

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ท.มส.นสุข อ.เมือง จ.ขอนแก่น 20131

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลจากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร
จังหวัดชลบุรี ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal transcribed spacer

ปีบะเนตร พึงพา

16 ส.ค. 2554 77 0017294
29 1556 เริ่มบริการ
17 พ.ย. 2554

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กรกฎาคม 2554

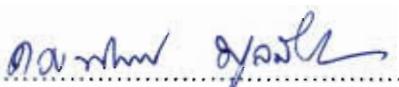
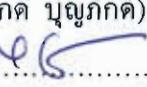
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ปีะเนตระ พึงพา ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาด้าน⁴
หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

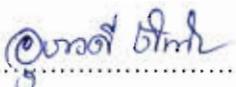
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....
 อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุดา นุญกั๊ดี)
.....
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.ถนอมศักดิ์ นุญกั๊ดี)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
 ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดาวพิพิชญ์ มูลมั่งมี)
.....
 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุดา นุญกั๊ดี)
.....
 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุศรัตน์ สวนจิตร)
.....
 กรรมการ

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาด้าน⁴
หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....
 ถนนดีคณะกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษาวาดี ดันดิวนุรักษ์)
วันที่...4...เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2554

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์
จากโครงการบัณฑิตศึกษาของศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม
พิชวิทยาและการบริหารจัดการเคมี
ประจำภาคต้น ปีการศึกษา 2552

ประกาศคุณภาพ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา นุญกักดี อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ดร. ถนนศักดิ์ นุญกักดี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาและนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดี เสนอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. ชูติวรรณ เดชาสกุลวัฒนา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัย นูรพาฯ ชลบุรี ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างแบบที่เรียบเท่าแก่ ได้จากฟองน้ำทะเล และให้ข้อมูล ตลอดจนความรู้เกี่ยวกับแนวคิดที่เรียบและฟองน้ำทะเลสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ และผู้ทรงคุณวุฒิ อาทิ ดร. กาญจนา หริ่มเพ็ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนูรพา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงทิพย์ มูลมั่น อาจารย์ประจำ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าชัชนาท ที่ให้ความ อนุเคราะห์ในการตรวจสอบทั้งให้คำแนะนำแก้ไขเกี่ยวกับรายละเอียดของงานวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

และขอขอบพระคุณ โครงการบัณฑิตศึกษา ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิชิวิทยาและการบริหารจัดการเคมี ที่ให้ทุนสนับสนุนสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นกตัญญูต่อท่าน บุพการี อาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและ ประสบความสำเร็จมาจนทราบเท่าทุกวันนี้

ปิยะเนตร พึงพา

51911886: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วทม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คำสำคัญ 16S rRNA/ 23S rRNA/ ITS/ marine sponge/ marine bacteria

ปีบัณฑิต พี่งพา: การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลจากบริเวณหมู่เกาะแสมสารจังหวัดชลบุรี ด้วยลำดับนิวคลีโอ ไทร์ดของ Internal transcribed spacer (DIVERSITY OF BACTERIA ASSOCIATED WITH MARINE SPONGES FROM SAMAESAN ISLANDS, CHONBURI PROVINCE BASED ON INTERNAL TRANSCRIBED SPACER SEQUENCES) คณะกรรมการคุณวิทยานิพนธ์: ชุดา บุญภักดี, Ph.D., ถนนอมศักดิ์ บุญภักดี, D.Agr.Sc. 93 หน้า. ปี พ.ศ. 2554.

การศึกษาในครั้งนี้ ทำการวิเคราะห์แบคทีเรีย 19 ไอโซเลต ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล 8 ชนิด (*Halichondria* sp., *Monanchora unguiculata*, *Mycale grandis*, *Xestospongia tesudinaria*, *Lamellodysidea herbacea*, *Oceamapia sagittaria*, *Neopetrosia* sp. และ *Cliona* sp. จำนวน 2, 5, 2, 2, 4, 2, 1 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ) เก็บจากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยศึกษาลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rRNA-23S rRNA จากปฏิกริยาพีซีอาร์ (PCR) โคลน และอ่านลำดับเบส ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 884-1,409 คู่เบส เมื่อเทียบเคียงลำดับเบสนบนฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับเบสในส่วนต้นของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 140 คู่เบส เทียบเคียงได้กับยีน 16S rRNA มีความเหมือน 84-100 % บ่งชี้แบคทีเรียทะเลได้ทั้งหมด 11 ตระกูล คือ *Alcanivorax* sp. (isolate 1), *Bacillus* sp. (isolate 2), *Haliea* sp. (isolate 3, 8), *Pseudoalteromonas* sp. (isolate 4, 5, 6, 9, 11), *Vibrio* sp. (isolate 7), *Shewanella* sp. (isolate 10), *Marinomonas* sp. (isolate 12), *Pseudomonas* sp. (isolate 13), *Dokdonia* sp. (isolate 14, 15), *Mesorhizobium* sp. (isolate 16, 17, 18) และ *Teredinibacter* sp. (isolate 19) ส่วนลำดับเบสในส่วนท้ายของผลิตภัณฑ์ PCR เทียบเคียงได้กับยีน 23S rRNA (479-934 คู่เบส) มีความเหมือน 85-94 % โดย 14 ไอโซเลต ระบุสกุลได้ตรงกับการใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ยกเว้น ไอโซเลต 14, 15, 16, 17 และ 18 ที่ลำดับนิวคลีโอ ไทร์ด บริเวณ 23S rRNA ไม่สามารถระบุได้ เมื่อศึกษาริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ขนาด 236 – 352 คู่เบส พบว่าไม่สามารถเทียบเคียงได้กับฐานข้อมูล GenBank (เมษายน, 2554) และพบว่าลำดับเบสของบริเวณ ITS มีความแตกต่างกันมากระหว่างสกุล แต่มีขนาดค่อนข้างใกล้เคียงกันใน ไอโซเลตที่จัดไว้เป็นสกุลเดียวกัน เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ 16S -23S rRNA ของแบคทีเรียแต่ละชนิดตัวตัวเดียวกัน ใช้มีตัดจำเพาะ MSeI พนแบบลายพิมพ์คีเอ็นอีที่แตกต่างกันจำนวน 16 แบบ แต่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างน้อยจึงไม่สามารถระบุความเป็นเอกลักษณ์ของลายพิมพ์คีเอ็นอีได้

51911886: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE, M.Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: *16S rRNA/ 23S rRNA/ ITS/ MARINE SPONGE/ MARINE BACTERIA*

PIYANATH PUNGPA: DIVERSITY OF BACTERIA ASSOCIATED WITH MARINE SPONGES FROM SAMAESAN ISLANDS, CHONBURI PROVINCE BASED ON INTERNAL TRANSCRIBED SPACER SEQUENCES. ADVISORY COMMITTEE: CHUTA BOONPHAKDEE, Ph.D., THANOMSAK BOONPHAKDEE, D.Agr.Sc. 93 P. 2011.

This study was undertaken to analyze nineteen marine bacteria isolated from eight marine sponges (*Halichondria* sp., *Monanchora unguiculata*, *Mycale grandis*, *Xestospongia tesudinaria*, *Lamellodysidea herbacea*, *Oceamapia sagittaria*, *Neopetrosia* sp. and *Cliona* sp.; 2, 5, 2, 2, 4, 2, 1 and 1 isolates, respectively) collected from Samaesan Islands, Chonburi Province. To examine these marine bacterial strains, the region of *16S-23S rRNA* (884-1,409 bp) was PCR-amplified, cloned, and sequencing. Blast analysis of the sequences obtained from the initially amplified-PCR products (~140 bp) against GenBank database revealed significant similarity (84-100 %) with *16S rRNA* gene. This analysis was able to identify 19 marine bacterial strains into 11 genus as *Alcanivorax* sp. (isolate 1), *Bacillus* sp. (isolate 2), *Haliea* sp. (isolate 3, 8), *Pseudoalteromonas* sp. (isolate 4, 5, 6, 9, 11), *Vibrio* sp. (isolate 7), *Shewanella* sp. (isolate 10), *Marinomonas* sp. (isolate 12), *Pseudomonas* sp. (isolate 13), *Dokdonia* sp. (isolate 14, 15), *Mesorhizobium* sp. (isolate 16, 17, 18) and *Teredinibacter* sp. (isolate 19). However, the nucleotide sequences from the end of the obtained amplicons (479 - 934 bp) showed significant similarity (85-94 %) with *23S rRNA* gene. This latter sequences analysis was able to discriminate 14 marine bacterial strains as those of the *16S rRNA* analyzed. Except for the isolates 14, 15, 16, 17 and 18, which were unable identified. Analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region between *16S rRNA* and *23S rRNA* genes (236 – 352 bp) of all strains was also investigated, but they did not match those of available in GenBank (April, 2011). The ITS sequences were very different between genus, but its size was almost identical in the same genus. The *16S - 23S rRNA* genes amplicons were subsequently digested with restriction enzyme *MSeI*, and 16 different RFLP types were generated. There were few bacterial samples analyzed in this study, therefore, the identical *16S - 23S rRNA* fingerprinting patterns of individual genus could not be reliably detected.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	๑
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๒
สารบัญ.....	๓
สารบัญตาราง.....	๔
สารบัญภาพ.....	๘
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัจจุบัน.....	3
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ชีววิทยาทั่วไปของฟองน้ำทะเล.....	5
2.2 แบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล.....	6
2.3 ความหลากหลายของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล.....	8
2.4 การจำแนกและบ่งชี้นิคของแบคทีเรีย.....	9
2.5 ข้อความพันธุกรรมของแบคทีเรีย.....	13
2.6 เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction).....	15
2.7 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล.....	17
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
3.1 อุปกรณ์.....	21
3.2 สารเคมี.....	22

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3.3 โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ศึกษา.....	23
3.4 ตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลที่ใช้ในการทดลอง.....	23
3.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล.....	24
3.6 การสักดิ้นดีเอ็นเอ โดยชุดสักดิ้นสำเร็จ High Speed Plasmid Mini Kit	26
3.7 การวิเคราะห์และขึ้นยั่นผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ และการสร้าง เคนโดรแกรม.....	27
3.8 การตัดผล PCR ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเรสทริกชันเอ็นไซม์ (PCR-RFLP).....	27
4 ผลการวิจัย.....	28
4.1 ขนาดของผลผลิต PCR ระหว่างยีน <i>16S – 23S rRNA</i>	28
4.2 การโคลนชีนส่วนดีเอ็นเอระหว่างยีน <i>16S - 23S rRNA</i> ของแบคทีเรีย.....	29
4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	29
4.4 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ และเคนโดรแกรมความสัมพันธ์.....	31
4.5 การจำลองการตัดผลผลิต PCR ระหว่างยีน <i>16 – 23S rRNA</i> ด้วยเรสทริกชัน เอนไซม์.....	52
5 อภิปรายและสรุปผล.....	59
บรรณานุกรม.....	67
ภาคผนวก.....	73
ภาคผนวก ก.....	74
ภาคผนวก ข.....	83
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	93

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2 – 1 ลักษณะการดำรงชีวิตแบ่งตามความต้องการแหล่งพลังงานและแหล่งการรับอน.....	10
4 – 1 ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ในช่วงระหว่างยีน $16S - 23S rRNA$ ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเดททั้ง 19 ไอโซเลต.....	30
4 - 2 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลโดยเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไฮด์ในส่วนของยีน $16S rRNA$ กับฐานข้อมูล Genbank.....	33
4 – 3 เมตริกซ์เปรียบเทียบทองลำดับนิวคลีโอไฮด์บริเวณ $16S rRNA$ ของแบคทีเรียทั้งหมด 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล.....	36
4 - 4 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลโดยเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไฮด์ในส่วนของยีน $23S rRNA$ กับฐานข้อมูล Genbank.....	39
4 - 5 เมตริกซ์เปรียบเทียบทองลำดับนิวคลีโอไฮด์บริเวณ $23S rRNA$ ของแบคทีเรียทั้งหมด 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล.....	44
4 - 6 สรุปข้อมูลของลำดับเบสในบริเวณ ITS ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล.....	47
4 – 7 เมตริกซ์เปรียบเทียบทองลำดับนิวคลีโอไฮด์บริเวณ ITS ของแบคทีเรียทั้งหมด 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล.....	50
4 - 8 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอในส่วนของยีน $16S rRNA - 23S rRNA$ และบริเวณ ITS ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ $MseI$ ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต (isolate 1-19).....	56

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 โครงสร้างชั้น choanocyte และ meshyl ของฟองน้ำทะเลที่มีแบคทีเรีย.....	7
2-2 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย.....	11
2-3 โครงสร้างของชุดยิน <i>rRNA</i> ของแบคทีเรีย (แสดงบริเวณยืน <i>16S</i> , <i>23S</i> และ <i>5S rRNA</i>).....	14
2-4 หลักการและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR.....	16
2-5 จำลองความแตกต่างของรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตภายในหลังตัดด้วย เอนไซม์ตัดเจ้าแพะ.....	17
4-1 ผลผลิต PCR ระหว่างยืน <i>16S - 23S rRNA</i> ของแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล 8 ชนิด.....	29
4-2 พลาสมิคลูกผสมระหว่างยืน <i>16S - 23S rRNA</i> ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล.....	30
4-3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยืน <i>16S rRNA</i> ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลจำนวน 19 ไอโซเลต.....	34
4-4 เด่น โครงการความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยืน <i>16S rRNA</i> ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต.....	37
4-5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยืน <i>23S rRNA</i> ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลจำนวน 19 ไอโซเลต.....	40
4-6 เด่น โครงการความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยืน <i>23S rRNA</i> ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต.....	45
4-7 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเล.....	48
4-8 เด่น โครงการความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS.....	51
4-9 แผนที่แสดงตำแหน่งการตัดผลผลิต PCR ด้วยเอนไซม์ตัดเจ้าแพะ <i>MseI</i> ระหว่างยืน <i>16 – 23S rRNA</i> ด้วยโปรแกรมตัดเอนไซม์.....	52
4-10 รูปแบบดีเอ็นเอภายในหลังตัดด้วยเอนไซม์ <i>MseI</i> ของแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลต.....	57
4-11 รูปแบบดีเอ็นเอภายในหลังตัดด้วยเอนไซม์ <i>MseI</i> ของแบคทีเรียสกุลเดียวกัน.....	58

สารบัญผนวก

ผนวกที่

หน้า

1 ฐานข้อมูลฟองน้ำทะเลโครงการวิจัยข่ายที่ 1 สถานภาพทรัพยากรสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศชายฝั่งทะเล บริเวณหาดนางรอง เกาะชะมะเจี้ยและกลุ่มเกาะช้าง อัมเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี.....	76
2 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต.....	79

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัจจัย

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีการดำรงชีวิตทั้งแบบอิสระ (free living) อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น (symbiosis) หรือดำรงชีวิตแบบปรสิต (Parasitism) การดำรงชีวิตแบบอิสระนั้นพบได้ตามแหล่งต่าง ๆ เช่น น้ำจืด น้ำทะเล และตะกอนดิน ส่วนการดำรงชีวิตแบบอาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น สาหร่าย พืช และสัตว์ เป็นต้น โดยพบว่าสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีแบคทีเรียอาศัยอยู่ร่วมมากที่สุดคือ พองน้ำทะเล เนื่องจากโครงสร้างที่มีรูพรุน โดยรอบของสิ่งมีชีวิตชนิดนี้ มีรายงานพบว่า แบคทีเรียที่แยกออกจากฟองน้ำทะเลเมามากถึง 33% ในขณะที่แยกออกจากน้ำทะเลเมีเพียง 2% เท่านั้น (Kelecom, 2002)

ปัจจุบันมุขย์ใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลหลายประการ โดยเฉพาะสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่สกัดได้จากแบคทีเรียดังกล่าว แบคทีเรียเหล่านี้อยู่ร่วมอย่างเข้มแข็งกับฟองน้ำทะเล (Taylor, Schupp, Dahllof, Kjelleberg, & Steinberg, 2004) เช่น แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* อาศัยอยู่กับฟองน้ำ *Isodictya setifera* สร้างสาร diketopiperazine และ phenazines ขึ้นจากการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบหลากหลายชนิด (Jayatilake, Thornton, Leonard, Grimwade, & Baker, 1996) *Micrococcus* sp. แยกได้จากฟองน้ำ *Tedania ignis* สามารถสร้างสาร diketopiperazines ได้เช่นกัน (Bultel-Ponce, Debitus, Berge, Cerceau, & Guyot, 1998) และแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *Aplysina aerophoba* และ *Aplysina cavernicola* คือ *Bacillus* sp., *Arthobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Vibrio* sp. และ *Pseudoalteromonas* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า *Pseudoalteromonas* sp. สามารถขับยั่งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (Hentschel, Schmid, Wagner, Gernert, & Hacker, 2001) ในขณะที่แบคทีเรีย *Salinispore* sp. ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Pseudoceratina clavata* มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำไปใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะ รักษาโรคและการติดเชื้อจากแบคทีเรียอื่น ๆ (Kim, Garson, & Fuerst, 2005) นอกจากนี้ยังใช้แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของโลหะหนักจำพวก Cd และ Hg ได้แก่ แบคทีเรีย *Sreptomyces* sp., *Salinobacter* sp., *Vibrio Reseobacter*, *Micromonospora* sp., *Alteromanas* sp. และ *Saccharomonaspora* sp. ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *Fasciospongia cavernosa*

เป็นต้น (Selvin, Shanmuga, Seghal, Thangavelu, & Bai, 2007) ดังนั้นการจัดจำแนกหรือระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ซึ่งมีความสำคัญ การจัดจำแนกแบคทีเรียทำได้หลายวิธี เช่น ตามลักษณะการเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยง (Cultural characteristics) คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) คุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristics) และคุณสมบัติขององค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition characteristics) (Roszak & Colwell, 1987) เป็นต้น วิธีการเหล่านี้สามารถจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดแบคทีเรียในเบื้องต้นได้หลายชนิด แต่ยังมีแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้อย่างชัดเจนและยืนยันผลได้แม่นอนด้วยวิธีการตั้งกล่าว ลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นข้อความพันธุกรรมซึ่งมีบทบาทสำคัญที่นำมาซึ่งในการจัดจำแนกกลุ่ม/ชนิดของแบคทีเรียให้ชัดเจนและถูกต้องมากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น อีกทั้งมีโอกาสค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่ได้ (Trevors & Van Elsas, 1989)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* ที่นิยมนำมาใช้จำแนกกลุ่มของแบคทีเรีย (e.g. Webster et al., 2001; Li et al., 2007; Kennedy et al., 2008) ยกตัวอย่าง แบคทีเรีย *Bacillus* sp., *Arthrobacte* sp., *Micrococcus* sp. และ *Vibrio* sp. ที่สกัดได้จากฟองน้ำทะเล *Aplysina aerophoba* และ *A. cavernicola* (Hentschel et al., 2001) เป็นต้น ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ในระดับสกุล รวมถึงในส่วนของยีน *23S rRNA* ที่ปรากฏในรายงานวิจัยของ Webster et al. (2004) ศึกษาแบคทีเรียที่สกัดได้จากฟองน้ำทะเล *Rhopaloeides odorabile* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ *23S rRNA* สามารถจำแนกแบคทีเรียไว้ในคิวชั่น α -proteobacteria, Actinobacteria นอกจากนี้ยังศึกษาแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ที่แยกได้มาจากการแพร่กระจายของผู้ป่วยในโรงพยาบาล เช่น แบคทีเรีย *Vibrio navarrensis*, *V. vulnificus*, *V. fischeri*, *V. logei* และ *V. mediterranei* เป็นต้น (Hoffmann et al., 2010) นอกจากนี้ มีรายงานการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) อยู่ระหว่างยีน *16S-23S rRNA* ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความแปรผันของข้อความทางพันธุกรรมระหว่างชนิดค่อนข้างสูงถูกนำมาใช้วิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างชนิดของแบคทีเรีย (Rocap, Distel, Waterbury, & Chisholm, 2002) เช่น Family *Vibriaceae* (Lee et al., 2002) กลุ่มไซไซโนแบคทีเรีย *Synechococcus* ในน้ำผุร้อน (Ferris, Kuhl, Wieland, & Ward, 2003) แบคทีเรียสกุล *Microcystis* (Boyer, Johansen, & Flechtner, 2002) และกลุ่มแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *Rhopaloeides odorabile* (Webster, Wilson, Blackall, & Hill, 2001) เป็นต้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA* เพื่อยืนยันบ่งชี้แบคทีเรียในระดับสกุล ชนิดหรือสายพันธุ์ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลบางชนิดซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้จากหมู่เกาะแสมสาร อ. สักหิน จ.ชลบุรี และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแบคทีเรียดังกล่าว

เพื่อจะสามารถพิจารณาคำนวณใช้บ่งชี้ชนิดได้อ่าย่างจำเพาะและนำแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ในลำดับต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลในส่วนของยีน *16S rRNA*, *23S rRNA* และบริเวณ ITS (ระหว่างยีน *16S-23S rRNA*)
- 2) จำลองรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของแบคทีเรียแต่ละชนิด/สายพันธุ์ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลที่ทำการศึกษาในครั้งนี้
- 3) ศึกษาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลบริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA*, *23S rRNA* และบริเวณ ITS มีความเป็นเอกลักษณ์สามารถนำมาใช้บ่งชี้ชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

- 1) ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA*, *23S rRNA* และบริเวณ ITS ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล
- 2) ได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเอกลักษณ์ของแบคทีเรียบางชนิดที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลด้วยการเก็บรวบรวมได้จากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร
- 3) เป็นข้อมูลในการศึกษาเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ บนฐานข้อมูล GenBank ในลำดับต่อไป

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการสักดีเอ็นเอจากตัวอย่างของแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลต ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลที่เก็บรวบรวมจากหมู่เกาะแสมสาร อ. สัตหีบ จ.ชลบุรี จำนวน 8 ชนิด โดยใช้ชุดสักด้าเรืองรูปจากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงระหว่างยีน *16S-23S rRNA* ITS ด้วยวิธี PCR ด้วยคู่ไฟรเมอร์เดียวกันทำการโคลนและอ่านลำดับเบส และนำข้อมูลลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยเฉพาะในส่วนของยีน *16S rRNA* และ

23S rRNA เพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียในเบื้องต้นแล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีอิค DNA ที่ดีบริเวณ ITS และวิเคราะห์ลำดับรูปแบบของแคนดีอีนเอปายหลังตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์โดยใช้เดตต์วิชั่น เรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม ยืนยันผลด้วยวิธีของการโถสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาทั่วไปของฟองน้ำทะเล (บพิธ จากรุพันธ์ และนันทพร จากรุพันธ์, 2547)

ฟองน้ำเป็นสัตว์หลายเซลล์ที่มีวิวัฒนาการต่าสุดมีรูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่เป็นรูปทรงกระบอกติดอยู่กับก้อนหินหรือวัตถุใดน้ำ มีรูพรุนเด็ก ๆ ทั่วตัว เซลล์เรียงกันเป็นสองชั้นแค่ชั้งไม่มีเนื้อเยื่อที่แท้จริง ไม่มีอวัยวะและไม่มีทางเดินอาหาร ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในทะเล มีบางชนิดอาศัยอยู่ในน้ำจืด ตัวอ่อนมีขนสามารถคลวบยึดได้เรียกตัวอ่อนในระบบนี้ว่า *Amphiblastula* หรือ *Parechymula* แล้วแต่ว่าจะเป็นฟองน้ำชนิดใด โดยจะว่ายน้ำไปตามก้อนหินและเจริญเป็นฟองน้ำตัวเต็มวัยที่ต่างชีวิตโดยการเกาะนิ่งอยู่กับที่

ฟองน้ำมีลักษณะสำคัญดังนี้

1) ลำด้ามีรูพรุน มีทางน้ำเข้า (ostium) และทางน้ำออก (osculum) ซึ่งว่างใหญ่กลางตัวเรียกว่า *spongocoel*

2) มีเซลล์ที่มีลักษณะเป็นปลอกและมีแส้ช่วยโอบพัดทำให้น้ำเคลื่อนผ่านลำตัว และทำหน้าที่กินสิ่งมีชีวิตเด็ก ๆ ที่แปบปนมากับน้ำทะเล เรียกเซลล์นี้ว่า เซลล์ปลอกคอ (collar cell or choanocyte)

3) มีโครงสร้างค้ำจุนระหว่างเนื้อเยื่อชั้นนอกกับชั้นในเพื่อให้คงรูปอยู่ได้โดยอยู่ในชั้นมีเซนไคเมอร์หรือมีโซฮีล โครงสร้างค้ำจุนมีอยู่ 2 แบบ คือ หนามฟองน้ำหรือขวาก (spicule) และเส้นใยฟองน้ำ (spongin fiber)

4) มีสมมาตรแบบไม่แน่นอน (asymmetry) หรือแบบรัศมี (radial symmetry) ไม่มีระบบประสาท

5) การสืบพันธุ์แบบทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ส่วนใหญ่ฟองน้ำมีเพศรวม (monoecious) มีการผสมพันธุ์ข้ามตัวโดยมีการปฏิสนธิภายในตัวและใช้ระบบหมุนเวียนนำพ่อสู่ไปปะทั้งฟองน้ำตัวอื่น อีกทั้งยังสืบพันธุ์แบบแตกหน่อ โดยการสร้างเยมมูตุชื่นมาซึ่งพบรูปในฟองน้ำจืด ตัวอ่อนของฟองน้ำทะเลมีการพัฒนาและเจริญเติบโตในตัวเมื่อระยะหนึ่งก่อนแล้วจึงออกสู่ภายนอก ล่องลอยตามกระแสน้ำทะเลหรืออยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

บทบาทของฟองน้ำทะเลในระบบนิเวศ

ฟองน้ำทะเลเป็นสัตว์กินอาหารด้วยวิธีการกรอง (filter feeder) โดยกรองน้ำผ่านตัวซึ่งสามารถกรองน้ำทะเลได้มากกว่าสิบเท่าของปริมาตรตัวเองภายใน 1 ชั่วโมง และทำงานต่อเนื่องอยู่ตลอดเวลาทั้งกลางวันและกลางคืน ฟองน้ำทะเลจึงมีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศทางทะเลในแง่การปรับปรุงคุณภาพน้ำทะเลให้เหมาะสมขึ้น ช่วยกำจัดตะกอนขนาดเล็กและลดปริมาณตะกอนสารอินทรีย์ในน้ำทะเล ฟองน้ำทะเลยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยย่อย (Microhabitat) ให้กับสัตว์มีชีวิตขนาดเล็กอื่น ๆ หลายชนิด เช่น กุ้ง ปู หอย และได้เดือนทะเลโดยใช้ห้องน้ำของฟองน้ำเป็นแหล่งหลบซ่อนภัยจากศัตรู ดาวประrageบางชนิดจะเปลี่ยนแปลงหน้าได้ແ xen เป็นตะขอไว้สำหรับเกาะฟองน้ำและอาศัยกระแสน้ำจากระบบท่อน้ำของฟองน้ำพัดพาอาหารมาให้ด้วย ส่วนปลิงสร้อยไข่ มุกนักเก็บกินตะกอนที่ตกค้างอยู่บนลําดับฟองน้ำเป็นอาหาร เป็นต้น (บพิช จาเรพันธ์ และ นันทพร จาเรพันธ์, 2547)

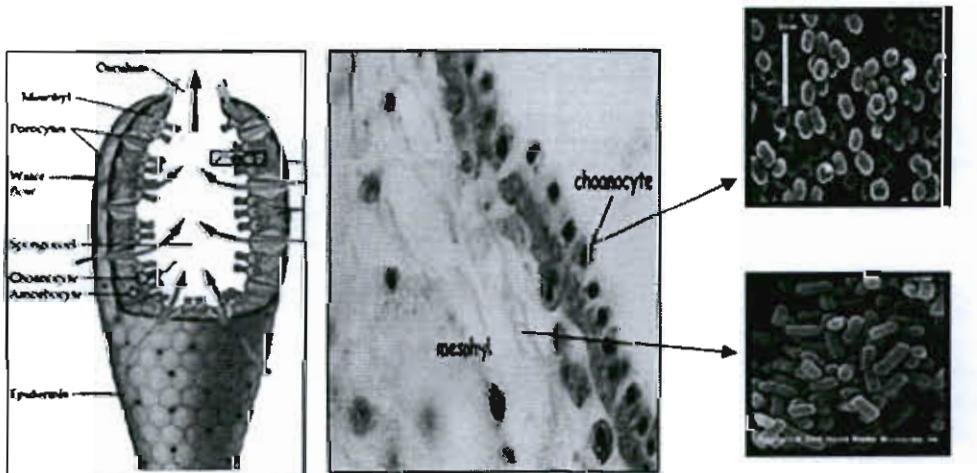
ฟองน้ำบางชนิดสามารถนำมาระบบใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เช่น ฟองน้ำห่อพุ่มสีแดง (*Oceanapia sagittaria*) จะสร้างห่อน้ำออกเป็นท่อสูงขึ้นเพื่อหลีกเลี่ยงการตกตะกอนของสารแขวนลอยในน้ำทะเล บริเวณที่ฟองน้ำทะเลชนิดนี้อาศัยอยู่เป็นจำนวนมากสามารถบอกได้ว่า สภาวะแวดล้อมบริเวณนั้นมีการตกตะกอนสูง และฟองน้ำฝังตัวชนิด *Cliona sp.* สามารถสร้างกรดที่ย่อยสลายหินปูนและสร้างโพรงอาศัยอยู่ในชากระหินปูน มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายชากระหิงหรือชากระหินปูนที่เป็นหินปูน บ่งบอกถึงสภาพธรรมชาติดังกล่าวว่ามีการสลายตัวของแนวปะการัง แต่ยังไงก็ตามจึงได้ว่าเป็นการหมุนเวียนธาตุคาร์บอนกลับคืนสู่วัฏจักรคาร์บอนในทะเล (สุเมตต์ ปุจฉาการ, 2550)

2.2 แบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล

ฟองน้ำทะเลบางชนิดมีแบคทีเรียที่อาศัยอยู่อย่างจำเพาะเนื่องจากฟองน้ำทะเลมีความสามารถในการกินอาหารแบบกรองจึงสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ปะปนอยู่ในน้ำทะเลได้ โดยข้อมูลน้ำทะเลและแบคทีเรียผ่านเข้าฝังตัวในเซลล์ ภายในตัวฟองน้ำทะเลจะพบจำนวนแบคทีเรียถึง 40 % ของน้ำหนักตัว โดยที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลในลักษณะปรสิตมีถึง 60 % (Thoms & Schupp, 2005) แบคทีเรียจะอาศัยอยู่ในชั้น choanocyte และ mesohyl หากที่สุด (ภาพที่ 2 - 1) เมื่อออกจากชั้น choanocyte ประกอบไปด้วยเซลล์ที่สำคัญของฟองน้ำทะเล เมื่อน้ำทะเลที่มีแบคทีเรียและอาหารพัดผ่านเข้าสู่เซลล์ตัวเซลล์จะโอบล้อมอาหารและแบคทีเรียที่ปะปนอยู่กับน้ำทะเลให้เป็นถุงอาหาร ไว้ภายในเซลล์และทำการย่อยอาหารในเซลล์ โดยตรง ซึ่งในเซลล์ชั้นนี้มีกระบวนการต่าง ๆ เกิดขึ้นมากและเป็นเซลล์แรกที่สัมผัสถกับน้ำทะเล เมื่อน้ำทะเลไหลผ่านเข้าสู่ภายใน

ตัวฟองน้ำทะเลจึงทำให้โอกาสที่แบคทีเรียฝังตัวมากขึ้น ส่วนชั้น mesohyl มีสารคล้ายวุ้นประเภทเจลตาดินแทรกอยู่ระหว่างชั้น pinacoderm และชั้น choanoderm ซึ่งจะมีเซลล์ที่เคลื่อนที่อยู่ทำหน้าที่บอกราคา สร้างเซลล์สีบพันธุ์ สร้างโครงร่างค้ำจุนร่างกาย และนำอาหารและน้ำทะเลไปปั้งเซลล์ต่างๆ (Kelecom, 2002) นอกจากนี้ฟองน้ำทะเลพบเชิงแบคทีเรียไว้เป็นอาหารของตนเองในระบบห่อและสร้างสารต้านจุลชีพขึ้นมาเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารของคนถูกแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่ไม่พึงประสงค์ จึงเป็นสาเหตุทำให้แบคทีเรียบางชนิดอยู่จำเพาะกับฟองน้ำแต่ละชนิด (Thoms & Schupp, 2005)

ปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล ยกตัวอย่างเช่น ความเค็ม (Salinity) ฟองน้ำทะเลจะเติบโตได้ในน้ำทะเลที่มีความเค็มระหว่าง 3.0 - 3.6% หรือ 30 - 36 ส่วนต่อพันล้านส่วน (part per thousand; ppt) ในบริเวณที่มีความเค็มต่ำ เช่น ปากแม่น้ำ ซึ่งนอกจากมีความเค็มต่ำแล้วยังมีความชื้นสูงเนื่องจากตะกอนที่แม่น้ำพัดพามา ลักษณะเช่นนี้จะไม่พนฟองน้ำทะเลอาศัยอยู่ ส่วนในบริเวณน้ำตื้นใกล้ชายหาดหากมีเศษจักน้ำทะเลจะเกิดการระเหยอย่างรวดเร็วทำให้ความเค็มของน้ำอาจสูงเกินไปจนฟองน้ำไม่สามารถอาศัยอยู่ได้ เช่นกัน ในแบคทีเรียหลายชนิดสามารถเติบโตได้ในสภาพที่มีเกลือมากน้อยต่างกัน แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้แม้มีความเค็มขั้นของเกลือเพียงเดือนน้อย แบคทีเรียบางชนิดต้องการเกลือปริมาณหนึ่งในการเจริญแต่แบคทีเรียบางกลุ่มอาจเจริญได้แม้อยู่ในสภาพที่มีเกลือมาก เราเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า halophilic bacteria อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเกลือที่มีปริมาณสูงมาก จะทำให้เซลล์แบคทีเรียตาย (Thoms & Schupp, 2005)



ภาพที่ 2 - 1 โครงสร้างชั้น choanocyte และ meshyl ของฟองน้ำทะเลที่มีแบคทีเรียอาศัย
(ที่มา : <http://images.google.co.th/images?um=1&hl=th&rlz>)

คลื่นและกระแสน้ำ (Wave and Current) การไหลเวียนของกระแสน้ำและทิศทางการพัดพาฟองน้ำทะเลที่มีแบคทีเรียเจือปนอยู่เข้าสู่เซลล์ฟองน้ำทะเล อิกทั้งแรงของกระแสน้ำทะเลจะทำให้

ตatkอนทรารยหุ่งหรือตatkอนดินน้ำทะเลที่เจือปนอยู่ขึ้นมาปะปนกับกระแสน้ำและพัดเข้าสู่ชีลด์ฟองน้ำทะเล อีกทั้งบทบาทของชาตุอาหารที่ส่งผลต่อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล มีหลากหลายระดับ เช่น ในระดับสิ่งมีชีวิต (organism scale) การที่น้ำทะเลเลมีปริมาณฟอสเฟตในระดับสูง จะขัดขวางกระบวนการสร้างหินปูน (calcification) ของฟองน้ำทะเล ในระดับสังคมสิ่งมีชีวิต (community scale) ปริมาณชาตุอาหารในระดับสูงจะทำให้พากฟองน้ำเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แบคทีเรียเช่นกันจะอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีปริมาณชาตุอาหารสูงหรือชนิดสารอาหารที่แบคทีเรียแต่ละชนิดต้องการ จึงมีโอกาสทำให้แบคทีเรียเข้าไปเจริญเติบโตในที่มีฟองน้ำทะเลอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก (Thoms & Schupp, 2005)

2.3 ความหลากหลายของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

มีรายงานการศึกษาของ Kim and John (2006) พบว่าในฟองน้ำทะเล *Pseudoceratina clavata* สามารถแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ได้ 4 กลุ่ม คือ Alphaproteobacteria (23 strains), Gammaproteobacteria (15 strains), Firmicutes (11 strains) และ Actinobacteria (12 strains) จากการศึกษาของ Kefalas, Catharios, and Miliou (2003) ศึกษาแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเล *Spongia officinalis* บริเวณอ่าว Aegean ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้เป็น *Morganella* sp., *Proteus* sp., *Pasteurella* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Acinetobacter* sp. และจากรายงาน การศึกษาในฟองน้ำทะเล 4 ชนิด คือ *Echinodictyum* sp., *Spongia* sp., *Sigmadocia fibulatus* และ *Mycale mannarensis* ที่แพร่กระจายในบริเวณอ่าว Mannar ในประเทศศรีลังกา สามารถแยก แบคทีเรียที่ผลิตสารชีวภาพได้จำนวน 4 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ตามลำดับ (Quinn et al., 1994)

รายงานการศึกษาของ Rungprom, Chavasiri, Kokpol, Kotze, and Garson (2004). หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำที่เก็บในน่านน้ำของประเทศไทย เผย พนว่าแบคทีเรียที่อาศัยในฟองน้ำ *Aplysilla sulphurea* มีสาร chromodorolides A, B (2a-2b) และ chromodorolide C (2c) และฤทธิ์ม่าหอนดักกลม *Haemonchus contortus* และ *Trichostrongylus colubriformis* ในระดับตัวอ่อนซึ่งเป็นตัวก่อโรคที่สำคัญในแกะและปศุสัตว์ และจากการบ่ง การศึกษาของ Jayatilake et al. (1996) แบคแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *Isodictya setifera* ซึ่งสามารถผลิตสาร phenazines ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ที่ทำให้เกิดเป็นพิษในอาหารและนม เมื่อรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้ออาจทำให้เกิดโรคได้ในปริมาณตั้งแต่ 105 cells/g ขึ้นไป

มีการใช้แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเป็นดัชนีประเมินคุณภาพสิ่งแวดล้อมที่มีสารพิษปนเปื้อน ยกตัวอย่างเช่น รายงานการศึกษาของ Selvin, Priya, Kiran, Thangavelu, and Sapna Bai (2007) ศึกษาแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *Cvernosa fasciospongia* ในอ่าว Mannar พบแบคทีเรีย *Tmyces* sp., *Ainobacter* sp., *Roseobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Icromonospora* sp., *Accharomonospora* sp. และ *Alteromonas* sp. มีข้อด้านพานโลหะหนักพวก Cd และ Hg ที่ปนเปื้อนกับฟองน้ำทะเล ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางการแพทย์ของน้ำทะเลได้

2.4 การจำแนกและบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก มีขนาดเดินผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.5 – 2.0 ไมครอน เป็นเซลล์แบบโปร夸里โอตประกอบด้วย เยื่อหุ้มเซลล์ ไซโทพลาสซึม ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ลักษณะรูปแบบ DNA เป็นวงเล็ก ๆ เรียกว่า พลาสมิด (plasmid) ที่ถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียอื่นได้ โดยใช้วิธีคอนjugation ผนังเซลล์ (cell wall) เป็นสาร peptidoglycan หุ้มเยื่อหุ้มเซลล์ และบางชนิดขึ้นสร้างแคปซูลเป็นสารเมือกหุ้มภายนอกอีกชั้นหนึ่ง (บพิช จารุพันธ์ และพันพพร จารุพันธ์, 2547)

ปัจจุบันการจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียมีประโยชน์ทั้งในทางทฤษฎีและปฏิบัติทำให้ทราบถึงการจัดหมวดหมู่ความสัมพันธ์ แหล่งที่มา แบคทีเรียจำนวนหลายพันสกุล ได้ ถูกจำแนก ดังนี้ และจัดเป็นพวกลักษณะ ได้ นักแบคทีเรียวิทยาในสมัยก่อนพบว่า เป็นการสะดวกที่จะ จัดแบ่งแบคทีเรียตามรูปร่าง การเรียงด้วย คุณสมบัติในการเจริญเติบโต และลักษณะการดำรงชีวิต (conventional methods) ซึ่งรู้จักกันทั่วไปว่า เป็นวิธีของ Bergey (Atlas et al., 1997)

2.4.1. คุณสมบัติความต้องการอาหาร (Nutritional requirement)

สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียตามแหล่งพลังงานที่ได้รับสารปัจจัยต่างที่ 2-1 ดังนี้

1) Photoautotrophs เป็นพวกลักษณะ เช่น ไดโอดาใช้ CO_2 เป็นวัตถุดิบ เช่น cyanobacteria (blue green algae)

2) Chemoautotrophs ใช้ CO_2 เป็นแหล่งคาร์บอน ไม่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน แต่ ใช้กระบวนการ oxidize สารอินทรีย์ เช่น ไฮโดรเจนชัลไฟฟ์ (H_2S) และ โนเนีย (NH_3) หรือ ferrous ions (Fe^{2+}) ตัวอย่างเช่น *Sulfobolus*

3) Photoheterotrophs พวกลักษณะ เช่น พลังงานจากแสง แต่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่ง คาร์บอน

4) Chemoheterotrophs ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนพบริปส์ใน prokaryote ส่วนใหญ่ รวมทั้ง protest fungi และสัตว์ หรือพืชที่เป็น parasite บางชนิด

ตารางที่ 2 – 1 ลักษณะการดำรงชีวิตแบ่งตามความต้องการแหล่งพลังงานและแหล่งสารอาหาร

Type	Energy source	carbon source	member
Photolithotroph (Photoautotroph)	light	CO ₂ , Photosynthetic	Sulfur bacteria cyanobacteria (blue green algae)
Photoheterotroph	light	Organic matter	Photosynthetic bacteria
Chemolithotroph (Chemoautotroph)	Inorganic matter	CO ₂	Hydrogen bacteria
Chemoheterotroph	Organic matter	Organic matter	Most organism

ที่มา : <http://www.moomsci.com/mscib/viewtopic.php?t=142>

2.4.2 ความต้องการทางด้านกายภาพ (Physical requirement) (Quinn et al., 1994)

สภาพแวดล้อมทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิอากาศ แสงแดด ความเป็นกรด-ด่าง และความต้องการแก๊สบานชnid สามารถนำมาใช้จัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียได้ เช่น แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในบรรยากาศที่มีออกซิเจน เรียกว่า aerobic bacteria และแบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญในบรรยากาศที่มีออกซิเจนแบคทีเรีย เรียกว่า anaerobic bacteria เช่น *Bacillus*, *Pseudomonas* อีกทั้งพวกที่สามารถสร้างพลังงานได้จากการหายใจ และกระบวนการหมัก เจริญได้ทั้งสองลักษณะ เรียกว่า facultative anaerobic bacteria เช่น *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter* หรือเจริญได้ในที่มีออกซิเจนเล็กน้อย เรียกว่า microaerophilic bacteria เช่น *Lactobacillus*, *Neisseria* การจัดกลุ่มแบคทีเรียตามสภาวะอุณหภูมิแบ่งออกได้เป็น 3 พากคือ พากที่ชอบเจริญในอุณหภูมิสูง เรียกว่า thermophilic bacteria แบคทีเรียสามารถเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิปานกลางเรียกว่า mesophilic bacteria และแบคทีเรียที่สามารถเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำๆ เรียกว่า psychrophilic bacteria เป็นต้น

2.4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง (Cultural characteristic)

เซลล์หนึ่งเซลล์ของแบคทีเรียจะเจริญรวมเป็นกลุ่มก้อนเรียกว่า โคลoni (colony) จนสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ทำให้สามารถศึกษาจากลักษณะของโคลoni เช่น ความนัน ความด้าน ใส ชุ่น ทึบ ทำให้รังควัตถุเป็นเม็ดละเอียดหรือหยาบ ขอบเขตการเจริญกระจาย

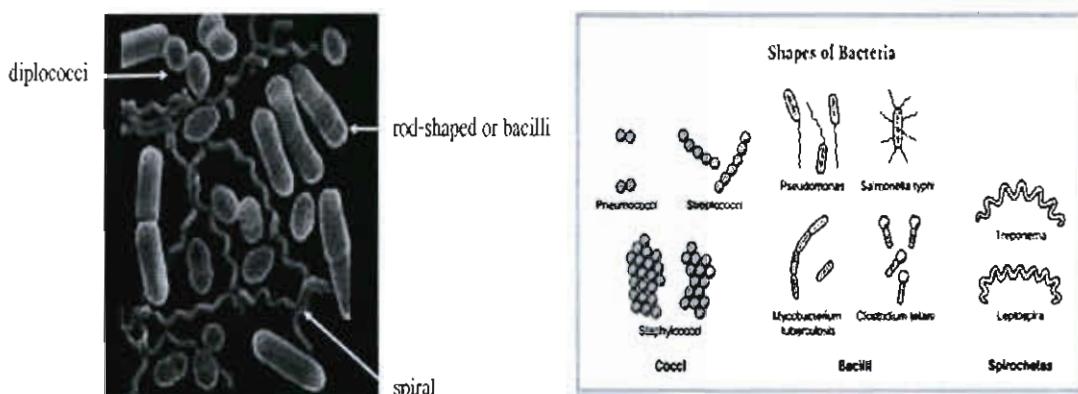
ออกหรือเป็นจุดเล็ก ๆ มีลักษณะของเรียบหรือขุ่นระ เป็นเมือกหรือแห้งหรือเป็นเกล็ด เป็นต้น (Cappuccino & Sherman, 1992)

2.4.4 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

เป็นคุณสมบัติที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าต้องส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียโดยทั่วไปคือพวกที่อยู่ในอันดับ Eubacteriales ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรายงานศึกษามากที่สุด มีขนาดเป็นไมครอน ต้องใช้กำลังขยายประมาณ 1000 เท่า ทำให้สามารถเห็นรูปร่างได้ เช่น แท่งทรงกลม หรือ เกลียว มีการจัดเรียงตัวแบบใด รวมทั้งศึกษาการสร้างสปอร์ สร้างแคปซูล และคุณนิค ของแพลกเจลล่า เป็นต้น

1) การเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (ภาพที่ 2-2)

แบคทีเรียมีหลายรูปร่าง เช่น 1) กลม (coccus หรือ spherical) เซลล์ที่อยู่เดี่ยว ๆ เรียกว่า micrococci เป็นคู่ เรียกว่า diplococci เรียงตัวกันเป็นสายยาว เรียกว่า streptococci เรียงเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่นเรียกว่า staphylococci เรียงตัวเป็นกลุ่ม 8 เซลล์ เรียก sarcina 2) รูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped หรือ bacilli) มักจะอยู่เดี่ยว ๆ และ 3) รูปร่างเป็นเกลียว (spiral) มักจะอยู่เดี่ยว ๆ ไม่เกาะติดกันเป็นลักษณะเหมือนพวกที่มีรูปร่างกลม



ภาพที่ 2 - 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย

ที่มา : www.technoinhome.com/vspcite/fro...id%3D229

2.4.5 คุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristic)

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น จากคุณสมบัติที่แบคทีเรียแต่ละชนิด มีความสามารถในการย่อยสารอาหารต่างกันมาก เลี้ยงแบคทีเรียไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่มีความจำเพาะของสารอาหาร แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เช่น การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเกิดกรด ค้าง แก๊ส หรือสารบางชนิด ยกตัวอย่าง ค่า pH ปกติ

ในการเจริญของแบคทีเรียมีค่าประมาณ 6.5 - 7.5 แคล่แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Vibrio cholerae* สามารถเจริญได้ที่ pH=8 อย่างไรก็ตามการเจริญของแบคทีเรียจะมีการปล่อยสารพากโรค - ด่างออกมาทำให้ค่า pH เปลี่ยนแปลงไปทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ดังนั้นจึงมีการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น KH_2PO_4 และ K_2HPO_4 เพื่อช่วยทำหน้าที่ในการด้านثانการเปลี่ยน pH ไปย่างราคเรื้ว (ดวงพร คันธ์ โฉดี, 2537)

2.4.6 คุณสมบัติของส่วนประกอบทางเคมี (Chemical composition characteristic)

ปัจจุบันมีเทคนิคใหม่ๆ ที่สามารถแยกโครงสร้างต่างๆ ของแบคทีเรีย เช่น แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจากส่วนประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ศึกษาสารพันธุกรรมและสารที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์กรดไขมันในเซลล์แบคทีเรียเป็นวิธีการจำแนกชนิดที่แม่นยำวิธีหนึ่งที่มีผู้นิยมใช้ วิธีการคือ ถักด้วยมันจากเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารมาตรฐานที่กำหนด เปลี่ยนไขมันให้อยู่ในรูปของ methyl ester และนิดเข้าเครื่อง gas liquid chromatography (GLC) นำ peak ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของแบคทีเรียชนิดต่างๆ แล้วจำแนกว่าเป็นชนิดใด วิธีนี้มีข้อด้อยบางประการ คือ ต้องเลี้ยงในอาหารมาตรฐาน ซึ่งมีข้อจำกัดสำหรับแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถเจริญในอาหารนี้ได้ ไม่สามารถแยกชนิดแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกันสูง เช่น *E. coli* และ *Salmonella* และที่สำคัญต้องใช้เครื่อง GLC ที่มีราคาแพงจึงไม่เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วๆ ไป (เชวนี มีหวัง, วงศ์ บุญสืบสกุล, กรณิการ์ ดวงนาลัย และสุรangsค์ สุธิราฐุช, 2550) ดังเช่นการศึกษาของ Boonsuebsakul et al. (2006) วิเคราะห์กรดไขมันในเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* จำนวน 11 สปีชีส์ 20 สายพันธุ์ พบร่วมกับลักษณะที่คล้ายคลึงกันเป็นกุ่มๆ และมีบางสปีชีส์ เช่น *Paenibacillus alvei* มีรูปแบบที่แตกต่างจาก *Bacillus sp.* อื่นๆ

2.4.7 คุณสมบัติการเป็นแอนติเจน

การศึกษาถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับปฏิกริยาของแอนติเจน-แอนติบอดี โดยวิเคราะห์จากความสามารถของแบคทีเรียในการเป็นแอนติเจน ทำโดยการฉีดแบคทีเรียเข้าไปในร่างกายของสัตว์ทดลอง แล้วตรวจสอบว่ามีแอนติบอดีเกิดขึ้นในชีรัมหรือไม่ ซึ่งปฏิกริyanี้มีความจำเพาะเฉพาะเจาะจงสูง ยกตัวอย่างเช่น คุณสมบัติของแอนติเจน *Escherichia coli* มีหลายชนิด คือ

1) แอนติเจน O มี 162 ชนิด อยู่ในชั้นผนังเซลล์ ทนต่อความร้อนที่ 121°C ได้ดี

2) แอนติเจน K มี 100 ชนิดซึ่งอาจเป็น L, A หรือ B แอนติเจนนี้เป็นส่วนหนึ่งของแคปซูลที่หุ้มตัวแบคทีเรียและคลุมแอนติเจน O ทำให้เชื้อไม่เกาะกุ่มกันในแอนติซิรัม O ยกเว้นต่อเมื่อทำลายแอนติเจน K ก่อน โดยการต้มที่ 100 °C นาน 2.5 ชม. หรือที่ 121 °C นาน 2 ชม.

3) แอนติเจน H มี 52 ชนิด เป็นส่วนของแฟลกเจลลารของแบคทีเรีย จะถูกทำลายเมื่อนำไปต้มที่ 100°C แอนติเจน O, K และ H มีคุณสมบัติทางการภายในและภายนอกกันวิทยาต่างกัน และการแยก serotype ของเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนเหล่านี้

2.4.8 คุณสมบัติทางพันธุกรรม (Genetic characteristic)

เป็นวิธีการจัดจำแนกที่สมบูรณ์ที่สุด โดยเฉพาะเมื่อมีข้อมูลบนฐานข้อมูลสำหรับเทียบเคียงไว้แล้ว แต่เดิมประกอบด้วย 2 วิธี คือ การวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโน acid โดยการหาปริมาณแบบสกัดน้ำและใช้ โอลิเซนไนซ์ (oligonucleotide) และการหาความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาไฮบริดไซซ์ (hybridization) ระหว่าง DNA กับ DNA หรือ DNA กับ RNA ของแบคทีเรียต่างชนิดกัน รวมถึงวิธีการอ่านและเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนต่าง ๆ เป็นดัง

2.5 ข้อความพันธุกรรมของแบคทีเรีย

ในปัจจุบันมีการค้นพบแบคทีเรียในสกุลต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น การจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียมีกระบวนการวิธีดังที่กล่าวมา ทำให้การจำแนกมีความละเอียดและถูกต้องยิ่งขึ้น การใช้เทคนิคชีวโมเลกุลเพื่อจัดจำแนกชนิดและกลุ่มของแบคทีเรียทำให้สามารถทราบถึงโครงสร้างหน้าที่ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน หรือในส่วนที่ไม่ใช่ยีนบนสายดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน หรือเหมือนกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด รวมทั้งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษา

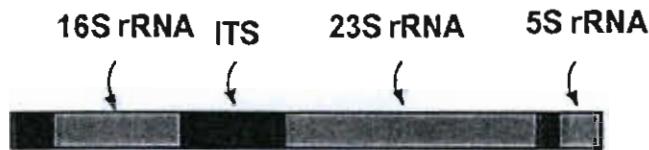
ความสัมพันธ์ในสาขาวิชานาการของแบคทีเรียได้

ยีนที่นิยมนิยมมาใช้ในการบ่งชีวนิคและจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียคือ ยีน $16S\text{ rRNA}$ และ $23S\text{ rRNA}$ ซึ่งในปัจจุบันว่ามียีนหลายยีนเรียงติดกันเป็นชุด ประกอบด้วยยีน $16S$, $23S$ และ $5S\text{ rRNA}$ เรียงต่อกันโดยแต่ละยีน rRNA ถูกคั่นด้วยลำดับเบสขนาดสั้น ๆ ที่ไม่ใช่ยีนเรียกว่า ช่องว่าง (spacer) ซึ่ง rRNA ทั้ง 3 ชนิด จะถูกจำลองรหัสออกมาพร้อมกัน โดยใช้ promoter ร่วมกัน (ภาพที่ 2-3) (Martinez, Bescos, Rodriguez-Sala, & Rodriguez-Valera, 2001) โดยทั่วไปโมเลกุลของ rRNA ประกอบรวมอยู่กับโปรตีนแล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงช้อนที่เรียกว่า ไรโนโซม (Ribosome) ประกอบด้วยหน่วยบ่อย 2 หน่วย คือ $50S$ และ $30S$ ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการแปรรหัสที่พบในปัจจุบัน คือ

1) $23S\text{ rRNA}$ มีขนาดประมาณ 2,904 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เป็นองค์ประกอบของหน่วยใหญ่ของไรโนโซมขนาด $50S$

2) $16S\text{ rRNA}$ มีขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์ เป็นองค์ประกอบของหน่วยใหญ่ของไรโนโซมขนาด $30S$

3) *5S rRNA* มีขนาดประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของหน่วยใหญ่ของไรโบโซมขนาด 50S ไรโบโซมของโปรตีโนตซ์มีขนาด 70S



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของชุดยีน *rRNA* ของแบคทีเรีย (แสดงบริเวณยีน *16S*, *23S* และ *5S rRNA*)
ที่มา : <http://www.irn.pdx.edu/~newmanl/SynRRNA.GIF>, 2547

16S rRNA เป็นยีนที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซมมีหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนที่มีความจำเป็นในกระบวนการเมต้าบอลิซึมของเซลล์ ปัจจุบันลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* ถูกนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของแบคทีเรีย เนื่องจากมีข้อคิดเหยยประการ คือ พบในกลุ่ม *proteobacteria*, แบคทีเรียแกรมลบ (*Streptomyces* sp. และ *Bacillus* sp.) และไซano แบคทีเรีย ทำให้สามารถเปรียบเทียบยูเบคทีเรียได้ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* มีขนาดประมาณ 1,500 bp ในยูเบคทีเรียทุกชนิดบางช่วงบนสายดีเอ็นเอมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน (บริเวณอนุรักษ์) ซึ่งสามารถนำมาใช้ออกแบบプライเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับแบคทีเรีย ส่วนใหญ่ได้ (universal primers) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR amplification) (ประพันธ์ ไตรสุทธิ์, 2551) ในขณะเดียวกันก็มีบางช่วงของสายดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด

ยีน *23S rRNA* ของ *E. coli* ลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาด 2,904 bp ซึ่งพบในหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (50S) โดยมีลำดับเบสแบบอนุรักษ์ที่สมบูรณ์ในบริเวณ stem-loop มีรายงานว่าแบคทีเรียมากกว่า 98 % มีบริเวณอนุรักษ์ในบริเวณนี้ (Cannone et al., 2002)

ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *16S-23S rRNA* เรียกว่า internal transcribed spacer (ITS) ในแบคทีเรียทั่วไปเป็นบริเวณที่มีขนาดประมาณ 500-1,200 bp (Hilis & Dixon, 1991) ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่บริเวณ ITS นี้เป็นบริเวณที่ลำดับเบสนี้ความแปรปรวนสูงซึ่งนิยมใช้ไว้เคราะห์หาความแตกต่างภายในประชากรและระหว่างประชากรภายในชนิดเดียวกัน (Martinez et al., 2001)

2.6 เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

ในกรณีที่ต้องย่างศึกษามีปริมาณน้อย พีซีอาร์เป็นเทคนิคการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มจำนวน โมเลกุลของดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณมาก โดยทำปฏิกิริยาอย่างค่อนข้างเป็นถูกโฉม ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยสารดังด้านที่สำคัญ ดังนี้

1) Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสาขใหม่ ประกอบไปด้วยเบส 4 ชนิด คือ อะตีนีน (A) กัวนีน (G) ไซโตซีน (C) และไทมีน (T)

2) DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อ尼วคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไฟรเมอร์

3) Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการสร้างไฟรเมอร์จำเพาะ

4) PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาพของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{++})

5) Template คือ ดีเอ็นเอต้นแบบหรือขีนในส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ เป็นดีเอ็นเอที่สักด้วยจากเซลล์ที่มีนิวคลียสทรีออร์กานเซลล์ของมนุษย์ สัตว์ พืช หรือสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ซึ่งทราบลำดับเบสแล้วบางส่วน

ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์มีข้อดี คือ การใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ใช้ระยะเวลาสั้น ค่าใช้จ่ายต่ำ และเปลี่ยนได้ง่าย (จริยา ชนาวนิทรร์ และคณะ, 2540)

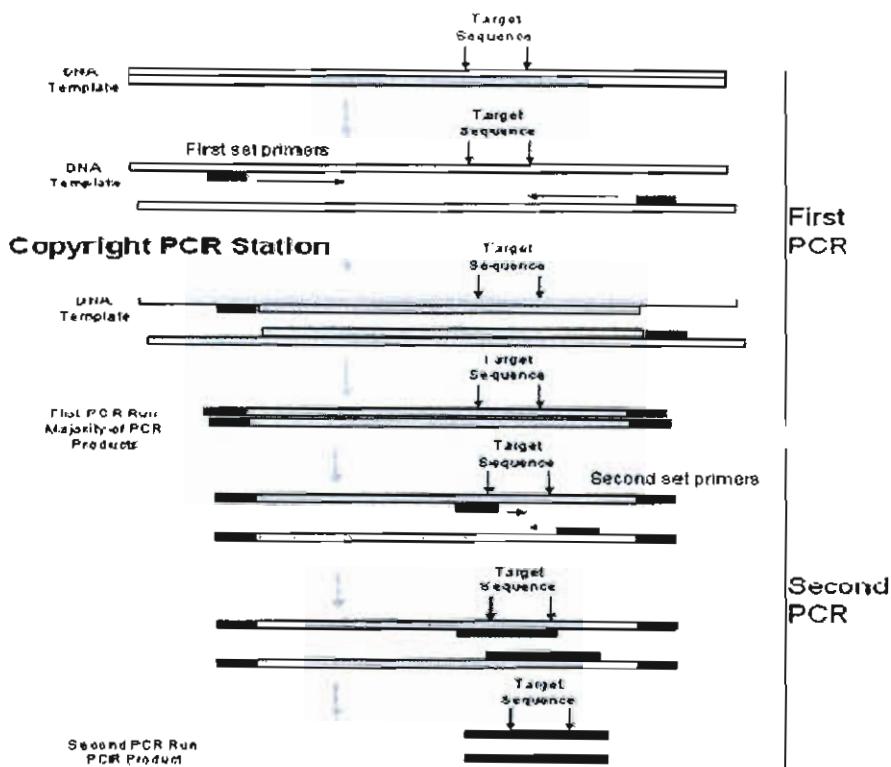
2.6.1 หลักการทำพีซีอาร์ (ภาพที่ 2 - 4)

1) Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่คลายเกลียวเป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92 - 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 30 - 60 วินาที

2) Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและให้ไฟรเมอร์ที่เป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14 - 13 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมจับกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ จับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 50 - 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 - 60 วินาที

3) Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไฟรเมอร์ ตามข้อมูลนัดดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของดีเอ็นไซม์ ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรต (DNA polymerase) ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ

70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 - 120 วินาที ขึ้นอยู่กับความยาวของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน เอ็นไซม์ดีเอ็นเอ โพลิเมอร์เรสท์ที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาพของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน



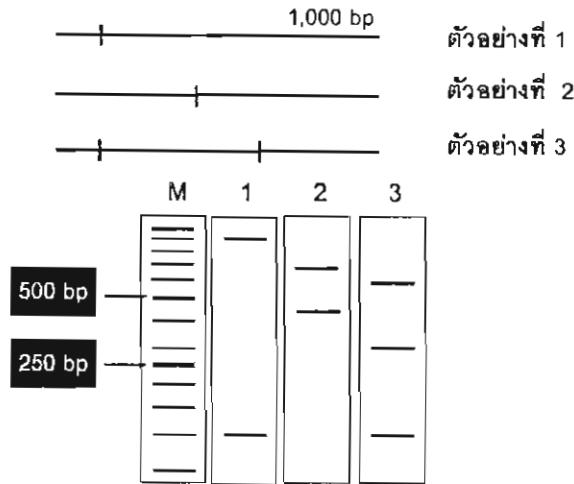
ภาพที่ 2 - 4 หลักการและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR

ที่มา : www.pcrstation.com/nested-pcr

2.7 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล (Molecular Markers)

เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดของดีเอ็นเอกายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนี้จึงเป็นวิธีการที่ใช้ศึกษาความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับดีเอ็นเอ โดยการนำสายดีเอ็นเอมาขยับด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่บริเวณลำดับของเบสที่จำเพาะเท่านั้นเรียกว่า ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิด ประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นถ้ามีดีเอ็นเอจากแหล่งอื่นซึ่งมีลำดับเบสที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ต่างกันแม้เพียง 1 เบสหรือตำแหน่งเดียวกันออกໄไปเมื่อนำไปแยกด้วยวิธีของการ跑了เจลオリเล็กโตร โฟร์ซีส แล้วดีเอ็นเอที่ปรากฏจะแตกต่างกัน (ภาพที่ 2 - 7) (ชูชา นุญภักดี, 2544)



ภาพที่ 2 - 5 จำลองความแตกต่างของรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ตัดเฉพาะ และดีเอ็นเอตรวจสอบที่เลือกใช้ ถ้าเปลี่ยนชนิดของเอนไซม์ตัดเฉพาะหรือดีเอ็นเอตรวจสอบก็จะได้รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เปลี่ยนไป เช่นกัน อย่างไรก็ตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนี้จะมีลักษณะที่เฉพาะสมอ ดังนั้นการใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะร่วมกับดีเอ็นเอตรวจสอบที่มากกว่า 1 ชนิด ก็จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการพิสูจน์เอกสารลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตได้สูงขึ้นเช่นกัน

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความหลากหลายพันธุกรรมและการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยทำการศึกษาในขึ้นด่าง ๆ ยกตัวอย่างเช่น Taylor et al. (2004) ศึกษาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *Cymbastela concentrica*, *Stylinos* sp. และ *Callyspongia* sp. โดยใช้ข้อความพันธุกรรมในบริเวณยีน *rpoB* และ *16S rRNA* พบร่วมในบริเวณยีน *rpoB* ให้ผลการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียไม่ชัดเจนและลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแปรปรวนมากกว่าในส่วนของยีน *16S rRNA*

Gemert et al. (2005) แยกแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *spongilla lacustris* แล้วสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียไว้ในคิวชั่น α - proteobacteria, β - proteobacteria และ Actinobacteria จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* เช่นเดียวกับ Li et al. (2007) ทำการสกัดแยก

แบคทีเรียจากฟองน้ำทะเล *Hymeniacidon perleve* จากทะเลเหลือง (Yellow sea) ประเทศไทย และศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมของแบคทีเรียในบริเวณ 16S rRNA เช่นกัน สามารถบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียได้ คือ *Streptomyces nocardiosis*, *Pseudonocardia antarctica*, *Nocardia salmonicida*, *Micromonospora aurantiaca*, *Actinoalloteichus cyanogriseus* และ *Rhodococcus opacus* และจากรายงานการของ Taylor et al. (2004) ศึกษาข้อความทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล 3 ชนิด สามารถจำแนกแบคทีเรียที่ได้จากฟองน้ำ *Cymbastela concentrica* ได้เป็น *Theonella swinhoei*, *Asterionella glacialis*, *Mesorhizobium mediterraneum* และ *Asterionella glacialis* ส่วนฟองน้ำทะเล *Stylinos* sp. แยกได้แบคทีเรีย *Unculture soil bacterium* และฟองน้ำทะเล *Callyspongia* sp. พบกลุ่มแบคทีเรียที่จัดอยู่ในดิวิชั่น α-proteobacteria ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้พบว่าบางชนิดสามารถจัดจำแนกได้ในระดับสกุลเท่านั้น การศึกษาของ Hentschel et al. (2001) แยกแบคทีเรียทั้งหมด 27 ไอโซเลต จากฟองน้ำทะเล *Aplysina aerphoba* และ *A. cavernicola* สามารถบ่งชี้ได้ในระดับสกุลคือ *Bacillus* sp., *Arthobacter* sp., *Micrococcus* sp และ *Vibrio* sp. และยังพบว่ามีแบคทีเรียบางชนิดที่ยังไม่สามารถที่จัดจำแนกได้

การศึกษาในส่วนของยีน 23S rRNA ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลยังปรากฏรายงานเป็นจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับข้อมูลในส่วนของ 16S rRNA เช่น รายงานของ Webster et al. (2004) ศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Rhopaloeides odorabile* วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน 23S rRNA แล้วสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียไว้ในดิวิชั่น α-proteobacteria, *Actinobacteria* และบ่งชี้ได้เป็น *Cytophaga flavobacterium* เมื่อศึกษาริเวณ 16S rRNA ร่วมด้วย นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาในส่วนบริเวณยีน 23S rRNA ในแบคทีเรียที่พบจากแหล่งอื่น ๆ ยกตัวอย่างเช่น Hoffmann et al. (2010) ศึกษาแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่ได้จากแหล่งธรรมชาติและจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลทั้งหมดจำนวน 69 ไอโซเลต สามารถบ่งชี้ได้เป็น *V. navarrensis*, *V. vulnificus*, *V. fischeri*, *V. logei*, *V. mediterranei*, *V. pelagius*, *V. splendens*, *V. lentus*, *V. harveyii*, *V. parahaemolyticus*, *V. natriegens*, *V. ordalii*, *V. hollisae*, *V. fluvialis* และ *V. cholerae* รายงานการศึกษาของ Kurabachew et al. (2003) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 516 คู่เบส ในส่วนของยีน 23S rRNA ของ *Mycobacterium tuberculosis* จำนวน 54 ไอโซเลต จากผู้ป่วยในประเทศ Ethiopia พบว่าสามารถใช้บ่งชี้ชนิด *Mycobacterium* ได้ทั้งระดับสกุลและชนิด ได้อย่างชัดเจน และรายงานการศึกษาของ Pei et al. (2009) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนและแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวนทั้งหมด 184 ไอโซเลต โดยสามารถบ่งชี้ได้เป็น *Carboxydothermus hydrogenoformans*, *Haloarcula marismortui*, *Shewanella oneidensis*, *Streptococcus pyogenes*,

Nocardia farcinica, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium* และ *Thermoanaerobacter tengcongensis* อีกทั้งยังพบช่วงลำดับเบสอูรักม์ในบริเวณ stem-loop ของยีน 23S rRNA อีกด้วย

Coplin and Kado (2001) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสกุล *Pantoea* ในช่วงระหว่างยีน 16SrRNA และ 23SrRNA (บริเวณ ITS) ซึ่งมีขนาด 500 - 1,000 คู่เบส เพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียโดยสามารถบ่งชี้ได้เป็น *Pantoea agglomerans*, *P. ananatis* และ *P. stewartii*

Boyer et al. (2002) รายงานว่าแบคทีเรียชนิด *Coelodesmium wrangelii*, *Tolypothrix distorta* และ putative new genus (isolate SRS70) จำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS มีขนาด 520, 510 และ 509 คู่เบส ตามลำดับ และจากรายงานของ Lee et al. (2002) ที่พบว่าเมื่อใช้เพรมอร์จิ้งเพาคู่เดียวกันเพิ่มจำนวนในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS แบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีขนาดแตกต่างกันคือ 500-1,000 คู่เบส และสามารถนำมาใช้จำแนกแบคทีเรียใน Family *Vibrionaceae* ได้

ประพันธ์ ไตรบสุทธิ์ (2551) ศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S- 23S rRNA ITS ของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนจำนวน 5 สายพันธุ์ และนำไปสร้างเดน โครแกรม สามารถจำแนกกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียได้ 3 กลุ่ม ซึ่งระบุได้เพียงในระดับสกุลเท่านั้น คือ คือ *Phormidium* sp. ผลลัพธ์ PCR บริเวณ 16S-23S rRNA มีขนาด 787, 794 คู่เบส *Leptolyngbya* sp. มีขนาด 870 คู่เบส และ *Scytonema* sp. มีขนาด 839, 840 คู่เบส ตามลำดับ

Boyer et al. (2002) ศึกษาไซยาโนแบคทีเรียกลุ่ม *Microcoleus* ในส่วนของยีน 16S rRNA และในบริเวณ ITS พบร่วมกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA สามารถบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียบีนขั้นผลได้ ตรงกับการศึกษาทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยบ่งชี้ได้เป็น *Microcoleus* จำนวน 2 สายพันธุ์ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนสุานข้อมูลระบุได้เป็น *Microcoleus steenstrupii* และ *M. vaginatus* และลำดับเบสในบริเวณ ITS ของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีความต่างกัน อีกทั้งได้ทำการศึกษาในแบคทีเรียชนิด *Coelodesmium wrangelii*, *Tolypothrix distorta* และ putative new genus (isolate SRS70) บริเวณ ITS พบร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ตามลำดับ คณะผู้วิจัยได้เสนอแนะให้มีการศึกษาทั้งบริเวณ ITS ควบคู่ไปกับการศึกษาในส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยเพื่อความแม่นยำต่อการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มที่ศึกษานี้

Ferris et al. (2003) ศึกษาลำดับเบสในบริเวณ ITS ของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. ในน้ำพุร้อนพบว่า *Synechococcus* sp. ที่เจริญอยู่บริเวณชั้นบนจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ความแตกต่างกับพวกที่เจริญอยู่ในชั้นล่าง ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะมีความผันแปรและตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไซยาโนแบคทีเรียอาศัยอยู่ และคณะผู้วิจัยแนะนำให้ศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ควบคู่ไปด้วยเช่นกัน

จากการศึกษาของ Harasawa, Pitcher, Ramirez, and Bradbury (2003) พบรความ
หลักหลาทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินหายใจของล่า จากการเปรียบเทียบ
ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ของแบคทีเรียกับฐานข้อมูล สามารถบ่งชี้ชนิดได้เป็นแบคทีเรีย[†]
Mycoplasma gallisepticum และ *M. imitans* และพบว่าขนาดและลำดับเบสของผลผลิต PCR
บริเวณนี้แตกต่างกัน คือ 940 และ 783 บีบส ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ
และสร้างลายพิมพ์คือเอ็นเอจีเพาะกับแบคทีเรีย สามารถใช้เป็นข้อมูลต้นแบบสำหรับการ
เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มอื่น ๆ เช่น จำแนกแบคทีเรียสกุล *Staphylococci* จำนวน 228
โคลoni พบร่วมกับลายพิมพ์คือเอ็นเอจีเพาะ จำนวน 40 รูปแบบ
(Yin & Ji, 2008) และการจำแนกและในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น เชื้อรากในกลุ่ม dermatophytes จำนวน
33 ด้วยบริเวณ ITS ทำการสร้างลายพิมพ์คือเอ็นเอจีเพาะด้วยวิธี PCR-RFLP และบ่งชี้ชนิดได้เป็น[†]
Arthroderma, *Chrysosporium* และ *Epidermophyton* (Baere, Summerbell, Theelen, Boethout, &
Vaneechoutte, 2010)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

- 1) ตู้บ่มเชื้อ บริษัท carbolite
- 2) ตู้บ่มเชื้อแบบแข็ง บริษัท Gallenkamp
- 3) ตู้อบ บริษัท Memmert
- 4) เครื่องควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Memmert
- 5) เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบร้อน/เย็น รุ่น MC-01N บริษัท Major Science
- 6) เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบหมุนรุ่น RPN 2510 บริษัท Amersham
- 7) เครื่องผสมสาร รุ่น REAX 200 บริษัท Heidolph ประเทศเยอรมัน
- 8) เครื่องปั่นเหวี่ง 260D บริษัท Brushless microcentrifuge
- 9) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน รุ่น SS-245 บริษัท Prestige Medical
- 10) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง บริษัท Tanita บริษัท Sartonus
- 11) ตู้อบไนโตรเจน
- 12) ตู้ปลดปล่อยเชื้อ รุ่น HLF 1200 E
- 13) เครื่องเพิ่มข่ายปริมาณดีเอ็นเอ รุ่น T-Gradient thermoblock บริษัท Biometra
- 14) ชุดแยกข่ายชิ้นดีเอ็นเอภาคใต้กระแทไฟฟ้า ยี่ห้อ Kodak บริษัท Biomax
- 15) เครื่องถ่ายภาพเจลภาชนะที่แสงอัตราไฟฟ้า UV-Tranilluminator บริษัท Syngene
- 16) เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) MD 625B-12 บริษัท Hoefer scientific
- 17) incubate water thermostat บริษัท Biosas
- 18) เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง รุ่น MXX-612 บริษัท Denver instrument
- 19) Speed vac รุ่น SC110 บริษัท Savant
- 20) หลอดทดลอง (microtube)
- 21) ไนโตรบีปีต ทิป
- 22) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 23) บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่
- 24) เพลสสำหรับเดี่ยงเชื้อแบบที่เรียบ

3.2 สารเคมี

3.2.1 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GF-1 Bacterial DNA extraction kit บริษัท Vivantis

1) ชุดทำบิสท์จากเซลและผลผลิตพิซิวาร์ GF/PCR DNA Fragment Extraction Kit บริษัท Bioscience

2) ชุดสกัดพลาสมิด High-Speed Plasmid Minikit บริษัท Genaid

3) พลาสมิด pGEM-T-easy vector system บริษัท Promega, U.S.A

4) เชื้อแบคทีเรีย E.coli JM 109 บริษัท Promega, U.S.A

3.2.2 ไพรเมอร์ โดยแบ่งออกเป็น

1) ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีจำเพาะกับบริเวณ 16S/23S rRNA และ ITS

2) ไพรเมอร์สำหรับหาลำดับเบส M13 Forward และ M13 Reverse

3.2.3 เอนไซม์

1) Taq DNA polymerase 5 U/ μ l บริษัท New England Biolabs Qiagen

2) เอนไซม์ *MseI* และ *EcoRI*

3.2.4 ดีเอ็นเอดาตารูป (Markers)

1) 1 kb 1.0 μ g/ μ l และ 100 bp DNA ladder Plus 0.5 μ g/ μ l บริษัท Fermentas

2) 100 bp DNA Plus Ladder (1.0 μ g/ml) บริษัท Fermentas

3.2.5 สารเคมี

1) Go Taq Green บริษัท Promega

2) 10 mM dNTP Mix บริษัท Fermentas

3) 50 mM MgCl₂ บริษัท Vivantis

4) SDS Sodium dodecyl sulfate บริษัท Fluka

5) Ethanol บริษัท Merck

6) Tris Base บริษัท Promega

7) Boric acid บริษัท univar

8) EDTA Ethylene diamine tetra-acetic acid บริษัท Amresco

9) Guanidine Thiocyanate บริษัท Fluka

10) Proteinase K บริษัท Fermentas

11) Ribonuclease A บริษัท Sigma

12) Isopropanol บริษัท Invitrogen

๑๕ ปี นักศึกษา มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 2013

- 13) Seakem LE Agarose gel บริษัท Cambrex bio science rockland
- 14) LB Broth บริษัท Eriterion
- 15) LB agar บริษัท Molekula
- 16) X-gal บริษัท Applichem
- 17) Amplicillin บริษัท T.P. Drug Laboratories
- 18) Nuclease free water บริษัท Promega
- 19) Agarose gel บริษัท Vivantis

3.3 โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ศึกษา

- 1) ClustalX version 1.84
- 2) Bioedit version 7.0
- 3) MEGA4 version 4.1
- 4) NEB cutter vesion 2.0

3.4 ตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลทั้งหมด 8 ชนิด ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ชูติวรรัตน เดชสกุลวัฒนา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี ตัวอย่างฟองน้ำทะเลเก็บรวบรวมได้ในบริเวณแนวปะการังติดชายฝั่งของเกาะช้าง เกาะจาน เกาะจระเข้ เกาะโรงโนน และหาดนางรอง ค. แสมสาร อ. สตูล จ. ชลบุรี กือ *Halichondria* sp., *Monanchora unguiculata*, *Mycale grandis*, *Xestospongia tesudinaria*, *Lamellodysidea herbacea*, *Oceamapia sagittaria*, *Neopetrosia* sp. และ *Cliona* sp. แบคทีเรียที่รับได้จำนวน 2, 5, 2, 2, 4, 2, 1 และ 1 ไอโซเลต รวมทั้งหมด 19 ไอโซเลต ตามลำดับ

3.4.1 การเตรียมดีอีนจากตัวอย่างแบคทีเรียโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จ (Vivantis GF-1 Bacterial DNA)

