รายงานการวิจัย

การผลิตสารต้านมะเร็ง renieramycins ปริมาณมาก จากฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. (c.f. *Neopretosia* sp.) สายพันธุ์อันดามัน 1 โดยการเลี้ยงในทะเลแบบ sea farming บริเวณเกาะลิบง จังหวัดตรัง

Mass production of anticancer substance (renieramycins) from a blue marine sponge, *Xestospongia*. sp (c.f. *Neopretosia*. sp), Andaman1 strain by cultured as sea farming model in the area of Libong Island, Trang province

พชร เพ็ชรประดับ Patchara Pedpradab

ศิลปชัย เสนารัตน์ Sinlapachai Sanarat

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

ประจำปี พ.ศ. 2565

การผลิตสารต้านมะเร็ง renieramycins ปริมาณมาก จากฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. (c.f. *Neopretosia* sp.) สายพันธุ์อันดามัน ๑ โดยการเลี้ยงในทะเลแบบ sea farming บริเวณเกาะลิบง จังหวัดตรัง

พชร เพ็ชรประดับ[1] และศิลปชัย เสนารัตน์[1]

บทคัดย่อ

การเลี้ยงฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. ในทะเล มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณการสร้าง renieramycins การเลี้ยงดำเนินการโดยใช้วิธีประยุกต์เลี้ยงในถุงตาข่ายร่วมกับแบบแขวน โดยใช้น้ำหนักเริ่มต้นพ่อแม่พันธุ์เฉลี่ย 27.333 กรัม ผลการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงดังนี้ 52.333, 67.733 และ114.733 กรัม ตามลำดับ คุณภาพน้ำทุกพารามิเตอร์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คุณภาพน้ำที่สำคัญได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเค็ม แอมโมเนีย และไนไตรน์ อยู่ในช่วงต่ำกว่าระดับที่ทำให้ฟองน้ำเกิดความเครียด ได้แก่ 6.22-7.43 ppt, 30.17-31.20 mg/l, 0.001, และ 0.00 mg/l ตามลำดับ ดังนั้นฟองน้ำทะเลดังกล่าวจึงไม่มีความเครียดสภาพแวดล้อม ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียอาศัยร่วมในฟองน้ำ พบแบคทีเรีย *Candidatus Endohaliclona renieramycinifaciens* ซึ่งมีรายงานว่าเป็นผู้สร้างสาร renieramycins ดังนั้นการเลี้ยงฟองน้ำดังกล่าวจึงเป็นการเลี้ยงแหล่งที่อยู่อาศัยของแบคทีเรียผู้สังเคราะห์สารดังกล่าว

คำสำคัญ ฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. สารต้านมะเร็ง renieramycins การเลี้ยงแบคทีเรีย ประเทศไทย

[1] อาจารย์ สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเลและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ. สิเกา จ.ตรัง

Mass production of anticancer substance (renieramycins) from a blue marine sponge, *Xestospongia*. sp (c.f. *Neopretosia*. sp), Andaman 1 strain by cultured as sea farming model in the area of Libong Island, Trang province

Patchara Pedpradab and Sinlapachai Sanarat

Abstract

Culture of a blue marine sponge *Xestospongia* sp. in the sea has the main objectives to determine growth and to assess renieramycins produced potential of a sponge. The culturing performed by combination of net bag and long line rope methods. The average weight of mother plant was 27.333 gram. The growth was measured every 30 days. After 30, 60 and 120 days of cultural period, the average of sponge's weight was 52.333, 67.733, and 114.733 gram, respectively. All measured water quality parameters were in the standard sea water range values. The importance water quality including dissolve oxygen (DO), salinity, ammonia and nitritenwere below stress values for marine sponge culture. namely 6.22-7.43 ppt, 30.17-31.20 mg/l, 0.001, และ 0.00 mg/l etc. Analysis of bacteria associated marine sponge found the presence of renieramycin produced bacteria, *Candidatus Endohaliclona renieramycinifaciens*. Therefore, the blue marine sponge *Xestosponga* sp. is a harbor of renieramycins produced bacteria.

คำสำคัญ *Xestospongia* sp., Renieramycins, Cultivation, Bacterium, Thailand

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประประมาณแผ่นดินประจำปี 2564 จัดเป็นงานวิจัยที่สร้างความรู้เกี่ยวกับการเลี้ยง ฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. (c.f. *Neopretosia* sp.) สายพันธุ์อันดามัน 1 ในทะเลแบบ sea farming และนำไปสู่การผลิตสารต้านมะเร็ง renieramycins ปริมาณมาก จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อประโยชน์ทางด้านการแพทย์และสร้างผลิตภัณฑ์ยาชนิดใหม่

ขอขอบคุณจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่ได้สนับสนุนทุนเพื่อทำงานวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนสถาบันทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมที่ได้สนับสนุนเครื่องมือและห้องปฏิบัติการ

พชร เพ็ชรประดับ
ศิลปชัย เสนารัตน์

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.3 ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง	4
1.4 วัตถุประสงค์	6
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงานวิจัย	7
บทที่ 3 ผลการวิจัย	16
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการวิจัย	36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	39
เอกสารอ้างอิง	40

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. PCR products ของการวิเคราะห์ 16S ribosomal RNA (16S rRNA) แบคทีเรียอาศัยร่วมในฟองน้ำ *Xestospongia* sp. 11
2. สภาวะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA 12
3. PCR products ของการวิเคราะห์ *renC* และ *renJ* ของแบคทีเรีย *Candidatus* Endohaliclona renieramycinifaciens 12
4. สภาวะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *renC* และ *renJ* ของแบคทีเรีย *Candidatus* Endohaliclona renieramycinifaciens 13
5. ส่วนผสมของการวิเคราะห์ Plasmid Miniprep Kit 14
6. การเจริญเติบโตของฟองน้ำตามระยะเวลาการเลี้ยง 17
7. ปริมาณสารต้านมะเร็ง (RM) 17
8. ผลของการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทะเลบริเวณเลี้ยงฟองน้ำ 18
9. ตารางผลการแสดงสภาวะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA 19
10. ตารางแสดงผลของสภาวะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *renC* และ *renJ* ของแบคทีเรีย *Candidatus* Endohaliclona renieramycinifaciens 24
11. ผลของจำนวนเซลล์ที่พบในฟองน้ำ 34

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างโมเลกุลของสาร renieramycins	5
2	รูปแบบการเลี้ยงฟองน้ำ *Xestospongia* sp. สีน้ำเงินในทะเล	8
3	แผนภูมิแสดงการเจริญเติบโตของฟองน้ำ	19
4	ปริมาณสาร RM ที่ต่างกันในระยะเวลาการเลี้ยง 280 วัน	19
5	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp.	20
6	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากฟองน้ำที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	21
7	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อยีน 16S rRNA จากตัวอย่างฟองน้ำทะเล *Xestospongia* sp.	22
8	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อยีน 16S rRNA จากฟองน้ำตัวอย่างที่ 3 โคโลนีที่ 1 ที่มีการแปรผันของปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ	23
9	แสดง 0.8% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อยีน *ren C* และ *ren J*	24
10	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR รวม ต่อยีน *ren C* และ *ren J*	25
11	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นส่วนยีน *ren C* และ *ren J* ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	26
12	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียที่ทดสอบด้วยวิธี rapid size screening	27
13	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของพลาสมิดที่สกัดได้จากรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย (1)	28
14	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ของพลาสมิดที่สกัดได้จากรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย (2)	29
14	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ren C* ของรีคอมบิแนนท์โคลนเทียบกับที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล	28
15	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ren J* ของรีคอมบิแนนท์โคลนเทียบกับที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล	30
16	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ren J* ของรีคอมบิแนนท์โคลนเทียบกับที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล (GenBank Accession No. MK748464.1, MK748465.1, MK748463.1, MK748462.1)	31
17	สัณฐานวิทยาและมิญชวิทยาตามขวางของฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestrospongia* sp.	32
18	มิญชวิทยาและชนิดเซลล์ที่พบในฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestrospongia* sp.	33
19	ผลการนับจำแนกและจำนวนเซลล์ฟองน้ำโดยวิธีเนื้อเยื่อวิทยา	35

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตสารต้านมะเร็ง renieramycins ปริมาณมาก จากฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน*Xestospongia* sp. (c.f. *Neopretosia* sp.) สายพันธุ์อันดามัน 1 โดยการเลี้ยงในทะเลแบบ sea farming บริเวณเกาะลิบง จังหวัดตรัง” เป็นการวิจัยเพื่อเก็บข้อมูลและหาข้อสรุประยะสุดท้ายของการวิจัยเกี่ยวกับฟองน้ำทะเลสีน้ำเงินชนิดนี้ในประเทศไทย หลังจากทำวิจัยในเรื่องที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กันอย่างเป็นลำดับ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2557 จนได้คำตอบที่แน่ชัดว่า หนทางที่น่าจะเป็นไปได้มากสำหรับการผลิตสารเคมีชีวภาพจากฟองน้ำชนิดนี้ คือ การทำฟาร์มในทะเล ผลการวิจัยจะเกิดผลกระทบเป็นวงกว้าง ตั้งแต่การเกิดขึ้นของธุรกิจแนวใหม่ อุตสาหกรรมการผลิตยาต้านมะเร็งและเภสัชกรรมที่เกี่ยวข้อง การสาธารณสุข การพัฒนานวัตกรรมหรือเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงฟองน้ำทางทะเล เศรษฐกิจชุมชน เป็นต้น การวิจัยนี้ครอบคลุมประเด็นสำคัญ ได้แก่ ข้อมูลท่อนพันธุ์ของฟองน้ำแม่แบบ เทคนิควิธีการเลี้ยงที่เหมาะสม ความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตสารกับฤดูกาลหรือปัจจัยสภาวะแวดล้อมในสภาพธรรมชาติ อัตราการผลิตสารเมื่อสิ้นสุดการทดลองและความคุ้มทุน จากการทดลองเลี้ยงฟองน้ำชนิดในทะเลอันดามันบริเวณจังหวัดตรังของทีมวิจัยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2557 และเก็บรวบรวมสายพันธุ์มาทางฝั่งทะเลอันดามันตลอดระยะเวลา 6 ปี พบว่า ฟองน้ำ *Xastosporgia* sp. (*Neopretosia* sp.) สายพันธุ์อันดามัน 1 มีความโดดเด่นในการสร้างสาร Renieramycin อนุพันธุ์ M (อนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพสูงอย่างมีนัยสำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้ง) สำหรับการเลี้ยงพบว่าถ้าเลี้ยงในทะเลใกล้ชายฝั่งมาก ๆ อัตราการรอดจะต่ำเพราะประสบปัญหาการสะสมของดินโคลนตะกอนหรือ organic particle ขนาดใหญ่อุดตันระบบไหลเวียนน้ำภายใน จากการทดลองดังกล่าว พบว่าเทคนิคเหมาะสมที่ใช้เลี้ยงฟองน้ำชนิดนี้คือการแขวนในแนวดิ่ง (vertical long line method) วัสดุยึดเกาะคือเชือกทนเค็มและพบเทคนิคการผูกยึดติดระหว่างวัสดุกับตัวท่อนพันธุ์แม่ ดังนั้นการเลี้ยงใกล้ฝั่งมีความเสี่ยงต่ออัตราการอดและขาดทุน เมื่อแก้ปัญหาโดยเลี้ยงในโรงเรือนด้วยระบบน้ำไหลเวียนกึ่งปิด พบว่า แม้ควบคุมปัจจัยต่างๆได้ แต่ประสบปัญหาการสร้างสารและอัตราการรอดน้อยเพราะขาดกระบวนการหรือกลไกป้องกันตนเอง (mechanisms of defend) ตามธรรมชาติ อีกทั้งต้องใช้อาหารและเสริมแร่ธาตุในน้ำเลี้ยงอย่างมาก (พชร, อุดมศักดิ์ และวัฒนา, 2562) เนื่องจากอัตราการบริโภคอาหารสูง การเลี้ยงจะเติบโตดีในช่วง 3 สัปดาห์แรกต่อจากนั้นทยอยตาย การเลี้ยงในโรงเรือนจะทำได้ก็ต่อเมื่อมีการพัฒนาใช้เทคโนโลยีและนวัตกรรมการอื่น ๆ อีกมาก เช่น การออกแบบระบบปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ระบบรับรู้อัตโนมัติ (Sensors) การติดตามการบริโภคแร่ธาตุสารอาหารแบบเสมือนจริง (Real time) ระบบควบคุมการนำจ่ายอาหารทางไกลอัตโนมัติ ซึ่งกระทบต่อต้นทุนการผลิตจึงยังไม่เหมาะสมสำหรับประเทสไทยในภาวะปัจจุบัน เมื่อทีมวิจัยทดลองขั้นต้น (preliminary) โดยเลี้ยงในทะเลที่ไกลฝั่งออกไปคือที่บริเวณเกาะลิบงที่ระดับความลึก 7-10 เมตร กลับพบการเจริญเติบโตดีสร้างสารได้ในระดับมากกว่าร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัวอย่างเปียก ดังนั้นจึงมีประเด็น

คำถามว่าการผลิตสาร renieramycins โดยวิธีธรรมชาติจึงเป็นวิธีการเหมาะสมที่สุด ณ เวลาปัจจุบันหรือไม่ คุ้มค่ากับการลงทุนหรือเปล่า ถ้ามีความคุ้มและเป็นไปได้ มีโอกาสเป็นไปได้ไหมที่จะเกิดสัตว์เศรษฐกิจชนิดใหม่ หรือกลุ่มธุรกิจใหม่ด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล นอกจากนี้การทำฟาร์มเลี้ยงฟองน้ำเพื่อผลิตสารต้านมะเร็งในลักษณะ sea farming จะเป็นโอกาสดีที่จะศึกษาชีววิทยาการเลี้ยงและการสะสมสารในเยื่อเยื่อรวมทั้งอิทธิพลของฤดูการต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารไปในคราวเดียวกัน ซึ่งคาดหวังว่าการวิจัยนี้จะนำไปสู่การเลี้ยงระดับอุตสาหกรรมและพัฒนาความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเลี้ยงฟองน้ำของประเทศต่อไป น่าจะเป็นจิ๊กซอว์ชิ้นหนึ่งของขั้นตอนการเตรียมโมเลกุลเป้าหมาย (lead molecules) ในกระบวนการวิจัยและพัฒนายา โครงการวิจัยนี้มุ่งประเด็นไปที่การผลิตสารต้านมะเร็งที่สร้างโดยสิ่งมีชีวิตในทะเล คือสาร renieramycins จากฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongis* sp. (ชื่อที่ยอมรับในปัจจุบันคือ *Neopretosia* sp.) สารกลุ่มนี้ถูกค้นพบในประเทศไทยกว่า 16 ปีมาแล้ว (Suwanborirux *et al*., 2003) มีคุณสมบัติต้าน มะเร็งปอด ลำไส้ ตับ และมะเร็งเยื่อบุผิว อย่างมีประสิทธิภาพ ลักษณะทางโมเลกุลคล้ายกับสาร saframycin ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งในปัจจุบัน แต่ประสิทธิภาพสูงกว่า ซึ่งสารนี้กำลังพัฒนาให้เป็นยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ (Perdicaris *et al*., 2013) ดังนั้นจึงเป็นโอกาสของประเทศไทยที่จะผลิตสารนี้ใช้เองจากธรรมชาติ เพราะมีความได้เปรียบเรื่องฐานทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของฟองน้ำทะเลสีน้ำเงินชนิดนี้ซึ่งพบกระจายทั่วไปทั้ง ในทะเลฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน

1.2 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

<u>แนวคิด</u>

1. ต้องการผลิตสารต้านมะเร็งจากฟองน้ำทะเลโดยวิธีธรรมชาติแทนการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากการสังเคราะห์ทางเคมีต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูงใช้เม็ดเงินลงทุนมาก มีการวิจัยพื้นฐานสั่งสมองค์ความรู้มาเป็นเวลายาวนาน ดังนั้นจึงค่อนข้างจำกัดและมีอุปสรรคมากในปัจจุบันสำหรับประเทศไทย เมื่อเทียบกับประเทศอุตสาหกรรม ในทางตรงข้ามประเทศไทยมีความได้เปรียบเรื่องทรัพยากร และพื้นที่ติดกับทะเลทั้ง 2 ด้านจึงมีความเหมาะสมที่จะผลิตสารเคมีชีวภาพโดยวิธีการทำฟาร์มในทะเล (Sea Farming)

2. ฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. พบการแพร่กระจายทั่วไปในทะเลไทย ทางฝั่งอันดามัน พบมากที่จังหวัดสตูล และจังหวัดตรัง โดยเฉพาะที่ตรัง พบสายพันธ์ที่สร้างสาร renieramycins m. อย่างเป็นเอกลักษณ์ ดังนั้น ทะเลตรังจึงน่ามีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงฟองน้ำชนิดนี้ เพราะเป็นที่อยู่ของสายพันธ์สร้างสารเป้าหมายประกอบกับตรังมีพื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ทะเลบริเวณเกาะลิบง และอยู่ในเขตเงาพายุ จึงเป็นสถานที่เหมาะสมสำหรับทดลองทำฟาร์มเลี้ยงฟองน้ำให้ประสบความสำเร็จ

3. ถ้าการทดลองประสบความสำเร็จจะเกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่อง เช่น กลุ่มธุรกิจเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ธุรกิจที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารเคมีโดยวิธีธรรมชาติ การเพาะเลี้ยงทางทะเล ตลอดจนการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ อุตสาหกรรมการดำน้ำชมฟาร์มฟองน้ำทะเล ก็จะเป็นมิติใหม่

ของการท่องเที่ยวต่อไป การกระจายรายได้ก็จะมีมากขึ้นกว่าปกติ องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยสามารถขยายผลพัฒนาต่อยอด สร้างองค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเลี้ยงฟองน้ำทะเลต่อไป

ทฤษฎี

การผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำทะเล เพื่อใช้ประโยชน์ด้านสุขภาพ และใช้เป็นเครื่องมือทางชีวภาพ สามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยง ซึ่งจำเป็นต้องทำวิจัยสั่งสมองค์ความรู้มาเป็นระยะเวลาค่อนข้างยาวนาน ซึ่งการเลี้ยงฟองน้ำเพื่อผลิตสารเคมีชีวภาพ สามารถทำได้ 4 วิธีหลักๆ คือ การเลี้ยงในทะเล (Sea Farming) การเลี้ยงในอุปกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) การเลี้ยงในโรงเรือน (hatchery) และการเลี้ยงเซลล์ (perimorphs) วิธีที่ง่ายลงทุนน้อย และความเสี่ยงน้อยคือการเลี้ยงแบบทำเป็นฟาร์มทะเล กรณีฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ฟองน้ำชนิดนี้สร้างสารกลุ่ม tetrahydroisoquinoline alkaloid ชื่อ renieramycins ซึ่งมีศักยภาพสูงในการต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิด สารกลุ่มนี้กำลังเป็นที่ต้องการของตลาดทางสารเคมีและเวชภัณฑ์ในปัจจุบัน และเมื่อ approve ให้เป็นยาแล้วความต้องการสารนี้จะเพิ่มมากขึ้นในอนาคต

จากการวิจัยตั้งแต่ปี 2557 พบว่าการเลี้ยงฟองน้ำทะเลชนิดนี้สามารถทำได้ 2 วิธี คือการเลี้ยงในทะเล และในโรงเรือน ส่วนการเลี้ยงในอุปกรณ์ชีวภาพและการเลี้ยงเซลล์ perimorphs ยังขาดข้อมูลพื้นฐาน และจำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีและการลงทุนสูงจึงยังไม่เหมาะกับประเทศไทย จากการเลี้ยงในโรงเรือนพบว่า อัตราการผลิตสาร renieramycins น้อยกว่าในธรรมชาติ เพราะฟองน้ำสร้างสารโดยผ่านกลไกการป้องกันตัวเองในธรรมชาติของฟองน้ำ ถูกรุกรานโดยสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น ผู้ล่า จุลินทรีย์ในทะเล และสารเคมีที่หลั่งออกมาจากสิ่งมีชีวิตอื่นในระบบนิเวศ ฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. จึงสร้างสาร renieramycins ขึ้นมาป้องกันตัวเองจากการถูกรุกรานดังกล่าว ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีการสร้างสารเมแทโบไลด์ทุติยภูมิของสิ่งมีชีวิตในทะเล แต่ในระบบโรงเรือนมีการกรองและบำบัดน้ำก่อนน้ำเข้าระบบการเลี้ยงป้องกันตัวอ่อนสัตว์ทะเลอื่นๆ ปะปนมา และอาจคัดกรองเอาศัตรูในธรรมชาติออกไป ทำให้กลไกการป้องกันตัวเองทำงานน้อยลง การผลิตสารจึงลดลงตามไปด้วย การเลี้ยงในโรงเรือนจึงไม่ใช่วิธีที่เหมาะสม ณ ปัจจุบัน จึงเหลือเพียง 1 ทางเลือกคือการเลี้ยงในทะเลซึ่งก็สอดคล้องกับทฤษฎีการเลี้ยงฟองน้ำทะเลเช่นกัน

สมมุติฐาน

การผลิตสาร renieramycins ให้ได้ปริมาณมากในระดับการค้าและมีความเสถียรทางการผลิต จำเป็นต้องมีองค์ประกอบต่อไปนี้ ได้แก่ ต้นกล้าพันธุ์ที่ดีสมบูรณ์ เทคนิควิธีการเลี้ยง ปัจจัยสภาวะแวดล้อมและความสมบูรณ์ของระบบนิเวศทางทะเล สมมติฐานแบ่งได้เป็นข้อดังนี้

1. ท่อนพันธ์อันดามัน 1 ได้จากการสำรวจตั้งแต่ปี 2557 คิดเลือกโดยวิธี LCMSMS พบผลิตสาร renieramycins m. เป็นสารหลัก มีการเจริญเติบโตดี มีความทนทานสูง ยังไม่มีการกลายพันธุ์หรือเสียคุณสมบัติการสร้างสาร ถูกเก็บไว้ในธรรมชาติและมีปริมาณพียงพอต่อการขยายพันธุ์ ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นสายพันธุ์ทดลองในครั้งนี้
2. ถ้าใช้เทคนิคการเลี้ยงแบบแขวนตามแนวดิ่ง ใช้ plastic net หรือเชือกเป็นวัสดุยึดเกาะที่ระดับความลึก 5-10 เมตร ฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. จะเจริญได้ดี

3. เขตห้ามล่า ตำบลเกาะลิบง จังหวัดตรัง เป็นพื้นที่ปลอดภัยของระบบนิเวศที่สมบูรณ์และยังไม่ถูกรบกวนมาก ได้รับผลกระทบจากลมมรสุมน้อย ฟาร์มจึงไม่ได้รับความเสียหาย สามารถเลี้ยงและเก็บข้อมูลได้ทั้งปี

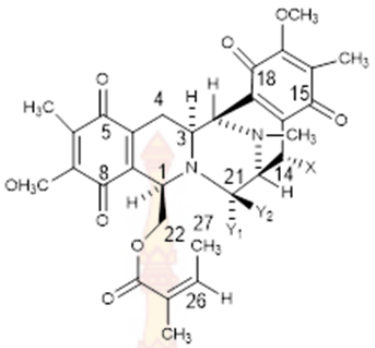
4. สาร renieramycins m. สังเคราะห์ผ่านกลไกการป้องกันตัวเองของฟองน้ำสีน้ำเงิน Neopetrosia sp. ดังนั้นกรเลี้ยงในสภาพธรรมชาติจึงให้ผลผลิตรสารได้มากกว่าการเลี้ยงแบบ lard bare หรือในโรงเพาะฟัก เพราะมีศัตรูโดยฑรรมชาติเป็นตัวกระตุ้นการสร้างสาร

5. ผลการวิจัยจะทำให้ผลกระทบเป็นวงกว้าง ทั้งด้านทรัพยากร ธุรกิจชีวภาพ และการท่องเที่ยว

1.3 ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

โรคมะเร็งที่มีความรุนแรงและเป็นปัญหาสุขภาพระดับวิกฤติของไทยโดยเป็นสาเหตุการเสียชีวิตเป็นอันดับ 1 ของประชากรโลกและประเทศไทย (Ferlay *et al*, 2018) ยาที่ใช้รักษาโรคชนิดนี้มีราคาแพง ผู้ป่วยบางรายไม่สามารถเข้าถึงยาใหม่ๆและมีประสิทธิภาพได้ เนื่องจากลิขสิทธิ์สารต้นแบบมีอายุมากถึง 20 ปี การสร้างยาสามัญ (Generic drug) ซึ่งผลิตโดยเลียนแบบจากยาต้นแบบแต่ใช้สารตัวเดียวกันต้องรอเวลากว่า 20 ปีจึงจะสามารถทำได้ ส่งผลให้ยามีราคาสูงมาก กระทบโดยตรงต่อการรักษาและงบประมาณด้านการจัดการสุขภาพ จากข้อมูลปี พ.ศ. 2562 กระทรวงสาธารณสุขชดเชยค่ารักษาโรคมะเร็งจำนวน 26,679 ล้านบาท (www.gettgo.com เข้าถึงวันที่ 6/11/2562) เนื่องจากยารักษาโรคมะเร็งมีราคาแพงนำเข้าจากต่างประเทศเกือบทั้งหมด จุดนี้จึงเป็นประเด็นปัญหาที่สำคัญและคาดว่าน่าจะเข้าสู่ภาวะวิกฤติด้านค่าใช้จ่ายทางสาธารณสุขและความมั่นคงด้านการดูแลสุขภาพของประชากรของประเทศ การแก้ปัญหานี้ทางหนึ่งคือการพัฒนายาเพื่อใช้ในประเทศ ซึ่งมีความจำเป็นมากและคาดว่าถ้าผลิตยาใช้เองในประเทศจะสามารถลดค่าใช้จ่ายได้ร้อยละ 5-8 (นรินทร์, 2561) อย่างไรก็ตามปัญหาการพัฒนายาในประเทศยังมีข้อจำกัดเรื่องความเชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชั้นสูงเพื่อการสังเคราะห์ยาในระดับอุตสาหกรรมซึ่งต้องใช้เม็ดเงินในการลงทุนสูงมาก อีกทั้งตัวยาที่ใช้รักษาหรือ lead compounds ที่จะได้รับการคัดเลือกเพื่อพัฒนาเป็นยาก็ยังมีจำนวนมีน้อยซึ่งสารเหล่านี้มีอยู่ในธรรมชาติทั้งบนบกและในทะเล ดังนั้นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าว คือ การเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตที่สร้างสารนั้นๆเองในธรรมชาติเพื่อผลิตสารเป้าหมายโดยวิธีตรง ซึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งของสาร โดยที่สารเหล่านั้นควรผ่านการวิจัยทางเคมีและคุณสมบัติทางเภสัชวิทยามาก่อน อยู่ในขั้นการทดลองระดับคลินิก (clinical trial) หรือกำลังจะผลิตใช้ในปัจจุบัน การวิจัยในลักษณะนี้จึงเป็นการเตรียมความพร้อมด้านเวชภัณฑ์ให้กับประเทศในระยะยาว สาร Renieramycins (ภาพที่ 1) ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นสารกลุ่มเตตร้าไฮโดรไอโซควิโนลีนอัลคาลอยด์ พบในฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xastospongia* sp. สายพันธุ์พบประเทศไทย ฟองน้ำชนิดนี้พบทั้งในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับสาร saframycin ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็งในปัจจุบัน (Perdicaris *et al*., 2013) สาร renieramycins บางอนุพันธ์กำลังได้รับการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ในการบำบัด

โรคมะเร็งปอด โดยเฉพาะอนุพันธ์ m (renieramycin m) สารนี้กำลังอยู่ในขั้นตอนการพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งชนิดใหม่และคาดว่าจะผลิตออกสู่ตลาดในอีกไม่กี่ปีข้างหน้า



A (1a) : X=OH, Y_1, Y_2=H_2 E (1e) : X=Y_2=H,Y_1=OH K (1k) : X=Y_1=CH_2COCH_3,Y_2=H

B (1b) : X=OC_2H_5,Y_1,Y_2=H_2 F (1f) : X =OCH_3,Y_1=OH,Y_2=H M (1m): X=Y_2=H,Y_1=CN

C (1c) : X=OH,Y_1,Y_2=O G (1g) : X=H,Y_1,Y_2=O O (1o) : X=OH,Y_1=CN, Y_2=H

D (1d) : X=OC_2H_5,Y_1,Y_2=0 J (1a) : X=Y_2=H,Y_1=CH_2COOCH_3

ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของสาร Renieramycins

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดลองทำฟาร์มทะเลเลี้ยงฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Neopretrosia* sp. ผลิตสารต้านมะเร็ง renieramycins ระดับการค้า

2. เพื่อตรวจวัดและประเมินปริมาณการสร้างสาร renieramycins และการเจริญเติบโตของฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ตามฤดูกาล

3. เพื่อวิเคราะห์ปัจจัยสภาวะแวดล้อมของแหล่งเลี้ยง และบริเวณใกล้เคียง

4. เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลสายพันธุ์ อันดามัน 1 ได้แก่ข้อมูล พันธุกรรม เนื้อเยื่อ และความเสถียรของการสร้างสาร พร้อมทั้งเตรียมการขึ้นทะเบียนเป็นสายพันธุ์ของประเทศไทย

5. เพื่อวิเคราะห์แบคทีเรียอาศัยร่วมกับฟองน้ำชนิดนี้ซึ่งจะนำไปสู่การประเมินกลไกการป้องกันตัวเองต่อไป

6. เพื่อให้ได้ฟาร์มต้นแบบสำหรับการเลี้ยงฟองน้ำในทะเล ผลิตสารเคมีทางชีวภาพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ หน่วยงานที่นำการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ต้นแบบการเลี้ยงฟองน้ำทะเลสีน้ำเงินในทะเลและข้อมูลการผลิตสารต้านมะเร็ง renieramycin m ในรอบปี

2. ได้องค์ความรู้การเลี้ยงฟองน้ำทะเลสีน้ำเงินและสามารถประยุกต์วิธีการสู่การเลี้ยงฟองน้ำชนิดอื่น ๆ โดยมุ่งเน้นการผลิตสารเคมีชีวภาพทางการแพทย์จากทะเล

3. ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ผลการวิจัยในวารสารระดับชาติ นานาชาติ หรือที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.หน่วยงานวิจัยด้านเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สถานีทดลองประมงชายฝั่ง หน่วยงานอุทยานทางทะเล มหาวิทยาลัย หน่วยงานวิจัยต่างๆ

2. บริษัทยาและผู้ผลิตสารเคมี

3. เกษตรกรหรือผู้ประกอบการที่สนใจสามารถ พัฒนาตนเองนำความรู้ไปขยายผลได้

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การเตรียมตัวอย่างฟองน้ำ พื้นที่เลี้ยง และออกแบบวิธีการเลี้ยง

1.1 การเตรียมตัวอย่างท่อนพันธุ์

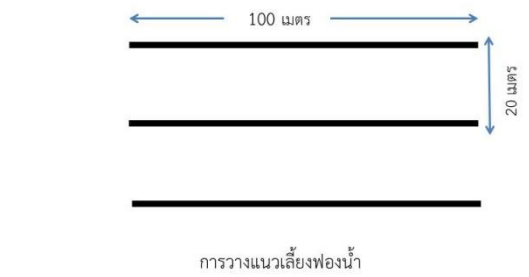
เลือกโคโลนีที่สมบูรณ์ (สังเกตจากสีและลักษณะโคโลนี) ตัดเก็บร้อยละ 10 ของโคโลนี ขั้นตอนนี้ตัวอย่างจะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกคิดเป็นร้อยละ 2 ของตัวอย่างที่เก็บได้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความหลากหลายของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อ สร้างลายพิมพ์ทางเคมี และวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม ส่วนที่สองจะถูกนำไปพักฟื้นในบ่อซิเมนต์ขนาด 8x10x5 ตารางเมตร (m^2) ซึ่งเป็นบ่อระบบไหลเวียนแบบเปิด เป็นเวลา 7-10 วัน มีการประเมินความสมบูรณ์และการมีอยู่ของสาร renieramycin m โดยเครื่อง LCMSMS ตรวจก่อนนำไปเลี้ยงในพื้นที่เป้าหมาย

1.2 การเตรียมพื้นที่

ใช้พื้นที่เกาะลิบง จังหวัดตรังเป็นพื้นที่เลี้ยง การเลือกระบบนิเวศเลี้ยงใช้วิธีดำน้ำลึก (SCUBA diving) สำรวจพื้นที่เลี้ยง เลือกระบบนิเวศหาดทรายระดับความลึก 3-5 เมตร โดยสำรวจในวันที่น้ำลงต่ำสุดหรือน้ำตาย

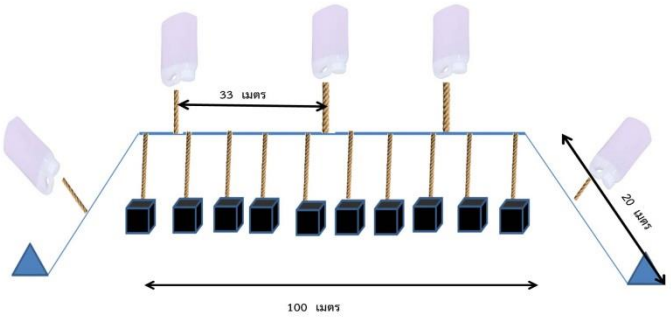
1.3 การออกแบบวิธีการเลี้ยง

เทคนิคการเลี้ยงดัดแปลงมาจาก วิธีการเลี้ยงในถุงตาข่าย (Duckworth, 2009) โดยสร้างกระชังเลี้ยงรูปลูกบาศก์ ขนาด 30 × 30 × 30 เซนติเมตร หุ้มด้วยแผ่นตาข่ายพลาสติก ผูกกระชังเลี้ยงกับเชือกแกนกลาง โดยผูกชุดเลี้ยงจำนวน 10 ชุด ต่อเชือกแกนกลาง 1 เส้น ระยะห่างระหว่างกระชังเท่ากับ 1 เมตร เชือกแกนกลางจะผูกติดกับตัวยึดที่พื้นทะเลหรือสมอทรายยาว 1 เมตร ใช้แกลลอนพลาสติกความจุ 5 ลิตร เป็นตัวผยุงให้ระบบเลี้ยงลอยอยู่กลางระดับน้ำที่ระดับความลึก 5 เมตร ทำการเลี้ยง 1 แปลง ซึ่งประกอบด้วย 3 ชุด (10 กระชังต่อชุด)

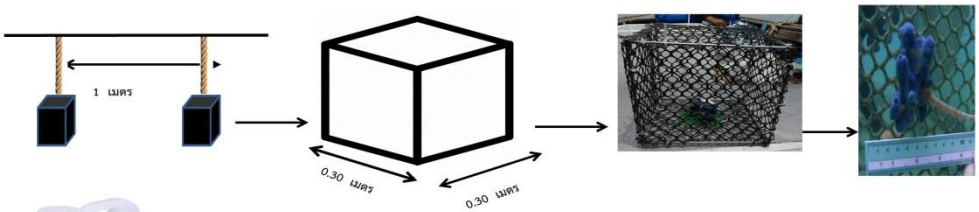


การวางแนวเลี้ยงในทะเล

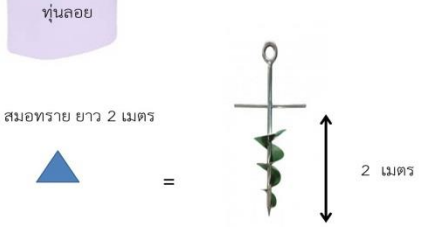
การวางแนวเลี้ยงฟองน้ำ



ลักษณะการเลี้ยงแบบแขวน



ลักษณะกระชังเลี้ยง



ภาพที่ 2 รูปแบบการเลี้ยงฟองน้ำ *Xestospongia* sp. สีน้ำเงินในทะเล

1.4 การเตรียมตัวอย่างท่อนพันธุ์ลำดับที่ 2

ใช้ตัวอย่างท่อนพันธุ์ที่เก็บรักษาและขยายพันธุ์โดยวิธีธรรมชาติ ในสถานเก็บรักษาสายพันธุ์บริเวณ เกาะลิบง จังหวัดตรัง ก่อนจะแยกท่อนพันธุ์ออกจากตัวแม่จะทำการวิเคราะห์สาร Renieramycins โดยวิธี LCMSMS จากนั้นตัดชิ้นส่วน (Explant) ออกจากตัวแม่ (mother colony) ให้มีขนาด 3x3 ซ.ม. นำท่อนพันธุ์นี้ไปยึดติดกับวัสดุเกาะ ด้วยเชือกพลาสติก โดยให้ตัวอย่างจมน้ำตลอดเวลา

ตอนที่ 2 การตรวจวิเคราะห์ข้อมูลการเลี้ยงฟองน้ำและการเก็บเกี่ยว

2.1 การวัดการเจริญเติบโต

ทำการสุ่มประเมินน้ำหนักเดือนละ1 ครั้งโดยวิธีชั่งน้ำหนักเปียกดัดแปลงจากวิธีของ Sipkema (2004) ตัวอย่างถูกสุ่มชั่งร้อยละ 80 ของจำนวนที่เลี้ยงโดยใช้เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง โดยหักลบน้ำหนักที่ชั่งได้กับตะแกรงมาตรฐานจะได้ข้อมูลน้ำหนักฟองน้ำที่แท้จริง สิ้นสุดการทดลองจะทำการหาการเจริญเติบโตเฉลี่ยเปรียบเทียบในแต่ละเดือนโดยใช้สถิติการเปรียบเทียบแบบรายคู่ (Post Hoc) รายงานผลโดยใช้ตารางและแผนภูมิ

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร renieramycins

ตัดตัวอย่างให้มีน้ำหนัก 1.5 มิลลิกรัม นำไปบดให้ละเอียดจากนั้นนำไปแช่ใน 10 มิลลิโมล (mM) Potassium cyanide ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมากรองเอากากนำไปสกัด แช่ในเมทานอลปริมาณ 24 มิลลิลิตร (ml) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงแยกกากที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวมาสกัดแบบแยกส่วนด้วยเอทิลอะซิเตต เมื่อระเหยแห้งสารละลายเอ ทิลอะซิเตตจะได้ของสกัด renieramycins มีสีชาเข้มลักษณะแข็ง ซึ่งจะถูกนำมาละลายด้วยเมทานอลที่ผสมด้วย 300 ng acenaphthene และกรองด้วยกระดาษกรอง 0.5 ไมครอน นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร renieramycins โดย HPLC และ LCMS/MS ตามลำดับ ใช้สภาวะเครื่องดังนี้

Colum	Dionex C18- Reverse Phase
UV wavelength	270 nm.
Mobile Phase	Methanol: water 7:3
Flow rate	0.7 ml/min

2.3 การตรวจวัดและติดตามปัจจัยสภาวะแวดล้อม

ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ความเค็ม อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง Multiprobe analyser YSI 556 (New York, USA) ส่วนความเค็มวัดโดย reflecto salinometer ส่วนปัจจัยทางเคมีได้แก่ การวิเคราะห์แอมโมเนีย ไนไตรท์ ฟอสฟอรัส ปริมาณซิลิกาละลายน้ำ วิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานที่เสนอไว้คู่มือการวิเคราะห์น้ำทะเล (method of sea water analysis) โดย Stricland and Parson (1972)

2.4 การเก็บเกี่ยว

ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 10 เดือนโดยใช้วิธีตัดเก็บด้วยของมีคมร้อยละ 80 ของโคโลนีเพื่อรักษาสายพันธุ์เดิมไว้ จากนั้นเก็บใส่ในลังน้ำแข็งระหว่างขนส่งไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล สาขา วิทยาศาสตร์ทางทะเล มทร.ศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานสายพันธุ์ อันดามัน 1

3.1 การวิเคราะห์เนื้อเยื่อฟองน้ำ

เนื่องจากฟองน้ำสังเคราะห์สารเก็บสะสมไว้ในเนื้อเยื้อ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื้อวิทยาของฟองน้ำ จะเป็นข้อมูลสำคัญประการหนึ่งในการทำความเข้าใจสรีรวิทยากับการสังเคราะห์สารของฟองน้ำชนิดนี้ ดังนั้นการเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์สภาพเนื้อเยื้อทำ 2 ครั้ง คือก่อนและสิ้นสุดการเลี้ยง รายละเอียดดังนี้

ตัวอย่างฟองน้ำเป็นชิ้นขนาดไม่เกิน 0.5x0.5 ซ.ม. จากบริเวณใจกลางและบริเวณผิว จากนั้นล้างด้วยน้ำทะเลฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ก่อนนำมาแช่ใน 10 % formalin และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำชิ้นตัวอย่างฟองน้ำมาผ่านกระบวนการทาวมิญชวิทยาและตัดแผ่นบางด้วยด้วยเครื่อง microtome แบบหมุน และนำมาย้อมสี Hematoxylin Eosin เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์ภายใต้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและบันทึกภาพด้วยกล้อง Olympus รุ่น BX53 F2

3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียอาศัยร่วมกับฟองน้ำ

การวิเคราะห์ความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียร่วมอาศัยกับฟองน้ำ เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญต่อการเข้าในระบบการป้องกันตัวเองของฟองน้ำซึ่งจะนำไปสู่การสังเคราะห์สาร Renieramycins การวิเคราะห์ความหลายหลายของแบคทีเรียดังกล่าวสามารถทำได้โดยวิธี 16s rDNA และตำแหน่งของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อใช้วิธี Fluorescent in situ hybridization (FISH) (Thoms *et al*., 2006) ดังนี้

3.3 การวิเคราะห์ไซยาโนแบคทีเรีย *Candidatus* Endohaliclona renieramycinifaciens[2] มีวิธีการดังนี้

3.3.1. เตรียมตัวอย่างและสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากฟองน้ำ

ล้างฟองน้ำด้วยน้ำปลอดเชื้อปลอดประจุ 2 ครั้ง สุ่มเก็บฟองน้ำ 3 ตัวอย่างจากแต่ละโคโลนี โดยหลังตัดแต่งส่วนผิวด้านนอกและผ่ากลางช่องทางน้ำออก (osculum) นำไปบดกับไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดและบรรจุในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากตัวอย่าง (น้ำหนัก 1.5-2.0 กรัม) โดยใช้ MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification Kit (Lucigen, Middletown, WI) โดยเติม Tissue and Cell Lysis Solution/Proteinase K ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที (ผสมตัวอย่างให้เข้ากันทุก ๆ 5 นาที) เมื่อตัวอย่างเย็นลง ดูดสารละลายส่วนใสจากตัวอย่าง ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ (400-600 ไมโครลิตร) เติมเอนไซม์ RNase A ปริมาณ 5 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นบ่มตัวอย่างในน้ำแข็ง 5 นาที เติม MPC Protein Precipitation Solution (200-300 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 17000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดไมโครฟิวจ์ใหม่และเติม isopropanol (cold) ในปริมาตรที่เท่ากัน คว่ำหงายหลอดตัวอย่างจนเข้ากัน

[2] แบคทีเรียอาศัยร่วมทำหน้าที่ผลิตสารกลุ่ม renieramycins

ดี นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 17000 x g 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol (1 มิลลิลิตร) 2 ครั้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำปลอดเชื้อปลอดประจุปริมาตร 30-60 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.3.2. ทำบริสุทธิ์ตัวอย่างจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 300 ไมโครลิตร เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 17000 x g นาน 10 นาที ดูดสารสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอดหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติม 3 M sodium acetate 25 ไมโครลิตรปริมาตร 1 ใน 10 ของสารละลาย ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติมเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย ผสมเข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 17000 x g นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol 1 มิลลิลิตร และละลายตะกอนด้วยน้ำปลอดเชื้อปลอดประจุ ปริมาตร 73 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.3.3. ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน 16S ribosomal RNA (16S rRNA)

ยืนยันการมีอยู่ของแบคทีเรียในตัวอย่างฟองน้ำด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน 16S rRNA โดยใช้ตัวอย่างจีโนมิกส์ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ 25 นาโนกรัมเป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน 16S rRNA ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ (27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG; 1492R: CGGTTACCTTGTTACGACTT) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

ตารางที่ 1 PCR products ของการวิเคราะห์ 16S ribosomal RNA (16S rRNA) แบคทีเรียอาศัยร่วมในฟองน้ำ *Xestospongia* sp.

รายการที่	PCR products	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1	Nuclease-free water	13.8
2	10X *Taq* DNA buffer	2
3	10 µM 27F primer	0.2
4	10 µM 1492R primer	0.2
5	50 mM $MgCl_2$	1
6	10 mM dNTPs	0.2
7	*Taq* DNA polymerase (5 U/µl)	0.1
8	purified genomic DNA (10 ng/µl)	2.5

จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังตารางที่ 1 เมื่อสิ้นสุดนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 2 สภาวะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (° ซ)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	
Annealing	57	30 วินาที	35
Extension	72	2 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1
Hold	12	∞	-

3.3.4. ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน *renieramycins C* (*RenC*) และ *renieramycins J* (*RenJ*) ของแบคทีเรีย *Candidatus* Endohaliclona renieramycinifaciens

เพื่อยืนยันการคงอยู่ของแบคทีเรีย *Candidatus* Endohaliclona renieramycinifaciens ในฟองน้ำ นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากจากฟองน้ำโคโลนีที่ 1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และให้ผลบวกในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน 16S rRNA มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน *renC* และ *renJ* ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดนี้ โดยอาศัยไพร์เมอร์ที่จำเพาะ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีส่วนประกอบดังนี้

ตารางที่ 3 PCR products ของการวิเคราะห์ *renC* และ *renJ* ของแบคทีเรีย *Candidatus Endohaliclona* renieramycinifaciens

รายการที่	PCR products	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1	Nuclease-free water	11.75
2	5X Phusion HF buffer	5
3	2.5 µM F primer	2.5
4	.5 µM R primer	2.5
5	10 mM dNTPs	0.5
6	Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µL)	0.25
7	purified genomic DNA (10 ng/µl)	2.5

ต่อมานำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังตารางที่ 2 จากนั้นตรวจสอบขนาดของยีนด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากผลิตภัณฑ์ที่ได้

ตารางที่ 4 สภาวะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *renC* และ *renJ* ของแบคทีเรีย *Candidatus* Endohaliclona renieramycinifaciens

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (° ซ)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	98	2 นาที	1
Denaturation	98	10 วินาที	
Annealing	59	30 วินาที	35
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	1
Hold	25	∞	-

สกัดชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR (*renC* และ *renJ*) ออกจากเจลอะกาโรส ตามวิธีการที่ระบุใน Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA) หลังจากเชื่อมชิ้นส่วนยีน renC หรือ renJ กับพลาสมิดแล้ว เคลื่อนย้ายริคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α (จีโนไทป์: F- ϕ 80lac ZDΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk-) phoA supE44 λ- thi1 gyrA69 relA1) ด้วยวิธี Heat shock จากนั้นเกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำโคโลนีของรีคอมบิแนนท์โคลน (มีพลาสมิด pJET1.2/blunt_renC หรือ pJET1.2/blunt_renJ) ที่เจริญบนอาหารแข็ง มาตรวจสอบเบื้องต้นว่ามีพลาสมิดที่สนใจด้วยวิธี rapid size screening เปรียบเทียบกับแบคทีเรียควบคุมที่มีพลาสมิด pJET 1.2/blunt (empty plasmid) โดยทำการเขี่ยแต่ละโคโลนีเดี่ยวใน lysis buffer (100 mM NaOH, 60 mM KCl, 5 mM EDTA, 10% (w/v) D-sucrose, 0.25% (w/v) SDS และ 0.05% (w/v) Bromophenol blue ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และบ่มต่อในน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที และดูดเฉพาะส่วนน้ำ 20 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียที่พลาสมิดมียีน *renC* หรือ *renJ* มาอย่างละ 3 โคลน (ภาพที่ 8) มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *renC* หรือ *renJ* ตามวิธีการที่ระบุใน Monarch® Plasmid Miniprep Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA) โดยละลายตะกอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 35 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบขนาดที่แท้จริงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

ตารางที่ 5 ส่วนผสมของการวิเคราะห์ Plasmid Miniprep Kit

รายการที่	PCR products	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1	Nuclease-free water	11
2	10X R buffer	1.5
3	*Xho*I (10 U/µL)	0.5
4	พลาสมิด	2

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสควบคู่กับพลาสมิดที่สกัดได้ ขั้นตอนสุดท้ายส่งตัวอย่างพลาสมิดไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen, Korea) นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit blast เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) วิเคราะห์และแสดงผลด้วยโปรแกรม Gene Doc

3.4 การวิเคราะห์แบคทีเรียร่วมอาศัยกับฟองน้ำ *Xestospongia* sp.

3.4.1 การสกัด DNA จากแบคทีเรียอาศัยร่วม

เก็บตัวอย่างในหลอด centrifuge ปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บรักษาในกล่องน้ำแข็งตลอดการขนส่ง ซึ่งใช้ระยะเวลาการขนส่งไม่เกิน 6 ชั่วโมง และดำเนินการคงสภาพหรือแยกเชื้อแบคทีเรียทันทีเมื่อตัวอย่างถูกส่งถึงห้องปฏิบัติการ สกัด DNA จากตัวอย่างตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Simister และคณะ (2011) ทำการล้างตัวอย่างฟองน้ำในน้ำทะเลปลอดเชื้อ 10 ครั้ง บดตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นทำการสกัด DNA ด้วย DNAzol (Invitrogen, US) ตามวิธีการมาตรฐานของบริษัทผู้ผลิต ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ DNA ด้วยวิธีการ spectrophotometry โดยเครื่อง NANO-DROP fluorospectrometer (Thermo scientific) การตรวจสอบปริมาณ DNA เป้าหมายแต่ละกลุ่มแบคทีเรียด้วยวิธีการ qPCR โดยใช้ Taqman probes ที่จำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียแต่ละกลุ่มที่สนใจเปรียบเทียบกับปริมาณ Eubacteria ที่พบในตัวอย่าง (Cristiane *et al*., 2014) เมื่อได้ชิ้นส่วน DNA แล้วจะเก็บไว้ที่อุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของแบคทีเรียร่วมอาศัยกับฟองน้ำ

วิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ได้จากตัวอย่างแบคทีเรีย เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับฐานข้อมูลสาธารณะ (GenBank) ของโดเมน Eubacteria โดยใช้ Archaea เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบภายนอกกลุ่ม Eubacteria ทำการ alignment ข้อมูลลำดับเบสของ 16S rDNA ด้วยโปรแกรม Clustal X กับข้อมูล 16S rDNA ของ Eubacteria ที่คัดเลือกจากนั้นวิเคราะห์ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PhyML และ MAGA 5 สำหรับระบบปฏิบัติการ Window XP โดยวิธี maximum parsimony (MP) และ maximum likelihood (ML) และในการทำ bootstrapping มีการเปลี่ยนแปลงชุดข้อมูล (replicates) 500 ชุด สำหรับการวิเคราะห์ MP และ 1000 ชุดสำหรับการวิเคราะห์ ML (Fehmida *et al*., 2021)

3.4.3 การหาลำดับเบส

แถบ DNA จากเจลอิเลคโตรโฟรีซิสจะถูกตัดออกมาทำความสะอาดและชะด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragments Extration Kit (RBC science, Taiwan) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA sequencer (ABI, Prism377) และวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อตรวจหาชนิดของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสาธารณะ (GeneBank) โดยวิธี Basic local alignment search tool (Blast) (Fehmida *et al*., 2021)

3.5 การวิเคราะห์และสร้างข้อมูลเอกลักษณ์สายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ยีน 28S rDNA

โดยทำตามวิธีของ Lopp และ คณะ (2007) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

3.5.1 การสกัด genomic DNA:

บดละเอียดฟองน้ำ 0.1 กรัม ในไนโตรเจนเหลว เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วปริมาตร 300 ไมโครลิตร (µl) ตามด้วยบัฟเฟอร์ 500 µl ซึ่งประกอบด้วย cetylmethylammonium bromide 20g/l, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.1M Tris-HCL pH 8 จากนั้นเติม protease K solution เข้มข้น 20 mg/ml ปริมาตร 20 µl นำส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จากนั้น genomic DNA ทั้งหมดจะถูกสกัดด้วยส่วนผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับบัฟเฟอร์ CTAB (g/l CTAB กับ 1.2 M NaCl) นำส่วนสกัด DNA ไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีก่อนปั่นเหวี่ยงเอาเฉพาะตะกอนนำมาล้างด้วย 1.2 M NaCl ปริมาตร 350 µl จากนั้น DNA จะถูกตกตะกอนอีกครั้งด้วย isopropanol ล้างตะกอน DNA ด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 500 µl และละลายด้วย 100 µl น้ำฆ่าเชื้อ วิเคราะห์ด้วย เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 nm

3.5.2 การเพิ่มปริมาณ DNA โดย PCR

การ amplify D3 domain ของ 28S rDNA ของฟองน้ำใช้ไพรเมอร์ 5′-GAC CCG TCT TGA AAC ACG GA และ5′-TCG GAG GGA ACC AGC TAC TA (Lopp *et al*., 2007) โดยทำใน vial ขนาด 50 µl ที่ประกอบด้วย 50 ng genomic DNA buffer A (20 mM Tris-HCL, pH 9 ที่ 25 องศาเซลเซียส , 50 mM KCl, 0.1 mg/l gelatin); 200 µM ของ dATP d GTP dCTP และ dTTP; ไพรเมอร์ 0.4 µM และเอนไซม์ Taq polymerase 1.25 หน่วย โปรแกรม PCR ที่ใช้ตามลำดับดังนี้ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที, 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาทีจำนวน 35 รอบ, annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จากนั้นตรวจสอบ PCR product โดย 1.5% อิเลคโตรโฟรีซิส และทำให้บริสุทธิ์โดยชุดสำเร็จรูปด้วย JetQuick kit (Genomed, Germany) การหาลำดับเบสส่งไปวิเคราะห์ที่ 1st Base laboratory ประเทศสิงคโปร์ ลำดับเบสที่ได้จะถูกถูกวิเคราะห์โดย Buoedit sequence alignmen Editor 7.2.3 และ Basic local alignment search tool (Blast).

บทที่ 3
ผลการทดลอง

3.1 ผลการเลี้ยงฟองน้ำ

เนื่องจากการทดลองในระยะแรกเป็นช่วงหน้ามรสุม ส่งผลให้กระชังเลี้ยงทั้งหมดเสียหายจากพายุและกระแสคลื่นลมในช่วงปีแรกของการเลี้ยง ดังนั้นคณะวิจัยจึงดำเนินการเลี้ยงใหม่ในเดือนธันวาคม 2564 จากกการทดลองในระยะเวลา 280 วัน พบการเจริญเติบโตของฟองน้ำเพิ่มขึ้นดังตารางที่ 6 และภาพที่ 3 ตามลำดับ

3.2 ปริมาณสารต้านมะเร็ง (RM) ตารางที่ 7 ภาพที่ 4

ปริมาณสารต้านมะเร็ง renieramycins m ของฟองน้ำทะเลสีน้ำเงินที่เลี้ยงในระยะเวลา 280 วัน ซึ่งพบว่า ยิ่งระยะเวลาการเลี้ยงมากขึ้นจะส่งผลต่อความสมบูรณ์ของตัวฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน ที่มีประสิทธิภาพต่อการสร้างสาร RM ได้มากขึ้น แต่ทั้งนี้การสร้างสารดงกล่าวจะมีระยะคงที่เมื่อฟองน้ำหยุดการเจริญเติบโต

3.3 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำบริเวณเลี้ยง

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำตามตารางที่ 8 ซึ่งพบว่าโดยรวมแล้วคุณภาพน้ำในช่วงระยะเวลาการเลี้ยงตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 280 ไม่มีความแตกต่างกัน ยกแว้น Transparency (NTUX) และ Total Organic Carbon (TOC) เนื่องด้วยในระยะของวันที่ 120 หรือเข้าช่วงเดือนที่ 4 ของการเลี้ยง ซึ่งเป็นช่วงฤดูมรสุมมีฝนตกหนักและคลื่นรมที่แรงส่งผลให้มีการพัดพาตะกอนชายฝั่งลงมาสะสมดังกล่าว

ตารางที่ 6 การเจริญเติบโตของฟองน้ำตามระยะเวลาการเลี้ยง

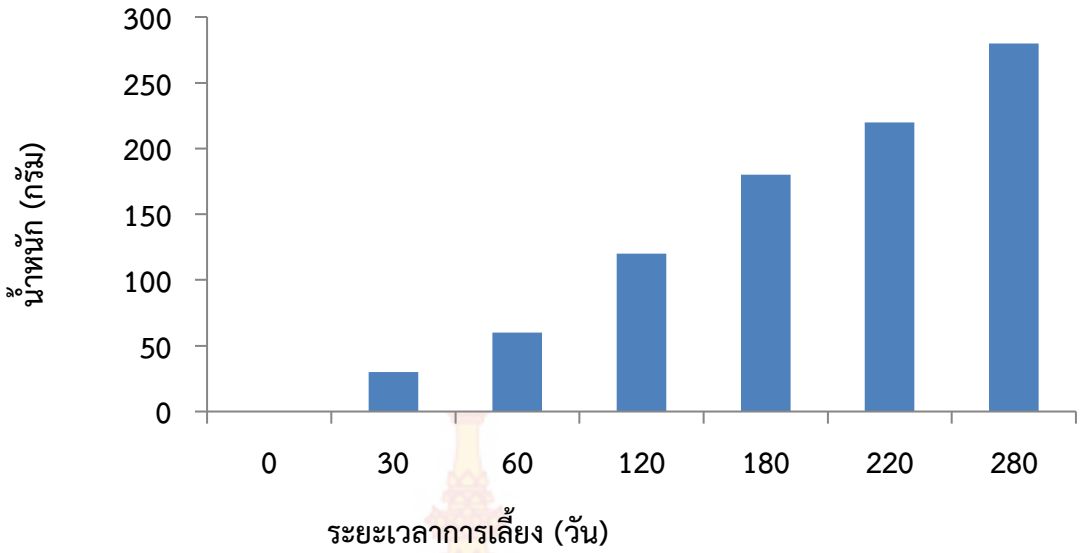
น้ำหนักฟองน้ำ (กรัม)	ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)						
	0	30	60	120	180	220	280
แถวที่ 1	28.10±0.000	42.00±3.466	70.40±14.153	136.80±10.803	218.60±86.112	351.60±10.471	271.40±55.125
แถวที่ 2	25.60±0.000	52.33±9.292	62.60±19.552	116.40±20.367	144.20±64.076	202.40±79.519	266.60±10.266
แถวที่ 3	28.30±0.000	62.67±12.702	70.20±17.108	91.00±22.661	199.40±27.754	245.00±12.316	263.40±14.326

ตารางที่ 7 ปริมาณสารต้านมะเร็ง (RM)

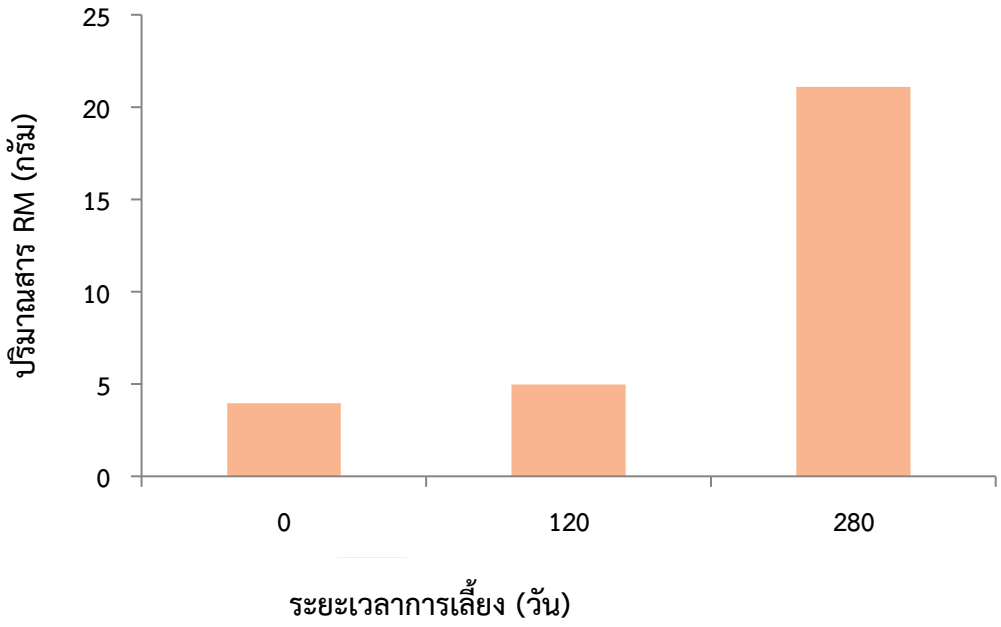
น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)		
	0	120	280
	3.95±0.42	4.98±0.31	21.10±0.21

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทะเลบริเวณเลี้ยงฟองน้ำ

ปัจจัยสถาวะแวดล้อม	ระยะเวลการเลี้ยง (วัน)						
	0	30	60	120	180	220	280
Temperature (C°)	31.00±0.432	29.89±0.384	30.68±0.159	29.61±0.110	31.47±054	31.54±025	31.42±025
pH	7.77±0.047	7.71±0.031	7.62±0.080	7.98±0.104	8.30±0.050	8.75±0.060	8.39±0.060
Transparency (NTUX)	1.69±0.101	1.20±0.025	1.03±0.058	1.20±0.010	12.20±0.100	10.89±0.352	11.79±0.352
Dissolved Oxygen (mg/L)	7.43±0.115	6.43±0.145	6.21±0.015	6.29±0.010	8.09±0.081	6.10±0.010	6.97±0.010
Salinity (ppt)	30.17±0.061	31.07±0.155	31.20±0.200	31.27±0.306	30.30±0.100	31.00±0.050	31.25±0.050
Ammonia (mg/L)	0.01±0.000	0.01±0.000	0.01±0.000	0.01±0.000	0.02±0.000	0.02±0.000	0.02±0.000
Nitrite (mg/L)	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000
Phosphate (mg/L)	0.16±0.001	0.16±0.001	0.17±0.001	0.17±0.001	0.18±0.001	0.18±0.001	0.18±0.001
Silica (mg/L)	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000
Total Organic Carbon (TOC)	2.91±0.02	2.37±0.03	2.23±0.03	3.44±0.05	3.70±0.03	5.23±0.06	5.23±0.06



ภาพที่ 3 น้ำหนักฟองน้ำ (กรัม) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

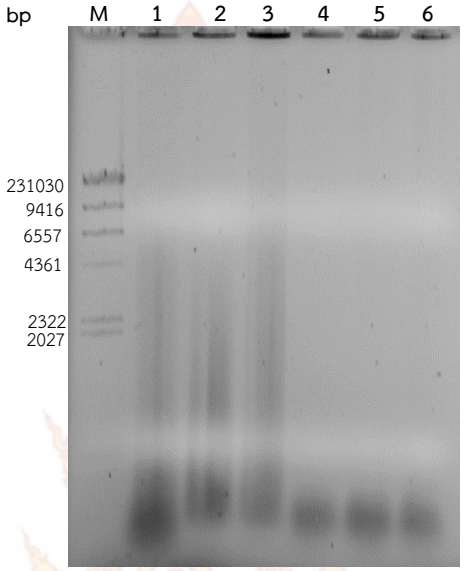


ภาพที่ 4 ปริมาณสาร RM ที่ต่างกันในระยะเวลาการเลี้ยง 280 วัน

3.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียอาศัยร่วมกับฟองน้ำ

(1. ผลการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากฟองน้ำ

เมื่อดีเอ็นเอของฟองน้ำถูกสกัดและจะนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังภาพที่

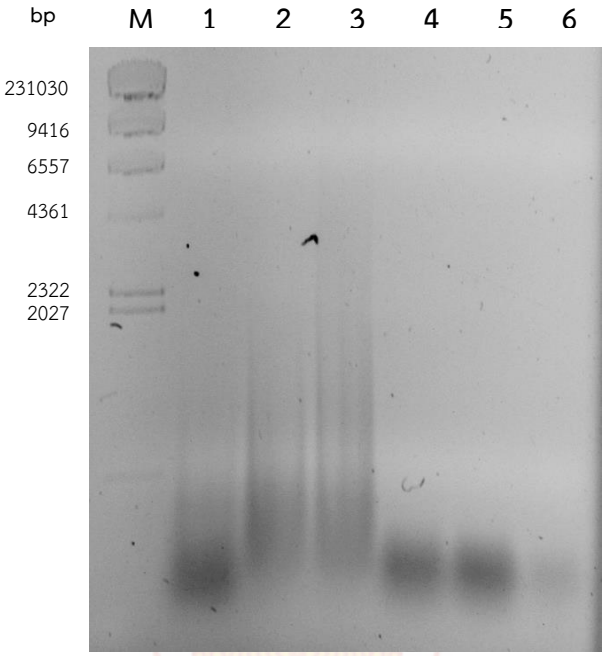


ภาพที่ 5 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp.

หมายเหตุ: เลน M: Lambda DNA/HindIII Marker (Thermo Scientific, Waltham, MA) 200 นาโนกรัม, เลน 1-3 : ตัวอย่างที่ 1 2 และ 3 จากฟองน้ำโคโลนีที่ 1ม เลน 4-6 : ตัวอย่างที่ 1 2 และ 3 จากฟองน้ำโคโลนีที่ 2

(2. ทำบริสุทธิ์ตัวอย่างจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.3.1 มาปรับปริมาตรให้ได้ 300 ไมโครลิตร ล้างทำความสะอาดด้วยคลอโรฟอร์มและเอทานอลร้อยละ 75 จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 6 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากฟองน้ำที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

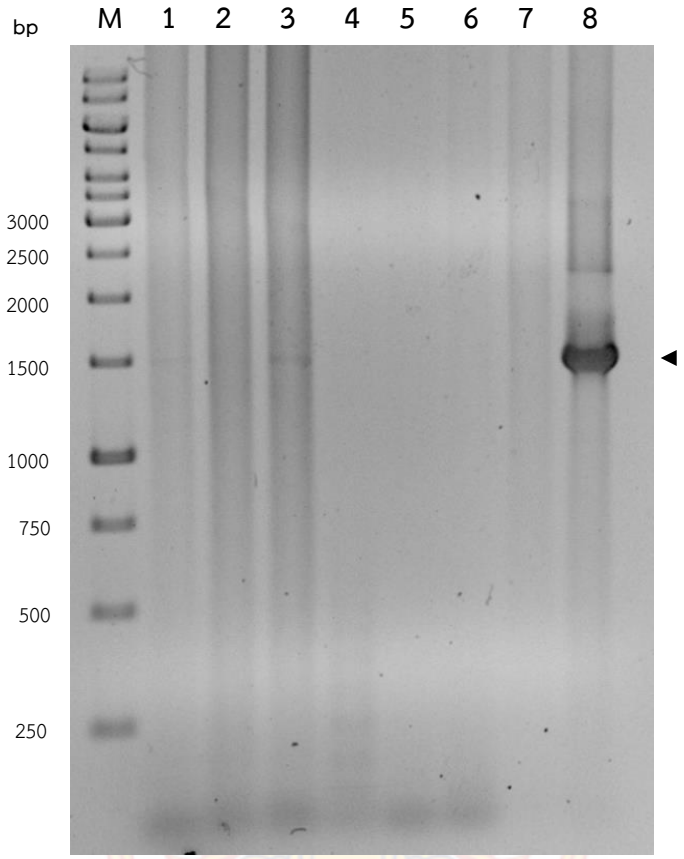
<u>หมายเหตุ</u>: เลน M: Lambda DNA/HindIII Marker (Thermo Scientific, Waltham, MA) 200 นาโนกรัม , เลน 1-3 : ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 จากฟองน้ำโคโลนีที่ 1, เลน 4-6 : ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 จากฟองน้ำโคโลนีที่ 2

(3. ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน 16S ribosomal RNA (16S rRNA)

ยืนยันการมีอยู่ของแบคทีเรียในตัวอย่างฟองน้ำด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน 16S rRNA โดยใช้ตัวอย่างจีโนมิกส์ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ 25 นาโนกรัม เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ-เมอเรสต่อยีน 16S rRNA ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ 9 ตามที่ระบุไว้ในวิธีการทดลองจากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ผลดังตารางที่ 1b เมื่อสิ้นสุดนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (รูปที่ 6)

ตารางที่ 9 แสดงสภาวะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA

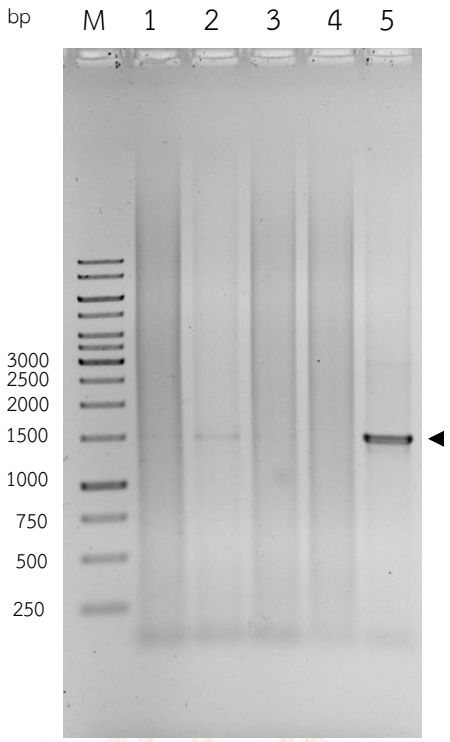
ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (° ซ)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	
Annealing	57	30 วินาที	35
Extension	72	2 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1
Hold	12	∞	-



ภาพที่ 7 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อยีน 16S rRNA จากตัวอย่างฟองน้ำทะเล *Xestospongia* sp.

หมายเหตุ: เลน M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA) 200 นาโนกรัม, เลน 1-3 : ผลิตภัณฑ์ PCR ต่อยีน 16S rRNA ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 จากฟองน้ำโคโลนีที่ 1, เลน 4-6 : ผลิตภัณฑ์ PCR ต่อยีน 16S rRNA ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 จากฟองน้ำโคโลนีที่ 2, เลน 7:ผลิตภัณฑ์ PCR ตัวควบคุมลบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน 16S rRNA, เลน 8:ผลิตภัณฑ์ PCR ตัวควบคุมบวกในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน 16S rRNA

จากผลการศึกษา (ภาพที่ 6) พบชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียจากฟองน้ำโคโลนีที่ 1 ทั้ง 3 ตัวอย่าง แต่ไม่พบจากฟองน้ำโคโลนีที่ 2 เพื่อตรวจสอบว่าปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอบริสุทธิ์มีผลต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือไม่ จึงใช้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากฟองน้ำโคโลนีที่ 1 (เฉพาะตัวอย่างที่ 3) 10 25 และ 100 นาโนกรัม เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสอีกครั้ง จากผลการศึกษาพบปริมาณผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสสามารถตรวจสอบได้ชัดเจนที่สุดเมื่อใช้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ปริมาณ 25 นาโนกรัม (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 8 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อยีน 16S rRNA จากฟองน้ำตัวอย่างที่ 3 โคโลนีที่ 1 ที่มีการแปรผันของปริมาณจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

<u>หมายเหตุ</u>: เลน M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA) 200 นาโนกรัม เลน 1-3 : ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอ 10, 25 และ 100 นาโนกรัม ตามลำดับ, เลน 4: ผลิตภัณฑ์ PCR ตัวควบคุมลบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน 16S rRNA, เลน 5: ผลิตภัณฑ์ PCR ตัวควบคุมบวกในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน 16S rRNA

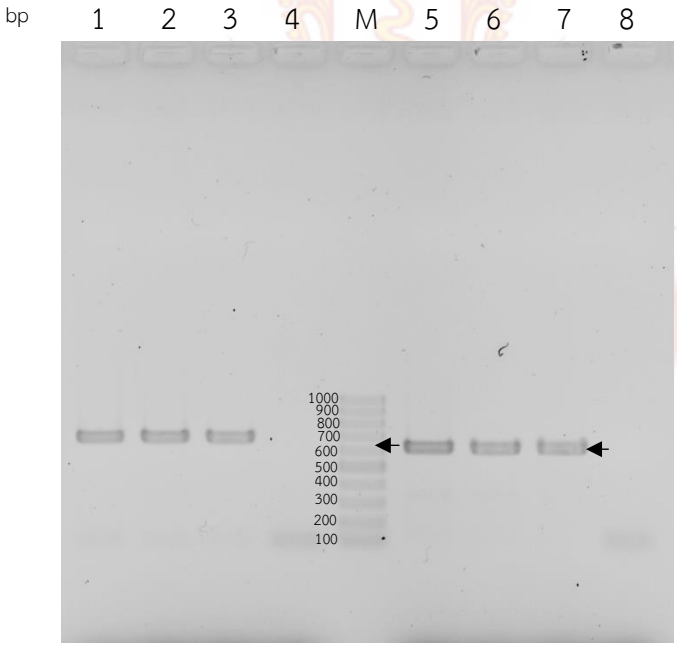
(4. ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน *renC* และ *renJ* ของแบคทีเรีย *Candidatus Endohaliclona renieramycinifaciens*

เพื่อยืนยันการคงอยู่ของแบคทีเรีย *Candidatus Endohaliclona renieramycinifaciens* ในฟองน้ำ นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากจากฟองน้ำโคโลนีที่ 1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และให้ผลบวกในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน 16S rRNA มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน *renC* และ *renJ* จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังตารางที่ 9

ตารางที่ 10 สภาวะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *renC* และ *renJ* ของแบคทีเรีย *Candidatus Endohaliclona renieramycinifaciens*

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (° ซ)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	98	2 นาที	1
Denaturation	98	10 วินาที	
Annealing	59	30 วินาที	35
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	1
Hold	25	∞	-

จากนั้นตรวจสอบขนาดของยีนด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากผลิตภัณฑ์ที่ได้ ซึ่งผลการศึกษาพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 600 ถึง 700 คู่เบส (ภาพที่ 8) ใกล้เคียงกับขนาดของยีนเป้าหมายทั้ง 2 (*renC* และ *renJ*) ของแบคทีเรีย*Candidatus* Endohaliclona renieramy cinifaciens



ภาพที่ 9 แสดง 0.8% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อยีน *renC* และ *renJ*

หมายเหตุ:

เลน M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA) 200 นาโนกรัม

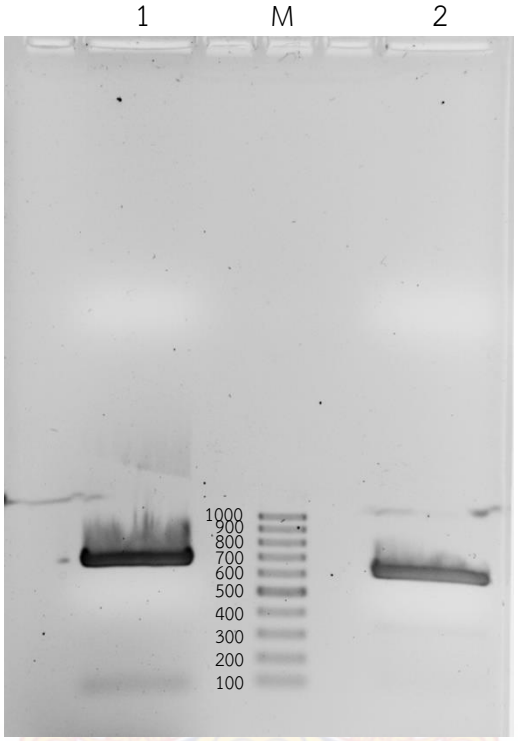
เลน 1-3: ผลิตภัณฑ์ PCR ต่อยีน *renC* ตัวอย่างที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ จากฟองน้ำโคโลนีที่ 1

เลน 4: ผลิตภัณฑ์ PCR ตัวควบคุมลบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน *renC*

เลน 5-7: ผลิตภัณฑ์ PCR ต่อยีน *renJ* ตัวอย่างที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ จากฟองน้ำโคโลนีที่ 1

เลน 8: ผลิตภัณฑ์ PCR ตัวควบคุมลบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อยีน *renJ*

สกัดชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR (*renC* และ *renJ*) ออกจากเจลอะกาโรส (ภาพที่ 9) ตามวิธีการที่ระบุใน Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA)



ภาพที่ 10 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR รวม ต่อยีน *renC* และ *renJ*

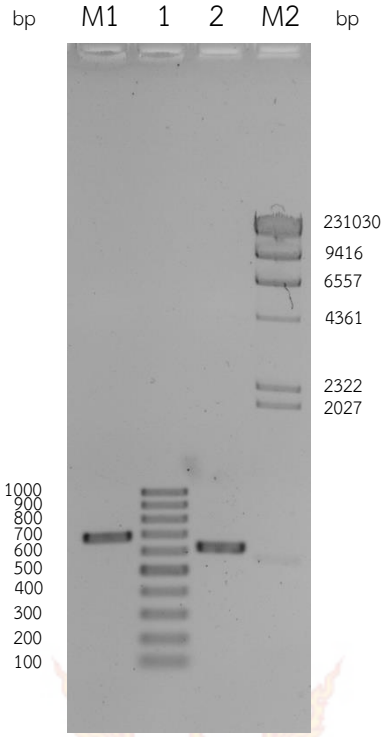
หมายเหตุ:

เลน M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA) 200 นาโนกรัม

เลน 1: ผลิตภัณฑ์ PCR ต่อยีน *renC* ตัวอย่างที่ 1 และ 2 จากฟองน้ำโคโลนีที่ 1 (40 ไมโครลิตร)

เลน 2: ผลิตภัณฑ์ PCR ต่อยีน *renJ* ตัวอย่างที่ 1 และ 2 จากฟองน้ำโคโลนีที่ 1 (40 ไมโครลิตร

ประเมินความเข้มข้นและใช้ชิ้นส่วนยีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ภาพที่ 10) ที่เหมาะสมโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pJET 1.2/blunt ตามวิธีการที่ระบุใน CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA)



ภาพที่ 11 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นส่วนยีน *renC* และ *renJ* ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

หมายเหตุ:

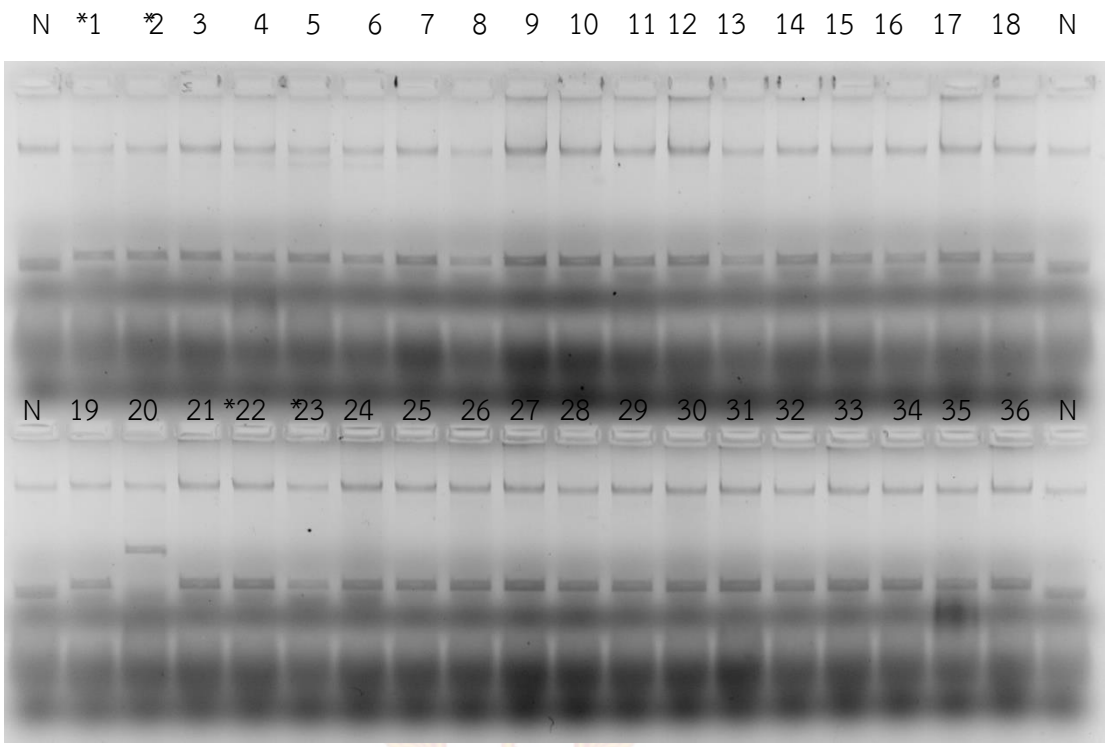
เลน M1: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA) 200 นาโนกรัม

เลน M2: Lambda DNA/HindIII Marker (Thermo Scientific, Waltham, MA) 200 นาโนกรัม

เลน 1: ชิ้นส่วนยีน *renC* ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

เลน 2: ชิ้นส่วนยีน *renJ* ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

หลังจากเชื่อมชิ้นส่วนยีน *renC* หรือ *renJ* กับพลาสมิดแล้ว เคลื่อนย้ายริคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α (จีโนไทป์: F$^-$ φ80*lac* ZDΔM15 Δ(*lac*ZYA$^-$*arg*F) U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (r_k^-, m_k^-) *pho*A *sup*E44 λ^- *thi*1 *gyr*A69 *rel*A1) ด้วยวิธี Heat shock จากนั้นเกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำโคโลนีของรีคอมบิแนนท์โคลน (มีพลาสมิด pJET1.2/blunt_*renC* หรือ pJET1.2/blunt_*renJ*) ที่เจริญบนอาหารแข็ง มาตรวจสอบเบื้องต้นว่ามีพลาสมิดที่สนใจด้วยวิธี rapid size screening เปรียบเทียบกับแบคทีเรียควบคุมที่มีพลาสมิด pJET 1.2/blunt (empty plasmid) โดยทำการเขี่ยแต่ละโคโลนีเดี่ยวใน lysis buffer (100 mM NaOH, 60 mM KCl, 5 mM EDTA, 10% (w/v) D-sucrose, 0.25% (w/v) SDS และ 0.05% (w/v) Bromophenol blue ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และบ่มต่อในน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที และดูดเฉพาะส่วนน้ำ 20 ไมโครลิตรไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 12 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียที่ทดสอบด้วยวิธี rapid size screening

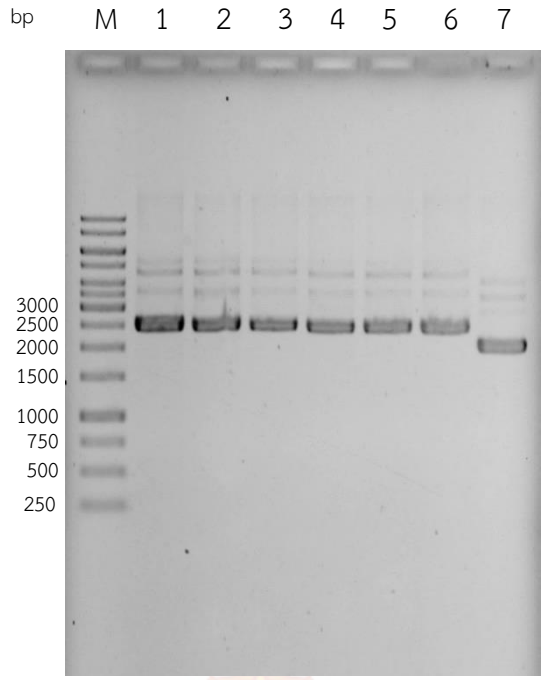
<u>หมายเหตุ</u>:

เลน N: รีคอมบิแนนท์แบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJET1.2/blunt (แบคทีเรียควบคุม)

เลน 1-18: รีคอมบิแนนท์แบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJET1.2/blunt_*renC* โคลนที่ 1 ถึง 18

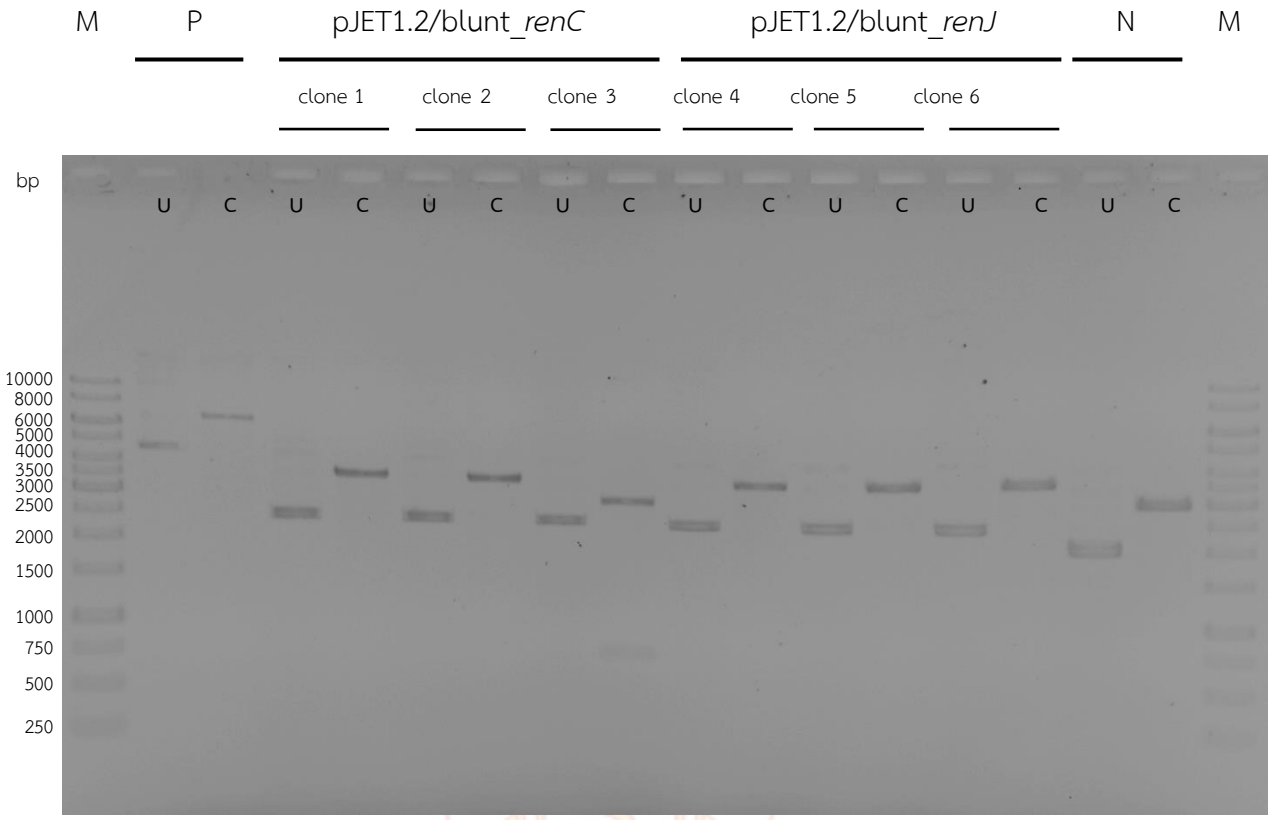
เลน 19-36: รีคอมบิแนนท์แบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJET1.2/blunt_*renJ* โคลนที่ 1 ถึง 18

คัดเลือกรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียที่พลาสมิดมียีน *renC* หรือ *renJ* มาอย่างละ 3 โคลน (ภาพที่ 11 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *renC* หรือ *renJ* ตามวิธีการที่ระบุใน Monarch® Plasmid Miniprep Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA) โดยละลายตะกอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 35 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 13 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ของพลาสมิดที่สกัดได้จากรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย (1)
เลน M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA) 200 นาโนกรัม
เลน 1-3: รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJET1.2/blunt_*renC* โคลนที่ 1 ถึง 3
เลน 4-6: รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJET1.2/blunt_*renJ* โคลนที่ 4 ถึง 6
เลน 7: พลาสมิด pJET1.2/blunt (พลาสมิดควบคุม)

จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบขนาดที่แท้จริงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสควบคู่กับพลาสมิดที่สกัดได้



ภาพที่ 14 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ของพลาสมิดที่สกัดได้จากรีคอมบิแนนท์แบคทีเรีย (2)

หมายเหตุ :

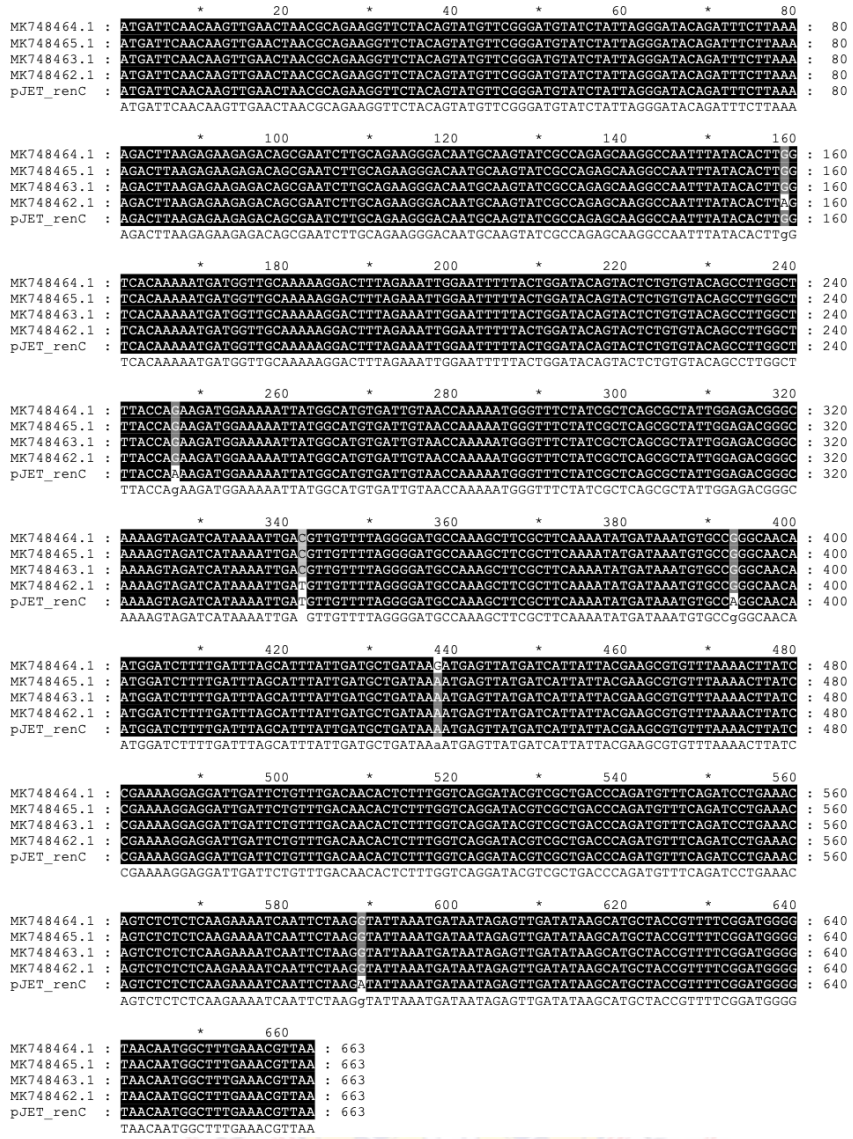
เลน M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA) 200 นาโนกรัม

เลน P: พลาสมิดควบคุมบวก (pET-28a(+)_ISKNV_*mcp*)

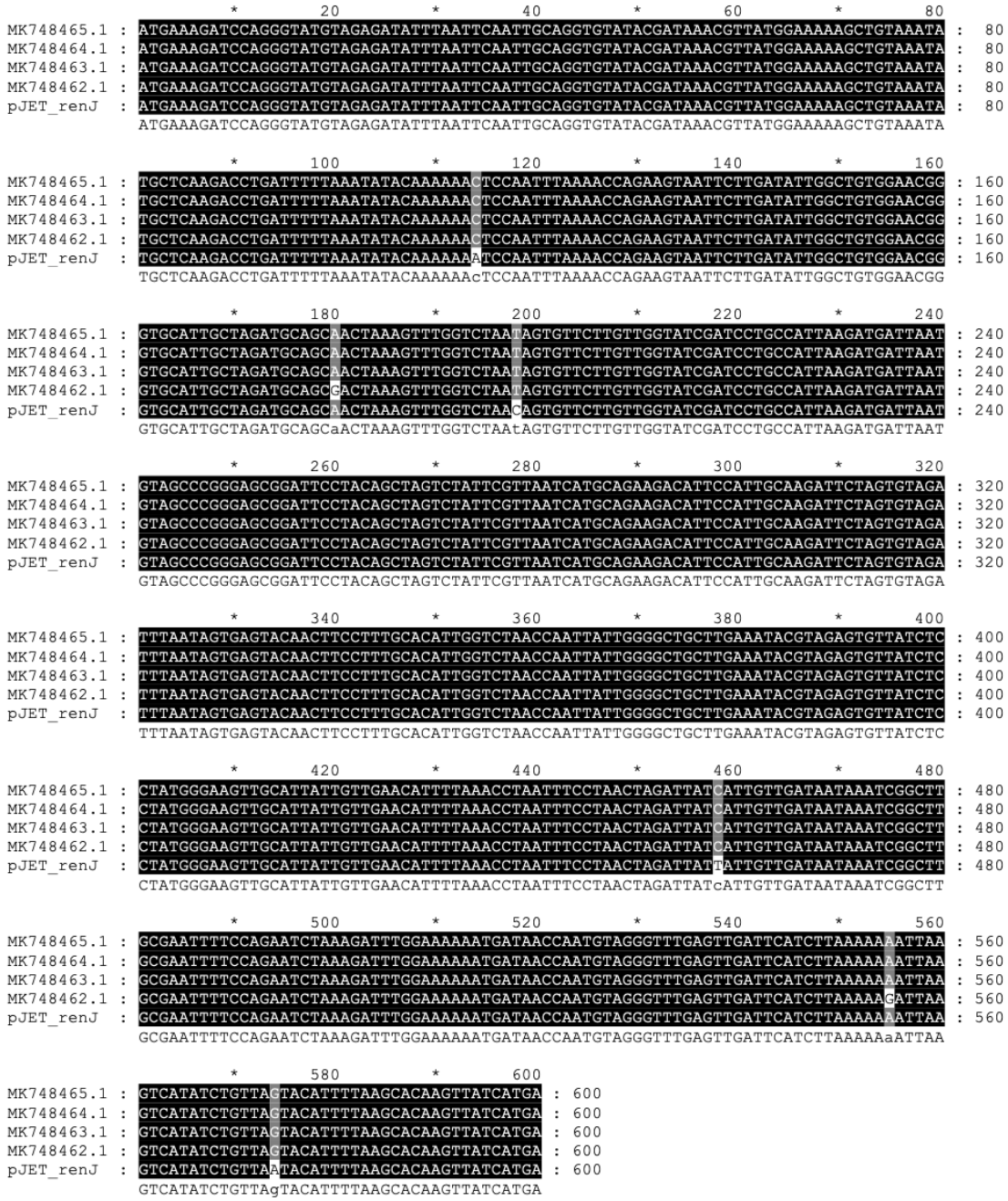
เลน N: พลาสมิดควบคุมลบ (pJET 1.2/blunt)

เลน U และ C: พลาสมิดที่ไม่ได้บ่ม และบ่มกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I ตามลำดับ

ขั้นตอนสุดท้ายส่งตัวอย่างพลาสมิดไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen, Korea) นำลำดับ นิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit blast เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) วิเคราะห์และแสดงผลด้วยโปรแกรม Gene Doc จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีน *renC* หรือ *renJ* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *renC* ที่ได้ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าคล้ายคลึงกับยีน *renC* ของ *Candidatus* Endohaliclona renieramycinifaciens (GenBank Accession No. MK748465.1, MK748463.1, MK748462.1 99.40% และ MK748464.1 99.25%) (ภาพที่ 14) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *renJ* พบว่าคล้ายคลึงกับยีน *renJ* ของ *Candidatus* Endohaliclona renieramycinifaciens (GenBank Accession No. MK748465.1, MK748464.1, MK748463.1 99.33% และ MK748462.1 99.00%) (ภาพที่ 15) ซึ่งยืนยันการมีอยู่ของแบคทีเรีย *Candidatus* Endohaliclona renieramycinifaciens ในฟองน้ำดังกล่าว



ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ren C* ของรีคอมบิแนนท์โคลนเทียบกับที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล (GenBank Accession No. MK748464.1, MK748465.1, MK748463.1, MK748462.1)



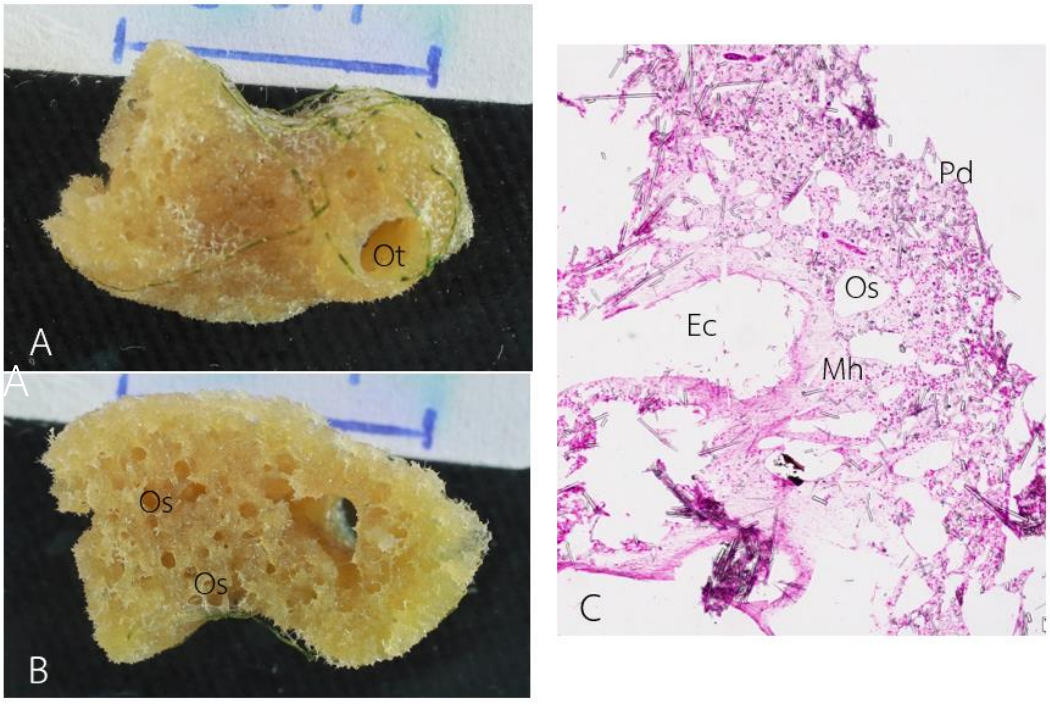
MK748462.1)

ภาพที่ 16 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ren J* ของรีคอมบิแนนท์โคลนเทียบกับที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล (GenBank Accession No. MK748464.1, MK748465.1, MK748463.1, MK748462.1)

3.5 สัณฐานวิทยาและมิญชวิทยาของฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestrospongia* sp.

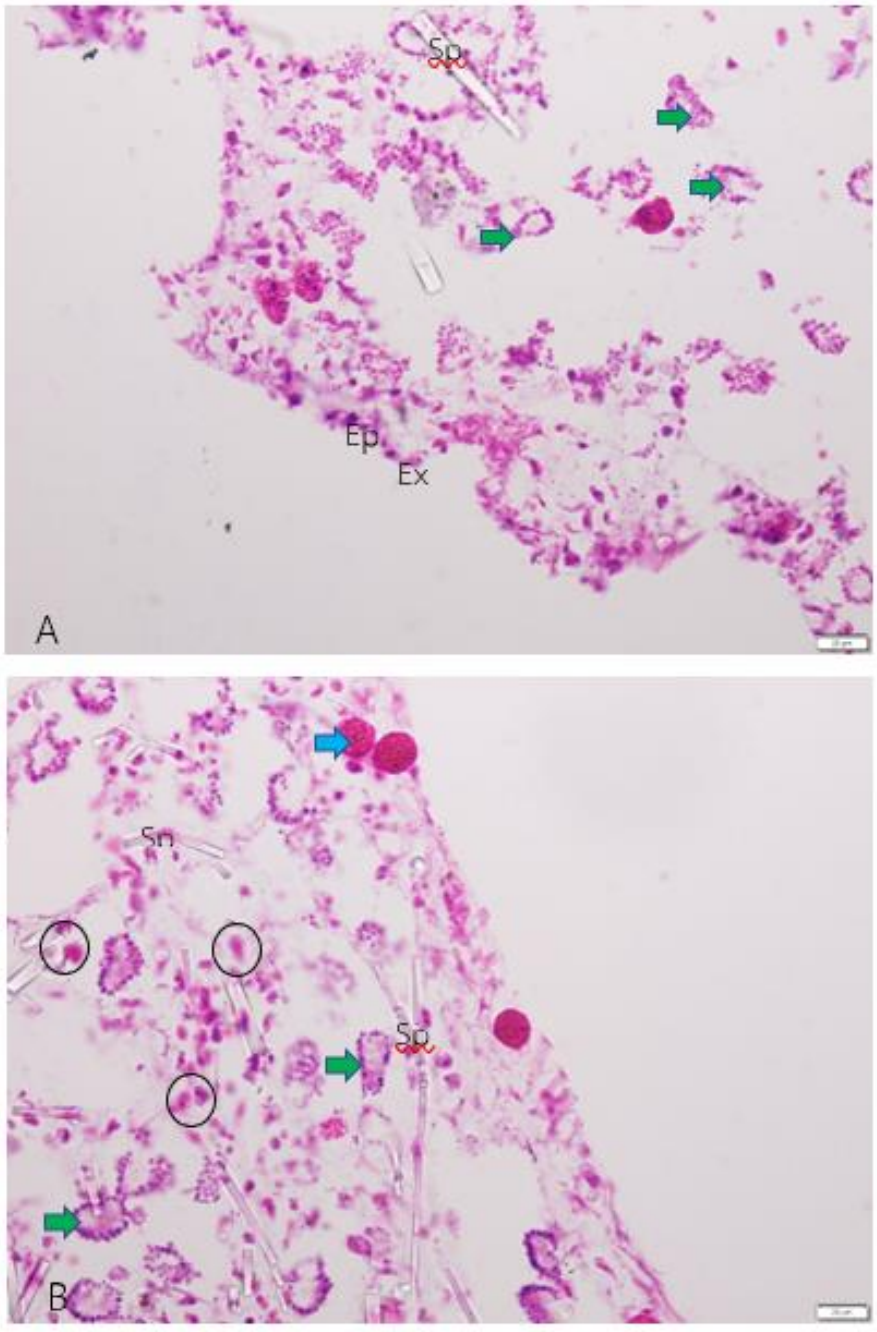
จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestrospongia* sp. พบโครงสร้างที่มี exhalant pore หรือ osculum ที่ชัดเจน (ภาพที่ 17A) พร้อมมีลำตัวพรุนและสามารถสังเกตช่องของ ostium จำนวนมาก (ภาพที่17 B) สอดคล้องกับมิญชิวยาของฟองน้ำชนิดนี้ที่ตัดตามแนวขวางพบการจัดเรียงของชั้นต่าง ๆ จากด้านนอกเข้าสู่ด้านใน คือ pinacoderm ซึ่งเป็นชั้นนอกสุดที่สามารถแบ่งเป็น 2 ชั้นย่อย คือ exopinacoderm และ endopinacoderm (ภาพที่ 17C) และชั้น mesohyl (หรือ archaeocyte) เป็นชั้นในที่ติดสีชมพูอ่อน และมีโครงสร้างสปิคูล (spicule) ซึ่งเป็นผลึกสารมีลักษณะเป็นแท่งใสเป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 17A)

หากพิจารณากำลังขยายที่สูงขึ้นยังสามารถจำแนกโครงสร้างและองค์ประกอบได้อีกหลายชนิด พบว่า choanocyte chamber มีการจัดเรียงเป็นก้อนทรงกลมและมี choanocyte เป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 18A-18B) ส่วนของ sclerocyte เป็นเซลล์กลม ติดสีชมพูเข้ม แต่จำแนกตำแหน่งของนิวเคลียสได้ยาก (ภาพที่ 18B) นอกจากนี้ยังพบ aechaeocyte เป็นเซลล์ขนาดเล็กรูปร่างไม่แน่นอน มีนิเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์ และล้อมรอบด้วยไซโทพลาซึมติดสีชมพูอ่อน (ภาพที่ 18B)



ภาพที่ 17 สัณฐานวิทยาและมิญชวิทยาตามขวางของฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestrospongia* sp.

หมายเหตุ: Ec = exhalant canal, Mp = mesohyl, Ot = osculum, Os = ostia, Pd = Pinacoderm

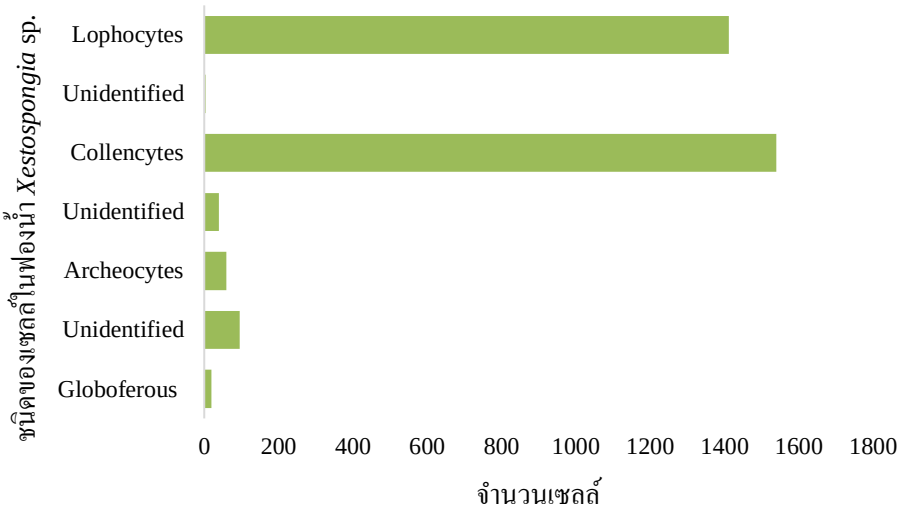


ภาพที่ 18 มิญชวิทยาและชนิดเซลล์ที่พบในฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestrospongia* sp.

หมายเหตุ: Ex = exopinacoderm, Ep endopinacoderm, Sp = spicule, Green arrows = choanocyte chamber, blue arrow heads = sclerocyte, cycles = aechaeocyte

ตารางที่ 11 ผลของจำนวนเซลล์ที่พบในฟองน้ำ

Figure	Globoferous	Unidentified	Archeocytes	Unidentified	Collencytes	Unidentified	Lophocytes
A1.1	5	12			18		15
A1.2	0	10			35		10
A1.3	0	2			19		47
A1.4	0		8		27	1	20
A4.2	0		5	10	15		29
A4.4	0		2		9		13
A4.5	0					1	7
B2.1	0				17	1	12
B2.2	0				15		24
B2.3	0				26		16
B2.4	0				9		14
B2.5	0				25		15
B2.6	0				10		9
B2.7	0				17		11
B2.8	0				26		20
B4.1	0				19		15
B4.2	0				22	1	14
B4.3	0				15		13
B4.4	0				29		22
B4.5	0				32		27
Total	**20**	**96**	**60**	**40**	**1540**	**4**	**1412**



ภาพที่ 19 ผลการนับจำแนกและจำนวนเซลล์ฟองน้ำโดยวิธีเนื้อเยื่อวิทยา

บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเจริญเติบโต

จากการเลี้ยงฟองน้ำทะเล *Xestospongia* sp. สีน้ำเงินเป็นระยะเวลา 280 วัน พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยง (ตารางที่ 3 และกราฟที่ 2) แสดงว่าฟองน้ำสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีโดยพบการเจริญสูงสุดอยู่ในช่วงวันที่ 220-280 ของการเลี้ยงซึ่งตรงกับเดือน พฤษภาคม- กรกฎาคม เป็นช่วงฤดูฝนมีปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำสูงเป็นผลมาจากการชะล้างสารอินทรีย์จากชายฝั่งสู่ทะเล ฟองน้ำจึงกรองกินสารอินทรีย์ได้มากจากปกติ ดังนั้นจึงมีการเจริญเติบโตดี การเจริญเติบโตของฟองน้ำขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญหลายประการ ได้แก่ อาหาร คุณภาพสิ่งแวดล้อมในบริเวณเลี้ยง ฟองน้ำเป็นสัตว์ยุคโบราณ ดำรงชีวิตโดยการกรองกินอาหารในมวลน้ำ แต่ยังมีข้อมูลไม่เพียงพอที่จะสรุปได้แน่ชัดว่าฟองน้ำแต่ละชนิดกินอาหารแตกต่างกันอย่างไรทั้งชนิดและปริมาณเนื่องจากมีรายงานการศึกษาค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับทรัพยากรฟองน้ำที่มี ฟองน้ำกรองกินสารอินทรีย์ในน้ำทะเลเป็นอาหารทั้งมีชีวิตและไม่มีชีวิต ซึ่งอยู่ในรูปแขวนลอยและละลายน้ำ ฟองน้ำส่วนใหญ่กินแบคทีเรียในน้ำทะเลเป็นอาหาร ตัวอย่างเช่น ฟองน้ำ *Aphysina aerophoba* สามารถ uptake แบคทีเรียได้มากกว่า 2.76×10^6 เซลล์ต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม ซึ่งเป็นไปในลักษณะกรองกินตลอดเวลา (Friedrich *et al*., 2001) การกรองกินอาหารของฟองน้ำเป็นแบบคัดเลือก (selective feeding) กล่าวคือ ฟองน้ำจะเลือกกินแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นและจะยอมให้แบคทีเรียอาศัยอยู่ในเนื่อเยื่ออย่างจำเพาะ แบคทีเรียที่เป็นอาหารจะถูกดักจับโดยเซลล์ choanocyte และย่อยดูดซึมเข้าสู่เซลล์แบบ phagocytosis ส่วนที่ไม่เป็นอาหารหรือไม่ได้รับคัดเลือให้เป็นผู้ร่วมอาศัยจะถูกพัดออกจากโครงสร้างตัวผ่านทางท่อน้ำออก (Riyanti *et al*., 2020) ฟองน้ำจะเจริญเติบโตได้ดีต้องมีปริมาณอาหารอยู่อย่างเพียงพอในธรรมชาติโดยเฉพาะ organic particle ทั้งมีชีวิตและไม่มีชีวิต (Riisgård *et al*., 2003) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อมูลรายงานความหลากหลายและชนิดของแบคทีเรียที่ฟองน้ำ *Xestospongia* sp. สีน้ำเงินกินเป็นอาหาร จากการวิเคราะห์ 16S rDNA พบไซยาโนแบคทีเรีย *C.E. renieramycinifaciens* ชนิดเดียวเท่านั้นที่มีคุณภาพยีนพอในการวิเคราะห์หาชนิดได้ แสดงว่าอาจมีแบคทีเรียร่วมอาศัยชนิดอื่นน้อยมาก อาจเป็นแบบอาศัยชั่วคราวโดยปนมากับมวลน้ำ แต่ *C.E. renieramycinifaciens* เป็นชนิดอยู่อาศัยถาวรหรือจุลินทรีย์ประจำถิ่น ข้อมูลการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามเวลาของฟองน้ำ *Xestospongia* sp. (ภาพที่ 3) ยืนยันได้ว่าทะเลบริเวณเกาะลิบงมีความเหมาะสมในการเลี้ยงฟองน้ำชนิดนี้ การเปลี่ยนแปลงปัจจัยสภาพแวดล้อมทำให้ฟองน้ำตกอยู่ในสภาวะเครียดส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง เมื่อพิจารณาปัจจัยสภาพแวดล้อมโดยเฉพาะคุณภาพน้ำ พบว่า อุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรดด่างของน้ำทะเลมีการ

เปลี่ยนแปลงน้อย กล่าวคืออยู่ในช่วง 29.89-31.00 องศาเซลเซียส , 30.17-31.20 ppt และ7.6-7.7 mg/L ตามลำดับ โดยทั่วไปฟองน้ำทนต่อการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยดังกล่าวได้ในช่วงแคบๆ และเป็นระยะเวลาสั้นๆ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เร็วเกินไป เป็นสาเหตุทำให้ฟองน้ำมีอัตราการเจริญเติบโตลดลงและตายในที่สุด ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้พบในฟองน้ำทะเลสีเหลือง *Agelas oroidas* ซึ่งเป็นฟองน้ำอาศัยอยู่ในที่ลึกประมาณ 150 เมตร เมื่อนำมาเลี้ยงบริเวณผิวน้ำ ซึ่งมีอุณหภูมิสูงกว่าบริเวณที่อาศัยเดิมประมาณ 3 องศาเซลเซียส พบอัตราการเจริญเติบโตน้อยและมีการตายเป็นจำนวนมากหลังเลี้ยงได้ 30 วัน (Ruiz *et al*., 2013) เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงความเค็มในช่วงกว้างทำให้ฟองน้ำเครียดได้ (Carballo *et al*., 2010) ในขณะที่ไนไตรท์และแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารพิษต่อฟองน้ำในบริเวณเลี้ยงมีความเข้มข้นต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานหรือไม่เป็นพิษ (ตารางที่ 7) เพราะบริเวณเลี้ยงเชื่อมต่อกับทะเลเปิด ไกลจากแหล่งชุมชนและมีกระแสน้ำไหลเวียนตลอดเวลา ดังนั้นฟองน้ำจึงไม่อยู่ในสภาพเครียด อีกปัจจัยหนึ่งที่คาดว่ามีความเหมาะสม คือ ความลึก (อาจกล่าวได้อีกนัยหนึ่งคือความเข้มแสง) การทดลองครั้งนี้เลี้ยงฟองน้ำที่ระดับความลึก 1.5-3.0 เมตรซึ่งเป็นความลึกที่เหมาะสม ที่ระดับความลึกมากกว่านี้จะมีปริมารความเข้มแสงไม่เหมาะสม จุลินทรีย์ร่วมอาศัยไม่สามารถสังเคราะห์แสงสร้างสารอินทรีย์ซึ่งจะถูกส่งต่อเป็นอาหารให้กับฟองน้ำอีกทีหนึ่ง ดังนั้นฟองน้ำแต่ละชนิดเจริญเติบโตได้ที่ระดับความลึกแตกต่างกันอันเนื่องมาจากความต้องการแสงของจุลินทรีย์ร่วมอาศัยนั่นเอง บางชนิดต้องการแสงน้อย เช่น ฟองน้ำทะเลลึก (*Euplectella* spp.) (Friedrich *et al*., 1999) สำหรับฟองน้ำ *Xestospongia* sp. คาดว่ามีแบคทีเรียอาศัยร่วมหลายชนิด ดังนั้นแสงจึงมีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์อาหารของจุลินทรีย์อาศัยร่วม จากการทดลองพบว่าฟองน้ำสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความลึก 1.5-3 เมตร ซึ่งสอดคล้องกับความต้องการแสงของไซยาโนแบคทีเรียร่วมอาศัยซึ่งต้องการแสงในการสังเคราะห์อาหารในขณะเดียวกันรงควัตถุสีน้ำเงินในฟองน้ำช่วยป้องกันความเสียหายของเซลล์อันเนื่องมาจากความเข้มแสงมากๆในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามในสภาพธรรมชาติมักจะมีผู้ล่าจำเพาะเจาะจง กรณีฟองน้ำชนิดนี้มีผู้ล่าที่สำคัญคือ ทากเปลือย *Jorunna funebris* ซึ่งพบมากในบริเวณเลี้ยง ในช่วงแรกๆของการเลี้ยงฟองน้ำ ไม่ค่อยพบทากเปลือยชนิดนี้ แต่เมื่อฟองน้ำเจริญเติบโตดีจะปล่อยสารบางขนิดเป็นสื่อลงในน้ำเหนี่วยน้ำให้ทากเปลือยอบยมมาสู่บริเวณเลี้ยงสารดังกล่าวจัดเป็น เซ็นเซอร์ทางเคมี (Chemical sensor) สำหรับสื่อสารของสิ่งมีชวิตในทะเล ดังนั้นการแก้ปัญหาคือเลี้ยงฟองน้ำในกรงหรือกระชังขนาดเล็กแต่จะประสบปัญหาซากตะกอนอุดตันตาข่ายทำให้น้ำไหลไม่สะดวกส่งผลกระทบต่อปริมาณอาหารที่ฟองน้ำได้รับ ดังนั้นการเลี้ยงที่ดีน่าจะเป็นการปล่อยตามธรรมชาติโดยยึดฟองน้ำใว้กับวัสดุที่เป็น เชือก หรือพลาสติก หรือซากปะการัง น่าจะเหมาะสมที่สุด เนื่องจาก พลาสติกบางชนิดมีสารป้องกันการเคลือบเกาะ (Antifouling) ทำให้ฟองน้ำสามารถเกาะกับวัสดุแข็งได้

4.2 การสร้างสาร Renieramycin M

สาร RM ถูกสังเคราะห์โดยไซยาโนแบคทีเรีย *C.E. renieramycinifaciens* ดังนั้นการปริมาณสารจึงขึ้นอยู่กับปัจจัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมทั้งต่อแบคทีเรียและเจ้าบ้านจาก ภาพที่ 4 พบว่าปริมาณการสังเคราะห์สาร RM เพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตของฟองน้ำ เป็นเพราะว่าแบคทีเรียมีพื้นที่เพิ่มขึ้นในการอยู่อาศัยดังนั้นความหนาแน่นจึงมากขึ้นจึงพบปริมาณสารมาก อีกปัจจัยหนึ่งคือสภาวะแวดล้อมมีความเหมาะสมต่อการอยู่อาศัยและสร้างสารของไซยาโนแบคทีเรีย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

สาร Renieramycins แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Xestospongia* sp. สีน้ำเงิน สร้างจากแบคทีเรียร่วมอาศัย *Cardidatus* Endohalicona renieramycinifactens ซึ่งเป็น Cyanobacteria ชนิดหนึ่ง พบในมหาสมุทรแปรซิฟิก และทะเลหมู่เกาะปาปัวนิวกินี (Tianero *et al*., 2010) ดังนั้นเพื่อพิสูจน์การมีอยู่ของไซยาโนแบคทีเรียนี้ในฟองน้ำสายพันธุ์อันดามัน 1 ที่กำลังศึกษา ทีมวิจัยจึงทำการสกัดดีเอ็นเอ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ จากการศึกษาพบการมีอยู่ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ในฟองน้ำ *Xestospongia* sp. สีน้ำเงิน สายพันธุ์อันดามัน 1 (ภาพที่14 และ 15) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าสาร renieramycin m ผลิตโดยแบคทีเรียร่วมอาศัย ไม่ได้เกิดจากการสังเคราะห์ของตัวฟองน้ำเอง คาดว่าแบคทีเรียชนิดดังกล่าวใช้สารเมแทบอไลต์ (metabolites) จากฟองน้ำเพื่อการดำรงชีพหรือเพื่อกิจกรรมอื่นของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตจากนั้นสังเคราะห์สาร renieramycins ขึ้นมา ยังไม่พบรายงานการแยกเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาเลี้ยงในลักษณะ monoclonal culture เพื่อผลิตสาร renieramycins ระดับอุตสาหกรรม คาดว่ายังไม่มีข้อมูล trace metabolites ที่แบคทีเรีย uptake จากฟองน้ำ จึงไม่สามารถสร้างสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ได้ ดังนั้นการเลี้ยงฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. จึงเป็นการเลี้ยงแหล่งอาศัยของเชื้อแบคทีเรียผลิตสาร renieramycin ซึ่งยังคงเป็นทางเลือกต้นทุนต่ำ

เอกสารอ้างอิง

พชร เพ็ชรประดับ, และวัฒนา วัฒนกุล, 2562. รายงานการวิจัยเรื่อง การพัฒนาการเลี้ยงฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xastosporgia* sp. ในโรงเรือน เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตสารต้านมะเร็ง Renieramycins มทร ศรีวิชัย วข. ตรัง 50 น.

นรินทร์ โชวเจริญสุข, 2464. แนวโน้มธุรกิจ/อุตสาหกรรม ปี 2561-63 อุตสาหกรรมยา 2561. 20 น.

Carballo, J. L., Yanez, B., Zubia, E., Ortega, M. J. and Vega, C. 2010. Culture of explants from the sponge *Mycale Cecilia* to obtain bioactive mycalazal-type metabolites. **Marine Biotechnology** 1: 516–525.

Cristiane C.P.H. and Costa, R. 2014. Microbial Communities and Bioactive Compounds in Marine Sponges of the Family Irciniidae—A Review. **Marine Drugs** 12: 5089–5122.

Duckworth, A. 2009, Farming sponge to supply bioactive metabolites and bath sponges: a Rewiew. **Marine Biotechnology** 11: 669–679.

Fehmida, B., Muhammad, I.N. and Esam. I.A. 2021. Assessing the diversity of bacterial communities from marine sponges and their bioactive compounds. **Saudi Journal of Biological Sciences** 28(5): 2747–2754.

Friedrich A.B., Fischer I., Proksch P., Hacker J. and Hentschel, U. 2001. Temporal variation of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*, **FEMS Microbiology Ecology** 38: 105–113.

Ferlay J., Ervik M, Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M., Znaor A. and Soerjomataram, I. 2018, **The Journal of Chulabhorn Royal Academy** eISSN : 2697-5203 (Online).

Friedrich A.B., Merkert H., Fendert T., Hacker J., Proksch P. and Hentschel U. 1999. Microbial diversity in the marine sponge Aplysina cavernicola (formerly Verongia cavernicola) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH), **Marine Biology** 134: 461–470.

Riyanti W.B., Liun Y., Sharma A., Mihajlovic S., Hartwig C., Leis B., Frets J.R., Frans G.I., Wägele H., König G.M. and Schäberle. T.F. 2020. Selection of sponge-associated bacteria with high potential for the production of antibacterial compounds. **Scientific Reports** 10: 196–214.

Ruiz, C., Valderrama, K., Zea, S. and Castellanos, L. 2013. Mariculture and natural production of the antitumoural (+)-Discodermolide by the Caribbean marine sponge Discodermia dissolute. **Marine Biotechnology** 15: 571–583.

Sipkema, D., Yosef, N. A. M., Adamczewski, M., Osinga, R., Mendola, D., Tramper J. and Wijffels, R. H. (2006). Hypothesized kinetic models for describing the growth of globular and encrusting demosponges. **Marine Biotechnology** 8: 40–51.

Suwanborirux K., Amnuoypol S., Plubrukarn A., Pummangura S., Kubo A., Tanaka C. and Saito N. 2003. Chemistry of Renieramycins. Part 3.1 Isolation and Structure of Stabilized Renieramycin Type Derivatives Possessing Antitumor Activity from Thai Sponge Xestospongia Species, Pretreated with Potassium Cyanide. **Journal of Natural Products**. 66 (11): 1441–1446.

Perdicaris S., Vlachogianni T. and Valavanidis A., 2013. Bioactive natural substances from Marine Sponges: New Developments and Prospects for Future Pharmaceuticals. **Natural Products Chemistry Research** 1: 1-3.

Thoms, C., Ebel, R. and Proksch, P. (2006). Activated chemical defense in *Aplysia sponges* revisited. **Journal of Chemical Ecology** 32: 97–123.

Tianero D., Jared N.B. and Mohamed S.D. 2019. Localized production of defense chemicals by intracellular symbionts of Haliclona sponges, **Nature Microbiology** 4: 1149–1159.