชีวิตในทะเล ซึ่งสาร TBT คงอยู่ได้นานกว่า 5 ปี (Smith & Smith, 1975; & Evans, 1988) นำมาใช้ในการป้องกันการเกาะของเพรียงหินที่ได้ท้องเรือเดินทะเล ในรูปสีทากันเพรียง นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามที่จะค้น

การศึกษาของ มากิ และคณะ (Maki, et al, 1990) คัดแยกแบคทีเรียจากผิวหนังของ หินและบริเวณผิวน้ำ และแบคทีเรียที่เก็บรวบรวมได้จากสถาบันเก็บรวบรวมเชื้อของประเทศสหรัฐอเมริกา (American type culture collection) เช่น *Pseudomonas atlantica* (ATCC 19262), *Vibrio campbelli* (ATCC 25920), *V. vulnificus* (ATCC 27562) และ *Deleya marina* (ATCC 25374)

การศึกษาของคอนเนอร์และริชาร์ดสัน (O'Connor & Richardson, 1996) แบคทีเรีย ที่ใช้ในการทดลองเป็นแบคทีเรียที่ถูกเก็บรวบรวมไว้ *Deleya marina* (ATCC 25374), *Alteromonas macleodii* (ATCC 27126) และ *Pseudomonas fluorescens* (# 105)

การศึกษาของคอนยา และคณะ (Kon-ya, et al., 1995) แบคทีเรียสกุล *Alteromonas* คัดแยกจากฟองน้ำ *Halichondria okadai*

การศึกษาของโฮมสโตรม และเคเดนเบอร์ก (Holmstrom & Kjelleberg, 1999) คัดแยก แบคทีเรียสกุล *Pseudoalteromonas* จากหอยแมลงภู่, เพรียงหัวหอม และฟองน้ำ และการศึกษาของเกรส (Grace, 1999) ทดลองใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas tunicata* คัดแยกจากเพรียงหัวหอมตัวเต็มวัย

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียต่อการ ลงเกาะของตัวอ่อนทดสอบ มีวิธีการศึกษาโดยทดสอบกับเซลล์แบคทีเรีย และการทดสอบกับของ เหลวที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย (supernatant) (ชุดีวรรณ เดชสกุลวัฒนา, และคณะ, 2537, CMBB Annual Report, 1998) สารที่แบคทีเรียผลิตและมีผลต่อการลงเกาะของตัวอ่อน โดยอาจจะกระตุ้นหรือยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนทดสอบ จากการศึกษาของมากิ และคณะ (Maki et al, 1990) และแบคทีเรียที่มีอายุ 3 วัน มีความหนาแน่นของฟิล์มแบคทีเรีย $5.9 (\pm 1.6) \times 10^6$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร จะมีผลยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนมากกว่าฟิล์ม แบคทีเรียที่มีอายุ 1 วัน ซึ่งมีความหนาแน่นของฟิล์มแบคทีเรีย $2.4 (\pm 1.1) \times 10^6$ เซลล์ต่อตาราง เซนติเมตร ($p < .001$) และจากฟิล์มการศึกษาของโฮมสโตรม และคณะ (Holmstrom, Rittschof & Kjelleberg, 1992) บ่มแบคทีเรียดี 2 (*Alteromonas* sp.) ระยะเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ได้ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรีย 1.75×10^7 และ 2.54×10^7 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร สามารถยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนทดสอบ รวมทั้งแบคทีเรียที่เจริญถึงระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) จะมีฤทธิ์ต่อต้านการลงเกาะของตัวอ่อนเพิ่มขึ้น (Maki et al, 1990; Holmstrom, et al., 1992; Grace, 1999) จากการทดสอบการลงเกาะของตัวอ่อนทดสอบใน น้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียดี 2 ที่ไม่ได้เจือจาง และที่นำมาเจือจางอัตราส่วน 1:1 มีความเป็นพิษ

