

ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกฟองน้ำที่สร้างสารยับยั้งจุลชีพ

จากการสกัดฟองน้ำ 28 ชนิด ด้วยสารละลายเมทิลแอลกอฮอล์และโทลูอีน ในอัตราส่วน 3 : 1 โดยปริมาตร แล้วนำไปทดสอบกับจุลชีพ 19 ชนิด ได้แก่ จุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ 12 ชนิด จุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในกิ้งกูดดำ 4 ชนิด และจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในพืช 3 ชนิด เพื่อคัดเลือกฟองน้ำที่สร้างสารยับยั้งจุลชีพในวงกว้างและโดดเด่นที่สุด นำไปทำการแยกหาสารบริสุทธิ์ที่ทำหน้าที่ยับยั้งจุลชีพอย่างแท้จริง ผลการทดสอบมีดังต่อไปนี้

ฟองน้ำจากแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี จำนวน 9 ชนิด พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำที่สามารถยับยั้งจุลชีพได้มี 3 ชนิด ได้แก่ ฟองน้ำ Sadej06, Sadej07 และ Sadej09 (ตารางที่ 6) ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 33.33 ของสารสกัดจากฟองน้ำจากแหลมเสด็จทั้งหมด สารสกัดจากฟองน้ำจากแหลมเสด็จที่ยับยั้งจุลชีพได้มากที่สุด คือ Sadej07 โดยสามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ได้ 2 ชนิด ได้แก่ *B. cereus* และ *E. faecalis* ส่วนฟองน้ำ Sadej06 และ Sadej09 สามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ได้อย่างละชนิด คือ *B. cereus* และ *B. subtilis* ตามลำดับ จุลชีพที่ถูกยับยั้งโดยสารสกัดจากฟองน้ำจากแหลมเสด็จทั้งหมด เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ทั้งสิ้น ได้แก่ *B. cereus*, *B. subtilis* และ *E. faecalis* โดยไม่พบสารสกัดจากฟองน้ำชนิดใดที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อรา สารสกัดจากฟองน้ำทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งจุลชีพได้เพียงเล็กน้อย โดยสังเกตจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเพียง 13.01 - 17.00 มิลลิเมตรเท่านั้น ซึ่งการที่ฟองน้ำที่เก็บจากแหลมเสด็จออกฤทธิ์ต้านจุลชีพได้น้อย น่าจะเกิดจากตัวอย่างที่เก็บได้เป็นตัวอย่างจากอวนจมน้ำ โดยตัวอย่างอาจจะถูกเก็บขึ้นมาจากน้ำ และทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลานาน ทำให้คุณภาพของสารในฟองน้ำมีการเสื่อมสลายไปด้วยความร้อนและแสงแดด

ฟองน้ำจากหมู่เกาะช้าง จังหวัดตราด จำนวน 19 ชนิด แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพที่โดดเด่นกว่าฟองน้ำที่เก็บจากแหลมเสด็จอย่างชัดเจน โดยมีฟองน้ำที่สามารถยับยั้งจุลชีพได้มากถึง 14 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 73.68 (ตารางที่ 6) การยับยั้งจุลชีพส่วนใหญ่ของฟองน้ำทั้ง 14 ชนิด จะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและกลุ่มเชื้อราได้ดี ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะยับยั้งได้เพียงเล็กน้อย โดยสารสกัดจากฟองน้ำที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพในวงกว้าง (broad spectrum activity) และ

ยับยั้งจุลชีพที่โดดเด่น และมีเอกลักษณ์เฉพาะ มีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ ฟองน้ำ Chang01, Chang08, และ Chang09

โดยสารสกัดจากฟองน้ำ Chang01 มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพที่โดดเด่นกว่าฟองน้ำอื่นอย่างชัดเจน เนื่องจากสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพในวงกว้าง ได้มากถึง 11 ชนิด ได้แก่ จุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ คือ แบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis*, *E. faecalis* และ *S. aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *V. cholerae* และเชื้อรา *A. niger*, *M. gypseum* และ *T. mentagrophytes* และสารสกัดจากฟองน้ำ Chang01 ยังแสดงผลการยับยั้งจุลชีพที่น่าสนใจในทางการเกษตรกรรม โดยเป็นฟองน้ำเพียงชนิดเดียวที่สามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในทางการเกษตรได้ถึง 4 ชนิด ได้แก่ *R. solanacearum*, *X. campestris*, *V. cholerae* และ *V. fluvialis* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 20, 14, 20.5 และ 21.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 14) จากประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากฟองน้ำ Chang01 ที่โดดเด่นที่สุด จึงนำไปศึกษาต่อเพื่อแยกสารบริสุทธิ์ต่อไป

นอกจากนี้ยังมีสารสกัดจากฟองน้ำที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพในวงกว้าง และมีศักยภาพในการยับยั้งจุลชีพที่น่าสนใจ โดยสามารถยับยั้งจุลชีพได้ 6 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากฟองน้ำ Chang08 และ Chang09 โดยสารสกัดจากฟองน้ำ Chang09 สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. albicans* ได้อย่างโดดเด่น โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งถึง 22 มิลลิเมตร นับว่าเป็นสารสกัดจากฟองน้ำที่ยับยั้งเชื้อยีสต์ดังกล่าวได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ ได้แก่ *V. cholerae*, *A. niger*, *M. gypseum* และ *T. mentagrophytes* และสามารถยับยั้งจุลชีพสาเหตุของโรคพืช *X. campestris* ได้ สำหรับสารสกัดจากฟองน้ำ Chang08 สามารถยับยั้งจุลชีพได้ครอบคลุมหลายกลุ่ม ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *A. niger*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* และสามารถยับยั้งจุลชีพสาเหตุของโรคพืช *X. campestris* ได้ด้วยเช่นกัน

สารสกัดจากฟองน้ำ Chang17 สามารถยับยั้งเชื้อราและยีสต์ที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ได้ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *A. niger*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* และ *C. albicans* โดยคุณสมบัติที่โดดเด่นของสารสกัดจากฟองน้ำชนิดนี้ คือ สามารถยับยั้งเชื้อรา *M. gypseum* และ *T. mentagrophytes* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งถึง 58 และ 45 มิลลิเมตร ตามลำดับ

มีรายงานการศึกษาที่พบว่า ฟองน้ำเป็นแหล่งของสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพในวงกว้าง ตัวอย่างเช่น ฟองน้ำ *Psammophysilla purea* สามารถยับยั้งจุลชีพได้มากถึง 8 ชนิด โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ 4 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, *Mycobacterium* sp., *E. coli* และเชื้อราและยีสต์ 4 ชนิด ได้แก่ *A. niger*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *T. mentagrophytes* (Honma et al., 1995) และฟองน้ำ *Hippospongia communis* สามารถยับยั้งจุลชีพได้มากถึง 7 ชนิด โดยแบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis*, *E. coli*, *V. anguillarum* และเชื้อราและยีสต์ 4 ชนิด ได้แก่ *A. niger*, *C. albicans*, *C. tropicalis* และ *C. neoformans* (Rifai et al., 2004) การที่ฟองน้ำสามารถสร้างที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพในวงกว้าง น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งจุลชีพได้ครอบคลุมกับจุลชีพหลายชนิด

สำหรับจุลชีพที่ถูกยับยั้งได้มากที่สุดจากการทดสอบกับสารสกัดฟองน้ำทะเล ได้แก่ แบคทีเรีย *B. cereus* โดยมีสารสกัดจากฟองน้ำที่ยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวได้ถึง 9 ชนิด โดยสารสกัดจากฟองน้ำที่ยับยั้งได้ดีที่สุด คือ Chang03 ส่วนจุลชีพที่ถูกยับยั้งรองลงมาโดยถูกยับยั้งจากสารสกัดจากฟองน้ำ 7 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ *V. cholerae* และแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุของโรคพืช *X. campestris* ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อจุลชีพทั้ง 2 ถูกยับยั้งโดยสารสกัดจากฟองน้ำชนิดเดียวกัน จึงอาจมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากฟองน้ำดังกล่าว มีกลไกในการยับยั้งจุลชีพในแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 2 ชนิดนี้ที่เหมือนกัน นอกจากนี้ยังมีจุลชีพที่ถูกยับยั้งจากสารสกัดจากฟองน้ำ 5 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ *B. subtilis* และเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ 3 ชนิด ได้แก่ *A. niger*, *M. gypseum* และ *T. mentagrophytes* ส่วนจุลชีพที่ถูกยับยั้งจากสารสกัดจากฟองน้ำได้ 2 ชนิด ได้แก่ จุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ *E. faecalis* กับ *S. aureus* และเชื้อยีสต์ *C. albicans* และจุลชีพที่ถูกยับยั้งจากสารสกัดจากฟองน้ำ 1 ชนิด จะเป็นจุลชีพในกลุ่มที่เป็นสาเหตุของโรคทางเกษตรกรรม ได้แก่ *R. solanacearum*, *V. cholerae* และ *V. fluvialis* ซึ่งถูกยับยั้งโดยสารสกัดจากฟองน้ำ Chang01 เพียงชนิดเดียวเท่านั้น

การคัดเลือกสารสกัดจากฟองน้ำที่ยับยั้งจุลชีพ นอกจากจะคัดเลือกจากสารที่ยับยั้งจุลชีพในวงกว้างและโดดเด่นแล้ว สารที่มีลักษณะเฉพาะตัว เช่น สารยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และสารยับยั้งเชื้อราก็มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เพราะสารที่แสดงคุณสมบัติดังกล่าว มักมีคุณลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ ซึ่งมีความสำคัญต่อการนำไปพัฒนาไปใช้ในการพัฒนาประโยชน์ทางยาเช่นกัน



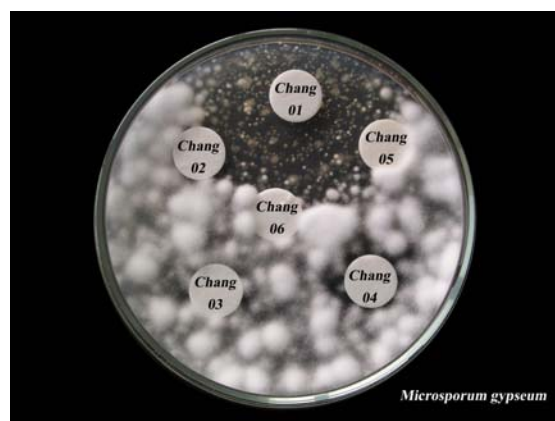
14.1



14.2



14.3



14.4

ภาพที่ 14 การสร้างสารยับยั้งจุลชีพของสารสกัดฟองน้ำ

14.1 เชื้อแบคทีเรียโรคพืช *R. solanacearum* 14.2 เชื้อแบคทีเรียโรคกุ้ง *V. cholerae*

14.3 เชื้อแบคทีเรียโรคกุ้ง *V. fluvialis* 14.4 เชื้อราโรคในมนุษย์ *M. mentagrophytes*

จากการศึกษาสารยับยั้งจุลชีพส่วนใหญ่จะพบว่า แบคทีเรียแกรมลบจะมีความไวต่อสารต้านจุลชีพน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของผนังเซลล์ที่ทำให้ทนทานต่อสารยับยั้งจุลชีพได้มากกว่า (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2547) โดยสารสกัดจากฟองน้ำในการศึกษานี้ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ 5 ชนิด โดยจะพบว่าสารสกัดฟองน้ำที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *V. cholerae* ที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ และแบคทีเรีย *X. campestris* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในพืชได้อย่างโดดเด่น ได้แก่ Chang01, Chang07, Chang09 และ Chang12 และมีสารสกัดจากฟองน้ำ Chang01 เพียงสารเดียวเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค

ในกึ่งกลาดำ *V. fluvialis* และ *V. cholerae* และแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในพืช *R. solanacearum* ได้

สำหรับเชื้อราซึ่งเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าเป็นจุลชีพที่มีการปรับตัวให้ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม รวมถึงสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้มากกว่าจุลชีพอื่น ๆ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้มีสารยับยั้งเชื้อราที่ใช้ในการรักษาทางการแพทย์ไม่มากนัก (Andriole, 1999) แต่ในการทดลองครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำทะเล Chang01, Chang08, Chang09, Chang17 และ Chang19 สามารถยับยั้งเชื้อราและยีสต์ที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ ได้แก่ *A. niger*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* และ *C. albicans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะฟองน้ำ Chang17 แสดงคุณสมบัติที่โดดเด่นคือสามารถยับยั้งเชื้อรา *M. gypseum* และ *T. mentagrophytes* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งถึง 58 และ 45 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งนับว่าเป็นฟองน้ำที่มีศักยภาพที่น่าสนใจ ในการที่จะศึกษาและพัฒนาเพื่อหาสารยับยั้งเชื้อราที่มีประสิทธิภาพต่อไป สำหรับสารสกัดจากฟองน้ำ Chang09 และ Chang17 สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์และเชื้อราได้ทั้ง 4 ชนิด ส่วนสารสกัดจากฟองน้ำ Chang01, Chang09 และ Chang19 ยับยั้งได้เฉพาะเชื้อราเท่านั้น

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย เป็นอุตสาหกรรมที่นำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นจำนวนมาก โดยในระหว่างปี พ.ศ. 2534-2544 ประเทศไทยเป็นผู้นำทางด้านการผลิตและการส่งออกกุ้งทะเล โดยมีการส่งออกสูงสุดในปี พ.ศ. 2543 มีมูลค่าถึง 107,891 ล้านบาท การเลี้ยงกุ้งในระยะหลัง เกษตรกรประสบปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้งเป็นจำนวนมาก อันมีสาเหตุมาจากการปล่อยลูกพันธุ์อย่างหนาแน่น บางครั้งทำให้สิ่งแวดล้อมในบ่อกุ้งเสื่อมลง เป็นสาเหตุให้กุ้งอ่อนแอ จึงมีโอกาสดต่อการติดเชื้อโรคได้ง่ายมากขึ้น โดยเกษตรกรควบคุมโรคโดยการใส่ยาปฏิชีวนะที่มีผลข้างเคียงต่อมนุษย์ที่บริโภคเข้าไป เช่น คลอแรมเฟนิคอล และไนโตรฟูแรนส์ ทำให้ในช่วงปี พ.ศ. 2545 ประเทศไทยประสบปัญหาการส่งกุ้งไปประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป (ชลอ และพรเลิศ, 2547) จากเหตุผลดังกล่าวการจึงเห็นความสำคัญของพัฒนาสารยับยั้งจุลชีพจากสารสกัดฟองน้ำไปใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรกรรม ซึ่งนับว่าเป็นคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพที่น่าสนใจอีกประการ ในปัจจุบันมีการศึกษาและพัฒนาสารจากฟองน้ำไปใช้ประโยชน์ ในการยับยั้งความเสียหายที่เกิดจากการติดเชื้อจากจุลชีพในทางการเกษตรกรรมไม่มากนัก การศึกษาครั้งนี้พบว่าฟองน้ำที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจดังกล่าว คือ สารสกัดจากฟองน้ำ Chang01 โดยเป็นสารสกัดจากฟองน้ำเพียงชนิดเดียว ที่สามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในกึ่งกลาดำ *V. cholerae* และ *V. fluvialis*

ตารางที่ 6 การยืนยันจุดชีพของสารสกัดจากฟองน้ำทะเล 28 ชนิด

สารสกัด จากฟองน้ำ	แบคทีเรียโรคนมนุษย์								แบคทีเรียโรคพืช			แบคทีเรียโรคกุ้ง				เชื้อราและยีสต์โรคนมนุษย์				รวม
	แกรมบวก				แกรมลบ				แกรมลบ			แกรมลบ								
	BC	BS	EF	SA	EA	EC	ST	VC	XC	RS	ERC	VC	VF	VH	VP	AN	CA	MG	TM	
Sadej01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Sadej02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Sadej03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Sadej04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Sadej05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Sadej06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Sadej06	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Sadej07	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Sadej08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sadej09	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Chang01	-	+	+	++	-	-	-	++	+	++	-	++	+++	-	-	+++	-	++++	+++	11
Chang02	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Chang03	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สารสกัด จากฟองน้ำ	แบคทีเรียโรคมมนุษย์								แบคทีเรียโรคพืช			แบคทีเรียโรคกุ้ง				เชื้อราและปรสิตโรคมมนุษย์				รวม
	แกรมบวก				แกรมลบ				แกรมลบ			แกรมลบ								
	BC	BS	EF	SA	EA	EC	ST	VC	XC	RS	ERC	VC	VF	VH	VP	AN	CA	MG	TM	
Chang04	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Chang05	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Chang06	++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Chang07	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Chang08	++	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	++++	+++	7
Chang09	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	++++	+++	++++	++++	6
Chang10	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Chang11	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Chang12	+	+++	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Chang13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Chang14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Chang15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สารสกัด จากฟองน้ำ	แบคทีเรียโรคมมนุษย์								แบคทีเรียโรคพืช			แบคทีเรียโรคกุ้ง				เชื้อราและยีสต์โรคมมนุษย์				รวม
	แกรมบวก				แกรมลบ				แกรมลบ			แกรมลบ								
	BC	BS	EF	SA	EA	EC	ST	VC	XC	RS	ERC	VC	VF	VH	VP	AN	CA	MG	TM	
Chang16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Chang17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++	++++	++++	4
Chang18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Chang19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	++++	++++	3
รวม	9	5	2	2	-	-	-	7	7	1	-	1	1	-	-	5	2	5	5	52

หมายเหตุ BC = *B. cereus*, BS = *B. subtilis*, EF = *E. faecalis*, SA = *S. aureus*, EA = *E. aerogenes*, EC = *E. coli*, ST = *S. Typhimurium*, VC = *V. cholerae*,
 XC = *X. campestris*, RS = *R. solanacearum*, ERC = *E. caratovor*, VF = *V. fluvialis*, VH = *V. harveyi*, VF = *V. parahaemolyticus*,
 AN = *A. niger*, CA = *C. albicans*, MG = *M. gypseum*, TM = *T. mentagrophytes*,
 บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) : ++++ = > 25.01, +++ = 21.01-25.00, ++ = 17.01-21.00, + = 13.01-17.00, - = ไม่ยับยั้ง

และโรคพืช *R. solanacearum* และ *X. campestris* ได้ด้วยเช่นกัน จะเห็นได้ว่าฟองน้ำเป็นแหล่งของสารยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในทางการเกษตรกรรมที่ควรพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

จากการคัดเลือกสารยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากฟองน้ำ 28 ชนิด ที่เก็บจากแหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี และจากหมู่เกาะช้าง จังหวัดตราด พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำ 17 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 60.71 แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ สอดคล้องกับรายงานการรวบรวมการศึกษาสารยับยั้งจุลชีพจากฟองน้ำของ Kuniyoshi and Higa (2001) ที่พบว่าฟองน้ำเป็นแหล่งของสารยับยั้งจุลชีพที่มีความสำคัญที่สุดแหล่งหนึ่ง สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ฟองน้ำ Chang01 มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพได้ในวงกว้าง โดยสามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ 7 ชนิด โรคกุ้งกุลาดำ 2 ชนิด และโรคพืช 2 ชนิด และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้อย่างโดดเด่น โดยเฉพาะการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในทางการเกษตรได้อย่างเด่นชัดถึง 4 ชนิด ได้แก่ *V. cholerae*, *V. fluvialis* *X. campestris* และ *R. Solanacearum* ซึ่งเป็นความเฉพาะตัวของสารสกัดจากฟองน้ำ Chang01 ที่สามารถยับยั้งจุลชีพดังกล่าวได้ สารสกัดจากฟองน้ำ Chang01 จะนำไปสู่ขั้นตอนการศึกษาต่อไป คือ การแยกสารให้บริสุทธิ์ รวมทั้งมีการศึกษาเพิ่มเติมที่สำคัญ คือ การแยกแบคทีเรียจากฟองน้ำชนิดนี้ ซึ่งคาดว่าจะอาจมีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพอื่น ๆ ด้วย

2. การสกัดสารและแยกสารบริสุทธิ์จากฟองน้ำ Chang01 ที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ

จากการคัดเลือกสารสกัดจากฟองน้ำที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ พบว่าฟองน้ำ Chang01 สร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพโดดเด่น และยับยั้งในวงกว้าง ดังนั้นฟองน้ำ Chang01 จึงถูกคัดเลือกมาทำการศึกษาต่อ ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน และการเปรียบเทียบรายงานการสำรวจความหลากหลายของฟองน้ำ บริเวณหมู่เกาะช้าง (ชัชรี และคณะ, 2547) พบว่าฟองน้ำ Chang01 คือ ฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. “blue” (ภาพที่ 15) โดยเป็นฟองน้ำที่พบได้ทั่วไปแต่ไม่มีผู้ใดทำการบรรยายชนิด จึงยังคงใช้สีของลำตัวฟองน้ำ เพื่อเป็นลักษณะของการกล่าวถึงฟองน้ำชนิดนี้ การแพร่กระจายของฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ในประเทศไทย จากรายงานการสำรวจที่พบส่วนใหญ่ จะพบในอ่าวไทย เช่น หมู่เกาะต่าง ๆ ของจังหวัดชลบุรี ได้แก่ หมู่เกาะสีชัง หมู่เกาะล้าน หมู่เกาะไผ่ หมู่เกาะรีน หมู่เกาะคราม หมู่เกาะแสมสาร (สุเมตต์ และคณะ, 2547) ส่วนหมู่เกาะช้าง จังหวัดตราด พบแพร่กระจายที่เกาะช้าง เกาะคลุ้ม เกาะพร้าวนอก และเกาะมะปราง (ชัชรี และคณะ, 2547) และสำหรับในอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะอ่างทอง จังหวัดสุราษฎร์ธานี มีการพบแพร่กระจายอยู่เป็นบริเวณกว้าง ได้แก่ บริเวณเกาะสามเส้า เกาะว่าว



ภาพที่ 15 ลักษณะของฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp.

เกาะแม่เกาะ เกาะวัวตาหลับ เกาะวัวกันตัง เกาะนอแรด เกาะช้างโตรม และเกาะท้ายเพลา (ศูนย์วิจัยป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2549) ซึ่งจะเห็นได้ว่าฟองน้ำชนิดนี้ มีปริมาณมาก และมีการแพร่กระจายเป็นบริเวณกว้าง ซึ่งเหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งของฟองน้ำ ที่ จะนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

Oku *et al.* (2003) ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. โดยทำการเก็บตัวอย่างฟองน้ำชนิดนี้จากเกาะ Kuchinoerabu-jima เกาะ Iwo-jima และหมู่เกาะ Satsunan ประเทศญี่ปุ่น โดยนักวิจัยที่จำแนกฟองน้ำในการศึกษาครั้งนี้ คือ Van Soest ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญในการจำแนกชนิดฟองน้ำจาก Institute for Systematics and Ecology มหาวิทยาลัย Amsterdam ได้บรรยายลักษณะของฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ไว้ว่า ฟองน้ำชนิดนี้เป็น ฟองน้ำเคลือบที่มีลักษณะเป็นก้อนหนา โดยมีท่อน้ำออกซึ่งมีรูปร่างแบบแจกันหลายท่อ ยื่นออกมา จากบริเวณฐาน มีความสูงของท่อน้ำออกประมาณ 4 เซนติเมตร หรืออาจมีลักษณะเป็นก้อนยกลูกนูน ขึ้นมาคล้ายสันเขา ท่อน้ำออกมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-5 มิลลิเมตร ลำตัวมีสีน้ำเงิน ส่วน บริเวณฐานจะมีสีน้ำตาลจาง ๆ ลำตัวจะมีลักษณะเป็นรูพรุนเล็ก ๆ มีความเหนียวหรือค่อนข้างแข็ง มีโครงร่างที่มีสปีคูลเรียงตัวกันเป็นแบบร่างแห โดยตาของตาข่าย (mesh) เป็นแบบวงกลมหรืออาจ เป็นทรงเหลี่ยม สปีคูลเป็นแบบ oxea ปลายแหลม มีขนาดประมาณ 225-260 x 11-13 ไมโครเมตร ในอดีตฟองน้ำชนิดนี้ เคยถูกจำแนกชนิดว่าเป็นฟองน้ำสกุล *Xestospongia* sp. ซึ่งเป็นฟองน้ำที่

จัดอยู่ในวงศ์เดียวกัน โดยฟองน้ำทั้งสองชนิดนี้มีความคล้ายคลึงกันมาก สำหรับลักษณะที่แตกต่างกันคือ ขนาดของสปิкул โดยฟองน้ำ *Xestospongia* sp. จะมีสปิкулใหญ่กว่าฟองน้ำ *Neopetrosia* sp. ซึ่งมีการใช้ขนาดของสปิкулในการแยกฟองน้ำสองชนิดเมื่อไม่นานมานี้ ทำให้ในสมัยก่อนจะจำแนกฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ว่าเป็นฟองน้ำ *Xestospongia* sp. ในปัจจุบันฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. มีการจัดลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้ (Hooper and Van Soest, 2002)

Phylum Porifera

Class Demospongiae

Order Haplosclerida

Suborder Petrosina

Family Petrosiidae

Genus *Neopetrosia* sp.

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของฟองน้ำ *Neopetrosia* sp. ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโดยคณะนักวิจัยชาวญี่ปุ่น ซึ่งสารจากฟองน้ำ *Neopetrosia* sp. มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น สารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ Renieramycin J ซึ่งเป็นสารกลุ่ม tetrahydro-isoquinoline alkaloid สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเซลล์ 3Y1 โดยการเปลี่ยนแปลงลักษณะของ RNA หรือเป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Oku *et al.*, 2003) สาร Araguspongine B, D, M และสารกลุ่ม 5 α ,8 α -Epidioxy sterols 3 อนุพันธ์ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ แต่เมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งจุลชีพ ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor hiemalis* และ *Ruegeria atlantica* พบว่าไม่สามารถยับยั้งจุลชีพดังกล่าวได้เลย (Liu *et al.*, 2004) คุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอีกประการ คือ การยับยั้งโรคผิวหนังที่เกิดจากโปรโตซัว *Leishmania amazonensis* (antileishmanial activity) โดยสาร Renieramycin A สามารถยับยั้งปรสิตนี้ได้ ที่ IC₅₀ เท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Nakao *et al.*, 2004)

สำหรับการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. ที่คาดว่าน่าจะเป็นฟองน้ำชนิดเดียวกับฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. มีรายงานของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ในปี ค.ศ. 1996 Edrada *et al.* ได้ศึกษาฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. ที่เก็บจากชายฝั่งของเกาะ Mindoro ประเทศฟิลิปปินส์ ซึ่งในขณะนั้น Van Soest เป็นผู้จำแนกชนิด

ฟองน้ำดังกล่าว ได้รายงานว่าเป็นฟองน้ำที่ไม่เคยพบรายงานในแถบอินโดแปซิฟิกมาก่อน และ คาดว่าฟองน้ำดังกล่าวอาจจะเป็นฟองน้ำชนิดใหม่ โดยคณะวิจัยได้พบสารในกลุ่มไอโซควิโนลิโน คิวโนน 4 สาร ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สาร *N*-ethylene methyl ketone สาร 1,6-Dimethyl-7-methoxy -5,8-dihydroisoquinoline-5,8-dione สาร Renierone และ สาร Mimosamycin โดยสารทั้ง 4 ชนิดนี้ สามารถยับยั้งจุลชีพได้แก่ *B. subtilis* และ *S. aureus* นอกจากนี้สาร Mimosamycin ยังสามารถยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium cucumerinum* ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบสาร 1,6-Dimethyl-7-methoxy -5,8-dihydroisoquinoline-5,8-dione และสาร Renierone ในฟองน้ำ *Reniera* sp. ด้วย ส่วนสาร Mimosamycin ก็ยังพบในฟองน้ำสีน้ำเงิน สกุล *Reniera* และ *Xestospongia* ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ เพิ่มพูน และ จันทนา (2544) ที่พบสาร Mimosamycin จากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. เช่นเดียวกัน โดยเป็นฟองน้ำที่เก็บจาก เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี นอกจากนี้ยังพบสารอื่นอีก ได้แก่ สาร Cribrostation 3 และ 4-Aminomimosamycin โดยสารสกัดหยาบจากฟองน้ำชนิดนี้ สามารถยับยั้งจุลชีพ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อกระดาศทดสอบ 1 แผ่น

ต่อมา Suwanborirux *et al.* (2003) ได้รายงานการศึกษาฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. จากเกาะสีชังเช่นเดียวกัน โดยเริ่มทำการศึกษาดังแต่ปี ค.ศ. 1992 จากการศึกษพบว่าสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สาร 1,6-Dimethyl-7-methoxy-5,8-dihydro isoquinoline-5,8-dione สาร Renierone สาร *N*-formyl-1,2-dihydrorenierone สาร Renieramycins J, K, L สาร Mimosamycin และสาร *N*-ethylene methyl ketone นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ทำการแยกสาร Renieramycins M และ N โดยการเติมโพแทสเซียมไซยาไนด์ (potassium cyanide) ลงไปในสารสกัดหยาบในระหว่างการสกัด เนื่องจากสาร Renieramycins M และ N มีกลุ่ม carbinolamine group ซึ่งทำให้เกิดความไม่เสถียรระหว่างการแยกสาร โดยเฉพาะสาร Renieramycins N จะมีความไวในการออกซิไดซ์ (oxidize) ต่อแสง ออกซิเจน และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ที่มากกว่า 7 ขึ้นไป ต่อมา Amnuoypol *et al.* (2004) ซึ่งเป็นคณะวิจัยกลุ่มเดิม ยังได้พบอนุพันธ์ของสาร Renieramycins อีก 4 ชนิด คือ Renieramycins O, Q, R, S และจากการทดสอบสาร renieramycins M, N, O, Q, R และ S พบว่าทุกสารมีคุณสมบัติเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) และเซลล์มะเร็งปอด (QG56) ของมนุษย์ จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. เป็นสารที่มีคุณสมบัติที่น่าจะพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งได้ในอนาคต

จากรายงานการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ที่ผ่านมา พบว่ามีสารที่น่าสนใจเป็นจำนวนมาก ในการศึกษาครั้งนี้จึงจะทำการสกัดและแยกสารจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ให้ได้สารบริสุทธิ์ โดยจะต้องทำการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติม เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนนี้ รวมทั้งจะมีการศึกษาการแยกแบบที่เรียบริสุทธิ์ เพื่อศึกษาผลการยับยั้งจุลชีพจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ไปพร้อมกันด้วย ซึ่งการเตรียมสารสกัด และแยกสารบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ และเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง มีผลการศึกษาดังนี้

2.1 สารสกัดหยาบจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp.

นำฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. 1,050 กรัม มาสกัดด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ ครั้งละ 1.5 ลิตร 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้มารวมกัน และนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้งระบบสุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบ (crude extract) น้ำหนักรวม 28.54 กรัม คิดเป็นร้อยละ 2.72 ของน้ำหนักฟองน้ำทั้งหมด

2.2 การแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

นำสารสกัดหยาบจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. น้ำหนัก 5.4 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยจะด้วยตัวทำละลายผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ 13 ชนิด ชนิดละ 150 มิลลิลิตร จะสังเกตจากสีของสารสกัดที่ถูกชะออกมา สามารถเก็บสารสกัดส่วนย่อย (fraction) ทั้งหมด 25 ส่วนย่อย (ภาพที่ 17 , ตารางที่ 7) และสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ๆ ตามความแตกต่างของสี คือ

กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มของสารสกัดส่วนย่อยที่ละลายในนอร์เมลเฮปเทนไปจนถึงโทลูอิน ซึ่งเป็นกลุ่มของสารที่มีขั้วต่ำ จะมีสีของสารตั้งแต่ไม่มีสีจนถึงสีเหลืองอ่อน โดยจะเห็นการแยกที่ชัดเจน (ภาพที่ 16.1) โดยเก็บสารสกัดส่วนย่อยได้ 6 ส่วนย่อย คือ NEO_CC_01 ถึง NEO_CC_06 (ภาพที่ 17)

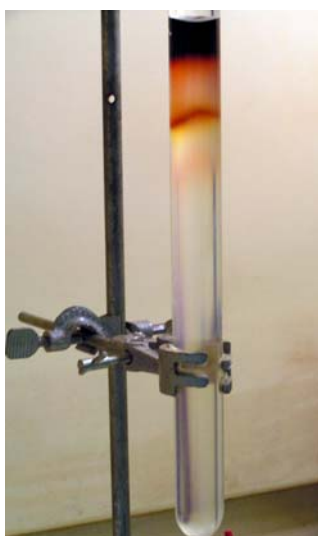
กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มของสารสกัดส่วนย่อยที่ละลายในโทลูอินถึงเอทิลแอซิเตต ซึ่งเป็นกลุ่มของสารที่มีขั้วปานกลาง สังเกตเห็นการแยกของสารเป็นสีต่างๆ ชัดเจน ได้แก่ สีชมพู แดง

ตารางที่ 7 สีและปริมาณสารสกัดส่วนย่อยที่ได้จากการแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

สารสกัดส่วนย่อย	สารละลายที่ใช้ในการแยก อัตราส่วน (ปริมาตร : ปริมาตร)	สีสารสกัด ส่วนย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
NEO_CC_01	นอร์แมลเฮปเทน	ไม่มีสี	2
NEO_CC_02	นอร์แมลเฮปเทน : โทลูอิน = 3 : 1	เหลือง	15
NEO_CC_03	นอร์แมลเฮปเทน : โทลูอิน = 1 : 1	ไม่มีสี	2
NEO_CC_04	นอร์แมลเฮปเทน : โทลูอิน = 1 : 3	ไม่มีสี	3
NEO_CC_05	โทลูอิน	เหลืองขุ่น	11
NEO_CC_06	โทลูอิน	เหลืองอมชมพู	9
NEO_CC_07	โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 3 : 1	ไม่มีสี	4
NEO_CC_08	โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 3 : 1	เหลือง	60
NEO_CC_09	โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 3 : 1	แดงอมส้ม	14
NEO_CC_10	โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 3 : 1	แดง	26
NEO_CC_11	โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 3 : 1	แดง	11
NEO_CC_12	โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 3 : 1	น้ำตาลแดง	36
NEO_CC_13	โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 3 : 1	น้ำตาล	2
NEO_CC_14	โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 3 : 1	น้ำตาล	22
NEO_CC_15	โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 1 : 1	ส้ม	5
NEO_CC_16	โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 1 : 1	น้ำตาลเขียว	33
NEO_CC_17	โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 1 : 3	เขียว	9
NEO_CC_18	โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 1 : 3	น้ำตาลเขียว	10
NEO_CC_19	เอทิลเอซีเตต	น้ำตาล	25
NEO_CC_20	เอทิลเอซีเตต : เมทิลแอลกอฮอล์ = 3 : 1	น้ำตาล	30
NEO_CC_21	เอทิลเอซีเตต : เมทิลแอลกอฮอล์ = 1 : 1	น้ำตาลเข้ม	114
NEO_CC_22	เอทิลเอซีเตต : เมทิลแอลกอฮอล์ = 3 : 1	น้ำตาล	17
NEO_CC_23	เอทิลเอซีเตต : เมทิลแอลกอฮอล์ = 1 : 3	น้ำตาลแดง	406
NEO_CC_24	เอทิลเอซีเตต : เมทิลแอลกอฮอล์ = 1 : 3	น้ำตาล	889
NEO_CC_25	เมทิลแอลกอฮอล์	น้ำตาล	988

ส้ม น้ำตาล เจริญ โดยสารสกัดส่วนย่อยแต่ละสารในกลุ่มนี้ มีความเป็นขี้ที่ใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากถูกชะออกมาโดยตัวทำละลายในระยะเวลาใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 16.2) โดยเฉพาะสารสกัดส่วนย่อยที่ละลายในโทลูอีนผสมกับเอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่มีขี้ปานกลาง โดยเก็บสารสกัดส่วนย่อยที่มีสีแตกต่างกันได้มากถึง 12 ส่วนย่อย รหัส NEO_CC_07 ถึง NEO_CC_19 (ภาพที่ 17)

กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มของสารสกัดส่วนย่อยที่ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ถึงเมทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นกลุ่มของสารที่มีขี้สูง สังเกตเห็นการแยกของสารเป็นสีต่าง ๆ ได้แก่ สีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลเข้ม สารสกัดส่วนย่อยแต่ละสารในกลุ่มนี้ แยกออกจากกันไม่ชัดเจนเหมือนสารใน 2 กลุ่มแรก โดยสังเกตจากสีของสารสกัดส่วนย่อยที่ถูกชะออกมา จะมีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 16.3) ซึ่งสามารถเก็บสารสกัดส่วนย่อยได้ 6 ส่วนย่อย คือ NEO_CC_20 ถึง NEO_CC_26 (ภาพที่ 17)



16.1



16.2



16.3

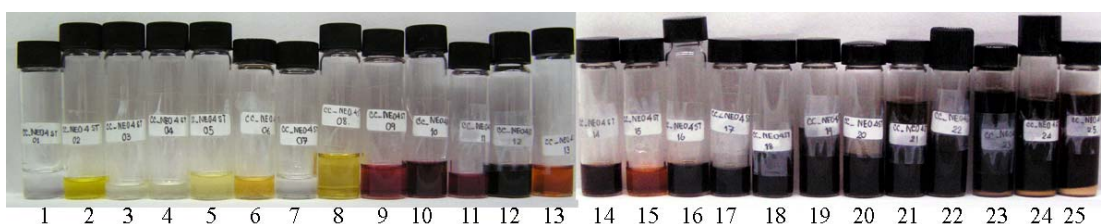
ภาพที่ 16 การแยกสารด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

16.1 สีของสารสกัดส่วนย่อยเมื่อชะคอลัมน์ด้วยสารละลายที่มีขี้ต่ำ

16.2 สีของสารสกัดส่วนย่อยเมื่อชะคอลัมน์ด้วยสารละลายที่มีขี้ปานกลาง

16.3 สีของสารสกัดส่วนย่อยเมื่อชะคอลัมน์ด้วยสารละลายที่มีขี้สูง

เมื่อพิจารณาจากสีของสารสกัดส่วนย่อย ซึ่งมีความแตกต่างกันเป็นจำนวนมากในแต่ละส่วนสกัด แสดงให้เห็นว่าฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. มีองค์ประกอบทางเคมีของสารจำนวนมาก ทั้งนี้การคัดเลือกสารสกัดส่วนย่อยที่จะนำไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป จะพิจารณาจากคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพ ประกอบกับพิจารณาความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยด้วย



ภาพที่ 17 สารสกัดส่วนย่อยจากการแยกสารสกัดหยาบโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

2.3 การศึกษาผลการยับยั้งจุลชีพและความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อย

สารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้ จะนำมาทดสอบการยับยั้งจุลชีพ จากนั้นนำสารสกัดส่วนย่อยที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ มาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ และศึกษาลักษณะของโครมาโตแกรม จากเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง เพื่อใช้ในการตัดสินใจเลือกสารสกัดส่วนย่อยที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ซึ่งมีผลการศึกษาที่สำคัญ ดังนี้

2.3.1 สารสกัดส่วนย่อยที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ

นำสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้จากโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ จำนวน 25 ส่วนย่อย มาทดสอบการยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ กุ้งกุลาดำ และฟิช โดยเตรียมสารสกัดส่วนย่อยให้ได้น้ำหนัก 100 ไมโครกรัมต่อกระดาดทดสอบ 1 แผ่น ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 8 ซึ่งผลการศึกษาที่สำคัญ คือ สารสกัดส่วนย่อยที่ถูกชะละลายในนอร์แมลเฮปแทนไปจนถึงโทลูอีน ได้แก่ สารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_01 ถึง NEO_CC_06 ซึ่งเป็นกลุ่มของสารที่มีขั้วต่ำ พบว่าไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลชีพ

สารสกัดส่วนย่อยที่ถูกชะละลายในสารละลายผสมระหว่างโทลูอินกับเอทิล-แอซีเตตไปจนถึงเอทิลแอซีเตต ได้แก่ สารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_07 ถึง NEO_CC_19 ซึ่งเป็นกลุ่มของสารที่มีขั้วปานกลาง ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ โดยมีสารสกัดส่วนย่อยที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพที่น่าสนใจดังนี้

สารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_07 และ NEO_CC_08 เป็นสารที่ถูกชะออกมาโดยสารละลายผสมระหว่างโทลูอินและเอทิลแอซีเตต อัตราส่วน 3 : 1 สารสกัดส่วนย่อยทั้ง 2 ส่วนย่อยนี้ มีลักษณะที่โดดเด่นกว่าสารสกัดส่วนย่อยอื่น ๆ คือ เป็นสารกลุ่มเดียวที่สามารถยับยั้ง *B. cereus* และ *C. albicans* ได้เท่านั้น นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์อีก 2 ชนิด คือ *A. niger* และ *T. mentagrophytes* ได้อีกด้วย โดยสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_07 สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดส่วนย่อยอื่น ๆ

สารสกัดส่วนย่อย คือ NEO_CC_12, NEO_CC_13 และ NEO_CC_14 ซึ่งเป็นสารสกัดส่วนย่อยที่มีสีน้ำตาลเหมือนกัน สามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ได้ 3 ชนิด คือ *B. subtilis*, *V. cholerae* และ *T. mentagrophytes* โดยเฉพาะ NEO_CC_14 ที่สามารถยับยั้ง *A. niger* ได้อีกด้วย

นอกจากนี้สารสกัดส่วนย่อยกลุ่มที่มีขั้วปานกลาง มีลักษณะที่น่าสนใจและโดดเด่นกว่าสารสกัดส่วนย่อยอื่น ๆ คือ สารยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในกิ้งกูดาค่าได้ 2 ชนิด คือ แบคทีเรีย *V. cholerae* และ *V. fluvialis* โดยสารสกัดส่วนย่อยที่ยับยั้งได้ คือ NEO_CC_18 และ NEO_CC_19 ส่วนสารสกัดส่วนย่อยอื่น ๆ มีการยับยั้งจุลชีพที่คล้ายคลึงกัน คือสามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์

สารสกัดส่วนย่อยที่ถูกชะละลายในสารละลายผสมระหว่างเอทิลแอซีเตตกับเมทิลแอลกอฮอล์ไปจนถึงเมทิลแอลกอฮอล์ ได้แก่ สารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_20 ถึง NEO_CC_25 ซึ่งเป็นกลุ่มของสารที่มีขั้วสูง พบว่าสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_21 และ NEO_CC_22 มีลักษณะที่โดดเด่นกว่าสารขั้วสูงอื่น ๆ โดยสามารถยับยั้งจุลชีพได้มากถึง 10 ชนิด แต่ที่มีความน่าสนใจที่สุด คือ คุณสมบัติในการยับยั้งจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคในทางการเกษตรกรรม โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในกิ้งกูดาค่าได้ 2 ชนิด คือ *V. cholerae* และ *V. fluvialis* และแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในพืช 1 ชนิด คือ *R. solanacearum* นอกจากนี้

สารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_21 และ NEO_CC_22 ยังเป็นสารสกัดส่วนย่อยกลุ่มเดียวที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus*, *E. faecalis* และ *S. Typhimurium* ได้อีกด้วย

ในการศึกษาคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากฟองน้ำ พบว่าสารสกัดส่วนย่อยจากฟองน้ำที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพแต่ละกลุ่มได้ดี คือ กลุ่มที่ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ พบว่าสารสกัดส่วนย่อยที่มีการยับยั้งแบคทีเรียที่น่าสนใจ ได้แก่ NEO_CC_21 และ NEO_CC_22 โดยเป็นสารกลุ่มเดียวที่สามารถยับยั้ง *E. faecalis*, *S. aureus* และ *S. Typhimurium* ได้ อีกทั้งยังสามารถยับยั้ง *B. subtilis* และ *V. cholerae* ได้ดีที่สุดอีกด้วย

สำหรับการยับยั้งเชื้อยีสต์และราที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ จากการศึกษานี้ พบว่าสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้จากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. หลายสาร มีคุณสมบัติการยับยั้งยีสต์และราที่มีประสิทธิภาพมาก โดยเฉพาะสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_07 และ NEO_CC_08 ซึ่งเป็นสารเพียงกลุ่มเดียวที่ยับยั้งเชื้อยีสต์และราได้ทุกชนิด นอกจากนี้ NEO_CC_07 ยังสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งกว้างถึง 21.2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 18.1) ส่วนสาร NEO_CC_21 สามารถยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งกว้างถึง 22.1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 18.2)

ลักษณะที่โดดเด่นของคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพที่สำคัญอีกประการ คือ การออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในทางเกษตรกรรม โดยพบว่าสารสกัดส่วนย่อยที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพดังกล่าว จะเป็นสารสกัดส่วนย่อยที่มีความเป็นขี้ก่อนข้างสูง โดย NEO_CC_21 และ NEO_CC_22 เป็นสารกลุ่มเดียวที่ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคในพืชชนิด *R. solanacearum* ได้ สำหรับแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคในกุ้งกุลาดำ *V. cholerae* และ *V. fluvialis* ถูกยับยั้งได้โดยสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_18, NEO_CC_19, NEO_CC_21 และ NEO_CC_22 โดยสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_22 สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *V. cholerae* และ *R. solanacearum* ได้ดีที่สุด ส่วนแบคทีเรีย *V. fluvialis* ถูกยับยั้งได้ดีที่สุดโดย โดยสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_21 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งกว้าง 11.10 มิลลิเมตร

จากการศึกษาสารสกัดส่วนย่อยในการยับยั้งจุลชีพครั้งนี้ พบว่ามีสารสกัดส่วนย่อยบางสารสามารถยับยั้งจุลชีพที่สารสกัดหยาบไม่สามารถยับยั้งได้ ได้แก่ แบคทีเรีย *B. cereus* และ

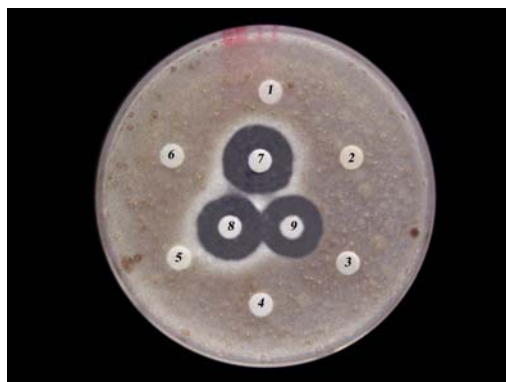
ตารางที่ 8 การขยับขั้วจุดชีพของสารสกัดส่วนย่อยจากวิธีโครมาโทกราฟแบบคอลัมน์

สารสกัดจาก ฟองน้ำ	แบคทีเรียโรคมมนุษย์								แบคทีเรียโรคพืช			แบคทีเรียโรคกุ้ง				เชื้อราและยีสต์			รวม
	แกรมบวก				แกรมลบ				แกรมลบ			แกรมลบ				โรคมมนุษย์			
	BC	BS	EF	SA	EA	EC	ST	VC	XC	RS	ERC	VC	VF	VH	VP	AN	CA	TM	
NEO_CC_01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NEO_CC_02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NEO_CC_03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NEO_CC_04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NEO_CC_05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NEO_CC_06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NEO_CC_07	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++	++++	4
NEO_CC_08	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++	++++	4
NEO_CC_09	-	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	3
NEO_CC_10	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
NEO_CC_11	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
NEO_CC_12	-	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	3
NEO_CC_13	-	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
NEO_CC_14	-	+	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	++++	4
NEO_CC_15	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	2
NEO_CC_16	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	+++	4

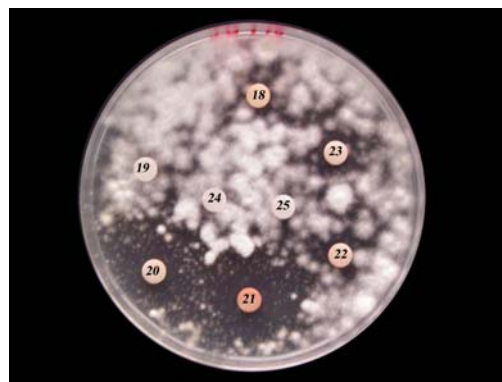
ตารางที่ 8 (ต่อ)

สารสกัดจาก ฟองน้ำ	แบคทีเรียโรคนมนุษย์								แบคทีเรียโรคพืช			แบคทีเรียโรคกุ้ง				เชื้อราและยีสต์			รวม
	แกรมบวก				แกรมลบ				แกรมลบ			แกรมลบ				โรคนมนุษย์			
	BC	BS	EF	SA	EA	EC	ST	VC	XC	RS	ERC	VC	VF	VH	VP	AN	CA	TM	
NEO_CC_17	-	+	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	3
NEO_CC_18	-	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	5
NEO_CC_19	-	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	4
NEO_CC_20	-	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	3
NEO_CC_21	-	++++	+++	++	-	-	+++	++++	-	+	-	++	+++	-	-	++++	-	++++	10
NEO_CC_22	-	++	++	+	-	-	++	++++	-	++	-	+++	+	-	-	++++	-	+++	10
NEO_CC_23	-	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	3
NEO_CC_24	-	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
NEO_CC_25	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
รวม	2	15	2	2	-	-	2	17	-	2	-	4	4	-	-	8	2	11	73

หมายเหตุ BC = *B. cereus*, BS = *B. subtilis*, EF = *E. faecalis*, SA = *S. aureus*, EA = *E. aerogenes*, EC = *E. coli*, ST = *S. Typhimurium*, VC = *V. cholerae*,
XC = *X. campestris*, RS = *R. solanacearum*, ERC = *E. caratovora*, VF = *V. fluvialis*, VH = *V. harveyi*, VF = *V. parahaemolyticus*,
AN = *A. niger*, CA = *C. albicans*, MG = *M. gypseum*, TM = *T. mentagrophytes*,
บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) : +++++ = > 12.01, +++ = 10.01-12.00, ++ = 8.01-10.00, + = 6.01-8.0, - = ไม่ยับยั้ง



18.1



18.2

ภาพที่ 18 บริเวณยับยั้งเชื้อราของสารสกัดส่วนย่อยจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp.

18.1 เชื้อรา *A. niger* 18.2 เชื้อรา *T. mentagrophytes*

S. Typhimurium รวมถึงเชื้อยีสต์ *C. albicans* ซึ่งอาจเป็นเพราะในสารสกัดหยาบมีปริมาณของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพดังกล่าวในปริมาณน้อย เมื่อเทียบกับอัตราส่วนทั้งหมดของสารสกัดหยาบ ดังนั้นเมื่อนำมาแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ ซึ่งจะได้สารสกัดส่วนย่อย แล้วนำไปทำให้เข้มข้น จากนั้นนำมาเตรียมให้ปริมาณสารเท่ากัน คือ 100 ไมโครลิตรต่อกระดาดทดสอบ 1 แผ่น จึงสามารถเห็นการออกฤทธิ์ยับยั้งของสารดังกล่าวได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ไม่พบสารสกัดส่วนย่อย ที่มีคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในพืชชนิด *X. campestris* ในขณะที่สารสกัดหยาบสามารถยับยั้งได้ ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดหยาบมีองค์ประกอบของสารหลายชนิดที่เป็นตัวช่วยเสริมฤทธิ์กัน ทำให้เมื่อแยกออกเป็นสารสกัดส่วนย่อยแล้ว การออกฤทธิ์ร่วมกันดังกล่าวจึงอาจสูญเสียไป

การทดสอบการยับยั้งจุลชีพในการศึกษารั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดส่วนย่อย ร้อยละ 76 แสดงคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพได้ โดยมีสารสกัดส่วนย่อยที่มีความโดดเด่นและมีเอกลักษณ์เฉพาะ เช่น สารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_07 ถึง NEO_CC_08 ซึ่งเป็นสารสกัดส่วนย่อยกลุ่มเดียว ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* และยีสต์ *C. albicans* ได้ ส่วนสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_18, NEO_CC_19, NEO_CC_21 และ NEO_CC_22 สามารถยับยั้งแบคทีเรียโรคงูปลา *V. cholerae* และ *V. fluvialis* ได้ นอกจากนี้สารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_21 และ NEO_CC_22 สามารถยับยั้งจุลชีพได้ในวงกว้างถึง 10 ชนิด และยังเป็นสารกลุ่มเดียวที่ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ *E. faecalis*, *S. aureus* และ *V. cholerae* ได้อีกด้วย นอกจากอาศัยคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพในการคัดเลือกสารที่จะนำไปแยกให้บริสุทธิ์ จะทำการศึกษา

ความแตกต่างขององค์ประกอบของสารด้วยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ และศึกษาความเป็นไปได้ในการแยกสาร จากโครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการตัดสินใจคัดเลือกสารสกัดส่วนย่อยที่จะนำไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป

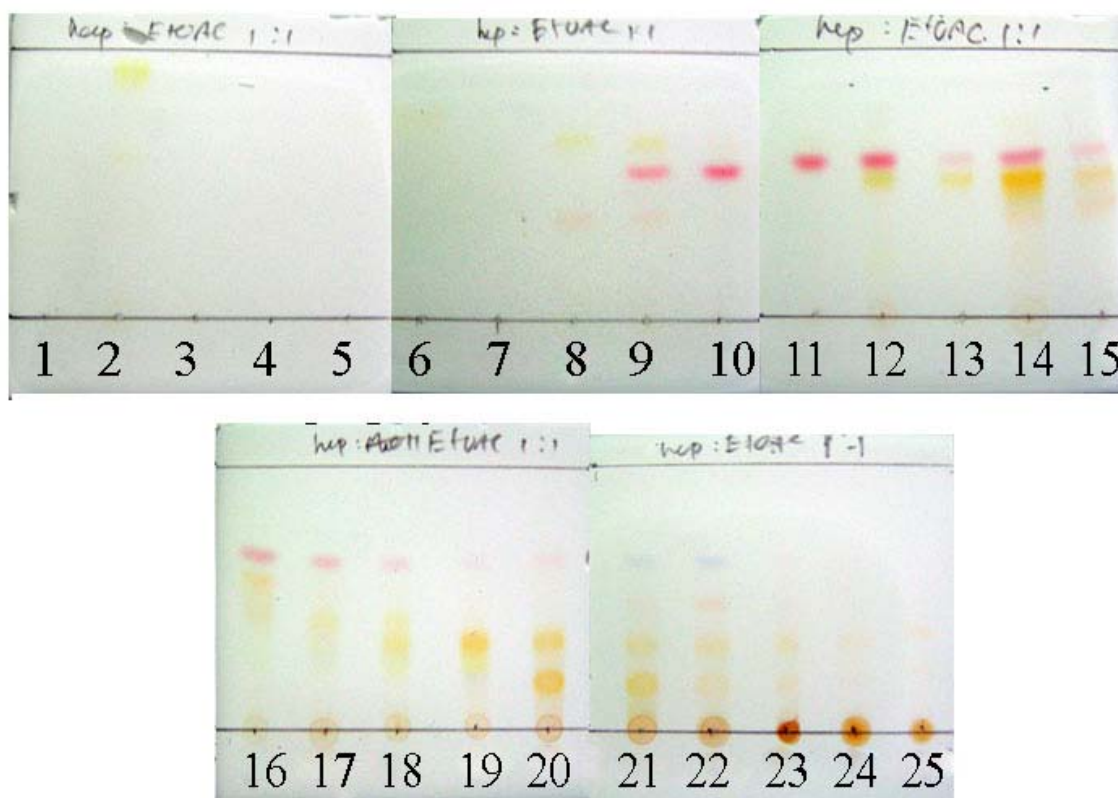
2.3.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยด้วยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ

นำสารสกัดส่วนย่อยทั้งหมด 25 ส่วนย่อย มาวิเคราะห์ความแตกต่างขององค์ประกอบของสารด้วยแผ่น TLC โดยใช้สารละลายผสมระหว่างนอร์แมลเฮกเซนและเอทิล-แอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคไหล โดยผลการศึกษามีดังต่อไปนี้ (ภาพที่ 19)

จากการศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบของสารสกัดส่วนย่อย 25 ส่วนย่อย พบว่าสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_01 ถึง NEO_CC_07 ซึ่งเป็นสารที่ถูกชะออกมาโดยสารละลายผสมที่มีความเป็นขั้วต่ำ มีองค์ประกอบของสารคล้ายคลึงกัน คือ ไม่ปรากฏ spot ของสารเมื่อตรวจสอบด้วยแสงธรรมชาติ ยกเว้นใน NEO_CC_02 ที่ปรากฏ spot สีเหลือง ซึ่งมีค่า $R_f = 0.91$ และใน NEO_CC_02, NEO_CC_03, NEO_CC_06 และ NEO_CC_07 ปรากฏ spot ไม่มีสี แต่เรืองแสงกับแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 356 นาโนเมตร ซึ่งมีค่า $R_f = 0.83$

สารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_08 และ NEO_CC_09 มีองค์ประกอบของสารที่คล้ายคลึงกัน คือ ปรากฏ spot สีเหลือง ซึ่ง spot ดังกล่าวเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 356 นาโนเมตรด้วย โดยมีค่า $R_f = 0.64$ นอกจากนี้ยังมี spot สีส้มอ่อน ซึ่ง spot ดังกล่าวเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรด้วย โดยมีค่า $R_f = 0.40$ นอกจากนี้ NEO_CC_09 ยังมี spot สีแดง มีค่า $R_f = 0.60$ ซึ่งพบในสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_10 และ NEO_CC_11 ด้วยเช่นกัน

สารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_12 ถึง NEO_CC_16 มีองค์ประกอบของสารที่คล้ายคลึงกัน คือ ปรากฏ spot สีแดง มีค่า $R_f = 0.60$ และ spot สีส้มเข้ม มีค่า $R_f = 0.51$ โดย spot ทั้งสองเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 356 นาโนเมตร นอกจากนี้



ภาพที่ 19 การศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบของสารสกัดส่วนย่อยด้วย TLC

ในสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_14 ถึง NEO_CC_16 ยังปรากฏ spot สีส้มอ่อน ซึ่ง spot ดังกล่าวเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรด้วย โดยมีค่า $R_f = 0.40$

สารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_17 ถึง NEO_CC_19 มีองค์ประกอบของสารที่คล้ายคลึงกัน คือ ปรากฏ spot สีแดง มีค่า $R_f = 0.60$ spot สีส้ม มีค่า $R_f = 0.35$ และ spot สีเขียวอ่อน มีค่า $R_f = 0.25$ โดย spot ทั้งสามเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 356 นาโนเมตร

สารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_20 ถึง NEO_CC_25 มีองค์ประกอบของสารที่คล้ายคลึงกัน คือ spot สีส้ม มีค่า $R_f = 0.35$ และ spot สีส้มเข้ม มีค่า $R_f = 0.21$ โดย spot ทั้งสองเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 356 นาโนเมตร ในสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_20 ยังปรากฏ spot สีแดง มีค่า $R_f = 0.60$ ซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 356 นาโนเมตร นอกจากนี้สารสกัดส่วนย่อย

NEO_CC_21 และ NEO_CC_22 ยังปรากฏ spot สีม่วง มีค่า $R_f = 0.66$ ซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เท่านั้น และ spot สีชมพู มีค่า $R_f = 0.49$ ซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ทั้งที่ความยาวคลื่น 254 และ 356 นาโนเมตร

จากผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ ทำให้เห็นถึงความแตกต่างขององค์ประกอบของสารสกัดส่วนย่อยของฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. และทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของสารสกัดส่วนย่อยตามโครมาโตแกรมของ TLC ซึ่งในขั้นตอนต่อไปจะเป็นการศึกษาโครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง เพื่อเป็นข้อมูลสุดท้ายในการคัดเลือกว่าสารสกัดส่วนย่อยไปทำการแยกสารบริสุทธิ์ต่อไป

2.3.3 การศึกษาโครมาโตแกรมเบื้องต้นของสารสกัดส่วนย่อยที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ ด้วยเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง

หลังจากการแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ สารสกัดส่วนย่อยของฟองน้ำยังประกอบด้วยสารผสมหลายชนิด ซึ่งสังเกตได้จากโครมาโตแกรมที่ได้จากโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ ดังนั้นจึงต้องทำการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีการที่มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น นั่นคือการแยกสารด้วยเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง ซึ่งการแยกสารที่มีประสิทธิภาพที่สุด จะต้องทำให้องค์ประกอบของสารต่าง ๆ แยกออกจากกันอย่างชัดเจน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาโครมาโตแกรมเบื้องต้นของสารสกัดส่วนย่อยที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ ว่าองค์ประกอบใดที่สามารถแยกได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด เพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการตัดสินใจเลือกสารสกัดส่วนย่อยไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

การศึกษาโครมาโตแกรมจากเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง เพื่อดูความแตกต่างขององค์ประกอบ และปริมาณของสารประกอบที่อยู่ในสารสกัดส่วนย่อยแต่ละสาร โดยเปรียบเทียบโครมาโตแกรมเพื่อหาสารสกัดส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบของสารที่มีอำนาจการแยก (resolution) สูง โดยดูจากการแยกกันของพิก (peak) นอกจากนี้ต้องพิจารณาปริมาณของสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งควรมีปริมาณมากเพียงพอที่จะนำไปทดสอบการยับยั้งจุลชีพ และศึกษาโครงสร้างทางเคมี โดยพิจารณาจากความสูงของพิก (peak height) ซึ่งมีผลการศึกษาที่สำคัญดังนี้ (ภาพที่ 20)