ทำการเตรียม Genomic DNA ของแบคทีเรียจากตัวอย่างที่เล็บในอาหารเหลว ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ข้ามคืน โดยปีเปต 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปปั่นให้เที่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสราระถายส่วนบนทั้งจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ R1 จำนวน 100 ไมโครลิตร เพื่อให้เซลล์แตกกระจายเซลล์โดยการปีเปตขึ้นลง แล้วเติม lysozyme (50 mg/ml) จำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นให้เที่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

778.77
26210
2.2

291556

เทสระลักษณ์ส่วนบนทั้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ R2 จำนวน 180 ไมโครลิตร และเติม Proteinase K (20 mg/ml) จำนวน 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเติม RNase A (20 mg/ml) จำนวน 20 ไมโครลิตร เพื่อกำจัด อาเรอีนเอ แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมบัฟเฟอร์ BG ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายประมาณ 440 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาหลายครั้ง จนกระหั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาทีให้สารละลายเย็นลง แล้วเติม absolute ethanol จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที แล้วถ่ายสารละลายลงคอลัมน์ที่อยู่ใน collection tube และปั่น เหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วย Wash buffer จำนวน 750 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกรอบเพื่อกำจัดเชรานอล วางคอลัมน์ลง ในหลอดทดลองใหม่ที่นี่ซ้ำแล้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลันปราศจากเอนไซม์ นิวคลีอสจำนวน 50 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ศึกษาต่อไป

3.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล

3.5.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S/23S rRNA และบริเวณ ITS โดยใช้ คู่ไพรเมอร์ 16-23S_F (5' TTGTACACACCGCCCCGTC) และ 16-23S_R (5' CCTTTCCCTCA CGGTACTG) (Simon et al., 2002) ในปฏิกริยา PCR ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 2X master mix (10 mM dNTPs, 25 mM MgCl₂, 5U/μl Taq DNA polymerase) จำนวน 6 ไมโครลิตร คู่ไพร์เมอร์จำนวน 1 ไมโครลิตร 10 μM Primer 16-23S_F/R สายละ 1 ไมโครลิตร และ nuclease free water จำนวน 1 ไมโครลิตร ปฏิกริยา PCR ทำจำนวน 35 รอบ โดยมีขั้นตอน pre denature, 3 นาที denature 94°C, 3 นาที denature 94°C, 30 วินาที annealing 55-60°C, 40 วินาที extension 72°C, 40 วินาที และ final extension 72 °C, 5 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วย วิธีอကารอสเจลอะลีกโตร โฟร์ซีสความเร็ว 1 เมอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentus, USA) จำนวน 250 นาโนกรัม ตรวจดูແບບดีเอ็นดี้ด้วยเครื่อง UV-Transilluminator (Syngene, UK) ภายหลังข้อมูลตัวอย่างได้รับการบันทึกภาพ

3.5.2 การโคลนหาลำดับเบสและการขึ้นยันผลของการเพิ่มจำนวนในบริเวณ ITS

1) การเชื่อมต่อผลผลิต PCR กับพลาสมิดดีอีนเอ นำผลผลิต PCR ที่เพิ่มจำนวนได้มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM-T-easy ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ภายในปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีอีนเอ 3.5 ไมโครลิตร 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA ligase จำนวน 1 ไมโครลิตร และพลาสมิด pGEM-T-easy vector จำนวน 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปในโอนาคุน 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน (16-20 ชั่วโมง)

2) การนำดีอีนเอพาหะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Transformation) นำรีกอมบิเนนท์ดีอีนเอของบนน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยาจากนั้นปีเปดรีกอมบิเนนท์ดีอีนเอ 3 ไมโครลิตร เดิมลงในในโครทิวที่มี competent cells (*E.coli* JM 109) จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการ heat shock โดยบ่ำໄว้ที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 50 วินาที แล้วขยายน้ำแข็งทันทีและทิ้งไว้เป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นนำออกมานึ่ง LB medium หรือ SOC medium จำนวน 500 ไมโครลิตร บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบเบ่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นทำการปั่นเก็บตะกอนเซลล์ ปีเปต LB medium ออก 250 ไมโครลิตร กระจายเซลล์ จากนั้นปีเปต 150 ไมโครลิตร และ 100 ไมโครลิตร spread บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB agar) ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร X-gal 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ IPTG 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3) การตรวจสอบแบปท์เรียที่มีพลาสมิดสูกผสมโดยวิธีพีซีอาร์ ทำการ replica โคลนเดี่ยวสีขาวที่เจริญในข้อ 3.5.2.2 ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่พร้อมกัน ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแตะโคลนเดี่ยวดังกล่าวจุ่มลงในสารละลายผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ที่ประกอบด้วย PCR master mix จำนวน 3 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ M13 Forward/Reverse ความเข้มข้น 10 Mm สายละจำนวน 0.25 ไมโครลิตร และ Nuclease free water จำนวน 2.5 ไมโครลิตร แล้วนำไปจิ้มฟันดังกล่าวไป streak ลงบนอาหารเจึงที่ผสมด้วยแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร X-gal 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ IPTG 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ส่วนหลอดทดลอง PCR นำไปเข้าเครื่อง Thermal cycle เพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยเริ่มจาก denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที จำนวน 28 รอบ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นนำผลิตผล PCR ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีของการเจลอิเล็กtro โฟร์ซิส

เปรียบเทียบกับดีเจ็นเอ็นเอมารฐาน โดยใช้เจลที่มีความเข้มข้น 1% ในบัพเพอร์ TBE ความเข้มข้น 0.5 เท่า ภายใต้ความต่างหัก 100 โวลต์ นาน 30 นาที

3.6 การสกัดพลาสมิคดีเอ็นเอโดยชุดสกัดสำเร็จ High Speed Plasmid Mini Kit (บริษัท Geneaid)

นำ replica โคโนนีของแบคทีเรียสีขาวที่ได้รับพลาสมิคลูกผสมที่ถูกตรวจสอบแล้วให้ผลบวกโดยวิธี PCR มาทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวน 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว (LB broth) ที่มีแอมพิซิลิน 50 ไมโครลิตร นำเข้าตู้บ่มเพื่อแบบเบื้องต้นด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) จากนั้นนำเชือ้แบคทีเรียที่เจริญในหลอดทดลองผ่านเกลียวจำนวน 1.5 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นให้บริบูรณ์ที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสราระลายส่วนใส่ทึบเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นสกัดพลาสมิคด้วยชุดสำเร็จ High Speed Plasmid Mini Kit ตามคำแนะนำของบริษัท โดยเติมบัพเพอร์ PD1 (Resuspension Buffer) จำนวน 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex เพื่อกระจายเซลล์ให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกจากกันหลอด จากนั้นทำการเติมบัฟเฟอร์ PD2 (Lysis buffer) จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงไปมา 5-10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นทำการเติมบัฟเฟอร์ PD3 ทันทีปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทำการกลับหลอดขึ้นลงไปมา 5-10 ครั้ง แล้วนำไปปั่นให้บริบูรณ์ที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใส่ที่ได้ใส่ลงลงในกระถางคอลัมน์ แล้วทำไปทำ การปั่นให้บริบูรณ์ที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสราระลายที่ผ่านคอลัมน์ทึบ เติม W1 Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ทำการปั่นให้บริบูรณ์ที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสราระลายที่ผ่านคอลัมน์ทึบ แล้วล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer (70% EtOH) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นให้บริบูรณ์ที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้น เทสราระลายส่วนใส่ที่ผ่านคอลัมน์ทึบแล้วทำการปั่นให้บริบูรณ์ที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที อีกครั้ง เพื่อขัดกรองลดออกให้หมดเดียวทำการข้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครทิวบ์ใหม่ หลังจากนั้นเติมน้ำที่ปราศจากนิวคลีอสปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปทำการปั่นให้บริบูรณ์ที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายพลาสมิคที่ผ่านคอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

3.7 การวิเคราะห์และยืนยันผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ และการสร้างเดนโตรแกรม

นำพลาสมิคลูกผสมที่ได้ในข้อ 3.6 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd (Malaysia) จากนั้นนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบความเหมือนและตรวจสอบเพื่อยืนยันผล โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0 และ BLAST (Altschul et al., 1990) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคัดเลือกชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมที่มีดำเนินการตัดบนชิ้นส่วนเดิมๆ เพิ่มจำนวนตั้งกล่าว โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ Insilico (<http://insilico.ehu.es/>) เพื่อศึกษารูปแบบคีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR -RFLP ในลำดับต่อไป ส่วนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นำมาเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ โดยใช้โปรแกรม BLAST จากนั้นสร้างเดนโตรแกรมความสัมพันธ์และยืนยันชนิดแบคทีเรียจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA 4 (Tamura et al., 2007) โดยใช้ Neighbor-Joining : NJ โนเมล Nucleotide : Maximum Composite Likelihood ทำการ Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง แสดงผลที่มีค่ามากกว่า 50 %

3.8 การตัดผล PCR ที่เพิ่มจำนวนໄได้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (PCR-RFLP)

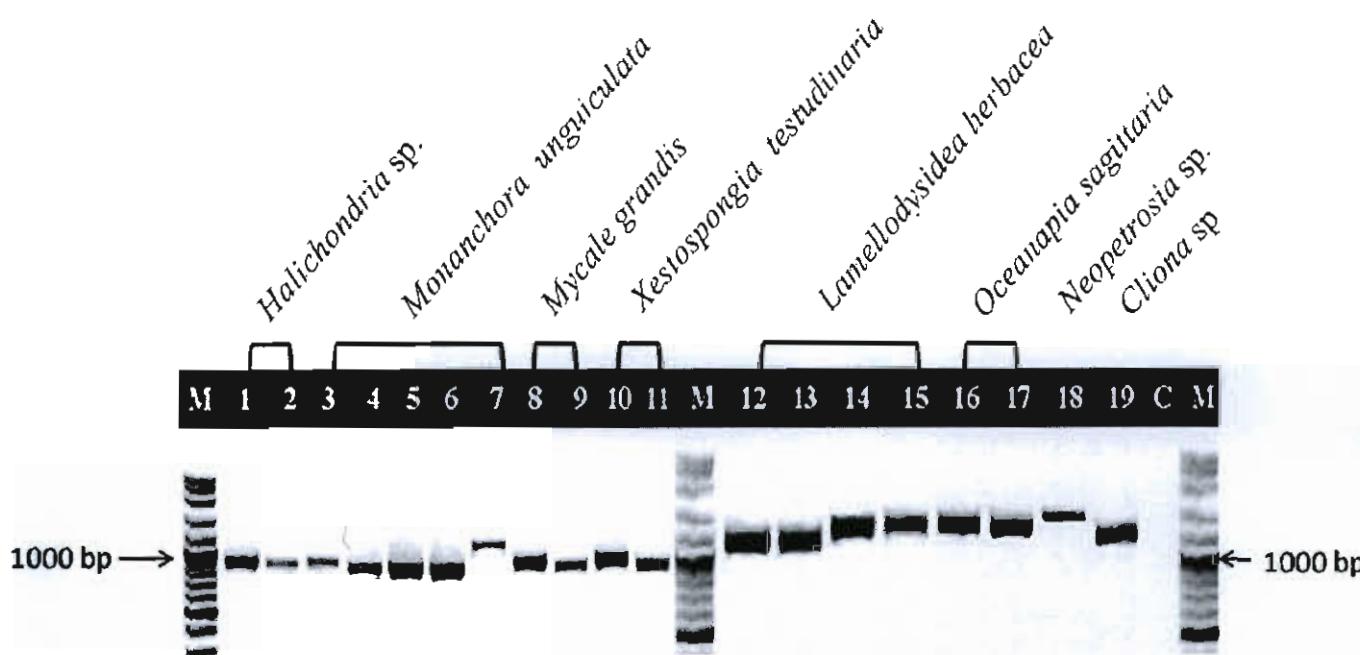
ทำการตัดคีเอ็นเอที่เพิ่มໄได้ของตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่คัดเลือกในข้อ 3.7 โดยใช้คีเอ็นเอ 2 ไมโครกรัมต่อเรสทริกชันเอนไซม์ 5 ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสหรืออุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลาข้ามคืน แล้ววิเคราะห์ผลโดยนำปริมาตรหั้งหมาทำอิเล็กโตร โฟร์ซิสโดยใช้อะการโถสเจลที่ความเข้มข้น 3 % ที่มีอัตราเดินໂบรมไม่ต่ำกว่า 50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และบันทึกภาพ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ขนาดของผลผลิต PCR ระหว่างยีน *16S – 23S rRNA*

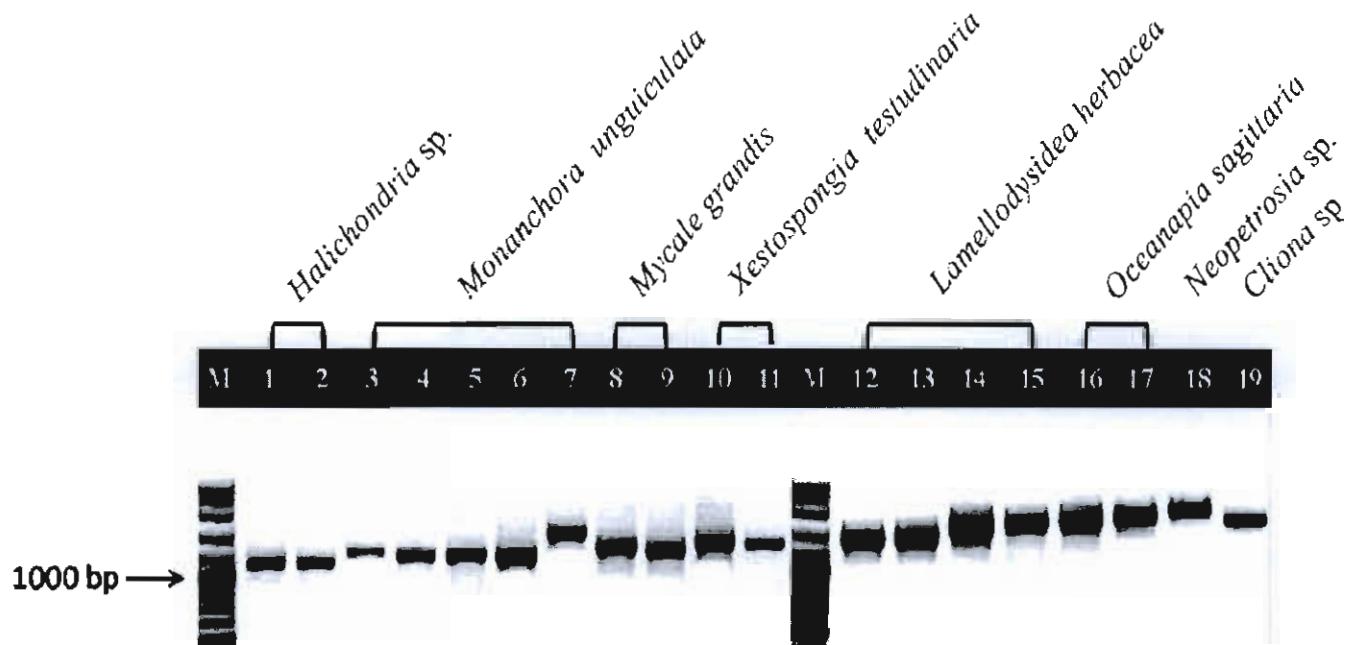
ในการศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลโดยแยกจากฟองน้ำทะเล *Halichondria* sp. (isolate 1 และ isolate 2), *Monanchora unguiculata* (isolate 3, 4, 5, 6 และ isolate 7), *Mycale grandis* (isolate 8 และ isolate 9), *Xestospongia testudinaria* (isolate 10 และ isolate 11), *Lamellodysidea herbacea* (isolate 12, 13, 14 และ isolate 15), *Oceanapia sagittaria* (isolate 16 และ isolate 17), *Neopetrosia* sp. (isolate 18) และ *Cliona* sp. (isolate 19) เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนเดิมในอัตรา 16S - 23S rRNA ด้วยคู่ไพรเมอร์เดียวกัน คือ 16S-23S_F/R ด้วยเทคนิค PCR พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดแตกต่างกันคือ ดังแต่ 800-1,400 คู่เบส (ภาพที่ 4 - 1)



ภาพที่ 4 - 1 ผลผลิต PCR ระหว่างยีน *16S – 23S rRNA* ของแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล 8 ชนิด (เรียงตามลำดับไอโซเลตที่ 1- 19) (M = 100 bp Plus DNA Ladder และ C = negative control)

4.2 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอระหว่างยีน *16S - 23S rRNA* ของแบคทีเรีย

ทำการเขียนต่อผลผลิต PCR ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลในภาพที่ 4-1 กับพลาสมิคแวร์ pGEM-T-easy ขนาด 3,015 คู่เบส สู่มตรวจทราบสฟอร์แมนท์ของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิคลูกผสมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ M 13 Forward/Reverse พบว่าขนาดของผลผลิต PCR ใหม่ซึ่งรวมกับลำดับเบสของแวร์ที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ M13 Forward/Reverse มีขนาดเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 200 คู่เบส (ภาพที่ 4 – 2 จัดเรียงໄอโซเลตที่ 1 – 19 ตามลำดับ)



ภาพที่ 4 - 2 พลาสมิคลูกผสมระหว่างยีน *16S - 23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล ทั้ง 19 ໄอโซเลต (เรียงตามลำดับໄอโซเลตที่ 1 – 19) วิเคราะห์ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 (M = 100 bp Plus DNA Ladder)

4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิคดีเอ็นเอลูกผสม และนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Bioedit พบว่าผลผลิตที่เพิ่มจำนวนได้ในช่วงระหว่างยีน *16S - 23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ໄอโซเลต

(เรียงตามลำดับ ໄອໂჟເລຕທີ 1 – 19) ມີໜາດເທົກັນ 904, 897, 938, 884, 884, 882, 1078, 938, 884, 953, 895, 1,117, 1,146, 1,280, 1,070, 1,302, 1,309, 1,409 ແລະ 991 ຄູບສ ຕາມລຳດັບ (ຕາງໆທີ 4 - 1)
 ຕາງໆທີ 4 - 1 ພາດຂອງພລິຕິກັນທີ PCR ໃນຊ່ວງຮະຫວ່າງເບີນ 16S – 23S rRNA ຂອງແບກທີ່ເຮັດວຽກ
ຮ່ວມກັນພອງນໍາທະເລທີ 19 ໄອໂჟເລຕ

Marine sponge	Bacterial strain/isolate	Size of 16S – 23S rRNA	
			Amplicons (bp)
<i>Halichondria</i> sp.	1	904	
	2	897	
<i>Monanchora unguiculata</i>	3	938	
	4	884	
<i>Mycale grandis</i>	5	884	
	6	882	
<i>Xestospongia testudinaria</i>	7	1078	
	8	938	
<i>Lamellodysidea herbacea</i>	9	884	
	10	953	
<i>Oceanapia sagittaria</i>	11	895	
	12	1117	
<i>Neopetrosia</i> sp.	13	1146	
	14	1280	
<i>Cliona</i> sp.	15	1070	
	16	1302	
	17	1309	
	18	1409	
	19	991	

4.4 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ และเดนโครแกรมความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

4.4.1 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะในส่วนของยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต ที่สักดําได้จากฟองน้ำทะเล 8 ชนิด มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank (เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2553) พบว่าในส่วนต้นของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทุกไอโซเลตสามารถเทียบเคียงได้ประมาณ 140 คู่เบส กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* ที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 4 - 2) โดยมี % ความเหมือนสูงสุด (identity) ที่ 84 – 100 % (ภาพที่ 4 - 3)

4.4.2 การยืนยันชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเดนโครแกรมจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA*

ภายหลังการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* และสร้างเดนโครแกรมความสัมพันธ์ของข้อมูลตั้งกล่าวตัวข้อโปรแกรม MEGA 4.0 ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Archaea คือ *Aeropyrum pernix* (GenBank รหัสหมายเลข AB078022) เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียนิดต่าง ๆ บนฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมีความเหมือนสูงสุดกับไอโซเลตของแบคทีเรียที่ทำการศึกษาสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียทะเลบาง ไอโซเลตไว้เป็นชนิดเดียวกัน ได้แก่ 1) แบคทีเรีย *Pseudoalteromonas* spp. (isolate 4, 6 แยกได้จากฟองน้ำ *Monanchora unguiculata* และ isolate 9 แยกได้จากฟองน้ำ *Mycale grandis* 2) *Haliea* sp. (isolate 3 แยกจากฟองน้ำ *Monanchora unguiculata* และ isolate 8 แยกจากฟองน้ำ *Mycale grandis*) 3) *Mesorhizobium* sp. (isolate 16, 17 แยกจากฟองน้ำ *Oceanapia sagittaria* และ isolate 18 แยกจากฟองน้ำ *Neopetrosia* sp.) และ 4) *Dokdonia* sp. (isolate 14 และ isolate 15) แยกมาจากฟองน้ำ *Lamellodysidea herbacea*

จากเดนโครแกรมสามารถยืนยันการจัดจำแนกแบคทีเรียบาง ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียต่างชนิดแต่จัดอยู่ในสกุลเดียวกันคือ *Pseudoalteromonas* spp. isolate 4, 6 และ 9 และ *Pseudoalteromonas* spp. isolate 5 และ 11 มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ ไอโซเลต 4 และ 9 มีลำดับเบสเหมือนกัน 99.6% , ไอโซเลต 9 และ 6 มีลำดับเบสเหมือนกัน 100% และ ไอโซเลต 5 และ 11 มีลำดับเบสเหมือนกัน 99.2% (ตารางที่ 4 - 3) อีกทั้งยังพบแบคทีเรีย ไอโซเลตที่ต่างสกุล/ชนิดกันจัดไว้เป็นสกุล/ชนิดเดียวกันระหว่าง *Haliea* sp. (isolate 3 และ isolate 8)

กับ *Pseudoalteromonas* spp. (isolate 4, 5, 6, 9 และ 11) (ภาพที่ 4 - 4) โดยมีค่าความเหมือนของลำดับเบต้าระหว่าง 2 สายพันธุ์ที่ 96% - 97% เป็นต้น (ตารางที่ 4 - 3)

ตารางที่ 4 - 2 การแบ่งชั้นโดยแบบพิธีรับพันธุ์ต่างๆ ตามพองานทางเดินหายใจและพันธุ์ของ RNA ที่ได้คัดเลือกไว้ก็จะเป็นตัวชี้วัดยืนยัน 16S rRNA กับฐานข้อมูล Genbank

Marine sponge	Bacterial strain/isolate	16S rRNA			Species Homology	GenBank Accession no.
		GenBank	Aligned position	Blast identity (%)		
<i>Haliclondria</i> sp.	1	1-137	100(137/137)	<i>Alcanthorau</i> sp.		EU591711
	2	1-137	100(137/137)	<i>Bacillus</i> sp.		GU726175
<i>Monanchora ungululata</i>	3	1-137	100(137/137)	<i>Haliea</i> sp.		FN398053
	4	1-132	98(130/132)	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		AB373122
	5	1-132	100(132/132)	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		AB373122
	6	1-132	98(130/132)	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		AB373122
	7	1-143	89(115/129)	<i>Vibrio</i> sp.		CP001805
<i>Mycale grandis</i>	8	1-137	100(137/137)	<i>Haliea</i> sp.		FN398053
	9	1-132	98(130/132)	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		AB373122
<i>Xestospongia testudinaria</i>	10	1-134	100(134/134)	<i>Shewanella</i> sp.		GU289648
	11	1-132	99(131/132)	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		AB373122
	12	1-121	99(119/121)	<i>Marinomonas</i> sp.		EU330338
<i>Lamellostidea herbacea</i>	13	1-126	84(114/136)	<i>Pseudomonas</i> sp.		AJ312161
	14	1-128	98(126/128)	<i>Dokdonia</i> sp.		DQ481462
	15	1-128	98(126/128)	<i>Dokdonia</i> sp.		DQ481462
<i>Oceanapia saginaria</i>	16	1-134	99(133/134)	<i>Mesorhizobium</i> sp.		AB604651
	17	1-134	99(133/134)	<i>Mesorhizobium</i> sp.		AB604651
<i>Neopetrosia</i> sp.	18	1-134	99(133/134)	<i>Mesorhizobium</i> sp.		AB604651
<i>Cliona</i> sp.	19	1-137	100(66/66)	<i>Teredinibacter</i> sp.		CP001614

	10	20	30	40	50	60
isolate 7						
Vibrio sp._CP001805	TTGTACACACCGCCCGCTGTAACAAGGTAGGCCCTAGGGAAACCTGGGCCATGGCC	60				
isolate 19	.TGTGTAACAAGGTA GC.CTA.GGG .ACCTGGG CT..AT.ACCTC.TT	50				
Teredinibacter sp._CP001614A.TTGT.AGC AAGAAC TT.C.GG.GTA..A.AAGCTGA	59				
isolate 2AC.C..C.AG..TTTG..ACACCCGAAGTC.. .AGGTA	58				
Bacillus sp._GU726175	C.T.GT...AC.G.CCGTC.CACCAAGC..AGTT.GTAAC.CC.GAA.TCGG	58				
isolate 14AAGC..T..A..CTGGGG.TACCTGAAGTCC..CA	53				
Dokdonia sp._DQ481462	C.T.GT...AC.G.CCGTC..GCCATGGAAG.TGG..T.CCTGAA.TC.G.TCA	55				
isolate 15AAGC..T..A..CTGGGG.TACCTGAAGTCC..CA	53				
isolate 6AC.C..T..G..TGGG.T.CTCC.GAAGT..A ..A.C.TAA	53				
isolate 9AC.C..T..G..TGGG.T.CTCC.GAAGT..A ..A.C.TAA	53				
isolate 4AC.C..T..G..TGGG.T.CTCC.GAAGT..A ..A.C.TAA	53				
isolate 5AC.C..T..G..TGGG.T.CTCC.GAAGT..A ..A.C.TAA	53				
isolate 11AC.C..T..G..TGGG.T.CTCC.GAAGT..A ..A.C.TAA	53				
isolate 8AC.C..T..G..TGGG.T.CTCC.GAAGT..T ..A.CCTAA	53				
isolate 3AC.C..T..G..TGGG.T.CTCC.GAAGT..T ..A.CCTAA	53				
Halice sp._FN398053	C.T.GT...AC.G.CCGTC.CACCATGG.AGTTGGTT.CTCCAGAA.T.GA	58				
Pseudoalteromonas sp._AB373122AC.C..T..G..TGGG.T.CTCC.GAAGT..C ..A.TCTAA	58				
isolate 13AC.C..T..G..TGGG.T.CTCC.GAAGT..C ..A.TCTAA	58				
Pseudomonas sp._AJ312161AC.C..T..G..TGGG.T.CTCC.GAAGT..C ..A.TCTAA	58				
isolate 10AC.C..T..G..TGGG.TCAA..GAAGT..C ..A.TCTAA	58				
Shewanella sp._GU289648	C.T.GT...AC.G.CCGTC.CACCATGG.AGTTGGCT.C..AGAA.T.G.	58				
isolate 1AC.C..T..G..TGGG.T.CACC.GAAGTA.T ..A.TCTAA	58				
Alcanivorax sp._EU591711	C.T.GT...AC.G.CCGTC.CACCATGG.AGTTGG.TT.C.CCAGAA.TAGT	58				
Marinomonas sp._EU330338	C.T.GT...AC.G.CCGTC.CACCATGG.AGTTG..TT.CTCAGAA.TAGG	58				
isolate 12AC.C..T..G..TTGA..T.CTCC.GAAGTA..A ..A.TCTAA	58				
isolate 17AC.C..T..G..TTGG..TTTACCCGAAG.C.C ..TGCTAA	58				
isolate 18AC.C..T..G..TTGG..TTTACCCGAAG.C.C ..TGCTAA	58				
isolate 16AC.C..T..G..TTGG..TTTACCCGAAG.C.C ..TGCTAA	58				
Mesorhizobium sp._AB604651	C.T.GT...AC.G.CCGTC.CACCATGG.AGTTGGTTTT.CC.GAA..CG	58				
Aeropyrum pernix	CGAC.GGGCT..TAGGACG.CGC.CCTTAG..GAGGGA.CCC.CAGAA..CT	58				
	70	80	90	100	110	120
isolate 7	CTCCTTATACGATGA	TTATTGCGATGAGTATTCA	CACAGATTGATATG	TTTATA	114	
Vibrio sp._CP001805	A.A.AATG..SBC.TTATTGCG..GAGTG.TCA	CACAGATTG.T.CG.T.TATAAA	G.T	107		
isolate 19	TGG...G.GACT...	AT..AG.CC.GT.G..T..C.G.T..GAGCGC	CC	109		
Teredinibacter sp._CP001614CTA.AGGCT..TA.CTC.GCTGGTTAGAGCGC	CCCTGA..AG	49			
isolate 2CAGC..CCT..AGG.GGGGAT.GG.G.GA.GT	106			
Bacillus sp._GU726175	AA..SBC.TTTTG..GC	CAGCCGCCTA..GGTGGG	..C.GATGAT..GGG.GA	110		
isolate 14	..CG C.A.G	ACCG..CCT..GG.AA..	..TAG.AAC.GG.GC.A.GT	97		
Dokdonia sp._DQ481462	..G TA.GSBCT	GAGCCGCCTAGGGT..AA	..CTGGT.AC..GGGCTA	101		
isolate 15	..CG C.A.G	AGCG..CCT..GG.AA..	..TAG.AAC.GG.GC.A.GT	97		
isolate 6	..C T.CG.GA.G	GCCTTC..CT.CCGAGTC	..TTC..GAC.GG..GA.GT	106		
isolate 9	..C T.CG.GA.G	GCCTTC..CT.CCGAGTC	..TTC..GAC.GG..GA.GT	106		
isolate 4	..C T.CG.GA.G	GCCTTC..CT.CCGAGTC	..TTC..GAC.GG..GA.GT	106		
isolate 5	..C T.CG.GA.G	GCCTTC..CT.CCGAGTC	..TTC..GAC.GG..GA.GT	106		
isolate 11	..C T..G.GA.G	GCCTTC..CC.CCGAGTC	..TTC..GAC.GG..GA.GT	106		
isolate 8	..C T.CG.GA.G	GCCTTC..CC.CCGAGTC	..TTC..GAC.GG..GA.GT	106		
isolate 3	..C T.CG.GA.G	GCCTTC..CC.CCGAGTC	..TTC..GAC.GG..GA.GT	106		
Halice sp._FN398053	..C T.CG.GA.G	GCCTTC..CC.CCGAGTC	..TTC..GAC.GG..GA.GT	106		
Pseudoalteromonas sp._AB373122	AA..SBC.TTCCG..GG	CGTTCAACACCGAGTC	..TTCATGAC..GGG.GA	110		
isolate 13	..C T.CG.GG.G	.CG.TC..CC.CCGAGTC	..TTC..GAC.GG..GA.GT	106		
Pseudomonas sp._AJ312161	..C T.CG.GG.G	CG..TT.C..CC.CCGAGTC	..TTC..GAC.GG..GA.GT	104		
isolate 10	..C T.CG.GG.G	CG..TC..CC.C..GTG	GTTC..GAC.GG..GA.GT	106		
Shewanella sp._GU289648	AA..SBC.TTCCG..GGG	ACG.TCACCA..TGTG	GTTCATGAC..GGG.GA	110		
isolate 1	..C T.CG.GA.G	.CGATT..CC.CCG..GTG	GTTC..GAC.GG..GA.GT	106		
Alcanivorax sp._EU591711	AA..SBC.TTCCG..GG	ACGAT..ACCAACGTG	GTTCATGAC..GGG.GA	110		
Marinomonas sp._EU330338	AA..SBC.GTA..G..GG	ACGCT..ACCAACGTG	GTCAATGAC..GGG.GA	110		
isolate 12	..CG ..A.GG.G	CGCTT..CC.CCGAGTC	GTCA..GAC.GG..GA.GT	106		
isolate 17	..CG ..A.GA.G	CAG...CC.CGG..AGG	GTCAAGCGAC..GG.G.GA.GT	106		
isolate 18	..CG ..A.GA.G	CAG...CC.CGG..AGG	GTCAAGCGAC..GG.G.GA.GT	106		
isolate 16	..CG ..A.GA.G	CAG...CC.CGG..AGG	GTCAAGCGAC..GG.G.GA.GT	106		
Mesorhizobium sp._AB604651	AA..SBC.G.A.G..GG	CAG.CGACCACGGT..CG	GTCAAGCGAC..GGG.GA	110		
Aeropyrum pernix	..C..CTGGGCC..CGACTAGCC..CTCCGCC..CGG.TGGC..GCC.A.GGG.CCGGGCC	118				

ภาพที่ 4 - 3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกจากพองั้ง

อะเดจานวน 19 ไอโซเลต และจากฐานข้อมูล GenBank 11 ชนิด โอดอมี *Aeropyrum pernix* (GenBank accession no. AB078022) เป็น outgroup ด้วยโปรแกรม BioEdit หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับถ้าที่ 1; (*) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคู่ลัมป์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง

	130	140	150	160	
isolate 7	
Vibrio sp._CP001805	CA CGATTAAAGAGACGATAC	TOGGGTCTGGGG			146
isolate 19	.AAGAG.CGATACSB.	TGGG TCT.			132
Teredinibacter sp._CP001614	.CT...A.GG.T..G.TCGGCAGT			138
isolate 2	GGT..GGTCG.CAGTT				60
Bacillus sp._GU726175	.GTA.CA.GGT..C..	TATCG.A A..T.CGG			137
isolate 14	GT..TAAC...GT.GCSBCTCGTA.C..A	A..T.GCGGG			147
Dokdonia sp._DQ481462	.GTA.CA.GGT..C..	TACCG.A A..T.CGG			128
isolate 15	GT..TAAC...GT.GCCG	TACC..ASBCTA..TGC GG			138
isolate 6	.GTA.CA.GGT..C..	TACCG.A A..T.CGG			128
isolate 9	.GTA.CA.GGT..C..C	TGGGG.AACCTG...			137
isolate 4	.GTA.CA.GGT..C..C	TGGGG.AACCTG...			137
isolate 5	.GTA.CA.GGT..C..C	TAGGG.AACCTG...			137
isolate 11	.GTA.CA.GGT..C..C	TAGGG.AACCTG...			137
isolate 8	.GTA.CA.GGT..C..C	TAGGG.AACCTG...			137
isolate 3	.GTA.CA.GGT..C..C	TAGGG.AACCTG...			137
Haliea sp._FN398053	.GTA.CA.GGT..C..C	TAGGG.AACCTG...			137
Pseudoalteromonas sp._AB373122	GT..TAAC...GT.GCSBCTCCTAG...AA.C				142
isolate 13	.GTA.CA.GGT..C..C	TAGGG.			128
Pseudomonas sp._AJ312161	.GTA.CA.GGT..C..	TAGGG.			126
isolate 10	.GTA.CA.GGT..C..C	TAGGG.AACCTG...			137
Shewanella sp._GU289648	GT..TAAC...GT.GCSBCTCCTAG...AA.CT.				144
isolate 1	.GTA.CA.GGT..C..	TAGGG.AACCTG..			137
Alcanivorax sp._EU591711	GT..TAAC...GT.GCSB	CTC.TA.GGGAACCTGCGG			147
Marinomonas sp._EU330338	GT..TAAC...GT.GCSB	CTC			131
isolate 12	.GTA.CA.GGT..C..C	TAGGG.AACCTG...			137
isolate 17	.GTA.CA.GGT..C..C	TAGGG.AACCTG...			137
isolate 18	.GTA.CA.GGT..C..C	TAGGG.AACCTG...			137
isolate 16	.GTA.CA.GGT..C..C	TAGGG.AACCTG...			137
Mesorhizobium sp._AB604651	GT..TAAC...GT.GCSBCTCGTAG...AA.CT.				144
Aeropyrum pernix	GC..CGGCCGT.ACTCCGG				137

ภาพที่ 4 - 3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA (ต่อ)

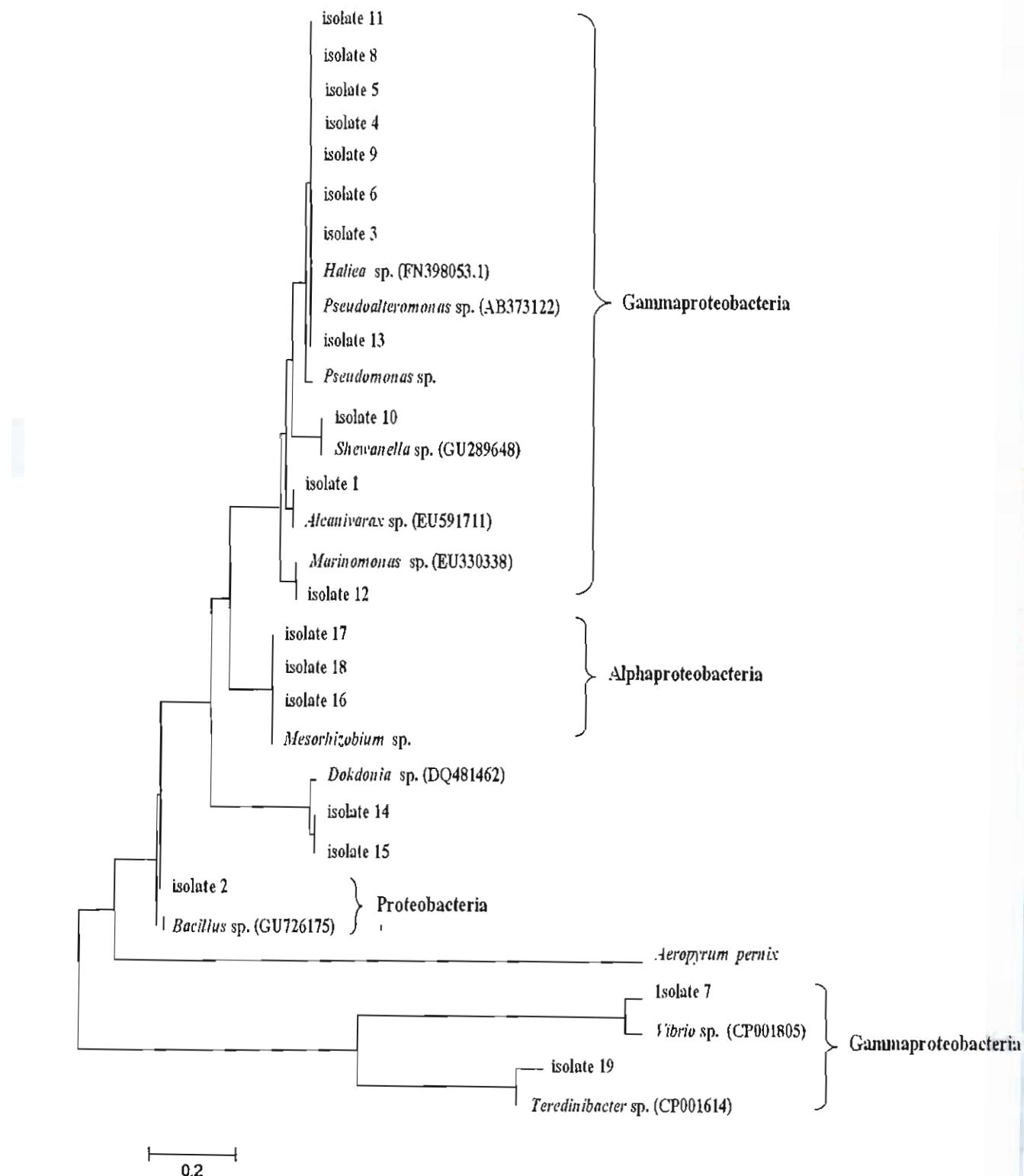
หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแทร็พที่ 1;

(★) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคู่ลัมป์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่

เทียบเคียง

ตารางที่ 4 - 3 เมตริกซ์ปริมาณพืชแบคทีเรียที่ถูกเพลี้ยกลัง 16S rRNA ของแบคทีเรียทั้งหมด 19 โภชนาณ์ที่อยู่ร่วมกับพ่อ娘นำพาเดส

isolate (species)	14	15	2	17	18	16	6	4	9	5	11	8	3	1	12	10	13	7	19	20			
14 (<i>Dokdonia</i> sp.)	1	0.693	0.656	0.656	0.656	0.635	0.635	0.635	0.627	0.635	0.642	0.62	0.598	0.7	0.445	0.432	0.432	0.37					
15 (<i>Dokdonia</i> sp.)	1	0.693	0.656	0.656	0.656	0.635	0.635	0.635	0.627	0.635	0.642	0.62	0.598	0.7	0.445	0.432	0.432	0.37					
12 (<i>Bacillus</i> sp.)	0.693	0.693	0.759	0.759	0.759	0.729	0.729	0.729	0.729	0.729	0.744	0.715	0.693	0.678	0.452	0.482	0.482	0.384					
17 (<i>Mesorhizobium</i> sp.)	0.656	0.656	0.759	1	1	0.773	0.773	0.773	0.788	0.795	0.795	0.795	0.795	0.839	0.788	0.722	0.472	0.503	0.412				
18 (<i>Mesorhizobium</i> sp.)	0.656	0.656	0.759	1	1	0.773	0.773	0.773	0.788	0.795	0.795	0.795	0.795	0.839	0.788	0.722	0.472	0.503	0.412				
16 (<i>Mesorhizobium</i> sp.)	0.656	0.656	0.759	1	1	0.773	0.773	0.773	0.788	0.795	0.795	0.795	0.795	0.839	0.788	0.722	0.472	0.503	0.412				
6 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.635	0.635	0.729	0.773	0.773	0.773	0.773	0.773	1	1	0.985	0.978	0.963	0.963	0.89	0.861	0.883	0.81	0.479	0.46	0.398		
4 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.635	0.635	0.729	0.773	0.773	0.773	0.773	0.773	1	1	0.985	0.978	0.963	0.963	0.89	0.861	0.883	0.81	0.479	0.46	0.398		
9 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.635	0.635	0.729	0.773	0.773	0.773	0.773	0.773	1	1	0.985	0.978	0.963	0.963	0.89	0.861	0.883	0.81	0.479	0.46	0.398		
5 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.635	0.635	0.729	0.788	0.788	0.788	0.788	0.788	0.985	0.985	0.992	0.992	0.978	0.978	0.905	0.875	0.897	0.81	0.479	0.453	0.384		
11 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.627	0.627	0.729	0.795	0.795	0.795	0.795	0.795	0.978	0.978	0.992	0.992	0.97	0.97	0.97	0.897	0.883	0.89	0.802	0.479	0.453	0.377	
8 (<i>Haliea</i> sp.)	0.635	0.635	0.729	0.795	0.795	0.795	0.795	0.795	0.963	0.963	0.963	0.963	0.978	0.97	0.97	0.927	0.883	0.905	0.802	0.493	0.46	0.391	
3 (<i>Haliea</i> sp.)	0.635	0.635	0.729	0.795	0.795	0.795	0.795	0.795	0.963	0.963	0.963	0.963	0.978	0.97	0.97	0.927	0.883	0.905	0.802	0.493	0.46	0.391	
1 (<i>Alcanivorax</i> sp.)	0.642	0.642	0.744	0.795	0.795	0.795	0.795	0.795	0.89	0.89	0.905	0.897	0.927	0.927	0.927	0.897	0.905	0.773	0.493	0.468	0.426		
12 (<i>Marinomonas</i> sp.)	0.62	0.62	0.715	0.839	0.839	0.839	0.839	0.839	0.861	0.861	0.875	0.883	0.883	0.883	0.89	0.905	0.905	0.861	0.861	0.751	0.472	0.489	0.412
10 (<i>Shewanella</i> sp.)	0.598	0.598	0.693	0.788	0.788	0.788	0.788	0.788	0.883	0.883	0.897	0.89	0.905	0.905	0.905	0.861	0.861	0.759	0.466	0.468	0.398		
13 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	0.7	0.7	0.678	0.722	0.722	0.722	0.722	0.722	0.81	0.81	0.81	0.81	0.802	0.802	0.802	0.773	0.751	0.759	0.439	0.418	0.412		
7 (<i>Vibrio</i> sp.)	0.445	0.445	0.452	0.472	0.472	0.472	0.472	0.472	0.479	0.479	0.479	0.479	0.479	0.479	0.479	0.493	0.493	0.472	0.466	0.439	0.425	0.29	
19 (<i>Teredinibacter</i> sp.)	0.432	0.432	0.482	0.503	0.503	0.503	0.503	0.503	0.46	0.46	0.453	0.453	0.46	0.46	0.46	0.468	0.489	0.468	0.418	0.425	0.34		
20 (<i>Aeropyrum permix</i>)	0.37	0.37	0.384	0.412	0.412	0.412	0.412	0.412	0.398	0.398	0.398	0.398	0.377	0.391	0.391	0.426	0.412	0.398	0.412	0.29	0.34		



ภาพที่ 4 - 4 เด่นໂຄຣແກຣມความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียที่เรียกต่อๆ กันฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซເලේට และลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank 11 ชนิด และ Archaea : *Aeropyrum pernix* (รหัสหมายเลข AB078022) ด้วยໂປຣແກຣມ MEGA 4

4.4.3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต ที่สักด้วยเจลฟองน้ำทะเล 8 ชนิด มาเปรียบเทียบบนฐานข้อมูล GenBank (เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2553) พบว่าในส่วนท้ายของชิ้นส่วนดีเย็นสามารถเทียบเคียงได้ประมาณ 479-934 คู่เบส กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *23S rRNA* (ตารางที่ 4 - 3) โดยมี % ความเหมือนสูงสุดที่ 85 – 94 % ซึ่งการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียเกือบทั้งหมดสอดคล้องกับผลการศึกษาจากข้อมูล *16S rRNA* ยกเว้น ไอโซเลตที่ 3, 8, 14 และ 15 ระบุได้เพียง uncultured bacterium และ ไอโซเลตที่ 16, 17 และ 18 เป็น unknown marine alpha Proteobacterium (ตารางที่ 4-4) *23S rRNA* ทั้ง 19 ไอโซเลต แสดงดังภาพที่ 4-5 ทั้งนี้จะพบบริเวณลำดับเบสที่เหมือนกันมากในช่วงท้ายของยีน *23S rRNA* ที่เพิ่มจำนวนได้คาดว่าจะเป็นบริเวณอนุรักษ์ (□ ในภาพที่ 4-6)

4.4.4 การยืนยันชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเดนโครแกรมจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA*

ภายหลังการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *23S rRNA* สามารถสร้างเดนโครแกรมความสัมพันธ์ของข้อมูลตั้งกล่าว โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Archaea คือ *Aeropyrum pernix* (GenBank รหัสหมายเลข AB078022) เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียนิดต่าง ๆ บนฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมีความเหมือนสูงสุดกับ ไอโซเลตของแบคทีเรียที่ทำการศึกษาพบว่าสามารถยืนยันชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียทะเลแต่ละ ไอโซเลตได้ดังนี้ แบคทีเรียนิดเดียวกัน ได้แก่ 1) *Pseudoalteromonas* spp. isolate 4, 9 และ 11 ซึ่งแยกได้จากฟองน้ำต่างชนิดกันคือ *Monanchora unguiculata*, *Mycale grandis* และ *Xestospongia testudinaria* ตามลำดับ 2) *Pseudoalteromonas* spp. isolate 5 และ isolate 6 แยกจากฟองน้ำ *Monanchora unguiculata* มีลำดับเบสเหมือนกัน 99% 3) Unknown marine alpha Proteobacterium isolate 16, 17 และ isolate 18 แยกจากฟองน้ำ *Oceanapia sagittaria* และ isolate 18 แยกได้จากฟองน้ำ *Neopetrosia* sp. มีลำดับเบสเหมือนกัน 100% (ตารางที่ 4 - 5)

นอกจากนี้แบคทีเรียภายในสกุล *Pseudoalteromonas* แต่ต่างชนิดกัน ได้แก่ *Pseudoalteromonas* spp. isolate 4, 9 และ 11 กับ *Pseudoalteromonas* spp. isolate 5 และ 6 มีลำดับเบสเหมือนกัน 91 - 92% แสดงดังภาพที่ 4 - 6

ตารางที่ 4 - 4 การประชุมคุณภาพแบบฟรีเชิงกับสำลีบันดาต่อไปนี้ทางเดียวที่สามารถพิสูจน์ว่าเป็น 23S rRNA กับฐานข้อมูล Genbank

Marine sponge	Bacterial strain/isolate	23S rRNA		Species Homology (%)	Genbank Accession no.
		GenBank Aligned position	Blast identity (%)		
<i>Halichondria</i> sp.	1	399-904	93(445/477)	<i>Alcanivorax</i> sp.	AF197903
	2	417-899	91(478/523)	<i>Bacillus</i> sp.	AF267884
<i>Monanchora unguiculata</i>	3	425-938	87(373/431)	Uncultured bacterium	GU925965
	4	387-884	94(446/473)	<i>Pseudalteromonas</i> sp.	FJ501589
	5	379-844	90(428/477)	<i>Pseudalteromonas</i> sp.	FJ501589
	6	369-882	91(430/475)	<i>Pseudalteromonas</i> sp.	FJ501589
	7	424-1078	93(395/424)	<i>Vibrio</i> sp.	AJ294422
<i>Mycale grandis</i>	8	435-938	85(370/433)	Uncultured bacterium	GU925965
	9	386-884	94(446/473)	<i>Pseudalteromonas</i> sp.	FJ501589
<i>Xestospongia testudinaria</i>	10	454-953	88(378/430)	<i>Shewanella</i> sp.	CP000606
	11	416-895	93(445/480)	<i>Pseudalteromonas</i> sp.	FJ501589
<i>Lamellochydidea herbacea</i>	12	412-1117	88(425/482)	<i>Marinomonas</i> sp.	CP000749
	13	479-1146	86(410/479)	<i>Pseudomonas</i> sp.	Y00432
	14	444-1280	86(376/435)	Uncultured bacterium.	GU926738
	15	430-1070	86(376/435)	Uncultured bacterium	GU926738
	16	457-1309	92(371/403)	Unknown marine alpha Proteobacterium	AY309485
<i>Oceanapia sagittaria</i>	17	449-1302	92(371/403)	Unknown marine alpha Proteobacterium	AY309485
<i>Neopetrosia</i> sp.	18	475-1409	92(371/403)	Unknown marine alpha Proteobacterium	AY309485
<i>Ciona</i> sp.	19	398-991	87(302/349)	<i>Terdinibacter</i> sp.	CP001614

	10	20	30	40	50	60	70
isolate 13
Pseudomonas sp._Y000432	GAGGCAGAGAAGGACGTGA	TAA CCTGGATAAGC	TACCGGGGAG	ATGCCACATACTTGT	59		
isolate 16T...A.....C.....GT.....	CT..GA..AG C..TGAT	61			
isolate 17T...A.....C.....GT.....	CT..OA..AG C..TGAT	61			
isolate 18T...A.....C.....GT.....	CT..GA..AG C..TGAT	61			
Unknown marine alpha proteobac	T.....T.....C.....GT.....	CT..GA..AG C..TGAT	61			
isolate 2C...C.....G..C.....	.AC.....T.....TT.....	CT.T AG GAG C..TGA	60			
Bacillus sp._AF267884T.....G..C.....	.GC.....T.....T.....	CT.T AG .AG C..TGAS	51			
isolate 1T.....TG ..G C.....T.....	TC...A C.GA C..TG	60			
Alcanivorax sp._AF197903T.....AG ..G C.....T.....	TC...A.C.GA C..TGSB	62			
Uncultured bacterium_GU926738T.....AGO ..G C.....GT TA.....	C...A.C.G C..SBCT	62			
isolate 15T.....AGG ..G C.....A..TC TA.....	C.....CAG C..	58			
isolate 14T.....AGG ..G C.....C TA.....	TC.....C.GA C..	58			
isolate 4T.....AC ..CT.....CTA TCA ..	CCA.T AGAGGC ..C.TG	60			
isolate 9T.....AC ..CT.....CTA TCA ..	CCA.T AGAGGC ..C.TG	60			
isolate 11T.....AC ..CT.....CTA TCA ..	CCA.T AGAGGC ..C.TG	60			
Pseudoalteromonas sp._PJ501589T.....AT ..CT.....CTA TCA ..	C.A.T.A.G AC.TGSB	62			
isolate 5T.....AC ..CT.....CTA TCA ..	CCA.T AGAGGC ..C.TG	60			
isolate 6T.....AC ..CT.....CTA TCA ..	CCA.T AGAGGC ..C.TG	60			
isolate 7T.....A ..AG ..CCCA ATT ..	G.A.T.ACA..C A..TG	60			
Vibrio sp._AJ294422T.....A.G ..AT ..CTTA ATT ..	G.A.T.A..C ..GTGSB	61			
isolate 10T.....T ..TA..CT ..	G..AT.A..C A..TTAG	62			
Shewanella sp._CP000606T.....AG ..CT ..AG.TG.C ..CT	AG..AA..AGC.SB C..TTGA	65			
isolate 19T.....T ..TT CTG.TTA ..	G..AT.A..A A ..CCGT	58			
Teredinibacter sp._CP001614T.....T ..TT CTG.TTA ..	G..AT.A..A A ..CCGT	58			
Oncultured bacterium_GU925965T.....TG ..G CACG ..	T..T..A..ACTA ACCCSBC	62			
isolate 3T.....G ..T ..A ..T CTT	CC..AT..A..C.GGCC	59			
isolate 3T.....G ..T ..A ..T CTT	CC..AT..A..C.GGCC	59			
isolate 12T.....TG ..C ..G ..T	C...T.A.C..AG C..TG	60			
Marinomonas sp._CP000749T.....G ..T ..A ..G ..T	T..AT..A..C..AG C..TGSB	62			
Aeropyrum	.T.C...C.....CCA.GCTGT ..	CT...TGG..AG CG CG	56			
	80	90	100	110	120	130	140
isolate 13
Pseudomonas sp._Y000432	GATCCGTGGATTTCGGAATGGGGCAACCGGCC	ATGTTGAAGACATGTCATCCTTTC	114				
isolate 16A..AAT..TTGGG..T..ATGGAAAAG	114				
isolate 17	CC ..GC.....T.....CA ..CC ..T..T..GG	GT..C..GCAA	110			
isolate 18	CC ..GC.....T.....CA ..CC ..T..T..GG	GT..C..GCAA	110			
Unknown marine alpha protobac	SBCTC ..GC.....A..CA ..TCC GT..T..GA	GT..C..GCAA	113			
isolate 2	TC ..AGAG ..CATTGT..CG..A..T..GA..CAAT ..A ..	TTGA A 120				
Bacillus sp._AF267884	BTCTTC ..AAA..CA..CATACG ..A..T..GT ..GT ..A ..	CTGASBCTA 128				
isolate 1	ATC ..GAA..CA ..C ..TT ATG ..GT ..G T ACTGA	A 114				
Alcanivorax sp._AF197903	CTATC ..GAA..CA ..TCTCAT ..AGGA..GT ..ACA T ACTGASBCTA	127				
Uncultured bacterium_GU926738	TGATC ..TAAC ..G ..A ..CA ..TTAACCAT ..AGGTAG ..G..A..A	GTSBCTGAA 127					
isolate 15	TGATC ..TA ..A ..G ..A ..CA ..TCC ..T ..GA	GT ..CA..A ACTGAA 116					
isolate 14	TGATC ..TA ..A ..G ..A ..CA ..TCC ..T ..GA	GT ..CA..A ACTGAA 116					
isolate 4	AGA ..TAA..CA ..CTGT ..T ..C..G	GT ..CC..A ACTG AA 115				
isolate 9	AGA ..TAA..CA ..CTGT ..T ..C..G	GT ..CC..A ACTG AA 115				
isolate 11	AGA ..TAA..CA ..CTGC ..T ..C..G	GT ..T..G..A ACTG AA 115				
Pseudoalteromonas sp._PJ501589	CTAGA ..TGA ..C..T ..A ..CA ..CTGC ..T ..C..G	GT ..T..G..A ACTG AA 115					
isolate 5	AGA ..TAA..CA ..CTGC ..T ..C..G	GT ..T..G..A ACTG AA 115				
isolate 6	AGA ..TAA..CA ..CTGC ..T ..C..G	GT ..T..G..A ACTG AA 115				
isolate 7	AG ..TG ..T ..A ..CAA ..CTGCA ..A ..CA ..T ..T ..TG..A ACTG	AA 117					
Vibrio sp._AJ294422	CTAG ..TGA ..C..T ..A ..CA ..CTGCA ..A ..CA ..T ..T ..TG..G ACTG	AA 120					
isolate 10	GCT TAC..G..T..G..CA..A ..A ..A ..AACA ACTG	AA 117				
Shewanella sp._CP000606	GCT AAC ..G ..A ..C..G..C..CCA..A ..GT ..	AC..A ACTGSBCTGAA 125					
isolate 19	ATAGA ..A ..AA..CA ..CC ..T..TT..G..GT ..	TGCTACTGAA 114				
Teredinibacter sp._CP001614	ATAGA ..A ..AA..CA ..CC ..T..TT..G..GT ..	TGCTACTGAA 114				
Uncultured bacterium_GU925965	TT ..CA..CA ..CTGAGATC ACTCA..GT ..G..G ..AGTGSBCTAA 128					
isolate 3AG..A ..G ..A ..CA ..CGACAA ..A ..T ..GT ..A CCTG	AA 118					
isolate 3AG..A ..G ..A ..CA ..TCACACA ..TG AGT ..A CCTG	AA 118					
isolate 12	ATC ..GAC ..A ..CA ..CTGT ..AC AGG ..T ..TC..A ACTGAA	116					
Marinomonas sp._CP000749	CTATC ..AAC ..G ..A ..CA ..TCTAC ..T AGA ..GT ..C CACAGTGAASBCT	125					
Aeropyrum	AA ..A..ACA ..G ..AATC ..CA ..C..CA ..TG..T ..GCGCA	106					

ภาพที่ 4 - 5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 23S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกจาก

ฟองน้ำทะเลจำนวน 19 ไอโซเลต และจากฐานข้อมูล GenBank 11 ชนิด โดยมี

Aeropyrum pernix (GenBank accession no. AB078022) เป็น outgroup

ด้วยโปรแกรม BioEdit

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแทวที่ 1;

(*) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่

เทียบเคียง (แสดงในช่วงตำแหน่งที่ 1-570 คู่เบส)

	150	160	170	180	190	200	210
isolate 13		GAGGAGGCCAAGTG		GGGAACTGAAACATCTAAGTACCCATAGGAGA			161
Pseudomonas sp._Y000432		GA.GA.CC.AAGT.	GG..AACTGAA.C.TC.AAGTACC.AT.CGA..	AG	163		
isolate 16		.G...A..CCCG		GG....A			154
isolate 17		.G...A..CCCG		GG....A			154
isolate 18		.G...A..CCCG		GG....A			154
Unknown marine alpha proteobec		.GA..A..CCSBCTC.		GG....A			161
isolate 2	TACAT	AGA GTATG.A...AG.CCC	A.		TGG...AGAG	180	
Bacillus sp._AF267684	TACAT	AGG GTAAG.A..A.AC.CCC	A.		TGG...AGASB	189	
isolate 1	TCCAT	AGGTGC	.CGC		G...ACAG	173	
Alcanivorax sp._AF197903	TCCAT	AGGTAT GT	.CGC		G...ACASB	187	
Uncultured bacterium_GU926738	TACAT	A G CTAT.C..A...CCC			GG...ASBCT	187	
isolate 15	TTCAT	AGG TTATG	.CCCC		CGGA.GA	173	
isolate 14	TACAT	AGG TTAAG	.CG.ACAC		GC...A	174	
isolate 4	TACAT	AGG TTAAC	.CGC	.A.	G...A	171	
isolate 9	TACAT	AGG TTAAC	.CGC	.A.	G...A	171	
isolate 11	TACAT	AGG TTAAC	.CGC	.A.	G...A	171	
Pseudoalteromonas sp._FJ501589	TACATSBCTAGG TTAAC	.CGC	.A.		G...A	179	
isolate 5	TACAT	AGC TGTAT	.A...CGC	.A.	G...A	170	
isolate 6	TACAT	AEC TGTAT	.A...CGC	.A.	G...A	170	
isolate 7	TAC	ATAGG TTAAAC AGA	.CCC		CG...A	173	
Vibrio sp._AJ294422	TASBCTCATAGC TCA.C	.CC.			CG...A	180	
isolate 10	TACAT	AGC TTGT T	.CG.		A	173	
Shewanella sp._CP000606	TACAT	AGC TTA. T	.CGA		T...ASBCT	185	
isolate 19	TACAT	AG GTA.TA	.A..CCC	.A.	GG...A	170	
Teredinibacter sp._CP001614	TACAT	AG GTA.TA	.A..CCC	.A.	GG...A	170	
Uncultured bacterium_GU925965	TACAT	AGCTGCA T.A.	.CCC	.A.	GG...ASBCT	188	
isolate 3	TACAT	AGGGTTTAG	.CCC		GG...A	175	
isolate 3	TACAT	AGGGTTTAG	.CCC		GG...A	175	
isolate 12	TACAT	AGGTTT TGA	.CCC		GG...A.A.G	176	
Marinomonas sp._CP000749	TACAT	AGCTGTGTG	.CCC		GG...A.A.SB	186	
Aeropyrum		AT..G..CGCC		T....T	GG.C..A	149	
	220	230	240	250	260	270	280
isolate 13	AGAAAAACAA	ATAATGATTCCGTTAGTAAAG	TGGCGAGCGAAACGCCGAAATAAGCCCAAACCAA	224			
Pseudomonas sp._Y000432	.A...C.	AT.GT.ATTCCGTTAATTAAG	TGGC.A.C.AA.CG..GAAT.AGCC.AA.CC.AA.T	226			
isolate 16	.G.C.T..	.CC.A..C...C..GT	C....CC.G...AGTGGT..T	215			
isolate 17	.G.C.T..	.CC.A..C...C..GT	C....CC.G...AGTGGT..T	215			
isolate 18	.G.C.T..	.CC.A..C...C..GT	C....CC.G...AGTGGT..T	215			
Unknown marine alpha proteobec	.G.C.T..	.CC.A..C...SBCTG.	C....CC.G...AGTGG..T	226			
isolate 2	.G..	.T.C...C.G..GC	CG...TGT	.A.G	238		
Bacillus sp._AF267684	CTG...G..	.AT.C...T.C.G..GC	CG.A.TCT	.A.G	250		
isolate 1	...T..	.T.A...C..GC	C...T.	TTA.G	227		
Alcanivorax sp._AF197903	CTG...T..	.T.A...GC	C...T.	TTA.G	244		
Uncultured bacterium_GU926738	.AG...T..	.CC.A...C..GC	G...GC	TTA.G	244		
isolate 15	.A....	.C	C.T...G...O		200		
isolate 14	.AG...T..	.CC.A...C..GC	C...G.O..T.	TTA.G	231		
isolate 4	.AG...T..	.CC.A...AA..GC	T...C.	TTA.G	228		
isolate 9	.AG...T..	.CC.A...AA..GC	T...C.	TTA.G	228		
isolate 11	.AG...T..	.CC.A...AA..GC	T...C.	TTA.G	228		
Pseudoalteromonas sp._FJ501589	.AG...T..	.SBCT.CC.A...A..GC	T...C.	TTA.G	240		
isolate 5	.AG...T..	.CC.A...AA..GC	T...T.	TTA.G	227		
isolate 6	.AG...T..	.CC.A...AA..GC	T...T.	TTA.G	227		
isolate 7	.AG...	ACCA.CC.A...AA..GC	TT...C.	TTA.G	230		
Vibrio sp._AJ294422	GAG..SB.TATCA.CC.A...AA..GC		TT...T.	TTA.G	241		
isolate 10	.AG...T..	.CC.A...CC..GC	C.G..T.	TTA.G	230		
Shewanella sp._CP000606	.AG...T..	.CC.A...CC..GC	C.G..T.	TTA.G	242		
isolate 19	.AG...T..	.CC.A...T.C.A..GC	C.G.A..C	G..	224		
Teredinibacter sp._CP001614	.AG...T..	.CC.A...T.C.A..GC	C.G.A..C	G..	224		
Uncultured bacterium_GU925965	.AG...T..	.CC.A...C..GC	C.G..T.	TTA.G	245		
isolate 3	.AG...T..	.CC.A...CC..GC	C.G..CC	TTA.G	232		
isolate 3	.AG...T..	.CC.A...CC..GC	C.G..CC	TTA.G	232		
isolate 12	...T..	.CC.A...C.A..GC	C.G..T.	TTA.G	230		
Marinomonas sp._CP000749	CTG...T..	.CC.A...C.A..GC	C.G..T.	TTA.G	243		
Aeropyrum	.AG...T..	.AC.A...AT..C..C	C...T..C GC..TAC	TG..	209		

ภาพที่ 4 - 5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 23S rRNA (ต่อ)

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับเดิมที่ 1;

(*) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคู่กัน; ตัวเลขค้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่

เทียบเคียง (แสดงในช่วงตำแหน่งที่ 1-570 คู่เบส) ด้วยโปรแกรม BioEdit

	250	300	310	320	330	340	350
isolate 13							
Pseudomonas sp._Y000432	ATCGG	TTACGGCCGGTTGGGTTGTAAGGACTACCGGATTAGGATTGAAATGAATTAG	A	289			
isolate 16	. . TTT	A.GAAC.G.AACAA.TT..G		240			
isolate 17	. . TTT	A.GAAC.G.AACAA.TT..G		240			
isolate 18	. . TTT	A.GAAC.G.AACAA.TT..G		240			
Unknown marine alpha proteobec	GATTT	A.GAAC.G.AACC.TCT.GSBCT		254			
isolate 2	. . GGC	.G.CTCTT..G..TA..ACACTCTATAACCGA.TT.CA.A.GAA..A.G.AG.CG	.	300			
Bacillus sp._AF267884	. . SBCTGGC..G.CTCTT..G..TA..ACA.TCTATAACCGA.TT.CA.A.GAAC.AGG.AG.CGSBCT.		320				
isolate 1	CATAT	GA CT.A ..A..AAC.GT		251			
Alcanivorax sp._AF197903	C.T.T	SB CT.AAT.A..A..AAC.GT		272			
Uncultured bacterium_GU926738	C SB	C.TTAATTG.TT..A.T..AAC.CT		272			
isolate 15	C	TTTTAAT.TT..A.T..AAG..T		200			
isolate 14	C.T	.A ..TGTAA..A.T..AACAA.T		255			
isolate 4	C.T	.A ..TGTAA..A.T..AACAA.T		252			
isolate 9	C.T	.A ..TGTAA..A.T..AACAA.T		252			
isolate 11	C.T	.A ..TGTAA..A.T..AACAA.T		252			
Pseudoalteromonas sp._PJ501589	C.TAT	.A T.TSB.T ..AAT..AAG.CT		268			
isolate 5	C.T	.A ATGTA..A.T..AACAA.T		251			
isolate 6	C.T	.A ATGTA..A.T..AACAA.T		251			
isolate 7	C.T T	.A AT..AACA..T.AA..AG		254			
Vibrio sp._AJ294422	C.T T	.A ATSB.T.AACA..T.AAO.CT		269			
isolate 10	T.TTT	AAGAA..A.T..AA..G		254			
Shewanella sp._CP000606	CCTSB	C..A.AGG.T..A.T..AA..G		270			
isolate 19		.C.GTA TA.T ..A.T..AACACT		247			
Terediniibacter sp._CP001614		.C.GTA TA.T ..A.T..AACACT		247			
Uncultured bacterium_GU925965	.T S	BCTGTAATA.T...A.T..AACAGT		273			
isolate 3	CAA	TTTT..TC.A.T..AAC.TT		256			
isolate 3	CAA	T.TTT..TC.A.T..AAGACT		256			
isolate 12	CAATC	..GTA.C.A.TAAAACACT		254			
Marinomonas sp._CP000749	TGGTT	SBC TTTGGT ..A.TA.AAG.CT		271			
Aeropyrum	GG.CTACGGC.AATGT..TG.ATT..CC.GC	OA.CAACG..CU..C..TC.T.CG		267			
	360	370	380	390	400	410	420
isolate 13	ACCTGTTGAAAGACANNGCCAAAAAAAGGGTGATAGCCCTTGNNTAACTAAAGATCAAATCTA	359					
Pseudomonas sp._Y000432	CTG.T.GGAA.G.C.NN..CCAA..GG.T.AT.GCC.TTGNT.A..AGTAA.G.TCAA.T.CTTAGT	361					
isolate 16	. . A ..T..C.. TT..GT.....C ..A.GGGTAO.....GAT.TG..CC	293					
isolate 17	. . A ..T..C.. TT..GT.....C ..A.GGGTAG.....GAT.TG..CC	293					
isolate 18	. . A ..T..C.. TT..GT.....C ..A.GGGTAG.....GAT.TG..CC	293					
Unknown marine alpha proteobec	. . .TC..C.. TT..GC.....C ..A.GGGTAG..TT ATCT..G.CC	308					
isolate 2	. . GAA..C.. GC..T.. . .G.A..A.C.A..A.T.G.AACTTC..TCCC..C	361					
Bacillus sp._AF267884	. . G.A.CC.. GC..T.. . .C.G..A.C.A..C..A.TCG.AACTTCG.TCTCSB..C	385					
isolate 1	C..G.. GC..C.. . .T.GT.....C ..A.CCG..A..TG..TA..	304					
Alcanivorax sp._AF197903	C..G.. GC..C.. . .T.GT.....C ..A.CCG.SBCT.AG..TG..TA..	329					
Uncultured bacterium_GU926738	C.. . . TG..CG ..T.C.....C ..A.SBCTACG..A.GCCT.TTAA	330					
isolate 15	C.. . . T..CG ..T.C.....C ..A..ACG..A.GGC.T.TTAA	200					
isolate 14	C.. . . TT..ACG ..T.C.....C ..T.C..AA..CTT ..TCTAAA	309					
isolate 4	C.. . . TT..ACG ..T.C.....C ..T.C..AA..CTT ..TCTAAA	306					
isolate 9	C.. . . TT..ACG ..T.C.....C ..T.C..AA..CTT ..TCTAAA	306					
isolate 11	C.. . . TT..ACG ..T.C.....C ..T.C..AA..CTT ..TCTAAA	308					
Pseudoalteromonas sp._PJ501589	C.. . . TG..ACG ..T.C.....T..C ..A..G.AA.CSBC.GC.T.TTAA	326					
isolate 5	C.. . . T..ACG ..T.C.....C ..T.C..AA..CG.CA..CTT ..T.TAAA	305					
isolate 6	C.. . . T..ACG ..T.C.....C ..T.C..AA..CG.CA..CTT ..T.TAAA	305					
isolate 7	C.. . . T..CG ..T.C.....C ..A.CCG.CA ..TCTC.TC.TCA	308					
Vibrio sp._AJ294422	C.. . . TG..CG ..T.C.....C ..A.CCG.CASBCTTCTC.TC.TCA	327					
isolate 10CG ..GC.C.....C ..A..G ..A.A.G.C.TAAAG	308					
Shewanella sp._CP000606CG ..T.C.....C ..A..SBC.G..A.CT..C.T..AG	328					
isolate 19	C.. . . T.G..ACG ..T.G.....T..C ..A..ACG..G.C.TATA..G	300					
Terediniibacter sp._CP001614	C.. . . T.G..ACG ..T.G.....T..C ..A..ACG..G.C.TATA..G	300					
Uncultured bacterium_GU925965	C.. . . T.C..CG ..T.C.....C ..ASBCTCACG..A.C.C.TATTAC	330					
isolate 3	C.. . . TG..C.. . .T.GT.....C ..A..CG.AAGGCC..TTA.T	310					
isolate 3	C.. . . TG..C.. . .T.GT.....C ..A..CG.AAGGCC..TTA.T	310					
isolate 12	C.. . . TG..C.. . .T.GT.....C ..A..G..TT..GA.T	308					
Marinomonas sp._CP000749	C.. . . TG..CG ..T.G.....C ..A..CCSBC..A.CACCT..A.C	329					
Aeropyrum	.GTCTCC..C..G..CG ..C.C.....A..C ..A.C ..G..G..T.T..GAC	326					

ภาพที่ 4 - 5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 23S rRNA (ต่อ)

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับແວที่ 1;

(★) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคู่ด้าน; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่

เทียบเคียง (แสดงในช่วงตำแหน่งที่ 1-570 คู่เบส) ด้วยโปรแกรม BioEdit

	430	440	450	460	470	480	490
isolate 13							
Pseudomonas sp._Y000432	GTA	ATCCCTGAGTA	GCGCGG GGCACGGGAAA	CCTGTGT GAATT	TGGCGG	A	412
isolate 16	ACT	ATCCCTGA.TA	GC...G .GCA.GG.AA.	CC.TG... GAATT	TGCC.G.	ACC	414
isolate 17	T.GAG		.G....A..T...	T...C. .CA	...G...		338
isolate 18	T.GAG		.G....A..T...	T...C. .CA	...G...		338
Unknown marine alpha proteobec	TCGAS	BCT..	.G....A..T.	T....C. .CA	..G...		338
isolate 2	T.GACTGG	CG....A..T.	T...C.CG ...GC	...GA..		317
Bacillus sp._AF267884	T.GAATGT	CG....AA..T..	TT.C..CG ..C	...GA..		441
isolate 1	..GAA	AC.....	.GT....T...	..T.AC...CA	...G...	G	355
Alcanivorax sp._AF197903	..GAA	TC.....	.GT... A...T...	TT.AC...G	...GSBCTGGG.		394
Oncultured bacterium_GU926738	..GAA	TC ..	.GA...A..T..T	T....T...SBCTA...G..			384
isolate 15							200
isolate 14	..GAA	TC....	.GT... A...T..TT	T.T..AC...C	A ..G...		360
isolate 4	..GAA	TC ..	.GT... A...T..	TT..AC...A	..A.GT..		357
isolate 9	..GAA	TC....	.GT... A....T..	TT..AC...A	..A.GT..		357
isolate 11	..GAA	AT.C....	.GT...GA....T..	..ACTTT..AC...A	..A.GT..		364
Pseudoalteromonas sp._PJ501589	..GAA	TC....	.GT... A...T...	TT..AC...A	..A.GT..		377
isolate 5	..GAA	TC....	.GT... AA...T..	TT..AC...A	..G...G		357
isolate 6	..GAA	TC....	.GT... A....T..	TT..AC...A	..G...		356
isolate 7	..GAA	TC....	.G... A...T..T	T....C...A	..G...		359
Vibrio sp._AJ294422	..GAA	TC....	.G... A...T..T	T....C...A	..G...SBCTG		382
isolate 10	A.GAA	TC....	.GA...CA...T..T	TGT..C...CA	...G...		359
Shewanella sp._CP000606	..GAA	AC....	.GA...A...T..T	T.T..TC...ASBCT...G..			393
isolate 19	.ACAC	T.A....	.GT...A...T...	..TT..AC.G	AAG A.A.G...		351
Teredinibacter sp._CP001614	.ACAC	T.A....	.GT...A...T...	..TT..AC.G	AAG A.A.G...		351
Oncultured bacterium_GU925965	..GAA	AC....	.GT...A...T...	..TT..AC.GSBC.AAC A...G...			355
isolate 3	..GAA	TC....	.GT... CA...T..	TGT..AC...CA	...G...		361
isolate 3	..GAA	TC....	.GT... CA...T..	TGT..AC...CA	...G...		361
isolate 12	..GAA	TC....	.AG...A...T..	..T...C...C	A...G...		359
Marinomonas sp._CP000749	A.GAA	AC....	.GA...GA...T..TT	T....C...SBCTA...G..			384
Aeropyrum	..GAG	.C.GT.CCG.A.TA.C..GGCTT.G	AT.CC.CGT...A	C...A.C			391

	500	510	520	530	540	550	560	570
isolate 13	CC	ATCCGCTAAGGTAAAT	ACTCCTGA	GAGACCGATA GTGAACCGATACC	GTGACCGA	AAGG		874
Pseudomonas sp._Y000432	CCC		
isolate 16	..C..T.C..C...G.	AG TC.....	C.C.....		800
isolate 17	..C..T.C..C...G.	AG TC.....	C.C.....		499
isolate 18	..C..T.C..C...G.	AG TC.....	C.C.....		499
Unknown marine alpha proteobec	..C..T.C..C...G.SBCT	TG TC.....	C...A.....		423
isolate 2	..TC.C.....	CT...T.....		479
Bacillus sp._AF267884	..SBCT..TC.C.....	A.CT...T..T		507
isolate 1	..T.C.....	G CT.....	A...		817
Alcanivorax sp._AF197903	..T.C.....	G CT.....	SBCT GA...		450
Oncultured bacterium_GU926738	..T.C.....	CA..CT.....	GSBCTT..AGGG AA.G.		450
isolate 15	..T.C.....	CAG CT.....	GTGAG..A.AG G			200
isolate 14	..AT.....	CA..CT.....			422
isolate 4	..AT.....	CA..CT.....			419
isolate 9	..AT.....	CA..CT.....			419
isolate 11	..AT.....	CA..CT.....	C.....G	AA		427
Pseudoalteromonas sp._PJ501589	SBCTCC..AT.....	CA..CT.....	SBCTGG		447
isolate 5	..T.C.....G	CA..CT.....	GA..G	A..	419
isolate 6	..T.C.....	CA..CT.....	A..G	A..	417
isolate 7	..T.C.....	A...CT.....		421
Vibrio sp._AJ294422	..T.C.....	A...CT.....	SB CT...		448
isolate 10	..T.C.....	CT.....GG OA...		421
Shewanella sp._CP000606	..T.C.....	CT.....	SBCT ..GG GA...		449
isolate 19	..T.....	CA..TT.....	ACCGT..AGGG AA.G.			413
Teredinibacter sp._CP001614	..T.....	CA..TT.....	ACCGT..AGGG AA.G.			413
Oncultured bacterium_GU925965	..T.C.....	T..CT.....	SB..TACCGT..AGGG AA.G.			451
isolate 3	..T.C.....	CT.....		423
isolate 3	..T.C.....	CT.....		423
isolate 12	..T.C.....	CT.....	G T..AGGG AA.G.			421
Marinomonas sp._CP000749	..T.C.....	CT.....	GSBCTT..AGGG AA.O.			450
Aeropyrum	T..TA.T..C.....	CG ..C..	C...A..G..C...C..ACGC			442

ภาพที่ 4 - 5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไฮด์ในส่วนของยีน 23S rRNA (ต่อ)

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแทร็วที่ 1;

(★) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคู่ลัมป์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่

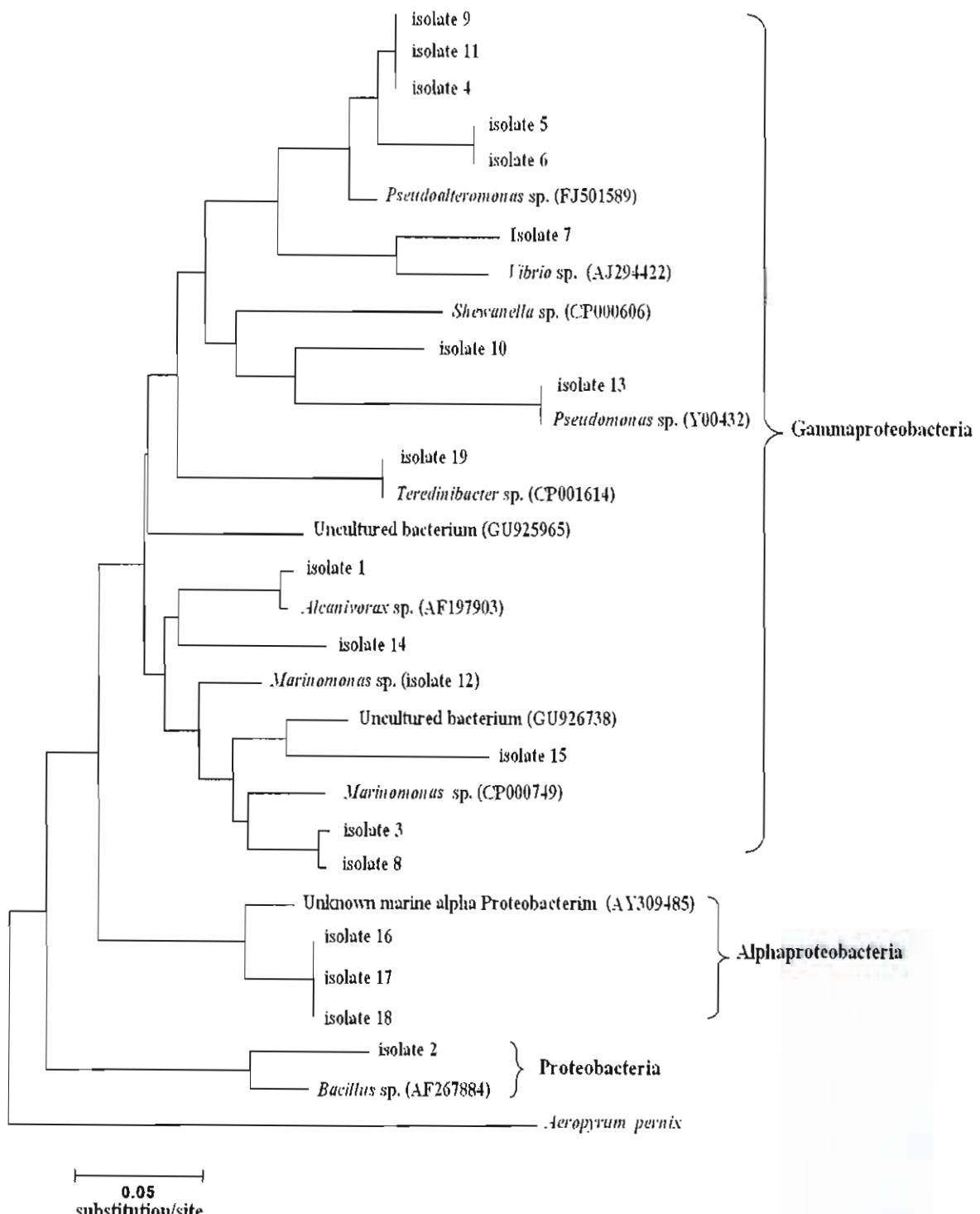
เทียบเคียง (แสดงในช่วงตำแหน่งที่ 1-570 คู่เบส) ด้วยโปรแกรม BioEdit

□ = ช่วงลำดับเบสอนุรักษ์ในส่วนของยีน 23S rRNA ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับพองน้ำทะเล

ตารางที่ 4 - 5 เมตริกซ์ปรีเซนต์เบบาร์ดัมเมต์ สำหรับรีเควัล ของค่าปริมาณ 23S rRNA อะดีงแบคทีเรียฟังก์ชัน 19 ไฮดราต ที่อยู่รวมกับพองน้ำทะเล

isolate (species)	16	17	18	4	9	11	5	6	19	7	10	1	12	3	8	14	15	2	13	20		
isolate 16 (<i>Uma. proteobacterium</i>)	1	1	0.66	0.66	0.64	0.65	0.65	0.68	0.68	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.7	0.32	0.56	0.58	0.5			
isolate 17 (<i>Uma. proteobacterium</i>)	1	1	0.66	0.66	0.64	0.65	0.65	0.68	0.68	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.7	0.32	0.56	0.58	0.5			
isolate 18 (<i>Uma. proteobacterium</i>)	1	1	0.66	0.66	0.64	0.65	0.65	0.68	0.68	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.7	0.32	0.56	0.58	0.5			
isolate 4 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.66	0.66	0.66	1	0.97	0.91	0.92	0.81	0.8	0.77	0.78	0.81	0.78	0.78	0.78	0.82	0.34	0.6	0.55	0.52		
isolate 9 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.66	0.66	0.66	1	0.97	0.91	0.92	0.81	0.8	0.77	0.78	0.81	0.78	0.78	0.78	0.82	0.34	0.6	0.55	0.52		
isolate 11 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.64	0.64	0.64	0.97	0.97	0.97	0.97	0.9	0.9	0.79	0.78	0.75	0.76	0.78	0.77	0.76	0.8	0.34	0.6	0.54	0.51	
isolate 5 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.65	0.65	0.65	0.91	0.91	0.9	0.9	0.99	0.99	0.78	0.79	0.77	0.77	0.77	0.76	0.79	0.33	0.59	0.54	0.51		
isolate 6 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.65	0.65	0.65	0.92	0.92	0.9	0.99	0.99	0.99	0.78	0.79	0.77	0.77	0.76	0.76	0.8	0.33	0.59	0.54	0.51		
isolate 19 (<i>Teredinibacter</i> sp.)	0.68	0.68	0.68	0.81	0.81	0.79	0.79	0.8	0.8	0.78	0.79	0.78	0.78	0.78	0.77	0.76	0.35	0.59	0.54	0.51		
isolate 7 (<i>Vibrio</i> sp.)	0.68	0.68	0.68	0.8	0.8	0.78	0.78	0.78	0.78	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.76	0.8	0.33	0.59	0.56	0.51	
isolate 10 (<i>Shewanella</i> sp.)	0.68	0.68	0.68	0.77	0.77	0.75	0.79	0.79	0.76	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.76	0.78	0.8	0.32	0.62	0.59	0.5
isolate 1 (<i>Alcanivorax</i> sp.)	0.72	0.72	0.72	0.78	0.76	0.77	0.78	0.74	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.78	0.81	0.84	0.36	0.62	0.58	0.53
isolate 12 (<i>Marinomonas</i> sp.)	0.72	0.72	0.72	0.81	0.81	0.78	0.77	0.78	0.79	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.8	0.83	0.38	0.64	0.58	0.52	
isolate 3 (<i>Unculturedd bacterium</i>)	0.72	0.72	0.72	0.78	0.77	0.76	0.76	0.78	0.78	0.8	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.87	0.98	0.85	0.37	0.63	0.56	0.52
isolate 8 (<i>Unculturedd bacterium</i>)	0.72	0.72	0.72	0.78	0.76	0.76	0.76	0.77	0.76	0.79	0.81	0.86	0.98	0.98	0.98	-	0.84	0.38	0.63	0.55	0.52	
isolate 14 (<i>Unculturedd bacterium</i>)	0.7	0.7	0.7	0.82	0.82	0.8	0.79	0.8	0.76	0.81	0.8	0.84	0.83	0.85	0.84	0.84	0.39	0.63	0.58	0.55		
isolate 15 (<i>Unculturedd bacterium</i>)	0.32	0.32	0.32	0.34	0.34	0.33	0.33	0.35	0.33	0.32	0.36	0.38	0.37	0.38	0.38	0.39	0.39	0.63	0.58	0.55		
isolate 2 (<i>Bacillus</i> sp.)	0.56	0.56	0.56	0.6	0.6	0.59	0.59	0.59	0.59	0.62	0.62	0.64	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.29	0.29	0.26	0.25	
isolate 13 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	0.58	0.58	0.58	0.55	0.55	0.54	0.54	0.54	0.54	0.56	0.59	0.58	0.58	0.56	0.55	0.58	0.26	0.58	0.58	0.54		
20 (<i>Aeropyrum pernix</i>)	0.5	0.5	0.5	0.52	0.52	0.51	0.51	0.51	0.51	0.5	0.53	0.52	0.52	0.52	0.52	0.55	0.25	0.54	0.54	0.54		

* *Uma. Proteobacterium* = Unknown marine alpha Proteobacterium



ภาพที่ 4 - 6 เด่น ໂຄຣແກຣມความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 23S rRNA ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับพองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซලे�ต และลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank 11 ชนิด และ Archaea : *Aeropyrum pernix* (รหัสหมายเลข AB078022) ด้วยໂປຣແກຣມ MEGA 4.

4.4.5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS

เมื่อวิเคราะห์ขนาดของ ITS ที่อยู่ระหว่างยีน *16S rRNA* และ ยีน *23S rRNA* ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตพบว่ามีขนาดไม่เท่ากันคือตั้งแต่ 236 – 352 คู่เบส ได้แก่ 1) แบคทีเรีย *isolate 1* และ 2 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Halichondria sp.* มีขนาด 261 และ 279 คู่เบส ตามลำดับ 2) *isolate 3, 4, 5, 6* และ 7 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Monanchora unguiculata* มีขนาด 287, 254, 246, 236 และ 280 คู่เบส ตามลำดับ 3) ไอโซเลต 8 และ 9 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Mycale grandis* มีขนาด 297 และ 253 คู่เบส ตามลำดับ 4) *isolate 10* และ 11 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Xestospongia testudinaria* มีขนาด 319 และ 283 คู่เบส ตามลำดับ 5) ไอโซเลต 12, 13, 14 และ 15 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Lamellodysidea herbacea* มีขนาด 290, 352, 315 และ 301 คู่เบส ตามลำดับ 6) ไอโซเลต 16 และ 17 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Oceanapia sagittaria* มีขนาด 322 และ 314 คู่เบส ตามลำดับ 7) ไอโซเลต 18 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Neopetrosia sp.* มีขนาด 340 คู่เบส และ 8) ไอโซเลต 19 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Cliona sp.* มีขนาด 263 คู่เบส (ตารางที่ 4 - 6) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้ทั้ง 19 ไอโซเลต โดยให้ซื้อตามที่ระบุจากข้อมูลของยีน *16S rRNA* พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกันมากในระดับสกุล แม้มีขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างคล้ายกันสำหรับแบคทีเรียที่จัดไว้ในสกุลเดียวกัน ดังภาพที่ 4 – 7 (แสดงในช่วงตำแหน่งที่ 1 - 380 คู่เบส) เช่น *Pseudoalteromonas sp.* บริเวณ ITS มีขนาดเท่ากับ 236 - 238 คู่เบส *Mesorhizobium sp.* มีขนาด 314 - 340 คู่เบส และ *Dokdonia sp.* มีขนาดเท่ากับ 301 - 322 คู่เบส เป็นต้น (ตารางที่ 4-6) โดย *Pseudoalteromonas sp.* (4, 9, 11 และ 6) ไอโซเลต 4 และ 9 มีลำดับเบสคล้ายกัน 99.6%, ไอโซเลต 4 และ 11 มีลำดับเบสคล้ายกัน 88.6%, ไอโซเลต 9 และ 6 มีลำดับเบสคล้ายกัน 68%, ไอโซเลต 11 และ 6 มีลำดับเบสคล้ายกัน 61.9% (ตารางที่ 4 - 7)

4.4.6 การยืนยันชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเดโนรีแกรมจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS

ภายหลังการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ด้วยโปรแกรม BioEdit สร้างเดโนรีแกรมความสัมพันธ์ของข้อมูลด้วยวิธีเดียวกันกับที่รายงานในยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA* สามารถยืนยันไอโซเลตที่คาดว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกัน ได้แก่ 1) *Pseudoalteromonas sp.* ไอโซเลต 5 และ 6 2) *Haliea sp.* ไอโซเลต 3 และ ไอโซเลต 8

ส่วนแบ่งที่เรียกว่าต่างชนิด คือ *Pseudoalteromonas* sp. ไอโซเลต 5, และ 6 กับ *Pseudoalteromonas* sp. ไอโซเลต 4, 9 และ 11 และยืนยันได้ว่าต่างสกุลกันคือ *Dokdonia* sp. ไอโซเลต 14 และ 15 และ *Mesorhizobium* sp. ไอโซเลต 16, 17 และ 18 (ภาพที่ 4 – 8)

ตารางที่ 4 - 6 สรุปข้อมูลของลำดับเบสในบริเวณ ITS ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลตที่แยกได้จากพองน้ำทะเล

Marine Sponge	Isolate	Species (<i>16S rRNA</i>)	ITS	
			Nucleotide position (bp)	size (bp)
<i>Halichondria</i> sp.	1	<i>Alcanivorax</i> sp.	138-398	261
	2	<i>Bacillus</i> sp.	138-416	279
<i>Monanchora unguiculata</i>	3	<i>Haliea</i> sp.	138-424	287
	4	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	133-386	254
	5	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	133-378	246
	6	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	133-368	236
	7	<i>Vibrio</i> sp.	144-423	280
<i>Mycale grandis</i>	8	<i>Haliea</i> sp.	138-434	297
	9	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	133-385	253
<i>Xestospongia testudinaria</i>	10	<i>Shewanella</i> sp.	135-453	319
	11	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	133-415	283
<i>Lamellodysidea herbacea</i>	12	<i>Marinomonas</i> sp.	122-411	290
	13	<i>Pseudomonas</i> sp.	127-478	352
	14	<i>Dokdonia</i> sp.	129-443	315
	15	<i>Dokdonia</i> sp.	129-429	301
<i>Oceanapia sagittaria</i>	16	<i>Mesorhizobium</i> sp.	135-456	322
	17	<i>Mesorhizobium</i> sp.	135-448	314
<i>Neopetrosia</i> sp.	18	<i>Mesorhizobium</i> sp.	135-474	340
<i>Cliona</i> sp.	19	<i>Teredinibacter</i> sp.	135-397	263

		10	20	30	40	50	60	70
isolate 3	1	GAACCTGGGGCTGGATCACCTCCC	TTAACCGAAGACTGACCTTCCATAAGCGTCACACG	60				
isolate 8	1	CTGGATCACCTCCC	TTAACCGAAGACTGACCTTCCATAAGCGTCACACG	49				
isolate 4	1	TGGGGCTGGATCACCTCCTT	AACGATTAGAACAGATTGTCGTACTGTCCACACA	57				
isolate 9	1	TGGGGCTGGATCACCTCCTT	AACGATTAGAACAGATTGTCGTACTGTCCACACA	57				
isolate 11	1	CTGGGGCTGGATCACCTCCTT	AACGATTAGAACAGATTGTCGTACTGTCCACACA	58				
isolate 5	1	TGGGGCTGGATCACCTCCTT	ATCGACTTAGAACGATTGTCGAAGTGTCACACA	57				
isolate 6	1	TGGGGCTGGATCACCTCCTT	ATCGACTTAGAACGATTGTCGAAGTGTCACACA	57				
isolate 10	1	GGGCTGGATCACCTCCTT	ATCGACAGATGTTCACTTGTAGAGTGTCCACACA	55				
isolate 7	1	GTAAGCTCAGCTGGGTTAGAGCTTTCGCC	TGATAAGCGAGAGGGTCCGGTGGTTCAAGTCCACTCAG	68				
isolate 19	1							1
isolate 16	1	GGGGCTGGATCACCTCCTT	TCTAAGGATCGGTCTTCAGCT		TACTTTGGTT	50		
isolate 17	1	GGGCTGGATCACCTCCTT	TCTAAGGATCGGTCTTCAGCT		TACTTTGGTT	49		
isolate 18	1	GGGCTGGATCACCTCCTT	TCTAAGGATCGGTCTTCAGCTATGTCACCTTGAAG	56				
isolate 12	1	CTAOGGGAACCTGGGGCTGGATCACCTCCTTAAACGATTGTCGCGTCTG	GCAAGCGTTCACACG	66				
isolate 13	1	GGAACCTGGGGCTGGATCACCTCCTTAAACGATTGTCGCGTCTG	GCAAGCGTTCACACG	64				
isolate 15	1		CAAGGGATTGTTTTA	GGCCTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGC	43			
isolate 14	1	CTGGAAAACCCCTC	CTTCTTAGAGAAATTAGAAATGCTACAGACTCAGAAC	52				
isolate 1	1	CTGGATCACCTCCTT	AACGAAAGAACTTTCAAAC	AGGACCCACACG	47			
isolate 2	1	CTGGATCACCTCCTT	TCTAAGGAAGATTAACTA	AACTTGTGACAAG	47			
<i>Aeropyrum pernix</i>	1	CTGGATCGACCTCA	GGAGCCCTGGCTCTGGCGAAGGGCGGAGGG	49				
		80	90	100	110	120	130	140
isolate 3	61	AAT TGTGGA	TAACACCAACAGCG		AAAGCTGGCTGGTGTGT		TTTGT	107
isolate 8	50	AAT TGTGGA	TAACACCAACAGCG		AGAGTTGCTGGTGTGT		TTTGT	96
isolate 4	58	GAT GATTG	TTAGTT AGCT		TTATAGCTAAATAATATTG		C	95
isolate 9	58	GAT GATTG	TTAGTT AGCT		TTATAGCTAAATAATATTG		C	95
isolate 11	59	GAT GATTG	TTAGTT AGCT		TTATAGCTAAATAATATTG		C	96
isolate 5	58	GAT GATTG	TTGCTTGTTAGCT		TGCTTACTGAGTGTATTG		C	99
isolate 6	55	GAT GATTG	TTGCTTGTTAGCT		TGCTTACTGAGTGTATTG		C	99
isolate 10	56	GATATGCTTGAOT	ATTTACTTGCAGATACCGATACTTGCCTTACCGTATAGA				GA GT	116
isolate 7	69	ACCCACCAATCT	TCCTCCCAGAAGAATTG		GCACACAGTATCAACACC		TGATGGG	123
isolate 19	1		CAAGTCTGC		CCAGGGCTACCAAAGATT		AGATGGG	39
isolate 16	51	TG CTATTGA	CTGCTTTTGAAACATA		GCTGACTTGATCAGCAA		AGATGCC	100
isolate 17	50	TG CTATTGA	CTGCTTTTGAAACATA		GCTGACTTGATCAGCAA		AGATGCC	99
isolate 18	57	TGACAACATATCGA	CTGCTTTTGAAACATA		GCAGGCTTGACCTGCAA		AGATGCC	110
isolate 12	67	AATTATCTGATC	AGTATGTAGAGAGAGCG		AGAAGGTTACCTAG			109
isolate 13	65	CATTOCTTGATCOTACTGATGATGATGAGTGGAAAGTCAG	TGAAGGCCCCCTGGGGGGTTCTAAAGAGC					128
isolate 15	44	GCACCCCTGATA	AGGGTGAAGTGGCCGAGT		TCAAGTCTGCCAG			26
isolate 14	53	GTT TTATTCAAGGAGTTGATTTAGTTTCO	GCTGTCAATAAAATATTAAAGGATCGAT					113
isolate 1	48	TTT GCTTGCT	GTGTTTCCGGCGTCGAG		AAGCCGTAACAAGTGTATT		C	95
isolate 2	48	TCGAAGTTTTGTT	CAAGTTTGATCGTTA		ATAAGGTTTTGCGAGAG		C	96
<i>Aeropyrum pernix</i>	50	GCTACTCCGGGGTGTCTGCUCGTATCGCACTTACCCCCGGGGCCCTGCTGTGAGCGC						C 110
		150	160	170	180	190	200	210
isolate 3	108	TCTTTAACAAATGCGAAT	CCAAACTTAAATTAAAGCTGAAT		TGATTAAAGCAACTG		ATC	165
isolate 8	97	TCTTTAACAAATGCGAAT	CCAAACTTAAATTAAAGCTGAAT		TGATTAAAGCAACCGCTTTAATG			160
isolate 4	96	TCTTTAAAAAATTGGAAAA	GCTGATAATTAAATTCTT					
isolate 9	96	TCTTTAAAAAATTGGAAAA	GCTGATAATTAAATTCTT		TTAGAAGAAAATTCTAAAAAG			151
isolate 11	97	TCTTTAAAAAATTGGAAAA	GCTGATAATTAAATTCTT		TTAGAAGAAAATTCTAAAAAG			152
isolate 5	100	TCTTTAAAAAATTGGAAAA	GCTGATATTAAATTCTCGGAATG		ACAATGAAAATTGTTCTATAG			164
isolate 6	100	TCTTTAAAAAATTGGAAAA	GCTGATATTAAATTCTCGGAATG		ACAATGAAAATTGTTCTATAG			164
isolate 10	117	TCTTTAACAAATTGGAAA	GCTGATAGT AATACTAACGAAT		GTTAGTAATACAAAATCTAAAAA			180
isolate 7	124	GCTATAGCTCAGCTG	GGAGAGCGCTGCCCTGCAC		CCA GGAGCTCAGCATTTGCATCTGCTT			186
isolate 19	35	GCTATAGCTCAGCTG	GGAGAGCGCTGCCCTGCAT		TCAGAGGTCGCCTTGCATCCCGCGT			97
isolate 16	101	GAAGCCGCCGCTTC	GTTCCTTTCTTATGATATCGCT		CGAACGTAAGGATGCTCACTTGAGC			164
isolate 17	100	GAAGCCGCCGCTTC	GTTCCTTTCTTATGATATCGCT		GGAGGTAAGGATGCTCACTTGAGC			163
isolate 18	111	GAAGCCGCCGCTTC	GTTCCTTTCTTATGATATCGCT		GGAGGTAAGGATGCTCACTTGAGC			174
isolate 12	109	GTGACT	GGGTTAGGCTGTTGTA		GCTCAGCTGGTTAGAGGCGACCCCTGATA			160
isolate 13	129	CCTGGGTTACCCGAGGGCGAGATTAGGCCGAT	GCTCAGCTGGTTAGAGGCGACCCCTGATA					196
isolate 15	56	GCCT	ACCAAATTTCGTTATGCGTCGTTGTA					
isolate 14	114	TGTTTATTAGGCAATTGATTTACTAACGAAGTCTCATGATCGCTAGGTTAGAGGCOCTACACTGATA						153
isolate 1	96	GAAAATTATTGTTACCGGTTTTAGTCCGGTGTAAATT	CATCTTCAAGATGCTCTTAAACA					162
isolate 2	97	AAAATACCATCCATCAA	AACTTTTGTCCTTACGAGA		TGAAAACGGATTGTTCTTGTAAA			159
<i>Aeropyrum pernix</i>	111	GCCTCCATCCACCAACCGCG	GGCCAGCCGAGGGTCCGGGGTCCCCGTGCGGGCACAGAGCCGCCCTAGAC					179

ภาพที่ 4 - 7 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแบคทีเรียที่เรียกจากฟองน้ำทะเล

จำนวน 19 ไอโซเลต (แสดงในช่วงตำแหน่งที่ 1-380 คู่เบส) ด้วยโปรแกรม BioEdit

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง.; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับແղວที่ 1;

(*) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ค่าเลขค่านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่

เทียบเคียง

		220	230	240	250	260	270	280
isolate 3	166	AGT	AATTTATTATTGATGAGTCGTTAAATGAGATTCTGCTGAGACACTCTCAAGTGTATGGCGA	230				
isolate 8	161	AGTCGTCAGATTATTGATGCGTCGTTAAATGAGATTCTGCTGAGACACTCTCAAGTGTATGGCGA	230					
isolate 4	152	AGTT	TTCAAAAGTAAAACAATGCCGA	TAACACATTAAAGTTGTTTATTAGCGTCTACTTTAGTA	213			
isolate 9	152	AGTT	TTCAAAAGTAAAACAATGCCGA	TAACACATTAAAGTTGTTTATTAGCGTCTACTTTAGTA	213			
isolate 11	153	AGTT	TTCAAAAGTAAAACAATGCCGA	TAACACATTCACTTTATTAGCGTCTACTTTAGTA	214			
isolate 5	165	AGTT	TTCGAAAGAAAAA	ATGCCGA	TAATTCCGAAGAATTATTAGCGTCTACTTTAGTA	223		
isolate 6	165	AGTT	TTCGAAAGAAAAA	ATGCCGA	TAATTCCGAAGAATTATTAGCGTCTACTTTAGTA	223		
isolate 10	181	TCCT	TTAGTAATGCCCTTTATTTA	GAATCGTTATTAAAATTAGTATTITGACCGAATA	240			
isolate 7	187	AGCT	CCACCATCTTAAGGCATTTGGCTAAGTGTCTTAAATAGTAAACAGTAAGTCTCGATAAGAATTCTAG	250				
isolate 19	98	AGCT	CCACCATCTACACCTCTTAAGAACAGAATTACTAAACAGTAAGTCTCGATAAGAATTCTAGTT	166				
isolate 16	165	AGA	CCAGTTAGATACTGGGTCGGTAGCTCAGGGTTAG	AGGCCACGCCGTGATAAGCGTAGGTC	230			
isolate 17	164	AGA	CCAGTTAGATACTGGGTCGGTAGCTCAGGGTTAG	AGGCCACGCCGTGATAAGCGTAGGTC	229			
isolate 18	175	AGA	CCAGTTAGATACTGGGTCGGTAGCTCAGGGTTAG	AGGCCACGCCGTGATAAGCGTAGGTC	240			
isolate 12	161	AGGG	TGAGGTCGGGGTTCAAGTCCACTCAGGCCA	CCAACTTATCGGTGCT	ATAAGGTTG	221		
isolate 13	197	AGGG	TGAGGTCGGGGTTCAAGTCCACTCAGGCCA	CCAACTTATCGGTGCT	GTTTATTTA	261		
isolate 15	141	AGCT	TCTCTGCAACACGCCCTAGCTTAACGAAAATTAACTCTGATTGATTCTTTTA	AATCAAGATG	207			
isolate 14	184	ATGT	AGAGGTGGGAGTCTGAGACTACGAAATAAGTCATTTATATTGAAATAAGGAAA	252				
isolate 1	163	ATCTGGGAAATGAGAAGTCCAAGTATTCCAATGGAATAACACGTTAGAGACTTATATCTGACACTTG	232					
isolate 2	160	ACTA	GATAAAAGATAATTGATAGTCAAGAAATTACCGAGTATGCCCATTTAGGTTAAACCT	224				
<i>Aeropyrum pernix</i>	179	AGCG	CTCCCTGCCTGGGGGGCTGCCGGGGCGCCTGTAC		216			
		290	300	310	320	330	340	350
isolate 3	231	TTCAG	ACGTTTCTCTTTTATTAAAGAGGGATGGACTGAATAAGATCGTTAAAGGTAG					287
isolate 8	231	TTCAG	ACGTTTCTCTGTATTAAAGAGGGATGGACTGAATAAGATCGTTAAAGGTAGTTAAGGCAC					297
isolate 4	214	TTCAT	ATTAACCTCTGGCGAAGTTAAACACTGTCTTGAC					254
isolate 9	214	TTCAT	ATTAACCTCTGGCGAAGTTAAACACTGTCTTGAC					253
isolate 11	215	TTCAT	ATTAACCTCTGGCGAAGTTAAACACTGTCTTGACACATACACCTCAAAGTAATAACCAC	TC				283
isolate 5	224	TTA	CTTAACCTCTGGCGAAGTTA					246
isolate 6	224	TTA	CTTAACCTCT					236
isolate 10	241	CTAA	AAGAAGTTCTAACACTTATTAAAGTGTCTTGAATATTCAACTAAGCGAACGTGAAAGACG					308
isolate 7	250		CTCTTAAACAATTGGAAAGCTGACGAATA					280
isolate 19	167	TTAGT	TTTTTATAAAACATGCTCTTAAACAAATTGGAAAGCTGATAAAATTAAAGTAAACATTATTG					236
isolate 16	230	GGAGGTTCAAGT	CCTCCTCGACCCACCATCTCTTTGG	TAATGGGGCC	TTAGCTCAGCTG	290		
isolate 17	229	GGAGGTTCAAGT	CCTCCTCGACCCACCATCTCTTTGG	TAATGGGGCC	TTAGCTCAGCTG	289		
isolate 18	240	GGAGGTTCAAATTCTCTCGACCCACCATCTCTCGGAATGATGTCCTCGTGGTCTTTAGTT						308
isolate 12	221	CGCTT	TATCGATGGGGCTATAGCTCAGCTGGAGAGGCCCTGCTT	TCACGCCAGGAGGTCTG				283
isolate 13	261	TTCTCTGATAGCGTCTATGGGGCGAACAAAATGCTCGCCTGAGAAAAAATTAAACGCTAG						323
isolate 15	207	GCTTATCGAAATGGGGCTATAGCTCAGCTGGAGAGGCCCTGCTTGCACGCCAGGAGGTCTG						269
isolate 14	253	TTT	TAGAAGTTGTGCTACTGTCACAAATTCTTGGCTACGGTCAACTTTATAAGACGGGAAT					315
isolate 1	233	TCTAT	TAGGTGAATCGTTGGCTTACCGAC					261
isolate 2	225	GATGTAACAACCAATTGGTTAAGTTATGAAGGGCCACGGTGGATGCCTGGCA						279
<i>Aeropyrum pernix</i>	216							216
isolate 3	287			287				
isolate 8	297			297				
isolate 4	254			254				
isolate 9	253			253				
isolate 11	283			283				
isolate 5	246			246				
isolate 6	236			236				
isolate 10	309	TTTATCAAACC		319				
isolate 7	280			280				
isolate 19	237	TTTATTTAAATTGTTATTCAAACACT		263				
isolate 16	291	GGAGAGCGCTGATTGCAATTAGGAGGT CAG		322				
isolate 17	290	GGAGAGCGCTGATTGCAATTAGGAGGT CAG		314				
isolate 18	309	TGTCGTACTCGATTGCTTGCATCTGTGTG		340				
isolate 12	284	CG GTTCG		290				
isolate 13	324	CAAGCTTAAGGCAACAGCTACTGACTTAT		352				
isolate 15	270	CG GTTCGATCCCGTTAGCTCCACCATTT CCT		301				
isolate 14	315			315				
isolate 1	261			261				
isolate 2	279			279				
<i>Aeropyrum pernix</i>	216			216				

ภาพที่ 4 - 7 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแบคทีเรียที่เรียกจากพองนำ้

อะเดจานวน 19 ปีอโซเลต (ต่อ) ด้วยโปรแกรม BioEdit

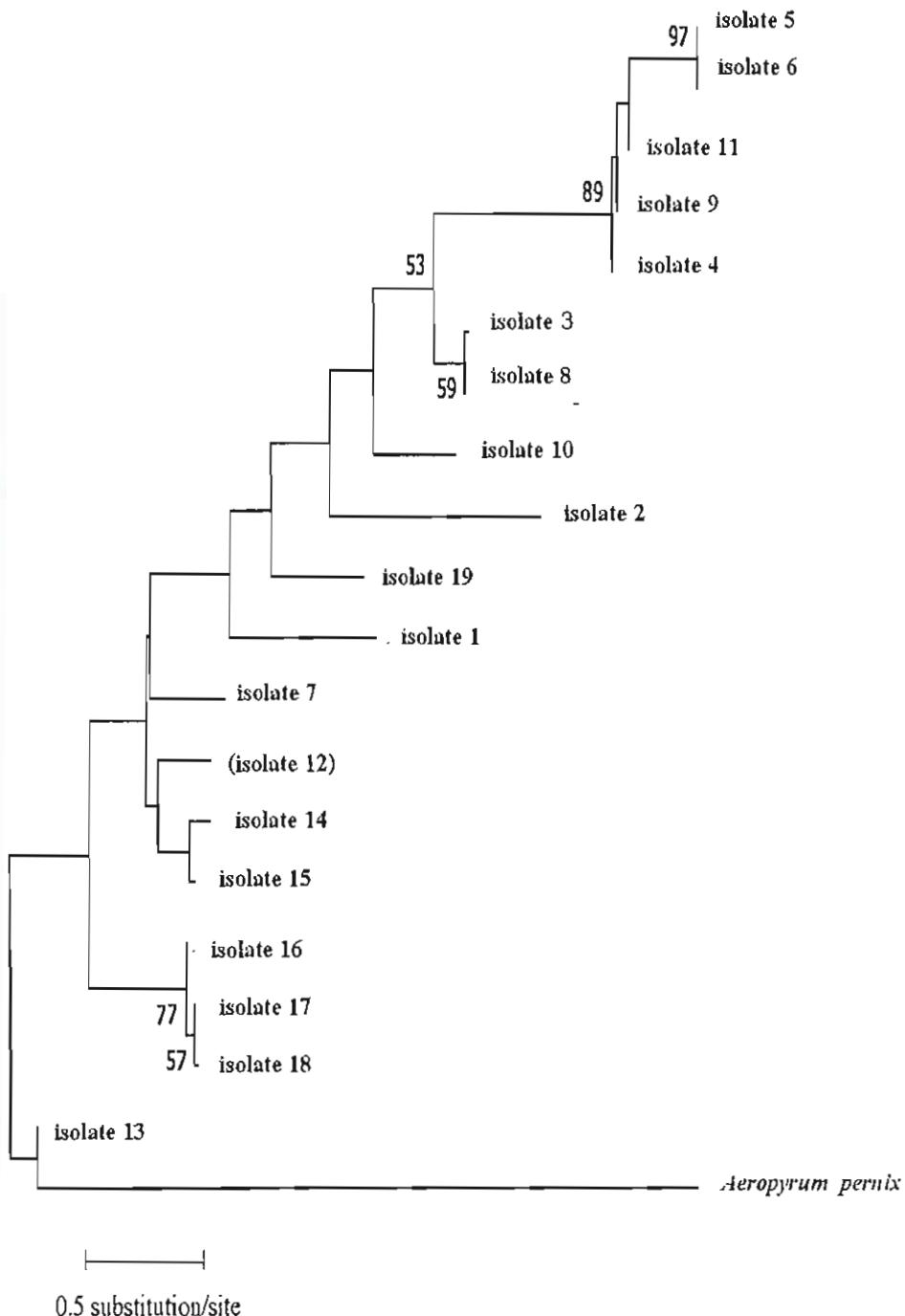
หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแถวที่ 1;

(*) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่

เทียบเคียง

ตารางที่ 4 - 7 เมตริกซ์ประเมินเชิงเทียบสำหรับพิเศษ化ของสารเคมีเพื่อใช้ในการฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการชั้นห้องแม่ 19 โภชนาค ที่อยู่ริมแม่น้ำปhog น้ำท่ามะเดื่อ

isolate (species)	12	13	7	19	16	17	18	3	8	4	9	11	5	6	10	15	14	1	2	20
isolate 12 (<i>Marinomonas</i> sp.)	ID	0.536	0.38	0.272	0.294	0.297	0.303	0.297	0.286	0.269	0.281	0.25	0.244	0.285	0.404	0.355	0.26	0.255	0.165	
isolate 13 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	0.536	ID	0.298	0.272	0.296	0.294	0.32	0.283	0.265	0.288	0.285	0.309	0.254	0.251	0.294	0.293	0.364	0.261	0.24	0.211
isolate 7 (<i>Vibrio</i> sp.)	0.38	0.298	ID	0.375	0.259	0.265	0.273	0.187	0.21	0.196	0.197	0.221	0.178	0.171	0.227	0.208	0.295	0.197	0.194	0.164
isolate 19 (<i>Teredinibacter</i> sp.)	0.272	0.272	0.375	ID	0.216	0.214	0.207	0.134	0.152	0.155	0.153	0.19	0.133	0.122	0.19	0.22	0.225	0.138	0.149	0.091
isolate 16 (<i>Mesorhizobium</i> sp.)	0.294	0.296	0.259	0.216	ID	0.975	0.812	0.228	0.256	0.218	0.218	0.222	0.212	0.206	0.287	0.221	0.297	0.26	0.225	0.146
isolate 17 (<i>Mesorhizobium</i> sp.)	0.297	0.294	0.265	0.214	0.975	ID	0.805	0.229	0.262	0.219	0.219	0.223	0.214	0.208	0.294	0.21	0.304	0.266	0.23	0.15
isolate 18 (<i>Mesorhizobium</i> sp.)	0.303	0.32	0.273	0.207	0.812	0.805	ID	0.252	0.286	0.212	0.212	0.231	0.215	0.21	0.287	0.229	0.304	0.245	0.236	0.155
isolate 3 (<i>Haliea</i> sp.)	0.297	0.283	0.187	0.134	0.228	0.229	0.252	ID	0.863	0.393	0.393	0.408	0.384	0.381	0.408	0.176	0.252	0.283	0.319	0.146
isolate 8 (<i>Haliea</i> sp.)	0.286	0.265	0.21	0.152	0.256	0.262	0.286	0.863	ID	0.37	0.37	0.403	0.359	0.352	0.408	0.196	0.27	0.291	0.32	0.141
isolate 4 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.269	0.288	0.196	0.155	0.218	0.219	0.212	0.393	0.37	ID	0.996	0.886	0.716	0.679	0.44	0.162	0.282	0.327	0.336	0.155
isolate 9 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.269	0.285	0.197	0.153	0.218	0.219	0.212	0.393	0.37	0.996	ID	0.883	0.719	0.681	0.44	0.162	0.282	0.328	0.333	0.155
isolate 11 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.281	0.309	0.221	0.19	0.222	0.223	0.231	0.408	0.403	0.886	0.883	ID	0.653	0.619	0.469	0.17	0.282	0.295	0.312	0.138
isolate 5 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.25	0.254	0.178	0.133	0.212	0.214	0.215	0.384	0.359	0.716	0.719	0.653	ID	0.959	0.425	0.173	0.241	0.353	0.313	0.18
isolate 6 (<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	0.244	0.251	0.171	0.122	0.206	0.208	0.21	0.381	0.352	0.679	0.681	0.619	0.959	ID	0.413	0.17	0.232	0.35	0.31	0.187
isolate 10 (<i>Shewanella</i> sp.)	0.285	0.294	0.227	0.19	0.287	0.294	0.287	0.408	0.408	0.44	0.44	0.469	0.425	0.413	ID	0.212	0.266	0.281	0.312	0.171
isolate 15 (<i>Dokdonia</i> sp.)	0.404	0.293	0.208	0.22	0.221	0.21	0.229	0.176	0.196	0.162	0.162	0.17	0.173	0.17	0.212	ID	0.225	0.182	0.202	0.145
isolate 14 (<i>Dokdonia</i> sp.)	0.355	0.364	0.295	0.225	0.297	0.304	0.304	0.252	0.27	0.282	0.282	0.241	0.232	0.266	0.225	ID	0.311	0.263	0.19	
isolate 1 (<i>Alcanivorax</i> sp.)	0.26	0.261	0.197	0.138	0.26	0.266	0.245	0.283	0.291	0.327	0.328	0.295	0.353	0.35	0.281	0.182	0.311	ID	0.354	0.178
isolate 2 (<i>Bacillus</i> sp.)	0.255	0.24	0.194	0.149	0.225	0.23	0.236	0.319	0.32	0.336	0.333	0.312	0.313	0.31	0.202	0.263	0.354	ID	0.186	
20 (<i>Aeropyrum pernix</i>)	0.165	0.211	0.164	0.091	0.146	0.15	0.155	0.146	0.141	0.155	0.138	0.18	0.187	0.171	0.145	0.19	0.178	0.186	ID	

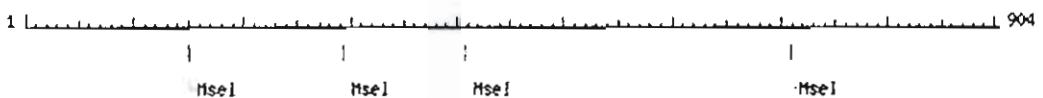


ภาพที่ 4 - 8 เด่น ໂຄຣແກຣມຄວາມສັນພັນຮ່າງຂອ້ມູນລຳດັບນິວຄລືໄອໄທດົບຮົວເຜີມ ITS ຂອງແບກທີ່ເຮັບ
ທີ່ອູ່ຮ່ວມກັບພອງນໍ້າທະເລທັ້ງ 19 ໄອໂໂເລຕ ແລະ ລຳດັບນິວຄລືໄອໄທດົກຈາກ
ຖານຂໍ້ອ້ມູນ GenBank 11 ຊນຶດ ແລະ Archaea : *Aeropyrum pernix* (ຮັສຫມາຍເລຂ
AB078022) ດ້ວຍໂປຣແກຣມ MEGA 4.

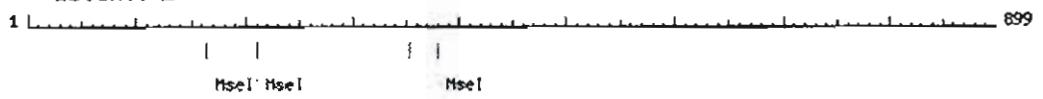
4.7 การจำลองลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผลผลิต PCR บริเวณยืน 16 – 23S rRNA

การจำลองรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำเพาะของแบคทีเรียทำโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยโปรแกรม NEB cutter V. 2.0 คัดเลือกเอนไซม์มา 1 ชนิดที่มีตำแหน่งบริเวณจุดจำที่สามารถตัดดีเอ็นเอแล้วได้ชิ้นย่อยเมื่อแยกบนเจลอะกราฟและเกิดเป็นรูปแบบที่จำเพาะของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต คือเอนไซม์ *MseI* ซึ่งมีบริเวณจุด 5'-TTAA-3' โดยแผนที่ตำแหน่งการตัดบนผลผลิต PCR ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตแสดงในภาพที่ 4 - 9 และแสดงรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำลองในภาพที่ 4 - 10 A1, B1

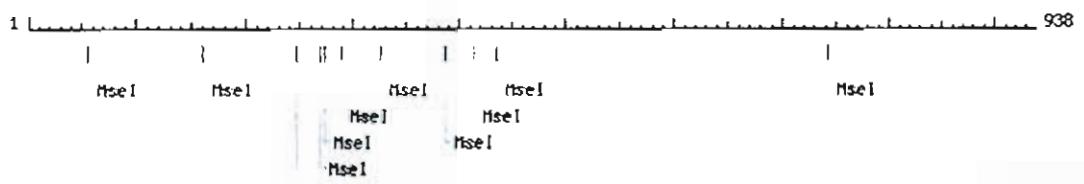
Isolate 1



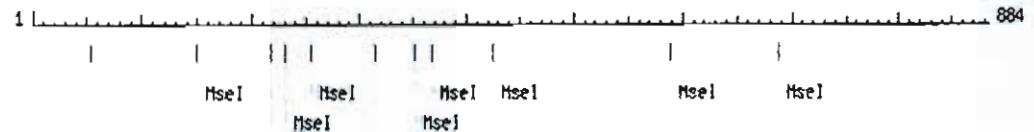
Isolate 2



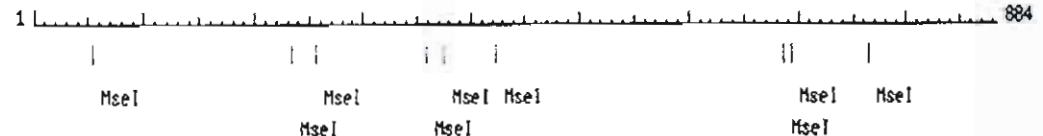
Isolate 3



Isolate 4



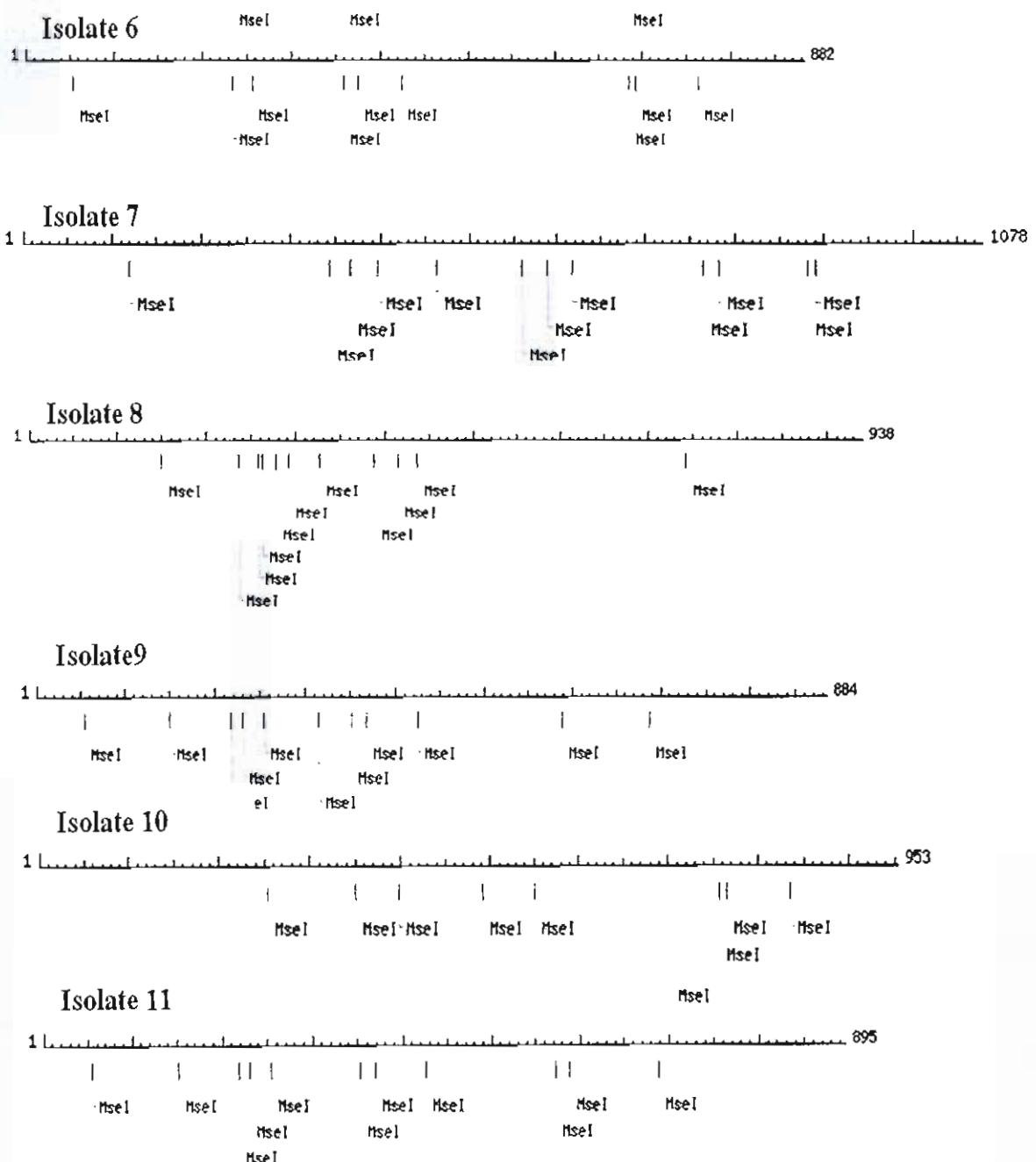
Isolate 5



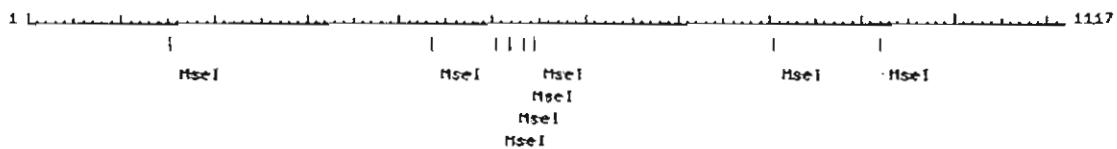
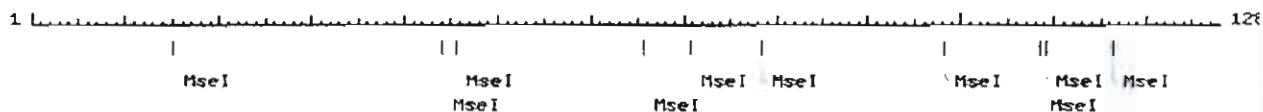
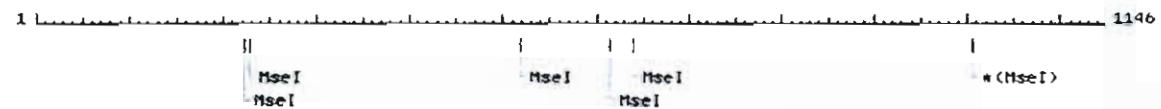
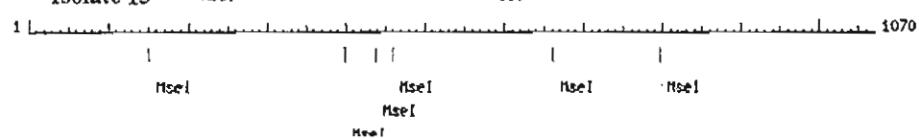
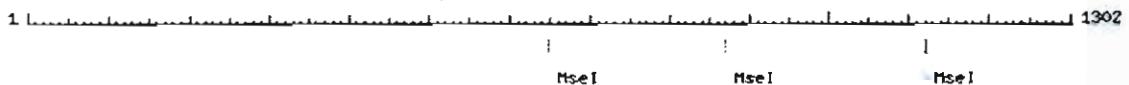
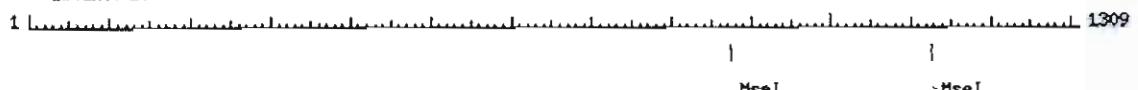
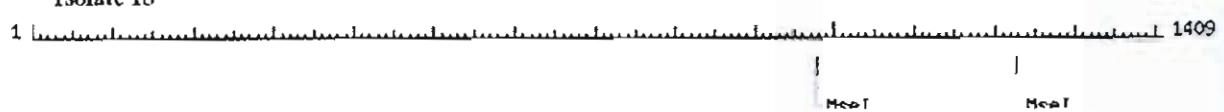
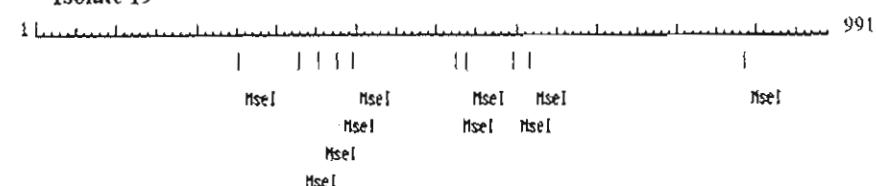
ภาพที่ 4 - 9 แผนที่แสดงตำแหน่งการตัดผลผลิต PCR บริเวณยืน 16 – 23S rRNA ด้วยเอนไซม์ตัด

จำเพาะ *MseI* โดยใช้โปรแกรม NEB cutter V. 2.0

หมายเหตุ ตัวเลขแสดงจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4 - 9 แผนที่แสดงตำแหน่งการตัดผลผลิต PCR (ด้วย)

Isolate 12**Isolate 13****Isolate 14****Isolate 15****Isolate 16****Isolate 17****Isolate 18****Isolate 19**

ภาพที่ 4 - 9 แผนที่แสดงตำแหน่งการตัดผลผลิต PCR (ต่อ)

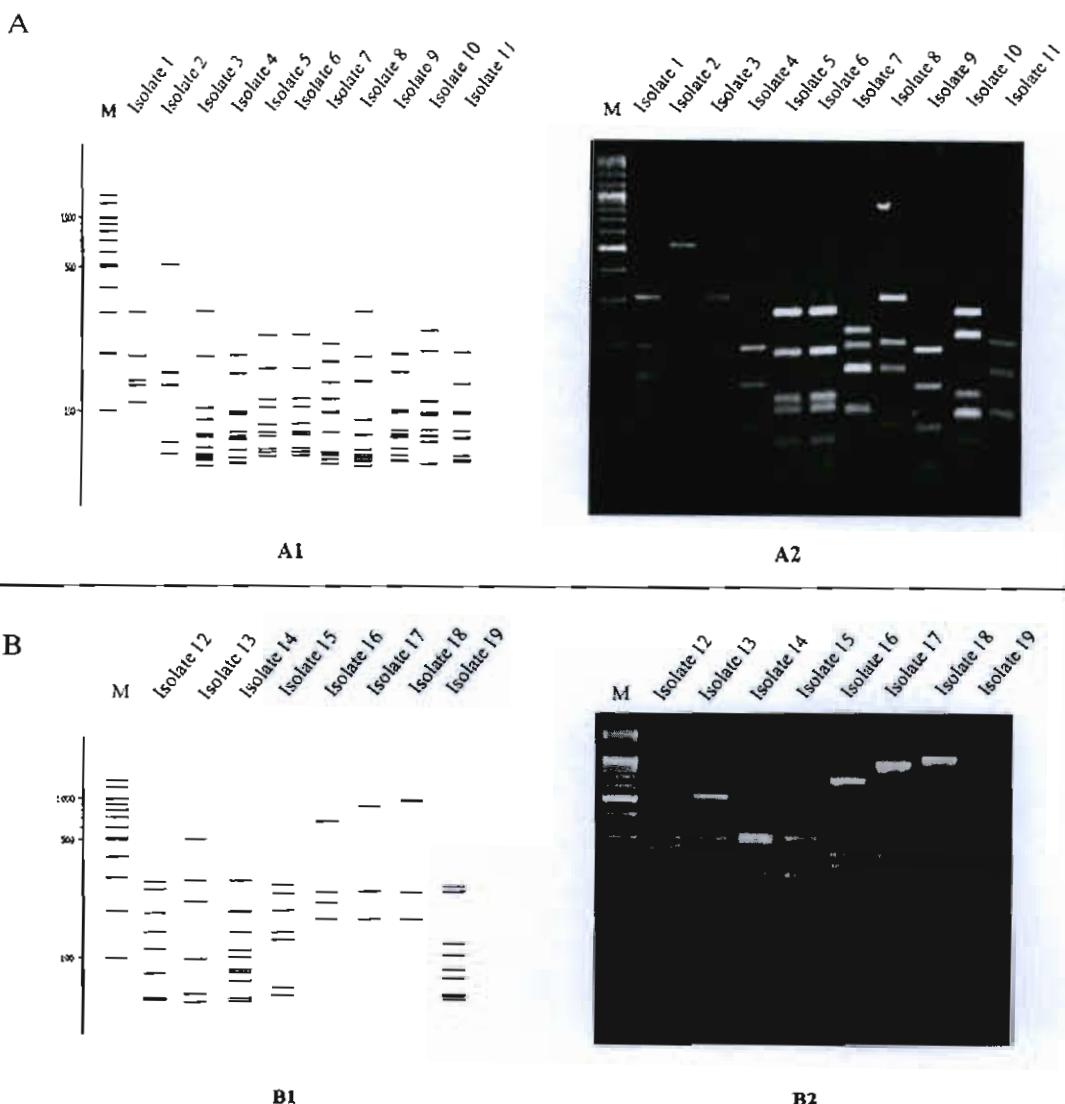
ภายหลังสร้างรูปแบบจำลอง (ภาพที่ 4-10 A1, B1) ทำการทดสอบการตัดผลผลิต PCR ในช่วงของยีน *16S rRNA- 23S rRNA* (รวมบริเวณ ITS) ด้วยเรสทริกชันแอนไซม์ริงในห้องปฏิบัติการ แล้ววิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ปรากฏว่าทุกไอโซเลตปราศรูปแบบลายพิมพ์คืออีนเอที่ตรงกันกับที่จำลองโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ แต่อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนของดีอีนเองจะแสดงออกต่ำกว่า 100 คูเบส ไม่สามารถระบุขนาดที่ถูกต้องได้เนื่องจากข้อจำกัดของ % agarose ที่ใช้สำหรับแยกชิ้นส่วนดีอีนเอที่มีความเข้มข้นมาก (3 %) และใช้เวลาสั้นในการทำอีเล็ก tro ไฟฟ์ซีส

ผลการวิเคราะห์จากการตัดผลผลิต PCR ของแบคทีเรียที่บ่งชี้ชนิดเดียวด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ *16S rRNA* ทั้ง 19 ไอโซเลต ปราศรูปแบบลายพิมพ์จำนวน 16 แบบ แต่ละแบบมีขนาดของชิ้นดีอีนเอแตกต่างกัน (ตารางที่ 4 – 7) และพบว่าแบคทีเรียที่จัดไว้ในสกุลเดียวกันมีรูปแบบลายพิมพ์คืออีนเอแตกต่างกันสอดคล้องกับผลการศึกษาในบริเวณ ITS มากกว่าจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *16S rRNA* เช่น *Pseudoalteromonas* sp. (isolate 4, 5, 6, 9 และ 11) จากการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ *16S rRNA* แยก *Pseudoalteromonas* sp. ออกเป็น 2 กลุ่ม (4, 9, 6, 5, 11) ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณ ITS จำแนกออกเป็น 4 กลุ่ม (5, 6, 11, 9, 4) และการศึกษลายพิมพ์คืออีนเอ *16S rRNA- 23S rRNA* ปราศรูปแบบ ได้แก่ A (5, 6), B (4, 9) และ C (11) นอกจากนี้สกุล *Dokdonia* sp. (isolate 14 และ 15) ข้อมูล *16S rRNA* ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ 2 ไอโซเลตออกจากกันได้ แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS จำแนกถึงความแตกต่างได้ เช่นเดียวกับลายพิมพ์คืออีนเอที่ปราศรูปแบบ คือ E, F และสกุล *Mesorhizobium* sp. (isolate 16, 17 และ 18) ซึ่งข้อมูลของยีน *16S rRNA* แยกความแตกต่างไม่ได้แต่ปราศรูปความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS เช่นเดียวกับลายพิมพ์คืออีนเอที่มี 3 รูปแบบเอกลักษณ์ คือ G, F และ I ในขณะที่แบคทีเรียสกุลอื่น ๆ ที่นำมาศึกษาระดับนี้เพียงสกุลละ 1 ไอโซเลต จะพบรูปแบบคืออีนเอที่แตกต่างกันไปในแต่ละสกุล (ภาพที่ 4-10, 4-11)

ตารางที่ 4 - 8 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอบริเวณยีน *16S rRNA- 23S rRNA* ภายหลังตัดด้วย酵んไซม์ตัด
จำพวก *MseI* ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต

species/isolate	isolate	Size of PCR product digested with <i>MseI</i>
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	4	195, 163, 100, (96, 67, 61, 57, 55, 37, 24, 16, 13)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	5	262, 180, 119, 103 (71, 55, 49, 22, 16, 7)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	6	262, 180, 119, 103 (71, 55, 49, 22, 16, 7)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	9	195, 163, 100, (96, 67, 61, 57, 55, 37, 24, 16, 13)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	11	205, 146, 100 (98, 96, 67, 57, 56, 24, 17, 16, 13)
<i>Haliea</i> sp.	3	306, 195, 151, 106 (86, 61, 56, 38, 21, 22, 21, 15, 5)
<i>Haliea</i> sp.	8	306, 195, 151, 106 (86, 61, 35, 27, 22, 21, 15, 14, 5)
<i>Dokdonia</i> sp.	14	289, 200, 199, 152, 116, 102 (76, 71, 52, 15, 8)
<i>Dokdonia</i> sp.	15	273, 248, 201, 152, 136 (39, 21)
<i>Mesorhizobium</i> sp.	16	649, 250, 222, 181, 122 (69)
<i>Mesorhizobium</i> sp.	17	873, 250, 181, 152 122 (69)
<i>Mesorhizobium</i> sp.	18	978, 250, 181, 152, 122 (69)
<i>Alcanivorax</i> sp.	1	302, 194, 151, 143, 144
<i>Bacillus</i> sp.	2	518, 165, 143 (46, 27)
<i>Vibrio</i> sp.	7	222, 187, 148, 121, 100 (98, 65, 31, 29, 28, 24, 17, 8)
<i>Shewanella</i> sp.	10	254, 207, 118 (97, 94, 69, 58, 48, 8)
<i>Marinomonas</i> sp.	12	283, 258, 195, 152, 118 (69, 16, 15, 11)
<i>Pseudomonas</i> sp.	13	500, 368, 289, 223, 139 (97, 27, 7)
<i>Teredinibacter</i> sp.	19	253, 128, 106 (76, 58, 24, 23, 21, 20, 14)

หมายเหตุ () คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณของโปรแกรม NEB cutter และเป็นชิ้นส่วน
ดีเอ็นเอที่ไม่สามารถระบุขนาดได้ (น้อยกว่า 100 bp) ด้วยวิธีอะก้าโรส
เจลオリเด็กไตร โพลิชิส



ภาพที่ 4-10 รูปแบบคีเอ็นเอภายในริเวณยีน $16 - 23S$ rRNA หลังตัดด้วยเอนไซม์ $MseI$ ของแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลต

A = รูปแบบคีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลตที่ 1-11 ตัดด้วยเอนไซม์ $MseI$, A1 = รูปแบบคีเอ็นเอจำลองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ A2 = รูปแบบคีเอ็นเอบนเจลอะการาส 3 % agarose gel

B = รูปแบบคีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลตที่ 12 - 19 ตัดด้วยเอนไซม์ $MseI$, B1 = รูปแบบคีเอ็นเอจำลองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ B2 = รูปแบบคีเอ็นเอบนเจลอะการาส 3 % ; M = 100 bp DNA Ladder

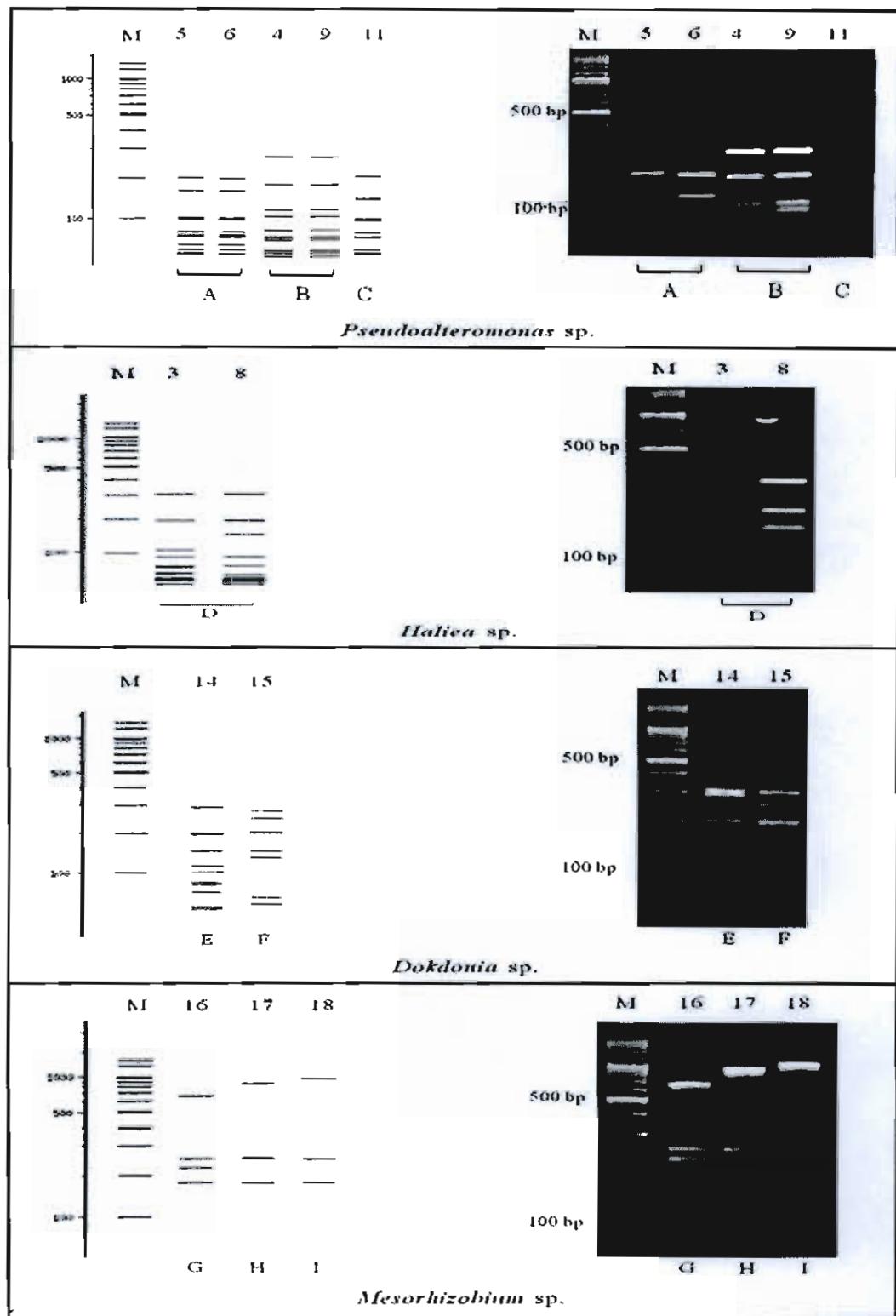
isolate 1 = *Alcanivorax* sp. isolate 2 = *Bacillus* sp. isolate 3,8 = *Haliea* sp.

isolate 4, 5, 6 , 9 และ 11 = *Pseudoalteromonas* sp. isolate 7 = *Vibrio* sp.

isolate 10 = *Shewanella* sp. isolate 12 = *Marinomonas* sp.

isolate 13 = *Pseudomonas* sp. isolate 14, 15 = *Dokdonia* sp

isolate 16, 17, 18 = *Mesorhizobium* sp. isolate 19 = *Teredinibacter* sp.



ภาพที่ 4-11 รูปแบบดีเจ็นเอ (A-I) ภายหลังตัดคิวบ์เออนไซม์ *MseI* ของแบคทีเรียสกุลเดียวกัน วิเคราะห์ด้วย 3 % agarose gel electrophoresis ที่ความด่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ใน 0.5X TBE buffer ; M = 100 bp DNA Ladder

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

ขนาดของผลผลิต PCR บริเวณยีน *16S – 23S rRNA*

เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนของยีน *16S – 23S rRNA* (รวมบริเวณ ITS) ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลจำนวน 8 ชนิด ด้วยคู่ไฟรเมอร์ *16S-23S_F/R* พบว่าขนาดผลผลิต PCR มีความหลากหลายตั้งแต่ 800-1,400 คู่เบส (ภาพที่ 4-1) สอดคล้องกับรายงานของ Jeng et al. (2001) ที่พบว่าไฟรเมอร์ *16-23S_F* และ *16-23S_R* มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *16S* และ *23S rRNA* ตามลำดับและลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณนี้สามารถใช้ปั่งชี้ชนิดแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต คือ *Pseudomonas fluorescens*, *P. syringae*, *Xanthomonas arboricola*, *Agrobacterium vitis*, *Erwinia amylovora* ที่ขนาดผลผลิต PCR ไม่เท่ากัน (ประมาณ 800-1,550 คู่เบส) และ Lee et al. (2002) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันนี้ ออกแบบไฟรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ Family *Vibrionaceae* ผลผลิต PCR มีขนาด 500-1,000 คู่เบส เครื่องจักรการศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S – 23S rRNA* และใช้คู่ไฟรเมอร์เดียวกันกับที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนน้อย พนเพียง การศึกษาในแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติกับแบคทีเรียอื่นที่อยู่ในสกุลเดียวกันซึ่งผลผลิต PCR มีขนาดใกล้เคียงกัน ดังเช่น Vanlooveren et al. (1999) ศึกษาแบคทีเรีย *Neisseria gonorrhoeae* จำนวน 105 สายพันธุ์ และ *N. gonorrhoeae* ที่แยกจากช่องคลอดของผู้ป่วยเพศหญิงในเมือง Banduag ประเทศอินโดนีเซีย โดยใช้คู่ไฟรเมอร์ *16-23S_F/R* พบว่าผลผลิต PCR มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส

การบ่งชี้แบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA*

โดยทั่วไปในแหล่งธรรมชาติฟองน้ำทะเล 1 ชนิด มักพบว่าแบคทีเรียอาศัยอยู่ร่วมด้วย หลากหลายชนิด/สายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้นำแบคทีเรียหลายไอโซเลตที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลชนิดเดียวกันมาศึกษาพบว่าผลผลิต PCR ระหว่างยีน *16S – 23S rRNA* มีขนาดแตกต่างกัน เมื่อทำการบ่งชี้ชนิดด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ส่วนของยีน *16S rRNA* (ขนาดประมาณ 140 คู่เบส) พบว่าส่วนใหญ่เทียบเคียงได้ความเหมือนมากกว่า 97% แต่สามารถระบุแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตได้ในระดับสกุล (Genus) ในขณะที่การศึกษาในบริเวณยีน

16S rRNA ของแบคทีเรียบาง ไอโซเลตที่ศึกษาด้วยความバラลำดับนิวคลีโอไทด์ ประมาณ 1,500 คู่เบส สามารถระบุแบคทีเรียในระดับสกุลหรือชนิด การศึกษาในครั้งนี้แบคทีเรียแต่ละ ไอโซเลตที่แยกมาจากฟองน้ำทะเล *M. unguiculata* ซึ่งมีแบคทีเรียนำมาศึกษามากที่สุดจำนวน 5 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกได้ 3 สกุล คือ *Haliea* sp., *Vibrio* sp. และ *Pseudoalteromonas* sp. เป็นที่น่าสังเกตว่า *Pseudoalteromonas* sp. นอกจากพบจำนวน ไอโซเลตได้มากที่สุดในฟองน้ำชนิดนี้แล้ว (3 ไอโซเลต) ยังพบได้ในฟองน้ำทะเล *M. grandis* และ *X. testudinaria* อีกด้วย

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ในส่วนของยีน *16S rRNA* พบความหลากหลายระดับชนิดของ *Pseudoalteromonas* spp. ทั้งที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *M. unguiculata* โดยจัดแยกไว้ 2 กลุ่ม ซึ่งคาดว่าต่างชนิดกันยืนยันได้จากเด่นโครงสร้างที่สร้างมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบเคียงกัน (ภาพที่ 4-4) ในฟองน้ำทะเล *L. herbacea* แบคทีเรียที่นำมาระบุมีจำนวน 4 ไอโซเลต เมื่อใช้ข้อมูลจากบริเวณยีน *16S rRNA* สามารถจัดจำแนกได้ 3 สกุล ซึ่ง 2 สกุล มีความเหมือนสูงสุดที่ 98 และ 99% กับ *Dokdonia* sp. และ *Marinomonas* sp. ตามลำดับ แต่ 1 สกุลคือ ไอโซเลตที่ 13 มีความเหมือนกับลำดับเบสของ *Pseudomonas* sp. ที่ระดับ 84 % เท่านั้น (ตารางที่ 4-2) แสดงว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. นี้มีความหลากหลายของชนิด/สายพันธุ์มาก แต่จำนวนข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียศักยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลชนิดที่ศึกษา (ไอโซเลตที่ 13) ยังไม่ปรากฏบนฐานข้อมูล GenBank เปอร์เซ็นต์เทียบเคียงได้จึงน้อย หรืออาจเกิดจากการบ่งชี้ชนิดด้วย *16S rRNA* ที่ใช้เทียบเคียงประมาณ 140 คู่เบส เพียงอย่างเดียวไม่สามารถระบุในระดับที่สูงกว่าสกุล ได้ เหตุผลน่าจะเป็นในทำนองเดียวกับ ไอโซเลตที่ 7 ที่บ่งชี้ได้เป็น *Vibrio* sp. ซึ่งบริเวณ *16S rRNA* เทียบเคียงกับ GenBank มีความเหมือนที่ระดับ 89% เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *16S rRNA* ถูกนำมาใช้บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียจำนวนมาก ดังรายงานการศึกษาของ Boyer et al. (2002) ที่ศึกษาในส่วนของยีน *16S rRNA* ของไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Microcoleus* พบว่าลำดับเบสของยีน *16S rRNA* สามารถบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียได้ตรงกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งระบุได้เป็น *Microcoleus* จำนวน 2 สายพันธุ์ และผลการเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลมีความเหมือนกับ *M. steenstrupii* ที่ 99.4% และ *M. vaginatus* ที่ 99.9% เป็นที่น่าสังเกตว่าข้อมูลในส่วนของยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดนั้นมีความเหมือนกันมาก การศึกษาของ Hentschel et al. (2001) ทำการศึกษาแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* สามารถระบุได้ในระดับสกุล เช่น กับคือ แบคทีเรีย *Bacillus* sp., *Arhobacter* sp., *Micrococcus* sp. และ *Vibrio* sp. ที่แยกออกจากฟองน้ำทะเล *Aplysina aerophoba* และ *A. cavernicola*

23S rRNA

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเทียบเคียงในส่วนของยีน 23S rRNA ร่วมกับ 16S rRNA ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันผลของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับพองน้ำทะเลกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏบนฐานข้อมูล GenBank พบร่องน้ำดูของยีน 23S rRNA ที่นำมาใช้เทียบเคียงของแบคทีเรียแต่ละ ไอโซเลตจะใกล้เคียงกัน โดยผลการเทียบเคียงระบุได้ในระดับสกุลเช่นเดียวกับในส่วนของยีน 16S rRNA ซึ่งระบุได้ตรงกันเป็นส่วนใหญ่ มีเพียงไอโซเลตที่ 14 และ 15 เมื่อเทียบเคียงด้วยส่วนของยีน 16S rRNA สามารถระบุได้เป็น *Dokdonia* sp. แต่เมื่อเทียบเคียงด้วยยีน 23S rRNA ไม่สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้ (uncultured bacterium) เช่นเดียวกับไอโซเลตที่ 16, 17 และ 18 เมื่อเทียบเคียงด้วยยีน 16S rRNA สามารถระบุได้เป็น *Mesorhizobium* sp. แต่ใช้ยีน 23S rRNA พบร่องไม่สามารถระบุได้ (unknown marine alpha proteobacterium) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 19 ไอโซเลต กับฐานข้อมูล GenBank มีค่าที่ระดับ 87 - 94% (ตารางที่ 4-3) ซึ่งต่ำกว่าการเทียบเคียงด้วยยีน 16S rRNA ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการข้อมูลการศึกษาแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับพองน้ำทะเลในส่วนของยีน 23S rRNA มีเป็นจำนวนน้อยและลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันเช่น มากแม้จะเป็นแบคทีเรียต่างสกุลกันเช่น ไอโซเลต 4 บ่งชี้ได้เป็น *Pseudoalteromonas* sp. กับไอโซเลต 12 บ่งชี้เป็น *Marinomonas* sp. ลำดับเบสมีความเหมือนเท่ากับ 81 % (ตารางที่ 4-5) จึงทำให้การขัดจําแนกด้วยข้อมูลของยีน 23S rRNA อาจมีความคลาดเคลื่อนได้มากกว่าการบ่งชี้ด้วย 16S rRNA จึงทำให้การใช้ยีน 23S rRNA เพื่อระบุชนิดไม่เป็นที่นิยม แต่ยีน 23S rRNA สามารถนำมาใช้ระบุแบคทีเรียในระดับสกุลได้บางไอโซเลตและใช้ได้ในกรณีที่ไม่สามารถระบุชนิดด้วยยีน 16S rRNA แต่เพียงอย่างเดียว ส่วนใหญ่มักพบรายงานการศึกษา การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียด้วยลำดับเบสของยีน 23S rRNA ใช้ควบคู่กับยีน 16S rRNA ดังเช่นรายงานการศึกษาของ Webster et al. (2004) ที่ศึกษาริเวณยีน 16S rRNA - 23S rRNA กับแบคทีเรียที่แยกออกจากพองน้ำทะเล *Rhopaloeides odorabile* พบร่องถ้าเทียบเคียงเฉพาะในส่วนของยีน 16S rRNA ไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียบางสายพันธุ์ในคิวชัน α-proteobacteria และ Actinobacteria ได้ชัดเจน เนื่องจากในบริเวณยีน 16S rRNA มีจำนวนเบส G+C น้อย จึงต้องใช้บริเวณยีน 23S rRNA ซึ่งมีเบส G+C มาก ทำให้ยืนยันผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้ชัดเจน บริเวณยีน 23S rRNA ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับพองน้ำทะเลที่ศึกษาในครั้งนี้พบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนท้ายของ 23S rRNA ที่เพิ่มจำนวนได้ทุกไอโซเลตมีลำดับเบสที่คล้ายกัน (ภาพที่ 4-5 ต่อ; ภายในการอบเครื่องหมาย □) ซึ่งเป็นบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ ลำดับเบสบริเวณนี้เป็นประโยชน์ในการเลือกใช้ไพรเมอร์สากลที่แบคทีเรียหลากหลายชนิดสามารถเพิ่มจำนวนผลผลิต PCR ได้ด้วยคู่ไพรเมอร์เดียวกันเช่นเดียวกับที่ทำการศึกษาในครั้งนี้

ITS (internal transcribed spacer)

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะบริเวณ ITS ของแบคทีเรียทุกไオโซเลตพบว่าไม่สามารถเทียบเคียงได้กับฐานข้อมูล GenBank เนื่องจากข้อมูลที่ได้ในครั้งนี้เป็นข้อมูลใหม่บริเวณ ITS ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่จัดไว้ต่างสกุล (ตามข้อมูล 16S rRNA) นั้น พบว่ามีขนาดไม่เท่ากัน (236 – 352 คู่เบส) แต่ในสกุลเดียวกันพบว่ามีขนาดใกล้เคียงกัน เช่น *Pseudoalteromonas* sp. ไอโซเลตที่ 4, 5, 6, 9 และ 11 มีขนาด 254, 246, 236, 253 และ 283 คู่เบส ตามลำดับ *Haliea* sp. ไอโซเลตที่ 3 และ 18 มีขนาด 287 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ *Dokdonia* sp. ไอโซเลตที่ 14 และ 15 มีขนาด 315 และ 301 คู่เบส ตามลำดับ และ *Mesorhizobium* sp. ไอโซเลตที่ 16, 17 และ 18 มีขนาด 322, 314 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ สอดคล้องกับ Daffonchio et al. (2003) ทำการศึกษาแบคทีเรีย *Bacillus anthracis* ของ Institut Pasteur-Paris (IPP) จำนวน 6 สายพันธุ์ (รหัส 300, 376, 779, 832, 170, และ 663) ที่บริเวณ ITS มีขนาด 250 คู่เบส แต่การศึกษาในครั้งนี้พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ศึกษาเพียง 1 ไอโซเลตมีขนาด 279 คู่เบส (ตารางที่ 4-4) และรายงานการศึกษาของ Mohamed et al. (2005) ที่ศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียสกุล *Mycobacterium* พบว่าบริเวณ ITS มีขนาดใกล้เคียงกันประมาณ 255 - 360 คู่เบส นอกจากนี้ยังพบรายงานการศึกษาลำดับเบสบริเวณ ITS ของไซยาโนแบคทีเรียในทะเล Mediterranean, South Pacific, Gulf Stream, Equatorial Pacific และทะเล Sargasso พบว่าในสกุล *Prochlorococcus* sp. จำนวน 32 สายพันธุ์บริเวณ ITS มีขนาดใกล้เคียงกัน คือตั้งแต่ 537-548 คู่เบส และ *Synechococcus* sp. จำนวน 25 สายพันธุ์ บริเวณ ITS มีขนาดตั้งแต่ 747-810 คู่เบส (Rocap et al., 2002) ดังนั้นขนาดของบริเวณ ITS น่าจะเป็นเอกลักษณ์ในระดับชนิด