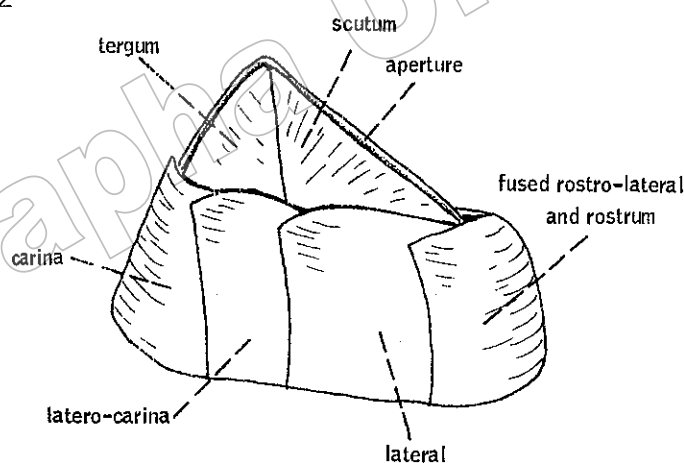
ต่อตัวอ่อนของเพรียงหินระยะนอพลีซิส และระยะไซพริต 100 % และจากการตรวจสอบคุณสมบัติ เบื้องต้นของสารประกอบนี้พบว่า เป็นสารมีขั้วและทนความร้อนสามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 6 วัน โครงสร้างโมเลกุลเป็นสารคาร์โบไฮเดรต (Holmstrom, et al., 1992) แสดงว่าสารที่แบคทีเรียผลิตออกมาภายนอกเซลล์มีประสิทธิภาพยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนทดสอบ

3. ตัวอ่อนทดสอบของสิ่งมีชีวิตประเภทลงเกาะติด ตัวอ่อนที่นำมาใช้ในการทดสอบ คือ ตัวอ่อนของเพรียงหิน ในรายงานการวิจัยส่วนใหญ่ ใช้ตัวอ่อนเพรียงหินชนิด *Balanus amphitrite* ซึ่งเป็นชนิดที่กระจายอยู่ทั่วโลก จากการรวบรวมงานวิจัยสามารถสรุปกลุ่ม หรือ ชนิดแบคทีเรียที่มีผลต่อการยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนที่นำมาใช้ในการทดลองได้ดังตาราง 2 ตารางที่ 2 แสดงชนิดหรือกลุ่มแบคทีเรียที่ค้นพบจากรายงานการวิจัยที่มีผลยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนทดสอบ

ชนิด / กลุ่มแบคทีเรีย	ชนิดตัวอ่อนทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
<i>Alteromonas, Vibrio</i>	<i>Balanus amphitrite</i>	ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, และคณะ 2537
<i>Deleya marina</i>	<i>Balanus amphitrite</i>	Maki et al., 1990
<i>Vibrio, Pseudoalteromonas</i>	<i>Balanus amphitrite</i>	Holmstrom et al., 1992, 1998
<i>Alteromonas</i>	<i>Balanus amphitrite</i>	Kon-ya et al., 1995
<i>Deleya marina</i>	<i>Balanus amphitrite</i>	O'Connor &
<i>Alteromonas macleodii</i>		Richardson, 1996
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Pseudoalteromonas tunicate</i>	<i>Balanus amphitrite</i>	Grace, 1999
	<i>Ciona intestinulis</i>	

อนุกรมวิธานของเพรียงหิน (taxonomy of barnacle)

เพรียงหิน (acorn barnacle) จัดอยู่ในไฟลัมอาร์โทรพอด (Phylum Arthropoda) คลาสครัสเตเชีย (Class Crustacean) ซับคลาสเซอริพิดี (Subclass Cirripedia) เพรียงหินมีอยู่ประมาณ 1,000 ชนิด (species) มีถิ่นอาศัย (habitat) ในทะเลน้ำตื้นเขตร้อนและเขตอบอุ่น ในระยะตัวอ่อน ดำรงชีวิตเป็นแพลงก์ตอน ส่วนตัวเต็มวัยเกาะนิ่งบนวัตถุชนิดต่าง ๆ เช่น ก้อนหิน ท้องเรือ สากห่วยทะเล เสาเข็ม ท่าเรือ ตู้ต่อเรือ บนตัวสัตว์ทะเล เศษไม้ที่ลอยตามน้ำ และบางชนิดเป็นพาราไซต์อยู่ในตัวปู ปลา ดาว เป็นต้น เพรียงหินเป็นสัตว์ที่มีสองเพศในตัวเดียวกัน (hermaphrodites) การผสมพันธุ์สามารถผสมพันธุ์ข้ามตัว (cross-fertilization) และการผสมในตัวเดียวกัน (self-fertilization) และบางชนิดแยกเพศ เพรียงหินที่มีการสืบพันธุ์ภายในตัว เช่น *Chthamalus stellatus* *Balanus perforatus* และ *Verruca stroemia* กลุ่มที่ผสมข้ามตัว เช่น *Semibalanus balanoides* *Balanus crenatus* *Elminius modestus* และ *Balanus balanus* (Darwin, 1854; Crisp, 1954; Barnes & Crisp, 1956; Furman & Yule, 1990) พฤติกรรมของเพรียงหินตัวเต็มวัย เมื่อเพรียงหินอยู่ในน้ำฝาบนสองฝาจะเปิดเพื่อให้ส่วนขาที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปดักจับอาหาร ลักษณะรูปร่างภายในคล้ายกัง ส่วนหัวชี้ลง โครงสร้างภายนอกประกอบด้วย 4 ถึง 6 ฝาหินปูน (calcareous plates) สีขาว ขมขรุขระ มันวาว แล้วแต่ชนิด ดังแสดงในภาพ 2



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างภายนอกของเพรียงหิน (Barn, 1987)

วงจรชีวิตของเพรียงหิน (life cycle of barnacle)

เพรียงหินตัวเต็มวัยมีฟูไไซที่ฐานซึ่งเป็นส่วนช่องท้องของเพรียง ตัวอ่อนระยะแรกเรียกว่า นอเพลียส (nauplius larvae) ตัวอ่อนระยะนี้มีลักษณะพิเศษคือ มีคาลาเปส (calapace) เป็นรูปสามเหลี่ยมโดยมีฐานอยู่ด้านหน้า รัยางค์ของตัวอ่อนระยะนอเพลียสมี 3 คู่ หนวดคู่ที่ 1 (antennules) หนวดคู่ที่ 2 (antennae) และกราม (mandibler) ตัวอ่อนระยะนี้กินสารแขวนลอย, แพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ กลุ่มไดอะตอมเช่น คีโตเซอรอส (*Chaetoceros* sp.) สกิลีโตนีมา (*Skeletonema* sp.) เป็นอาหาร นอเพลียสจะลอกคราบ 6 ครั้ง ก่อนเจริญเป็นตัวอ่อนระยะไซพริต (cyprid larvae) ซึ่งมีคาลาเปส 2 ฝา หุ้มลำตัวจนมิด ระยะนี้ไม่กินอาหารจนกระทั่งลงเกาะ ไซพริตเกาะโดยใช้หนวดคู่ที่ 1 และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป (metamorphosis) จนเป็นตัวเต็มวัย ระยะลงเกาะจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือน (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2541) ซึ่งแล้วแต่ชนิดและฤดูกาล ดังแสดงในภาพที่ 3

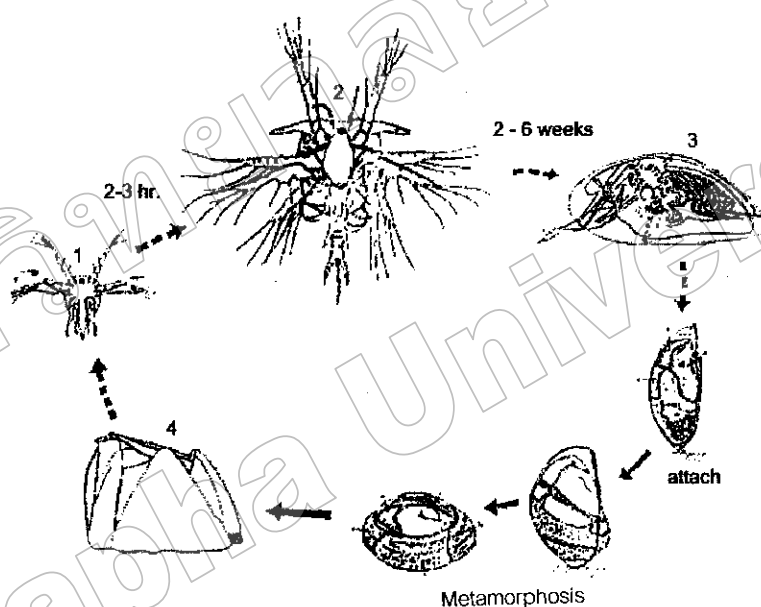
เพรียงหินโดยทั่วไปในช่วงการสืบพันธุ์ สามารถสร้างตัวอ่อนได้มากถึง 20,000 ตัว ขึ้นอยู่กับฤดูกาล จากการศึกษาของคอนและคูลิโควา (Korn & Kulikova, 1995 ; Angsupanich et al, 1998) ศึกษาการแพร่กระจายตามฤดูกาลของตัวอ่อนเพรียงหินในอ่าวอวacha (Avacha) ประเทศรัสเซีย พบว่าฤดูกาลมีผลต่อความชุกชุมของตัวอ่อนเพรียงหิน ช่วงกลางเดือนเมษายนพบตัวอ่อนเพรียงหินชุกชุมที่สุด (1,800 ตัว / ลูกบาศก์เมตร) อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนเพรียงหินขึ้นอยู่กับชนิดของเพรียงหิน ลักษณะภูมิอากาศ ปริมาณอาหาร ความเค็ม ความขุ่นใสของน้ำ และกระแสน้ำ (Kaestner, 1970 ; Angsupanich et al, 1998)

