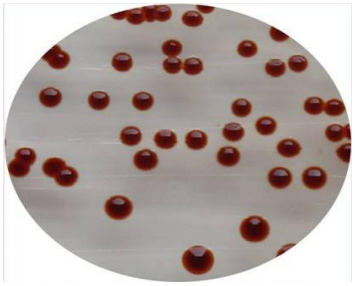
รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๕
เรื่อง

ความหลากหลายทางชนิดและลักษณะทางพันธุกรรมของจุลชีพที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลพื้นที่ปกปักษ์พันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี

(สนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช
อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี)

ภายใต้แผนงานวิจัย : ทรัพยากรชีวภาพทางทะเลในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี : องค์ความรู้ผันสู่วิถีไทยและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน



โดย

ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา
ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ

คณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ.- มหาวิทยาลัยบูรพา

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณแผ่นดินปี ๒๕๕๕
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๘

หน่วยงานที่รับผิดชอบโครงการ

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

หน่วยงานสนับสนุน

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

ผู้รับผิดชอบโครงการวิจัย

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

คณะกรรมการดำเนินงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจาก พระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

โดยพระราชานุญาต
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

ประกาศที่ อพ.สธ. 78/ 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ. ก

บทที่ 1 บทนำ 4

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

วัตถุประสงค์ของแผนงานวิจัย 6

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย 7

อุปกรณ์และสารเคมี

ตอนที่ 1 การเก็บตัวอย่างฟองน้ำ การคัดแยกแบคทีเรียและ การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

1.1 การคัดแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ 8

1.2 การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย 10

ตอนที่ 2 การศึกษารูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล 11

2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเล 11

2.2 การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างแบคทีเรียและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR 11

บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ 13

ตอนที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียและ การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

1.1 การคัดแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ 13

1.2 การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย 14

ตอนที่ 2 การศึกษารูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล 21

2.1 การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างแบคทีเรียและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR 21

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง และ ปัญหาอุปสรรค 23

การเผยแพร่ผลงานวิจัย 24

เอกสารอ้างอิง 27

ภาคผนวก 30

แบบรายงานประจำปีของโครงการวิจัย ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย **ลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายของจุลชีพที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล**

Molecular Genetics and Species Composition of Microorganisms in Marine Sponges

(เพื่อสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ระยะ ๕ ปีที่ ๔ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555)

ชื่อแผนงานวิจัย ทรัพยากรชีวภาพทางทะเลกับการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน กรณีศึกษาหาดนางรอง เกาะจระเข้และกลุ่มจวง อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

รายชื่อคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

หัวหน้าโครงการวิจัยและผู้วิจัย:

ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

169 ถนนลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131

โทร. 0 3839 1671~3 โทรสาร 0 3839 1674

E-mail: chutiwan@buu.ac.th, chutiwan@bims.buu.ac.th

ผู้วิจัย: ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

169 ถนนลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131

sumaitt@bims.buu.ac.th

ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 จำนวนเงิน 435,800 บาท

เริ่มทำการวิจัยเมื่อเดือน ตุลาคม 2554 (ตุลาคม พ.ศ. 2553 เริ่มปีที่ 1 ของโครงการฯ)

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ ทำการศึกษาคัดแยกแบคทีเรีย จากฟองน้ำทะเล 16 ชนิด ที่เก็บจากพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี บริเวณเกาะแรด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พบว่ามีแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำในปริมาณที่แตกต่างกันคือ ครั้งที่ 1 ในเดือนมกราคม 2555 ฟองน้ำจำนวน 11 ตัวอย่าง คัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีได้ 86 ไอโซเลต โดยมีปริมาณแบคทีเรียเจริญได้แตกต่างกัน คือฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง RAD55-B-POR02 พบมีปริมาณต่ำสุดที่ 1.1×10^5 ส่วนฟองน้ำเคลือบสีม่วง RAD55-A-POR02 *Haliclona* sp."purple" มีสูงสุดที่ 6.1×10^6 โคโลนีต่อกรัม ครั้งที่ 2 ในเดือนพฤษภาคม เก็บตัวอย่างฟองน้ำ ได้ 5 ตัวอย่าง คัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีได้ 40 ไอโซเลต โดยมีปริมาณแบคทีเรียเจริญได้แตกต่างกัน คือ ฟองน้ำก้อนสีขาว RAD55-G-POR01 พบมีปริมาณต่ำสุดที่ 1.1×10^5 โคโลนีต่อกรัม ส่วนฟองน้ำเคลือบบางสีแดง RAD55-F-POR02 มีปริมาณสูงสุด 4.88×10^6 โคโลนีต่อกรัม ดังแสดงในตารางที่ 1 และแผ่นภาพที่ 1 และทำการเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Zobell 0.3% agar เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

เมื่อทำการคัดเลือกไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกจากฟองน้ำจำนวน 78 สายพันธุ์ มาทำการตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ กับตัวแทนแบคทีเรียกรัมบวกได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC25923; *Bacillus subtillus* ATCC6633; และกรัมลบได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; *Vibrio anguilarum*; *Escherichia coli* ATCC25922) ด้วยวิธี Disc Diffusion Agar Assay พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกจากฟองน้ำจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ R55B1-4, R55B2-9, R55F1-9, R55F1-10, R55F2-2, R55F3-2, R55F3-11, R55G1-3, R55G1-6or, R55G2-1BK, แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียท7ดสอบได้ดี คิดเป็นร้อยละ 12.8 ของแบคทีเรียที่ทดสอบ โดยในจำนวนนี้มีแบคทีเรียทะเล 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ R55B 1-4, R55B2-9, R55B2-11Br, R55F1-9, R55G2-1BK, แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 4 แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่จะเป็นแหล่งใหม่ของสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่น่าสนใจที่จะทำการวิจัยต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 2

การบ่งชี้แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA*

จากการศึกษาในปีที่ผ่านมาจึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ฟองน้ำที่น่าสนใจมาทำการศึกษาการบ่งชี้แบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล 4 ชนิด ได้แก่ RAD55-B-POR01, RAD55-B-POR02, RAD55-F-POR01, และ RAD55-G-POR02 ด้วยการสกัด DNA เพื่อนำไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA* ต่อไปให้สามารถบ่งชี้ชนิดแบคทีเรียด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* ถึงยีน *23S rRNA* ด้วยไพรเมอร์ 16S-23S_F/R พบว่าได้ผลผลิต PCR ที่มี

ขนาดแตกต่างกัน ภายหลังจากโคลนและอ่านลำดับเบสพบว่ามีขนาด 884 - 1,409 คู่เบส แล้วนำไปเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลกับฐานข้อมูล GeneBank ในส่วนของยีน *16S rRNA* จะสามารถบ่งชี้แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตได้

บทนำ

ปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่มีความจำเป็นต้องจัดจำแนกหรือบ่งชี้ชนิดนั้น มักใช้เทคโนโลยีด้านชีวโมเลกุลศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยา เนื่องจากข้อมูลพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอนั้นมีความเป็นเอกลักษณ์จำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Hewitt *et al.,* 1989; Quick, 1993; Burton, 1996) และสามารถใช้เป็นข้อมูลเชิงลึกประยุกต์ใช้ร่วมกับงานศึกษาด้านอื่น ๆ นอกเหนือจากงานอนุกรมวิธาน ทำให้ทราบปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกัน ความสัมพันธ์ในสายวิวัฒนาการ รวมถึงกลไกและบทบาทที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่สำคัญในแง่มุมอื่นๆ

