รายงานโครงการวิจัยประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๗

เรื่อง

ลักษณะทางพันธุกรรมของประชาคมแบคทีเรียและการใช้ประโยชน์ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี

(สนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช
อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี)

โดย

ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา

ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ

คณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ.- มหาวิทยาลัยบูรพา

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณแผ่นดินปี ๒๕๕๗
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน พ.ศ. ๒๕๕๘

หน่วยงานที่รับผิดชอบโครงการ

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง
จังหวัดชลบุรี 20131 โทรฯ 038-391671~3 โทรสาร 038-391674

หน่วยงานสนับสนุน

1.โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราช
กุมารี สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต กรุงเทพมหานคร 10303
2 หน่วยสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ

ผู้รับผิดชอบโครงการวิจัย

1. ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา	หัวหน้าโครงการวิจัย
2. ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ	ผู้ร่วมโครงการ

คณะกรรมการดำเนินงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจาก พระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

โดยพระราชานุญาต
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

ประกาศที่ อพ.สธ. 78/ 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ. iv

บทที่ 1 บทนำ 3

ความสำคัญและที่มาของปัญหา 3

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 6

บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง **7**

ทฤษฎี และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 7

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย 10

ตอนที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำให้บริสุทธิ์ 10

ตอนที่ 2 การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย 12

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 14

ตอนที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำให้บริสุทธิ์ 14

ตอนที่ 2 การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย 14

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 22

เอกสารอ้างอิง 23

ลักษณะทางพันธุกรรมของประชาคมแบคทีเรียและการใช้ประโยชน์ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี

Genetics of bacterial community and it's application in the Marine Plant Genetic Conservation Area, Moo Ko Samaesarn, Chon Buri province

(สนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี)

ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา และ ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
chutiwan@buu.ac.th

บทคัดย่อ

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเล 7 ชนิด ที่เก็บจากพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี บริเวณเกาะจวง และเกาะปลาหมึก หมู่เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พบว่ามีแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำในปริมาณที่แตกต่างกัน สามารถพบประชากรแบคทีเรียอาศัยอยู่ในฟองน้ำแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันโดยพบมีแบคทีเรียอาศัยอยู่มากที่สุด ฟองน้ำเคลือบบางสีแดงCHUANG 57-A 03 *Monanchora unguiculata* จำนวน 4.55×10^6 โคโลนีต่อกรัม และ จำนวนน้อยที่สุดใน ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง MHUK 57-B 02 *Xestospongia testudinaria* จำนวน 5.40×10^4 โคโลนีต่อกรัม ในส่วนของน้ำทะเลได้ทำการเก็บจากบริเวณร่องน้ำระหว่างเกาะลูกลม ถึงเกาะแรด พบมีแบคทีเรียเจริญได้ในประชาคมจำนวนตั้งแต่ 9.0×10^2 ถึง 7.7×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันให้บริสุทธิ์ได้จากฟองน้ำ 41 สายพันธุ์ จากน้ำทะเล 9 สายพันธุ์ ที่แสดงถึงความหลากหลายและลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียทะเล ยังอยู่ในระหว่างการศึกษา

นอกจากนี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทะเลแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ กับตัวแทนแบคทีเรียกรัมบวกได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC25923; *Bacillus subtillus* ATCC6633; และกรัมลบได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; *Vibrio anguilarum*; *Escherichia coli* ATCC25922) ด้วยวิธี Disc Diffusion Agar

Assay พบว่ามีแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำจำนวน 6 สายพันธุ์ ที่มีฤทธิ์ชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้งแกรมบวกหรือแกรมลบ *B. subtillus* , *S. aureus* และ *V. anguilarum* โดยในจำนวนนี้พบที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้มีเพียง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ CHUAHG A 1-1, และ RAD - 5

บทที่ 2

บทนำ

งานวิจัยนี้ดำเนินงานเพื่อสนองพระราชดำริภายใต้ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี ในบริบท **กิจกรรมที่ 2** กิจกรรมสำรวจเก็บรวบรวมพันธุกรรมพืช **ของ กรอบการเรียนรู้ทรัพยากร** โครงการวิจัยนี้กิจกรรมสำรวจเก็บรวบรวมพันธุกรรมนำเทคโนโลยีชีววิทยาโมเลกุลมาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยแก้ปัญหาด้านงานอนุกรมวิธานสำหรับการบ่งชี้ และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียทะเลในประชาคมหลากชนิดที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำและในน้ำทะเล ซึ่งยังคงมีความสับสนโดยเฉพาะจุลชีพกลุ่มแบคทีเรียทะเล บ่งชี้ได้ยาก และ/หรือที่ไม่สามารถบ่งชี้หรือจัดจำแนกได้ด้วยวิธีการศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยาแต่เพียงอย่างเดียว เนื่องจากเครื่องหมายทางพันธุกรรม คือข้อความหรือลำดับเบสบนจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่มีความจำเพาะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงจากปัจจัยภายนอกเหมือนกับลักษณะสัณฐานวิทยา ที่ลักษณะปรากฏภายนอกเกิดจากการควบคุมและการแสดงออกของยีนบนจีโนม ในโครงการวิจัยนี้จึงเริ่มทดลองศึกษากับแบคทีเรียทะเลหลากชนิดที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำและในน้ำทะเล เป็นอันดับแรก ซึ่งมีปัญหาในด้านการจัดจำแนกในงานอนุกรมวิธาน ลักษณะชีววิทยาและนิเวศวิทยาบางประการ ซึ่งข้อมูลและเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จะเป็นแนวทางให้ทราบถึงความสัมพันธ์ในสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกันในแหล่งอาศัยนี้อีกด้วย ก็จะรักษาพันธุกรรมดั้งเดิมซึ่งจะทำการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปเมื่อมีความพร้อม การสำรวจ ทำรหัสประจำ เพื่อรวบรวมเป็นฐานข้อมูลในพื้นที่

จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์โดยวิธีทางชีวโมเลกุล เพื่อนำไปสู่การพัฒนาพันธุ์ และเก็บเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของฟองน้ำและจุลชีพชนิดนั้น ๆ เครื่องหมายพันธุกรรมที่ได้นี้จะเป็นฐานข้อมูลสากลของฟองน้ำทะเลและสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลของไทยต่อไปในอนาคต

จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ขยายการดำเนินงานเพื่อสนองพระราชดำริ ในกรอบที่ 2 คือ **กรอบการใช้ประโยชน์** โดยดำเนินงานสนับสนุน **กิจกรรมที่ 4 กิจกรรมอนุรักษ์และใช้ประโยชน์พันธุกรรมพืช** เป็นกิจกรรมที่ดำเนินการศึกษาประเมินศักยภาพพันธุกรรมจุลินทรีย์ ที่สำรวจเก็บรวบรวมและเก็บรักษาไว้ โดยมีการศึกษาดำเนินการในห้องปฏิบัติการมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียที่เก็บรักษาและเพาะเลี้ยงได้ เช่น ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตลอดจนคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างรงควัตถุชีวภาพที่น่าสนใจ เพื่อเป็นแนวทางการพัฒนาการใช้ประโยชน์ของทรัพยากรในท้องถิ่นในด้านอื่นๆ นำไปสู่การวางแผนพัฒนาพันธุ์พืชและทรัพยากรต่าง ๆ ต่อไปในอนาคต

มหาสมุทรของโลกกำลังประสบกับความเครียดเป็นประวัติการณ์จากผลกระทบของมนุษย์เช่น สารอาหารที่เพิ่มขึ้นไหลบ่า การประมงที่มากเกิน และการเพิ่มการปล่อยก๊าซเรือนกระจกที่เป็นสาเหตุของ

การเปลี่ยนแปลงในมหาสมุทรทางเคมีและอุณหภูมิประชาคมทางวิทยาศาสตร์ต้องการความรู้และเครื่องมือที่จะคาดการณ์ว่าการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะมีผลวิกฤตต่อระบบนิเวศของมหาสมุทร ในสังคมที่เกี่ยวโยงกับหน้าที่ที่สำคัญมาก ในเป้าหมายระยะยาวของ MMI คือ ความสามารถที่จะเข้าใจที่ครอบคลุมของกลุ่มจุลินทรีย์ในทะเล รวมทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมองค์ประกอบของพวกเขาและหน้าที่; บทบาทต่อระบบนิเวศในมหาสมุทรและผลการสร้างเสริมสุขภาพของมหาสมุทรตลอดผลผลิต

แบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงของคาร์บอนในทะเล ระบบนิเวศและความสำคัญของเชื้อแบคทีเรีย heterotrophic ในทะเล การทำงานในระบบนิเวศได้รับการยอมรับเป็นอย่างดี (Azam et al., 1983) พวกเขาเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของระบบนิเวศทางทะเล ความอุดมสมบูรณ์และชีวมวลมีสูง มีกระบวนการมากกว่ากึ่งหนึ่งของมวลรวมผลผลิตเบื้องต้นและการมีปฏิสัมพันธ์กันอย่างแพร่หลาย กับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Azam, 1998; Fuhrman, 2002) ปริมาณมวลชีวภาพสามารถเทียบได้กับของแพลงก์ตอนพืชในเขต euphotic (Cho และ Azam, 1990; Mitchel et al, 1989;.. Simon et al, 1992)

แม้จะมีความสำคัญดังกล่าวแต่ในทะเลเรื่อง biogeochemistry มีความยากลำบากในการวิเคราะห์และการจำแนกความแตกต่างถิ่นที่อยู่อาศัยในการจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในชุมชนที่ซับซ้อน และความไม่แน่นอนในการเพาะเลี้ยงตามความแตกต่างสายพันธุ์ที่ประกอบด้วยชุมชนให้ทำให้แบคทีเรียกลุ่ม heterotrophic ตกอยู่ในปริศนา “black box” (Fuhrman และ Hagstrom, 2008)

ต่อมาด้วยเทคนิค denaturing gradient gel-electrophoressis ติดตามลายพิมพ์ DNA ช่วยให้ประมาณการกลุ่มที่โดดเด่นของ phylotype ใน ตัวอย่างที่กำหนดได้ (Muyzer et al., 1993) ที่มีความหลากหลายมากของแบคทีเรีย assemblages เช่นในดินนำเสนอหลาย ๆ วง (Muyzer และ Smalla, 1998) ขยายโดยตรงและการวิเคราะห์ของ 16S rRNA ยีน ในน้ำทะเลยังได้รับรายงานมีแถบพันธุกรรมมากถึง 20-35 แถบ(Schauer et al., 2000)

ในช่วงฤดูฝน ฤดูร้อน ของชายฝั่งประเทศไทยเป็นภูมิภาคที่แปรปรวนตามฤดูกาล ในกระบวนการทางชีวภาพที่เด่นชัด คือในช่วงฤดูฝน ทะเลบริเวณใกล้ชายฝั่งที่อุดมไปด้วยสารไนเตรทและปริมาณมหาศาลของ drainages ที่ดินในช่วงระยะเวลามรสุมสูงสุด (กรกฎาคม-ตุลาคม) ปริมาณคลอโรฟิลเพิ่มผลผลิตที่มักจะนำไปสู่การลดลงของ ออกซิเจนละลายน้ำและ denitrification ซัลเฟตที่เพิ่มขึ้นมากเกินไป อุณหภูมิบรรยากาศ 35-39 $^{\circ}$C (ระหว่าง ฤดูร้อน: กุมภาพันธ์- เมษายน ฤดูฝน: กรกฎาคม-ตุลาคม) และ 25 – 29 $^{\circ}$C (ระหว่าง 'ฤดูหนาว': ธันวาคม -มกราคม) ทะเลใกล้ชายฝั่ง อุณหภูมิพื้นผิวยังคงอุ่น ขณะที่ผลกระทบของเหตุการณ์เหล่านี้ในชุมชน autotrophic ก็มีรายงานตลอด

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของประชาคมแบคทีเรียในบริเวณชายฝั่งทะเลไทยไม่มีรายงานปรากฏ ดังนั้นการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค denaturing gradient gel-electrophoressis ติดตามลายพิมพ์ DNA ช่วยให้ประเมินความสำคัญต่อการผันผวนองค์ประกอบของประชาคมแบคทีเรียได้

จากการศึกษาของชุติวรรณและคณะ(2541) พบว่าแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเลของไทยมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น นอกจากนี้ยังรายงานว่าฟองน้ำชนิดเดียวกันที่เก็บในประเทศไทยสถานที่เดียวกันแต่แตกต่างช่วงเวลา จะให้สารประกอบและแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรที่จะสนับสนุนการศึกษาวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลให้มากยิ่งขึ้น และช่วยกันศึกษาวิจัยหลายๆหน่วยงานเพื่อเสริมสร้างความเข้มแข็งศักยภาพในการแข่งขันของประเทศและส่งเสริมให้ประเทศไทยได้พึ่งพาตนเองในด้านอุตสาหกรรมยาอาหารเสริมและผลิตภัณฑ์เคมีได้มากขึ้นและเร็วยิ่งขึ้นทันต่อการพัฒนาประเทศในอนาคตอันใกล้นี้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

6.1 สนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ในกิจกรรมที่ 2 กิจกรรมสำรวจเก็บรวบรวมพันธุกรรมพืช และกิจกรรมที่ 4 กิจกรรมอนุรักษ์และใช้ประโยชน์พันธุกรรมพืช

6.2 เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียทะเลในประชาคมและที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำและน้ำทะเล จากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี เพื่อคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียของไทยที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ

6.3 เพื่อตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านแบคทีเรียจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ดำเนินการศึกษาปริมาณแบคทีเรียทะเลในประชาคมในสิ่งแวดล้อม คัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกได้จากฟองน้ำจากบริเวณพื้นที่ปกปักษ์พันธุกรรมพืช ในพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ หมู่เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เพื่อตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (anti-bacterial activity) และคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างสารชีวรงควัตถุ ของจุลชีพ(แบคทีเรียทะเล) ตลอดจนจำแนกชนิดและศึกษาทางพันธุกรรมของแบคทีเรียทะเล ซึ่งจะเป็นแนวทางต่อการดำเนินการศึกษาด้านสารประกอบทางเคมีสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ที่น่าสนใจต่อไป

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Azam และคณะ (1983)ได้แสดงให้เห็นบทบาทสำคัญของ แบคทีเรียทะเลในการเปลี่ยนแปลงของคาร์บอนระบบนิเวศทางทะเลและโดยเฉพาะความสำคัญของเชื้อแบคทีเรีย heterotrophic ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของระบบนิเวศทางทะเล ได้รับการยอมรับเป็นอย่างดีว่า ให้ความอุดมสมบูรณ์และชีวมวลมีสูง มีกระบวนการมากกว่ากึ่งหนึ่งของมวลรวมผลผลิตเบื้องต้นและการมีปฏิสัมพันธ์กันอย่างแพร่หลาย กับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Azam, 1998; Fuhrman, 2002; 2008) ปริมาณมวลชีวภาพ สามารถเทียบได้กับของแพลงก์ตอนพืชในเขต euphotic (Cho และ Azam, 1990; Mitchel et al, 1989;.. Simon et al, 1992)

เมื่อเร็วๆ นี้ Sigh และ Ramaiah (2011) ได้ศึกษาประชาคมของแบคทีเรียในทะเลอาราเบียน พบว่า ผลวิเคราะห์ด้วยวิธี DGGE ทำให้ทราบถึงความผันผวนชั่วคราวของประชาคมแบคทีเรียในช่วงก่อนมรสุม หลังมรสุม มรสุม ชี้ให้เห็นความสำคัญอย่างยิ่งของแบคทีเรียกลุ่ม gammaproteobacteria, bacteroidetes และ cyanobacteria ที่แปรปรวนไปกับพื้นที่ มีอิทธิพลโดยกระบวนการเกิดมรสุม ตลอดจนยังบ่งชี้อีกว่าปริมาณ Chlorophyll a มีส่วนสำคัญในการควบคุมองค์ประกอบในประชาคมแบคทีเรีย(bacterial communities composition: BCC) จากระดับความลึกบนลงล่าง ในขณะที่ปริมาณไนเตรต นั้นควบคุมจากพื้นท้องทะเลขึ้นมา และ BCC สามารถแปรปรวนได้สูงจากผลของระยะทางในพื้นที่ภูมิศาสตร์เล็กๆ

จากการทดลองในระดับ mesocosm โดย Shafer และคณะ(2001) เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารอาหารกับกิจกรรมและความหลากหลายของแบคทีเรียโดยรวม จากบริเวณทะเลเมดิเตอร์เรเนียน พบการการเปลี่ยนแปลงในความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียเด่น ตรวจสอบโดยลายพิมพ์ DGGE ของผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากวิธี เข้ารหัสยีนส์ PCR 16S rRNA ซึ่งได้แสดงรูปแบบแถบ DGGE ที่เปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกับ ลำดับยีนส์ 16S rRNA ของสมาชิกในกลุ่ม alpha-, gamma- and delta-Proteobacteria and of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides phylum (CFB) นอกจากนี้ ยังใกล้เคียงกับของกลุ่ม Ruegeria-like bacteria โดยเฉพาะ กลุ่ม CFB กลายเป็นกลุ่มที่โดดเด่นในระหว่างที่มีการเพาะบ่ม ซึ่งชี้แนะให้เห็นถึงความสำคัญของประชากรเหล่านี้ที่เป็นผู้สร้างผลผลิตของแบคทีเรียและกิจกรรมหลังระยะการบริโภคในการทดลอง

ต่อมา Xing และ Ren (2006) ได้ทดลองเปรียบเทียบให้เห็นว่า วิธี DGGE นั้นสามารถใช้อธิบายถึงประชาคมจุลินทรีย์ได้จากพื้นฐาน กรดอะมิโนบางส่วน และติดตามแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไม่ได้และยีนส์เฉพาะได้ สามารถวิเคราะห์ความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงประชากรได้

แบคทีเรียทะเลนั้นนอกเหนือจากการมีบทบาทสำคัญในการเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นในระบบนิเวศทางทะเลแล้ว ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกยังแสดงให้เห็นความสำคัญของแบคทีเรีย ที่จะเป็นแหล่งของผลผลิตทุติยภูมิ(secondary metabolites) ที่สร้างขึ้นนั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น การต้านจุลินทรีย์ การต้านมะเร็ง การต้านการอักเสบ ตลอดจนรงควัตถุชีวภาพที่สำคัญ(De Rosa et al.,2000; Faulkner 2000; Kim et al., 2008; Kim and Bhatnagar, 2011)

สำหรับในประเทศไทยนั้นการศึกษาด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำและสิ่งมีชีวิตในทะเลนั้นส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่ฤทธิ์ทางชีวภาพ การศึกษาด้านพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ มีน้อย โดยเฉพาะประเทศไทย Dechsakulwatana และคณะ(2007) ได้รายงานถึงความหลากหลายของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำทะเลในพื้นที่อ่าวไทยที่มีความหลากหลายของฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจได้แก่ *Pseudoalteromonas*, *Psedomonas, Vibrio*

จากผลการศึกษาวิจัยของชุติวรรณและคณะ(2541) Dechsakulwatana et al.(2007) และข้อมูลการวิจัยล่าสุด พ.ศ. 2553-2554 (โดยการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ) ได้ค้นพบสารสำคัญจากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำหลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด และยังมีศักยภาพในการสร้างสารสี(รงควัตถุชีวภาพ) เช่น สาร Violacein(สีม่วง) และ สาร Prodigiosin(สีแดง) ที่มีความคงตัวของสารรงควัตถุ (รูปที่ 2) และจากผลการวิจัยของ Thawornwiriyanun., et al. (2009) ได้วิจัยพบแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่เก็บจากอ่าวไทย สายพันธุ์ *Methylobacterium mesophilicum* MAKB 08-4 สร้างรงควัตถุชีวภาพ Astaxanthin เป็นตัวหลักใน Carotenoids ที่มีสีเหลืองส้มที่นิยมใช้เป็นสีผสมอาหาร เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

ต่อมาในปี ค.ศ. 2012 Thawornwiriyanun., et al. (2012) ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่สำคัญของจุลินทรีย์ทะเลที่เป็นแหล่งของสารสำคัญตัวยาและเวชสำอางทางทะเลโดยเฉพาะอย่างยิ่งได้แก่ สารรงควัตถุแคโรทีนอยด์ กลุ่ม ซีแซนทริน จากแบคทีเรียชนิดใหม่ทะเลของไทยที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Sphingomonas phyllosphaerae* และ *Shingomonas (Blastomonas) nataloria* นอกจากนี้ Kim และ Bhatnagar (2011) ได้รายงานให้เห็นถึงศักยภาพที่สำคัญของทะเลที่เป็นแหล่งของสารสำคัญเวชสำอาง เปปไตด์ กรดอะมิโน(MAAs) คอลลาเจน เอนไซม์ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ antioxidant, antiwrinkle, antityrosinase และ antiacne โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ทะเลที่จะเป็นแหล่งใหม่ของการค้นหาและการผลิตเวชสำอางในปัจจุบันและพัฒนาสู่อุตสาหกรรมเวชสำอางในอนาคตต่อไป นอกจากนี้ Rungprom และคณะ(2008) รายงานการศึกษาแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ *Halisarca*

ectofibrosa ที่เก็บจากชายฝั่งจังหวัดชลบุรี ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารเปปไตด์ชนิดใหม่ของโลก เมื่อจำแนกถึงระดับอณูพันธุกรรม ของแบคทีเรียเป็น *Pseudoalteromonas* sp

ดังนั้นการศึกษาและวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของประชาคมแบคทีเรียในบริเวณชายฝั่งทะเลไทย ไม่มีรายงานปรากฏ ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม DNA ช่วยให้ประเมินความสำคัญต่อการผันผวน องค์ประกอบของประชาคมแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศได้ ตลอดจนการคัดแยกแบคทีเรีย ทะเลเพื่อมาตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพและชีวรงควัตถุที่อาจนำไปพัฒนาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรมและ เวชสำอางได้ต่อไปในอนาคต

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียในประชาคมสิ่งแวดล้อมและที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำทะเล การเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ฟองน้ำ การคัดแยก ตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียทะเล และการศึกษาการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

1.1 **การเก็บตัวอย่าง**

1.1.1 ทำการเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเล (โดยการดำน้ำแบบการใช้เครื่องช่วยหายใจใต้น้ำ (SCUBA diving)) อย่างน้อย 4-8 ตัวอย่าง จากบริเวณเกาะจวง และเกาะปลาหมึก หมู่เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พร้อมบันทึกข้อมูลของสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ความลึกของน้ำ ตัวอย่างฟองน้ำที่เก็บได้ส่วนหนึ่งจะนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอและเก็บรักษาไว้ในเอทธานอล 99% เพื่อไว้ใช้งานในห้องปฏิบัติการ ต่อไป

1.1.2 ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ใต้ผิวน้ำ 0.5 เมตร กลางน้ำ และพื้นท้องน้ำ ในบริเวณ หมู่เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พร้อมบันทึกข้อมูลของสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ความลึกของน้ำ สิ่งแวดล้อม

ตรวจวัดค่าคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ด้วยเครื่อง YSI วัดค่าอุณหภูมิของน้ำทะเลความเค็ม pH, ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

ตัวอย่างน้ำทะเลจะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกจะถูกนำไปดำเนินการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของประชาคมแบคทีเรีย และส่วนที่สองนำไปศึกษาการใช้ประโยชน์ โดยดำเนินการดังนี้

1.2 การตรวจปริมาณแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้(Total Viable Bacteria) และการคัดแยกแบคทีเรียทะเลให้บริสุทธิ์ (Isolation and Purification)

ทำการเกลี่ยกระจายตัวอย่างฟองน้ำและน้ำทะเล ที่ผ่านการเตรียมตัวอย่าง ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง(26 ^{o}C) เป็นเวลา 3-5 วัน นำมาคัดเลือกโดยดูจากลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันของโคโลนีแบคทีเรีย แล้วทำการคัดแยกให้บริสุทธิ์ และเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

1.3 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (อยู่ในระหว่างการศึกษา)

ทำการสกัดดีเอ็นเอทำ 2 ซ้ำ ทั้งสองตัวอย่างน้ำ (~ 2 ลิตร) เป็นกรองผ่านตลับ : Sterivex ที่ใส่เมมเบรน กรองขนาดรู 0.2 µm เพื่อทำการกรองเก็บเซลล์จุลินทรีย์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอภายหลัง เติมตลับเต็มด้วย 1.8 ml buffer (50 mM Tris pH 8.3, 40 mM EDTA และซูโครส M 0.75) ปิดผนึกและแช่แข็ง นำกลับไปยังห้องปฏิบัติการและเก็บไว้ที่ - 80 องศาเซลเซียสจน-กว่าจะดำเนินการวิเคราะห์ การสกัดดีเอ็นเอ และการทำให้บริสุทธิ์ถูกพาตัวออกตามที่อธิบายโดย Ferrari และ Hollibaugh (1999) ในทุกทั้งหมด 72 extractions ถูกสร้างขึ้นมา และดีเอ็นเอจากตัวอย่างซ้ำถูก pooled ความสมบูรณ์ของทั้งหมด 36 ดีเอ็นเอสิ่งแวดล้อมถูกตรวจสอบเมื่อ 0.7% agarose gel

อย่างไรก็ตามควรเพิ่มการตรวจสอบให้ได้หลายชนิดมากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ ควรดำเนินการสำหรับแต่ละตัวอย่างซ้ำเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ถูก pooled ออกและทดสอบซ้ำบน 2% agarose gel