เพรียงหินชนิด *Balanus amphitrite* (Darwin, 1854) *Balanus amphitrite* Darwin, 1854 จัดอยู่ในคลาส (Class Crustacean) ออเดอร์ไทรอาซิกา (Order Thoracica) สกุลบาลานีดี (Family Balanidae)

Balanus amphitrite มีชื่อสามัญว่า เพรียงหินลาย (striped barnacle) มีลักษณะแตกต่างจากเพรียงหินชนิดอื่นคือมีพื้น 12-13 สี บนลาบรัม (labrum) และมีหนามสั้น ๆ บนทีการ์ (terga) ครึ่งหนึ่งของความยาวฐาน (Harding, 1962) ส่วนของ ลาบรัมลิพ (labrum lip-like) แผ่ขยายจากส่วนหน้าไปถึงปากมีทีการ์ 1-2 คู่

อนุกรมวิธานของเพรียงหิน *Balanus amphitrite* (Darwin, 1854) ดาร์วินแบ่งเพรียงหินออกเป็น 9 กลุ่ม คือ *Communis*, *Venustus*, *Pallidus*, *Niveus*, *Modestus*, *Stutsburi*, *Obscurus*, *Variegatus* และ *Cirratus* และต่อมา ฮาร์ดดิง (Harding, 1962) แบ่งกลุ่มชนิดเพรียงหินทั้ง 9 โดยใช้ชิ้นส่วนแห้งของดาร์วิน (dried speciment) แบ่งออกเป็น 4

กลุ่มคือ *B. amphitrite*, *B. pallidus*, *B. venustus*, และ *B. variegatus* และกลุ่มของ *B. amphitrite* เปลี่ยนชื่อเป็นชนิด *B. amphitrite* var *amphitrite* ส่วนชนิด *Pallidus* และ *Stutsburi* จัดเป็นชนิด *Pallidus* ส่วนกลุ่ม *Venustus*, *Niveus*, *Modestus* และ *Obscurus* จัดเป็นชนิด *Venustus* และชนิด *Variegatus* และ *Cirratu* จัดเป็นชนิด *Variegatus* (Harding, 1962) และจากการศึกษาในระยะเวลาต่อมาโดยเฮนรีและแมกลองจิ้น (Henry & McLaughlin, 1975) ได้สรุปชนิดของเพรียงหินไว้ 2 สับสปีชีส์ (subspecies) ที่พบในปัจจุบัน คือ *B. amphitrite amphitrite* และ *B. saltonensis* Rogers, 1949 และจากการศึกษาทาง พันธุกรรม (ยีนส์) พบว่าเพรียงหินมีเพียงชนิดย่อยชนิดเดียวคือ *B. amphitrite* ที่แพร่กระจายอยู่ ทั่วโลกในปัจจุบัน (Flowerdew, 1985)

