รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความหลากหลายทางชีวภาพและความผันแปรตามฤดูกาลของประชาคมแบคทีเรียในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกเพื่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

(สนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี)

Diversity and Seasonal Variation of bacterial community it's application in the Marine Plant Genetic Conservation Area on the Coastal zone of the east of Thailand for Conservation and Sustainable Utilization
(Under the Plant Genetic Conservation Project Under the Royal Initiative of Her Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn)

ภายใต้แผนงานวิจัย

สถานภาพทรัพยากรทางทะเลบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทยเพื่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน
The status of marine natural resources on the coastal zone of the east of Thailand for conservation and sustainable uses

ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๒๕๖๐A๑๐๘๐๓๐๕๓
สัญญาเลขที่ ๑๗๙ /๒๕๖๐

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความหลากหลายทางชีวภาพและความผันแปรตามฤดูกาลของประชาคมแบคทีเรีย ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก เพื่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

(สนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี)

Diversity and Seasonal Variation of bacterial community it's application in the Marine Plant Genetic Conservation Area on the Coastal zone of the east of Thailand for Conservation and Sustainable Utilization
(Under the Plant Genetic Conservation Project Under the Royal Initiative of Her Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn)

ภายใต้แผนงานวิจัย

สถานภาพทรัพยากรทางทะเลบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย
เพื่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน
The status of marine natural resources on the coastal zone of the east of Thailand for conservation and sustainable uses

ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน พ.ศ. ๒๕๖๑
มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับพระราชานุญาตให้สนองพระราชดำริภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๑๗๙ /๒๕๖๐

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้เพราะได้รับความช่วยเหลือและสนับสนุนจากหน่วยงานและบุคคลากรจากหน่วยบัญชาการส่งครามพิเศษ กองทัพเรือ ซึ่งคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบ พระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และนิสิตฝึกงานของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ทุกท่านที่มีส่วนให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี

Acknowledgement

This work was permitted Under the Plant Genetic Conservation Project Under the Royal Initiative of Her Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn and was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. ๑๗๙/๒๕๖๐).

หน่วยงานหลัก สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง จ. ชลบุรี ๒๐๑๓๑
โทรศัพท์: ๐-๓๘๓๙ ๑๖๗๑-๓ โทรสาร: ๐-๓๘๓๙ ๑๖๗๔
e-mail address: chutiwan@buu.ac.th; chutiwan@bims.buu.ac.th

หน่วยงานสนับสนุน หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษ กองทัพเรือ, ต.แสมสาร อ. สัตหีบ จ.ชลบุรี

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชาคมแบคทีเรียและการใช้ประโยชน์ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร อ.สัตหีบ จังหวัดชลบุรี จึงเลือกศึกษาบริเวณ หาดเตย และหาดเทียน เกาะจวง เกาะปลาหมึก แสมสาร โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชาคมของแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลและน้ำทะเล ได้ดำเนินการสำรวจและตัวอย่างฟองน้ำ แล้วคัดแยกแบคทีเรียได้ ๗๐ ไอโซเลต จากฟองน้ำ ๙ ตัวอย่าง และ จากน้ำทะเล ๖ ตัวอย่าง สามารถพบแบคทีเรียอาศัยอยู่ในฟองน้ำแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันโดยพบมีแบคทีเรียอาศัยอยู่จำนวนมากที่สุดในฟองน้ำท่อน้ำตาล SS -B ๐๔ จำนวน ๒.๕๑ x ๑๐^{๖} โคโลนีต่อกรัม และน้อยที่สุดใน ฟองน้ำเมือกม่วง SS -A ๐๒ จำนวน ๔.๐๔ x ๑๐^{๓} โคโลนีต่อกรัม ดังรายละเอียดในตารางที่ ๑

ส่วนในน้ำทะเลได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างจาก ๔ พื้นที่จากบริเวณชายฝั่ง หาดเตย หาดเทียน เกาะจวงและ เกาะปลาหมึก หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี พบมีแบคทีเรียเจริญได้แตกต่างกันดังนี้ ๑.๐๕ x ๑๐^{๓} , ๑.๘๕ x ๑๐^{๒} ๒.๖๕ x ๑๐^{๒}, และ ๘.๙๕ x ๑๐^{๒} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับดังรายละเอียดในตารางที่ ๒ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นแบคทีเรียแกรมลบและสมบัติทางชีวเคมีสามารถบ่งชี้ในเบื้องต้นได้เป็นสกุล *Pseudomonas, Alteromonas, Pseudoalteromonas, Vibrio, Flavobacterium, Acinetobacter,* และกลุ่มที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ และจากการจำแนกชนิดแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกจากน้ำและดินตะกอนในระดับชีวโมเลกุลพบว่าเป็นแบคทีเรียกรัมลบที่มีชนิดแตกต่างกันได้แก่ *Pseudomonas taiwanensis, Pseudomonas pseudoalcaligenes* และ *Pseudoalteromonas* sp.

เมื่อได้แบคทีเรียบริสุทธิ์แล้ว จะทำการเก็บรักษาเพื่อดำเนินการทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวิธี Disc diffusion Agar Assay ตลอดจนการสร้างสารชีวรงควัตถุ จากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลและน้ำทะเล เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน ๙ ไอโซเลตที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ SS -A ๒-๒ SS -B ๒-๕ SS -C ๒-๓ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ***B. subtilis*** ดีที่สุด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ	
๑. บทนำ	๑
๒. การดำเนินการวิจัย	๖
๒.๑ วิธีดำเนินการวิจัย	๖
๒.๒ ผลการวิจัย	๑๐
๓. อภิปรายผลการวิจัย	๑๔
๔. สรุปผลการวิจัย	๑๕
๕. ข้อเสนอแนะ	๑๗
๖. ผลผลิต	๑๗
บรรณาณุกรม	๑๘
ประวัติคณะผู้วิจัย	๒๐

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
๑. จำนวนแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณ หาดเตย(TYW) หาดเทียน(TNW) เกาะแสมสาร(SSW) หมู่เกาะแสมสาร อ.สัตหีบ จังหวัดชลบุรี	๑๑
๒. ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกจากน้ำและดินตะกอนในระดับชีวโมเลกุล	๑๒
๓. ผลการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบ โดยแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกจากน้ำและดินตะกอน	๑๓

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
๑. แบคทีเรียทะเลในดินตะกอนที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและคัดแยกได้	๑๑
๒. แบคทีเรียทะเลในน้ำทะเลที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและคัดแยกได้	๑๑
๓. จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว ๕ สายพันธุ์ ที่เจริญเติบโตในระยะเวลาที่แตกต่างกัน	๑๒

๑. บทนำ

งานวิจัยนี้ดำเนินงานเพื่อสนองพระราชดำริภายใต้ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี ในบริบท **กิจกรรมที่ ๒** กิจกรรมสำรวจเก็บรวบรวมพันธุกรรมพืช **ของ กรอบการเรียนรู้ทรัพยากร** โครงการวิจัยนี้กิจกรรมสำรวจเก็บรวบรวมพันธุกรรมนำเทคโนโลยีชีววิทยาโมเลกุลมาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยแก้ปัญหาด้านงานอนุกรมวิธานสำหรับการบ่งชี้ และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียทะเลในประชาคมหลากชนิดที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำและในน้ำทะเล ซึ่งยังคงมีความสับสนโดยเฉพาะจุลชีพกลุ่มแบคทีเรียทะเล บ่งชี้ได้ยาก และ/หรือที่ไม่สามารถบ่งชี้หรือจัดจำแนกได้ด้วยวิธีการศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยาแต่เพียงอย่างเดียว เนื่องจากเครื่องหมายทางพันธุกรรม คือข้อความหรือลำดับเบสบนจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่มีความจำเพาะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงจากปัจจัยภายนอกเหมือนกับลักษณะสัณฐานวิทยา ที่ลักษณะปรากฏภายนอกเกิดจากการควบคุมและการแสดงออกของยีนบนจีโนม ในโครงการวิจัยนี้จึงเริ่มทดลองศึกษากับแบคทีเรียทะเลหลากชนิดที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำและในน้ำทะเล เป็นอันดับแรก ซึ่งมีปัญหาในด้านการจัดจำแนกในงานอนุกรมวิธาน ลักษณะชีววิทยาและนิเวศวิทยาบางประการ ซึ่งข้อมูลและเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จะเป็นแนวทางให้ทราบถึงความสัมพันธ์ในสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกันในแหล่งอาศัยนี้อีกด้วย ก็จะรักษาพันธุกรรมดั้งเดิมซึ่งจะทำการศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปเมื่อมีความพร้อม การสำรวจ ทำรหัสประจำ เพื่อรวบรวมเป็นฐานข้อมูลในพื้นที่

จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์โดยวิธีทางชีวโมเลกุล เพื่อนำไปสู่การพัฒนาพันธุ์ และเก็บเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของฟองน้ำและจุลชีพชนิดนั้น ๆ เครื่องหมายพันธุกรรมที่ได้นี้จะเป็นฐานข้อมูลสากลของฟองน้ำทะเลและสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลของไทยต่อไปในอนาคต

จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ขยายการดำเนินงานเพื่อสนองพระราชดำริ ในกรอบที่ ๒ คือ **กรอบการใช้ประโยชน์** โดยดำเนินงานสนับสนุน **กิจกรรมที่ ๔ กิจกรรมอนุรักษ์และใช้ประโยชน์พันธุกรรมพืช** เป็นกิจกรรมที่ดำเนินการศึกษาประเมินศักยภาพพันธุกรรมจุลินทรีย์ ที่สำรวจเก็บรวบรวมและเก็บรักษาไว้ โดยมีการศึกษาดำเนินการในห้องปฏิบัติการมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียที่เก็บรักษาและเพาะเลี้ยงได้ เช่น ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตลอดจนคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างรงควัตถุชีวภาพที่น่าสนใจ เพื่อเป็นแนวทางการพัฒนาการใช้ประโยชน์ของทรัพยากรในท้องถิ่นในด้านอื่นๆ นำไปสู่การวางแผนพัฒนาพันธุ์พืชและทรัพยากรต่าง ๆ ต่อไปในอนาคต

มหาสมุทรของโลกกำลังประสบกับความเครียดเป็นประวัติการณ์จากผลกระทบของมนุษย์เช่นสารอาหารที่เพิ่มขึ้นไหลบ่า การประมงที่มากเกิน และการเพิ่มการปล่อยก๊าซเรือนกระจกที่เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงในมหาสมุทรทางเคมีและอุณหภูมิประชาคมทางวิทยาศาสตร์ต้องการความรู้และเครื่องมือที่จะคาดการณ์ว่าการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะมีผลวิกฤตต่อระบบนิเวศของมหาสมุทร ในสังคมที่เกี่ยวโยงกับหน้าที่ที่สำคัญมาก ในเป้าหมายระยะยาวของ MMI คือ ความสามารถที่จะเข้าใจที่ครอบคลุมของกลุ่มจุลินทรีย์ในทะเล รวมทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมองค์ประกอบของพวกเขาและหน้าที่; บทบาทต่อระบบนิเวศในมหาสมุทรและผลการสร้างเสริมสุขภาพของมหาสมุทรตลอดผลผลิต

แบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงของคาร์บอนในทะเล ระบบนิเวศและความสำคัญของเชื้อแบคทีเรีย heterotrophic ในทะเล การทำงานในระบบนิเวศได้รับการยอมรับเป็นอย่างดี (Azam et al., ๑๙๘๓) พวกเขาเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของระบบนิเวศทางทะเล ความอุดมสมบูรณ์และชีวมวลมีสูง มีกระบวนการมากกว่ากึ่งหนึ่งของมวลรวมผลผลิตเบื้องต้นและการมีปฏิสัมพันธ์กันอย่างแพร่หลาย กับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Azam, ๑๙๙๘; Fuhrman, ๒๐๐๒) ปริมาณมวลชีวภาพ สามารถเทียบได้กับของแพลงก์ตอนพืชในเขต euphotic (Cho และ Azam, ๑๙๙๐; Mitchel et al, ๑๙๘๙;.. Simon et al, ๑๙๙๒)

แม้จะมีความสำคัญดังกล่าวแต่ในทะเลเรื่อง biogeochemistry มีความยากลำบากในการวิเคราะห์และการจำแนกความแตกต่างถิ่นที่อยู่อาศัยในการจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในชุมชนที่ซับซ้อน และความไม่แน่นอนในการเพาะเลี้ยงตามความแตกต่างสายพันธุ์ที่ประกอบด้วยชุมชนให้ทำให้แบคทีเรียกลุ่ม heterotrophic ตกอยู่ในปริศนา “black box” (Fuhrman และ Hagstrom, ๒๐๐๘)

ต่อมาด้วยเทคนิค denaturing gradient gel-electrophoressis ติดตามลายพิมพ์ DNA ช่วยให้ประมาณการกลุ่มที่โดดเด่นของ phylotype ใน ตัวอย่างที่กำหนดได้ (Muyzer et al., ๑๙๙๓) ที่มีความหลากหลายมากของแบคทีเรีย assemblages เช่นในดินนำเสนอหลาย ๆ วง (Muyzer และ Smalla, ๑๙๙๘) ขยายโดยตรงและการวิเคราะห์ของ ๑๖S rRNA ยีน ในน้ำทะเลยังได้รับรายงานมีแถบพันธุกรรมมากถึง ๒๐-๓๕ แถบ(Schauer et al., ๒๐๐๐)

ในช่วงฤดูฝน ฤดูร้อน ของชายฝั่งประเทศไทยเป็นภูมิภาคที่แปรปรวนตามฤดูกาล ในกระบวนการทางชีวภาพที่เด่นชัด คือในช่วงฤดูฝน ทะเลบริเวณใกล้ชายฝั่งที่อุดมไปด้วยสารไนเตรทและปริมาณมหาศาลของ drainages ที่ดินในช่วงระยะเวลามรสุมสูงสุด (กรกฎาคม-ตุลาคม) ปริมาณคลอโรฟิลเพิ่มผลผลิตที่มักจะนำไปสู่การลดลงของ ออกซิเจนละลายน้ำและ denitrification ซัลเฟตที่เพิ่มขึ้นมากเกินไป อุณหภูมิบรรยากาศ ๓๕-๓๙ °C (ระหว่าง ฤดูร้อน: กุมภาพันธ์- เมษายน ฤดูฝน: กรกฎาคม-ตุลาคม) และ ๒๕ – ๒๙ °C (ระหว่าง 'ฤดูหนาว': ธันวาคม -มกราคม) ทะเลใกล้ชายฝั่ง อุณหภูมิพื้นผิวยังคงอุ่น ขณะที่ผลกระทบของเหตุการณ์เหล่านี้ในชุมชน autotrophic ก็มีรายงานตลอด

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของประชาคมแบคทีเรียในบริเวณชายฝั่งทะเลไทยไม่มีรายงานปรากฏ ดังนั้นการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค denaturing gradient gel-electrophoressis ติดตามลายพิมพ์ DNA ช่วยให้ประเมินความสำคัญต่อการผันผวนองค์ประกอบของประชาคมแบคทีเรียได้

จากการศึกษาของชุติวรรณและคณะ(๒๕๔๑) พบว่าแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเลของไทยมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น นอกจากนี้ยังรายงานว่าฟองน้ำชนิดเดียวกันที่เก็บในประเทศไทยสถานที่เดียวกันแต่แตกต่างช่วงเวลา จะให้สารประกอบและแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรที่จะสนับสนุนการศึกษาวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลให้มากยิ่งขึ้น และช่วยกันศึกษาวิจัยหลายๆหน่วยงานเพื่อเสริมสร้างความเข้มแข็งศักยภาพในการแข่งขันของประเทศและส่งเสริมให้ประเทศไทยได้พึ่งพาตนเองในด้านอุตสาหกรรมยาอาหารเสริมและผลิตภัณฑ์เคมีได้มากขึ้นและเร็วยิ่งขึ้นทันต่อการพัฒนาประเทศในอนาคตอันใกล้นี้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

๖.๑ สนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ในกิจกรรมที่ ๒ กิจกรรมสำรวจเก็บรวบรวมพันธุกรรมพืช และกิจกรรมที่ ๔ กิจกรรมอนุรักษ์และใช้ประโยชน์พันธุกรรมพืช

๖.๒ เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียทะเลในประชาคมและที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำและน้ำทะเล จากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี เพื่อคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียของไทยที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ

๖.๓ เพื่อตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านแบคทีเรียจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

ขอบเขตของโครงการวิจัย

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

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Azam และคณะ (๑๙๘๓)ได้แสดงให้เห็นบทบาทสำคัญของ แบคทีเรียทะเลในการเปลี่ยนแปลงของคาร์บอนระบบนิเวศทางทะเลและโดยเฉพาะความสำคัญของเชื้อแบคทีเรีย heterotrophic ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของระบบนิเวศทางทะเล ได้รับการยอมรับเป็นอย่างดีว่า ให้ความอุดมสมบูรณ์และชีวมวลมีสูง มีกระบวนการมากกว่ากึ่งหนึ่งของมวลรวมผลผลิตเบื้องต้นและการมีปฏิสัมพันธ์กันอย่างแพร่หลาย กับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Azam, ๑๙๙๘; Fuhrman, ๒๐๐๒; ๒๐๐๘) ปริมาณมวลชีวภาพ สามารถเทียบได้กับของแพลงก์ตอนพืชในเขต euphotic (Cho และ Azam, ๑๙๙๐; Mitchel et al, ๑๙๘๙;.. Simon et al, ๑๙๙๒)

เมื่อเร็วๆ นี้ Sigh และ Ramaiah (๒๐๑๑) ได้ศึกษาประชาคมของแบคทีเรียในทะเลอาราเบียน พบว่า ผลวิเคราะห์ด้วยวิธี DGGE ทำให้ทราบถึงความผันผวนชั่วคราวของประชาคมแบคทีเรียในช่วงก่อนมรสุม หลังมรสุม มรสุม ชี้ให้เห็นความสำคัญอย่างยิ่งของแบคทีเรียกลุ่ม gammaproteobacteria, bacteroidetes และ cyanobacteria ที่แปรปรวนไปกับพื้นที่ มีอิทธิพลโดยกระบวนการเกิดมรสุม ตลอดจนยังบ่งชี้อีกว่าปริมาณ Chlorophyll a มีส่วนสำคัญในการควบคุมองค์ประกอบในประชาคมแบคทีเรีย(bacterial communities composition: BCC) จากระดับความลึกบนลงล่าง ในขณะที่ปริมาณไนเตรต นั้นควบคุมจากพื้นท้องทะเลขึ้นมา และ BCC สามารถแปรปรวนได้สูงจากผลของระยะทางในพื้นที่ภูมิศาสตร์เล็กๆ

จากการทดลองในระดับ mesocosm โดย Shafer และคณะ(๒๐๐๑) เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารอาหารกับกิจกรรมและความหลากหลายของแบคทีเรียโดยรวม จากบริเวณทะเลเมดิเตอร์เรเนียน พบการการเปลี่ยนแปลงในความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียเด่น ตรวจสอบโดยลายพิมพ์ DGGE ของผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากวิธี เข้ารหัสยีนส์ PCR ๑๖S rRNA ซึ่งได้แสดงรูปแบบแถบ DGGE ที่เปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกับ ลำดับยีนส์ ๑๖S rRNA ของสมาชิกในกลุ่ม alpha-, gamma- and delta-Proteobacteria and of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides phylum (CFB) นอกจากนี้ ยังใกล้เคียงกับของกลุ่ม Ruegeria-like bacteria โดยเฉพาะ กลุ่ม CFB กลายเป็นกลุ่มที่โดดเด่นในระหว่างที่มีการเพาะบ่ม ซึ่งชี้แนะให้เห็นถึงความสำคัญของประชากรเหล่านี้ที่เป็นผู้สร้างผลผลิตของแบคทีเรียและกิจกรรมหลังระยะการบริโภคในการทดลอง

ต่อมา Xing และ Ren (๒๐๐๖) ได้ทดลองเปรียบเทียบให้เห็นว่า วิธี DGGE นั้นสามารถใช้อธิบายถึงประชาคมจุลินทรีย์ได้จากพื้นฐาน กรดอะมิโนบางส่วน และติดตามแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไม่ได้และยีนส์เฉพาะได้ สามารถวิเคราะห์ความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงประชากรได้

แบคทีเรียทะเลนั้นนอกเหนือจากการมีบทบาทสำคัญในการเป็นผู้ผลิตเบื้องต้นในระบบนิเวศทางทะเลแล้ว ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกยังแสดงให้เห็นความสำคัญของแบคทีเรีย ที่จะเป็นแหล่งของผลผลิตทุติยภูมิ(secondary metabolites) ที่สร้างขึ้นนั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น การต้านจุลินทรีย์ การต้านมะเร็ง การต้านการอักเสบ ตลอดจนรงควัตถุชีวภาพที่สำคัญ(De Rosa et al.,๒๐๐๐; Faulkner ๒๐๐๐; Kim et al., ๒๐๐๘; Kim and Bhatnagar, ๒๐๑๑)

สำหรับในประเทศไทยนั้นการศึกษาด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำและสิ่งมีชีวิตในทะเลนั้นส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่ฤทธิ์ทางชีวภาพ การศึกษาด้านพันธุกรรมและความสัมพันธ์

ของจุลินทรีย์ มีน้อย โดยเฉพาะประเทศไทย Dechsakulwatana และคณะ(๒๐๐๗) ได้รายงานถึงความหลากหลายของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำทะเลในพื้นที่อ่าวไทยที่มีความหลากหลายของฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจได้แก่ *Pseudoalteromonas, Psedomonas, Vibrio*

จากผลการศึกษาวิจัยของชุติวรรณและคณะ(๒๕๔๑) Dechsakulwatana et al.(๒๐๐๗) และข้อมูลการวิจัยล่าสุด พ.ศ. ๒๕๕๓-๒๕๕๔ (โดยการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ) ได้ค้นพบสารสำคัญจากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำหลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด และยังมีศักยภาพในการสร้างสารสี(รงควัตถุชีวภาพ) เช่น สาร Violacein(สีม่วง) และ สาร Prodigiosin(สีแดง) ที่มีความคงตัวของสารรงควัตถุ (รูปที่ ๒) และจากผลการวิจัยของ Thawornwiriyanun., et al. (๒๐๐๙) ได้วิจัยพบแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่เก็บจากอ่าวไทย สายพันธุ์ *Methylobacterium mesophilicum* MAKB ๐๘-๔ สร้างรงควัตถุชีวภาพ Astaxanthin เป็นตัวหลักใน Carotenoids ที่มีสีเหลืองส้มที่นิยมใช้เป็นสีผสมอาหาร เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

ต่อมาในปี ค.ศ. ๒๐๑๒ Thawornwiriyanun., et al. (๒๐๑๒) ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่สำคัญของจุลินทรีย์ทะเลที่เป็นแหล่งของสารสำคัญตัวยาและเวชสำอางทางทะเลโดยเฉพาะอย่างยิ่งได้แก่สารรงควัตถุแคโรทีนอยด์ กลุ่ม ซีแซนทริน จากแบคทีเรียชนิดใหม่ทะเลของไทยที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Sphingomonas phyllosphaerae* และ *Shingomonas (Blastomonas) nataloria* นอกจากนี้ Kim และ Bhatnagar (๒๐๑๑) ได้รายงานให้เห็นถึงศักยภาพที่สำคัญของทะเลที่เป็นแหล่งของสารสำคัญเวชสำอาง เปปไตด์ กรดอะมิโน(MAAs) คอลลาเจน เอนไซม์ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ antioxidant, antiwrinkle, antityrosinase และ antiacne โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ทะเลที่จะเป็นแหล่งใหม่ของการค้นหาและการผลิตเวชสำอางในปัจจุบันและพัฒนาสู่อุตสาหกรรมเวชสำอางในอนาคตต่อไป นอกจากนี้ Rungprom และคณะ(๒๐๐๘) รายงานการศึกษาแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ *Halisarca ectofibrosa* ที่เก็บจากชายฝั่งจังหวัดชลบุรี ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารเปปไตด์ชนิดใหม่ของโลก เมื่อจำแนกถึงระดับอณูพันธุกรรม ของแบคทีเรียเป็น *Pseudoalteromonas* sp

ดังนั้นการศึกษาและวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของประชาคมแบคทีเรียในบริเวณชายฝั่งทะเลไทยไม่มีรายงานปรากฏ ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม DNA ช่วยให้ประเมินความสำคัญต่อการผันผวนองค์ประกอบของประชาคมแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศได้ ตลอดจนการคัดแยกแบคทีเรียทะเลเพื่อมาตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพและชีวรงควัตถุที่อาจนำไปพัฒนาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรมและเวชสำอางได้ต่อไปในอนาคต

๒. การดำเนินการวิจัย

๒.๑ ดำเนินการวิจัย

ตอนที่ ๑ การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียในประชาคมสิ่งแวดล้อมและที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำทะเล การเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ฟองน้ำ การคัดแยก และการศึกษาการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

๑.๑ การเก็บตัวอย่าง

๑.๑.๑ ทำการเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเล (โดยการดำน้ำแบบการใช้เครื่องช่วยหายใจใต้น้ำ (SCUBA diving)) อย่างน้อย ๔-๘ ตัวอย่าง จากบริเวณเกาะจวง และเกาะปลาหมึก หมู่เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พร้อมบันทึกข้อมูลของสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ความลึกของน้ำ ตัวอย่างฟองน้ำที่เก็บได้ส่วนหนึ่งจะนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอและเก็บรักษาไว้ในเอทธานอล ๙๙% เพื่อไว้ใช้งานในห้องปฏิบัติการ ต่อไป

๑.๑.๒ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ใต้ผิวน้ำ ๐.๕ เมตร กลางน้ำ และพื้นท้องน้ำ ในบริเวณ หมู่เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พร้อมบันทึกข้อมูลของสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ความลึกของน้ำ สิ่งแวดล้อม

ตรวจวัดค่าคุณภาพน้ำพารามิเตอร์ด้วยเครื่อง YSI วัดค่าอุณหภูมิของน้ำทะเลความเค็ม pH, ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

ตัวอย่างน้ำทะเลจะถูกแบ่งเป็น ๒ ส่วน ส่วนแรกจะถูกนำไปดำเนินการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของประชาคมแบคทีเรีย และส่วนที่สองนำไปศึกษาการใช้ประโยชน์ โดยดำเนินการดังนี้

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

ทำการเกลี่ยกระจายตัวอย่างฟองน้ำและน้ำทะเล ที่ผ่านการเตรียมตัวอย่าง ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง(๒๖ °C) เป็นเวลา ๓-๕ วัน นำมาคัดเลือกโดยดูจากลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันของโคโลนีแบคทีเรีย แล้วทำการคัดแยกให้บริสุทธิ์ และเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

๑.๓ การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม

ทำการสกัดดีเอ็นเอทำ ๒ ซ้ำ ทั้งสองตัวอย่างน้ำ (~ ๒ ลิตร) เป็นกรองผ่านตลับ : Sterivex ที่ใส่เมมเบรน กรองขนาดรู ๐.๒ µm เพื่อทำการกรองเก็บเซลล์จุลินทรีย์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอภายหลัง เติมตลับเต็มด้วย ๑.๘ ml buffer (๕๐ mM Tris pH ๘.๓, ๔๐ mM EDTA และซูโครส M ๐.๗๕) ปิดผนึกและแช่แข็ง นำกลับไปยังห้องปฏิบัติการและเก็บไว้ที่ - ๘๐ องศาเซลเซียสจน-กว่าจะดำเนินการวิเคราะห์ การสกัดดีเอ็นเอ และการทำให้บริสุทธิ์ถูกพาตัวออกตามที่อธิบายโดย Ferrari และ Hollibaugh (๑๙๙๙) ใน

ทุกทั้งหมด ๗๒ extractions ถูกสร้างขึ้นมา และดีเอ็นเอจากตัวอย่างซ้ำถูก pooled ความสมบูรณ์ของทั้งหมด ๓๖ ดีเอ็นเอสิ่งแวดล้อมถูกตรวจสอบเมื่อ ๐.๗% agarose gel

อย่างไรก็ตามควรเพิ่มการตรวจสอบให้ได้หลายชนิดมากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ ควรดำเนินการสำหรับแต่ละตัวอย่างซ้ำเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ถูก pooled ออกและทดสอบซ้ำบน ๒% agarose gel

แบ่งตัวอย่างน้ำทะเล ๒๕ มล. ถูกเก็บรักษากับฟอร์มาลดีไฮด์บัฟเฟอร์ (ที่ ๒% ความเข้มข้นสุดท้าย) และเก็บไว้ที่ ๔ องศาเซลเซียสในที่มืดจนนำขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ การสุ่มตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ตัวอย่างน้ำทะเลย้อมด้วย ๔'๖'-diamidino-๒- phenylindole (DAPI; ๑ Jg ML-๑, ความเข้มข้นสุดท้าย) และกรองบนแผ่นเมมเบรนสีดำขนาด ๐.๒ μm (โพลีคาร์บอเนตเมมเบรน (Millipore,) U.S.A นำแต่ละตัวอย่างไปนับใต้กล้องจุลทรรศน์ Epifluorescence โดยใช้ Olympus (BX ๕๑, ญี่ปุ่น) นับขั้นต่ำ ๑๐ พื้นที่ แล้วหาค่าเฉลี่ย TBC

การสกัดดีเอ็นเอ:

สกัดดีเอ็นเอทำ ๒ ซ้ำ ทั้งสองตัวอย่างน้ำ (~ ๒ ลิตร) เป็นกรองผ่านตลับ : Sterivex ที่ใส่เมมเบรนกรองขนาดรู ๐.๒ μm เพื่อทำการกรองเก็บเซลล์จุลินทรีย์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอภายหลัง เติมตลับเต็มด้วย ๑.๘ ml buffer (๕๐ mM Tris pH ๘.๓, ๔๐ mM EDTA และซูโครส M ๐.๗๕) ปิดผนึกและแช่แข็งนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการและเก็บไว้ที่ - ๘๐ องศาเซลเซียสจน-กว่าจะดำเนินการวิเคราะห์ การสกัดดีเอ็นเอ และการทำให้บริสุทธิ์ถูกพาตัวออกตามที่อธิบายโดย Ferrari และ Hollibaugh (๑๙๙๙) ในทุกทั้งหมด ๗๒ extractions ถูกสร้างขึ้นมา และดีเอ็นเอจากตัวอย่างซ้ำถูก pooled ความสมบูรณ์ของทั้งหมด ๓๖ ดีเอ็นเอสิ่งแวดล้อมถูกตรวจสอบเมื่อ ๐.๗% agarose gel

อย่างไรก็ตามควรเพิ่มการตรวจสอบให้ได้หลายชนิดมากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ ควรดำเนินการสำหรับแต่ละตัวอย่างซ้ำเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ถูก pooled ออกและทดสอบซ้ำบน ๒% agarose gel

ตอนที่ ๒ การศึกษาการใช้ประโยชน์ การตรวจหาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมาตรฐานที่ทดสอบ (Screening of anti-bacterial activity)

๒.๑ นำตัวอย่างน้ำทะเล ๐.๑ มล. เกลี่ยกระจายบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย modified Zobell อีกส่วนน้ำทะเล ๑๐ มล. กรองผ่านชุดกรอง ที่ใส่เมมเบรน กรองขนาดรู ๐.๒ μm เพื่อทำการกรองเก็บเซลล์จุลินทรีย์ นำแผ่นที่กรองไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๓-๕ วัน นำจานตัวอย่างที่มีโคโลนีแบคทีเรียเจริญขึ้นนับจำนวนแบคทีเรีย บันทึกผล จากนั้นคัดแยกแบคทีเรียแบบสุ่มไปเพาะเลี้ยงให้บริสุทธิ์ เก็บรักษาแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้ เพื่อนำไปตรวจหาฤทธิ์ทางชีภาพต่อไป

๒.๒ เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (Standard test strain) ในอาหารวุ้น Tryptic Soy Agar medium หรือ Mueller Hinton medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๕ องศาเซลเซียส นาน ๒๔ ชั่วโมง

- การถ่ายเชื้อ ลงในหลอดอาหารเหลว TSB (heavy inoculate) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ ๓๕ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ภายในการเขย่าในแนวราบ (๑๐๐ รอบต่อนาที)
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๖๐๐ นาโนเมตร (O.D. ที่ ๖๐๐ nm) ของเชื้อ Standard test strain โดยจะใช้ทำการทดลองเมื่อมีค่า O.D. ประมาณ ๐.๕ – ๑.๐

- ดูดเชื้อปริมาตร ๐.๑ มิลลิลิตร หยดลงใน Tryptic Soy Agar medium หรือ Mueller Hinton medium plate แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำซ้ำ ๒ จาน (duplicates)
การเตรียม Standard test strains ได้แก่

แกรมบวก	**แกรมลบ**
- *Staphylococcus aureus* ATCC๒๕๙๒๓	- *Vibrio . anguillarum / Vibrio parahaemolyticus*
- *Bacillus subtilis* ATCC๖๖๓๓	- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC
	- *Escherichia coli* ATCC๒๕๙๒๒

๒.๓ การตรวจสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนด (Screening of Antimicrobial activity assay)

การตรวจหาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ(target strains) และยืนยันผล (Screening of antimicrobial activity

๒.๓.๑ การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำ (test strain)

- เลี้ยงแบคทีเรียจากฟองน้ำแต่ละสายพันธุ์ (test strain) บนอาหารวุ้น modified Zobell agar slant บ่มที่อุณหภูมิ ๒๕ องศาเซลเซียส นาน ๒๔ ชั่วโมง

- ทำการถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว modified Zobell broth (Heavy inoculate) ที่มีปริมาตร ๕ มิลลิลิตร หรือ ๑-๑๐ ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ ๒๕ องศาเซลเซียส นาน ๒๔ ชั่วโมง ภายใต้การเขย่าในแนวราบ (๑๐๐ รอบต่อนาที)

- วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น ๖๐๐ นาโนเมตร (O.D. ที่ ๖๐๐ nm) และนำเชื้อที่มีค่า O.D. ระหว่าง ๐.๖ – ๑.๐ มาทำการทดสอบต่อไป

ทำการทดสอบโดยวิธี Disc Diffusion Assay วัดผลประสิทธิภาพการยับยั้งจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้ง(inhibition zone) โดยหยดเชื้อหรือสารลงบน antibiotic assay disc (AA disc) แล้ววางลงบนจานเพาะเชื้อมาตรฐาน โดยสังเกตผลทุก ๒๔, ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง

- นำ antibiotic assay disc (AA disc) ที่ปราศจากเชื้อ ขนาด ๑๓ มิลลิเมตร วางบน petri dish ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นดูดเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากฟองน้ำมา ๐.๑ มิลลิเมตร มาหยดลงบน sterile AA disc ทิ้งไว้สักครู่ แล้วนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ standard ที่เตรียมไว้แล้ว นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ ๒๕ องศาเซลเซียส นาน ๒๐ – ๒๔ ชั่วโมง และควบคุมการทดลองโดยใช้ standard antibiotic disc ที่มี Oxytetracyclin ๓๐ ไมโครกรัมและ Streptomycin ๑๐ ไมโครกรัม ต่อ disc โดยทำกาทดสอบซ้ำ ๒ ครั้ง (duplicates)

ส่วน ๑-๑๐ ลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยง นำไปสกัดด้วยสารละลาย ethyl acetate, chloroform: methanol, ethanol แล้วทำการละเหยแห้ง เมื่อจะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงละลายด้วย Dimethylsulfo oxide(DMSO) ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

- ทำการวัดผลฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยการวัดขนาดของบริเวณที่ยับยั้ง (inhibition zone) โดยสังเกตผลทุก ๒๔, ๔๘ และ ๗๒ ชั่วโมง

สำหรับแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่กำหนดจะนำมาทดสอบสารสกัดเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ในขั้นตอนต่อไปในอนาคต

การตรวจสอบขั้นยืนยันผลฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมาตรฐาน

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมาตรฐาน ให้ได้ปริมาณ ๑-๑๐ ลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยง นำไปดำเนินการสกัดสารอย่างหยาบจากแบคทีเรียทะเลด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate, ตัวทำละลายผสม chloroform: methanol, หรือ ethanol แล้วทำการลขระเหยแห้งภายใต้การลดความดัน (Vacuum Rotary Evaporator) เมื่อจะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงละลายด้วย Dimethylsulfo oxide(DMSO) ความเข้มข้นตามที่ต้องการ ทำการทดสอบและวัดผลเช่นเดียวกับในตอนที่ ๒

๒.๒ ผลการวิจัย

ตอนที่ ๑ การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียในประชาคมสิ่งแวดล้อมและที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำทะเล การเก็บตัวอย่างน้ำทะเล ฟองน้ำ การคัดแยก ตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียทะเล และการศึกษาการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

๑.๑ การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลและตัวอย่างน้ำทะเล (โดยการดำน้ำแบบการใช้เครื่องช่วยหายใจใต้น้ำ (SCUBA diving)) ได้ ๗ ตัวอย่าง จากบริเวณเกาะจวง และเกาะปลาหมึก และทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากบริเวณร่องน้ำระหว่าง เกาะลูกลมและเกาะแรด จำนวน ๓ สถานี หมู่เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พร้อมบันทึกข้อมูลของสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ความลึกของน้ำ ตัวอย่างฟองน้ำที่เก็บได้ส่วนหนึ่งจะนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอและเก็บรักษาไว้ในเอทธานอล ๙๙% เพื่อไว้ใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการต่อไป

๑.๒ การตรวจปริมาณแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้และการคัดแยกแบคทีเรียทะเลให้บริสุทธิ์

จากพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้ดำเนินการสำรวจและตัวอย่างฟองน้ำ แล้วคัดแยกแบคทีเรียได้ ๕๗ ไอโซเลต จากฟองน้ำ ๙ ตัวอย่าง และ จากน้ำทะเล ๖ ตัวอย่าง สามารถพบแบคทีเรียอาศัยอยู่ในฟองน้ำแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันโดยพบมีแบคทีเรียอาศัยอยู่จำนวนมากที่สุดในฟองน้ำท่อน้ำตาล SS ๕๘-B ๐๔ จำนวน ๒.๕๑ x ๑๐^{๖} โคโลนีต่อกรัม และน้อยที่สุดใน ฟองน้ำเมือกม่วง SS ๕๘-A ๐๒ จำนวน ๔.๐๔ x ๑๐^{๓} โคโลนีต่อกรัม ดังรายละเอียดในตารางที่ ๑

ได้ดำเนินการสำรวจและตัวอย่างฟองน้ำ แล้วคัดแยกแบคทีเรียได้ ๗๗ ไอโซเลต จากฟองน้ำ ๙ ตัวอย่าง และ จากน้ำทะเล ๖ ตัวอย่าง สามารถพบแบคทีเรียอาศัยอยู่ในฟองน้ำแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันโดยพบมีแบคทีเรียอาศัยอยู่จำนวนมากที่สุดในฟองน้ำท่อน้ำตาล SS ๕๘-B ๐๔ จำนวน ๒.๕๑ x ๑๐^{๖} โคโลนีต่อกรัม และน้อยที่สุดใน ฟองน้ำเมือกม่วง SS ๕๘-A ๐๒ จำนวน ๔.๐๔ x ๑๐^{๓} โคโลนีต่อกรัม ดังรายละเอียดในตารางที่ ๑

สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันให้บริสุทธิ์ได้จากน้ำทะเลได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างจาก ๔ พื้นที่จากบริเวณชายฝั่ง หาดเตย หาดเทียน เกาะจวงและ เกาะปลาหมึก หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี พบมีแบคทีเรียเจริญได้แตกต่างกันดังนี้ ๑.๐๕ x ๑๐^{๓} , ๑.๘๕ x ๑๐^{๒} ๒.๖๕ x ๑๐^{๒}, และ ๘.๙๕ x ๑๐^{๒} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับดังรายละเอียดในตารางที่ ๒ ที่แสดงถึงความหลากหลายและลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียทะเล ยังอยู่ในระหว่างการศึกษ และเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Zobell ๐.๓% agar ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ ๑, และตารางที่ ๒ ตามลำดับ และตัวอย่างฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่เพาะเลี้ยงได้ดังแผ่นภาพที่ ๑

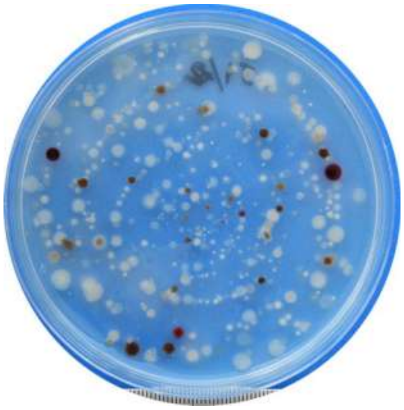
เมื่อได้แบคทีเรียบริสุทธิ์แล้ว ทำการเก็บรักษาเพื่อดำเนินการทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียมาตรฐานที่ทดสอบ

ตารางที่ ๑ จำนวนแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำบริเวณ หาดเตย หาดเทียน เกาะจวง เกาะปลาหมึกแสมสาร หมู่เกาะแสมสาร อ.สัตหีบ จังหวัดชลบุรี

รหัส	ชื่อไทย	จำนวนแบคทีเรียทะเลทั้งหมดที่พบ(CFU/g)
SS ๕๘-A ๐๑	ฟองน้ำสีน้ำเงิน	๓.๒๘ x $๑๐^{๕}$
SS ๕๘-A ๐๒	ฟองน้ำเมือกม่วง	๔.๐๔ x $๑๐^{๓}$
SS ๕๘-B ๐๑	ฟองน้ำครก	๒.๗๐ x $๑๐^{๔}$
SS ๕๘-B ๐๒	ฟองน้ำสีน้ำตาลเหลือง	๖.๐๒ x $๑๐^{๔}$
SS N ๕๘-B ๐๑	ฟองน้ำสีน้ำเงินเทา	๒.๖๗ x $๑๐^{๕}$
SS N ๕๘-B ๐๒	ฟองน้ำสีน้ำเงิน	๒.๒๖ x $๑๐^{๕}$
SS ๕๘-B ๐๔	ฟองน้ำท่อสีน้ำตาล	๒.๕๑ x $๑๐^{๖}$
SS ๕๘-C ๐๑	ฟองน้ำครก	๒.๖๐ x $๑๐^{๕}$
SS ๕๘-C ๐๒	ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง	๗.๔๐ x $๑๐^{๔}$

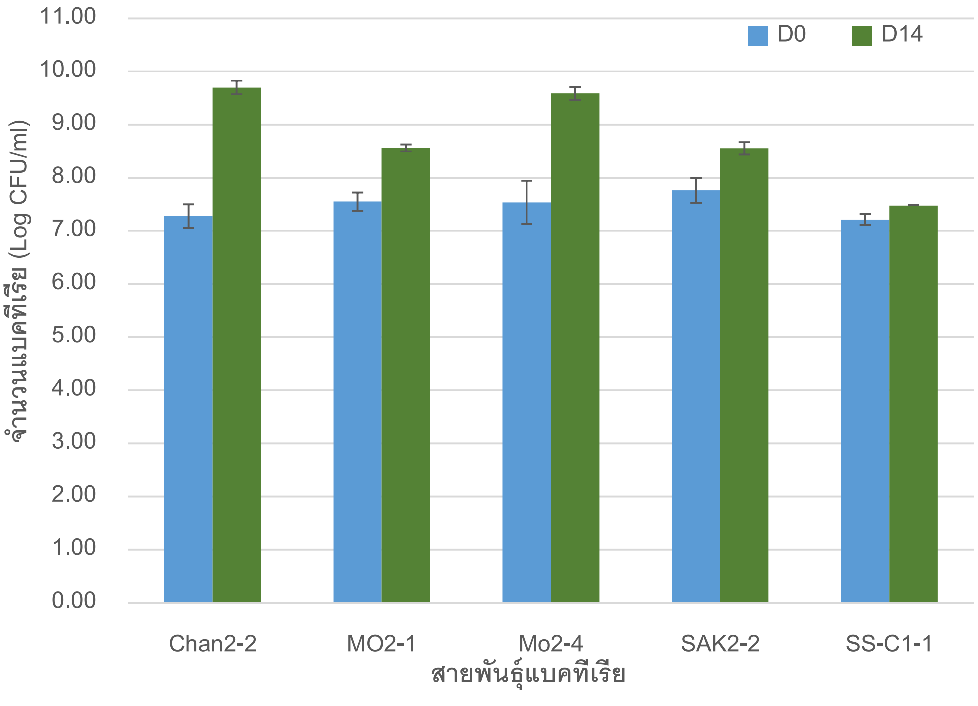
ตารางที่ ๒ จำนวนแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณ หาดเตย(TYW) หาดเทียน (TNW) เกาะแสมสาร(SSW) หมู่เกาะแสมสาร อ.สัตหีบ จังหวัดชลบุรี

ลำดับ	รหัส	จำนวนแบคทีเรียทะเลทั้งหมดที่พบ (CFU/mL)
๑.	SSW ๑	๕.๕ x $๑๐^{๓}$
๒.	SSW ๒	๑.๘๕ x $๑๐^{๓}$
๓.	SSW ๓	๒.๖๕ x $๑๐^{๒}$
๔.	SSW ๔	๘.๙๕ x $๑๐^{๒}$
๕.	TYW ๑	๑.๐๘ x $๑๐^{๓}$
๖.	TYW ๒	๒.๕ x $๑๐^{๒}$
๗.	TNW ๑	๕.๘ x $๑๐^{๒}$
๘.	TNW ๒	๒.๕ x $๑๐^{๓}$



รูปที่ ๑ แบคทีเรียทะเลที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและคัดแยกได้

รูปที่ ๒ แบคทีเรียทะเลที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและคัดแยกได้



รูปที่ ๓ จำนวนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว ๕ สายพันธุ์ ที่เจริญเติบโตในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ๔ ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกจากน้ำและดินตะกอนในระดับชีวโมเลกุล

สายพันธุ์	**ชนิดแบคทีเรีย**	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (๕' ถึง ๓')
Chan๒-๒	*Pseudomonas taiwanensis*	GAGATGCATACCACGTKGGTTGGA-(F) AGCTGTTGTTCGGGAAGAYWGTGCMGTT-(R)
SS W-C	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	CATAATAAAGGGCATCACCGT-(F) GATTTCATTCTCGAAACTCCAAAC-(R)
SS W-R	*Pseudoalteromonas* sp.	ATCTGGGCGCGTTGGGATTTGAGCG-(F) CGCATGGTGATCGCTGTGCCGCTGC-(R)

ตารางที่ ๕ ผลการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบ โดยแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกจากน้ำและดินตะกอน
(แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของบริเวณที่ยับยั้ง: SA= *Staphylococcus aureus*; BS= *Bacillus subtillus*; VA= *Vibrio alginoliticus*; EC= *Escherichia coli*)

ลำดับ	**รหัสเชื้อ**	**ผลของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)**			
		B. subtilis	***S. aureus***	***V.*** *alginoliticus*	***E. coli***
๑	SW-SS -B ๐๑-๑	-	-	-	-
๒	SW-SS -B ๐๑-๒	-	-	-	-
๓	SW-SS -B ๐๑-๓	-	-	๒๐.๐	๑๘.๕
๔	SW-SS B ๐๑-๔	๑๗.๐	-	-	-
๕	SW-SS N -B ๐๑-๑	-	-	-	-
๖	SW-SS N -B ๐๑-๒	-	-	-	-
๗	SW-SS N -B ๐๑-๓	-	-	-	-
๘	SW-SS C -B ๐๑-๑	๒๒.๐	๑๘.๕	-	-
๙	SW-SS C -B ๐๑-๒	-	-	-	-
๑๐	SW-SS C -B ๐๑-๓	-	๑๗.๐	๑๘.๕	-
๑๑	SW-SS C -B ๐๑-๔	-	-	-	-
๑๒	SW-SS C -B ๐๑-๕	-	-	๑๗.๐	๑๘.๕
๑๓	SW-SS P -B ๐๑-๑	-	-	-	-
๑๔	SW-SS P ๕๘-B ๐๑-๒	๒๐.๐	๑๙.๐	-	-
๑๕	SW-SS P ๕๘-B ๐๑-๓	-	-	-	-
๑๖	SW-SS R ๕๘-B ๐๑-๑	๒๐.๐	๑๘.๕	-	-
๑๗	SW-SS R ๕๘-B ๐๑-๒	-	-	๑๗.๐	๑๓.๕

๓. อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการทดลองในการตรวจฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียเบื้องต้นของแบคทีเรียจากน้ำและดินตะกอนจากบริเวณชายฝั่งทะเล ๘ ตัวอย่างซึ่งคัดแยกได้แบคทีเรีย ๗๐ ไอโซเลต จากพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี หมู่เกาะแสมสาร จ. ชลบุรี พบว่าแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกและเพาะเลี้ยงได้ เมื่อสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีและสี มีความหลากหลายแตกต่างกัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับ การศึกษาของชุติวรรณและคณะ(๒๕๔๑) ที่เก็บตัวอย่างฟองน้ำได้ ๖๘ ชนิด จากบริเวณทั้ง ๔ แห่ง คือ เกาะครก จ. ชลบุรี, หมู่เกาะสิมิลัน, หมู่เกาะสุรินทร์ จ. พังงา และหน้าหาดแม่รำพึง จังหวัดระยอง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกันในฟองน้ำ แต่ละชนิดได้รวม ๔๖๘ สายพันธุ์ แบคทีเรียที่ได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบมากกว่า ๙๕ เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียแกรมบวกประมาณ ๕ เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อทำการตรวจสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC ๒๕๙๒๓, *Escherichia coli* ATCC ๒๕๙๒๒, *Vibrio anguillarum* ORI และ *Bacillus subtilis* ATCC ๖๖๓๓ พบเชื้อที่มีความสามารถในการต่อต้านเชื้อ ดังกล่าว ๒๐ สายพันธุ์ คิดเป็น ๔.๓% แต่ไม่พบว่ามีแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ใดแสดงฤทธิ์ในการต่อต้านฟังไจ *Candida albicans* และ *Pennicillium crysogenum* นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ooky และ คณะ (๒๐๐๗) พบว่าแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ *A. hydrophila* และสายพันธุ์รหัส BSP๔๓ ที่สามารถต้านการเจริญของ *S. aureus* และ *B. subtilis* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ได้ใช้ในการทดลองนี้ได้เช่นกัน

จากการศึกษาของ Rungprom และคณะ(๒๐๐๘) เมื่อทำการสกัดสารจากแบคทีเรียที่แสดงฤทธิ์ในเบื้องต้นมาทำการมดสอบซ้ำ โดยนำสารสกัดหยาบทั้งจากส่วนของเซลล์ และส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความสามารถละลายได้ในชั้นของ ethyl acetate และละลายได้ชั้นของน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของชุติวรรณและคณะ(๒๕๔๑) ที่พบว่า ส่วนของสารสกัดของเซลล์ในชั้นของน้ำ และสารสกัดของส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อในชั้น ethyl acetate ของเชื้อสายพันธุ์ IMS ๗-๑, IMS ๑๑-๒, แสดงฤทธิ์ในการในการต่อต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC ๒๕๙๒๓ ได้ดี ส่วนสายพันธุ์ IMS ๒๔-๑, IMS ๒๕-๒, และ IMS ๓๔-๑ มีฤทธิ์ในการต่อต้าน *B. subtilis* ATCC ๖๖๓๓ และ*V. anguillarum* ได้ดี ซึ่งเมื่อนำสารสกัดของสายพันธุ์ IMS ๒๔-๑, IMS ๒๕-๒, และ IMS ๓๔-๑ มาทำการแยกแฟรคชั่นด้วย Silica Column Chromatography หรือ Thin Layer Chromatography และ HPLC จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS และ NMR Spectrometer (Varian ๒๐๐ หรือ ๕๐๐ MHz พบว่าสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพคือ **Cyclo- tyr- Val**, **Pentabromopseudiline** และ **Isatin** ตามลำดับ

งานวิจัยของ kennedy และคณะ (๒๐๐๙) พบแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำสายพันธุ์ BC๒, SM๒, SM๔, SM๘, SM๑๘ และ SM๑๙ ที่สามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* แต่ไม่มีฤทธิ์ต้าน *E. coli* ได้ ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบที่ได้ใช้ในการทดลองนี้ได้เช่นกัน

จากการจำแนกชนิดแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกจากน้ำและดินตะกอนในระดับชีวโมเลกุลพบว่าเป็นแบคทีเรียกรัมลบที่มีชนิดแตกต่างกันได้แก่ *Pseudomonas taiwanensis, Pseudomonas pseudoalcaligenes* และ *Pseudoalteromonas* sp.

๔. สรุปผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียทะเลน้ำและดินตะกอนจากบริเวณชายฝั่งทะเล ๘ ตัวอย่าง ซึ่งได้แบคทีเรีย ๗๐ ไอโซเลต จากบริเวณชายฝั่ง หาดเตย หาดเทียน เกาะจวง หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ซึ่งอยู่ในพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พบมีแบคทีเรียเจริญได้แตกต่างกันดังนี้ ๑.๐๕ x ๑๐^{๓} , ๑.๘๕ x ๑๐^{๒} ๒.๖๕ x ๑๐^{๒}, และ ๘.๙๕ x ๑๐^{๒} โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นแบคทีเรียแกรมลบและสมบัติทางชีวเคมีสามารถบ่งชี้ถึงลักษณธทางพันธุกรรมที่มีความหลากหลายของแบคทีเรียในประชาคมในเบื้องต้นได้เป็นสกุล *Pseudomonas, Alteromonas, Pseudoalteromonas, Vibrio, Flavobacterium, Acinetobacter,* และกลุ่มที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้

เมื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้มาศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำ ในการสร้างสารมาต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง ๔ ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginoliticus และ Escherichia coli*ในระยะเวลา ๒๔ ชั่วโมง ซึ่งจากจำนวนแบคทีเรียทะเล ๕๗ สายพันธุ์ที่แยกได้ พบว่ามีฟองน้ำมี ๙ ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ สามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* ได้ มีแบคทีเรียทะเลจำนวน ๘ สายพันธุ์ และสามารถต้านการเจริญของ *S. aureus* ได้บางส่วนมี ๒ ไอโซเลต โดยสายพันธุ์ SS-A ๒-๒ SS-B ๒-๕ SS-C ๒-๓ ให้ผลการต้านมากที่สุด ส่วนที่มีฤทธิ์ในการต้าน *S. aureus* มีแบคทีเรียทะเลจำนวน ๕ ไอโซเลต และสามารถต้านการเจริญของ *S. aureus* ได้บางส่วนมี ๑๖ ไอโซเลต โดยสายพันธุ์ SS -B ๒-๕ ให้ผลการต้านมากที่สุด และสามารถต้านการเจริญของ *V. alginoliticus*ได้ มีแบคทีเรียทะเลจำนวน ๖ ไอโซเลต โดยสายพันธุ์ SS -C ๒-๓ มีฤทธิ์ในการต้านมากที่สุด ส่วนที่มีฤทธิ์ในการต้าน *E. coli* ไม่มีแบคทีเรียทะเลที่สามารถต้านการเจริญของ *E. coli* สรุปได้ว่า แบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก (gram positive) ที่ทดสอบ ๒ ชนิดคือ *B. subtilis* และ*S. aureus* ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) ๒ ชนิดได้แก่ *V. alginoliticus* และ *E. coli*

จากการตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง ๔ ชนิด จากจำนวนแบคทีเรียทะเลที่แยกจากฟองน้ำ ๙ ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ ทำการทดลองต่อโดยการเพาะเลี้ยงจำนวน ๕ ไอโซเลต ได้แก่ SS -A ๒-๒, SS -B ๒-๕, SS -C ๒-๓, SW-SS P -B ๐๑-๒ จากนั้นทำการสกัดสารโดยแบ่งส่วนของน้ำเลี้ยงและเซลล์ของแบคทีเรียทะเลที่แยกจากฟองน้ำ โดยส่วนของน้ำเลี้ยงนั้นส่วนหนึ่งจะสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตด และอีกส่วนหนึ่งผ่านคอลัมน์โดยใช้เมทานอลเป็นตัวชะล้าง ส่วนของตะกอนเซลล์นั้นจะสกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์ม ที่ระดับความเข้มข้น ๔๐๐,๒๐๐ และ ๑๐๐ µg โดยใช้ DMSO เป็น negative control และใช้ยาstreptomycin เป็น positive controlจากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดหยาบที่สกัดจากแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำสายพันธุ์ IMS๑-๔Y ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*และ *S. aureus* ได้ ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อ *V. alginoliticus* ได้ แต่ยับยั้งเชื้อ

B. subtilis และ *S. aureus* ได้บางส่วนเท่านั้น ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ SS -A ๒-๒ ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตด สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*และ *S. aureus* ได้ ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*ได้บางส่วน ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ SS-C ๒-๓, ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *E. coli*ได้ ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลคลอโรฟอร์มไม่สามารถยับยั้งเชื้อชนิดใดได้เลย ส่วนสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ SS -A ๒-๒ โดยส่วนของน้ำเลี้ยงที่ผ่านคอลัมน์สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *V. alginoliticus* และ *E. coli* ได้ ส่วนน้ำเลี้ยงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตด สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้แต่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้บางส่วนเท่านั้น ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ SS -C ๒-๓ ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *E. coli* ได้

สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นส่วนของน้ำเลี้ยงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มซึ่งเป็นส่วนของตะกอนเซลล์ แสดงว่าแบคทีเรียทะเลได้สารบางอย่างออกมาในน้ำเลี้ยง ซึ่งพบน้อยมากในตะกอนเซลล์ จึงจัดได้ว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนี้เป็นสารที่ถูกขับออกมาภายนอกเซลล์ และสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทะเลสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก(gram positive) ที่ทดสอบ ๒ ชนิดคือ *B. subtilis* และ *S. aureus* ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) ยับยั้งได้เพียง *V. alginoliticus* และในการจำแนกชนิดแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกจากน้ำและดินตะกอนในระดับชีวโมเลกุลพบว่าเป็นแบคทีเรียกรัมลบที่มีชนิดแตกต่างกันได้แก่ *Pseudomonas taiwanensis, Pseudomonas pseudoalcaligenes* และ *Pseudoalteromonas* sp.

๔. ข้อเสนอแนะ

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและการใช้ประโยชน์ของประชาคมแบคทีเรียในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล ในประเทศไทยนั้นมีอยู่น้อยมาก ทำให้ประเทศไทยขาดข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพโดยเฉพาะจากจุลินทรีย์ทะเลซึ่งเป็นประชาคมที่มีความสำคัญอย่างยิ่งทั้งในบทบาทผู้ผลิตเบื้องต้นและการเป็นผู้ย่อยสลาย ตลอดจนในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกได้ให้ความสำคัญต่อแบคทีเรียทะเลในบทบาทเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงควรที่จะสนับสนุนให้ทำการวิจัยอย่างต่อเนื่อง เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับทรัพยากรชีวภาพทางทะเลที่มีอยู่ของไทย เพื่อเป็นนแวทางพัฒนาศักยภาพสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

๕. ผลผลิต

- จะถ่ายทอดองค์ความรู้ผ่านการจัดนิทรรศการ การประชุมวิชาการและนิทรรศการ ครั้งที่ ๙ "ทรัพยากรไทย : " ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิทยาเขตสระบุรี ในเดือน พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๖๐
- จะนำเสนอผลงานวิจัยการประชุมวิชาการและนิทรรศการในครั้งต่อไป

บรรณานุกรม

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา รวิวรรณ วัฒนะดิลก และสุเมตต์ ปุจฉาการ (๒๕๔๑) การศึกษาสารไบโอแอกทีฟ เมตตาบอไลต์ จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำในประเทศไทย. รายงายฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

Azam, F., T. Fenchel, J.G. Field, J.S. Gray, L.A. Meyer-Reil and F. Thingstad. ๑๙๘๓. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, ๑๐, ๒๕๗-๒๖๓.

Azam, F. ๑๙๙๘. Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. ๑๙๙๘. *Science*, ๒๘๐, ๖๙๔-๖๙๖.

Cho, B.C. and F. Azam. ๑๙๙๐. Biogeochemical significance of bacterial biomass. in the oceans euphotic zone. *Mar. Eco. Pro. Ser.,* ๖๓, ๒๕๓-๒๕๙.

Cho และ Azam, ๑๙๙๐. Biogeochemical significance of bacterial biomass in the oceans euphotic zone. Mar. Eco. Pro. Ser., ๖๓, ๒๕๓-๒๕๙.

De Rosa, S., Milone, A., Ku jumgiev, A., Stefanov, K., Nechev, I., Popov, S., ๒๐๐๐. Metabolites from a marine bacterium *Pseudomonas/ Alteromonas,* associated with sponge*Dysidea fragillis.* Comp. Biochem. Physiol. ๑๑๒๖, ๓๙๑-๓๙๖.

Faulkner, D,J., Harper, M.K., Haygood, M.G., Saloman, C.E., and Schmidt, E.W. Symbiotic Bacteria in Sponges : Sources of Bioactive Substances ; in Fusetani, N.(ed)Drugs From the Sea, S. Karger. AG, Basel, ๒๐๐๐, pp. ๑๐๗ – ๑๑๙.

Fuhrman, J.A. and A. Hagstrom. ๒๐๐๘. Bacteria and archaeal community structure and its pattern. *In: Microbial ecology of the ocean* (Ed.: D.L. Kirchman). ๒nd Edn. (Wiley-blackwell, Canada). pp. ๔๕-๙๐.

Fuhrman, J.A. ๒๐๐๒. Community structure and function in prokaryotic marine plankton. *Anton. Leeun. Int. J. G.*, ๘๑, ๕๒๑-๕๒๗.

Kim, Se-Kwon, and Bhatnagar, Ira. ๒๐๑๑. Screening Strategies for Discovery of Marine Microbial Cosmeceuticals. *In*: *Marine Cosmeceuticals: Trends and Perspects. Edited by :* Kim, Se-Kwon CRC Press. ๔๒๘ pp.

Kim, Se-Kwon, and Wijesekara, I. ๒๐๑๐. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review, *Journal of Functional Foods*, ๒: ๑-๙.

Kim, Se-Kwon, Ravichandran, Y.D., Khan, S.B., and Kim, Y.T. ๒๐๐๘. Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering,* ๑๓:๕๑๑-๕๒๓.

Mitchell, J.G., A. Okubo, J.A. Fuhrman and W. Cochlan. ๑๙๘๙. The contribution of phytoplankton to ocean density gradients. *Deep-Sea Res*. I, ๓๖, ๑๒๗๗-๑๒๘๒.

Schäfer H, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Servais P, Pukall R, Stackebrandt E, Troussellier M, Guindulain T, Vives-Rego J, Muyzer G. ๒๐๐๑. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol.* ๓๔(๓):๒๔๓-๒๕๓.

Sigh, Sanjay Kumar, and Ramaiah, Nagappa. ๒๐๑๑. Denaturing gradient gel electrophoresis profiling of bacterial communities composition in Arabian Sea. *J. Environ. Biol.* ๓๒:๓๓๙-๓๔๖.

Simon, M., B.C. Cho and F. Azam. ๑๙๙๒. Significance of bacterial biomass in lakes and the ocean - Comparison to phytoplankton biomass and biogeochemical implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, ๘๖, ๑๐๓-๑๑๐.

Thawornwiriyanun, Patcharee., **Dechsakulwatana, Chutiwan**, Sunthornsuk, Leena, and Suntornsuk, Worapot. ๒๐๐๙. Carotenoid Production from Sponge-associated Bacteria Isolated in the Gulf of Thailand. *J. Science, Technology, and Humanities*. ๗:๑๑-๑๘.

Thawornwiriyanun, Patcharee., Somboon Tanasupawat, **Chutiwan Dechsakulwatana**, Somkiet Techkarnjanaruk, and Worapot Suntornsuk. ๒๐๑๒. Identification of Newly Zeaxanthin-Producing Bacteria Isolated from Sponges in the Gulf of Thailand and their Zeaxanthin Production. Appl Biochem Biotechnol., June ๒๐๑๒, ๑๒ pp.

Wimolpun Rungprom., Lynette K Lambert., **Chutiwan Dechsakulwatana**., Michael C. Barden., Warinthorn Chavasiri., Udom Kokpol., and Mary Garson. ๒๐๐๘. Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed *Diginea* sp. and the sponge *Halisarca ectofibrosa*. ***Tetrahedron***. ๖๔(๑๔):๓๑๔๗-๓๑๕๒.

Webster, N.S., Wilson, K.J., Blackall, L.L., and Hill, R.T. ๒๐๐๑. Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Rhopaloeides .odoralbile.*

Xing DF, Ren NQ., ๒๐๐๖. Common problems in the analyses of microbial community by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Wei Sheng Wu Xue Bao.*(Chineese) Apr;๔๖(๒):๓๓๑-๕.