แบ่งตัวอย่างน้ำทะเล 25 มล. ถูกเก็บรักษากับฟอร์มาลดีไฮด์บัฟเฟอร์ (ที่ 2% ความเข้มข้นสุดท้าย) และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสในที่มืดจนนำขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ การสุ่มตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ตัวอย่างน้ำทะเลย้อมด้วย 4'6'-diamidino-2- phenylindole (DAPI; 1 Jg ML-1, ความเข้มข้นสุดท้าย) และกรองบนแผ่นเมมเบรนสีดำขนาด 0.2 µm (โพลีคาร์บอเนตเมมเบรน (Millipore,) U.S.A นำแต่ละตัวอย่างไปนับใต้กล้องจุลทรรศน์ Epifluorescence โดยใช้ Olympus (BX 51, ญี่ปุ่น) นับขั้นต่ำ 10 พื้นที่ แล้วหาค่าเฉลี่ย TBC

การสกัดดีเอ็นเอ:

สกัดดีเอ็นเอทำ 2 ซ้ำ ทั้งสองตัวอย่างน้ำ (~ 2 ลิตร) เป็นกรองผ่านตลับ : Sterivex ที่ใส่เมมเบรน กรองขนาดรู 0.2 µm เพื่อทำการกรองเก็บเซลล์จุลินทรีย์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอภายหลัง เติมตลับเต็มด้วย 1.8 ml buffer (50 mM Tris pH 8.3, 40 mM EDTA และซูโครส M 0.75) ปิดผนึกและแช่แข็ง นำกลับไปยังห้องปฏิบัติการและเก็บไว้ที่ - 80 องศาเซลเซียสจน-กว่าจะดำเนินการวิเคราะห์ การสกัดดีเอ็นเอและการทำให้บริสุทธิ์ถูกพาตัวออกตามที่อธิบายโดย Ferrari และ Hollibaugh (1999) ในทุกทั้งหมด 72 extractions ถูกสร้างขึ้นมา และดีเอ็นเอจากตัวอย่างซ้ำถูก pooled ความสมบูรณ์ของทั้งหมด 36 ดีเอ็นเอสิ่งแวดล้อมถูกตรวจสอบเมื่อ 0.7% agarose gel

อย่างไรก็ตามควรเพิ่มการตรวจสอบให้ได้หลายชนิดมากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ ควรดำเนินการสำหรับแต่ละตัวอย่างซ้ำเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ถูก pooled ออกและทดสอบซ้ำบน 2% agarose gel

ตอนที่ 2 การศึกษาการใช้ประโยชน์ การตรวจหาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมาตรฐานที่ทดสอบ (Screening of anti-bacterial activity)

2.1 นำตัวอย่างน้ำทะเล 0.1 มล. เกลี่ยกระจายบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย modified Zobell อีกส่วนน้ำทะเล 10 มล. กรองผ่านชุดกรอง ที่ใส่เมมเบรน กรองขนาดรู 0.2 μm เพื่อทำการกรองเก็บเซลล์จุลินทรีย์ นำแผ่นที่กรองไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน นำจานตัวอย่างที่มีโคโลนีแบคทีเรียเจริญขึ้นนับจำนวนแบคทีเรีย บันทึกผล จากนั้นคัดแยกแบคทีเรียแบบสุ่มไปเพาะเลี้ยงให้บริสุทธิ์ เก็บรักษาแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้ เพื่อนำไปตรวจหาฤทธิ์ทางชีภาพต่อไป

2.2 เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (Standard test strain) ในอาหารวุ้น Tryptic Soy Agar medium หรือ Mueller Hinton medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

- การถ่ายเชื้อ ลงในหลอดอาหารเหลว TSB (heavy inoculate) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในการเขย่าในแนวราบ (100 รอบต่อนาที)
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (O.D. ที่ 600 nm) ของเชื้อ Standard test strain โดยจะใช้ทำการทดลองเมื่อมีค่า O.D. ประมาณ 0.5 – 1.0
- ดูดเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงใน Tryptic Soy Agar medium หรือ Mueller Hinton medium plate แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำซ้ำ 2 จาน (duplicates)

การเตรียม Standard test strains ได้แก่

แกรมบวก	**แกรมลบ**
- *Staphylococcus aureus* ATCC25923	- *Vibrio . anguillarum / Vibrio parahaemolyticus*
- *Bacillus subtilis* ATCC6633	- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC
- *Micrococcus luteus*	- *Escherichia coli* ATCC25922

2.3 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนด (Screening of Antimicrobial activity assay)

การตรวจหาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ(target strains) และยืนยันผล (Screening of antimicrobial activity

2.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำ (test strain)

- เลี้ยงแบคทีเรียจากฟองน้ำแต่ละสายพันธุ์ (test strain) บนอาหารวุ้น modified Zobell agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

- ทำการถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว modified Zobell broth (Heavy inoculate) ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร หรือ 1-10 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่าในแนวราบ (100 รอบต่อนาที)

- วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (O.D. ที่ 600 nm) และนำเชื้อที่มีค่า O.D. ระหว่าง 0.6 – 1.0 มาทำการทดสอบต่อไป

ทำการทดสอบโดยวิธี Disc Diffusion Assay วัดผลประสิทธิภาพการยับยั้งจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้ง(inhibition zone) โดยหยดเชื้อหรือสารลงบน antibiotic assay disc (AA disc) แล้ววางลงบนจานเพาะเชื้อมาตรฐาน โดยสังเกตผลทุก 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

- นำ antibiotic assay disc (AA disc) ที่ปราศจากเชื้อ ขนาด 13 มิลลิเมตร วางบน petri dish ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นดูดเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากฟองน้ำมา 0.1 มิลลิเมตร มาหยดลงบน sterile AA disc ทิ้งไว้สักครู่ แล้วนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ standard ที่เตรียมไว้แล้ว นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 – 24 ชั่วโมง และควบคุมการทดลองโดยใช้ standard antibiotic disc ที่มี Oxytetracyclin 30 ไมโครกรัมและ Streptomycin 10 ไมโครกรัมต่อ disc โดยทำกาทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง (duplicates)

ส่วน 1-10 ลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยง นำไปสกัดด้วยสารละลาย ethyl acetate, chloroform: methanol, ethanol แล้วทำการละเหยแห้ง เมื่อจะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจึงละลายด้วย Dimethylsulfo oxide(DMSO) ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

- ทำการวัดผลฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยการวัดขนาดของบริเวณที่ยับยั้ง (inhibition zone) โดยสังเกตผลทุก 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

สำหรับแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่กำหนดจะนำมาทดสอบสารสกัดเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ในขั้นตอนต่อไปในอนาคต

การตรวจสอบขั้นยืนยันผลฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมาตรฐาน

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมาตรฐาน ให้ได้ปริมาณ 1-10 ลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยง นำไปดำเนินการสกัดสารอย่างหยาบจากแบคทีเรียทะเลด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate, ตัวทำละลายผสม chloroform: methanol, หรือ ethanol แล้วทำการลระเหยแห้งภายใต้การลดความดัน (Vacuum Rotary Evaporator) เมื่อจะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงละลายด้วย Dimethylsulfo oxide(DMSO) ความเข้มข้นตามที่ต้องการ ทำการทดสอบและวัดผลเช่นเดียวกับในตอนที่ 2

บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

ตอนที่ 1 การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียในประชาคมสิ่งแวดล้อมและที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำทะเล การเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ฟองน้ำ การคัดแยก ตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียทะเล และการศึกษาการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

1.1 **การเก็บตัวอย่าง**

ทำการเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลและตัวอย่างน้ำทะเล (โดยการดำน้ำแบบการใช้เครื่องช่วยหายใจใต้น้ำ (SCUBA diving)) ได้ 7 ตัวอย่าง จากบริเวณเกาะจวง และเกาะปลาหมึก และทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากบริเวณร่องน้ำระหว่าง เกาะลูกลมและเกาะแรด จำนวน 3 สถานี หมู่เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พร้อมบันทึกข้อมูลของสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ความลึกของน้ำ ตัวอย่างฟองน้ำที่เก็บได้ส่วนหนึ่งจะนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอและเก็บรักษาไว้ในเอทธานอล 99% เพื่อไว้ใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการต่อไป

1.2 การตรวจปริมาณแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้และการคัดแยกแบคทีเรียทะเลให้บริสุทธิ์

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเล 7 ชนิด ที่เก็บจากพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี บริเวณเกาะจวง และเกาะปลาหมึก หมู่เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พบว่ามีแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำในปริมาณที่แตกต่างกัน สามารถพบประชากรแบคทีเรียอาศัยอยู่ในฟองน้ำแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันโดยพบมีแบคทีเรียอาศัยอยู่มากที่สุด ฟองน้ำเคลือบบางสีแดงCHUANG 57-A 03 *Monanchora unguiculata* จำนวน 4.55×10^{6} โคโลนีต่อกรัม และ จำนวนน้อยที่สุดใน ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง MHUK 57-B 02 *Xestospongia testudinaria* จำนวน 5.40×10^{4} โคโลนีต่อกรัม ในส่วนของน้ำทะเลได้ทำการเก็บจากบริเวณร่องน้ำระหว่างเกาะลูกลม ถึงเกาะแรด พบมีแบคทีเรียเจริญได้ในประชาคมจำนวนตั้งแต่ 9.0×10^{2} ถึง 7.7×10^{4} โคโลนีต่อกรัม สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันให้บริสุทธิ์ได้จากฟองน้ำ 41 สายพันธุ์ จากน้ำทะเล 14 สายพันธุ์ ที่แสดงถึงความหลากหลายและลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียทะเล ยังอยู่ในระหว่างการศึกษ และเก็บรักษาสาย

พันธุ์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Zobell 0.3% agar ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1, และตารางที่ 2 ตามลำดับ และตัวอย่างฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่เพาะเลี้ยงได้ดังแผ่นภาพที่ 1

เมื่อได้แบคทีเรียบริสุทธิ์แล้ว ทำการเก็บรักษาเพื่อดำเนินการทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมาตรฐานที่ทดสอบ

ตอนที่ 2 การตรวจสอบขั้นยืนยันผลฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมาตรฐาน

นอกจากการศึกษาประชาคม และลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียทะเลแล้ว ยังมีในส่วนของการศึกษาเพื่อตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ จากจุลชีพที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลและในน้ำทะเลเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทะเลแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ กับตัวแทนแบคทีเรีย ด้วยวิธี Disc Diffusion Agar Assay พบว่า พบว่ามีแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำออกฤทธิ์ชีวภาพจำนวน 5 สายพันธุ์ โดยในจำนวนนี้พบที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtillus* ; *S. aureus* ได้ ได้แก่สายพันธุ์ CHAUNG 57 A 1-2**,** CHAUNG 57 B 2-4, MHUK 57 B 1-3 B จากฟองน้ำ โดยในจำนวนนี้พบที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ทดสอบ *V. anguilarum* มีเพียง 2 สายพันธุ์

และเมื่อดำเนินการเพาะเลี้ยงทดสอบซ้ำเพื่อตรวจหาประสิทธิภาพเพื่อยืนยันฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญกับตัวแทนแบคทีเรียด้วยวิธี Disc Diffusion Agar Assay พบว่ามีแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำยังคงแสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง ซึ่งยังมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 1 จำนวนแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำบริเวณเกาะจวง และเกาะปลาหมึก หมู่เกาะแสมสาร อ.สัตหีบ จังหวัดชลบุรี

รหัส	**ชื่อฟองน้ำ**			จำนวนแบคทีเรียทะเลทั้งหมดที่พบในฟองน้ำ(CFU/g)
	ชื่อไทย	**ชื่อวิทยาศาสตร์**		
CHUANG 57-A 01	ฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง	*Xestospongia*	*testudinaria*	2.54×10^5
CHUANG 57-A 02	ฟองน้ำสีน้ำเงิน	*Neopetrosia*	sp. "blue"	1.86×10^5
CHUANG 57-A 03	ฟองน้ำเคลือบบางสีแดง	*Monanchora*	*unguiculata*	4.55×10^6
CHUANG 57-A 04	ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง	*Iotrochota*	baculifera	7.98×10^5
MHUK 57-B 01	ฟองน้ำก้อนหนามสีดำ	*Clathria (Thalysia)*	*reinwardti*	1.41×10^5
MHUK 57-B 02	ฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง	*Xestospongia*	*testudinaria*	5.40×10^4
MHUK 57-B 03	ฟองน้ำยืดหยุ่นสีดำ	*Hyrtios*	*erectus*	1.59×10^6

3. วิเคราะห์ สรุปผล และเสนอแนะ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับดำเนินการในแง่มุมอื่น ๆ เพิ่มเติม

ตารางที่ 2 จำนวนแบคทีเรียทะเลที่แยกได้น้ำทะเลบริเวณระหว่างเกาะลูกลมและเกาะแรด หมู่เกาะแสมสาร อ.สัตหีบ จังหวัดชลบุรี

รหัส	พื้นที่	จำนวนแบคทีเรียทะเลทั้งหมดที่พบในน้ำทะเล(CFU/ml)
1. LL	เกาะลูกลม	5.04×10^4
2. LR-M	กลางร่องน้ำระหว่างเกาะลูกลมและเกาะแรด	9.0×10^2
3. RAD	เกาะแรด	7.7×10^4

