บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การศึกษาบทบาทศักยภาพของจุลชีพ /แบคทีเรียทะเลที่สำคัญต่อระบบเวศน์ในทะเล ในการผลิตสารเมตาบอไลต์ ได้กลายเป็นหัวข้อการวิจัยใหม่ที่สำคัญในปัจจุบัน(Faulkner, 2000) จากการค้นคว้าวิจัยหลาย ๆ โครงการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารปรกอบเคมีที่น่าสนใจเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ (Barsby et al., 2001; Chelossi et al., 2004.; Hardt et al., 2000) โดยส่วนใหญ่ความสนใจจะมุ่งเน้นที่การวิจัยจุลินทรีย์ทั้งจากตะกอนดินบริเวณชายฝั่งและทะเลลึก แบคทีเรียทะเลสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและ/หรือสารยับยั้งการลงเกาะของเพรียง antifouling(Holmstrom and Kjelleberg, 1999; De Rosa et al., 2000; Egan et al., 2000; Dechsakulwaatana et al, 2002) ซึ่ง Wilkinson (1978) ทั้งสารเคมีและ/หรือทางกายภาพภายในฟองน้ำที่เกี่ยวข้องกับมวลชีวภาพของจุลินทรรีย์มากถึง 40 % (Vacelet, 1975; Wilkinson, 1978 a;b; Berthold, et al., 1982)

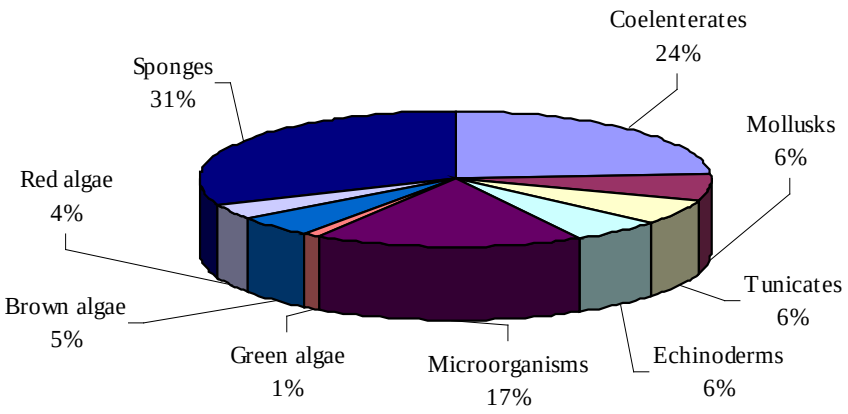
จากการที่จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน บางพวกอยู่อย่างเสริมกัน(Benevolent interaction) ขณะที่ บางพวกอาจอยู่อย่างต่อต้านกัน(Antagonistic interaction) ส่วนอีกหลายๆ พวกอยู่อย่างอิสระไม่เกี่ยวข้องกัน การที่จุลินทรีย์บางอย่างสามารถสร้างสารที่ต้านการเจริญของจุลินทรีย์พวกอื่นๆได้ จะใช้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการแตกของเซลล์ที่ตายแล้วสำหรับใช้ในการรอดชีวิต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

ปัญหาสำคัญของนักเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลที่ไม่อาจปฏิบัติได้ก็คือปริมาณของเมตาบอไลต์จากสัตว์ทะเลเช่น ฟองน้ำ ที่จะตอบสนองต่อการพัฒนาทางเภสัชกรรม การเก็บเกี่ยวจากธรรมชาติดูเหมือนจะสวนทางกับการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพในโลกปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงฟองน้ำยังคงประสบความสำเร็จน้อย ในขณะเดียวกันความพยายามที่จะแสวงหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ เพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัช ซึ่งสามารถทดแทนแหล่งใหม่ได้ และสามารถรักษาประชากรของฟองน้ำในธรรมชาติไว้ได้ อีกทั้งในอนาคตความก้าวหน้าทาง พันธุวิศวกรรมของ นาโนเทคโนโลยีชีวภาพ(Nanobiotechnology) จะสามารถช่วยให้ทราบถึง DNA ที่เป็นตัวรหัสสำคัญในการสังเคราะห์ทางชีวภาพ สามารถนำส่วนของยีนส์นั้นถ่ายสู่ DNA ของ *Escherichia coli* หรือแบคทีเรียอื่นๆ ได้ และสร้างแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาและค้นหากลไกของจุลินทรีย์ในการสร้าง สารออกฤทธิ์ชีวภาพของฟองน้ำ และนำไปสู่การโคลนนิ่ง DNA ต่อไป (Faulkner, *et al*.,2000)

มนุษย์สามารถที่จะนำปรากฏการณ์นี้มาใช้ประโยชน์ สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นในช่วงที่เริ่มหยุดการเจริญจะมีประโยชน์ เพราะยับยั้งการสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่บางชนิดในเซลล์ได้ จึงช่วยรักษาพลังงานส่วนหนึ่งไว้ นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์อื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นนี้จะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดลงได้ ประโยชน์ของยาปฏิชีวนะที่ดัดแปลงมาจากสารเมตาบอไลท์ที่จุลินทรีย์บางชนิดผลิตขึ้นนั้น จะมีอาการแพ้ยาหรือเป็นอันตรายต่อมนุษย์น้อยมาก สารเมตาบอไลท์เหล่านี้มีประโยชน์ในด้านต่างๆมากมายทั้งด้านอุปโภค บริโภค และอุตสาหกรรม

โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการแพทย์อาจใช้รักษาโรคติดเชื้อ หรือรักษาโรคอื่น เช่น เพื่อรักษาโรคมะเร็ง หรือใช้ในงานวิจัยเพราะมีพิษสูงเกินกว่าที่จะใช้ในร่างกาย (มาลิน, 2540) ในการผลิตยาปฏิชีวนะที่จะนำมาใช้ได้นั้น จำเป็นต้องมีคุณสมบัติหลายประการ เช่น ไม่ควรมีพิษ ไม่ตกตะกอนโปรตีนในซีรั่ม ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัว ไม่ควรมีฤทธิ์ข้างเคียงหรือมีน้อยที่สุด ในปัจจุบันยังไม่มียาปฏิชีวนะใดที่มีคุณสมบัติดีทุกด้าน ทำให้งานการค้นหาตัวยาใหม่ๆ ยังมีความจำเป็น อย่างไรก็ตามการผลิตยาปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์มีข้อดี คือ 1. สามารถปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้ 2. สามารถปรับปรุงสภาแวดล้อมในการเจริญของจุลินทรีย์ 3. สามารถปรับปรุงและควบคุมสภาวะในการผลิตสารของจุลินทรีย์ เป็นต้น (มาลิน, 2540)

จากความน่าสนใจทางเคมีและชีวภาพของสารทุติยภูมิอย่างมีนัยสำคัญ จุลินทรีย์ทะเลที่เป็นที่คาดหวังว่าจะทำหน้าที่เป็นผู้ผลิตสารที่นำไปสู่การพัฒนายาที่มีศักยภาพหรือเครื่องมือสำหรับการวิจัยทางเภสัชวิทยาพื้นฐานในวิทยาศาสตร์เพื่อชีวิต การสำรวจสภาพแวดล้อมทางทะเลที่เริ่มต้นของทรัพยากรที่น่าตื่นเต้นในช่วงทศวรรษที่ 1960 เพื่อแยกสารประกอบใหม่ ความสนใจมากมีการคัดแยก การจำแนกและการทำให้สารบริสุทธิ์สำหรับสารชีวเคมีที่มีประโยชน์และใช้ประโยชน์จากสารเหล่านั้นในเรื่องสวัสดิภาพของมนุษย์และการพัฒนา จึงเริ่มต้นการศึกษาของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเหล่านี้ได้มุ่งเน้นไปที่ลักษณะทางเคมีของสารจากสาหร่ายทะเลและสัตว์ macroscopic สัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เพื่อให้ห่างไกลกว่า 3,700 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ได้รับการแยกออกจากกลุ่มเหล่านี้(A.S. Ninawe. http://www.pharmaasia.com/article/marine-natural-products; เข้าถึงเมื่อวันที่ 30 กันยายน 2554) การวิจัยและพัฒนาสารตัวยาจากสิ่งมีชีวิตในทะเลโดยเฉพาะฟองน้ำและจุลินทรีย์ทะเลซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ(ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การกระจายของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลตามกลุ่มไฟลัมต่างๆ ซึ่งในไฟลัมฟองน้ำพบร้อยละ 31 ไฟลัมซีเลนเทอเลตร้อยละ 24 รองลงมากลุ่มจุลินทรีย์ร้อยละ 17 และมีแนวโน้มที่จะพบมากขึ้นเรื่อยๆ (ปรับปรุงจาก Blunt *et al*., 2003,2005)

ต่อมา Xin-Qing Zhao (2011) ได้รายงานและวิเคราะห์ถึงวิสัยทัศน์และศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเลที่ยิ่งใหญ่ในการพัฒนาตัวยาจากสิ่งมีชีวิตในทะเล ทำให้เกิดการวิจัย และแสวงหาตัวยาใหม่ๆ จากทะเล และมีการค้นพบสารประกอบตัวยาใหม่จำนวนมาก ที่เป็นแหล่งของสารตัวยาที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ที่อยู่ในระหว่างการทดสอบทางคลินิคโดยเฉพาะกลุ่มของตัวยาต้านมะเร็งดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากจุลินทรีย์ทะเลทะเลที่อยู่ในระหว่างการทดลองใช้รักษาทางการแพทย์

Metabolites	Source	Activity	Clinical status
Soblidotin(TZT1027) Peptide	Synthetic derivative of dolastatin 10 Isolated from marine cyanobacterium *Symploca* sp. VP642	Anticanceer	Phase III
Plinabulin	Synthetic analog of halimide isolated from the marine fungus *Aspergillus* sp. CNC-139	Anticanceer	Phase II
Bryostatin 1	Identified from bryozoan and also marine symbiotic bacteria *Candidatus Endobuluga sertula*	Anticanceer Anti-Alzheimer	Phase I
Marizomib(salinosporamide A, NPI-0052): Beta-lactone-gamma lactam	Marine actinobacteria *Salinispora arnicola*	Anticanceer	Phase I
Compound 4 (curacin A synthetic derivative	Curacin A was isolated from the marine cyanobacterium *Lygbya majuscula*	Anticanceer	Preclinical

จากการค้นคว้าจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาบทบาทของแบคทีเรียที่ผลิตสารปฏิชีวนะที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล และคุณประโยชน์ทางการแพทย์ของสารที่ต่อต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำตลอดจนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่อาศัยอยู่ในทะเลเพื่อใช้ในการพัฒนาปรับปรุงทำเป็นยารักษาโรคในชั้นสูงต่อไป

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยมากทั้งที่ประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรทางทะเลที่อุดมสมบูรณ์และนักวิจัยชาวต่างชาติพยายามที่จะเข้ามาทำการศึกษาวิจัยในรูปแบบต่างๆ ถึงแม้ว่าจะเริ่มมีหน่วยงานอื่นที่ศึกษาในเรื่องนี้อยู่บ้างแต่จากผลการศึกษาเบื้องต้นของ Kijjoa et al. (2002, 2007) และชุติวรรณและคณะ(2541)พบว่าฟองน้ำชนิดเดียวกันที่เก็บในประเทศไทยสถานที่เดียวกันแต่แตกต่างช่วงเวลา จะให้สารประกอบและแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรที่จะสนับสนุนการศึกษาวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลให้มากยิ่งขึ้น และช่วยกันศึกษาวิจัยหลายๆ หน่วยงานเพื่อเสริมสร้างความเข้มแข็งศักยภาพในการแข่งขันของประเทศและส่งเสริมให้ประเทศไทยได้พึ่งพาตนเองในด้านอุตสาหกรรมยาและผลิตภัณฑ์เคมีได้มากขึ้นและเร็วยิ่งขึ้นทันต่อการพัฒนาประเทศในอนาคตอันใกล้นี้

คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural Products) ฟองน้ำ(sponges) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive metabolites) จุลชีพ/จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่(associated bacteria) แบคทีเรียทะเล(marine bacteria) ฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์ (antimicrobial) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(anti-oxidants) สาร/ยาปฏิชีวนะ(antibiotics) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร(food supplements)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1 เพื่อศึกษาและคัดกรองฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์มาตรฐาน (amtimicrobial activity) จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับ ฟองน้ำทะเล
2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive metabolites) สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง ชนิดต่างๆ โดยสารสกัดแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำบางชนิดที่พบบริเวณชายฝั่งทะเล
3 เพื่อศึกษาถึงความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
4 เพื่อถ่ายทอดความรู้ในการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล

ขอบเขตของโครงการวิจัย

- จากการดำเนินการวิจัยระยะที่ 1 ที่ผ่านมา พบถึงศักยภาพการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ ของทะเลไทย งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการวิจัยเพื่อตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบโดยอาศัยกระบวนทางเคมีและชีวเคมี ในะแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ ในด้านต่างๆเช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) นอกจากนี้ยังพัฒนาในด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ คือ กรดไขมัน ชีวรงควัตถุ โดยในระยะที่ 2 นี้จะมุ่งเน้นการเก็บตัวอย่างฟองน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนล่าง ครอบคลุมพื้นที่บริเวณชายฝั่งทะเลอ่ บริเวณจังหวัด นครศรีธรรมราช และ ประจวบคีรีขันธ์ ดำเนินการเก็บตัวอย่างฟองน้ำ ประมาณ 20 - 50 ตัวอย่าง ในปีที่ 1-3
- จำนวนของเชื้อแบคทีเรียคาดว่าจะคัดแยกได้ประมาณ 200 – 400 สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในโครงการวิจัย
- ดำเนินการตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพ ปีที่ 1-3
- ดำเนินการวิจัยและพัฒนาสารตัวยาตั้งต้น และผลิตภัณฑ์อาหารเสริม
- ร่วมมือวิจัยและพัฒนาสารตัวยาที่น่าสนใจกับเครือข่ายวิจัยของศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านนวัตกรรมทางเคมี
- ถ่ายทอดองค์ความรู้แก่ หน่วยงานรัฐและภาคเอกชนที่สนใจผ่านการฦกอบรมและสัมมนาวิชาการ
- สร้างนักวิจัยใหม่ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะผ่านผู้ช่วยวิจัย การฝึกงานวิจัยแก่นิสิต นักศึกษา และการทำปัญหาพิเศษและวิทยานิพนธ์

