

บทคัดย่อ

พื้นผิวโลกมากกว่าร้อยละ 70 ถูกปกคลุมด้วยทะเล ดังนั้นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากจุลินทรีย์ทะเลจึงเป็นแหล่งที่ใหญ่ที่สุด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำในทะเลไทย ซึ่งจะเป็นแหล่งใหม่ของสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย จากการคัดแยกแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำจำนวน 33 ตัวอย่าง ที่เก็บมาจากบริเวณชายฝั่งหมู่เกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี สามารถคัดแยกแบคทีเรียทะเลได้ 197 สายพันธุ์ พบแบคทีเรียอาศัยอยู่ในฟองน้ำแต่ละตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียที่แตกต่างกัน โดยพบจำนวนน้อยที่สุดใน ฟองน้ำครกสีม่วง TAO-E-02, *Xestospongia testudinaria* จำนวน 2.0×10^3 โคโลนีต่อกรัม และมากที่สุดฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง TAO-G-08 *Oceanapia sagittaria* จำนวน 8.66×10^6 โคโลนีต่อกรัม จากการตรวจสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียทะเลจำนวน 197 สายพันธุ์ โดยตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio alginoliticus* และ *Escherichia coli* พบว่ามีแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ 21 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 10.6 ที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบ ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* แต่ไม่มีแบคทีเรียทะเลใดสามารถยับยั้ง *V. alginoliticus* โดยในจำนวนนี้มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ T55 H 1-6, T55 J 2-7, และ T55 J 2-6 ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุดทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และสามารถจำแนกชนิดได้เป็นสกุล *Pseudoalteromonas* spp. และ *Pseudomonas* sp. ตามลำดับ เมื่อนำสายพันธุ์ที่แสดงฤทธิ์ทั้ง 21 สายพันธุ์ มาทำการเพาะเลี้ยงและสกัดสารแยกออกเป็นส่วนของน้ำเลี้ยงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และส่วนของเซลล์สกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอลและคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 2:1) และระเหยแห้งด้วย Rotary Evaporator จนได้สารสกัดหยาบทั้งสองส่วน จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียซ้ำด้วยวิธี Disc Diffusion Agar Assay พบว่าสารสกัดหยาบของแบคทีเรียทะเลนี้มีเพียง 11 สายพันธุ์ที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *V. alginoliticus* แต่มีสารสกัดหยาบของแบคทีเรียทะเล 10 ตัวอย่างสูญเสียความสามารถในการยับยั้ง *E. coli*

Abstract

More than 70% of the Earth's surface cover with the seas, marine derived microbial natural products have been largest and many unique microorganisms, which produce biological active compounds to adapt to particular environmental conditions. For examples, antibiotics are secondary metabolites of biosynthetic pathways in microorganisms. The aim of this study was to screening of antibacterial activity from sponge-associated bacteria. A total of 197 isolates from 33 sponges collected from northern to western coast of Tao Island, Suratthani Province were screened for antibacterial activity using disc diffusion agar assay. The result showed that 21 isolated bacteria (about 10.6%) exhibited antagonistic activity against the test bacteria, gram positive bacteria, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and gram negative bacteria, *Vibrio alginolyticus* and/or *Escherichia coli*. Among them, 3 isolates, T55 H 1-6, T55 J 2-7, and T55 J 2-6 showed high antibacterial activity against to all test gram positive- and gram negative bacteria. These isolates were identified as *Pseudoalteromonas* spp. and *Pseudomonas* sp. respectively. In further study, culture supernatant and cell pellets were extracted with ethyl acetate and mix solvents of methanol and chloroform (ratio 2:1) then both extracted fractions were evaporated by Rotary vacuum evaporator. Only ethyl acetate extracts indicated the high potential antibacterial activity from confirmed assay against test bacteria, *B. subtilis*, *S. aureus* and *V. alginolyticus*. The results obtained in this study suggest that sponge-associated bacteria may be an interesting source for discovery of antibacterial agents.

การศึกษาบทบาทศักยภาพของจุลินชีพ /แบคทีเรียทะเลที่สำคัญต่อระบบเวสน์ในทะเล ในการผลิตสารเมตาบอไลต์ ได้กลายเป็นหัวข้อการวิจัยใหม่ที่สำคัญในปัจจุบัน(Faulkner, 2000) มีการค้นคว้าวิจัยหลาย ๆ โครงการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารประกอบเคมีที่น่าสนใจเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ (Barsby et al., 2001; Chelossi et al., 2004.; Hardt et al., 2000) โดยส่วนใหญ่ความสนใจจะมุ่งเน้นที่การวิจัยจุลินทรีย์ทั้งจากตะกอนดินบริเวณชายฝั่งและทะเลลึก แบคทีเรียทะเลสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและ/หรือสารยับยั้งการเกาะของเฟรียง antifouling(Holmstrom and Kjelleberg, 1999; De Rosa et al., 2000; Egan et al., 2000; Dechsakulwaatana et al, 2002) ซึ่ง Wilkinson (1978) ทั้งสารเคมีและ/หรือทางกายภาพภายในฟองน้ำที่เกี่ยวข้องกับมวลชีวภาพของจุลินทรีย์มากถึง 40 % (Vacelet, 1975; Wilkinson, 1978 a;b; Berthold, et al., 1982)

จากการที่จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน บางพวกอยู่อย่างเสริมกัน(Benevolent interaction) ขณะที่ บางพวกอาจอยู่อย่างต่อต้านกัน(Antagonistic interaction) ส่วนอีกหลายๆ พวกอยู่อย่างอิสระไม่เกี่ยวข้องกัน การที่จุลินทรีย์บางอย่างสามารถสร้างสารที่ต้านการเจริญของจุลินทรีย์พวกอื่นๆ ได้ จะใช้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการแตกของเซลล์ที่ตายแล้วสำหรับใช้ในการรอดชีวิต (Gauthier and Flatau 1976)

ปัญหาสำคัญของนักเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลที่ไม่อาจปฏิบัติได้ก็คือปริมาณของเมตาบอไลต์จากสัตว์ทะเลเช่น ฟองน้ำ ที่จะตอบสนองต่อการพัฒนาทางเภสัชกรรม การเก็บเกี่ยวจากธรรมชาติ ดูเหมือนจะสวนทางกับการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพในโลกปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงฟองน้ำยังคงประสบความสำเร็จน้อย ในขณะที่ความพยายามที่จะแสวงหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัช ซึ่งสามารถทดแทนแหล่งใหม่ได้ และสามารถรักษาประชากรของฟองน้ำในธรรมชาติไว้ได้ อีกทั้งในอนาคตความก้าวหน้าทาง พันธุวิศวกรรมของ นาโนเทคโนโลยีชีวภาพ (Nanobiotechnology) จะสามารถช่วยให้ทราบถึง DNA ที่เป็นตัวรหัสสำคัญในการสังเคราะห์ทางชีวภาพสามารถนำส่วนของยีนนั้นถ่ายสู่ DNA ของ *Escherichia coli* หรือแบคทีเรียอื่นๆ ได้ และสร้างแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาและค้นหากลไกของจุลินทรีย์ในการสร้าง สารออกฤทธิ์ชีวภาพของฟองน้ำ และนำไปสู่การโคลนนิ่ง DNA ต่อไป (Faulkner, et al.,2000)

ต่อมา Stierle และ คณะ(1988) ได้ทำการทดสอบพิสูจน์ให้เห็นว่าสารประกอบเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลนั้น ในความเป็นจริงนั้นสารประกอบเหล่านั้นผลิตขึ้นมาโดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์นั้นๆ ซึ่งสามารถแยกสาร diketopiperazines (DKP's) โครงสร้างที่ 1-3 จากแบคทีเรียกรัมบวก รูปกลม *Micrococcus* sp. ที่คัดแยกจากฟองน้ำ *Tedania ignis* เช่นกัน ซึ่งต่อมา Bultel-Ponce และคณะ (1998) ได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของแบคทีเรียสกุลเดียวกัน แต่ต่างชนิด *Micrococcus luteus* ซึ่งคัดแยกได้จากฟองน้ำต่างชนิด *Xestospongia* sp. สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์

เช่นเดียวกับสารสังเคราะห์ที่เป็นที่รู้จักกันก่อนหน้านี้ 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenylether และยังพบสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่เป็นสารสำคัญที่ผลิตได้คือ acyl-1-(acyl-6'-mannobiosyl)-3-glycerol

มนุษย์สามารถที่จะนำปรากฏการณ์นี้มาใช้ประโยชน์ สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นในช่วงที่เริ่มหยุดการเจริญจะมีประโยชน์ เพราะยับยั้งการสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่บางชนิดในเซลล์ได้ จึงช่วยรักษาพลังงานส่วนหนึ่งไว้ นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์อื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นนี้จะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดลงได้ ประโยชน์ของยาปฏิชีวนะที่ดัดแปลงมาจากสารเมตาบอไลต์ที่จุลินทรีย์บางชนิดผลิตขึ้นนั้น จะมีอาการแพ้ยาหรือเป็นอันตรายต่อมนุษย์น้อยมาก สารเมตาบอไลต์เหล่านี้มีประโยชน์ในด้านต่างๆมากมายทั้งด้านอุปโภค บริโภค และอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการแพทย์อาจใช้รักษาโรคติดเชื้อ หรือรักษาโรคอื่น เช่น เพื่อรักษาโรคกระดูก หรือใช้ในงานวิจัยเพราะมีพิษสูงเกินกว่าที่จะใช้ในร่างกาย (มาลิน, 2540) ในการผลิตยาปฏิชีวนะที่จะนำมาใช้ได้นั้น จำเป็นต้องมีคุณสมบัติหลายประการ เช่น ไม่ควรมีพิษ ไม่ตกตะกอนโปรตีนในซีรัม ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัว ไม่ควรมีฤทธิ์ข้างเคียงหรือมีน้อยที่สุด ในปัจจุบันยังไม่มียาปฏิชีวนะใดที่มีคุณสมบัติดีทุกด้าน ทำให้งานการค้นคว้าดยาใหม่ๆ ยังมีความจำเป็น อย่างไรก็ตามการผลิตยาปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์มีข้อดี คือ 1. สามารถปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้ 2. สามารถปรับปรุงสภาพแวดล้อมในการเจริญของจุลินทรีย์ 3. สามารถปรับปรุงและควบคุมสถานะในการผลิตสารของ จุลินทรีย์ เป็นต้น (มาลิน, 2540)

จากการค้นคว้าจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาบทบาทของแบคทีเรียที่ผลิตสารปฏิชีวนะที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีการควบคุมหลังในทะเล และคุณสมบัติของการแพทย์ของสารที่ต่อต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดย แบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำตลอดจนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่อาศัยอยู่ในทะเลเพื่อใช้ในการพัฒนาปรับปรุงป็นยาต้านโรคในชั้นสูงต่อไป

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยมากทั้งที่ประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรทางทะเลที่อุดมสมบูรณ์และนักวิจัยชาวต่างชาติพยายามที่จะเข้ามาทำการศึกษาวิจัยในรูปแบบต่างๆ ถึงแม้ว่าจะเริ่มมีหน่วยงานอื่นที่ศึกษาในเรื่องนี้อยู่บ้างแต่จากผลการศึกษาเบื้องต้นของ Kijjoa et al. (2002, 2007) และชุตีวรรณและคณะ(2541)พบว่าฟองน้ำชนิดเดียวกันที่เก็บในประเทศไทยสถานที่เดียวกันแต่แตกต่างกันช่วงเวลา จะให้สารประกอบและแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรที่จะสนับสนุนการศึกษาวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลให้มากยิ่งขึ้น และช่วยกันศึกษาวิจัยหลายๆหน่วยงานเพื่อเสริมสร้างความเข้มแข็งศักยภาพในการแข่งขันของประเทศและส่งเสริมให้ประเทศไทยได้พึ่งพาตนเองในด้านอุตสาหกรรมยาและผลิตภัณฑ์เคมีได้มากขึ้นและเร็วขึ้นทันต่อการพัฒนาประเทศในอนาคตอันใกล้

- 1 เพื่อคัดแยกและตรวจสอบหาสารสกัดยับยั้งจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ (antimicrobial activity)
- 2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive metabolites) สารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำบางชนิดที่พบบริเวณชายฝั่งทะเล
- 3 เพื่อศึกษาสารประกอบของแบคทีเรียในฟองน้ำที่แสดงผลในการยับยั้ง เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสังเคราะห์ หรือสารตั้งต้นด้วยใหม่
- 4 เพื่อศึกษาถึงความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ
- 5 เพื่อถ่ายทอดความรู้ในการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล

ขอบเขตของโครงการวิจัย

- จากการดำเนินการวิจัยระยะที่ 1 ที่ผ่านมา พบถึงศักยภาพการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ ของทะเลไทย งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการวิจัยเพื่อตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดยับยั้งโดยอาศัยกระบวนการทางเคมีและชีวเคมี ในแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ ในด้านต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer) นอกจากนี้ยังพัฒนาในด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ คือ กรดไขมัน ชีวรงควัตถุ และเอนไซม์ โดยในระยะที่ 2 นี้จะมุ่งเน้นการเก็บตัวอย่างฟองน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนล่าง ครอบคลุมพื้นที่บริเวณชายฝั่งทะเล บริเวณจังหวัดชุมพร และ เกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี ดำเนินการเก็บตัวอย่างฟองน้ำ ประมาณ 60 - 100 ตัวอย่าง ในปีที 1-3

- จำนวนของเชื้อแบคทีเรียคาดว่าจะคัดแยกได้ประมาณ 300 – 600 สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในโครงการวิจัย
- ดำเนินการตรวจสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพ ปีที 1-3
- ร่วมมือวิจัยและพัฒนาสารด้วยที่น่าสนใจกับเครือข่ายวิจัยของศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านนวัตกรรมทางเคมี
- สร้างนักวิจัยใหม่ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะผ่านผู้ช่วยวิจัย การฝึกงานวิจัยแก่นิสิต นักศึกษา และการทำปัญหาพิเศษและวิทยานิพนธ์
- ถ่ายทอดองค์ความรู้แก่ หน่วยงานภาครัฐและภาคเอกชนที่สนใจผ่านสัมมนาวิชาการการหรือฝึกอบรม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร ฯลฯ และหน่วยงานที่น่าผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ให้ทราบถึงสายพันธุ์แบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ(bioactive metabolites) และสารประกอบทางเคมีนั้น ที่สามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์สารใหม่ที่สกัดจากแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลที่พบในประเทศไทย ซึ่งจะยังประโยชน์ต่อการแพทย์ ด้านวิทยาศาสตร์ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและอื่นๆ

2. ทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานของฤทธิ์ทางชีวภาพ(bioactive metabolites) และเภสัชวิทยา จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในฟองน้ำในประเทศไทย ซึ่งเป็นแนวทางนำไปสู่การพัฒนาด้านเภสัชกรรม ต่อไป
3. ได้ข้อมูลของปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถของแบคทีเรียและสารสกัดกลุ่มต่างๆในการต้านจุลินทรีย์
4. ทำให้มีข้อมูลและสามารถถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีอยู่ในท้องถิ่นแก่นักเรียน นิสิตนักศึกษา อาจารย์ นักวิจัยและเกษตรกรผู้สนใจ
5. ได้ข้อมูลหรือขั้นตอนการวิจัยสำหรับนำไปใช้ในการสอนวิชาเคมี ชีวเคมี จุลชีววิทยา เภสัชวิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ ระดับอุดมศึกษา
6. ได้แนวทางสารตั้งต้นสารปฏิชีวนะ ข้อมูลหรือขั้นตอนการวิจัยสำหรับนำไปใช้ในการวิจัยต่อยอดในระดับสูงขึ้นและพัฒนาไปสู่การนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การค้นหาวายาใหม่ได้เกิดการแข่งขันสูงมาก โดยเฉพาะทั้งยาต่อต้านไวรัส และต่อต้านมะเร็ง เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งฤทธิ์จะถูกเลือกเฉพาะที่ไม่ทำอันตรายสิ่งมีชีวิต นั่นด้วย วายาใหม่บางตัวเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เป้าหมายในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา คือ สิ่งมีชีวิตจากทะเล อาทิ เช่น ฟองน้ำ กัลปังหา ปะการัง นับแต่นั้นมานักวิจัยทางเคมี และเภสัชกรรมของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้หันมาให้ความสนใจต่อฟองน้ำ

ในปี 1995 การค้นพบของเวชภัณฑ์ใหม่ ๆ เช่นยาปฏิชีวนะมาจากแหล่งข้อมูลทางพันธุกรรมของที่ดินที่ใช้เป็นจุดเริ่มต้นให้ลดน้อยลง นักวิทยาศาสตร์จำเป็นต้องเป็นแหล่งใหม่เพื่อค้นหาสารพันธุกรรม Aphios, บริษัทด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีขนาดเล็กมีการวางแผนที่จะเป็นระบบเก็บรวบรวมและประเมินตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์จากความหลากหลายของแหล่งที่มาของทะเลมหาสมุทรในสถานที่ที่แตกต่างกันและระดับความลึก (เช่นตะกอนน้ำลึก, โกงกางดินและบ่อเกลือ) และการพัฒนา แพลตฟอร์มเทคโนโลยีสำหรับการเพาะเลี้ยง, fractionating และคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในทะเลเพื่อที่จะพัฒนาห้องสมุดของการรักษาที่มีศักยภาพ Aphios นำมาใช้สำหรับการระดมทุนจากสาขาวิชาเทคโนโลยีขั้นสูง (ATP) ในปี 1995; ข้อเสนอของพวกเขาหลายผู้รับเหมาได้รับการยอมรับจากผู้เชี่ยวชาญเช่น Bristol - Myers Squibb, Kelco ส่วนหนึ่งของมอนซานโต, CalBioMarine Technologies, ฮาร์เบอร์สาขาสถาบัน Oceanographic, Massachusetts Institute of Technology, เซลล์หนึ่ง ระบบและ Scripps Institution of Oceanography เป็นโครงการที่มีความเสี่ยงและนวัตกรรมที่สูงเนื่องจากการเก็บรักษาห้องสมุดที่ครอบคลุมของจุลินทรีย์ในทะเลชีวิตสำหรับการวิจัยในอนาคตที่เกิดความท้าทายที่สำคัญ นอกจากนี้ยังมีเทคนิคที่แข็งแกร่งไม่ได้พร้อมสำหรับการได้อย่างมีประสิทธิภาพจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในทะเลน้ำทะเลเช่นสื่อการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ไม่เคยได้ทำในเชิงการค้าและสิ่งอำนวยความสะดวกเพียงเล็กน้อยหรือไม่อยู่ในการผลิตยาใหม่ ๆ จากการมีชีวิตในทะเล

เนื่องจากฟองน้ำได้กลายมาเป็นแหล่งที่ยิ่งใหญ่ของการค้นพบผลิตภัณฑ์เมตาบอไลต์ อาทิ เช่น การยับยั้งจุลินทรีย์ (Amade *et al.*, 1987 ; Amade *et al.*, 1982 ; Nair & Simidu, 1987 ; McCaffery & Endean, 1985 ; Ravi *et al.* 1974 ; Thompson *et al.*, 1985), สารต่อต้านมะเร็ง (Weinheimer & Karns, 1974), สารอัลคาลอยด์ต่อต้านลูติเมีย prianosin A (Kobayashi *et al.*, 1987), สารเปปไทด์ใหม่ : keramamide B-D (Kobayashi *et al.*, 1991) สารไซโครโซล-เปปไทด์ใหม่ : keramamide-F (Itagaki *et al.*, 1992) สารไซโตทอกซิก-เซสลิเทอร์พินอยด์ : metachromines D-H (Kobayashi *et al.*, 1992) สารโพลีแซคคาไรด์ใหม่ : theonezolid A (Kobayashi *et al.*, 1993)

วนิดา เลาะศิริ และคณะ (1994) ได้ศึกษาพบว่า 40% ของฟองน้ำ 73 ตัวอย่างจากประเทศไทย แสดงผลการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของไข่ม้วนทะเลที่ผสมแล้ว ผลการศึกษาการต่อต้านทั้งเชื้อรา และแบคทีเรียที่พบว่าฟองน้ำหลายชนิดมีประสิทธิภาพดังกล่าว

นอกจากนี้แอคทีฟเมตาบอไลต์หลายชนิด สามารถแยกได้จากฟองน้ำเช่นกัน อาทิเช่น สารไซโตทอกซิก : kabiramide B และ C, สารปฏิชีวนะแซสเทอร์พินอยด์ : 6 z Neomanoalide, สารปฏิชีวนะดิเทอร์พินอยด์ : Kalihinol X, สารเซลิเทอพินนอยด์คินอน

จากการศึกษาของ Nair และ Simidu (1987) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเล ตะกอน แผลงก์ตอนพืช และแผลงก์ตอนสัตว์ ที่เก็บจากอ่าว Suruga, Sagami และ Tokyo ประเทศญี่ปุ่น รวมทั้งปะการังอ่อนและฟองน้ำที่เก็บจากชายฝั่งประเทศไต้หวัน จำนวนรวมทั้งสิ้น 726 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ 37 สายพันธุ์ แสดงผลการยับยั้งแบคทีเรียอื่น *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC17802) หรือ *Staphylococcus aureus* (P 209) เมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา Shigemori และคณะ (1992) ได้อธิบายถึงยุทธศาสตร์ที่สร้างการค้นพบสาร Tetracyclic Alkaloid, Alteramide A จากแบคทีเรีย *Alteromonas* sp. ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ (*Halichondria okadai*) จากนั้นในปี ค.ศ. 1992 Imamura และคณะ (1993) ค้นพบสารปฏิชีวนะที่ชื่อว่า urauchimycins A,B จาก *Streptomyces* sp. ซึ่งแยกได้จากฟองน้ำ

ในปี ค.ศ. 1992 Shigemori และคณะ ได้อธิบายถึงยุทธศาสตร์ที่สร้างการค้นพบสาร Tetracyclic Alkaloid, Alteramide A จากแบคทีเรีย *Alteromonas* sp. ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ (*Halichondria okadai*) จากนั้นในปี ค.ศ. 1993 Imamura และคณะ ค้นพบสารปฏิชีวนะที่ชื่อว่า urauchimycins A, B จาก *Streptomyces* sp. ซึ่งแยกได้จากฟองน้ำเช่นกัน

นอกจากนี้มียารงานการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

จากการศึกษาของชุดิวรรณและคณะ(2541) ที่เก็บตัวอย่างฟองน้ำได้ 68 ชนิด จากบริเวณทั้ง 4 แห่ง คือ เกาะครก จ. ชลบุรี, หมู่เกาะสิมิลัน, หมู่เกาะสุรินทร์ จ. พังงา และหน้าหาดแม่รำพึง จังหวัดระยอง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกันในฟองน้ำ แต่ละชนิดได้รวม 468 สายพันธุ์ แบคทีเรียที่ได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียแกรมบวก ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อทำการตรวจสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vibrio anguillarum* ORI และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 พบเชื้อที่มีความสามารถในการต่อต้านเชื้อ ดังกล่าว 20 สายพันธุ์ คิดเป็น 4.3% แต่ไม่พบว่ามีแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ใดแสดงฤทธิ์ในการต่อต้านฟังไจ *Candida albicans* และ *Penicillium crysogenum* เมื่อทำการมาสกัดสารอย่างหยาบทั้งจากส่วนของเซลล์ และส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความสามารถละลายได้ในชั้นของ ethyl acetate และละลายได้ชั้นของน้ำ พบว่าส่วนของสารสกัดของเซลล์ในชั้นของน้ำ และสารสกัดของส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อในชั้น ethyl acetate ของเชื้อสายพันธุ์ IMS 7-1, IMS 11-2, แสดงฤทธิ์ในการในการต่อต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดี ส่วนสายพันธุ์ IMS 24-1, IMS 25-2, และ IMS 34-1 มีฤทธิ์ในการต่อต้าน *B. subtilis* ATCC 6633 และ *V. anguillarum* ได้ดี ซึ่งเมื่อนำสารสกัดของสายพันธุ์ IMS 24-1, IMS 25-2, และ IMS 34-1 มาทำการแยกแฟรคชันด้วย Silica Column Chromatography หรือ Thin Layer Chromatography และ HPLC จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

และ NMR Spectrometer (Varian 200 หรือ 500 MHz พบว่าสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพคือ **Cyclo- tyr- Val, Pentabromopseudiline** และ **Isatin** ตามลำดับ

ฤทธิ์ และคณะ (2548) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์จากฟองน้ำที่เก็บจากหมู่เกาะ แสมสาร จังหวัดชลบุรี ได้แบคทีเรีย 93 ไอโซเลตจากฟองน้ำ 10 ชนิด ผลการศึกษาที่น่าสนใจคือ แบคทีเรียที่คัด แยกจากฟองน้ำ 2 ชนิด *Clathria* sp. และ *Hymenaphia* sp โดยเฉพาะ *Clathria* sp. พบมีแบคทีเรียจำนวน 8 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 10 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* ได้ดี อีกทั้งยังพบแบคทีเรียที่มี ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans*

จากการวิจัยเพื่อพิสูจน์หาแหล่งที่มาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย Stierle และ คณะ (1988) แสดงให้เห็นว่าสารประกอบเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลนั้น ในความเป็นจริงนั้น สารประกอบเหล่านั้นผลิตขึ้นมาโดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์นั้นๆ ซึ่งสามารถแยกสาร diketopiperazines (DKP's) โครงสร้างที่ 1-3 จากแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม *Micrococcus* sp. ที่คัดแยกจากฟองน้ำ *Tedania ignis* เช่นกัน ซึ่งต่อมา Bultel-Ponce และคณะ (1998) ได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของแบคทีเรียสกุล เดียวกัน แต่ต่างชนิด *Micrococcus luteus* ซึ่งคัดแยกได้จากฟองน้ำต่างชนิด *Xestospongia* sp. สามารถสร้างสาร ยับยั้งจุลินทรีย์เช่นเดียวกับสารสังเคราะห์ที่เป็นที่รู้จักกันก่อนหน้านี้ 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenylether และยังพบสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่เป็นสารสำคัญที่ผลิตได้คือ acyl-1-(acyl-6'-mannobiosyl)-3-glycerol หรือ แม้แต่แบคทีเรียต่างกลุ่มคือแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำก็แสดงถึงศักยภาพในการสร้างออก ฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่นๆ เช่นกัน จากผลการวิจัยของ Bultel-Ponce และคณะ (1999) ที่พบว่าแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน กลุ่ม *Pseudomonas* ที่คัดแยกจากฟองน้ำ *Hamophyria* sp. สามารถสร้างสาร Quinolones 1(2-undecyl-4-quinolone) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Plasmodium falciparum* และยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB cells ได้ดี แต่ไม่ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นที่ทดสอบ

นอกจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำหรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะเป็นแหล่งของสารฤทธิ์ทางชีวภาพ แล้ว Mitova และคณะ (2003) ยังได้รายงานถึงแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ เป็นแหล่งของประกอบที่ สำคัญอื่น เช่น ไชโคไลเปปไทด์ โดยได้คัดแยกแบคทีเรีย 2 ชนิดจากฟองน้ำ *Ircinia muscaran* จากอ่าว Naples ประเทศอิตาลี ทำการสกัด Fatty acid และ cyclic dipeptide จากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่เพาะเลี้ยง แล้วสกัด สารจากส่วนของ exo -cellular พบว่าเป็นสารชนิดใหม่ cyclotetra peptide 1 ส่วน

De Rosa และคณะ (2003) โดยได้คัดแยกแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Pseudomonas* / *Alteromonas* จากฟองน้ำ *Ircinia variabilis* จากอ่าว Naples ประเทศอิตาลี เช่นเดียวกันสามารถทำการสกัด Fatty acid และ cyclic dipeptide ได้จาก แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง

สำหรับประเทศไทยเมื่อเร็ว ๆ นี้ Preecha และคณะ (2003) รายงานถึงการค้นพบ สาร **Mycaperoxide H**, ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ที่เป็นพิษต่อ **cytotoxic norsesiterpene peroxide** ที่สกัดได้จากฟองน้ำไทย และจาก รายงานของ Rungprom และคณะ (2008) ที่เป็นการศึกษาวิจัยร่วมกับเครือข่ายการวิจัยของสถาบันวิทยาศาสตร์

ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพาได้รายงานถึงการค้นพบสาร cyclic peptides ชนิดใหม่จากแบคทีเรียทะเล

Pseudoalteromonas sp. ที่สกัดแยกจากฟองน้ำของไทย *Halisarca ectofibrosa* ที่เก็บได้จากอ่าวไทยเช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ เครือข่ายการวิจัยของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ได้แสดงผลให้เห็นถึงศักยภาพของการสร้างนวัตกรรมทางเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของทรัพยากรชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ฟองน้ำ และแบคทีเรียทะเล ในอ่าวไทย อาทิเช่น Kijjoa และคณะ (2007) ได้รายงานถึงศักยภาพของสารประกอบ **kuanoniamines A** และ **C** ที่สกัดจากฟองน้ำที่เก็บจากอ่าวไทยแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง เซลล์มะเร็งได้ดี และเมื่อเร็วๆ นี้

Watanadilok., R. และคณะ (2007) ค้นพบฟองน้ำ 2 ชนิด *Haliclona baeri* และ *Haliclona cymaeformis* ที่เก็บจากอ่าวไทยแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรากลุ่มอัสดี 7 ชนิด และเชื้อราที่มีเส้นใย 8 ชนิด ได้ดีเช่นกัน แต่ไม่มีชนิดใดสามารถยับยั้งเซลล์เนื้องอกเต้านม(MCF- 7)ได้

โครงการนี้จะเป็นการวิจัยประยุกต์หาสารตัวยาได้สารตั้งต้นและนำไปการพัฒนารักษาโรค และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่างๆ ที่มีความเป็นไปได้สูง เป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับทรัพยากรชีวภาพจากทะเลที่มีอยู่ในประเทศ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความก้าวหน้าทางวิชาการในเรื่องการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลอย่างกว้างขวาง อีกทั้งส่งเสริมให้มีการค้นคว้าตัวยารักษาโรค และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารใหม่ๆ อย่างจริงจัง และยังช่วยพัฒนาเครือข่ายความร่วมมือห้องปฏิบัติการในการทดสอบฤทธิ์ของยา และผลิตภัณฑ์ทางเภสัชวิทยา นอกจากนี้สารสกัด สารบริสุทธิ์ และจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโครงการนี้จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง เชื้อ HIV ฤทธิ์ต้านอักเสบ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็นต้น ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาตัวยารักษาโรค เป็นแนวทางสู่การแก้ปัญหาที่สำคัญด้านสุขภาพ และส่งผลต่อสังคมสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจเหล่านี้จะถูกนำไปทดสอบทางเภสัชวิทยาด้านพิษวิทยา เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นสารตัวยาตั้งต้น และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในระยะต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับจากฟองน้ำให้บริสุทธิ์ (Isolation and Purification of sponge-associated bacteria, test strain) และ การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำ (isolated strains)
2. การตรวจหาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ(test/ target strains) และยืนยันผล (Screening of antimicrobial activity)
3. การตรวจหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดความเสียหายจากแบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ(antioxidants activity)

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับจากฟองน้ำให้บริสุทธิ์ (Isolation and Purification of sponge-associated bacteria, test strain) และ การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำ (test strains)

1.1 ดำเนินการคัดแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากฟองน้ำและแยกให้บริสุทธิ์ โดยวิธีดังนี้

การเก็บตัวอย่างฟองน้ำจะเก็บโดยนักดำน้ำแบบ Scuba Diving ลงไปเก็บตัวอย่างฟองน้ำโดยตัดส่วนของฟองน้ำ เก็บใส่ถุงที่ปิดสนิทพร้อมติดแผ่นบันทึกข้อมูล

1.1.1 ตัดเนื้อเยื่อฟองน้ำเพื่อชั่งน้ำหนักให้ได้ประมาณ 5-10 กรัม แล้วล้างฟองน้ำเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ เช่น ตะกอนออก

1.1.2. ทำการบดเนื้อเยื่อฟองน้ำโดยใส่น้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 5 มิลลิลิตร จนละเอียด

1.1.3. คูด่วนที่เป็นน้ำที่ได้จากการบด 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางตัวอย่างจากการบดให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} ในน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้ว ต่อจากนั้นนำมาเกลี่ยเชื้อ โดยทำเช่นเดียวกับข้อ

1.1.4. คูด่วนที่เป็นน้ำที่ได้จากการเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเกลี่ยกระจายเชื้อบนผิวหน้าอาหาร เลี้ยงเชื้อ Zobell medium ที่ปรับปรุงสูตร

1.1.5 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 5 - 7 วัน ตรวจสอบผล

1.6 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญขึ้นในแต่ละจานเพาะเลี้ยง แล้วคำนวณค่าเป็นโคโลนีต่อกรัม (CFU/g)

1.1.7 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันในแต่ละจานเพาะเชื้อของแต่ละตัวอย่างฟองน้ำ

1.1.8 นำโคโลนีที่เลือกมาทำให้บริสุทธิ์ (Purify) โดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีนั่นลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 2 - 3 วัน เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเป็น stock ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Zobell medium ที่ปรับปรุงสูตรที่มีวุ้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในศึกษาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต่อไป

1.2 การเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์

ทำการเก็บสายพันธุ์แบบกึ่งถาวรเพื่อรักษาสภาพสรีระของเซลล์ ภายเทคนิคปราศจากเชื้อ

1.2.1 นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้บริสุทธิ์แล้ว มาทำการเพาะเลี้ยงใน Zobell broth ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน

1.2.2 นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 8,000 รอบ/นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำทะเล แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทน้ำล้างเซลล์ทิ้ง

1.2.3 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ครึ่งหนึ่ง อีกครึ่งหนึ่งเติมกลีเซอรอล แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เป็นการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียแบบกึ่งถาวร

2. การตรวจหาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ(target strains) และยืนยันผล (Screening of antimicrobial activity)

2.1 การเตรียม Standard test strains ได้แก่

แกรมบวก	แกรมลบ
- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	- <i>Vibrio . anguillarum</i> / <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
- <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC
- <i>Micrococcus luteus</i>	- <i>Escherichia coli</i> ATCC25922

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

2.1.2 ทำการถ่ายเชื้อ ลงในหลอดอาหารเหลว TSB (heavy inoculate) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในการเขย่าในแนวนอน (100 รอบต่อนาที)

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

2.1.4. คูณเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงใน Tryptic Soy Agar medium หรือ Mueller Hinton medium plate แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำซ้ำ 3 จาน (triplicates)

2.2 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนด (Screening of Antimicrobial activity assay)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำ (test strain)

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

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

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

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

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

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

สำหรับแบคทีเรียจากฟองน้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่กำหนดจะนำมาทดสอบสารสกัดเบื้องต้นในขั้นตอนต่อไป

2.3. การตรวจสอบยืนยันผลฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์มาตรฐาน

2.3.1 ทำการเตรียมเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, *V. anguillarum* ORI และ *B. subtilis* ATCC 6633 ลงในอาหารวุ้น Tryptic Soy Agar medium หรือ Mueller Hinton medium ซึ่งวิธีการได้อธิบายไว้แล้วในข้อ 3.1 ในหัวข้อการเตรียม standard test strains

2.3.2 เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียจากการทดสอบเบื้องต้นบน modified Zobell agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.3.3 ทำการถ่ายเชื้อลง modified Zobell broth (Heavy inoculate) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่าในแนวนอน (120 รอบต่อนาที)

2.3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD ที่ 600 nm) และนำเชื้อที่มีค่า OD ระหว่าง 0.6 - 1.0 มาทดสอบต่อไป

2.3.5 ทำการปั่นเหวี่ยงเชื้อตัวอย่างโดยใช้เครื่อง Microcentrifuge Fixed Angle Rotor ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที นาน 10-20 นาที

2.3.6 หลังจากปั่นเหวี่ยงทำให้ได้ส่วนของตะกอนเซลล์ และส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (supernatant)

- ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำ antibiotic assay disc (AA disc) วางบน petri dish ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นดูดส่วนใสที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบน AA disc ทิ้งไว้สักครู่แล้วนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ standard ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 1
- ส่วนของเซลล์ หลังจากที่มีการนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อออกไปแล้ว จะเหลือส่วนของตะกอน จะนำมาละลายด้วย modified Zobell broth ในอัตราส่วนที่เท่ากับส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อในตอนแรก ต่อจากนั้นนำสารละลายตะกอนที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบน AA disc ทิ้งไว้สักครู่ แล้วนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกันกับส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- ทำการควบคุมการทดลองโดยใช้ standard antibiotic disc ที่มี oxytetracyclin 30 ไมโครกรัม, streptomycin 10 ไมโครกรัมต่อ disc โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (triplicates)
- ทำการวัดผลฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยการวัดขนาดของบริเวณที่ยับยั้ง (inhibition zone) โดยสังเกตผลทุก 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

3. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) บนแผ่น TLC ชนิดบางโดยสารสกัดหยาบ(crude extracts) จากแบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อื่น

3.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเล (crude extraction)

- 3.1.1 เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนดใน modified Zobell agar slant บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- 3.1.2 ทำการถ่ายเชื้อลงใน modified Zobell broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่าในแนวนอน (100 รอบต่อนาที)
- 3.1.3 ทำการถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 2 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งบรรจุ(ขนาด 2 ลิตร)พลาสติกละ 1 ลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าในแนวนอน (100 รอบต่อนาที) โดยจะใช้ทำการทดลองเมื่อครบเวลาเท่ากับที่เชื้อออกฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนด
- 3.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง High Speed Refrigerated Centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส หลังจากผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วจะแยกออกเป็นสองส่วน ดังนี้

ส่วนเซลล์ของแบคทีเรีย

- นำส่วนของเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาล้างด้วย Normal saline 0.85%
- ทำการปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้อ 3.1.4 ในแต่ละหลอดที่ใช้ปั่นแยกเซลล์โดยนำส่วนที่ชะได้ทั้งหมดใส่ลงในหลอด ที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ที่ชั่งน้ำหนัก และบันทึกไว้แล้ว

- ทิ้งส่วน supernatant ที่ทิ้งไปคงเหลือแต่ส่วนของเซลล์ และนำไปชั่งน้ำหนักทั้งหมด แล้วคำนวณหาน้ำหนักของเซลล์
- ทำการสกัดด้วยสารละลาย เอทานอล, สารละลายผสม คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ($\text{CH}_3 : \text{MeOH} = 1 : 2$) ประมาณ 100 มิลลิลิตร โดยทำการชะตะกอนเซลล์ให้หลุดออกจากกัน แล้วนำไปปด (homogenized) โดยใช้เครื่อง biomixer หรือ Ultrazonic นาน 5-10 นาที
- เทสารละลายที่ได้ใส่บีกเกอร์ ผ่านการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrazonic
- ทำการปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้อ 4
- นำส่วนของตะกอนเซลล์ที่ได้มาทำเช่นเดียวกับตอนต้น อีก 2 ครั้ง แล้วทำการชั่งน้ำหนักสุดท้าย
- นำตัวอย่างที่ได้มาใส่ ethyl acetate และน้ำ โดยใช้อัตราส่วน 1 : 1 ประมาณ 100 มิลลิลิตร ใส่กรวยสำหรับแยกชั้นขนาด 300 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นของ ethyl acetate และน้ำ โดยส่วนชั้นบนจะเป็นส่วนที่สามารถละลายได้ใน ethyl acetate ซึ่งจะนำมาทำให้แห้งโดยใช้พลาสติกสำหรับ evaporate ที่ชั่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้ว ส่วนชั้นล่างจะเป็นส่วนที่มีสารสกัดที่ละลายได้ดีในน้ำจะนำมาใส่ ethyl acetate ประมาณ 30 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น ทำเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง แล้วเอาส่วนของน้ำที่ได้สุดท้ายไปทำให้แห้ง และชั่งน้ำหนักก่อน และหลังทำการทดลองทุกครั้ง
- นำส่วนใสที่ได้แต่ละชั้นคือ ethyl acetate และน้ำใส่พลาสติกสำหรับ evaporate โดยต่อเข้ากับเครื่อง rotary vacumm evaporator

ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (supernatant)

- นำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาสกัดด้วย ethyl acetate ในอัตราส่วน 1 : 4 พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นของ ethyl acetate และน้ำ โดยส่วนชั้นบนจะเป็นส่วนที่สามารถละลายได้ใน ethyl acetate ซึ่งจะนำมาระเหยให้แห้งโดยใช้พลาสติกสำหรับ evaporate เพื่อนำไปทดสอบต่อไป
- ทำการทดลองเช่นต่อไป เช่นเดียวกับที่ดำเนินการในตอนต้น

นำสารสกัดหยาบที่ได้(crude extracts) ทั้งสองส่วน(fractions) ไปทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป

3.2 การเตรียมทดสอบ

3.2.1 การเตรียมสารละลาย 0.004 % DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

การเตรียมสารละลาย ดีพีพีเอช DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ในเอทานอลบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 0.004% ในสารละลายเอทานอลบริสุทธิ์ เก็บในภาชนะทึบแสง(ขวดสเปรย์) โดยชั่งดีพีพีเอช 0.0004 กรัม ลงในขวด ละลายด้วยเอทานอล วัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.2.2 การแยกสาร secondary metabolites โดยวิธี Thin – layer Chromatography (TLC)

3.2.2.1 เตรียมแผ่น TLC แท่ง TLC และระบบตัวทำละลาย (Stahl, 1969)

นำแผ่น TLC ชนิด plates sheet silica gel 60 F 254 บริษัท Merck (ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร) ตัดมาขนาด 3 x 5 เซนติเมตร

ในการเตรียมแท่ง TLC ซึ่งมีสารละลายในอัตราส่วน $\text{CH}_3\text{Cl} : \text{CH}_3\text{OH}$ ในการแยกส่วนประกอบของสาร secondary metabolites