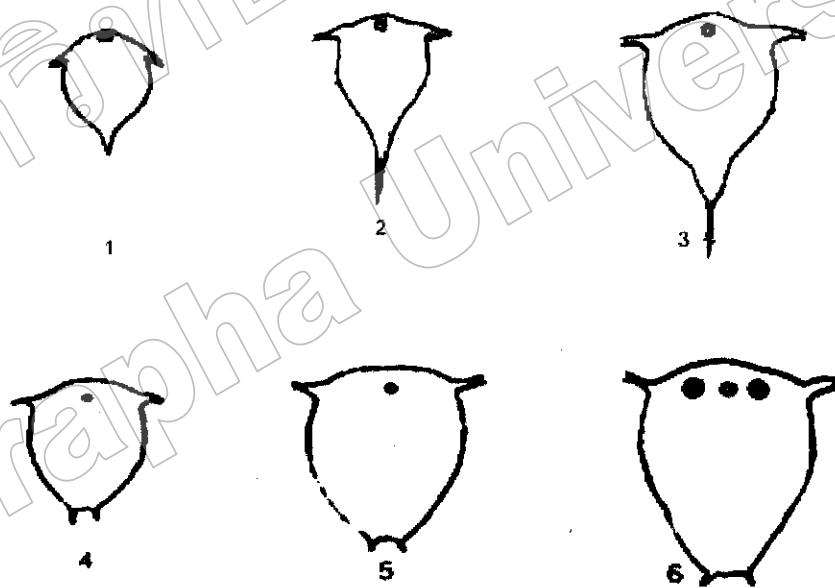


ภาพที่ 3 แสดงวงจรชีวิตของเพรียงหิน (Newman, 1969 cited in Dechsakulwatana, 1994) หมายเลข 1-2 ตัวอ่อนนอพอเลียสระยะที่ 1-2 หมายเลข 3 ตัวอ่อนระยะไซพริด และ หมายเลข 4 ตัวเต็มวัยของเพรียงหิน

ลักษณะทางชีววิทยาของเพรียงหินชนิด *B. amphitrite* *B. amphitrite* มีระยะการเป็นนอพอเลียส 6 ระยะ และระยะไซพริด (cypris) 1 ระยะ ก่อนเป็นตัวเต็มวัย (Costlow & Bookhout, 1958) นอพอเลียสระยะที่ 1 มีลักษณะเหมือนลูกแพร์ มีเขาคตรงส่วนหน้า มีการเจริญของลาบรัมและหนวด (Karande, 1974) ส่วนท้องของนอพอเลียสที่ปลายสุดมีหนามแหลม 2 อัน (Costlow & Bookhout, 1958) ดังแสดงในภาพ 4-9

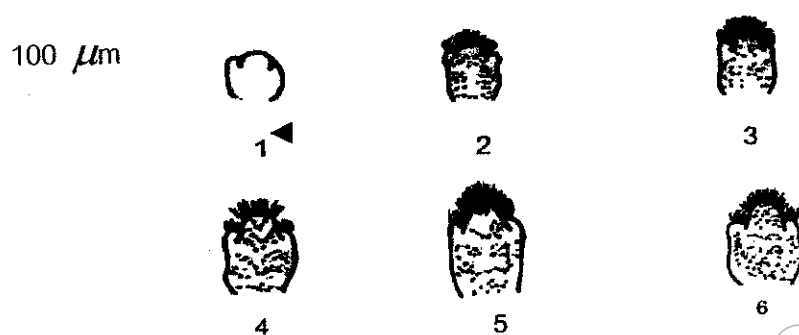
นอเพรียงระยะที่ 2 มีการพัฒนาแผ่นคาราเปส (carapace) และหนามที่ขอบคาราเปส มีการเปลี่ยนแปลงที่ส่วนท้องกับส่วนหน้าและส่วนหลังเกิดวงหนาม (Karade, 1974) เขาด้านหน้าเลื่อนไปอยู่ด้านข้าง (Costlow & Bookhout, 1958) แสดงในภาพ 4-9

นอเพรียงระยะที่ 3 การพัฒนาแกนหนวดขยายขนาดขึ้น (Karade, 1974) ส่วนนอเพรียง ระยะที่ 4 คาราเปสขนาดใหญ่ขึ้น และมีการพัฒนาฟันคู้หน้า (Costlow & Bookhout, 1958) นอเพรียงระยะที่ 5 มีการเปลี่ยนแปลงของ ซีติล (setal) (Karade, 1974) และมีหนามเล็ก ๆ เพิ่มขึ้นแต่ละข้างของร่างกายจนถึงส่วนท้อง (Costlow & Bookhout, 1958) และนอเพรียงระยะที่ 6 มีการพัฒนาตาเป็น 1 คู่ (Karade, 1974; Costlow & Bookhout, 1958) ต่อมา มีการเปลี่ยนแปลงส่วนท้อง รางค์ที่หางได้โครงสร้างของตัว (Karade, 1974) จนกลายเป็นระยะไซพริต หลังจากการปฏิสนธิจนกระทั่งเข้าสู่ระยะไซพริตใช้เวลา 11-12 วัน (Karade, 1974) ภายหลังจากระยะนี้ตัวอ่อนเพรียงหินมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเพรียงหินตัวเต็มวัย