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (ให้ระบุขั้นตอนอย่างละเอียด)

- ระยะเวลาทำการวิจัย เป็นเวลา 3 ปี เริ่ม ตุลาคม 2555 ถึง กันยายน 2558

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทฤษฎี กรอบแนวความคิด

จากการศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้จึงเป็นยุทธศาสตร์ของการแยก และการค้นพบสารประกอบใหม่ที่ประสบความสำเร็จของโปรแกรมผลิตภัณฑ์ และสิ่งแวดล้อมในทะเลจากการศึกษาที่นำมาสู่การค้นพบความสัมพันธ์ระหว่างเคโมออโตโทรฟิคแบคทีเรีย (chemoautotrophic bacteria) และสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Cavanaugh et al., 1981; Felbeck et al, 1981; 1983; Southward et al., 1981) การค้นพบนี้ได้ชี้นำสู่ความสำคัญของแบคทีเรียต่อสารอาหาร, การแพร่ กระจาย และการผลิตของสิ่งมีชีวิต (host organisms) และสังคมของมัน (Canvanaugh et al., 1983) ได้นำไปสู่การศึกษายุทธศาสตร์ของการแยกและการค้นพบสารประกอบใหม่ที่ประสบความสำเร็จของโปรแกรมผลิตภัณฑ์ธรรมชาติถูกพัฒนามาสู่จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับสิ่งมีชีวิต และ สิ่งแวดล้อมในทะเล เมื่อศึกษาสรีรวิทยาของฟองน้ำเพิ่มเติมพบว่าภายในประกอบด้วยแบคทีเรียหลายชนิดเป็นปริมาณถึง 40 % ของสิ่งมีชีวิตที่ตรวจพบ (Vacelet, 1975; Wilkinson, 1978 a;b)

บทบาทของจุลิทรีย์ในทะเล ในเรื่องของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาตินั้นอันที่จริงแล้ว Rosenfeld และ ZoBell (1947) เป็นผู้ค้นพบเป็นครั้งแรกว่า แบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมในทะเลสามารถผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียอื่น *Bacillus* และ *Micrococcus* จากนั้นได้มีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านได้สนับสนุนศักยภาพของแหล่งที่ยิ่งใหญ่ของการผลิตเมตาบอไลต์จาก สิ่งแวดล้อมในทะเล และได้กลายเป็นการแสวงหาผลประโยชน์ที่สำคัญยิ่ง (Anderson et al., 1974. Baarn, et al., 1966. Buck et al., 1962; Burkholder et al., 1963, 1966; Krassilnikova, 1961; Skerman et al., 1980) ซึ่งแบคทีเรีย

เหล่านี้ถูกจัดอยู่ในสกุลต่างๆ และแสดงผล ต่อต้านทั้งแบคทีเรียกรัมบวก และแบคทีเรียกรัมลบ (Gauthier, 1966)

Okami (1986) ได้รายงานถึงความสามารถของแบคทีเรียกรัมบวกในการผลิตสารปฏิชีวนะและสาร aminoglycoside ชนิดใหม่ เรียกว่า Istamycin จากจุลชีพ actinomycete ซึ่งแยกได้จากโคลนทะเลใน Sagami Bay ประเทศญี่ปุ่น นอกจากนี้ยังรายงานถึง Polysaccharide ของ marine *flavobacterium* ซึ่งแยกได้จากสาหร่ายทะเล แสดงผลต่อต้าน Sarcoma-180 solid tumor virus (s-180) ด้วย

การศึกษาวิจัยที่ผ่านมายังได้ชี้ให้เห็นว่าบางสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลเช่นฟองน้ำ, coelentrates, gorgonians, ปะการังอ่อนและแข็ง, สาหร่าย, หอย, หรือ protochordates มาจากจุลินทรีย์ symbiotic เช่นแบคทีเรีย, เชื้อรา, สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน, dinoflagellates หรือ haptophytes สารเหล่านี้มีการแสดงที่จะแสดง antitumor, ยาปฏิชีวนะและกิจกรรมทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ สัญญาซื้อขายล่วงหน้าของ dictyotacean สาหร่าย (Spatoglossum schmittii) แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษ spatol melanoma กับมนุษย์และเซลล์ astrocytomat ในวัฒนธรรม Stypopodium เป็นพิษที่มีศักยภาพการผลิตโดย zonale Stypopodium จะปรากฏขึ้นเพื่อยับยั้งความเสียหายจากเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจุลินทรีย์ในทะเลเป็นตัวแทนของแหล่งทรัพยากรที่สำคัญและไม่ได้ใช้สำหรับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่(A.S. Ninawe. http://www.pharmaasia.com/article/marine-natural-products; เข้าถึงเมื่อวันที่ 30 กันยายน 2554)

นอกจากนี้ ชุติวรรณ (Dechsakulwatana, 1994) ได้ศึกษาแยกแบคทีเรีย จำนวนกว่า 200 สายพันธุ์ จากแหล่งต่าง ๆ เช่น จากปะการัง ปะการังอ่อน ฟองน้ำและ น้ำทะเล เป็นต้น จากเกาะ Ishigaki ประเทศญี่ปุ่น และเกาะแสมสาร ในอ่าวไทย นำมาทดสอบ พบแบคทีเรีย 56 สายพันธุ์ แสดงผลในการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* และ/หรือ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มของแบคทีเรียเหล่านี้ จำนวน 10 สายพันธุ์ และ supernatant ของ 12 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนของเพรียงหิน (rock barnacle) อีกด้วย แบคทีเรียทะเลนี้ส่วนใหญ่ ถูกจำแนกชนิดอยู่ในสกุล *Vibrio* และ *Alteromonas*

โดยเมื่อเร็วๆ นี้ เครือข่ายการวิจัยของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ได้แสดงผลให้เห็นถึงศักยภาพของการสร้างนวัตกรรมทางเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของทรัพยากรชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ฟองน้ำ และแบคทีเรียทะเลในอ่าวไทย อาทิเช่น Kijjoa และคณะ (2007) ได้รายงานถึงศักยภาพของสารประกอบที่สกัดจากฟองน้ำจากอ่าวไทยแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง เซลล์มะเร็งได้ดี และเมื่อเร็วๆ นี้ Watanadilok., R. และคณะ(2007) ค้นพบฟองน้ำ 2 ชนิดที่เก็บจากอ่าวไทยแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราและจุลินทรีย์อื่นได้ดีเช่นกัน นอกจากนี้ Rungprom และคณะ (2008) ได้รายงานถึงการค้นพบสารไซคลิกเปปไตด์ ชนิดใหม่ที่สกัดได้จากแบคทีเรียทะเล *Pseudoalteromonas* sp. ที่คัดแยกจากฟองน้ำ *Halisarca ectofibrosa* ที่เก็บจากอ่าวไทยเช่นกัน นอกจากนี้คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าควรที่มีการสนับสนุนให้มีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง เพื่อการวิจัยและพัฒนาต่อยอดการวิจัยอย่างต่อเนื่อง

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยมากทั้งที่ประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรทางทะเลที่อุดมสมบูรณ์และนักวิจัยชาวต่างชาติพยายามที่จะเข้ามาทำการศึกษาวิจัยในรูปแบบต่างๆ ถึงแม้ว่าจะเริ่มมีหน่วยงานอื่นที่ศึกษาในเรื่องนี้อยู่บ้างแต่จากผลการศึกษาเบื้องต้นของ Kijjoa et al. (2002) และชุติวรรณและคณะ(2541, 2550)พบว่าฟองน้ำชนิดเดียวกันที่เก็บในประเทศไทยสถานที่เดียวกันแต่แตกต่างช่วงเวลา จะให้สารประกอบและแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรที่จะสนับสนุนการศึกษาวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลให้มากยิ่งขึ้น และช่วยกันศึกษาวิจัยหลายๆ หน่วยงานเพื่อเสริมสร้างความเข้มแข็งศักยภาพในการแข่งขันของประเทศและส่งเสริมให้ประเทศไทยได้พึ่งพา

ตนเองในด้านอุตสาหกรรมยาและผลิตภัณฑ์เคมีได้มากขึ้นและเร็วยิ่งขึ้นทันต่อการพัฒนาประเทศในอนาคตอันใกล้นี้

เอกสสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 สิ่งมีชีวิตจากทะเลได้กลายเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม (Burkholder, 1963 ; 1968 ; Crescitelli and Geisman, 1962 ; Halstead, 1967 ; 1968 ; Hashimoto, 1979 ; Lane, 1968 ; Nigrelli, 1960 ; Nigrelli *et al*., 1967 ; Russell, 1957 ; Sheuer, 1964 ; Welsh, 1964)

การค้นหาตัวยาใหม่ได้เกิดการแข่งขันสูงมาก โดยเฉพาะทั้งยาต่อต้านไวรัส และต่อต้านมะเร็ง เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งฤทธิ์จะถูกเลือกเฉพาะที่ไม่ทำอันตรายสิ่งมีชีวิต นั้นด้วย ตัวยาใหม่บางตัวเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เป้าหมายในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา คือ สิ่งมีชีวิตจากทะเล อาทิ เช่น ฟองน้ำ กัลปังหา ปะการัง นับแต่นั้นมานักวิจัยทางเคมี และเภสัชกรรมของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้หันมาให้ความสนใจต่อฟองน้ำ

เนื่องจากฟองน้ำได้กลายมาเป็นแหล่งที่ยิ่งใหญ่ของการค้นพบผลิตภัณฑ์เมตาบอไลท์ 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 7 Karns, 1974), สารอัลดาลอยด์ต่อต้านลุดิเมีย prianosin A (Kobayashi *et al*., 1987), สารเปปไตด์ใหม่ : keramamide B-D (Kobayashi *et al*., 1991) สารไธอะโซล-เปปไตด์ใหม่ : keramamide-F (Itagaki *et al*., 1992) สารไซโตทอซิค-เซสคิเทอร์พินอยด์ : metachromines D-H (Kobayashi *et al*., 1992) สารโพลีแซคคาไลด์ใหม่ : theonezolide A (Kobayashi *et al*., 1993)

วนิดา เลาะศิริ และคณะ (1994) ได้ศึกษาพบว่า 40% ของฟองน้ำ 73 ตัวอย่างจากประเทศไทยแสดงผลการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของไข่เม่นทะเลที่ผสมแล้ว ผลการศึกษาการต่อต้านทั้งเชื้อรา และแบคทีเรียก็พบว่าฟองน้ำหลายชนิดมีประสิทธิภาพดังกล่าว

นอกจากนี้แอกทีฟเมตาบอไลต์หลายชนิด สามารถแยกได้จากฟองน้ำเช่นกัน อาทิเช่น สารไซโตทอซิค : kabiramide B และ C, สารปฏิชีวนะแซ สเทอร์ฟีนอยด์ : 6 z Neomanoalide, สารปฏิชีวนะดิเทอร์พีนอยด์ : Kalihinol X, สารเซลดิเทอฟีนนอยด์คินอน

จากการศึกษาของ Nair และ Simidu (1987) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเล ตะกอน แพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนสัตว์ ที่เก็บจากอ่าวSuruga, Sagami และ Tokyo ประเทศญี่ปุ่น รวมทั้งปะการังอ่อนและฟองน้ำที่เก็บจากชายฝั่งประเทศไต้หวัน จำนวนรวมทั้งสิ้น 726 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ 37 สายพันธุ์ แสดงผลการยับยั้งแบคทีเรีย*อื่น 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

เมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา Shigemori และคณะ (1992) ได้อธิบายถึงยุทธศาสตร์ที่สร้างการค้นพบสาร Tetracyclic Alkaloid, Alteramide A จากแบคทีเรีย *Alteromonas* sp. ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ

(*Halichondria okadai*) จากนั้นในปี ค.ศ. 1992 Imamura และคณะ (1993) พบสารปฏิชีวนะที่ชื่อว่า urauchimycins A, B จาก *Streptomyces* sp. ซึ่งแยกได้จากฟองน้ำเช่นกัน

นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

จากการศึกษาของชุติวรรณและคณะ(2541) ที่เก็บตัวอย่างฟองน้ำได้ 68 ชนิด จากบริเวณทั้ง 4 แห่ง คือ เกาะครก จ. ชลบุรี, หมู่เกาะสิมิลัน, หมู่เกาะสุรินทร์ จ. พังงา และหน้าหาดแม่รำพึง จังหวัดระยอง พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกันในฟองน้ำ 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 *Pennicillium crysogenum* เมื่อทำการมาสกัดสารอย่างหยาบทั้งจากส่วนของเซลล์ และส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความสามารถละลายได้ในชั้นของ ethyl acetate และละลายได้ชั้นของน้ำ พบว่า ส่วนของสารสกัดของเซลล์ในชั้นของน้ำ 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 มาทำการแยกแฟรคชั่นด้วย 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

De Rosa และคณะ(2003) ได้รายงานแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ เป็นแหล่งของไซคลิกเปปไตด์ โดยได้คัดแยกแบคทีเรีย 2 ชนิดจากฟองน้ำ*Ircinia variabillis* จากอ่าว Naples ประเทศอิตาลี ทำการสกัด Fatty acid และ cyclic dipeptide จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง

การศึกษาสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรียที่ชุติวรรณ และคณะ (2541, 2550) ได้ศึกษาไว้ในส่วนของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เน้นในกลุ่มของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยใช้กระบวนการทางเคมี ได้ค้นพบสารสำคัญจากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำหลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด และยังมีศักยภาพในการสร้างสารสี(รงควัตถุชีวภาพ) เช่น สาร Violacein(สีม่วง) และ สาร Prodigiosin(สีแดง) และจากการวิจัยของ Thawornwiriyanun., et al. (2009) ได้วิจัยพบแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่เก็บจากอ่าวไทย สายพันธุ์ *Methylobacterium mesophilicum* MAKB 08-4 สร้างรงควัตถุชีวภาพ Astaxanthin เป็นตัวหลักใน Carotenoids ที่มีสีเหลืองส้มที่นิยมใช้เป็นสีผสมอาหาร เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารเหล่านี้มีศักยภาพที่ควรจะพัฒนานำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเวชภัณฑ์และเวชสำอางได้และพบแบคทีเรียจากทะเลหลายสายพันธุ์แนวโน้มสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์น้ำได้คือ *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Micrococcus luteus*, และ *Vibrio anguilarum* จึงน่าที่จะได้มีการทดลองสกัดสารและกระบวนการทดสอบสารที่ได้โดยวิธีทางชีวเคมีควบคู่กันไปกับการศึกษาที่ผ่านมาด้วย ซึ่งเป็นการใช้วิธีการสกัดที่แตกต่างกัน เพื่อให้ได้สารกลุ่มใหม่ที่เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน แล้วทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยใช้แบคทีเรียมาตรฐานและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค อันจะทำให้ได้

ข้อมูลใหม่หรือสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่มีประสิทธิ์ภาพสูงขึ้นหรือมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งแตกต่างจากข้อมูลที่ผ่านมา

ซึ่งเมื่อเร็ว ๆ นี้ Rungprom และคณะ (2008) ได้รายงานถึงการค้นพบสาร cyclic peptide ชนิดใหม่จากแบคทีเรียทะเล *Pseudoalteromonas* sp. ที่คัดแยกจากฟองน้ำของไทย *Halisarca ectofibrosa*

โครงการนี้จะเป็นการวิจัยประยุกต์หาสารตัวยาใหม่ได้สารตั้งต้นและนำไปการพัฒนายารักษาโรคและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่างๆ ที่มีความเป็นได้สูง เป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับทรัพยากรชีวภาพจากทะเลที่มีอยู่ในประเทศ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความก้าวหน้าทางวิทยาการในเรื่องการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลอย่างกว้างขวาง อีกทั้งส่งเสริมให้มีการค้นคว้าตัวยารักษาโรค และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารใหม่ๆ อย่างจริงจัง และยังช่วยพัฒนาเครือข่ายความร่วมมือห้องปฏิบัติการในการทดสอบฤทธิ์ของยา และผลิตภัณฑ์ทางเภสัชวิทยา นอกจากนี้สารสกัด สารบริสุทธิ์ และจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโครงการนี้จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็นต้น ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาตัวยารักษาโรค เป็นแนวทางสู่การแก้ปัญหาที่สำคัญด้านสุขภาพ และส่งผลต่อสังคมสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจเหล่านี้จะถูกนำไปทดสอบทางเภสัชวิทยาด้านพิษวิทยา เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นสารตัวยาตั้งต้น และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในระยะต่อไป

ตารางที่ 1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆที่คัดแยกได้จากฟองน้ำในแหล่งต่างๆ

ชนิด/กลุ่มของแบคทีเรีย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	สารประกอบ	แหล่งที่พบ		อ้างอิง
			ชนิดของฟองน้ำ	บริเวณ	
Bacteria					
Pseudoalteromanas sp.	antimicrobiol	Cyclic peptide	*Harisacar ectofibrosa*	Gulf of Thailand	Rungprom et al, inpres
Micrococcus sp.		diketopiperazines	*Tedania ignis*	Bermudian	Stierle, 1988
		benzothiazoles			
Vibrio sp.		brominated diphenyl	*Dysidea* sp.	Eastern Samoa	Elyakok, 1991
Alteromonas sp.	cytotoxic	macrocyclic lactam alteramide A	*Halikondria okadai*	Kanagawa Bay Japan	Shigemori, 1992
Pseudomonas sp.		C_{50}-corotenoid,okada-xanthin	*Halikondria okadai*	Suruga Bay Japan	Miki 1994
Vibrio sp.	antimicrobiol	7, 7-bis (3-indoly) p-cresol	*Hyattella* sp.		Oclarit 1994
Pseudomonas aeruginosa	antimicrobial	diketopiperazines	Isodictya setifera		Jayatilake, 1996
Pseudomonas/ Alteromonas	antimicrobiol	-	Sponges		Nair & Simidu, 1987
Purple-pigment, Gram negative bacteria	antimicrobial	o-aminophenol	*Adocia* sp.	Nichinan-Ooshima Island, Japan	Oslarit, 1994
Alcaligenies sp.	antimicrobial	Cyclo-tyr-val	*Clathria* sp.	Similan Island, Thailand	Chutiwan, 1998
Pseudoalteromonas luteaviolacea	antimicrobial	Pentabromopseudilin	*Rhabderemia forceppula*	Surin Island, Thailand	Chutiwan, 1998
Flavobacterium	antibacterial	1H-Indole-2, 3-dione	*Niphates* sp.	Surin Island, Thailand	Chutiwan, 1998
Pseudomonas spp.	antibacterial		***Hytios erecta***	Krok Island, Similan Thailand	Chutiwan, 1998
Pseudoalteromonas luteaviolacea	antibacterial, anticancer		***(Tedania) meandrica***	Rhin Island, Thailand	Dechsakulwatana, et al. 2008
Unidentify	antibacterial, anticancer		***Dragmacidon australis***	Samet Island, Thailand	Dechsakulwatana, et al. 2008
Unidentify	antibacterial, anticancer		***Oceanapia amboinensis***	Rad Island, Thailand	Dechsakulwatana, et al. 2008
unidentify	antibacterial,anticancer		***Raspailia sp.new***	Chang Island, Thailand	Dechsakulwatana, et al. 2008

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานของเภสัชวิทยาและฤทธิ์ทางชีวภาพ(bioactive metabolites) จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในฟองน้ำในประเทศไทย ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาด้านเภสัชกรรม ต่อไป
2. ได้ข้อมูลของปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถจของแบคทีเรียและสารสกัดกลุ่มต่างๆในการต้านจุลินทรีย์
3. ทำให้มีข้อมูลและสามารถถ่ายทอดความรู้เกี่ยวการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีอยู่ในท้องถิ่นแก่นักเรียน นิสิตนักศึกษา อาจารย์ นักวิจัยและเกษตรกรผู้สนใจ

4. ได้ข้อมูลหรือขั้นตอนการวิจัยสำหรับนำไปใช้ในการสอนวิชาเคมี ชีวเคมี จุลชีววิทยา เภสัชวิทยา และเทคโนโลยีชีวภาพ ระดับอุดมศึกษา

5. ได้แนวทางสารตั้งต้นสารปฏิชีวนะ ข้อมูลหรือขั้นตอนการวิจัยสำหรับนำไปใช้ในการวิจัยต่อยอดในระดับสูงขึ้นและพัฒนาไปสู่การนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ดำเนินการเก็บตัวอย่างฟองน้ำเพื่อแยกแบคทีเรียจากฟองน้ำ จากบริเวณต่างๆ ตามที่กำหนดในโครงการวิจัยที่ 1 ดังภาพที่ 1 คือ

เก็บตัวอย่างฟองน้ำในการวิจัยปีที่ 1- 3 โดยการดำน้ำแบบ SCUBA DIVING จากบริเวณชายฝั่งทะเล อ่าวไทยในระบบนิเวศต่างๆ แนวประการัง หาดทราย หาดหิน หาดเลน และแหล่งหญ้าทะเล ในเขต บริเวณจังหวัด นครศรีธรรมราช ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี และ ชุมพร ดำเนินการเก็บตัวอย่างฟองน้ำ ประมาณ 30 - 50 ตัวอย่าง ในปีที่ 1-3

- จำนวนของเชื้อแบคทีเรียคาดว่าจะคัดแยกได้ประมาณ 200 – 300 สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในโครงการวิจัย

ตัวอย่างฟองน้ำที่ได้แต่ละตัวจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ

- ส่วนที่ 1 เก็บรักษาไว้ด้วยวิธีทางชีววิทยาเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของฟองน้ำ(โครงการวิจัย ที่ 1
- ส่วนที่ 2 นำไปทำการคัดแยกแบคทีเรียจากฟองน้ำ เพื่อสกัดสารจากแบคทีเรีย
- ส่วนที่ 3 เก็บแช่แข็งเพื่อสกัดสารจากตัวอย่างฟองน้ำ(ดำเนินงานในโครงการวิจัย ที่ 2)

<u>ส่วนที่ 1 เก็บรักษาไว้ด้วยวิธีทางชีววิทยาใช้ในการจำแนกชนิดของฟองน้ำ (โครงการวิจัยที่ 1)</u>

การสำรวจและเก็บตัวอย่าง ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลจากพื้นที่ทำการศึกษา โดยการดำน้ำสุ่มเก็บตัวอย่างแบบ SCUBA ในเวลากลางวัน บันทึกภาพใต้น้ำ บันทึกข้อมูลสถานที่ ความลึก วัตถุใต้น้ำที่ยึดเกาะ สีของฟองน้ำขณะที่มีชีวิต ฯลฯ ตัวอย่างที่ได้นำมาศึกษาลักษณะภายนอก เช่น รูปแบบการเจริญเติบโต ความยืดหยุ่น ลักษณะผิว ลักษณะและการกระจายตัวของท่อน้ำเข้าและท่อน้ำออก สิ่งมีชีวิตที่เกาะติดหรืออาศัยอยู่ด้วย เหล่านี้เป็นต้น จากนั้นทำการเก็บรักษาด้วย แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการต่อไป

<u>ส่วนที่ 2 นำไปทำการคัดแยกแบคทีเรียจากฟองน้ำเพื่อสกัดสารจากแบคทีเรีย</u>

1) ดำเนินการคัดแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากฟองน้ำและแยกให้บริสุทธิ์ โดยวิธีดังนี้

การเก็บตัวอย่างฟองน้ำจะเก็บโดยนักดำน้ำแบบ Scuba Diving ลงไปเก็บตัวอย่างฟองน้ำโดยตัดส่วนของฟองน้ำ เก็บใส่ถุงที่ปิดสนิทพร้อมติดแผ่นบันทึกข้อมูล

1.1 ตัดเนื้อเยื่อฟองน้ำเพื่อชั่งน้ำหนักให้ได้ประมาณ 5-10 กรัม แล้วล้างฟองน้ำเพื่อกำจัดสิ่งเจือปนด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ เช่น ตะกอนออก

1.2 ทำการบดเนื้อเยื่อฟองน้ำโดยใส่น้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 5 มิลลิลิตร จนละเอียด

1.3 ดูดส่วนที่เป็นน้ำที่ได้จากการบด 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางตัวอย่างจากการบดให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1},10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ในน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้ว ต่อจากนั้นนำมาเกลี่ยเชื้อ โดยทำเช่นเดียวกับข้อ

1.4 ดูดส่วนที่เป็นน้ำที่ได้จากการเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเกลี่ยกระจายเชื้อบนผิวหน้าอาหาร เลี้ยงเชื้อ Zobell medium ที่ปรับปรุงสูตร

1.5 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 5 - 7 วัน ตรวจดูผล

1.6 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญขึ้นในแต่ละจานเพาะเลี้ยง แล้วคำนวณค่าเป็นโคโลนีต่อกรัม (CFU/g)

1.7 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันในแต่ละจานเพาะเชื้อของแต่ละตัวอย่างฟองน้ำ

1.8 นำโคโลนีที่เลือกมาทำให้บริสุทธิ์ (Purify) โดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีนั้นลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 2 - 3 วัน เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเป็น stock ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Zobell medium ที่ปรับปรุงสูตรที่มีวุ้น0.3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในศึกษาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต่อไป

2) การก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์

ทำการเก็บสายพันธุ์แบบกึ่งถาวรเพื่อรักษาสภาพสรีรของเซลล์ ภายเทคนิคปราศจากเชื้อ

2.1 นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้บริสุทธิ์แล้ว มาทำการเพาะเลี้ยงใน Zobell broth ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน

2.2 นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วประมาณ 8,000 รอบ/นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์ ด้วยน้ำทะเล แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทน้ำล้างเซลล์ทิ้ง

2.3 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ครึ่งหนึ่ง อีกครึ่งหนึ่งเติมกลีเซอรอล แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เป็นการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียแบบกึ่งถาวร

3) การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์มาตรฐาน

3.1 การเตรียม Standard test strains ได้แก่

Gram positive bacteria	Gram negitive bacteria
Staphylococcus aureus ATCC25923	*Vibrio alguilarum*
Bacillus subtilis ATCC6633	*Escherichia coli* ATCC25922

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

3.1.2 ทำการถ่ายเชื้อ ลงในหลอดอาหารเหลว TSB (heavy inoculate) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายในการเขย่าในแนวราบ (100 รอบต่อนาที)

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

3.1.4. ดูดเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงใน Tryptic Soy Agar medium หรือ Mueller Hinton medium plate แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำซ้ำ 3 จาน (trplicates)

3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนด (Screening of Antimicrobial activity assay)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำ (test strain)

3.2.1. เลี้ยงแบคทีเรียจากฟองน้ำแต่ละสายพันธุ์ (test strain) บนอาหารวุ้น ORI agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.2.2 ทำการถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว ORI broth (Heavy inoculate) ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร หรือ 10-20 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่าในแนวราบ (100 รอบต่อนาที)

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

3.2.4. นำ antibiotic assay disc (AA disc) ที่ปราศจากเชื้อ ขนาด 13 มิลลิเมตร วางบน petri dish ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นดูดเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากฟองน้ำมา 0.1 มิลลิเมตร มาหยดลงบน sterile AA disc ทิ้งไว้สักครู่ แล้วนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ standard ที่เตรียมไว้แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 – 24 ชั่วโมง และควบคุมการทดลองโดยใช้ standard

antibiotic disc ที่มี Oxytetracyclin 30 ไมโครกรัมและ Streptomycin 10 ไมโครกรัม ต่อ disc โดยทำกาทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicates)

ส่วน 10-20 ลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยง นำไปสกัดด้วยสารละลาย ethyl acetate, chloroform: methanol, ethanol แล้วทำการละเหยแห้ง เมื่อจะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจึงละลายด้วย Dimethylsulfo oxide(DMSO) ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

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

สำหรับแบคทีเรียจากฟองน้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่กำหนดจะนำมาทดสอบสารสกัดเบื้องต้นในขั้นตอนต่อไป

ตอนที่ 2 การตรวจสอบขั้นยืนยันผลฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์มาตรฐาน

3.3.1 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

3.3.2 เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียจากการทดสอบเบื้องต้นบน ORI agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.3.3 ทำการถ่ายเชื้อลง ORI broth (Heavy inoculate) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่าในแนวราบ (120 รอบต่อนาที)

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

3.3.5 ทำการปั่นเหวี่ยงเชื่อตัวอย่างโดยใช้เครื่อง Microcentrifuge Fixed Angle Rotor ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8000-12,000 รอบต่อนาที นาน 10-20 นาที

3.3.6 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 จะเหลือส่วนของตะกอนจะนำมาละลายด้วย ORI broth ในอัตราส่วนที่เท่ากับส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อในตอนแรก ต่อจากนั้นนำสารละลายตะกอนที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบน AA disc ทิ้งไว้สักครู่แล้วนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกันกับส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- ทำการควบคุมการทดลองโดยใช้ standard antibiotic disc ที่มี oxytetracyclin 30 ไมโครกรัม, streptomycin 10 ไมโครกรัมต่อ disc โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (tripicates)
- ทำการวัดผลฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยการวัดขนาดของบริเวณที่ยับยั้ง (inhibition zone) โดยสังเกตผลทุก 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

4) ดำเนินการสกัดสารอย่างหยาบจากแบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบโดยดำเนินการดังนี้

4.1 เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนดใน ORI agar slant บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

4.2 ทำการถ่ายเชื้อลงใน ORI broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่าในแนวราบ (100 รอบต่อนาที)

4.3 ทำการถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 2 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งบรรจุ(ขนาด 2 ลิตร)ฟลาสค์ละ 1 ลิตร จำนวน 50 – 100 ลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าในแนวราบ (100 รอบต่อนาที) โดยจะใช้ทำการทดลองเมื่อครบเวลาเท่ากับที่เชื้อออกฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนด

4.4 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง High Speed Refrigerated Centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
หลังจากผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วจะแยกออกเป็นสองส่วน ดังนี้

ส่วนเซลล์ของแบคทีเรีย

- นำส่วนของเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาล้างด้วย Normal saline 0.85%
- ทำการปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้อ 4 ในแต่ละหลอดที่ใช้ปั่นแยกเซลล์โดยนำส่วนที่ชะได้ทั้งหมดใส่ลงในหลอด ที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงหลอดใหม่ที่ชั่งน้ำหนัก และบันทึกไว้แล้ว
- ทิ้งส่วน supernatant ทิ้งไปคงเหลือแต่ส่วนของเซลล์ และนำไปชั่งน้ำหนักทั้งหมด แล้วคำนวณหาน้ำหนักของเซลล์
- ทำการสกัดด้วยสารละลาย เอทธานอล, สารละลายผสม คลอโรฟอร์ม และเมทธานอล (CH_3 : MeOH = 1 : 2) ประมาณ 100-300 มิลลิลิตร โดยทำการชะตะกอนเซลล์ให้หลุดออกจากกัน แล้วนำไปบด (homogenized) โดยใช้เครื่อง biomixer หรือ Ultrazonic นาน 5 นาที
- เทสารละลายที่ได้ใส่บีกเกอร์ ผ่านการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrazonic
- ทำการปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้อ 4
- นำส่วนของตะกอนเซลล์ที่ได้มาทำเช่นเดียวกับข้อ อีก 2 ครั้ง แล้วทำการชั่งน้ำหนักสุดท้าย
- นำตัวอย่างที่ได้มาใส่ ethylacetate และน้ำ โดยใช้อัตราส่วน 1 : 1 ประมาณ 100 มิลลิลิตร ใส่กรวยสำหรับแยกชั้นขนาด 300 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นของ ethylacetate และน้ำ โดยส่วนชั้นบนจะเป็นส่วนที่สามารถละลายได้ใน ehthylacetate ซึ่งจะนำมาทำให้แห้งโดยใช้พลาสค์สำหรับ evaporate ที่ชั่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้ว ส่วนชั้นล่างจะเป็นส่วนที่มีสารสกัดที่ละลายได้ดีในน้ำจะนำมาใส่ ethylacetate ประมาณ 30 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น ทำเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง แล้วเอาส่วนของน้ำที่ได้สุดท้ายไปทำให้แห้ง และชั่งน้ำหนักก่อน และหลังทำการทดลองทุกครั้ง
- นำส่วนใสที่ได้แต่ละชั้นคือ ethyl acetate และน้ำใส่ฟลาสค์สำหรับ evaporate โดยต่อเข้ากับเครื่อง rotary vacumm evaporator

ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (supernatant)

- นำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาสกัดด้วย ethyl acetate ในอัตราส่วน 1 : 4 พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นของ ethylacetate และน้ำ โดยส่วนชั้นบนจะเป็นส่วนที่สามารถละลายได้ใน ethylacetate ซึ่งจะนำมาทำให้แห้งโดยใช้ฟลาสค์สำหรับ evaporate เพื่อนำไปทดสอบต่อไป
- ทำการทดลองขั้นต่อไป เช่นเดียวกับที่ดำเนินการในตอนต้น

ภาพที่ 3-1 แผนที่แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างฟองน้ำบริเวณเกาะวังนอก ซึ่งอยู่ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี (ที่มา : www.i-creativeweb.com)

บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1 การเก็บตัวอย่างฟองน้ำและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ

จากการเก็บตัวอย่างฟองน้ำ จากบริเวณเกาะวังนอก จังหวัดสุราษฎร์ธานี เก็บตัวอย่างฟองน้ำที่แตกต่างกัน และสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลให้บริสุทธิ์ โดยเลือกแต่ละโคโลนีที่แตกต่างกันนำมาขีด (streak) บนอาหารใหม่ได้ทั้งหมด 110 สายพันธุ์ และได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย โดยการเกลี่ยกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell ager

ตารางที่ 1 จำนวนแบคทีเรียทะเลที่คัดแยกได้จากฟองน้ำบริเวณเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎรธานี

รหัส	**ชื่อไทย**	จำนวนแบคทีเรียทะเล ทั้งหมดที่พบในฟองน้ำ(CFU/g)
POR01	ฟองน้ำเปลี่ยนสีสีเหลือง	5.07×10^6
POR02	ฟองน้ำสีน้ำเงิน	2.70×10^6
POR03	ฟองน้ำเคลือบแข็งสีม่วง	3.73×10^6
POR04	ฟองน้ำเคลือบบางสีส้มหนามยาว	7.56×10^6
POR05	ฟองน้ำยืดหยุ่นสีดำ	3.82×10^6
POR06	ฟองน้ำปล่องภูเขาไฟ	2.88×10^5
POR07	ฟองน้ำปะการังสีเทา	6.04×10^6
POR 31	ฟองน้ำต้นไม้สีดำ	6.20×10^6
POR 32	ฟองน้ำยืดหยุ่นสีดำ	3.37×10^6
POR 33	ฟองน้ำเคลือบสีดำ	8.35×10^6
POR 34	ฟองน้ำเคลือบหนาสีม่วง	2.63×10^6
POR 35	ฟองน้ำก้อนสีม่วง	2.79×10^6
POR 36	ฟองน้ำครก	2.60×10^5
POR 37	ฟองน้ำปะการังสีม่วง	8.73×10^6
POR 38	ฟองน้ำไฟ	2.11×10^6

4.2 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านฤทธิ์เชื้อแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่ระยะเวลา24 ชม.

จากการศึกษาการตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่ระยะเวลา 24 ชม. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบที่ใช้ในการตรวจสอบมีทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Vibrio alginoliticus และ Escherichia coil* โดยใช้ Disc

Diffusion Agar Assay ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell ager พบว่าแบคทีเรียทะเลที่แยกได้มาจากฟองน้ำสามารถต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ ซึ่งจากจำนวนแบคทีเรียทะเล 221 สายพันธุ์นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งด้วยด้วยวิธี Disc diffusion agar assay เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบโดยวัดขนาดบริเวณใสที่ได้ พบว่า แบคทีเรีย 38 สายพันธุ์ พบบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบ โดยแบคทีเรียทะเลสามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis*ได้ 17 สายพันธุ์ ได้แก่ WO1-4Y, WO3-1, WO3-1-1, WO3-1-2, WO3-1-3, WO3-1-4, WO3-3Or-1, WO4-1-2, WO4-3, WO4-8, WO4-11, WO6-6-1, WO6-6-2, WO18-4-1, WO18-4-2, WI1-6Y-1และ WI1-6Y-2 และสามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* ได้บางส่วน ได้แก่ แบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO8-3Or-2, WO8-2 และ CKB1-1BK-4ส่วน*S.aureus*พบฤทธิ์ต้านโดยแบคทีเรียทะเล 17 สายพันธุ์ ได้แก่ WO1-4Y, WO3-1, WO3-1-1, WO3-1-2, WO3-1-3, WO3-1-4, WO3-3Or-1,WO4-1-2, WO4-3, WO4-8, WO6-6-1, WO6-6-2, WO8-2, WO9-4Y-3, WO11-2, WI1-6Y-1, WI1-6Y-2 และสามารถต้านการเจริญของ *S.aureus*ได้บางส่วน ได้แก่ แบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO8-3Or-2, WO9-6-2, WO11-3-1, WO11-4-3, WO11-6-1, WO12-1Y-1, WO18-4-2, WI1-1, WI1-2Y-1, WI1-14or-3, R15-10-1, T3-4Y-2, KE2-2Br-1, KE2-2Br-3, KE2-2Br-4 และ CKB1-1Bk-4 ส่วน *E.coli*พบว่าฤทธิ์ต้านโดยแบคทีเรียทะเล 19 สายพันธุ์ ได้แก่ WO1-4Y, WO3-1, WO3-1-1, WO3-1-2, WO3-1-3, WO3-1-4, WO3-3Or-1, WO8-3Or-2, WO8-2, WO9-4Y-3, WO11-2, WO18-4-1, WO18-4-2, WI1-1, WI1-2Y-1, WI1-6Y-1, WI1-6Y-2, R15-6-1 และ R21-1-2 และสามารถต้านการเจริญของ *E.coli* ได้บางส่วน ได้แก่ R1-14Y-4ส่วน *V.alginoliticus*พบฤทธิ์ต้านโดยแบคทีเรีย 13 สายพันธุ์ ได้แก่ WO1-4Y, WO3-1, WO3-1-1, WO3-1-2, WO3-1-3, WO3-1-4, WO3-3Or-1, WO4-1-2, WO4-3, WO4-8, WO4-11, WO18-4-1 และ WO18-4-2 จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO1-4Y, WO3-1, WO3-1-1, WO3-1-2, WO3-1-3, WO3-1-4, WO3-3Or-1, WO18-4-1 และWO18-4-2 สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis*, *S.aureus*,*V.alginoliticus*และ*E.coli*ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่4-2และรูปภาพประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของของแบคทีเรีย WO1-4Y และ WO3-1 ดังที่แสดงในรูปภาพที่แผนภาพ 4.1.1 และประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *Escherichia coil* ของแบคทีเรีย WO11-2 ดังที่แสดงในรูปภาพที่แผนภาพ 4.1.2

จากผลการทดลองพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ooky และ คณะ (2007) พบว่าแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ *A.hydrophila*และสายพันธุ์รหัส BSP43 ที่สามารถต้านการเจริญของ *S.aureus*และ *B.subtilis*ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ได้ใช้ในการทดลองนี้ได้เช่นกัน

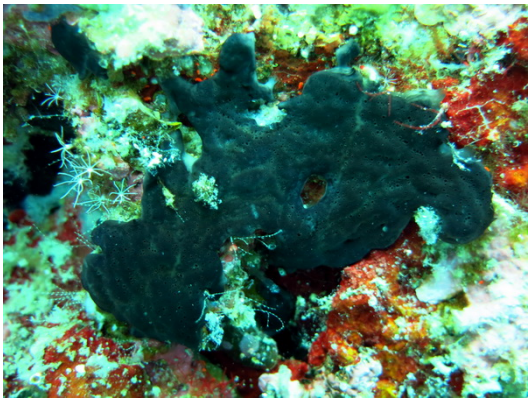
ตารางที่ 4-2 ผลของการตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบของแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางความกว้างของบริเวณที่มีฤทธิ์ในการต้านเป็นมิลลิเมตร)

หมายเลข	ชื่อเชื้อ	ความกว้างของ clear zone(nm)			
		BS	SA	VA	EC
1	POR 1-4Y (D)	18.0	24.5	17.0	23.0
2	POR 1-4Y (S)	20.0	23.0	19.0	25.0
3	POR 1-4Y(MC1)	19.5	22.5	16.5	23.0
4	POR 1-4Y(MC2)	16.5	21.5	16.0	25.0
5	POR 1-4Y (C)	18.0	24.5	18.0	27.0
6	POR 3-1	17.0	24.5	16.0	25.5
7	POR 5-2 (D)	16.5	23.5	18.0	23.0
8	POR 5-2 (S)	24.5	25.5	22.0	-
9	POR 5-3(MC1)	25.5	25.2	25.5	-
10	POR 5-4 (MC2)	23.0	23.0	23.0	-
11	POR 36-1 -1 (C)	27.0	21.0	21.5	-
12	POR 36-2 -3 (E)	17.5	23.5	-	-
13	POR 36-3	17.5	16.0	-	-

14	POR 37-2 (S)	+17.5	+19.0	-	26.0
15	POR 37-	+19.0	29.5	-	35.5
16	POR 11 (MC2)	-	+18.5	-	-
17	WO4-1-2 (C)	-	21.0	-	27.0
18	POR 5-1 (E)	-	31.0	-	30.0
19	POR 11 (MC2)	-	+17.5	-	-
20	WO4-1-2 (C)	-	+17.5	-	-
21	POR 5-1 (E)	-	+16.0	-	-
22	WO11-2 (D)	-	+16.0	-	-
23	WO11-2 (S)	17.5	+23.5	18.0	26.5
24	WO11-2 (MC1)	15.5	+26.5	18.0	22.5
25	WO11-2 (MC2)	-	+19.5	-	22.0
26	WO11-2 (C)	-	+17.5	-	31.0

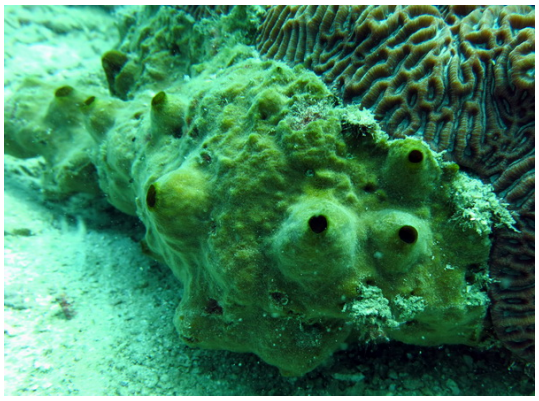
หมายเลข	ชื่อเชื้อ	ความกว้างของ clear zone(nm)			
		BS	SA	VA	EC
27	WI1-6Y-1	22.0	22.5	-	34.0
28	WI1-6Y-2	21.5	22.0	-	34.5
29	R1-14Y-4	-	-	-	+16.0
30	R15-6-1	-	-	-	17.0
31	R15-10-1	-	+17.0	-	-

<u>หมายเหตุ:</u> โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ ได้แก่ BS : *Bacillus subtilis* ,SA : *Staphylococcus aureus*, VA : *Vibrio alginoliticus* ,*EC : Escherichia coli* เครื่องหมาย; (-) แสดงบริเวณที่ไม่มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียที่ทดสอบ, (ตัวเลข) แสดงบริเวณที่มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียที่ทดสอบซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้มาจากทดสอบ 2 ซ้ำ มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร



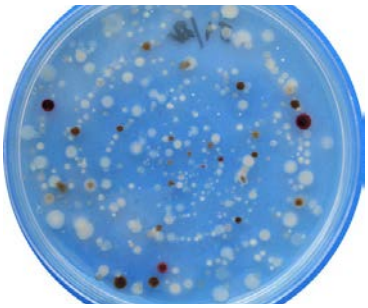
น้อยที่สุด 2.60 x 10^5

รูปที่ ๒ ฟองน้ำเคลือบสีดำ POR 37
พบมีแบคทีเรียอาศัยอยู่จำนวนมากที่สุด 8.35 x 10^6
โคโลนีต่อกรัม

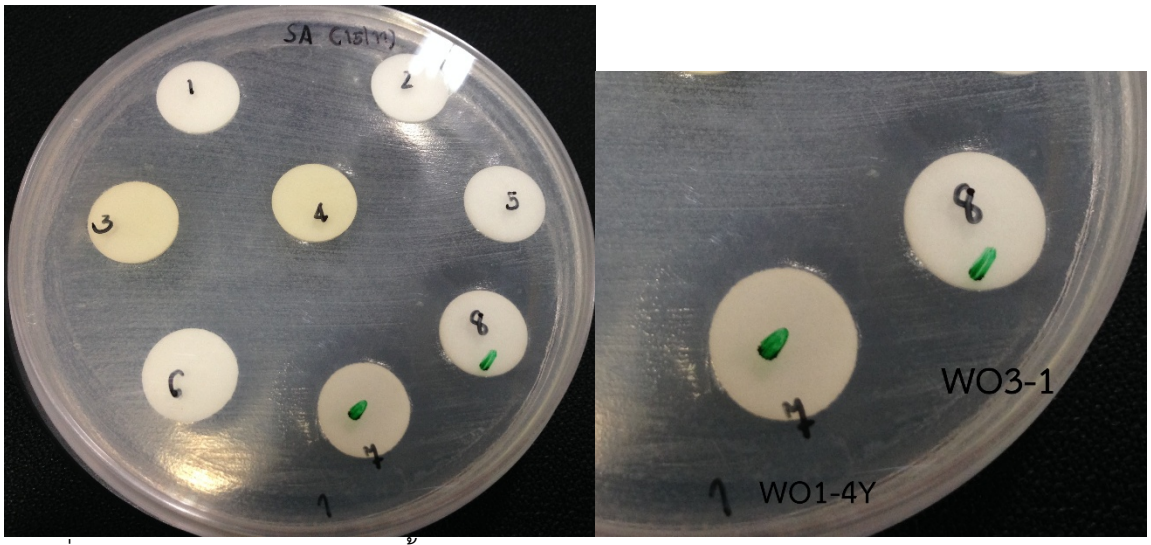


รูปที่ ๓ ฟองน้ำปล่องภูเขาไฟ POR06
พบมีแบคทีเรียอาศัยอยู่จำนวนน้อย 2.88 x 10^5 โคโลนีต่อกรัม

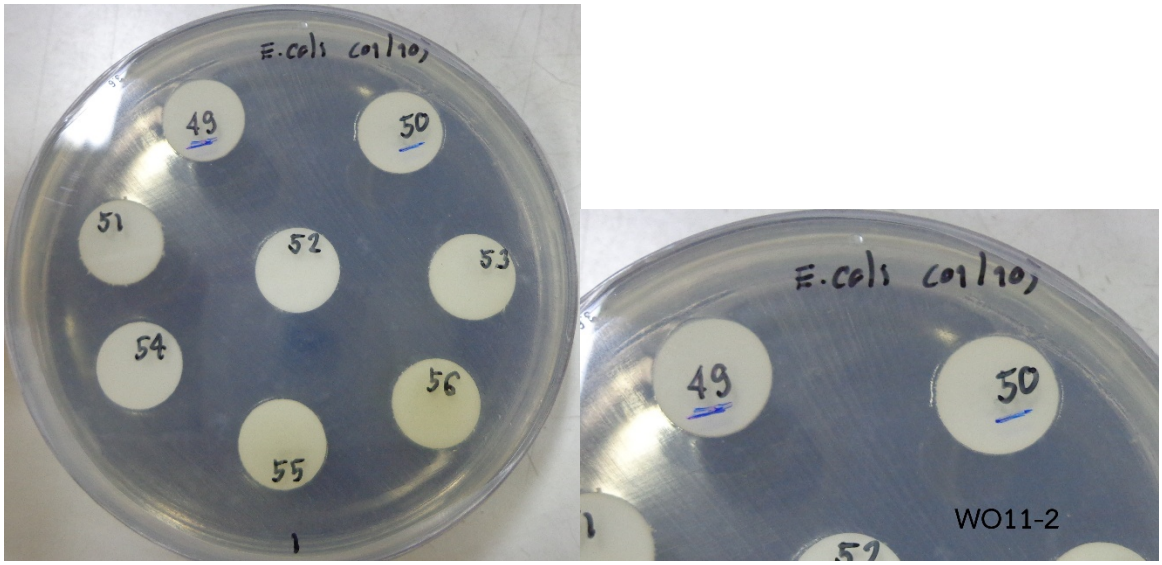
รูปที่ ๔ ฟองน้ำเคลือบบางสีส้มหนามยาว POR04
พบมีแบคทีเรียอาศัยอยู่จำนวนมาก 7.56 x 10^6
โคโลนีต่อกรัม



รูปที่ ๕ ความหลากหลายของโคโลนีแบคทีเรียจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างเช่น ลักษณะรูปร่าง ขอบ และรงควัตถุ



ภาพที่ 4.1.1 ประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบของแบคทีเรีย WO1-4Y และ WO3-1ที่แยกได้จากฟองน้ำ



ภาพที่ 4.1.1 ประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *Escherichia coil* ของสารสกัดหยาบของแบคทีเรีย WO11-2ที่แยกได้จากฟองน้ำ

4.3 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบของสารสกัดหยาบที่สกัดมาจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่เวลา 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบของสารสกัดหยาบที่สกัดมาจากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ 38 สายพันธุ์โดยคัดเลือกมา 5 สายพันธุ์ ได้แก่ WO1-4Y, WO3-1, WO4-1-2, WO11-2 และ WI1-6Y-2 โดยคัดเลือกจากบริเวณที่ยับยั้งซึ่งมีขนาดกว้างและให้ผลที่ชัดเจน โดยนำมาเพาะเลี้ยงแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายด้วยการแยกเป็นส่วนของน้ำเลี้ยงซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลซิเตด และส่วนน้ำเลี้ยงที่ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเรซินจากนั้นนำมาชะล้างด้วยเมทานอล และส่วนของเซลล์สกัดด้วยตัวทำละลายผสมเมทานอลและคลอโรฟอร์ม(อัตราส่วน2:1) และระเหยแห้งด้วย Rotary Evaporator จนได้สารสกัดหยาบ แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียทะเลมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ ที่ระดับความเข้มข้น 400, 200 และ 100 µg และใช้ DMSO เป็น negative control ส่วนยา streptomycin เป็น positive control จะพบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO1-4Y ที่สามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis*และ*S. aureus* ได้เป็นส่วนใหญ่โดยสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มเป็นส่วนของชั้นตะกอนเซลล์ และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตดเป็นส่วนของชั้นน้ำเลี้ยง ที่ความเข้มข้น 400, 200, และ 100 µg สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ*B. subtilis* และ *S.aureus* ได้ ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ*B. subtilis* และ *S.aureus*ได้บางส่วนเท่านั้น ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO3-1ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดที่ความเข้มข้น 400, 200, และ 100 µg สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ*B. subtilis* และ *S.aureus* ได้ ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ*B. subtilis* และ *S.aureus*ได้บางส่วนเท่านั้นส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO4-1-2 สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ*B. subtilis*,*S.aureus* และ *E.Coli*ที่ระดับความเข้มข้น 400 µg และที่ความเข้มข้นที่ 200 µg สามารถยับยั้งเชื้อ *E.Coli*และ ความเข้มข้นที่ 100 µg สามารถยับยั้งเชื้อ *E.Coli*ได้บางส่วนเท่านั้น ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียสายพันธุ์ WO11-2 สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดสามารถที่ระดับความเข้มข้น 400 µg ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้บางส่วนและสามารถยับยั้งเชื้อ *E.Coli* ได้ ส่วนน้ำเลี้ยงที่ผ่านคอลัมน์ชะล้างด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้นที่ 400 µg สามารถยับยั้งเชื้อ *E.Coli* ได้ แต่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *V. alginoliticus* ได้บางส่วน ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg น้ำเลี้ยงที่ผ่านคอลัมน์สามารถยับยั้งเชื้อ *V. alginoliticus* และ *E.Coli* ได้ แต่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้บางส่วน ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิลเตดสามารถยับยั้งเชื้อ*B. subtilis*ได้บางส่วนเท่านั้น ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg น้ำเลี้ยงที่ผ่านคอลัมน์สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*,*V.alginoliticus* และ *E.Coli*ได้ ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียสายพันธุ์ WI1-6Y-2 สารสกัดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดที่ระดับความเข้มข้น 400 µg สามารถยับยั้งเชื้อ*B. subtilis* และ *E.Coli* ได้ แต่ยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ได้บางส่วน และที่ความเข้มข้น 200 µg สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *E.Coli* ได้ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นส่วนของน้ำเลี้ยงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มซึ่งเป็นส่วนของตะกอนเซลล์ แสดงว่าแบคทีเรียทะเลได้สารบางอย่างออกมาในน้ำเลี้ยง ซึ่งพบน้อยมากในตะกอนเซลล์ จึงจัดได้ว่าสารนี้เป็นสารที่ถูกขับออกมาภายนอกเซลล์ ในการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียนั้นมีการใช้ระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน ซึ่งระดับความเข้มข้นที่ต่างกันของสารสกัดหยาบนี้เป็นตัวชี้ว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียทะเลนั้นสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ที่ความเข้มข้นมากหรือน้อย เพราะถ้าใช้ในระดับความเข้มข้นน้อยๆแล้วมีการต้านแสดงว่าฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียสูง จะใช้สารสกัดหยาบในระดับความเข้มข้นน้อยๆก็มีฤทธิ์ในการต้านได้แล้ว เมื่อ

เปรียบเทียบกับยา streptomycin ซึ่งเป็น positive control จะทำให้รู้ว่าสารที่สกัดได้มาฤทธิ์ใกล้เคียงกับยา streptomycinดังรายละเอียดในตารางที่ 4-3 และรูปภาพประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบของแบคทีเรีย WO3-1 ดังที่แสดงในรูปภาพที่แผนภาพ4.2.1 และประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *Escherichia coil* ของสารสกัดหยาบของแบคทีเรีย WO11-2 ดังที่แสดงในรูปภาพที่แผนภาพ 4.2.2

จากผลการทดลองพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ kennedy และคณะ (2009) พบแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำสายพันธุ์ BC2, SM2, SM4, SM8, SM18 และ SM19 ที่สามารถต้านการเจริญของ *B.subtilis* แต่ไม่มีฤทธิ์ต้าน *E.Coli* ได้ ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบที่ได้ใช้ในการทดลองนี้ได้เช่นกัน

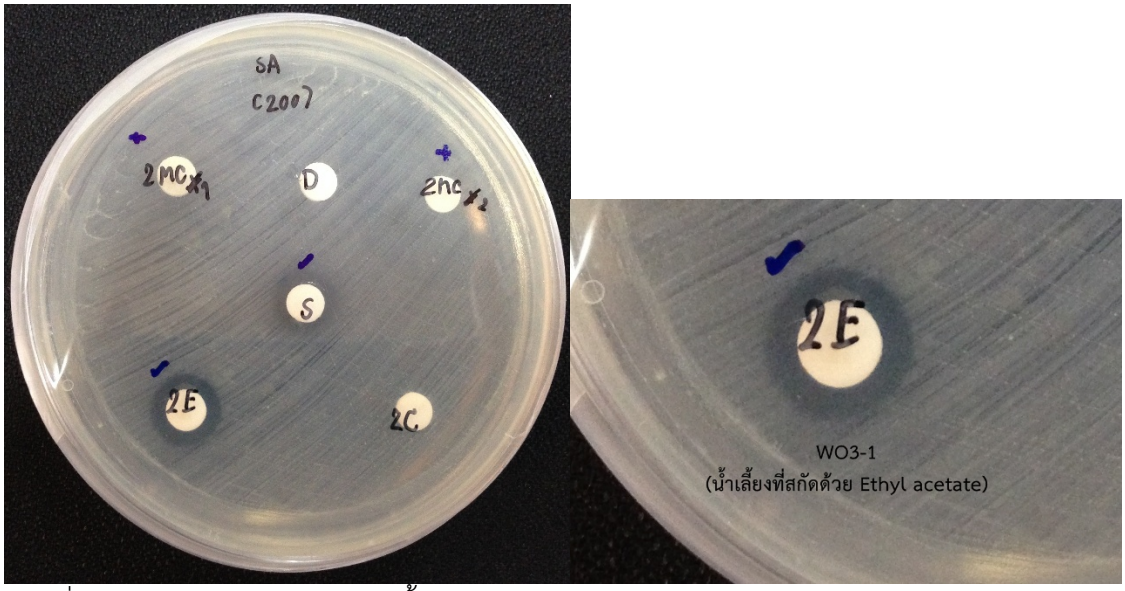
ตารางที่4-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบของสารสกัดหยาบที่สกัดมาจากแบคทีเรียทะเลที่ระดับความเข้มข้น 400, 200 และ 100 µg/disc(ที่ใช้คือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร)

หมายเลข	ชื่อเชื้อ	ความกว้างของ clear zone(nm)											
		B. subtilis			*S. aureus*			*V. alginoliticus*			*E.coli*		
		100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400
1	POR 1-4Y (D)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	POR 1-4Y (S)	-	-	-	15	13	8	-	-	-	-	13	-
3	POR 1-4Y(MC1)	-	-	+10	-	-	-	-	15	-	-	-	-
4	POR 1-4Y(MC2)	-	-	+10	+26	+36	+40	35	-	-	-	-	-
5	POR 1-4Y (C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	POR 3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	POR 5-2 (D)	11	15	18	9	12	15	-	-	-	-	-	-
หมายเลข	ชื่อเชื้อ	ความกว้างของ clear zone (nm)											
		B. subtilis			*S. aureus*			*V. alginoliticus*			*E.coli*		
		100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400
8	POR 5-2 (S)	-	-	-	12	13	15	-	-	-	-	-	-
9	POR 5-3(MC1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	POR 5-4 (MC2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	POR 36-1 -1 (C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	POR 36-2 -3 (E)	9	12	-	8	12	12	-	-	-	-	-	-
13	POR 36-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	POR 37-2 (S)	-	-	-	13	-	12	-	-	-	-	-	-
15	POR 37-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	POR 11 (MC2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	WO4-1-2 (C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

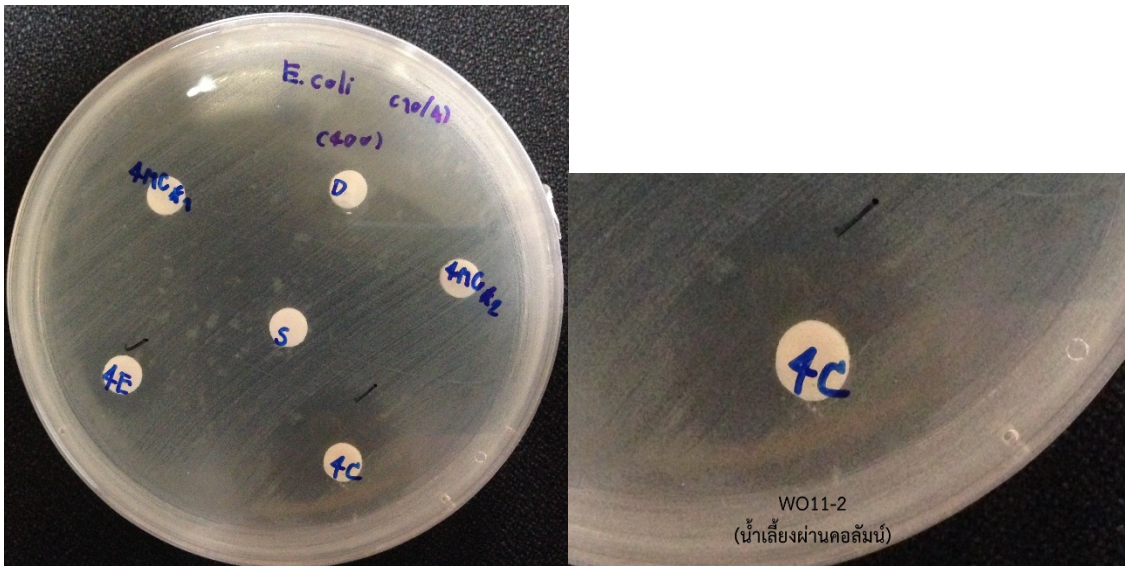
18	POR 5-1 (E)	9	-	-	8	12	12	-	-	-	+11	13	17
19	WO11-2 (D)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	WO11-2 (S)	-	-	-	15	14	11	-	-	-	-	-	-
21	WO11-2 (MC1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	WO11-2 (MC2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	WO11-2 (C)	14	-	-	-	-	-	13	15	+19	13	-	-
24	WO11-2 (E)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
25	WI1-6Y-2 (D)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	WI1-6Y-2 (S)	-	-	-	13	13	16	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ:ทดสอบด้วยสารสกัด ได้แก่ D : DMSO, S : streptomycin, MC1 : ส่วนของตะกอนเซลล์ในลิตรแรก, MC2 : ส่วนของตะกอนเซลล์ในลิตรที่สอง, C : ส่วนของน้ำเลี้ยงที่ผ่านคอลัมน์, E : ส่วนของน้ำเลี้ยงที่สกัดด้วยEthyl acetateเครื่องหมาย; (-) แสดงบริเวณที่ไม่มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียที่ทดสอบ, (+) แสดงบริเวณที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้บางส่วน, (ตัวเลข) แสดงบริเวณที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทดสอบซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้มาจากทดสอบ 2 ซ้ำ มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

แผนภาพที่ 4.2แสดงประสิทธิภาพการต้านเชื้อแบคทีเรีย



ภาพที่ 4.2.1 ประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบของแบคทีเรีย WO3-1ที่แยกได้จากฟองน้ำ จากเกาะวังนอก จังหวัดสุราษฎร์ธานี



ภาพที่ 4.2.2ประสิทธิภาพการต้านเชื้อ*Escherichia coil* ของสารสกัดหยาบของแบคทีเรีย WO11-2 ที่แยกได้จากฟองน้ำ จากเกาะวังนอก จังหวัดสุราษฎร์ธานี

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการตรวจสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำ ในการสร้างสารมาต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*,*Vibrio alginoliticusและ Escherichia coli*ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจากจำนวนแบคทีเรียทะเล 110 สายพันธุ์ที่แยกได้ พบว่ามีฟองน้ำมี 38 สายพันธุ์ ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ สามารถต้านการเจริญของ *B.subtilis*ได้ มีแบคทีเรียทะเลจำนวน 18 สายพันธุ์ และสามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* ได้บางส่วนมี 2 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ WO4-11 ให้ผลการต้านมากที่สุด ส่วนที่มีฤทธิ์ในการต้าน *S. aureus* มีแบคทีเรียทะเลจำนวน 18 สายพันธุ์ และสามารถต้านการเจริญของ *S. aureus* ได้บางส่วนมี 16 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ WO11-2 ให้ผลการต้านมากที่สุด และสามารถต้านการเจริญของ *V. alginoliticus*ได้ มีแบคทีเรียทะเลจำนวน 13 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ WO 4-3 มีฤทธิ์ในการต้านมากที่สุด ส่วนที่มีฤทธิ์ในการต้าน *E. coli* มีแบคทีเรียทะเลจำนวน 19 สายพันธุ์และสามารถต้านการเจริญของ *E. coli* ได้บางส่วนมี 1 สายพันธุ์โดยสายพันธุ์ WI1-6Y-2 ให้ผลการต้านมากที่สุด และพบว่าแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำมี

ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง 4 ชนิด จำนวน 7 สายพันธุ์ สรุปได้ว่า แบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก(gram positive) ที่ทดสอบ 2 ชนิดคือ *B. subtilis* และ*S. aureus* ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) 2 ชนิดได้แก่ *V. alginoliticus* และ *E. coli*

จากการตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง 4 ชนิด จากจำนวนแบคทีเรียทะเลที่แยกจากฟองน้ำ 38 สายพันธุ์ ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ ทำการทดลองต่อโดยการเพาะเลี้ยงจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ WO1-4Y, WO3-1, WO4-1-2, WO11-2 และ WI1-6Y-2 จากนั้นทำการสกัดสารโดยแบ่งส่วนของน้ำเลี้ยงและเซลล์ของแบคทีเรียทะเลที่แยกจากฟองน้ำ โดยส่วนของน้ำเลี้ยงนั้นส่วนหนึ่งจะสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตด และอีกส่วนหนึ่งผ่านคอลัมน์โดยใช้เมทานอลเป็นตัวชะล้าง ส่วนของตะกอนเซลล์นั้นจะสกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์ม ที่ระดับความเข้มข้น 400,200 และ 100 µg โดยใช้ DMSO เป็น negative control และใช้ยาstreptomycin เป็น positive controlจากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดหยาบที่สกัดจากแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำสายพันธุ์ WO1-4Y ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*และ *S. aureus* ได้ ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อ *V. alginoliticus* และ *E.coli* ได้ แต่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้บางส่วนเท่านั้น ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO3-1 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตด สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*และ *S. aureus* ได้ ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*ได้บางส่วน ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO4-1-2 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *E. coli*ได้ ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลคลอโรฟอร์มไม่สามารถยับยั้งเชื้อชนิดใดได้เลย ส่วนสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO11-2 โดยส่วนของน้ำเลี้ยงที่ผ่านคอลัมน์สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *V. alginoliticus* และ *E. coli* ได้ ส่วนน้ำเลี้ยงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตด สามารถยับยั้งเชื้อ *E.coli* ได้แต่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้บางส่วนเท่านั้น ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WI1-6Y-2 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *E. coli* ได้

สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นส่วนของน้ำเลี้ยงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มซึ่งเป็นส่วนของตะกอนเซลล์ แสดงว่าแบคทีเรียทะเลได้สารบางอย่างออกมาในน้ำเลี้ยง ซึ่งพบน้อยมากในตะกอนเซลล์ จึงจัดได้ว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนี้เป็นสารที่ถูกขับออกมาภายนอกเซลล์ และสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก(gram positive) ที่ทดสอบ 2 ชนิดคือ *B. subtilis* และ *S. aureus*ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative)2 ชนิดได้แก่ *V. alginoliticus*และ *E.coli*

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อให้ทราบชนิดและคุณลักษณะของเชื้อสำหรับใช้เป็นประโยชน์ต่อการแยกเลี้ยงและศึกษาต่อไป

2.จากผลการทดสอบข้างต้นเป็นการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบของแบคทีเรียทะเลที่แยกจากฟองน้ำ ซึ่งทำให้เราได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มาจากธรรมชาติ ซึ่งควรนำผลที่ได้ไปทำการศึกษาแยกสารประกอบทางเคมีที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ต่างๆต่อไป

3. จากการศึกษานี้ควรจะมีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติม เช่น การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์การต้านการอับเสบ หรือฤทธิ์การต้านเชื้อรา เป็นต้น เพื่อที่จะได้รู้ว่าสารสกัดจากแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลมีประสิทธิ์ได้ดีเพียงใดเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีการที่ต่างๆกัน

4. ควรจะมีการศึกษาวิธีการสกัดสารจากแบคทีเรียด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม

5. การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ พบว่ายับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ (ตารางที่4-2) ความเป็นไปได้นี้ ที่จะใช้แบคทีเรียทะเลเป็นแหล่งของสารต้านแบคทีเรียในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคได้แก่*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*,*Vibrio alginoliticus*และ*Escherichia coli*

6. เนื่องจากสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำแสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจกับการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย แต่มีหลายตัวอย่างที่สูญเสียประสิทธิภาพในการต้านซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากวิธีการสกัดและชนิดของสารละลายที่ใช้ไม่เหมาะสมกับสารประกอบเคมีที่แสดงฤทธิ์ ดังนั้นจึงควรศึกษาวิธีการสกัดสารที่จำเพาะต่อแบคทีเรียบางชนิด และควรจะนำสารสกัดจากแบคทีเรียทะเล มาทำการค้นหาสารประกอบทางเคมีที่สามารถออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, สุวดี ประคองภักดิ์, จิรภัทร จันทมาลี 2551. ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ จากบริเวณหินขาว หมู่เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง การประชุมวิชาการ 7 กรกฎาคม 2551. ณ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี.

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา และ สุเมตต์ ปุจฉาการ. 2551. ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ จากเกาะหมาก จังหวัดตราด. การประชุมวิทยาศาสตร์ทางทะเลแห่งประเทศไทย. 25-27 สิงหาคม 2551. ณ โรงแรมภูเก็ต จ.ภูเก็ต

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา รวิวรรณ วัฒนะดิลก และสุเมตต์ ปุจฉาการ (2541) การศึกษาสารไบโอแอกทีฟ เมตตาบอไลต์จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำในประเทศไทย. รายงายฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา สิรินุช จินตสุนทรจุไร และสุเมตต์ ปุจฉาการ (2544) บทคัดย่อ การ ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำบางชนิดในจังหวัดชลบุรี การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 27 หน้า 464.

มาลิน จุลศิริ (2540) ยาต้านจุลชีพ : ความรู้พื้นฐาน และการประยุกต์ โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน กรุงเทพฯ, 209 หน้า.

นันทวัน นันทวนิช วิมลมาศ ลิปิพันธ์ และสุนันท์ พงษ์สามารถ (2544) ผลของสารโพลิแซคคาไรด์เจลจากเปลือกของผลทุเรียน ต่อการต้านแบคทีเรียในระดับหลอดทดลอง การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 27 หน้า 466.

นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์และคณะ. 2545. ความหลากหลายทางชีวภาพของฟองน้ำที่อาศัยอยู่ในแนวปะการัง บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก (จังหวัดชลบุรี – ตราด). *รายงานการวิจัยในโครงการ BRT (2545).* หน้า 148-155.

Amade, P.,Charrion, C., Baby, C., Vacelet, J. 1987. Antimicrobial activities of marine sponges from Mediterranean Sea. Marine Biology, 94 : 271-275.

Amade, P., Pesando, D., Chevolot, L. 1982. Antimicrobial activities of marine sponges from French Polynesia and Brittany. Marine Biology, 70 : 223-228. Autotoxic antibiotic production by a marine *Chromobacterium*. Mar.Biol.27:281-285.

Anand, T. Prem, Bhat, A.W., Shouche, 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. Microbiological Research, 161:252-262.

Baarn,B.R.,Gandhi,N.M., and Fretias, Y.M. 1966. Abtibiotic activity of marine microorgamisms. Helgol. Wiss. Meeresunters. 13:181-185.

Barsby, T., Kelly, M.T. Gagne, S.M., Anderson., R.J., 2001. Bugorol A produced in culture by marine *Bacillus* sp. reveal a novel template for cationic peptide antibiotics. Org. Lett. 3, 437-440.

Bernan, V.S., Roll, D.M., Iveland, C.M., Greenstein, M., Maiese, W.M., and steinberg, D.A. (1993) A study on the mechanism of action of sceptrin, an antimicrobial agent isolated from the south pacific sponge *Agelas mauritiana* **J. Antimicrob. Chemother. 32** : 539 - 550.

Berthold, RJ., Borowitzka, MA., and Mackay MA. 1982. The Ultrastructure of *Oscillatoria spongeliae*, the blue – green algal endosymbiont of the sponge *Dysidea herbacea*. Phycologia 21 : 327 – 335.

Bewley, CA., Holland, ND., and Faulkner; DJ. 1996. Two classed of metabolites From Theonella swimhoei are localized indistint populations of bacterial gymbionts. Experientia. 52 : 716 – 722.

Boury-Esnault, N. & K. Rützler. (eds.) 1997. Thesaurus of sponge morphology. *Smithsonian Contributions to Zoology* No. 596. 55 p.

Burton, M. & H.S. Rao 1932. Report on The shallow-water marine sponges in the collection of The Indian Museum Part 1. *Records of the Indian Museum,* 34:

Brunton, FR. And Dixon, OA. 1994. Siliceous sponge – microbe biotic association and their Recurrence through the phanerozoic as reef mound constructors. Palaios 9 : 370 – 387.

Burkholder, P.R., Pfister, R.M. and Leitz, F.H. 1966. Production of a pyrrole antibiotic by Marine bacterium. Applied Microbiology 14, 649 – 653.

Buck, J.D.,Meyers,S.P. and Kamp, K.M. 1962. Marine bacteria with antiyeast activity. Science. N.Y. 138:1338-1340. Burkholder, P.R. 1968. Antimicrobial substances from the sea. In : Drugs from the Sea, Freudenthal, H.D., Ed., Marine Technology Society, Washigton, D.C., P. 87-112.

Cavanaugh, C. 1983. Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide habitats. Nature. 302 : 58-61. Cavanaugh, C., Gardiner, S.L., Jones, M.L., Jannash, H.W. and Waterburg, J.B. 1981. Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm Riftia pachyptila Jones :Possible chemoautotrophic symbionts. Science. 213:340-342. Crescitelli, F. and Geisman, T.A. 1962. Invertebrate pharmacology; selected topics. Annu. Rev. Pharmacol., 2 : 143-192.

Chelossi, E., Milanese, M., Milano, R.P., Riccardi, G., 2004. Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis*(Porifera, Demospongiae)

Dechsakulwatana, C. 1994. Inhibitory Effect of Marine Bacteria on Barnacle larvae. A dissertation submitted in partial fullfilment of the requirements for a Ph.D., The University of Tokyo, Tokyo, Japan. 120 p.

Dechsakulwatana, Chutiwan., Wimolpun Rungprom., Rawiwan Watanadilok., Preecha Phuwapraisirisarn. And Mary Garson. 2007. Natural Compounds from the Marine Organisms and their Associated Bacteria Collected from the Gulf of Thailand PERCH-CIC Congress V, Theme:Chemistry for Innovation, May 6-9, 2007, Pataya, Chonburi, Thailand

Dechsakulwatana, Chutiwan., Rungprom, Wimolpun., Kokpol, Udom., Garson, Mary., Chavasiri, Warinthorn., and Putchakarn, Sumaitt.. 2005. Antimicrobial Substance of Marine Bacteriaum, *Pseudoalteromonas* sp. associated with Sponges, *Halisurca ectofibrosa* Collected from the Gulf of Thailand. International Marine Biotechnology Conference 2005, June 7-12, 2005, St. John' Newfoundland& Labrador, Canada.

Dechsakulwatana, C., P. Ra-ngubpit, and S. Putchakarn. 2002. Inhibiton of Larval Attachment by Isolated Bacteria from Sponges and Soft Corals Collected from Chang Islands, Thailand. Proceeding of the 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "biotechnology for Better Living in the New Economy" 12-15 November 2002, Khon Kaen, Thailand. P. O-IBO2/1-5

Dechsakulwatana, Chutiwan., W. Chiewchan, , S. Putchakarn,, K. Ohwada, K. Tsukamoto-Kita, H. Shigemori, and Jun Kobayashi. 1996. Isolation ans Screening for Antibacterial Substance of Marine Bacteria

Associated with Sponges Collected from North Surin Islands, Thailand. Proc. of Seventh Joint Seminar on Marine Science, December 3-5, 1996, Tokyo, Japan. P. 60-64.

De Rosa, S., Milone, A., Ku jumgiev, A., Stefanov, K., Nechev, I., Popov, S., 2000. Metabolites from a marine bacterium *Pseudomonas/ Alteromonas,* associated with sponge*Dysidea fragillis.* Comp. Biochem. Physiol. 1126, 391-396.

De Rosa, S., Mitova, M., Tommonaro, G., 2003. Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. Biomol. Engineer. 20, 311-316.

Egan, S., Thomas, T., Holmstrom, C., Kjellebeerg, S., 2000. Phylogenitic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from marine alga *Ulva lactuca.* Environ. Microbiol. 2, 343-347.

Ely, R., Supriya, T., and Naik, C.G., 2004. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South India. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 309(1):121-127.

Engel, S., Jensen, P.R., and Fenical, W., 2002. Chemical ecology of marine microbial defense. J. Chem. Ecol. 28(10):1971-1985.

Faulkner, D,J. 2000. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. 17, 7-55.

Faulkner, D,J., Harper, M.K., Haygood, M.G., Saloman, C.E., and Schmidt, E.W. Symbiotic Bacteria in Sponges : Sources of Bioactive Substances ; in Fusetani, N.(ed)Drugs From the Sea, S. Karger. AG, Basel, 2000, pp. 107 – 119.

Felbeck, H., Childress, J.J. and Somero, G.N. 1981. Calvin-Benson cycle and sulphied oxidation ezymes in animals from sulphide rich habitats. Nature 293 : 291-293.

Felbeck, H., Liebezeit, G., Dawson, R. and Giere, O. 1983. Co_2 fixation in tissues of marineoligohaetes *(Phallodrilus leukocermatus and P. planus*) containing symbiotic, hemoautotrophic bacteria. Marine Biology. 75 : 187-191.

Fromont, J. 1989. Sponge processing procedures for classical taxonomy. pp. 253-255. *In* S.A. English (eds.). Soft-sediment marine invertebrates of Southeast Asia and Australia: A guide to identification. Australian Institute of Marine Science, Townsville.

Fromont, J. 1991a. Descriptions of species of the Petrosida (Porifera: Demospongiae) occurring in the tropical waters of The Great Barrier Reef. *The Beagle, Records of the Northern Territory Museum of Arts and Science,* 8(1): 73-96.

Fromont, J. 1991b. Descriptions of species of the Haplosclerida (Porifera: Demospongiae) occurring in the tropical waters of The Great Barrier Reef. *The Beagle, Records of the Northern Territory Museum of Arts and Science,* 10(1): 7-40.

Fusetani, N. 1987. Marine Metabolites Which Inhibit Development of Echinoderm Embryos. Bioorganic Marine Chemistry, Vol.l. 61-92.

Gauthier, M.J. and Flateau, G.N. 1976. Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. Canadian Journal of Microbiology, 22:1612-1619

Gauthier, MJ. 1982. Validation of the name *Alteromonas luteoviolacea*. International Journal Of Systemetic Bacteriology 32, 82 – 86.

Gerth, K., and Müller, R., 2005. Moderately thermophilic Myxobacteria: novel potential for the production of natural products. Isolation and characterization. Environmental Microbiology 7:874-880.

Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, Stefan., and Müller, R., 2003. Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities—past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. J. Biotechnology. 106:233-254.

Halstead, B.W. 1968. Marine biotoxins, new foods and new drugs from the sea. In : Drugs from the sea, Freudenthal, H.D., Ed, Marine Technology Society, Washington, D.C., p. 229-239.

Hardt, L.H., Jensen, P.R., Fenical, W., 2000. Neomarinone, and new cytotoxic marine derivatives, produced by a marine filamentous bacterium(Actinomycetetales). Tetrahedron Lett. 41, 2073-2076.

Holt., J.G., Krieg., N.R., Sneath., P.H., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition, Willams&Wilkins, Baltimore. 787 pp.

Hooper, J.N.A. 1997. Sponge Guide. Queensland Museum, Queensland, Australia. 143 p.

Hooper, J.N.A. & R. Van Soest. (eds.) 2002. Systema Porifera. Kluwer/Plenum Publishers. London.

Hoshino, T., Tanaka, T., Hori., S., and Ogasawa, N. 1987. Biosynthesis of violacien: Origins of hydrogen, nitrogen and oxygen atoms in the 2-pyrrolidone nucleus. Agricultural Biological Chemistry. 51, 2733-2741.

Imamura, N., Adachi, K., Nishijima, M. and Sano, H. 1993. Antibioticsproduces bymarine Bacteria. MBI Report 1992, Marine Biotechnology Institute co., LTD., Tokyo. Japan. p 78-87.

Itagaki,F., Shigemori,H., Ishibashi, M., Nakamura, T., Sasaki, T., and Kobayashi, J. 1992. Keramamide F, A new Theazole-Containing Peptide from the Okinawan Marine Sponge *Theonella* sp. J.Org.Chem., 57:5540-5542.

Ishibashi,M., Takahashi, K., Ogura, M., Nagasawa, S., Nakamura, T., Hirota, H., Ohta, T., and Nozoe,S. 1991. Keramamide B-D:Novel peptides from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp. J.Am.chem.Soc. 113:7812-7813.

Jayatilake, G.,S., Thornton, M.P., Leonard, A.C., Grim wade, J.E. and Baker, B.J. (1996) Metabolites from an Antartic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Natural Product. 59** : 293 - 296.

Kalinovskaya, N. I., Ivanova, E.P., Alexeeva, Y.V., Gorshkova, N. M., Kuznetsova, T. A., Dmitrenok, A.S., and Nicolau, D.V., 2004. Low-molecular-weight, biologically active compounds from marine *Pseudoalteromonas* spoecies. Current Microbiology. 48:441-446.

Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Nakajima, K., Nagata., K., and Nagata, S., 2005. Inhibitory activities of surface associated bacteria isolated from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. 20(3):178-185.

Kelly-Borges, M. & P.R. Bergquist. 1988. Sponges from Motupore Island, Papau New Guinea. *Indo-Malayan Zoology,* 5:121-159.

Kelly-Borges, M. & S. Pompani. 1992. The simple fool's guide to sponge taxonomy. Sponge Taxonomy Workshop, Harbor Branch Oceanographic Institution, Inc. 106 p.

Keegan, H.L. and MacFarlane, W.V., EDs. 1963. Vernomous and Poisonous Animals and Noxious Plants of the Pacific Region. Pergamon New york, PP. 456.

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.

Kiijoa, A., Watanadilok, R., Sonchaeng, P., Puchakarn, S., Sawangwong, P. and Herz, W. 2002. **Bromotyrosine Derivatives from the Marine Sponge *Suberea* aff. *praetensa***. Bolletlino del Musei e degli Istituti Biologici dell' Universita di Genova. (in press).

Kijjoa, A., Watanadilok, R., Sonchaeng, P., Sawangwong, P., Pedro, M., Nascimento, S. J. M., Silva, M. S. A., Eaton, G., and Herz, W. 2002. **Further Halotyrosine Derivatives from the Marine Sponge *Suberea* aff. *praetensa*.** *Z. Naturforsch*., 57c, 732-738.

Kijjoa, A., Watanadilok, R., Sonchaeng, P., Puchakarn, S., Pedro, M. and Herz, W. 2002. **Bromotyrosine Derivatives from the Marine Sponge *Suberea* aff. *praetensa*.** The 6th Sponge Conference, 29 September-5October 2002, Rapallo, Genoa, Italy.

Krassil'nikova, E.N. 1961. Antibiotic properties of microorganismsisolatedfromvarius depths of world oceans. Mikrobiologiya, 30 : 545-550.

Kobayashi, J.,Naitoh,K., Sasaki, T., and Shigemori,H. 1992. Metachromins D-H, New Cytotoxic sesquiter penoids from the Okinawan marine sponge Hippospongia metachromia . J.Org.Chem. 57:5773-5776.

Kobayashi, J., Kondo,K.,Ishibashi,M.,Walchli,M.R., and Nakamura, T. 1993. Theonezolide A:A novel polyketide natural product from the Okinawan marine sponge Theonella sp. J.Am.Chem. Soc. 115 : 6661-6665.

Lemos, M.L., Toranzo, A.E., and Barja, J.L.1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. Microbial Ecology. 11:149-163.

Lippert, H., Brinkmeyer, R., Mulhaupt, T., and Iken, K. 2003. Anitimicrobial activity in sub-Artic marine invertebrates. Polar Biol. 26:591-600.

McCaffrey, E.J. and Endean, R. 1985. Anitimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. Marine Biology. 89 : 1-8.

Mc Carthy, S.A., Johnson, R.M., and Kakimoto 1994. Characterization of an antibiotic produced by *Alteromonas luteaviolacea* Gauthier 1982, 85 isolated From Kinko Bay, Japan. Journal of Applied Bacteriology. 77 : 426 – 432.

Miki, W., Otaki, N., Yokoyama, A., Izumida, H., and Shimidzu 1994. Okaduxanthin, a novel C_{50} - KK 10206C associded with marine sponge, *Holichon okadai*. Experientia (50) - 684 - 686.

Nagano, H. and S. Ikegami. Aphdicholing : Shinkakusaibou DNA polymerase & no tokuiteki sogaizai (aphidi chline : a specific inhibitor of DNA polymerase & eukaryotic cells) Seikagaku. 1980 : 52 : 1208-1211

Nagai, K., Kamigiri, K., Arao, N., Suzumura, K., Kawano, Y., Yamaoka, M., Zhang, H., Watanabe, M., and Suzuki, K. 2003. YM-266183 and YM-266184, novel thiopeptide antibiotics produced by *Bacillus cereus isolated* from marine sponge. J. Antibiotics. 56(2): 123-128.

Nair, S. and Simidu, U. 1987. Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. Appl. and Environ. Microbiol. 53(12) : 2957-2962.

Newman, D.J., and Cragg, G.M. 2004. Marine natural products and related compounds in Clinical and advanced preclinical trials. J. Nat. Prod. 67:1216-1238.

Nigrelli, R.F. 1960. Biochemistry and pharmacology of compounds derived from marine organisms. Ann. N.Y. Acad. Sci., 90 : 615-950.

Okami,Y.1986.Marine microorganisms as a source of bioactive agents Microbiol Ecology, 12:65-78. Ravi, B.N., Erdman, T.R. and Schcuer, P.S. 1974. An antimicrobial constituent of asponges, *Chondrosia* sp. In : Webber, H.H. & Ruggiesi, G.D.Eds. Food-Drugsform the sea. Proceeding. Marine Technology Society, 258-262

Oclarit, J.M., Ohta, S., Kamimura, K., Yamaoka, Y. Shimizu, T. and Ikegami, S. 1994. Production of Antibacterial Agent, O-Aminophenol, by abacterium Isolated from the Marine Sponge, *Adocia* sp. Fisheries Science. 60 (5) 559 - 562.

Piel, Jörn. 2004. Metabolites from symbiotic bacteria. Nat. Prod. Rep. 21:519-538

Proksch, P., Edrada, R.A., Ebel, R., 2002. Drugs from the sea-current status and microbiological implications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59:125-134.

Rosenfeld, W.D. and ZoBell, C.E. 1947. Antibiotic production by marine microorganisms. J. Bacteriology, 54:393-398.

Rungprom, W., Siwu, ERO., Lambert, LK., Dechsakulwata, C., Barden, MC., Kolpol, U., Blanchfield, JT., Kita, M., Garson, M. 2008. Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed *Diginea* sp. and the sponge *Halisarca ectofibrosa.* TETRAHEDRAN. 64: 3147-3152.

Russell, F.E. 1967. Pharmacology of animal vernoms. Clin. Pharmacol. Ther., 8 : 849-873

Schmidt, EW., Bewley, CA., and Faulkenr, DJ. 1998. Theopdoua – mide, a bicyclic glycopeptide From Filamuntous bacterial gymbionts of the lithistid sponge Theonella swinhoei From Palau and Mozambique. J. Org. Chem. 63 : 1254 – 1258.

Sheuer,P.J. 1964. Thechemistry of toxin isolated from some marine organisms. In : Progress in Chemistry of Organic Natural Products, Zechmeister, L., Ed., Springer-Verlag. New York, p. 265-278.

Shigemori, H., Bae, M.A., Yazawa,K., Sasaki, T. and Kobayashi, J. 1992. Alteramide A, a New Tetracyclic Alkaloidfroma Bacterium *Alteromonas* sp. associatedwiththe marime sponge *Halichondria okadai*. J. Org. Chem. 57 : 4317-4320.

Sipkema, D., Osinga, R., Schatton, W., Mendola, D., Tramper, J., and Wiffels, R.H. 2005. Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cell, or synthesis? Biotech and Bioeng. 90(2): 201-222.

Skerman, V.B.D., McGowan, V., and Sneath, P.H.A. 1980. Approved lists of bacterial names. International Journal of Systematic Bacteriology, 30:225-420.

Southward, A.J., Southword, E.C., Dando, P.R., Ran, C.H., Felbeck, H. and Flugel, H. 1981. Bacterial symbiontsand low $^{13}C/^{12}C$ ratiosin tissues of Pogonophora indicate unusual nutrition and metabolism. Nature. 293 : 616-620.

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.

Strahl, E.D., Dobson, W.E., and Lundie, Jr. L.L, 2002. Isolation and screening of Brittlestar-associated bacteria for antibacterial activity. Cuurent Microbiology. 44:450-459.

Unson, MD., Holland, ND., and Faulkner, DJ. 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of marine sponge and accumulation of the crystalline metobolite in the sponge tissue. Mar. Biol. 115 : 1 – 11.

Unson, MD., and Faulkner, DJ. 1993. Cyanobacterial Symbiont Biosynthesis of Chlorinated metabolites From *Dysidea herbacea* (Porifer). Experientia 49 : 349 – 353.

Thakur, N.L., Hentschel, U., Krasko, A., Pabel, C.T., Anil, A.C., and Muller, W..E.G., 2003. Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs:potential basis for epibacterial chemical defense. Aquat. Microb. Ecol. 31(1) :77-83.

Thakur, A.N., Thakur, N.L., Indap, M.M., Pandit, R.A., Datar, V.V., and Muller, W..E.G., 2005. Antiangiogenic, antimicrobial, and cytotoxic potential of sponge-associated bacteria. Marine Biotechnology. 7:245-252.

Thompson, J.E., Walker,R.P. and Faulkner, D.J.1985. Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. Mar. Biol. 88:11~21.

Vacelet, J., 1975 Etude en microscopic electronique de l'association entre bacteries et spongiaires du genre Verongia (Dictyo ceratida). J.Microscopic Biol. Cell. 23:271-288

Weinheimer, A.J. and Karns, T.K.B. 1976. A search for anticancer and cardiovasculas agents in marine organisms. In:Food drugs from the sea, pp.491-496. (Proceedings of the 4th Drug from the Sea Conference 1974). Ed. by H.H. Webber and G.D.Ruggieri Washington: Marine Technology Society.

Welsh, J.H. 1964. Composition and mode ofactionof some invertebrates vernoms. Annu. Rev. Pharmacol., 4 : 293-304.

Wilkinson, C. 1978 a. Microbial associationsin sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. Marine Biology. 30 : 301-314.

Wilkinson, C. 1978 b. Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. Marine Biology. 49 : 169-176.

Wonganuchitmeta, S., Yuenyongsawad, S., Kaewpradub, N., and Plubrukarn, A., 2004. Antitubercular Sesterterpenes from the Thai sponge *Brachiaster* sp. J. Nat. Prod. 67:1767-1770.

Wimolpun Rungprom., Lynette K Lambert., **Chutiwan Dechsakulwatana**., Michael C. Barden., Warinthorn Chavasiri., Udom Kokpol., and Mary Garson. 2008. Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed *Diginea* sp. and the sponge *Halisarca ectofibrosa*. ***Tetrahedron***. 64(14):3147-3152.

Zheng, L., Chen, H., Han, X., Lin, W., and Yan, X., 2005. Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium NJ-6-3-1 associated with the sponge *Hymeniacidon perleve*. World J. Microb & Biotechnol. 21:201-206.

Zheng, L., Yan, X., Xu, J., Chen, H., and Lin, W., 2005. *Hymeniacidon perleve*, associated bioactive *Pseudomonas* sp. NJ-6-3-1. Appl. Biochem. Microbiol. 41(1): 35-39.

Zhao, Xin-Qing. 2011. Genome-Based Studies of Marine Microorganisms to Maximize the Diversity of Natural Products Discovery for Medical Treatments. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 1-11.

Blunt, John W., Brent R. Copp, Murray H. G. Munro, Peter T. Northcote and Michèle R. Prinsep. 2005. Marine Natural Products. ***Nat. Prod. Rep.***, **22**, 15-61

A.S. Ninawe. http://www.pharmaasia.com/article/marine-natural-products; เข้าถึงเมื่อวันที่ 30 กันยายน 2554

http://www.bioaqua.net/mnp/MNP/clinical.asp: เข้าถึงเมื่อวันที่ 4 เม.ย. 2550

<u>ส่วน ค</u> :ประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติของหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว ชุติวรรณ นามสกุล เดชสกุลวัฒนา
   (ภาษาอังกฤษ) Miss Chutiwan Dechsakulwatana
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ หัวหน้างานวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล
4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร
   สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล
   มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131
   โทรศัพท์ (038) 391671-3 โทรสาร (038) 391674
   E-mail: chutiwan@buu.ac.th, , chutiwan@bims.buu.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

- วท. บ. (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน, 2526
- M.Sc. (Fishery Science)	The University of Tokyo, 1991
- Ph.D. (Fishery Science)	The University of Tokyo, 1994

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
- เทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแบคทีเรียทะเล
- จุลชีววิทยาทางทะเล
- นิเวศนวิทยาทางจุลชีววิทยาในน้ำเค็ม

7. งานสนับสนุนการเรียนการสอน
   - อาจารย์พิเศษ สอนปริญญาตรี และปริญญาโท ประจำภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
   - อาจารย์พิเศษ ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยบูรพา

<u>ส่วน ค</u> ประวัติคณะผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ-สกุล นาย ปรีชา ภูวไพรศิริศาล

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี) ---
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
   ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. พญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330 โทรศัพท์ 0-2218-7624
   preecha.p@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	วท.บ. (เคมี, เกียรตินิยม)	ปีที่จบ	2538	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาโท	วท.ม. (เคมีอินทรีย์)	ปีที่จบ	2541	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาเอก	Ph.D. (Aquatic Bioscience)	ปีที่จบ	2546	The University of Tokyo, Japar

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล
   เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืช
   นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สำหรับการหาสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