วิธีการแยกสาร secondary metabolites ที่ได้ด้วย TLC

นำแผ่น TLC plates sheet silica gel ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1.1 มาทำการหยดสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ข้อ 3.1 มาแยกสาร secondary metabolites ที่เป็นจุด (spot) โดยให้มีขนาดเล็กที่สุดโดยใช้หลอดแคปิลารีขนาด 5 ไมโครลิตร แล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำแผ่น TLC plates silica gel แต่ละแผ่น ไปอบในภาชนะที่อิมมัวด้วยสารละลายผสมในอัตราส่วน $\text{CH}_3\text{Cl} : \text{CH}_3\text{OH}$ หรือ Dichloromethane : Methanol (95:5) โดยให้ส่วนปลายฐานของแผ่นที่แช่อยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร เมื่อสารละลายเคลื่อนที่มาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบน TLC plates silica gel ประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาทำให้แห้ง จากนั้นทำการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยา antioxidation โดยการสเปกโตรสโกปีของ TLC plates ภายใต้แสง UV เป็นการตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นไขมันและอบด้วยเกลือไอโอดีนเป็นคุณสมบัติการเป็นสาร hydrophobic ต่อจากนั้นทำการวัดระยะที่สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ได้บนแผ่น TLC คำนวณหาค่า R_f ของสาร secondary metabolites ที่แยกแต่ละชนิด

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับจากฟองน้ำให้บริสุทธิ์ (Isolation and Purification of sponge-associated bacteria, test strain) และ การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำ (isolated strains)

การศึกษาจุลชีพที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ: แหล่งใหม่ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร
ระยะที่ 2 ดำเนินการเก็บตัวอย่างฟองน้ำจากจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 8 จุดสำรวจ โดยวิธี scuba diving จากบริเวณทะเลหมู่เกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้แก่ บริเวณทิศเหนือ จรดทิศตะวันตก ได้ฟองน้ำจำนวน 33 ตัวอย่าง โดยได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยการเกลี่ยกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell agar และสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลให้บริสุทธิ์โดยเลือกแต่ละโคโลนีที่แตกต่างก็นำมาจีด (streak) บนอาหารใหม่ได้ทั้งหมด สามารถทำการคัดแยกแบคทีเรียได้ 197 สายพันธุ์ พบแบคทีเรียอาศัยอยู่ในฟองน้ำแต่ละตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียที่แตกต่างกันโดยพบจำนวนน้อยที่สุดใน ฟองน้ำครกสีม่วง TAO-E-02, *Xestospongia testudinaria* จำนวน 2.0×10^3 โคโลนีต่อกรัม และมากที่สุดฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง TAO-G-08 *Oceanapia sagittaria* จำนวน 8.66×10^6 โคโลนีต่อกรัม ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1 และตัวอย่างภาพถ่ายฟองน้ำรหัส TAO-E-02 และ TAO-G-08 ดังแผ่นภาพที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำบริเวณเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี

รหัส	ชื่อฟองน้ำ		จำนวนแบคทีเรียทะเล ทั้งหมดที่พบใน ฟองน้ำ(CFU/g)
	ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	
TAO-A-01	ฟองน้ำปล่องภูเขาไฟ	<i>Spheciospongia vagabunda</i>	7.0×10^4
TAO-A-02	ฟองน้ำครกแข็งสีเหลือง	<i>Petrosia (Petrosia) sp.</i>	3.4×10^4
TAO-A-03	ฟองน้ำเคลือบหนาสีฟ้า	<i>Gelliodes petrosioides</i>	3.76×10^5
TAO-A-04	ฟองน้ำเคลือบแดงลายขาว	<i>Clathria (Thalysias) toxifera</i>	8.2×10^6
TAO-A-05	ฟองน้ำเคลือบแข็งสีม่วง	<i>Xestospongia sp.</i>	1.08×10^5
TAO-B-01	ฟองน้ำไฟ	<i>Biemna fortis</i>	2.78×10^5
TAO-B-02	ฟองน้ำถั่วสีดำ	<i>Cacospongia sp.</i>	3.1×10^5
TAO-B-03	ฟองน้ำเคลือบบางสีส้มหนามยาว	<i>Thrinacophora incrustans,</i>	1.36×10^6
TAO-B-04	ฟองน้ำเคลือบสีชมพู	<i>Psammochela elegans</i>	2.72×10^5
TAO-B-05	ฟองน้ำสีน้ำเงิน	<i>Neopetrosia sp.</i>	6.46×10^5
TAO-B-06	ฟองน้ำเปลี่ยนสีสีเหลือง	<i>Pseudoceratina purpurea</i>	2.47×10^6
TAO-B-07	ฟองน้ำเคลือบแข็งสีม่วง	<i>Xestospongia sp.</i>	1.88×10^5
TAO-B-08	ฟองน้ำครกสีม่วง	<i>Xestospongia testudinaria</i>	4.0×10^4
TAO-B-09	ฟองน้ำท่อสีขาว	<i>Haliclona sp.</i>	1.42×10^6
TAO-C-01	ฟองน้ำสีน้ำตาล	<i>Petrosia (Petrosia) hoeksemai</i>	1.7×10^5
TAO-C-02	ฟองน้ำครกสีม่วง	<i>Xestospongia testudinaria</i>	1.6×10^4
TAO-C-03	ฟองน้ำเปลี่ยนสีสีเหลือง	<i>Pseudoceratina purpurea</i>	1.15×10^6
TAO-C-04	ฟองน้ำเคลือบแข็งสีม่วง	<i>Xestospongia sp.</i>	1.42×10^5
TAO-D-01	ฟองน้ำยัดหุ้มสีดำ	<i>Hyrtios erectus</i>	2.94×10^5
TAO-D-02	ฟองน้ำสีม่วง	<i>Axinyssa sp.</i>	6.4×10^4
TAO-D-03	ฟองน้ำถั่วสีดำ	<i>Cacospongia sp.</i>	1.46×10^6
TAO-D-04	ฟองน้ำฟุ้งตัวสีแดง	<i>Mycale (Mycale) grandis</i>	2.67×10^4
TAO-D-05	ฟองน้ำเคลือบสีดำ	<i>Corticium niger</i>	1.26×10^5
TAO-D-06	ฟองน้ำครกสีม่วง	<i>Xestospongia testudinaria</i>	1.0×10^4

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัส	ชื่อฟองน้ำ		จำนวนแบคทีเรียทะเล ทั้งหมดที่พบใน ฟองน้ำ (CFU/g)
	ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	
TAO-E-01	ฟองน้ำสีน้ำตาล	<i>Petrosia (Petrosia) hoeksemai</i>	1.1×10^5
TAO-E-02	ฟองน้ำครกสีม่วง	<i>Xestospongia testudinaria</i>	2.0×10^3
TAO-E-03	ฟองน้ำยัดหยุ่นสีดำ	<i>Hyrtios erectus</i>	2.22×10^5
TAO-E-04	ฟองน้ำยัดหยุ่นสีเทา	<i>Hyrtios erectus</i>	5.48×10^5
TAO-E-05	ฟองน้ำไฟ	<i>Biemna fortis</i>	3.86×10^5
TAO-E-06	ฟองน้ำเปลี่ยนสีสีเหลือง	<i>Pseudoceratina purpurea</i>	9.03×10^5
TAO-F-01	ฟองน้ำสีน้ำเงิน	<i>Neopetrosia</i> sp.	4.6×10^4
TAO-F-02	ฟองน้ำสีน้ำตาล	<i>Petrosia (Petrosia) hoeksemai</i>	1.64×10^5
TAO-F-03	ฟองน้ำสีม่วง	<i>Axinyssa</i> sp.	3.18×10^5
TAO-F-04	ฟองน้ำตุ้ต้วสีดำ	<i>Cacospongia</i> sp.	7.5×10^5
TAO-F-05	ฟองน้ำเคลือบหนาสีฟ้า	<i>Gelliodes petrosioides</i>	1.72×10^5
TAO-F-06	ฟองน้ำเคลือบแข็งสีม่วง	<i>Xestospongia</i> sp.	1.46×10^5
TAO-F-07	ฟองน้ำไฟ	<i>Biemna fortis</i>	3.6×10^5
TAO-F-08	ฟองน้ำคันไม้สีดำ	<i>Pachastrissa nux</i>	6.44×10^5
TAO-F-09	ฟองน้ำกิ่งสีขาว	<i>Halichondria</i> sp.	2.2×10^6
TAO-F-10	ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง	<i>Halichondria Halichondria</i>	5.6×10^5
TAO-G-01	ฟองน้ำเคลือบสีชมพู	<i>Psammochela elegans</i>	3.3×10^6
TAO-G-02	ฟองน้ำกิ่งสีขาว	<i>Petrosia (Petrosia) sp.</i>	1.68×10^5
TAO-G-03	ฟองน้ำกิ่งสีน้ำตาลม่วง	<i>Halichondria</i> sp.	8.28×10^5
TAO-G-04	ฟองน้ำกิ่งสีขาว	<i>Xestospongia</i> sp.	6.6×10^4
TAO-G-05	ฟองน้ำก้อนนิ่มสีขาว	<i>Stylissa massa</i>	1.1×10^6
TAO-G-06	ฟองน้ำก้อนหนามสีน้ำตาล	<i>Echinodictyum</i> sp.1	3.38×10^6
TAO-G-07	ฟองน้ำลูกกอล์ฟ	<i>Cinachyrella australiensis</i>	2.72×10^5
TAO-G-08	ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง	<i>Oceanapia sagittaria</i>	8.66×10^6

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัส	ชื่อฟองน้ำ		จำนวนแบคทีเรียทะเล ทั้งหมดที่พบใน ฟองน้ำ (CFU/g)
	ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	
TAO-H-01	ฟองน้ำเคลือบสีเหลืองนํม	<i>Halichondria</i> sp.	9.0×10^5
TAO-H-02	ฟองน้ำท่อสีขาว	<i>Haliclona</i> sp.	1.98×10^6
TAO-H-03	ฟองน้ำเคลือบสีม่วง	<i>Petrosia (Petrosia)</i> sp.	1.0×10^6
TAO-I-02	ฟองน้ำปะการังสีฟ้า	<i>Cladocroce</i> sp.	1.2×10^6
TAO-J-01	ฟองน้ำลูกกอล์ฟ	<i>Cinachyrella australiensis</i>	8.48×10^5
TAO-J-02	ฟองน้ำกิ่งสีเหลือง	<i>Pseudoceratina</i> sp.	3.11×10^6
TAO-J-03	ฟองน้ำสีม่วง	<i>Axinyssa</i> sp.	2.04×10^6
TAO-J-04	ฟองน้ำเคลือบแข็งสีม่วง	<i>Xestospongia</i> sp.	8.8×10^4
TAO-J-05	ฟองน้ำครกค่าง	<i>Petrosia (Petrosia)</i> sp.	8.2×10^4
TAO-K-01	ฟองน้ำกิ่งสีม่วง	<i>Axinyssa</i> sp.	6.6×10^5
TAO-K-02	ฟองน้ำเคลือบสีม่วงนํม	<i>Axinyssa</i> sp.	3.38×10^5
TAO-K-03	ฟองน้ำเคลือบสีขาวท่อใหญ่	<i>Halichlona</i> sp.	1.12×10^6
TAO-K-04	ฟองน้ำเปลี่ยนสีสีเหลือง	<i>Pseudoceratina purpurea</i>	8.6×10^4

2. การตรวจหาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ(test strains) และยืนยันผล (Screening of antimicrobial activity)

จากการศึกษาการตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบของแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบที่ใช้ในการตรวจสอบมีทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Vibrio alginolyticus* โดยวิธี Disc Diffusion Agar Assay ใช้น้ำที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนดิสก์แล้วไปทดสอบกับแบคทีเรียทดสอบที่เป็นตัวแทนของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell agar พบว่า แบคทีเรียทะเลที่แยกได้มาจากฟองน้ำ ที่เก็บจากบริเวณ หมู่เกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้แก่ บริเวณทิศเหนือ จรดทิศตะวันตก ได้ฟองน้ำจำนวน 33 ตัวอย่าง ที่นำมาทดสอบจำนวนแบคทีเรียทะเล 197 สายพันธุ์ สามารถต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ 21 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 10.6 ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ โดยในจำนวนนี้ พบว่าแบคทีเรียทะเล 35 สายพันธุ์ สามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* ได้แก่ T55 H 1-6, T55 J 2-7, และ T55 J 2-6 ซึ่งสายพันธุ์ TE 11-7 ให้ผลการต้านดีที่สุด มีขนาดของบริเวณใส คือ 25.0 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่า *B. subtilis* เป็นชนิดที่มีจำนวนของสายพันธุ์แบคทีเรียทะเลที่สามารถต้านการเจริญได้มากที่สุด ผลการทดลองที่ได้คล้ายกับงานวิจัยของ Kennedy และคณะ (2009) และ Ocky และคณะ (2007) และมีขนาดของบริเวณใสใหญ่สุดด้วยเช่นกัน ส่วน *S. aureus* พบฤทธิ์ต้านโดยแบคทีเรียทะเล 16 สายพันธุ์ ได้แก่ TA 2-6 Bk, TA 5-2 R, TA 5-3 Br, TA 5-12 Bk, TA 5-3 Br, TC 3-1 Bk, TE 11-1 DP, TE 19-1 R, TE 19-4 Br, TE 19-5 BK, MSA 2-3 R, MSA 4-8R, MSA 4-9 Y, MSB 1-5 Y และ MSB 6-3R ซึ่งสายพันธุ์ TE 19-5 BK ให้ผลการต้านดีที่สุด ซึ่งมีขนาดของบริเวณใสคือ 20.2 มิลลิเมตร ซึ่งความสามารถในการต้านของแบคทีเรียทะเลแต่ละสายพันธุ์นั้นมีค่าใกล้เคียงกัน โดย *P. aeruginosa* ถูกต้านโดยแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์เดียว ได้แก่ TE 9-8 ในขณะที่ไม่มีแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. alginolyticus* ได้ แบคทีเรียทะเลที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบมากกว่า 1 ชนิดมี 14 สายพันธุ์ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 2

จากผลการทดลองพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ocky และคณะ (2007) พบแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ *A. hydrophila* และสายพันธุ์รหัส BSP4.3 ที่สามารถต้านการเจริญของ *S. aureus* และ *B. subtilis* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ได้ใช้ในการทดลองนี้ได้เช่นกัน

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นพบแบคทีเรียทะเลจำนวน 21 สายพันธุ์ จากที่ทดสอบ 197 สายพันธุ์ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่ใช้ในการทดสอบรวม 4 ชนิด โดยสามารถยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, และ/หรือ กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (ตารางที่ 2) จากนั้นได้คัดเลือกทำการเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพจำนวน 4 สายพันธุ์ เพื่อให้ได้สารสกัดหาปริมาณมากสำหรับศึกษาในขั้นยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพและศึกษาสารประกอบทางเคมีต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ(บริเวณยับยั้ง แสดงผล
เส้นผ่านศูนย์กลางเป็นมิลลิเมตร)

หมายเลข	รหัสเชื้อ	ผลของการยับยั้ง			
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>E. coli</i>
82	T55A1-5Y	-	$14+14/2=14.0$	$15+15/2=15.0$	$18+16/2=17.0$
94	T55A2-6or	$15+14/2=14.5$	$14+14/2=14.0$	-	-
104	T55A3-3	$20+19/2=19.5$	$19+17/2=18.0$	$16+14/2=15.0$	$21+19/2=20.0$
114	T55A4-2	-	$15+16/2=15.5$	-	-
126	T55A5-4or	$15+15/2=15.0$	$16+15/2=15.5$	$15+15/2=15.0$	$18+16/2=17.0$
134	T55A5-13	$16+19/2=17.5$	$18+17/2=17.5$	$16+16/2=16.0$	-
135	T55B7-1	$15+16/2=15.5$	-	-	$15+15/2=15.0$
143	T55B8-1or	$18+16/2=17.0$	-	-	-
155	T55B9-5BK	$18+17/2=17.5$	-	$20+19/2=19.5$	$18+17/2=17.5$
175	T55D5-4C	-	$16+15/2=15.5$	-	$15+15/2=15.0$
190	T55E5-5	$16+16/2=16.0$	-	-	-
191	T55E5-7	$15+15/2=15.0$	-	-	-
198	T55E5-19	$15+15/2=15.0$	-	-	-
199	T55E6-1cy	$15+18/2=17.0$	-	-	-
210	T55F2-3Y	-	-	$18+16/2=17.0$	$18+17/2=17.5$
215	T55F4-9C	$15+15/2=15.0$	$16+16/2=16.0$	-	-
222	T55G2-1Y	$17+17/2=17.0$	-	-	-
223	T55G2-2	$19+19/2=19.0$	-	-	-
226	T55G3-6or	-	-	$15+15/2=15.0$	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	รหัสเชื้อ	ผลของการยับยั้ง			
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>E. coli</i>
243	T55G5-10Bk	$15+14/2=14.5$	-	-	-
254	T55G6-11R	$18+17/2=17.5$	$18+18/2=18.0$	$15+15/2=15.0$	-
255	T55G7-1Bk	$16+16/2=16.0$	$17+18/2=17.5$	$15+15/2=15.0$	-
256	T55G7-2	$14+15/2=14.5$	$14+14/2=14.0$	-	-
276	T55H1-6Bk	$19+19/2=19.0$	$14+15/2=14.5$	$16+15/2=15.5$	$18+15/2=16.5$
290	T55H3-7Br	$16+18/2=17.0$	-	-	-
296	T55H3-13Br	$18+17/2=17.5$	$19+19/2=19.0$	-	-
316	T55J2-6	$19+19/2=19.0$	$20+18/2=19.0$	$20+19/2=19.5$	$18+18/2=18.0$
317	T55J2-7R	$18+16/2=17.0$	$17+16/2=16.5$	$15+16/2=15.5$	$16+16/2=16.0$
319	T55J2-9Br	$15+15/2=15.0$	$18+17/2=17.5$	-	-
330	T55J4-5Br	$18+17/2=17.5$	-	-	-
341	T55k1-4Br	$18+18/2=18.0$	-	-	-
360	T55k3-4R	$16+15/2=15.5$	-	-	-
365	T55k3-9Bk	$15+15/2=15.0$	-	-	-
373	T55k4-7Br	$17+17/2=17.0$	-	-	-

หมายเหตุ: การทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ ได้แก่ *B. subtilis* : *Bacillus subtilis*, *S. aureus* : *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*, *V. alginolyticus* : *Vibrio alginolyticus*, *E. coli* : *Escherichia coli*

ตัวเลข: แสดงขนาดของบริเวณที่มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียที่ทดสอบซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยมาจากทดสอบ 2 ซ้ำ มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร, เครื่องหมาย — : แสดงผลที่ไม่มีการต้านแบคทีเรียที่ทดสอบ และ ND หมายถึงไม่ได้ทำการทดสอบ

3 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่สกัดมาจากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ

จากการศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ ที่เก็บจากหมู่เกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทดสอบ สายพันธุ์ใดที่แสดงประสิทธิภาพที่ดี จะคัดไปทำการเพาะเลี้ยง ปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จำนวน 43 สายพันธุ์ โดยวิธี **DPPH Assay** (Spray with 0.004 % DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) on loaded TLC plate)

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบด้วยส่วนของเซลล์สกัดด้วยตัวทำละลายผสม คลอโรฟอร์ม และ เมทานอล ($\text{CH}_3 : \text{MeOH} = 1 : 2$) และส่วนของน้ำเลี้ยงที่สกัดด้วย เอทิลอะซิเตต ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ แสดงแบนสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แตกต่างกันไป โดยสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลหรือเอทิลอะซิเตต ที่แสดงแบนสารมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ชัดเจนที่สุด (ดังแสดงผลในตารางที่ 3) จะถูกนำสารสกัดหยาบมาแยกต่อเพื่อแยกหาสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีและการตกผลึก และวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้โดยอาศัยข้อมูลจากการวิเคราะห์โดยเทคนิคสเปกโตรสโกปี ได้แก่ IR, UV, NMR และ LCMS ต่อไป

ผลของโครงการวิจัยนี้เป็นข้อมูลแสดงถึงศักยภาพของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ เพื่อส่งเสริมการวิจัยและพัฒนาสารออกฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยหาสารด้วยที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป

ทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการตรวจสอบมี 5 ชนิด คือ *B. Subtilis*, *S. Aureus*, *P. Aeruginosa*, *V. Alginoliticus* และ *E. coli* ทดสอบกับแบคทีเรียทะเล โดยใช้วิธี Disc Diffusion Agar Assay บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar โดยใช้ AA disc ขนาด 6 มิลลิเมตร. เมื่อนำ 44 สายพันธุ์มาทำการแยกเพาะเลี้ยงและสกัดสารแยกออกเป็นส่วนของน้ำเลี้ยงสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต และส่วนของเซลล์สกัดด้วยสารละลายผสมเมทานอลและคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 2:1) และระเหยแห้งด้วย Rotary Evaporator จนได้สารสกัดหยาบทั้งสองส่วน แล้วนำมา ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียทะเลมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ ที่ระดับความเข้มข้น 200, 400 และ 800 μg ของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากแบคทีเรียทะเลที่แยกจากฟองน้ำมีเพียง 11 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 25 จาก 44 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ จะพบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลที่สามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* ได้แก่ สายพันธุ์ TB 8-6Br (เซลล์), TA 5-3 Br (น้ำเลี้ยง) และ MSB5 – 3 R (เซลล์) ส่วนสารสกัดของสายพันธุ์ TA5-2-7BK, TE 11 – 1DP และ TA5 – 12 Bk แสดงประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ทั้งในส่วนของน้ำเลี้ยงและเซลล์ โดยสายพันธุ์ TB8 – 6 Br (เซลล์) ซึ่งมีขนาดของบริเวณยับยั้งการเจริญสูงสุด

คือ 21.7 มิลลิเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 800 µg ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลที่สามารถต้านการเจริญของ *S. aureus* ได้แก่ สายพันธุ์ TA5 – 12 Bk (น้ำเลี้ยง), TB 6 – 1 Br (น้ำเลี้ยง), TC3 – 1 Bk (เซลล์ซึ่ง TB8 – 6 Br, TA5-2-7BK และ TE 11 – 1DP สามารถต้านได้ทั้งในส่วนของน้ำเลี้ยงและเซลล์ โดยสายพันธุ์ TA5 – 12 Bk (น้ำเลี้ยง) ซึ่งมีขนาดของบริเวณยับยั้งสูงสุดคือ 10.0 มิลลิเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 400 µg ในขณะที่สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลที่สามารถต้านการเจริญของ *V. alginoliticus* ได้แก่ สายพันธุ์ MSB5 – 3 R (เซลล์), MSA2 – 3R (เซลล์) และ MSB6 – 3R (เซลล์) ซึ่งสายพันธุ์ TE 11 – 1 DP และ MSA3– 6 สามารถต้านได้ทั้งในส่วนของน้ำเลี้ยงและเซลล์ โดยสายพันธุ์ CD3266DP (เซลล์) มีขนาดของบริเวณยับยั้งใหญ่ที่สุดคือ 13.2 มิลลิเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 800 µg ซึ่งไม่มีสารสกัดหยาบที่สกัดจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ใดสามารถต้านการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* และ *E. coli* ได้ เพราะสูญเสียความสามารถในการต้านไปที่อาจเกิดจากวิธีการสกัดสารที่ต้องมีความจำเพาะต่อสาร ซึ่งระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเป็นตัวชี้ว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียทะเลนั้นสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ที่ความเข้มข้นมากหรือน้อย เพราะถ้าใช้ในระดับความเข้มข้นน้อยๆแล้วมีการต้าน แสดงว่าฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียสูง จะใช้สารสกัดหยาบในระดับความเข้มข้นน้อยๆก็มีฤทธิ์ในการต้านได้แล้ว จากการทดสอบจะพบว่าสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบทั้งในส่วนของทั้งส่วนของน้ำเลี้ยงและเซลล์ อยู่ 4 สายพันธุ์ เฉพาะส่วนน้ำเลี้ยง 3 สายพันธุ์ และส่วนเซลล์ 3 สายพันธุ์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ TE 11 – 1DP (น้ำเลี้ยงและเซลล์) สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้มากที่สุด 3 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *E. coli* ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kennedy และคณะ (2009) พบแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำสายพันธุ์รหัส BC2, SM2, SM4, SM8, SM18 และ SM19 ที่สามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* แต่ไม่มีฤทธิ์ต้าน *E. coli* ได้ ในขณะที่การวิจัยครั้งนี้มีแบคทีเรียที่คัดแยกได้สายพันธุ์ TE 11 – 1DP (น้ำเลี้ยงและเซลล์) และ MSB5 – 3 R (เซลล์) แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* ได้

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Assay

(Spray with 0.004 % DPPH on loaded TLC plate)

ลำดับ	รหัส	Mid-point (b)	Solvent front (a)	ค่า R_f ($b \div a$)
1	TB8 – 6 Br(น้ำเลี้ยง)	3.6	4.1	0.88
2	TB8 – 6 Br(Cell)	3.5	4.1	0.85
3	TA5 – 3 Br(น้ำเลี้ยง)	3.5	4.1	0.85
4	TA5 – 3 Br(Cell)	-	-	-
5	TA5 – 2 R(น้ำเลี้ยง)	3.8	4.1	0.93
6	TA5 – 2 R(Cell)	3.5	4.1	0.85
7	TA3 – 4 y(น้ำเลี้ยง)	2.9	4.0	0.72
8	TA3 – 4 y(Cell)	-	-	-
9	TA 3 -3(น้ำเลี้ยง)	3.2	4.0	0.8
10	TA 3 -3(Cell)	-	-	-
11	TA5-2-7Bk(น้ำเลี้ยง)	3.5	4.2	0.83
12	TA5-2-7Bk(Cell)	-	-	-
13	TB 4 – 1(น้ำเลี้ยง)	3.3	4.2	0.78
14	TB 4 – 1(Cell)	-	-	-
15	TA2 – 6 Bk(น้ำเลี้ยง)	3.6	4.2	0.86
16	TA2 – 6 Bk(Cell)	-	-	-
17	TA 2 – 4R (น้ำเลี้ยง)	3.2	4.2	0.76
18	TA 2 – 4R (Cell)	-	-	-
19	TC 7 - 6y(น้ำเลี้ยง)	3.2	4.2	0.76
20	TC 7 - 6y(Cell)	-	-	-
21	TB 6 – 1 Br(น้ำเลี้ยง)	3.5	4.2	0.83
22	TB 6 – 1 Br(Cell)	-	-	-
23	TB 5 – 3 - 11(น้ำเลี้ยง)	3.3	4.1	0.80
24	TB 5 – 3 - 11(Cell)	-	-	-
25	TE 11-7(น้ำเลี้ยง)	3.3	4.1	0.80
26	TE 11-7(Cell)	-	-	-
27	TE 9 – 8(น้ำเลี้ยง)	3.4	4.1	0.83

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	Mid-point (b)	Solvent front (a)	ค่า Rf (b÷a)
28	TE 9 – 8(Cell)	-	-	-
29	TE 9 – 9 Br(น้ำเลี้ยง)	3.2	4.1	0.78
30	TE 9 – 9 Br(Cell)	-	-	-
31	TE 11 – 1 DP(น้ำเลี้ยง)	3.3	4.1	0.80
32	TE11 – 9 Or(น้ำเลี้ยง)	3.3	4.1	0.80
33	TE11 – 9 Or(Cell)	-	-	-
34	TE14 – 7(น้ำเลี้ยง)	3.4	4.1	0.83
35	TE14 – 7(Cell)	-	-	-
36	TE19 – 1R(น้ำเลี้ยง)	3.5	4.1	0.85
37	TE19 – 4Br(น้ำเลี้ยง)	3.3	4.1	0.80
38	TE19 – 4Br(Cell)	-	-	-
39	TE19 – 5Bk(น้ำเลี้ยง)	3.8	4.1	0.93
40	TC3 – 1 Bk (น้ำเลี้ยง)	3.1	4.0	0.78
41	TC3 – 1 Bk(Cell)	-	-	-



รูปที่ 1 TAO-G-08 ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง *Oceanapia sagittaria* พบจำนวนแบคทีเรียมากที่สุด 8.66×10^6 โคโลนีต่อกรัม



รูปที่ 2 TAO-E-02 ฟองน้ำครกสีม่วง *Xestospongia testudinaria* พบจำนวนแบคทีเรียที่น้อยที่สุด 2.0×10^3 โคโลนีต่อกรัม

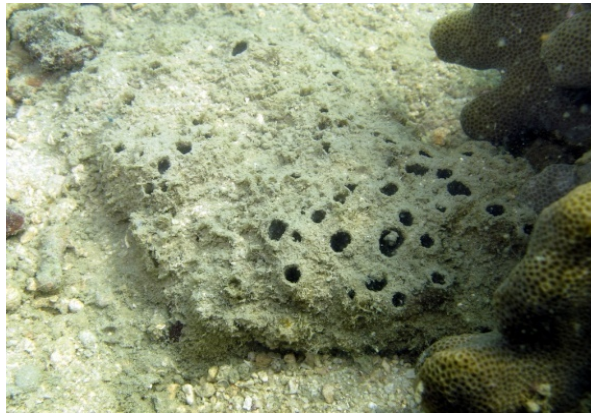


รูปที่ 3 *Halichondria* sp. "yellow"
รหัส TAO55-H-POR01
ชื่อสามัญ : ฟองน้ำเคลือบสีเหลืองนึ่ง



รูปที่ 4 *Pseudoceratina* sp. "yellow"
รหัส TAO55-J-POR02
ชื่อสามัญ : ฟองน้ำกิ่งสีเหลือง

แผ่นภาพที่ 2 รูปถ่ายฟองน้ำจากบริเวณเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี
(ภาพถ่ายโดย ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ)



รูปที่ 1 *Biemna fortis*

รหัส TAN-A-02

ชื่อสามัญ : ฟองน้ำไฟ



รูปที่ 2 *Oceanapia sagittaria*

รหัส TAN-A-05

ชื่อสามัญ : ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง



รูปที่ 3 *Axinyssa* sp.

รหัส TAN-B-04

ชื่อสามัญ : ฟองน้ำเคลือบสีม่วง



รูปที่ 4 *Xestospongia testudinaria*

รหัส TAN-B-8

ชื่อสามัญ : ฟองน้ำครกแข็ง

แผ่นภาพที่ 2 รูปถ่ายฟองน้ำจากบริเวณเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี
(ภาพถ่ายโดย ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ)



รูปที่ 5 *Hyattella intestinalis*

รหัส TAN-C-3

ชื่อสามัญ : ฟองน้ำตัวสีน้ำตาลเขียว



รูปที่ 6 *Neopetrosia* sp.

รหัส TAN-C-12

ชื่อสามัญ : ฟองน้ำสีน้ำเงิน

แผ่นภาพที่ 2 (ต่อ) รูปถ่ายฟองน้ำจากบริเวณเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี

(ภาพถ่ายโดย ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ)

สรุปผลการวิจัย

จากการตรวจสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำในการสร้างสารมาด้านการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginoliticus* และ *Escherichia coli* ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจากจำนวนแบคทีเรียทะเล 197 สายพันธุ์ที่แยกได้จากฟองน้ำ มี 44 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 10 ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ พบว่าแบคทีเรียทะเลจำนวน 38 สายพันธุ์ สามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* ได้ ซึ่งสายพันธุ์ TE 11-9 Or ให้ผลการต้านขนาดใหญ่ที่สุด โดยที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *S. aureus* ได้ มีแบคทีเรียทะเลจำนวน 16 สายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ TE 19-5 BK ให้ผลการต้านขนาดใหญ่ที่สุด ส่วนที่มีฤทธิ์ต้าน *E. coli* มีแบคทีเรียทะเลจำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งความสามารถในการต้านของแบคทีเรียทะเลแต่ละสายพันธุ์นั้นมีความใกล้เคียงกัน และแบคทีเรียทะเลเพียงตัวเดียวที่สามารถต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้แก่ TE 9-8Y ซึ่งไม่มีแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ที่สามารถต้านเชื้อ *V. alginoliticus* ได้

สรุปได้ว่าแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) ที่ทดสอบได้ 2 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis* และ *S. aureus* และ แบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) ที่ทดสอบได้ 2 ชนิดเช่นเดียวกัน ได้แก่ *P. aeruginosa* และ *E. coli*

จากการตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง 5 ชนิด ของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากส่วนของน้ำเลี้ยงและเซลล์ของแบคทีเรียทะเลที่แยกจากฟองน้ำเพาะเลี้ยงที่ปริมาตร 1 ลิตร ที่ระดับความเข้มข้น 200, 400 และ 800 µg มีเพียง 11 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 25 จาก 44 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ พบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* ได้แก่ สายพันธุ์ TB 8-6Br (เซลล์), TA 5-3 Br (น้ำเลี้ยง) และ MSB 5-3 R (เซลล์) ซึ่งสายพันธุ์ TB 5-2-7 Bk, TE 11-1 DP, TA 5-12 Bk สามารถต้านได้ทั้งในส่วนของน้ำเลี้ยงและเซลล์ โดยสายพันธุ์ CD3085Br (เซลล์) ให้ผลการต้านขนาดใหญ่ที่สุด ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลที่สามารถต้านการเจริญของ *S. aureus* ได้แก่ สายพันธุ์ TA 5-12 Bk (น้ำเลี้ยง), TB 8-6Br (น้ำเลี้ยง), TC 3-1 Bk (เซลล์), MSB 5-3 R (เซลล์), MSA 2-3 R (น้ำเลี้ยง), MSA 3-6 (น้ำเลี้ยง), MSA 2-3 R (เซลล์) และ MSB 6-3R (เซลล์) ได้ ซึ่ง TB 8-6Br, TB 5-2-7 Bk และ TE 11-1 DP สามารถต้านได้ทั้งในส่วนของน้ำเลี้ยงและเซลล์ โดยสายพันธุ์ TA 5-12 Bk (น้ำเลี้ยง) ให้ผลการต้านขนาดใหญ่ที่สุดในขณะที่สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลที่สามารถต้านการเจริญของ *V. alginoliticus* ได้แก่ สายพันธุ์ MSB 5-3 R (เซลล์), MSA 2-3 R (เซลล์), และ MSB 6-3R (เซลล์) ซึ่งสายพันธุ์ TE 11-1 DP และ MSA 3-6 สามารถต้านได้ทั้งในส่วนของน้ำเลี้ยงและเซลล์ โดยสายพันธุ์ TE 11-1 DP (เซลล์) ให้ผลการต้านขนาดใหญ่ที่สุด ซึ่งไม่มีสารสกัดหยาบที่สกัดจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ใดสามารถต้านเชื้อ *P. aeruginosa* และ *E. coli* ได้ จะพบว่าสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบทั้งอยู่ในส่วนของทั้งส่วนของน้ำเลี้ยงและเซลล์จำนวน 4 สายพันธุ์ เฉพาะส่วนน้ำเลี้ยงจำนวน 3 สายพันธุ์ และส่วนเซลล์ จำนวน 3 สายพันธุ์

สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) ที่ทดสอบได้ 2 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis* และ *S. aureus* และ แบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) ได้แก่ *V. alginolyticus* เพียงชนิดเดียว

เอกสารอ้างอิง

- ชุดิวรรณ เดชสกุลวัฒนา , สิริสุข จินตสุนทรจุไรและสุเมตต์ ปุจฉาการ. (2544). การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง
จุลินทรีย์โดยแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำบางชนิดในจังหวัดชลบุรี
คุณิ ชนะบริพัฒน์. (2546). จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร.(2551). สัตว์น้ำไม่มีกระดูกสันหลัง. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
ฤทธิ์รงค์ พรหมมาศ, พงษ์เทพ วิไลพันธ์ และพันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธ์. 2548. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสาร
ยับยั้งจุลินทรีย์จากฟองน้ำทะเล. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
บพิศ จารุพันธุ์, นันทพร จารุพันธุ์. (2547). สัตววิทยา. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
บัญญัติ สุขศรีงาม. (2534). จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
ยุพิน สังวรินทะ, สุภินันท์ อัญเชิญ, พงศ์ วนิเกียรติ และนพมาศ วงศ์วิทย์เดชา.(2538). เภสัชวิทยา.
กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล
มัทนา แสงจินดาวงษ์. (2527). จุลชีววิทยาประมง. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง, คณะประมง,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (หน้า 12 – 18)
ศิริเพ็ญ สุภทราวัฒน์. (2552). สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขั้นต่ำ. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
Austin, B. (1988). Marin Microbiology Massachusetts: Cambridge University Press. 222p.
Bultel-Ponce, Vale'rie., Debitus, Ce'cile., Berge, Jean-Pascal., Cerceau, Claude., and Guyot, Miche'le.
(1999). Metabolites from the sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. Journal of Marine
Biotechnology. 6: 233-236.
Bultel-Ponce, Vale'rie., Berge, Jean-Pascal., Debitus, Ce'cile., Nicolas, Jejun-Louis., and Guyot, Miche'le.
Metabolites from the Sponge-Associated Bacterium *Pseudomonas* Species
Clive R. Wilkinson, Nowak, M., Austin, B and Rita R. Cowell . (1981). Specificity of bacterial
symbionts in Mediterranean and Great Barrier Reef sponges. Microbial Ecology, 7: 13 - 21
Chelossi, E., Milanese, M., Milano, A., Pronzato, R., Riccardi, G., (2004). Characterisation and
antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae) .
Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 309 : 21– 33
De Rosa, S., Milone, A., Kujumgiev, A., Stefanov, K., Nechev, I., Popov. (2000). Metabolites from
a marine bacterium *Pseudomonas/Alteromonas*, associated with the sponge *Dysidea*
fragilis. Comparative Biochemistry and Physiology. 126: 391 – 396.

- Gokulkrishnan, K., Kusuma, S., and Boopalan, Kamala. 2011. Antimicrobial Activity of Marine Bacteria Isolated from the Mangalore Coast, West Coast of India. *Recent Research in Science and Technology*. 3 : 15-17.
- Hosny, Alaa El Din M.S., Sheir, Donia Hosni., Eldewany, Ahmed I. 2011. Production of Antimicrobial Agent from Marine Bacteria Isolated from Mediterranean. *Australian Journal of Basic and Applied Science*. 5: 121-128.
- Jayatilake, G. S.,Thomton,M.P.,Leonard,A.C.,Grimwade,J.E.and Baker,B.J.(1996).Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium,*Psudmonas aeruginosa*. Journal Natural Product. 59:293-296
- Kanagasabhapathy,M., Sasaki,H., Kazuhiko , N., Nagata, K and Nagata,S. (2005).Inhibition Activities of Surface Associated Bacteria Isolated from the Marine Sponge *Pseudoceratina purpurea*. Microbes and Environments :178-185
- Kennedy, J., Baker, P., Piper,C.,Paul, D., Cotter , Walsh, M., Marlies ,J., Mooij., Marie,B., Bourke., Mary, C., Rea ., Paula ,M., O'Connor ., R. Paul Ross ., Hill ,C., Fergal O'Gara ., R ,Julian., Marchesi ., D ,Alan., W. Dobson. (2009).Isolation and Analysis of Bacteria with Antimicrobial Activities from the Marine Sponge *Haliclona simulans* Collected from Irish Waters. Mar Biotechnol. 11: 384-396
- Kijjoa, A., Watanadilok, R., Campos, N., Nascimento, M.S.J., Pinto, M. and Herz, W. 2007. Anticancer activity evaluation of kuanoniamines A and C isolated from the marine sponge *Oceanapia sagittaria*, collected from the Gulf of Thailand. *Mar. Drugs*, 5, 6-22.
- Mitova, Maya., Tommonaro, Giuseppina., and De Rosa, Salvatore.(2003). A Novel Cyclopeptide from a Bacterium Associated with the Marine Sponge *Ircinia muscarum*. *Z. Naturforsch.* 58c:740-745.
- Ocky,R.K.,Sabdon,A.,Junaidi and Zocchi,E. (2007).Richness of Secondary Metabolite- Producing Marine Bacteria Associated with Spong *Haliclona sp*.*International. Journal of Pharmacology*. 3:275-279
- Oclarit , M.J. , Ohta, S., Kamimura, K.,Yamacka , Y. and Ikegami, S. (1994). Production of an antibacterial agent ,O-Aminophenol , by bacterium isolated from the marine sponges *Adosia sp*. Fisheries Science. 60:559 - 562
- Preecha, P., Matsunaga, S., Fusetani, N., Chaitanawisuti, N., Kritsanapuntu, S., Menasveta, P. 2003. **Mycaperoxide H, a new cytotoxic norsesterterpene peroxide from Thai marine sponge *Mycale* sp.** *J. Nat. Prod.* 66, 289-291.

- Stierle, A.C., Cardellina II, J.H. and Singleton, F.L. 1988. A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia* 44 : 1021.
- Watanadilok, R., Sawangwong, P., Rodrigues, C., Cidade, H., Pinto, M., Pinto, E., Silva, A. and Kijjoa, A. 2007. Antifungal activity evaluation of the constituents of *Haliclona baeri* and *Haliclona cymaeformis*, collected from the Gulf of Thailand. *Mar. Drugs* 5, 40-51.
- Wichels, A., Biel, S. S., Gelderblom, H. R., Brinkhoff, T., Muyzer, G., Schütt, C. (1998). Bacteriophage diversity in the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 : 4128–4133
- Xue, S., Zhang H. T., Wu, P.C., Zhang, W., and Yuan, Q., (2004). Study on bioactivity of extracts from marine sponges in Chinese Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 298 : 71-78
- Zheng, L., Chen, H., Han, X., Lin, W. and Yan, X. (2005). Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium NJ6-3-1 associated with the sponge *Hymeniacidon perleve*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 201-206
- Zheng, L., Han, X., Chen, H., Lin, W., and Yan, X. (2005). Marine bacterium associated with marine macroorganisms: the potential antimicrobial resources. *Annals of Microbiology*. 55: 119-124.

การเผยแพร่ผลงานวิจัย
ในระดับชาติและนานาชาติ

Antibacterial Activity from Sponge-associated Bacteria Collected from northern to western coast of Tao Island, Suratthani Province

Chutiwan Dechsakulwatana

*Institute of Marine Science, Burapha University, Saensuk, A. Muang, Chonburi Province
20131, Thailand
Email:chutiwan@buu.ac.th*

Abstract

More than 70% of the Earth's surface cover with the seas, marine derived microbial natural products have been largest and many unique microorganisms, which produce biological active compounds to adapt to particular environmental conditions. For examples, antibiotics are secondary metabolites of biosynthetic pathways in microorganisms. The aim of this study was to screening of antibacterial activity from sponge-associated bacteria. A total of 197 isolates from 33 sponges collected from northern to western coast of Tao Island, Suratthani Province were screened for antibacterial activity using disc diffusion agar assay. The result showed that 21 isolated bacteria(about 10.6%) exhibited antagonistic activity against the test bacteria, gram positive bacteria, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and gram negative bacteria, *Vibrio alginolyticus* and/or *Escherichia coli*. Among them, 3 isolates, T55 H 1-6, T55 J 2-7, and T55 J 2-6 showed high antibacterial activity against to all test gram positive- and gram negative bacteria. These isolates were identified as *Pseudoalteromonas* spp. and *Pseudomonas* sp. respectively. In further study, culture supernatant and cell pellets were extracted with ethyl acetate and mix solvents of methanol and chloroform (ratio 2:1) then both extracted fractions were evaporated by Rotary vacuum evaporator. Only ethyl acetate extracts indicated the high potential antibacterial activity from confirmed assay against test bacteria, *B. subtilis*, *S. aureus* and *V. alginolyticus*. The results obtained in this study suggest that sponge-associated bacteria may be an interesting source for discovery of antibacterial agents.

Keywords: sponge-associated bacteria, antibacterial activity,

☒ Poster presentation

☐ Oral presentation

Antibacterial Activity from Sponge-associated Bacteria Collected from northern to western coast of Tao Island, Suratthani Province

Chutiwan Dechsakulwatana
Institute of Marine Science, Burapha University,
e-mail: chutiwan@bua.ac.th

Abstract

More than 70% of the Earth's surface cover with the seas, marine derived microbial natural products have been largest and many unique microorganisms, which produce biological active compounds to adapt to particular environmental conditions. For examples, antibiotics are secondary metabolites of biosynthetic pathways in microorganisms. The aim of this study was to screening of antibacterial activity from sponge-associated bacteria. A total of 197 isolates from 33 sponges collected from northern to western coast of Tao Island, Suratthani Province were screened for antibacterial activity using disc diffusion agar assay. The result showed that 21 isolated bacteria (about 10.6%) exhibited antagonistic activity against the test bacteria, gram positive bacteria, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and gram negative bacteria, *Vibrio alginolyticus* and/or *Escherichia coli*. Among them, 3 isolates, T55 H 1-6, T55 J 2-7, and T55 J 2-6 showed high antibacterial activity against to all test gram positive- and gram negative bacteria. These isolates were identified as *Pseudodalteromonas* spp. and *Pseudomonas* sp. respectively. In further study, culture supernatant and cell pellets were extracted with ethyl acetate and mix solvents of methanol and chloroform (ratio 2:1) then both extracted fractions were evaporated by Rotary vacuum evaporator. Only ethyl acetate extracts indicated the high potential antibacterial activity from confirmed assay against test bacteria, *B. subtilis*, *S. aureus* and *V. alginolyticus*. The results obtained in this study suggest that sponge-associated bacteria may be an interesting source for discovery of antibacterial agents.

Introduction

Marine organisms and their associated microorganisms are improved promising to produce several novel products that have potentially application in medicine, in food and cosmetics. The potential of these products is tremendous investigation. Recently, the bioprocess of several marine organisms are improved. A large number of bioactive compounds / lead compounds that have potential to become drugs candidate have been isolated from sponges and their associated microorganisms. Out of screening on 15,000 natural marine products, Currently, 45 marine derived natural products are tested in preclinical and clinical trials (Faulkner, 2000; Newman et al., 2004). In addition, Thai waters also has potential to develop because of their geological connect to Indian Ocean and Pacific Ocean that supply diversity of marine organisms. Currently, several Thai sponges and their associated bacteria have the potential activity against test microorganisms, tuberculosis tumor and cancer cell lines (Kijjoo et al., 2007; Watanadilok et al., 2007; Rungprom et al., 2008; Dechsakulwatana et al., 2007). In this paper, Thai sponge and their associated bacterial extracts are approached on antibacterial and cytotoxic activity.



Results and Discussions

Collection of sponges and Isolation of marine associated bacteria

In this study, a total of 33 sponge samples were collected the northern to western coast of Tao Island, Suratthani Province, Thailand and 197 bacterial strains were isolated from sponges. Viable count ranged from 2.0×10^3 to 8.6×10^6 CFU/g (Table 1).

Antibacterial assay

The results indicated that 21 bacterial strains showed antibacterial activity against the test gram positive bacteria: *Bacillus subtilis* or *Staphylococcus aureus* while only 7 samples showed activity against gram negative *Vibrio alginolyticus* and/or *Escherichia coli*. Among them, 3 active isolates T55 H 1-6, T55 J 2-6, and T55 J 2-7R exhibited wild spectrum highly activity against all test bacteria. Then each active strain was cultured again and extracted in both partials, cell pellets was sonicated and extract with mix solvents of chloroform/methanol (1:2) and cultured broth with ethyl acetate. Out of the 21 extracts of active isolates, 15 showed stability of antibacterial activity. And 4 isolates those indicated on the fraction of ethyl acetate extractions at the minimum concentration 250 mcg/disc stills exhibited high activity against test bacteria *B. subtilis*, *S. aureus* and/or *V. alginolyticus* which were summarized in Table 1. In addition this study has 4 isolates, T55 F 3-2, T55 H 1-6Bk, T55 J 2-6, and T55 J 2-7R against *E. coli* which are summarized in Table 2. These results will be guided to further study on cytotoxicity test against tumor and cancer cell lines.

Identification of 3 active bacteria T55 H 1-6, T55 J 2-6, and T55 J 2-7R are gram negative, with will further be apply to 16S rRNA gene sequence *Eubac27F* 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' and *Eubac1492R* 5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'.

In conclusion, this study has approved the promising of potential of antibiotics producing by sponge-associated bacteria.

Table 1 Viable count of sponge-associated bacteria

Code	Sponge	Common name	Colony forming unit/gram	Colony type
T55 H 1-6	<i>Halichondria</i> sp.	ฟองน้ำชนิดสีเหลืองเข้ม	9.0×10^5	7
T55 J 2-6	<i>Pseudoceratina</i> sp.	ฟองน้ำกิ่งสีเหลือง	3.11×10^6	6
T55 J 2-7R	<i>Pseudoceratina</i> sp.	ฟองน้ำกิ่งสีเหลือง	3.11×10^6	8
T55 JF2-3Y	<i>Petrosia hoeksemai</i>	ฟองน้ำสีน้ำตาล	1.64×10^5	5
T55 E 1	<i>Petrosia hoeksemai</i>	ฟองน้ำสีน้ำตาล	2.0×10^3	5

Table 3 Antibacterial activity

Bacteria (extract)	Sponge	Antibacterial Test (µg / ml)			
		BS	SA	VA	EC
T55 H 1-6	<i>Halichondria</i> sp.	23.0	16.1	15.5	16.5
T55 J 2-6	<i>Pseudoceratina</i> sp.	19.5	20.0	19.5	18.0
T55 J 2-7R	<i>Pseudoceratina</i> sp.	22.1	18.0	15.5	16.0
T55 JF2-3Y	<i>Petrosia hoeksemai</i>	-	-	18.0	18.5

References

- [1] Faulkner, D.J., Harper, M.K., Haygood, M.G., Saloman, C.E., and Schmidt, E.W. 2000. Symbiotic bacteria in sponges: Sources of bioactive substances. In *Drugs From the Sea* (Fusetani, N., ed), pp. 107 - 119. Karger, Basel, Switzerland.
- [2] Proksch, P., Ederada, R.A., and Ebel, R. 2002. Drugs from the Seas-current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 125-134.
- [3] Anand, T.P., Bhat, A.W., Shouche, Y.S., Roy, U., Siddharth, J., and Sarma, S.P. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the coast of south east India. *Microbiol. Res.* 161: 252-262.
- [4] Radjasa, O.K., Martens, T., Grossart, H.P., Brinkhoff, T., Sabdono, A., and Simon, M. 2007. Antagonistic activity of marine bacterium *Pseudodalteromonas luteoviolacea* TAB4.2 associated with coral *Acropora* sp. *J. Biol. Sci.* 7:239-246.

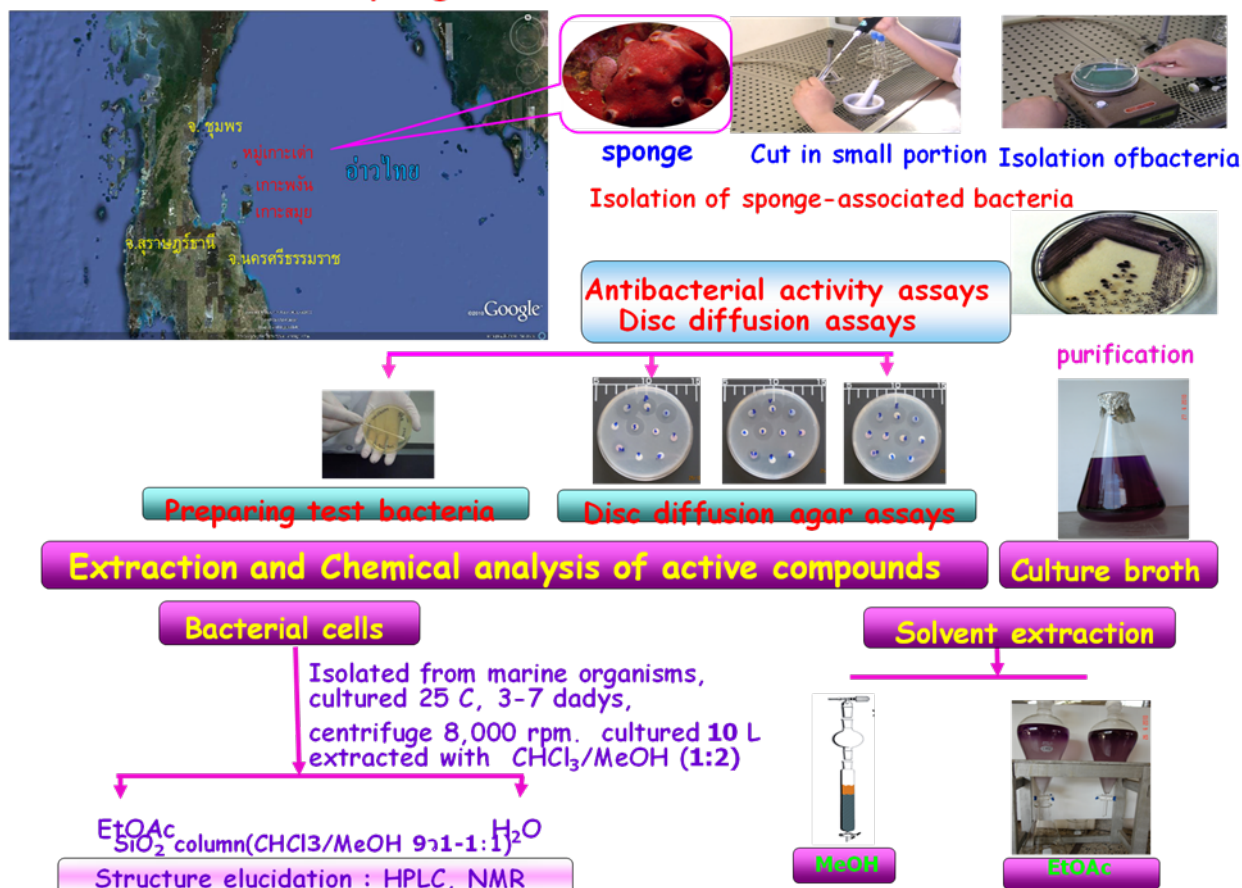
Acknowledgement: This project was supporting by National Research Council of Thailand and Center of Excellence for Innovation in Chemistry trough the fiscal budget.

Introduction

Marine organisms and their associated microorganisms are improved promising to produce several novel products that have potentially application in medicine, in food and cosmetics. The potential of these products is tremendous investigation. Recently, the bioprocess of several marine organisms are improved. A large number of bioactive compounds / lead compounds that have potential to become drugs candidate have been isolated from sponges and their associated microorganisms. Out of screening on 15,000 natural marine products, Currently, 45 marine derived natural products are tested in preclinical and clinical trials (Faulkner, 2000; Newman et al., 2004). In addition, Thai waters also has potential to develop because of their geological connect to Indian Ocean and Pacific Ocean that supply diversity of marine organisms. Currently, several Thai sponges and their associated bacteria have the potential activity against test microorganisms, tuberculosis tomor and cancer cell lines (Kijjoa et al., 2007; Watanadilok et al., 2007; Rungprom et al., 2008; Dechsakulwatana et al., 2007). In this paper, Thai sponge and their associated bacterial extracts are approached on antibacterial and cytotoxic activity.

Materials and Methods

Isolation and Screening with antibacterial activity from sponge-associated bacteria



Materials and Methods

Isolation and Screening with antibacterial activity from sponge-associated bacteria

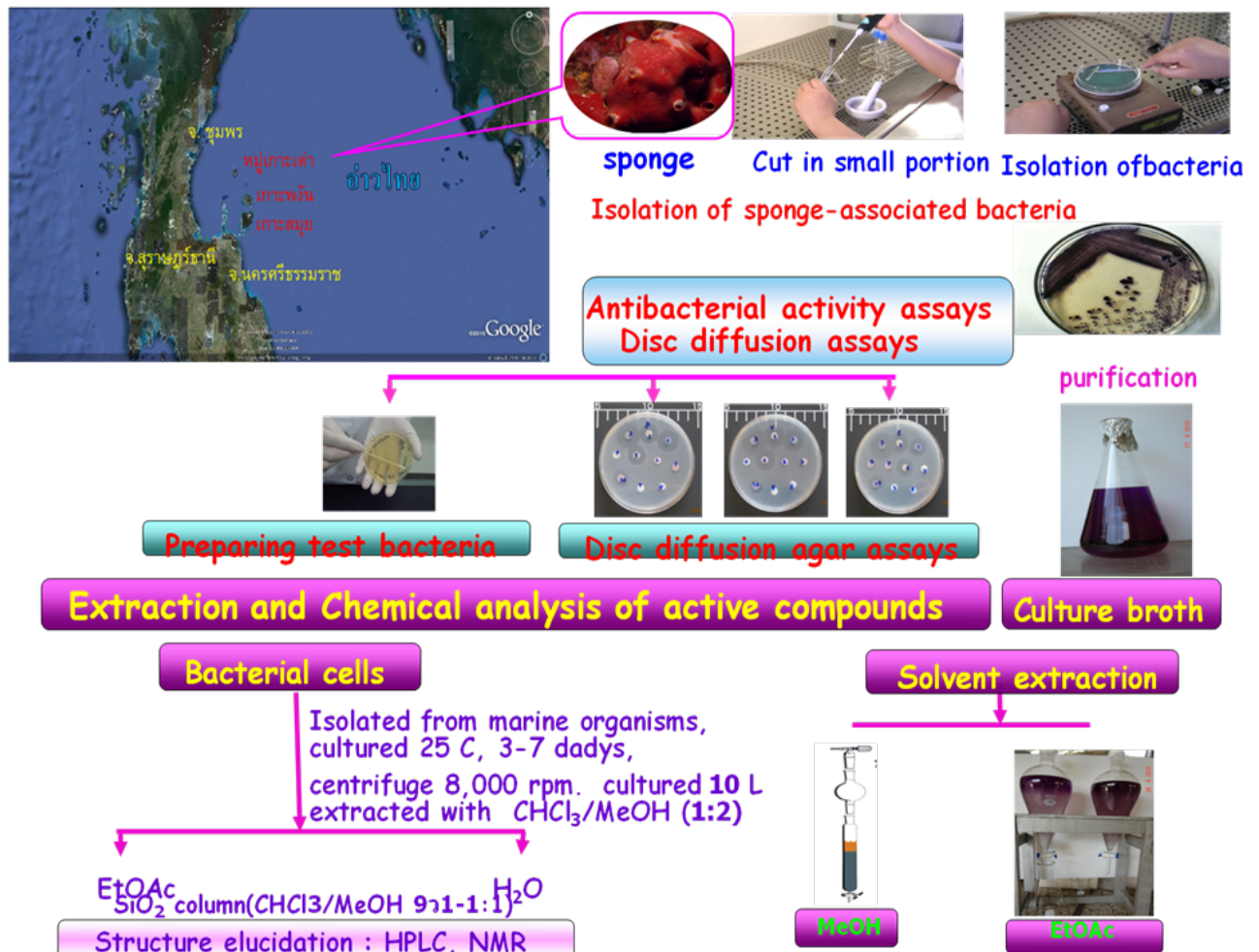
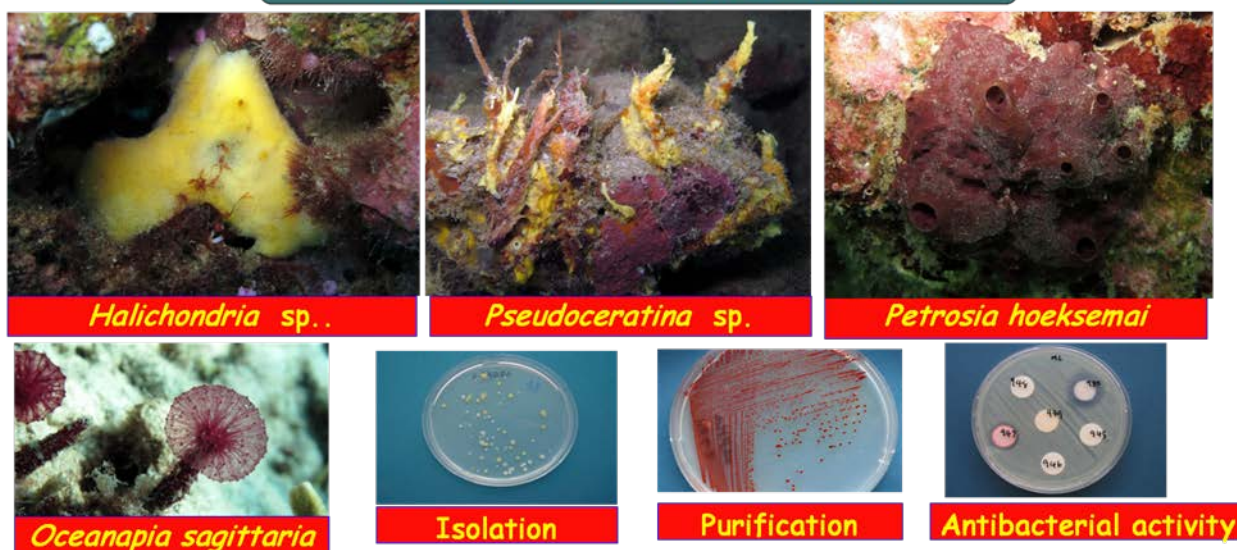


Table 1 Viable count of sponge-associated bacteria

Code	Sponge	Common name	Colony forming unit/gram	Colony type
T55 H 1-6	<i>Halichondria</i> sp.	ฟองน้ำเคลือบสีเหลืองนํม	9.0×10^5	7
T55 J 2-6	<i>Pseudoceratina</i> sp.	ฟองน้ำกิ่งสีเหลือง	3.11×10^6	6
T55 J 2-7R	<i>Pseudoceratina</i> sp.	ฟองน้ำกิ่งสีเหลือง	3.11×10^6	8
T55 JF2-3V	<i>Potrasia hooksemai</i>	ฟองน้ำกิ่งสีเทา	1.64×10^5	5
T55 E 1	<i>Potrasia hooksemai</i>	ฟองน้ำกิ่งสีเทา	2.0×10^5	5

Results and Discussions



Results and Discussions

Collection of sponges and Isolation of marine associated bacteria

In this study, a total of 33 sponge samples were collected the nothern to western coast of Tao Island, Suratthani Province, Thailand and 197 bacterial strains were isolated from sponges. Viable count ranged from 2.0×10^3 to 8.6×10^6 CFU/g (Table 1).

Antibacterial assay

The results indicated that 21 bacterial strains showed antibacterial activity against the test gram positive bacteria; *Bacillus subtilis* or *Staphylococcus aureus* while only 7 samples showed activity against gram negative *Vibrio. alginoliticus* and/or *Escherichia coli*. Among them, 3 active isolates T55 H 1-6, T55 J 2-6, and T55 J 2-7R exhibited wild sprectrum highly activity against all test bacteria. Then each active strain was cultured again and extracted in both partials, cell pellets was sonicated and extract with mix solvents of chloroform/methanol(1:2) and cultured broth with ethyl acetate. Out of the 21 extracts of active isolates, 15 showed stability of antibacterial activity. And 4 isolates those indicated on the fraction of ethyl acetate extractions at the minimum concentration 250 mcg/disc stills exhibited high activity against test bacteria *B. subtilis*, *S. aureus* and /or *V. alginoliticus* which were summarized in Table 1. In addition this study has 4 isolates, T55 F 3-2, T55 H 1-6Bk, T55 J 2-6, and T55 J 2-7R against *E. coli* which are summarized in Table 2. . These results will be guided to further study on cytotoxicity test against tumor and cancer cell lines.

Identification of 3 active bacteria T55 H 1-6, T55 J 2-6, and T55 J 2-7R are gram negative, with will further be apply to 16S rRNA gene sequence Eubac27F 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' and Eubac1492R 5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'.

In conclusion, this study has approved the promising of potential of antibiotics producing by sponge-associated bacteria.

Table 3 Antibacterial activity

Bacteria (extract)	Sponge	Antibacterial Test (μg / ml)			
		<i>BS</i>	<i>SA</i>	<i>VA</i>	<i>EC</i>
T55 H 1-6	<i>Halichondria</i> sp.	23.0	16.1	15.5	16.5
T55 J 2-6	<i>Pseudoceratina</i> sp.	19.5	20.0	19.5	18.0
T55 J 2-7R	<i>Pseudoceratina</i> sp.	22.1	18.0	15.5	16.0
T55 JF2-3Y	<i>Petrosia hoeksemai</i>	-	-	18.0	18.5

References

- [1] Faulkner, D.J., Harper, M.K., Haygood, M.G., Saloman, C.E., and Schmidt, E.W. 2000. Symbiotic bacteria in sponges: Sources of bioactive substances. In *Drugs From the Sea* (Fusetani, N., ed), pp. 107 - 119, Karger, Basel, Switzerland.
- [2] Proksch, P., Edrada, R.A., and Ebel, R. 2002. Drugs from the Seas-current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 125-134.
- [3] Anand, T.P., Bhat, A.W., Shouche, Y.S., Roy, U., Siddharth, J., and Sarma, S.P. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of south east India. *Microbiol. Res.* 161: 252-262.
- [4] Radjasa, O.K., Martens, T., Grossart, H.P., Brinkoff, T., Sabdono, A., and Simon, M. 2007. Antagonistic activity of marine bacterium *Pseudalteromonas luteoviolacea* TAB4.2 associated with coral *Acropora* sp. *J. Biol. Sci.* 7:239-246

Acknowledgement: This project was supporting by National Research Council of Thailand and Center of Excellence for Innovation in Chemistry through the fiscal budget.

ฤทธิ์ทางชีวภาพและการประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ

; ชุตีวรรณ เดชสกุลวัฒนา¹; ปรีชา ภูวไพโรศศิริศา²; วรพจน์ สุนทรสุข³; วิชัย รุ่งตระกูล⁴;
¹มหาวิทยาลัยบูรพา ²จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ³มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
ธนบุรี ⁴มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

รงควัตถุชีวภาพ (สารสี) มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ยาและเครื่องสำอาง จุลินทรีย์สามารถเป็นแหล่งผลิตรงควัตถุชีวภาพเช่นกัน โดยเฉพาะยีสต์ *Rhodotorula* spp. หรือเชื้อรา *Monascus* spp. แบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลก็เป็นแหล่งผลิตรงควัตถุชีวภาพที่น่าสนใจและเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง แบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลจำนวน 19 สายพันธุ์จาก 24 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตสีเหลือง ส้ม แดงและน้ำตาลบนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Modified Zobell agar) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบและมีรูปร่างเป็นท่อน ที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลและผลิตรงควัตถุได้ 8 สายพันธุ์ พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Methylobacterium mesophilicum*, *Chryseomonas luteola*, *Pseudomonas luteola*, *Moraxella* sp., *Burkholderia cepacia*, และ *Vibrio vulnificus* ซึ่งหลังจากการเลี้ยง 7-10 วัน แบคทีเรียดังกล่าวผลิตเบต้า-แคโรทีนในอาหาร Modified Zobell 0.14-0.81 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ารงควัตถุชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย MAK08-4 และ CHOB06-6 คาดว่าเป็นแคโรทีนอยด์ชนิด แอสต้าแซนทินและ/หรืออนุพันธ์ของแคโรทีนอยด์ สำหรับแบคทีเรีย CHOB 04-1 และ KODA19-6 คาดว่าเป็นแคโรทีนอยด์ชนิด เบต้า-แคโรทีนและแอสต้าแซนทิน

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากฟองน้ำที่เก็บจากบริเวณเกาะบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก จำนวน 44 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลที่มีลักษณะและสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกันทั้งสิ้น 551 สายพันธุ์ เมื่อทำการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลที่ได้จากฟองน้ำจำนวน 35 ตัวอย่าง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ โดยมี 35 ตัวอย่างสามารถยับยั้งแบคทีเรีย กรัมนบวกคือ *Micrococcus luteus* ATCC9341 และ/หรือ *Bacillus subtilis* ATCC6633 ได้ดี ส่วนแบคทีเรียกรัมนบนั้นก็มีเพียง 3 ตัวอย่าง มีประสิทธิภาพยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Vibrio. alginoliticus* หรือ *Escherichia coli* ATCC 25922 ส่วนประสิทธิภาพของแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมพบว่ามี 23 สายพันธุ์ ที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย กรัมนบวกที่ทดสอบ *B. subtilis* และ *M. luteus* และมีเพียง 10 สายพันธุ์เท่านั้นที่ยับยั้งแบคทีเรียกรัมนลบ *P. aeruginosa* และ *V. alginoliticus* และจากการนำสารสกัดจากส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยเอธิลอะซิเตตและส่วนของเซลล์ที่สกัดด้วยเมทานอลผสมคลอโรฟอร์มของแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis*, *M. luteus* และ *V. alginoliticus* สารสกัดจากแบคทีเรียไปทดสอบการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง/เนื้องอก P388, KB, MCF-7, Lu-1, และ ASK โดยตรวจผลกับสาร MTT พบว่ามีแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์มีฤทธิ์ยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นที่ $IC_{50} < 4$ ถึง 15 ไมโครกรัม/ม.ล

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Modified Zobell Medium มีองค์ประกอบต่อลิตรดังนี้

1.1 Proteose peptone No. 3 (DIFCO)	1	กรัม
1.2 Yeast extract	1	กรัม
1.3 Phytone(BBL)	0.5	กรัม
1.4 Sodium thiosulfate	0.2	กรัม
1.5 Sodium sulfite	0.05	กรัม
1.6 2% Ferric citrate	1	มิลลิลิตร
1.7 น้ำทะเล	900	มิลลิลิตร
1.8 น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับ pH 7.6 ± 1

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร กวนส่วนผสมทั้งหมดให้ละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ให้ได้ตามที่ต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaCl) และกรดไฮโดรคลอริก(HCl) เมื่อได้ pH ที่ต้องการแล้วเติม agar กรณี Modified Zobell agar plate ใส่ agar 1.5 % ส่วนที่ใช้เป็น stock เก็บเชื้อ ใส่ agar 0.3 % กวนส่วนผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วให้ความร้อนจน agar ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปมาเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที