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

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลจากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal transcribed spacer

ปิยะเนตร พึ่งพา

16 ส.ค. 2554
291556
TH 00172944
เริ่มบริการ
17 พ.ย. 2554

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
กรกฎาคม 2554

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

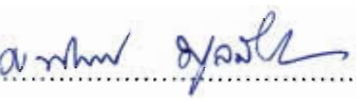
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ปิยะเนตร พึ่งพา ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูดา บุญภักดี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.ถนอมศักดิ์ บุญภักดี)

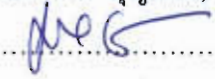
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงทิพย์ มูลมั่งมี)

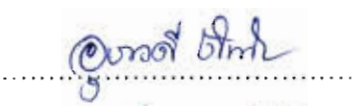
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูดา บุญภักดี)

.....กรรมการ
(ดร.ถนอมศักดิ์ บุญภักดี)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดารัตน์ สวนจิตร)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา



.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษาวดี ดันดิวรานุรักษ์)
วันที่...4...เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2554

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์
จากโครงการบัณฑิตศึกษาของศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม
พิษวิทยาและการบริหารจัดการเคมี
ประจำภาคต้น ปีการศึกษา 2552

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล และให้ข้อมูลตลอดจนความรู้เกี่ยวกับแบคทีเรียและฟองน้ำทะเลสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ และผู้ทรงคุณวุฒิ อาทิ ดร. กาญจนา หริ่มเพ็ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดารัตน์ สวนจิตร อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงทิพย์ มูลมั่งมี อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจสอบรวมทั้งให้คำแนะนำแก้ไขเกี่ยวกับรายละเอียดของงานวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

และขอบพระคุณโครงการบัณฑิตศึกษา ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยาและการบริหารจัดการเคมี ที่ให้ทุนสนับสนุนสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี อาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

ปิยะเนตร พึ่งพา

51911886: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วทม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
คำสำคัญ *16S rRNA/ 23S rRNA/* ITS/ marine sponge/ marine bacteria

ปิยะเนตร พึ่งพา: การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลจากบริเวณหมู่เกาะแสมสารจังหวัดชลบุรี ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal transcribed spacer (DIVERSITY OF BACTERIA ASSOCIATED WITH MARINE SPONGES FROM SAMAESAN ISLANDS, CHONBURI PROVINCE BASED ON INTERNAL TRANSCRIBED SPACER SEQUENCES) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชูตา บุญภักดี, Ph.D., ถนอมศักดิ์ 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* จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) โคลน และอ่านลำดับเบส ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 884-1,409 คู่เบส เมื่อเทียบเคียงลำดับเบสบนฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับเบสในส่วนต้นของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 140 คู่เบส เทียบเคียงได้กับยีน *16S rRNA* มีความเหมือน 84-100 % บ่งชี้แบคทีเรียทะเลได้ทั้งหมด 11 สกุล 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* ยกเว้นไอโซเลต 14, 15, 16, 17 และ 18 ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *23S rRNA* ไม่สามารถระบุได้ เมื่อศึกษาบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ขนาด 236 – 352 คู่เบส พบว่าไม่สามารถเทียบเคียงได้กับฐานข้อมูล GenBank (เมษายน, 2554) และพบว่าลำดับเบสของบริเวณ ITS มีความแตกต่างกันมากระหว่างสกุล แต่มีขนาดค่อนข้างใกล้เคียงกันในไอโซเลตที่จัดไว้เป็นสกุลเดียวกัน เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ *16S -23S rRNA* ของแบคทีเรียแต่ละชนิดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MSe*I พบแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 16 แบบ แต่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างน้อยจึงไม่สามารถระบุความเป็นเอกลักษณ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้ได้

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 *MSe*I, 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..... จ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 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 การจำแนกและบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรีย..... 9

2.5 ข้อความพันธุกรรมของแบคทีเรีย..... 13

2.6 เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยาพีซีอาร์ (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 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดสำเร็จ High Speed Plasmid Mini Kit	26
	3.7 การวิเคราะห์และยืนยันผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ และการสร้างเดนโดรแกรม	27
	3.8 การตัดผลิตผล PCR ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (PCR-RFLP)	27
4	ผลการวิจัย	28
	4.1 ขนาดของผลผลิต PCR ระหว่างยีน *16S – 23S rRNA*	28
	4.2 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอระหว่างยีน *16S - 23S rRNA* ของแบคทีเรีย	29
	4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	29
	4.4 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ และเดนโดรแกรมความสัมพันธ์	31
	4.5 การจำลองการตัดผลผลิต PCR ระหว่างยีน *16 – 23S rRNA*ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์	52
5	อภิปรายและสรุปผล	59
	บรรณานุกรม	67
	ภาคผนวก	73
	ภาคผนวก ก	74
	ภาคผนวก ข	83
	ประวัติย่อของผู้วิจัย	93

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2 – 1 ลักษณะการดำรงชีวิตแบ่งตามความต้องการแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน..... 10

4 – 1 ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ในช่วงระหว่างยีน *16S – 23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต..... 30

4 - 2 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลโดยเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* กับฐานข้อมูล Genbank..... 33

4 – 3 เมตริกซ์เปรียบเทียบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *16S rRNA* ของแบคทีเรียทั้งหมด 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล..... 36

4 - 4 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลโดยเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA* กับฐานข้อมูล Genbank..... 39

4 - 5 เมตริกซ์เปรียบเทียบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *23S rRNA* ของแบคทีเรียทั้งหมด 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล..... 44

4 - 6 สรุปข้อมูลของลำดับเบสในบริเวณ ITS ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล..... 47

4 – 7 เมตริกซ์เปรียบเทียบของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 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 โครงสร้างของชุดยีน *rRNA* ของแบคทีเรีย (แสดงบริเวณยีน *16S, 23S* และ *5S rRNA*)..... 14

2-4 หลักการและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR..... 16

2-5 จำลองความแตกต่างของรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ..... 17

4-1 ผลผลิต PCR ระหว่างยีน *16S - 23S rRNA* ของแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล 8 ชนิด..... 29

4-2 พลาสมิดลูกผสมระหว่างยีน *16S - 23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล 30

4-3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลจำนวน 19 ไอโซเลต..... 34

4-4 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต..... 37

4-5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA* ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลจำนวน 19 ไอโซเลต..... 40

4-6 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต..... 45

4-7 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเล 48

4-8 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS..... 51

4-9 แผนที่แสดงตำแหน่งการตัดผลผลิต PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* ระหว่าง*ยีน 16 – 23S rRNA* ด้วยโปรแกรมตัดเอนไซม์..... 52

4-10 รูปแบบดีเอ็นเอภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *MseI*ของแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลต 57

4-11 รูปแบบดีเอ็นเอภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* ของแบคทีเรียสกุลเดียวกัน..... 58

สารบัญผนวก

ผนวกที่ หน้า

1 ฐานข้อมูลฟองน้ำทะเลโครงการวิจัยย่อยที่ 1 สถานภาพทรัพยากรสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศชายฝั่งทะเล บริเวณหาดนางรอง เกาะจระเข้และกลุ่มเกาะจวง อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี..... 76

2 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่อยู่รวมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต..... 79

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีการดำรงชีวิตทั้งแบบอิสระ (free living) อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น (symbiosis) หรือดำรงชีวิตแบบปรสิต (Parasitism) การดำรงชีวิตแบบอิสระนั้นพบได้ตามแหล่งต่าง ๆ เช่น น้ำจืด น้ำทะเล และตะกอนดิน ส่วนการดำรงชีวิตแบบอาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิดอื่น เช่น สาหร่าย พืช และสัตว์ เป็นต้น โดยพบว่าสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีแบคทีเรียอาศัยอยู่ร่วมมากที่สุดคือ ฟองน้ำทะเล เนื่องจากโครงร่างที่มีรูพรุนโดยรอบของสิ่งมีชีวิตชนิดนี้ มีรายงานพบว่าแบคทีเรียที่แยกออกจากฟองน้ำทะเลมีมากถึง 33% ในขณะที่แยกออกจากน้ำทะเลมีเพียง 2% เท่านั้น (Kelecom, 2002)

ปัจจุบันมนุษย์ใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลหลายประการ โดยเฉพาะสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่สกัดได้จากแบคทีเรียดังกล่าว แบคทีเรียเหล่านี้อยู่ร่วมอย่างจำเพาะกับฟองน้ำทะเล (Taylor, Schupp, Dahllof, Kjelleberg, & Steinberg, 2004) เช่น แบคทีเรีย *Pseudomonas aeroginosa* อาศัยอยู่กับฟองน้ำ *Isodictya setifera* สร้างสาร diketopiperazine และ phenazines ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด (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. สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphyloccoccus aureus* และ *S. epidermidis* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (Hentschel, Schmid, Wagner, Gernert, & Hacker, 2001) ในขณะที่แบคทีเรีย *Salinispora* sp. ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Pseudoceratina clavata* มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำไปใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะรักษาโรควัณโรคและการติดเชื้อจากแบคทีเรียอื่นได้ (Kim, Garson, & Fuerst, 2005) นอกจากนี้ยังใช้แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของโลหะหนักจำพวก Cd และ Hg ได้แก่ แบคทีเรีย *Streptomyces* sp., *Salinobacter* sp., *Vibrio Reseobacter*, *Micromonospra* sp., *Alteromanas* sp. และ *Saccharomonaspora* sp. ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *Fasciospongia cavernosa*

เป็นต้น (Selvin, Shanmugha, Seghal, Thangavelu, & Bai, 2007) ดังนั้นการจัดจำแนกหรือระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเพื่อนำไปใช้ประโยชน์จึงมีความสำคัญ

การจัดจำแนกแบคทีเรียทำได้หลายวิธี เช่น ตามลักษณะการเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยง (Cultural characteristis) คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristis) คุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristis) และคุณสมบัติขององค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition characteristis) (Roszak & Colwell, 1987) เป็นต้น วิธีการเหล่านี้สามารถจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดแบคทีเรียในเบื้องต้นได้หลายชนิด แต่ยังมีแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้อย่างชัดเจนและยืนยันผลได้แน่นอนด้วยวิธีการดังกล่าว ลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นข้อความพันธุกรรมจึงมีบทบาทสำคัญที่นำมาช่วยในการจัดจำแนกกลุ่ม/ชนิดของแบคทีเรียให้ชัดเจนและถูกต้องมากยิ่งขึ้น 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., *Arthobacte* sp., *Micrococcus* sp. และ *Vibrio* sp. ที่สกัดได้จากฟองน้ำทะเล *Aplysina aerphoba* และ *A. cavernicola* (Hentschel et al., 2001) เป็นต้น ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ในระดับสกุล รวมถึงในส่วนของยีน *23S rRNA* ที่ปรากฏในรายงานวิจัยของ Webster et al. (2004) ศึกษาแบคทีเรียที่สกัดได้จากฟองน้ำทะเล *Rhopaloeides odorabile* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ *23S rRNA* สามารถจำแนกแบคทีเรียไว้ในดิวิชั่น α - proteobacteria, Actinobacteria นอกจากนี้ยังศึกษาแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ที่แยกได้มาจากแหล่งธรรมชาติและผู้ป่วยในโรงพยาบาล เช่น แบคทีเรีย *Vibrio navarrensis*, *V. vulnificus*, *V. fischeri*, *V. logei* และ *V. mediterranei* เป็นต้น (Hoffmann et al., 2010) นอกจากนี้มีรายงานการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) อยู่ระหว่างยีน *16S-23S rRNA* ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความแปรผันของข้อความทางพันธุกรรมระหว่างชนิดค่อนข้างสูงถูกนำมาใช้วิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างชนิดของแบคทีเรีย (Rocap, Distel, Waterbury, & Chisholm, 2002) เช่น Family *Vibrioceae* (Lee et al., 2002) กลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* ในน้ำพุร้อน (Ferris, Kuhl, Wieland, & Ward, 2003) แบคทีเรียสกุล *Microcystis* (Boyer, Johensen, & Flechtner, 2002) และกลุ่มแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *Rhopaloeides odorabile* (Webster, Wilson, Blackall, & Hill, 2001) เป็นต้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA* เพื่อยืนยันบ่งชี้แบคทีเรียในระดับสกุล ชนิดหรือสายพันธุ์ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลบางชนิดซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้จากหมู่เกาะแสมสาร อ. สัตหีบ จ.ชลบุรี และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแบคทีเรียดังกล่าว

เพื่อจะสามารถพิจารณานำมาใช้บ่งชี้ชนิดได้อย่างจำเพาะและนำแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ในลำดับต่อไปได้

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) ได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเอกลักษณ์ของแบคทีเรียบางชนิดที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้จากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร

3) เป็นข้อมูลในการศึกษาเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ บนฐานข้อมูล GenBank ในลำดับต่อไป

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างของแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลต ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลที่เก็บรวบรวมจากหมู่เกาะแสมสาร อ. สัตหีบ จ.ชลบุรี จำนวน 8 ชนิด โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงระหว่างยีน *16S-23S rRNA* ITS ด้วยวิธี PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์เดียวกันทำการโคลนและอ่านลำดับเบส และนำข้อมูลลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยเฉพาะในส่วนของยีน *16S rRNA* และ

23S rRNA เพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียในเบื้องต้นแล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS แล้วจำลองรูปแบบของแถบดีเอ็นเอภายหลังตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม ยืนยันผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาทั่วไปของฟองน้ำทะเล (บพิธ จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์, 2547)

ฟองน้ำเป็นสัตว์หลายเซลล์ที่มีวิวัฒนาการต่ำสุดมีรูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่เป็นรูปทรงกระบอกติดอยู่กับก้อนหินหรือวัตถุใต้น้ำ มีรูพรุนเล็ก ๆ ทั่วตัว เซลล์เรียงกันเป็นสองชั้นแต่ยังไม่มีเนื้อเยื่อที่แท้จริงไม่มีอวัยวะและไม่มีทางเดินอาหารส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในทะเล มีบางชนิดอาศัยอยู่ในน้ำจืด ตัวอ่อนมีขนสามารถว่ายน้ำได้เรียกตัวอ่อนในระยะนี้ว่า Amphiblastula หรือ Parechymula แล้วแต่ว่าจะเป็นฟองน้ำชนิดใด โดยจะว่ายน้ำไปเกาะตามก้อนหินและเจริญเป็นฟองน้ำตัวเต็มวัยที่ดำรงชีวิตโดยการเกาะนิ่งอยู่กับที่

ฟองน้ำมีลักษณะสำคัญดังนี้

1) ลำตัวมีรูพรุน มีทางน้ำเข้า (ostium) และทางน้ำออก (osculum) ช่องว่างใหญ่กลางตัวเรียก spongocoel

2) มีเซลล์ที่มีลักษณะเป็นปลอกและมีแส้ช่วยโบกพัดทำให้น้ำเคลื่อนผ่านลำตัว และทำหน้าที่กินสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ที่ปะปนมากับน้ำทะเล เรียกเซลล์นี้ว่า เซลล์ปลอกคอ (collar cell or choanocyte)

3) มีโครงสร้างค้ำจุนระหว่างเนื้อเยื่อชั้นนอกกับชั้นในเพื่อให้คงรูปอยู่ได้โดยอยู่ในชั้นมีเซนไคม์หรือมีโซฮีล โครงสร้างค้ำจุนมีอยู่ 2 แบบ คือ หนามฟองน้ำหรือขวาก (spicule) และเส้นใยฟองน้ำ (spongin finber)

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

5) การสืบพันธุ์แบบทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ส่วนใหญ่ฟองน้ำมีเพศรวม (monoecious) มีการผสมพันธุ์ข้ามตัวโดยมีการปฏิสนธิภายในตัวและใช้ระบบหมุนเวียนน้ำพาอสุจิไปยังฟองน้ำตัวอื่น อีกทั้งยังสืบพันธุ์แบบแตกหน่อ โดยการสร้างเจมมูลขึ้นมาซึ่งพบในฟองน้ำจืด ตัวอ่อนของฟองน้ำทะเลมีการพัฒนาและเจริญเติบโตในตัวแม่ระยะหนึ่งก่อนแล้วจึงออกสู่ภายนอกล่องลอยตามกระแสน้ำทะเลหรืออยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

บทบาทของฟองน้ำทะเลในระบบนิเวศ

ฟองน้ำทะเลเป็นสัตว์กินอาหารด้วยวิธีการกรอง (filter feeder) โดยกรองน้ำผ่านตัวซึ่งสามารถกรองน้ำทะเลได้มากกว่าสิบเท่าของปริมาตรตัวเองภายใน 1 ชั่วโมง และทำงานต่อเนื่องอยู่ตลอดเวลาทั้งกลางวันและกลางคืน ฟองน้ำทะเลจึงมีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศทางทะเลในแง่การปรับปรุงคุณภาพน้ำทะเลให้ใสสะอาดขึ้น ช่วยกำจัดตะกอนขนาดเล็กและลดปริมาณตะกอนสารอินทรีย์ในน้ำทะเล ฟองน้ำทะเลยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยย่อย (Microhabitat) ให้กับสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอื่น ๆ หลายชนิด เช่น กุ้ง ปู หอย และไส้เดือนทะเลโดยใช้ท่อน้ำของฟองน้ำเป็นแหล่งหลบซ่อนภัยจากศัตรู ดาวเปราะบางชนิดจะเปลี่ยนแปลงหนามใต้แขนเป็นตะขอไว้สำหรับเกาะฟองน้ำและอาศัยกระแสน้ำจากระบบท่อน้ำของฟองน้ำพัดพาอาหารมาให้ด้วย ส่วนปลิงสร้อยไข่มุกมักเก็บกินตะกอนที่ตกค้างอยู่บนลำตัวฟองน้ำเป็นอาหาร เป็นต้น (บพิธ จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์, 2547)

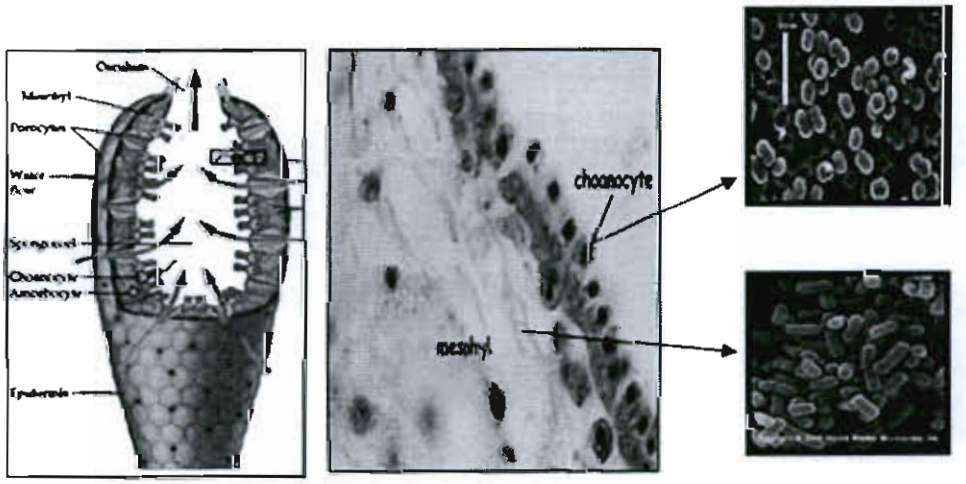
ฟองน้ำบางชนิดสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เช่น ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง (*Oceanpia sagittaria*) จะสร้างท่อน้ำออกเป็นท่อสูงขึ้นเพื่อหลีกเลี่ยงการตกตะกอนของสารแขวนลอยในน้ำทะเล บริเวณที่ฟองน้ำทะเลชนิดนี้อาศัยอยู่เป็นจำนวนมากสามารถบอกได้ว่าสภาวะแวดล้อมบริเวณนั้นมีการตกตะกอนสูง และฟองน้ำฝังตัวชนิด *Cliona* sp. สามารถสร้างกรดที่ย่อยสลายหินปูนและสร้างโพรงอาศัยอยู่ในซากหินปูน มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากปะการังหรือซากเปลือกหอยที่เป็นหินปูน บ่งบอกถึงสภาพธรรมชาติดังกล่าวว่ามีการสลายตัวของแนวปะการัง แต่อย่างไรก็ตามจัดได้ว่าเป็นการหมุนเวียนธาตุคาร์บอนกลับคืนสู่วัฏจักรคาร์บอนในทะเล (สุเมตต์ ปุจฉาการ, 2550)

2.2 แบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล

ฟองน้ำทะเลบางชนิดมีแบคทีเรียที่อาศัยอยู่อย่างจำเพาะเนื่องจากฟองน้ำทะเลมีความสามารถในการกินอาหารแบบกรองจึงสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ปะปนอยู่ในน้ำทะเลได้ โดยยอมให้น้ำทะเลและแบคทีเรียผ่านเข้าฝังตัวในเซลล์ ภายในตัวฟองน้ำทะเลจะพบจำนวนแบคทีเรียถึง 40 % ของน้ำหนักตัว โดยที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลในลักษณะปรสิตมีถึง 60 % (Thoms & Schupp, 2005) แบคทีเรียจะอาศัยอยู่ในชั้น choanocyte และ mesohyl มากที่สุด (ภาพที่ 2 - 1) เนื่องจากชั้น choanocyte ประกอบไปด้วยเซลล์ที่สำคัญของฟองน้ำทะเล เมื่อน้ำทะเลที่มีแบคทีเรียและอาหารพัดผ่านเข้าสู่เซลล์ตัวเซลล์จะโอบล้อมอาหารและแบคทีเรียที่ปะปนอยู่กับน้ำทะเลให้เป็นถุงอาหารไว้ภายในเซลล์และทำการย่อยอาหารในเซลล์โดยตรง ซึ่งในเซลล์ชั้นนี้มีกระบวนต่าง ๆ เกิดขึ้นมากและเป็นเซลล์แรกที่สัมผัสกับน้ำทะเล เมื่อน้ำทะเลไหลผ่านเข้าสู่ภายใน