200 μm

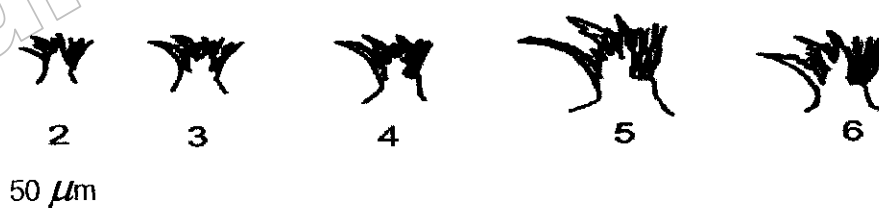
ภาพที่ 4 แสดงคาราเปส นอเพรียงระยะที่ 1-6 *Balanus amphitrite* (Darwin, 1854)



ภาพที่ 5 แสดงลาบรัม นอเพลียสระยะที่ 1-6 *Balanus amphitrite* (Darwin, 1854)



ภาพที่ 6 แสดงขบวนการเปลี่ยนแปลงที่ช่องท้องและหนามที่ส่วนหาง นอเพลียสระยะที่ 1-6 *Balanus amphitrite* (Darwin, 1854)

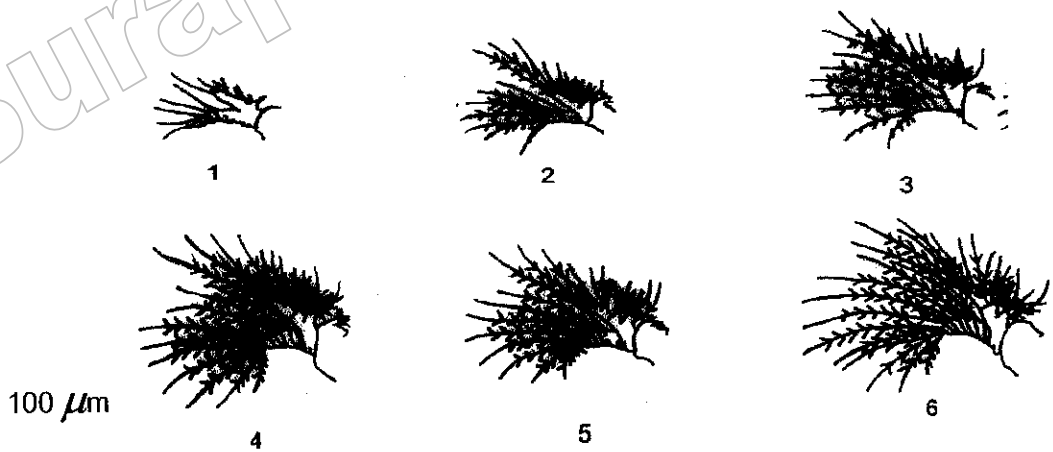


ภาพที่ 7 แสดง Gnathobase ของหนวดนอเพลียสระยะที่ 2-6 *Balanus amphitrite* (Darwin, 1854)



ภาพที่ 8 แสดงหนวดคู่ที่ 1 (ซ้าย) และขากรรไกร (ขวา) นอเพลียสระยะที่ 1 - 6

Balanus amphitrite (Darwin, 1854)



ภาพที่ 9 แสดงหนวดคู่ที่ 2 นอเพลียส ระยะที่ 1 - 6 *Balanus amphitrite* (Darwin, 1854)

จากการศึกษาของคาลคาโน และคณะ (Calcagno, Gappa & Tablado, 1998) พบว่าเพรียงหินลายที่อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งเมดิเตอร์เรเนียนสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 77 วัน และมีชีวิตอยู่ได้นาน สูงสุด 1.26 ถึง 1.44 ปี และเพรียงหินที่อัฟริกาได้สามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 22 เดือนและดำรงชีวิตได้นานสูงสุด 5-6 ปี ดาเนียลและฟิลไล (Daniel, 1958; Pillai, 1985) ศึกษาการวางไข่ของเพรียงหินชนิด *B. amphitrite* ในประเทศอินเดียพบว่าเพรียงหินชนิดนี้สามารถวางไข่ได้ตลอดปี และจากการศึกษาของคอสโรวและบรู๊คเฮ้า (Costlow & Bookhout, 1958) พบว่าเพรียงหินชนิดนี้ผสมพันธุ์สูงสุดในช่วงฤดูร้อน และอีแกนและแอนเดอร์สัน (Egan & Anderson, 1986) ศึกษาเพรียงหินชนิดนี้ในประเทศออสเตรเลียพบว่าเพรียงหินมีฤดูกาลผสมพันธุ์ในระหว่างฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน เพรียงหินชนิดนี้สามารถให้ผลผลิตได้เมื่อเป็นตัวเต็มวัย ขนาด 5 มิลลิเมตร จากการศึกษาของ คาลคาโน และคณะ (Calcagno et al., 1997) ในอัฟริกาได้พบว่า ส่วนฐานของตัวเต็มวัยเพรียงหิน *Balanus amphitrite* มีเส้นผ่านศูนย์กลางยาวที่สุด 16.4 มิลลิเมตร ถึง 16.9 มิลลิเมตร และจากการศึกษาของอีแกนและ แอนเดอร์สัน (Egan & Anderson, 1986) ในประเทศออสเตรเลียพบว่าความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของฐานเพรียงหิน *B. amphitrite* คือ 19.0 มิลลิเมตร และจากการศึกษาของเอล-โคมิ และคาจิฮารา (El-Komi & Kajihara, 1991) พบว่าเพรียงหินนี้สามารถปล่อยไข่จำนวน 1,000 ถึง 10,000 ฟองต่อครอก และมีจำนวน 24 ครอกภายในระยะเวลา 1 ปี

การศึกษาเรื่องการทนอุณหภูมิของเพรียงหิน *B. amphitrite* โดยแอนนิและคูเรียน (Anil & Kurian, 1996) พบว่าอัตราการตายของเพรียงหินที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีอัตราการตายสูงที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสในทุก ๆ ความเค็ม (Anil, Chiba, Okamoto & Kurokura, 1995)

ในการศึกษาเรื่องการทนความเค็มของเพรียงหินพบว่าปัจจัยหลักขึ้นกับอุณหภูมิของน้ำ (Anil, et al., 1995) จากการศึกษาของแอนนิ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของตัวอ่อนเพรียงหินชนิดนี้คือ 23 องศาเซลเซียส และเมื่อทดสอบที่ความเค็มต่างกันพบว่า ที่ความเค็ม 10 ส่วนในพันส่วน (ppt) มีอัตราการตาย 21 เปอร์เซ็นต์ ที่ 20 ppt มีอัตราการตาย 13 เปอร์เซ็นต์ (Anil, et al., 1995) ที่อุณหภูมิสูงสุดและอุณหภูมิต่ำสุดของความเค็ม 20 ppt มีอัตราการตาย 99 - 58 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 23-27 องศาเซลเซียสของความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วนมีอัตราการตาย 10-19 เปอร์เซ็นต์

การกินอาหาร เพรียงหินลายกินสารแขวนลอยในน้ำโดยใช้ cirral apparatus (LaBarbera, 1984) ซึ่งมีลักษณะเหมือนตะแกรงยื่นออกมาตั้งฉากกับทิศทางการไหลของกระแสน้ำ (Crisp & Bourget, 1985)

จากการศึกษาของซูโร (Zullo, 1963) พบว่า *B. amphitrite* กระจายอยู่ทั่วโลกในเขตอบอุ่นและทะเลเขตร้อนที่พอรีดาถึงเมทซาจูเซท ทางทิศเหนือของอเมริกาในเมดิเตอร์เรเนียน, ตะวันตกของอินเดีย, อัฟริกาใต้, ฟิลิปปินส์, นิวเซาเวลล์ และเกาะอังกฤษ

ศักยภาพของเพรียงหินลาย เป็นสิ่งมีชีวิตที่ชอบลงเกาะท้องเรือและท่าเรือ (Brankevich, Bastida & Martinez, 1984) โดยเพรียงหินจะปล่อยสารออกมายึดเกาะพื้นแข็งที่มีโปรตีนเคลือบอยู่บริเวณท่อน้ำไหล (Mangum, Shepherd & Williams, 1972; Starostin, 1961) ซึ่งเป็นสาเหตุการผูกพันของโลหะ ทำให้ต้องเสียค่าบำรุงรักษา และเป็นสาเหตุการเพิ่มแรงเสียดทานระหว่างพื้นผิวได้ท้องเรือ ทำให้เรือมีความเร็วลดลง ทำให้สูญเสียค่าใช้จ่ายในการเดินทางเพิ่มขึ้น (London, 1972)