



รายงานโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๖

เรื่อง

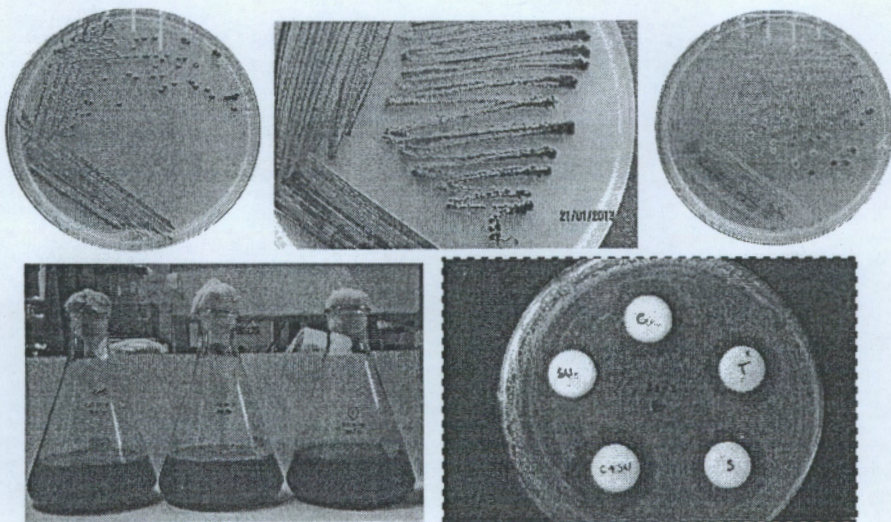
ศักยภาพของแบคทีเรียทะเล: แหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

The Potential of Marine Bacteria as the Source of
Bioactive Metabolites and Food Supplements

ภายใต้แผนงานวิจัย

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

Marine Microbes as the New Sources of Drug Agents and
Food Supplements



16 ก.ค. 2558

355566

โดย

ศษ ๐๑๐๖๔๖

เริ่มบริการ

๐๑๗๘๐๐ 9

ดร. ชติวรรณ เดชสกุลวัฒนา, มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ.ดร. ปรีชา กุวไพโรตติธาล, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย -2 พ.ค. 2559

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณแผ่นดินปี ๒๕๕๖

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๗

คณะที่ปรึกษาโครงการวิจัย

๑. ศ.ดร. สุชาติ อุปถัมภ์ (อดีตอธิการบดีมหาวิทยาลัยบูรพา) ที่ปรึกษา
๒. ศ.ดร. สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา (อดีตรองอธิการบดีมหาวิทยาลัยบูรพา) ที่ปรึกษา
๓. ศ.ดร. วิชัย รุ่งตระกูล ผู้อำนวยการศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมเคมี(PERCH-CIC) ที่ปรึกษา

คณะผู้วิจัย

๑. ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา หัวหน้าโครงการวิจัย
๒. ผศ.ดร. ปรีชา ภูวไพโรศรีศาล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ร่วมวิจัย

หน่วยงานหลัก - สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง จ. ชลบุรี ๒๐๑๓๑
โทรศัพท์: ๐-๓๘๓๙ ๑๖๗๑-๓ โทรศัพท์: ๐-๓๘๓๙ ๑๖๗๔
e-mail address: chutiwan@buu.ac.th; chutiwan@bims.buu.ac.th

หน่วยงานสนับสนุน - คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร
e-mail address: p.puwaprisirisarn@cu.ac.th

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงได้เพราะได้รับความช่วยเหลือและสนับสนุนจากบุคคลหลายท่านโดยเฉพาะท่านที่ปรึกษา ศ.ดร. สุชาติ อุปถัมภ์ ศ.ดร. สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา และ ศ.ดร. วิชัย รวีตระกูล ที่ได้ให้คำปรึกษาแก่คณะผู้วิจัยเป็นอย่างดี ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมเคมี(PERCH-CIC) ตลอดจนหน่วยงานต่างๆ ซึ่งคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้คือ

แผนงานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปี ๒๕๕๖ ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ผู้ช่วยวิจัย นักวิทยาศาสตร์ นิสิตที่ทำปัญหาพิเศษจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาและนิสิตฝึกงานของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ทุกท่านที่มีส่วนให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
วัตถุประสงค์	5
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
ระเบียบวิธีวิจัย	10
ผลและอภิปรายผลการวิจัย	20
สรุปผลการวิจัย	32
เอกสารอ้างอิง	35

บทคัดย่อ

การศึกษา ศักยภาพของแบคทีเรียทะเล: แหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยดำเนินการคัดแยกแบคทีเรียได้ 210 สายพันธุ์จากฟองน้ำ 52 ตัวอย่าง จากหมู่เกาะ อ.สิชล จังหวัด นครศรีธรรมราช สามารถพบแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในฟองน้ำแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันโดยพบมีแบคทีเรีย อาศัยอยู่จำนวนน้อยที่สุดใน ฟองน้ำครกแข็งสีเหลือง RAB56 A-8 *Petrosia* sp. จำนวน 1.1×10^5 โคโลนีต่อ กรัม และมากที่สุด ฟองน้ำถั่วสีน้ำตาลเขียว *Spongia* sp. "yellow" RAB56 A-19 จำนวน 4.58×10^7 โคโลนีต่อ กรัม เมื่อแบคทีเรียทะเล จำนวน 210 สายพันธุ์ มาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ทดสอบโดยวิธี Disc diffusion Agar Assay แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกคือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, แบคทีเรียแกรมลบคือ *Vibrio alginolyticus*, และ *Escherichia coli* พบว่า มีฟองน้ำมี 38 สายพันธุ์ ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ และได้ทำการสกัดแบคทีเรียที่ อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่มีออกฤทธิ์ชีวภาพจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ WNAI56 -1 จากฟองน้ำท่อสีเทา (*Cladocroce* sp. "grey") สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ได้ ส่วน สายพันธุ์ RAB56 A-28 จากฟองน้ำสีม่วง (*Petrosia hoeksemai*) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรม ลบที่ทดสอบ *E. coli* ได้ดี

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

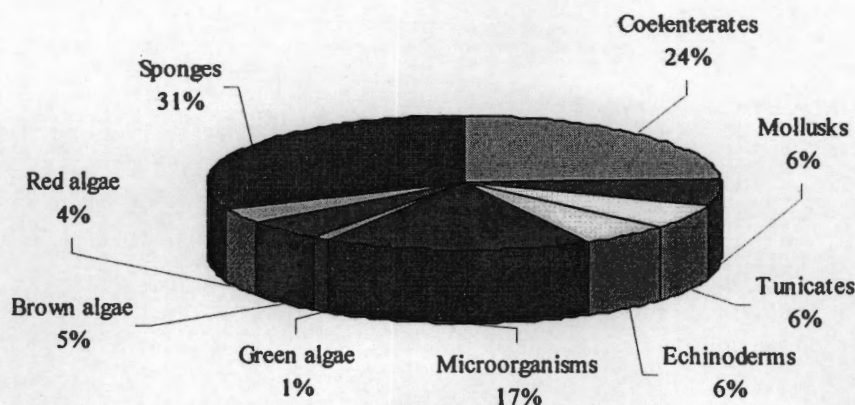
การศึกษาด้านวิทยาศาสตร์ของจุลินทรีย์ /แบคทีเรียทะเลที่สำคัญต่อระบบนิเวศในทะเล ในการผลิตสารเมตาบอไลต์ ได้กลายเป็นหัวข้อการวิจัยใหม่ที่สำคัญในปัจจุบัน(Faulkner, 2000) จากการค้นคว้าวิจัยหลาย ๆ โครงการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารประกอบเคมีที่น่าสนใจเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ (Barsby et al., 2001; Chelossi et al., 2004.; Hardt et al., 2000) โดยส่วนใหญ่ความสนใจจะมุ่งเน้นที่การวิจัยจุลินทรีย์ทั้งจากตะกอนดินบริเวณชายฝั่งและทะเลลึก แบคทีเรียทะเลสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและ/หรือสารยับยั้งการเกาะของเพรียง 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 การที่จุลินทรีย์บางอย่างสามารถสร้างสารที่ต้านการเจริญของจุลินทรีย์พวกอื่นๆได้ จะใช้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการแตกของเซลล์ที่ตายแล้วสำหรับการรอดชีวิต (Gauthier and Flatau 1976)