ตัวฟองน้ำทะเลจึงทำให้โอกาสที่แบคทีเรียฝังตัวมากขึ้น ส่วนชั้น mesohyl มีสารคล้ายวุ้นประเภทเจลลาตินแทรกอยู่ระหว่างชั้น pinacoderm และชั้น choanoderm ซึ่งจะมีเซลล์ที่เคลื่อนที่อยู่ทำหน้าที่ย่อยอาหาร สร้างเซลล์สืบพันธุ์ สร้างโครงร่างค้ำจุนร่างกาย และนำอาหารและน้ำทะเลไปยังเซลล์ต่างๆ (Kelecom, 2002) นอกจากนี้ฟองน้ำทะเลบางชนิดเลี้ยงแบคทีเรียไว้เป็นอาหารของตนเองในระบบท่อและสร้างสารต้านจุลชีพขึ้นมาเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารของตนถูกแย่งจากแบคทีเรียชนิดอื่น 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 ซึ่งนอกจากจะมีความเค็มต่ำแล้วยังมีความขุ่นสูงเนื่องจากตะกอนที่แม่น้ำพัดพามา ลักษณะเช่นนี้จะไม่พบฟองน้ำทะเลอาศัยอยู่ ส่วนในบริเวณน้ำตื้นใกล้ชายหาดหากมีแดดจัดน้ำทะเลจะเกิดการระเหยอย่างรวดเร็วทำให้ความเค็มของน้ำอาจสูงเกินไปจนฟองน้ำไม่สามารถอาศัยอยู่ได้เช่นกัน ในแบคทีเรียหลายชนิดสามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือมากน้อยต่างกัน แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้แม้มีความเข้มข้นของเกลือเพียงเล็กน้อย แบคทีเรียบางชนิดต้องการเกลือปริมาณหนึ่งในการเจริญแต่แบคทีเรียบางกลุ่มอาจเจริญได้แม้อยู่ในสภาวะที่มีเกลือมาก เราเรียกแบคทีเรียกลุ่มนั้นว่า 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) การไหลเวียนของกระแสน้ำและทิศทางการพัดพาน้ำทะเลที่มีแบคทีเรียเจือปนอยู่เข้าสู่เซลล์ฟองน้ำทะเล อีกทั้งแรงของกระแสน้ำทะเลจะทำให้

ตะกอนทรายฟุ้งหรือตะกอนดินน้ำทะเลที่เจือปนอยู่ขึ้นมาปะปนกับกระแสน้ำและพัดเข้าสู่เซลล์ฟองน้ำทะเล อีกทั้งบทบาทของธาตุอาหารที่ส่งผลต่อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล มีหลายระดับ เช่น ในระดับสิ่งมีชีวิต (organism scale) การที่น้ำทะเลมีปริมาณฟอสเฟตในระดับสูงจะขัดขวางกระบวนการสร้างหินปูน (calcification) ของฟองน้ำทะเล ในระดับสังคมสิ่งมีชีวิต (community scale) ปริมาณธาตุอาหารในระดับสูงจะทำให้พวกฟองน้ำเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แบคทีเรียเช่นกันจะอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีปริมาณธาตุอาหารสูงหรือชนิดสารอาหารที่แบคทีเรียแต่ละชนิดต้องการ 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. และจากรายงานการศึกษาในฟองน้ำทะเล 4 ชนิด คือ *Echinodictyum* sp., *Spongia* sp., *Sigmadocia fibulatus* และ *Mycale mannarensis* ที่แพร่กระจายในบริเวณอ่าว Mannar ในประเทศอินเดีย สามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตสารชีวภาพได้จำนวน 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). หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำที่เก็บในน่านน้ำของประเทศออสเตรเลีย พบว่าแบคทีเรียที่อาศัยในฟองน้ำ *Aplysilla sulphurea* มีสาร chromodorolides A, B (2a-2b) และ chromodorolide C (2c) แสดงฤทธิ์ฆ่าหนอนตัวกลม *Haemonchus contortus* และ *Trichostrongylus colubriformis* ในระยะตัวอ่อนซึ่งเป็นตัวก่อโรคที่สำคัญในแกะและปศุสัตว์ และจากรายงานการศึกษาของ Jayatilake et al. (1996) แยกแบคทีเรีย *Pseudomonas aeroginosa* 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 fsciospongia* ในอ่าว Mannar พบแบคทีเรีย *Tmyces* sp., *Ainobacter* sp., *Roseobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Icromonospora* sp., *Accharomonospora* sp. และ *Alteromonas* sp. มีขีนด้านทานโลหะหนักพวก Cd และ Hg ที่ปนเปื้อนกับฟองน้ำทะเล ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางกายภาพของน้ำทะเลได้

2.4 การจำแนกและบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.5 – 2.0 ไมครอน เป็นเซลล์แบบโปรคาริโอตประกอบด้วย เยื่อหุ้มเซลล์ ไซโทพลาสซึม ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ลักษณะรูปแบบ DNA เป็นวงเล็ก ๆ เรียกว่า พลาสมิด (plasmid) ที่ถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียอื่นได้ โดยใช้วิธีคอนจูเกชัน ผนังเซลล์ (cell wall) เป็นสาร peptidoglycan หุ้มเยื่อหุ้มเซลล์ และบางชนิดยังสร้างแคปซูลเป็นสารเมือกหุ้มภายนอกอีกชั้นหนึ่ง (บพิธ จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์, 2547)

ปัจจุบันการจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียมีประโยชน์ทั้งในทางทฤษฎีและปฏิบัติทำให้ทราบถึงการจัดหมวดหมู่ความสัมพันธ์ แหล่งที่มา แบคทีเรียจำนวนหลายพันสกุลได้ถูกจำแนก ตั้งชื่อ และจัดเป็นพวกได้ นักแบคทีเรียวิทยาในสมัยก่อนพบว่าเป็นการสะดวกที่จะจัดแบ่งแบคทีเรียตามรูปร่าง การเรียงตัว คุณสมบัติในการเจริญเติบโต และลักษณะการดำรงชีวิต (conventional methods) ซึ่งรู้จักกันทั่วไปว่าเป็นวิธีของ Bergey (Atlas et al., 1997)

2.4.1. คุณสมบัติความต้องการอาหาร (Nutritional requirement)

สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียตามแหล่งพลังงานที่ได้รับสรุปดังตารางที่ 2-1 ดังนี้

1) Photoautotrophs เป็นพวกสังเคราะห์แสงได้โดยใช้ CO_2 เป็นวัตถุดิบ เช่น cyanobacteria (blue green algae)

2) Chemoautotrophs ใช้ CO_2 เป็นแหล่งคาร์บอน ไม่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน แต่ใช้กระบวนการ oxidize สารอินทรีย์เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) แอมโมเนีย (NH_3) หรือ ferrous ions (Fe^{2+}) ตัวอย่างเช่น *Sulfolobus*

3) Photoheterotrophs พวกที่ใช้พลังงานจากแสง แต่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน

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

ตารางที่ 2 – 1 ลักษณะการดำรงชีวิตแบ่งตามความต้องการแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน

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 อุณหภูมิ อากาศ แสงแดด ความเป็นกรด-ด่าง และความต้องการแก๊สบางชนิด สามารถนำมาใช้จัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียได้ เช่น แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในบรรยากาศที่มีออกซิเจน เรียกว่า aerobic bacteria และแบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญในบรรยากาศที่มีออกซิเจนแบคทีเรีย เรียกว่า anaerobic bacteria เช่น *Bacillus, Pseudomonas* อีกทั้งพวกที่สามารถสร้างพลังงานได้จากกระบวนการหายใจและกระบวนการหมัก เจริญได้ทั้งสองลักษณะ เรียกว่า facultative anaerobic bacteria เช่น *Escherichia, Proteus, Enterobacter* หรือเจริญได้ดีในที่มีออกซิเจนเล็กน้อย เรียกว่า microaerophilic bacteria เช่น *Lactobacillus, Neisseria* การจัดกลุ่มแบคทีเรียตามสภาวะอุณหภูมิแบ่งออกได้เป็น 3 พวกคือ พวกที่ชอบเจริญในอุณหภูมิสูง เรียกว่า thermophilic bacteria แบคทีเรียสามารถเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิปานกลางเรียกว่า mesophilic bacteria และแบคทีเรียที่สามารถเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ ๆ เรียกว่า psychrophilic bacteria เป็นต้น

2.4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง (Cultural characteristic)

เซลล์หนึ่งเซลล์ของแบคทีเรียจะเจริญรวมเป็นกลุ่มก้อนเรียกว่า โคโลนี (colony) จนสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ทำให้สามารถศึกษาจากลักษณะของโคโลนี เช่น ความมัน ความด้าน ใส ขุ่น ทึบ ทำให้รงควัตถุเป็นเม็ดละเอียดหรือหยาบ ขอบเขตการเจริญกระจาย

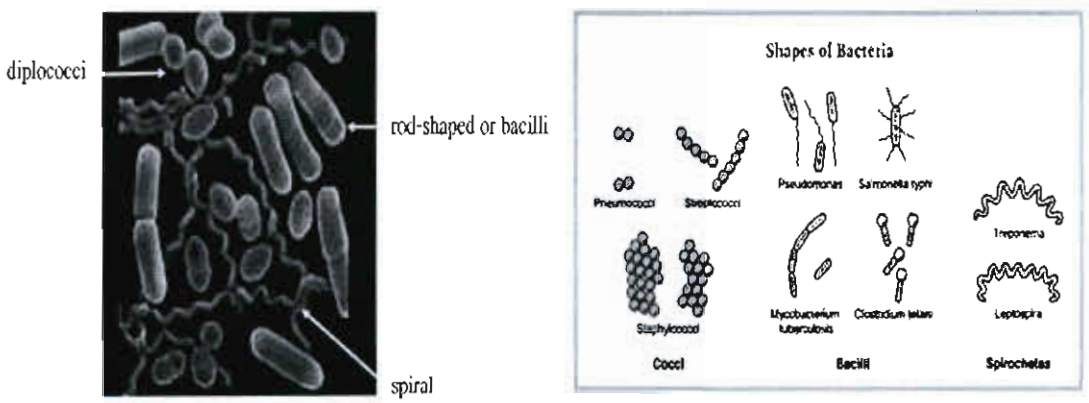
ออกหรือเป็นจุดเล็ก ๆ มีลักษณะขอบเรียบหรือขรุขระ เป็นเมือกหรือแห้งหรือเป็นเกล็ด เป็นต้น (Cappuccino & Sherman, 1992)

2.4.4 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

เป็นคุณสมบัติที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าต้องส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียโดยทั่วไปคือพวกที่อยู่ในอันดับ Eubacteriales ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรายงานศึกษามากที่สุด มีขนาดเป็นไมครอน ต้องใช้กำลังขยายประมาณ 1000 เท่า ทำให้สามารถเห็นรูปร่างได้ เช่น แท่ง ทรงกลม หรือ เกลียว มีการจัดเรียงตัวแบบใด รวมทั้งศึกษาการสร้างสปอร์ สร้างแคปซูล และดูชนิดของแฟลกเจลลา เป็นต้น

1) การเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (ภาพที่2-2)

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 จากคุณสมบัติที่แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยสารอาหารต่างกันมาก เลี้ยงแบคทีเรียไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่มีความจำเพาะของสารอาหาร แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เช่น การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเกิดกรด ด่าง แก๊ส หรือสารบางชนิด ยกตัวอย่าง ค่า pH ปกติ

ในการเจริญของแบคทีเรียมีค่าประมาณ 6.5 - 7.5 แต่แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Vibrio cholerae* สามารถเจริญได้ที่ pH=8 อย่างไรก็ตามการเจริญของแบคทีเรียจะมีการปล่อยสารพวกกรด - ด่าง ออกมาทำให้ค่า pH เปลี่ยนแปลงไปทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ดังนั้นจึงมีการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น KH_2PO_4 และ K_2HPO_4 เพื่อช่วยทำหน้าที่ในการต้านทานการเปลี่ยน pH ไปอย่างรวดเร็ว (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

2.4.6 คุณสมบัติของส่วนประกอบทางเคมี (Chemical composition characteristic)

ปัจจุบันมีเทคนิคใหม่ๆที่สามารถแยกโครงสร้างต่าง ๆ ของแบคทีเรีย เช่น แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจากส่วนประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ศึกษาสารพันธุกรรมและสารที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์กรดไขมันในเซลล์แบคทีเรียเป็นวิธีการจำแนกชนิดที่แม่นยำวิธีหนึ่งที่มีผู้นิยมใช้ วิธีการคือ สกัดไขมันจากเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารมาตรฐานที่กำหนด เปลี่ยนไขมันให้อยู่ในรูปของ methyl ester และฉีดเข้าเครื่อง gas liquid chromatography (GLC) นำ peak ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ แล้วจำแนกว่าเป็นชนิดใด วิธีนี้มีข้อด้อยบางประการ คือ ต้องเลี้ยงในอาหารมาตรฐาน จึงมีข้อจำกัดสำหรับแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถเจริญในอาหารนี้ได้ ไม่สามารถแยกชนิดแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกันสูง เช่น *E. coli* และ *Salmonella* และที่สำคัญต้องใช้เครื่อง GLC ที่มีราคาแพงจึงไม่เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป (เชาวนี มีหวัง, วงศ์ บุญสืบสกุล, กรรณิการ์ ดวงมาลย์ และสุรางค์ สุธิราวุธ, 2550) ดังเช่นการศึกษาของ Boonsuebsakul et al. (2006) วิเคราะห์กรดไขมันในเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* จำนวน 11 สปีชีส์ 20 สายพันธุ์ พบว่ามีลักษณะที่คล้ายคลึงกันเป็นกลุ่มๆ และมีบางสปีชีส์ เช่น *Paenibacillus alvei* มีรูปแบบที่แตกต่างจาก *Bacillus* sp. อื่น ๆ

2.4.7 คุณสมบัติการเป็นแอนติเจน

การศึกษาถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของแอนติเจน-แอนติบอดี โดยวิเคราะห์จากความสามารถของแบคทีเรียในการเป็นแอนติเจน ทำโดยการฉีดแบคทีเรียเข้าไปในร่างกายของสัตว์ทดลอง แล้วตรวจสอบว่ามีแอนติบอดีเกิดขึ้นในซีรัมหรือไม่ ซึ่งปฏิกิริยานี้มีความจำเพาะเจาะจงสูง 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 ทำให้เชื้อไม่เกาะกลุ่มกันในแอนติซีรัม O ยกเว้นต่อเมื่อทำลายแอนติเจน K ก่อนโดยการต้มที่ 100 °C นาน 2.5 ชม. หรือที่ 121 °C นาน 2 ชม.

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

2.4.8 คุณสมบัติทางพันธุกรรม (Genetic characteristic)

เป็นวิธีการจัดจำแนกที่สมบูรณ์ที่สุด โดยเฉพาะเมื่อมีข้อมูลบนฐานข้อมูลสำหรับเทียบเคียงไว้แล้ว แต่เดิมประกอบด้วย 2 วิธี คือ การวิเคราะห์ปริมาณของกรดนิวคลีอิกโดยการหาปริมาณเบสกัวนินและไซโตซีนในเซลล์ และการหาความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน (hybridization) ระหว่าง DNA กับ DNA หรือ DNA กับ RNA ของแบคทีเรียต่างชนิดกัน รวมถึงวิธีการอ่านและเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนต่าง ๆ เป็นต้น

2.5 ข้อความพันธุกรรมของแบคทีเรีย

ในปัจจุบันเมื่อมีการค้นพบแบคทีเรียในสกุลต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น การจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียมักรวมหลายวิธีดังที่กล่าวมา ทำให้การจำแนกมีความละเอียดและถูกต้องยิ่งขึ้น การใช้เทคนิคชีวโมเลกุลเพื่อจัดจำแนกชนิดและกลุ่มของแบคทีเรียทำให้สามารถทราบถึงโครงสร้างหน้าที่ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน หรือในส่วนที่ไม่ใช่ยีนบนสายดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันหรือเหมือนกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด รวมทั้งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ในสายวิวัฒนาการของแบคทีเรียได้

ยีนที่นิยมนำมาใช้ในการบ่งชี้ชนิดและจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียคือ ยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA* ซึ่งในโปรคาริโอตพบว่ามียีนหลายยีนเรียงติดกันเป็นชุด ประกอบด้วยยีน *16S, 23S* และ *5S rRNA* เรียงต่อกันโดยแต่ละยีน rRNA ถูกคั่นด้วยลำดับเบสขนาดสั้น ๆ ที่ไม่ใช่ยีนเรียกว่าช่องว่าง (spacer) ซึ่ง rRNA ทั้ง 3 ชนิด จะถูกจำลองรหัสออกมาพร้อมกันโดยใช้ promoter ร่วมกัน (ภาพที่ 2-3) (Martinez, Bescos, Rodriguez-Sala, & Rodriguez-Valera, 2001) โดยทั่วไปโมเลกุลของ *rRNA* ประกอบรวมอยู่กับโปรตีนแล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เรียกว่า ไรโบโซม (Ribosome) ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ 50S และ 30S ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการแปรรหัสที่พบในโปรคาริโอต คือ

1) *23S rRNA* มีขนาดประมาณ 2,904 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เป็นองค์ประกอบของหน่วยใหญ่ของไรโบโซมขนาด 50S

2) *16S rRNA* มีขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์ เป็นองค์ประกอบของหน่วยไรโบโซมขนาด 30S

3) *5S rRNA* มีขนาดประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของหน่วยใหญ่ของไรโบโซมขนาด 50S ไรโบโซมของโปรคาริโอตซึ่งมีขนาด 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 เป็นยีนที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซมมีหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนที่มีความจำเป็นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ปัจจุบันลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* ถูกนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของแบคทีเรีย เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ พบในกลุ่ม proteobacteria, แบคทีเรียแกรมบวก (*Streptomyces* sp. และ *Bacillus* sp.) และไซยาโนแบคทีเรีย ทำให้สามารถเปรียบเทียบยูแบคทีเรียได้ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* มีขนาดประมาณ 1,500 bp ในยูแบคทีเรียทุกชนิดบางช่วงบนสายดีเอ็นเอมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน (บริเวณอนุรักษ์) ซึ่งสามารถนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้ (universal primers) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR amplification) (ประพันธ์ ไตรยสุทธิ์, 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 นี้เป็นบริเวณที่ลำดับเบสมีความแปรปรวนสูงจึงนิยมใช้วิเคราะห์หาความแตกต่างภายในประชากรและระหว่างประชากรภายในชนิดเดียวกัน (Martinez et al., 2001)

2.6 เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

ในกรณีที่ตัวอย่างศึกษามีปริมาณน้อย พีซีอาร์เป็นเทคนิคการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มจำนวนโมเลกุลของดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณมากโดยทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยสารดั้งต้นที่สำคัญ ดังนี้

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

2) DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

3) Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการ สังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ

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

5) Template คือ ดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนในส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้มาจากเซลล์ที่มีนิวเคลียสหรือออร์กาเนลล์ของมนุษย์ สัตว์ พืช หรือสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ซึ่งทราบลำดับเบสแล้วบางส่วน

ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์มีข้อดี คือ การใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ใช้ระยะเวลาสั้น ค่าใช้จ่ายต่ำ และแปลผลได้ง่าย (จริยา ชมวารินทร์ และคณะ, 2540)

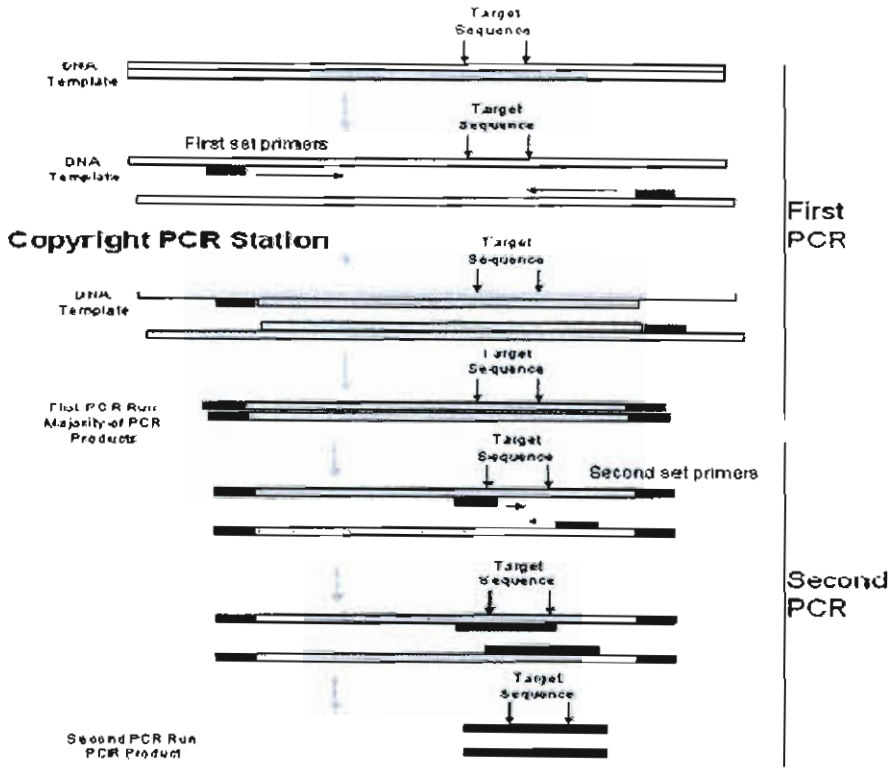
2.6.1 หลักการทำพีซีอาร์ (ภาพที่ 2 - 4)

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

2) Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและให้ไพรเมอร์ที่เป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14 - 13 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมจับกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 50 - 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 - 60 วินาที

3) Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ

70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 - 120 วินาที ขึ้นอยู่กับความยาวของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน



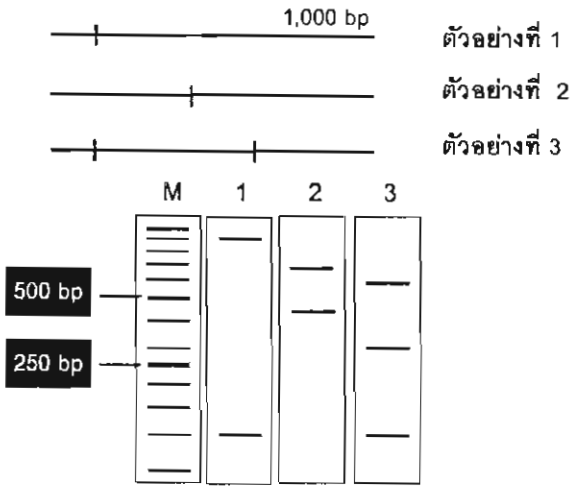
ภาพที่ 2 - 4 หลักการและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR

ที่มา : www.pcrstation.com/nested-pcr

2.7 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล (Molecular Markers)

เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดของดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนั้นจึงเป็นวิธีการที่ใช้ศึกษาความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับดีเอ็นเอโดยการนำสายดีเอ็นเอมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่บริเวณลำดับของเบสที่จำเพาะเท่านั้นเรียกว่า ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นถ้านำดีเอ็นเอจากแหล่งอื่นซึ่งมีลำดับเบสที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ต่างกันแม้เพียง 1 เบสหรือตำแหน่งเดียวกันออกไปเมื่อนำไปแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏก็จะแตกต่างกัน (ภาพที่ 2 - 7) (ชูตา บุญภักดี, 2544)