จากการศึกษาโครมาโตแกรมของสารสกัดส่วนย่อยรหัส NEO_CC_07 ถึง NEO_CC_25 ซึ่งสามารถยับยั้งจุลชีพได้ ใช้เวลาในการชะ 25 นาที โดยพีคที่ปรากฏที่เวลาชะ 3.7 นาที และ 4.0 นาที เป็นพีคของตัวทำละลายของสารสกัดส่วนย่อย และจากโครมาโตแกรมพบว่า สารสกัดส่วนย่อยที่มีความเป็นขั้วปานกลาง รหัส NEO_CC_08 ถึง NEO_CC_14 มีพีคที่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรได้ดี และมีอำนาจการแยก (resolution) สูงหลายพีค โดยมีโครมาโตแกรมของสารสกัดส่วนย่อยที่น่าสนใจดังนี้

โครมาโตแกรมของสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_08 และ NEO_CC_09 ปรากฏพีคหลักที่น่าสนใจ คือ พีคซึ่งมีเวลาชะ (retention time) 9.8 นาที เนื่องจากเป็นพีคที่มีอำนาจการแยกสูง และนอกจากนี้พีคของสารดังกล่าวยังดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรได้ดี แสดงถึงลักษณะโครงสร้างของสารที่น่าสนใจ และจากความสูงของพีค แสดงให้เห็นว่าสารดังกล่าวน่าจะมีปริมาณมากพอสมควร

โครมาโตแกรมของสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_10 และ NEO_CC_11 ปรากฏพีคหลักซึ่งมีเวลาชะ 7.0 นาที ซึ่งเป็นพีคที่มีอำนาจการแยก และมีความสูงของพีคสูงเช่นเดียวกัน

ส่วนโครมาโตแกรมของสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_12, NEO_CC_13 และ NEO_CC_14 ปรากฏพีคหลัก 2 พีค โดยพีคแรกมีเวลาชะ 7.0 นาที ซึ่งคล้ายคลึงกับพีคที่ปรากฏในโครมาโตแกรมของสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_10 และ NEO_CC_11 ส่วนพีคที่ 2 มีเวลาชะ 5.7 นาที ซึ่งพีคทั้งสองมีอำนาจการแยก และมีความสูงของพีคสูงเช่นเดียวกัน

สำหรับโครมาโตแกรมของสารสกัดส่วนย่อยอื่น ๆ พบว่ามีอำนาจการแยกต่ำ คือมีค่าเวลาชะใกล้เคียงกันมาก และมีบางพีคที่ซ้อนทับกัน เช่น NEO_CC_15 ถึง NEO_CC_25 ซึ่งนำมาแยกให้บริสุทธิ์ได้ยากและมีความสูงของพีคเพียงเล็กน้อย แสดงว่าพีคดังกล่าวมีปริมาณความเข้มข้นของสารจำนวนน้อย ซึ่งหากนำไปแยกจนบริสุทธิ์อาจได้ปริมาณไม่เพียงพอในการนำไปทดสอบการยับยั้งจุลชีพ และศึกษาโครงสร้างทางเคมีได้

จากผลการยับยั้งจุลชีพ การศึกษาองค์ประกอบของสารจากโครมาโตแกรมที่แยกด้วย TLC และโครมาโตแกรมที่แยกด้วยเครื่อง HPLC ของสารสกัดส่วนย่อย สามารถคัดเลือกสารสกัดส่วนย่อยที่จะนำไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อไปดังนี้

สารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_08 และ NEO_CC_09 สามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ ได้แก่ *B. cereus*, *B. subtilis*, *V. cholerae*, *A. niger*, *C. albicans* และ *T. mentagrophytes* ได้ โดยมีโครมาโตแกรมบนแผ่น TLC ที่คล้ายคลึงกัน คือ ปรากฏ spot สีเหลือง ค่า $R_f = 0.64$ และ spot สีส้มอ่อน ค่า $R_f = 0.40$ และจากโครมาโตแกรมของเครื่อง HPLC ปรากฏพีคซึ่งมีเวลาชะ 9.8 นาที เช่นเดียวกัน โดยพีคดังกล่าวมีอำนาจการแยกสูง ทำให้มีเวลาชะห่างจากพีคปนเปื้อนอื่น ๆ ทำให้เก็บสารบริสุทธิ์ที่ถูกชะออกมาจากการแยกด้วยเครื่อง HPLC ได้ง่ายและมีความสูงของพีคมากที่สุด ซึ่งเมื่อแยกสารบริสุทธิ์ดังกล่าวแล้วน่าจะได้ปริมาณเพียงพอต่อการนำไปศึกษาต่อ จึงรวมสารสกัดส่วนย่อยดังกล่าวเข้าด้วยกัน แล้วตั้งชื่อสารสกัดส่วนย่อยนั้นว่า NEO_COMBINE_1

สารสกัดส่วนย่อยต่อไปที่จะนำมาแยกให้บริสุทธิ์ คือ NEO_CC_10 และ NEO_CC_11 โดยสารดังกล่าวสามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ ได้แก่ *B. subtilis* และ *V. cholerae* ได้ โดยมีโครมาโตแกรมบนแผ่น TLC ที่คล้ายคลึงกัน คือ ปรากฏ spot สีแดง ค่า $R_f = 0.60$ และจากโครมาโตแกรมของเครื่อง HPLC ปรากฏพีคซึ่งมีเวลาชะ 7.0 นาที เหมือนกัน จึงรวมสารสกัดส่วนย่อยดังกล่าวเข้าด้วยกัน แล้วตั้งชื่อสารสกัดส่วนย่อยนั้นว่า NEO_COMBINE_2

สำหรับสารสกัดส่วนย่อยส่วนสุดท้ายที่จะนำมาแยกได้ให้บริสุทธิ์ คือ NEO_CC_12, NEO_CC_13 และ NEO_CC_14 โดยสารดังกล่าวสามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ ได้แก่ *B. subtilis*, *V. cholerae*, *A. niger* และ *T. mentagrophytes* ได้ โดยมีโครมาโตแกรมบนแผ่น TLC ที่คล้ายคลึงกัน คือ ปรากฏ spot สีแดง ค่า $R_f = 0.60$ และ spot สีส้มเข้ม ค่า $R_f = 0.51$ และจากโครมาโตแกรมของเครื่อง HPLC ปรากฏพีคซึ่งมีเวลาชะ 7.0 นาที และ 5.7 นาที เหมือนกัน จึงรวมสารสกัดส่วนย่อยดังกล่าวเข้าด้วยกัน แล้วตั้งชื่อสารสกัดส่วนย่อยนั้นว่า NEO_COMBINE_3

การคัดเลือกสารสกัดส่วนย่อยที่จะนำไปแยกสารบริสุทธิ์ เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีต่อไป ได้แก่ สาร NEO_COMBINE_1, NEO_COMBINE_2 และ NEO_COMBINE_3 โดยการคัดเลือกดังกล่าว ได้พิจารณาจากคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพ ความแตกต่างขององค์ประกอบของโครมาโตแกรมบนแผ่น TLC และเครื่อง HPLC รวมถึงความเป็นไปได้ในการแยกสารบริสุทธิ์ และได้ปริมาณสารที่เพียงพอจากสารสกัดส่วนย่อยดังกล่าว ซึ่งมีสารสกัดส่วนย่อยบางสารที่มีคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพที่ดีและโดดเด่น เช่น NEO_CC_18, NEO_CC_19,

NEO_CC_21 และ NEO_CC_22 ที่สามารถยับยั้งจุลชีพได้หลายชนิด แต่จากโครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC พบว่าพีคของสารสกัดส่วนย่อยดังกล่าวมีอำนาจการแยกต่ำ ทำให้ยากต่อการแยกจากพีคปนเปื้อนอื่น อีกทั้งพีคที่ปรากฏมีความสูงของพีคเพียงเล็กน้อย ซึ่งต้องใช้เวลานานในการแยกสารบริสุทธิ์ให้เพียงพอในการนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมี จึงยังไม่ได้คัดเลือกสารสกัดส่วนย่อยดังกล่าวไปทำการศึกษาต่อ ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการศึกษการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_1, NEO_COMBINE_2 และ NEO_COMBINE_3 และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปศึกษาโครงสร้างทางเคมีต่อไป

3. การแยกสารสกัดส่วนย่อยให้บริสุทธิ์

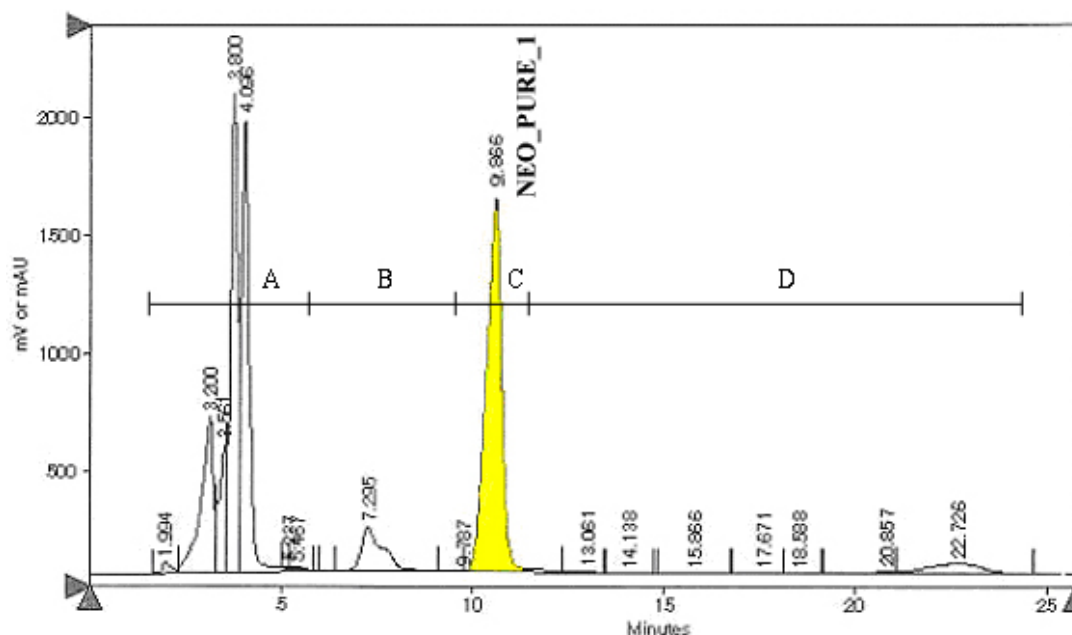
จากการคัดเลือกสารสกัดส่วนย่อย เพื่อนำมาแยกสารบริสุทธิ์ จนได้สารสกัดส่วนย่อย 3 ส่วน คือ NEO_COMBINE_1, NEO_COMBINE_2 และ NEO_COMBINE_3 โดยจะนำสาร NEO_COMBINE_1 และ NEO_COMBINE_3 มาแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง ส่วนสาร NEO_COMBINE_2 ซึ่งมีองค์ประกอบของสารไม่มาก จะแยกด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์สำเร็จรูป จากนั้นจะนำสารสกัดส่วนย่อยที่ได้จากการแยกในแต่ละขั้นตอน ไปทดสอบการยับยั้งจุลชีพ เพื่อตรวจสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารบริสุทธิ์ โดยสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ จะถูกนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมีต่อไป ซึ่งผลการศึกษามีดังนี้

3.1 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง

นำสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_1 และ NEO_COMBINE_3 มาทำการแยกด้วยเครื่อง HPLC แล้วเก็บสารสกัดส่วนย่อยที่ได้จากการแยก ไปทำการทดสอบการยับยั้งจุลชีพ เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพที่แท้จริงของสารสกัดส่วนย่อยแต่ละส่วน หากสารสกัดส่วนย่อยที่คาดว่าเป็นสารบริสุทธิ์สามารถยับยั้งจุลชีพได้ จะนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมีต่อไป โดยมีผลการแยกสารบริสุทธิ์แต่ละสารดังนี้

3.1.1 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_1

นำสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_1 มาแยกด้วยเครื่อง HPLC เก็บสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้จากเครื่อง HPLC ตามช่วงเวลาขณะที่แสดงในโครมาโตแกรมในภาพที่ 21 ได้สารสกัดย่อย 4 ส่วนย่อย ตั้งรหัสสารสกัดส่วนย่อยใหม่ว่า NEO_COMBINE_1_A,



ภาพที่ 21 โครมาโตแกรมของสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_1

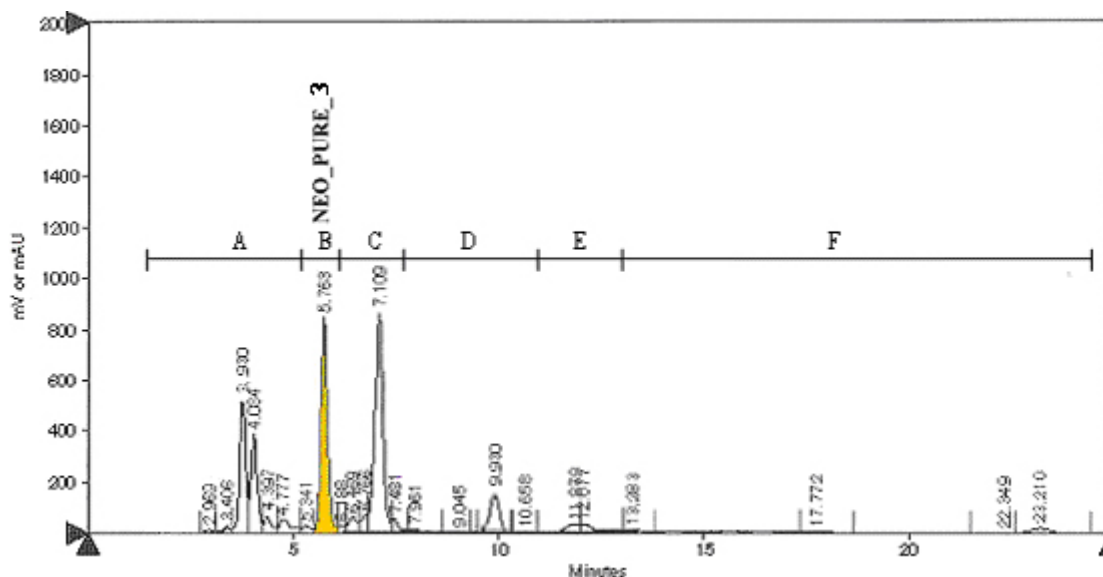
NEO_COMBINE_1_B, NEO_COMBINE_1_C และ NEO_COMBINE_1_D นำสารสกัดส่วนย่อยไปประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้งระบบสุญญากาศ เก็บรักษาสารที่ได้ในตู้แช่แข็ง

3.1.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_3

นำสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_3 มาแยกด้วยเครื่อง HPLC เก็บสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้จากเครื่อง HPLC ตามช่วงเวลาที่แสดงในโครมาโตแกรมในภาพที่ 22 ได้สารสกัดย่อย 6 ส่วนย่อย ตั้งรหัสสารสกัดส่วนย่อยใหม่ว่า NEO_COMBINE_3_A, NEO_COMBINE_3_B, NEO_COMBINE_3_C, NEO_COMBINE_3_D, NEO_COMBINE_3_E และ NEO_COMBINE_3_F นำสารสารสกัดส่วนย่อยไปประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้งระบบสุญญากาศ เก็บรักษาสารที่ได้ในตู้แช่แข็ง

3.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_2 ด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์สำเร็จรูป

นำสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_2 มาทำการแยกด้วยคอลัมน์สำเร็จรูป โดยเก็บสารสกัดส่วนย่อยจากสีของสารที่ถูกชะออกมา ได้สารสกัดส่วนย่อย 5 ส่วนย่อย โดยตั้งรหัส



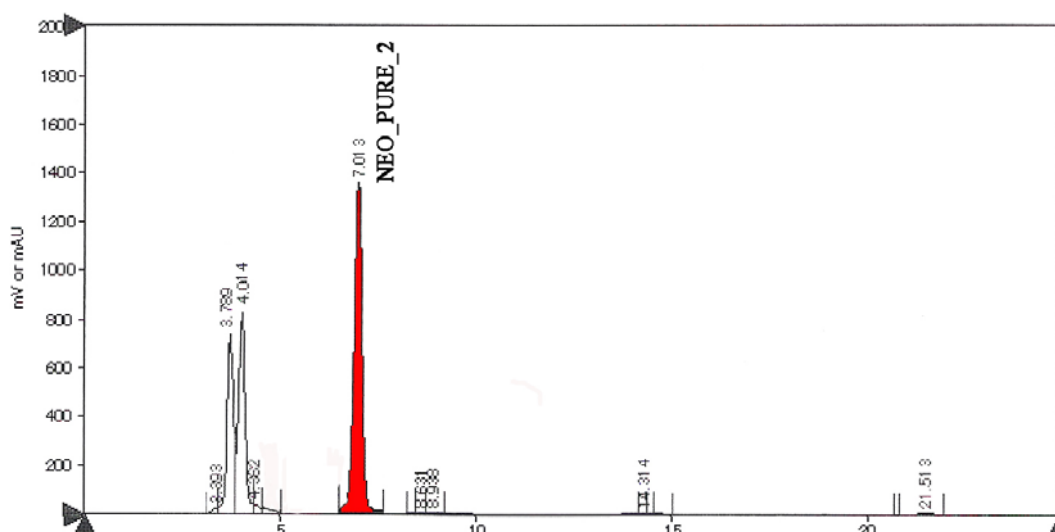
ภาพที่ 22 โครมาโตแกรมของสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_3

สารสกัดส่วนย่อยใหม่ ๆ NEO_COMBINE_2_A, NEO_COMBINE_2_B, NEO_COMBINE_2_C, NEO_COMBINE_2_D และ NEO_COMBINE_2_E นำสารสกัดส่วนย่อยไปประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้งระบบสุญญากาศ เก็บรักษาสารที่ได้ในตู้แช่แข็ง

3.3 การทดสอบการยับยั้งจุลชีพของสารสกัดส่วนย่อยที่แยกให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC และคอลัมน์สำเร็จรูป

การคัดเลือกสารสกัดส่วนย่อยที่คาดว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ซึ่งได้จากการแยกด้วยเครื่อง HPLC และโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์สำเร็จรูปไปศึกษาโครงสร้างทางเคมี จะคัดเลือกจากคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพ และพิจารณาจากการแยกของสารจากโครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่อง HPLC โดยนำสารสกัดส่วนย่อยที่ได้จากการแยกสาร NEO_COMBINE_1, NEO_COMBINE_2 และ NEO_COMBINE_3 มาทดสอบการยับยั้งจุลชีพ *B. subtilis*, *B. cereus*, *V. cholerae*, *A. niger*, *C. albicans* และ *T. mentagrophytes* ซึ่งเป็นกลุ่มของจุลชีพที่ถูกยับยั้งได้ โดยสารสกัดส่วนย่อยจากการแยกโดยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 9 โดยมีผลการศึกษาที่สำคัญดังนี้

สารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_1_C สามารถยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ *A. niger* และ *T. mentagrophytes* ได้ดี โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20.2 และ 18.0



ภาพที่ 23 โครมาโตแกรมของสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_2_C

มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้ง *B. subtilis*, *V. cholerae* ได้ สารดังกล่าวมีสีเหลือง ซึ่งได้มาจากการแยกสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_1 โดยมีเวลาที่ 9.866 นาที (ภาพที่ 21) จึงทำการแยกสารดังกล่าวให้มีปริมาณมากเพื่อนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมี และตั้งรหัสสาร NEO_COMBINE_1_C ใหม่ว่า NEO_PURE_1

สารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_2_C สามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ ได้แก่ *B. subtilis* และ *V. cholerae* สารดังกล่าวมีสีแดง ซึ่งได้มาจากการแยกสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_2 ด้วยคอลัมน์สำเร็จรูป เพื่อตรวจสอบว่าสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_2_C มีสารอื่นเจือปนหรือไม่ จึงนำมาแยกด้วยเครื่อง HPLC ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในภาพที่ 23 พบว่าปรากฏฟิสิกของสารดังกล่าวเพียงสารเดียว ที่เวลา 7.0 นาที จึงตั้งรหัสสาร NEO_COMBINE_2_D ใหม่ว่า NEO_PURE_2

สารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_3_B สามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ ได้แก่ *B. subtilis* และ *V. cholerae* สารดังกล่าวมีสีส้ม ซึ่งได้จากการแยกสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_3 และจากโครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC สารดังกล่าวปรากฏฟิสิกที่เวลา 5.763 นาที (ภาพที่ 22) จึงทำการแยกสารดังกล่าวให้มีปริมาณมากเพื่อนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมี และตั้งรหัสสาร NEO_COMBINE_3_B ใหม่ว่า NEO_PURE_3 นอกจากนี้จากการแยกสาร NEO_COMBINE_3 ยังพบว่าสารสกัดส่วนย่อย NEO_COMBINE_3_C สามารถยับยั้งจุลชีพ *B. subtilis* และ *V. cholerae* ได้ โดยเป็นสารสีแดง ซึ่งมีฟิสิกปรากฏที่เวลา

7.109 ซึ่งจากลักษณะที่กล่าวมาทั้งหมด จึงคาดว่าสาร NEO_COMBINE_3_C น่าจะเป็นสารเดียวกับ NEO_PURE_2 จึงไม่ได้นำ NEO_COMBINE_3_C ไปศึกษาโครงสร้าง นอกจากนี้ยังมีสารสกัดส่วนย่อย อื่น ๆ แม้สามารถยับยั้งจุลชีพได้ แต่เนื่องจากลักษณะโครมาโตแกรมที่ปรากฏฟิสิกที่มีอำนาจการแยกต่ำ และฟิสิกมีขนาดเล็ก ซึ่งอาจได้สารไม่เพียงพอในการนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมี ดังนั้นจึงไม่ได้นำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมี

ตารางที่ 9 การยับยั้งจุลชีพของสารสกัดย่อยที่แยกด้วยเครื่อง HPLC และทดสอบสำเร็จรูป

สารสกัดส่วนย่อย	จุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์					
	BC	BS	VC	AN	CA	TM
NEO_COMBINE_1_A	-	-	-	-	-	-
NEO_COMBINE_1_B	-	+	-	-	-	-
NEO_COMBINE_1_C	-	++	+++	+++	-	+++
NEO_COMBINE_1_D	-	-	-	-	-	-
NEO_COMBINE_2_A	-	-	-	-	-	-
NEO_COMBINE_2_B	-	-	-	-	-	-
NEO_COMBINE_2_C	-	++	+	-	-	-
NEO_COMBINE_2_D	-	+	-	+	-	+
NEO_COMBINE_2_E	+	-	-	-	+	-
NEO_COMBINE_3_A	-	-	-	-	-	-
NEO_COMBINE_3_B	-	++	+++	-	-	-
NEO_COMBINE_3_C	-	+	+	-	-	-
NEO_COMBINE_3_D	-	+	-	+	-	+
NEO_COMBINE_3_E	-	-	-	-	-	-
NEO_COMBINE_3_F	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ BC = *B. cereus*, BS = *B. subtilis*, VC = *V. cholerae*, AN = *A. niger*, CA = *C. albicans*,

TM = *T. mentagrophytes*,

บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) : +++ = > 12.01, ++ = 09.01-12.00, + = 6.01-09.00,

- = ไม่ยับยั้ง

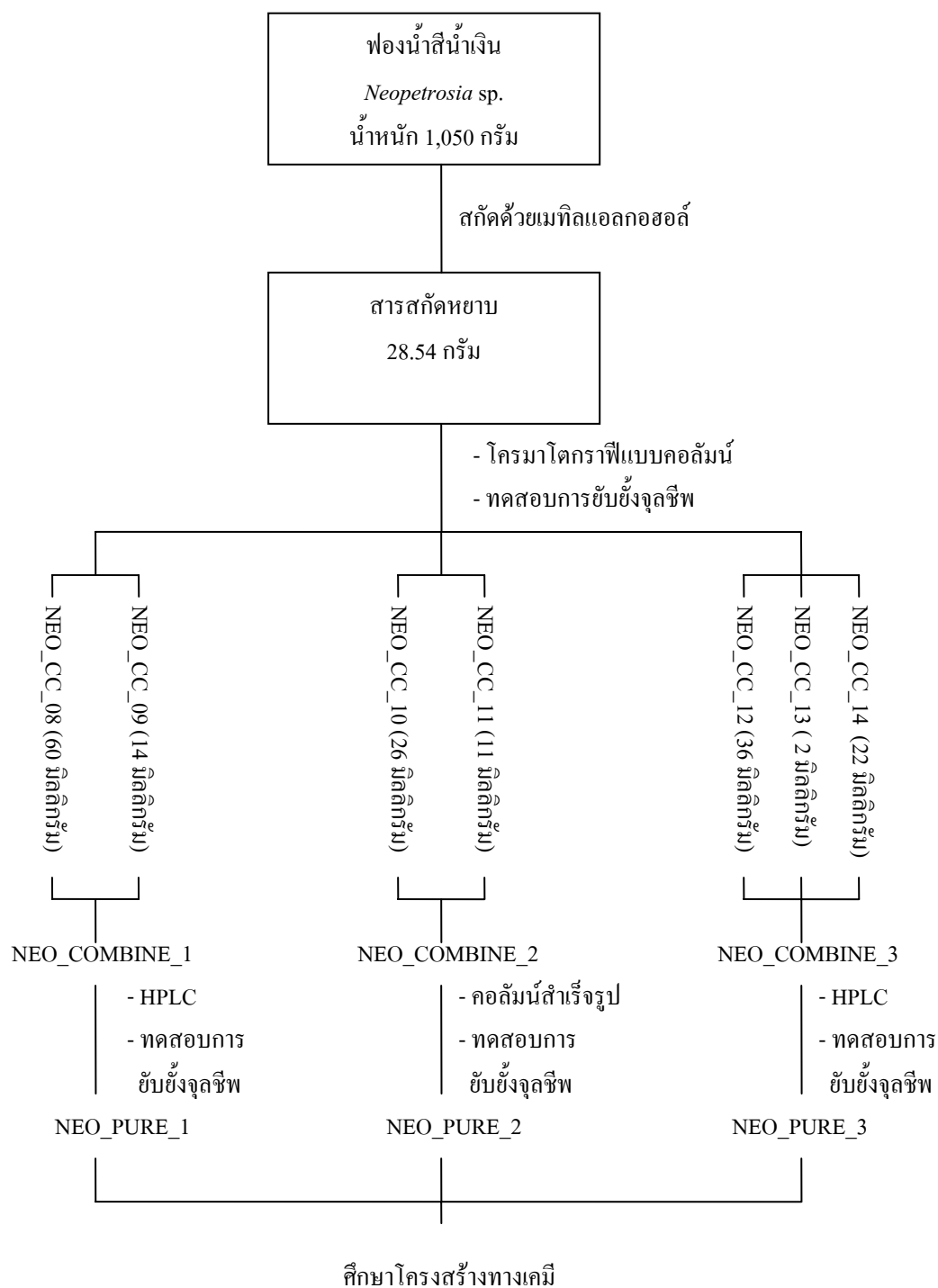
เมื่อแยกสารสกัดส่วนย่อยต่าง ๆ จนได้สารที่คาดว่าบริสุทธิ์ 3 สาร ได้แก่ NEO_PURE_1, NEO_PURE_2 และ NEO_PURE_3 ขึ้นต่อไปจะศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ โดยเปรียบเทียบข้อมูลโปรตอน-เอ็นเอ็มอาร์กับเอกสารการศึกษาในอดีต เพื่อหาลักษณะโครงสร้างของสารดังกล่าวต่อไป โดยขั้นตอนการศึกษาการสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ได้สรุปไว้ดังภาพที่ 24

4. การศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์

นำสาร NEO_PURE_1, NEO_PURE_2 และ NEO_PURE_3 ซึ่งเป็นสารที่ปรากฏเป็นพีกเดี่ยวที่ได้จากการแยกด้วยเครื่อง HPLC และคอลัมน์สำเร็จรูป ซึ่งแสดงคุณสมบัติในการยับยั้งจุลชีพ ไปตรวจหาโครงสร้างของโปรตอน-เอ็นเอ็มอาร์ (¹H-NMR) พบว่าสารที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์ มีสารอื่นเจือปนแต่ในปริมาณที่น้อยกว่ามาก ซึ่งพอจะสามารถคาดเดาโครงสร้างหลักของสารดังกล่าวได้ จากการเปรียบเทียบจากเอกสารการศึกษาสารที่แยกได้จากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. และฟองน้ำชนิดใกล้เคียง ซึ่งคาดว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ น่าจะมีองค์ประกอบของสารที่สำคัญที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ กลุ่มไอโซควิโนลีนควิโนน (isoquinoline quinone)

สารกลุ่มไอโซควิโนลีนควิโนน เป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นวงควิโนนเชื่อมติดกับวงไพริดีนที่มีอะตอมของไนโตรเจน 1 อะตอม (ภาพที่ 25.1) โดยสารกลุ่มดังกล่าวมีรายงานการพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย *Streptomyces* sp. (Arai *et al.*, 1979) ฟองน้ำ *Reniera* sp. (Frincke and Faulkner, 1982; Plubrukarn, 1993) หรือแม้กระทั่งทากทะเล *Jorunna funebris* (Fontana *et al.*, 2000) อีกด้วย ซึ่งสารกลุ่มไอโซควิโนลีนควิโนนมีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ คือ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ยับยั้งเนื้องอก และยับยั้งจุลชีพ

จากการศึกษาเอกสารของสารที่มีรายงานการแยกจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. และฟองน้ำชนิดใกล้เคียง พบว่าสารส่วนใหญ่ที่แยกได้จากฟองน้ำชนิดนี้ เป็นสารในกลุ่มไอโซควิโนลีนควิโนน (ตารางที่ 10) ซึ่งจากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ NEO_PURE_1 และ NEO_PURE_3 ด้วยโปรตอน-เอ็นเอ็มอาร์ จึงสันนิษฐานว่าสารบริสุทธิ์ดังกล่าว อาจจะเป็นสารกลุ่มไอโซควิโนลีนควิโนน ซึ่งจะนำโปรตอนสเปกตรัมที่วิเคราะห์ได้ มาทำการเปรียบเทียบกับโครงสร้างหลักของสารกลุ่มไอโซควิโนลีนควิโนน เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีจากความ



ภาพที่ 24 แผนภาพการแยกสารบริสุทธิ์จากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp.

เป็นไปได้ในการจัดเรียงตำแหน่งของอะตอมไฮโดรเจนต่าง ๆ บนคาร์บอนที่เป็นโครงสร้างหลัก โดยมีผลการศึกษาดังนี้

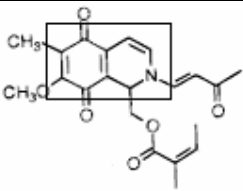
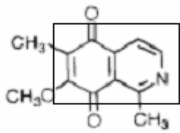
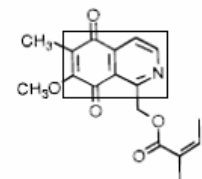
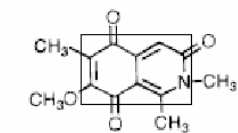
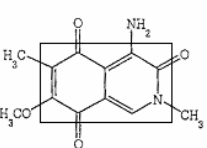
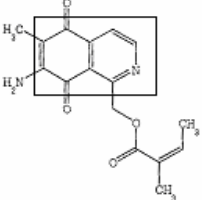
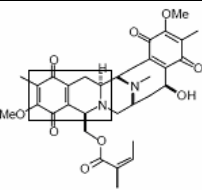
4.1 ลักษณะสเปกตรัมของสาร NEO_PURE_1

จากการวิเคราะห์โปรตอน-เอ็นเอ็มอาร์ของสาร NEO_PURE_1 เปรียบเทียบกับสาร Renierone (ภาพที่ 25.2) และ 1,6-Dimethyl-7-methoxy-5,8-dihydroisoquinoline-5,8-dione (ภาพที่ 25.3) ที่พบในฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. จากประเทศฟิลิปปินส์ (Edrada, *et al.*, 1996) โดยสารทั้ง 2 เป็นสารกลุ่มไอโซควิโนลิโนน จากสเปกตรัมของสาร NEO_PURE_1 (ภาพที่ 26) สามารถคาดเดาโปรตอนสเปกตรัมบางส่วนของสาร NEO_PURE_1 โดยโปรตอนสเปกตรัมที่แสดงสัญญาณของ aromatic part แสดงถึงตำแหน่งของไฮโดรเจนที่ δ 9.03 บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (H-3) และที่ δ 7.97 บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 (H-4) ของวงอะโรมาติกของสารกลุ่มไอโซควิโนลิโนน ส่วนสัญญาณของหมู่ methyl พบที่ δ 2.09 แสดงถึงการพบหมู่ methyl ปรากฏบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ ที่ δ 4.15 แสดงถึงการพบหมู่ methoxy ปรากฏบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 ส่วนโปรตอนสเปกตรัมอื่น ๆ ยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นสัญญาณตำแหน่งใด เนื่องจากโปรตอนสเปกตรัมไม่ตรงกับข้อมูลที่มีอยู่ และมีสัญญาณจากสารปนเปื้อนรบกวน ประกอบกับการศึกษาโครงสร้างทางเคมี อาศัยข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ เพียงอย่างเดียว ดังนั้นถ้าต้องการได้ข้อมูลของโครงสร้างที่ชัดเจนขึ้น จำเป็นจะต้องทำการศึกษาโครงสร้างสารทางเคมีอื่น ๆ เช่น $^{13}\text{C-NMR}$ หรือ 2D-NMR ด้วย แต่จากข้อมูลของโปรตอนสเปกตรัมที่เปรียบเทียบกับสารอื่น ๆ ทำให้พอคาดเดาได้ว่าสาร NEO_PURE_1 น่าจะเป็นสารในกลุ่มไอโซควิโนลิโนน เช่นเดียวกัน

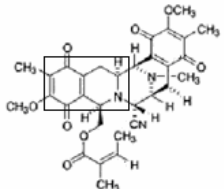
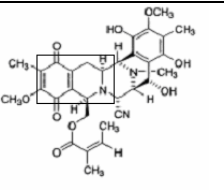
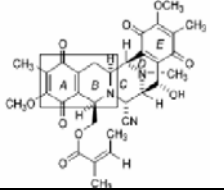
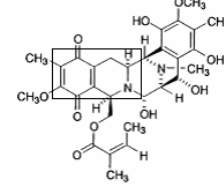
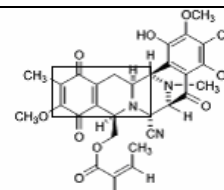
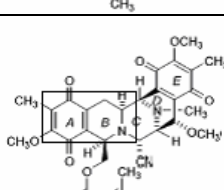
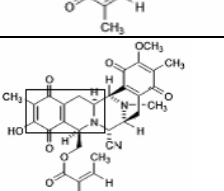
4.2 ลักษณะสเปกตรัมของสาร NEO_PURE_2

จากการวิเคราะห์โปรตอน-เอ็นเอ็มอาร์ของสาร NEO_PURE_2 จากสเปกตรัมที่แสดงในภาพที่ 27 พบว่าสาร NEO_PURE_2 มีการปนเปื้อนจากสารเจือปนอื่น ๆ เป็นจำนวนมาก ทำให้ไม่สามารถพิจารณาแยกโปรตอนสเปกตรัมของสาร NEO_PURE_2 กับสารเจือปนได้ ดังนั้นจึงควรต้องทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC โดยการทดลองหาสภาวะการแยกใหม่ที่เหมาะสมต่อไป

ตารางที่10 สารกลุ่มไอโซควิโนลิโนนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำ *Neopetrosia* sp. และ ฟองน้ำชนิดอื่น ๆ

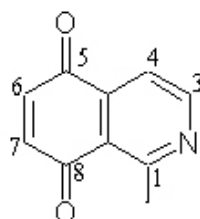
โครงสร้างสาร	ชื่อสาร	การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสารอ้างอิง
	<i>N</i> -ethylene methyl ketone	insecticidal antimicrobial	Edrada <i>et al.</i> , 1996
	1,6-Dimethyl-7-methoxy-5,8-dihydroisoquinoline-5,8-dione	insecticidal antimicrobial	Edrada <i>et al.</i> , 1996
	Renierone	insecticidal antimicrobial	Edrada <i>et al.</i> , 1996
	Mimosamycin	antimicrobial	Edrada <i>et al.</i> , 1996;
	4-Aminomimosamycin	antimicrobial	เพิ่มพูน และ ฉันทนา, 2544
	Cribostatin 3	antimicrobial	เพิ่มพูน และ ฉันทนา, 2544
	Renieramycins A	antileishmanial	Nakao, <i>et al.</i> , 2004

ตารางที่10 (ต่อ)

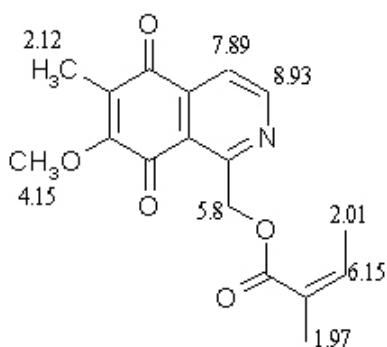
โครงสร้างสาร	ชื่อสาร	การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสารอ้างอิง
	Renieramycins M	cytotoxicity	Suwanborirux, <i>et al.</i> , 2003
	Renieramycins N	cytotoxicity	Suwanborirux, <i>et al.</i> , 2003
	Renieramycins O	cytotoxicity	Amnuoypol, <i>et al.</i> , 2004
	Renieramycins P	cytotoxicity	Oku, <i>et al.</i> , 2003; Suwanborirux, <i>et al.</i> , 2003
	Renieramycins Q	cytotoxicity	Amnuoypol, <i>et al.</i> , 2004
	Renieramycins R	cytotoxicity	Amnuoypol, <i>et al.</i> , 2004
	Renieramycins S	cytotoxicity	Amnuoypol, <i>et al.</i> , 2004

4.3 ลักษณะสเปกตรัมของสาร NEO_PURE_3

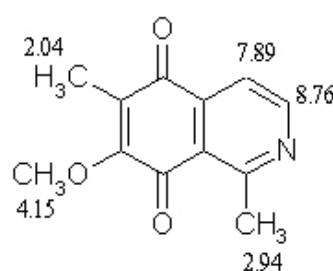
จากการวิเคราะห์โปรตอน-เอ็นเอ็มอาร์ของสาร NEO_PURE_3 สเปกตรัมจากการวิเคราะห์แสดงในภาพที่ 28 เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับรายงานการศึกษาของสารที่พบจากฟองน้ำ *Neopetrosia* sp. และฟองน้ำชนิดใกล้เคียง พบว่าสาร NEO_PURE_3 ซึ่งน่าจะเป็นสารกลุ่มไอโซควิโนลิโนนเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับสาร NEO_PURE_1 เนื่องจากการคาดเดาโปรตอนสเปกตรัมบางส่วนของสาร NEO_PURE_3 ที่แสดงสัญญาณของ aromatic part พบที่ δ 8.95 และ δ 7.92 แสดงถึงตำแหน่งของไฮโดรเจน 1 ตัว บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (H-3) และตำแหน่งที่ 4 (H-4) ของวงอะโรมาติกของสารกลุ่มไอโซควิโนลิโนน สำหรับโปรตอนสเปกตรัมอื่น ๆ ได้แก่ δ 3.41, 2.97, 2.09 และ 1.93 จำเป็นจะต้องมีข้อมูลของการศึกษาโครงสร้างอื่น ๆ มาประกอบ เช่น $^{13}\text{C-NMR}$ 2D-NMR เป็นต้น



25.1



25.2



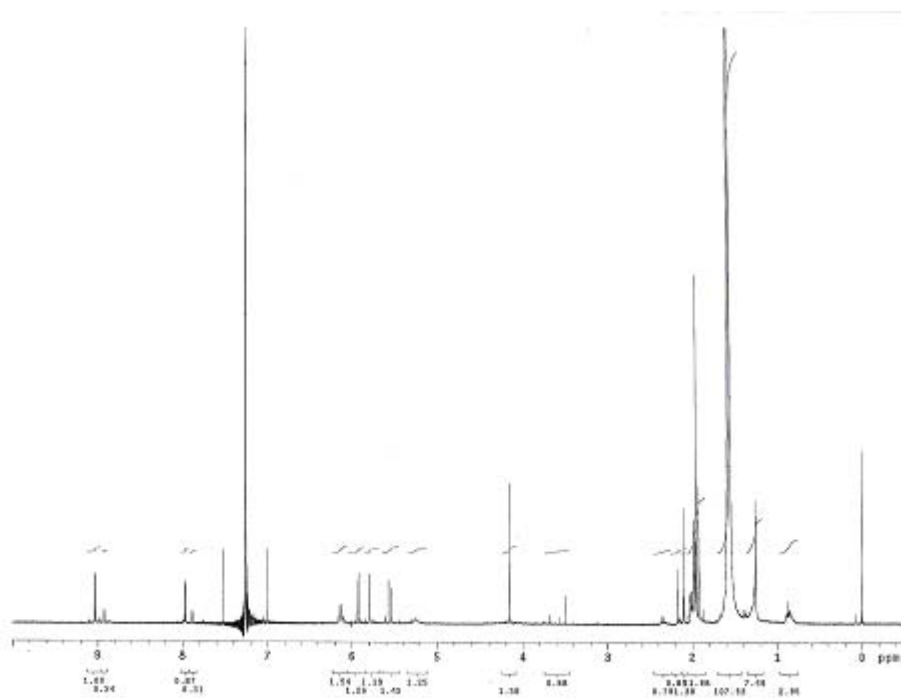
25.3

ภาพที่ 25 โครงสร้างของสารกลุ่มไอโซควิโนลิโนน และข้อมูล $^1\text{H-NMR}$

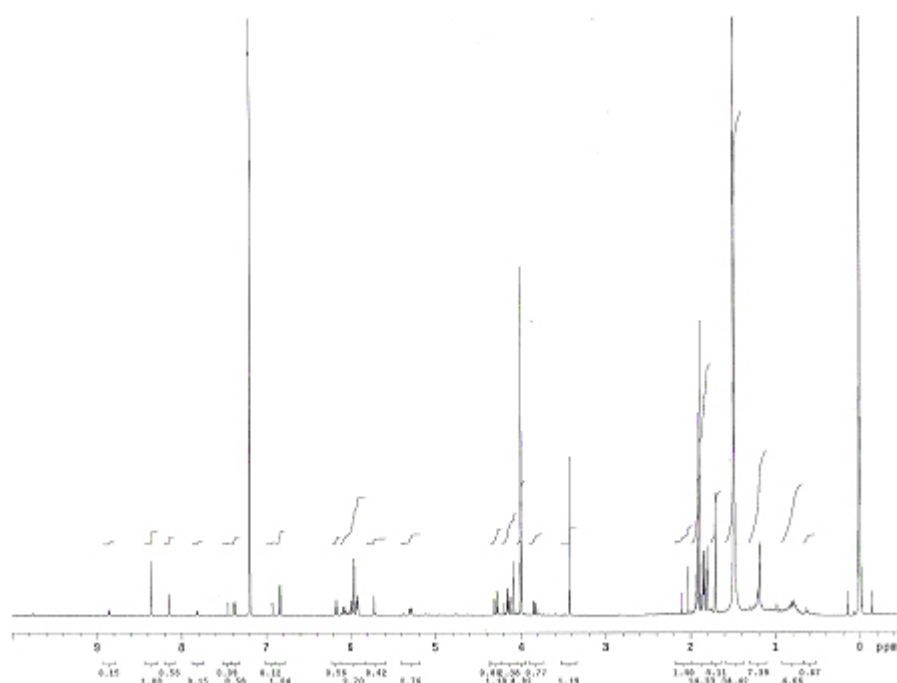
25.1 โครงสร้างหลักของสารไอโซควิโนลิโนน

25.2 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร Renierone

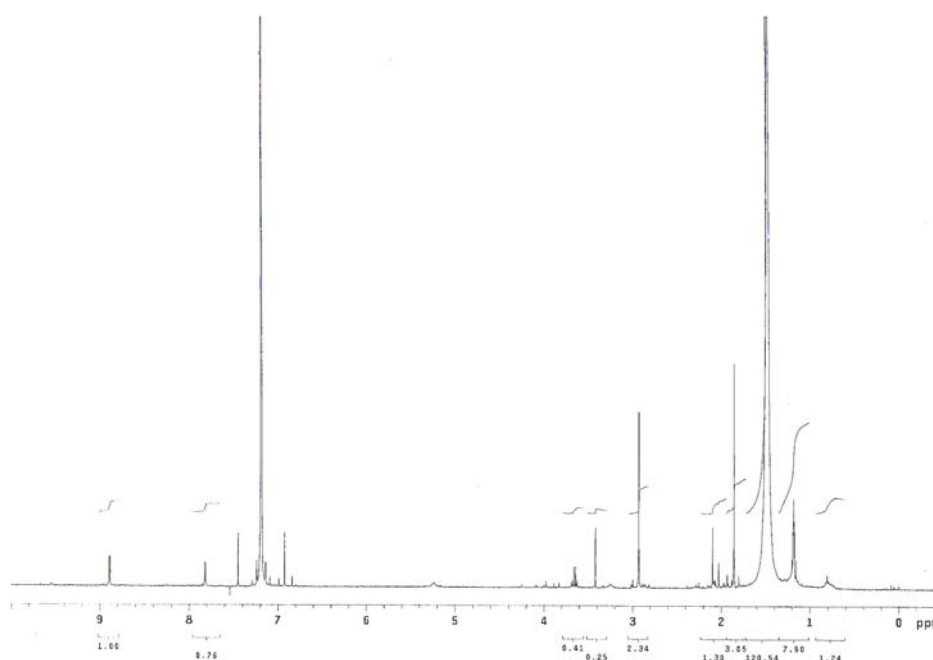
25.3 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 1,6-Dimethyl-7-methoxy-5,8-dihydroisoquinoline-5,8-dione



ภาพที่ 26 สเปกตรัมของ ¹H-NMR ของสาร NEO_PURE_1



ภาพที่ 27 สเปกตรัมของ ¹H-NMR ของสาร NEO_PURE_2



ภาพที่ 28 สเปกตรัมของ ^1H -NMR ของสาร NEO_PURE_3

สารที่ได้จากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. มีโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพที่น่าสนใจ ทั้งนี้จะต้องทำการแยกสาร NEO_PURE_1, NEO_PURE_2 และ NEO_PURE_3 ให้ได้สารบริสุทธิ์ปราศจากสารเจือปน รวมทั้งมีการศึกษาโครงสร้างทางเคมีอื่น ๆ ได้แก่ ^{13}C -NMR, 2D-NMR, MS, UV-VIS, IR และข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีอื่น ๆ เพิ่มเติมจาก ^1H -NMR เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและชัดเจนของโครงสร้างทางเคมีต่อไป

นอกจากนี้สารสกัดส่วนย่อยที่แยกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพได้ในวงกว้าง ได้แก่ NEO_CC_18, NEO_CC_19, NEO_CC_21 และ NEO_CC_22 ซึ่งยังไม่ได้นำมาทำการศึกษาเพื่อแยกบริสุทธิ์ เนื่องจากลักษณะของโครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ที่แสดงให้เห็นว่ามีอำนาจการแยกของพีคต่ำ ประกอบกับพีคมีความสูงเพียงเล็กน้อย ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง คือ สามารถยับยั้งจุลชีพทางการเกษตรกรรมได้ ซึ่งควรจะมีการนำไปศึกษาการแยกสารบริสุทธิ์และพัฒนาไปใช้ประโยชน์ต่อไป แต่จากการศึกษาสารยับยั้งจุลชีพที่ใช้ทดสอบกับจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่ามีการใช้สารสกัดหยาบในการทดสอบ เช่น สลอป และคณะ (2539) ได้คัดเลือกสมุนไพรไทย 16 ชนิดมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย

สกุล *Vibrio* 10 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดจากใบฝรั่ง และมะระจีน สามารถยับยั้งจุลชีพดังกล่าวได้ดีที่สุด คณะผู้วิจัยกลุ่มดังกล่าวยังได้ทดลองนำสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมานำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (SEMBV) ในกึ่งกลางดำ ซึ่งพบว่าสมุนไพรรอบทุกชนิดที่นำมาทดสอบสามารถยับยั้งไวรัสดังกล่าวได้ (สถาพร และคณะ, 2540) จากการศึกษาดังกล่าวทำให้เห็นแนวทางในการนำสารสกัดส่วนย่อย NEO_CC_18, NEO_CC_19, NEO_CC_21 และ NEO_CC_22 ไปทดลองใช้ในการยับยั้งจุลชีพในทางการเกษตรกรรมต่อไป โดยนำไปใช้ในการยับยั้งจุลชีพที่ทำให้เกิดโรคในกึ่งกลางดำ ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการพัฒนานำสารสกัดหยาบจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ไปใช้ประโยชน์ในการแก้ปัญหาที่เกิดจากการกีดกันในการส่งออกกึ่งกลางดำไปประเทศต่าง ๆ เนื่องจากการตกค้างของยาปฏิชีวนะ

5. การศึกษาสารยับยั้งจุลชีพจากแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp.

เนื่องจากในเนื้อเยื่อของฟองน้ำเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่สำคัญของแบคทีเรียแหล่งหนึ่ง และจากการศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำ พบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดที่สร้างสารยับยั้งจุลชีพได้ ทำให้เริ่มมีการสนใจในการศึกษาสารยับยั้งจุลชีพจากแบคทีเรีย ดังนั้นในการศึกษารุ่นนี้ จึงได้ทำการแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. มาศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพ เริ่มจากการเก็บตัวอย่างฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. และทำการแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ จากนั้นนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบการยับยั้งจุลชีพ และศึกษาลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรีย แล้วคัดเลือกแบคทีเรียที่ยับยั้งจุลชีพได้ดีมาศึกษาสาร เพื่อศึกษาการยับยั้งจุลชีพของสารสกัดดังกล่าว ผลการศึกษามีดังต่อไปนี้

5.1 แบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp.

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. และสังเกตจากความแตกต่างของสี ขอบ และขนาดของโคโลนี สามารถแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ทั้งสิ้น 15 isolate นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งจุลชีพ

5.2 การทดสอบการยับยั้งจุลชีพของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp.

แบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 15 isolate เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งจุลชีพกับจุลชีพ 19 ชนิด พบว่ามีแบคทีเรีย 8 isolate คิดเป็นร้อยละ 53.33 ของแบคทีเรียทั้งหมด (ตารางที่ 11) สามารถผลิต

สารยับยั้งจุลชีพได้ โดยมีผลการศึกษที่สำคัญดังนี้

แบคทีเรียกลุ่มที่สามารถยับยั้งจุลชีพได้ในวงกว้าง ได้แก่ แบคทีเรียรหัส NEO_11 เป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งจุลชีพได้ในวงกว้างที่สุด โดยสามารถยับยั้งจุลชีพได้ 6 ชนิด และเป็นแบคทีเรีย isolate เดียว ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *M. gypseum* ได้ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งจุลชีพที่นำมาทดสอบได้ทุกกลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ชนิด *E. faecalis*, *S. aureus* และ *E. coli* จุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งกุลาดำ *V. cholerae* และจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในพืช *X. campestris*

สำหรับแบคทีเรีย NEO_09 เป็นแบคทีเรียอีกชนิดที่ยับยั้งจุลชีพได้ดี สามารถยับยั้งจุลชีพแกรมลบได้มากถึง 4 ชนิด และเป็นแบคทีเรียที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้มากที่สุด โดยสามารถยับยั้ง *E. coli*, *S. Typhimurium*, *X. campestris* และ *V. cholerae* และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ได้อีกด้วย ส่วนแบคทีเรีย NEO_14 เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ได้ และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. faecalis*, *E. coli* และ *V. cholerae* ได้อีกด้วย

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เนื่องจากปกติแล้ว เชื้อราจะทนทานต่อสารยับยั้งจุลชีพได้ดีกว่าจุลชีพกลุ่มอื่น ๆ โดยแบคทีเรีย NEO_11 เป็นแบคทีเรีย isolate เดียว ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *M. gypseum* ได้ ส่วนเชื้อรา *T. mentagrophytes* มีแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำ 2 ชนิด ที่สามารถยับยั้งได้ ได้แก่ NEO_03 และ NEO_10

คุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคทางการเกษตรกรรม เป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจอีกประการ เนื่องจากหากสามารถนำสารยับยั้งจุลชีพจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ ไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในทางเกษตรกรรมได้ จะเป็นอีกแนวทางหนึ่ง ในการช่วยลดการใช้สารปฏิชีวนะที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม โดยแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้ง *V. cholerae* ได้แก่ NEO_02, NEO_09, NEO_11 และ NEO_14 ส่วนแบคทีเรีย NEO_02, NEO_07, NEO_09, NEO_10 และ NEO_11 สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในพืช *X. campestris* ได้ ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียทั้ง 4 ไปทำการสกัดสาร และศึกษาการยับยั้งจุลชีพของสารสกัดต่อไป

ตารางที่ 11 การยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับพองน้ำ

รหัส แบคทีเรีย	แบคทีเรียโรคนมนุษย์								แบคทีเรียโรคพืช			แบคทีเรียโรคกุ้ง				เชื้อราและยีสต์โรคนมนุษย์				รวม
	แกรมบวก				แกรมลบ				แกรมลบ			แกรมลบ								
	BC	BS	EF	SA	EA	EC	ST	VC	XC	RS	ERC	VC	VF	VH	VP	AN	CA	MG	TM	
NEO_01	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
NEO_02	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	3
NEO_03	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
NEO_04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NEO_05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NEO_06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NEO_07	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
NEO_08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NEO_09	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	5
NEO_10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
NEO_11	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	6
NEO_12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NEO_13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
NEO_14	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	4
NEO_15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
รวม	0	1	2	3	0	3	4	0	5	0	0	4	0	0	0	0	0	1	2	25

หมายเหตุ BC = *B3 cereus*, BS = *B3 subtilis*, EF = *E. faecalis*, SA = *S. aureus*, EA = *E. aerogenes*, EC = *E. coli*, ST = *S. Typhimurium*, VC = *V. cholerae*,
XC = *X. campestris*, RS = *R. solanacearum*, ERC = *E. caratovor*, VF = *V. fluvialis*, VH = *V. harveyi*, VF = *V. parahaemolyticus*, AN = *A. niger*,
CA = *C. albicans*, MG = *M. gypseum*, TM = *T. mentagrophytes*, += แสดงการยับยั้ง, -= ไม่ยับยั้ง

จากการศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. พบว่าแบคทีเรียหลาย isolate สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของชุตีวรรณและคณะ (2542) ที่ศึกษาแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำบริเวณเกาะครก จังหวัดชลบุรี หมู่เกาะสิมิลัน หมู่เกาะสุรินทร์ จังหวัดพังงา และหน้าหาดแม่รำพึง จังหวัดระยอง พบแบคทีเรีย 54 isolate จากทั้งหมด 468 isolate คิดเป็นร้อยละ 11.6 สามารถยับยั้งจุลชีพได้ สำหรับการศึกษาของ ฤทธิรงค์และคณะ (2548) ก็พบว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำจากเกาะเสม็ด จังหวัดชลบุรี สามารถยับยั้งจุลชีพได้ 28 isolate จากทั้งหมด 93 isolate คิดเป็นร้อยละ 26.88 และการศึกษาของ Anand *et al.* (2006) ก็พบว่าแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำที่เก็บจากบริเวณชายฝั่ง Tuticorin ประเทศอินเดีย 16 isolate จากทั้งหมด 75 isolate คิดเป็นร้อยละ 21 สามารถยับยั้งจุลชีพได้ จากผลการยับยั้งจุลชีพของแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำบางส่วนที่ได้กล่าวมา ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำสามารถผลิตสารยับยั้งจุลชีพได้ และฟองน้ำไม่เพียงเป็นแหล่งของสารยับยั้งจุลชีพที่น่าสนใจ แต่ยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่สำคัญของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพอีกด้วย

5.3 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ

จากผลการยับยั้งจุลชีพของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ จึงนำแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ การย้อมสีแกรม (gram stain) การย้อมสีเอนโดสปอร์ (endospore) การทดสอบเคลื่อนที่ (motility) และการทดสอบทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส (catalase) ออกซิเดส (oxidase) และการทนต่อความเค็ม (halophilicity test) เพื่อศึกษาลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพ ผลการศึกษามีดังนี้ (ตารางที่ 12)

ลักษณะของแบคทีเรียที่แยกออกมาได้จากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ พบว่าร้อยละ 62.5 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ร้อยละ 75 เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างแบบแท่ง ร้อยละ 25 เป็นแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้ ร้อยละ 62.5 สร้างเอนโดสปอร์และสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ร้อยละ 25 สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลส และทุก isolate สามารถทนต่อความเค็มที่ระดับไซเคียมคลอไรด์ระหว่างร้อยละ 0 - 3 ของปริมาณอาหารที่ใช้ทดสอบได้ โดยมีแบคทีเรียรหัส NEO_01, NEO_03, NEO_07, NEO_11 และ NEO_14 สามารถทนต่อความเค็มได้ในช่วงกว้าง คือ ที่ระดับไซเคียมคลอไรด์ระหว่างร้อยละ 0 - 5 ของปริมาณอาหารที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 12 คุณลักษณะของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำเบื้องต้นที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ

รหัส แบคทีเรีย	คุณลักษณะของแบคทีเรีย						
	แกรม	รูปร่าง	การเคลื่อนที่	การสร้างเอนโดสปอร์	การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	การสร้างเอนไซม์แคตาเลส	การทนต่อความเค็ม (NaCl%)
NEO_01	บวก	กลม	-	-	+	-	0-5
NEO_02	บวก	กลม	-	-	-	+	0-3
NEO_03	ลบ	แท่ง	+	+	+	-	0-5
NEO_07	ลบ	แท่ง	-	+	-	+	0-5
NEO_09	บวก	แท่ง	-	+	-	-	0-8
NEO_10	ลบ	แท่ง	-	+	+	-	0-3
NEO_11	ลบ	แท่ง	-	+	+	-	0-5
NEO_14	ลบ	แท่ง	+	-	+	-	0-5

หมายเหตุ += แสดงคุณสมบัติ, - = ไม่แสดงคุณสมบัติ

และมีแบคทีเรียรหัส NEO_09 เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ทนต่อความเค็มที่ระดับไฮเดียมคลอไรด์ระหว่างร้อยละ 0 - 8 ของปริมาณอาหารที่ใช้ทดสอบได้ จากการศึกษาลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งจุลชีพได้ พบว่าลักษณะที่เหมือนกันของแบคทีเรียส่วนใหญ่ คือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแบบแท่ง ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ ชุติวรรณ และคณะ (2541) และฤทธิรงค์ และคณะ (2548)

5.4 การสกัดสารและการทดสอบการยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ

นำแบคทีเรียรหัส NEO_02, NEO_09, NEO_11 และ NEO_14 มาทำการเตรียมสารสกัด เพื่อนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบกับจุลชีพ 7 ชนิด คือ *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *X. campestris*, *V. cholerae* ที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำทั้ง 4 isolate ซึ่งได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพในข้อ 4.3 มาแล้ว โดยมีผลการยับยั้งจุลชีพดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 การยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ

สารสกัด จาก แบคทีเรีย	แบคทีเรียโรคมมนุษย์					แบคทีเรียโรคพืช	แบคทีเรียโรคกุ้ง	เชื้อรา โรคมมนุษย์
	แกรมบวก		แกรมลบ			แกรมลบ	แกรมลบ	
	BS	EF	SA	EC	ST	XC	VC	MG
NEO_02	-	-	+	-	-	+	+	-
NEO_09	-	-	++	-	+	+	+	-
NEO_11	-	-	+	-	-	-	++	+
NEO_14	+++	+	-	+	-	-	+	-

หมายเหตุ BS = *B. subtilis*, EF = *E. faecalis*, SA = *S. aureus*, EC = *E. coli*,

ST = *S. Typhimurium*, XC = *X. campestris*, VC = *V. cholerae*, MG = *M. gypseum*

บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) : +++ = > 15, ++ = 11.01-15.00, + = 6.01-11.00,

- = ไม่ยับยั้ง

จากคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพ ของสารสกัดจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ สามารถยับยั้งจุลชีพชนิดเดิมที่เคยยับยั้งได้ เมื่อครั้งที่ทำการคัดเลือกด้วยวิธี agar overlay method ยกเว้นบางสารสกัด เช่น สารสกัดรหัส NEO_09 ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ได้ และสารสกัดรหัส NEO_11 ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. faecalis*, *E. coli*, *S. Typhimurium* และ *X. campestris* ได้ อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการสกัด ซึ่งมีการเลือกใช้ตัวทำละลายที่ใช้สกัด คือ เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 60 ซึ่งตัวทำละลายดังกล่าว

อาจไม่สามารถสกัดเอาสารทั้งหมดออกมาจากตะกอนกากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ทำให้คุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพบางส่วนลดลงหรือสูญหายไป

จากการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพ ของสารสกัดแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ ทำให้เห็นว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำมีศักยภาพในการพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งจุลชีพได้ และสิ่งที่ทำให้แบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำเป็นที่สนใจในการศึกษาสารยับยั้งจุลชีพ คือ สามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการที่จะนำไปใช้ในการศึกษาได้ แตกต่างสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่อาศัยในทะเลที่ต้องออกไปเก็บตัวอย่าง เพื่อนำมาสกัดสาร ซึ่งในครั้งอาจประสบปัญหาในการขาดแคลนตัวอย่างที่จะนำมาสกัด เนื่องจากปริมาณของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับฤดูกาล สถานที่ และปัจจัยภายนอกหลายประการที่ไม่สามารถควบคุมได้ ดังนั้นสารยับยั้งจุลชีพจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ จึงเป็นอีกแหล่งที่มีความสำคัญในการนำไปพัฒนาและศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป