

ภาคผนวก

โครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมี ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัณจรสู่โรงเรียน”

โดย คณะผู้วิจัยจากแผนวิจัย “จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร”

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ณ โรงเรียนในเขตจังหวัดชลบุรี

ระหว่างเดือนสิงหาคม ๒๕๕๗

๑. หลักการและเหตุผล

การพัฒนางานด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลมีบทบาทสำคัญกับภูมิภาคแถบชายฝั่งทะเล ซึ่งเกี่ยวข้องกับ 3 กลุ่มหลักๆ ได้แก่ เทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงในน้ำ เทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลเพื่อตอบสนองความต้องการของภาคอุตสาหกรรมต่างๆ และเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งพัฒนาบุคลากรทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี อันเป็นกำลังสำคัญในการพัฒนาประเทศ โดยในปัจจุบันยังขาดแคลนบุคลากรทางด้านนี้ทำให้ข้อมูลและการประยุกต์ใช้ทรัพยากรทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลอย่างยั่งยืนโดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ทะเลมีจำนวนไม่เพียงพอ

จากแผนวิจัย “จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร” ซึ่งประกอบด้วย 6 โครงการย่อย ที่มุ่งเน้นการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ทะเลแหล่งต่างๆ โดยมีเป้าหมายเพื่อค้นหาสารตัวตั้งต้นที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ พัฒนาการเพิ่มผลผลิตเซลล์จุลินทรีย์ พัฒนาองค์ความรู้บนฐานความหลากหลายทางชีวภาพ พัฒนาด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ พัฒนาการผลิตวัคซีนสำหรับสัตว์น้ำ และเป็นแนวทางในการถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยและแนวทางการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลไปสู่เยาวชนและประชาชนผู้สนใจ โดย โครงการถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและด้านเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลสู่โรงเรียน ถือเป็นการถ่ายทอดองค์ความรู้จากการศึกษาวิจัยของโครงการวิจัยสู่โรงเรียนในพื้นที่จังหวัดชลบุรี เป็นการดำเนินการที่สอดคล้องกับเป้าหมายของแผนงานวิจัยฯ กล่าวคือนักวิจัยสามารถนำผลงานวิจัยในปีที่ ๑ เกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล รวมถึงเทคนิคการสกัดสารประกอบประเภทต่างๆ เช่น สารสี กรดไขมัน และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ไปถ่ายทอดข้อมูลและความรู้ให้กับหน่วยงานสถาบันการศึกษาเพื่อกระตุ้นให้นักเรียน คิดค้น และมีวิธีการทำงานแบบวิทยาศาสตร์ ตลอดจนการรู้จักการวางแผน การปฏิบัติทดลอง การบันทึกข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล และการนำเสนอ ด้วยทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งจะทำให้เกิดการขยายกำลังการผลิตบุคลากร การพัฒนากำลังคนด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่อไปซึ่งประเทศไทยกำลังขาดแคลนการสร้างนักวิทยาศาสตร์และ

นักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีคุณภาพต้องได้รับการสนับสนุนจากภาคการศึกษาตั้งแต่ระดับเยาวชนเพื่อนำเข้าสู่กระบวนการพัฒนาอย่างถูกทางและเหมาะสมจึงต้องเร่งส่งเสริมและกระตุ้นให้เยาวชนหันมาสนใจและเพิ่มพูนทักษะทางวิทยาศาสตร์ตั้งแต่ระดับนักเรียน เด็กและเยาวชนของชาติเป็นทรัพยากรบุคคลที่มีบทบาทและสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งจะเป็นกำลังหลักในการพัฒนาประเทศ ปัจจุบันปริมาณนักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยมีจำนวนไม่เพียงพอ โดยพบสาเหตุว่าโครงการส่งเสริมการเป็นนักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยมีน้อย โครงการถ่ายทอดองค์ความรู้นี้เป็นเพียงโครงการนำร่องที่อาจช่วยผลักดันให้นักเรียนหันมาสนใจหรือนำไปประยุกต์ใช้ในโครงงานวิทยาศาสตร์ทางด้านวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

๒. วัตถุประสงค์โครงการ

๑. เพื่อถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเลสู่โรงเรียนระดับมัธยมศึกษาตอนปลายในเขตจังหวัดชลบุรี

๒. เพื่อพัฒนาแนวคิดและทักษะด้านวิทยาศาสตร์ของนักเรียนระดับมัธยมศึกษาตอนปลายในเขตจังหวัดชลบุรี

๓. ผู้รับผิดชอบโครงการ

๑. คณะผู้วิจัยจากแผนงานวิจัย “จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร” สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ดำเนินงานโครงการ

- ดร. รวิวรรณ วัฒนติลก

หัวหน้าโครงการ

- นางณิชา สิรินนธ์นา

เลขานุการโครงการ

กรรมการโครงการ

- ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา

- ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ

- ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

- นางสาวรัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์

- ดร. สุพรรณิณี ลิโทขวลิต

- ดร. จารุพันธ์ ประทุมยศ

๒. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

๓. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

๔. วิธีการฝึกอบรม

๑. บรรยายและปฏิบัติการ

๒. บอร์ดนิทรรศการ๔-๖บอร์ด

๕. ผู้เข้าร่วม

คณะครูและนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายสายวิทยาศาสตร์ของโรงเรียนสาธิต “พิบูลบำเพ็ญ” มหาวิทยาลัยบูรพา โรงเรียนชลราษฎรอำรุง และโรงเรียนสิงห์สมุทรจังหวัดชลบุรี จำนวน ๔๐๐-๔๕๐ คน

๖. ระยะเวลาดำเนินการ

ระยะเวลาดำเนินการโรงเรียนละ ๑ วัน รวม ๓ วัน ในเดือนสิงหาคม ๒๕๕๗

วันที่ ๑ สิงหาคม ๒๕๕๗ โรงเรียนสาธิต “พิบูลบำเพ็ญ” มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอมือ
จังหวัดชลบุรี

วันที่ ๒๐ สิงหาคม ๒๕๕๗ โรงเรียนสิงห์สมุทร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

วันที่ ๒๗ สิงหาคม ๒๕๕๗ โรงเรียนชลราษฎรอำรุง อำเภอมือ จังหวัดชลบุรี

๗. สถานที่จัด

๑. โรงเรียนสาธิต “พิบูลบำเพ็ญ” อำเภอมือ จังหวัดชลบุรี
๒. โรงเรียนชลราษฎรอำรุง อำเภอมือ จังหวัดชลบุรีและ
๓. โรงเรียนสิงห์สมุทร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

๘. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

๑. ผลงานวิจัยที่ได้จากโครงการวิจัยของแผนวิจัยมาถ่ายทอด บรรยายและสาธิตถึงความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์และฟองน้ำทะเล และเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติให้แก่ครูและนักเรียนที่เข้าร่วม สามารถนำไปประกอบการเรียนการสอน หรือประยุกต์ใช้ในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์

๒. สามารถสร้างทักษะด้านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ให้นักเรียนที่เข้าร่วม

๙. แผนการดำเนินงาน

กิจกรรม	เดือน ๒๕๕๗					
	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.
๑. ประสานงาน/ประชุมคณะทำงาน	←→					
๒. สำรวจพื้นที่/ วางแผนดำเนินงาน			←→			
๓. จัดทำโครงการ			←→			
๔. เตรียมข้อมูลและรูปแบบการถ่ายทอดฯ			←→			
๕. ดำเนินการถ่ายทอดองค์ความรู้ใน รูปแบบการบรรยายและปฏิบัติการ					←→	
๖. สรุปและประเมินผลกิจกรรม					←→	
๗. จัดทำรายงานการดำเนินโครงการ					←→	

๑๐. การประเมินโครงการ

การตอบแบบสอบถาม และสังเกตโดยผู้เชี่ยวชาญจากการเข้าร่วมฟังบรรยายและการฝึกภาคปฏิบัติการของนักเรียน

๑๑. งบประมาณ

งบประมาณค่าใช้จ่ายโครงการจำแนกตามประเภทต่างๆ

รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
๑. งบบุคลากร	-
๒. งบดำเนินงาน	๒๓,๗๐๐
๒.๑ ค่าตอบแทน ใช้สอยและวัสดุ	
(๑) ค่าตอบแทนวิทยากรและผู้ช่วยวิทยากร (บรรยายพร้อมปฏิบัติการ ชั่วโมงละ ๖๐๐บาท จำนวน ๘ คนๆละ ๑.๓๐ ชั่วโมง เป็นเวลา ๓ วัน)	๒๑,๖๐๐
(๒) ค่าตอบแทนผู้เชี่ยวชาญประเมินโครงการฯ วันละ ๗๐๐ บาท เป็นเวลา ๓ วัน	๒,๑๐๐
๒.๒ ค่าใช้สอย	๓๔,๕๐๐
- ค่าเช่ารถยนต์อัตรา ๒,๔๐๐บาท/วัน/คัน	๘,๖๐๐
- ค่าน้ำมันเชื้อเพลิง	๒,๔๐๐
- ค่าอาหารจัดเลี้ยง จำนวนประมาณ ๔๕๐ คน	๑๓,๕๐๐
- ค่าจ้างเหมาเจ้าหน้าที่ช่วยงาน จำนวน ๘ คน	๘,๐๐๐
- ค่าจัดเตรียมสถานที่	๑,๐๐๐
๒.๓ ค่าวัสดุ	๒๖,๘๐๐
- ค่าอุปกรณ์ในการจัดกิจกรรม	๑๓,๕๐๐
- ค่าเอกสารประกอบการบรรยาย	๑๐,๐๐๐
- ค่าวัสดุอื่นๆ เช่น โปสเตอร์ วัสดุสำนักงาน	๓,๓๐๐
รวมค่าใช้จ่ายในโครงการ	๘๕,๐๐๐

หมายเหตุ ขอถัวเฉลี่ยจ่ายทุกรายการได้ตามความจำเป็น

.....

(นางรวิวรรณ วัฒนติก)

ผู้อำนวยการแผนวิจัยฯ/หัวหน้าโครงการฝึกอบรมฯ

**กำหนดการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและ
เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัณฐานวิทยาโรงเรียน”**

วันที่ สิงหาคม ๒๕๕๗

เวลา	กิจกรรม
๐๘.๑๕ – ๐๘.๓๐ น.	ลงทะเบียน
๐๘.๓๐ – ๐๙.๐๐ น.	เปิดการอบรมแนะนำแผนงานวิจัยฯ และทีมงาน
๐๙.๐๐ – ๑๐.๐๐ น.	บรรยาย/สาธิต “การจำแนกชนิดตัวอย่างฟองน้ำทะเลอย่างง่าย ๆ” โดย ดร. สุเมตต์ ปุณณการ
๑๐.๐๐ – ๑๑.๐๐ น.	บรรยาย “การแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลและการทดสอบฤทธิ์ด้าน จุลชีพเบื้องต้น” โดย ดร. ชุตติวรรณ เดชสกุลวัฒนา
๑๑.๐๐ – ๑๒.๐๐ น.	ฝึกปฏิบัติการ “การจำแนกชนิดตัวอย่างฟองน้ำทะเลอย่างง่าย ๆ” และ “การแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลและการทดสอบฤทธิ์ด้านจุลชีพ” โดย ดร. สุเมตต์ ปุณณการ / ดร. ชุตติวรรณ เดชสกุลวัฒนา และ วิทยากรฝึกปฏิบัติ (นางณิชา สิรินนธ์ธนา, ดร. จันทร์จรัส วัฒนะ โชติ, ดร. สุพรรณิ ลิ้มทิวลิป และ ดร. จารุพันธ์ ประทุมยศ)
๑๒.๐๐ – ๑๓.๐๐ น.	พักรับประทานอาหารกลางวัน
๑๓.๐๐ – ๑๔.๐๐ น.	บรรยาย “การแยกและการใช้ประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท” โดย นางสาวรัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์
๑๔.๐๐ – ๑๕.๐๐ น.	บรรยาย “เทคนิคการสกัดสารสีและสกัดลิพิดจากแอคติโนมัยซีท และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ” โดย ดร. รวิวรรณ วัฒนดิถ
๑๕.๐๐ – ๑๖.๐๐ น.	ฝึกปฏิบัติการ “การแยกและการใช้ประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัย ซีท” และ “เทคนิคการสกัดสารสีและสกัดลิพิดจากแอคติโนมัยซีท และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ” โดย นางสาวรัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์/ดร. รวิวรรณ วัฒนดิถ และ วิทยากรฝึกปฏิบัติ (นางณิชา สิรินนธ์ธนา, ดร. จันทร์จรัส วัฒนะ โชติ, ดร. สุพรรณิ ลิ้มทิวลิป และ ดร. จารุพันธ์ ประทุมยศ)
๑๖.๐๐ น.	ส่งแบบประเมินโครงการฯ

สาขาวิชา: เทคโนโลยีชีวภาพ; วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คำสำคัญ : สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ/ รังสีอัลตราไวโอเล็ต/ แอคติโนมัยซีท

54030291 รวิภา เมืองนา; 54030919 วิจิตรา แสนเทพ: ผลของรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพของแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท. อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์; อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์. จำนวนหน้า 38 หน้า. ปีการศึกษา 2557.

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารปฏิชีวนะ มีบทบาทสำคัญในการรักษาทางการแพทย์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ที่ก่อให้เกิดโรคประเภทของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะ ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรียแอคติโนมัยซีท และแบคทีเรียอื่นๆ โดยทั่วไปแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ มีประสิทธิภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะในปริมาณน้อย จึงได้ทำการศึกษาศักยภาพของแอคติโนมัยซีทด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (รังสียูวี) เพื่อให้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มาก และทำการจัดจำแนกแอคติโนมัยซีท จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้สกุล *Micromonospora* 3 สายพันธุ์ และ สกุล *Streptomyces* 3 สายพันธุ์ ในการชักนำแอคติโนมัยซีท ใช้วิธีเดียวกันกับการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ทั่วไป โดยการฉายรังสียูวีบนเซลล์แขวนลอยเป็นเวลา 15, 20 และ 25 นาที คัดเลือกโคโลนีมาเลี้ยงบนอาหาร ISP2 พบว่าลักษณะโคโลนี และลักษณะสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีทภายหลังการฉายยูวีไม่แตกต่างไปจากเดิม แต่พบว่าแอคติโนมัยซีท สามารถสร้างสารชีวภาพเพิ่มมากขึ้นเกือบทุกสายพันธุ์ ยกเว้น RY2-20 และมีการสร้างสารชีวภาพใน 5 ลักษณะ คือ 1) สร้างสารไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม 2) สร้างสารออกมานอกเซลล์น้อยชนิดลง 3) สร้างสารออกมานอกเซลล์มากขึ้น 4) สร้างสารในเซลล์มากขึ้น 5) สร้างสารในเซลล์และสร้างสารออกมานอกเซลล์มากขึ้น การชักนำแอคติโนมัยซีทด้วยรังสียูวีมีผลต่อการสร้างสารชีวภาพมากขึ้นเป็นส่วนใหญ่ทั้งในแง่ปริมาณและจำนวนชนิด โดยสามารถผลิตสารชีวภาพได้ดังนี้ คือ CP-PH-3-2 ผลิตสารเพิ่มขึ้นร้อยละ 21.99, CP-PH-3-12 ผลิตสารเพิ่มขึ้นร้อยละ 256.60, CP-8-4-A ผลิตสารเพิ่มขึ้นร้อยละ 25.85, CH54-8 ผลิตสารเพิ่มขึ้นร้อยละ 46.62, A3-3 ผลิตสารเพิ่มขึ้นร้อยละ 5.75 และ RY2-20 ผลิตสารลดลงร้อยละ 26.63

MAJOR: Biotechnology; B.Sc. (Biotechnology)

KEYWORDS : Bioactive compound/ Ultraviolet ray/ Actinomycetes

54030291 Rawipha Muangna; 54030919 Wichitra Saentep: The effects of ultra-violet rays to create bioactive compounds by Actinomycetes bacteria.

ADVISOR: Rattanaorn Sriviboon, Co-ADVISOR: Assistant Professor Krongchan Rattanaphradit, Ph.D. 38 P. Academic Year 2014.

Bioactive compounds especially antibiotic was one of the major drugs in medical treatment. It have ability to disrupt bacterial growth, It have many type of microbes that can product antibiotic such as fungi, Actinomycetes bacteria and other bacteria, but most natural Actinomycetes can't generate antibiotics much enough for the manufacturing. So we desire to induce mutation in Actinomycetes by Ultraviolet treat for development bacterial strains to be able generate more antibiotics. From characteristic we can separate six strains of Actinomycetes to three strains of *Micromonospora* and three strains of *Streptomyces*. In mutation induction of Actinomycetes we use the common method by irradiated Ultraviolet ray to suspension cell for 15, 20 and 25 minute, then select bacterial colony to cultivate in ISP2 agar medium. The characteristic of Actinomyces after UV treat don't change from original strain, but almost Actinomycetes can generate more kind of bioactive compounds except for RY2-20, it can classification bioactive generation type to 5 type: 1) bioactive compounds still the same 2) decrease outer cell bioactive compounds 3) increase outer cell bioactive compounds 4) increase inner cell bioactive compounds 5) increase all bioactive compounds. Actinomycetes mutation induction by UV treat can made Actinomycetes produce more bioactive compounds both quantity and kind by Actinomycetes strain CP-PH-3-2 bioactive compounds production increase 21.99%, CP-PH-3-12 increase 256.60%, CP-8-4-A increase 25.85%, CH54-8 increase 46.62%, A3-3 increase 5.75% and RY2-20 increase 26.63%

Effect of salinity on the growth and fatty acid composition of the marine yeast *Pichia* sp. cultured in sugarcane bagasse media

Nisa Siranonthana, Janjarus Watanachote, Rattanaporn Srivibool and Jarunan Pratoomyot*

Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

*Corresponding author: Jarunan Pratoomyot

E-mail: jarunan@buu.ac.th

Abstract

Yeasts are used as live feeds in the culture zooplankton which are then fed to the larvae of a broad range of aquatic animals. Given the importance of yeasts in larviculture, it is imperative that the nutrient composition of each employed yeast is determined to ensure that the nutritional needs of the target aquaculture species are being met. In the present study, the growth and fatty acid composition of the marine yeast *Pichia* sp. cultured in sugarcane bagasse media (SM) adjusted to salinities of between 25-35 ppt over a period of 192 hours was determined. Salinity was found to influence the growth of the *Pichia* sp. with cultures grown in 25 ppt having a significantly ($p \leq 0.05$) higher cell density (cells ml⁻¹) than the cultures grown in salinities of 30 and 35 ppt. The growth of the *Pichia* sp. in the 25 and 30 ppt cultures peaked at 72 h, while those reared in 35 ppt peaked at 120 h post-inoculation. Determination of the fatty acid composition in sub-samples taken from each culture at peak growth found that the profiles were broadly similar and unaffected by salinity. There was, however, a significant difference ($p \leq 0.05$) in the production of palmitic acid (C16:0), which was higher in the *Pichia* cultures adjusted to a salinity of 35 ppt than in those of lower salinity. The essential fatty acid linoleic acid (C18:2n6) was found in high concentrations whilst linolenic acid (C18:3n3) was detected in only trace amounts; the concentration of each acid were similar in each culture. The study concludes that while salinity does affect the growth of the marine yeast *Pichia* sp., the fatty acid profile remains largely unchanged across the salinity range 25 to 35 ppt. Further work, however, is required to optimize the culture conditions of this yeast if it is to be used as a live feed for zooplankton within commercial scale aquaculture enterprises.

© 2015 Published by Burapha University.

Keywords: live feed; larviculture; monounsaturated fatty acids; polyunsaturated fatty acids; aquaculture

1. Introduction

Yeasts are ubiquitous and commonly occur within marine and estuarine ecosystems (Kandasamy et al., 2012) and have broad spectrum application within, for example, the biomedical, chemical and food industries, in agriculture and as biofuel (Kurtzman and Fell, 2000; Yanagida et al., 2002; Passoth and Schnürer, 2003; Nisiotou and Gibson, 2005; Hill et al., 2006; Bhadra et al., 2007; Nyanga et al., 2007; Lee et al., 2008; Liu et al., 2008; Matsushika et al., 2008; Rao et al., 2008; Chi et al., 2009; Barnett and Barnett, 2011), they also have an important application within aquaculture either as probiotics, or in the culture of rotifers which are used in the larval nutrition of many aquaculture species (Patterson and Burkholder, 2003; James et al., 2004; Czerucka et al., 2007). In larval nutrition, the essential fatty acids, i.e. those belonging to the n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid families and notably the n-3 highly unsaturated fatty acids, are considered vital nutrients for the development and growth of marine larvae (Sargent et al, 2002). If yeasts are to be used in the culture of zooplankton which are subsequently given as a live feed to the larvae of many mariculture species, it is judicious to determine the nutrient content of each yeast species that is used to ascertain whether their nutritive content meets the requirements of the target aquaculture species. The proximate composition of yeasts, as might be expected, is variable across the relative taxa and can be affected by local environmental factors including their culture media (Gutierrez and Silva, 1993; Rodríguez et al, 2012; Wang et al., 2012; Watanachote et al., 2012) and by salinity (Hunter and Rose, 1971; Urano et al., 2001).

Sugarcane bagasse, is the fibrous residual matter following the mechanical extraction of sucrose from sugar cane; the residue is typically rich in monosaccharides (Du Toit et al., 1984). Yeasts preferentially catabolize sugars, although they can utilize polyols, alcohols, organic acids and amino acids as carbon and sources of energy (Spencer and Spencer, 1997). Preliminary investigations by the current authors found that a marine yeast isolated from seawater, and subsequently identified as a strain belonging to the genus *Pichia* Hansen, 1904 ([Saccharomycetaceae](#)), was able to grow in sugarcane bagasse media; the proximate composition, however, was not determined within this earlier study. The current study investigates the growth and fatty acid composition of the same isolate of *Pichia* (coded BS6-2) cultured in sugarcane bagasse media adjusted to salinities of 25, 30 and 35 ppt.

2. Materials and methods

2.1 Preparation of the sugarcane bagasse media (SM)

Media was prepared by mixing autoclaved sugarcane bagasse cubes, obtained locally, with the relevant salinity (25-35 ppt) of artificial seawater (Oestmann and Lewis, 1995) in a ratio of 1:10 (w/v). The sugar content of the SM was 6 mg ml⁻¹ as determined by quantification of the initial reduced sugar. The sugarcane bagasse preparations were soaked and pressed for 1 h before they were filtered; 125 ml of the filtrate was then transferred a glass flask and autoclaved at 121°C for 15 min.

2.2 Yeast culture and sample preparation

The isolate of *Pichia* was originally recovered from a sample of seawater collected at Bang Saen beach, Chonburi Province, Thailand (13° 16' 56.82" N, 100° 54' 54.42" E), and held within the yeast collection maintained at the Institute of Marine Science, Burapha University, Thailand under the accession code BS 6-2. For the current study, the yeast was cultured in yeast malt (YM) media and the density of cells determined by a spectrophotometer at 600 nm and the stock culture adjusted until an optical density (OD) of 0.2 was obtained. To investigate the growth of the *Pichia* sp. at three different salinities, i.e. 25, 30 and 35 ppt, a series of 42 replicate 250 ml flasks were prepared, i.e. 14 flasks per salinity. Each flask contained 125 ml autoclaved sugarcane bagasse media made to the relative salinity (i.e. SM25, SM30 and SM 35) and then to each 1 ml of the *Pichia* sp. stock culture was added. Thereafter, the flasks were placed on a reciprocal shaker at 100 rpm at room temperature for a period of up to 192 h. Six flasks (two per salinity group) were removed at 24 h intervals to monitor the growth of each culture and to determine the fatty acid composition. Growth was determined by removing a 1 ml sample of culture from each flask and enumerating the density of cells. A further 60 ml was taken for the fatty acid analysis. On removal, the 60 ml sample was centrifuged at 2500 rpm 10oC for 20 min. Thereafter the supernatant was discarded and the residual pellet was washed twice with 40 ml of 0.85% NaCl and then subjected to a second round of

centrifugation under the same conditions. After decanting the supernatant, the pellet was allowed to dry out in a 60°C for 18 h.

2.3 Fatty acid analysis

Once dried, 0.1 g from the relative *Pichia* sp. sample was ultra-sonicated in 20 ml ice-cold chloroform:methanol (2:1, v/v) containing 0.1 % butylated hydroxytoluene for 20 min before the liquid fraction was transferred to a separating funnel. The residual matter was then subjected to a second round of extraction after which the liquid portion was transferred to the separating funnel. To separate the non-lipid phase, 0.88% (w/w) KCl (approx. 25% of the total sample volume) was then added into the separated funnel, agitated to mix the contents and then left until the solution separated into two layers. Total lipid was obtained by filtering the lower layer through anhydrous sodium sulfate before evaporating the collected fraction. Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared from the total lipid by subjecting samples to acid-catalysed transesterification by adding 1% sulphuric acid and then incubating them at 50°C for 16 h (Christie, 1993). Gas-liquid chromatography (Agilent Technologies GC7820A, USA) was then used to determine the FAME, with individual FAMES being identified by comparison to known standards (PUFA No. 3, menhaden oil, Supelco, USA). The FAMES were split injected through a wall-coated capillary column (HP-Innowax column, 30 m × 0.25 mm id, 0.25 µm film thickness (Agilent J&W, USA) and detected via a flame ionization detector (FID). Helium gas was used as the carrier at a constant flow rate of 1.2 ml min⁻¹. The temperature program used was an initial 150°C for 0.5 min, increasing to 170°C at a rate of 5°C min⁻¹, hold at 170°C for 10 min, then increasing to 190°C at a rate of 3°C min⁻¹, and, then hold at 190°C for 28 min. Temperatures at the injection and detection ports were 230°C and 250°C respectively.

2.4 Statistical analysis

All data are presented as the mean ± S.D. Differences between samples were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey HSD *post-hoc* testing SPSS 17 for Windows. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Growth of the marine yeast *Pichia* sp.

Throughout the culture period, the pH of the SM media in all test flasks ranged from pH 5-6. The results revealed that the *Pichia* sp. cultured in SM25, i.e. the media containing the lowest salinity considered in the current trial, significantly ($p \leq 0.05$) had the greatest number of cells ml⁻¹ at each time point over the 192 h trial but cell numbers were seen to peak at 72 h (Figure 1). Cell numbers in the SM30 also peaked at 72 h while those in SM35 peaked at 120 h (Figure 1).

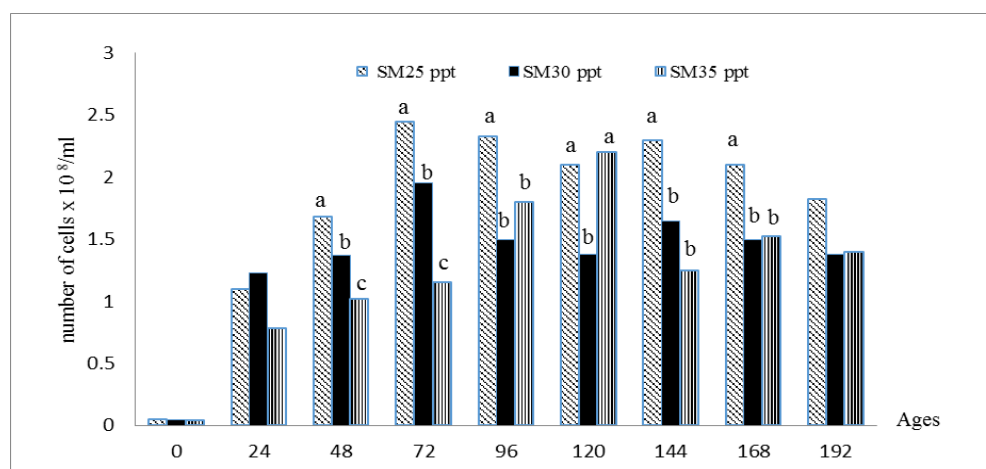


Figure 1. Growth of the marine yeast *Pichia* sp. cultured in sugarcane bagasse media adjusted to salinities of 25 (SM25), 30 (SM30) and 35 (SM35) ppt.

Given that the density of cells ml^{-1} versus time are important considerations in the production of live feeds for aquaculture, only the fatty acid composition of the samples taken at 72 h (*i.e.* peak of growth in SM25 and SM 30) and 120 h (*i.e.* peak growth in SM35) are presented here (Table 1). From the analysis of these, only palmitic acid (C16:0) was significantly affected ($p \leq 0.05$) by salinity where concentrations in SM35 were higher than those in SM25 and SM30. Although the concentration of saturated FA increased with rising salinity, while at the same time the amount of monounsaturated fatty acids (MUFAs) decreased with increased salinity, the differences between the tests groups were not significant (see Table 1). The concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), however, were consistent across the test samples. More generally, the FA compositions of all the cultures were similar: the monounsaturated fatty acids (MUFAs) were dominant representing 47-52% of the total fatty acid fraction (TFA), saturated FAs made up 31-37%, and, the polyunsaturated FAs (PUFAs) contributed about 17%. Within the MUFAs, the predominant FA was oleic acid (C18:1n9) which represented 42-47 % of the TFA; the dominant SFA was palmitic acid (C16:0) at 25-28 % of the TFA, and, linoleic acid (C18:2n-6) was the main PUFA representing approximately 17% of the TFA. The PUFA, linolenic acid (C18:3n-3), however, was only found in trace amounts (Table 1).

4. Discussion

The fatty acid composition of yeasts vary according to species and their source of nutrition and so alterations to local culture or environmental conditions will not only have an impact on growth but these changes may also effect modifications in their fatty acid composition (Gutierrez and Da Silva, 1993; Srivibool and Jaritkhuang, 2007; Chaung et al., 2012). A study conducted by Urano et al. (2001) working with halotolerant yeasts found that the number of yeast cells decreased with increasing salt concentrations but increased with higher levels of total organic carbon. This is supported by the findings from the current study where maximum cell density of the *Pichia* sp. cultured in either SM25 or SM30 peaked at 72 h, *i.e.* 48 h faster than that in SM35. Only the cell density of the SM25 culture, however, was significantly ($p \leq 0.05$) higher than that cultured in SM30 and SM35. When the fatty acid compositions of these cultures were compared, only the level of palmitic acid (C16:0) was significantly higher ($p \leq 0.05$); salinity had no other major effect on the FAs, which includes linoleic and linolenic acid, both of which are essential fatty acids for marine aquatic larvae. Essential fatty acids cannot be synthesised by marine aquatic animals and so these must be derived from their diet, *e.g.* the n-3 PUFAs - linolenic acid, eicosapentaenoic acid (C20:5n-3), docosahexaenoic acid (C22:6n-3), and the n-6 PUFAs - linoleic acid and arachidonic acid (C20:4n-6) (Sargent et al., 2002).

Table 1. The fatty acid composition of the marine yeast *Pichia* sp., expressed as percentages, that were cultured in a sugar cane bagasse based media adjusted to salinities of 25, 30 or 35 ppt salt. The yeast cultures were sampled at 72 h and 120 h when the growth of each test culture was at its peak.

Fatty acids	SM25 at 72 h	SM30 at 72 h	SM35 at 120 h
C14:0	0.71 $\pm$ 1.01	1.05 $\pm$ 0.38	0.59 $\pm$ 0.83
C16:0	24.25 $\pm$ 0.93 ^a	25.06 $\pm$ 0.82 ^a	28.24 $\pm$ 0.00 ^b
C18:0	5.48 $\pm$ 0.20	4.67 $\pm$ 1.28	8.24 $\pm$ 1.66
C16:1n7	2.90 $\pm$ 0.93	3.94 $\pm$ 2.42	3.53 $\pm$ 1.66
C18:1n9	47.20 $\pm$ 6.35	44.86 $\pm$ 7.51	42.35 $\pm$ 1.66
C20:1n9	1.45 $\pm$ 0.46	2.44 $\pm$ 1.88	0.59 $\pm$ 0.83
C18:2n6	17.65 $\pm$ 2.72	17.60 $\pm$ 4.40	16.47 $\pm$ 1.66
C18:3n3	Tr	Tr	tr
SFA	30.44 $\pm$ 1.74	30.78 $\pm$ 1.72	37.06 $\pm$ 2.50
MUFA	51.91 $\pm$ 4.46	51.61 $\pm$ 2.68	46.47 $\pm$ 0.83
PUFA	17.65 $\pm$ 2.72	17.60 $\pm$ 4.40	16.47 $\pm$ 1.66

Data are the mean $\pm$ sd of three replicates. Different superscript letters in the same row highlight statistical differences at $p \leq 0.05$ between test groups. tr = less than 0.05.

The current trial found that the *Pichia* sp. possessed had high percentages of oleic, palmitic and linoleic acids and although linolenic acid was found in only trace amounts, the results suggest that it is possible to culture the marine yeast *Pichia* sp. in sugarcane bagasse as the yeast retains EFA in their cells. These three fatty acids were also found in *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A and in *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 cultured in sugarcane molasses (Gutierrez and Da Silva (1993) and in torula yeasts cultured in vinasse, a by-product of the sugar industry (Rodríguez et al., 2012). The fatty acid profiles manifested by yeasts subjected to increasing levels of salinity are species dependent and can result in either decrements or increments of a particular fatty acid. The salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* was reported to exhibit only minor changes in its fatty acid composition when grown at different salinities while the salt intolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* when placed under salt stress had markedly lower levels of linolenic acid with a concomitant increase in the production of linoleic acid (Adler and Lijenbergh, 1981). Increasing the salt concentration in the culture media inoculated with the bacterium *Planococcus halophilus* NRCC 14033 resulted in a gradual increase in the amount of saturated, straight chain C16:0 and C18:0 also with increases in the production of the unsaturated FA C16:1n-9. At the same time, there was a decrease in the amount of saturated, branched chain ai-C15:0 and i-C16:0 and also in the unsaturated, straight chain C18:1 (Monteoliva-Sanchez and Ramos-Cormenzana 1987). In the present study, only the production of palmitic acid in the *Pichia* cultures were notably affected by an increased concentration of salt in the growth media. As lipids are an important structural component of cellular membranes, the increased production of palmitic acid in the SM35 cultures may be associated with changes in the membrane properties, such as fluidity and permeability, in response to increased levels of environmental salt.

In conclusion, the growth of the yeast *Pichia* sp. cultured in a sugar cane bagasse based media adjusted to 25 ppt salt (*i.e.* SM 25) peaked at 72 h when the cell density reached a maximum. Growth was significantly different ($p \leq 0.05$) from cultures grown in higher levels of salt (*i.e.* 30 and 35 ppt) but the production levels of the essential fatty acids linoleic and linolenic acid were unchanged. The study concludes that the species of *Pichia* investigated here could be cultured in SM25 and used as a live feed in the production of marine rotifers in the larval nutrition of many marine species. The mass culture of this marine yeast, however, requires further investigation and should be administered, as a feed, in conjunction with the use of microalgae to meet all the necessary nutritional requirements of the target aquaculture species.

5. Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the source of funding provided through an award from the National Research Council of Thailand administered through Burapha University.

6. References

- Adler, L., Liljenberg, C., 1981. Sterol Content, Fatty Acid Composition of Phospholipids, and Permeability of Labeled Ethylene Glycols in Relation to Salt Tolerance of Yeasts. *Physiologia Plantarum* 53, p 368-374.
- Barnett, J.A., Barnett, L., 2011. Yeast Research: a Historical Overview. American Society for Microbiology Press, 392 pp.
- Bhadra, B., Sreenivas Rao, R., Naveen Kumar, N., Chaturvedi, P., Sarkar, PK, Shivaji, S., 2007. *Pichia cecembensis* sp. nov. Isolated from a Papaya Fruit (*Carica papaya* L., Caricaceae). *FEMS Yeast Research* 7, p. 579–584.
- Chaung, K.C., Chu, C.Y., Su, Y.M., Chen, Y.M., 2012. Effect of Culture Conditions on Growth, Lipid Content, and Fatty Acid Composition of *Aurantiochytrium mangrovei* strain BL10. *AMB Express*, p. 42-53.

- Chi, Z.M., Chi, Z., Zhang, T., Yue, L., Li, J., Wang, X., 2009. Production, Characterization and Gene Cloning of the Extracellular Enzymes from the Marine-derived Yeasts and Their Potential Applications. *Biotechnology Advances* 27, p. 236–255.
- Christie, W. W., 2003. *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. The Oily Press, Bridgewater, UK, 416 pp.
- Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P., 2007. Review Article: Yeast as Probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology Therapeutics* 26, p. 767–778.
- Du Toit, P.J., Olivier, S. P. and Van Biljon, P. L., 1984. Sugar Cane Bagasse as a Possible Source of Fermentable Carbohydrates. 1. Characterization of Bagasse with Regard to Monosaccharide, Hemicellulose, and Amino Acid Composition. *Biotechnology and Bioengineering* 26, p. 1071-1078.
- Gutierrez, L. E., Da Silva, R. C. M., 1993. Fatty acid Acid Composition of Cane Molasses and Yeasts. *Sciagric, Piracicaba* 50, p. 473-477.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffany, D., 2006. Environmental, Economic, and Energetic Costs and Benefits of Biodiesel and Ethanol Biofuels. *Proceeding of the National Academy of Science* 103, p. 11206–11210.
- Hunter, k., Rose, A. H., 1971. Yeast Lipids and Membrane. *The Yeast* 2, p. 211 - 270.
- James, C. M., Dias, P., Salman, E., 2004. The Use of Marine Yeast (*Candida* sp.) and Bakers' Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in Combination with *Chlorella* sp. for Mass Culture of the Rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 147, p. 263-268.
- Kandasamy, K., Alikunhi, N.M., Subramanian, M., 2012. Yeasts in Marine and Estuarine Environments. *Journal of Yeast and Fungal Research* 3, p. 74-82.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., 2000. *The Yeasts: a Taxonomic Study*, 4th Revised and Enlarged Edition. Elsevier, Amsterdam, pp 1–525.
- Lee, C.F., Liu, C.H., Young, S.S., Chang, K.S. 2008. *Kazachstania jiainicus* sp. nov., an Ascomycetous Yeast Species Isolated from Soil in Taiwan. *FEMS Yeast Research* 8, p.114–118.
- Liu, C.H., Young, S.S., Chang, T.C., Lee, C.F. 2008. *Candida dajiaensis* sp. nov., *Candida yuanshanicus* sp. nov., *Candida jianshihensis* sp. nov., and *Candida sanyiensis* sp. nov., Four Anamorphic, Ascomycetous Yeast Species Isolated from Soil in Taiwan. *FEMS Yeast Research* 8, p.815–822.
- Matsushika, A., Watanabe, S., Kodaki, T., Makino, K., Sawayama, S., 2008. Bioethanol Production from Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Expressing Xylose Reductase, NADP(+)-Dependent Xylitol Dehydrogenase, and Xylulokinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105, p. 296–299.

- Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A., 1987. Cellular Fatty Acid Composition of *Planococcus halophilus* NRCC 14033 affected by Growth Temperature and Salt Concentration. *Current Microbiology* 15, p.133-136.
- Nisiotou, A.A., Gibson, G.R., 2005. Isolation of Culturable Yeasts from Market Wines and Evaluation of the 5.8S-ITS rDNA Sequence Analysis for Identification Purposes. *Letters in Applied Microbiology* 41, p. 454–463.
- Nyanga, L.K., Nout, M.J., Gadaga, T.H., Theelen, B., Boekhout, T., Zwietering, M.H., 2007. Yeasts and Lactic Acid Bacteria Microbiota from Masau (*Ziziphus mauritiana*) Fruits and Their Fermented Fruit Pulp in Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology* 120, p.159–166.
- Oestmann, D.J., Lewis, D. H., 1995. A Method for Producing Microbe-free *Amyloodinium ocellatum* (Brown) with Percoll. *Veterinary Parasitology* 59, p. 169-175.
- Passoth, V., Schnürer, J. 2003. Non-Conventional Yeasts in Antifungal Application. In “Functional genetics of industrial yeast” de Winde, J.H. Editor. Springer Verlag, Berlin, p. 297–319.
- Patterson, J. A., Burkholder, K. M., 2003. Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production. *Poultry Science* 82, p. 627–631.
- Rao, R.S., Bhadra, B., Shivaji, S. 2008. Isolation and Characterization of Ethanol-Producing Yeasts from Fruits and Tree Barks. *Letters in Applied Microbiology* 47, p. 19–24.
- Rodríguez, B., Iben, C., Valdivié, M., Martínez. M., 2012. Profile of Fatty Acids from *Torula* Yeast (*Candida utilis*) Grown on Distiller’s vinasse. Technical note. *Cuban Journal of Agricultural Science* 46, p.199-201.
- Sargent, J. R., Tocher, D.R., Bell, J. G., 2002. The lipids. In “Fish Nutrition 3rd” Halver, J.E., Hardy, R.W. Editors. Academic Press, San Diego, pp. 188-257.
- Spencer, J. F. T., Spencer. D.M., 1997. Yeasts in natural and artificial habitats. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. 373 pp.
- Srivibool, R., Jaritkhuan, S., 2007. “Marine Yeast: a New Alternative Source for Highly Unsaturated Fatty Acids.” 2nd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. Khon Kaen, Thailand, p 4-3.
- Urano, N., Yamazaki, M., Ueno, R., 2001. Distribution of Halotolerant and/or Fermentative Yeasts in Aquatic Environments. *Journal of the Tokyo University of Fisheries* 87, p. 23-29.
- Wang, G.Y., Chi, Z., Song, B., Wang, Z.P., Chi, Z.M., 2012. High Level Lipid Production by a Novel Inulinase-Producing Yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. *Bioresource Technology* 14, p, 124:77-82.
- Watanachote, J., Siranonthana, N., Watanadilok, R., Srivibool, R., 2012. “PUFAs in Marine Yeast Isolated from Coastal Water, Thailand”. International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology. Khon Kaen, Thailand. p. 350- 356.

Yanagida, F., Kodama, K., Shinohara, T. 2002. Selection of Marine Yeast Stock for Making White Wine. *Journal of the Brewing Society of Japan* 97, p. 150–161.

Distribution of Actinomycetes in Thai Mangrove Sediments

Rattanaporn Srivibool^{a,1}, Rawiwan Watanadilok^a

^a*Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand*

Abstract

Mangrove forest ecosystems are rich in microorganisms including actinomycetes. In this study, 24 sediment samples were collected from mangrove areas in Nakorn Si-Thammarat, Chumporn and Rayong provinces on the east coast and west coast of the Gulf of Thailand. Actinomycetes were isolated by several selective media, then were characterized and screened for antimicrobial and antioxidant activities. Actinomycetes were recovered in total 83 isolates from the 3 provinces, 55 from Nakorn Si-Thammarat, 16 from Chumporn and 12 from Rayong mangrove sediments. The actinomycetes recovered from Nakorn Si-Thammarat mangrove were rather diverse in different family, which were mainly *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Streptoalloteichus* and some unidentified genera; where as those found from Rayong and Chumporn mangroves were rather diverse mainly in same family in Actinoplanetes: *Virgisporangium*, *Micromonospora*, *Salinispora* and *Spirilliplanes* in which the colonies are small and in orange, brown or black which could differentiate to each other by chemotaxonomy and morphology studies. Although in Rayong and Chumporn mangrove areas did not obtain many anti-microbial producing strains as those obtained from Nakorn Si-Thammarat, we believed that by other method of antimicrobial investigation more antimicrobial producing strains would be found. Antioxidant activity by selected isolates from all areas reveal actinomycetes recovered from mangrove areas are potential source of lead antioxidant compounds.

© 2015 Published by Burapha University.

Keywords: Actinomycetes; mangrove sediments; antioxidant; antimicrobial

1. Introduction

Actinomycetes, gram positive bacteria with high G+C content, occur widely in both terrestrial and aquatic environments; many species are saprophytic and are important in soil ecology [Zhao et al., 2004]. As other soil microbes in sediment, actinomycetes play an important role in organic matters decomposition and mineral recycling. Importantly, they have contributed a wide range of biologically active compounds, notably antibiotics for clinical use and as therapeutic agents. Of the 3000+ microbial products possessing some biological activity as listed by the Antibiotic Literature Database (ABL) - Bioresearch Italia Database, the greatest contribution are made up of those isolated from actinomycetes [Lazzarini et al., 2000], many of which are from the genus *Streptomyces*. The search for novel actinomycetes and the discovery of new antibiotics for use within the medical industry is driven by the development of resistance among a number of pathogens [Bernan and Grensteun, 2004] and the emergence of new disease conditions [Taylor et al., 2001]. However, over the last few decades, the rate of new compounds being discovered from common, soil-derived actinomycetes has declined and focus has shifted investigating the vast and largely unexplored marine environment. Several studies have indicated that a diverse community of actinomycetes occur within marine sediments, even at considerable depths [Jensen and Lauro, 2008; Maldonado et al., 2005b; Pathomaree et al., 2005; Bredholdt et al., 2007] and that these may provide a new source of novel antibiotic compounds [Fiedler et al., 2005; Hernandez et al., 2004; Hong et al., 2009; Imada, 2005]. The search for novel antibiotics is sustained by the challenges imposed by antibiotic resistant pathogens on human health [Bernan et al., 2004] and by the emergence of new diseases [Taylor et al., 2001]. The purpose of the current study was to conduct a preliminary search for the distribution of actinomycete isolates that have potential

* Corresponding author. Tel.: +66-38-391-671; fax: +66-38-391-674.
E-mail address: rattanap@buu.ac.th.

antimicrobial producing strains from mangrove sediments collected both sides the Gulf of Thailand and to evaluate their antibiotic and antioxidant activities.

2. Materials and Methods

2.1 Sampling of sample sediments

Sediment samples were collected from three main mangrove forests both east and west of the Gulf of Thailand in Nakorn Si-Thammarat, Chumporn (n=9, Ban Natung, Ban Nacha-ang, and Park Canal; Rayong (n=8) All sites being along the western and eastern margins of the Gulf of Thailand. From mangrove forest ecological systems connected to the sea, 24 samples were taken and kept in sterile plastic bags. In each case, the sediment sample was taken from the sediment surface close to rhizosphere of plants at the mangrove site with a spatula. The samples were then transferred to the Bangsae Institute of Marine Science (BIMS) for processing and actinomycete isolation.

2.2 Isolation methods

Sediment samples were pretreated in two ways: heated for 1 h at 100°C and/or 30 min treated with 1.5% phenol before isolation [Nonomura, 1988; Hayakawa, 1990; Hayakawa, et al., 1991; Hayakawa, 2008]. Each treated substratum sample was processed, diluted with natural sea-water at 10^{-1} and 10^{-2} of 10-fold dilution prior to inoculation on the selected isolation media. The selective media used were: starch casein agar (SCA), actinomycete isolation agar (AIA) and malt extract-yeast extract medium (ISP2) for samples from Nakorn Si- Thammarat- and Rayong-mangrove sediments; and SCA, M4 and humic acid vitamin agar (HV) for samples from Chumporn-mangrove sediments. An equal volume of natural seawater was added to all isolation media. All isolation media were supplemented with 25 µg/mL novobiocin and 50 µg/mL nystatin to prevent the growth of other Gram-negative bacteria and fungi. The isolation plates were then incubated at 30°C and checked at regular intervals over a 4 week period for the appearance of actinomycete colonies. Actinomycete colonies appearing on the plates were subsequently purified and then kept on agar slants for subsequent investigation of antimicrobial and antioxidant activities and also in 20% glycerol which were then stored at -80°C for longer term preservation.

2.3 Screening of antimicrobial activity

The antimicrobial activity of all isolates were tested against *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 517, MRSA22 and *Candida albicans* TISTR 5235 provided by Thailand Institute of Scientific and Technological Research, TISTR, using the cross streak technique. The actinomycete isolates were cultured for 4-6 days at one side of the cultured plates before the 18 h test strains, 0.5 McFaland, were perpendicular streaked across by sterile cotton buds and continued incubation for another 24 h period.

2.4 Screening of antioxidant activity

Some pigmented and/or antimicrobial producing isolates were selected to investigate for antioxidant activity. To achieve the amount of secondary bioactive metabolites using, the actinomycetes isolates were cultured in ISP2 medium for at least 3 L at 30° C and shaken at 110 rpm for 7-10 d. After a 7 or 10 day incubation period, the mycelium and culture broth were separated by centrifugation. Actinomycete cultured medium was extracted by ethyl acetate, in separating funnel, shaken for a few minutes, and then the solvent layers were evaporated under vacuum (Buchi RE111). The crude extracts were then transferred into small vials using sterile Pasteur pipettes and dried with N₂ gas. Antioxidant activities of the components were preliminary investigated by thin layer chromatography technique, by DPPH radical [Alessandra et al., 2002].

2.5 Morphological characteristics

The inclined coverslip technique [Williams et al., 1989] was used to observe the type of spore chains, the aerial and substrate mycelium that were produced by each actinomycete isolate from each sediment sample. Some of the antibiotic producing strains were selected for further examination by scanning electron microscopy to determine the ultrastructure of the spore chain morphology and the ornamentation of the spore surface.

2.6 Chemotaxonomical study

The isomeric forms of diaminopimelic acid (DAP) and diagnostic sugars in whole-cell hydrolysates were determined by thin layer chromatography as described by Lechevalier et al., 1973. The strains were identified to genera according to Williams et al. [1989] and Maldonado et al. [2005a].

3. Results and Discussion

Actinomycetes recovered from all areas were obtained in total 83 isolates, 55 from Nakorn Si-Thammarat, 16 from Chumporn and 12 from Rayong mangrove sediments. The mangrove area in Nakorn Si-Thammarat is located some distance in land and the sediments are wet and dry according to the high and low tide each day, anyway the soil sediment is rather fertile with more plant debris and materials than the mangrove in Chumporn and Rayong provinces in which the areas are next to the sea with sandy sediments. Actinomycetes found from Nakorn Si-Thammarat mangrove were diverse in Family and genera and *Streptomyces* were dominant, whereas those found in Chumporn and Rayong mangroves were mainly in Family *Micromonosporaceae* (Table 1).

Identification into genera of the recovered isolates were done by morphological study and chemical analysis of cell wall DAP, including sugar pattern in whole-cell hydrolysates (Fig 1). In this study in land mangrove area was inhabitant of some other rare actinomycete genera such as *Thermoactinomyces*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Nocardia*, *Streptoalloteichus* and some unidentified genera whereas the outer mangroves which connect to the sea less *Streptomyces* and many genera in Family *Micromonosporaceae* were found. In Chumporn mangrove, 2 isolates of potentially antibiotic producing *Streptomyces* were found among the rare actinomycetes, whereas all isolates recovered from Rayong mangrove were members of the Family *Micromonosporaceae*, but rather diverse in genera anyway (Table 1).

Out of 55 isolates recovered from Nakorn Si-Thammarat mangrove, 27 isolates were antimicrobial producing strains, mostly to gram positive bacteria, 4 isolates to both gram positive bacteria and *C. albicans* and 4 isolates to only *Candida albicans* (Table 2). On the other hand, those recovered from Chumporn and Rayong mangrove sediments rarely produced antimicrobial substances by cross streak investigation which might be the active metabolites were not water soluble or were still inside cell membranes.

Table 1. Some morphological and chemical studies of representative isolates recovered from all areas. (Williams, et al., 1989 and Maldonado, et al., 2005a)

Isolate ID	Aerial mycelium	Substrate mycelium	DAP type	Sugar Pattern	Identified
NS1-2	W	Bn	Meso-DAP	-	<i>Thermoactinomyces</i>
NS1-4	Gy	LO		Ara, Gal	Unidentified
NS1-5	W	Bn	Meso-DAP	-	<i>Thermoactinomyces</i>
NS1-6	none	DBn	Meso-DAP	-	<i>Micromonospora</i>
NS1-7	none	C	Meso-DAP	Xyl, Ara	<i>Micromonospora</i>
NS2-2	W	Bn	Meso-DAP	-	<i>Nocardiopsis</i>
NS2-3	Gy	Bn	LL-DAP	-	<i>Streptomyces</i>
NS2-5	Gy	Bn	LL-DAP	-	<i>Streptomyces</i>
NS3-1	W	DBn	Meso-DAP	Rhm, Man, Gal	<i>Streptoalloteichus</i>
NS3-2	W	YBn	LL-DAP	Gal	<i>Streptomyces</i>
NS3-3	W	YBn	LL-DAP	-	<i>Streptomyces</i>
NS3-5	W->Gy	BnBk	LL-DAP	-	<i>Streptomyces</i>
NS3-7	W->Gy	YBn	LL-DAP	-	<i>Streptomyces</i>
NS3-8	W	PkBn	Meso-DAP	-	<i>Nocardiopsis</i>
NS3-9	W	C	Meso-DAP	Ara, Gal	<i>Nocardia</i>
NS3-10	W	PkBn	LL-DAP	-	<i>Streptomyces</i>
NS3-11	W	Bn	Meso-DAP	-	<i>Thermoactinomyces</i>
NS3-12	none	Bn	Meso-DAP	Xyl, Ara	<i>Micromonospora</i>
NS4-1	WBn	LY	LL-DAP	-	<i>Streptomyces</i>

NS4-2	W	PkBn	Meso-DAP	Gal, Man, Rhm	<i>Streptoalloteichus</i>
NS4-4	Gy	WGy	LL-DAP	Gal, Man	<i>Streptomyces</i>
NS4-6	W->BnGy	Bn	LL-DAP	Gal	<i>Streptomyces</i>
NS4-8	Gy	Gy	LL-DAP	-	<i>Streptomyces</i>
NS5-1	LGy	Bn	LL-DAP	-	<i>Streptomyces</i>
NS5-3	LGy	Bn	LL-DAP	-	<i>Streptomyces</i>

Table 1. (continued)

Isolate ID	Aerial mycelium	Substrate mycelium	DAP type	Sugar Pattern	Identified
NS5-4	WBn	Bn	LL-DAP	Gal	<i>Streptomyces</i>
NS6-2	LGy	YBn	LL-DAP	-	<i>Streptomyces</i>
CP2-2	none	O	Meso-DAP	Xyl, Ara, Gal	<i>Salinispora</i>
CP3-1	none	LO	Meso-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	<i>Virgisporangium</i>
CP-PH3-2	none	O	Meso-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	<i>Virgisporangium</i>
CP-PH3-9	none	BkO	Meso-DAP	Xyl, Ara	<i>Micromonospora</i>
CP-PH3-12	none	BkO	Meso-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	<i>Virgisporangium</i>
CP-PH3-13	none	LO	Meso-DAP	Xyl, Ara, Man, Gal	<i>Salinispora</i>
CP-PH3-22	none	O	Meso-DAP	Xyl, Ara	<i>Micromonospora</i>
CP8-4 A	Bn	Bn	LL-DAP	-	<i>Streptomyces</i>
RY2-20	none	LBn	Meso-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	<i>Virgisporangium</i>
RY2-22	none	LBn	Meso-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	<i>Virgisporangium</i>
RY2-24	none	OBn	Meso-DAP	Xyl, Ara	<i>Micromonospora</i>
RY2-25	none	OBn	Meso-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	<i>Virgisporangium</i>
RY3-32	none	Bk	Meso-DAP	Ara, Gal, Xyl	<i>Salinispora</i>
RY3-37	none	BkBn	Meso-DAP	Gal, Xyl	<i>Spirilliplanes</i>
RY7-8	none	OBn	Meso-DAP	Gal, Xyl	<i>Spirilliplanes</i>
RY8-3	none	OBn	Meso-DAP	Gal, Xyl	<i>Spirilliplanes</i>
RY8-8	none	OBn	Meso-DAP	Gal, Xyl	<i>Spirilliplanes</i>

Note: NS = Nakorn Si-Thamarat; CP = Chumporn; RY = Rayong; Ara = arabinose; Gal = Galactose; Man = Mannose; Rhm = Rhamnose; Xyl = Xylose; Bk = black; BkBn = blackish brown; BkO = blackish orange; Bn = brown; BnGy = brownish gray; C = cream; DBn = dark brown; Gy = gray; LGy = light gray; LO = light orange; LY = light yellow; O = orange; OBn = orange brown; PkBn = pinkish brown; W = white; WGy = whitish gray; YBn = yellow brown.

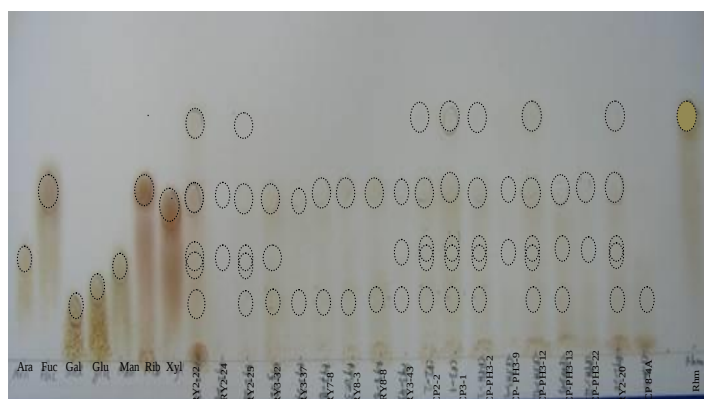


Fig 1. Chromatogram showed the diagnostic sugar pattern in some of isolates recovered from Rayong and Chumporn mangroves.

Table 2. Antimicrobial and antioxidant activities (IC_{50}) in some of the isolates recovered from Nakhon Si Thammarat, Chumporn and Rayong mangroves.

Isolate ID	Color of spore mass	Color of substrate	Antibiosis to (Distance of inhibition zone, mm)				IC_{50} DPPH scavenging ($\mu g/mL$)
			<i>B. subtilis</i>	MRSA21	MRSA22	<i>C. albicans</i>	
NS1-2	C	RO	15.0	5.0	-	-	NA
NS1-4	Gy	O	26.0	22.0	15.0	-	NA
NS1-5	W	Bn	12.0	-	-	-	NA
NS1-9	Gy	Y	20.0	-	-	-	NA
NS2-2	W	Bn	-	5.0	3.0	-	337.3 $\pm$ 34.2
NS2-3	Gy	Bn	-	5.0	3.0	-	56.6 $\pm$ 0.4
NS2-5	Gy	Bn	5.0	5.0	5.0	-	64.8 $\pm$ 1.2
NS3-1	W	DY	20.0	-	20.0	-	>400
NS3-2	W	Y	22.0	-	16.0	-	>400
NS3-3	W	YBn	30.0	-	-	5.0	NA
NS3-5	BkBn	YBn	-	-	-	28.0	NA
NS3-7	Gy	YBn	-	-	-	2.0	>400
NS3-8	W	P	-	-	20.0	-	NA
NS3-9	W	C	15.0	-	-	-	NA
NS3-10	W	PY	-	-	22.0	-	NA
NS4-1	Bn	LY	-	-	-	28.0	NA
NS4-4	Gy	WGy	15.0	-	-	12.0	>400
NS4-6	W..>BnGy	Bn	20.0	15.0	10.0	2.0	329.9 $\pm$ 57.5
NS5-1	Bn	Bn	-	-	-	-	>400
NS5-3	WGy	Bn	19.0	15.0	-	-	190.3 $\pm$ 5.9
NS5-4	LBn	Bn	32.0	20.0	-	-	>400
NS6-2	Gy	YBn	-	-	-	3.0	>400
CP-PH3-2	none	O	-	-	-	-	133.1 $\pm$ 4.0
CP-PH3-9	none	BkO	-	-	-	-	329.9 $\pm$ 7.9
CP8-4A	Bn	Bn	15.0	13.0	13.0	8.0	>400
RY2-20	none	LBn	-	-	-	-	294.23 $\pm$ 7
Ascorbic acid							2.8 $\pm$ 0.11

Note: - = inactive; NA = Not applicable; NS = Nakorn Si Thammarat; Bn = brown; Bk = black; BkBn = blackish brown; BkO = blackish orange; BnGy = brownish gray; C = cream; DY = dark yellow; Gy = gray; LY = light yellow; LBn = light brown; O = orange; P = pink; PY = pinkish yellow; RO = red orange; W = white; WGy = whitish gray; YBn = yellow brown;

The DPPH radical scavenging assay is commonly employed in evaluating the ability of antioxidants to scavenge free radicals. The more rapidly the absorbance decreases, the more potent the antioxidant activity of the extract due to its hydrogen atom donating ability. Among the isolated actinomycetes were screened for antioxidant activity using 1,1, diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) stable radical scavenging. The ethyl acetate extracts of NS2-3 and NS2-5 exhibited strong DPPH radical scavenging activity at the IC₅₀ value of 56.6±0.4 and 64.8±1.2 µg/mL, respectively. The extracts of CP-PH3-2 and NS5-3 showed good antioxidant activity whereas the five extracts of NS2-2, NS4-6, CP-PH3-9, CP-PH3-13 and RY2-20 were less active. However, the scavenging activity of extracts was less than that of standard ascorbic acid (IC₅₀ 2.8±0.11 µg/mL). The result of this study indicated that the crude extracts have the proton-donating ability and they are potential source for isolation of lead antioxidant compounds to reduce free radical induced tissue injury.

It has been estimated that the actinobacteria usually found only a small fraction of the bacteria flora in the marine [Goodfellow and Williams, 1985], but consequently, it was found up to 9% in marine sediments [Bull et al., 2005]. In this finding, more different genera and more diverse of actinomycete morphology were found in the inland mangrove sediments than those found in marine sediments. There was convincing evidence that actinomycetes were adapted to marine habitats [Moran, et al., 1995; Mincer et al., 2002]. From our finding, in marine sediments, *Streptomyces* were scarce whereas members of *Micromonosporaceae* were abundant and often found. Although the isolates in member of *Micromonosporaceae* did not show the ability of antimicrobial metabolites by cross streak, other methods of investigation are necessary as many reports found novel active compounds from this group of actinomycetes [Romero, et al., 1997; Fiedler et al., 2008, Williams, et al., 2005 and Jensen et al, 2007]. However, these results revealed that Thai mangrove sediments are a good source to search for both active antimicrobial and antioxidant compounds from both rare and non-rare species.

4. Acknowledgements

This work was supported by the Research Grant of Burapha University through Nation Research Council of Thailand (Grant no. 2557A10803041 and 2556A10801006).

5. References

- Alessandra, B., Chandra, S., Matteo, P., Lvano, M., Jeannete, M., 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*, Journal of Ethnopharmacology 79, p. 379.
- Bull, A.T., Stach, J. E., Ward, A. C. and Goodfellow, M. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions, *Antonie van Leeuwenhoek* 87, p. 65.
- Bernan, V.S., Grensteun, M., Carter, G.T., 2004. Mining marine microorganisms as a source of new antimicrobial and antifungals, *Current Medical Chemical-Anti-Infective Agents* 3, p.18.
- Bredholdt, H., Galatenko, O.A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L.P., Zotchev, S.B., 2007. Rare actinomycetes bacteria from the shallow water sediments from of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity, *Environmental Microbiology* 9, p. 2756.
- Fiedler, H.P., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C., Mihm, G., 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek* 87, p.37.
- Goodfellow, M., and Williams, S. T. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 37, p. 189.
- Hayakawa, M., 1990. Studies on selective isolation methods and distribution of soil Actinomycetes, *Actinomycetology* 4, p. 103.
- Hayakawa, M., Tamura, T., Nonomura, H., 1991. Selective isolation of *Actinoplanes* and *Dactylosporangium* from soil by using γ -collidine as the chemoattractant, *Journal Ferment Bioengineering* 72, p. 426.
- Hayakawa, M., 2008. Studies on the isolation of rare actinomycetes in soil, *Actinomycetol* 22, p. 12-19.
- Hernandez, I.L.C., Macedo, M.L., Berlinck, R.G.S., Ferreira, A.G., Godinho, M.J.L., 2004. Dipeptide metabolites from the marine derived bacterium *Streptomyces acrymicini*, *Journal of The Brazillian Chemical Society* 1, p. 441.

- Hong, K., Gao, A-H., Xie, Q-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H-P., Yu, H-P., Yao, S-H., Goodfellow, M., Ruan, J-S., 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China, *Marine Drugs* 7, p. 24.
- Imada, C., 2005. Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes, *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, p. 59.
- Jensen, P.R., Williams, P.G., Oh, D.C., Zeigler, L., Fenical, W. 2007. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*, *Journal of Applied Environmental Microbiology* 73, p. 1146
- Jensen, P.R., Lauro, F.M., 2008. An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment, *Antonie van Leeuwenhoek* 94, p. 51.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., Marinelli, F., 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics, *Antonie van Leeuwenhoek* 78, p. 399.
- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H., Horan, A.C., 1973. Chemical characteristic and classifications of Nocardiae, *Canadian Journal of Microbiology* 19, p. 965.
- Maldonado, L.A., Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Mincer, T. J., Ward, A. C., Bull, A. T., Goodfellow, M. 2005a. *Salinispora arenicola* gen. Nov., sp. Nov. And *Salinispora tropica* sp. Nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, p 1759.
- Maldonado, L.A., Stach, J.E.M., Pathomaree, W., Ward, A.C., Bull, A.T., Goodfellow, M., 2005b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments, *Antonie van Leeuwenhoek* 87, p. 11.
- Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2002. Widespread and persistent population of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Journal of Applied Environmental Microbiology* 68, p. 5005.
- Moran, M.A., Rutherford, L. T., Hodson, R. E. 1995. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Journal of Applied Environmental Microbiology* 6, p. 3695.
- Nonomura, H., Hayakawa, M., 1988. New methods of the selective isolation of soil Actinomycetes. In: Y. Okami, T. Beppu, H. Ogawara, *Biology of Actinomycetes '88* ed. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p. 288.
- Pathomaree, W., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., Goodfellow, M., 2005. Diversity of actinomycetes isolated from the challenger deep sediment (10898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* 10, p. 181.
- Romero, F., Espliego, F., Bas, J. P., Quesada, T. G., Gravalos, D., Calle, F., Fernandez-Puentes, J. L. 1997. Thiocoralline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*, *Journal of Antibiotics* 50, p.734.
- Taylor, L.H., Latham S.M., Woodhouse, M.E.J., 2001. Risk factors from human disease emergence, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 356, p. 983.
- Williams, S.T., Sharpe, M.E., Holt, J.G., (eds), 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4, Williams & Wilkins, Baltimore, P. 2333.
- Williams, P.G., Buchanan, G.O., Feling, R.H., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2005. New cytotoxic salinosporamides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*, *Journal of Organic Chemistry*, 70, p. 6196.
- Zhao, H. Y., Kassama, M., Young, D. B. Kell, R. G., 2004. Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique, *Applied and Environmental Microbiology* 70, p. 6619.

Biodiversity of Antimicrobial Producing Actinomycetes in Coastal Marine Sediments

¹Rattanaporn SRIVIBOOL, ²Trisukon MALI and ¹Rawiwan WATANADILOK

Email: rattanap@buu.ac.th

(¹Research Division, Institute of Marine Science, Burapha University, Thailand

²Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University)

Abstract

Coastal mangrove sediments were collected and isolated for antimicrobial producing actinomycetes. The study areas were in Chachoengsao, Chonburi and Nakhon Si Thammarat Provinces. Out of 12 samples, 5 from Chachoengsao, Chonburi and 7 from Nakhon Si Thammarat gave a total of 102 isolates, 47 from Chachoengsao and Chonburi and 55 from Nakhon Si Thammarat. It was found that 7 actinomycetes recovered from Chachoengsao and Chonburi were active to either *Candida albicans* or Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) tested while there were 27 active isolates from those recovered from Nakhon Si Thammarat. By chemical analysis of wall diaminopimelic acid and sugar pattern including morphological studies revealed that the active isolates were moderately diverse in genera level and were more diverse in species level from both areas.

Keywords: Antimicrobial, actinomycetes, mangrove

Type of presentation: N/A

Morphological study of antimicrobial actinomycete producing isolates from marine sediments

Srivibool Rattanaporn. -.¹

¹Institute of marine Science, Burapha University, Chonburi. 20131. Thailand

Email of the presenting author: rattanap@buu.ac.th

Actinomycetes are gram positive bacteria in which many bioactive compounds are generally produced. Over past decade information on the diversity of actinobacteria in marine habitats has grown considerably. In this study, morphological and chemical characteristics of wall chemotype were investigated for a rapid method of basically classification. The location of sediment sampling areas were in Chonburi and Bang-pakong mangrove forests in the east and Nakhon Si-thamarat mangrove in the west of the Gulf of Thailand, including marine shallow water coastal area in the east coast. The sediment samples were pre-treated with dry heat at 100o C for 1 h before dilution and spreading on selective medium plates, incubated at 30o C for 4 weeks. Morphological study was observed both under light microscope and scanning electron microscopy. The results revealed that most active isolates from Chonburi mangrove area were Streptomyces with rectiflexibile, spiral and hook spore chain types, while the isolates from Bang-pakong and the west side of the Gulf manifested various different morphological types. The active isolates from marine sediments mostly produced single spore chain type on short or long sporophores or produced in a bundle of Micromonospora and Salinispora, respectively; including a few white spore mass Streptomyces. The electronmicrographs of many isolates could reveal more different morphological detail to consider they were same or different species. Apart of morphological and chemical characteristic studies, some of representative actinomycetes were selected to identified by 16S rRNA gene sequencing. The active isolates from mangrove and marine sediments are moderately diverse in genera, but clearly shown they are morphologically diverse and are rich sources to screen for valuable bioactive compounds.

Acknowledgement: Acknowledgements: The financial support from the NRCT through the Burapha University budget was gratefully acknowledged.

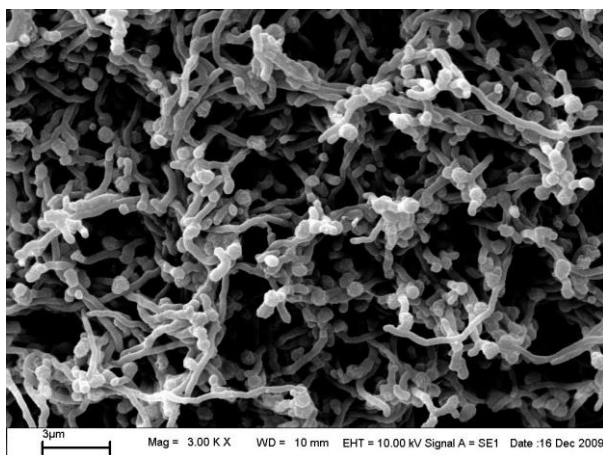


Fig. 1: Single spores are formed on short sporophores of hyphae of *Micromonospora* from marine substrate hyphae of *Micromonospora* on ISP2 medium, 7 days old, 3000X.

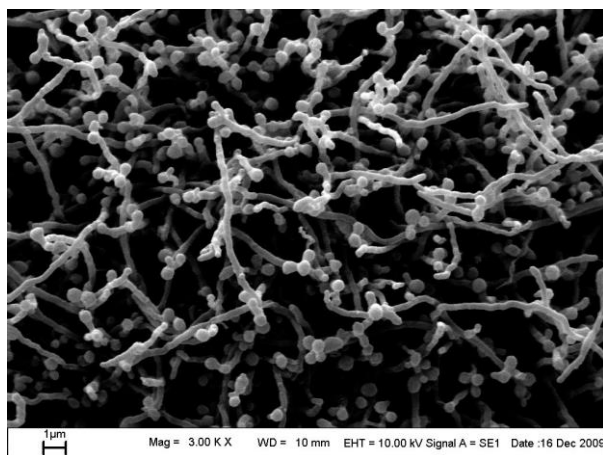


Fig. 2: Single spores are formed on short sporophores of substrate hyphae of *Micromonospora* on ISP2 medium, 7 days old, 3000X.

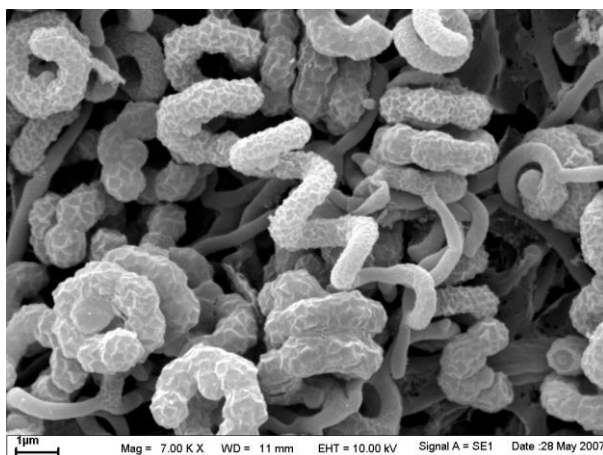


Fig. 3: Spiral spore chain type, rugose, of *Streptomyces* on ISP2 medium, 7 days old, 7000X.

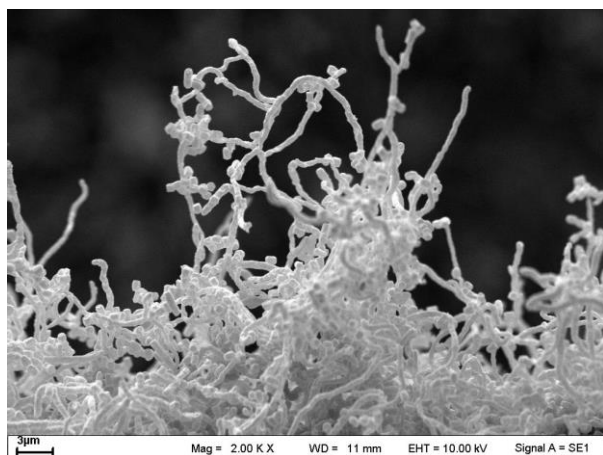


Fig. 4: Rectiflexible and hook spore chains are formed on arial mycelia of *Streptomyces* isolated from mangrove sediment, 7 days old, 2000X.

Antimicrobial Activity of Actinomycetes Isolated from Mangrove Sediments.

Rattanaporn Srivibool* and Rawiwan Watanadilok

Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi 20131 Thailand

Abstract

Sixteen actinomycete isolates were isolated using three types of media, SCA, HA and M4, from mangrove sediment collected at different locations from Chumporn province. All the isolates were screened for antibacterial activity by cross streak method. While the antioxidant activity of the crude extract was assessed by DPPH scavenging activity. It was found that isolates CP 8-4A and CP 8-4B were active against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, MRSA 22 and *Candida albicans*. The isolates CP-PH3-2 showed good antioxidant activity with the IC₅₀ value of 133.1±4.0 µg/mL while the inhibition of the standard antioxidant ascorbic acid showed strong inhibition with the IC₅₀ value of 1.9.1±0.16 µg/mL.

Keywords : Actinomycete, antioxidant activity, antimicrobial activity

*Corresponding author. E-mail : rattanap@buu.ac.th

**สรุปผลการประเมินผลความพึงพอใจและความคิดเห็นผู้เข้าร่วมฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง “ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของ
จุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัตว์จรัสโรงเรียน”**

วันที่ ๑ เดือนสิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๗

ณ โรงเรียนสาธิต "พิบูลบำเพ็ญ" มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

จากการสอบถามความพึงพอใจและความคิดเห็นของผู้เข้าร่วมโครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัตว์จรัสโรงเรียน” วันที่ ๑ เดือนสิงหาคม ๒๕๕๗ ณ โรงเรียน "สาธิตพิบูลบำเพ็ญ" มหาวิทยาลัยบูรพาเก็บข้อมูลจากผู้เข้าร่วมโครงการจำนวนทั้งสิ้น ๖๒ คนตอบแบบสอบถามจำนวน ๔๐ คนคิดเป็นร้อยละ ๖๔.๕๒ สรุปข้อมูลได้ดังนี้

เกณฑ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลมีระดับคะแนนดังนี้

๑. มีความพึงพอใจมากที่สุดระดับคะแนนเท่ากับ ๕
๒. มีความพึงพอใจมากระดับคะแนนเท่ากับ ๔
๓. มีความพึงพอใจปานกลางระดับคะแนนเท่ากับ ๓
๔. มีความพึงพอใจน้อยระดับคะแนนเท่ากับ ๒
๕. มีความพึงพอใจน้อยที่สุดระดับคะแนนเท่ากับ ๑

การหาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยกับเกณฑ์การประเมินค่าเฉลี่ยของบุญชมศรีสะอาด 2532: 111

ค่าเฉลี่ยระดับ ๔.๕๑ – ๕.๐๐ มีความพึงพอใจมากที่สุด

ค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ มีความพึงพอใจมาก

ค่าเฉลี่ยระดับ ๒.๕๑ – ๓.๕๐ มีความพึงพอใจปานกลาง

ค่าเฉลี่ยระดับ ๑.๕๑ – ๒.๕๐ มีความพึงพอใจน้อย

ค่าเฉลี่ยระดับ ๑.๐๐ – ๑.๕๐ มีความพึงพอใจน้อยที่สุด

ตอนที่ ๑ ผลการวิเคราะห์สถานภาพทั่วไปของผู้ตอบแบบประเมิน

ตารางที่ ๑ แสดงจำนวนร้อยละของเพศผู้ตอบแบบประเมิน

เพศ	จำนวน(คน)	ร้อยละ
ชาย	๑๒	๓๐
หญิง	๒๘	๗๐
รวม	๔๐	๑๐๐

*****จากตารางที่ ๑ พบว่าผู้ตอบแบบประเมินเป็นเพศหญิงมากกว่าเพศชาย โดยเพศชายคิดเป็นร้อยละ ๓๐ ส่วนเพศหญิงคิดเป็นร้อยละ ๗๐

ตอนที่ ๒ ผลการวิเคราะห์ระดับความพึงพอใจในการเข้าร่วมฝึกอบรม

ตารางที่ ๒ แสดงระดับความพึงพอใจเกี่ยวกับการฝึกอบรมด้านวิทยากรบรรยาย ด้านสถานที่ ระยะเวลา อาหาร ด้านความรู้ความเข้าใจ ด้านการนำความรู้ไปใช้ ด้านการฝึกปฏิบัติการ ด้านการจัดนิทรรศการ

ข้อ	รายการประเมิน	ระดับความพึงพอใจ					ค่าเฉลี่ย ระดับ ($\bar{X}$)	ค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน (S.D.)	ระดับ ความ พึง พอใจ	ร้อยละ	อันดับ ที่
		มากที่สุด (5)	มาก (4)	ปาน กลาง (3)	น้อย (2)	น้อย ที่สุด (1)					
ด้านวิทยากร											
๑.	ความเหมาะสมของเนื้อหาเกี่ยวกับวัตถุประสงค์การอบรม	๑๓	๒๒	๕	๐	๐	๔.๒๐	๐.๔๖๐๒	มาก	๘๔.๐	๖
๒.	ความเชื่อมโยงของเนื้อหาในการอบรม	๑๐	๒๓	๗	๐	๐	๔.๐๗	๐.๖๗๘๓	มาก	๘๑.๔	๘
๓.	ความรู้ของวิทยากรที่บรรยายในแต่ละหัวข้อ	๒๖	๑๐	๔	๐	๐	๔.๕๕	๐.๖๖๘๙	มากที่สุด	๙๑.๐	๒
๔.	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากร	๑๖	๑๗	๗	๐	๐	๔.๒๒	๐.๗๕๒๗	มาก	๘๔.๔	๕
๕	การเปิดโอกาสให้ผู้เข้าอบรมแสดงความคิดเห็น	๑๙	๑๕	๖	๐	๐	๔.๓๒	๐.๗๕๐๐	มาก	๘๖.๔	๔
๖	การตอบข้อซักถามตรงประเด็น เข้าใจง่าย	๑๔	๒๐	๖	๐	๐	๔.๒๐	๐.๖๗๘๒	มาก	๘๔.๐	๖
ด้านสถานที่/ระยะ/อาหาร											
๑.	สถานที่สะอาดและมีความเหมาะสม	๒๖	๑๔	๐	๐	๐	๔.๖๕	๐.๔๗๖๘	มากที่สุด	๙๓.๐	๑
๒.	ความพร้อมของอุปกรณ์โสตทัศนูปกรณ์	๒๐	๒๐	๐	๐	๐	๔.๕๐	๐.๕๐	มาก	๙๐.๐	๓
๓.	ระยะเวลาในการอบรม	๑๐	๑๖	๑๑	๑	๓	๓.๘๐	๐.๙๒๗๓	มาก	๗๖.๐	๑๔
๔.	อาหารมีความเหมาะสม	๙	๒๖	๕	๐	๐	๔.๑๐	๐.๕๘๓๐	มาก	๘๒.๐	๗
ด้านความรู้ความเข้าใจ											
๑	ความรู้ ความเข้าใจในหัวข้อบรรยายต่างๆ ก่อน การอบรม	๑	๑๒	๑๓	๙	๕	๒.๘๘	๑.๐๓๙๕	ปานกลาง	๕๗.๖	๑๖
๒	ความรู้ ความเข้าใจในหัวข้อบรรยายต่างๆ หลัง การอบรม	๑๑	๑๙	๙	๑	๐	๔.๐๐	๐.๗๗๔๕	มาก	๘๐.๐	๑๑
ด้านการนำความรู้ไปใช้											
๑	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประกอบการเรียน	๖	๒๕	๖	๓	๐	๓.๘๕	๐.๗๕๙๙	มาก	๗๗.๐	๑๒
๒	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดทำโครงการวิทยาศาสตร์	๑๑	๑๙	๑๐	๐	๐	๔.๐๓	๐.๖๙๕๗	มาก	๘๐.๖	๑๐
๓	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปสร้างทักษะด้านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์	๑๑	๑๙	๑๐	๐	๐	๔.๐๓	๐.๖๙๕๗	มาก	๘๐.๖	๑๐
ด้านการฝึกปฏิบัติการ											
๑	สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการเรียน	๘	๑๗	๑๒	๓	๐	๓.๗๕	๐.๘๕๘๗	มาก	๗๕.๐	๑๕
๒	สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการทำโครงการวิทยาศาสตร์	๘	๒๐	๙	๓	๐	๓.๘๒	๐.๘๕๕๙	มาก	๗๖.๔	๑๓

ด้านการจัดนิทรรศการ											
๑	ความเชื่อมโยงของนิทรรศการกับหัวข้อการอบรม	๑๒	๑๘	๑๐	๐	๐	๔.๐๕	๐.๗๓๔๙	มาก	๘๑.๐	๙
๒	รูปแบบและเนื้อหาที่นิทรรศการอ่านเข้าใจง่าย	๑๓	๑๘	๘	๐	๑	๔.๐๕	๐.๘๖๔๕	มาก	๘๑.๐	๙
รวม							๔.๐๕	-	มาก	๘๑.๑	-

จากตารางที่ ๒ พบว่าผู้เข้ารับการอบรมมีระดับความพึงพอใจในโครงการอยู่ในระดับมาก (ค่าเฉลี่ย ๔.๐๕) คิดเป็นร้อยละ ๘๑.๑ และเมื่อพิจารณาในแต่ละด้าน พบว่าในรายการประเมินด้านวิทยากรในหัวข้อ “ความรู้ของวิทยากรที่บรรยายในแต่ละหัวข้อ” ความพึงพอใจอยู่ในระดับมากที่สุด (๔.๕๕) คิดเป็นร้อยละ ๙๑.๐๐ รองลงมาในหัวข้อต่างๆ ความพึงพอใจอยู่ในระดับมากเท่ากันหมดดังแสดงในตารางที่ ๒ ส่วนรายการประเมินด้านสถานที่/ระยะเวลา/อาหาร ในหัวข้อ “สถานที่สะอาดและมีความเหมาะสม” ความพึงพอใจอยู่ในระดับมากที่สุด (๔.๖๕) คิดเป็นร้อยละ ๙๓.๐๐ รองลงมาในหัวข้ออื่นๆอยู่ในระดับมาก ส่วนรายการประเมินด้านความรู้ความเข้าใจ ในหัวข้อ “ความรู้ความเข้าใจในหัวข้อบรรยายต่างๆหลังการอบรม” ความพึงพอใจอยู่ในระดับมาก (๔.๐๐) คิดเป็นร้อยละ ๘๐.๐๐ ส่วนในหัวข้อ “ความรู้ความเข้าใจในหัวข้อบรรยายต่างๆก่อนการอบรม” ความพึงพอใจอยู่ในระดับปานกลาง (๒.๘๘) คิดเป็นร้อยละ ๕๗.๖๐ ส่วนรายการประเมินด้านการนำความรู้ไปใช้ด้านการฝึกปฏิบัติการและด้านการจัดนิทรรศการ พบว่าในทุกหัวข้อ ความพึงพอใจอยู่ในระดับมาก

ตอนที่ ๓ ข้อเสนอแนะอื่นๆ

1. ข้อเสนอแนะ ดิชม ในการอบรมครั้งนี้ได้แก่

- ระยะเวลาสั้นเกินไป
- การอบรมไม่สนุก
- วิทยากรพูดฟังแล้วค่อนข้างง่วงเสียงเบา
- ไม่ตรงกับข้อสอบโรงเรียน
- ไม่ใช่เรื่องสอบเอ็นทรานซ์
- ควรมีกิจกรรมให้นักเรียนมีส่วนร่วมมากกว่าการทำ lab
- ควรทำ lab หลังจากการบรรยายในแต่ละหัวข้อ
- ศัพท์บางคำเข้าใจยาก
- เนื้อหาเยอะเกินไป สอนละเอียดและลงลึกจนเข้าใจไม่ถึง
- อยากให้วิทยากรมีลูกตลกด้วยจะได้ไม่น่าเบื่อ

2. หัวข้อที่ท่านอยากให้จัดอบรมครั้งต่อไป ได้แก่

- ปีโตเลียม
- จิตวิทยาและพฤติกรรม
- ดาราศาสตร์ และอวกาศ
- ฉลาม
- สัตว์ทะเลที่ไม่ค่อยรู้จัก
- ปลาทะเล
- เรื่องการทดลองและสิ่งประดิษฐ์ทางวิทยาศาสตร์
- โรคที่เกิดจากจุลินทรีย์และแบคทีเรีย

ตอนที่ ๓ ข้อเสนอแนะอื่นๆ ในส่วนของข้อเสนอแนะจากผู้เข้ารับการอบรมส่วนใหญ่มีข้อเสนอแนะที่ต่างกันไปทั้งในด้านวิทยากรที่บรรยาย ด้านสถานที่ อาหาร ระยะเวลาการจัดอบรม เนื้อหาและรายละเอียดที่อบรม ความเกี่ยวข้องกับการนำไปใช้ในการเรียน เป็นต้น และในส่วนของหัวข้อที่อยากให้อบรมในครั้งต่อไปก็มีหลายเรื่อง ดังนั้นจึงขึ้นอยู่กับผู้จัดว่ามีความพร้อมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องหรือไม่ รวมทั้งแนวนโยบายในการจัดกิจกรรมของทั้งโรงเรียน และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลซึ่งเป็นหน่วยงานต้นสังกัดว่าจะมีทิศทางและนโยบายอย่างไรในอนาคต

สรุปผลการประเมินผลความพึงพอใจและความคิดเห็นผู้เข้าร่วมฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง “ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของ
จุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัตว์จรัสโรงเรียน”

วันที่ ๒๐ เดือนสิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๗

ณ โรงเรียนสิงห์สมุทร อำเภอสัตหีบจังหวัดชลบุรี

จากการสอบถามความพึงพอใจและความคิดเห็นของผู้เข้าร่วมโครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง “ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเล และฟองน้ำทะเล สัตว์จรัสโรงเรียน” วันที่ ๒๐ เดือนสิงหาคม ๒๕๕๗ ณ โรงเรียนสิงห์สมุทร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เก็บข้อมูลจากผู้เข้าร่วมโครงการจำนวนทั้งสิ้น ๑๕๘ คนตอบแบบสอบถามจำนวน ๑๓๙ คน คิดเป็นร้อยละ ๘๗.๙๗ สรุปข้อมูลได้ดังนี้

เกณฑ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลมีระดับคะแนนดังนี้

๑. มีความพึงพอใจมากที่สุดระดับคะแนนเท่ากับ ๕
๒. มีความพึงพอใจมากระดับคะแนนเท่ากับ ๔
๓. มีความพึงพอใจปานกลางระดับคะแนนเท่ากับ ๓
๔. มีความพึงพอใจน้อยระดับคะแนนเท่ากับ ๒
๕. มีความพึงพอใจน้อยที่สุดระดับคะแนนเท่ากับ ๑

การหาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับเกณฑ์การประเมินค่าเฉลี่ยของบุญชมศรีสะอาด 2532 : 111

ค่าเฉลี่ยระดับ ๔.๕๑ – ๕.๐๐ มีความพึงพอใจมากที่สุด

ค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ มีความพึงพอใจมาก

ค่าเฉลี่ยระดับ ๒.๕๑ – ๓.๕๐ มีความพึงพอใจปานกลาง

ค่าเฉลี่ยระดับ ๑.๕๑ – ๒.๕๐ มีความพึงพอใจน้อย

ค่าเฉลี่ยระดับ ๑.๐๐ – ๑.๕๐ มีความพึงพอใจน้อยที่สุด

ตอนที่ ๑ ผลการวิเคราะห์สถานภาพทั่วไปของผู้ตอบแบบประเมิน

ตารางที่ ๑ แสดงจำนวนร้อยละของเพศผู้ตอบแบบประเมิน

เพศ	จำนวน(คน)	ร้อยละ
ชาย	๖๐	๔๓.๑๗
หญิง	๗๙	๕๖.๘๓
รวม	๑๓๙	๑๐๐

*****จากตารางที่ ๑ พบว่าผู้ตอบแบบประเมินเป็นเพศหญิงมากกว่าเพศชายโดยเพศชายคิดเป็นร้อยละ ๔๓.๑๗ ส่วนเพศหญิง คิดเป็นร้อยละ ๕๖.๘๓

ตอนที่ ๒ ผลการวิเคราะห์ระดับความพึงพอใจในการเข้าร่วมฝึกอบรม

ข้อ	รายการประเมิน	ระดับความพึงพอใจ					ค่าเฉลี่ย ระดับ ($\bar{X}$)	ค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน (S.D.)	ระดับ ความ พึง พอใจ	ร้อยละ	อันดับที่
		มากที่สุด	มาก	ปาน กลาง	น้อย	น้อย ที่สุด					
ด้านวิชาการ											
๑.	ความเหมาะสมของเนื้อหาเกี่ยวกับวัตถุประสงค์การอบรม	๔๓	๘๕	๙	๑	๑	๔.๒๑	๐.๖๔๒๓	มาก	๘๔.๒	๕
๒.	ความสามารถในการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “การจำแนกชนิดพองน้ำทะเลอย่างง่ายๆ”	๓๕	๗๐	๑๙	๒	๐	๓.๗๑	๑.๓๖๘๗	มาก	๗๔.๒	๑๕
๓.	ความสามารถในการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “การแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลและการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้น”	๔๒	๖๕	๓๐	๒	๐	๔.๐๖	๐.๗๔๓๒	มาก	๘๑.๒	๙
๔.	ความสามารถในการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “การแยกและการใช้ประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท”	๓๓	๖๙	๓๑	๖	๐	๓.๙๓	๐.๗๘๒๗	มาก	๗๘.๖	๑๒
๕.	ความสามารถในการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “เทคนิคการสกัดสารสีและสกัดลิปิดจากแอคติโนมัยซีทและการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ”	๔๗	๖๘	๒๐	๔	๐	๔.๑๔	๐.๗๔๒๓	มาก	๘๒.๘	๘
๖.	ความเชื่อมโยงของเนื้อหาในการอบรม	๓๔	๗๐	๓๒	๓	๐	๓.๙๗	๐.๗๕๕๐	มาก	๗๙.๔	๑๑
๗.	ความเหมาะสมของเอกสารการอบรม	๕๗	๕๖	๒๑	๕	๐	๔.๑๙	๐.๘๐๓๓	มาก	๘๓.๘	๗
๘.	การเปิดโอกาสให้ผู้เข้าอบรมแสดงความคิดเห็น	๖๓	๕๗	๑๔	๔	๑	๔.๒๗	๐.๘๒๙๔	มาก	๘๕.๔	๓
๙.	หลังจากการอบรมท่านได้รับความรู้เพิ่มในระดับใด	๓๒	๖๖	๓๒	๙	๐	๓.๘๗	๐.๘๔๐๕	มาก	๗๗.๔	๑๓
ด้านสถานที่/ระยะ/อาหาร											
๑.	ความเหมาะสมของสถานที่จัดอบรม	๖๙	๖๑	๗	๒	๐	๔.๔๒	๐.๖๓๗๒	มาก	๘๘.๔	๑
๒.	ความพร้อมของอุปกรณ์สื่อนำเสนอ	๖๓	๖๐	๑๖	๐	๐	๔.๓๔	๐.๖๖๑๖	มาก	๘๖.๘	๒
๓.	ความเหมาะสมของระยะเวลาในการอบรม	๓๖	๕๗	๓๘	๘	๐	๓.๘๗	๐.๘๖๕๘	มาก	๗๗.๔	๑๓
๔.	ความเหมาะสมของอาหาร	๔๘	๕๗	๓๐	๒	๒	๔.๐๖	๐.๘๕๑๔	มาก	๘๑.๒	๙
ด้านการนำความรู้ไปใช้											
๑.	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประกอบการเรียน	๓๙	๖๙	๒๘	๓	๐	๔.๐๔	๐.๗๓๑๑	มาก	๘๐.๘	๑๐
๒.	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดทำโครงงานวิทยาศาสตร์	๔๖	๗๐	๒	๑	๑	๓.๗๓	๑.๖๐๗๓	มาก	๗๔.๖	๑๔

๓	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปสร้างทักษะด้านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์	๕๕	๖๒	๒๐	๒	๐	๔.๒๒	๐.๗๕๖๘	มาก	๘๔.๔	๔
ด้านการฝึกปฏิบัติการ											
๑	สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการเรียน	๔๖	๖๖	๑๒	๔	๐	๓.๘๗	๑.๓๓๖๒	มาก	๗๗.๔	๑๓
๒	สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการทำโครงการวิทยาศาสตร์	๕๔	๖๑	๒๒	๒	๐	๔.๒๐	๐.๗๕๘๘	มาก	๘๔.๐	๖
รวม							๔.๐๙		มาก	๘๑.๒	-

จากตารางที่ ๒ พบว่าผู้เข้ารับการอบรมมีระดับความพึงพอใจในโครงการอยู่ในระดับมาก (ค่าเฉลี่ย ๔.๐๙) คิดเป็นร้อยละ ๘๑.๒ และเมื่อพิจารณาในแต่ละด้าน พบว่าในรายการประเมินด้านวิทยากร พบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้ออยู่ในระดับมาก คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยที่หัวข้อ “การเปิดโอกาสให้ผู้เข้าอบรมแสดงความคิดเห็น” มีค่าร้อยละ ๘๕.๔ ซึ่งอยู่ในอันดับที่ ๑ ของด้าน รองลงมาคือหัวข้อ “ความเหมาะสมของเนื้อหาเกี่ยวกับวัตถุประสงค์การอบรม” มีค่าร้อยละ ๘๔.๒ ซึ่งอยู่ในอันดับที่ ๒ ของด้าน ส่วนด้านสถานที่/ระยะเวลา/อาหาร พบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้อก็ยังคงอยู่ในระดับมาก คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยมีหัวข้อ “ความเหมาะสมของสถานที่จัดอบรม” มีค่าร้อยละ ๘๔.๔ ซึ่งมากที่สุดในด้านนี้ รองลงมาคือหัวข้อ “ความพร้อมของอุปกรณ์โสตน์ทัศนูปกรณ์” ส่วนด้านการนำความรู้ไปใช้ พบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้ออยู่ในระดับมากเช่นกัน คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยหัวข้อ “สามารถนำความรู้ที่ได้ไปสร้างทักษะด้านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์” มีค่าร้อยละ ๘๔.๔ ซึ่งมากที่สุดในด้านนี้ ด้านการฝึกปฏิบัติการ จากการประเมินยังคงพบว่าพบค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้ออยู่ในระดับมาก คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยที่หัวข้อ “สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการทำโครงการวิทยาศาสตร์” มีค่าร้อยละ ๘๔.๐ ซึ่งมากที่สุดในด้านนี้

ตอนที่ ๓ ข้อเสนอแนะอื่นๆ

1. ข้อเสนอแนะ ดีชม ในการอบรมครั้งนี้ได้แก่

- ควรมี Video มาฉายประกอบให้น่าสนใจ (๒)
- ได้ความรู้เข้าใจดี
- ควรให้นักเรียนได้มีโอกาสทดลองทุกคน
- วิทยากรพูดได้สนุกดี
- ง่วงมากไม่มีบันเทิงมาแทรก
- ควรมีเกมส์และพูดให้ดึงดูด
- จัดได้เยี่ยม
- วิทยากรบรรยายเสียงเบา
- วิทยากรการบรรยายน่าเบื่อ
- เร่งเวลาและทำกิจกรรมมากเกินไป
- ไม่ควรบรรยายหรือทำกิจกรรมเกินเวลา
- ไม่มีกิจกรรมให้เล่นทำให้ง่วงนอน(๒)
- ควรมีเกมส์
- วิทยากรควรพูดให้ตลกบ้าง
- อยากให้มีเวลามากกว่านี้(๒)
- อยากให้มีการทดลองทุกครั้งหลังจากการบรรยาย(๒)

- การบรรยายดีแต่ยากให้ใช้ภาษาง่ายกว่านี้
- อยากทำกิจกรรมครบทุกฐาน และควรเพิ่มระยะเวลา ๒ วัน
- วิทยากรมีความสนใจดี
- อุปกรณ์แจกไม่ทั่วถึง
- วิทยากรพูดเร็วสรุปเกินไป
- ควรอธิบายให้สั้นลง และขยายเวลาการจัดกิจกรรม
- อธิบายเร็วเกินไป ไม่เข้าใจเนื้อหาครบถ้วน
- เพิ่มเทคนิคและวิธีการนำเสนอให้น่าสนใจ
- ควรจัดเวลาให้เหมาะสมมากกว่านี้
- วิทยากรถ่ายทอดความรู้ได้ดี ผู้ฟังสามารถรับรู้ได้
- ควรเพิ่มความน่าสนใจเพื่อให้นักเรียนสนใจมากขึ้น
- เวลาทำกิจกรรมน้อยเกินไป อยากให้มีการทดลองมากขึ้น
- ควรพูดถึงการอนุรักษ์บ้าง
- การนำเสนอเนื้อหาหยาบเกินไป ควรขยายเวลามากกว่านี้บางตอนสรุปแล้วยังไม่เข้าใจ
- ปฏิบัติการบางส่วนมากเกินไป/บางบทปฏิบัติการน่าสนใจมาก
- ควรจัดกิจกรรมหลายๆวัน/ควรมีกิจกรรมคลายเครียดและสนุกให้ทำ
- วิทยากรพูดเข้าใจง่ายแต่มีบางท่านพูดเหมือนดูถูก ต้องเข้าใจว่าเพิ่งมาฟังเรื่องนี้ยังไม่มีความรู้ ถ้าจะตอบได้

อย่างไร

- อยากให้มีเนื้อหาสาระแน่นและไม่เร็วเกินไป
- เวลาเตรียมตัวน้อย
- วิทยากรอธิบายเร็วตามไม่ทัน
- ควรมีกิจกรรมคลายเครียดบ้างเนื้อหาอย่างเดียวยาวรู้สึกเบื่อและนั่งนานเกินไป
- พูดไม่ชัดเจนเข้าใจบ้าง ไม่เข้าใจบ้าง
- เรื่องแบคทีเรียไม่เข้าใจ ยาวมาก ทำให้เบื่อ

2. หัวข้อที่ท่านอยากให้จัดอบรมครั้งต่อไป ได้แก่

- บีโตร์เลียม (๔) /ดาวนอกโลก /สัตว์น้ำชนิดต่างๆ /เกี่ยวกับจักรวาล /สัตว์น้ำลึก /สัตว์โลก /สมองสัตว์ /
 ประสาทสัมผัส /ปะการัง (๓) /ฟองน้ำ /คุณภาพของสิ่งมีชีวิต /วิธีทำผลิตภัณฑ์และวิธีหาสารธรรมชาติมาทำผลิตภัณฑ์
 บำรุงผิว /สิ่งมีชีวิตที่หายากในทะเล /ผ่าปลาหรีสัตว์อื่นเพื่อศึกษาอวัยวะภายใน /การผสมพันธุ์ปลา /ปลาทะเลชนิดต่างๆ /
 ชีวโมเลกุล (๒) /เซลล์ต่างๆแบบเจาะลึก /ป่าชายเลน /ดอกไม้ทะเล /เทคโนโลยีกับสิ่งแวดล้อมและการประยุกต์เทคโนโลยี
 /ชีววิทยา /สัตว์แปลกทั่วโลก /สิ่งมีชีวิตใต้ทะเลลึก /สารสกัดจากสาหร่ายทะเล /ทุกๆหัวข้อ /การสกัดสารต่างๆเกี่ยวกับ
 พืชหรือสัตว์ทะเลหรือเกี่ยวกับชีวเคมี /การอนุรักษ์ทรัพยากรทางทะเล /การทำปะการังเทียม /ระบบนิเวศใต้ทะเลลึก /
 ดุลยภาพ และการแบ่งเซลล์ /ระบบภูมิคุ้มกัน /ระบบร่างกาย /สัตว์ทะเล สัตว์น้ำ และสิ่งแวดล้อมที่น่าสนใจ /สิ่งประดิษฐ์
 จากธรรมชาติในแบบภูมิปัญญาท้องถิ่นไทย

ตอนที่ ๓ ข้อเสนอแนะอื่นๆ ในส่วนของข้อเสนอแนะจากผู้เข้ารับการอบรมส่วนใหญ่มีข้อเสนอแนะที่หลากหลาย แต่ส่วนใหญ่จะเสนอแนะเกี่ยวกับเรื่องของวิธีการนำเสนอและรูปแบบของการนำเสนอบางหัวข้อยังไม่เข้าใจและอยากเกินไป

มีศัพท์ภาษาอังกฤษฟังไม่เข้าใจ ระยะเวลาในการจัดอบรมน้อยไป ไม่มีกิจกรรมนันทนาการหรือเกมส์มาประกอบ รวมทั้ง การทำปฏิบัติการในแต่ละฐานทำได้ไม่ครบทุกคนและในส่วนของหัวข้อที่อยากให้จัดอบรมในครั้งต่อไปมีหลากหลายมาก ดังนั้นจึงขึ้นอยู่กับผู้จัดว่ามีความพร้อมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องหรือไม่ รวมทั้งแนวนโยบายในการจัดกิจกรรมของทั้ง โรงเรียน และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลแล้วจะมีทิศทางไปทางใดในอนาคต

**สรุปผลการประเมินผลความพึงพอใจและความคิดเห็นผู้เข้าร่วมฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง “ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของ
จุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัตว์จรัสโรงเรียน”**

วันที่ ๒๗ เดือนสิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๗

ณ โรงเรียนชลราษฎรอำรุง อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี

จากการสอบถามความพึงพอใจและความคิดเห็นของผู้เข้าร่วมโครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเลและฟองน้ำทะเล สัตว์จรัสโรงเรียน” วันที่ ๒๗ เดือนสิงหาคม ๒๕๕๗ ณ โรงเรียนชลราษฎรอำรุง อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เก็บข้อมูลจากผู้เข้าร่วมโครงการจำนวนทั้งสิ้น ๑๘๙ คนตอบแบบสอบถามจำนวน ๑๖๗ คนคิดเป็นร้อยละ ๘๘.๓๖ สรุปข้อมูลได้ดังนี้

เกณฑ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลมีระดับคะแนนดังนี้

๑. มีความพึงพอใจมากที่สุดระดับคะแนนเท่ากับ ๕
๒. มีความพึงพอใจมากระดับคะแนนเท่ากับ ๔
๓. มีความพึงพอใจปานกลางระดับคะแนนเท่ากับ ๓
๔. มีความพึงพอใจน้อยระดับคะแนนเท่ากับ ๒
๕. มีความพึงพอใจน้อยที่สุดระดับคะแนนเท่ากับ ๑

การหาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับเกณฑ์การประเมินค่าเฉลี่ยของบุญชมศรีสะอาด 2532 : 111

ค่าเฉลี่ยระดับ ๔.๕๑ – ๕.๐๐ มีความพึงพอใจมากที่สุด

ค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ มีความพึงพอใจมาก

ค่าเฉลี่ยระดับ ๒.๕๑ – ๓.๕๐ มีความพึงพอใจปานกลาง

ค่าเฉลี่ยระดับ ๑.๕๑ – ๒.๕๐ มีความพึงพอใจน้อย

ค่าเฉลี่ยระดับ ๑.๐๐ – ๑.๕๐ มีความพึงพอใจน้อยที่สุด

ตอนที่ ๑ ผลการวิเคราะห์สถานภาพทั่วไปของผู้ตอบแบบประเมิน

ตารางที่ ๑ แสดงจำนวนร้อยละของเพศผู้ตอบแบบประเมิน

เพศ	จำนวน(คน)	ร้อยละ
ชาย	๑๓๘	๘๒.๖๓
หญิง	๒๙	๑๗.๓๗
รวม	๑๖๗	๑๐๐

*****จากตารางที่ ๑ พบว่าผู้ตอบแบบประเมินเป็นเพศหญิงมากกว่าเพศชายโดยเพศชายคิดเป็นร้อยละ ๘๒.๖๓ เพศหญิงคิดเป็นร้อยละ ๑๗.๓๗

ละ ๘๒.๖๓ เพศหญิงคิดเป็นร้อยละ ๑๗.๓๗

ตอนที่ ๒ ผลการวิเคราะห์ระดับความพึงพอใจในการเข้าร่วมฝึกอบรม

ข้อ	รายการประเมิน	ระดับความพึงพอใจ					ค่าเฉลี่ย ระดับ ($\bar{X}$)	ค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน (S.D.)	ระดับ ความ พึง พอใจ	ร้อยละ	อันดับ ที่
		มากที่สุด	มาก	ปาน กลาง	น้อย	น้อย ย ที่สุด					
ด้านวิทยากร											
๑.	ความเหมาะสมของเนื้อหาเกี่ยวกับวัตถุประสงค์การอบรม	๖๓	๙๐	๑๒	๑	๐	๔.๒๖	๐.๗๕๙๕	มาก	๘๕.๒	๒
๒.	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “การจำแนกชนิดพืชน้ำทะเลอย่างง่าย ๆ”	๔๙	๙๔	๒๑	๒	๑	๔.๑๓	๐.๖๘๕๖	มาก	๘๒.๖	๕
๓.	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “การแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลและการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้น”	๔๓	๘๕	๓๖	๒	๑	๔.๐๐	๐.๗๕๘๒	มาก	๘๐.๐	๑๑
๔.	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “การแยกและการใช้ประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท”	๔๗	๘๐	๓๕	๓	๒	๔.๐๐	๐.๘๑๘๙	มาก	๘๐.๐	๑๑
๕.	ความสามารถในการการถ่ายทอดความรู้ของวิทยากรเรื่อง “เทคนิคการสกัดสารสีและสกัดลิพิดจากแอคติโนมัยซีทและการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ”	๔๔	๙๐	๒๘	๔	๑	๔.๐๓	๐.๗๖๑๒	มาก	๘๐.๖	๑๐
๖.	ความเชื่อมโยงของเนื้อหาในการอบรม	๔๐	๙๕	๓๑	๑	๐	๔.๐๔	๐.๖๘๐๓	มาก	๘๐.๘	๙
๗.	ความเหมาะสมของเอกสารการอบรม	๕๕	๗๐	๓๕	๖	๑	๔.๐๓	๐.๗๓๗๒	มาก	๘๐.๖	๑๐
๘.	การเปิดโอกาสให้ผู้เข้าอบรมแสดงความคิดเห็น	๗๕	๗๑	๑๙	๒	๐	๔.๓๑	๐.๗๒๕๐	มาก	๘๖.๒	๑
๙.	หลังจากการอบรมท่านได้รับความรู้เพิ่มในระดับใด	๓๕	๘๒	๔๖	๓	๑	๓.๘๘	๐.๗๗๓๕	มาก	๗๗.๖	๑๔
ด้านสถานที่/ระยะ/อาหาร											
๑.	ความเหมาะสมของสถานที่จัดอบรม	๖๓	๗๕	๒๘	๐	๑	๔.๑๙	๐.๗๕๘๗	มาก	๘๓.๘	๓
๒.	ความพร้อมของอุปกรณ์โสตทัศนูปกรณ์	๖๕	๖๕	๒๗	๙	๑	๔.๑๐	๐.๙๐๘๑	มาก	๘๒.๐	๖

๓.	ความเหมาะสมของระยะเวลาในการอบรม	๕๑	๖๖	๓๙	๑๓	๐	๓.๙๖	๐.๘๓๐๔	มาก	๗๙.๒	๑๒
๔.	ความเหมาะสมของอาหาร	๖๑	๖๖	๓๖	๒	๒	๔.๐๙	๐.๘๕๒๖	มาก	๘๑.๘	๗
ด้านการนำความรู้ไปใช้											
๑	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประกอบการเรียน	๔๐	๗๓	๓๙	๑๓	๑	๓.๘๑	๐.๘๘๕๑	มาก	๗๖.๒	๑๕
๒	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดทำโครงการวิทยาศาสตร์	๕๗	๗๐	๓๔	๕	๑	๔.๐๖	๐.๘๔๕๐	มาก	๘๑.๒	๘
๓	สามารถนำความรู้ที่ได้ไปสร้างทักษะด้านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์	๕๓	๘๖	๒๘	๐	๐	๔.๑๕	๐.๖๗๘๓	มาก	๘๓.๐	๔
ด้านการฝึกปฏิบัติการ											
๑	สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการเรียน	๔๖	๗๑	๔๕	๔	๑	๓.๙๔	๐.๘๓๑๘	มาก	๗๘.๘	๑๓
๒	สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการทำโครงการวิทยาศาสตร์	๕๐	๘๑	๓๓	๒	๑	๔.๐๖	๐.๗๗๐๙	มาก	๘๑.๒	๘
รวม							๔.๐๖	-	มาก	๘๑.๒	-

ตารางที่ ๒ แสดงระดับความพึงพอใจเกี่ยวกับการฝึกอบรมด้านวิทยากรบรรยาย ด้านสถานที่ ระยะเวลา อาหาร ด้านความรู้ความเข้าใจ ด้านการนำความรู้ไปใช้ ด้านการฝึกปฏิบัติการ

จากตารางที่ ๒ พบว่าผู้รับการอบรมมีระดับความพึงพอใจในโครงการอยู่ในระดับมาก (ค่าเฉลี่ย ๔.๐๖) คิดเป็นร้อยละ ๘๑.๒ และเมื่อพิจารณาในแต่ละด้าน พบว่าในรายการประเมินด้านวิทยากรพบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้ออยู่ในระดับมาก คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยที่หัวข้อ “ความเหมาะสมของเนื้อหาเกี่ยวกับวัตถุประสงค์การอบรม” มีค่าร้อยละ ๘๕.๒ ซึ่งอยู่ในอันดับที่ ๑ ของด้านนี้ ส่วนด้านสถานที่/ระยะเวลา/อาหาร พบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้อก็ยังคงอยู่ในระดับมาก คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยมีหัวข้อ “ความเหมาะสมของสถานที่จัดอบรม” มีค่าร้อยละ ๘๓.๘ ซึ่งมากที่สุดในด้านนี้ ส่วนด้านการนำความรู้ไปใช้ พบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้ออยู่ในระดับมากเช่นกัน คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยหัวข้อ “สามารถนำความรู้ที่ได้ไปสร้างทักษะด้านกระบวนการทางวิทยาศาสตร์” มีค่าร้อยละ ๘๓.๐ ซึ่งมากที่สุดในด้านนี้ ด้านการฝึกปฏิบัติการจากการประเมินยังคงพบว่าพบว่าค่าเฉลี่ยของความพึงพอใจในแต่ละหัวข้ออยู่ในระดับมาก คือมีค่าเฉลี่ยระดับ ๓.๕๑ – ๔.๕๐ โดยที่หัวข้อ “สามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการทำโครงการวิทยาศาสตร์” มีค่าร้อยละ ๘๑.๒ ซึ่งมากที่สุดในด้านนี้

ตอนที่ ๓ ข้อเสนอแนะอื่นๆ

1. ข้อเสนอแนะ ดิชม ในการอบรมครั้งนี้ได้แก่

เนื้อหาค่อนข้างยากเกินไป/ ความรู้เกินตัวไปหน่อยทำให้ไม่อยากฟัง/ เนื้อหาประกอบการบรรยายดีมาก/ การบรรยายกับภาพที่แสดงสับสนควรปรับปรุง/ ปรับคำให้ถูกต้อง เช่น ปาราสิต เป็น ปรสิต/สถานที่มีจอภาพขนาดเล็กไม่สามารถสไลด์ให้ผู้ฟังเห็นชัดเจน/ เสียงไมค์เบาเกินไป/ อุปกรณ์ไม่พร้อม เช่น หน้าจอโทรทัศน์ทำให้คนอยู่ข้างหลังมองไม่เห็น/ ตัวหนังสือเล็กไป/ควรมีตัวอย่างให้ดู/ เป็นการอธิบายที่ดี เข้าใจ/ น่าจะมีสิ่งที่สนุกกว่านี้/ มองไม่เห็น พูตเบาไป/

วิทยากรควรพูดให้สนุกกว่านี้/ ควรพูดให้สนุก ไม่น่าเบื่อ/ วิทยากรควรมีความสามารถให้อธิบายให้เข้าใจง่ายขึ้น/ขนมปัง
 อร่อยดี เอามาเยอะๆเลย/ ของว่างอร่อยดี/ ควรใช้เวลามากกว่านี้/ ดีมากแต่เนื่องจากระยะเวลาสั้นจึงทำให้เกิดการสับสน
 ได้ เพราะการดำเนินเรื่องเร็ว/ มีการจัดเวลาค่อนข้างดี/ วิทยากรมีความรู้ทางด้านนี้มากสามารถอธิบายความรู้ให้เข้าใจได้
 แต่การนำเสนอมีการมุงที่เนื้อหามากเกิน อาจทำให้รู้สึกเบื่อหน่ายและบางเนื้อหาเป็นภาษาอังกฤษและไม่มีคำอธิบายที่
 แน่นนอน/ ควรมี break หรือ พักมากกว่านี้ และควรมี entertain นักเรียนให้น่าสนใจกว่านี้/ ของว่างอร่อยมากอยากกิน
 อีก/ วิทยากรควรมีกิจกรรมขึ้นระหว่างบรรยาย ไม่ให้การบรรยายน่าเบื่อและเต็มไปด้วยความสนุกสนานและเป็นแรงจูงใจ
 ให้นักเรียนตั้งใจฟังยิ่งขึ้น/ ระยะเวลาในการจัดบรรยายยาวนานเกินไป ควรมีเบรกพักของแต่ละหัวข้อ/ ควรมีเนื้อหาที่
 เกี่ยวข้องกับ ม.ปลายด้วย หรือมีมากกว่านี้และควรให้มีความน่าสนใจในการฟัง/ วิทยากรให้ความรู้อย่างดี ข้อมูลแน่น/ มี
 การยกตัวอย่างที่ดี ควรมีวิดีโอประกอบด้วย/ เนื้อหายากเกินไป อธิบายแล้วไม่เข้าใจ ไม่เหมาะกับวัย และคุณวุฒิ/ พูดซ้ำๆ
 หน่อยครับ/ คนที่หนึ่งสอนดีมาก คนที่สอง สามพูดเสียงเบาทำให้ไม่น่าสนใจและควบคุมนักเรียนไม่อยู่ คนที่สี่สอนดีมาก/
 ควรทำสื่อการสอนที่น่าสนใจมากกว่านี้ มีเทคนิคการสอนที่ดีกว่านี้ เพื่อดึงดูดความสนใจของผู้ฟังให้มากกว่านี้/ อยากให้
 เพิ่มความคมชัดของภาพประกอบคำบรรยายในเอกสารทุกฉบับ/ ควรใช้ภาษาที่ฟังเข้าใจง่ายขึ้น/ อาหารว่างมาช้ามาก/
 งบกับเอกสารมากๆ ไม่เข้าใจเลย อ่านไม่ออก/ ทำไมต้องจัดตรงกับวันเรียน รด./ ควรนำเสนอความรู้ที่สามารถนำไป
 ประกอบโครงงานได้/ ผู้นำเสนอตั้งใจนำเสนอ/ ไม่ได้ทำ lab/ อาหารน้อย/ น่าเบื่อ/ เนื้อหามีความยาก และวิทยากรบาง
 ท่านเสียงไม่ค่อยดัง และผู้รับฟังแน่นไม่เข้าใจก็ไม่กล้าถาม/ การใช้ศัพท์วิทยาศาสตร์ทำให้เด็กไม่เข้าใจ บางคนไม่ได้เข้าร่วม
 การทดลอง ควรจัดเวลาให้ดีกว่านี้/ อุปกรณ์ไม่ค่อยเพียงพอ อยู่ไกลทำให้มองไม่เห็น เพื่อนในกลุ่มส่งเสียงดังทำให้การฟัง
 ถดถอย/ ควรอบรมให้เปิดกว้างกว่านี้ ไม่ควรนำเสนอข้อมูลให้ซ้ำเกินไป เด็กง่วงนอน/ ดีแล้วครับ แต่ควรมีมีนเตอร์
 ด้านหลังให้ข้างหลังมองเห็นด้วย/ อาหารน้อยเกินไป ควรมีให้กินทุกๆชั่วโมง/ ครูคนแรกพูดติดคำว่า “นะครับ” มาก
 เกินไป/ ของว่างอร่อย /ขยายตัวอักษรบนจอให้ใหญ่หน่อย/ ต้องพูดดึงดูดความสนใจให้มากกว่านี้/ สื่อการบรรยายบาง
 เรื่องไม่ค่อยดีมองเห็นตัวหนังสือไม่ชัด/ ควรจัดเวลาให้ดีกว่านี้และควรสอดแทรกมุขตลกไว้ด้วย และควรจัดเอกสารการ
 เรียนให้กะทัดรัด/ ควรเพิ่มเวลาให้มากขึ้น บรรยายให้เข้าใจง่ายอย่าใช้ศัพท์ยากเกินไปควรอธิบายความหมายด้วย/ ให้สอน
 ให้ช้ากว่านี้/ ข้อมูลเยอะดีฟังไม่เบื่อเลยครับ/ เนื้อหามาก พูดเร็ว/ แอร์หนาวมาก ควรสอนให้มีชีวิตชีวา/ ควรเลือกวันอื่นที่
 ไม่ใช่วันพุธ/ เนื้อหาสาระ ม.4 ยังไม่ได้เรียน ควรเลือก ม.5-6 เข้าเรียนจะได้ประโยชน์มากกว่านี้/ อยากให้ทำหนังสือการ
 อบรมดีกว่านี้/ ควรจัดกิจกรรมแบบนี้ให้รุ่นต่อไปได้เข้าร่วม/ อาจารย์ทุกท่านอบรมได้เข้าใจดี อยากให้ lab สนุกๆแบบนี้
 อีก/ อบรมครั้งนี้ดีมากทำให้เข้าใจเรื่องที่ไม่เคยรู้มาก่อน ด้านความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล เป็นเรื่องที่น่าสนใจ
 ควรถ่ายทอดให้คนรุ่นต่อไปได้รับรู้

2. หัวข้อที่ท่านอยากให้จัดอบรมครั้งต่อไป ได้แก่

จักรวาล/ Genetic/ ความผิดปกติของโรคทางพันธุกรรม/ ประเภทของสิ่งมีชีวิต /ดาราศาสตร์และอวกาศ/
 ฉลาม/ วาฬ/ หมึก/ จุลชีววิทยา/ สิ่งมีชีวิตลึกลับ/ ปลา/ พลาสติกชีวภาพ/ หัวข้อเดิม/ เซลล์/ การศึกษาการดำรงชีวิตของ
 เซลล์เดียว/ กระบวนการต่างๆในการดำรงชีวิต/ สัตว์โลกใต้ทะเลลึกที่สำคัญในมหาสมุทร/ การดำรงชีพกลางทะเล/
 หลักสูตรการปฏิบัติการทางทะเล/ สัตว์ทะเล/ ความสามารถและความแตกต่างของสัตว์ทะเลน้ำลึกกับสัตว์ทะเลน้ำตื้น/

เกี่ยวกับฮอริโมนของสัตว์/ การปะทุของภูเขาไฟ/ ระบบสุริยะจักรวาล/ อวกาศ/ เทคโนโลยีทางทะเล/ การกำจัดเพลี้ยโดยวิธีทางชีววิทยา/ สกัดพิษของแมงมุม/ สัตว์โลกน่ารัก/ การทำโครงการ/ ความหลากหลายของทะเลด้านต่างๆ/ ความหลากหลายของปลาในทะเล/ เรื่องที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในพื้นที่เรียนของผู้เข้าฟัง/ เรื่องที่เป็นปัจจุบันใกล้ตัวและเกี่ยวข้องกับนักเรียนมากที่สุด/ กระบวนการผลิตยารักษาโรคต่างๆ/ พัฒนาศักยภาพของการทำโครงการวิทยาศาสตร์ประเภทวิจัยประยุกต์/ แบททีเรียและเชื้อแอคติโนมัยซีท์ในเชิงลึก/ ชีววิทยาทางทะเลและระบบนิเวศวิทยาทางทะเล

ตอนที่ ๓ ข้อเสนอแนะอื่นๆ ในส่วนของข้อเสนอแนะจากผู้เข้ารับการอบรมส่วนใหญ่มีข้อเสนอแนะที่หลากหลายแต่ส่วนใหญ่จะเสนอแนะเกี่ยวกับเรื่องของวิธีการนำเสนอและรูปแบบของการนำเสนอบางหัวข้อยังไม่เข้าใจและยากเกินไป มีศัพท์ภาษาอังกฤษฟังไม่เข้าใจ ระยะเวลาในการจัดอบรมน้อยไป ไม่มีกิจกรรมนันทนาการหรือเกมส์มาประกอบ รวมทั้งการทำให้ปฏิบัติการในแต่ละฐานทำได้ไม่ครบทุกคนและในส่วนของหัวข้อที่อยากให้จัดอบรมในครั้งต่อไปมีหลากหลายมากดังนั้นจึงขึ้นอยู่กับผู้จัดว่ามีความพร้อมหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องหรือไม่ รวมทั้งแนวนโยบายในการจัดกิจกรรมของทั้งโรงเรียน และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลว่าจะมีทิศทางไปทางใดในอนาคต

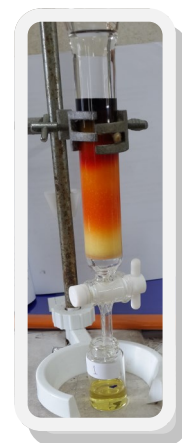


เอกสารประกอบการฝึกอบรบเชิงปฏิบัติการ

ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพ
และเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเล
และฟองน้ำทะเล สัญจรสู่โรงเรียน

โดย คณะผู้วิจัยจากแผนงานวิจัย...

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์
เสริมอาหาร



วันที่ 20 สิงหาคม 2557
ณ โรงเรียนสิงห์สมุทร

โครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ

“ถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพ
และเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของจุลินทรีย์ทะเล
และฟองน้ำทะเล สัณฐานวิทยาโรงเรียน”



แผนงานวิจัย

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

- ความหลากหลายทางชนิดของฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเล
อ่าวไทยตอนกลาง
- ศักยภาพของแบคทีเรียทะเล: แหล่งของสารออกฤทธิ์ทาง
ชีวภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร
- การค้นหารางควัตถุที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ทะเล

แผนงานวิจัย

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

- ศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งกรดไขมันชนิดจำเป็น
- การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนไมซีต
และการผลิตเซลล์ปริมาณมาก
- การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการ
ตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตตัวน้ำหรือ
แบคทีเรีย

แผนงานวิจัยต่อเนื่องระยะเวลา 3 ปี (พ.ศ. 2556-2558)

- คณะดำเนินงานวิจัย
 - หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 1 ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ
 - หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 2 ดร. ชุตติวรรณ เดชสกุลวัฒนา
 - หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 3 ดร. รวีวรรณ วัฒนดิลก
 - หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 4 นางณิษา สิรินนท์ธนา
 - หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 5 นางสาวรัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์
 - หัวหน้าโครงการวิจัยที่ 6 ดร. สุพรรณิณี ลีโทขวลิต

ความสำคัญและที่มา

- การวิจัยค้นคว้าสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นยารักษาโรค และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร
- ส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีท ยีสต์ และรา) บนแผ่นดิน จึงค้นหาสารตัวใหม่ๆ จากสิ่งมีชีวิตในทะเล
- จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ตลอดจนในน้ำทะเลหรือตะกอนดิน เป็นแหล่งของสารประกอบธรรมชาติที่ยิ่งใหญ่ และมีความหลากหลายของฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าจะนำมาผลิตด้วยได้

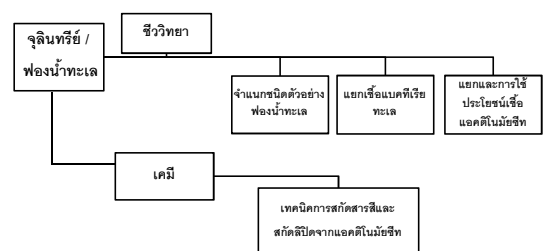
วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัย

- ค้นหาสารตัวตั้งต้นที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial)
- พัฒนาด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ได้แก่ กรดไขมัน และชีววงควัตถุ
- พัฒนาการผลิตวัคซีนสำหรับสัตว์น้ำ
- พัฒนาการเพิ่มผลผลิตเซลล์จุลินทรีย์
 - ถ่ายทอดองค์ความรู้ในการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล

ผลสำเร็จจากงานวิจัยปีที่1

- ทราบถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเล
- ทราบถึงสารตั้งต้นที่น่าสนใจเพื่อเป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง
- องค์ความรู้ที่สนับสนุนการเรียนการสอนและการผลิตบัณฑิต
- สร้างเยาวชนที่มีองค์ความรู้และความตระหนักในการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรชีวภาพทางทะเลอย่างยั่งยืนด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

อบรมเชิงปฏิบัติการ



Phylum Porifera (ฟองน้ำ:Sponges)



สุเมตต์ ปุจฉากการ
Sumaitt Putchakarn
งานวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
Marine Biodiversity Research Unit
Institute of Marine Science, Burapha University

งานวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล ฝ่ายวิจัย ภารกิจ

1. ทำงานวิจัยเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพในทะเล
2. ทำหน้าที่เก็บรวบรวมและจำแนกชนิดตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเล เพื่อจัดแสดงในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มและพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์ทางทะเล
3. ดูแลรักษาและจัดการฐานข้อมูลตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์อ้างอิง
4. บริการวิชาการเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพในทะเล



ทะเลไทย

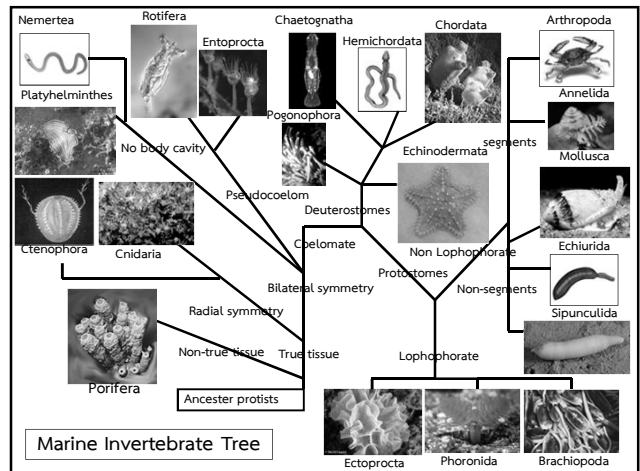
ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อน
(Tropical Zone)

ชายฝั่งทะเล มากกว่า 2,600 km
และเกาะมากกว่า 800 เกาะ

2 มหาสมุทร 1 ประเทศ คือ มหาสมุทร
อินเดียและมหาสมุทรแปซิฟิก

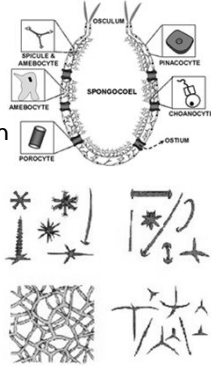
ตั้งอยู่บนเปลือกที่เก่าแก่และมั่นคง
(Sunda Plate)

ความหลากหลายทาง
ชีวภาพสูง!!!!

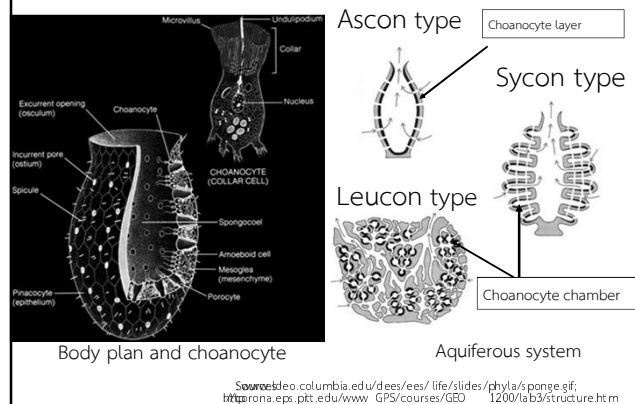


ชีววิทยาของฟองน้ำ

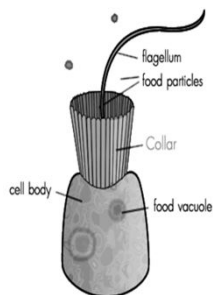
- Multi-cellular animal (Metazoa)
- No true tissue (parazoa), no organs, no nervous system
- Three types of water canal system
- Filter feeder
- Spicules and/or Spongin fiber are main skeleton
- Sexual and Asexual reproduction
- ~ 8,000 are extant species and more 900 genera are fossils



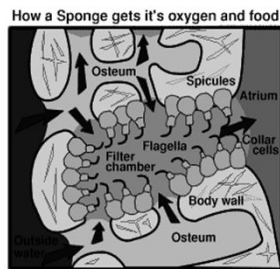
สัณฐานวิทยา



หน้าที่ของเซลล์ฟองน้ำ

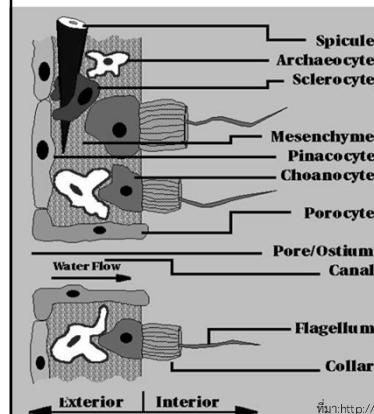


อนุภาคของอาหาร (food particles) จะเข้าไปในช่องคอของเซลล์ (collar cell) แล้วถูกกลืนโดยตัวเซลล์ (cell body) และจะถูกย่อยในช่องแวคิวโอล (food vacuole)



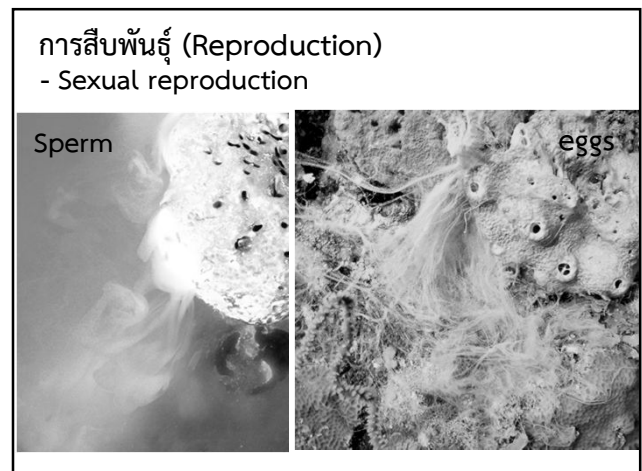
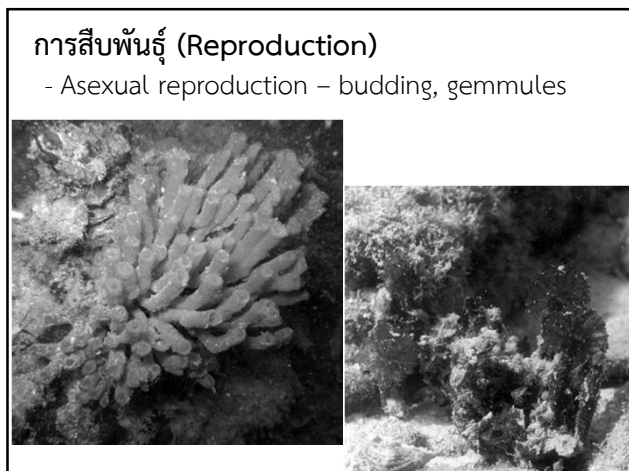
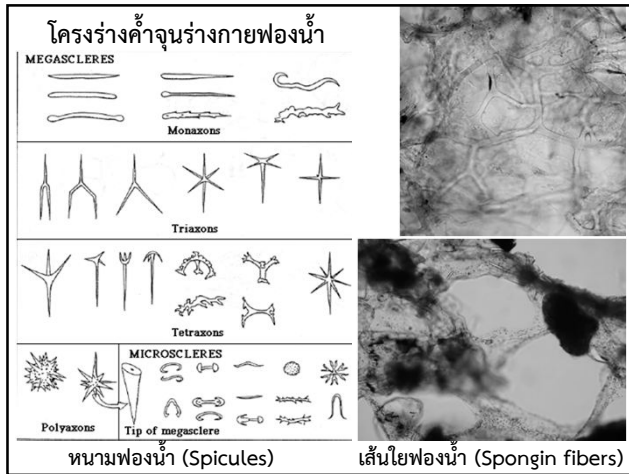
ที่มา: <http://www.mesa.edu.au/friends/seashores/sponges1.html>

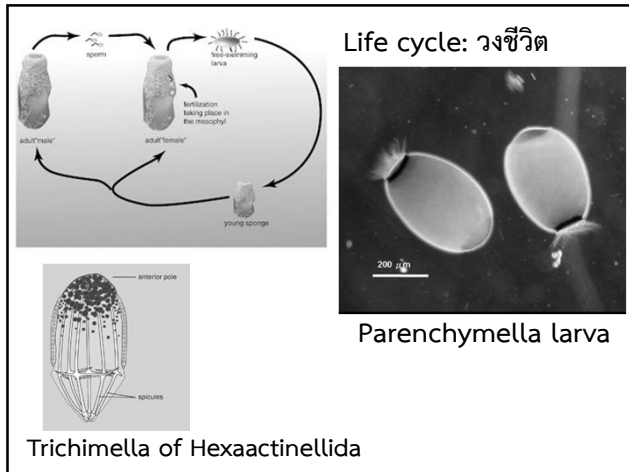
ผนังลำตัวและเซลล์ฟองน้ำที่สำคัญ



Totipotency
= การเปลี่ยนแปลงหน้าที่
ของเซลล์

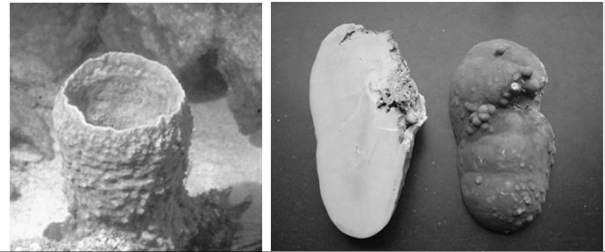
ที่มา: <http://www.ucmp.berkeley.edu/80/porifera/por.org.html>





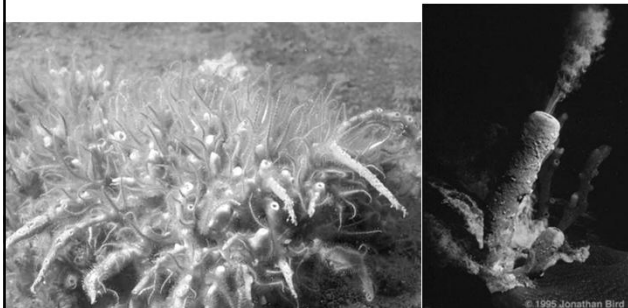
นิเวศวิทยาของฟองน้ำ

- สัตว์เกาะติด (Sessile animal) – Solitary or Colony
- พบทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม, ตั้งแต่ชายฝั่งทะเลถึงทะเลลึก
- บางระบบนิเวศพบฟองน้ำทะเลเป็นสัตว์ชนิดเด่น
- เจริญเติบโตช้าและอายุยืน อาจได้ถึง 5,000 ปี



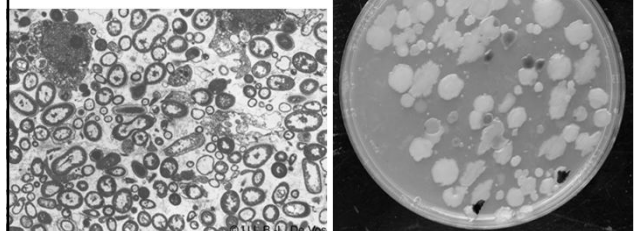
บทบาทในระบบนิเวศ

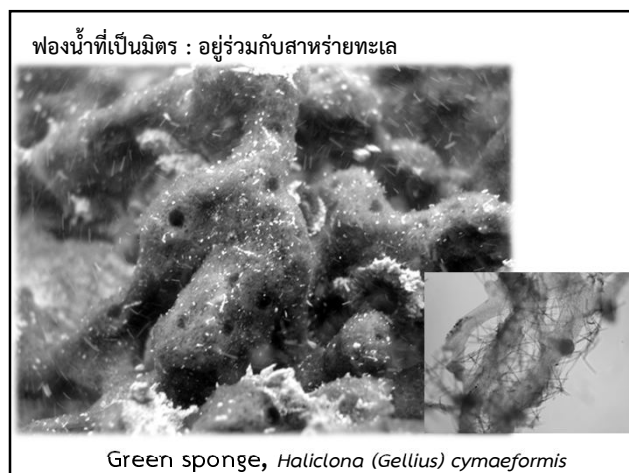
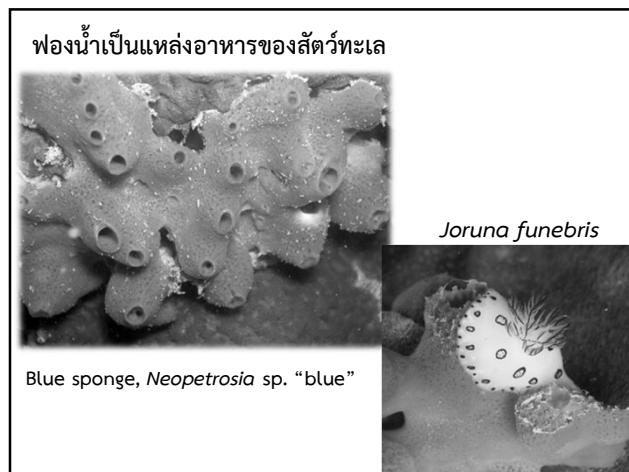
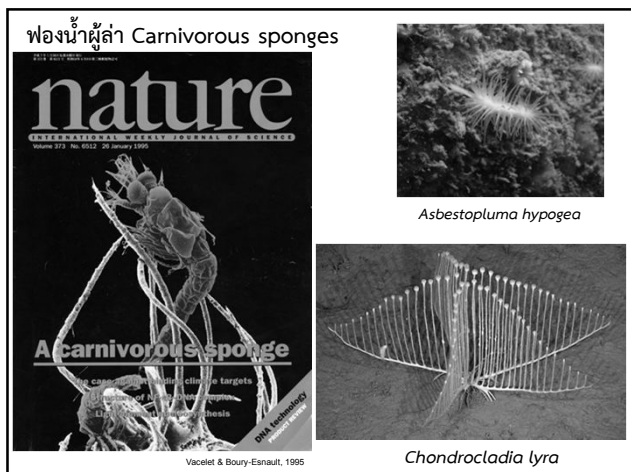
- ลดปริมาณตะกอนในน้ำทะเลโดยการกรอง
- เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยให้กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ



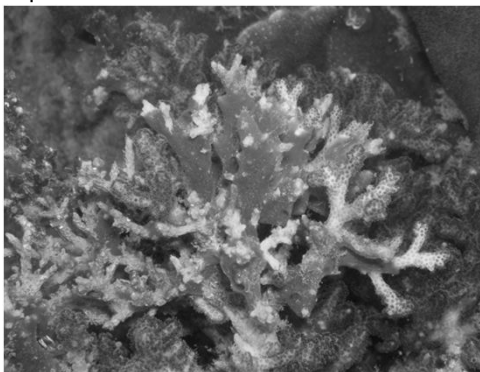
The first farmer in the sea: เกษตรกรยุคแรกของโลก

ฟองน้ำบางชนิดทำการเลี้ยงแบคทีเรียไว้เป็นอาหารของตนเองแล้วสร้างสารต้านจุลชีพขึ้นมาเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารของตนถูกทำร้ายหรือถูกแย่งแย่งที่อยู่ออแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่พึงประสงค์



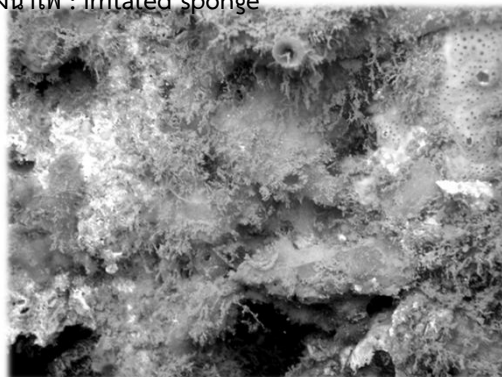


ฟองน้ำรุกราน Aggressive sponges



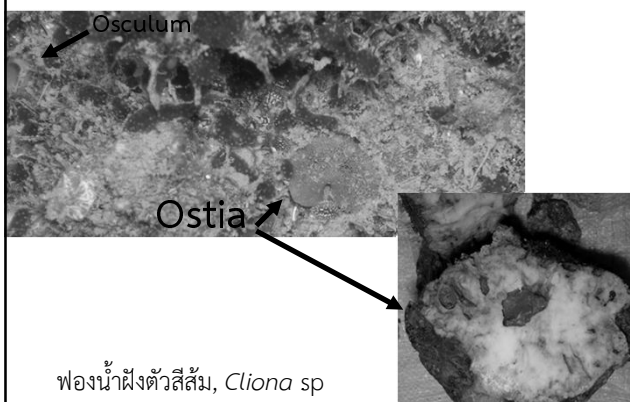
Purple sponge, *Haliclona (Reniera) sp*

ฟองน้ำไฟ : Irritated sponge



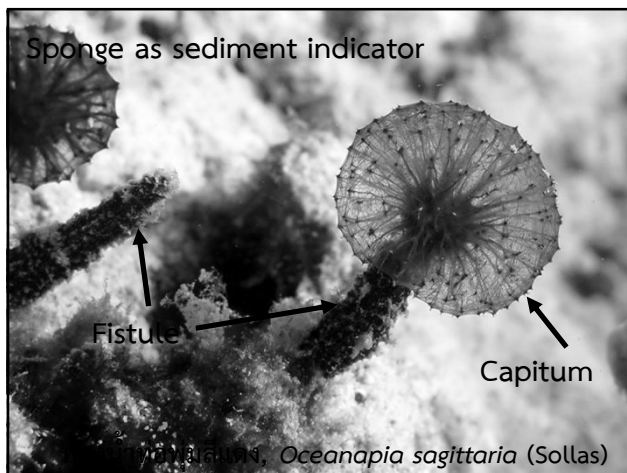
Fire sponge, *Biemna tubulata* (Dendy)

ฟองน้ำฝังตัว (Bio-erosion sponges)



ฟองน้ำฝังตัวสีส้ม, *Cliona sp*

Sponge as sediment indicator



ฟองน้ำลูกแพร์, *Oceanapia sagittaria* (Sollas)

การใช้ประโยชน์จากฟองน้ำ (Sponges as human use values)

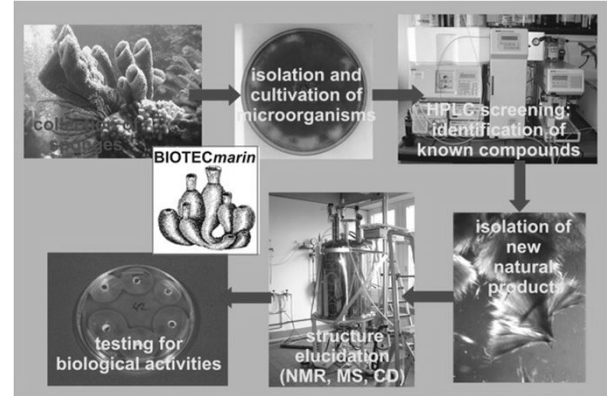


ฟองน้ำอุตสาหกรรม

ฟองน้ำธรรมชาติ

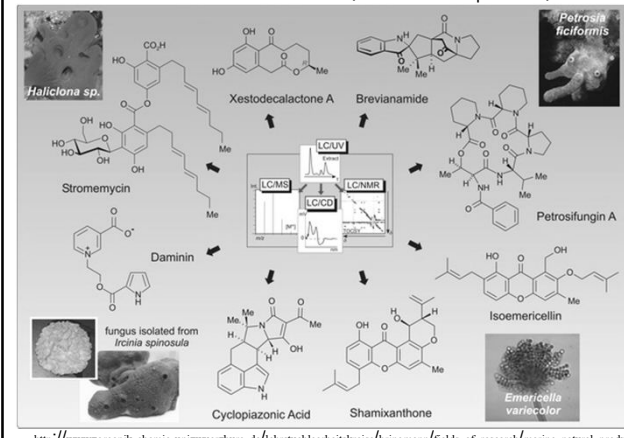
งานศิลป์และการตกแต่ง

ฟองน้ำเป็นแหล่งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (Marine natural products)



http://www-organik.chemie.uni-wuerzburg.de/lehrtstuhlcarbeitskreise/bringmann/fields_of_research/marine_natural_products

ฟองน้ำเป็นแหล่งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (Marine natural products)

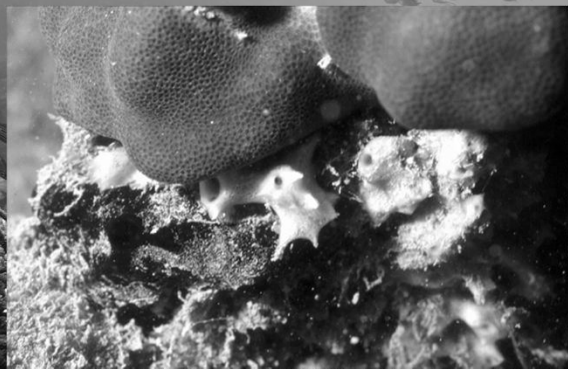


http://www-organik.chemie.uni-wuerzburg.de/lehrtstuhlcarbeitskreise/bringmann/fields_of_research/marine_natural_products

แหล่งศึกษาคือ ระบบนิเวศทางทะเลที่สำคัญ ได้แก่ หาดทราย หาดหิน ป่าชายเลน แหล่งหญ้าทะเล แนวปะการัง พื้นท้องทะเล นอกชายฝั่ง และสิ่งก่อสร้างที่มนุษย์สร้างขึ้น รวมถึงตลาดทำ เที่ยบเรือประมง



แหล่งศึกษาฟองน้ำ : แนวปะการัง



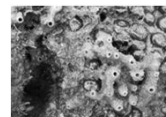
แหล่งศึกษาฟองน้ำ



แหล่งหญ้าทะเล



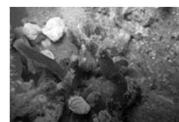
หาดทราย



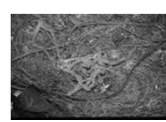
หาดหิน



เสาสะพานเทียบเรือ



สะพานปลา



ทำขึ้นเรือวนปู

การสำรวจและเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

- ฟองน้ำเป็นสัตว์เกาะติดอยู่กับที่ (Sessile animal)
- พบทั่วไปตั้งแต่ชายฝั่งในเขตน้ำขึ้นน้ำลง จนถึงพื้นที่ท้องทะเลลึก
- ในเขตร้อนพบมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก
- มีความเด่นอยู่ในทุกระบบนิเวศของทะเล
- มีพฤติกรรมหลากหลาย เช่น อยู่ร่วมกับสัตว์อื่น (Associated) ชอบแสง (Expose) ไม่ชอบแสง (Cryptic) เจริญขึ้นอยู่บนพื้นดิน (Excavated) ฝังตัว (Burrowing) ฯลฯ

การสำรวจต้องพยายามให้ครอบคลุมพื้นที่ให้มากที่สุด!!

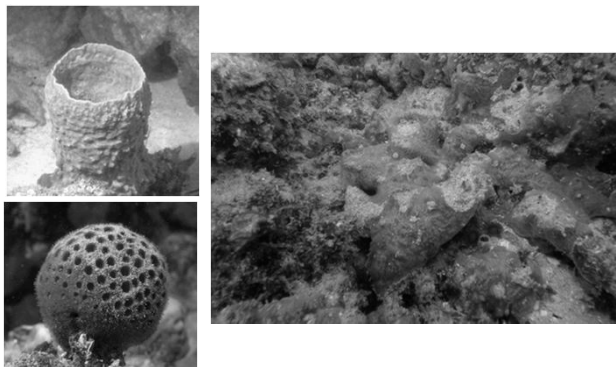
การสำรวจและเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

แบบเคลือบผิว (Encrusting)



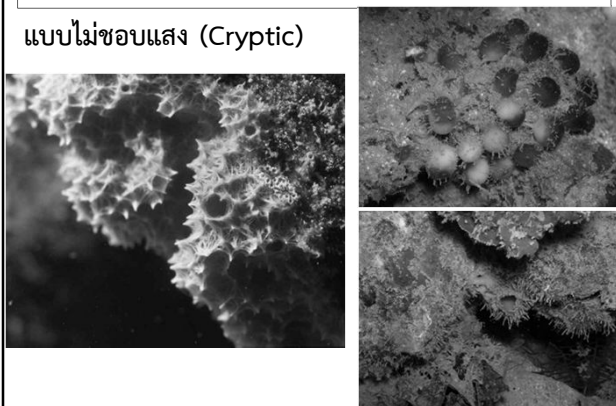
การสำรวจและเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

แบบชอบแสง (Expose)

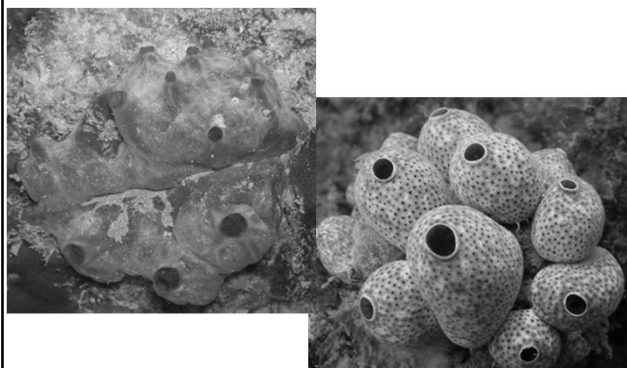


การสำรวจและเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

แบบไม่ชอบแสง (Cryptic)



ฟองน้ำ (Sponges) กับเพรียงหัวหอม (Ascidians)



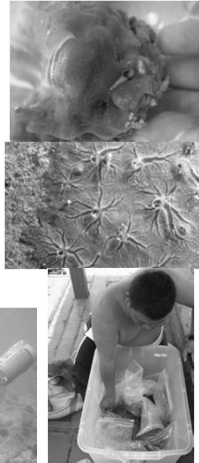
การเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

- อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง
- มีดสำหรับตัดฟองน้ำ ค้อนและสิ่ว
- ถุงซิปป
- กระดาษเลเบลตัวอย่าง
- ถุงมือยาง
- กล้องถ่ายรูป
- แอลกอฮอล์ 70%
- สมุดบันทึก



การเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

- พยายามเก็บตัวอย่างฟองน้ำให้ได้ทั้งก้อนฟองน้ำ
- ให้ตัวอย่างฟองน้ำอยู่ในน้ำทะเลตลอดเวลา
- แยกฟองน้ำแต่ละตัวอย่างในถุงซิปล็อคเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสปีชีส์
- ถ่ายรูปฟองน้ำและถิ่นที่อยู่อาศัย

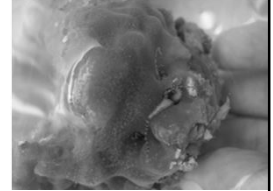


การบันทึกข้อมูลตัวอย่างฟองน้ำ

Data notes:

- Date & Time, GPS
- *in situ* photography
- Habitats: depths, types of habitat, substrate
- light exposing, etc
- External morphology: growth forms, surface features, oscule distribution, consistency, coloration, etc

ดองตัวอย่างฟองน้ำในแอลกอฮอล์ 70%



Data

งานในห้องปฏิบัติการ

Microscopic studies

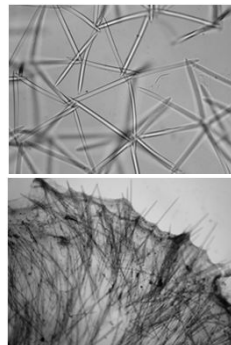
- Tangential and perpendicular sections through sponge tissue



Tangential section



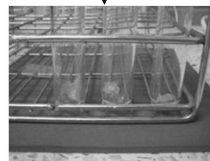
Perpendicular section



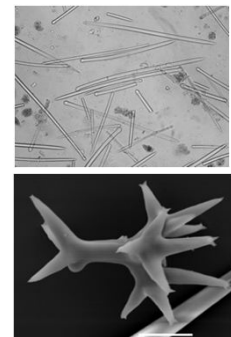
งานในห้องปฏิบัติการ

- Spicules preparation: cook in conc

citric acid

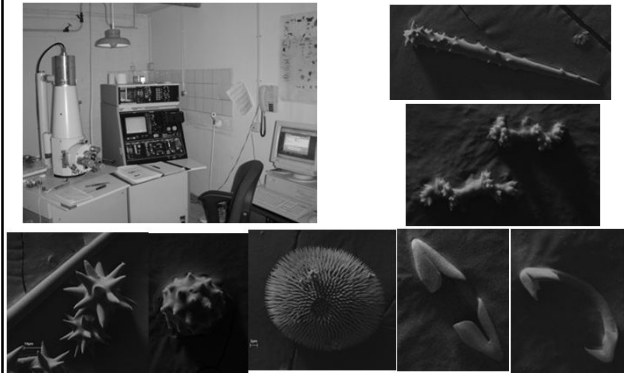


distilled and centrifuged
distilled water and
50% alcohol, and suspended in 9
alcohol



งานในห้องปฏิบัติการ

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscopy, SEM)



การจำแนกชนิดฟองน้ำ

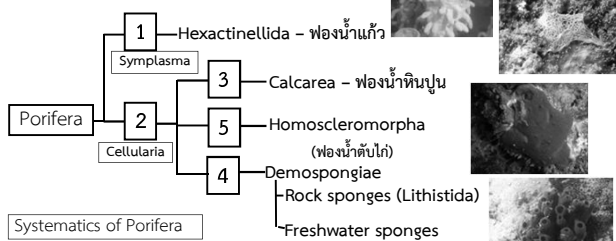
Sample

Order, Family and Genus level based on **Böcher**
2002, *Systema Porifera* and Terminology and glossary
to Römer, 1997-Esnault *Thesaurus of sponge*
morphology.

At species level based on collecting references



การจำแนกกลุ่มฟองน้ำ



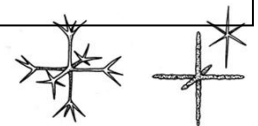
Systematics of Porifera

- 1= silica spicules; hexactine; syncytium; sycon or leucon type
- 2 = porocytes; transport of sperm to egg via choanocyte
- 3 = calcareous spicules; no silica spicules; 3 types of water canal
- 4 = silica spicules; tetraxon; spongyocytes&spongin fiber; leucon type
- 5 = silica spicules; no megasclere

sbcrp/www.biology.ualberta.ca/courses/hp/zool

250/Clades/clade03-Porifera.htm

Class Hexactinellida: ฟองน้ำแก้ว (Glass sponges)

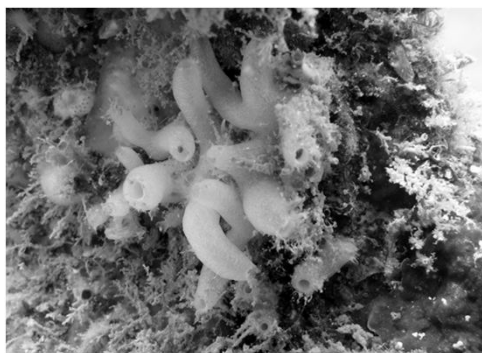


Deep water glass sponge from the Andaman Sea



Aphrocallistes sp.

Class Calcarea: ฟองน้ำหินปูน (calcareous sponges)



ฟองน้ำหินปูนแฉกกันสีขาว, *Sycon* sp. "white"



Class Calcarea
Calcareous sponges

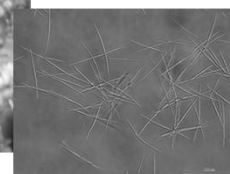


ฟองน้ำหินปูนท่อสีขาว, *Clathrina* sp. "white"

Class Homoscleromorpha
Order Homosclerophorida, Family Plakinidae

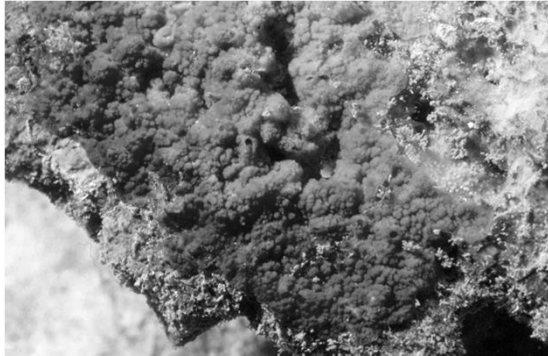


ฟองน้ำตับไก่, *Plakortis communis*



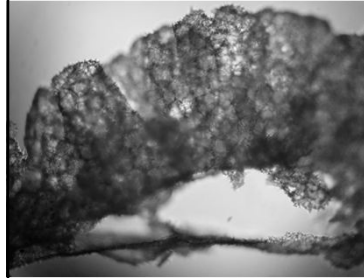
Diods

Order Homosclerophorida, Family Plakinidae

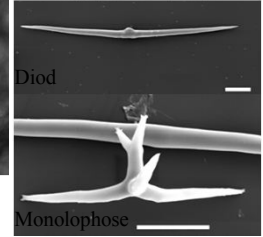
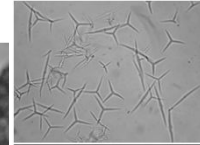


Plakina monolopha Schulze, 1880

Order Homosclerophorida, Family Plakinidae



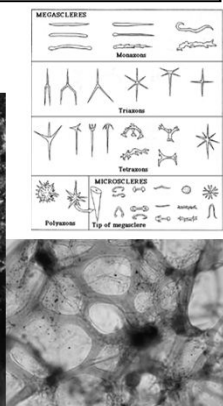
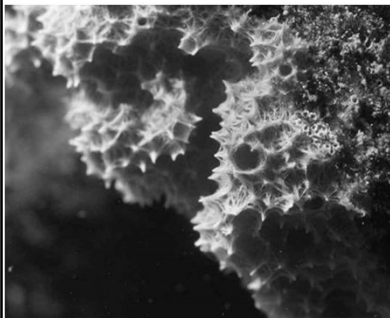
Ectosomal and Choanosomal skeleton



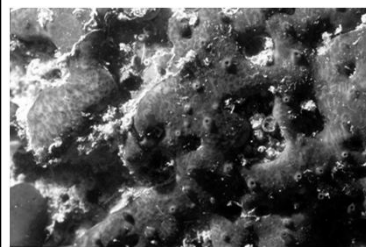
Monolopose

Plakina monolopha Schulze, 1880

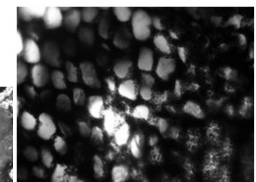
Class Spongiae: Demosponge



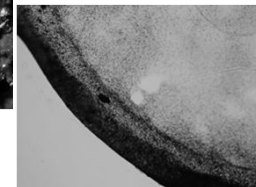
Order Chondrosida,
Family Chondrillidae



Chondrosia reticulata (Carter, 1881)

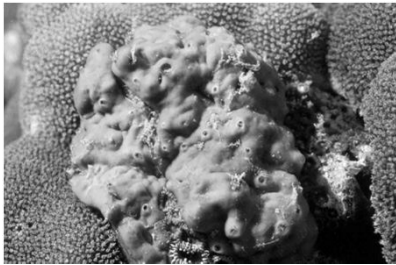


Ectosome

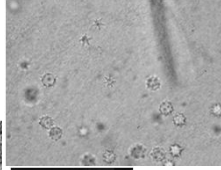


Cross section

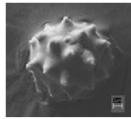
Order Chondrosida,
Family Chondrillidae



Chondrilla australiensis (Carter, 1873)



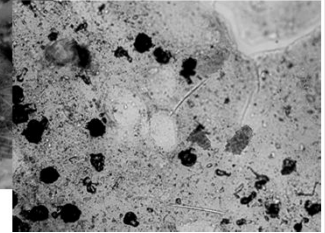
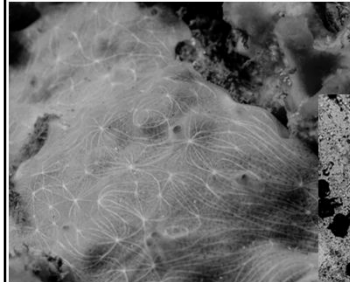
oxyaster



Spheraster

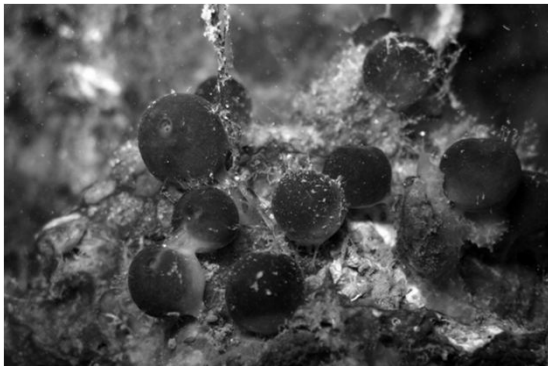
Order Chondrosida, Family Halisarcidae

- Choanocyte chambers tubular and branched



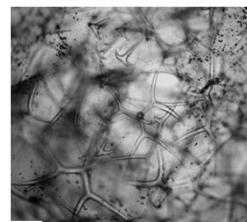
Halisarca ectofibrosa Vancelet et al., 1976

Order Astrophorida, Family Ancorinidae



Stelletta clavosa (Ridley, 1884)

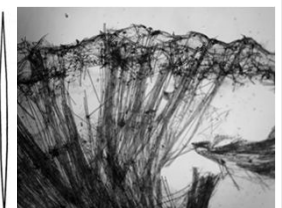
Order Astrophorida, Family Ancorinidae



Ectosomal skeleton



Dichotriaene



Oxea Choanosomal skeleton

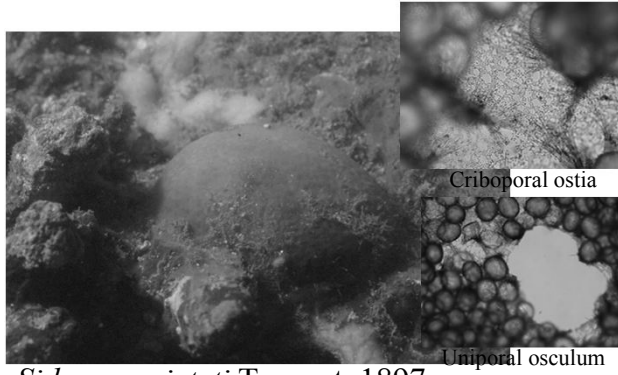


Tyloster

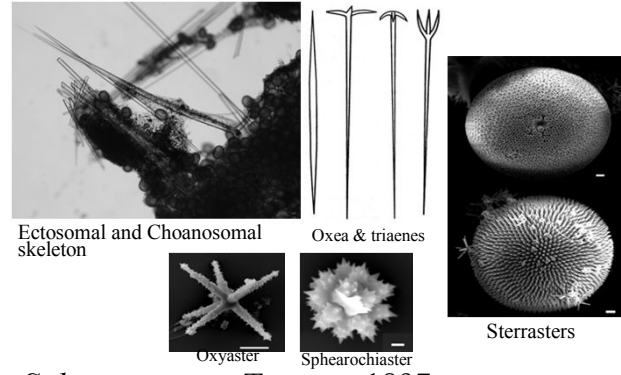
Anatriaene

Stelletta clavosa (Ridley, 1884)

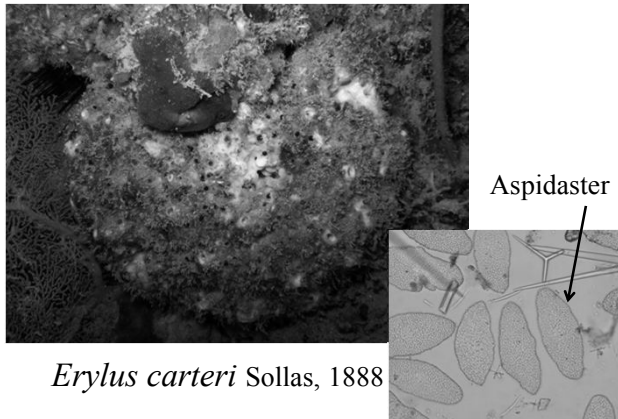
Order Astrophorida, Family Geodiidae

*Sidonops picteti* Topsent, 1897

Order Astrophorida, Family Geodiidae

*Sidonops picteti* Topsent, 1897

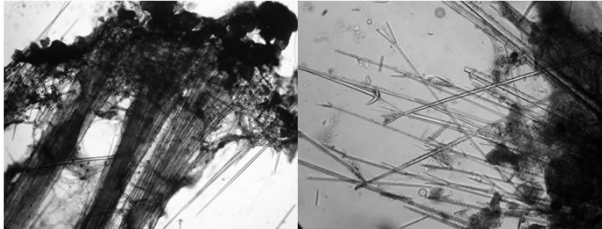
Order Astrophorida, Family Geodiidae

*Erylus carteri* Sollas, 1888

Order Spirophorida, Family Tetillidae

*Paratetilla bacca* (Selenka, 1867)

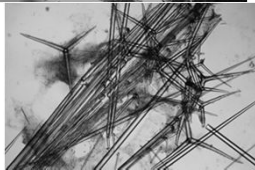
Order Spirophorida, Family Tetillidae



Ectosomal and Choanosomal skeleton

Calithrops-like shorted-sharp triaenes

Paratetilla bacca (Selenka, 1867)



Order Hadromerida,
Family Suberitidae

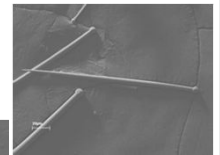


Terpios granulosa Bergquist, 1967

Tylostyle base with quadrilobate condition



Ectosomal skeleton

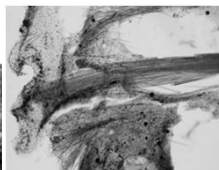


Tylostyles

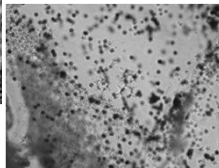
Order Hadromerida,
Family Tethyidae



Tethya seychellensis (Wright, 1881)



Ectosomal and
Choanosomal skeleton



Ectosomal spicules

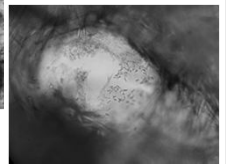
Order Hadromerida,
Family Clionaidae



Spheciospongia congenera (Ridley, 1884)



Ectosomal and
Choanosomal skeleton

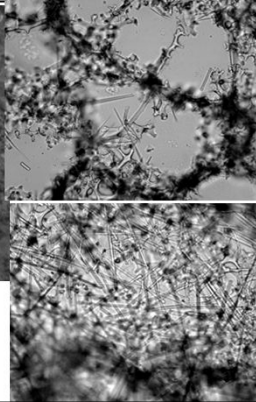


Ectosomal spicules

Order Lithistida : ฟองน้ำก้อนหิน

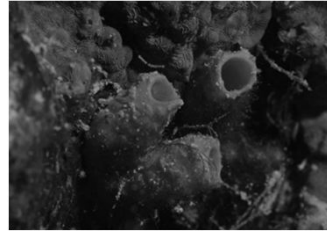


Lithistid sponge, *Aciculites* sp.

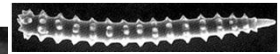


Order Agelasida Hartman, 1980, Family Agelasidae Verrill, 1907

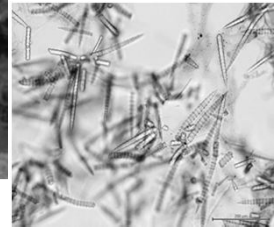
- contains 2 families with 6 valid genera.
- reticulation of spongin fibres cored and echinated by verticillate styles, occasionally including verticillate oxeas.



Agelas ceylonica Dendy, 1905

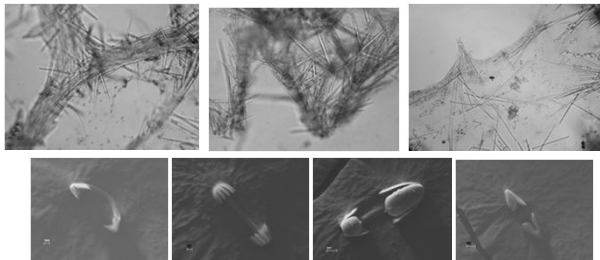


verticillate style



Order Poecilosclerida Topsent,

- main skeleton composed of megascleres and spongin fibers in various stages of development
 - microscleres chelae and sigmas and other diverse forms
- 4 suborders with 20 families, 129 genera and 50 subgenera;
highest diversity, more than three thousand species

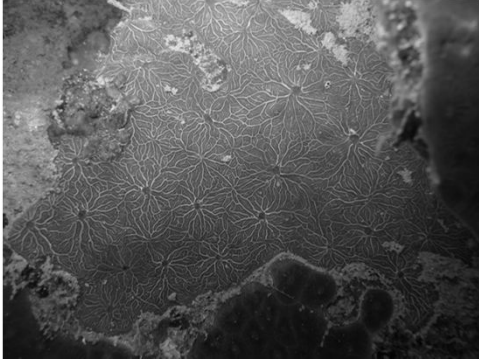


Suborder Microcionina, Family Microcionidae



Clathria (Thalysias) reinwardti Vosmer, 1880

Suborder Microcionina, Family Microcionidae



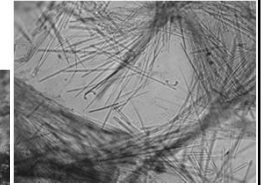
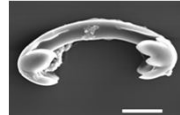
Clathria (Thalysias) toxifera (Hentschel, 1912)

Suborder Myxillina,
Family Crambeidae

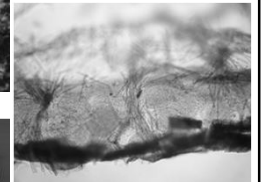


Monanchora unguiculata (Dendy, 1922)

unguiferate anchorate isochelae

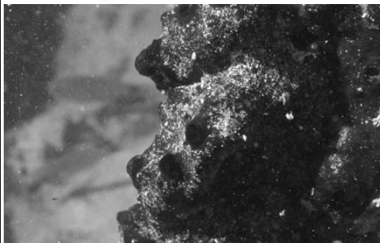


Ectosomal skeleton



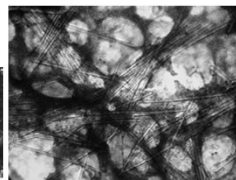
Choanosomal skeleton

Suborder Myxillina,
Family Iotrochotidae

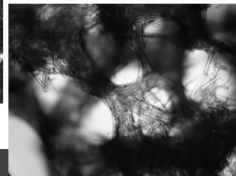


Iotrochota baculifera Ridley, 1884

Eirotula isochelae

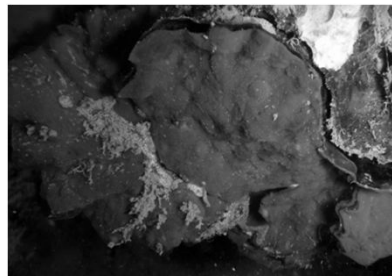


Ectosomal skeleton

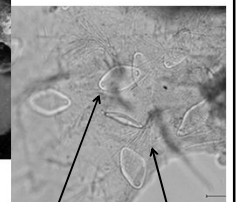


Choanosomal skeleton

Suborder Mycalina, Family Merliidae Kirkpatrick, 1908



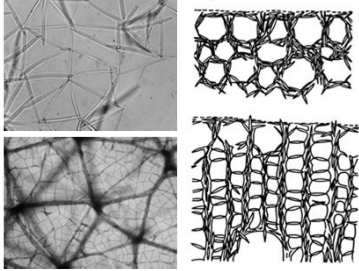
Merlia sp. "orange"



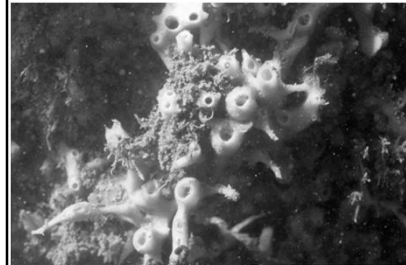
Clavdisc and subtylostyle

Order Haplosclerida Topsent, 1928

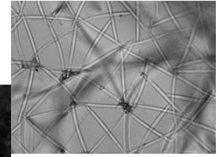
- Aniso- or isotropic reticulation
- Megascleres: shorted fusiform oxeas
- Microsclere: sigmas, toxas or trichodragmata



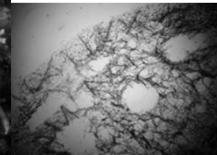
Suborder Haplosclerina, Family Chalinidae



Cladocroce burapha Puthakarn, *et al.*, 2004

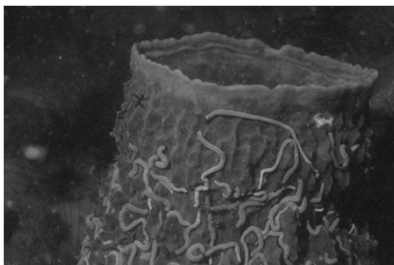


Ectosomal skeleton

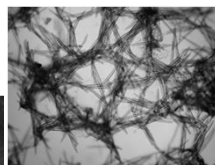


Choanosomal skeleton

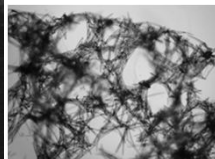
Suborder Petrosina, Family Petrosiidae



Xestospongia testudinaria (Lamarck, 1815)



Ectosomal skeleton



Choanosomal skeleton

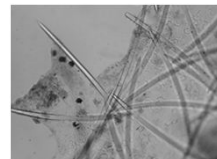
Suborder Petrosina, Family Phloeodictyidae



Oceanapia sagittaria (Sollas, 1902)

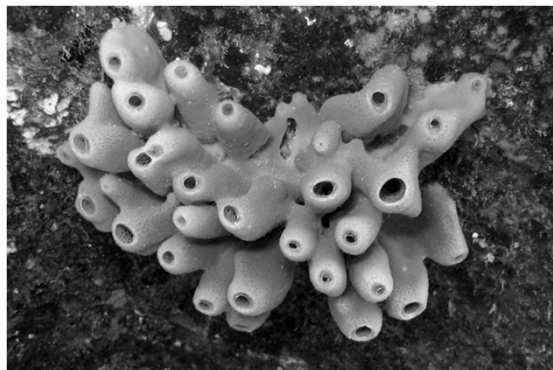


Ectosomal skeleton



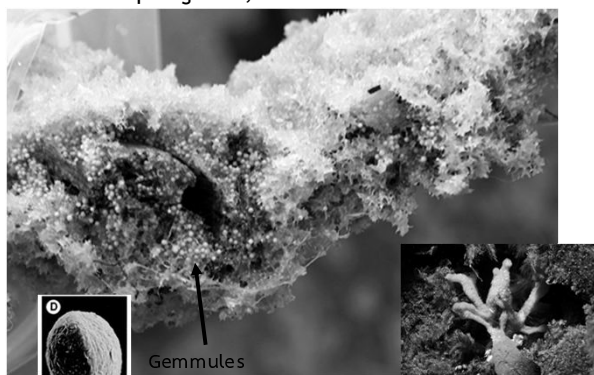
Ectosomal spicules

Suborder Petrosina, Family Petrosiidae



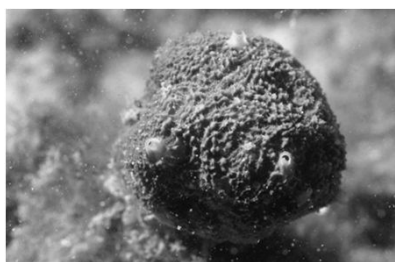
Neopetrosia sp. "blue"

Suborder Spongillina, ฟองน้ำน้ำจืด



Family Spongillidae, *Spongilla*.sp

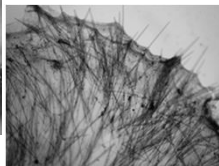
Order Halichondrida,
Family Halichodriidae



Axinyssa aplysinoides (Dendy, 1922)



Ectosomal skeleton



Choanosomal skeleton

Order Halichondrida, Family Axinellidae

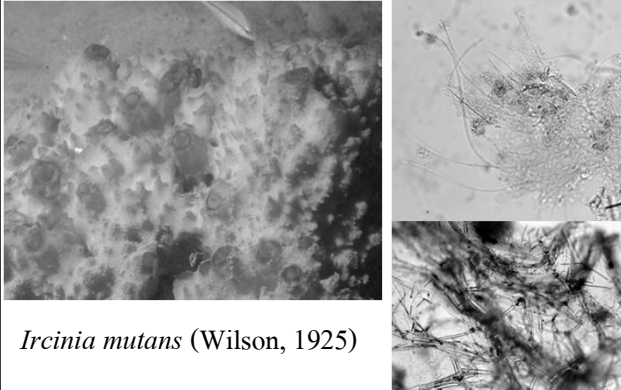


Phakellia ceylonensis Dendy, 1905

Choanosomal skeleton

Order Dictyoceratida, Family Irciniidae

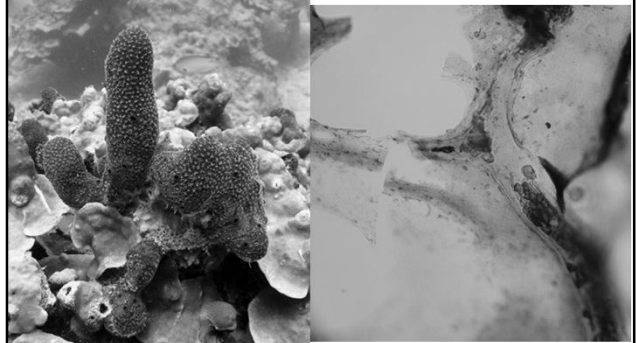
- Fine collagenous filaments present in addition to the fibre skeleton



Ircinia mutans (Wilson, 1925)

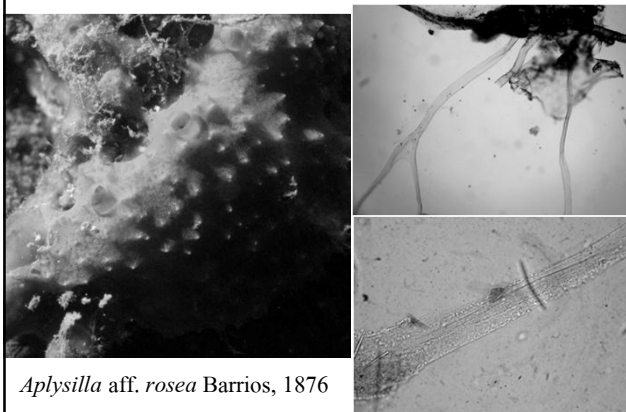
Order Dictyoceratida, Family Thorectidae

- Fibres marked laminations, Choanocyte chambers small, spherical



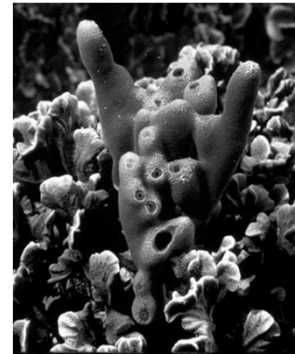
Hyrtios erectus (Keller, 1889)

Order Dendroceratida, Family Darwinellidae



Aplysilla aff. *rosea* Barrios, 1876

Thank you very much for your attention



Sponge love you!!!

บทปฏิบัติการ

การสกัดหนามฟองน้ำ (Spicules) และจำแนกชนิดฟองน้ำอย่างง่าย

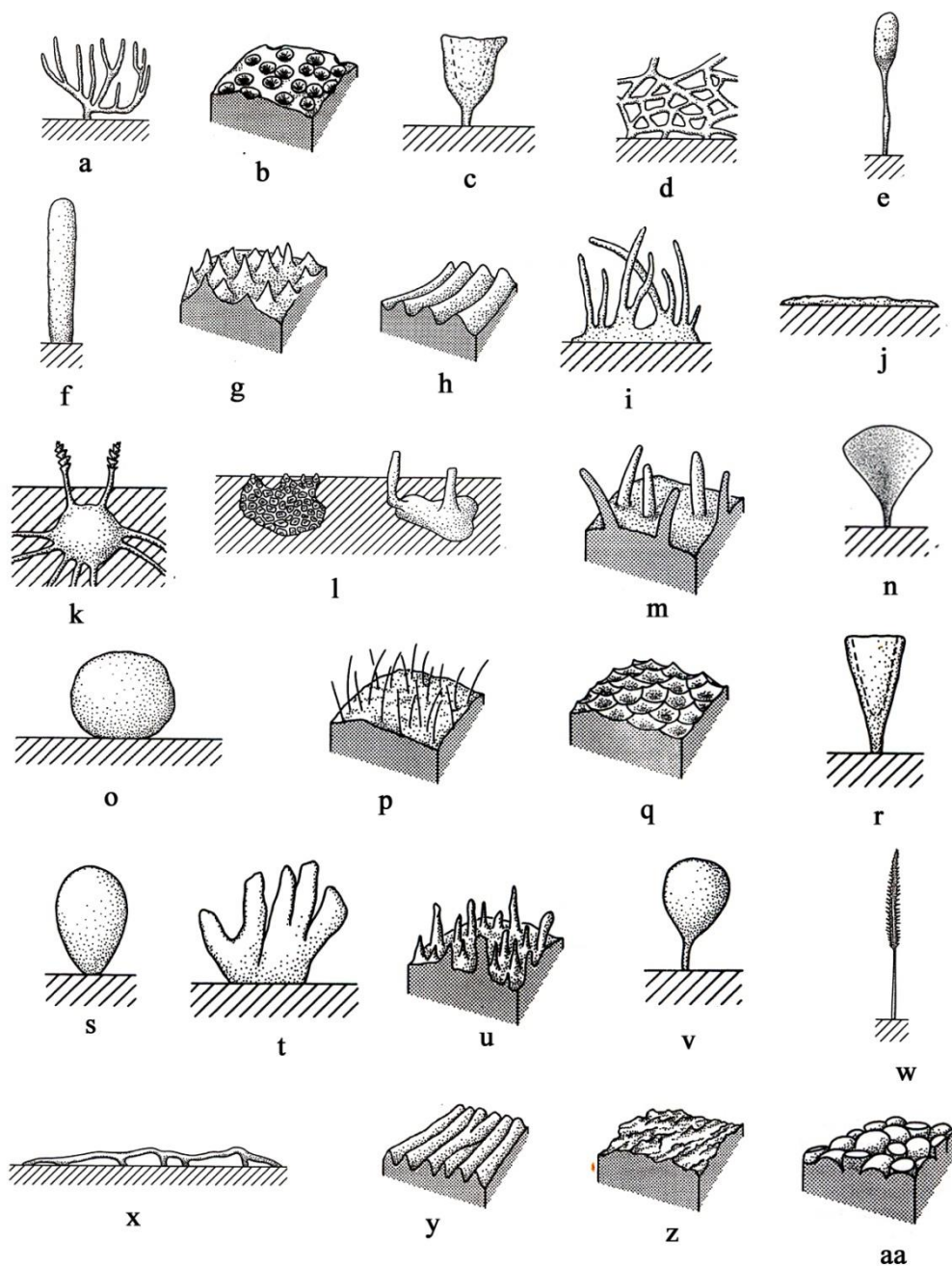
โดย ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ

งานวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

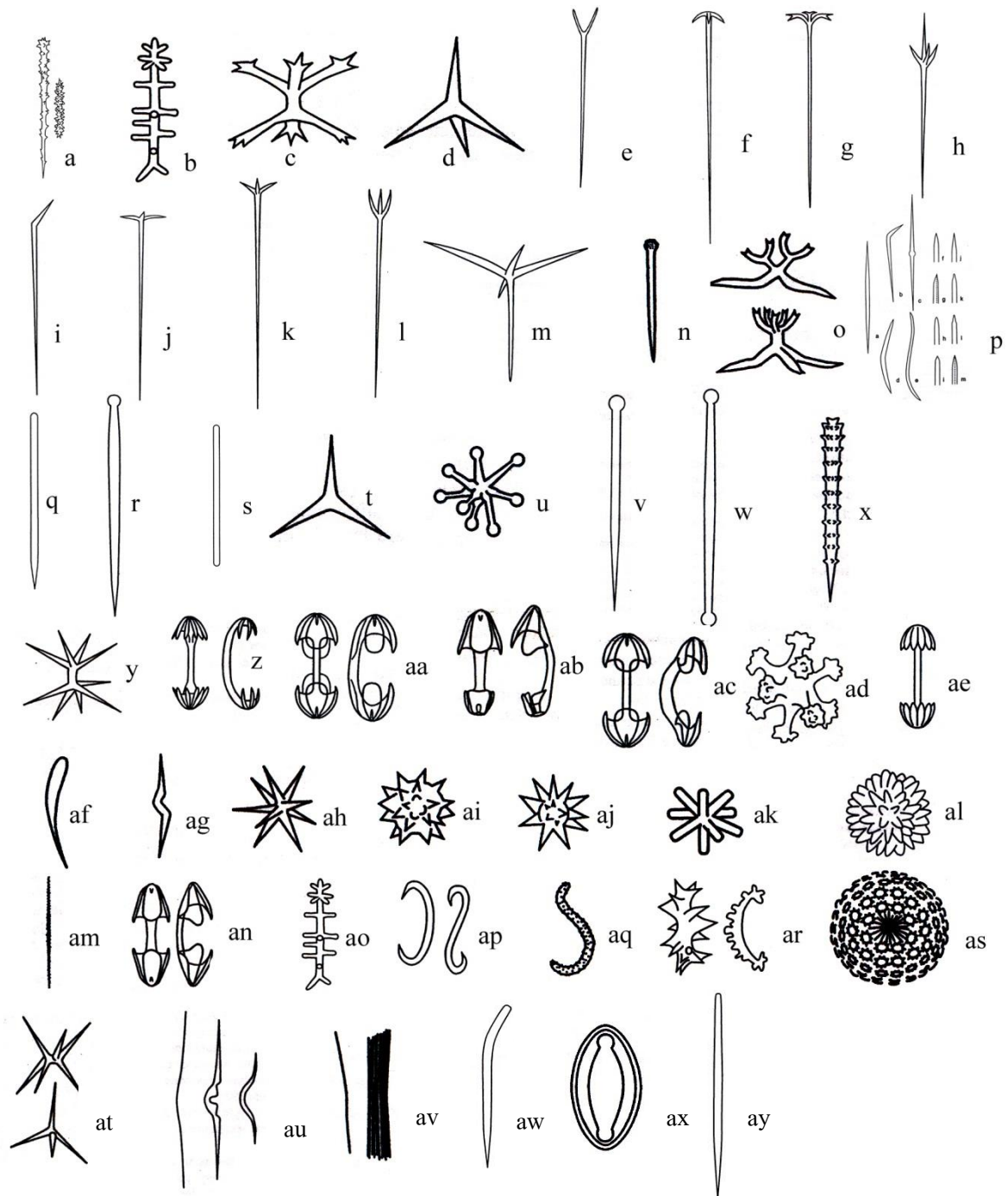
1. ขั้นตอนการปฏิบัติการสกัดหนามฟองน้ำและจำแนกชนิดฟองน้ำในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย

1. นำชิ้นตัวอย่างฟองน้ำออกจากขวดดอง วางลงบนถาดตัวอย่าง ตรวจสอบรูปร่างการเจริญเติบโตของฟองน้ำว่ามีลักษณะเป็นรูปทรงแบบใด ตามแผนภาพที่ 1
2. ใช้กรรไกรผ่าตัดหรือมีดผ่าตัด ตัดชิ้นฟองน้ำให้มีขนาดประมาณ 3X3X3 มิลลิเมตร นำมาวางลงบนสไลด์
3. ใช้หลอดดูดดูดสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) หรือคลอริกซ์ (Clorox) หรือสารฟอกขาว (Bleaching) เข้มข้น 5-10 % มาหยดลงบนชิ้นฟองน้ำพอให้ท่วมตัวอย่าง
4. วางทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาประมาณ 5 นาที ในบริเวณอากาศถ่ายเทสะดวก ไม่ควรสูดดมสารละลายเนื่องจากมีฤทธิ์กัดกร่อนเนื้อเยื่อ สารละลายจะย่อยสลายเนื้อเยื่อออกไปเหลือแต่เพียงหนามฟองน้ำ สังเกตจากฟองอากาศเริ่มลดจำนวนลง
5. หยดน้ำกลั่นลงบนตัวอย่างฟองน้ำเบาๆและพอประมาณให้ท่วมตัว ค่อยๆใช้หลอดดูดดูดน้ำและสารละลายออก และล้างน้ำซ้ำอีก 1-2 ครั้ง ใช้เข็มเขี่ยขยี้ตัวอย่างเบาๆและเกลี่ยให้ตะกอนที่เหลืออยู่กระจายตัวออก
6. หยดน้ำกลั่นลงบนตัวอย่าง 1-2 หยด วางแผ่นปิดสไลด์ นำสไลด์มาส่องตรวจหนามหนามฟองน้ำ ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายขนาดต่างๆ
7. บันทึกลักษณะของหนามฟองน้ำที่พบในสไลด์ ตามแผนภาพที่ 2

ตารางบันทึกผลการทดลองนามพองน้ำที่พบ



แผ่นภาพที่ 1 ลักษณะรูปทรงการเจริญและผนังลำตัวของฟองน้ำใน Class Demospongiae: a) Arborescent; b) Areolated; c) Caliculate; d) Clathrate; e) Clavate; f) Columnar; g) Conulose; h) Corrugated; i) Digitate; j) Encrusting; k) Endopsammic; l) Excavating; m) Fistule; n) Flabellate; o) Flagelliform; p) Hispid; q) Honeycombed; r) Infundibuliform; s) Ovate; t) Palmate; u) Papilla; v) Pedunculate; w) Pinnate; x) Repent; y) Ribbed; z) Rugose; aa) Verrucose. (ดัดแปลงจาก Boury-Esnault & Rützler, 1997)

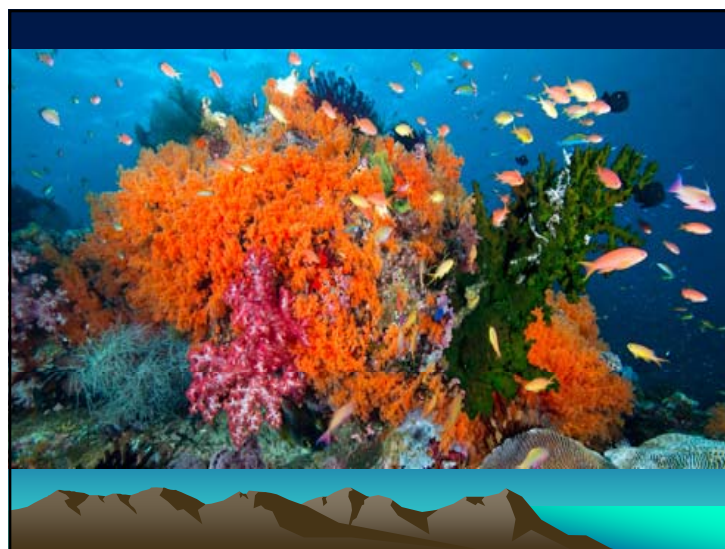


แผ่นภาพที่ 2 หนามฟองน้ำ (Spicules) ของฟองน้ำ Class Demospongiae: a) Acantho; b) Sanidaster; c) Amphitriaene; d) Calthrop; e) Diaene; f) Anatriaene; g) Dichotriaene; h) Mesotriaene; i) Monaene; j) Orthotriaene; k) Plagiotriaene; l) Protriaene; m) Centrotriaene; n) Exotyl; o) Lophocalthrop; p) Oxea; q) Style; r) Subtylostyle; s) Strongyle; t) Triod; u) Tylaster; v) Tylostyle; w) Tylote; x) Verticillate; y) Amphiaster; z) Anchorate chela; aa) Anchorate chela; ab) Anisochela; ac) Arcuate chela; ad) Anthaster; ae) Birotula; af) Commata; ag) Diod; ah) Oxyaster; ai) Spheraster; aj) Spheroxyaster; ak) Strongylaster; al) Truncaster; am) Onychaete; an) Palmate chela; ao) Sanidaster; ap) Sigma; aq) Sigmaspire; ar) Spiraster; as) Sterraster; at) Plesiaster; au) Toxa; av) Raphide, Trichodragmata; aw) Rhabdostyle; ax) Clavidisc; ay) Strongyloxea (ดัดแปลงจาก Boury-Esnault & Rützler, 1997)



Thai Waters

- Locate in tropical zone
- Marintime zone 350,000 km²
- Coastline > 2,815 kms. and about 500 Islands
- Connect to 2 oceans: Indian and Pacific Ocean
- High Biodiversity including marine habitats and organisms about 10% of the world



การใช้ประโยชน์ลักษณะทางกายภาพ

- แหล่งอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ
- แหล่งอุตสาหกรรม และแหล่งที่อยู่อาศัย
- แหล่งท่องเที่ยว
- การทำนาเกลือ
- การคมนาคม
- การทำเหมืองแร่ทะเล
- การทำนาเกลือ
- แหล่งเพาะเลี้ยงชายฝั่งทะเล



Drugs & Cosmetics from the Seas



การใช้ประโยชน์ลักษณะทางชีวภาพ

- แหล่งอาหาร ทรัพยากรประมง
- แหล่งอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ
- แหล่งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

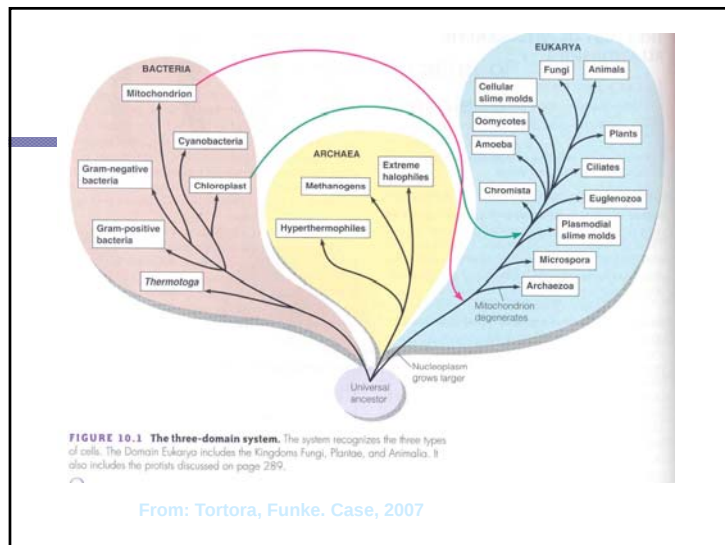


Phylum	World record species	Estimated species in Thailand	Known species in Thailand
Porifera	7,000	700	100
Cnidaria	9,000	1,000	401
Platyhelminthes	15,000	1,500	66
Nemertea	750	75	ND
Aschelminthes	12,000	1,200	157
Entoprocta	60	10	ND
Ectoprocta	3,300	330	ND
Brachiopoda	250	25	1
Echiurida	60	6	1
Mollusca	100,000	10,000	1,618
Annelida	12,000	1,200	84
Arthropoda	75,000	7,500	1,098
Echinodermata	7,000	700	370
Chaetognatha	50	5	ND
Urochordata	1,600	160	6

มูลค่าผลประโยชน์แห่งชาติทางทะเล	หน่วย: ล้านบาท	%
1.มูลค่าจากทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง		
1.1 ทรัพยากรมีชีวิต	234,608.85	3.15
1.2 ทรัพยากรไม่มีชีวิต	499,069.12	6.71
2.มูลค่าจากกิจกรรมการใช้ทะเล		
2.1 พาณิชยนาวี	6,120,901.00	82.24
2.2 อุตสาหกรรมต่อเนื่องต่างๆ	341,061.30	4.58
2.3 การท่องเที่ยว	197,390.30	2.65
2.4 อื่นๆ	49,786.60	0.67
รวมมูลค่าผลประโยชน์แห่งชาติทางทะเล	7,442,817.17	100
3.มูลค่าผลกระทบจากกิจกรรมการใช้ทะเล		
3.1 การกัดเซาะ	4,657.00	
3.2 น้ำมันรั่วไหล	1,919.11	
3.3 สึนามิ	85,084.17	
รวม	91,660.28	

หมายเหตุ เป็นมูลค่าที่รวบรวมได้เท่าที่มีการประเมินโดยการพิจารณาจากข้อมูลที่มีอยู่จริงทั้งหมด
 เติมนักคิด จารยะพันธ์ และคณะ 2550. "ผลประโยชน์แห่งชาติทางทะเลสถานการณ์ และ ข้อเสนอ"





จุลินทรีย์คืออะไร ?

- จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ประกอบด้วยเซลล์เดียว (Unicellular) หรือหลายเซลล์ (Multicellular) แต่เซลล์เหล่านั้นเป็นเซลล์ชนิดเดียวกันและมีรูปร่างเหมือนกัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อทำหน้าที่เฉพาะเหมือนในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง

ประเภทของจุลินทรีย์ (ตามประเภทของเซลล์)

- 1) พวกโปรคาริโอต ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ลักษณะเฉพาะของกลุ่ม คือ นิวเคลียสไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ (Nuclear membrane)
- 2) พวกยูคาริโอต ได้แก่ เชื้อรา โปรโตซัว และสาหร่ายต่างๆ ยกเว้นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ลักษณะเฉพาะของกลุ่มนี้ คือ นิวเคลียสมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส

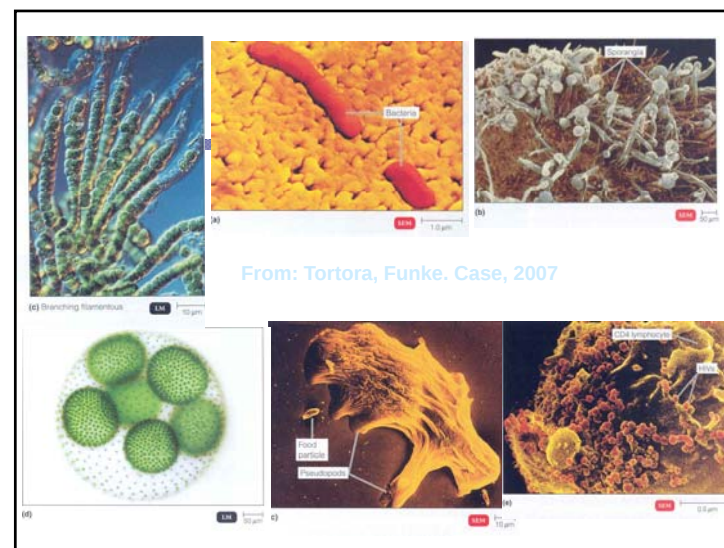
การจัดหมวดหมู่ของจุลินทรีย์

ในปี ค.ศ. 1866 Haeckel นักสัตววิทยาชาวเยอรมันได้เสนอแนะให้จัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตใหม่ โดยแยกสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ (lower organisms) ออกมาตั้งอาณาจักรใหม่ เรียกว่า Protista โดยอาศัยลักษณะร่างกายที่ประกอบด้วยเซลล์เดียว (unicellular) หรือหลายเซลล์ (multicellular)

Procaryotic cell เป็นกลุ่มที่เซลล์มีความแตกต่างน้อยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ นิวเคลียสไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) ทำให้สารพันธุกรรม (genetic material) อยู่อย่างกระจัดกระจายในไซโตพลาสซึม จุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ แบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียวน้ำเงิน

Eucaryotic cell เป็นกลุ่มที่เซลล์มีความแตกต่างมากกว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม นิวเคลียสมีเยื่อหุ้ม ทำให้สารพันธุกรรมอยู่รวมกลุ่มกันในไซโตพลาสซึม จุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้แก่ ฟังไจ โปรโตซัว และสาหร่ายอื่นๆ

Chutiwan Dechsakulwatana, Institute of Marine Science

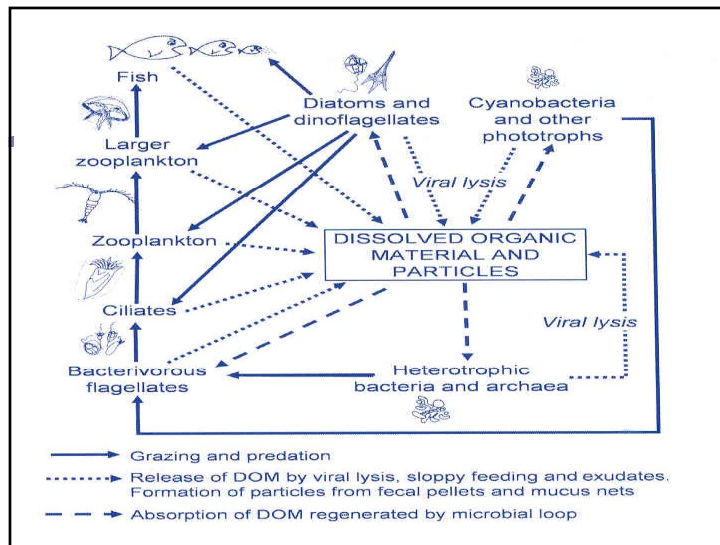


การดำเนินชีวิตของจุลินทรีย์

- อุณหภูมิ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (20°-45°C) แต่บางชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (ต่ำกว่า 0°-15°C) บางชนิดเจริญที่อุณหภูมิสูง (มากกว่า 45°C)
- แก๊สออกซิเจน จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาพที่มีแก๊สออกซิเจน บางชนิดเจริญได้ในที่มีแก๊สออกซิเจนน้อย บางชนิดเจริญได้ใน ที่ที่ไม่มีออกซิเจน
- ปริมาณเกลือแกง ความเป็นกรดเบส และความดัน จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดี เมื่อมีปริมาณเกลือมากกว่า 13 %
- ความเป็นกรดเบสค่อนข้างเป็นกลาง (pH 6-7)
- และจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ที่ความดันมากกว่า 9,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

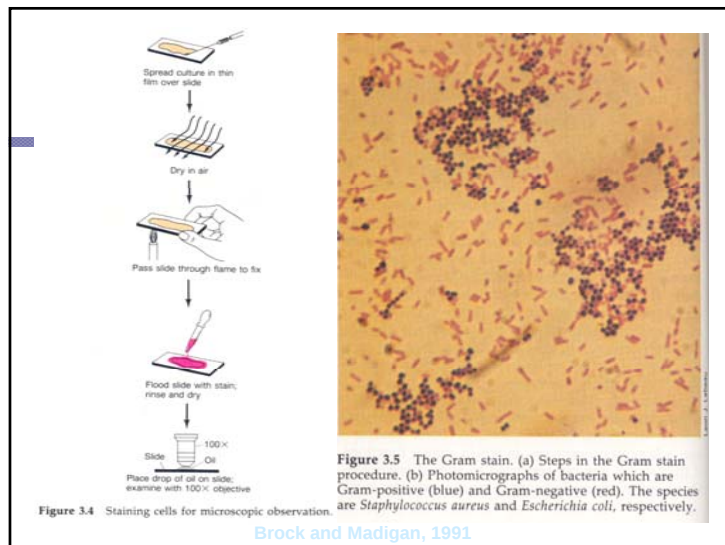
บทบาทและหน้าที่ของจุลินทรีย์

1. ทำให้เปลี่ยนแปลงของวัฏจักรสารต่างๆในดิน เพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน
2. ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์วัตถุในดินที่มีโมเลกุลซับซ้อน เช่น เซลลูโลส (เพิ่มสารประกอบคาร์บอนแล ไนโตรเจนในดิน และช่วยให้ดินมีคุณสมบัติอุ้มน้ำได้ดีขึ้น)
3. เกิดกิจกรรมการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดินที่เป็นกรด (ฟังไจเจริญได้ดี)
4. ทำให้เกิดกระบวนการหมัก
5. ผลิตยาปฏิชีวนะต่างๆ
6. ทำให้เกิดโรคกับมนุษย์ สัตว์และพืช



แบคทีเรีย

- แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดทั้งชนิดและจำนวน
- มีทั้งพวกที่เป็น autotroph และ Heterotroph
- แบคทีเรียเหล่านี้เจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย
- แบคทีเรียที่พบในดินจะมีชนิดและปริมาณแตกต่างกันไปตามอินทรีย์สารในดิน
 - ในดินที่มีการเพาะปลูกพืชจะมีแบคทีเรียมากกว่าในดินที่ไม่มีการเพาะปลูก
 - แบคทีเรียที่พบในดินส่วนมากได้แก่ สกุล *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Sarcina* และ *Xanthomonas*



Community Ecology & Benefits

ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ

1. neutralism : (0, 0) แบบเป็นกลาง เป็นการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด ที่ทั้งสองฝ่ายไม่ได้ประโยชน์หรือเสียประโยชน์
2. competition : (-, -) แบบแก่งแย่งกัน แบบนี้ทั้งสองฝ่ายต่างแก่งแย่งแข่งขันกันโดยตรง เช่น แก่งแย่งกันในเรื่องของอาหาร และที่อยู่อาศัย
3. anensalism : (0/+, -) แบบนี้ฝ่ายหนึ่งไม่ได้รับ หรือเสียผลประโยชน์ แต่อีกฝ่ายเสียผลประโยชน์
4. predation : (+, -) แบบนี้ฝ่ายหนึ่งจะเป็นผู้ล่า (predator) ส่วนอีกฝ่ายหนึ่งจะเป็นอาหารหรือเหยื่อ (prey)
5. symbiosis : แบบพึ่งพาอาศัยกัน เป็นการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด โดยฝ่ายหนึ่งเป็นผู้อาศัย (symbiont) และอีกฝ่ายหนึ่งเป็นผู้ถูกอาศัย หรือจำเป็น (host) ซึ่งยังสามารถแบ่งความสัมพันธ์แบบนี้ ออกตามการได้รับ หรือเสียผลประโยชน์ดังนี้

เทคโนโลยีชีวภาพ

การนำความรู้วิทยาศาสตร์ และวิศวกรรม หรือเทคนิคใด ๆ ที่ใช้ทรัพยากรมีชีวิต หรือบางส่วน เพื่อที่จะทำ หรือปรับปรุงผลผลิต ทำให้พืช หรือสัตว์ดีขึ้น หรือพัฒนา จุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ที่ต้องการ

Research, Development และ Engineering (R & D and E)

วิจัย, พัฒนา และวิศวกรรม

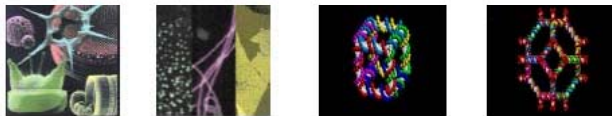
เทคโนโลยีชีวภาพคลาสสิก (Classic or Intermediate biotechnology)

เป็นเทคโนโลยีพื้นฐาน การจัดการทรัพยากรที่มีชีวิตรวมทั้งเทคโนโลยีการหมัก

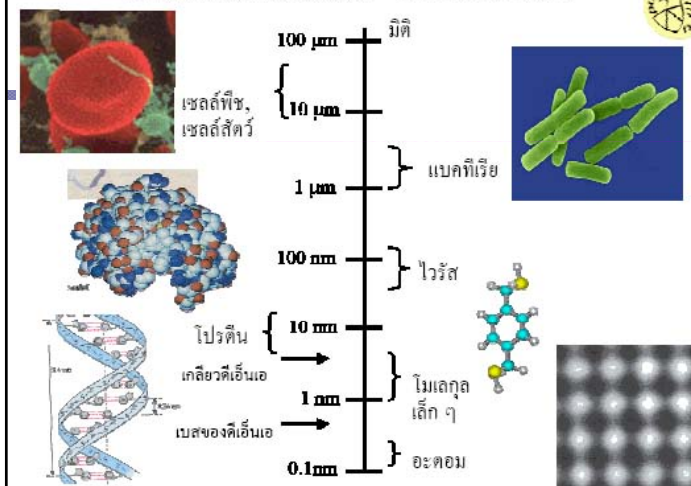
เทคโนโลยีชีวภาพก้าวหน้า (Modern or Advanced biotechnology)

นาโนไบโอเทคโนโลยีคืออะไร?

เป็นนาโนเทคโนโลยีแขนงหนึ่ง
ซึ่งรวมสหวิทยาการทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เคมี
และวิศวกรรมศาสตร์ เข้าด้วยกัน เพื่อใช้ในการตรวจสอบ ควบคุม
ดัดแปลง หรือสังเคราะห์
ชีวโมเลกุลขึ้นใหม่เพื่อให้คุณสมบัติตามต้องการ



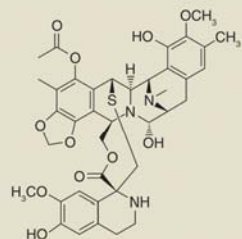
จากไมโครเมตรถึงนาโนเมตร – ชีวภาพ/เคมี/อะตอม



A *Conus magus*



B *Ecteinascidia turbinata*



ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล

การวิจัยผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิตในทะเล เรื่องอาหาร ยา สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ วัสดุทางการแพทย์ และวัตถุดับไฟที่ใช้ประโยชน์ด้านอื่นนั้นมีการศึกษา และพัฒนาเป็นลำดับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2512 (ค.ศ. 1969)

*พ.ศ. 2520 - 2528 มีรายงานผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกว่า 1,700 ชนิด ได้มาจากทะเล

*พ.ศ. 2528 - 2536 มีรายงานผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกว่า 5,000 ชนิด ได้มาจากทะเล

*พ.ศ. 2536 สามารถแยกสารประกอบทางทะเลที่แตกต่างกันจากทะเลเกือบ 7,000 ชนิด

พ.ศ. 2512 - 2538 สารประกอบจากทะเลได้จัดสิทธิบัตรกว่า 200 ชนิด

อาหาร ยา สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ วัสดุทางการแพทย์ และเครื่องสำอาง

- * ยาปฏิชีวนะ จากจุลินทรีย์ สาหร่าย ฟองน้ำ เพรียงหัวหอม
- * ยารักษามะเร็ง และโรคติดเชื้อไวรัส(HIV) จากฟองน้ำเปรียงหัวหอม ไบรโอแอคทีฟ
- * สารชีวพิษ ได้แก่ พิษจากปลาปักเป้า หอยเต้าปูน ให้พิษ **tetrodotoxin** และ **saxitoxin** สำหรับการศึกษาเซลล์ประสาท
- * โครงสร้างเทียมที่เป็นสารประกอบแคลเซียม คาร์บอเนตจากปะการังและหอยมุก
- * สารต้านการอักเสบ
- * สารเลคติน(สารhemaagglutinins)
- * อาหารเสริมเช่น -**linoleic acid** จากสาหร่ายสไปรูลีนา
- * สารต่อต้านอนุมูลอิสระ(antioxidants) จากสาหร่าย ฟองน้ำ จุลินทรีย์*
- * วัณ(agar) คุณภาพสูงจากสาหร่ายใช้เป็
- * **Alginate fiber** ใช้ทำผ้าพันแผล
- * รังควาญชีวภาพ หรือสารสี



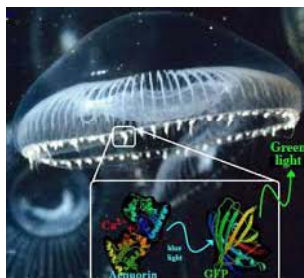
ฤทธิ์ทางชีวภาพ

- ต่อด้านแบคทีเรีย รา ไวรัสHIV - ต่อด้านสาหร่าย
- ต่อด้านปรสิต - ความเป็นพิษต่อเซลล์
- ต่อด้านเนื้องอก และมะเร็ง - ต้านอนุมูลอิสระ
- สารปรับภูมิคุ้มกัน - ต้านการลงเกาะของสิ่งมีชีวิต
- ต่อด้านมาเลเรีย
- ต่อด้านวัณโรค
- ต้านการอักเสบ

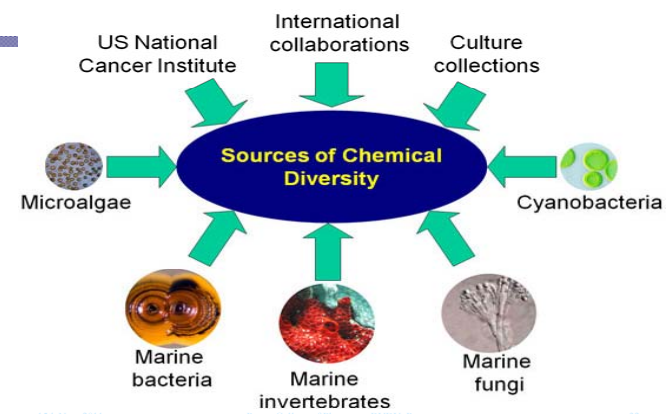
Cryptotethya crypta



Aequora victoria

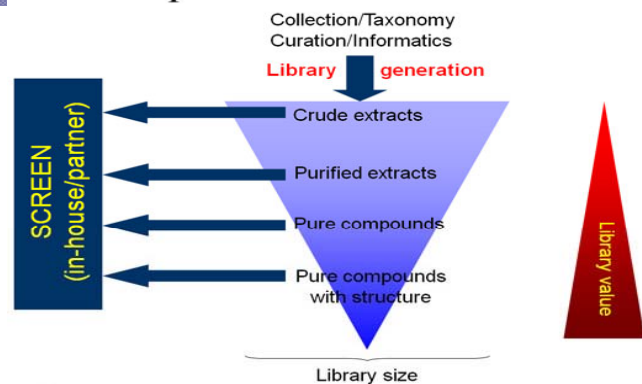


Sources of Chemical Diversity

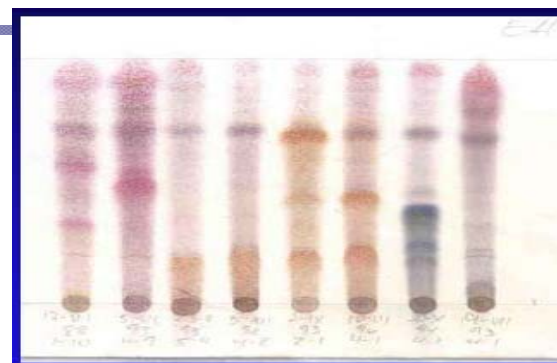


Generating Chemical Diversity

Compound and Extract Diversity



Extracts are Complex Mixtures of Marine Products



15th Nov. 2011

Poon College of Pharmacy, HYDRABAD, India

34



Marine Natural Products on the market (January, 2004, <http://www.เซาถึงเนบ>)

Product	Chemical Class	Application	Original Source	Method of Production	References
Aequorin		Bioluminescent calcium indicator	Bioluminescent jellyfish <i>Aequorea victoria</i>	Recombinant protein	Shimomura et al., 1962; Chiesi et al., 2001
Ara-A , (Vidarabine)	Nucleoside (Amino-6 Beta-D-Arabinofuranosyl-9 9H-Purine)	Antiviral drug (herpes infections)	Marine sponge <i>Cryptothecia crypta</i>	Microbial fermentation of analog	Bergmann & Feeney, 1951; McConnell et al., 1994
Ara-C , (Cytosar-U, Cytarabine) Is cell-phase specific, acting in the S phase to kill cells undergoing DNA synthesis(commenc:1972)	Nucleoside (4-amino-1-beta-D-arabinofuranosyl-2(1H)-pyrimidinone)	Anticancer drug (leukemia and non-Hodgkin's lymphoma)	Marine sponge <i>Cryptothecia crypta</i>	Chemical synthesis of analogue	Bergmann & Feeney, 1951; McConnell et al., 1994
Calyculin A (AG Scientific)	Polyketide	Molecular probe: selective inhibitor of protein phosphatase 1	Sponge <i>Discodermia calyx</i>	Extracted from the sponge	Kobayashi M., 2000
Cephalosporins (commercialisation: 1965)	β-lactam	Antibiotic (antibacterial by inhibition of mucopeptide synthesis)	Marine fungus <i>Cephalosporium acremonium</i>	Semisynthetic antibiotic derivatives of cephalosporin C	Newton & Abraham 1955.
Formulaid® (Martek Biosciences)	Fatty acids	Fatty acids (additive in nutritional supplement)	Marine microalgae	Cell culture	ESPGAN, 1991
Green Fluorescent Protein (GFP)	Protein	Reporter gene	Bioluminescent jellyfish <i>Aequorea victoria</i>	Recombinant protein	Chalfie et al., 1994
Kainic acid (commercialisation: Early 1900s)	Amino acid	Antiepileptic, insecticide, neuroexcitatory and neurotoxic activity	Red alga <i>Gracilaria tikvahiae</i>	Extracted from the alga, found mainly near Japan and Taiwan. (2) Chemical synthesis	Baslow, M. H. 1969
Limulus Amebocyte Lysate (Seikagaku, Endotoxin)		Detection of endotoxins associated with Gram-negative bacteria	Horseshoe crab <i>Limulus polyphemus</i>	Amebocytes of the horseshoe crab	Levin, J. and F.B. Bang, 1968

ความหลากหลายจุลินทรีย์จากทะเล : แหล่งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

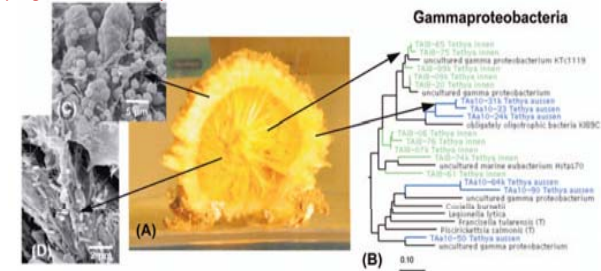
บุตวรณ เตชสกุลวัฒนา, ปรัชญา ภาวพรศิริธาส, รวีวรรณ วัฒนดีลัก และ วิชัย รื่นตระกูล
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา,
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยมหิดล

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารต่อต้านจุลินทรีย์, สารต่อต้านการแบ่งเซลล์ สารที่มีพิษต่อเซลล์จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียทะเล
3. เพื่อศึกษาโครงสร้างของสารประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

Sponge

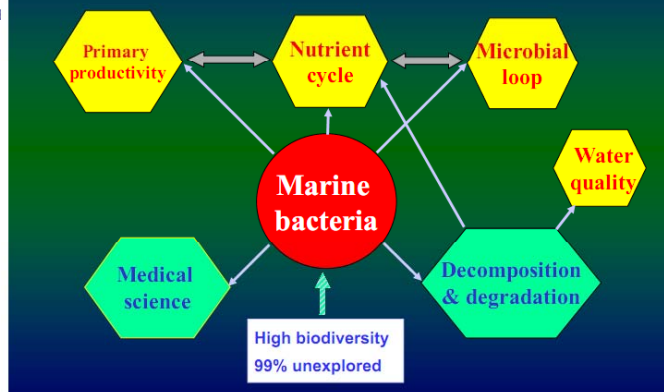
- High Biodiversity, Bioactive compounds were isolated 10,000 species of sponges
- Sponges are filter feeder organisms, their feature are secure habitat for other symbionts
- The related compounds from sponge revealed the relationship between sponges and their symbionts



Electron Microscope: Symbiotic bacteria-sponge

4

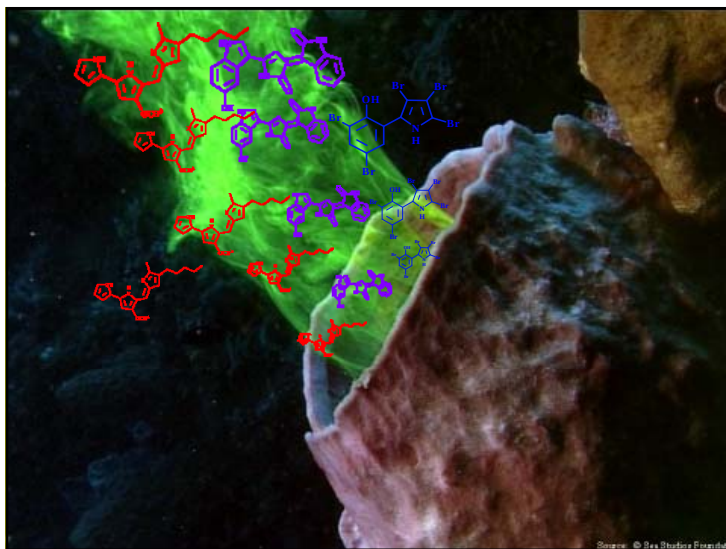
Importance of marine bacteria



Existing strength: largest collection in great China

- Center for Marine Bioactive Substances
- > 6000 bacterial isolates
- Purified and partially characterized >2600 strains
- Input information of >1500 strains' into database
- A password protected database
- Transferred > 1600 "species" into liquid nitrogen





การเก็บตัวอย่างโดย Scuba Diving

Hydrozoa

Densipapillia

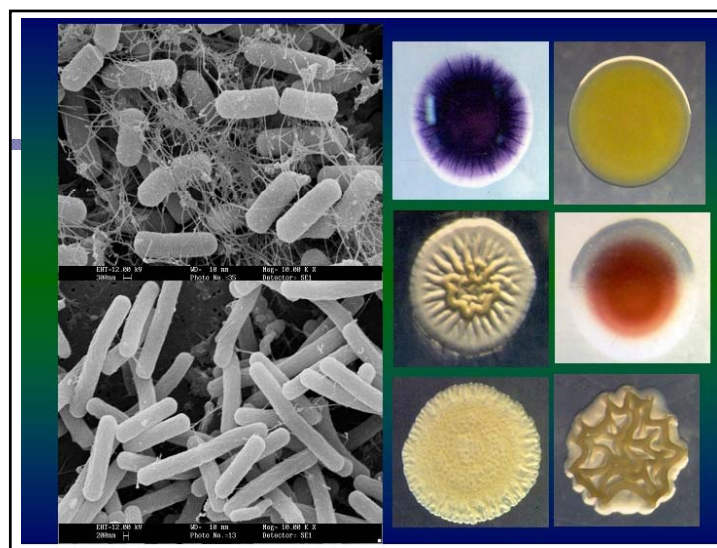
ทำการบดตัวอย่าง 5 กรัม- เจือจางด้วยน้ำทะเล

การแยกเชื้อแบคทีเรีย

เกลี่ยเชื้อบน ORI medium plates (yeast extract 0.1 % , proteose peptone no.3 0.1 % , phytone peptone 0.05 % , Na - thiosulphate 0.02 % , Na - Sulfite 0.005 % , Fe - citrate 0.004 % , 90 % Sea water , and adjust to pH 7.6)

เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 C 5-7 วัน

การแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์



Marine Natural Products under clinical trial (January 2004)						
Compound name	Origin	Supply	Discovered	Developed by	Biological Activity	Clinical Phase
APIDINE Depsipeptide	<i>Apidium albicans</i> Tunicate	Chemical Synthesis	Univ. of Illinois (USA) PharmaMar	PHARMAMAR(Spain)	Cytotoxic	Phase II
YONDELIS™ (Ecteinascidin-743) Alkaloid	<i>Ecteinascidia turbinate</i> Tunicate	Aquaculture (Chemical semisynthesis)	Univ. of Illinois (USA)	PHARMAMAR(Spain)	Cytotoxic	Phase II-III
BRYOSTATIN Macrocyclic lactone	<i>Bugula neritina</i> Bryozoan (Pos. bacterial origin)	Recollection/ Aquaculture (Bacterial)	Arizona State Univ. (USA)	GPC Biotech(Germany) -therapy trials	Antitumor(modulator of protein kinase C-PKC activity)	Phase II Esophageal cancer and
DISCOVERMOLIDE Polyketide	<i>Discodermis</i> sp. Sponge	Chemical Synthesis	Harbor Branch (USA)	NOVATIS(USA)	Antitumor	Phase I
ET 389	<i>Axinnella</i> sp. Sponge		Arizona State Univ. (USA)	NCI-Approved California Cancer Consortium(USA)EISAIInc.(Japan)	Antitumor	Phase I
HTI-286 (Synthetic Analogue of the Tripeptide Hemiascicin)	Various species of marine sponges	Synthesis	Univ. of British Columbia(Canada)	WYETH(Spain)	Antitumor	Phase I-II Non-small cell lung cancer
IPL-576092 (Corticosteroid synt. anal.) Steroid	<i>Petrosia coccinea</i> Sponge	Chemical Synthesis	Univ. of British Columbia(Canada)	INFLAZYME PHARMACEUTICALS (Canada) AVENTIS(France)	Anti-inflammatory	Phase II Oral asthma therapy
KRN7000 (alpha-galactosylceramide) Agelasphin synt. anal.) Glycosphingolipid	<i>Agelas mauritanicus</i> Sponge	Chemical Synthesis	Univ. of Ryukyus (Japan) Kirin Co (Japan)	KIRIN BREWERY CO (Japan)	Antitumor (Immunomodulatory no cytotoxic)	Phase II Pancreatic cancer, Solid tumors



ปัญหาในการใช้ทรัพยากรธรรมชาติจากทะเล

- การเก็บเกี่ยวทรัพยากรจากทะเลโดยตรงจากธรรมชาติ
- การใช้ทรัพยากรเกินกำลังผลิต
- การลดจำนวนของทรัพยากรที่มีประโยชน์เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมและโครงสร้างทางนิเวศวิทยา
- การใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัชกรรม
- พื้นที่แนวปะการัง แหล่งหญ้าทะเลและป่าชายเลนลดลง
- การสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตที่รู้จักและยังมิรู้จัก

การใช้ประโยชน์จากทรัพยากรทางทะเลอย่างยั่งยืน

- การศึกษาและค้นพบการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรทางทะเลเพิ่มขึ้น
- การเข้าใจถึงการเกิดสารประกอบและสูตรโครงสร้าง
- การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์หรือสารเคมีทดแทนการเก็บเกี่ยวจากธรรมชาติ
- การพัฒนาเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพเพื่อทดแทนการเก็บเกี่ยวจากธรรมชาติ
- ศึกษาถึงความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตและสารประกอบตลอดจนนิเวศวิทยาเพื่อเข้าใจถึงบทบาททางชีวภาพของสารประกอบนั้น
- ศักยภาพในการเก็บตัวอย่างและกระบวนการค้นพบ
- การอนุรักษ์ทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมทางทะเลควบคู่กับการใช้ประโยชน์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานต่างๆ ที่ให้ความ
อนุเคราะห์ให้ทุนปฏิบัติงาน ได้ตามวัตถุประสงค์ ได้แก่

1. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
3. ิ นิสิต มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ร่วมวิจัย
3. ทีมดำน้ำ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล



เอกสารอ้างอิง

- 1.Dietzman, G.R. 1997. The marine
environmentas discoveryresource.
- .Faulkner, D.J. 1984-2000. Natural
2.Product Reports.
- 3.McAllister, D.E. 1998. The Crises in
Marine Biodiversity and Key Knowledge.
4. Blunt. et al., 2005; 2006

ขอบคุณ



chutiwan@buu.ac.th

Wada, M.
Nagasaki University

การแยกและการใช้ประโยชน์ของแอคติโนมัยซีต (จากป้าชายเลน)

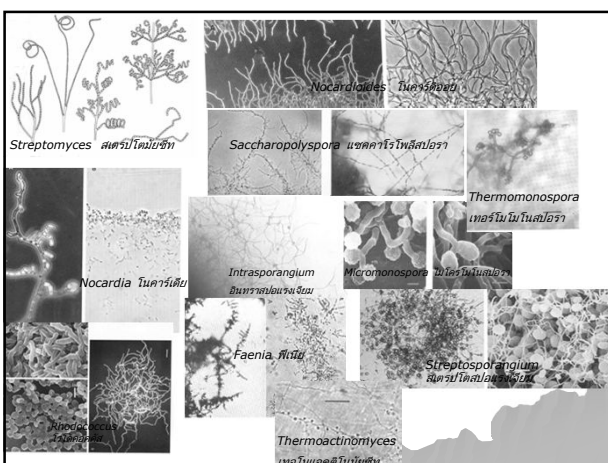
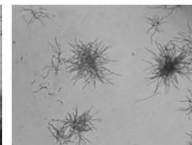
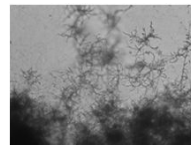
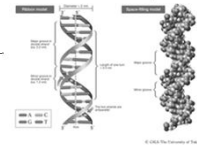


รัตนารณ ศรีวิบูลย์
Rattaporn Srivibool

Institute of Marine Science, Burapha
University

แอคติโนมัยซีต คืออะไร
What is actinomycete?

- เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ ของ G+C สูง
Gram positive bacteria having high G+C content.
- มีลักษณะเป็นเส้นใย คล้ายเชื้อรา
(Filamentous, fungus like)



ทำไมต้องเป็นแอคติโนมัยซีต
Why Actinomycetes?

- ◆ เป็นแหล่งของสารแอนติไบโอติก สารที่นำมาทำเป็นยารักษาโรค
- ◆ Source of antibiotics, pharmaceutical agents.
- ◆ สารแอนติออกซิแดนท์ Antioxidants.
- ◆ สารไซเคโอโทรฟ
- ◆ รงค์วัตถุ (pigments), แคโรทีนอยด์ (carotenoid), เมลานอยด์ (melanoid), (anthracycline).
- ◆ เอนไซม์ต่าง ๆ: Enzymes α -mannanase, β -(1,3)glucanase, proteinase, β -glucosidase, chitinase, dextranase, keratinase, Xylanase.

สารแอนติไบโอติก Antibiotics

จำนวนสารทุติยภูมิ โดยประมาณ ที่สร้างจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จนถึง ปี ค.ศ. 1994 (Hopwood et al 2000)

แหล่งที่สร้าง	สารแอนติไบโอติก	สารออกฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆ	รวมทั้งหมด	สารทุติยภูมิที่ไม่ออกฤทธิ์
แบคทีเรียอื่น ๆ	1400 (12%)	240 (9%)	1640 (11%)	2000-5000
แอคติโนมัยซีท	7900* (66%)	1220* (40%)	9120* (61%)	8000-10,000
รา	2600 (22%)	1540 (51%)	4140 (28%)	15,000-25,000
รวมทั้งหมด	11,900 (100%)	3000 (100%)	14,900 (100%)	25,000-40,000

สาร Antibiotics ที่แอคติโนมัยซีทสร้าง

ตัวอย่างของสารแอนติไบโอติกที่สร้างจาก แอคติโนมัยซีท

สาร Antibiotics	สร้างจาก
-Streptomycin	<i>Streptomyces</i>
-Kanamycin	<i>Streptomyces</i>
-Vancomycin	<i>Amycolatopsis</i>
-Rifampicin	<i>Streptomyces</i>
-Gentamicin	<i>Micromonospora</i>

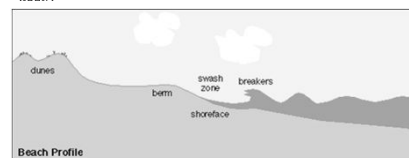
References: Miyadoh, 1997; Williams et al., 1989

แอคติโนมัยซีทพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ : ดิน น้ำ (แม่น้ำ ทะเล ตะกอนก้นทะเล) ดินป่าไม้ รากพืช ธรรมชาติอื่นๆทั่วไป

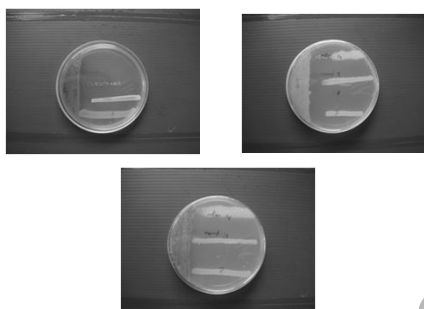


Mangrove forest Chantaburi

3 ใน 4 ส่วนของโลก เป็นพื้นน้ำ แต่ยังคงจากชายฝั่งก็ยังมีแอคติโนมัยซีทน้อยลง



วิธีทดสอบการสร้างสารแอนติไบโอติกของเชื้อ



แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบการสร้างสารแอนติไบโอติก

แบคทีเรีย (bacterial test strains)

- *Micrococcus luteus* 88STR
- *Staphylococcus aureus* 88STR
- Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* 815 (MRSA 815)
- *Pseudomonas aeruginosa* 78STR

ยีสต์ Yeast strain

- *Candida albicans* 58STR

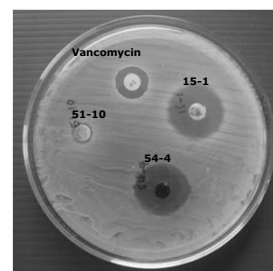
การเลี้ยงเชื้อปริมาณมากเพื่อสร้างสารแอนติไบโอติก/
สารที่ไม่ใช่เชื้อ



เพาะเชื้อให้เจริญบน
จานอาหารที่เหมาะสม



สกัดด้วยตัวทำ
ละลายอินทรีย์



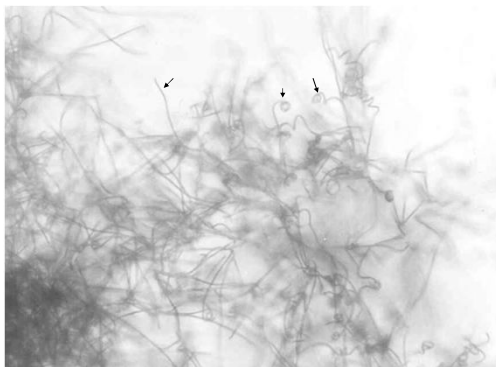
Anti-MRSA

การใช้ประโยชน์จากแอคติโนมัยซีท

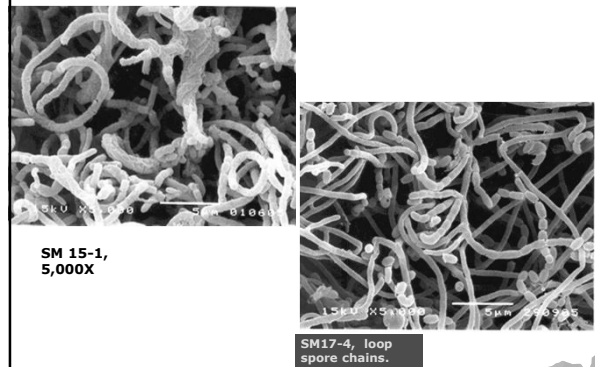
- สารแอนติไบโอติก- ประโยชน์ทางการแพทย์ และเภสัชวิทยา สารต้านจุลินทรีย์ ด้านเซลล์มะเร็ง
- รงควัตถุ สีต่าง ๆ สามารถนำมาทำสีย้อมผ้า
- สารแอนติออกซิแดนท์ (สารต้านอนุมูลอิสระ) / สารแอนติออกซิแดนท์ ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์ อาหารเสริม

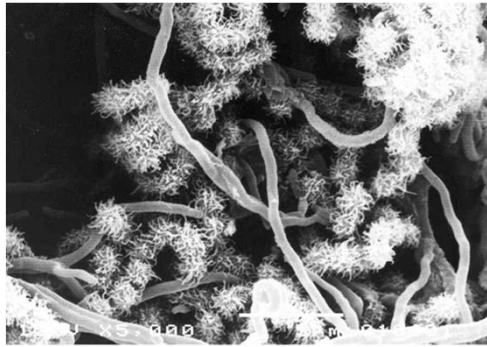
การใช้ประโยชน์จากรงควัตถุ (pigment) ที่แอคติโนมัยซีทสร้างขึ้น

- สารสกัดที่เป็นรงควัตถุใช้ทำสีย้อมผ้า
- ส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น สบู่ เครื่องสำอางค์
- สีที่ไม่เป็นอันตราย เช่น สารแคโรทีนอยด์ ใช้ผสมอาหารได้



Antimicrobial producing strain

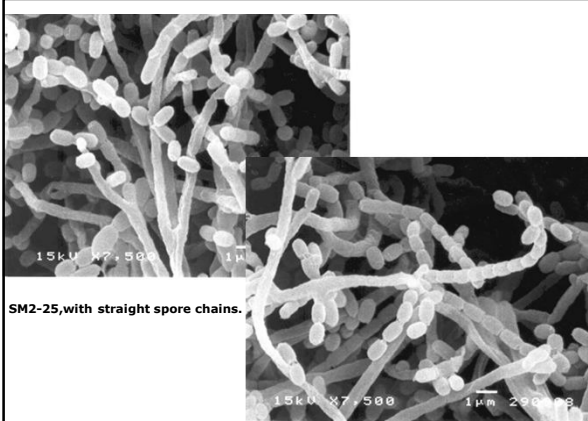




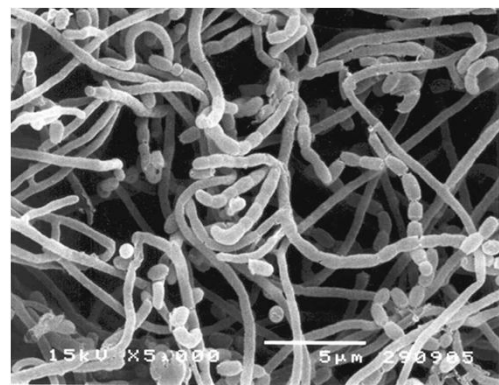
SM9-8, with spiral spore chains.



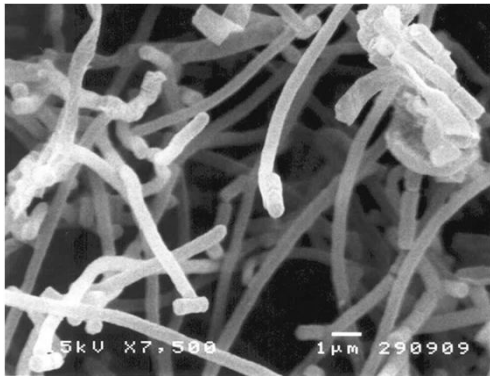
CH 51-10, with loop spore chains.



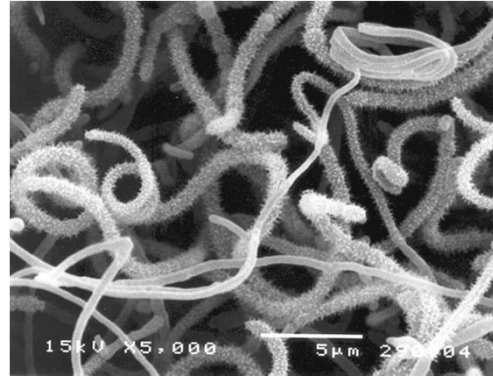
SM2-25, with straight spore chains.



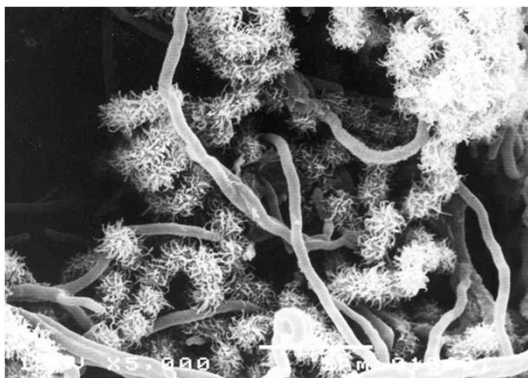
SM17-1, with loop spore chains.



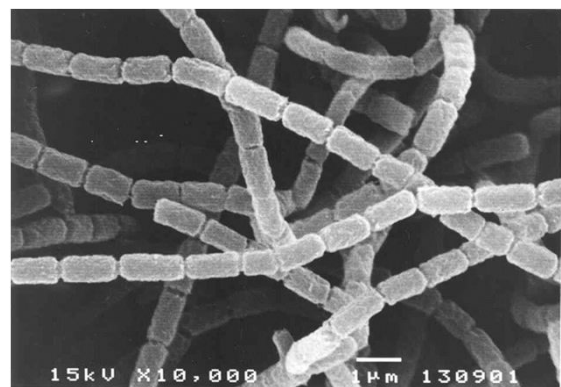
CH51-10, with loop spore chains.



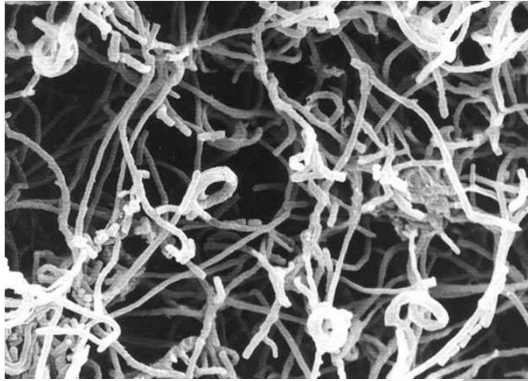
CH54-4 with straight and loop spore chains.



SM9-8, with spiral spore chains.



CH51-12, with straight spore chains.

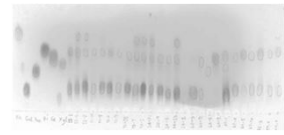


CH56-4, with loop spore chains.

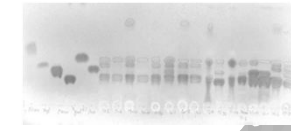
DAP Determination and Sugar Analysis



Std
Meso-DAP 15-1 56-4



Std Samples



Std Samples

THANK YOU



บทปฏิบัติการ การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

วิธีการแยกเชื้อ เก็บตัวอย่าง และการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

1. การเก็บตัวอย่าง : เก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลนชายฝั่งในจังหวัดจันทบุรี หรือจังหวัดใกล้เคียง โดยเก็บจากผิวน้ำดินลึกลงไปประมาณ 5 cm ดินบริเวณที่ใกล้รากพืช และดินที่มีเศษซากใบไม้ เพื่อนำมาแยกเชื้อหา Actinomycetes (ที่หายาก)

2. การแยกเชื้อ Actinomycetes จากดิน

2.1 นำตัวอย่างดินมาโดยแบ่งเป็น 2 ส่วน นำส่วนที่ 1 มา pre-treatment โดยอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และซังตัวอย่างดินแห้ง 1 กรัม ผสมลงในน้ำ sterile 9 ml. เขย่าให้เข้ากัน และปิเปตสารละลายตัวอย่างดินจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 1 ml. ลงในหลอดที่ 2 ที่มีน้ำ sterile 9 ml. ทำ dilution 10^{-1} ถึง 10^{-5}

2.2 ดินส่วนที่ 2 มาเติม 0.6 % yeast extract และ 0.05% SDS และนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที และซังตัวอย่างดินแห้ง 1 กรัม ผสมลงในน้ำ sterile 9 ml. เขย่าให้เข้ากัน และปิเปตสารละลายตัวอย่างดินจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 1 ml. ลงในหลอดที่ 2 ที่มีน้ำ sterile 9 ml. ทำ dilution 10^{-1} ถึง 10^{-5}

3.3 นำสารละลายทั้ง 2 ส่วนโดยเลือกความเข้มข้นที่ 10^{-1} - 10^{-3} มา spread plate บนอาหาร Starch Casein Agar และ Humic Acid-Vitamin Agar โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายมา 0.1 ml.

4.4 นำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-28 วัน

5.5 เมื่อเชื้อเจริญเลือกโคโลนีที่ทึบแสง ผิวและขอบขรุขระมา streak ลงบนอาหาร Starch Casein Agar เพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน

6.6 คัดเลือกโคโลนีที่สร้างเส้นใย ทึบแสงสีขาว หรือ เทา น้ำเงิน ม่วง แดง แดงเข้ม สีส้ม สีนํ้าตาลหรือสีเหลืองที่มีลักษณะคล้าย กำมะหยี่ หรือ คล้ายหนังสัตว์หรือโคโลนีที่ผิวหนานุ่ม ที่ขึ้นบนจานอาหารมาทำให้บริสุทธิ์และถ่ายเชื้อลงบนอาหารวุ้นเยือก Starch Casein Agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วันเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อการตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3. การทดสอบทางสัณฐานวิทยา

3.1 การศึกษาลักษณะของเส้นใย และสปอร์ของเชื้อ Actinomycetes

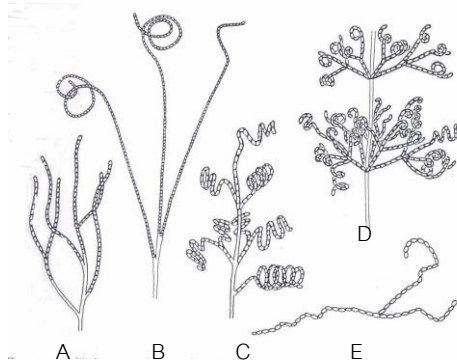
1. ใช้ loop เชี่ยเชื้อ Actinomycetes นำมา streak ลงบนอาหาร ISP2 (Actinomycete Isoaltion Agar) ให้ทั่ว

2. ใช้กระจกปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ววางเสียบลงบนอาหารทำมุม 45 องศา เซลเซียส

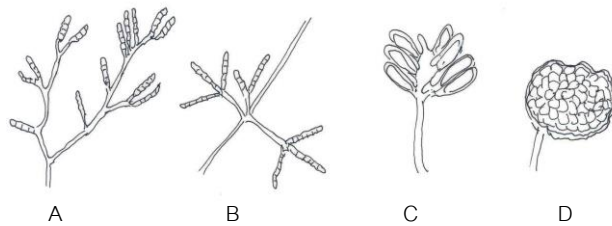
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน

4. นำกระจกปิดสไลด์ที่เสียบไว้มาย้อมแกรม แล้วนำไปตรวจดูลักษณะของเส้นใยและเส้นสายสปอร์ ลักษณะของสปอแรงเจียม (ถ้ามี) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2 หรือ สามารถส่องดู โคโลนี เซลล์ เส้นสายสปอร์ เส้นใย ได้โดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 1 สปอร์ที่สร้างเป็นเส้นสายยาวลักษณะต่าง ๆ A. Rectiflexibiles, B. Retinaculiaperti, C. Spirales, D. Verticillati, E. aerial hypha ที่แตกหักเป็นท่อน ที่มา: Miyadoh (1997)



ภาพที่ 2 ก้านชูสปอร์ (sporophores) และก้านชูอับสปอร์ (sporangioophores), A. ก้านชูสปอร์ที่แตกแขนงของ *Microtetraspora*, B. ก้านชูสปอร์ชนิด umbellate monoverticillate ของ *Streptovercillium*, C. ก้านชูอับสปอร์ของ *Planomonospora*, D. ก้านชูอับสปอร์เดี่ยว ๆ ของ *Actinoplanes* (วาดลายเส้นโดยรัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์)

Reference:

Miyado, S., Hamada, M., Hotta, K., Kudo, T., Seino, A., Vobis, G. and Yokata, A. 1997. Atlas of Actinomycetes. Asakura Publishing Co., Ltd. Tokyo. 223 p.

เทคนิคการสกัด (Extraction)

โดย ดร. รวิวรรณ วัฒนติลล

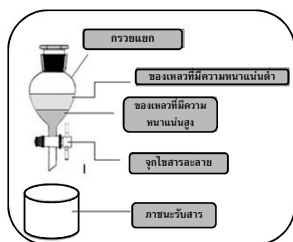
โครงการถ่ายทอดองค์ความรู้

เทคนิคการสกัด

- เทคนิคการสกัด แบ่งย่อยได้ตามสถานะของตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารดังนี้
 - เทคนิค liquid extraction สารสกัดเป็นของเหลว
 - เทคนิค liquid-solid extraction หรือเทคนิค solid phase extraction, (SPE) สารสกัดเป็นของแข็ง
 - เทคนิค gas extraction สารสกัดเป็นก๊าซ

การสกัดด้วยตัวทำละลาย

- ทำได้โดยใช้ตัวทำละลายของเหลวชนิดหนึ่ง สกัดตัวถูกละลายออกจากของเหลวอีกชนิดหนึ่ง เรียกว่าการสกัดนี้ว่า liquid-liquid extraction



Liquid-liquid extraction

การป้องกัน การเกิดสภาวะอิมัลชัน (Emulsion)

- หลีกเลี่ยงการเขย่าเพื่อสกัดสารอย่างรุนแรง
- ใช้สารละลายเนื้อผสม ในการสกัด
- เติมน้ำประกอบเกลือที่เป็นกลาง (เช่น โซเดียมคลอไรด์) เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของน้ำ และเปลี่ยนแปลงแรงตึงผิว



สารสี (Pigment)

■ สารสีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลาย ๆ ชนิดถูกสร้างมาจากแบคทีเรียทะเลหลายชนิด ซึ่งแยกได้จากดินตะกอน น้ำทะเล สาหร่าย และสัตว์ทะเล

■ สีที่เข้มทั้งสีสังเคราะห์และสีธรรมชาติ สังกะสีอินทรีย์จัดเป็นสีที่ได้จากธรรมชาติ ชนิดหนึ่งที่ยอมรับ

- สารสีแดงของ Prodigins ที่แยกจากแบคทีเรียทะเลมีความหลากหลายในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.

- ✓ antibacterial
- ✓ antifungal
- ✓ antimalarial
- ✓ antibiotic



- สารสีม่วง violacein ที่แยกจากแบคทีเรียทะเล :

- ✓ antiviral
- ✓ antibacterial
- ✓ anticancer

สีธรรมชาติและสีสังเคราะห์ ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร เสื้อผ้า ของใช้ เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ อีกมากมาย

การสกัดตัวอย่างฟองน้ำทะเล



ทำความสะอาดฟองน้ำเอาสิ่งมีชีวิตอื่นออก



ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แช่ด้วย Methanol ที่ไว้ 24 ชั่วโมง



กรองผ่านกระดาษกรอง (ทำ 3 ครั้ง)



ซึ่งน้ำหนัก

นำไปประเหย เอาตัวทำละลายออก

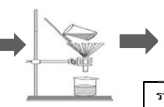
การสกัดสารสีจากแอคติโนมัยซีต



เซลล์แอคติโนมัยซีต



สกัดด้วยเมทานอล 5 mL ด้วยเครื่องคั่นความเร็วสูง



กรอง, สกัด 3 ชั่วโมง



รวมสารละลายเมทานอล



ตั้งทิ้งไว้ แยกชั้น



สกัดแยกส่วน ระหว่าง น้ำ-เอทิลอะซิเตต 1:1 (v/v)



ระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยสารสุญญากาศ

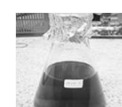
รวมชั้นเอทิลอะซิเตต

ระเหยให้แห้ง

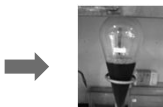
ทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน

ซึ่งน้ำหนัก

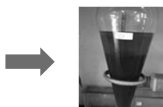
การสกัดน้ำเลี้ยงของแอคติโนมัยซีต



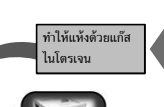
น้ำเลี้ยงของแอคติโนมัยซีต



สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต 1:1 (v/v) 3 ครั้ง



ตั้งทิ้งไว้ แยกชั้น



ทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน



ระเหยให้แห้ง ด้วยเครื่องระเหยสารสุญญากาศ



รวมชั้นเอทิลอะซิเตต

ซึ่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ

การสกัดลิปิด(Lipid extraction)

จากเชื้อแอคติโนมัยซีท

ลิปิด (Lipid)

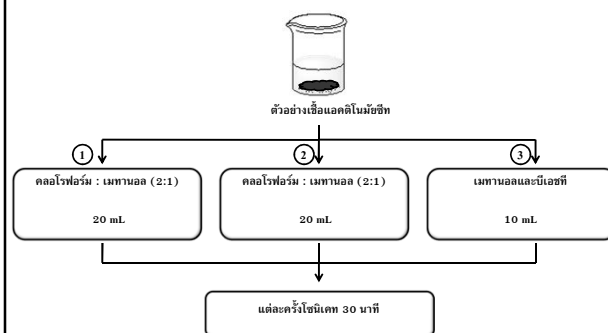
- ความก้าวหน้าด้านลิปิดเทคโนโลยีชีวภาพ (lipid biotechnology) เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว
- ความต้องการใช้ผลิตภัณฑ์ลิปิดเพิ่มขึ้นตามจำนวนประชากรโลก โดยได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพต่างๆ
 - ด้านพลังงาน อาหาร อาหารสัตว์ เครื่องสำอาง
 - ผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพและผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในชีวิตประจำวัน

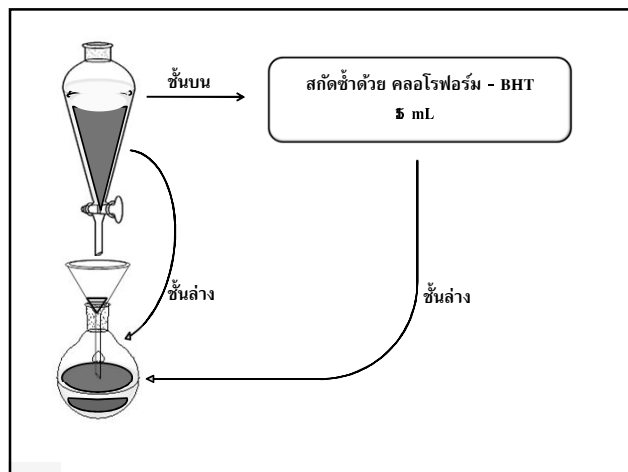
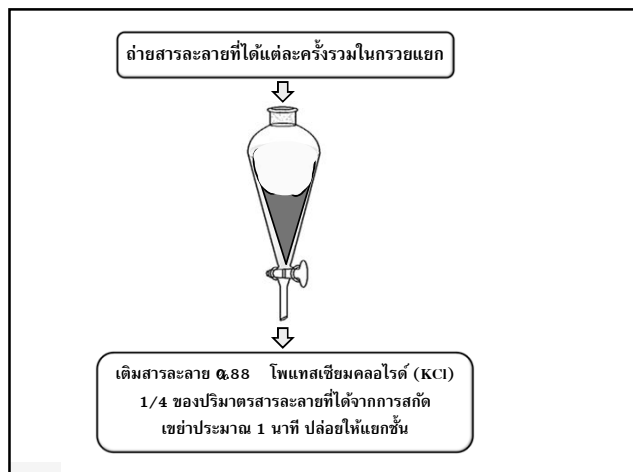
การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์ หรือที่เรียกว่า Single Cell Oils (SCO)

การผลิตลิปิดนั้นมีปัจจัยที่ต้องคำนึงหลายประการ :

- การคัดเลือกและเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์
- ชนิดและปริมาณของกรดไขมันและลิปิดภายในเซลล์
- สภาพการเพาะเลี้ยง
- วิธีการสกัดลิปิด
- การวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ลิปิด
- ต้นทุนในการผลิต

การสกัดลิปิด





การวิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] (DPPH radical scavenging assay)

โครงการถ่ายทอดองค์ความรู้

อนุมูลอิสระ (Free radical)

- อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล ว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา
- โดยรับอิเล็กตรอนจากสารอื่น ๆ โกล่เคียง ทำให้ตนเองเสถียรขึ้น
- ขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้นมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ จนอาจกลายเป็นสารที่มีความรุนแรงได้

อนุมูลอิสระ (Free radicals)

แหล่งที่มา

- ร่างกาย
 - เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกาย / เกิดจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมา
 - สารเคมีและสิ่งปนเปื้อนที่มาจากอากาศที่หายใจ / สารกันบูด รังสี ควันบุหรี่ แก๊สจากท่อไอเสีย อาหารเสริมไหม้ หรือเกิดจากการปิ้งย่าง

โรคที่เกี่ยวข้อง

- โรคเบาหวาน
- โรคมะเร็ง
- โรคหลอดเลือดหัวใจ
- โรคแก่ก่อนวัย
- โรคภูมิคุ้มกันผิดปกติ
- โรคพาร์กินสัน

อนุมูลอิสระ

- อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล ว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา
- โดยรับอิเล็กตรอนจากสารอื่น ๆ โกล่เคียง ส่งผลให้ตนเองเสถียรขึ้น
- ขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้นมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ จนอาจกลายเป็นสารที่มีความรุนแรงได้

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

- อนุมูลอิสระสามารถถูกกำจัดหรือลดความรุนแรงด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ
- สารต้านอนุมูลอิสระสามารถจับกับอนุมูลอิสระ แล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรมากกว่า ส่งผลให้หยุดวงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ได้

โครมาโทกราฟี (Chromatography)

- เป็นเทคนิคการแยกสารอีกวิธีหนึ่งที่อาศัยหลักการละลายของสารในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับได้ไม่เท่ากัน ทำให้สารเคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน
- สารต่างชนิดกันจะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคนิ่ง (Stationary phase หรือตัวดูดซับ และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase หรือตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน
- สารต่างชนิดกันจึงเดินทางผ่านวัฏภาคนิ่งออกมาที่วัฏภาคเคลื่อนที่ได้ไม่พร้อมกันจึงเกิดการแยกชั้น

ตัวดูดซับ (Adsorbent)

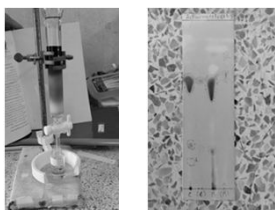
- ตัวดูดซับแต่ละชนิดมีความสามารถในการดูดซับสารไว้บนพื้นผิวได้ต่างกัน
- ตัวดูดซับมีขั้วสามารถดูดซับสารมีขั้วได้ดีกว่าสารไม่มีขั้ว
- สารไม่มีขั้วจึงถูกชะออกมาก่อนสารมีขั้ว

ตัวชะ (Eluent)

- ตัวชะ ทำหน้าที่ละลายสารออกจาก Stationary Phase
- ตัวชะมีความสามารถในการชะสารด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน
- ตัวชะที่มีขั้วสูงจะพาสารเกือบทุกชนิดเคลื่อนที่ไปได้เร็ว
- ขณะที่ตัวชะที่มีขั้วต่ำจะพาสารที่ถูกดูดซับน้อยออกมาก่อน

ประเภทของโครมาโตกราฟี

- โครมาโตกราฟี แบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography or TLC)
- โครมาโตกราฟี แบบคอลัมน์ (Column Chromatography)
- โครมาโตกราฟี แบบกระดาษ (Paper chromatography)



การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น (DPPH)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Alessandra และคณะ, 2002

หยดสารสกัดแอลคาลอยด์ลงในช่อง TLC

ใช้ตัวชะ
คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (๑๘: ๑)

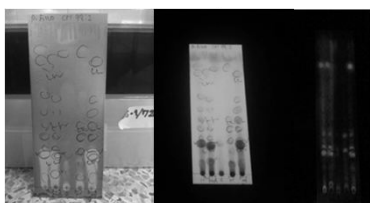
ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm

พ่นด้วยสารละลาย 0.2 % DPPH
เก็บไว้ที่มืด 30 นาที



ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

- สารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระจะปรากฏเป็นจุดสีเหลืองอยู่บนพื้นหลังสีม่วงบนแผ่น TLC



บทปฏิบัติการ

การสกัดสาร โครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

โดย ดร. รวิวรรณ วัฒนติก นางณิชา สิรินนธ์นา ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

งานวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแยกสารผสมด้วยวิธีการสกัดและโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC)
2. ศึกษาการพิสูจน์สารตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบค่า R_f และศึกษาบทบาทของ mobile phase ที่มีต่อการแยกสาร
3. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วย DPPH

หลักการของการสกัดคือ การใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสม และ Chromatography เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสม การทำสารให้บริสุทธิ์ และพิสูจน์สารเหล่านั้นได้ด้วย เป็นเทคนิคเกี่ยวข้องกับการกระจายของสาร ระหว่างภาคอยู่กับที่ (stationary phase) เป็นตัวดูดซับที่เคลือบอยู่บนแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติก และภาคที่เคลื่อนที่ได้ (mobile phase) ที่เคลื่อนผ่านตัวดูดซับ ในการแยกสารโดยวิธี chromatography จึงอาศัยหลักที่ว่า สารจะเคลื่อนที่ออกจากกัน บน stationary phase เนื่องจากอิทธิพลของ mobile phase และเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วต่างกัน โดยสารที่ละลายได้ดีใน mobile phase และถูกดูดซับได้น้อยโดย Stationary phase จะเคลื่อนที่ได้เร็ว

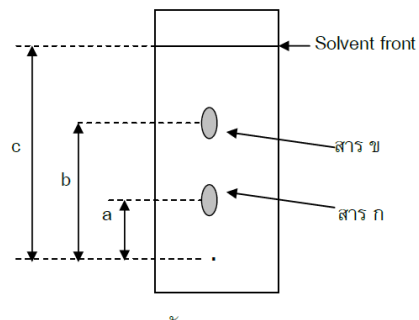
Solid-liquid adsorption chromatography จะมี stationary phase เป็นของแข็ง เรียกว่าตัวดูดซับ เช่น อลูมินา หรือ ซิลิกาเจล ส่วน mobile phase อาจเป็นก๊าซหรือของเหลวก็ได้ การแยกเกิดเนื่องจากสารแต่ละชนิดถูกดูดซับไว้โดยตัวดูดซับในอัตราที่ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของตัวดูดซับ ตัวอย่างของโครมาโทกราฟี แบบนี้คือ Thin layer chromatography (TLC) และ Column chromatography (CC)

Thin Layer Chromatography เป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว สามารถใช้ได้กับสารเกือบทุกชนิด จึงเป็นที่นิยมใช้กันมาก โดยทั่วไปแล้วนิยมใช้ TLC ในการแยกสารพิสูจน์ชนิดของสาร และตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น โดยเฉพาะในกรณีที่สารเป็นสารระเหยยาก หรือมีจำนวนน้อย

การหาค่า R_f ของสาร

ค่า R_f หรือค่า “rate of flow” คือ อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ในกรณีที่ใช้ตัวดูดซับเดียวกัน ใช้ระบบตัวทำละลายเดียวกัน และระบบที่ศึกษาอยู่ในสถานะเดียวกัน สารหนึ่งๆ จะมีค่า R_f คงที่เสมอ ถ้าระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดศูนย์กลางวงกลมของตำแหน่งสารที่ปรากฏ เป็นระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้และระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึง solvent front เป็นระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ จะได้ว่า

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$



การทดลอง

สารเคมี

1. methanol
2. chloroform / hexane
3. ตัวอย่างสารสกัด และสารมาตรฐาน
4. สารละลาย 0.2% DPPH

อุปกรณ์

1. หลอดแคปิลลารี (capillary tube)
2. ปีกเกอร์ / flask ขนาด 250 cm³
3. แผ่น TLC
4. TLC tank
5. กรวยสกัด

ตอนที่ 1 การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย

1. นำตัวอย่างใส่กรวยสกัด เพื่อทำการสกัดแยกส่วนระหว่าง น้ำ และตัวทำละลายที่เหมาะสม ในปริมาตร 1:1 (v/v)
2. เขย่ากรวยสกัดเบาๆ เปิดไล่แรงดัน และตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น
3. สังเกตสีของตัวอย่างในชั้นตัวทำละลาย บันทึกผลสีที่ได้ ไขเก็บชั้นตัวทำละลายของตัวอย่าง นำไปแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

ตอนที่ 2 การแยกสารตัวอย่าง

1. หยดสารสกัดตัวอย่างและสารมาตรฐานลงบนแผ่น TLC รอให้สารแห้ง

2. นำแผ่น TLC ตามข้อ 1 ใส่ลงใน TLC tank ซึ่งบรรจุตัวชะที่เตรียมไว้ ปิดฝา รอจนกระทั่ง mobile phase เคลื่อนที่ถึง solvent front
3. นำแผ่น TLC ออกจาก tank ปลอ่ยให้ mobile phase ระเหย แล้วสังเกตผล
4. วัดระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดศูนย์กลางของสารทุกชนิด และจากจุดเริ่มต้นถึง solvent front แล้วคำนวณค่า R_f ของแต่ละจุด เปรียบเทียบค่าที่ได้กับสารมาตรฐาน

ตอนที่ 3 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

1. นำแผ่น TLC ที่ได้จากการแยกสารข้างต้น ระบุตำแหน่งสารที่ปรากฏด้วยตาเปล่า และภายใต้แสง UV
2. สเปรย์สาร 0.2% DPPH ลงบนแผ่น TLC ให้ทั่วแผ่น (ระวังอย่าให้สารสัมผัสผิวหนัง) นำไปห่อกระดาษฟอยด์ เก็บในที่มืด นาน 15-30 นาที สังเกตและบันทึกผลที่เกิดขึ้น