ภาพที่ 2 - 5 จำลองความแตกต่างของรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ตัดเฉพาะและดีเอ็นเอตรวจสอบที่เลือกใช้ ถ้าเปลี่ยนชนิดของเอนไซม์ตัดเฉพาะหรือดีเอ็นเอตรวจสอบก็จะได้รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เปลี่ยนไปเช่นกัน อย่างไรก็ตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนี้จะมีลักษณะที่เฉพาะเสมอ ดังนั้นการใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะร่วมกับดีเอ็นเอตรวจสอบที่มากกว่า 1 ชนิดก็จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตได้สูงขึ้นเช่นกัน

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความหลายทางพันธุกรรมและการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยทำการศึกษาในยีนต่าง ๆ ยกตัวอย่างเช่น Taylor et al. (2004) ศึกษาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *Cymbastela concentrica, Stylinos* sp. และ *Callyspongia* sp. โดยใช้ข้อความพันธุกรรมในบริเวณยีน *rpoB* และ *16S rRNA* พบว่าในบริเวณยีน *rpoB* ให้ผลการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียไม่ชัดเจนและลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแปรปรวนมากกว่าในส่วนของยีน *16S rRNA*

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

แบคทีเรียจากฟองน้ำทะเล *Hymeniacidon perleve* จากทะเลเหลือง (Yellow sea) ประเทศจีน และศึกษาความหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในบริเวณ *16S rRNA* เช่นกัน สามารถบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียได้ คือ *Streptomyces nocardiopsis, 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 glaciallis, Mesorhizobium mediterraneum* และ *Asterionella glaciallis* ส่วนฟองน้ำทะเล *Stylinos* sp. แยกได้แบคทีเรีย *Unculture soil bacterium* และฟองน้ำทะเล *Callyspongia* sp. พบกลุ่มแบคทีเรียที่จัดอยู่ในดิวิชั่น α - proteobacteria ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้พบว่าบางชนิดสามารถจำแนกได้ในระดับสกุลเท่านั้น 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* เมื่อศึกษาบริเวณ *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. splendius, V. lentus, V. harveyii, V. parahaemolyticus, V. natriegens, V. ordalii, V. hollisae, V. fluvialis* และ *V. cholevae* รายงานการศึกษาของ Kurabachew et al. (2003) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 516 คู่เบส ในส่วนของยีน *23S rRNA* ของ *Mycobacterium tuberculosis* จำนวน 54 ไอโซเลต จากผู้ป่วยในประเทศ Ethiopia พบว่าสามารถใช้บ่งชี้ชนิด *Mycobacterium* ได้ทั้งระดับสกุลและชนิดได้อย่างชัดเจน และรายงานการศึกษาของ Pei et al. (2009) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียจากน้ำพุร้อนและแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวนทั้งหมด 184 ไอโซเลต โดยสามารถบ่งชี้ได้เป็น *Carboxydothermus hydrogenoformans, Haloarcula marismortui, Shewanella oneidensis, Streptococcus pygenes,*

Nocardia farcinica, Clostridium perfringens, Salmonella typhimurium และ *Thermoanaerobacter tengcongensis* อีกทั้งยังพบช่วงลำดับเบสอนุรักษ์ในบริเวณ 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) ที่พบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์จำเพาะคู่เดียวกันเพิ่มจำนวนในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS แบคทีเรียหลายสายพันธุ์มีขนาดแตกต่างกันคือ 500-1,000 คู่เบส และสามารถนำมาใช้จำแนกแบคทีเรียใน Family *Vibrionaceae* ได้

ประพันธ์ ไดรยสุทธิ์ (2551) ศึกษาลำดับเบสบริเวณ *16S- 23S rRNA* ITS ของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำพุร้อนจำนวน 5 สายพันธุ์ และนำไปสร้างเดนโดรแกรม สามารถจำแนกกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียได้ 3 กลุ่ม ซึ่งระบุได้เพียงในระดับสกุลเท่านั้น คือ คือ *Phormidium* sp. ผลผลิต 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 พบว่าลำดับเบสของยีน *16S rRNA* สามารถบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียยืนยันผลได้ตรงกับการศึกษาทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยบ่งชี้ได้เป็น *Microcoleus* จำนวน 2 สายพันธุ์ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลระบุได้เป็น *Microcoleus steenstrupii* และ *M. vaginatus* และลำดับเบสในบริเวณ ITS ของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีความต่างกัน อีกทั้งได้ทำการศึกษาในแบคทีเรียชนิด *Coelodesmium wrangelii, Tolypothrix distorta* และ putative new genus (isolate SRS70) บริเวณ ITS พบว่ามีขนาด 520, 510 และ 509 คู่เบส ตามลำดับ คณะผู้วิจัยได้เสนอแนะให้มีการศึกษาทั้งบริเวณ ITS ควบคู่ไปกับการศึกษาในส่วนของยีน *16S rRNA* ด้วยเพื่อความแม่นยำต่อการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มที่ศึกษานี้

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

จากการศึกษาของ Harasawa, Pitcher, Ramirez, and Bradbury (2003) พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินหายใจของลา จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ของแบคทีเรียกับฐานข้อมูล สามารถบ่งชี้ชนิดได้เป็นแบคทีเรีย *Mycoplasma gallisepticum* และ *M. imitans* และพบว่าขนาดและลำดับเบสของผลผลิต PCR บริเวณนี้แตกต่างกัน คือ 940 และ 783 คู่เบส ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำเพาะกับแบคทีเรีย สามารถใช้เป็นข้อมูลต้นแบบสำหรับการเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มอื่น ๆ เช่น จำแนกแบคทีเรียสกุล *Staphylococci* จำนวน 228 โคโลนี พบว่าปรากฏรูปแบบดีเอ็นเอหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำเพาะจำนวน 40 รูปแบบ (Yin & Ji, 2008) และการจำแนกและในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น เชื้อราในกลุ่ม dermatophytes จำนวน 33 ด้วยบริเวณ ITS ทำการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำเพาะด้วยวิธี PCR-RFLP และบ่งชี้ชนิดได้เป็น *Arthroderma, Chrysosporium* และ *Epidermophyton* (Baere, Summerbell, Theelen, Boethout, & Vaneechoutte, 2010)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1) ตู้บ่มเชื้อ บริษัท carbolite

2) ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า 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 ประเทศเยอรมนี

8) เครื่องปั่นเหวี่ยง 260D บริษัท Brushlees microentrifuge

9) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน รุ่น SS-245 บริษัท Presstige Medical

10) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง บริษัท Tanita บริษัท Sartonus

11) ตู้อบไมโครเวฟ

12) ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น HLF 1200 E

13) เครื่องเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ รุ่น T-Gradient thermoblock บริษัท Biometra

14) ชุดแยกขยายชิ้นดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า ยี่ห้อ Kodak บริษัท Biomax

15) เครื่องถ่ายภาพเจลภายใต้แสงอัตราไวโอเลต UV-Tranillumirator บริษัท Syngene

16) เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) MD 625B-12 บริษัท Hoefer scientific

17) incubate water thermostate บริษัท Biosas

18) เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง รุ่น MXX-612 บริษัท Denver insteument

19) Speed vac รุ่น SC110 บริษัท Savant

20) หลอดทดลอง (microtube)

21) ไมโครปิเปต ทิป

22) ตะเกียงแอลกอฮอล์

23) บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่

24) เพลสสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.2 สารเคมี

3.2.1 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GF-1 Bacterial DNA extraction kit บริษัท Vivantis

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

2) ชุดสกัดพลาสมิด High-Speed Plasmid Minikit บริษัท Genaid

3) พลาสมิด pGEM-T-easy vactor 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/µl บริษัท New England Biolabs Qiagen

2) เอนไซม์ *Mse*I และ *Eco*RI

3.2.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Markers)

1) 1 kb 1.0 µg/µl และ 100 bp DNA ladder Plus 0.5 µg/µl บริษัท Fermentas

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

3.2.5 สารเคมี

1) Go Taq Green บริษัท Promega

2) 10 mM dNTP Mix บริษัท Fermentas

3) 50 mM $MgCl_2$ 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 Ethaylene diamine tetra-acetic acid บริษัท Amresco

9) Guanidine Thiocynate บริษัท Fluka

10) Protinase K บริษัท Fermentas

11) Ribonuclease A บริษัท Sigma

12) Isopropanol บริษัท Invitrogen

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

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.ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี ตัวอย่างฟองน้ำทะเลเก็บรวบรวมได้ในบริเวณแนวปะการังติดชายฝั่งของเกาะจวง เกาะจาน เกาะจระเข้ เกาะโรงโขน และหาดนางรอง ด. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี คือ *Halichondria* sp., *Monanchora unguiculata*, *Mycale grandis*, *Xestospongia tesudinaria*, *Lamellodysidea herbacea*, *Oceamapia sagittaria*, *Neopetrosia* sp. และ *Cliona* sp. แยกแบคทีเรียได้จำนวน 2, 5, 2, 2, 4, 2, 1 และ 1 ไอโซเลต รวมทั้งหมด 19 ไอโซเลต ตามลำดับ

3.4.1 การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างแบคทีเรียโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จ (Vivantis GF-1 Bacterial DNA)

ทำการเตรียม Genomic DNA ของแบคทีเรียจากตัวอย่างที่เลี้ยงในอาหารเหลว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ข้ามคืน โดยปิเปต 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ R1 จำนวน 100 ไมโครลิตร เพื่อให้เซลล์แตกกระจายเซลล์โดยการปิเปตขึ้นลง แล้วเติม lysozyme (50 mg/ml) จำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

ว
578.77
ป621 ก
ฉ.2

291556

เทสารละลายส่วนบนทิ้ง 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 เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมบัฟเฟอร์ BG ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายประมาณ 440 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาหลายครั้ง จนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาทีให้สารละลายเย็นลง แล้วเติม absolute ethanol จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที แล้วถ่ายสารละลายลงคอลัมน์ที่อยู่ใน collection tube และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วย Wash buffer จำนวน 750 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกรอบเพื่อกำจัดเอธานอล วางคอลัมน์ลงในหลอดทดลองใหม่ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสจำนวน 50 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ศึกษาต่อไป

3.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล

3.5.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *16S/23S rRNA* และบริเวณ ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 16-23S_F (5'TTGTACACACCGCCCGTC) และ 16-23S_R (5'CCTTTCCCTCA CGGTACTG) (Simon et al., 2002) ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 2X master mix (10 mM dNTPs, 25 mM $MgCl_2$, 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 ไมโครลิดร ปฏิกิริยา 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 ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentus, USA) จำนวน 250 นาโนกรัม ตรวจดูแถบดีเอ็นด้วยเครื่อง UV-Transilluminator (Syngene, UK) ภายหลังย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกภาพ

3.5.2 การโคลนหาลำดับเบสและการยืนยันผลของการเพิ่มจำนวนในบริเวณ ITS

1) การเชื่อมต่อผลผลิต PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอ นำผลผลิต PCR ที่เพิ่มจำนวนได้มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM-T-easy ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ภายในปฏิกริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 3.5 ไมโครลิตร 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA ligase จำนวน 1 ไมโครลิตร และพลาสมิด pGEM-T-easy vactor จำนวน 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน (16-20 ชั่วโมง)

2) การนำดีเอ็นเอพาหะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Transformation) นำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอวางบนน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยาจากนั้นปิเปตรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร เติมลงในไมโครทิวบ์ที่มี competent cells (*E.coli* JM 109) จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการ heat shock โดยบ่มไว้ที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 50 วินาที แล้วย้ายไมโครทิวบ์วางบนน้ำแข็งทันทีและทิ้งไว้เป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นนำออกมาเติม LB medium หรือ SOC medium จำนวน 500 ไมโครลิตร บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นทำการปั่นเก็บตะกอนเซลล์ ปิเปต LB medium ออก 250 ไมโครลิตร กระจายเซลล์ จากนั้นปิเปต 150 ไมโครลิตร และ 100 ไมโครลิตร spread บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB agar) ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร X-gal 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ IPTG 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3) การตรวจสอบแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมโดยวิธีพีซีอาร์ ทำการ replica โคโลนีเดี่ยวสีขาวที่เจริญในข้อ 3.5.2.2 ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่พร้อมกัน ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวดังกล่าวจุ่มลงในสารละลายผสมสำหรับปฏิกิริยา 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 แล้วนำไม้จิ้มฟันดังกล่าวไป streak ลงบนอาหารแข็งที่ผสมด้วยแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร X-gal 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ IPTG 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ส่วนหลอดทดลอง PCR นำไปเข้าเครื่อง Thermal cycle เพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยเริ่มจาก 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 ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานโดยใช้เจลที่มีความเข้มข้น 1% ในบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 0.5 เท่า ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที

3.6 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดสำเร็จ High Speed Plasmid Mini Kit (บริษัท Geneaid)

นำ replica โคโลนีของแบคทีเรียสีขาวที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่ถูกตรวจสอบแล้วให้ผลบวกโดยวิธี PCR มาทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวน 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว (LB broth) ที่มีแอมพิซิลิน 50 ไมโครลิตร นำเข้าตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในหลอดทดลองฝาเกลียวจำนวน 1.5 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วยชุดสำเร็จ High Speed Plasmid Mini Kit ตามคำแนะนำของบริษัท โดยเติมบัฟเฟอร์ PD1 (Resuspension Buffer) จำนวน 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex เพื่อกระจายเซลล์ให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดกระจายจากก้นหลอด จากนั้นทำการเติมบัฟเฟอร์ PD2 (Lysis buffer) จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงไปมา 5-10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นทำการเติมบัฟเฟอร์ PD3 ทันทีปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทำการกลับหลอดขึ้นลงไปมา 5-10 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสที่ได้ใส่ลงตรงกลางคอลัมน์ แล้วทำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง เติม W1 Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง แล้วล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer (70% EtOH) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้น เทสารละลายส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์ทิ้งและทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที อีกครั้ง เพื่อขจัดเอธานอลออกให้หมดแล้วทำการย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครทิวบ์ใหม่ หลังจากนั้นเติมน้ำที่ปราศจากนิวคลีเอสปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายพลาสมิดที่ผ่านคอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

3.7 การวิเคราะห์และยืนยันผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ และการสร้างเดนโดรแกรม

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

3.8 การตัดผลิตผล PCR ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (PCR-RFLP)

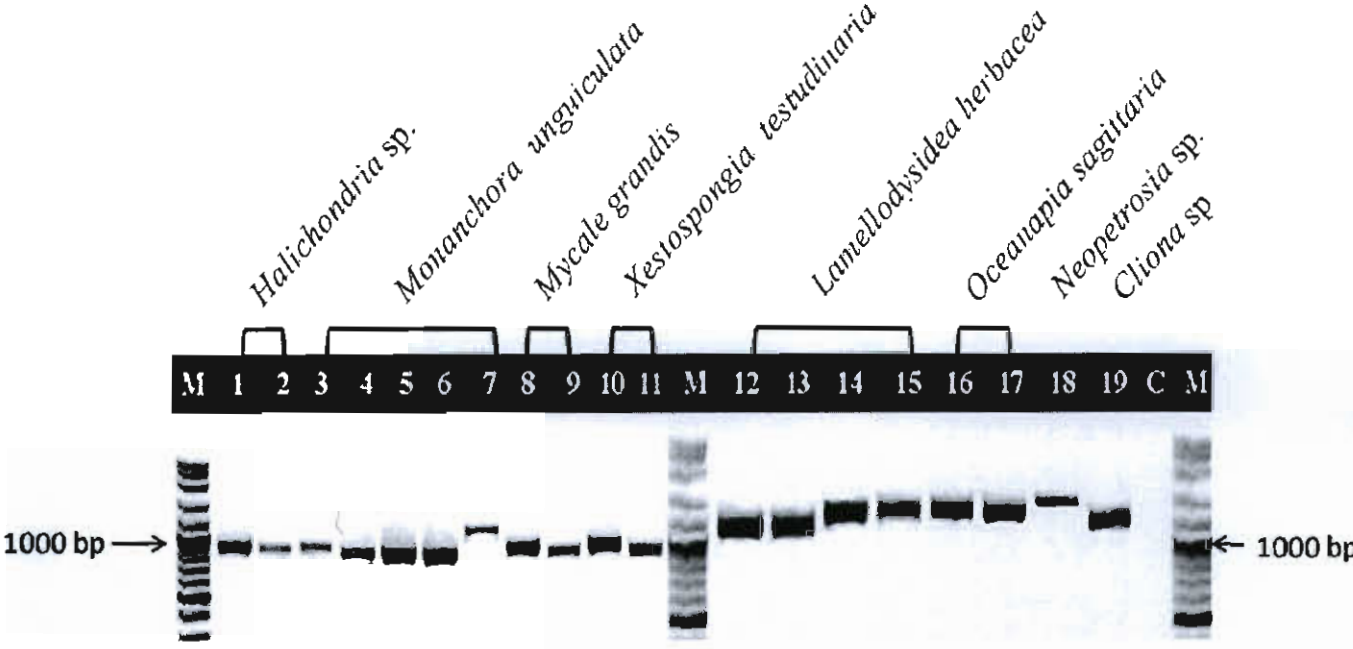
ทำการตัดดีเอ็นเอที่เพิ่มได้ของตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่คัดเลือกในข้อ 3.7 โดยใช้ดีเอ็นเอ 2 ไมโครกรัมต่อเรสทริกชันเอนไซม์ 5 ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสหรืออุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลาข้ามคืน แล้ววิเคราะห์ผลโดยนำปริมาตรทั้งหมดมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 3 % ที่มีเอธิเดียม-โบรไมด์เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร แล้วบันทึกภาพ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

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

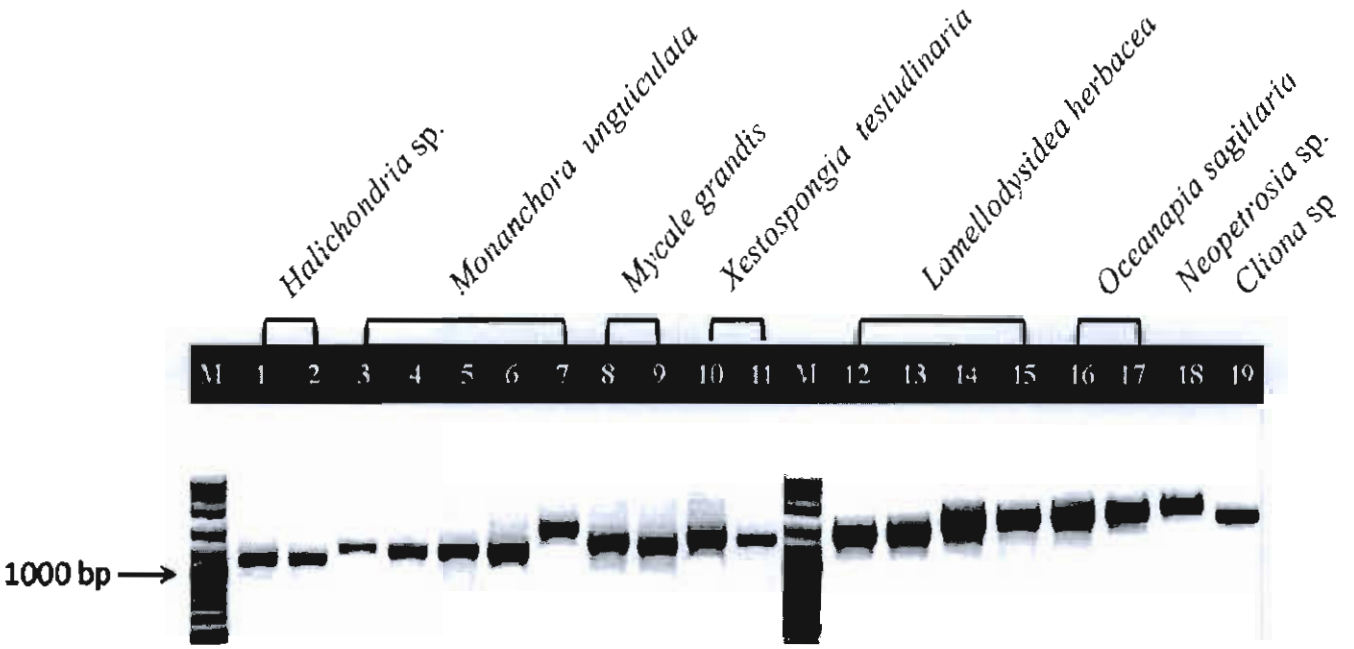
ในการศึกษาความหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล โดยแยกจากฟองน้ำทะเล *Halichondria* sp. (isolate 1 และ isolate 2), *Monanchora unguiculata* (isolate 3, 4, 5, 6 และ isolate 7), *Mycale grandis* (isolate 8 และ isolate 9), *Xestospongia testudinaria* (isolate 10 และ isolate 11), *Lamellodysidea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

ทำการเชื่อมต่อผลผลิต PCR ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลในภาพที่ 4-1 กับพลาสมิดเวคเตอร์ pGEM-T-easy ขนาด 3,015 คู่เบส สุ่มตรวจทรานสฟอร์แมนท์ของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ M 13 Forward/Reverse พบว่าขนาดของผลผลิต PCR ใหม่ซึ่งรวมกับลำดับเบสของเวคเตอร์ที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ M13 Forword/Reverse มีขนาดเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 200 คู่เบส (ภาพที่ 4 – 2 จัดเรียงไอโซเลตที่ 1 – 19 ตามลำดับ)



ภาพที่ 4 - 2 พลาสมิดลูกผสมระหว่างยีน *16S - 23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต (เรียงตามลำดับไอโซเลตที่ 1 – 19) วิเคราะห์ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 (M = 100 bp Plus DNA Ladder)

4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม และนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Bioedit พบว่าผลผลิตที่เพิ่มจำนวนได้ในช่วงระหว่างยีน *16S - 23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต

(เรียงตามลำดับไอโซเลตที่ 1 – 19) มีขนาดเท่ากับ 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 และ 991 คู่เบส ตามลำดับ (ตารางที่ 4 - 1)

ตารางที่ 4 - 1 ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ในช่วงระหว่างยีน *16S – 23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต

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

4.4 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ และเดนโดรแกรมความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

4.4.1 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะในส่วนของยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต ที่สกัดได้จากฟองน้ำทะเล 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/สายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเดนโดรแกรมจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA*

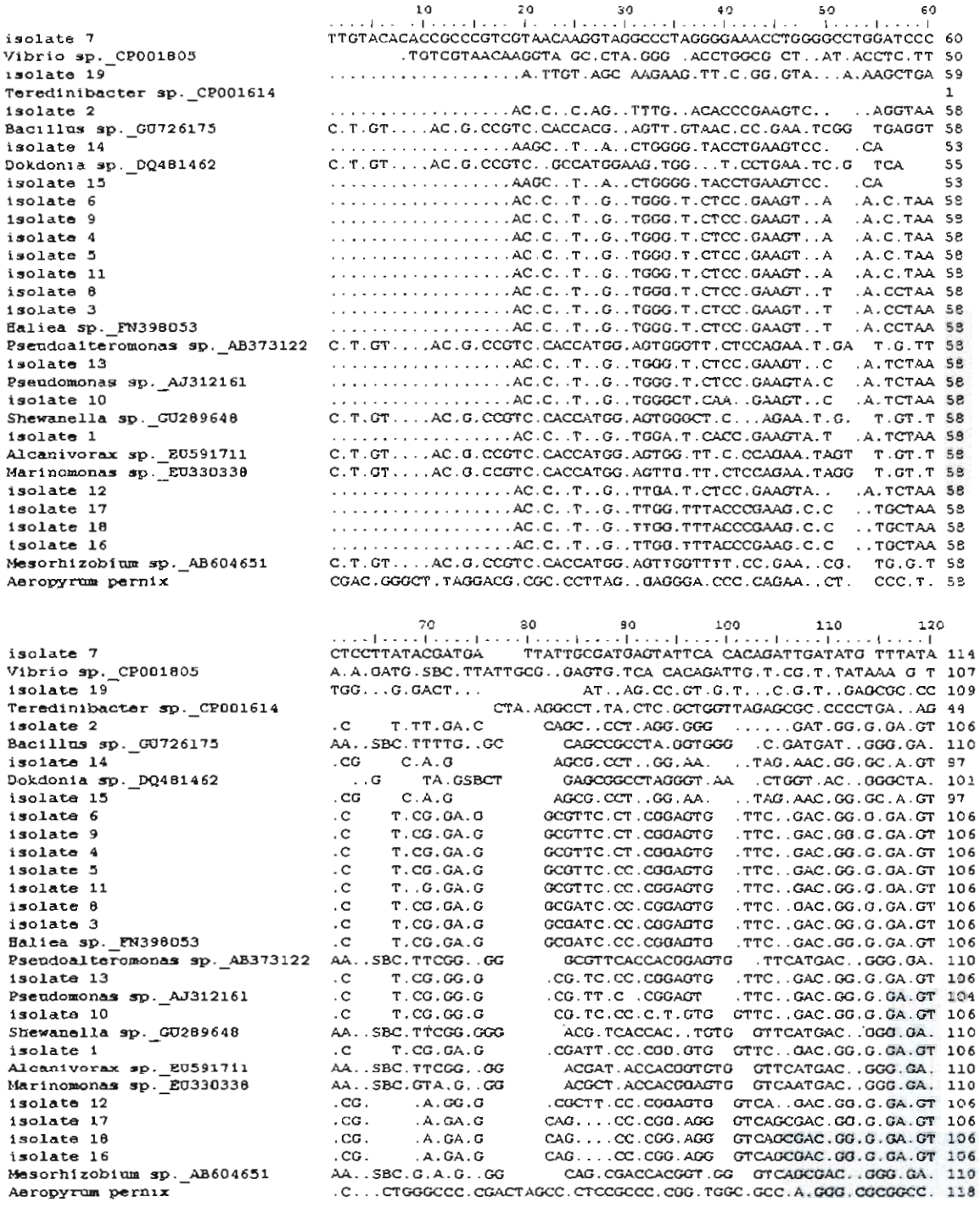
ภายหลังการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* และสร้างเดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของข้อมูลดังกล่าวด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Archaea คือ *Aeropyrum pernix* (GenBank รหัสหมายเลข AB078022) เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ บนฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมีความเหมือนสูงสุดกับไอโซเลตของแบคทีเรียที่ทำการศึกษา สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียทะเลบางไอโซเลตไว้เป็นชนิดเดียวกัน 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*

จากเดนโดรแกรมสามารถยืนยันการจัดจำแนกแบคทีเรียบางไอโซเลตเป็นแบคทีเรียต่างชนิดแต่จัดอยู่ในสกุลเดียวกันคือ *Pseudoalteromonas* spp. isolate 4, 6 และ 9 และ *Pseudoalteromonas* spp. isolate 5 และ 11 มีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ ไอโซเลต 4 และ 9 มีลำดับเบสเหมือนกัน 99.6% , ไอโซเลต 9 และ 6 มีลำดับเบสเหมือนกัน 100% และไอโซเลต 5 และ 11 มีลำดับเบสเหมือนกัน 99.2% (ตารางที่ 4 - 3) อีกทั้งยังพบแบคทีเรียไอโซเลตที่ต่างสกุล/ชนิดกันจัดไว้เป็นสกุล/ชนิดเดียวกันระหว่าง *Haliea* sp. (isolate 3 และ isolate 8)

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

ตารางที่ 4 - 2 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลโดยเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* กับฐานข้อมูล Genbank

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



ภาพที่ 4 - 3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลจำนวน 19 ไอโซเลต และจากฐานข้อมูล GenBank 11 ชนิด โดยมี *Aeropyrum pernix* (GenBank accession no. AB078022) เป็น outgroup ด้วยโปรแกรม BioEdit

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแถวที่ 1; (★) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง

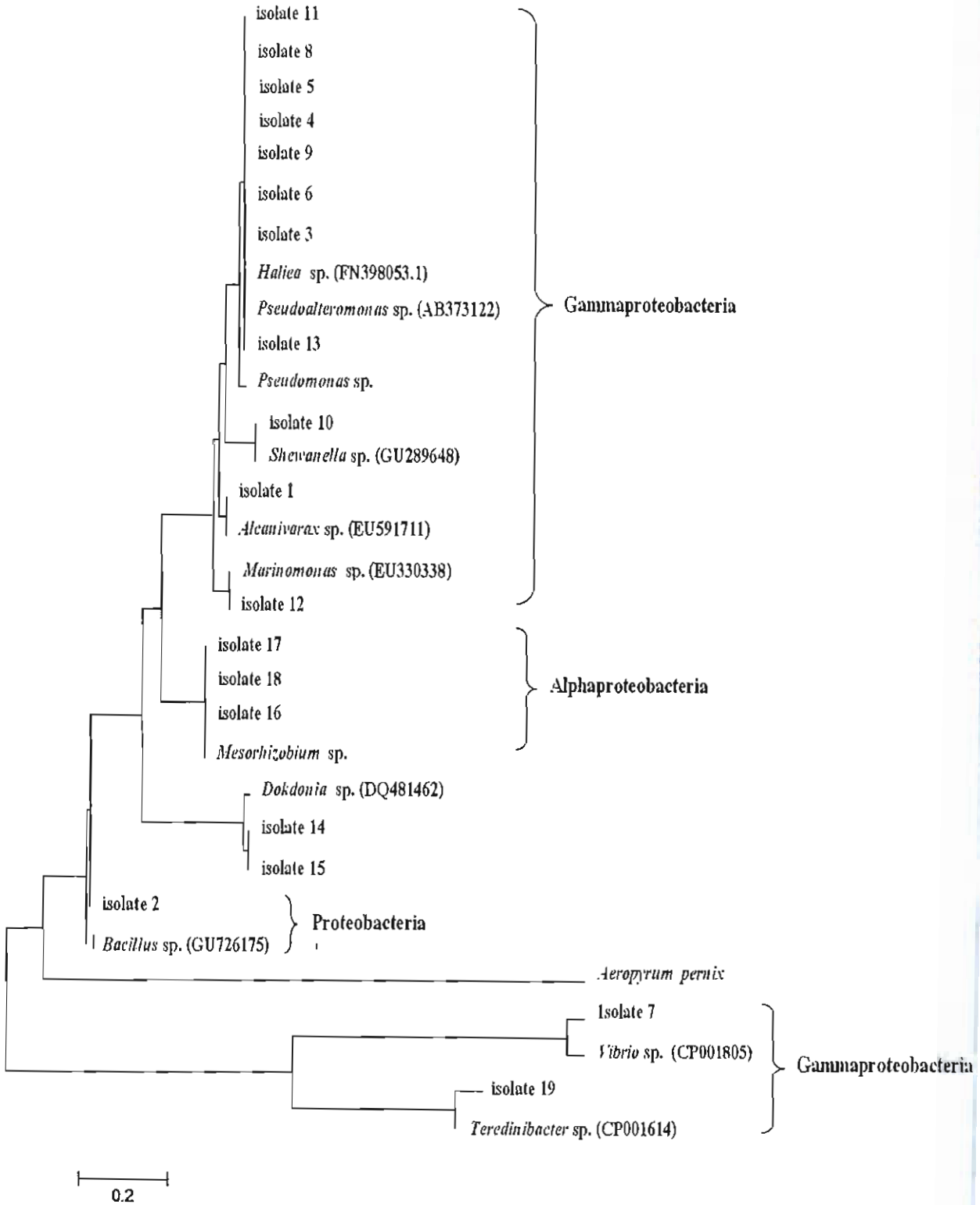
```
                                        130         140         150         160
                                        ....|....|....|....|....|....|....|....|.
isolate 7                               CACGATTAAAGAGACGATAC     TGGGGTCTGGGG        146
Vibrio sp._CP001805                       .AAGAG.CGATACSBC.TGGG TCT.                132
isolate 19                              .CT...A.GG.T..G.TCGGCAGT.....               138
Teredinibacter sp._CP001614             GGT..GGTCG.CAGTT                            60
isolate 2                               .GTA.CA.GGT..C..     TATCG.A     A..T.CGG   137
Bacillus sp._GU726175                   GT..TAAC...GT.GCSBCTCGTA.C..A     A..TGCGG  147
isolate 14                              .GTA.CA.GGT..C..     TACCG.A     A..T.CGG   128
Dokdonia sp._DQ481462                   GT..TAAC...GT.GCCG     TACC..ASBCTA..TGCGG  138
isolate 15                              .GTA.CA.GGT..C..     TACCG.A     A..T.CGG   128
isolate 6                               .GTA.CA.GGT..C.C     TGGGG.AACCTG...         137
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.AACCTGC..         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; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแถวที่ 1; (★) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง

ตารางที่ 4 - 3 เมตริกซ์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *16S rRNA* ของแบคทีเรียทั้งหมด 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

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



ภาพที่ 4 - 4 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต และลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank 11 ชนิด และ Archaea : *Aeropyrum pernix* (รหัสหมายเลข AB078022) ด้วยโปรแกรม MEGA 4

4.4.3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต ที่สกัดได้จากฟองน้ำทะเล 8 ชนิด มาเปรียบเทียบบนฐานข้อมูล GenBank (เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2553) พบว่าในส่วนท้ายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสามารถเทียบเคียงได้ประมาณ 479-934 คู่เบส กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *23S rRNA* (ตารางที่ 4 - 3) โดยมี % ความเหมือนสูงสุดที่ 85 – 94 % ซึ่งการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียเกือบทั้งหมดสอดคล้องกับผลการศึกษาจากข้อมูล *16S rRNA* ยกเว้นไอโซเลตที่ 3, 8, 14 และ 15 ระบุได้เพียง uncultured bacterium และไอโซเลตที่ 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)

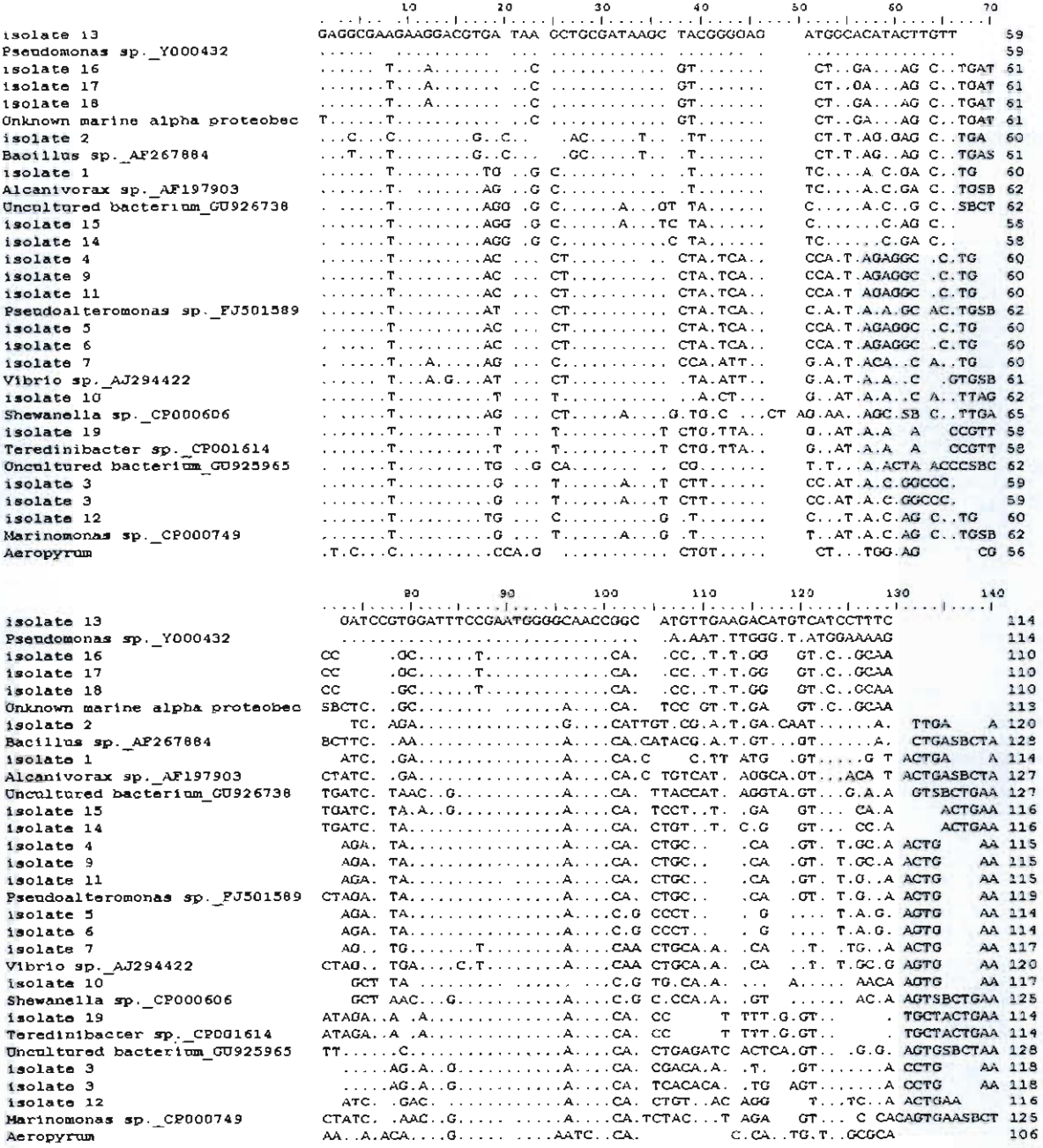
4.4.4 การยืนยันชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเดนโดรแกรมจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วนของยีน *23S rRNA*

ภายหลังการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *23S rRNA* สามารถสร้างเดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของข้อมูลดังกล่าว โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Archaea คือ *Aeropyrum pernix* (GenBank รหัสหมายเลข AB078022) เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ บนฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมีความเหมือนสูงสุดกับไอโซเลตของแบคทีเรียที่ทำการศึกษาพบว่าสามารถยืนยันชนิด/ สายพันธุ์ของแบคทีเรียทะเลแต่ละไอโซเลตได้ ดังนี้ แบคทีเรียชนิดเดียวกัน 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 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

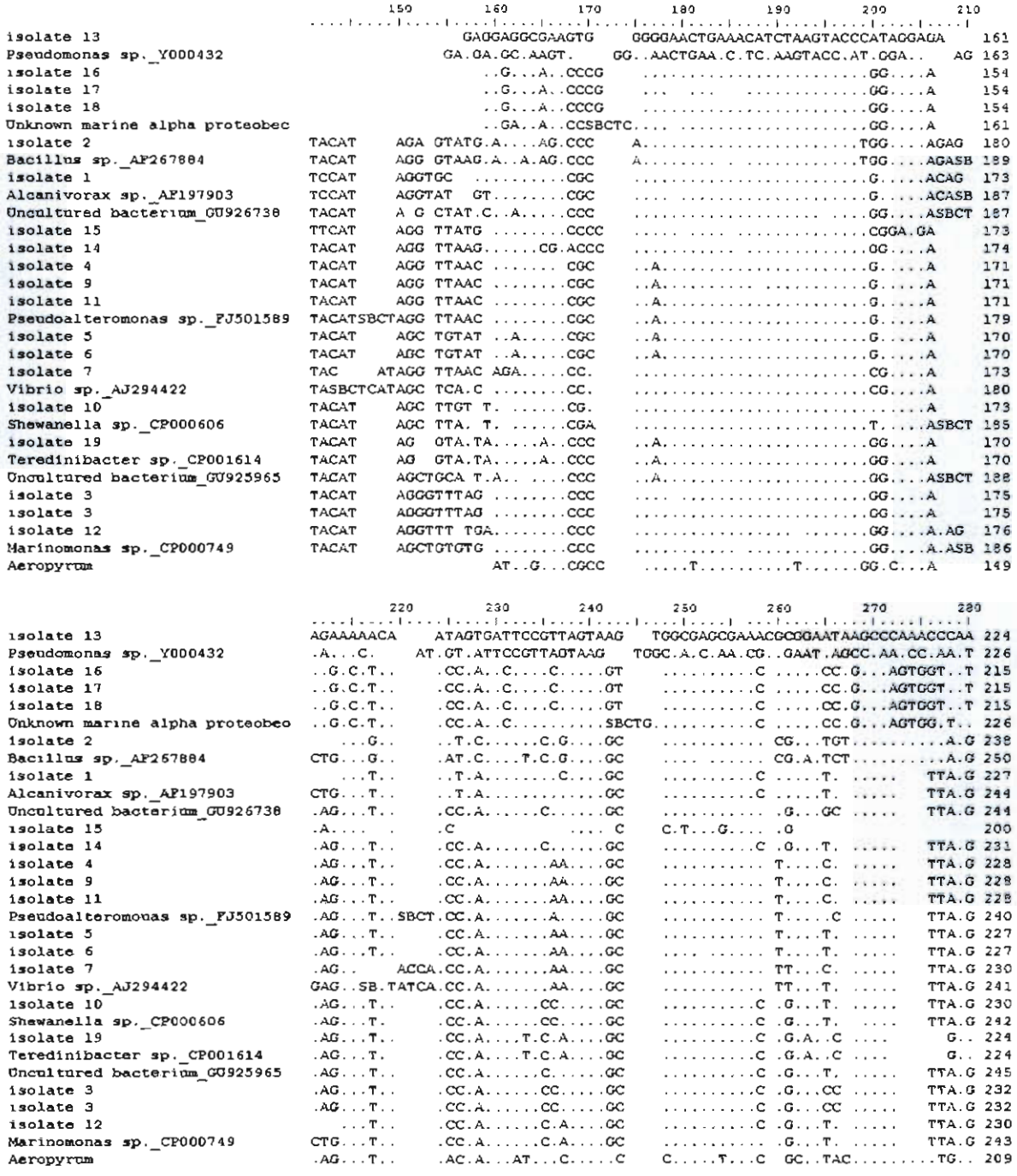
ตารางที่ 4 - 4 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลโดยเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA* กับฐานข้อมูล Genbank

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



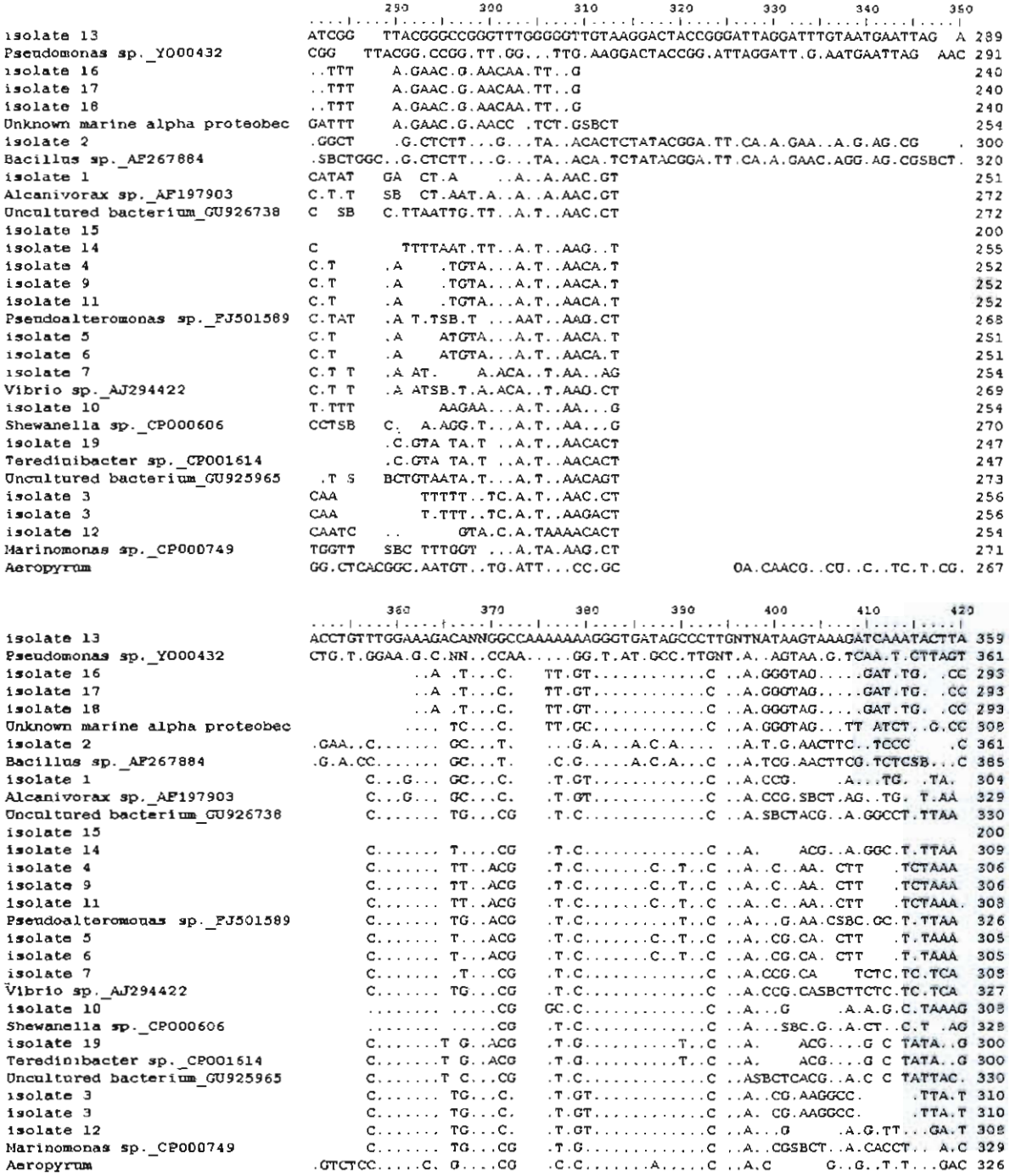
ภาพที่ 4 - 5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA* ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลจำนวน 19 ไอโซเลต และจากฐานข้อมูล GenBank 11 ชนิด โดยมี *Aeropyrum pernix* (GenBank accession no. AB078022) เป็น outgroup ด้วยโปรแกรม BioEdit

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแถวที่ 1; (★) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง (แสดงในช่วงตำแหน่งที่ 1-570 คู่เบส)



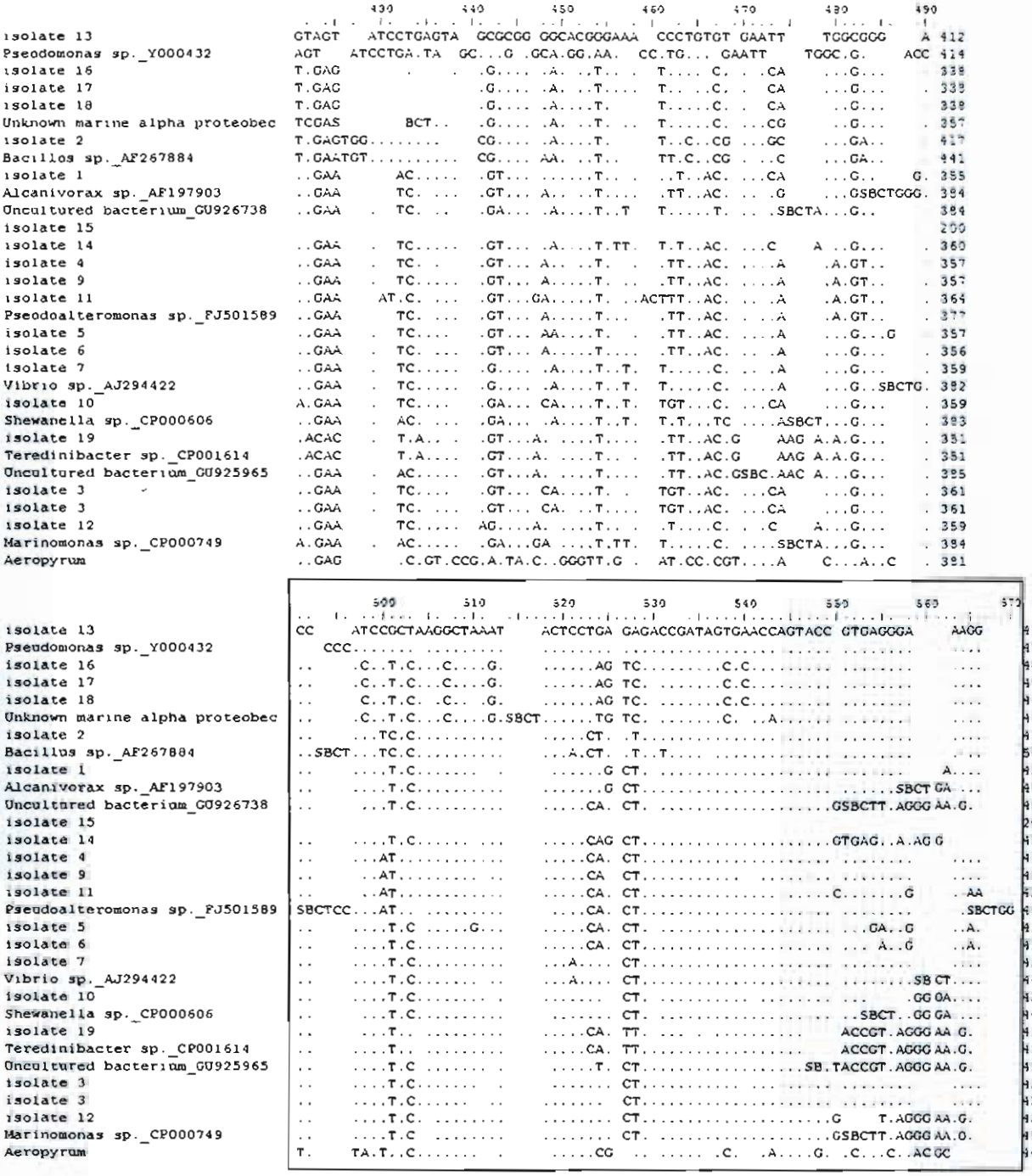
ภาพที่ 4 - 5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA* (ต่อ)

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแถวที่ 1; (★) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง (แสดงในช่วงตำแหน่งที่ 1-570 คู่เบส) ด้วยโปรแกรม BioEdit



ภาพที่ 4 - 5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA* (ต่อ)

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแถวที่ 1; (★) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง (แสดงในช่วงตำแหน่งที่ 1-570 คู่เบส) ด้วยโปรแกรม BioEdit



ภาพที่ 4 - 5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA* (ต่อ)

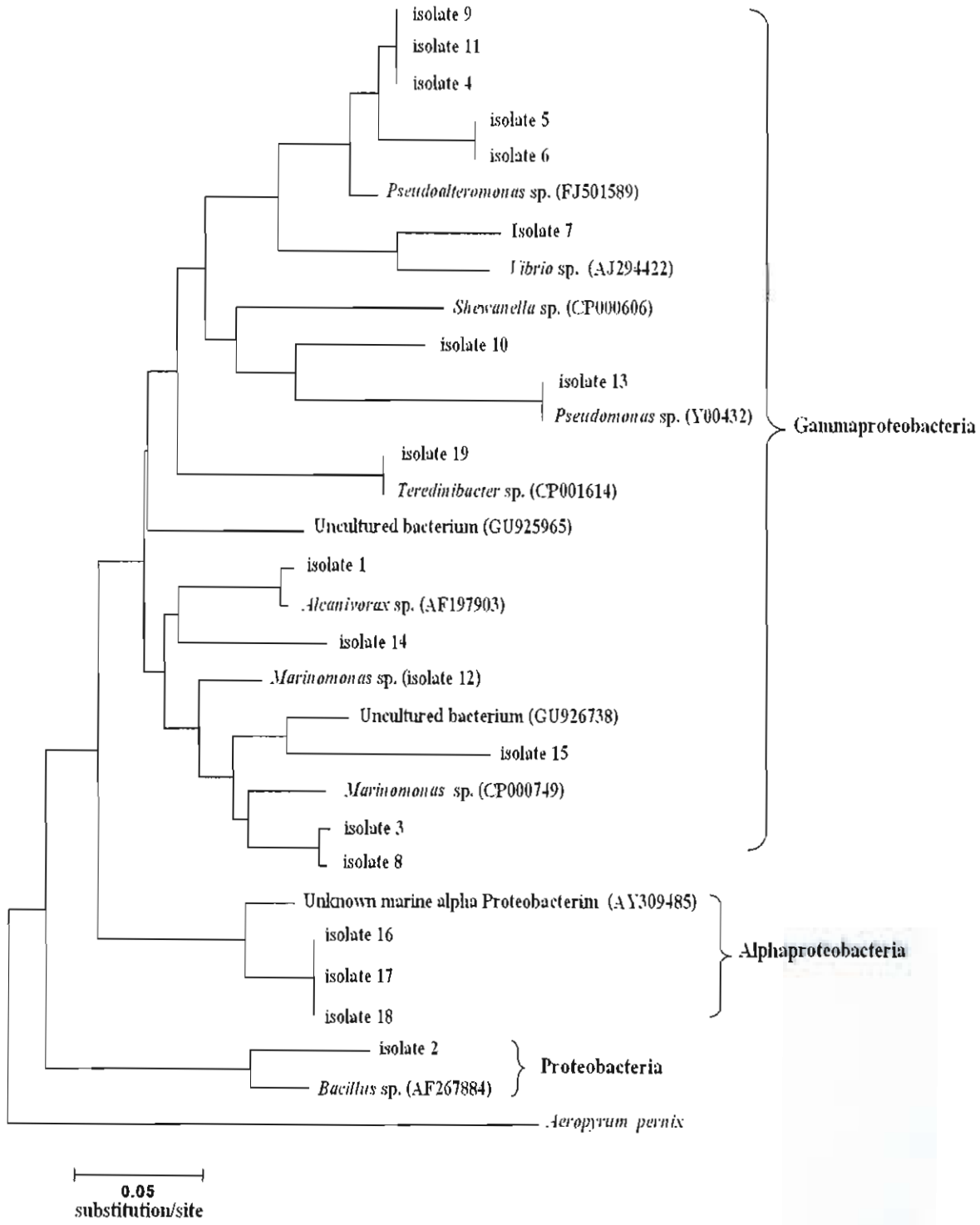
หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแถวที่ 1; (★) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง (แสดงในช่วงตำแหน่งที่ 1-570 คู่เบส) ด้วยโปรแกรม BioEdit

□ = ช่วงลำดับเบสอนุรักษ์ในส่วนของยีน *23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

ตารางที่ 4 - 5 เมตริกซ์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *23S rRNA* ของแบคทีเรียทั้งหมด 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

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

* Uma. Proteobacterium = Unknown marine alpha Proteobacterium



ภาพที่ 4 - 6 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต และลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank 11 ชนิด และ Archaea : *Aeropyrum pernix* (รหัสหมายเลข AB078022) ด้วยโปรแกรม MEGA 4.

4.4.5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 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) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะในบริเวณ ITS ของแต่ละไอโซเลตมาเปรียบเทียบบนฐานข้อมูล GenBank (เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2553) พบว่าไม่สามารถเทียบเคียงได้ และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้ทั้ง 19 ไอโซเลต โดยให้ชื่อตามที่ระบุจากข้อมูลของยีน *16S rRNA* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกันมากในระดับสกุล แต่มีขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างคล้ายกันสำหรับแบคทีเรียที่จัดไว้ในสกุลเดียวกัน 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)

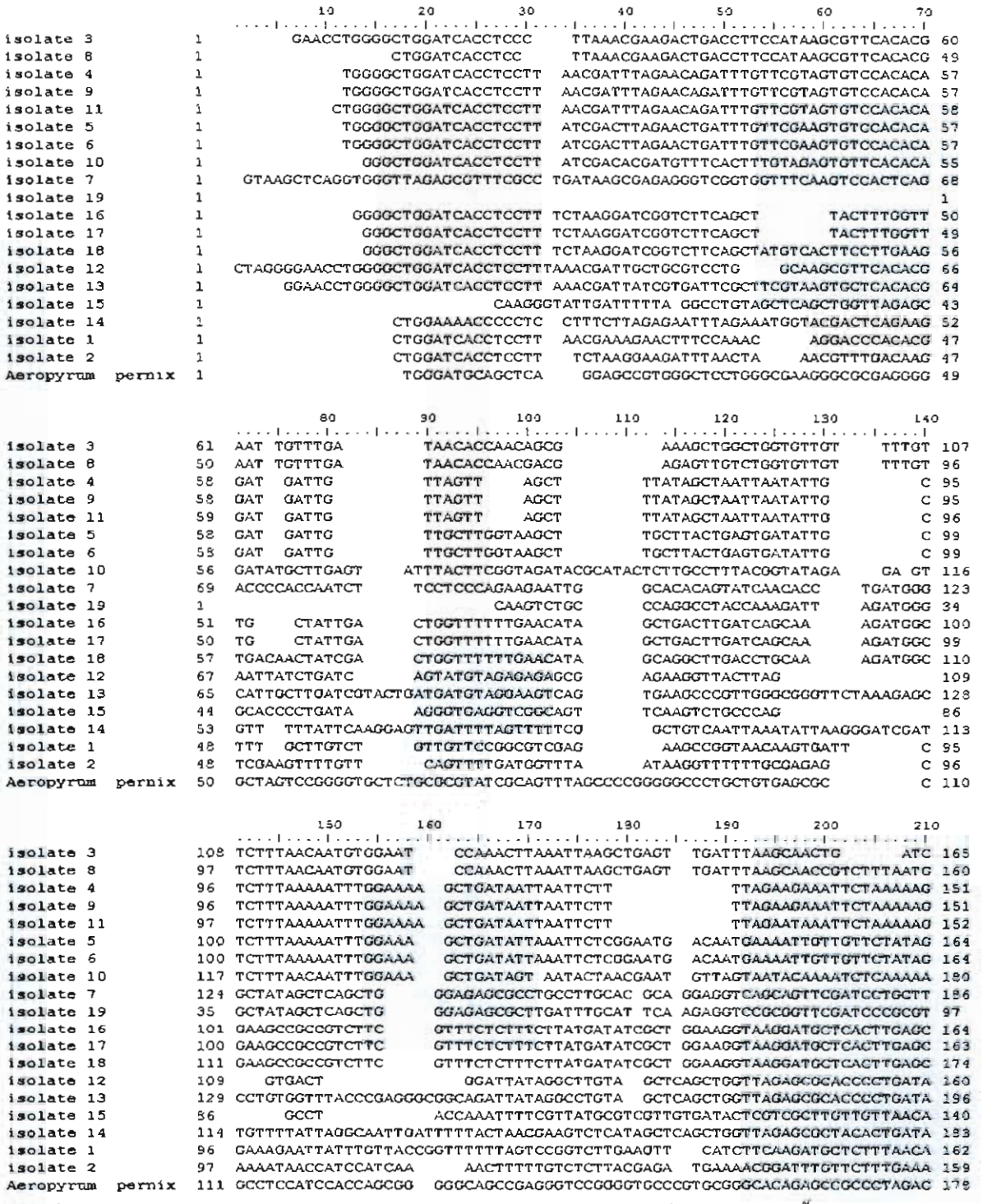
4.4.6 การยืนยันชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเดนโดรแกรมจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS

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

ส่วนแบคทีเรียสกุลเดียวกันที่คาดว่าต่างชนิด 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 ไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล

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



ภาพที่ 4 - 7 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเล จำนวน 19 ไอโซเลต (แสดงในช่วงตำแหน่งที่ 1-380 คู่เบส) ด้วยโปรแกรม BioEdit

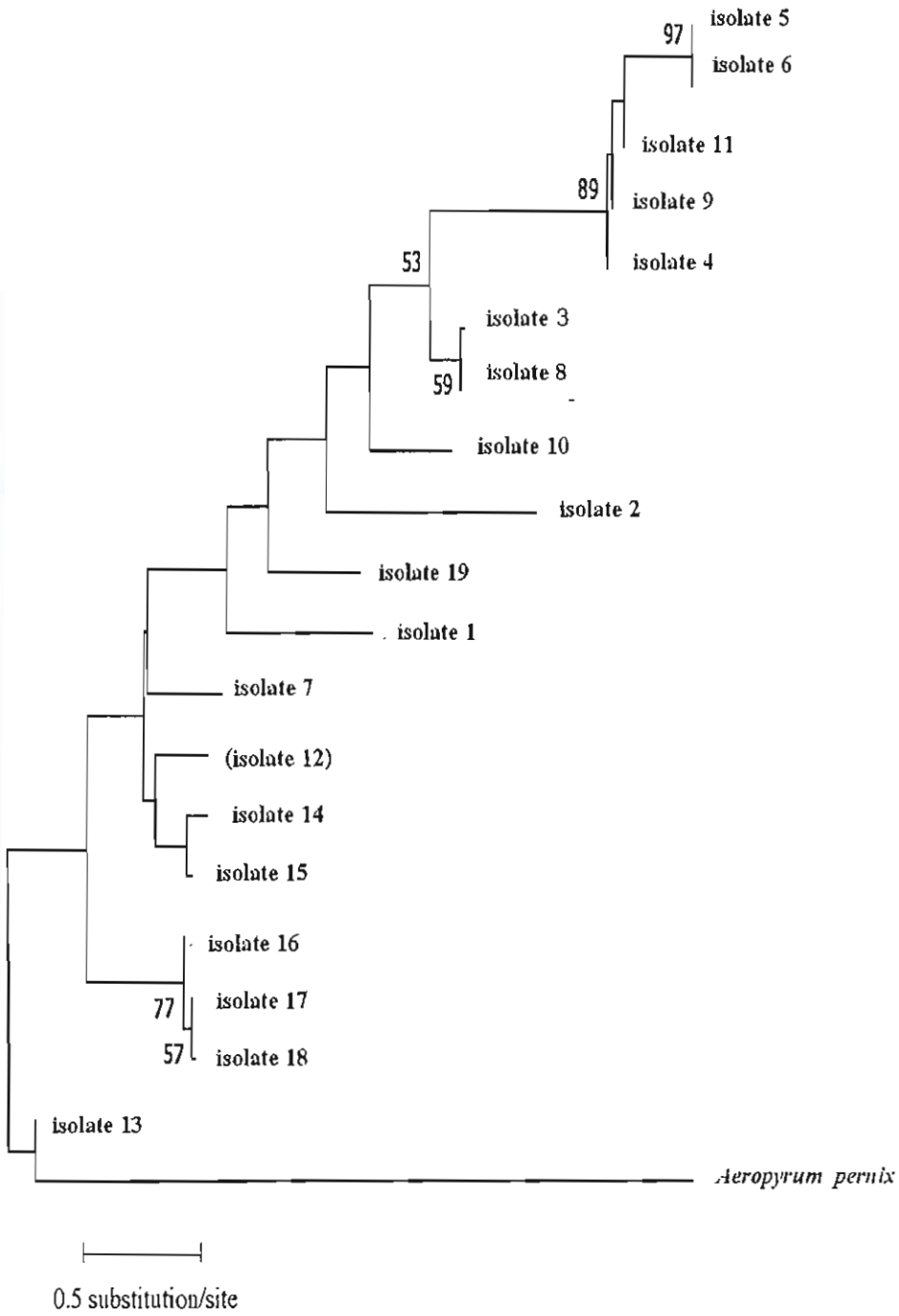
หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแถวที่ 1; (★) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง

ภาพที่ 4 - 7 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลจำนวน 19 ไอโซเลต (ต่อ) ด้วยโปรแกรม BioEdit

หมายเหตุ สัญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแถวที่ 1; (★) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง

ตารางที่ 4 - 7 เมตริกซ์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแบคทีเรียทั้งหมด 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

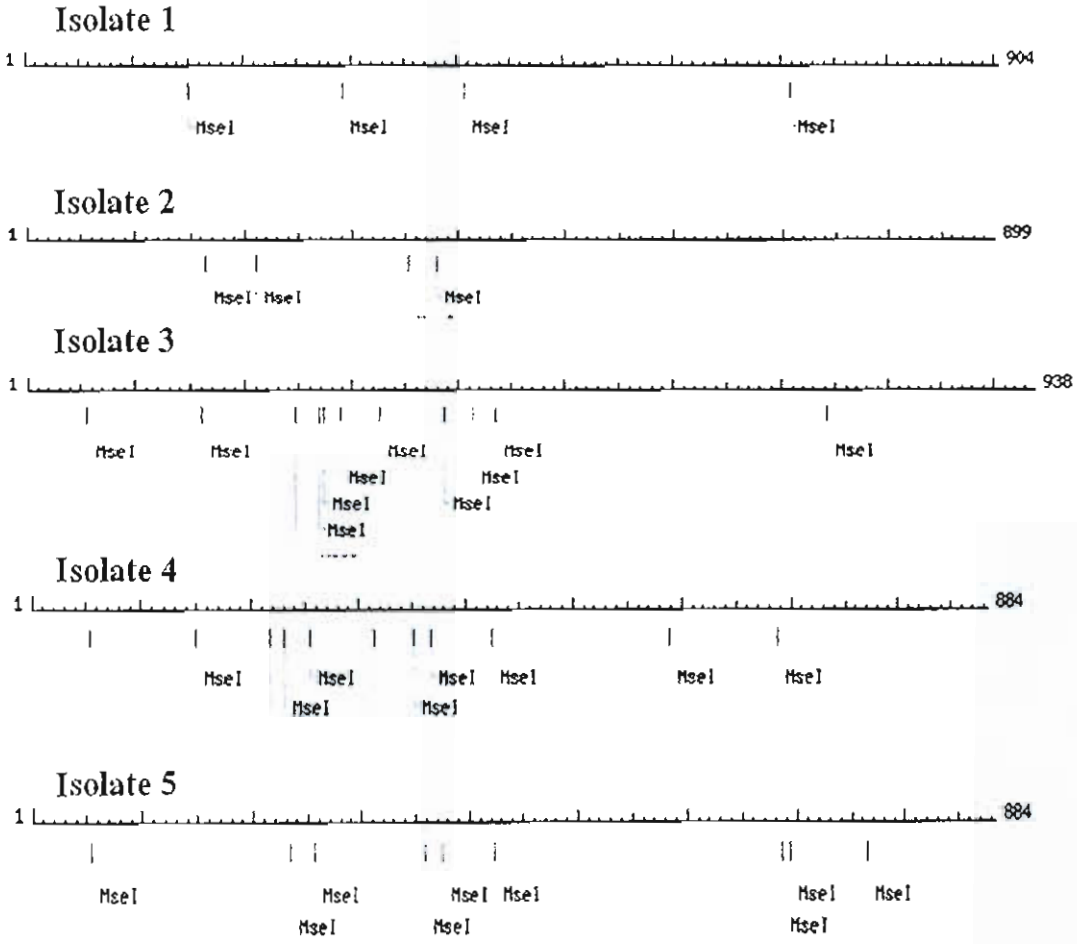
isolate (species)	12	13	7	19	16	17	18	3	8	4	9	11	5	6	10	15	14	1	2	20
isolate 12 (*Marinomonas* sp.)	ID	0.536	0.38	0.272	0.294	0.297	0.303	0.297	0.286	0.269	0.269	0.281	0.25	0.244	0.285	0.404	0.355	0.26	0.255	0.165
isolate 13 (*Pseudomonas* sp.)	0.536	ID	0.298	0.272	0.296	0.294	0.32	0.283	0.265	0.288	0.285	0.309	0.254	0.251	0.294	0.293	0.364	0.261	0.24	0.211
isolate 7 (*Vibrio* 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 (*Teredinibacter* 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 (*Mesorhizobium* 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 (*Mesorhizobium* 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 (*Mesorhizobium* 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 (*Haliea* 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 (*Haliea* 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 (*Pseudoalteromonas* 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 (*Pseudoalteromonas* 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 (*Pseudoalteromonas* 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
isolate5 (*Pseudoalteromonas* 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 (*Pseudoalteromonas* 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 (*Shewanella* 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 (*Dokdonia* 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(*Dokdonia* sp.)	0.355	0.364	0.295	0.225	0.297	0.304	0.304	0.252	0.27	0.282	0.282	0.282	0.241	0.232	0.266	0.225	ID	0.311	0.263	0.19
isolate 1 (*Alcanivorax* 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 (Bacillus 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	0.312	0.202	0.263	0.354	ID	0.186
20 (*Aeropyrum pernix*)	0.165	0.211	0.164	0.091	0.146	0.15	0.155	0.146	0.141	0.155	0.155	0.138	0.18	0.187	0.171	0.145	0.19	0.178	0.186	ID



ภาพที่ 4 - 8 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้ง 19 ไอโซเลต และลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank 11 ชนิด และ Archaea : *Aeropyrum pernix* (รหัสหมายเลข AB078022) ด้วยโปรแกรม MEGA 4.

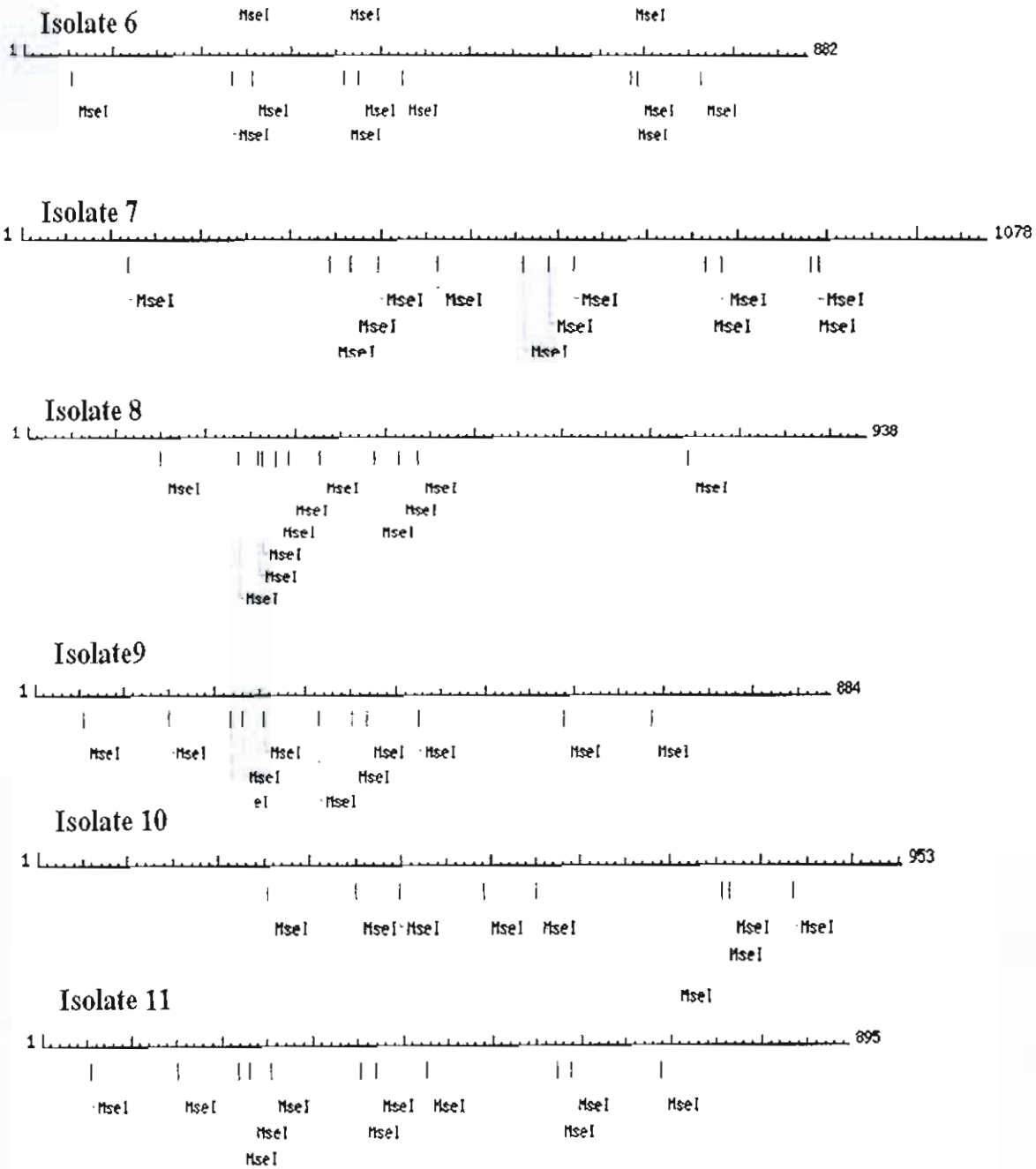
4.7 การจำลองลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผลผลิต PCR บริเวณยีน *16 – 23S rRNA*

การจำลองรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำเพาะของแบคทีเรียทำโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยโปรแกรม NEB cutter V. 2.0 คัดเลือกเอนไซม์มา 1 ชนิดที่มีตำแหน่งบริเวณจดจำที่สามารถตัดดีเอ็นเอแล้วได้ชิ้นย่อยเมื่อแยกบนเจลอะกาโรสและเกิดเป็นรูปแบบที่จำเพาะของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต คือเอนไซม์ *Mse*I ซึ่งมีบริเวณจดจำ 5'-TTAA- 3' โดยแผนที่ตำแหน่งการตัดบนผลผลิต PCR ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตแสดงในภาพที่ 4 - 9 และแสดงรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำลองในภาพที่ 4 - 10 A1, B1

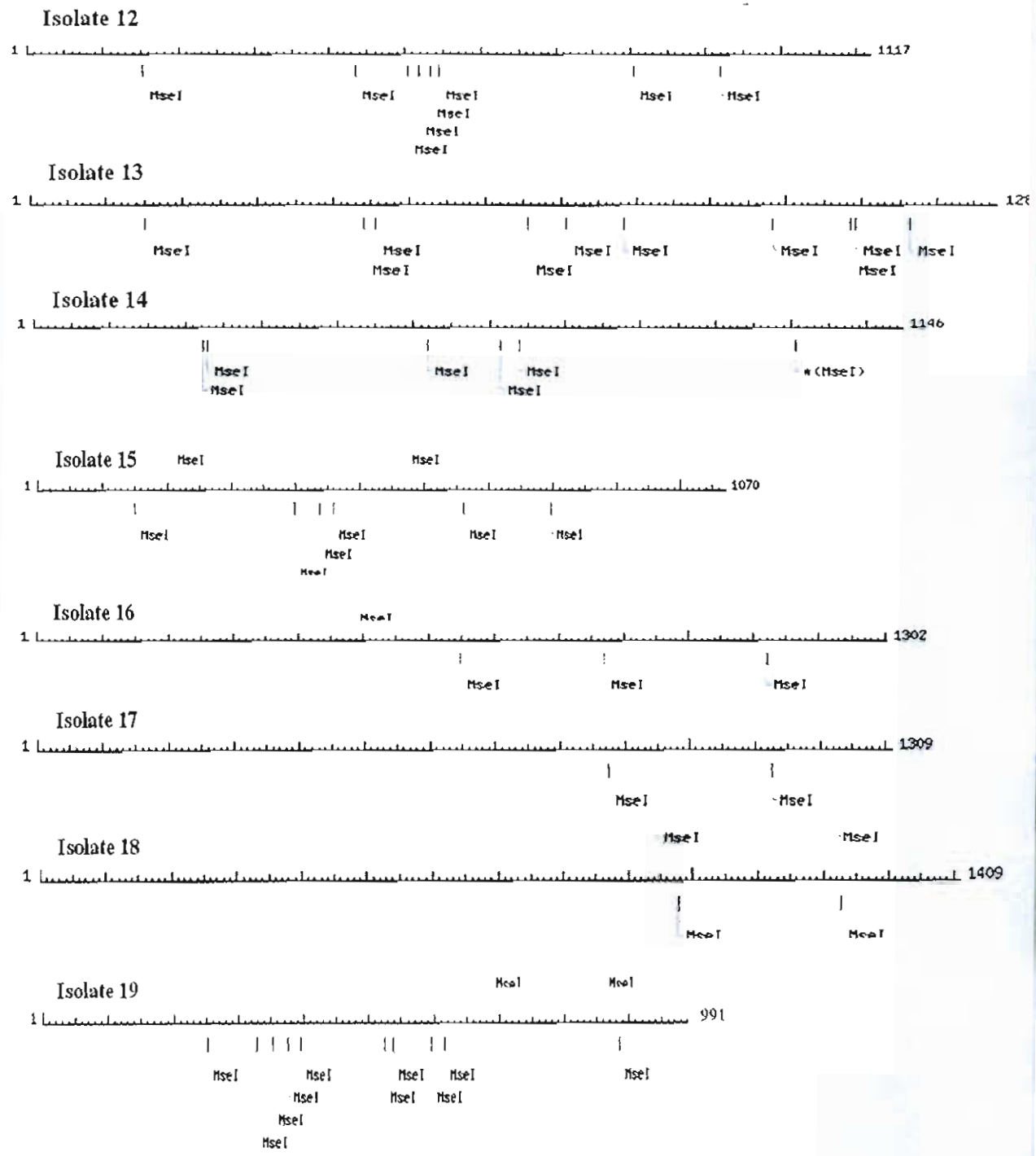


ภาพที่ 4 - 9 แผนที่แสดงตำแหน่งการตัดผลผลิต PCR บริเวณยีน *16 – 23S rRNA* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse*I โดยใช้โปรแกรม NEB cutter V. 2.0

หมายเหตุ ตัวเลขแสดงจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4 - 9 แผนที่แสดงตำแหน่งการตัดผลผลิต PCR (ต่อ)



ภาพที่ 4 - 9 แผนที่แสดงตำแหน่งการตัดผลผลิต PCR (ต่อ)

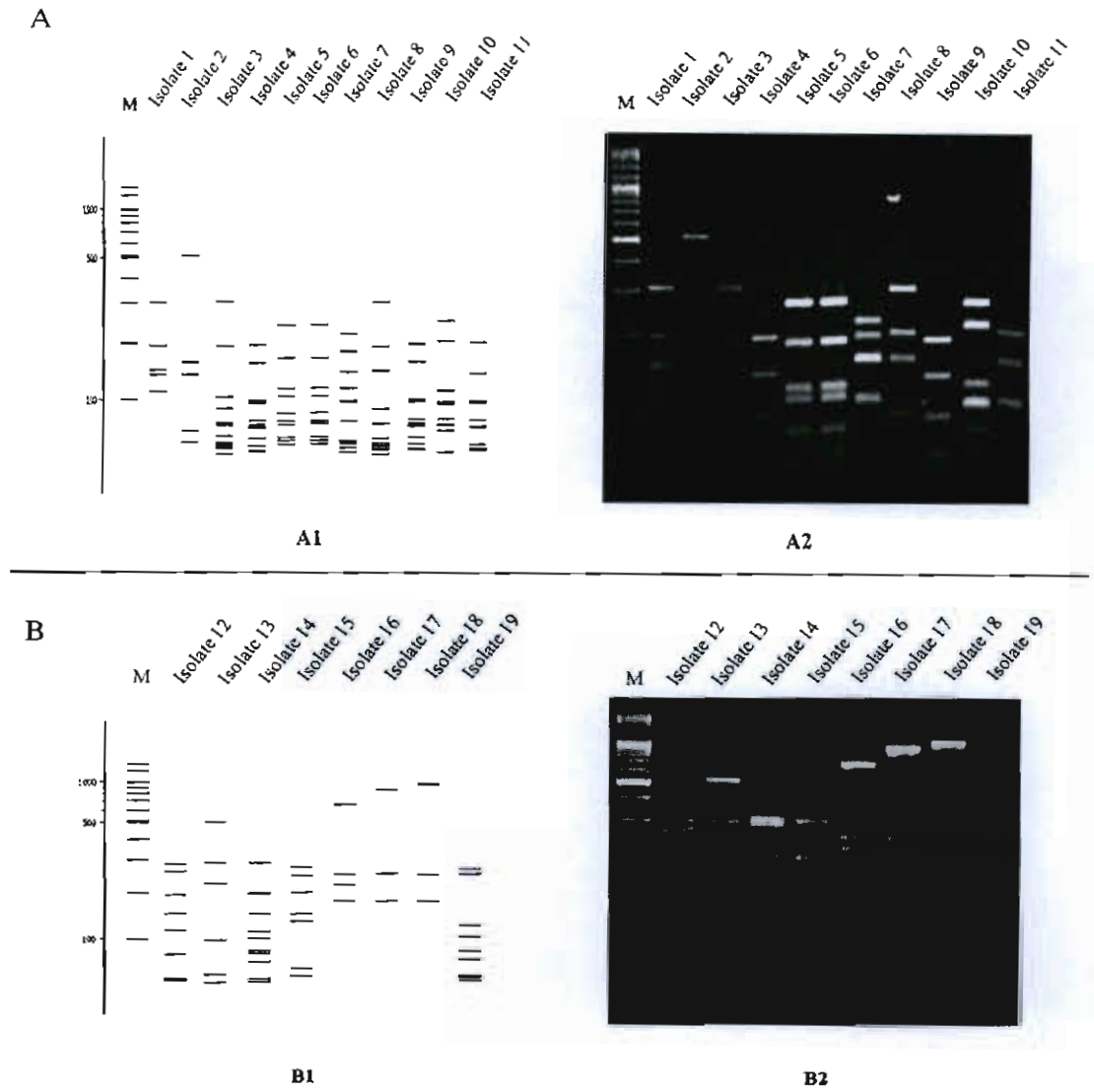
ภายหลังสร้างรูปแบบจำลอง (ภาพที่ 4-10 A1, B1) ทำการทดสอบการตัดผลผลิต PCR ในช่วงของยีน *16S rRNA- 23S rRNA* (รวมบริเวณ ITS) ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์จริงในห้องปฏิบัติการ แล้ววิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ปรากฏว่าทุกไอโซเลตปรากฏรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตรงกันกับที่จำลองโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ แต่อย่างไรก็ตาม ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรสที่มีขนาดต่ำกว่า 100 คู่เบส ไม่สามารถระบุขนาดที่ถูกต้องได้ เนื่องจากข้อจำกัดของ % agarose ที่ใช้สำหรับแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมาก (3 %) และใช้เวลาสั้นในการทำอิเล็กโตรโฟริซีส

ผลการวิเคราะห์จากการตัดผลผลิต PCR ของแบคทีเรียที่บ่งชี้ชนิดแล้วด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ *16S rRNA* ทั้ง 19 ไอโซเลต ปรากฏรูปแบบลายพิมพ์จำนวน 16 แบบ แต่ละแบบมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกัน (ตารางที่ 4 – 7) และพบว่าแบคทีเรียที่จัดไว้ในสกุลเดียวกันมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันสอดคล้องกับผลการศึกษาในบริเวณ 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) และการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ *16S rRNA- 23S rRNA* ปรากฏ 3 รูปแบบ 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 เช่นเดียวกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏ 2 รูปแบบ คือ E , F และสกุล *Mesorhizobium* sp. (isolate 16, 17 และ 18) ซึ่งข้อมูลของยีน *16S rRNA* แยกความแตกต่างไม่ได้แต่ปรากฏความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS เช่นเดียวกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มี 3 รูปแบบ เอกลักษณ์ คือ G, F และ I ในขณะที่แบคทีเรียสกุลอื่น ๆ ที่นำมาศึกษาครั้งนี้เพียงสกุลละ 1 ไอโซเลต จะพบรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไปในแต่ละสกุล (ภาพที่ 4-10, 4-11)

ตารางที่ 4 - 8 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอบริเวณยีน *16S rRNA- 23S rRNA* ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse*I ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต

species/isolate	isolate	Size of PCR product digested with *Mse*I
Pseudoalteromonas sp.	4	195, 163, 100, (96, 67, 61, 57, 55, 37, 24, 16, 13)
Pseudoalteromonas sp.	5	262, 180, 119, 103 (71, 55, 49, 22, 16, 7)
Pseudoalteromonas sp.	6	262, 180, 119, 103 (71, 55, 49, 22, 16, 7)
Pseudoalteromonas sp.	9	195, 163, 100, (96, 67, 61, 57, 55, 37, 24, 16, 13)
Pseudoalteromonas sp.	11	205, 146, 100 (98, 96, 67, 57, 56, 24, 17, 16, 13)
Haliea sp.	3	306, 195, 151, 106 (86, 61, 56, 38, 21, 22,21.15, 5)
Haliea sp.	8	306, 195, 151, 106 (86, 61, 35, 27, 22, 21, 15,14, 5)
Dokdonia sp.	14	289, 200, 199, 152, 116,102 (76, 71, 52, 15, 8)
Dokdonia sp.	15	273, 248, 201, 152, 136 (39, 21)
Mesorhizobium sp.	16	649, 250, 222, 181, 122 (69)
Mesorhizobium sp.	17	873, 250, 181, 152 122 (69)
Mesorhizobium sp.	18	978, 250, 181, 152, 122 (69)
Alcanivorax sp.	1	302, 194, 151, 143, 144
Bacillus sp.	2	518, 165, 143 (46, 27)
Vibrio sp.	7	222, 187, 148, 121, 100 (98, 65, 31, 29, 28, 24, 17, 8)
Shewanella sp.	10	254, 207, 118 (97, 94, 69, 58, 48, 8)
Marinomonas sp.	12	283, 258, 195, 152, 118 (69, 16, 15, 11)
Pseudomonas sp.	13	500, 368, 289, 223, 139 (97, 27, 7)
Teredinibacter sp.	19	253, 128, 106 (76, 58, 24, 23, 21, 20, 14)

หมายเหตุ () คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณของโปรแกรม NEB cutter และเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่สามารถระบุขนาดได้ (น้อยกว่า 100 bp) ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส



ภาพที่ 4-10 รูปแบบดีเอ็นเอภายบริเวณยีน *16 – 23S rRNA* หลังตัดด้วยเอนไซม์ *Mse*I ของแบคทีเรีย จำนวน 19 ไอโซเลต

A = รูปแบบดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลตที่ 1-11 ตัดด้วยเอนไซม์ *MseI*, A1 = รูปแบบดีเอ็นเอจำลองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ A2 = รูปแบบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 3 % agarose gel

B = รูปแบบดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลตที่ 12 - 19 ตัดด้วยเอนไซม์ *MseI*, B1 = รูปแบบดีเอ็นเอจำลองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ B2 = รูปแบบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 3 % ; M = 100 bp DNA Ladder

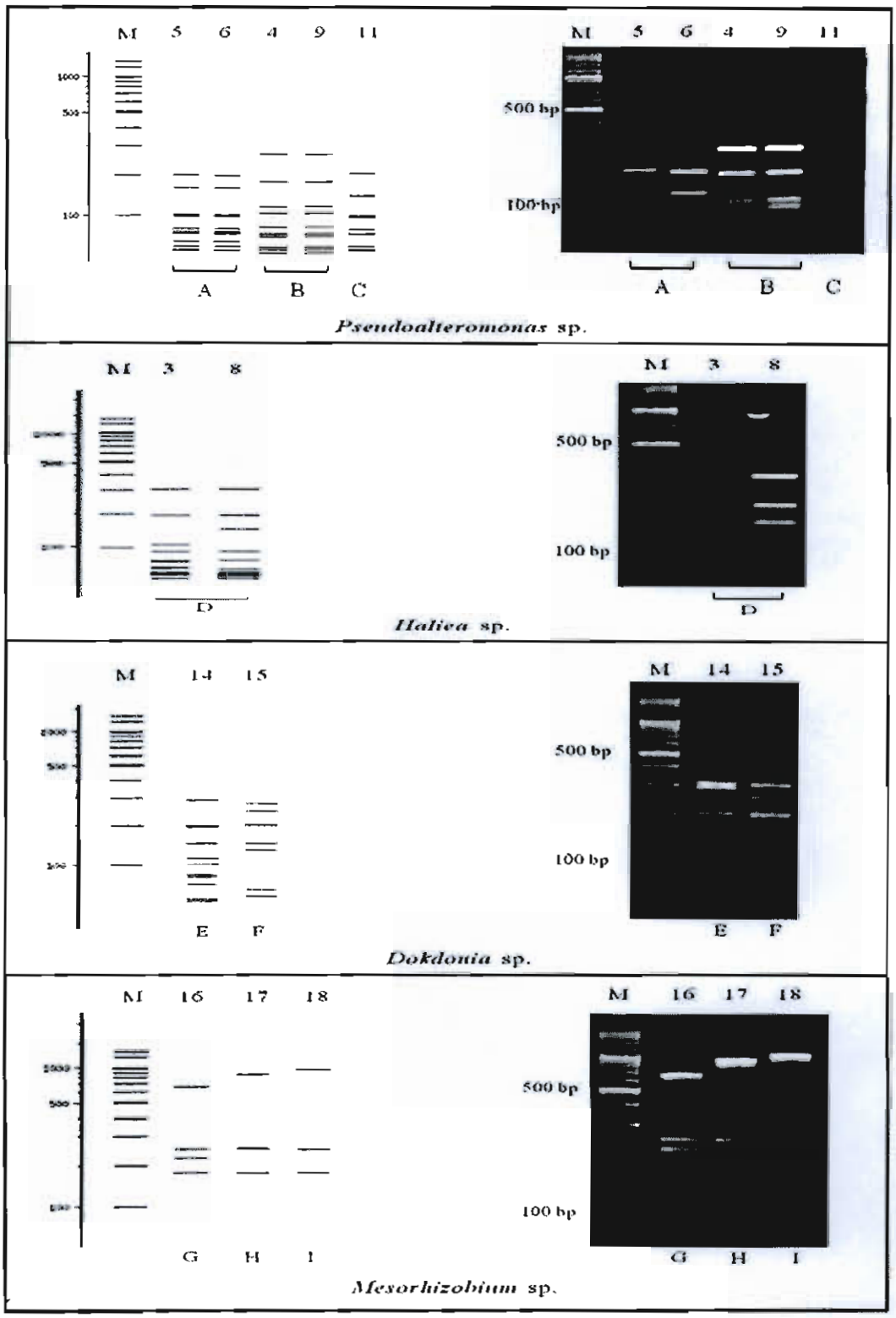
isolate 1 = *Alcanivorax* sp. isolate 2 = *Bacillus* sp. isolate 3,8 = *Haliea* sp.

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 รูปแบบดีเอ็นเอ (A-I) ภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *Mse*I ของแบคทีเรียสกุลเดียวกัน วิเคราะห์ด้วย 3 % agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 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 ด้วยคู่ไพรเมอร์ 16S-23S_F/R พบว่าขนาดผลผลิต PCR มีความหลากหลายตั้งแต่ 800-1,400 คู่เบส (ภาพที่ 4 - 1) สอดคล้องกับรายงานของ Jeng et al. (2001) ที่พบว่าไพรเมอร์ 16-23S_F และ 16-23S_R มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *16S* และ *23S rRNA* ตามลำดับและลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณนี้สามารถใช้บ่งชี้ชนิดแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต คือ *Pseudomonas fluorescens, P. syringan, Xanthomonas arboricola, Agrobacterium vitis, Erwinia amylovora* ที่ขนาดผลผลิต PCR ไม่เท่ากัน (ประมาณ 800-1,550 คู่เบส) และ Lee et al. (2002) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันนี้ ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ Family *Vibrionaceae* ผลผลิต PCR มีขนาด 500-1,000 คู่เบส แต่รายงานการศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S - 23S rRNA* และใช้คู่ไพรเมอร์เดียวกันกับที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนน้อย พบเพียงการศึกษาในแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติกับแบคทีเรียอื่นที่อยู่ในสกุลเดียวกันซึ่งผลผลิต PCR มีขนาดใกล้เคียงกัน ดังเช่น Vanlooveren et al. (1999) ศึกษาแบคทีเรีย *Neisseria gonorrhoeae* จำนวน 105 สายพันธุ์ และ *N. gonorrhoeae* ที่แยกจากช่องคลอดของผู้ป่วยเพศหญิงในเมือง Banduag ประเทศอินโดนีเซีย โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 16-23S_F/R พบว่าผลผลิต PCR มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส

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

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

16S rRNA ของแบคทีเรียบางไอโซเลตที่ศึกษาด้วยความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ ประมาณ 1,500 คู่เบส สามารถระบุแบคทีเรียในระดับสกุลหรือชนิด การศึกษาในครั้งนี้แบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่แยกมาจากฟองน้ำทะเล *M. unguiculata* ซึ่งมีแบคทีเรียนำมาศึกษามากที่สุดจำนวน 5 ไอโซเลต สามารถจำแนกได้ 3 สกุล คือ *Haliea* sp., *Vibrio* sp. และ *Pseudoalteromonas* sp. เป็นที่น่าสังเกตว่า *Pseudoalteromonas* sp. นอกจากพบจำนวนไอโซเลตได้มากที่สุดในฟองน้ำชนิดนี้แล้ว (3 ไอโซเลต) ยังพบได้ในฟองน้ำทะเล *M. grandis* และ *X. testudinaria* อีกด้วย

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ในส่วนของยีน *16S rRNA* พบความหลากหลายระดับชนิดของ *Pseudoalteromonas* spp. ทั้งที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *M. unguiculata* โดยจัดแยกไว้ 2 กลุ่ม ซึ่งคาดว่าต่างชนิดกันยืนยันได้จากเดนโดรแกรมที่สร้างมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบเคียงกัน (ภาพที่ 4-4) ในฟองน้ำทะเล *L. herbacea* แบคทีเรียที่นำมาศึกษามีจำนวน 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 แต่จำนวนข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียอาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลชนิดที่ศึกษา (ไอโซเลตที่ 13) ยังไม่ปรากฏบนฐานข้อมูล GenBank เปอร์เซ็นต์เทียบเคียงได้จึงน้อย หรืออาจเกิดจากการบ่งชี้ชนิดด้วย *16S rRNA* ที่ใช้เทียบเคียงประมาณ 140 คู่เบส เพียงอย่างเดียวไม่สามารถระบุในระดับที่สูงกว่าสกุลได้ เหตุผลน่าจะเป็นในทำนองเดียวกับไอโซเลตที่ 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* สามารถระบุได้ในระดับสกุลเช่นกัน คือ แบคทีเรีย *Bacillus* sp., *Arhobacter* sp., *Micrococcus* sp. และ *Vibrio* sp. ที่แยกออกมาจากฟองน้ำทะเล *Aplysina aerphoba* และ *A. cavernicola*

23S rRNA

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเทียบเคียงในส่วนของยีน *23S rRNA* ร่วมกับ *16S rRNA* ด้วย การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันผลของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏบนฐานข้อมูล GenBank พบว่าขนาดของยีน *23S rRNA* ที่นำมาใช้เทียบเคียงของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตจะใกล้เคียงกัน 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* พบว่าไม่สามารถระบุได้ (unknown marine alpha proteobacterium) ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 19 ไอโซเลต กับฐานข้อมูล GenBank มีค่าที่ระดับ 87 - 94% (ตารางที่ 4-3) ซึ่งต่ำกว่าการเทียบเคียงด้วยยีน *16S rRNA* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้อมูลการศึกษาแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลในส่วนของยีน *23S rRNA* มีเป็นจำนวนน้อยและลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันเช่น มากแม้จะเป็นแบคทีเรียต่างสกุลกันเช่น ไอโซเลต 4 บ่งชี้ได้เป็น *Pseudoalteromonas* sp. กับไอโซเลต 12 บ่งชี้เป็น *Marinomonas* sp. ลำดับเบสมีความเหมือนเท่ากับ 81 % (ตารางที่ 4-5) จึงทำให้การจัดจำแนกด้วยข้อมูลของยีน *23S rRNA* อาจมีความคลาดเคลื่อนได้มากกว่าการบ่งชี้ด้วย *16S rRNA* จึงทำให้การใช้ยีน *23S rRNA* เพื่อระบุชนิดไม่เป็นที่นิยม แต่ยีน *23S rRNA* สามารถนำมาใช้ระบุแบคทีเรียในระดับสกุลได้บางไอโซเลตและใช้ได้ในกรณีที่ไม่สามารถระบุชนิดด้วยยีน *16S rRNA* แค่เพียงอย่างเดียว ส่วนใหญ่มักพบรายงานการศึกษาการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียด้วยลำดับเบสของยีน *23S rRNA* ใช้ควบคู่กับยีน *16S rRNA* ดังเช่นรายงานการศึกษาของ Webster et al. (2004) ที่ศึกษาบริเวณยีน *16S rRNA - 23S rRNA* กับแบคทีเรียที่แยกออกมาจากฟองน้ำทะเล *Rhopaloeides odorabile* พบว่าถ้าเทียบเคียงเฉพาะในส่วนของยีน *16S rRNA* ไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียบางสายพันธุ์ในดิวิชั่น α- proteobacteria และ Actinobacteria ได้ชัดเจน เนื่องจากในบริเวณยีน *16S rRNA* มีจำนวนเบส G+C น้อย จึงต้องใช้บริเวณยีน *23S rRNA* ซึ่งมีเบส G+C มาก ทำให้ยืนยันผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้ ซึ่งบริเวณยีน *23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลที่ศึกษาในครั้งนี้พบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนท้ายของ *23S rRNA* ที่เพิ่มจำนวนได้ทุกไอโซเลตมีลำดับเบสที่คล้ายกัน (ภาพที่ 4-5 ต่อ; ภายในกรอบเครื่องหมาย □) ซึ่งเป็นบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ ลำดับเบสบริเวณนี้เป็นประโยชน์ในการเลือกใช้ไพรเมอร์สากลที่แบคทีเรียหลากหลายชนิดสามารถเพิ่มจำนวนผลผลิต PCR ได้ด้วยคู่ไพรเมอร์เดียวกันเช่นเดียวกับที่ทำการศึกษาในครั้งนี้

ITS (internal transcribed spacer)

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะบริเวณ ITS ของแบคทีเรียทุกไอโซเลต พบว่าไม่สามารถเทียบเคียงได้กับฐานข้อมูล GenBank เนื่องจากข้อมูลที่ได้ในครั้งนี้เป็นข้อมูลใหม่ บริเวณ ITS ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่จัดไว้ต่างสกุล (ตามข้อมูล *16S rRNA*) นั้น พบว่ามีขนาดไม่เท่ากัน (236 – 352 คู่เบส) แต่ในสกุลเดียวกันพบว่ามีขนาดใกล้เคียงกันเช่น *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) ที่ศึกษากับแบคทีเรียสกุล *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) แต่พบความแปรปรวน (ความแตกต่าง) เมื่อเป็นแบคทีเรียต่างสกุลมากกว่าลำดับเบสของยีน *16S rRNA* เช่นสกุล *Pseudoalteromonas* sp. ผลการวิเคราะห์เดนโดรแกรมจัดไว้ 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% และไอโซเลด 5 และ 11 มีลำดับเบสเหมือนกัน 99.2% (ตารางที่ 4-3) และแบคทีเรีย *Mesorhizobium* sp. ทั้งไอโซเลตที่ 16, 17 และ 18 ที่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างได้จาก *16S rRNA* มีลำดับเบสเหมือนกัน 100 % สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มด้วยข้อมูล 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 แต่ทั้งนั้นพบว่าการอ่านลำดับเบสยังคงสิ้นเปลืองงบประมาณและระยะเวลา ดังนั้นเทคนิค PCR-RFLP จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยการหาความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR แล้วดัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้ววิเคราะห์ผลบนเจลอะกาโรสซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในช่วงบริเวณยีน *16S-23S rRNA* ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในเบื้องต้นพบว่าเอนไซม์ *Mse*I มีความเหมาะสมมากกว่าเอนไซม์อื่น 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 I5) ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง 2 ไอโซเลตนี้ได้ (ภาพที่ 4-11) และ *Mesorhizobium* sp. (isolate 16, 17, I8) ปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันจำนวน 3 รูปแบบ คือ G, H และ I ในขณะที่ข้อมูล *16S rRNA* ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากกันได้ (ภาพที่ 4-11)

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

(ภาพที่ 4-9) จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของ 2 ไอโซเลตนี้ได้ แต่ถ้ามีการใช้เอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เช่น *BfuCI* และ *Sau3AI* (ไม่ได้แสดงผลการวิเคราะห์) ตัดผลผลิต PCR ร่วมด้วยจะสามารถแยกความแตกต่างได้ ดังเช่นรายงานการศึกษาของ Ruiz et al. (2000) ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในบริเวณ *16S-23S rRNA* ITS ของแบคทีเรีย *Gluconobacter oxydans* โดยศึกษาจำนวน 4 สายพันธุ์ เลือกตัดผลผลิต PCR ด้วยเอนไซม์ *TaqI*, *RseI* และ *MspI* พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* แสดงความแตกต่างของ 4 สายพันธุ์นั้นได้ การบ่งชี้ชนิดจากเอกลักษณ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยไม่ผ่านการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์จะไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากนักเมื่อเทียบกับการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่ควรมีจำนวนตัวอย่างของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลที่ศึกษาจำนวนมากขึ้นเพื่อยืนยันผลและนำไปประยุกต์ใช้งาน

จะเห็นว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละสกุลเหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและใช้บ่งชี้สกุลของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลในเบื้องต้น ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงของยีน *16S rRNA-23S rRNA* พบว่ามีความเป็นเอกลักษณ์สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับจำแนกแบคทีเรียในระดับที่ลึกกว่าสกุลได้ ข้อความของพันธุกรรมที่ศึกษาในครั้งนี้เป็นข้อมูลใหม่ที่ยังไม่ปรากฏบนฐานข้อมูล GenBank ดังนั้นภายหลังการศึกษาเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บันทึกไว้บนฐานข้อมูล จะเป็นประโยชน์ใช้เทียบเคียงเพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียต่อไปได้ อีกทั้งใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนสำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลด้วยวิธีอื่น ๆ ได้อย่างดียิ่ง นอกเหนือจากลักษณะสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางเคมีที่การจัดจำแนกหรือบ่งชี้ชนิดด้วยวิธีการดังกล่าวยังไม่ชัดเจน

ความหลากหลายของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

การบ่งชี้แบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลในการศึกษาครั้งนี้ใช้ผลจากการเทียบเคียงความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน *16S rRNA* พบว่าฟองน้ำทะเลที่จำแนกแบคทีเรียอาศัยอยู่ร่วมมากที่สุดคือ 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) ส่วนชนิดที่มีจำนวนแบคทีเรียมากรองลงมาคือฟองน้ำทะเล *L. herbacea* ที่จำแนกได้จำนวน 3 สกุลจาก 4 ไอโซเลต ได้แก่ *Marinomonas* sp. (isolate 12), *Pseudomonas* sp. (isolate 13) และ *Dokdonia* sp (isolate 14 และ 15) การศึกษาครั้งนี้พบแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลที่จัดอยู่ในคลาส Gammaproteobacteria เช่น *Shewanella* sp., *Pseudoalteromonas* sp. *Marinomonas* sp. และพบว่าอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลแบบจำเพาะ ได้แก่ 1) *Pseudoalteromonas* sp. อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล *M. unguiculata* 2) *Dokdonia* sp. อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล *L. herbacea* และ 3)

Mesorhizobium sp. อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล *O. sagittaria* จัดอยู่ในคลาส Alphaproteobacteria ซึ่งสกุลของแบคทีเรียที่ศึกษามีรายงานการนำมาใช้ประโยชน์ ยกตัวอย่างเช่น *Pseudoalteromonas* sp. สามารถใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphyloccoccus aureus* และ *S. epidermidis* (Hentschel et al, 2001) *Bacillus* sp. ที่พบในฟองน้ำทะเล *Halichondria* sp. แบคทีเรียสกุลนี้บางชนิดมีคุณสมบัติสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนำไปผลิตยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคให้กับผู้ป่วยและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Devi et al., 2010) และ *Pseudomonas* sp. ซึ่งเป็นสกุลหนึ่งที่พบอยู่ร่วมในฟองน้ำทะเล *L. herbacea* สามารถสร้างสาร diketopiperazine และ phenazines ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด ดังรายงานการศึกษาของ Jayatilake et al. (1996) ที่ใช้ *P.aeroginosa* ซึ่งแยกได้จากฟองน้ำทะเล *Isodictya setifera* สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ เป็นต้น ฉะนั้นหากพบว่าแบคทีเรียมีความสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ทำให้ลำดับเบสบริเวณ ITS มีความสำคัญต่อการบ่งชี้ชนิดที่สามารถนำมาใช้เทียบเคียงและค้นหาแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตได้แม่นยำขึ้น

สรุปผลการทดลอง

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

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

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 และภายในสกุลเดียวกันพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันด้วย

ดังนั้นจึงควรใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมากกว่า 1 ชนิด ตัดผลผลิต PCR เพื่อยืนยันผลที่ถูกต้องและในการประยุกต์ใช้งาน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน 16S rRNA ในขนาดความยาวที่สมบูรณ์มากกว่า 1,500 คู่เบส เพื่อการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลได้ถูกต้องและชัดเจนยิ่งขึ้น

2. ควรทำการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลด้วยวิธีการอื่น ๆ เช่น ลักษณะสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีควบคู่กันไปด้วย

3. ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลและนำมาศึกษาให้มากขึ้น

บรรณานุกรม

จริยา ชมวารินทร์, ชาญวิทย์ ลีลายวัฒน์ และเต็มดวง ส้มไพบูรย์ (2540). *PCR Technology and Applications*. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, สุเมตต์ ปุจฉาการ และรวิวรรณ วัฒนดิลก. (2541). *การศึกษาสารไบโอแอกทีฟเมตาบอไลต์จากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ชูตา บุญภักดี. (2544). *ชีววิทยาโมเลกุล เอกสารประกอบการสอน 306411*. ชลบุรี : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เชาวนี มีหวัง, วงศ์ บุญสืบสกุล, กรรณิการ์ ดวงมาลย์ และสุรางค์ สุธิราวุธ. (2550). *การใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography เพื่อการจำแนก Bacillus sp.* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ฤทธิรงค์ พรหมมาศ พงษ์เทพ วิไลพันธ์ และพันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์. (2543). *การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพจากฟองน้ำทะเล*. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงพร คันธโชติ. (2537). *อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ*. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

บพิธ จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์. (2547). *สัตววิทยา* (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประพันธ์ ไดรยสุทธิ์. (2551). *ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อน*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. (2545). *จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี*. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุเมตต์ ปุจฉาการ. (2550). ฟองน้ำทะเล เอคไคโนเดิร์มและเพรียงหัวหอม : บริเวณเกาะครามและเกาะใกล้เคียง. 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., & Vaneechoutte, 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., Johensen, 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).

Cappucino, J. G., & Sherman, N. (1992). *Microbiology a Laboratory Manual* (3rd ed.). The Benjamin / Cummings.

Coplin, D. L., & Kado, C. I. (2001). Laboratory guide for identicfication 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., Ramırez, 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 withtin 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 *Apylsillid* 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.

Vanlooveren, 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 clnical 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

แหล่งที่มาของตัวออย่าง สารเคมี และอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

2. วิธีการเตรียมสารเคมี

2.1 5X TBE buffer (เตรียมสารละลายปริมาตร 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 (Lauria-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 ฐานข้อมูลฟองน้ำทะเลโครงการวิจัยย่อยที่ 1 สถานภาพทรัพยากรสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศชายฝั่งทะเล บริเวณหาดนางรอง เกาะจระเข้และกลุ่มเกาะจวง อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

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

ตาราง ผ 1-2 สถานที่ (Locality) เก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเล

Bacteria/Isolate	marine sponge Field code	Locality Characters & Environment	Locality
1	NANGRONG-A-POR-03	เนวปะการังติดชายฝั่งที่มีสาหร่ายทะเลกลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาลเป็นกลุ่มเด่น อยู่ร่วมด้วย ปะการังรูปทรงแบบก้อนเป็นชนิดเด่น ใกล้ชายฝั่งเป็นซาก ปะการัง	หาดนางรอง ต. เสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
2	NANGRONG-A-POR-03	เนวปะการังติดชายฝั่งที่มีสาหร่ายทะเลกลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาลเป็นกลุ่มเด่น อยู่ร่วมด้วย ปะการังรูปทรงแบบก้อนเป็นชนิดเด่น ใกล้ชายฝั่งเป็นซาก ปะการัง	หาดนางรอง ต. เสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
3	CHAN-A-POR-02	เนวปะการังติดชายฝั่งบนพื้นทราย ความชันไม่มาก, ซากปะการัง ปะการังกำลังฟื้นตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบเคลือบ กิ่งก้าน เป็นชนิดเด่น มีสาหร่ายเคลือบ	เกาะจาน อ่าวไม่ทราบชื่อทางทิศใต้ ต. เสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
4	CHAN-A-POR-02	เนวปะการังติดชายฝั่งบนพื้นทราย ความชันไม่มาก, ซากปะการัง ปะการังกำลังฟื้นตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบเคลือบ กิ่งก้าน เป็นชนิดเด่น มีสาหร่ายเคลือบ	เกาะจาน อ่าวไม่ทราบชื่อทางทิศใต้ ต. เสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
5	CHAN-A-POR-02	เนวปะการังติดชายฝั่งบนพื้นทราย ความชันไม่มาก, ซากปะการัง ปะการังกำลังฟื้นตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบเคลือบ กิ่งก้าน เป็นชนิดเด่น มีสาหร่ายเคลือบ	เกาะจาน อ่าวไม่ทราบชื่อทางทิศใต้ ต. เสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
6	CHAN-A-POR-02	เนวปะการังติดชายฝั่งบนพื้นทราย ความชันไม่มาก, ซากปะการัง ปะการังกำลังฟื้นตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบเคลือบ กิ่งก้าน เป็นชนิดเด่น มีสาหร่ายเคลือบ	เกาะจาน อ่าวไม่ทราบชื่อทางทิศใต้ ต. เสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
8	CHAN-A-POR-03	เนวปะการังติดชายฝั่งบนพื้นทราย ความชันไม่มาก, ซากปะการัง ปะการังกำลังฟื้นตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบเคลือบ กิ่งก้าน เป็นชนิดเด่น มีสาหร่ายเคลือบ	เกาะจาน อ่าวไม่ทราบชื่อทางทิศใต้ ต. เสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
9	CHAN-A-POR-03	เนวปะการังติดชายฝั่งบนพื้นทราย ความชันไม่มาก, ซากปะการัง ปะการังกำลังฟื้นตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบเคลือบ กิ่งก้าน เป็นชนิดเด่น มีสาหร่ายเคลือบ	เกาะจาน อ่าวไม่ทราบชื่อทางทิศใต้ ต. เสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี

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

Bacteria/Isolate	marine sponge Field code	Locality Characters & Environment	Locality
10	CHAN-A-POR-01	แนวปะการังติดชายฝั่งบนพื้นทราย ความชันไม่มาก, ชากปะการัง ปะการังกำลังฟื้นตัว ปะการังที่มีรูปทรงแบบเคลือบ กิ่งก้าน เป็นชนิดเด่น มีสาหร่ายเคลือบ	เกาะจาน อ่าวไม่ทราบชื่อทางทิศได้ ต. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
11	JORAKE-A-POR-02	ชุมชนปะการังบนก้อนหิน ความชันมาก ปะการังที่มีรูปทรงแบบก้อน เป็นชนิดเด่น มีสาหร่ายหินปูนสีแดง	เกาะจระเข้ ทิศตะวันตก ต. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
13	NANGRONG-A-POR-01	แนวปะการังติดชายฝั่งที่มีสาหร่ายทะเลกลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาลเป็นกลุ่มเด่น อยู่ร่วมด้วย ปะการังรูปทรงแบบก้อนเป็นชนิดเด่น ใกล้ชายฝั่งเป็นชากปะการัง	หาดนางรอง ต. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
14	NANGRONG-A-POR-01	แนวปะการังติดชายฝั่งที่มีสาหร่ายทะเลกลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาลเป็นกลุ่มเด่น อยู่ร่วมด้วย ปะการังรูปทรงแบบก้อนเป็นชนิดเด่น ใกล้ชายฝั่งเป็นชากปะการัง	หาดนางรอง ต. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
14	NANGRONG-A-POR-01	แนวปะการังติดชายฝั่งที่มีสาหร่ายทะเลกลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาลเป็นกลุ่มเด่น อยู่ร่วมด้วย ปะการังรูปทรงแบบก้อนเป็นชนิดเด่น ใกล้ชายฝั่งเป็นชากปะการัง	หาดนางรอง ต. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
15	NANGRONG-A-POR-01	แนวปะการังติดชายฝั่งทีมีสาหร่ายทะเลกลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาลเป็นกลุ่มเด่น อยู่ร่วมด้วย ปะการังรูปทรงแบบก้อนเป็นชนิดเด่น ใกล้ชายฝั่งเป็นชากปะการัง	หาดนางรอง ต. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
16	NANGRONG-A-POR-02	แนวปะการังติดชายฝั่งที่มีสาหร่ายทะเลกลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาลเป็นกลุ่มเด่น อยู่ร่วมด้วย ปะการังรูปทรงแบบก้อนเป็นชนิดเด่น ใกล้ชายฝั่งเป็นชากปะการัง	หาดนางรอง ต. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
17	NANGRONG-A-POR-02	แนวปะการังติดชายฝั่งที่มีสาหร่ายทะเลกลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาลเป็นกลุ่มเด่น อยู่ร่วมด้วย ปะการังรูปทรงแบบก้อนเป็นชนิดเด่น ใกล้ชายฝั่งเป็นชากปะการัง	หาดนางรอง ต. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
18	JORAKE-A-POR-01	ชุมชนปะการังบนก้อนหิน ความชันมาก ปะการังที่มีรูปทรงแบบก้อน เป็นชนิดเด่น มีสาหร่ายหินปูนสีแดง	เกาะจระเข้ ทิศตะวันตก ต. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี
19	CHAUNG-D-POR-01	ชุมชนปะการังติดชายฝั่งบนพื้นทราย ความชันไม่มาก ขอบนอกแนวปะการังความชันมาก, ชากปะการัง ฟองน้ำครกเด่น	เกาะจวง ทิศเหนือ จ. ชลบุรี

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

Orde r: 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 และ isolate 15 : *Dokdonia* sp.

Domain : Bacteria, Eukaryota

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Bacteroidetes

Class : Flavobacteria

Order : Flavobacteriales

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 ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *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 พึ่งพา[1, 2], ชูตา บุญภักดี[1, 2, 3], ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา[4]

Piyanath Pungpa[1, 2], Chuta Boonphakdee[1, 2, 3], Chutiwan Dechsakulwatana[4]

[1]*ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยา และการบริหารจัดการสารเคมี*

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

[2]*โครงการบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131*

[2]*Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131*

[3]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131*

[3] *Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131*

[4]*สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131*

[4] *Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131*

บทคัดย่อ

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 โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA* จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) โคลน และอ่านลำดับเบส ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 884-1,409 คู่เบส เมื่อเทียบเคียงลำดับเบสบนฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับเบสในส่วนต้นของผลิตภัณฑ์ PCR เทียบเคียงได้กับยีน *16S rRNA* ขนาด 121-143 คู่เบส มีความเหมือน 84-100 % สามารถบ่งชี้แบคทีเรียทะเลได้ทั้งหมด 11 สกุล 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 เทียบเคียงได้กับยีน *23S rRNA* ขนาด 302-523 คู่เบส มีความเหมือน 86-95 % และทั้งหมด 14 ไอโซเลต ระบุสกุลได้ตรงกับที่ใช้ลำดับเบสของยีน *16S rRNA* ยกเว้นไอโซเลต 14, 15, 16, 17 และไอโซเลต 18 ที่ไม่สามารถระบุได้ ดังนั้นลำดับเบสในส่วนของยีน *16S rRNA* และ 23S *rRNA* จึงมีประโยชน์ต่อการบ่งชี้และจัดจำแนกแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลได้

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.

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

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

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

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

บทนำ

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ตามแหล่งต่างๆ เช่น น้ำจืด น้ำทะเล ตะกอนดิน หรืออาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น สาหร่าย พืช และสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ร่วมมากที่สุดคือ ฟองน้ำทะเล เนื่องจากโครงร่างที่มีรูพรุนโดยรอบ มีรายงานว่าจำนวนชนิดของแบคทีเรียที่แยกออกจากฟองน้ำทะเลพบมากถึง 33% ในขณะที่แยกได้มาจากน้ำทะเลเพียง 2% เท่านั้น ปัจจุบันมนุษย์ใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลหลายประการ เช่น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย (Kelecom, 2002) เป็นต้น แบคทีเรียบางชนิดอาศัยอย่างจำเพาะกับฟองน้ำทะเลแต่ละชนิดหรือหลายชนิด (Taylor *et al.*, 2004) เช่น แบคทีเรีย *Pseudomonas aeroginosa* อาศัยอยู่กับฟองน้ำ *Isodictya setifera* สร้างสาร diketopiperazine และ phenazines ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด (Jayatilake *et al.*, 1996) หรือ *Micrococcus* sp. ที่แยกจากฟองน้ำ *Tedania ignis* สามารถสร้างสาร diketopiperazines ได้เช่นกัน (Bultel-Ponce

et al., 1998) เป็นต้น ดังนั้นการจัดจำแนกหรือระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเพื่อนำไปใช้ประโยชน์จึงมีความสำคัญ การบ่งชี้ชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาในแบคทีเรียบางชนิดอาจไม่สามารถบ่งชี้ เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน ในปัจจุบันจึงนิยมนำข้อมูลทางพันธุกรรมของแบคทีเรียมาช่วยในการจัดจำแนกกลุ่ม/ชนิดให้ชัดเจนยิ่งขึ้น อีกทั้งมีโอกาสค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่ได้ (Trevors and Van, 1989) ยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA* มีลำดับเบสอนุรักษ์จึงนิยมใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย ดังเช่นที่ปรากฏในรายงานวิจัยแบคทีเรียสกัดได้จากฟองน้ำทะเล *Rhopaloeides odorabile* ซึ่งจัดแบคทีเรียไว้ในดิวิชั่น α - proteobacteria และ Actinobacteria นอกจากนี้ยังมีรายงานศึกษาแบคทีเรียในสกุล (genus) *Vibrio* ที่แยกได้มาจากแหล่งธรรมชาติ เป็นต้น (Webster *et al.*, 2004) ดังนั้นในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยจึงศึกษาลำดับเบสของยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA* เพื่อบ่งชี้ชนิดแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลที่เก็บจากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร จ. ชลบุรี ซึ่งยังไม่ปรากฏรายงาน

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. <u>การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)</u>

ตัวอย่างแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลต (isolate) แยกได้จากฟองน้ำทะเล 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. สัตหีบ จ. ชลบุรี และเลี้ยงไว้ในอาหารเหลว นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis Technologies, Malaysia) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต แล้วใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับทำปฏิกิริยา PCR เพิ่มปริมาณในบริเวณยีน *16S-23S rRNA* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 16-23S_F (5'TTGTACACACCGCCCGTC) และ 16-23S_R (5'CCTTTCCCTCACGGTACTG) (Lee *et al.*, 2002) ปฏิกิริยาทำในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 2X master mix (10mM dNTPs, 25 mM $MgCl_2$, 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 ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, USA) จำนวน 250 นาโนกรัม ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง InGenius gel documentation system (Syngene, England) ภายหลังย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วบันทึกภาพ

2. <u>การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA*</u>

นำผลผลิต PCR ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด (pGEMT- easy Vector, Promega) และทรานฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (*Escherichia coli* JM109) คัดเลือกทรานฟอร์แมนท์โดยสังเกตจากโคโลนีสีขาวหรือสีขาวอมฟ้า ตรวจสอบซ้ำด้วยเทคนิค PCR แล้วสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส (First BASE Laboratories SdnBhd, Malaysia) โดย

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

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. <u>การบ่งชี้ชนิดแบคทีเรียด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* ถึงยีน *23S rRNA*</u>

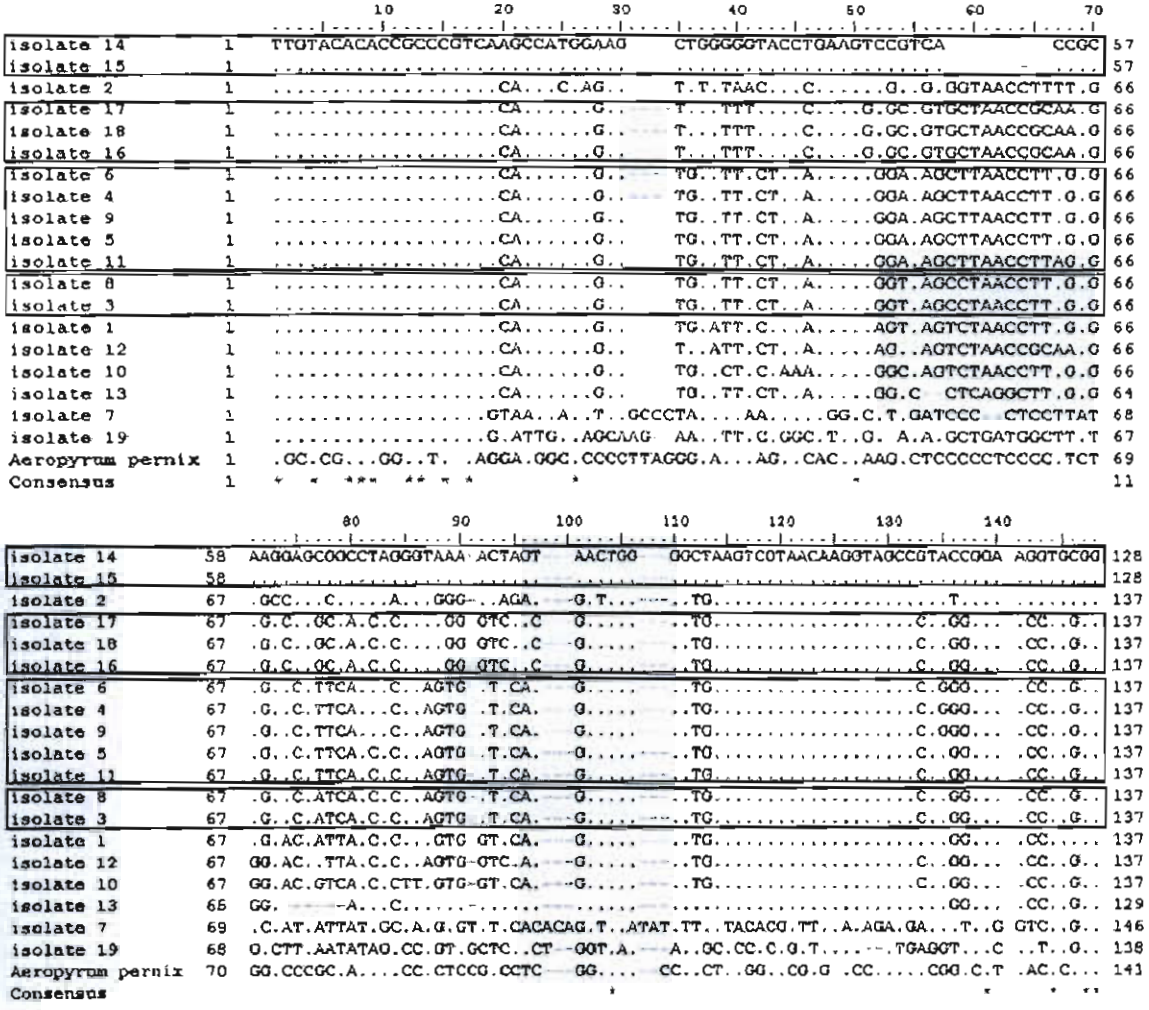
เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมด 19 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต 1 และ 2 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Halichondria* sp., ไอโซเลต 3, 4, 5, 6 และ ไอโซเลต 7 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *M. unguiculata*, ไอโซเลต 8 และ 9 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *M. grandis*, ไอโซเลต 11และ ไอโซเลต 10 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *X. testudinaria*, ไอโซเลต 12, 13, 14 และ ไอโซเลต 15 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *L. herbacea*, ไอโซเลต 16 และ 17 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *O. sagittaria*, ไอโซเลต 18 แยกได้ฟองน้ำทะเล *Neopetrosia* sp. และ ไอโซเลต 19 แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Cliona* sp. เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของยีน *16S rRNA* ถึงยีน *23S rRNA* ด้วยไพรเมอร์ 16S-23S_F/R พบว่าได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดแตกต่างกัน ภายหลังจากโคลนและอ่านลำดับเบสพบว่ามีขนาด 884 - 1,409 คู่เบส (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringa*, *Xanthomonas arboricola*, *Agrobacterium vitis*, *Erwinia amylovora* ที่พบว่าผลผลิต PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ 16-23S_F/R นี้มีขนาดไม่เท่ากัน คือประมาณ 800-1,550 คู่เบส (Jeng *et al.*, 2001) ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ที่เพิ่มจำนวนได้ในการศึกษาครั้งนี้กับฐานข้อมูล GenBank (เมื่อวันที่ 7 กันยายน 2553) พบว่าสามารถเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ 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., *Arhobacter* 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 aerphoba* และ *A. cavernicola*) (Hentschel *et al.*, 2001) และ 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนท้ายของผลิตภัณฑ์ PCR สามารถเทียบเคียงได้กับบริเวณยีน *23S rRNA* ที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank ขนาด 302-523 คู่เบส โดยมี % ความเหมือนสูงสุด 86 – 95 % และบ่งชี้ในระดับสกุลได้ตรงกันกับบริเวณยีน *16S rRNA* ทั้งหมด 14 ไอโซเลต (ตารางที่ 1) แต่บางไอโซเลตไม่สามารถบ่งชี้ได้ คือ ไอโซเลต 14 และ 15 ซึ่งเมื่อเทียบเคียงด้วยยีน *16S rRNA* สามารถระบุได้เป็น *Dokdonia* sp. และไอโซเลต 16, 17 และ 18 ได้เป็น *Mesorhizobium* sp. (ตารางที่ 2) จะเห็นได้ว่าจากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลกับฐานข้อมูล GeneBank ในส่วนของยีน *16S rRNA* สามารถบ่งชี้แบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลตได้ในระดับสกุลชัดเจนมากกว่ายีน *23S rRNA* แต่อย่างไรก็ตามการบ่งชี้แบคทีเรียบางครั้งไม่สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* แต่เพียงอย่างเดียว จึงมีความจำเป็นต้องใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *23S rRNA* ร่วมด้วยดังเช่นรายงานการศึกษาในแบคทีเรียที่สกัดได้จากฟองน้ำทะเล *Rhopaloeides odorabile*

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย 19 ไอโซเลต ที่แยกจากฟองน้ำทะเล 8 ชนิด ในส่วนของยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA*

		16S rRNA			*23S rRNA*		
Marine sponge	Bacteiral strain/isolate	Aligned position	Blast identity (%)	GenBank Accession no.	Aligned position	Blast identity (%)	GenBank Accession no
Halichondria 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
Monanchora unguiculata	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
	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
	7	16-143	90(115/129)	CP001805	424-1078	94(395/424)	AJ294422
Mycale grandis	8	1-137	100(137/137)	AY190666	435-938	86(370/433)	GU925965
	9	1-132	99(130/132)	AB373122	386-884	95(446/473)	FJ501589
Xestospongia testudinaria	10	1-134	100(134/134)	GU289648	454-953	88(378/430)	CP000606
	11	1-132	99(131/132)	AB373122	416-895	93(445/480)	FJ501589
Lamellodysidea herbacea	12	1-121	99(119/121)	EU330308	412-1117	89(425/482)	CP000749
	13	1-126	84(114/136)	AJ312161	479-1146	86(410/479)	Y00432
	14	1-128	99(126/128)	DQ481462	444-1280	86(368/428)	GU926738
	15	1-128	99(126/128)	DQ481462	430-1070	86(368/428)	GU926738
Oceanapia sagittaria	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
Neopetrosia sp	18	1-134	99(133/134)	AB604651	475-1409	93(371/403)	AY309485
Cliona sp.	19	78-134	100(76/78)	CP001614	398-991	87(302/349)	CP001614



ภาพที่ 2 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลจำนวน 19 ไอโซเลต และ *Aeropyrum pernix* (GenBank accession no. AB078022) เป็น outgroup

หมายเหตุ สัญญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแถวที่ 1; ( ) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง, □ = แบคทีเรียที่จัดไว้ในสกุลเดียวกัน

ที่พบว่าในส่วนของยีน *16S rRNA* จะไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียบางสายพันธุ์ในดิวิชั่น α – proteobacteria และ Actinobacteria ได้ชัดเจน เนื่องจากในบริเวณนี้มีจำนวนเบส G+C ต่ำ แต่เมื่อเทียบเคียงในส่วนของยีน *23S rRNA* ซึ่งมีเบส G+C สูง จะสามารถยืนยันผลการจำแนกแบคทีเรียภายในดิวิชั่นนี้ได้ (Webster *et al.*, 2004) และในการศึกษาครั้งนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *23S rRNA* ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลตมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกันมาก (ภาพที่ 3) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในแบคทีเรียที่ได้จากน้ำพุร้อนและแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวน 184 ไอโซเลตมีช่วงลำดับเบสอนุรักษ์ในส่วนของยีน *23S rRNA* (Pei *et al.*, 2009)

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

Marine sponge	Bacteral strain isolate	*16S rRNA* Species identity	*23S rRNA* Species identity
Halichondria sp.	1	*Alcanivorax* sp.	*Alcanivorax* sp.
	2	*Bacillus* sp.	*Bacillus* sp.
Monanchora unguiculata	3	*Halica* sp.	*Halica* sp.
	4	*Pseudoalteromonas* sp.	*Pseudoalteromonas* sp.
	5	*Pseudoalteromonas* sp.	*Pseudoalteromonas* sp.
	6	*Pseudoalteromonas* sp.	*Pseudoalteromonas* sp.
	7	*Vibrio* sp.	*Vibrio* sp.
Mycale grandis	8	*Halica* sp.	*Halica* sp.
	9	*Pseudoalteromonas* sp.	*Pseudoalteromonas* sp.
Xestospongia testudinaria	10	*Shewanella* sp.	*Shewanella* sp.
	11	*Pseudoalteromonas* sp.	*Pseudoalteromonas* sp.
Lamellodysidea herbacea	12	*Marinomonas* sp.	*Marinomonas* sp.
	13	*Pseudomonas* sp.	*Pseudomonas* sp.
	14	*Dokdonia* sp.	Uncultured bacterium
	15	*Dokdonia* sp.	Uncultured bacterium
Oceanapia sagittaria	16	*Mesorhizobium* sp.	Unknown: marine alpha proteobacterium
	17	*Mesorhizobium* sp.	Unknown: marine alpha proteobacterium
Neopetrosia sp.	18	*Mesorhizobium* sp.	Unknown: marine alpha proteobacterium
Cliona sp.	19	*Terediniibacter* sp.	*Terediniibacter* sp.

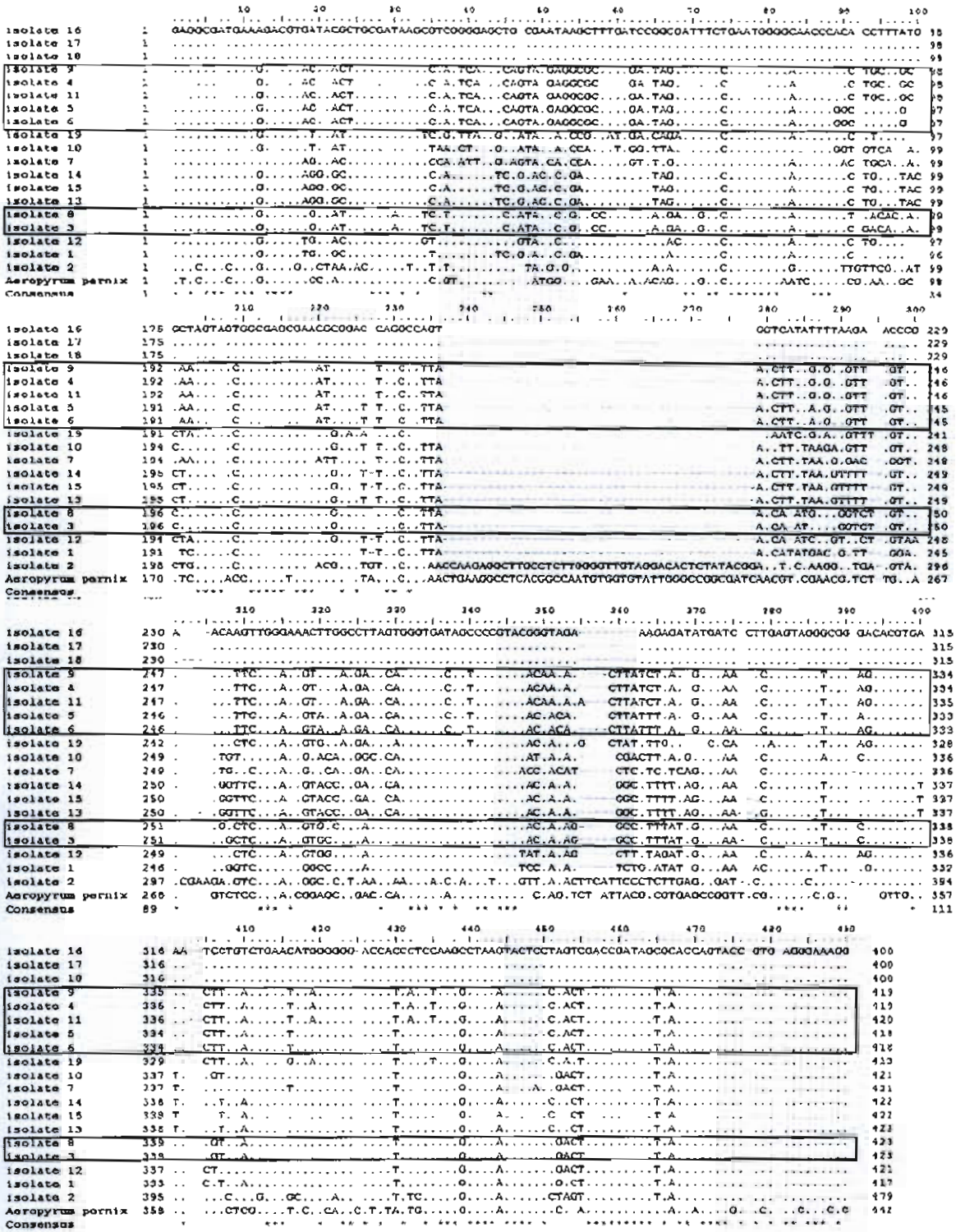
อนึ่งเทคนิค PCR ที่นำมาใช้ศึกษากับตัวอย่างแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลนี้มีความแม่นยำแม้มีดีเอ็นเอตัวอย่างเพียงเล็กน้อยก็สามารถเพิ่มจำนวนยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA* ได้อย่างจำเพาะ และลำดับนิวคลีโอไทด์มีประโยชน์ในการบ่งชี้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลในระดับสกุลได้

สรุปผลการทดลอง

1. ผลผลิต PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 16S-23S_F/R ของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลมีขนาดแตกต่างกัน มีขนาด 884-1,409 คู่เบส
2. ข้อความพันธุกรรมในส่วนของยีน *16S rRNA* สามารถใช้บ่งชี้สกุลของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลได้ดี ในขณะที่ข้อความพันธุกรรมในส่วนของยีน *23S rRNA* ช่วยยืนยันการจำแนกแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลได้ แต่พบว่าในบางสกุล เช่น *Dokdonia* sp. และ *Mesorhizobium* sp. ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *23S rRNA* ไม่สามารถบ่งชี้ได้ และงานวิจัยนี้เป็นงานสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

คำขอขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย



ภาพที่ 3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน *23S rRNA* ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลจำนวน 19 ไอโซเลต และ *Aeropyrum pernix* (GenBank accession no. AB078022) เป็น outgroup

หมายเหตุ สัญญลักษณ์ (-) = ไม่มีลำดับเบสในตำแหน่ง; (.) = ลำดับเบสที่เหมือนกันกับแถวที่ 1; (.) = ลำดับเบสเหมือนกันทั้งคอลัมน์; ตัวเลขด้านบน = ตำแหน่งของลำดับเบสที่เทียบเคียง ☐ = แบคทีเรียที่จัดไว้ในสกุลเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

Bultel-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.