ตารางที่ 3 ผลการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบ โดยแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำบางชนิด
(แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของบริเวณที่ยับยั้ง: SA= *Staphylococcus aureus*; BS= *Bacillus subtillus*; VA= *Vibrio anguillarum*; EC= *Escherichia coli*)

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)			
		B. subtilis	***S. aureus***	***V.** anguillarum*	***E. coli***
1	CHUANG A 1-1	20.0	20.0	19.0	-
2	CHUANG A 1-2	17.0	-	-	-
3	CHUANG A 1-3	-	-	-	-
4	CHUANG A 1-4	-	-	-	-
5	CHUANG A 1-5	-	-	-	-
6	CHUANG A 1-6	-	-	-	-
7	CHUANG A 1-7	-	-	-	-
8	CHUANG A 2-1	-	-	-	-
9	CHUANG A 2-2	-	-	-	-
10	CHUANG A 2-3	-	-	-	-
11	CHUANG A 2-4	23.5	16.5	-	-
12	CHUANG A 2-5	-	-	-	-
13	CHUANG A 2-6	-	-	-	-
14	CHUANG A 3-1	-	-	-	-
15	CHUANG A 3-2	-	-	-	-
16	CHUANG A 3-3	-	-	-	-
17	CHUANG A 3-4	16.0	22.5	17.5	-
18	CHUANG A 3-5	-	-	-	-
19	CHUANG A 3-6	-	-	-	-
20	CHUANG A 4-1	-	-	-	-
21	CHUANG A 4-2	-	-	-	-
22	CHUANG A 4-3	-	-	-	-
23	CHUANG A 4-4	-	-	-	-
24	CHUANG A 4-5	-	-	-	-

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)			
		B. subtilis	***S. aureus***	***V.*** *anguillarum*	***E. coli***
25	MHUK B 1-1	-	-	-	-
26	MHUK B 1-2	-	-	-	-
27	MHUK B 1-3	-	-	-	-
28	MHUK B 1-4	-	-	-	-
29	MHUK B 1-5	-	-	-	-
30	MHUK B 2-1	23.5	16.5	19.50	-
31	MHUK B 2-2	-	-	-	-
32	MHUK B 2-3	-	-	-	-
33	MHUK B 2-4				-
34	MHUK B 2-5	-	-	-	-
35	MHUK B 2-6	-	-	-	-
36	MHUK B 3-1	16.0	22.5	17.5	-
38	MHUK B 3-2	-	-	-	-
39	MHUK B 3-3	-	-	-	-
40	MHUK B 3-4	-	-	-	-
41	MHUK B 3-5	-	-	-	-

ตารางที่ 3 ผลการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบ โดยแบคทีเรียทะเล

(แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของบริเวณที่ยับยั้ง: SA= *Staphylococcus aureus*; BS= *Bacillus subtillus*; VA= *Vibrio anguillarum*; EC= *Escherichia coli*)

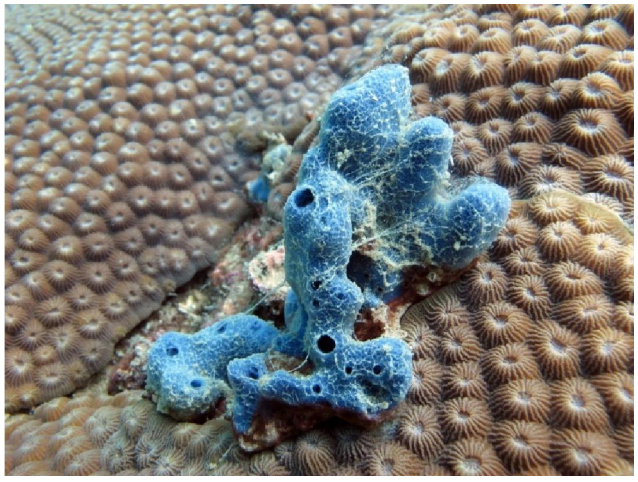
ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)			
		B. subtilis	***S. aureus***	***V.*** *anguillarum*	***E. coli***
1	LL - 1	-	-	-	-
2	LL - 2	17.0	-	-	-
3	LL - 3	-	-	-	-
4	LL - 4	-	-	-	-
5	LL - 5	20.0	19.0	-	-
6	LL - 6	-	-	-	-
7	LR-M - 1	-	-	-	-
8	LR-M - 2	-	-	-	-
9	LR-M – 3	19.0	-	-	-
10	LR-M – 4	-	-	-	-
11	LR-M – 5	-	-	-	-
12	LR-M - 6	-	-	-	-
13	RAD - 1	-	-	-	-
14	RAD - 2	-	-	-	-
15	RAD - 3	-	-	-	-
16	RAD - 4	-	-	-	-
17	RAD - 5	22.5	19.0	17.0	-

รูปที่ 1 ฟองน้ำเคลือบบางสีแดง(แทน) CHUANG -A 03

Monanchora unguiculata

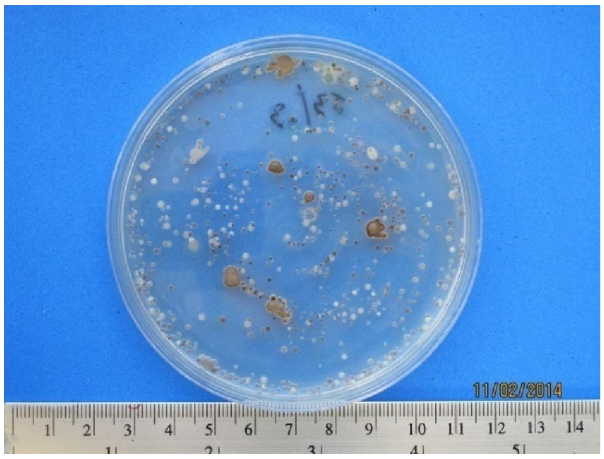
รูปที่ 2 ฟองน้ำครก (แทน) MHUK -B 02

Xestospongia testudinaria



รูปที่ 3 ฟองน้ำสีน้ำเงิน (แทน) CHUANG -A 1-1

Neopetrosia blue



รูปที่ 4 แบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำเคลือบบางสีแดง CHUANG 57-A 03 จำนวน 4.55 x 10^6 โคโลนีต่อกรัม

รูปที่ 5 แบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำยืดหยุ่นสีดำ MHUK 57-B 03 ที่สามารถการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 1.59 x 10^6 โคโลนีต่อกรัม

แผ่นภาพที่ 1 ตัวอย่างฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่เพาะเลี้ยงได้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

ประชากรแบคทีเรียอาศัยอยู่ในฟองน้ำแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันโดยพบมีแบคทีเรียอาศัยอยู่มากที่สุด ฟองน้ำเคลือบบางสีแดง CHUANG 57-A 03 *Monanchora unguiculata* จำนวน 4.55 x 10^6 โคโลนีต่อกรัม และ จำนวนน้อยที่สุดใน พบจำนวน 5.40 x 10^4 โคโลนีต่อกรัม ในขณะที่ส่วนของน้ำทะเลได้ทำการเก็บจากบริเวณร่องน้ำระหว่างเกาะลูกลม ถึงเกาะแรด พบมีแบคทีเรียเจริญได้ในประชาคมจำนวนน้อยตั้งแต่ 9.0 x 10^2 ถึง 7.7 x 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจเนื่องมาจากประชาคมแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในฟองน้ำอาศัยบริโภคสารอาหารที่มีอยู่อุดมสมบูรณ์ภายในฟองน้ำ

จากการตรวจสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำ ในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพมาต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *และ Vibrio anguillarum* ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจากจำนวนแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำจำนวน 41 สายพันธุ์ที่แยกได้จากฟองน้ำ 7 ตัวอย่าง พบว่ามีแบคทีเรียทะเล 6 สายพันธุ์ ที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ คิดเป็นร้อยละ 14.6 จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ทดสอบทั้ง 2 ชนิด มีเพียง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ CHUANG A 1-1, และ MHUK 2-1

สรุปได้ว่า แบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก(gram positive) ที่ทดสอบ 2 ชนิดคือ *B. subtilis* และ*S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) 1 ชนิดได้แก่ *V. angullarum* โดยไม่พบแบคทีเรียทะเลที่สามารถยับยั้ง *E. coli* ที่ทดสอบได้

ดังนั้นจึงควรที่จะทำการเพาะเลี้ยงจำนวนมากเพื่อทำการสกัดให้ได้สารสกัดหยาบจำนวนมากแล้วนำไปทดสอบในขั้นยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพ ในด้านอื่น ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาสารรงควัตถุชีวภาพเพิ่มเติม ตลอดจนการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในประชาคมของระบบนิเวศทางทะเลต่อไป

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา รวิวรรณ วัฒนะดิลก และสุเมตต์ ปุจฉาการ (2541) การศึกษาสารไบโอแอกทีฟ เมตตาบอไลต์ จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำในประเทศไทย. รายงายฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

Azam, F., T. Fenchel, J.G. Field, J.S. Gray, L.A. Meyer-Reil and F. Thingstad. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser*., 10, 257-263.

Azam, F. 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. 1998. *Science*, 280, 694-696.

Cho, B.C. and F. Azam. 1990. Biogeochemical significance of bacterial biomass. in the oceans euphotic zone. *Mar. Eco. Pro. Ser.,* 63, 253-259.

Cho และ Azam, 1990. Biogeochemical significance of bacterial biomass in the oceans euphotic zone. Mar. Eco. Pro. Ser., 63, 253-259.

De Rosa, S., Milone, A., Ku jumgiev, A., Stefanov, K., Nechev, I., Popov, S., 2000. Metabolites from a marine bacterium *Pseudomonas/ Alteromonas,* associated with sponge*Dysidea fragillis.* Comp. Biochem. Physiol. 1126, 391-396.

Faulkner, D,J., Harper, M.K., Haygood, M.G., Saloman, C.E., and Schmidt, E.W. Symbiotic Bacteria in Sponges : Sources of Bioactive Substances ; in Fusetani, N.(ed)Drugs From the Sea, S. Karger. AG, Basel, 2000, pp. 107 – 119.

Fuhrman, J.A. and A. Hagstrom. 2008. Bacteria and archaeal community structure and its pattern. *In: Microbial ecology of the ocean* (Ed.: D.L. Kirchman). 2nd Edn. (Wiley-blackwell, Canada). pp. 45-90.

Fuhrman, J.A. 2002. Community structure and function in prokaryotic marine plankton. *Anton. Leeun. Int. J. G*., 81, 521-527.

Kim, Se-Kwon, and Bhatnagar, Ira. 2011. Screening Strategies for Discovery of Marine Microbial Cosmeceuticals. *In*: *Marine Cosmeceuticals: Trends and Perspects. Edited by :* Kim, Se-Kwon CRC Press. 428 pp.

Kim, Se-Kwon, and Wijesekara, I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review, *Journal of Functional Foods*, 2: 1-9.

Kim, Se-Kwon, Ravichandran, Y.D., Khan, S.B., and Kim, Y.T. 2008. Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering,* 13:511-523.

Mitchell, J.G., A. Okubo, J.A. Fuhrman and W. Cochlan. 1989. The contribution of phytoplankton to ocean density gradients. *Deep-Sea Res*. I, 36, 1277-1282.

Schäfer H, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Servais P, Pukall R, Stackebrandt E, Troussellier M, Guindulain T, Vives-Rego J, Muyzer G. 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol.* 34(3):243-253.

Sigh, Sanjay Kumar, and Ramaiah, Nagappa. 2011. Denaturing gradient gel electrophoresis profiling of bacterial communities composition in Arabian Sea. *J. Environ. Biol.* 32:339-346.

Simon, M., B.C. Cho and F. Azam. 1992. Significance of bacterial biomass in lakes and the ocean - Comparison to phytoplankton biomass and biogeochemical implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 86, 103-110.

Thawornwiriyanun, Patcharee., **Dechsakulwatana, Chutiwan**, Sunthornsuk, Leena, and Suntornsuk, Worapot. 2009. Carotenoid Production from Sponge-associated Bacteria Isolated in the Gulf of Thailand. *J. Science, Technology, and Humanities*. 7:11-18.

Thawornwiriyanun, Patcharee., Somboon Tanasupawat, **Chutiwan Dechsakulwatana**, Somkiet Techkarnjanaruk, and Worapot Suntornsuk. 2012. Identification of Newly Zeaxanthin-Producing Bacteria Isolated from Sponges in the Gulf of Thailand and their Zeaxanthin Production. Appl Biochem Biotechnol., June 2012, 12 pp.

Wimolpun Rungprom., Lynette K Lambert., **Chutiwan Dechsakulwatana**., Michael C. Barden., Warinthorn Chavasiri., Udom Kokpol., and Mary Garson. 2008. Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed *Diginea* sp. and the sponge *Halisarca ectofibrosa*. ***Tetrahedron***. 64(14):3147-3152.

Webster, N.S., Wilson, K.J., Blackall, L.L., and Hill, R.T. 2001. Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Rhopaloeides .odoralbile.*

Xing DF, Ren NQ., 2006. Common problems in the analyses of microbial community by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Wei Sheng Wu Xue Bao.*(Chineese) Apr;46(2):331-5.