บริเวณ ITS ของแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุลเดียวกันมีลำดับเบสค่อนข้างคล้ายกัน (ภาพที่ 4-7) แต่พนความแปรปรวน (ความแตกต่าง) เมื่อเปรียบเทียบต่างสกุลมากกว่าลำดับเบสของยีน 16S rRNA เช่นสกุล *Pseudoalteromonas* sp. ผลการวิเคราะห์โดยโปรแกรมจัด秩 4 กลุ่ม ตามลำดับเบสของบริเวณ ITS (4, 9, 11 และ 6) ไอโซเลต 4 และ 9 มีลำดับเบสเหมือนกัน 99.6% , ไอโซเลต 4 และ 11 มีลำดับเบสเหมือนกัน 88.6 %, ไอโซเลต 9 และ 6 มีลำดับเบสเหมือนกัน 68%, ไอโซเลต 11 และ 6 มีลำดับเบสเหมือนกัน 61.9% ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA จำแนกได้เพียง 2 กลุ่ม (4, 9, 6 และ 5, 11) ไอโซเลต 4 และ 9 มีลำดับเบสเหมือนกัน 99.6% , ไอโซเลต 9 และ 6 มีลำดับเบสเหมือนกัน 100% และไอโซเลต 5 และ 11 มีลำดับเบสเหมือนกัน 99.2% (ตารางที่ 4-3) และแบคทีเรีย *Mesorhizobium* sp. ทั้งไอโซเลตที่ 16, 17 และ 18 ที่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้จาก 16S rRNA มีลำดับเบสเหมือนกัน 100 % สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือข้อมูล ITS (16 และ 17, 18) ไอโซเลต 16 และ 17 มีลำดับเบสเหมือนกัน 97.5%, ไอโซเลต 17 และ 18 มีลำดับเบสเหมือนกัน 80% และไอโซเลต 18 และ 16 มีลำดับเบสเหมือนกัน 81.2%

จะเห็นได้ว่าบริเวณ ITS ของแบคทีเรียภายในสกุลเดียวกันมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสต่ำ (ลำดับเบสระหว่างไอโซเลตมีความแตกต่างกัน) จึงควรพิจารณาคุณสมบัติทางชีวเคมี ลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง และลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียประกอบด้วยเพื่อจัดจำแนกในระดับย่อยกว่าระดับสกุลและยืนยันความถูกต้องได้

การวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล (DNA fingerprint)

จากการจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกเพียงอย่างเดียวมักยืนยันผลได้ไม่ชัดเจน เทคนิค PCR เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ศึกษาร่วมด้วยซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยเฉพาะที่กล่าวมาคือ ข้อมูลในส่วนของยีน *16S rRNA* และ ITS เมื่อศึกษาร่วมกันจะสามารถจัดจำแนกและระบุชนิดได้ถูกต้องยิ่งขึ้น แต่ทั้งนั้นพบว่าการอ่านลำดับเบสยังคงสืบสานไปในปริมาณและระยะเวลา ดังนั้ntechnic PCR-RFLP จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยการหาความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR แล้วดัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้ววิเคราะห์ผ่านเจลอะกอโรสซีนในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในช่วงบริเวณยีน *16S-23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในเบื้องต้นพบว่า เออนไซม์ *MseI* มีความเหมาะสมมากกว่าเออนไซม์อื่น ๆ คือ แบคทีเรียแต่ละสกุลแสดงความแตกต่างกันจำนวน 16 แบบ (ภาพที่ 4-9) สอดคล้องกับผลการบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* ในระดับสกุลเป็นส่วนใหญ่ แต่บางสกุลลายพิมพ์ดีเอ็นเอแสดงความแตกต่างได้มากกว่า เช่น *Dokdonia* sp. ที่พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอปรากฏ 2 รูปแบบ คือ E (isolate 14) และ F (isolate 15) ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง 2 ไอโซเลตนี้ได้ (ภาพที่ 4-11) และ *Mesorhizobium* sp. (isolate 16, 17, 18) ปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันจำนวน 3 รูปแบบ คือ G, H และ I ในขณะที่ข้อมูล *16S rRNA* ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของจากกันได้ (ภาพที่ 4-11)

แบคทีเรียบางสกุลมีความหลากหลายของชนิดมากจึงพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันขณะเดียวกันถ้าไม่พบความแตกต่างภายในสกุลเดียวกันควรพิจารณาใช้อ่อนไซม์มากกว่า 1 ชนิด เพื่อยืนยันผลการทดลอง ดังเช่นในการศึกษาครั้งนี้พบว่า *Hallea* sp. จำนวน 2 ไอโซเลต (isolate 3 และ 8) มีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันคือ แบบ D (แทนดีเอ็นเอขนาด 306, 195, 151 และ 106 คู่เบส (ตารางที่ 4-5) ซึ่งมีลำดับเบสที่เหมือนกันในส่วนของยีน *16S rRNA* แต่พบว่าลำดับเบสในส่วนของ *23S rRNA* และบริเวณ ITS มีความแตกต่างกัน และพบตำแหน่งตัดของ *MseI* ตรงกัน

(ภาพที่ 4-9) จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของ 2 ไอโซเลตนี้ได้ แต่ถ้ามีการใช้อ่อนไชเมซันดิอื่น ๆ เช่น *BpuCI* และ *Sau3AI* (ไม่ได้แสดงผลการวินิจฉัย) คัดผลผลิต PCR ร่วมด้วยจะสามารถแยกความแตกต่างได้ ดังเช่นรายงานการศึกษาของ Ruiz et al. (2000) ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในบริเวณ *16S-23S rRNA ITS* ของแบคทีเรีย *Gluconobacter oxydans* โดยศึกษาจำนวน 4 สายพันธุ์ เลือกตัดผลผลิต PCR ด้วยอ่อนไชเมซ์ *TaqI*, *RseI* และ *MspI* พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน แต่เมื่อตัดด้วยอ่อนไชเมซ์ตัดจำเพาะ *AluI* แสดงความแตกต่างของ 4 สายพันธุ์นี้ได้ การบ่งชี้ชนิดจากเอกลักษณ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยไม่ผ่านการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์จะไม่สื้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากนักเมื่อเทียบกับการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่ควรมีจำนวนตัวอย่างของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลขึ้นมากจึงเพื่อยืนยันผลและนำไปประยุกต์ใช้งาน

จะเห็นว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละสกุลเหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและใช้บ่งชี้สกุลของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลในเบื้องต้น ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงของยีน *16S rRNA-23S rRNA* พบว่ามีความเป็นเอกลักษณ์สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับจำแนกแบคทีเรียในระดับที่ลึกกว่าสกุล ได้ ข้อความของพันธุกรรมที่ศึกษาในครั้งนี้เป็นข้อมูลใหม่ที่ยังไม่ปรากฏบนฐานข้อมูล GenBank ดังนั้นภายนอกการศึกษามี่อนนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บันทึกไว้บนฐานข้อมูล จะเป็นประโยชน์ใช้เทียบเคียงเพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียต่อไปได้ อีกทั้งใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนสำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลด้วยวิธีอื่น ๆ ได้อย่างดียิ่ง นอกจากนี้จากลักษณะสัมฐานวิทยาและการทดสอบทางเคมีที่การจัดจำแนกหรือบ่งชี้ชนิดด้วยวิธีการดังกล่าวข้างไม่ชัดเจน

ความหลากหลายของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

การบ่งชี้แบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลในการศึกษาริ้งนี้ใช้ผลจาก การเทียบเคียงความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน *16S rRNA* พบว่าฟองน้ำทะเลที่จำแนกแบคทีเรียอาชัยอยู่ร่วมมากที่สุดคือ ฟองน้ำทะเล *M. unguiculata* ระบุได้จำนวน 3 สกุลจาก 5 ไอโซเลต ได้แก่ *Haliea* sp. (isolate 3), *Vibrio* sp. (isolate 7) และ *Pseudoalteromonas* sp. (isolate 4, 5 และ 6) ส่วนชนิดที่มีจำนวนแบคทีเรียมากของลงมาคือฟองน้ำทะเล *L. herbacea* ที่จำแนกได้จำนวน 3 สกุลจาก 4 ไอโซเลต ได้แก่ *Marinomonas* sp. (isolate 12), *Pseudomonas* sp. (isolate 13) และ *Dokdonia* sp. (isolate 14 และ 15) การศึกษาริ้งนี้พบแบคทีเรียที่อาชัยร่วมกับฟองน้ำทะเลที่จัดอยู่ในคลาส *Gammaproteobacteria* เช่น *Shewanella* sp., *Pseudoalteromonas* sp. *Marinomonas* sp. และพบว่าอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลแบบจำเพาะ ได้แก่ 1) *Pseudoalteromonas* sp. อาชัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *M. unguiculata* 2) *Dokdonia* sp. อาชัยร่วมกับฟองน้ำทะเล *L. herbacea* และ 3)

Mesorhizobium sp. อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล *O. sagittaria* จัดอยู่ในคลาส Alphaproteobacteria ซึ่งสกุลของแบคทีเรียที่ศึกษามีรายงานการนำมาใช้ประโภช์ ยกตัวอย่างเช่น *Pseudoalteromonas* sp. สามารถใช้ขับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *S. epidermidis* (Hentschel et al, 2001) *Bacillus* sp. ที่พบในฟองน้ำทะเล *Halichondria* sp. แบคทีเรียสกุลนี้บางชนิดมีคุณสมบัติสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนำไปผลิตยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคให้กับผู้ป่วยและขับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Devi et al., 2010) และ *Pseudomonas* sp. ซึ่งเป็นสกุลหนึ่งที่พบอยู่ร่วมในฟองน้ำทะเล *L. herbacea* สามารถสร้างสาร diketopiperazine และ phenazines ที่ใช้ในการขับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบหลากหลายชนิด ดังรายงานการศึกษาของ Jayatilake et al. (1996) ที่ใช้ *P.aeroginosa* ซึ่งแยกได้จากฟองน้ำทะเล *Isodictya setifera* สร้างสารออกฤทธิ์ขับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้เป็นต้น ขณะนี้หากพนวณว่าแบคทีเรียมีความสามารถนำมาใช้ประโภช์ได้ทำให้คำนับแบบริเวณ ITS มีความสำคัญต่อการบ่งชี้ชนิดที่สามารถนำมาใช้เก็บคีบและค้นหาแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตได้แม่นยำขึ้น

สรุปผลการทดลอง

1. ผลผลิต PCR บริเวณ *16S – 23S rRNA* ที่เพิ่มจำนวนด้วยคู่ไพรเมอร์ 16S-23S_F/R ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเมื่อนำมาตั้งแต่ 884 - 1,409 คู่เบส จำแนกเป็น 11 สกุล

2. ข้อความพันธุกรรมในส่วนของยีน *16S rRNA* (ประมาณ 140 คู่เบส) สามารถใช้บ่งชี้สกุลของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลในเบื้องต้นได้ โดยมีความจำเพาะในระดับสกุลมากกว่าข้อมูลในส่วนของ *23S rRNA* ที่ระบุได้เพียง 8 สกุล แต่ข้อความพันธุกรรมในส่วนของยีน *23S rRNA* มีประโภช์ช่วยยืนยันการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลได้ถูกต้องยิ่งขึ้น

3. ขนาดของ ITS ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต มีขนาดไม่เท่ากัน (236 – 352 คู่เบส) และเป็นข้อมูลใหม่ที่ยังไม่ปรากฏบนฐานข้อมูล GenBank (เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2553) โดยขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกันมากในระดับสกุล แต่ภายในสกุลเดียวกันมีขนาดใกล้เคียงกันและลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกัน

4. การจำลองลายพิมพ์ดีเอ็นเอบริเวณ *16S rRNA- 23S rRNA* และยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ชนิดคือ *MseI* พบแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 16 แบบ ที่แตกต่างกันในแต่ละสกุล และภายใต้แสงสีเขียวจะเห็นรอยแตกต่างกันด้วย

ดังนั้นจึงควรใช้อ่อนไข้มีตัดจำเพาะมากกว่า 1 ชนิด ตัดผลผลิต PCR เพื่อยืนยันผลที่ถูกต้องและใน การประยุกต์ใช้งาน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาลำดับนิวคลีโอไฮด์ในบริเวณยีน 16S rRNA ในขนาดความยาวที่สมบูรณ์มากกว่า 1,500 คู่เบส เพื่อการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลได้ถูกต้องและชัดเจน ยิ่งขึ้น
2. ควรทำการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลเด็ดขาดวิธีการอื่น ๆ เช่น ลักษณะ สัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีควบคู่กันไปด้วย
3. ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลและนำมาศึกษาให้มากขึ้น

บรรณานุกรม

จริยา ชมารินทร์, ชาญวิทย์ สีลักษณ์ และเต็มดวง ลั่น ไพบูรย์ (2540). *PCR Technology and Applications*. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, สุเมตต์ ปุจฉาการ และรวิวรรณ วัฒนดิลก. (2541). การศึกษาสารใบโไอ แยกที่ฟิล์มตาบองไอล์ต์จากแบคทีเรียทะเลที่อ้าห้องรับฟองน้ำในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ชุติญา บุญภักดี. (2544). ชีววิทยาโนเมเลกุล เอกสารประกอบการสอน 306411. ชลบุรี : ภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เชาวนี มีหวัง, วงศ์ บุญสืบสกุล, กรณิการ์ ดวงมาลย์ และสุรangs ศุธิราฐ. (2550). การใช้เทคนิค *Thin Layer Chromatography* เพื่อการจำแนก *Bacillus sp.* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ฤทธิรงค์ พรมมาศ พงษ์เทพ วีไลพันธ์ และพันธุ์พิพิช วิเศษพงษ์พันธุ์. (2543). การคัดเลือก แบคทีเรียที่ผลิตสารขับยั่งชืดชีพจากฟองน้ำทะเล. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงพร คันธ์โชคดี. (2537). อนุกรรมวิชานของแบคทีเรียและปฏิกิริยา. กรุงเทพฯ : โอดีเยนส์โตร์. บพิช จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์. (2547). สัตววิทยา (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประพันธ์ ไตรยสุทธิ์. (2551). ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางไฟโอลิเจนติก ของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุรินทร์ ปียะ โชคณาภุ. (2545). จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอ派ดีและเออเอฟ แอลพี. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุเมตต์ ปุจฉาการ. (2550). ฟองน้ำทะเล เอกไคโนเดิร์มและเพรียหัวหอม : บริเวณเกาะรามและเกาะไถลเคียง. ใน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. กรุงเทพฯ.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Molecular Biology*, 215, 403-410.

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Baere, T. D., Summerbell, R., Theelen, B., Boekhout, T., & Vanechoutte, M. (2010). Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 48-54.
- Bultel-Ponce, V., Debitus, C., Berge, J. P., Cerceau, C., & Guyot, M. (1998). Metabolites from the sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. *Micrology Biotechnology*, 6, 233-236.
- Boonsuebsakul, W., Tsuchiya, K., Suyama, K., Negishi, H., Daikohara, M., Manabe, K., Thaveechai, N., & Matsuyama, N. (2006). Preliminary study on rapid and easy differentiation of *Bacillus* species with TLC chromatograms for amino-lipid. *Journal of Agricultural Science*, 62, 112-116.
- Boyer, S. L., Johansen, J. R., & Flechtner, V. R. (2002). Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region. *Journal of Phycology*, 38, 1222-1235.
- Cannone, J. J., Subramanian, S., Schnare, M. N., Collett, J. R., D'Souza, L. M., Du, Y., Feng, B., Lin, N., Madabusi, L. V., Muller, K. M., Pande, N., Shang, Z., Yu, N., & Gutell, R. R. (2002). The Comparative RNA Web (CRW) Site: An online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics*, 3 (2).
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (1992). *Microbiology a Laboratory Manual* (3rd ed.). The Benjamin / Cummings.
- Coplin, D. L., & Kado, C. I. (2001). Laboratory guide for identificfication of plant pathogenic bacteria: *Pantoea*. *Minnesota*, 73-83.
- Daffonchio, D., Cherif, A., Brusetti, L., Rizzi, A., Mora, D., Boudabous, A., & Borin1, S. (2003). Nature of Polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Microbiology*, 9, 5128-5137.

- Devi, P., Wahidullah, S., Rodrigues, C., & Souza, L. D. (2010). The sponge- associated bacterium *Bacillus licheniformis* SAB1: a source of antimicrobial compounds. *Marine Drugs*, 8, 1203–1212.
- Ferris, J. M., Kuhl, M., Wieland, A., & Ward, M. D. (2003). Cyanobacterial ecotypes in different optical microenvironments of a 68 °C hot spring mat community revealed by 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region variation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2893-2898.
- Gernert, C., Glockner, F. O., Krohne, G., & Hentschel, U. (2005). Microbial diversity of the freshwater sponge *Spongilla lacustris*. *Microbial Ecology*, 50, 206–212.
- Gurtler, V., & Barrie, H. D. (1995). Typing of *Staphyloococcus aureus* strains by PCR amplification of variable length 16s rRNA-23s rRNA spacer regions : characterization of spacer sequences. *Microbiology*, 141, 1255-1265.
- Gurtler, V., & Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16SrRNA -23S rRNA spacer region. *Microbiology*, 142, 3-16.
- Hoffmann, M., Brown, E. W, Feng, P. C. H., Keys, C. E, Fischer, M., & Monday, S. R. (2010). PCR-based method for targeting 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among *Vibrio* species. *BMC Microbiol*, 10, 90.
- Hillis, D. M., Moritz, C., Porter, C. A., & Baker, R. J. (1991). Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science*, 251, 308-310.
- Hentschel, U., & Hacker, J. (2001). Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microbes Infect*, 3, 545–548.
- Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A. B., Wagner, M., Hacker, J., & Hacker, J. (2002). Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4431-4440.
- Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, F., Gernert, C., & Hacker, J. (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 305–312.

- Harasawa, R., Pitcher, D. G., Ramirez, A. S., & Bradbury, J. M. (2004). A putative transposase gene in the *16S–23S rRNA* intergenic spacer region of *Mycoplasma imitans*. *Microbiology*, *150*, 1023–1029.
- Jeng, R., Svircev, A., Myers, A., Beliaeva, L., Hunter, D., & Hubbes, M. (2001). The use of 16S and 16S-23S rDNA to easily detect and differentiate common Gram-negative orchard epiphytes. *Journal of Microbiological Methods*, *44*, 69-77.
- Jayatilake, G. S., Thornton, M. P., Leonard, A. C., Grimwade, J. E., & Baker, B. J. (1996). Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the National. Pro*, *59*, 293-296.
- Kefalas, E., Castritsi-Catharios, J., & Miliou, H. (2003). Bacteria associated with the sponge *Spongia officinalis* as indicators of contamination. *Ecological Indicators*, *2*, 339-343.
- Kelecom, A. (2002). Secondary metabolites from marine microorganism. *An Acad. Bras. Cien*, *74*, 151-170.
- Kim, T. K., & Fuerst, J. A. (2006). Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoceratina clavata*: culture-dependent and culture-independent approaches. *Environmental Microbiology*, *8*, 1460–1470.
- Kim, T. K., Garson, M. J., & Fuerst, J. A. (2005). Marine actinomycetes related to the “*Salinospora*” group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environmental Microbiology*, *7*, 509–518.
- Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Cotter, P. D., Walsh, M., Mooij, M. J., Bourke, M. B., Rea, M. C., Connor, P. M., Ross, R. P., Hill, C., O’Gara, F., Marchesi, J. R., & Dobson, A.D.W. (2008). Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. *Marine Biotechnology*, *11*, 384-396.
- Kurabachew, M., Enger, O., Sandaa, R-A., Lemma, E., & Bjorvatn, B. (2003). Amplified ribosomal DNA restriction analysis in the differentiation of related species of mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, *55*, 83–90.

- Lee, S.K.Y., Wang, H. Z., Law, S.H.W., Wu, R. S., & Kong, R. Y.C. (2002). Analysis of the 16S–23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. *Marine Pollution Bulletin*, 44, 412–42.
- Li, Z., Hu, Y., Liu, Y., Huang, Y., He, L., & Miao, X. (2007). 16S rDNA clone library-based bacterial phylogenetic diversity associated with three South China Sea sponges. *Chemistry and Material Science*, 23, 1265-1272.
- Martinez, J. G., Bescos, I., Rodriguez-Sala, J. J., & Rodriguez-Valera, F. (2001). Rissc: a novel database for ribosomal 16S-23S RNA genes spacer regions. *Nucleic acids Research*, 29, 178-180.
- Mohamed, A. M., Kuyper, D. J., Iwen, P. C., Ali, H. H., Bastola, D. R., & Hinrichs, S. H. (2005). Computational approach involving use of the internal transcribed spacer 1 region for identification of *Mycobacterium* Species. *Microbiology*, 43, 3811–3817.
- Pei, A., Nossa, C. W., Chokshi, P., Blaser, M. J., Yang, L., Rosmarin, D. M., & Pei, Z. (2009). Diversity of 23S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *PLoS One*, 4, 5437.
- Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. K., & Carter, G. R. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. London : Wolfe Mosby-Year Europe.
- Roszak, D. B., & Colwel, R. R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural. *Environmental Microbiology*, 51, 365-379.
- Rocap, G., Distel, L. D., Waterbury, B. J., & Chisholm, W. S. (2002). Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosome DNA internal transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1180-1191.
- Rungprom, W., Chavasiri, W., Kokpol, U., Kotze, A., & Garson, M. J. (2004). Bioactive chromodorolide diterpenes from an *Aplysillid* sponge. *Marine Drugs*, 23, 101-107.
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., & Guillamon, J. M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S–23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1981–1987.
- Sievers, M., Alonso, L., Gianotti, S., Boesch, C., & Teuber, M. (1996). 16S-23S Ribosomal RNA spacer regions of *Acetobacter europaeus* and *A. xylinum*, tRNA genes and antitermination sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 142, 43-48.

- Sievers, M., Ludwig, W., & Teuber, M. (1994). Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodopila* and *Acidiphilum* species as a branch of acidophilic bacteria in the asubclass of Proteobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences. *Syst Appl Microbiology*, 17, 189-196.
- Selvin J., Priya, S. S., Kiran, K. G., Thangavelu, T., & Bai, S. N. (2007). Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution. *Microbiological Research*, 164, 352-363 .
- Trevors, J. T., & van Elsas, J. D. (1989). A review of selected methods in environment microbial genetics. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 895-902.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- Thoms, C., & Schupp, P. (2005). Biotechnological potential of marine sponges and their associated bacteria as producers of new pharmaceuticals. *International Journal of Biotechnology*, 2, 257–264.
- Taylor, M. W., Schupp, P. J., Dahllof, I., Kjelleberg, S., & Steinberg, P.D. (2004). Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 6, 121-130.
- Vanloooveren, M., Ison, C. A., Ieven, M., Vandamme, P., Martin, I. M., Vermeulen, K., Renton, A., & Goossens, H. (1999). Evaluation of the discriminatory power of typing methods for *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of clinical microbiology*, 37, 2183–2188 .
- Webster, N. S., Wilson, K. J., Blackall, L., & Hill, R. T. (2001). Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 434-444.
- Webster, N. S., Negri, A. P., Munro, M.M.H.G., & Battershill, C.N. (2004). Diverse microbial communities inhabit antarctic sponges. *Environmental Microbiology*, 6, 288–300.
- Yin, D., & Ji, Y. (2008). Identification of essential genes in *Staphylococcus aureus* by construction and screening of conditional mutant library. *Methods in Molecular Biology*, 416, 297-305.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

แหล่งที่มาของตัวอย่าง สารเคมี และอนุกรรมวิธานของแบบที่เรียกว่าร่วมกับฟองน้ำทะเล

2. วิธีการเตรียมสารเคมี

2.1 5X TBE buffer (เตรียมสารละลายน้ำมาร์ 1,000 ml)

Tis-base	54 g
Boric acid	27.5 g
EDTA (disodium dehydrate MV=372.24 g/mol)	3.72 g

2.2 LB (Luria-Bertani) broth (20 mg/l)

LB broth	4 g
น้ำกลั่น	200 ml

2.3 LB agar

LB broth	4 g
Bacto agar	3 g
น้ำกลั่น	200 ml

2.4 X-gal (40 mg/ml)

X-gal	0.04 g
Dimethyl formamide	1 ml

2.5 Ampicillin (200 mg/ml)

Ampicillin	0.002 g
น้ำกลั่น	1 ml

ตาราง ผ 1-1 ฐานข้อมูลของน้ำพะเพต โครงการวิจัยชั้นที่ 1 สถานภาพทรัพยากร่องน้ำพะเพตในระบบน้ำพะเพต บริเวณหาดนาวงร่อง เกาะจะนะและกุ้งภานุวัฒนา สำหรับตัวอย่าง จังหวัดฉะเชิงเทรา

Bacteria/Isolate marine sponge Field code	Common name	Class	Order	Family	Genus	species
1 NANGRONG-A-POR-03	ฟองน้ำชนิดมีเม็ดสีขาว	Demospongiae	Halichondrida	Halichondriidae	Halichondria	sp.1
2 NANGRONG-A-POR-03	ฟองน้ำชนิดมีเม็ดสีขาว	Demospongiae	Halichondrida	Halichondriidae	Halichondria	sp.1
3 CHAN-A-POR-02	ฟองน้ำเกลี้ยงบางสีแดง	Demospongiae	Poecilosclerida	Crambeidae	Monanchora	unguiculata (Dendy, 1922)
4 CHAN-A-POR-02	ฟองน้ำเกลี้ยงบางสีแดง	Demospongiae	Poecilosclerida	Crambeidae	Monanchora	unguiculata (Dendy, 1922)
5 CHAN-A-POR-02	ฟองน้ำเกลี้ยงบางสีแดง	Demospongiae	Poecilosclerida	Crambeidae	Monanchora	unguiculata (Dendy, 1922)
6 CHAN-A-POR-02	ฟองน้ำเกลี้ยงบางสีแดง	Demospongiae	Poecilosclerida	Crambeidae	Monanchora	unguiculata (Dendy, 1922)
7 CHAN-A-POR-02	ฟองน้ำเกลี้ยงบางสีแดง	Demospongiae	Poecilosclerida	Crambeidae	Monanchora	unguiculata (Dendy, 1922)
8 CHAN-A-POR-03	ฟองน้ำผึ้งตัวสีแดง	Demospongiae	Poecilosclerida	Mycalidae	Mycale (Mycale)	grandis Gray, 1868
9 CHAN-A-POR-03	ฟองน้ำผึ้งตัวสีแดง	Demospongiae	Poecilosclerida	Mycalidae	Mycale (Mycale)	grandis Gray, 1868
10 CHAN-A-POR-01	ฟองน้ำดำรอก	Demospongiae	Haplosclerida	Petrosiidae	Xestospongia	testudinaria (Lamarck, 1814)
11 JORAKE-A-POR-02	ฟองน้ำดำรอก	Demospongiae	Haplosclerida	Petrosiidae	Xestospongia	testudinaria (Lamarck, 1814)
12 NANGRONG-A-POR-01	ฟองน้ำเกลี้ยงบางสีขาว	Demospongiae	Dictyoceratida	Dysideidae	Lamellosidaea	herbacea (Keller, 1889)
13 NANGRONG-A-POR-01	ฟองน้ำเกลี้ยงบางสีขาว	Demospongiae	Dictyoceratida	Dysideidae	Lamellosidaea	herbacea (Keller, 1889)
14 NANGRONG-A-POR-01	ฟองน้ำเกลี้ยงบางสีขาว	Demospongiae	Dictyoceratida	Dysideidae	Lamellosidaea	herbacea (Keller, 1889)
15 NANGRONG-A-POR-01	ฟองน้ำเกลี้ยงบางสีขาว	Demospongiae	Dictyoceratida	Dysideidae	Lamellosidaea	herbacea (Keller, 1889)
16 NANGRONG-A-POR-02	ฟองน้ำห่อพูมสีแดง	Demospongiae	Haplosclerida	Phloeodictyidae	Oceanapia	sagittaria (Sollas, 1902)
17 NANGRONG-A-POR-02	ฟองน้ำห่อพูมสีแดง	Demospongiae	Haplosclerida	Phloeodictyidae	Oceanapia	sagittaria (Sollas, 1902)
18 JORAKE-A-POR-01	ฟองน้ำสีน้ำเงิน	Demospongiae	Haplosclerida	Petrosiidae	Neopetrosia	sp. "blue"
19 CHAUNG-D-POR-01	ฟองน้ำผึ้งตัวสีน้ำตาล	Demospongiae	Hadromerida	Clionidae	Clioma	sp.

ตาราง ผ 1-2 สถานที่ (Locality) เก็บตัวอย่างพองาน้ำทะเล

Bacteria/Isolate	marine sponge Field code	Locality Characters & Environment	Locality
1	NANGRONG-A-POR-03	เนินปะการังติด礁ซึ่งมีสีขาวร่องแคบลุ่มดินหินสูญเสียตามไปเป็นแนวต้น อยู่ริมด้วยปะการังรุ่งปะหงส์ก้อนใหญ่ขนาดใหญ่ ใกล้ชายฝั่งป่าไม้มาก ประกอบ	หาดนางรอง ๗. แสมสาร ๘. ตันทีบี ๑. ชลบุรี
2	NANGRONG-A-POR-03	เนินปะการังติด礁ซึ่งมีสีขาวร่องแคบลุ่มดินหินสูญเสียตามไปเป็นแนวต้น อยู่ริมด้วยปะการังรุ่งปะหงส์ก้อนใหญ่ขนาดใหญ่ ใกล้ชายฝั่งป่าไม้มาก ประกอบ	หาดนางรอง ๗. แสมสาร ๘. ตันทีบี ๑. ชลบุรี
3	CHAN-A-POR-02	เนินปะการังติด礁ซึ่งมีสีขาวร่องแคบลุ่มดินหินสูญเสียตามไปเป็นแนวต้น ประกอบริมด้วยปะหงส์ตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบหลังเลื่อน ร่อง ก้าน เป็นแนวต้น มีต้นหัวร่าขดล้อม	หาดจัน อ่าว บูร์กรานซื้อขายที่ดิน ๑. แสมสาร ๘. ตันทีบี ๑. ชลบุรี
4	CHAN-A-POR-02	เนินปะการังติด礁ซึ่งมีสีขาวร่องแคบลุ่มดินหินสูญเสียตามไปเป็นแนวต้น ประกอบริมด้วยปะหงส์ตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบหลังเลื่อน ร่อง ก้าน เป็นแนวต้น มีต้นหัวร่าขดล้อม	หาดจัน อ่าว บูร์กรานซื้อขายที่ดิน ๑. แสมสาร ๘. ตันทีบี ๑. ชลบุรี
5	CHAN-A-POR-02	เนินปะการังติด礁ซึ่งมีสีขาวร่องแคบลุ่มดินหินสูญเสียตามไปเป็นแนวต้น ประกอบริมด้วยปะหงส์ตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบหลังเลื่อน ร่อง ก้าน เป็นแนวต้น มีต้นหัวร่าขดล้อม	หาดจัน อ่าว บูร์กรานซื้อขายที่ดิน ๑. แสมสาร ๘. ตันทีบี ๑. ชลบุรี
6	CHAN-A-POR-02	เนินปะการังติด礁ซึ่งมีสีขาวร่องแคบลุ่มดินหินสูญเสียตามไปเป็นแนวต้น ประกอบริมด้วยปะหงส์ตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบหลังเลื่อน ร่อง ก้าน เป็นแนวต้น มีต้นหัวร่าขดล้อม	หาดจัน อ่าว บูร์กรานซื้อขายที่ดิน ๑. แสมสาร ๘. ตันทีบี ๑. ชลบุรี
8	CHAN-A-POR-03	เนินปะการังติด礁ซึ่งมีสีขาวร่องแคบลุ่มดินหินสูญเสียตามไปเป็นแนวต้น ประกอบริมด้วยปะหงส์ตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบหลังเลื่อน ร่อง ก้าน เป็นแนวต้น มีต้นหัวร่าขดล้อม	หาดจัน อ่าว บูร์กรานซื้อขายที่ดิน ๑. แสมสาร ๘. ตันทีบี ๑. ชลบุรี
9	CHAN-A-POR-03	เนินปะการังติด礁ซึ่งมีสีขาวร่องแคบลุ่มดินหินสูญเสียตามไปเป็นแนวต้น ประกอบริมด้วยปะหงส์ตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบหลังเลื่อน ร่อง ก้าน เป็นแนวต้น มีต้นหัวร่าขดล้อม	หาดจัน อ่าว บูร์กรานซื้อขายที่ดิน ๑. แสมสาร ๘. ตันทีบี ๑. ชลบุรี

ตาราง ผ 1-2 (ต่อ) สถานที่ (Locality) เก็บตัวอย่างพอยางสำหรับ

Bacteria/Isolate	marine sponge Field code	Locality Characters & Environment	Locality
10	CHAN-A-POR-01	เห็นปะการังติดชากับผงน้ำทะเลตามหินไม่มีแมลง ชนิดการสัมภาระที่มีปะการังพื้นที่ไม่ใหญ่ เก็บตัวอย่างในบริเวณน้ำตื้น ไม่มีสาหร่ายมากถึง 10 cm	ทางชาน อ่ามหาราชชัยทางทิศใต้ จ. เพชรบุรี อ. หนองโภ บ. หนองบูรี
11	JORAKE-A-POR-02	ชุมชนปะการังบนผืนดินหินภูเขา ประกอบพื้นที่ปะการังพื้นที่ใหญ่ ปะการังติดชากับผงน้ำทะเลตามหินไม่มีแมลง ชนิดการสัมภาระที่มีสาหร่ายมากถึง 10 cm	ทางชานอ่ามหาราชชัยที่ติดกับวัฒนา ต. เพชรบุรี อ. หนองโภ บ. หนองบูรี
13	NANGRONG-A-POR-01	เห็นปะการังติดชากับผงน้ำทะเลตามหินไม่มีแมลง ชนิดการสัมภาระที่มีสาหร่ายมากถึง 10 cm อยู่ร่วมกับปะการังสูงปะการุงแบบก้อนน้ำหินคลื่น ใกล้ชานผืนน้ำตื้น ไม่มีแมลง	ทางชานอ่ามหาราชชัยที่ติดกับวัฒนา ต. เพชรบุรี อ. หนองโภ บ. หนองบูรี
14	NANGRONG-A-POR-01	เห็นปะการังติดชากับผงน้ำทะเลตามหินไม่มีแมลง ชนิดการสัมภาระที่มีสาหร่ายมากถึง 10 cm อยู่ร่วมกับปะการังสูงปะการุงแบบก้อนน้ำหินคลื่น ใกล้ชานผืนน้ำตื้น ไม่มีแมลง	ทางชานอ่ามหาราชชัยที่ติดกับวัฒนา ต. เพชรบุรี อ. หนองโภ บ. หนองบูรี
14	NANGRONG-A-POR-01	เห็นปะการังติดชากับผงน้ำทะเลตามหินไม่มีแมลง ชนิดการสัมภาระที่มีสาหร่ายมากถึง 10 cm อยู่ร่วมกับปะการังสูงปะการุงแบบก้อนน้ำหินคลื่น ใกล้ชานผืนน้ำตื้น ไม่มีแมลง	ทางชานอ่ามหาราชชัยที่ติดกับวัฒนา ต. เพชรบุรี อ. หนองโภ บ. หนองบูรี
15	NANGRONG-A-POR-01	เห็นปะการังติดชากับผงน้ำทะเลตามหินไม่มีแมลง ชนิดการสัมภาระที่มีสาหร่ายมากถึง 10 cm อยู่ร่วมกับปะการังสูงปะการุงแบบก้อนน้ำหินคลื่น ใกล้ชานผืนน้ำตื้น ไม่มีแมลง	ทางชานอ่ามหาราชชัยที่ติดกับวัฒนา ต. เพชรบุรี อ. หนองโภ บ. หนองบูรี
16	NANGRONG-A-POR-02	เห็นปะการังติดชากับผงน้ำทะเลตามหินไม่มีแมลง ชนิดการสัมภาระที่มีสาหร่ายมากถึง 10 cm อยู่ร่วมกับปะการังสูงปะการุงแบบก้อนน้ำหินคลื่น ใกล้ชานผืนน้ำตื้น ไม่มีแมลง	ทางชานอ่ามหาราชชัยที่ติดกับวัฒนา ต. เพชรบุรี อ. หนองโภ บ. หนองบูรี
17	NANGRONG-A-POR-02	เห็นปะการังติดชากับผงน้ำทะเลตามหินไม่มีแมลง ชนิดการสัมภาระที่มีสาหร่ายมากถึง 10 cm อยู่ร่วมกับปะการังสูงปะการุงแบบก้อนน้ำหินคลื่น ใกล้ชานผืนน้ำตื้น ไม่มีแมลง	ทางชานอ่ามหาราชชัยที่ติดกับวัฒนา ต. เพชรบุรี อ. หนองโภ บ. หนองบูรี
18	JORAKE-A-POR-01	ชุมชนปะการังติดชากับผงน้ำทะเลตามหินไม่มีแมลง ชนิดการสัมภาระที่มีปะการังพื้นที่ใหญ่ ปะการังติดชากับผงน้ำทะเลตามหินไม่มีแมลง ชนิดการสัมภาระที่มีสาหร่ายมากถึง 10 cm	ทางชานอ่ามหาราชชัยที่ติดกับวัฒนา ต. เพชรบุรี อ. หนองโภ บ. หนองบูรี
19	CHAUNG-D-POR-01	ชุมชนปะการังติดชากับผงน้ำทะเลตามหินไม่มีแมลง ชนิดการสัมภาระที่มีสาหร่ายมากถึง 10 cm	ทางชานอ่ามหาราชชัย ต. เพชรบุรี อ. หนองโภ บ. หนองบูรี

ลำดับอนุกรมวิธานของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล 8 ชนิด

isolate 1 : *Alcanivorax* sp.

Domain : Bacteria, Eukaryota

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Oceanospirillales

Family : Alcanivoracaceae

Genus : *Alcanivorax* sp.

isolate 2 : *Bacillus* sp.

Domain : Bacteria, Eukaryota

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Bacilli

Order : Bacillales

Family : Bacillaceae

Genus : *Bacillus* sp.

isolate 3 และ isolate 8 : *Haliea* sp.

Domain : Bacteria, Eukaryota

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Alteromonadales

Family : Alteromonadaceae

Genus : *Haliea* sp.

isolate 4, 5, 6, 9 และ 11 : *Pseudoalteromonas* sp.

Domain : Bacteria, Eukaryota

Kingdom : Eubacteria

Division : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order: Alteromonadales

Family : Pseudoalteromonadaceae

Genus : *Pseudoalteromonas* sp.

isolate 7 : *Vibrio* sp.

Domain : Bacteria, Eukaryota

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Vibrionales

Family : Vibrionaceae

Genus : *Vibrio* sp.

isolate 10 : *Shewanella* sp.

Domain : Bacteria, Eukaryota

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Alteromonadales

Family : Shewanellaceae

Genus : *Shewanella* sp.

isolate 12

Domain : Bacteria, Eukaryota

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Oceanospirillales

Family : Oceanospirillaceae

Genus : *Marinomonas* sp.

isolate 13 : *Pseudomonas* sp.

Domain : Bacteria, Eukaryota

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Pseudomonadales

Family : Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas* sp.

isolate 14 នាម isolate 15 : *Dokdonia* sp.

Domain : Bacteria, Eukaryota

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Bacteroidetes

Class : Flavobacteria

Order : Flavobacterales

Family : Flavobacteriaceae

Genus : *Dokdonia* sp.

isolate 16, 17 และ isolate 18 : *Mesorhizobium* sp.

Domain : Bacteria, Eukaryota

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Alphaproteobacteria

Order : Rhizobiales

Family : Phyllobacteriaceae

Genus : *Mesorhizobium* sp.

isolate 19 : *Teredinibacter* sp.

Domain : Bacteria, Eukaryota

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Alteromonadales

Family : Alteromonadales

Genus : *Teredinibacter* sp.

ภาคผนวก ข

ผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ

การบ่งชี้แบคทีเรีย 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล 8 ชนิด ด้วยลำดับนิวคลีอไทด์
บริเวณยืน 16S rRNA และ 23S rRNA

Identification of nineteen bacterial isolates associated with eight marine sponges
based on 16S rRNA and 23S rRNA nucleotide sequences

ปิยะเนตร พึงพา^{1,2}, ชุต้า บุญภักดี^{1,2,3}, ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา⁴

Piyanath Pungpa^{1,2}, Chuta Boonphakdee^{1,2,3}, Chutiwan Dechsakulwatana⁴

¹ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยา และการบริหารจัดการสารเคมี

¹Center of Excellence on Environmental Health, Toxicology and Management of Chemical

²โครงการบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

²Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131

³ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

³Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131

⁴สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

⁴Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ ทำการวิเคราะห์แบคทีเรีย 19 ไอโซเลต ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล 8 ชนิด (*Halichondria* sp., *Monanchora unguiculata*, *Mycalia grandis*, *Xestospongia tesudinaria*, *Lamellodysidea herbacea*, *Oceamapia sagittaria*, *Neopetrosia* sp. และ *Cliona* sp. จำนวน 2, 5, 2, 2, 4, 2, 1 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ) เก็บจากบริเวณหมู่เกาะแม่น้ำ จังหวัดชลบุรี โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณยืน 16S rRNA และ 23S rRNA จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) โคลน และอ่านลำดับเบส ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 884-1,409 คู่เบส เมื่อเทียบเคียงลำดับเบสบนฐานข้อมูล GenBank พบร่องลำดับเบสในส่วนต้นของผลิตภัณฑ์ PCR เทียบเคียงได้ กับยืน 16S rRNA ขนาด 121-143 คู่เบส มีความเหมือน 84-100 % สามารถบ่งชี้แบคทีเรียทะเลได้ทั้งหมด 11 ถูก คือ *Alcanivorax* sp. (ไอโซเลต 1), *Bacillus* sp. (ไอโซเลต 2), *Haliea* sp. (ไอโซเลต 3, 8), *Pseudoalteromonas* sp. (ไอโซเลต 4, 5, 6, 9, 11), *Vibrio* sp. (ไอโซเลต 7), *Shewanella* sp. (ไอโซเลต 10), *Marinomonas* sp. (ไอโซเลต 12), *Pseudomonas* sp. (ไอโซเลต 13), *Dokdonia* sp. (ไอโซเลต 14, 15), *Mesorhizobium* sp. (ไอโซเลต 16, 17, 18) และ *Teredinibacter* sp. (ไอโซเลต 19) และลำดับเบสในส่วนท้ายของผลิตภัณฑ์ PCR เทียบเคียงได้กับยืน 23S rRNA ขนาด 302-523 คู่เบส มีความเหมือน 86-95 % และ ทั้งหมด 14 ไอโซเลต ระบุสกุลได้ตรงกับที่ใช้ลำดับเบสของยืน 16S rRNA ยกเว้นไอโซเลต 14, 15, 16, 17 และ ไอโซเลต 18 ที่ไม่สามารถระบุได้ ดังนั้นลำดับเบสในส่วนของยืน 16S rRNA และ 23S rRNA จึงมีประโยชน์ต่อ การบ่งชี้และจัดจำแนกแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลได้

ABSTRACT

This study was undertaken to analyze nineteen marine bacteria isolated from eight marine sponges (*Halichondria* sp., *Monanchora unguiculata*, *Mycale grandis*, *Xestospongia tesudinaria*, *Lamellodysidea herbacea*, *Oceamapia sagittaria*, *Neopetrosia* sp. and *Cliona* sp.; 2, 5, 2, 2, 4, 2, 1 and 1 isolates, respectively) collected from Samaesan Islands, Chonburi Province. To examine these marine bacterial strains, the region of 16S-23S rRNA genes (884-1,409 bp) was PCR-amplified, cloned, and sequencing. Blast analysis of the sequences obtained from the initially amplified-PCR products (121-143 bp) against GenBank database revealed significant similarity (84-100 %) with 16S rRNA gene. This analysis was able to identify 19 marine bacterial strains into 11 genus as *Alcanivorax* sp. (isolate 1), *Bacillus* sp. (isolate 2), *Haliea* sp. (isolate 3,8), *Pseudoalteromonas* sp. (isolate 4, 5, 6, 9, 11), *Vibrio* sp. (isolate 7), *Shewanella* sp. (isolate 10), *Marinomonas* sp. (isolate 12), *Pseudomonas* sp. (isolate 13), *Dokdonia* sp. (isolate 14, 15), *Mesorhizobium* sp. (isolate 16, 17, 18) and *Teredinibacter* sp. (isolate 19). However, the nucleotide sequences from the end of the obtained amplicons (302-523 bp) showed significant similarity (86-95 %) with 23S rRNA gene. This latter gene sequences analysis was able to discriminate 14 marine bacterial strains as those of 16S rRNA analyzed. Except for the isolate 14, 15, 16, 17 and 18, which were unable to identify. Therefore, the molecular sequences of 16S rRNA and 23S rRNA genes, are proved to be useful for identification and classification of the marine bacteria associated with marine sponges.

*ค่าสำคัญ 16S rRNA, 23S rRNA, marine sponge, marine bacteria

*Keyword: 16S rRNA, 23S rRNA, marine sponge, marine bacteria

*ติดต่อนักวิจัย: ชุต้า บุญภักดี (อีเมล์ chutagene@yahoo.com)

*Corresponding author : Chuta Boonphakdee (Email: chutagene@yahoo.com)

บทนำ

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ตามแหล่งต่างๆ เช่น น้ำจืด น้ำทะเล ตะกอนดิน หรืออาศัยอยู่ร่วมกับ สิ่งมีชีวิต เช่น สาหร่าย พืช และสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีจุลินทรีย์ อาศัยอยู่ร่วมมากที่สุดคือ ฟองน้ำทะเล เนื่องจาก โครงสร้างที่มีพุทธุณิธิรอบ มีรายงานว่าจำนวนชนิด ของแบคทีเรียที่แยกออกจากฟองน้ำทะเลเป็นมาก ถึง 33% ในขณะที่แยกได้มาจากน้ำทะเลเพียง 2% เท่านั้น ปัจจุบันนูนเซย์ได้ประยิชณ์จากแบคทีเรียที่ อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลโดยการประการ เช่น

สารออกฤทธิทางเคมี (bioactive compounds) ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย (Kelecom, 2002) เป็นต้น แบคทีเรียบางชนิดอาศัยอย่างจำเพาะกับฟองน้ำ ทะเลแต่ละชนิดหรือหลายชนิด (Taylor et al., 2004) เช่น แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* อาศัยอยู่กับฟองน้ำ *Isodictya setifera* สร้างสาร diketopiperazine และ phenazines ที่มีคุณสมบัติ ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด (Jayalilake et al., 1996) หรือ *Micrococcus* sp. ที่แยกจากฟองน้ำ *Tedania ignis* สามารถสร้าง สาร diketopiperazines ได้เช่นกัน (Bultel-Ponce

et al., 1998) เป็นต้น ดังนั้นการจัดจำแนกหรือระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทະเลเพื่อนำไปใช้ประโยชน์จึงมีความสำคัญ การบ่งชี้ชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาในแบคทีเรียบางชนิดอาจไม่สามารถบ่งชี้เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน ในปัจจุบัน จึงนิยมนำข้อมูลทางพันธุกรรมของแบคทีเรียมาร่วมในการจัดจำแนกกลุ่ม/ชนิดให้ชัดเจนยิ่งขึ้น อีกทั้งมีโอกาสค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่ได้ (Trevors and Van, 1989) ยืน 16S rRNA และ 23S rRNA มีลำดับเบสอนุรักษ์จึงนิยมใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย ดังเช่นที่ปรากฏในรายงานวิจัยแบคทีเรียสกัดได้จากฟองน้ำทະเล *Rhopaloeides odorabile* ซึ่งจัดแบคทีเรียไว้ในดิวิชัน α - proteobacteria และ Actinobacteria นอกจากนี้ยังมีรายงานศึกษาแบคทีเรียในสกุล (genus) *Vibrio* ที่แยกได้มาจากแหล่งธรรมชาติ เป็นต้น (Webster *et al.*, 2004) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ คณผู้วิจัยจึงศึกษาลำดับเบสของยืน 16S rRNA และ 23S rRNA เพื่อบ่งชี้ชนิดแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทະเลที่เก็บจากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร จ. ชลบุรี ซึ่งยังไม่ปรากฏรายงาน

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

- การสกัดดีเอ็นเอกะการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)
- ตัวอย่างแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลต (isolate) แยกได้จากฟองน้ำทະเล 8 ชนิด คือฟองน้ำ *Halichondria* sp., *Monanchora unguiculata*, *Mycale grandis*, *Xestospongia testudinaria*, *Lamellodysidea herbacea*, *Oceanapia sagittaria*, *Neopetrosia* sp . และ *Cliona* sp. (จำนวน 2, 5, 2, 2, 4, 2, 1 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ) เก็บจากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร อ. สีตห์บุรี และเลี้ยงไว้ในอาหารเหลว น้ำมาน้ำสกัด ดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Bacterial

DNA Extraction Kit (Vivantis Technologies, Malaysia) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต แล้วใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับทำปฏิกิริยา PCR เพิ่มปริมาณในบริเวณยืน 16S-23S rRNA โดยใช้คู่ไฟรเมอร์ 16-23S_F (5'TTGTACACACCCGCCGTC) และ 16-23S_R (5'CCTTCCCTCACGGTACTG) (Lee *et al.*, 2002) ปฏิกิริยาทำในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 2X master mix (10mM dNTPs, 25 mM MgCl₂, 5U/μl Taq DNA polymerase) จำนวน 6 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอจำนวน 1 ไมโครลิตร 10 μM Primer 16-23S_F/R สายละ 1 ไมโครลิตร และ nuclease free water จำนวน 1 ไมโครลิตร ปฏิกิริยา PCR ทำจำนวน 35 รอบ โดยมีขั้นตอน pre denature 94°C, 3 นาที denature 94°C, 30 วินาที annealing 55-60°C, 40 วินาที extension 72°C, 40 วินาที และ final extension 72°C, 5 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟโรสก์ความเข้มข้น 1 เบอร์เซนต์ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, USA) จำนวน 250 นาโนกรัม ตรวจดูแบบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง InGenius gel documentation system (Syngene, England) ภายหลังย้อมเจลด้วยเอชีเดียมโนร์มินด์ แล้วบันทึกภาพ

2. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอกะและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยืน 16S rRNA

นำผลผลิต PCR ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทະเลมาเข้ามือต่อ กับพลาสมิด (pGEMT-easy Vector, Promega) และทราบพ่อแม่เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (*Escherichia coli* JM109) คัดเลือกทราบพ่อแม่โดยสังเกตจากโคลนีสีขาวหรือสีขาวอมฟ้า ตรวจสอบช้าด้วยเทคนิค PCR และสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส (First BASE Laboratories SdnBhd, Malaysia) โดย

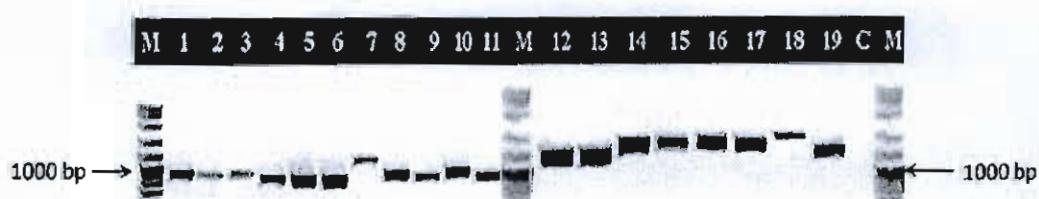
อ่าน 2 ทิศทาง จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ด้วยโปรแกรม Blast และเทียบเคียงข้อมูลของตัวอย่างร่วมกับ *Aeropyrum permix* (รหัสหมายเลข AB078022) ด้วยโปรแกรม Clustalx

ผลและวิธารณ์ผลการทดลอง

1. การบ่งชี้ชนิดแบคทีเรียตัวบ้าดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ถึงยีน 23S rRNA

เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมด 19 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต 1 และ 2 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Halichondria* sp., ไอโซเลต 3, 4, 5, 6 และ ไอโซเลต 7 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *M. unguiculata*, ไอโซเลต 8 และ 9 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *M. grandis*, ไอโซเลต 11 และ ไอโซเลต 10 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *X. testudinaria*, ไอโซเลต 12, 13, 14 และ ไอโซเลต 15 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *L. herbacea*, ไอโซเลต 16 และ 17 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *O. sagittaria*, ไอโซเลต 18 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Neopetrosia* sp. และ ไอโซเลต 19 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Ciona* sp. เพิ่มจำนวนเดือนอนในส่วนของยีน 16S rRNA ถึงยีน 23S rRNA ด้วยไฟรเมอร์ 16S-23S_F/R พบร่วมได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดแตกต่างกัน ภายหลังจากโคลนและอ่านลำดับเบสพบว่ามีขนาด 884 - 1,409 คู่เบส (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringa*, *Xanthomonas arboricola*, *Agrobacterium vitis*, *Erwinia amylovora* ที่พบร่วมผลผลิต PCR ที่ได้จากคุไฟรเมอร์ 16-23S_F/R นี้มีขนาดไม่เท่ากัน คือประมาณ 800-1,550 คู่เบส (Jeng et al., 2001) ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ที่เพิ่มจำนวนได้ในการศึกษาครั้งนี้กับฐานข้อมูล GenBank (เมื่อวันที่ 7 กันยายน 2553) พบร่วมสามารถเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 2 ส่วน (ดังนี้ 1) ส่วนต้นของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 121-143 คู่เบส เทียบเคียงได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียโดยมีความเหมือนสูงสุด (identity) ที่ 84 - 100 % ในแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียสกุล *Pseudoalteromonas* sp. (ไอโซเลต 4, 5, 6, 9 และ 11) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล GenBank accession no. FJ501589 ที่ 99 -100% (130/132 bp) และ *Mesorhizobium* sp. (ไอโซเลต 16, 17 และ 18) มีความเหมือนกับ accession no. AY309485 ที่ 99% (133/134 bp) (ตารางที่ 1) (ภาพที่ 2 แสดงการเทียบเคียงลำดับเบสในส่วนของยีน 16 S rRNA ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต) สอดคล้องกับการศึกษาลำดับเบสของยีน 16 rRNA ที่สามารถระบุ *Bacillus* sp., *Arthobacter* sp.,



ภาพที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S-23S rRNA ของแบคทีเรีย 19 ไอโซเลต (isolate 1-19) แยกได้จากฟองน้ำทะเล 8 ชนิด ขนาด 884 - 1,409 คู่เบส เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA marker (M), (C = ปฏิกิริยาควบคุมไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบ)

และ *Vibrio* sp. ในระดับสกุล (แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Aplysina aerophoba* และ *A. cavernicola*) (Hentschel et al., 2001) และ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนท้ายของผลิตภัณฑ์ PCR สามารถเทียบเคียงได้ กับบริเวณยืน 23S rRNA ที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank ขนาด 302-523 คู่เบส โดยมี % ความเหมือนสูงสุด 86 – 95 % และบ่งชี้ในระดับสกุลได้ ตรงกับบริเวณยืน 16S rRNA ทั้งหมด 14 ไอโซเลต (ตารางที่ 1) แต่บางไอโซเลตไม่สามารถบ่งชี้ได้ คือ ไอโซเลต 14 และ 15 ซึ่งเมื่อเทียบเคียงด้วยยืน 16S rRNA สามารถระบุได้เป็น *Dokdonia* sp. และ

ไอโซเลต 16, 17 และ 18 ได้เป็น *Mesorhizobium* sp. (ตารางที่ 2) จะเห็นได้ว่าจากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลกับฐานข้อมูล GeneBank ในส่วนของยืน 16S rRNA สามารถบ่งชี้แบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลตได้ในระดับสกุล ขัดเจนมากกว่ายืน 23S rRNA แต่อย่างไรก็ตามการบ่งชี้แบคทีเรียบางครั้งไม่สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยืน 16S rRNA แต่เพียงอย่างเดียว จึง มีความจำเป็นต้องใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยืน 23S rRNA ร่วมด้วยดังเช่นรายงานการศึกษาในแบคทีเรียที่ สกัดได้จากฟองน้ำทะเล *Rhopaloeides odorabile*

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่เรียก 19 ไอโซเลต ที่แยกจากฟองน้ำทะเล 8 ชนิด ในส่วนของยืน 16S rRNA และ 23S rRNA

Marine sponge	Bacterial strain/isolate	16S rRNA			23S rRNA		
		Aligned position	Blast identity (%)	GenBank Accession no.	Aligned position	Blast identity (%)	GenBank Accession no.
<i>Halichondria</i> sp.	1	1-137	100(137/137)	EU591711	399-904	94(445/477)	AF197903
	2	1-137	100(137/137)	GU726175	417-899	92(478/523)	AF267884
<i>Monanchora longiciliata</i>	3	1-137	100(137/137)	AY190666	425-938	87(373/431)	GU925965
	4	1-132	99(130/132)	AB373122	387-884	95(446/473)	FJ501589
<i>Mycale grandis</i>	5	1-132	100(132/132)	AB373122	379-844	90(428/477)	FJ501589
	6	1-132	99(130/132)	AB373122	369-882	91(430/475)	FJ501589
<i>Xestospongia testudinaria</i>	7	16-143	90(115/129)	CP001805	424-1078	94(395/424)	AJ294422
	8	1-137	100(137/137)	AY190666	435-938	86(370/433)	GU925965
<i>Lamellodysidea herbacea</i>	9	1-132	99(130/132)	AB373122	386-884	95(446/473)	FJ501589
	10	1-134	100(134/134)	GU289648	454-953	88(378/430)	CP000606
<i>Oceanapia sagittaria</i>	11	1-132	99(131/132)	AB373122	416-895	93(445/480)	FJ501589
	12	1-121	99(119/121)	EU330308	412-1117	89(425/482)	CP000749
<i>Neopetrosia</i> sp	13	1-136	84(114/136)	AB312161	479-1146	86(410/479)	Y00432
	14	1-128	99(126/128)	DQ481462	444-1280	86(368/428)	GU926758
<i>Cliona</i> sp.	15	1-128	99(126/128)	DQ481462	430-1070	86(368/428)	GU926738
	16	1-134	99(133/134)	AB604651	457-1309	93(371/403)	AY309485
	17	1-134	99(133/134)	AB604651	449-1302	93(371/403)	AY309485
	18	1-134	99(133/134)	AB604651	475-1409	93(371/403)	AY309485
	19	78-134	100(76/78)	CP001614	398-991	87(302/349)	CP001614

		10	20	30	40	50	60	70	
isolate 14	1	TTGTACACACCGCCCCGTCAGCCATGGAA		CTGGGGTACCTGAAGTCCGTC		CGGC			57
isolate 15	1								57
isolate 2	1		CA...C.AG..	T.T.TAAC...C...G.O.GGTAACCTTT.G					66
isolate 17	1		CA....G..	T...TTT...C...G.GC.GTGCTAACCGCAA.G					66
isolate 18	1		CA....G..	T...TTT...C...G.GC.GTGCTAACCGCAA.G					66
isolate 16	1		CA....G..	T...TTT...C...G.GC.GTGCTAACCGCAA.G					66
isolate 6	1		CA....G..	TG..TT.CT..A...GGA.ACCTTAACCTT.G.G					66
isolate 4	1		CA....G..	TG..TT.CT..A...GGA.ACCTTAACCTT.G.G					66
isolate 9	1		CA....G..	TG..TT.CT..A...GGA.ACCTTAACCTT.G.G					66
isolate 5	1		CA....G..	TG..TT.CT..A...GGA.ACCTTAACCTT.G.G					66
isolate 11	1		CA....G..	TG..TT.CT..A...GGA.ACCTTAACCTTAG.G					66
isolate 8	1		CA....G..	TG..TT.CT..A...GOT.ACCTTAACCTT.G.G					66
isolate 3	1		CA....G..	TG..TT.CT..A...GGT.ACCTTAACCTT.G.G					66
isolate 1	1		CA....G..	TG.ATT.C...A...AGT.AGTCTAACCTT.G.G					66
isolate 12	1		CA....G..	T..ATT.CT..A...AG..AGTCTAACCGCAA.G					66
isolate 10	1		CA....G..	TG..CT.C.AAA...GCC.AGTCTAACCTT.G.G					66
isolate 13	1		CA....G..	TG..TT.CT..A...GG.C.CTCAGGCTT.G.G					64
isolate 7	1		GTAA..A..T..GCCCTA...AA...GG.C.T.GATCCC.CTCCTTAT						68
isolate 19	1		G.ATTG..AGCMAG AA..TT.C.GGC.T..G..A.A.GCTGATGGCTT.T						67
Aeropyrum pernix	1	.GC.CG..GO..T..AGGA.GC.CCCCTTAGGG.A..AG..CAC..AAQ.CTCCCCCTCCCC.TCT							69
Consensus	1	*	*	*	*	*	*	*	11
		80	90	100	110	120	130	140	
isolate 14	58	AAGGAGCGGCCCTAAGGTAAA	ACTAQT	AACTGG	GGCTAAGTCOTAACAAAGGTAACCGTACCGGA	AGGTGCGG			128
isolate 15	58								128
isolate 2	67	...GCC...C...A...GGG...AGA...	G.T...	..TG...			T...		137
isolate 17	67	.G.C..GC.A.C.C...GG	GTC..C	G....	..TG...		C..GG...	.CC..G..	137
isolate 18	67	.G.C..GC.A.C.C...GG	GTC..C	G....	..TG...		C..GG...	.CC..G..	137
isolate 16	67	.G.C..GC.A.C.C...GG	GTC..C	G....	..TG...		C..GG...	.CC..G..	137
isolate 6	67	.G..C.TTCA..C..AGTG	.T.CA.	G....	..TG...		C..GG...	.CC..G..	137
isolate 4	67	.G..C.TTCA..C..AGTG	.T.CA.	G....	..TG...		C..GG...	.CC..G..	137
isolate 9	67	.G..C.TTCA..C..AGTG	.T.CA.	G....	..TG...		C..GG...	.CC..G..	137
isolate 5	67	.G..C.TTCA..C..AGTG	.T.CA.	G....	..TG...		C..GG...	.CC..G..	137
isolate 11	67	.G..C.TTCA..C..AGTG	.T.CA.	G....	..TG...		C..GG...	.CC..G..	137
isolate 8	67	.G..C..ATCA..C..C..AGTG	.T.CA.	G....	..TG...		C..GG...	.CC..G..	137
isolate 3	67	.G..C..ATCA..C..C..AGTG	.T.CA.	G....	..TG...		C..GG...	.CC..G..	137
isolate 1	67	.G.AC.ATTA.C.C..GTC	GT.CA.	G....	..TG...		GG...	.CC...	137
isolate 12	67	GG.AC..TTA.C.C..AGTG	OTC.A.	-G....	..TG...		C..GG...	.CC..G..	137
isolate 10	67	GG.AC.GTCA.C.CTT.GT	G.T.CA.	-G....	..TG...		C..GG...	.CC..G..	137
isolate 13	65	GG...	-A...C...				GG...	.CC..G..	129
isolate 7	69	.C..AT..ATTAT.GC.A.G..GT..T..CACACAG.T..ATAT..TT..TACACU..TT..A..AGA..GA..T..G..GTC..G..							146
isolate 19	68	O..CTT..AATATAO..CC..GT..GCTC..CT..GOT..A..A..OC..CC..C..G..T..TGAGGT..C..T..G..							138
Aeropyrum pernix	70	GG..CCCGC..A...CC..CTCCG..CCTC	GG...	CC..CT..GG..CC..G..CC..CGG..C..T..AC..C..					141
Consensus		*	*	*	*	*	*	*	

ภาพที่ 2 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทະเลจำนวน 19

ไอโซเลต และ Aeropyrum pernix (GenBank accession no. AB078022) เป็น outgroup

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับเดาที่ 1; () = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง, □ = แบคทีเรียที่จัดได้ในสกุลเดียวกัน

ที่พบว่าในส่วนของยีน 16S rRNA จะไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียนางพันธุ์ในดิวิชัน A - proteobacteria และ Actinobacteria ได้ชัดเจนเนื่องจากในบริเวณนี้มีจำนวนเบส G+C ต่ำ แต่เมื่อเทียบเคียงในส่วนของยีน 23S rRNA ซึ่งมีเบส G+C สูง จะสามารถยืนยันผลการจำแนกแบคทีเรียภายในดิวิชันนี้ได้ (Webster et al., 2004) และในการศึกษา

ครั้งนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 23S rRNA ของแบคทีเรียที่เรียกว่า 19 ไอโซเลตมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกันมาก (ภาพที่ 3) แสดงถ้วนว่าการรายงานการศึกษาในแบคทีเรียที่ได้จากน้ำพุร้อนและแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวน 184 ไอโซเลตมีช่วงลำดับเบสอนุรักษ์ในส่วนของยีน 23S rRNA (Pei et al., 2009)

ตารางที่ 2 การบ่งชี้สกุลของแบคทีเรีย 19 ไอโซเลต ที่แยกจากฟองน้ำทะเล 8 ชนิดในส่วนของยีน 16S rRNA และ 23S rRNA

Marine sponge	Bacterial strain isolate	16S rRNA		23S rRNA	
		Species	Identity	Species	Identity
<i>Haliclona</i> sp.	1	<i>Aleurovorax</i> sp.		<i>Aleurovorax</i> sp.	
	2	<i>Bacillus</i> sp.		<i>Bacillus</i> sp.	
<i>Monanchora marginulina</i>	3	<i>Halicea</i> sp.		<i>Halicea</i> sp.	
	4	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	
<i>Mycalia grandis</i>	5	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	
	6	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	
<i>Xestospongia testudinaria</i>	7	<i>Tilapia</i> sp.		<i>Tilapia</i> sp.	
	8	<i>Halicea</i> sp.		<i>Halicea</i> sp.	
<i>Lamellodysidea herbacea</i>	9	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	
	10	<i>Shewanella</i> sp.		<i>Shewanella</i> sp.	
<i>Oceanapia agglomata</i>	11	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	
	12	<i>Marmomonas</i> sp.		<i>Marmomonas</i> sp.	
<i>Neopetrosia</i> sp.	13	<i>Pseudomonas</i> sp.		<i>Pseudomonas</i> sp.	
	14	<i>Dokdonia</i> sp.		Uncultured bacteria	
<i>Ciona</i> sp.	15	<i>Dokdonia</i> sp.		Uncultured bacteria	
	16	<i>Mesorhizobium</i> sp.	บางครั้ง alpha proteobacterium		
	17	<i>Mesorhizobium</i> sp.	บางครั้ง alpha proteobacterium		
	18	<i>Mesorhizobium</i> sp.	บางครั้ง alpha proteobacterium		
	19	<i>Teredinibacter</i> sp.	<i>Teredinibacter</i> sp.		

อนึ่งเทคนิค PCR ที่นำมาใช้ศึกษาถึงตัวอย่างแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเนื่มความแม่นยำแม้มีเดื่อเนินเอตัวอย่างเพียงเล็กน้อยก็สามารถเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA และ 23S rRNA ได้ด้วยร่องจำเพาะ และลำดับนิวคลีอิດที่มีประโยชน์ในการบ่งชี้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลในระดับสกุลได้

สรุปผลการทดลอง

- ผลผลิต PCR โดยใช้คู่ไฟรเมอร์ 16S-23S_F/R ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเมื่อขนาดแทรกต่างกัน มีขนาด 884-1,409 คู่เบส
- ข้อความพันธุกรรมในส่วนของยีน 16S rRNA สามารถใช้บ่งชี้สกุลของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลได้ ในขณะที่ข้อความพันธุกรรมในส่วนของยีน

23S rRNA ช่วยยืนยันการจำแนกแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลได้ แต่พบว่าในบางสกุล เช่น *Dokdonia* sp. และ *Mesorhizobium* sp. ลำดับนิวคลีอิດในส่วนของยีน 23S rRNA ไม่สามารถบ่งชี้ได้ และงานวิจัยนี้เป็นงานสนับสนุนพัฒนาในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

คำขอขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนวิจัยจากบประมาณแผ่นดิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) คณะกรรมการวิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
isolate 16	1	G	A	G	C	T	A	T	A	T	G
isolate 17	1	98
isolate 18	1	99	
isolate 9	1	95	
isolate 4	1	.	O	.	AC	ACT	.	C	A	C	TOC GC
isolate 11	1	.	.	O	.	AC	ACT	C	A	C	TOC OC
isolate 5	1	.	.	G	.	AC	ACT	C	A	C	TOC OC
isolate 6	1	.	.	O	.	AC	ACT	C	A	C	OC OC
isolate 19	1	.	.	O	.	T	AT	C	A	C	T
isolate 10	1	.	.	G	.	T	AT	T	A	T	GTG TCA A
isolate 7	1	.	.	O	.	AG	AC	CCA ATT	G AGTA CA CCA	T GT	AC TOCA A
isolate 14	1	.	.	O	.	AGG	GC	C A	T G AC C GA	T AD	C TO TAC
isolate 15	1	.	.	O	.	AGG	GC	C A	T G AC C GA	T AD	C TG TAC
isolate 13	1	.	.	O	.	AGG	GC	C A	T G AC C GA	T AG	C TU TAC
isolate 8	1	.	.	O	.	O	AT	A	TG T	C ATA C G OC	A OA O C
isolate 3	1	.	.	O	.	O	AT	A	TC F	C ATA C G OC	A OA O C
isolate 12	1	.	.	G	.	TG	AC	GT	ATA C	AC	C TO
isolate 1	1	.	.	O	.	TG	OC	T	TC O A C GA	A	C
isolate 2	1	.	C	C	G	O	CTA AC	T T	TA G O	A A	T G T T C O AT
Aeropyrum pernix	1	.	T	C	C	G	OC A	C GT	ATGG	GAA A ACAG	O C
Consensus	1	AA TC
		210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
isolate 16	175	OCT	ACT	AGT	CGG	GA	CC	GA	CC	OCT	CTA TTT TAA GA
isolate 17	175	ACCC
isolate 18	175	229
isolate 9	192	A	A	A	C	.	AT	T	C	TTA	A CTT G O O OTT
isolate 4	192	AA	.	C	.	AT	.	T	C	TTA	A CTT G O O OTT
isolate 11	192	AA	.	C	.	AT	.	T	C	TTA	A CTT G O O OTT
isolate 5	191	AA	.	C	.	AT	.	T	T	C	A CTT A G O OTT
isolate 6	191	AA	.	C	.	AT	.	T	T	C	A CTT A G O OTT
isolate 19	191	CTA	.	C	.	AT	.	T	C	TTA	AATC G A G OTT
isolate 10	194	C	.	C	.	AT	.	T	T	C	A TT AA G A GTT
isolate 7	194	AA	.	C	.	ATT	.	T	C	TTA	A CTT TAA O GAC
isolate 14	195	CT	.	C	.	U	T	T	C	TTA	A CTT TAA UTTTT
isolate 15	195	CT	.	C	.	U	T	T	C	TTA	A CTT TAA GTTTT
isolate 13	195	CT	.	C	.	U	T	T	C	TTA	A CTT TAA GTTTT
isolate 8	196	C	.	C	.	G	.	C	TTA	A CA ATG O O OTT	
isolate 3	196	C	.	C	.	O	.	C	TTA	A CA ATG O O OTT	
isolate 12	194	CTA	.	C	.	O	T	T	C	TTA	A CA ATC G T CT
isolate 1	191	TC	.	C	.	T	T	C	TTA	A CATATGAC G TT	
isolate 2	195	CTG	.	C	.	ACG	TG	C	TTA	A ACCAAGAAGGCTTCCCTCTTGGGTTGTAAGAACACTCTATACOGH	
Aeropyrum pernix	170	TC	.	ACG	.	T	TA	C	TTA	TCGAA	
Consensus	170	267
		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
isolate 16	230	A	-ACA	AGT	TGG	GA	AA	ACT	TGG	CTT	AGT AAGGCG
isolate 17	230	315
isolate 18	230	315
isolate 9	247	.	TTC	.	A	GT	.	A	GA	C	CTATCT A G O A G
isolate 4	247	.	TTC	.	A	GT	.	A	GA	C	CTATCT A G O A G
isolate 11	247	.	TTC	.	A	GT	.	A	GA	C	CTATCT A G O A G
isolate 5	246	.	TTC	.	A	GT	.	A	GA	C	CTATCT A G O A G
isolate 6	246	.	TTC	.	A	GT	.	A	GA	C	CTATCT A G O A G
isolate 19	242	.	TCV	.	A	GTG	.	A	GA	C	CTAT TTG C CA A G
isolate 10	249	.	TGT	.	A	O	ACA	CA	A	C	CGACT A G O A A C
isolate 7	249	.	TG	C	A	G	CA	GA	A	C	CTC TC AGAC A A C
isolate 14	250	.	UOTTC	.	A	GTAC	C	GA	CA	C	DGC TTTT A G O A A C
isolate 15	250	.	GGTTC	.	A	GTAC	C	GA	CA	C	GCG TTTT A G O A A C
isolate 13	250	.	GGTTC	.	A	GTAC	C	GA	CA	C	GCG TTTT A G O A A C
isolate 8	251	.	O	TC	.	A	GTG	C	A	C	GCC TTTT A G O A A C
isolate 3	251	.	O	GTC	.	A	GTG	C	A	C	GCC TTTT A G O A A C
isolate 12	249	.	CTC	.	A	GTG	C	A	C	T	CTT TAGAT G O A A C
isolate 1	246	.	O	GTC	.	A	GTG	C	A	T	TCTG ATAT G O A A C
isolate 2	287	CGAAA	GTG	.	A	O	GC	C	T	AA	T GTT A CTTTCCCTTGAG GAT C C
Aeropyrum pernix	260	.	GTCTCC	.	A	C	GAAC	O	CA	A	C ADG TCT ATTACO COTQAACCGGCGT CG C O
Consensus	89	111
		410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
isolate 16	316	AA	TCC	TG	CT	AA	CAT	GGG	GG	GG	GGGGAAAGG
isolate 17	316	400
isolate 10	316	400
isolate 9	335	CTT	A	.	T	A	.	T	A	T	CTATCT A G O A G
isolate 4	336	CTT	A	.	T	A	.	T	A	T	CTATCT A G O A G
isolate 11	336	CTT	A	.	T	A	.	T	A	T	CTATCT A G O A G
isolate 5	334	CTT	A	.	T	A	.	T	A	T	CTATCT A G O A G
isolate 6	334	CTT	A	.	T	A	.	T	A	T	CTATCT A G O A G
isolate 19	329	CTT	A	.	O	A	.	T	A	T	CTAT TTG C CA A G
isolate 10	337	T	.	GT	.	A	.	T	A	T	CGACT A G O A A C
isolate 7	337	T	.	GT	.	A	.	T	A	T	CTC TC AGAC A A C
isolate 14	338	T	.	T	T	A	.	T	A	T	DGC TTTT A G O A A C
isolate 15	338	T	.	T	T	A	.	T	A	T	GCG TTTT A G O A A C
isolate 13	338	T	.	T	T	A	.	T	A	T	GCG TTTT A G O A A C
isolate 8	335	.	O	T	A	.	T	O	A	T	GCC TTTT A G O A A C
isolate 3	335	.	GT	A	.	T	O	A	GACT	T A	123
isolate 12	337	.	CT	.	.	T	O	A	GACT	T A	421
isolate 1	335	.	C	T	A	.	O	A	OCT	T A	417
isolate 2	395	.	C	G	GC	.	T	T	CTAGT	T A	479
Aeropyrum pernix	358	.	CTC	O	T	C	C	T	TA	T G	442
Consensus	89	*

ภาพที่ 3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 23S rRNA ของแบคทีเรียที่เรียกจากฟองน้ำทะเลจำนวน 19

ไครโซเลต และ Aeropyrum pernix (GenBank accession no. AB078022) เป็น outgroup

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแทร็ค 1; (□) =

= ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง □ =

แบคทีเรียที่จัดไว้ในสกุลเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

- Bullet-Ponce, V., Debitus, C., Berge, J-P., Cerceau, C., & Guyot, M. 1998. Metabolites from the sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. *Journal of Marine Biotechnology*, 6, 233-236.
- Hentschel, U., Schmid , M., Wagner, M., Fieseler L., Gernert, C., & Hacker, J. 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol Evol*, 35, 305-312.
- Jayatilake, G. S., Thornton, M. P., Leonard, A. C., Grimwade, J. E., & Baker, B. J. 1996. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Nat. Prod*, 59, 293-296.
- Jeng, R. S., Svircev, A. M., Myers, A. L., Beliaeva, L., Hunter, D. M., & Hubbes, M. 2001. The use of 16S and 16S-23S rDNA to easily detect and differentiate common Gram-negative orchard epiphytes. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 69 - 77.
- Kelecom, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganism. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 74, 51-170.
- Lee, S. K. Y., Wang, H. Z., Law, S. H. W., Wu, R. S. S., & Kong, R. Y.C. 2002. Analysis Of the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. *Marine Pollution Bulletin* 44, 412-42.
- Pei, A., Nossa C. W., Chokshi, P., Blaser, M. J., Yang, L., Rosmarin, D. M., & Pei, Z. 2009. Diversity of 23S rRNA gene within individual prokaryotic genomes. *PLoS One*, 4, 543.
- Trevors, J.T., & Van, J. E. D. 1989. A review of selected methods in environmental microbial genetics. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 895-902.
- Taylor, M. W., Schupp, P. J., Dahllöf, I., Kjelleberg, S., & Steinberg, P. D. 2004. Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environmental microbiology*, 6, 121-130.
- Webster, N.S, Negri, A.P, Munro M.M.H.G., & Battershill, C.N. 2004. Diverse Microbial communities inhabit antarctic sponges. *Environ Microbiol*, 6, 288-300.