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

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

จากความน่าสนใจทางเคมีและชีวภาพของสารทุติยภูมิอย่างมีนัยสำคัญ จุลินทรีย์ทะเลที่เป็นที่คาดหวังว่าจะทำหน้าที่เป็นผู้ผลิตสารที่นำไปสู่การพัฒนาที่มีศักยภาพหรือเครื่องมือสำหรับการวิจัยทางเภสัชวิทยาพื้นฐานในวิทยาศาสตร์เพื่อชีวิต การสำรวจสภาพแวดล้อมทางทะเลที่เริ่มต้นของทรัพยากรที่นำขึ้นต้นในช่วงทศวรรษที่ 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) การวิจัยและพัฒนาสารตัวยานี้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลโดยเฉพาะฟองน้ำและจุลินทรีย์ทะเลซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ (ภาพที่ 1)



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

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

ตารางที่ 1 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากจุลินทรีย์ทะเลที่อยู่ในระหว่างการทดลองใช้รักษาทางการแพทย์

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

จากการค้นคว้าจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาบทบาทของแบคทีเรียที่ผลิตสารปฏิชีวนะที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล และคุณสมบัติของสารที่ต่อต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำตลอดจนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่อาศัยอยู่ในทะเลเพื่อใช้ในการพัฒนาปรับปรุงทำเป็นยารักษาโรคในขั้นสูงต่อไป

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

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 (antimicrobial activity) จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับ ฟองน้ำทะเล
- 2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive metabolites) สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง ชนิดต่างๆ โดยสารสกัดแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำบางชนิดที่พบบริเวณชายฝั่งทะเล
- 3 เพื่อศึกษาถึงความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
- 4 เพื่อถ่ายทอดความรู้ในการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล

ขอบเขตของโครงการวิจัย

- จากการดำเนินการวิจัยระยะที่ 1 ที่ผ่านมา พบถึงศักยภาพการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ ของทะเลไทย งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการวิจัยเพื่อตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหายาโดยอาศัยกระบวนการทางเคมีและชีวเคมี ในแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ ในด้านต่างๆเช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) นอกจากนี้ยังพัฒนาในด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ คือ กรดไขมัน ชีวรงค์วัตถุ โดยในระยะที่ 2 นี้จะมุ่งเน้นการเก็บตัวอย่างฟองน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนล่าง ครอบคลุมพื้นที่บริเวณชายฝั่ง

ทะเล่ บริเวณจังหวัด นครศรีธรรมราช และ ประจวบคีรีขันธ์ ดำเนินการเก็บตัวอย่างฟองน้ำ ประมาณ 20 - 50 ตัวอย่าง ในปี ที่ 1-3

- จำนวนของเชื้อแบคทีเรียคาดว่าจะคัดแยกได้ประมาณ 200 – 400 สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในโครงการวิจัย

- ดำเนินการตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพ ปีที่ 1-3

- ดำเนินการวิจัยและพัฒนาสารตัวยาดั้งเดิม และผลิตภัณฑ์อาหารเสริม

- ร่วมมือวิจัยและพัฒนาสารตัวยาที่น่าสนใจกับเครือข่ายวิจัยของศูนย์ความเป็นเลิศทางด้าน
นวัตกรรมทางเคมี

- ถ่ายทอดองค์ความรู้แก่ หน่วยงานรัฐและภาคเอกชนที่สนใจผ่านการฝึกอบรมและสัมมนาวิชาการ

- สร้างนักวิจัยใหม่ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะผ่านผู้ช่วยวิจัย การฝึกงานวิจัยแก่นิสิต นักศึกษา และ

การทำปัญหาพิเศษและวิทยานิพนธ์

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 และสิ่งแวดล้อมในทะเลจากการศึกษาที่นำมาสู่การค้นพบความสัมพันธ์ระหว่างเคมีออโตโทรฟิกแบคทีเรีย (chemoautotrophic bacteria) และสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Cavanaugh et al., 1981; Felbeck et al., 1981; 1983; Southward et al., 1981) การค้นพบนี้ได้ชี้ไปสู่ความสำคัญของแบคทีเรียต่อสารอาหาร, การแพร่กระจาย และการผลิตของสิ่งมีชีวิต (host organisms) และสังคมของมัน (Cavanaugh et al., 1983) ได้นำไปสู่การศึกษายุทธศาสตร์ของการแยก และการค้นพบสารประกอบใหม่ที่ประสบความสำเร็จของโปรแกรมผลิตภัณฑ์ธรรมชาติถูกพัฒนามาสู่จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับสิ่งมีชีวิต และ สิ่งแวดล้อมในทะเล เมื่อศึกษาสรีรวิทยาของฟองน้ำเพิ่มเติมพบว่าภายในประกอบด้วยแบคทีเรียหลายชนิดเป็นปริมาณถึง 40 % ของสิ่งมีชีวิตที่ตรวจพบ (Vacelet, 1975; Wilkinson, 1978 a;b)

บทบาทของจุลินทรีย์ในทะเล ในเรื่องของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาตินั้นอันที่จริงแล้ว Rosenfeld และ ZoBell (1947) เป็นผู้ค้นพบเป็นครั้งแรกว่า แบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมในทะเลสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียอื่น *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) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ถูกจัดอยู่ในสกุลต่างๆ และแสดงผล ต่อต้านทั้งแบคทีเรียกรัมบวก และแบคทีเรียกรัมลบ (Gauthier, 1966)

Okami (1986) ได้รายงานถึงความสามารถของแบคทีเรียกรัมบวกในการผลิตสารปฏิชีวนะและสาร aminoglycoside ชนิดใหม่ เรียกว่า Istamycin จากจุลินทรีย์ 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, ยาปฏิชีวนะและ กิจกรรมทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ สัญญาซื้อขายล่วงหน้าของ dictyotacean สาหร่าย (*Spatoglossum schmittii*) แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษ spatol melanoma กับมนุษย์และเซลล์ astrocytoma ใน วัฒนธรรม *Styopodium* เป็นพิษที่มีศักยภาพการผลิตโดย zonale *Styopodium* 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 และเกาะสมสาร 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) ได้รายงานถึงการค้นพบสารไซคลิกเปปไทด์ ชนิดใหม่ที่สกัดได้จากแบคทีเรียทะเล *Pseudoalteromonas* sp. ที่คัดแยกจากฟองน้ำ *Halisarca ectofibrosa* ที่เก็บจากอ่าวไทยเช่นกัน นอกจากนี้คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าควรที่ที่มีการสนับสนุนให้มีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง เพื่อการวิจัยและพัฒนาต่อยอดการวิจัยอย่างต่อเนื่อง

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

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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)

การค้นหาค้นคว้าใหม่ได้เกิดการแข่งขันสูงมาก โดยเฉพาะทั้งยาต่อต้านไวรัส และต่อต้านมะเร็ง เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งฤทธิ์จะถูกเลือกเฉพาะที่ไม่ทำอันตรายสิ่งมีชีวิต นั้นด้วย ด้วยว่าใหม่บางตัวเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เป้าหมายในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา คือ สิ่งมีชีวิตจากทะเล อาทิ เช่น ฟองน้ำ กัลปังหา ปะการัง นับแต่นั้นมานักวิจัยทางเคมี และเภสัชกรรมของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้หันมาให้ความสนใจต่อฟองน้ำ

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), สารอัลคาลอยด์ต่อต้านลิวติเมีย prianosin A (Kobayashi *et al.*, 1987), สารเปปไทด์ใหม่ : keramamide B-D (Kobayashi *et al.*, 1991) สารโรอะโซล-เปปไทด์ใหม่ : keramamide-F (Itagaki *et al.*, 1992) สารไซโตทอกซิก-เฮสคิเทอร์พินอยด์ : metachromines D-H (Kobayashi *et al.*, 1992) สารโพลีแซคคาไลด์ใหม่ : theonezolid A (Kobayashi *et al.*, 1993)

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

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

จากการศึกษาของ Nair และ Simidu (1987) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเล ตะกอน แพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนสัตว์ 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

เมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา Shigemori และคณะ (1992) ได้อธิบายถึงยุทธศาสตร์ที่สร้างการค้นพบสาร Tetracyclic Alkaloid, Alteramide A จากแบคทีเรีย *Alteromonas* sp. ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ (*Halichondria okadae*) จากนั้นในปี ค.ศ. 1992 Imamura และคณะ (1993) พบสารปฏิชีวนะที่ชื่อว่า 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 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 *Penicillium 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 มาทำการแยกแפרคชันด้วย 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 เป็นแหล่งของไซคลิกเปปไทด์ โดยได้คัดแยกแบคทีเรีย 2 ชนิดจากฟองน้ำ *Ircinia variabilis* จากอ่าว Naples ประเทศอิตาลี ทำการสกัด Fatty acid และ cyclic dipeptide จากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยง

การศึกษาสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรียที่ชุดิวรรณ 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* MAK8-08-4 สร้างรงควัตถุชีวภาพ Astaxanthin เป็นตัวหลักใน Carotenoids ที่มีสีเหลืองส้มที่นิยมใช้เป็นสี

ผสมอาหาร เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารเหล่านี้มีศักยภาพที่ควรที่จะพัฒนานำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเวชภัณฑ์และเวชสำอางได้และพบแบคทีเรียจากทะเลหลายสายพันธุ์แนวโน้มสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์น้ำได้คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, และ *Vibrio anguillarum* จึงน่าที่จะได้มีการทดลองสกัดสารและกระบวนการทดสอบสารที่ได้โดยวิธีทางชีวเคมีควบคู่กันไปกับการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งเป็นการใช้วิธีการสกัดที่แตกต่างกัน เพื่อให้ได้สารกลุ่มใหม่ที่เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน แล้วทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยใช้แบคทีเรียมาตรฐานและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค อันจะทำให้ได้ข้อมูลใหม่หรือสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นหรือมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งแตกต่างจากข้อมูลที่ผ่านมา

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

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

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่น่าผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานของเภสัชวิทยาและฤทธิ์ทางชีวภาพ(bioactive metabolites) จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในพองน้ำในประเทศไทย ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาต่อด้านเภสัชกรรมต่อไป
2. ได้ข้อมูลของปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถของแบคทีเรียและสารสกัดกลุ่มต่างๆในการต้านจุลินทรีย์
3. ทำให้มีข้อมูลและสามารถถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีอยู่ในท้องถิ่นแก่นักเรียน นิสิตนักศึกษา อาจารย์ นักวิจัยและเกษตรกรผู้สนใจ
4. ได้ข้อมูลหรือขั้นตอนการวิจัยสำหรับนำไปใช้ในการสอนวิชาเคมี ชีวเคมี จุลชีววิทยา เภสัชวิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ ระดับอุดมศึกษา
5. ได้แนวทางการเริ่มต้นสารปฏิชีวนะ ข้อมูลหรือขั้นตอนการวิจัยสำหรับนำไปใช้ในการวิจัยต่อยอดในระดับสูงขึ้นและพัฒนาไปสู่การนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ดำเนินการเก็บตัวอย่างฟองน้ำเพื่อแยกแบคทีเรียจากฟองน้ำ จากบริเวณต่างๆ ตามที่กำหนดในโครงการวิจัยที่ 1 ดังภาพที่ 1 คือ

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

- จำนวนของเชื้อแบคทีเรียคาดว่าจะคัดแยกได้ประมาณ 200 – 300 สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในโครงการวิจัยตัวอย่างฟองน้ำที่ได้แต่ละตัวจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ

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

ส่วนที่ 1 เก็บรักษาไว้ด้วยวิธีทางชีววิทยาใช้ในการจำแนกชนิดของฟองน้ำ (โครงการวิจัยที่ 1)

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

ส่วนที่ 2 นำไปทำการคัดแยกแบคทีเรียจากฟองน้ำเพื่อสกัดสารจากแบคทีเรีย

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 ต่อกันนั้นนำมาเกลี่ยเชื้อ โดยทำเช่นเดียวกับข้อ

1.4 ดูดส่วนที่เป็นน้ำที่ได้จากการเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเกลี่ยกระจายเชื้อบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Zobell medium ที่ปรับปรุงสูตร

1.5 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 5 - 7 วัน ตรวจสอบผล

1.6 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญขึ้นในแต่ละจานเพาะเลี้ยง แล้วคำนวณค่าเป็นโคโลนีต่อกรัม (CFU/g)

1.7 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันในแต่ละจานเพาะเชื้อของแต่ละตัวอย่างฟองน้ำ

1.8 นำโคโลนีที่เลือกมาทำให้บริสุทธิ์ (Purify) โดยเชื้อจากโคโลนีนั้นลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 2 - 3 วัน เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเป็น stock ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Zobell medium ที่ปรับปรุงสูตรที่มีวัน 0.3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการศึกษาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต่อไป

2) การเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์

ทำการเก็บสายพันธุ์แบบกึ่งถาวรเพื่อรักษาสภาพสรีรของเซลล์ ภายใต้เทคนิคปราศจากเชื้อ

2.1 นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้บริสุทธิ์แล้ว มาทำการเพาะเลี้ยงใน Zobell broth ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน

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

2.3 เติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ครึ่งหนึ่ง อีกครึ่งหนึ่งเติมกลีเซอรอล แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เป็นการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียแบบกึ่งถาวร

3) การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์มาตรฐาน

3.1 การเตรียม Standard test strains ได้แก่

Gram positive bacteria	Gram negative bacteria
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Vibrio alguilarum</i>
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922

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

3.1.2 ทำการถ่ายเชื้อ ลงในหลอดอาหารเหลว TSB (heavy inoculate) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้การเขย่าในแนวนอน (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 (triplicates)

3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนด (Screening of Antimicrobial activity assay)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟองน้ำ (test strain)

3.2.1. เลี้ยงแบคทีเรียจากฟองน้ำแต่ละสายพันธุ์ (test strain) บนอาหารร่วน 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 ภายใต้การเขย่าในแนวนอน (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 โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicates)

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

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

สำหรับแบคทีเรียจากฟองน้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่กำหนดจะนำมาทดสอบสารสกัดเบื้องต้นในขั้นตอนต่อไป

3.3 การตรวจสอบยืนยันผลฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์มาตรฐาน

3.3.1 ทำการเตรียมเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, *V. anguillarum* ORI และ *B. subtilis* ATCC 6633 ลงในอาหารร่วน 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 ภายใต้การเขย่าในแนวนอน (120 รอบต่อนาที)

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

3.3.5 ทำการปั่นเหวี่ยงเชื้อตัวอย่างโดยใช้เครื่อง 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 ที่งัดไว้แล้วนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ standard ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 1
- ส่วนของเซลล์ หลังจากที่มีการนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อออกไปแล้ว จะเหลือส่วนของตะกอนจะนำมาละลายด้วย ORI broth ในอัตราส่วนที่เท่ากับส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อในตอนแรก ต่อจากนั้นนำสารละลายตะกอนที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบน AA disc ที่งัดไว้แล้วนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกันกับส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 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

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 ภายใต้การเขย่าในแนวนอน (100 รอบต่อนาที)

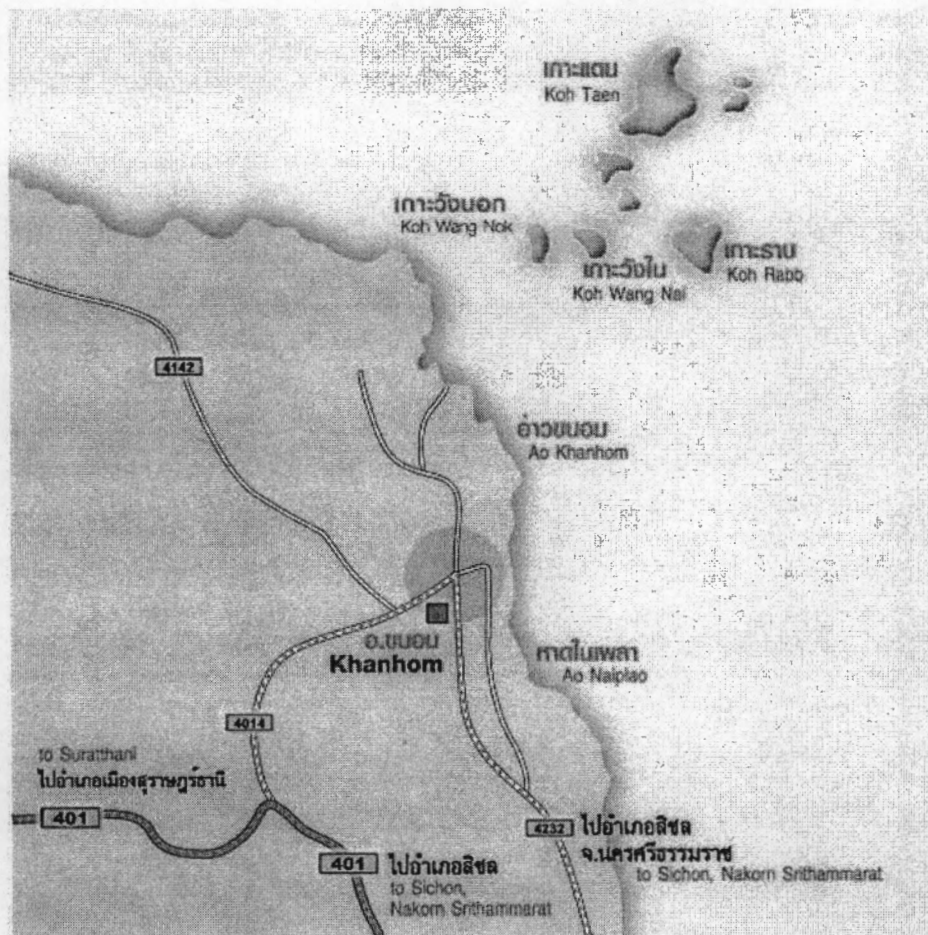
4.3 ทำการถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 2 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งบรรจุ (ขนาด 2 ลิตร) ฟลาสค์ละ 1 ลิตร จำนวน 50 – 100 ลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าในแนวนอน (100 รอบต่อนาที) โดยจะใช้ทำการทดลองเมื่อครบเวลาเท่ากับที่เชื้อออกฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่กำหนด

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 แล้วคำนวณหา น้ำหนักของเซลล์
- ทำการสกัดด้วยสารละลาย เอทานอล, สารละลายผสม คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ($\text{CH}_3 : \text{MeOH} = 1 : 2$) 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 ใส่กรวย สำหรับแยกชั้นขนาด 300 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นของ ethylacetate และน้ำ โดยส่วนชั้นบนจะเป็นส่วนที่สามารถละลายได้ใน ethylacetate ซึ่งจะนำมา ทำให้แห้งโดยใช้ฟลาสค์สำหรับ evaporate ที่ชั่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้ว ส่วนชั้นล่างจะเป็นส่วนที่มีสาร สกัดที่ละลายได้ดีในน้ำจะนำมาใส่ ethylacetate ประมาณ 30 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าจนสารละลาย เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น ทำเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง แล้วเอาส่วนของน้ำที่ได้สุดท้ายไปทำให้แห้ง และ ชั่งน้ำหนักก่อน และหลังทำการทดลองทุกครั้ง
- นำส่วนใสที่ได้แต่ละชั้นคือ ethyl acetate และน้ำใส่ฟลาสค์สำหรับ evaporate โดยต่อเข้ากับเครื่อง rotary vacuum evaporator
ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (supernatant)
- นำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาสกัดด้วย ethyl acetate ในอัตราส่วน 1 : 4 พร้อมทั้งเขย่าจน สารละลายเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นของ ethylacetate และน้ำ โดยส่วนชั้นบนจะเป็นส่วนที่ สามารถละลายได้ใน ethylacetate ซึ่งจะนำมาทำให้แห้งโดยใช้ฟลาสค์สำหรับ evaporate เพื่อนำไป ทดสอบต่อไป
- ทำการทดลองขั้นต่อไป เช่นเดียวกับที่ดำเนินการในตอนต้น



ภาพที่3-1 แผนที่แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างฟองน้ำบริเวณเกาะวังนอก ซึ่งอยู่ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี (ที่มา : www.i-creativeweb.com)

บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1 การเก็บตัวอย่างฟองน้ำและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ

จากการเก็บตัวอย่างฟองน้ำ จากบริเวณเกาะวังนอก จังหวัดสุราษฎร์ธานี เก็บตัวอย่างฟองน้ำที่แตกต่างกัน และสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียทะเลให้บริสุทธิ์ โดยเลือกแต่ละโคโลนีที่แตกต่างกันนำมาขีด (streak) บนอาหารใหม่ได้ทั้งหมด 221 สายพันธุ์ และได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย โดยการเกลี่ยกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell agar

ตารางที่ 1 จำนวนแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำบริเวณหมู่เกาะ อ.ลิซล จังหวัดนครศรีธรรมราช

รหัส	ชื่อฟองน้ำ		จำนวนแบคทีเรียทะเลทั้งหมดที่พบในฟองน้ำ(CFU/g)
	ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	
RAB56 A-1	ฟองน้ำท่อไฟสีเหลือง	<i>Biemna tubulata</i>	4.0×10^6
RAB56 A-2	ฟองน้ำถ่าน	<i>Xestospongia mammillata</i>	1.4×10^6
RAB56 A-3	ฟองน้ำครกสีม่วง	<i>Petrosia</i> sp.	ND
RAB56 A-4	ฟองน้ำดูดตัวสีน้ำตาลเขียว	<i>Hyattella intestinalis</i>	1.5×10^6
RAB56 A-6	ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง	<i>Iotrochota baculifera</i>	1.2×10^5
RAB56 A-7	ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง	<i>Oceanapia sagittaria</i>	2.75×10^5
RAB56 A-8	ฟองน้ำครกแข็งสีเหลือง	<i>Petrosia</i> sp.	1.1×10^5
RAB56 A-9	ฟองน้ำสีน้ำเงิน	<i>Neopetrosia</i> sp. "blue"	2.1×10^5
RAB56 A-10	ฟองน้ำเคลือบหนาสีฟ้า	<i>Gelliodes petrosioides</i>	9.0×10^5
RAB56 A-11	ฟองน้ำก้อนหนามสีดำ	<i>Echinodictyum conulosum</i>	7.9×10^6
RAB56 A-12	ฟองน้ำหนามสีเทา	<i>Dysidea</i> sp. "grey"	3.4×10^6
RAB56 A-13	ฟองน้ำยัดหนามหนามสีขาว	<i>Ircinia mutans</i>	1.78×10^7
RAB56 A-14	ฟองน้ำปล่องภูเขาไฟ	<i>Spheciospongia vagabunda</i>	8.1×10^5
RAB56 A-15	ฟองน้ำหนามสีเขียว	<i>Callyspongia pseudofibrosa</i>	3.6×10^6
RAB56 A-18	ฟองน้ำเปลี่ยนสีสีเหลือง	<i>Pseudoceratina purpurea</i>	1.15×10^7
RAB56 A-19	ฟองน้ำดูดตัวสีน้ำตาลเขียว	<i>Spongia</i> sp. "yellow"	4.58×10^7

รหัส	ชื่อฟองน้ำ		จำนวนแบคทีเรียทะเลทั้งหมดที่พบในฟองน้ำ(CFU/g)
	ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	
RAB56 A-20	ฟองน้ำกิ่งสีฟ้า	<i>Niphates</i> sp. "blue"	3.12×10^7
RAB56 A-21	ฟองน้ำสีม่วงแดง	<i>Chalinula</i> sp. "red"	1.7×10^7
RAB56 A-22	เพรียงหัวหอม	unidentified	2.28×10^7
RAB56 A-23	ฟองน้ำเคลือบสีม่วง	<i>Gelliodes</i> sp. "purple"	1.84×10^7
RAB56 A-24	ฟองน้ำยัดหุ่ยสีดำ	<i>Hyrtios</i> erectus	6.7×10^6
RAB56 A-25	ฟองน้ำถั่วดำ	<i>Cacospongia</i> sp.	2.39×10^7
RAB56 A-26	ฟองน้ำยัดหุ่ยสีดำ	<i>Hyrtios</i> erectus	1.83×10^7
RAB56 A-27	ฟองน้ำถั่วดำ	<i>Cacospongia</i> sp.	1.17×10^7
RAB56 A-28	ฟองน้ำสีม่วง	<i>Petrosia</i> hoeksemai	9.4×10^6
WNOK56 -1	ฟองน้ำร่างแหตาข่าย	<i>Scopalina</i> australiensis	1.12×10^7
WNOK56 -2	ฟองน้ำสีม่วงแดง	<i>Chalinula</i> sp.	5.0×10^5
WNOK56 -3	ฟองน้ำกิ่งสีฟ้า	<i>Gelliodes</i> sp. "blue"	2.5×10^5
WNOK56 -4	ฟองน้ำเปลี่ยนสีสีน้ำตาลเหลือง	<i>Pseudoceratina</i> purpurea	1.2×10^7
WNOK56 -6	ฟองน้ำหนามสีเทา	<i>Dysidea</i> sp. "grey"	2.4×10^7
WNOK56 -7	ฟองน้ำลูกกอล์ฟหลุมใหญ่	<i>Cinachyrella</i> sp.	2.07×10^6
WNOK56 -8	ฟองน้ำลูกกอล์ฟหลุมเล็ก	<i>Paratetilla</i> bacca	9.7×10^6
WNOK56 -9	ฟองน้ำแท่งสีดำ	<i>Stylissa</i> massa	8.97×10^6
WNOK56 -10	ฟองน้ำหนามสีเขียว	<i>Callyspongia</i> pseudofibrosa	1.25×10^6
WNOK56 -11	ฟองน้ำกิ่งสีส้ม	<i>Haliclona</i> sp.	1.84×10^7
WNOK56 -12	ฟองน้ำสีส้ม	<i>Axinyssa</i> sp. "orange"	8.1×10^6
WNOK56 -14	ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง	<i>Iotrochota</i> baculifera	2.25×10^5
WNOK56 -15	ฟองน้ำปล่องภูเขาไฟ	<i>Spheciospongia</i> vagabunda	9.66×10^6
WNOK56 -16	ฟองน้ำก้อนสีม่วงขาว	<i>Bubaris</i> sp. "purple"	4.75×10^6
WNOK56 -17	ฟองน้ำเคลือบแข็งสีม่วง	<i>Xestospongia</i> sp. "purple"	9.8×10^5
WNOK56 -18	ฟองน้ำถ่าน	<i>Xestospongia</i> mammillata	1.53×10^6
WNOK56 -22	ฟองน้ำถั่วดำ	<i>Cacospongia</i> sp.	1.19×10^7
WNAI56 -1	ฟองน้ำท่อสีเทา	<i>Cladocroce</i> sp. "grey"	9.7×10^5

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัส	ชื่อฟองน้ำ		จำนวนแบคทีเรียทะเลทั้งหมดที่พบในฟองน้ำ(CFU/g)
	ชื่อไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	
WNAI56 -2	ฟองน้ำสีม่วง	<i>Stylissa massa</i>	2.43×10^6
WNAI56 -3	ฟองน้ำกิ่งตาข่ายสีม่วง	<i>Suberea praetensa</i>	3.4×10^5
WNAI56 -4	ฟองน้ำเคลือบสีน้ำตาล	<i>Mycale parishii</i>	3.91×10^6
WNAI56 -5	ฟองน้ำก้อนสีม่วงขาว	<i>Axinyssa sp.</i>	9.2×10^5
WNAI56 -6	ฟองน้ำตุ้มน้ำตาลเขียว	<i>Hyattella sp. "brown"</i>	4.8×10^5
WNAI56 -7	ฟองน้ำสีม่วง	<i>Axinyssa sp. "purple"</i>	2.97×10^6
WNAI56 -8	ฟองน้ำเปลี่ยนสีน้ำตาลเหลือง	<i>Pseudoceratina purpurea</i>	9.0×10^5
WNAI56 -9	ฟองน้ำครกสีม่วง	<i>Petrosia sp.</i>	4.4×10^5
WNAI56 -10	ฟองน้ำกิ่งสีส้ม	<i>Haliclona sp.</i>	1.16×10^6

4.2 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านฤทธิ์เชื้อแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่ระยะเวลา 24 ชม.

จากการศึกษาการตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่ระยะเวลา 24 ชม. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบที่ใช้ในการตรวจสอบมีทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginoliticus* และ *Escherichia coli* โดยใช้ Disc Diffusion Agar Assay ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell agar พบว่าแบคทีเรียทะเลที่แยกได้มาจากฟองน้ำสามารถต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ ซึ่งจากจำนวนแบคทีเรียทะเล 221 สายพันธุ์นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งด้วยวิธี 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-1 และ WI1-6Y-2 และสามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* ได้บางส่วน ได้แก่ แบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO8-3Or-2, WO8-2 และ CKB1-1BK-4 ส่วน *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 และสามารถต้าน

การเจริญของ *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-4 ส่วน *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 และ WO18-4-2 สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis*, *S.aureus*, *V.alginoliticus* และ *E.coli* ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4-2 และรูปภาพประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *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

355566

ตารางที่ 4-2 ผลของการตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบของแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับ ฟองน้ำ (แสดงเป็นค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางความกว้างของบริเวณที่มีฤทธิ์ในการต้านเป็นมิลลิเมตร)

หมายเลข	ชื่อเชื้อ	ความกว้างของ clear zone(nm)			
		BS	SA	VA	EC
1	WO1-4Y	18.0	24.5	17.0	23.0
2	WO3-1	20.0	23.0	19.0	25.0
3	WO3-1-1	19.5	22.5	16.5	23.0
4	WO3-1-2	16.5	21.5	16.0	25.0
5	WO3-1-3	18.0	24.5	18.0	27.0
6	WO3-1-4	17.0	24.5	16.0	25.5
7	WO3-3Or-1	16.5	23.5	18.0	23.0
8	WO4-1-2	24.5	25.5	22.0	-
9	WO4-3	25.5	25.2	25.5	-
10	WO4-8	23.0	23.0	23.0	-
11	WO4-11	27.0	21.0	21.5	-
12	WO6-6-1	17.5	23.5	-	-
13	WO6-6-2	17.5	16.0	-	-
14	WO8-3or-2	+17.5	+19.0	-	26.0
15	WO8-2	+19.0	29.5	-	35.5
16	WO9-6-2	-	+18.5	-	-
17	WO9-4Y-3	-	21.0	-	27.0
18	WO11-2	-	31.0	-	30.0
19	WO11-3-1	-	+17.5	-	-
20	Wo11-4-3	-	+17.5	-	-
21	WO11-6-1	-	+16.0	-	-
22	WO12-1Y-1	-	+16.0	-	-
23	WO18-4-1	17.5	+23.5	18.0	26.5
24	WO18-4-2	15.5	+26.5	18.0	22.5
25	WI1-1	-	+19.5	-	22.0
26	WI1-2Y-1	-	+17.5	-	31.0

หมายเลข	ชื่อเชื้อ	ความกว้างของ clear zone(nm)			
		BS	SA	VA	EC
27	W1-6Y-1	22.0	22.5	-	34.0
28	W1-6Y-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	-	-
32	R21-1-2	-	-	-	15.0
33	T3-4Y-2	-	+17.0	-	-
34	KE2-2Br-1	-	+17.5	-	-
35	KE2-2Br-3	-	+17.5	-	-
36	KE2-2Br-4	-	+17.5	-	-
37	CKB1-1Br-4	18.5	+19.5	-	-

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



รูปที่ ๑ ฟองน้ำครกแข็งสีเหลือง RAB56 A-8 *Petrosia* sp.
พบมีแบคทีเรียอาศัยอยู่จำนวนน้อยที่สุด 1.1×10^5
โคโลนีต่อกรัม



รูปที่ ๒ ฟองน้ำถั่วตัวสีน้ำตาลเขียว RAB56 A-19 *Spongia* sp.
"yellow" พบมีแบคทีเรียอาศัยอยู่จำนวนมากที่สุด 4.58×10^7
โคโลนีต่อกรัม

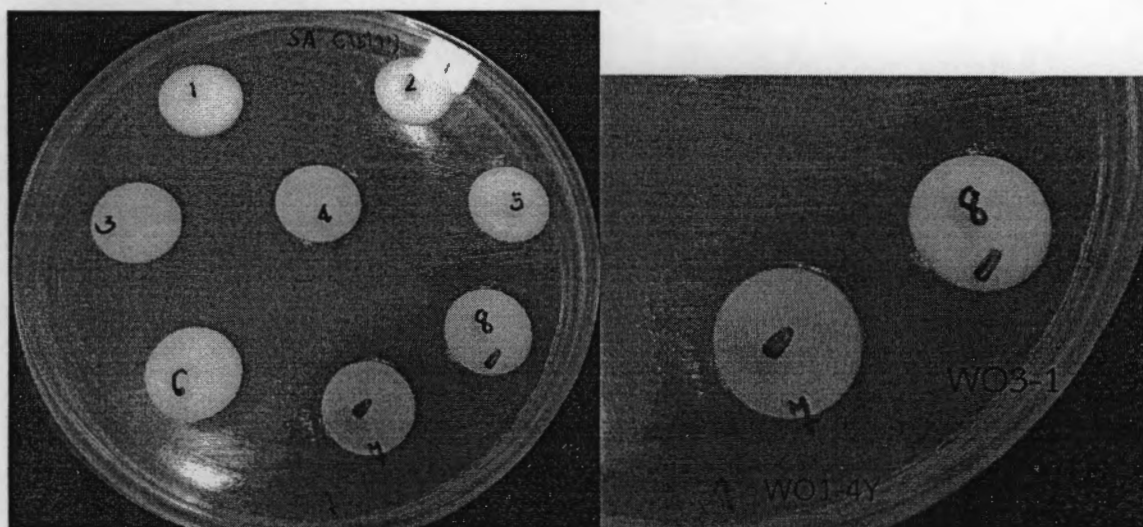


รูปที่ ๓ ฟองน้ำท่อสีเทา WNAI56 -1 (*Cladocroce* sp.
"grey") ที่พบแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ
Staphylococcus aureus



รูปที่ ๔ ฟองน้ำสีม่วง RAB56 A-28 (*Petrosia*
hoeksemai) ที่พบแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ
Escherichia coli

แผนภาพที่ 4.1แสดงประสิทธิภาพการต้านเชื้อแบคทีเรีย



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



ภาพที่ 4.1.1 ประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *Escherichia coli* 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 โดยนำมาเพาะเลี้ยงแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายด้วยการแยกเป็นส่วนของน้ำเลี้ยงซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต 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 และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตเป็นส่วนของชั้นน้ำเลี้ยง ที่ความเข้มข้น 400, 200, และ 100 µg สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้บางส่วนเท่านั้น ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO3-1 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 400, 200, และ 100 µg สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้บางส่วนเท่านั้น ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO4-1-2 สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *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 สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตสามารถที่ระดับความเข้มข้น 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 ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้บางส่วนเท่านั้น ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg น้ำเลี้ยงที่ผ่านคอลัมน์สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *V. alginoliticus* และ *E. Coli* ได้ ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียสายพันธุ์ WI1-6Y-2 สารสกัดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่ระดับความเข้มข้น 400 µg สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *E. Coli* ได้ แต่ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้บางส่วน และที่ความเข้มข้น 200 µg สามารถ

ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *E.Coli* ได้ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตดส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นส่วนของน้ำเลี้ยงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มซึ่งเป็นส่วนของตะกอนเซลล์ แสดงว่าแบคทีเรียทะเลได้สารบางอย่างออกมาในน้ำเลี้ยง ซึ่งพบน้อยมากในตะกอนเซลล์ จึงจัดได้ว่าสารนี้เป็นสารที่ถูกขับออกมาภายนอกเซลล์ ในการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียนั้นมีการใช้ระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน ซึ่งระดับความเข้มข้นที่ต่างกันของสารสกัดหยาบนี้เป็นตัวชี้ว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียทะเลนั้นสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ที่ความเข้มข้นมากหรือน้อย เพราะถ้าใช้ในระดับความเข้มข้นน้อยๆแล้วมีการต้านแสดงว่าฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียสูง จะใช้สารสกัดหยาบในระดับความเข้มข้นน้อยๆก็มีฤทธิ์ในการต้านได้แล้ว เมื่อเปรียบเทียบกับยา streptomycin ซึ่งเป็น positive control จะทำให้รู้ว่าสารที่สกัดได้มาฤทธิ์ใกล้เคียงกับยา streptomycin ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-3 และรูปภาพประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบของแบคทีเรีย WO3-1 ดังที่แสดงในรูปภาพที่แผนภาพ 4.2.1 และประสิทธิภาพการต้านเชื้อ *Escherichia coli* 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

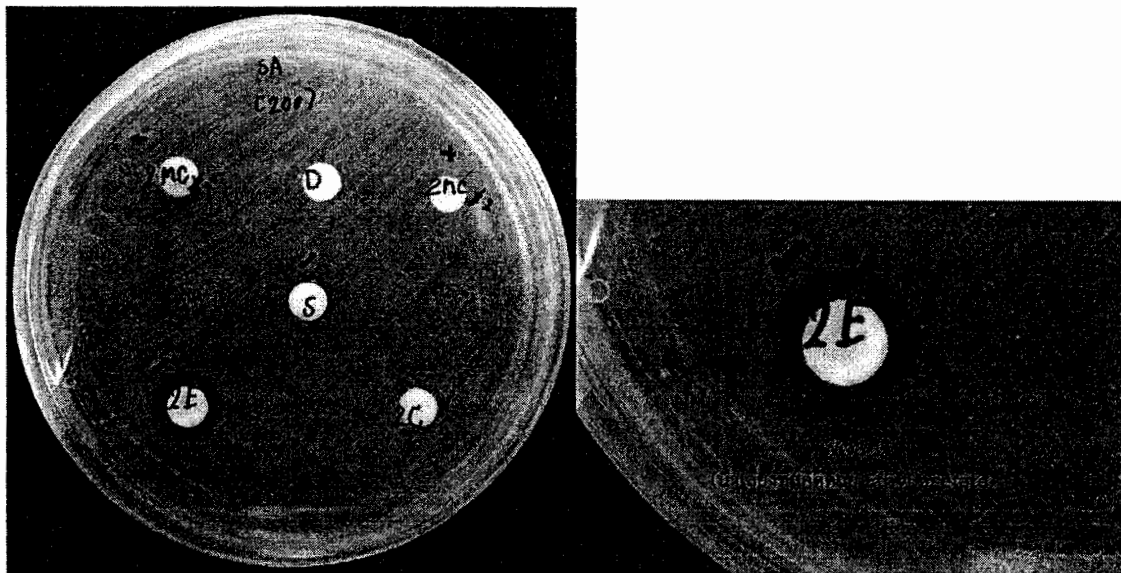
ตารางที่ 4-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบของสารสกัดหยาบที่สกัดมาจากแบคทีเรียทะเลที่ระดับความเข้มข้น 400, 200 และ 100 µg/disc (ที่ใช้คือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร)

หมายเลข	ชื่อเชื้อ	ความกว้างของ clear zone(nm)											
		<i>B. subtilis</i>			<i>S. aureus</i>			<i>V. alginoliticus</i>			<i>E.coli</i>		
		100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400
1	WO1-4Y (D)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	WO1-4Y (S)	-	-	-	15	13	8	-	-	-	-	13	-
3	WO1-4Y (MC1)	-	-	+10	-	-	-	-	15	-	-	-	-
4	WO1-4Y (MC2)	-	-	+10	+26	+36	+40	35	-	-	-	-	-
5	WO1-4Y (C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	WO1-4Y (E)	11	15	18	9	12	15	-	-	-	-	-	-
7	WO3-1 (D)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

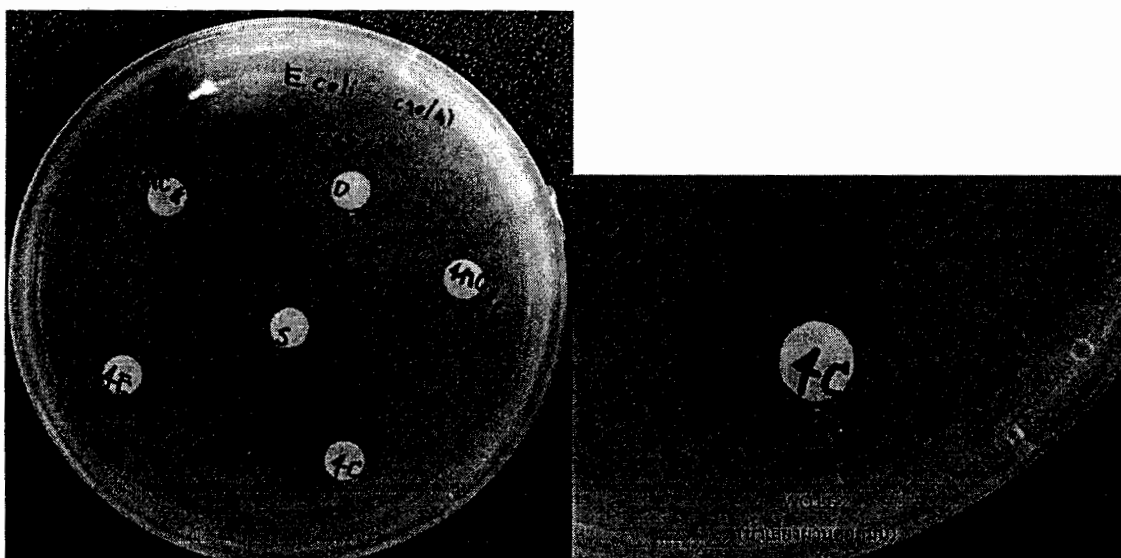
หมายเลข	ชื่อเชื้อ	ความกว้างของ clear zone (nm)											
		<i>B. subtilis</i>			<i>S. aureus</i>			<i>V. alginoliticus</i>			<i>E.coli</i>		
		100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400
8	WO3-1 (S)	-	-	-	12	13	15	-	-	-	-	-	-
9	WO3-1 (MC1)	-	-	-	+20	+22	+36	-	-	-	-	-	-
10	WO3-1 (MC2)	-	-	-	+42	+35	+38	-	-	-	-	-	-
11	WO3-1 (C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	WO3-1 (E)	9	12	20	8	12	12	-	-	-	-	-	-
13	WO4-1-2 (D)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	WO4-1-2 (S)	-	-	-	13	-	12	-	-	-	-	-	-
15	WO4-1-2 (MC1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	WO4-1-2 (MC2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	WO4-1-2 (C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	WO4-1-2 (E)	-	-	15	-	-	19	-	-	-	+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	+17	+23	-	-	-	13	15	+19	13	20	25
24	WO11-2 (E)	-	+11	+11	-	-	-	-	-	-	-	-	15
25	WI1-6Y-2 (D)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	WI1-6Y-2 (S)	-	-	-	13	13	16	-	-	-	-	-	-
27	WI1-6Y-2 (MC1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	WI1-6Y-2 (MC2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	WI1-6Y-2 (C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	WI1-6Y-2 (E)	-	13	16	-	-	+11	-	-	-	-	12	19

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

แผนภาพที่ 4.2แสดงประสิทธิภาพการต้านเชื้อแบคทีเรีย



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



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

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการตรวจสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำ ในการสร้างสารมาต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginoliticus* และ *Escherichia coli* ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจากจำนวนแบคทีเรียทะเล 221 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 WO4-3 มีฤทธิ์ในการต้านมากที่สุด ส่วนที่มีฤทธิ์ในการต้าน *E. coli* มีแบคทีเรียทะเลจำนวน 19 สายพันธุ์ และสามารถต้านการเจริญของ *E. coli* ได้บางส่วนมี 1 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ WI1-6Y-2 ให้ผลการต้านมากที่สุด และพบว่าแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง 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 โดยส่วนของน้ำเลี้ยงนั้นส่วนหนึ่งจะสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต และอีกส่วนหนึ่งผ่านคอลัมน์โดยใช้เมทานอลเป็นตัวชะล้าง ส่วนของตะกอนเซลล์นั้นจะสกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์ม ที่ระดับความเข้มข้น 400,200 และ 100 µg โดยใช้ DMSO เป็น negative control และใช้ยา streptomycin เป็น positive control จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดยับยั้งที่สกัดจากแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำสายพันธุ์ WO1-4Y ที่

สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อ *V. alginoliticus* และ *E. coli* ได้ แต่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้บางส่วนเท่านั้น ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO3-1 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้บางส่วน ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO4-1-2 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *E. coli* ได้ ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลคลอโรฟอร์มไม่สามารถยับยั้งเชื้อชนิดใดได้เลย ส่วนสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WO11-2 โดยส่วนของน้ำเลี้ยงที่ผ่านคอลัมน์สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *V. alginoliticus* และ *E. coli* ได้ ส่วนน้ำเลี้ยงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ แต่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้บางส่วนเท่านั้น ส่วนสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ WI1-6Y-2 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *E. coli* ได้

สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตส่วนใหญ่ 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. จากการศึกษาครั้งนี้ควรจะมีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติม เช่น การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์การต้านการอักเสบ หรือฤทธิ์การต้านเชื้อรา เป็นต้น เพื่อที่จะได้รู้ว่าสารสกัดจากแบคทีเรียทะเลที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลมีประสิทธิผลดีเพียงใดเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีการที่ต่างกัน
4. ควรจะมีการศึกษาวิธีการสกัดสารจากแบคทีเรียด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม
5. การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ พบว่ายับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ (ตารางที่ 4-2) ความเป็นไปได้นี้ ที่จะใช้แบคทีเรียทะเลเป็นแหล่งของสารต้านแบคทีเรียในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginoliticus* และ *Escherichia coli*

6. เนื่องจากสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำแสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจกับการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย แต่มีหลายตัวอย่างที่สูญเสียประสิทธิภาพในการต้านซึ่งอาจจะ เป็นผลมาจากวิธีการสกัดและชนิดของสารละลายที่ใช้ไม่เหมาะสมกับสารประกอบเคมีที่แสดงฤทธิ์ ดังนั้นจึง ควรศึกษาวิธีการสกัดสารที่จำเพาะต่อแบคทีเรียบางชนิด และควรจะนำสารสกัดจากแบคทีเรียทะเล มาทำ การค้นหาสารประกอบทางเคมีที่สามารถออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- ชุดิวรรณ เดชสกุลวัฒนา, สุวดี ประคองภักดิ์, จิรภัทร จันทมาลี 2551.ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ จากบริเวณหินขาว หมู่เกาะเสม็ด จังหวัดระยอง การประชุมวิชาการ 7 กรกฎาคม 2551. ณ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี.
- ชุดิวรรณ เดชสกุลวัฒนา และ สุเมตต์ ปุจฉาการ. 2551.ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยสารสกัดจากฟองน้ำและแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ จากเกาะหมาก จังหวัดตราด. การประชุมวิทยาศาสตร์ทางทะเลแห่งประเทศไทย. 25-27 สิงหาคม 2551. ณ โรงแรมภูเก็ต จ.ภูเก็ต
- ชุดิวรรณ เดชสกุลวัฒนา รวีวรรณ วัฒนะติลล และสุเมตต์ ปุจฉาการ (2541) การศึกษาสารไบโอแอคทีฟ เมตาบอไลต์จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำในประเทศไทย. รายงานฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- ชุดิวรรณ เดชสกุลวัฒนา สิริสุข จินตสุนทรจโร และสุเมตต์ ปุจฉาการ (2544) บทคัดย่อ การ ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำบางชนิดในจังหวัดชลบุรี การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 27 หน้า 464.
- มาลิน จุลศิริ (2540) ยาด้านจุลชีพ : ความรู้พื้นฐาน และการประยุกต์ โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน กรุงเทพฯ, 209 หน้า.
- นันทวัน นันทวนิช วิมลมาศ ลิปิพันธ์ และสุนันท์ พงษ์สามารถ (2544) ผลของสารโพลีแซคคาไรด์เจลาจากเปลือกของผลทุเรียน ต่อการต้านแบคทีเรียในระดับหลอดทดลอง การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 27 หน้า 466.
- นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิและคณะ. 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., Chevolut, 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. Antibiotic activity of marine microorganisms. 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 scephtrax, an antimicrobial agent isolated from the south pacific sponge *Agelas mauritiana* J. Antimicrob. Chemother. 32 : 539 - 550.
- Berthold, R.J., Borowitzka, M.A., and Mackay M.A. 1982. The Ultrastructure of *Oscillatoria spongeliae*, the blue - green algal endosymbiont of the sponge *Dysidea herbacea*, Phycologia 21 : 327 - 335.
- Bewley, C.A., Holland, N.D., and Faulkner, D.J. 1996. Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized indistinct populations of bacterial symbionts. 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, F.R. And Dixon, O.A. 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, Washington, 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 fulfillment of the requirements for a Ph.D., The University of Tokyo, Tokyo, Japan. 120 p.
- Dechsakulwatana, Chutiwan., Wimolpun Rungprom., Raviwan Watanadilok., Preecha Phuwapraisirisan. 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 Puchakarn, Sumait. 2005. Antimicrobial Substance of Marine Bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. associated with Sponges, *Halisarca ectofibrosa* Collected from the

- Gulf of Thailand. International Marine Biotechnology Conference 2005, June 7-12, 2005, St. John's Newfoundland & Labrador, Canada.
- Dechsakulwatana, C., P. Ra-ngubpit, and S. Putchakarn. 2002. Inhibition 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 and 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., Kujumgiev, A., Stefanov, K., Nechev, I., Popov, S., 2000. Metabolites from a marine bacterium *Pseudomonas/ Alteromonas*, associated with sponge *Dysidea fragilis*. 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., Kjelleberg, S., 2000. Phylogenetic 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 sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide rich habitats. Nature 293 : 291-293.
- Felbeck, H., Liebezeit, G., Dawson, R. and Giere, O. 1983. CO₂ fixation in tissues of marine oligochaetes (*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.I. 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, M.J. 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* species. *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, Papua 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.
- Kijjoa, A., Watanadilok, R., Sonchaeng, P., Puchakarn, S., Sawangwong, P. and Herz, W. 2002. Bromotyrosine Derivatives from the Marine Sponge *Suberea* aff. *praetensa*. *Bollettino del Musei e degli Istituti Biologici dell' Università 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 microorganisms isolated from various depths of world oceans. *Mikrobiologiya*, 30 : 545-550.
- Kobayashi, J., Naitoh, K., Sasaki, T., and Shigemori, H. 1992. Metachromins D-H, New Cytotoxic sesquiterpenoids 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. Theonezolid 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. Antimicrobial activity in sub-Arctic marine invertebrates. *Polar Biol.* 26:591-600.

- McCaffrey, E.J. and Endean, R. 1985. Antimicrobial 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 luteoviolacea* 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 C₅₀ - KK 10206C associated with marine sponge, *Holichon okadae*. *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 Schuer, P.S. 1974. An antimicrobial constituent of sponges, *Chondrosia* sp. In : Webber, H.H. & Ruggiesi, G.D. Eds. Food-Drugs from 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 a bacterium 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*. *TETRAHEDRON*. 64: 3147-3152.
- Russell, F.E. 1967. Pharmacology of animal venoms. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 8 : 849-873
- Schmidt, EW., Bewley, CA., and Faulkenr, DJ. 1998. Theopdousin - mide, a bicyclic glycopeptide From Filamentous bacterial symbionts of the lithistid sponge

- Theonella swinhoei From Palau and Mozambique. J. Org. Chem. 63 : 1254 – 1258.
- Sheuer, P.J. 1964. The chemistry 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 Alkaloid from a Bacterium *Alteromonas* sp. associated with the marine 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., Southward, E.C., Dando, P.R., Ran, C.H., Felbeck, H. and Flugel, H. 1981. Bacterial symbionts and low $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in 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. Current 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 metabolite 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 microscopie électronique de l'association entre bactéries 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 cardiovascular 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 of action of some invertebrate venoms. *Annu. Rev. Pharmacol.*, 4 : 293-304.
- Wilkinson, C. 1978 a. Microbial associations in 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 *Digenea* 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