ข้อมูลทางพันธุกรรมหรือรหัสทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นเป็นข้อความหรือลำดับเบสบนจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่มีความจำเพาะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงจากปัจจัยภายนอกเหมือนกับลักษณะสัณฐานวิทยา (ที่ลักษณะปรากฏภายนอกเกิดจากการควบคุมและการแสดงออกของยีนบนจีโนม) ในสิ่งมีชีวิตทั่วไปจะแตกต่างกันที่การเรียงลำดับของเบสบนสายดีเอ็นเอ (DNA sequences) ซึ่งดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตประกอบด้วยส่วนที่อยู่บนโครโมโซม (chromosomal DNA หรือ nuclear DNA) และส่วนที่อยู่นอกโครโมโซม (ในสัตว์คือ mitochondrial DNA) ด้วยเหตุที่ลำดับเบสของ mitochondrial DNA มีการเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าลำดับเบสที่อยู่บนโครโมโซม ไม่เกิด recombination และมีการถ่ายทอดมาจากแม่เท่านั้น ทำให้ข้อมูลลำดับเบสของ mitochondrial DNA เป็นที่นิยมนำมาใช้ศึกษาถึงความหลากหลายของประชากรและใช้จัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกัน ซึ่งปัจจุบันในโครงการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โคดของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น นก ปลา และโคพิปอด ก็ใช้ลำดับเบสจากบริเวณดังกล่าวเช่นกัน (Bucklin *et al.,* 2003; Hebert *et al.,* 2004) แต่ทั้งนี้การศึกษาด้านพันธุกรรมของฟองน้ำทะเลและสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลนั้นในปัจจุบันมีปรากฏไม่มากนัก พบเพียงรายงานการศึกษาอนุกรมวิธานของฟองน้ำโดยใช้ lipid biomarkers (long chain fatty acids-LCFA, $>C_{24}$; Thiel *et al.,* 2002) และ insulin receptor-like tyrosin kinases (Skorokhod *et al.,* 1999) และมีปรากฏบ้างที่ใช้ลำดับเบสจากบริเวณ 18S rRNA (Cavalier *et al.,* 1996; Blanquer and Uriz, 2007) เป็นต้น ในขณะที่ปัจจุบันเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเพื่อช่วยในการจัดจำแนกและบ่งชี้ในสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรีย แพลงค์ตอนชนิดต่าง ๆ พืช และสัตว์อีกหลายชนิด เช่น นก ปลา หอย กุ้ง ปู เม่นทะเล เพรียงหิน และโคพิปอด เป็นต้น โดยนิยมใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะของ mitochondrial DNA ที่ตำแหน่งต่าง ๆ เช่น บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) (Bouchon *et al.*, 1994; Chow *et al.,* 1993; Chu *et al.,* 2001; Fernandez *et al.*, 2001; Masuda *et al.*, 1995; Imai *et al.,* 2004) บริเวณ cytochrome *c* oxidase I (COI) (Hebert *et al*., 2004; Addis and Peterson, 2005; Nichols, 2005) หรืออาจใช้ลำดับเบสทั้งหมดของ

mitochondrial DNA หรือจากลำดับเบสของ 16S rRNA (Webb and Maas, 2002; Weinberg *et al*., 2003; Nohara *et al.*, 2004) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้ลำดับเบสจาก 18S rRNA (nuclear DNA) ซึ่งเป็นลำดับเบสที่มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงช้ากว่าบริเวณอื่นเพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ในสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและยืนยันการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในระดับสกุล (genus) และครอบครัว (family) ให้มีความถูกต้องและยืนยันผลร่วมกับการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาได้ 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

งานอนุกรมวิธานการบ่งชี้และจัดจำแนกชนิดของฟองน้ำทะเลและสิ่งมีชีวิตหลากชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลของไทยในปัจจุบันเฉพาะข้อมูลด้านสัณฐานวิทยาภายนอกยังคงมีความสับสนบ่งชี้ได้ยาก และ/หรืออีกหลายชนิดที่ไม่สามารถบ่งชี้หรือจัดจำแนกได้ด้วยวิธีการศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยาแต่เพียงอย่างเดียว ในโครงการวิจัยนี้นำเทคนิคชีวโมเลกุลศึกษากับฟองน้ำทะเลและสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับฟองน้ำทะเลโดยเฉพาะจุลชีพกลุ่มแบคทีเรียทะเล ซึ่งข้อมูลและเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นฐานข้อมูลสากลของฟองน้ำทะเลและสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลของไทยต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางให้ทราบถึงความสัมพันธ์ในสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกันในน่านน้ำไทยนี้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

2. เพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลชีพ (แบคทีเรียทะเล) ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลที่พบในบริเวณเกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

3. เพื่อเป็นแนวทางในการบ่งชี้และจำแนกชนิดของฟองน้ำทะเลและจุลชีพที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำของไทยและจัดทำฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของจุลชีพที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่อง Thermo cycler
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง microcentrifuge
3. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
4. ตู้อบ (Memmert)
5. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Cool-Hotter Dry bath incubator) รุ่น MC-01N (Major science)
6. เครื่องผสมสาร (vortex)
7. ชุดแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า รุ่น i-Mupid
8. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator)
9. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)
10. เครื่องชั่ง 2-4 ตำแหน่ง Sartonus)
11. ไมโครเวฟ
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงสูญญากาศ (speed vacuum concentrator) (Savant)
13. ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) ทิปและทิปไส้กรองสำหรับปิเปต ขนาด 2, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
14. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (Canon)
15. หลอด microcentrifuge ผนังบางทนความร้อนขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
16. อุปกรณ์ผ่าตัด
17. บีกเกอร์ ขวดรูปกรวย (flask) และกระบอกตวงขนาดต่างๆ
18. ตะเกียงแอลกอฮอล์
19. จานเพาะเชื้อ

สารเคมี

1. Boric acid (APS Finechem)

2. EDTA disodium, dehydrate ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) (Amresco)
3. Ethanol [absolute] (VWR™BDH Prolabo)
4. Ethidium bromide (Invitrogen™ Life Technologies)
5. NaOH (Univar)
6. Nuclease free water (Promega)
7. SeaKem® Gold Agarose (Cambrex Bio Science)
8. Standard TE buffer (Invitrogen™ Life Technologies)
9. *Taq* DNA Polymerase (Vivantis, Germany)
10. 6x Loading dye (Fermentas)

เครื่องแก้วและสารละลายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ทำให้สะอาดและปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย-บริเวณยีน 16S rRNA

Eubac27F 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'

Eubac1492R 5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'

ทั้งหมดสังเคราะห์โดยบริษัท First Base Laboratories SdnBhd (Malasia)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA marker)

ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้คือ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas) จำนวน 0.5 ไมโครกรัม/ช่อง หลังจากทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 14 แถบ แต่ละแถบมีขนาดดังนี้ 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 คู่เบส ตามลำดับ

ตอนที่ 1 การเก็บตัวอย่างฟองน้ำ การคัดแยกและตรวจหาฤทธิ์ของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ

ทำการเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลและตัวอย่างน้ำในบริเวณที่ฟองน้ำอาศัยอยู่ (โดยการดำน้ำแบบการใช้เครื่องช่วยหายใจใต้น้ำ (SCUBA driving)) อย่างน้อย 5-8 ตัวอย่าง จากบริเวณเกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พร้อมบันทึกข้อมูลของสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ความลึกของน้ำ สิ่งแวดล้อมที่ฟองน้ำยึดเกาะ และบันทึกภาพใต้น้ำไว้ ตัวอย่างฟองน้ำจะถูกแช่แข็งไว้ระหว่างนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างฟองน้ำที่เก็บได้ส่วนหนึ่งจะนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอและเก็บรักษาไว้ในเอทธานอล 99% เพื่อไว้ใช้งานต่อไป

การตรวจหาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ (Screening of antimicrobial activity

1.1 การเตรียม Standard test strains ได้แก่

- *Staphylococcus aureus* ATCC25923
- *Bacillus subtilis* ATCC6633
- *Vibrio . anguillarum* / *Vibrio parahaemolyticus* หรือ
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC
- *Escherichia coli* ATCC25922

1.1.1. เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (Standard test strain) ในอาหารวุ้น Tryptic Soy Agar medium หรือ Mueller Hinton medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ส่วนฟังไจใช้ อาหารวุ้น Potato Dextose แทน

1.1.2 ทำการถ่ายเชื้อ ลงในหลอดอาหารเหลว TSB (heavy inoculate) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในการเขย่าในแนวราบ (100 รอบต่อนาที)

1.1.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (O.D. ที่ 600 nm) ของเชื้อ Standard test strain โดยจะใช้ทำการทดลองเมื่อมีค่า O.D. ประมาณ 0.5 – 1.0

1.1.4. ดูดเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงใน Tryptic Soy Agar medium หรือ Mueller Hinton medium plate แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำซ้ำ 3 จาน (trplicates)

1.2 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนด (Screening of Antimicrobial activity assay)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำ (test strain)

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

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

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

1.2.4. นำ antibiotic assay disc (AA disc) ที่ปราศจากเชื้อ ขนาด 13 มิลลิเมตร วางบน petri dish ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นดูดเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากฟองน้ำมา 0.1 มิลลิเมตร มาหยดลงบน sterile AA disc ทิ้งไว้สักครู่ แล้วนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ standard ที่เตรียมไว้แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 – 24 ชั่วโมง และควบคุมการทดลองโดยใช้ standard antibiotic disc ที่มี Oxytetracyclin 30 ไมโครกรัมและ Streptomycin 10 ไมโครกรัม ต่อ disc โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicates)

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

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

ตอนที่ 2 การศึกษารูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล

2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเล

นำฟองน้ำทะเลแต่ละชนิดมาล้างด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ตัดเนื้อเยื่อฟองน้ำ ซับน้ำออกจากฟองน้ำด้วยกระดาษซับ จากนั้นตัดฟองน้ำเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนักรวมประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในโกร่งแล้วบดให้ละเอียดด้วยแทงแกวคน จากนั้นเติมน้ำทะเลที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไป 5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:1 ของน้ำหนักกับปริมาตรของน้ำทะเล) ดูดสารละลายในหลอดมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} และ10^{-3} ตามลำดับ จากนั้นดูดตัวอย่างแต่ละความเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI medium แล้วเกลี่ยเชื้อบนผิวหน้าอาหารให้กระจายจนทั่ว นำจานไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นแยกโคโลนีแบคทีเรียที่มีลักษณะเบื้องต้นที่แตกต่างกัน เช่น สี รูปร่าง และขนาดของโคโลนี ไปเขี่ยลงจานอาหารใหม่ ทำการแยกซ้ำต่อไป (reisolate) จนได้เชื้อแบคทีเรียที่แยกเป็นโคโลนีบริสุทธิ์สวนหนึ่งนำมาทำ PCR และเก็บรักษาในอาหารเก็บเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่มีอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semi-solid)

2.2 การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างแบคทีเรียและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

2.2.1. <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 สายละ1 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 ด้วย

วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (Fermentas, USA) จำนวน 250 นาโนกรัม ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง InGenius gel documentation system (Syngene, England) ภายหลังย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วบันทึกภาพ

2.2.2. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA*

นำผลผลิต PCR ของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทะเลมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด (pGEMT- easy Vector, Promega) และทรานฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (*Escherichia coli* JM109) คัดเลือกทรานฟอร์แมนท์โดยสังเกตจากโคโลนีสีขาวหรือสีขาวอมฟ้า ตรวจสอบซ้ำด้วยเทคนิค PCR แล้วสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส (First BASE Laboratories SdnBhd, Malaysia) โดยอ่าน 2 ทิศทาง จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ด้วยโปรแกรม Blast และเทียบเคียงข้อมูลของตัวอย่างร่วมกับ *Aeropyrum pernix* (รหัสหมายเลข AB078022) ด้วยโปรแกรม Clustalx

ผลการทดลองและวิจารณ์

ตอนที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียและ การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

1.1 การคัดแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

จากการดำเนินการเก็บตัวอย่างฟองน้ำเพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากฟองน้ำ จำนวน 16 ตัวอย่าง ให้บริสุทธ์ ได้แบคทีเรีย 124 สายพันธุ์ และเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Zobell 0.3% agar

การคัดแยกแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

<u>เดือนมกราคม</u> จำนวน 11 ตัวอย่าง คัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีได้ 86 ไอโซเลต โดยมีปริมาณแบคทีเรียเจริญได้แตกต่างกัน คือฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง RAD55-B-POR02 พบมีปริมาณต่ำสุดที่ 1.1×10^5 ส่วนฟองน้ำเคลือบสีม่วง RAD55-A-POR02 *Haliclona* sp."purple" มีสูงสุดที่ 6.1×10^6 โคโลนีต่อกรัม

<u>เดือนพฤษภาคม</u> เก็บตัวอย่างฟองน้ำ ได้ 5 ตัวอย่าง คัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีได้ 40 ไอโซเลต โดยมีปริมาณแบคทีเรียเจริญได้แตกต่างกัน คือ ฟองน้ำก้อนสีขาว RAD55-G-POR01 พบมีปริมาณต่ำสุดที่ 1.1×10^5 โคโลนีต่อกรัม ส่วนฟองน้ำเคลือบบางสีแดง RAD55-F-POR02 มีปริมาณสูงสุด 4.88×10^6 โคโลนีต่อกรัม ดังแสดงในตารางที่ 1 และแผ่นภาพที่ 1

และทำการเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Zobell 0.3% agar เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 1 จำนวนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำทะเลที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

รหัส	ชื่อฟองน้ำ	ชื่อวิทยาศาสตร์		ปริมาณแบคทีเรีย
		Genus	Species	CFU/g
1. RAD55-A-POR01	ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง	*Oceanapia*	*sagittaria*	$2.6x10^5$
2. RAD55-A-POR02	ฟองน้ำเคลือบสีม่วง	*Haliclona*	sp."purple"	$1.6x10^6$
3. RAD55-B-POR01	ฟองน้ำครกสีม่วงอ่อน	*Xestospongia*	cf. *bergquistia*	$1.98x10^5$
4. RAD55-B-POR02	ฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง	*Xestospongia*	*testudinaria*	$1.1x10^5$
5. RAD55-B-POR03	ฟองน้ำเคลือบเขียวเหลือง	*Amorphinopsis*	*excavans*	$1.0x10^6$
6. RAD55-B-POR04	ฟองน้ำหนังสีดำ	*Chondrilla*	sp."black"	$7.5x10^5$
7. RAD55-B-POR05	ฟองน้ำยืดหยุ่นสีดำ	*Hyrtios*	*erectus*	$7.58x10^5$
8. RAD55-B-POR06	ฟองน้ำตาข่ายสีฟ้า	*Dysidea*	sp. "blue"	$4.1x10^6$
9. RAD55-C-POR01	ฟองน้ำครกสีม่วงอ่อน	*Xestospongia*	cf. *bergquistia*	$4.37x10^5$
10.RAD55-C-POR02	ฟองน้ำพุ่มหนามสีดำ	*Echinodictyum*	*conulosum*	$4.0x10^6$
11.RAD55-C-POR03	ฟองน้ำปล่องภูเขาไฟ	*Spheciospongia*	congenera	$8.7x10^5$
12.RAD55-F-POR01	ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง	*Iotrochota*	*baculifera*	$1.4x10^5$
13.RAD55-F-POR02	ฟองน้ำเคลือบบางสีแดง	*Monanchora*	*unguiculata*	$4.88x10^6$
14.RAD55-F-POR03	ฟองน้ำเคลือบสีม่วง	*Haliclona*	sp."purple"	$3.46x10^5$
15.RAD55-G-POR01	ฟองน้ำก้อนสีขาว	*Geodia*	sp."white"	$1.0x10^5$
16.RAD55-G-POR02	ฟองน้ำเชือก	*Clathria*	reinwardti	$7.4x10^5$

1.2 การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

จากการนำแบคทีเรียที่คัดแยกจากฟองน้ำจำนวน 78 สายพันธุ์ มาทำการตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญกับตัวแทนแบคทีเรียกรัมบวกได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC25923; *Bacillus subtillus* ATCC6633; และกรัมลบได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; *Vibrio anguilarum*; *Escherichia coli* ATCC25922) พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกจากฟองน้ำจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ R55B1-4, R55B2-9, R55F1-9, R55F1-10, R55F2-2, R55F3-2, R55F3-11, R55G1-3, R55G1-6or, R55G2-1BK, แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียท7ดสอบได้ดี คิดเป็นร้อยละ 12.8 ของแบคทีเรียที่ทดสอบ โดยในจำนวนนี้มีแบคทีเรียทะเล 4 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ R55B 1-4, R55B2-9, R55B2-11Br, R55F1-9, R55G2-1BK, แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 4 ชนิด และเมื่อดำเนินการเพาะเลี้ยงทดสอบซ้ำเพื่อตรวจหาประสิทธิภาพเพื่อยืนยันฤทธิ์ใน

การยับยั้งการเจริญกับตัวแทนแบคทีเรียด้วยวิธี Disc Diffusion Agar Assay พบว่ามีแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำยังคงแสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง ซึ่งยังมีประสิทธิภาพ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลยืนยันการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบ โดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำบางชนิด
(แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของบริเวณที่ยับยั้ง: SA= *Staphylococcus aureus*; BS= *Bacillus subtillus*; VA= *Vibrio anguilarum*; EC= *Escherichia coli*)

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)			
		B. subtilis	***S. aureus***	***V. alginolyticas***	***E. coli***
1	R55B1-1or	-	-	-	-
2	R55B1-4	20.0	20.0	19.0	17.0
3	R55B1-5	-	-	-	-
4	R55B1-8	19.0	18.0	18.0	17.5
5	R55B1-12	-	16.0	15.5	15.0
6	R55B1-13	-	-	-	-
7	R55B1-16Y	-	-	-	-
8	R55B1-19	22.0	-	-	-
9	R55B1-20	-	-	-	-
10	R55B1-21	-	-	-	-
11	R55B2-1	-	-	-	-
12	R55B2-2	23.5	16.5	19.50	-
13	R55B2-3Y	-	-	-	-
14	R55B2-5DP	24.0	-	-	-
15	R55B2-6	22.5	-	-	-
16	R55B2-7Y	-	-	-	-
17	R55B2-8or	-	-	-	-
18	R55B2-9	16.0	22.5	17.5	18.0
19	R55B2-10	-	-	-	-
		ผลของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)			

ลำดับ	รหัสเชื้อ	*B. subtilis*	*S.aureus*	*V.alginolyticas*	*E.coli*
20	R55B2-11Br	16.5	25.5	15.0	17.0
21	R55B2-13	-	-	-	-
22	R55B2-14	-	-	-	-
23	R55B2-15	-	-	-	-
24	R55B2-16	-	-	-	-
25	R55B4-2	-	-	-	-
26	R55B4-5Y	-	-	-	-
27	R55B4-7	-	-	-	-
28	R55B4-8	18.0	-	-	16.5
29	R55B5-1	-	-	-	-
30	R55B5-3	-	-	-	-
31	R55F1-2	-	-	-	-
32	R55F1-3	-	-	-	-
33	R55F1-4	-	-	-	-
34	R55F1-5Y	-	-	-	-
35	R55F1-5	-	-	-	-
36	R55F1-6	-	-	-	-
37	R55F1-7	-	-	-	-
38	R55F1-8Br	18.5	-	-	-
39	R55F1-9	18.5	16.5	16.0	18.5
40	R55F1-10	16.5	-	-	-
41	R55F1-11	-	-	-	-
42	R55F1-12	19.5	17.5	16.5	18.5
43	R55F1-13Y	-	-	-	-
44	R55F1-14	-	-	-	-

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)			
		B. subtilis	***S.aureus***	***V.alginolyticas***	***E.coli***
45	R55F2-1	-	-	-	-
46	R55F2-2	17.5	-	-	-
47	R55F3-1	-	-	-	-
48	R55F3-2	16.5	-	-	-
49	R55F3-3	18.5	17.5	16.5	18.5
50	R55F3-4Y	-	-	-	-
51	R55F3-5Y	-	-	-	-
52	R55F3-6or	-	-	-	-
53	R55F3-7	-	-	-	-
54	R55F3-8or	-	-	-	-
55	R55F3-9	-	-	-	-
56	R55F3-10	-	-	-	-
57	R55F3-11	17.0	15.5	-	16.5
58	R55G1-1or	-	-	-	-
59	R55G1-2	-	-	-	-
60	R55G1-3	16.5	15.5	-	16.0
61	R55G1-4Y	-	-	-	-
62	R55G1-5	-	-	-	-
63	R55G1-6or	15.5	15.0	-	15.5
64	R55G1-7	-	-	-	-
65	R55G1-8	-	-	-	-
66	R55G1-9	-	-	-	-
67	R55G1-10or	-	-	-	-
68	R55G1-11Y	-	-	-	-
69	R55G2-1BK	19.5	19.5	18.5	20.0

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)			
		B. subtilis	***S.aureus***	***V.alginolyticas***	***E.coli***
70	R55G2-2	-	-	-	-
71	R55G2-3or	-	-	-	-
72	R55G2-4Y	-	-	-	-
73	R55G2-5	-	-	-	-
74	R55G2-6	-	-	-	-
75	R55G2-7	-	-	-	-
76	R55G2-8Y	-	-	-	-
77	R55G2-9	-	-	-	-
78	R55G2-10Y	-	-	-	-

RAD55-B-POR02 ฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง (*Xestospongia testudinaria* (Lamarck, 1814)

RAD55-A-POR02ฟองน้ำเคลือบสีม่วง (*Haliclona* sp."purple")

RAD55-B-POR01 ฟองน้ำครกสีม่วงอ่อน *(Xestospongia* cf. *bergquistia)*

RAD55-F-POR01 ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง (*Iotrochota baculifera*)

แผ่นภาพที่ 1 ตัวอย่างฟองน้ำที่มีแบคทีเรียที่สามารถนำมาคัดแยกและเจริญบนอาหารในห้องปฏิบัติการได้

<u>เดือนมกราคม</u> พบมีปริมาณแบคทีเรียเจริญได้แตกต่างกัน คือฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง RAD55-B-POR02 พบมีปริมาณต่ำสุดที่ 1.1×10^5 ส่วนฟองน้ำเคลือบสีม่วง RAD55-A-POR02 *Haliclona* sp."purple" มีสูงสุดที่ 6.1×10^6 โคโลนีต่อกรัม

<u>เดือนพฤษภาคม</u> พบมีปริมาณแบคทีเรียเจริญได้แตกต่างกัน คือ ฟองน้ำก้อนสีขาว RAD55-G-POR01 พบมีปริมาณต่ำสุดที่ 1.1×10^5 โคโลนีต่อกรัม ส่วนฟองน้ำเคลือบบางสีแดง RAD55-F-POR02 มีปริมาณสูงสุด

RAD55-F-POR02 ฟองน้ำเคลือบบางสีแดง (*Monanchora unguiculata*)

RAD55-G-POR02 ฟองน้ำเชือก (*Clathria reinwardti*)

แผ่นภาพที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างฟองน้ำที่มีแบคทีเรียที่สามารถนำมาคัดแยกและเจริญบนอาหารในห้องปฏิบัติการได้

<u>เดือนมกราคม</u> พบมีปริมาณแบคทีเรียเจริญได้แตกต่างกัน คือฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง RAD55-B-POR02 พบมีปริมาณต่ำสุดที่ 1.1 x 10^5 ส่วนฟองน้ำเคลือบสีม่วง RAD55-A-POR02 *Haliclona* sp."purple" มีสูงสุดที่ 6.1 x 10^6 โคโลนีต่อกรัม

<u>เดือนพฤษภาคม</u> พบมีปริมาณแบคทีเรียเจริญได้แตกต่างกัน คือ ฟองน้ำก้อนสีขาว RAD55-G-POR01 พบมีปริมาณต่ำสุดที่ 1.1 x 10^5 โคโลนีต่อกรัม ส่วนฟองน้ำเคลือบบางสีแดง RAD55-F-POR02 มีปริมาณสูงสุด 4.88x10^6 โคโลนีต่อกรัม

ตอนที่ 2 การศึกษารูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล

การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างแบคทีเรียและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

การสกัดสารพันธุกรรม ดำเนินการสกัดสารพันธุกรรมจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำจำนวน 4 สายพันธุ์ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ RAD55-B-POR01, RAD55-B-POR02, RAD55-F-POR01, และ RAD55-G-POR02 ดังตารางที่ 3 สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมฟองน้ำในภายหลังจะนำไปเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank (accession No.) ส่วนอีก 6 สายพันธุ์นั้นสารพันธุกรรมที่ได้พบว่ายังไม่บริสุทธิ์ จะต้องดำเนินการสกัดใหม่

ตารางที่ 3 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ดำเนินการสกัดสารพันธุกรรมได้และอยู่ในระหว่างดำเนินการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์

รหัส	**ชื่อฟองน้ำ**	**ชื่อวิทยาศาสตร์**		DNA Extraact
		Genus	**Species**	
1. RAD55-B-POR01	ฟองน้ำครกสีม่วงอ่อน	*Xestospongia*	cf. *bergquistia*	d
2. RAD55-B-POR02	ฟองน้ำครกสีน้ำตาลเหลือง	*Xestospongia*	*testudinaria*	d
3.RAD55-F-POR01	ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง	*Iotrochota*	*baculifera*	d
4.RAD55-G-POR02	ฟองน้ำเชือก	*Clathria*	reinwardti	d

การบ่งชี้แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA*

จากการศึกษาในปีที่ผ่านมาจึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ฟองน้ำที่น่าสนใจมาทำการศึกษาการบ่งชี้แบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล 4 ชนิด ได้แก่ RAD55-B-POR01, RAD55-B-POR02, RAD55-F-POR01, และ RAD55-G-POR02 ด้วยการสกัด DNA เพื่อนำไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *16S rRNA* และ *23S rRNA* ต่อไปให้สามารถบ่งชี้ชนิดแบคทีเรียด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* ถึงยีน *23S rRNA*

ด้วยไพรเมอร์ 16S-23S_F/R พบว่าได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดแตกต่างกัน ภายหลังจากโคลนและอ่านลำดับเบสพบว่ามีขนาด 884 - 1,409 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในแบคทีเรีย *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) แล้วนำไปเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่อยู่

ร่วมกับฟองน้ำทะเลกับฐานข้อมูล GeneBank ในส่วนของยีน *16S rRNA* จะสามารถบ่งชี้แบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลตได้ในระดับสกุลชัดเจนมากกว่ายีน *23S rRNA* แต่อย่างไรก็ตามการบ่งชี้แบคทีเรียบางครั้งไม่สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *16S rRNA* แต่เพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำเช่นเดียวกับผลการวิจัยของท่านอื่นๆ

ประชาคมแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำสี่ชนิดจากทะเลจีนใต้ฟองน้ำ-*Stelletta tenuis, Halichondria rugosa, Dysidea avara* และ *Craniella australiensis* ที่ถูกเพาะเลี้ยงเลี้ยงผสมกัน ถูกตรวจสอบโดยเทคนิค ประชาคมของจุลินทรีย์ DNA-based DGGE fingerprinting และ การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ 16S rDNA เชื้อแบคทีเรียที่หลากหลายเช่น alpha-, gamma-, Delta-Proteobacteria Bacteroidetes และ Firmicutesที่เลี้ยง ซึ่งมีบางส่วนที่ไม่สามารถเลี้ยงได้มาก่อนหน้านี้สายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพความคล้ายคลึงกันน้อยกว่า 95% ไปเทียบกับที่ใกล้เคียงที่สุดในกลุ่มของมัน และ กลุ่ม symbionts ของฟองน้ำที่เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ มีการเพิ่มของสารสกัดจากฟองน้ำ ตามที่ 16S rDNA BLAST วิเคราะห์ส่วนใหญ่ของเชื้อแบคทีเรียที่ถูกเพาะเลี้ยงจากฟองน้ำเป็นครั้งแรก แม้จะ phyla ที่คล้ายกันกับของเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับก่อนหน้านี้ การเลือกสารสกัดจากฟองน้ำชนิดของแบคทีเรียที่เลี้ยงก็ชี้ให้เห็น แม้ว่าผลของสารสกัดจากฟองน้ำในประชาคมแบคทีเรียในสารอาหารสูงไม่ได้มีนัยสำคัญ แม้ว่า กลุ่ม alphaและ gamma-Proteobacteria ปรากฏในรูปแบบที่โดดเด่นของประชาคมแบคทีเรียที่โดดเด่นเพาะเลี้ยงของฟองน้ำ 4 ชนิด องค์ประกอบของประชาคมแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงผสมแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอาหารและชนิดฟองน้ำ ความหลากหลายของแบคทีเรียที่ยิ่งใหญ่พบว่าในอาหาร C และ CS สำหรับ *Stelletta tenuis* ในอาหาร F และ FS สำหรับ *Halichondria rugosa* และ Craniella australiensis, S. tenuis พบว่ามีความหลากหลายมากที่สุดของแบคทีเรียเพาะเลี้ยงได้แก่ alpha-, gamma-, Delta-Proteobacteria, Bacteroidetes และ Firmicutes ตามด้วยฟองน้ำ Dysidea avara โดยไม่ต้อง Delta-Proteobacteria rugosa Halichondria, ฟองน้ำที่มีเพียงอัลฟา, gamma-Proteobacteria และ Bacteroidetes และ australiensis ฟองน้ำ C. มีเพียงอัลฟา, gamma-Proteobacteria และ Firmicutes จากการศึกษาครั้งนี้โดยกลยุทธ์ของการเพาะเลี้ยงผสมรวมเข้ากับประชาคม DNA-based DGGE fingerprinting และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ ที่เจริญเติบโตของจุลินทรีย์, ประชาคมแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ของฟองน้ำอาจจะพิสูจน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ(Li., *et al*. 2007)

จากเทคนิคทางโมเลคุลาร์ที่ไม่ต้อพึ่งการเพาะเลี้ยงที่ Li และ คณะ (2007) ใช้ในการวิจัยโดยการใช้เทียบกับ 16S, rDNA clone library alongside RFLP และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับฟองน้ำ 3 ตัวอย่างจากทะเลจีนใต้, *Stelletta tenui, Halichondria rugosa* และ *Dysidea avara* พบความหลากหลายของแบคทีเรียที่ตรวจอย่างมาก ตามจำนวนจีโนม DNA-bases 16S rDNA clone library อุดมไปด้วยโคลนที่แสดงออกต่ำกับลำดับที่ดึงมาจากฐานข้อมูลพบว่าเป็น symbionts ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียจาก *Stelletta tenui* จะคล้ายกับของ

Halichondria rugosa ประกอบด้วย gamma-*Proteobacteria* และ *Firmicutes* ในขณะที่ alpha-*Proteobacteria*, gamma-*Protebacteria Bacteroidetes* และ จุลชีพที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ที่พบในฟองน้ำ *Dysidea avara* ซึ่งบ่งชี้ว่า *Dysidea avara* มีความหลากหลายแบคทีเรียเสูงสุดในบรรดาฟองน้ำสมาคมฟองน้ำเหล่านี้ ความจำเพาะของจุลชีพต่อฟองน้ำชี้ให้เห็นความแตกต่างขึ้นอยู่กับความหลากหลายของแบคทีเรียในกลุ่มเหล่านี้ฟองน้ำทั้งสามชนิด จากที่ตั้งทางภูมิศาสตร์เดียวกันและสามารถสังเกตเห็นความจำเพาะของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เฉพาะต่อฟองน้ำ

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

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

การประชุมวิชาการและนิทรรศการ ครั้งที่ ๖ “ทรัพยากรไทย : นำสิ่งดีงามสู่ตาโลก”

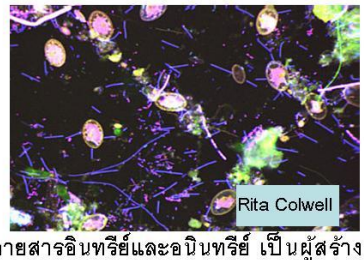
ณ เขื่อนศรีนครินทร์ อ.ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี
วันที่ ๒๐ – ๒๖ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๕๖

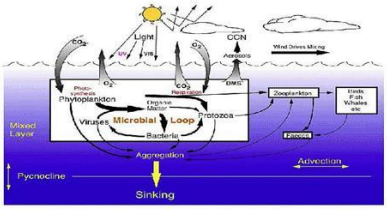
จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี

ดร.ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, ผศ.ดร.ชูตา บุญภักดี และ น.ส.ปิยะเนตร พึ่งพา, มหาวิทยาลัยบูรพา

จุลินทรีย์ หรือ จุลชีวัน หรือ จุลชีพ (Microorganism) เป็นสิ่งมีชีวิต ขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจึงจำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ส่องขยาย ได้แก่ แบคทีเรีย อาร์เคีย ราสาหร่าย และโปรโตซัว เป็นต้น มีขนาดตั้งแต่ 1 ในพันส่วนของมิลลิเมตร เราสามารถพบจุลินทรีย์ได้ทุกหนทุกแห่งแม้แต่ในสิ่งมีชีวิตอื่น ในมนุษย์ พืชและสัตว์ในสิ่งแวดล้อม ทั้งดิน น้ำ อาหาร อากาศ อาจกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมากประมาณ 5 แสนชนิด

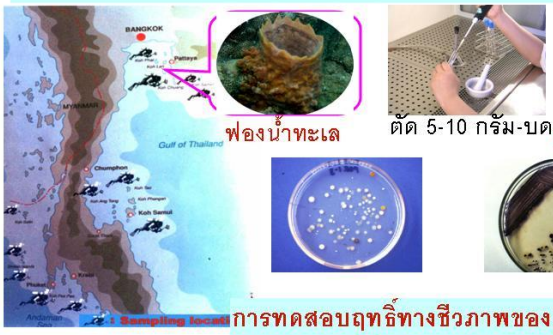




ประโยชน์ของจุลินทรีย์ที่สำคัญคือเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ เป็นผู้สร้างผลผลิตเบื้องต้นตลอดจนรักษาสมดุลในระบบนิเวศ มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับคาร์บอนในโลก มนุษย์นำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์นานหลายพันปีในการหมักไวน์และอาหาร เมื่อวิทยาการก้าวหน้าจึงพัฒนาสู่การผลิตเป็นยาปฏิชีวนะเช่น เพนนิซิลิน รักษาโรคติดเชื้อ ช่วยชีวิตมนุษย์จำนวนมาก ตลอดจนผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเช่นกรดไขมัน

มหาวิทยาลัยบูรพาได้สนองพระราชดำริในการศึกษาถึงความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ทะเลเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน เป็นสารตัวยา(ยาต้านมะเร็ง, ยาต้านการอักเสบ) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร(กรดไขมัน, เปปไทด์) สารสีและสารสำคัญในตำรับเครื่องสำอาง จากข้อมูลทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ทะเลโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ

การคัดแยกแบคทีเรียทะเลจากฟองน้ำ



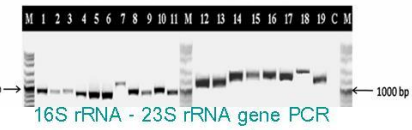
ฟองน้ำทะเล

ตัด 5-10 กรัม-บด

การแยกแบคทีเรียใบริสุทธิ์

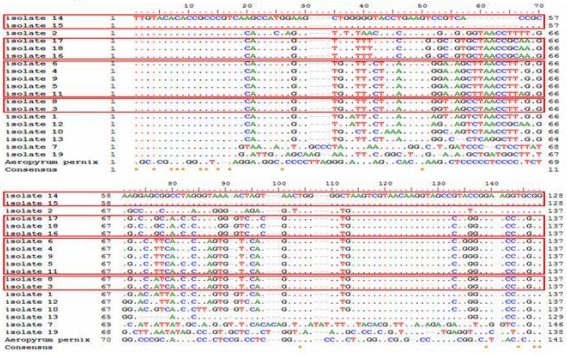
การจำแนกชนิดแบคทีเรีย

การสกัด DNA ให้บริสุทธิ์



16S rRNA - 23S rRNA gene PCR

เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูลGenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)



การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียทะเล

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

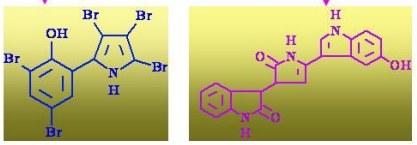
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ มะเร็ง ด้วยวิธี MTT

การวิเคราะห์ทางเคมีสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย

แบคทีเรียเซลล์

สกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH, CHCl3

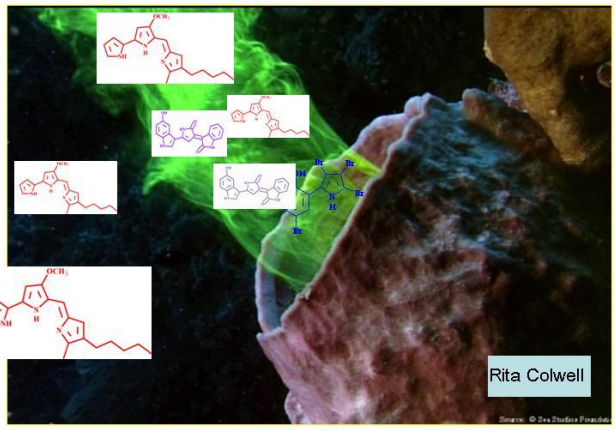
วิเคราะห์ชนิดสาร: HPLC, NMR



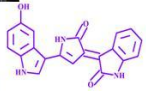
Pentabromopseudoline

น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย

สกัดด้วยตัวทำละลาย EtOAc, MeOH



ผลผลิต Violacein



ผลผลิต Prodigiosin

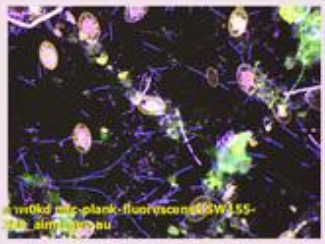
ตัวอย่างโปสเตอร์เผยแพร่

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำทะเล และการใช้ประโยชน์

ดร.ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, ผศ.ดร.ชูตา บุญภักดี และ ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา,
อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131; chutiwan@buu.ac.th

จุลินทรีย์ หรือ จุลชีวัน หรือ จุลชีพ (Microorganism) เป็นสิ่งมีชีวิต ขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจึงจำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ส่องขยาย ได้แก่ แบคทีเรีย อาร์เคีย รา สาหร่าย และโปรโตซัว เป็นต้น มีขนาดตั้งแต่ 1 ในพันส่วนของมิลลิเมตร เราสามารถพบจุลินทรีย์ได้ทุกหนทุกแห่งแม้แต่ในสิ่งมีชีวิตอื่น ในมนุษย์ พืชและสัตว์ในสิ่งแวดล้อม ทั้งดิน น้ำ อาหาร อากาศ อาจกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมากประมาณ 5 แสนชนิด และที่พบมากที่สุดคือแบคทีเรีย

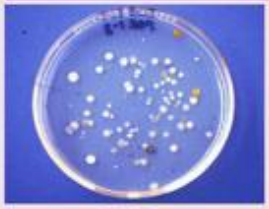
ประโยชน์ของจุลินทรีย์ที่สำคัญคือเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์และอนินทรีย์ เป็นผู้สร้างผลผลิตเบื้องต้นตลอดจนรักษาสมดุลในระบบนิเวศ มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความบนโลก มนุษย์นำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์มานานหลายพันปีในการหมักไวน์และอาหาร เมื่อวิทยาการก้าวหน้าจึงพัฒนาสู่การผลิตเป็นยาปฏิชีวนะเช่น เพนนิซิลิน รักษาโรคติดเชื้อ ช่วยชีวิตมนุษย์จำนวนมาก ตลอดจนผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเช่น กรดไขมัน เปปไตด์ สารต้านอนุมูล อิสระ

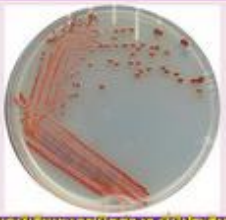


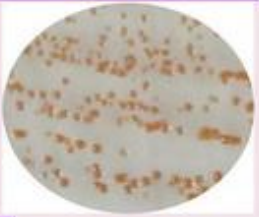
แบคทีเรียและแพลงก์ตอนในทะเล

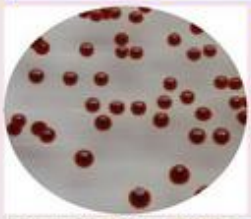
แบคทีเรียทะเลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

มหาวิทยาลัยบูรพาได้ทำการศึกษาถึงความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ทะเลเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน เป็นสารต้านปฏิชีวนะ ต้านเซลล์มะเร็ง เป็นต้น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเช่นกรดไขมัน, เปปไตด์) นอกจากนี้ยังมีสารสี(รงควัตถุชีวภาพ)และสารสำคัญในด้านเครื่องสำอาง จากข้อมูลทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ทะเลโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ









แบคทีเรียทะเลชนิดต่างๆ ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างรงควัตถุชีวภาพ(สาร) ที่ผลิตแยกได้จากฟองน้ำชนิดต่างๆ

ขั้นตอนการศึกษาสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแบคทีเรียทะเล

การคัดแยกแบคทีเรียทะเลจากฟองน้ำ

การจำแนกชนิดแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียทะเล

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ มะเร็ง ด้วยวิธี MTT

16S rRNA - 23S rRNA gene PCR

การวิเคราะห์ทางเคมีสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย

แบคทีเรียเซลล์

น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย

วิเคราะห์ชนิดสาร: HPLC, NMR

ผลผลิต Prodigiosin

เอกสารอ้างอิง

อุทัยรัตน์ ณ นคร และศรีจรรยา สุขมโนมนต์. 2549. *ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาบึกและปลากลุ่มเดียวกันอีกสองชนิดโดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mtDNA 16S rRNA.* ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Addis, J.S. and Peterson, K.J. 2005. Phylogenetic relationships of freshwater sponges (Porifera, Spongillina) inferred from analyses of 18S rDNA, COI mtDNA, and ITS2 rDNA sequences. *Zool. Scr*. 34: 549-557.

Asntini, S., and Polacco, G. 2006. Finding Nemo: Molecular phylogeny and evolution of the unusual life style of anemonefish. *Gene*, 385: 19-27.

Blanquer, A. and Uriz, M.J. 2007. Cryptic speation in marine spongs evidenced by mitochondrial and nuclear gene: A phylogenetic approach. *Mol. Phylogenet. Evol*. 45: 392-397.

Boonphakdee, C. and Sawangwong, P. 2008. Discrimination of anemonefish species by PCR-RFLP analysis of mitochondrial gene fragments. *EnvironmentAsia*. 1: 51-54.

Bouchon, D., Souty-Grosset, C. and Raimond, R. 1994. Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. japonicus* Bate. *Aquaculture* 127: 131-144.

Brown, W.M., Matthew, G.Jr. and Wison, A.C. 1979. Rapid evolution of mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 76: 1967-1971.

Bucklin, A., B.W. Frost, J. Bradford-Grieve, L.D. Allen and N.J. Copley (2003) Molecular systematic assessment of thirty-four calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae using DNA sequences of mtCOI and nuclear 18S rRNA. *Mar. Biol.* 142: 333-343.

Burton, R.S. 1996. Molecular tools in marine ecology. *J. Exp. Mar.Biol. Ecol.* 200: 85-101.

Cavalier, S.T., Allsopp, M.T.E.P., Chao, E.E., Boury-Esnault, N. and Vacelet, J. 1996. Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18s rRNA evidence. *Can J. Zool.* 74: 2031-2045.

Chow, S., Clark, M.E. and Walsh, P.J. 1993. PCR-RFLP analysis on thirteen weatern Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification. *Fish. Bull.* 91, 619-627.

Chu, K.H., Li, C.P. and Ho, H.Y. 2001. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in crustacea. *Mar. Biotechnol*. 3: 355-361.

Crandall, K.A., Fitzpatrick, J.F.Jr. 1996. Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Syst. Biol.* 45: 1-26.

Fernandez, A., Garcia, T., Asensio, L. and Rodrigez, M.A. 2001. PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS-1) region for identification of 3 clam species. *J. Food Sci*. 66:657-661.

France SC, Kocher TD. 1996. DNA sequencing of formalin-fixed crustaceans from archival research collections. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 5: 304-313.

Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemlak, T.S. and Francis, C.M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLOS Biology* 2: 1657-1663.

Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B. and Young, J.P.W. 1989. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Germany: Speinger-Verlin Heidelberg.

Imai, H., Cheng, J.-H., Hamasaki, K. and Numachi, K.-I. 2004. Identification of four mud crab species (genus *Scylla*) using ITS-1 and 16s rDNA markers. *Aquat. Living Resour.* 17:31-34.

Li, Zhiyong., Liming He, Xiaoling Miao. 2007. **16S rDNA clone library-based bacterial phylogenetic diversity associated with three South China Sea sponges.** World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23 : 1265-1272.

Li, Zhiyong., Ye Hu, Yan Liu, Yi Huang, Liming He, Xiaoling Miao. 2007. Cultivable bacterial community from South China Sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. Current Microbiology. 55 : 46-472.

Klossa-Killia, E., Paposotriopoulos, V. Kilias, G. and Alahiotis, S. 2002. Authentication of Messolongi (Greece) fish roe using PCR-RFLP analysis of 16s rRNA mtDNA segment. *Food control.* 13: 169-172.

Maniatis, T., Fritsh, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor.

Masuda, R., Kamaishi, t., Kobayashi, T., Tsukamoto, K.and Numachi, K. 1995. Mitochondrial DNA differentiation between two sympatric morphs of striped jack near Japan. *J. Fish. Biol. 46*:1003-1010.

Nichols, S.A. 2005. An evalution of support for order-level monophyly and interrelationships within the class Demospongiae using partial data from the large subunit rDNA and cytochrome oxidase subunit I *Mol. Phylogenet. Evol*. 34: 81-86.

Nohara, M., Nishida, M., Manthacitra, V. and Nishikawa, T. 2004. Ancient phylogenetic separation between Pacific and Atlantic cephalochordtes as revealed by mitochondrial genome analysis. *Zoological Science* 21: 203-210.

Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., MacMillan, W.O., Stice, L. and Grabowski, G. 1991. The Simple fool's Guide to PCR, Ver. 2.0. *Department of Zoology*. Kewalo Marine laboratory, Holulu University of Hawaii.

Quick, D.L.J. 1993. *Principles and techniques of contemporary taxonomy*. London: Blackie Academic & Professional.

Skorokhod A., Gamulin V., Gundacker D., Kavsan V., Muller I.M., Muller, W.E.G. 1999. Origin of insulin receptor-like tyrosin kinases in marine sponges. *Biol. Bull.* 197: 63-73.

Taylor, D.J, Finston TL, Hebert P.D.N. 1998. Biogeography of a widespread freshwater crustacean: pseudocongruence and cryptic endemism in the North American *Daphnia laevis* complex. *Evol.* 52: 1648-1670.

Thiel, V., Blumenberg, M., Hefter, J., Pape, T., Pomponi, S., Reed, J., Reitner, J., Worheide, G. and Michaelis, W. 2002. A chemical view of the most ancient metazoa-biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* 89: 60-66.

Webb, V.L. and Maas, E.W. 2002. Sequence analysis of 16S rRNA gene of cyanobacteria associated with the marine sponge *Mycale (Carmia) hentschele*. *FEMS Micro. Lett*. 207: 43-47.

Weinberg, J.R., Dahlgren, T.G., Trowbridge, N. and Halanych, K.M. 2003. Genetic differences within and between species of deep-sea crabs (*Chaceon*) from the North Atlantic Ocean. *Biol. Bull*. 204: 318-326.

Wilson, A. B., Vincent, A., Ahnesjo, I., & Meyer, A. 2001. Male Pregnancy in Seahorses and Pipefishes (Family Syngnathidae): Rapid diversification of paternal brood pouch morphology inferred from a molecular phylogency. *J. Hered.* 92: 159-166.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ

2X PCR mastermix (Thermopol)

10X Thermopol buffer (2.0 mM $MgSO_4$)	60 ไมโครลิตร
10 mM dNTPmix (0.2 mM of each dNTP)	12 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 unit/20 µl)	3.0 ไมโครลิตร
Q-solution	30 ไมโครลิตร
Nuclease free water	195 ไมโครลิตร

2X PCR mastermix (Vivantis)

10X Taq buffer A	70 ไมโครลิตร
10 mM dNTPmix (0.2 mM of each dNTP)	14 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 unit/µl)	4.0 ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$ (3 mM)	42 ไมโครลิตร
Nuclease free water	220 ไมโครลิตร

20X SB buffer

NaOH (MW=40 g/mol)	8 กรัม
Boric acid	45 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร