การเลี้ยงฟองน้ำ *Xestospongia* sp. สีน้ำเงิน บริเวณแหลมมะขาม อ.สิเกา จ.ตรัง เพื่อผลิตสารต้านมะเร็ง

The culture of a blue marine sponge, *Xestospongia* sp., at Makham area, Sikao District, Trang Province to produce antitumor compounds.

ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่ทำวิจัย

จากโครงการสำรวจฤทธิ์ทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตในทะเลอันดามัน (สนับสนุนโดยโครงการ BRN พ.ศ. 2550) ทีมวิจัยพบฟองน้ำสีน้ำเงินชนิดหนึ่ง ชื่อ *Xestospongia* sp. แพร่กระจายมาก บริเวณแหลมมะขาม อำเภอสิเกา จ.ตรัง ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำชนิดนี้พบว่ามีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งทดสอบ (Vero cells) โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 7.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg /ml) จากการวิเคราะห์สารทุติยภูมิเบื้องต้นโดยวิธีโครมาโท กราฟฟีแบบเยื่อบางพ่นด้วยน้ำยาทดสอบ พบสารกลุ่มอัลคาลอยด์หลายชนิด ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบพีคที่มีค่า Rt ตรงกับสารต้านมะเร็งชื่อ renieramycins เมื่อศึกษาปัจจัยสภาพแวดล้อมกับการสร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าฟองน้ำชนิดนี้เจริญเติบโตดีช่วงรอยต่อระหว่างฤดูฝนกับฤดูแล้งคือเดือน ก.ย-ก.พ และยังคงมีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตลอดทั้งปี ฟองน้ำชนิดนี้เจริญเติบโตดีที่ระดับความลึกสูงสุด 3 เมตร (วัดจากผิวน้ำช่วงน้ำขึ้นสูงสุด) ค่าความเป็นกรดด่าง 6.29-7.72 อุณหภูมิน้ำ 29-32 องศาเซลเซียส (°C) ความเค็มประมาณ 29.3-31.4 ppt ทนต่อสภาพตากแห้งแต่ไม่ทนต่อสภาพความเข้มแสงสูง ๆ สังเกตจากการเลือกเจริญบริเวณเงาหินเพื่อหลบแสงช่วงน้ำลงในเวลากลางวัน

จากการตรวจสอบเอกสาร (ข้อ 9) พบว่าฟองน้ำชนิดนี้สร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มอัลคาลอยด์หลายชนิดโดยสาร reniermycins ซึ่งเป็นสารหลัก (Major component) และมีประสิทธิภาพสูงในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งทดสอบหลายชนิด เช่น P388, LB cell และ Vero cell เป็นต้น (Orabi *et al*., 2002) ปัจจุบันสารนี้ได้รับการพัฒนาให้เป็นสารต้านมะเร็งชนิดใหม่ แต่มีปัญหาและอุปสรรค คือสาร renieramycins มีปริมาณไม่พอต่อความต้องการของนักวิจัยสำหรับศึกษาพัฒนาขั้นคลินิก และความต้องการของผู้ป่วยในอนาคต การสังเคราะห์ระดับห้องปฏิบัติการทำได้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้นและใช้จำนวนเงินมากจนอยู่ในภาวะไม่คุ้มทุน ปัจจุบันยังไม่มีการผลิตระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากมีขีดจำกัดด้านความรู้ของวิธีการสังเคราะห์และงบลงทุนมากเกินไป ดังนั้นการผลิตจากธรรมชาติโดยเลี้ยงฟองน้ำ *Xestospongia* sp. เพื่อเก็บเกี่ยวสารออกฤทธิ์จึง เป็นทางออกที่ดีที่สุดในปัจจุบัน แต่นักวิทยาศาสตร์ก็พบปัญหาต่อเนื่อง ได้แก่ การไม่มีข้อมูลการแพร่กระจาย ทำให้ไม่มีข้อมูลลักษณะภูมิประเทศและปัจจัยสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของฟองน้ำสายพันธุ์นี้

ในประเทศไทยมีรายงานพบฟองน้ำสายพันธุ์นี้เพียงสองบริเวณเท่านั้นคือ ในอ่าวไทยบริเวณเกาะสีชัง จ.ชลบุรี (Suwanborirux, *et al*., 2003) และแหล่งที่สองคือในทะเลอันดามันบริเวณแหลมมะขาม อ่าวสิเกา อ. สิเกา จ. ตรัง จากผลการวิจัยปัจจัยสภาวะแวดล้อมกับการสร้างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในอ่าวสิเกา (สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2553) ทำให้ทราบข้อมูลปัจจัยสภาวะแวดล้อมเบื้องต้นที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของฟองน้ำ *Xestospongia* sp. และพื้นที่การแพร่กระจายที่เหมาะสม ดังนั้นจึงเสนอโครงการวิจัยต่อยอดเลี้ยงฟองน้ำสายพันธุ์นี้เพื่อผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยมุ่งเป้าเพื่อผลิตสารrenieramycins ตอบสนองความต้องการของตลาดในอนาคต โดยใช้ฟองน้ำสายพันธุ์ที่พบในท้องถิ่นชายฝั่งทะเลอันดามันของประเทศไทย และมีความคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มมูลค่าให้แก่ทรัพยากรชีวภาพในท้องถิ่นได้

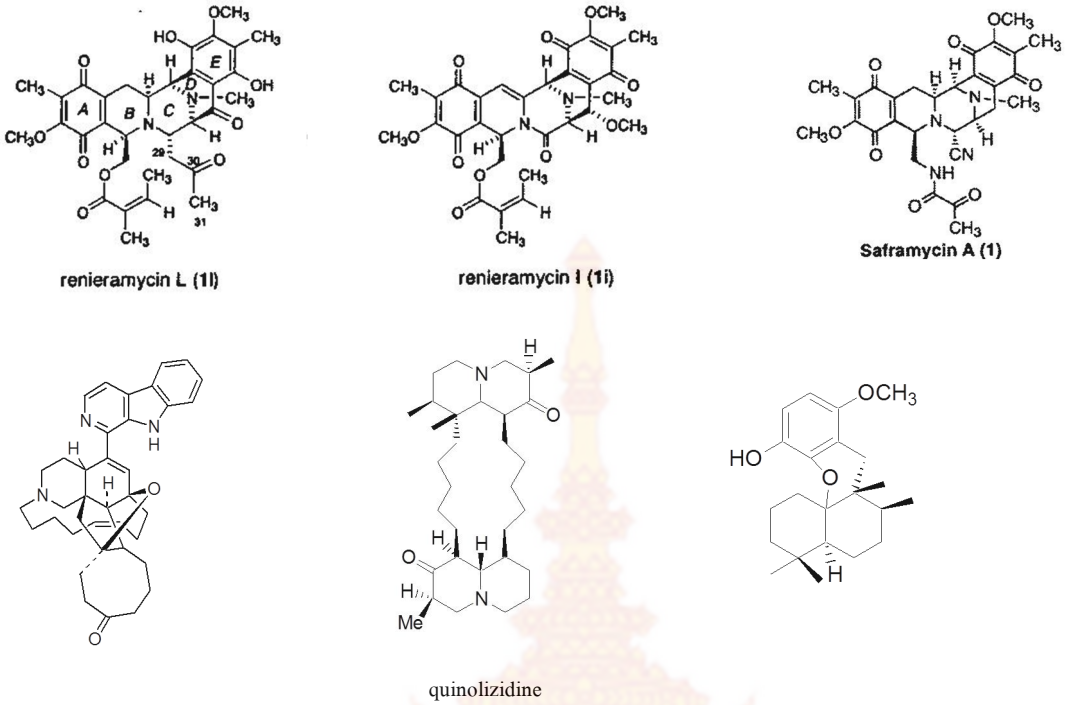
ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง[1]

ฟองน้ำสกุล *Xestospongia* สร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่ สารกลุ่มอัลคาลอยด์ เช่น manzamine, quinolizidine, isoquinoline alkaloids เป็นต้น (Blunt *et al*., 2009) แต่สารที่ได้รับการศึกษามากที่สุดในขั้นก่อนคลินิกและคลินิก (preclinical and clinical trial) คือสาร renieramycins ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม isoquinoline alkaloids สาร renieramycins อนุพันธ์ j-l (ภาพที่ 1) ถูกค้นพบครั้งแรกจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. ซึ่งมีแหล่งที่อยู่อาศัยบริเวณเกาะสีชังชายฝั่งตะวันออกของประเทศไทย สารนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทดลองหลายชนิด เช่น KB cell, Vero cell และ P 388 (Orabi *et al*., 2002) และมีประสิทธิภาพใกล้เคียง กับสาร saframycin A ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็งในปัจจุบัน (Suwanborirux *et al*., 2003) สาร renieramycins จึง ได้รับการพัฒนาให้เป็นสารต้านมะเร็งชนิดใหม่

การพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หรืออุตสาหกรรมจำเป็นต้องมีสารตัวอย่างให้พอกับการศึกษา และหากประสบความสำเร็จต้องผลิตสารนั้นให้เพียงพอกับความต้องการ โดยส่วนใหญ่ได้จากการสังเคราะห์หรือกึ่งสังเคราะห์ ซึ่งต้องใช้งบประมาณลงทุนจำนวนมหาศาล เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เวชภัณฑ์มีราคาแพง ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการลงทุนสูงและกระบวนการผลิตที่รบกวนสิ่งแวดล้อม จึงมีการผลิตสารโดยการเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตที่เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์โดยตรงนับเป็นทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรม

---

[1] ข้อมูลที่ใช้ เน้นข้อมูล *Xestospongia* สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยเป็นหลักเนื่องจากกำลังวิจัยทดลองสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย โดยปกติgenus *Xestospongia* spp. แพร่กระจายทั่วโลกผลิตสารทุติยภูมิหลากหลายแต่เมื่อสรุปโดยรวมและเน้นสารที่มีศักยภาพเชิงการใช้ประโยชน์แล้วจะเป็นไปตามที่ยกตัวอย่างเบื้องต้น ส่วนข้อมูลการเลี้ยง specimen ของฟองน้ำสายพันธุ์นี้เพื่อผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพยังไม่พบรายงาน



ภาพที่ 1 ตัวอย่างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำ *Xestospongia* sp.

การเพาะเลี้ยงฟองน้ำเริ่มศึกษากันมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1983 ในประเทศญี่ปุ่นและประเทศบริเวณทะเลแคริเบียนโดยสามารถผลิตฟองน้ำครก (Bath sponges) ได้ 2.6 ล้านปอนด์ต่อปี (Brusca and Brusca, 1990) ต่อมาได้มีการศึกษาพัฒนาวิธีการเลี้ยงมากขึ้น ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็นการเลี้ยงในทะเล (Mari-culture) ดังนั้นผลผลิตจึงขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ ชีวภาพ และทางเคมีของสิ่งแวดล้อมในทะเล (Osinga *et al.,* 1999) การเลี้ยงดังกล่าวนี้มีจุดประสงค์เพื่อนำเซลล์ฟองน้ำไปใช้โดยตรง ปัจจุบัน (1990) การเลี้ยงฟองน้ำทะเลได้ถูกปรับเปลี่ยนเป็นการเลี้ยงเพื่อผลิตสารเคมีชีวภาพ ตัวอย่างเช่น การเลี้ยงฟองน้ำ *Mycale hentscheli* บริเวณเกาะ Kapiti และ Pelorus sound ในประเทศนิวซีแลนด์เพื่อผลิตสารต้านมะเร็งชื่อ Mycalamide A-D, Pateamine และ Peloruside A การเลี้ยงฟองน้ำ *Haliclona* sp. เพื่อผลิตสารต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งชื่อ Salicylihalamide A บริเวณอ่าว Bremer, Hamelin และเกาะ Rottnest ประเทศออสเตรเลีย (Abdo *et al*., 2007) ซึ่งการเลี้ยงฟองน้ำเพื่อผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพมีความจำเป็นต้องเก็บข้อมูลปัจจัยสภาวะแวดล้อมอย่างละเอียดควบคู่ไปด้วย เพราะข้อมูลเหล่านี้มีประโยชน์ในการจำลองสภาวะแวดล้อมให้ใกล้เคียงธรรมชาติมากที่สุดเมื่อนำฟองน้ำมาเลี้ยงในโรงเรือน หรือดัดแปลงเงื่อนไขสภาวะแวดล้อมเพื่อกระตุ้นให้มีการผลิตสารที่ต้องการให้มากขึ้น ดังรายงานการปรับเปลี่ยนความลึก และ

ความเค็มกับการเลี้ยงฟองน้ำ *Negombata magnifica* เพื่อเพิ่มการผลิตสาร latrunculin เชิงพานิชย์ในทะเลแดงประเทศอิสราเอล (Hadas *et al*., 2004)

ฟองน้ำแต่ละชนิดเจริญเติบโตได้ดีในในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน ประเด็นปัจจัยสภาวะแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการสร้างสารทุติยภูมินั้นยังไม่ปรากฏข้อมูลเพียงพอที่จะสรุปให้เด่นชัดได้ โดยทั่วไปปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการเจริญเติบโตของฟองน้ำสามารถสรุปได้ดังนี้

1. อากาศ (Air) : ไม่ควรให้ฟองน้ำสัมผัสหรือตากอากาศนานๆ เนื่องจากฟองน้ำมีรูพรุนทั่วร่างกาย รูพรุนนี้เป็นทางเดินน้ำภายใน หากอยู่ในสภาพตากแห้งนานๆ อากาศจะเข้าไปแทนที่น้ำในช่องทางเดินน้ำ ทำให้ช่อง choanocyte เสียหายได้ ดังนั้นเราจึงพบการตายของฟองน้ำหลังตากอากาศเป็นเวลานาน แต่ในฟองน้ำที่เจริญบริเวณชายฝั่งน้ำตื้นอาจมีการปรับตัวต่อการตากอากาศในช่วงน้ำลงต่ำสุดได้ เช่นฟองน้ำ *Halichondria panicea* (Vethaak *et al*., 1982)

2. ปริมาณแสง (Light intensity): แสงมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของฟองน้ำแต่หากปริมาณความเข้มแสงมากเกินไปจะทำให้ฟองน้ำตายได้เพราะเกิดกระบวนการ photoinhibitation ดังนั้นความเข้มแสงและเวลาการสัมผัสโดนจึงเป็นปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการเลี้ยงฟองน้ำ(Osinga *et al*., 1999)

3. ความเค็มและอุณหภูมิ (Salinity and Temperature) : ปกติน้ำทะเลจะมีความเค็มโดยเฉลี่ย 35 ส่วนในพันส่วน (ppt) อุณหภูมิน้ำประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส (°C) สิ่งมีชีวิตในทะเลทุกชนิดสามารถปรับตัวให้อยู่รอดที่ความเค็มและอุณหภูมิระดับนี้ ฟองน้ำมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มและอุณหภูมิแบบฉับพลันซึ่งทำให้เกิดการช็อก (Shock) ผลคือเกิดการตายของเซลล์และโคโลนีมีขนาดเล็กลง (MacMillan,1996) แต่ในทางกลับกันมีงานวิจัยบางฉบับพบว่าฟองน้ำที่เจริญเติบโตบริเวณชวากทะเล (Estuary) สามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและความเค็มช่วงกว้างได้เช่น ฟองน้ำ *Hippospongia lachne* สามารถอยู่รอดได้ที่ความเค็มน้ำในช่วง 26-46 ppt ถึงกระนั้นก็ตามการเปลี่ยนแปลงทั้งอุณหภูมิและความเค็มมีผลต่อการ Shock ของฟองน้ำและทำให้ขนาดโคโลนีเล็กลง (Storr, 1964)

4. คุณภาพน้ำอื่นๆ (Other water quality): ในการเลี้ยงฟองน้ำยังขาดข้อมูลอิทธิพลของคุณภาพน้ำต่อการเจริญเติบโต เพราะส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงแบบอิงธรรมชาติ ส่วนการเลี้ยงในโรงเรือนยังมีรายงานน้อย คุณภาพน้ำที่ควรติดตามเก็บข้อมูลและควบคุมคือ 1) ปริมาณสารอินทรีย์แขวนลอย (POC) และปริมาณสารอินทรีย์ละลายน้ำ (DOC), 2) ปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนีย ถ้ามีมากเกินไปจะลดอัตราการเจริญของฟองน้ำดังนั้น หากเป็นกรณีเลี้ยงในโรงเรือนควรเลี้ยงแบบหนาแน่นต่ำ, 3) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ควรควบคุมให้อยู่ในระดับปกติของน้ำทะเลคือ 7.8 – 8.4 (Osinga *et al*., 1999)

5. ผู้ล่า (Predators): ผู้ล่าที่สำคัญของฟองน้ำได้แก่ ทากเปลือย (Nudibranches) ซึ่งจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อฟองน้ำแต่ล่ะชนิด นั่นคือ ทากเปลือยแต่ละชนิดจะเลือกกินฟองน้ำแบบเจาะจงชนิด ดังนั้น จึงมีฟองน้ำบางชนิดเท่านั้นที่ถูกกินโดยทากเปลือย ทั้งนี้เพราะฟองน้ำมีกลไกการป้องกันตัวเองโดยสร้างสารทุติยภูมิขึ้นมานั่นเอง (Pawlik *et al*., 1995) ส่วนผู้ล่าชนิดอื่นๆ ได้แก่ ปลานกแก้ว เม่นทะเล แต่ยังไม่พบรายงานว่าก่อความเสียหายเป็นอันมากให้กับฟาร์มเพาะเลี้ยง (Chanas *et al*., 1996)

6. โรค (Diseases) : ยังไม่พบรายงานโรคในฟองน้ำแต่สิ่งที่สร้างความเสียหายให้กับฟาร์มฟองน้ำจำนวนมากคือการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำทะเล (Treeck, 1993)

แหลมมะขามเป็นชวากทะเล (Estuary) ตั้งอยู่บริเวณหาดปากเมง มีพื้นที่ประมาณ 450,000 ตารางเมตร บริเวณนี้ได้รับน้ำจืดจากคลองสิเกาไหลลงมาบรรจบกับทะเลอ่าวสิเกา จึงเป็นบริเวณที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์สูง และเป็นระบบนิเวศได้รับการรบกวนน้อยจึงชุกชุมด้วยทรัพยากรชีวภาพมากมายโดยเฉพาะฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน (*Xestospongia* sp.) สายพันธุ์สร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ renieramycins และสารอื่นๆ ฟองน้ำสายพันธุ์นี้แพร่กระจายได้ดีระหว่างเดือน ก.ย.-ก.พ. ซึ่งเป็นช่วงปลายฤดูฝนและเริ่มต้นฤดูแล้ง

ทฤษฎีสมมุติฐาน [2]

1. ฟองน้ำสีน้ำเงินพบแพร่กระจายบริเวณแหลมมะขาม อ.สิเกา จ.ตรัง สร้างสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) หลายชนิด สารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ชื่อ renieramycins ซึ่งกำลังได้รับการพัฒนาให้เป็นสารต้านมะเร็งชนิดใหม่ แต่ประสบปัญหาด้านขีดจำกัดในการสังเคราะห์และต้นทุนการผลิตสูงมากจนอยู่ในลักษณะไม่คุ้มทุน สาร renieramycins จึงมีปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการ การเลี้ยงฟองน้ำชนิดนี้เพื่อสกัดแยกเอาสารมีฤทธิ์โดยตรงจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสามารถแก้ปัญหาการขาดแคลนและลดต้นทุนการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพได้

2. จากผลการสำรวจและวิเคราะห์ปัจจัยสภาวะแวดล้อมเบื้องต้นพบว่าฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. แพร่กระจายดีบริเวณแหลมมะขาม อ.สิเกา จ.ตรัง แสดงว่าบริเวณดังกล่าวมีปัจจัยแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ทำให้มีศักยภาพสูงในการใช้พื้นที่นี้ เพื่อพัฒนาการเลี้ยงฟองน้ำ *Xestospongia* sp. ลักษณะอิงธรรมชาติ (Sea-based aquaculture) เพื่อเก็บเกี่ยวสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะสาร renieramycins ได้

[2] ยังไม่พบข้อมูลการเลี้ยง specimen ของฟองน้ำสายพันธุ์นี้เพื่อผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่มีข้อมูลด้าน cell culture รายงานในปี ค.ศ. 2003 (J. Biotech.100(2):169-176) ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงครั้งนี้ ดังนั้นไม่สามารถอนุมานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟองน้ำสดกับปริมาณสารทุติยภูมิจึงไม่สามารถประมาณการผลผลิตได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเลี้ยงฟองน้ำ *Xestospongia* sp. สีน้ำเงินแบบอิงธรรมชาติ บริเวณแหลมมะขาม อ. สิเกา จ.ตรัง

2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณการสร้างสารต้านมะเร็งของฟองน้ำ *Xestospongia* sp. สีน้ำเงิน ที่เลี้ยงแบบอิงธรรมชาติ บริเวณแหลมมะขาม อ. สิเกา จ. ตรัง โดยมุ่งเน้นการวิเคราะห์สารกลุ่มอัลคาลอยด์ชื่อ renieramycins

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์เชิงวิชาการ ได้แก่ ทราบข้อมูลการเลี้ยงฟองน้ำ *Xestospongia* sp. สีน้ำเงิน ที่พบในแหลมมะขาม อ. สิเกา จ. ตรัง และรู้ปริมาณการสร้างสารต้านมะเร็งโดยเฉพาะสาร renieramycins ซึ่งเป็นสารที่กำลังได้รับการพัฒนาให้เป็นสารต้านมะเร็งชนิดใหม่ เพิ่มข้อมูลด้านคุณค่าของทรัพยากรชีวภาพทางทะเลของประเทศไทยให้มากขึ้น และจะนำไปสู่ประโยชน์เชิงเศรษฐกิจ ได้แก่การพัฒนาใช้ประโยชน์จากทรัพยากรชีวภาพที่มีในท้องถิ่นให้มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ หรือการหาสัตว์เศรษฐกิจพันธุ์ใหม่ของไทยต่อไป

หน่วยงานที่นำการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- หน่วยงานการศึกษา ค้นคว้าวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การประมงและเกษตรศาสตร์
- หน่วยงานการศึกษาระดับมหาวิทยาลัยและหน่วยงานวิจัยอื่นๆ
- เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในท้องถิ่น

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วิธีการเลี้ยง : ใช้ฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. ที่มีบริเวณแหลมมะขาม อ. สิเกา จ. ตรังช่วงเดือนมกราคม (จากการเก็บข้อมูลตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551-ปัจจุบัน พบเป็นช่วงมีการแพร่กระจายและเซลล์มีลักษณะสมบูรณ์มากที่สุด แต่โดยปกติพบแพร่กระจายทั้งปี เท่าที่เก็บข้อมูลยังไม่พบผู้ล่า)[3] การทดลองเลี้ยงแบบอิงธรรมชาติดังนี้ (ดัดแปลงจากวิธีของ Duckworth and Battershill, 2003)

1.1 <u>การเตรียมชุดทดลองเลี้ยง</u>

1.1.1 การเตรียมกล่องตาข่ายทดลองขนาด 50x50 เซนติเมตรโครงสร้างทำด้วยไมระแนงขนาด 1 นิ้ว หุ้มด้วยอวนตาข่ายขนาดความกว้างตาอวน 1 นิ้ว มีหมุด 4 ด้าน ยึดกับพื้นผิวดิน กล่องนี้ทำหน้าที่ป้องกันฟองน้ำทดลองซึ่งบรรจุอยู่ภายในไม่ให้ถูกรบกวนจากเศษวัสดุหรือสัตว์ขนาดใหญ่ และลดการกระแทกเนื่องจากกระแสน้ำ

1.1.2 เลือกใช้วัสดุยึดเกาะ[4] (ภาพที่ 2) คือ เชือกไนลอน ซิเมนต์ก้อน และท่อพีวีซี โดยวิธีการเตรียม ดังนี้

- เชือกไนลอน : ใช้เชือกไนลอนขนาด 7-10 มิลลิเมตร (mm) เป็นแกนกลางยึดชิ้นส่วนฟองน้ำแล้วนำเชือกนี้ไปมัดแขวนกับกล่องตาข่าย

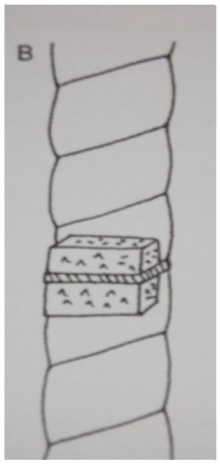
- ซิเมนต์ก้อน : เตรียมซีเมนต์ก้อนรูปทรงกระบอก ขนาดยาว 7 เซนติเมตร ปลายด้านหนึ่งต่อกับไม้ปลายแหลมยาว 1 ฟุต เจาะช่องตามแนวเอียงขนาดกว้าง 1 นิ้ว ลึก 0.5 นิ้ว โดยรอบก้อนซีเมนต์นำชิ้นส่วนฟองน้ำใส่ไว้ในช่องภายใน มัดด้วยเชือกไนลอนอีกครั้งหนึ่ง

- ท่อพีวีซี : เตรียมท่อพีวีซีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว ลึก 1 นิ้ว เจาะช่องขนาด 1เซนติเมตรโดยรอบ ภายในบรรจุชิ้นส่วนฟองน้ำ ท่อพีวีซีนี้จะถูกยึดติดกับกล่องตาข่ายอีกครั้งหนึ่ง

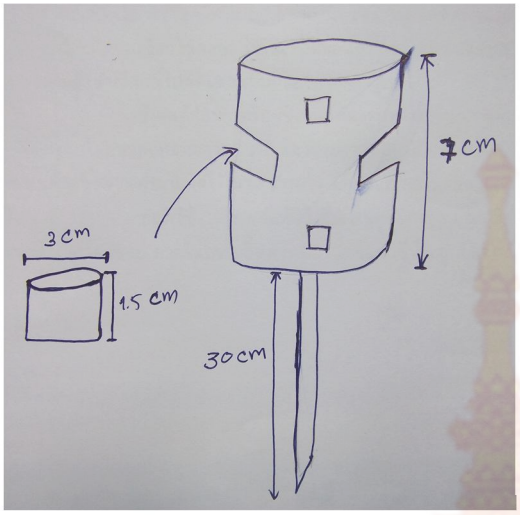
---

[3] ผู้ล่าของฟองน้ำมีความเจาะจงมากชัดที่สุดคือทากเปลือยซึ่งจะเจาะจงกับฟองน้ำแต่ละชนิดกรณี *Xestospongia* sp. สีน้ำเงินคือ *Jorunna* sp. ตั้งแต่เริ่มสำรวจทีมวิจัยยังไม่พบ จึงทำให้พบการแพร่กระจายดีทั้งปี

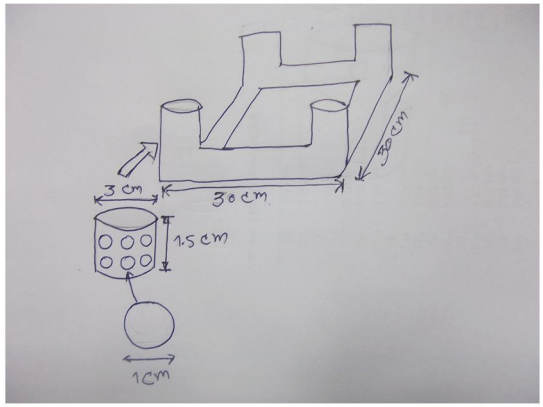
[4] จากการเก็บข้อมูลเบื้องต้นไม่พบว่าฟองน้ำเคลือบปนปะการังหรือบนสิ่งมีชีวิตอื่น แสดงว่าสิ่งมีชีวิตเหล่าผลิต antifouling compounds ฟองน้ำชนิดนี้จึงเคลือบเกาะไม่ได้ จึงเป็นเหตุผลให้ทีมวิจัยเลือก inorganic substrates



1



2



3

ภาพที่ 2 ภาพแบบวัสดุยึดเกาะ (1.เชือกไนลอน 2.ซิเมนต์ก้อน 3.ท่อพีวีซี)

1.1.3 การเตรียมชิ้นส่วนตัวอย่างฟองน้ำทดลอง

ใช้กรรไกรปลอดเชื้อชนิดคมพิเศษทำจากสแตนเลสตัดฟองน้ำให้มีรูปทรงกระบอกขนาด 8 ลูกบาศก์เซนติเมตร (cm^3)โดยประมาณ นำไปยึดกับวัสดุทดลอง ในขั้นตอนนี้ควบคุมให้ฟองน้ำจมน้ำตลอดเวลาปฏิบัติการ เพื่อหลีกเลี่ยงการตากแห้ง แช่วัสดุยึดเกาะในน้ำทะเลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำชิ้นฟองน้ำไปตรึงติดกับวัสดุยึดเกาะ

1.2 <u>การเลี้ยง</u>

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยใช้ชนิดวัสดุยึดเกาะเป็นทรีทเม้นท์ (Treatment) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เลี้ยงชุดทดลองในแปลงที่กำหนดเป็นเวลา 8 เดือน เก็บ ข้อมูลการเจริญเติบโตโดยชั่งน้ำหนักและเก็บข้อมูลการลงเกาะโดยนับจำนวนโคโลนี ตรวจวิเคราะห์ปัจจัยสภาวะแวดล้อม เดือนละ 1 ครั้ง ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง, อุณหภูมิ, ความขุ่นใส (transparency), ปริมาณแอมโมเนีย และ ปริมาณซิลิเกตละลายน้ำ

1.3 <u>การประเมินการเจริญเติบโต</u> (Growth assessment)

โดยการวัดขนาดโคโลนี แยกเป็นสองส่วนคือ คือความกว้างและความยาว ทำเดือนละครั้งตอนน้ำลงต่ำสุดโดยใช้เวอร์เนีย

1.4 <u>การวิเคราะห์ปัจจัยสภาวะแวดล้อม</u>

วิเคราะห์ปัจจัยทางกายภาพและเคมีของน้ำทะเลที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของฟองน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง (pH) อุณหภูมิ ความเค็ม วิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ Multiprobe analyser YSI 556 ความเค็มวัดโดย reflecto salinometer รุ่น S-100 ความขุ่นใส (Turbidity) โดยเครื่องวิเคราะห์ความขุ่น (Turbidity meter) รุ่น PC Checkit, Lovibond (Canada) รายงานผลในหน่วย NTU (Nephelometric Turbidity Unit) ปริมาณสารอินทรีย์ละลายน้ำ (DOC) ปริมาณสารอินทรีย์แขวนลอย (POC) ปริมาณแอมโมเนียและซิลิกา วิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานที่เสนอไว้คู่มือการวิเคราะห์น้ำทะเล (method of sea water analysis) โดย Strickland and Parson (1972) กรณี DOC และ POC เมื่อเตรียมตัวอย่างน้ำตามคู่มือเสร็จแล้ว ปริมาณคาร์บอนจะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CHN analyzer รุ่น Flash 1112 EAseries, Thermoquest (วิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

2. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การเลี้ยงวิเคราะห์ด้วยวิธี Mann-Whitney Utest เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตเป็นรายคู่ ตามวิธีของ ธีรเดช (2555)

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ แบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

3.1 <u>การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านมะเร็ง</u> (renieramycins) ใช้วิธีของ Suwanborirux *et al*. (2003) โดยบดฟองน้ำตัวอย่างให้ละเอียดเติมสารละลายโพแทสเซียมไซยาไนด์จนชุ่ม จากนั้นสกัดด้วยเมทานอลเป็นเวลา 72 ชั่วโมง กรองแยกเอากากออก ระเหยส่วนที่เป็นของเหลวด้วยเครื่องลดความดัน จะได้ส่วนสกัด เรียกว่า aqueous methanol ซึ่งจะถูก partition ด้วยไดคลอโรมีเทนและบิวทานอลตามลำดับ สารละลายสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนและบิวทานอลจะถูกระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยลดความดัน ได้สิ่งสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทนและบิวทานอล[5] ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.1.1 การวิเคราะห์สิ่งสกัดหยาบด้วยวิธี HPLC (Dionex Ultimate 3000)

ละลายสิ่งสกัดหยาบด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 0.1 mg/ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลววิเคราะห์ด้วย HPLC ใช้คอลัมน์ RP-18 กำหนดอุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 25 °C ระบบเฟสเคลื่อนที่ใช้เมทานอลและน้ำ (โปรแกรมตามตารางที่ 1) ใช้ Diode Array Detector (DAD) เป็น detector กำหนด 4 ความยาวคลื่น คือ 235, 254, 280 และ 366 nm การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสาร renieramycins ทำโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Clomeleon Version 6.80 SR7

[5] มี 12 หน่วยทดลองๆละ 2 สิ่งสกัด จำนวนสิ่งสกัดทั้งหมดเท่ากับ $12 \times 2 = 24$ สิ่งสกัด

3.2 <u>การวิเคราะห์ปริมาณสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่นๆ</u>

ขั้นตอนการสกัดและวิเคราะห์จะดำเนินเช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่ไม่เติมสารละลายโพแทสเซียมไซยาไนด์ในขั้นตอนแช่สกัด การวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเครื่อง HPLC คำนวณหาความเข้มข้นของแต่ละ peak ด้วยโปรแกรม Clomeleon Version 6.80 SR7 เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1

ตารางที่ 1 โปรแกรมระบบเฟสเคลื่อนที่สำหรับวิเคราะห์สารด้วย HPLC

เวลา (นาที)	น้ำ (%)	เมทานอล (%)
0	100	0
45	0	100
50	0	100
55	100	0

4. การวิเคราะห์ยืนยันชนิดของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

วิเคราะห์สิ่งสกัดชั้นที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งทดลอง Vero cell และ KB cell ด้วยเครื่อง LCMS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry) ยี่ห้อ waters รุ่น 2690-LCTควบคู่กับเครื่องวิเคราะห์มวลสารยี่ห้อ Alliance-Micromass (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มอ.) สารจะถูกแยกออกเป็น peaks ด้วยเครื่อง LC แต่ละ peak ถูกวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยเครื่องวิเคราะห์มวลสารทั้งแบบ positive ESIMS และ negative ESIMS ซึ่งจะเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานในฐานข้อมูล Dictionary of Natural Products หรือ Marinlit

5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (โดยห้องปฏิบัติการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ สวทช.)

5.1 <u>การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ทดลองชนิด Vero</u> ใช้วิธี GFP assay ทดสอบในจานหลุมทดลอง (384 well plate) ตามวิธีของ Hunt *et al*., 1999 ดัดแปลงโดย Changsen *et al*., 2003 การทดลองทำโดยเติมเซลล์ทดลองปริมาตร 45 μL (จำนวนเซลล์ประมาณ 3.3×10^4 cell/mL) ลงในหลุมทดลองแต่ละหลุม (ทำ 2 ซ้ำ) ภายในหลุมบรรจุสารทดสอบปริมาตร 5 μL (ละลายสารทดสอบด้วย 5% DMSO ให้มีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 50 μg/mL แล้วเจือจางลดลงแบบสองเท่า) จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 4 วัน ประเมินผลโดยวัดด้วยแสง Fluorescence (Molecular Spectra M5) คำนวณค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Pro Solfware

5.2 ทดสอบความเป็นพิษต่อ KB cell (Humen Epidermoid Carcinomar, ATCC CCL-17) โดยวิธี colorimetric cytotoxic assay ตามวิธีของ Skehan และ คณะ (1990)

ผลการวิจัย

1. ปัจจัยสภาวะแวดล้อม

ผลการวิเคราะห์ปัจจัยสภาวะแวดล้อมระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2557 พบว่าปัจจัยสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของฟองน้ำมีการเปลี่ยนแปลงดังนี้ อุณหภูมิอยู่ในช่วง 29.40-31.50 °C ความเป็นกรด-ด่าง 7.54-9.37 ความเค็ม 29.00-31.00 ppt ออกซิเจนละลายในน้ำ 6.58-8.95 mg/l ความโปร่งแสง 0.80-2.50 เมตร (m) ซิลิเกต 0.34-0.65 มิลิกรัมต่อลิตร (mg/l) (ตารางที่ 1)

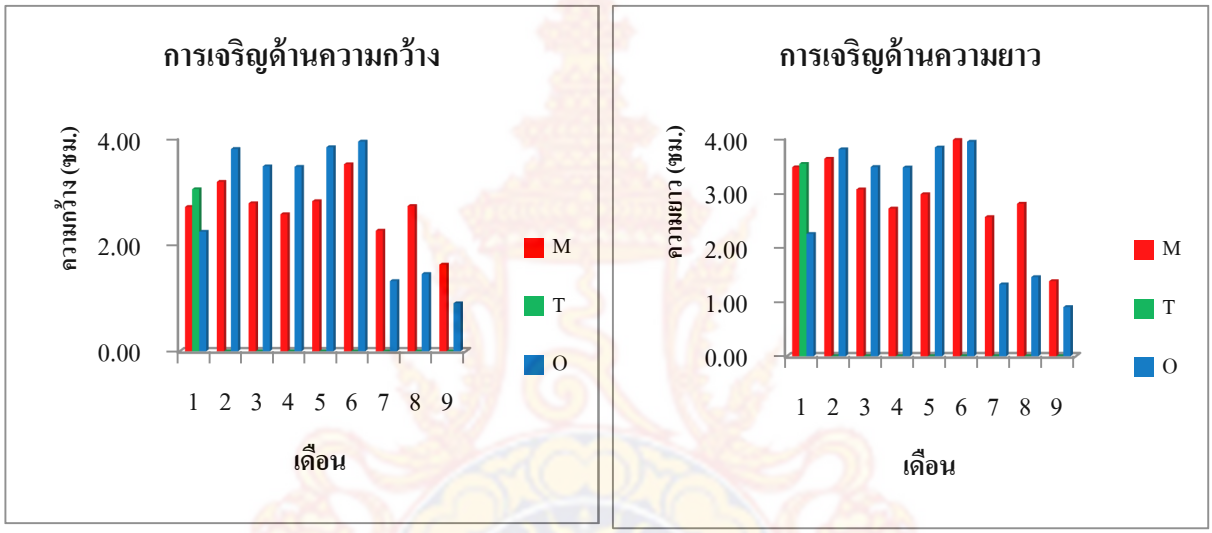
ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปัจจัยสภาวะแวดล้อม

ปัจจัยสภาวะแวดล้อม	2557								
	ก.พ.	**มี.ค.**	**เม.ย.**	**พ.ค.**	**มิ.ย.**	**ก.ค.**	**ส.ค.**	**ก.ย.**	**ต.ค.**
อุณหภูมิ (℃)	31.20	30.72	31.50	31.40	31.30	29.40*	31.30	30.00	30.00
ความเป็นกรด-ด่าง	8.75	9.37	7.65	7.65	7.56	7.75	7.54	8.65	8.65
ความเค็ม (ppt)	30.00	31.00	31.00	30.00	31.00	29.00	31.00	30.00	30.00
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (mg/l)	7.86	6.58	8.52	8.42	8.95	8.76*	8.76	7.84	7.84
ความโปร่งแสง (m)	2.50	1.30	1.50	0.80	0.90	0.90	1.30	1.40	2.50
ซิลิเกต (mg/l)	0.56	0.56	0.53	0.34	0.43	0.65*	0.43	0.65	0.65

* มีอิทธิพลต่อการเจริญด้านความกว้างและความความยาวมากที่สุด

2. ผลการประเมินการเจริญเติบโตของฟองน้ำ

การศึกษาการเจริญเติบโตด้านความกว้างและความยาวของฟองน้ำ ทำการศึกษาระหว่างเดือน กุมภาพันธ์ ถึง เดือนตุลาคม 2556 โดยใช้วัสดุยึดเกาะ 3 ประเภท ได้แก่ ซิเมนต์ก้อน (M) เชือกไนล่อน (T) และท่อพีวีซี (O) ตามลำดับ (ภาพที่ 3) พบการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วงฤดูฝน (เดือนกรกฎาคม-ตุลาคม) โดยฟองน้ำที่ใช้ด้วยเชือกเป็นวัสดุยึดเกาะไม่สามารถเติบโตได้เนื่องจากมีฝุ่นตะกอนเกาะบริเวณโคโลนีทำให้ฟองน้ำตาย ส่วนฟองน้ำที่ใช้วัสดุยึดเกาะทั้งซิเมนต์ก้อนและท่อพีวีซียังคงพบการเจริญเติบโตและมีอัตราการรอดในระดับที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตด้านความกว้าง (ซ้าย) และความยาว (ขวา) ของฟองน้ำจากวัสดุยึดเกาะทั้ง 3 ประเภท ในแต่ละเดือน

หมายเหตุ : 1-9 คือเดือนกุมพาพันธ์ถึงเดือนตุลาคม

3. ผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการเจริญเติบโตของฟองน้ำ

การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยสภาวะแวดล้อมต่อการเจริญเติบโตทำโดยการวิเคราะห์สถิติแบบ Mann-Whitney U test ประกอบไปด้วยตัวแปรตามจำนวนสองตัวแปรคือ ความกว้างและความยาวของฟองน้ำ ส่วนตัวแปรอิสระ คือปัจจัยสภาวะแวดล้อม

3.1 ผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อความกว้างของฟองน้ำทะเล

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยสภาวะแวดล้อมกับความกว้าง พบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ อุณหภูมิ ปริมาณซิลิเกตละลายน้ำ มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตด้านความกว้างของฟองน้ำ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 3, 4 และ5 ตามลำดับ)

ตารางที่ 3 อิทธิพลของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่อการเจริญเติบด้านความกว้างของฟองน้ำ

ชนิดวัสดุยึดเกาะ	**n**	**Mean rank**	**Mann-Whitney U test**	**p-value**
M	4	2.50	0.00	0.14
	5	7.00		
T	4	9.00	0.00	0.00*
	5	4.50		
O	4	2.00	0.00	0.02*
	5	6.50		

หมายเหตุ : * p<0.05

ตารางที่ 4 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตด้านความกว้างของฟองน้ำ

ความกว้างรหัส	**n**	**Mean rank**	**Mann-Whitney U test**	**p-value**
M	4	2.50	0.00	0.01*
	5	7.00		
T	4	4.50	8.00	0.03*
	5	5.40		
O	4	2.50	0.00	0.01*
	5	7.00		

หมายเหตุ : * p<0.05

ตารางที่ 5 อิทธิพลของปริมาณซิลิเกตต่อการเจริญเติบโตด้านความกว้างของฟองน้ำ

ความกว้าง รหัส	**n**	**Mean rank**	**Mann-Whitney U test**	**p-value**
M	4	2.50	0.00	0.01*
	5	7.00		
T	4	4.50	8.00	0.37
	5	5.40		
O	4	2.50	0.00	0.01*
	5	7.00		

หมายเหตุ : * $p<0.05$

3.2 <u>ผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการเจริญด้านความยาวของฟองน้ำ</u>

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยสิ่งแวดล้อมกับความยาว พบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ อุณหภูมิ ปริมาณซิลิเกตละลายน้ำ มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตด้านความยาวของฟองน้ำ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 6, 7 และ 8)

ตารางที่ 6 อิทธิพลของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่อการเจริญเติบโตความยาวของฟองน้ำ

ความยาว รหัส	**n**	**Mean rank**	**Mann-Whitney U test**	**p-value**
M	4	2.50	0.00	0.14
	5	7.00		
T	4	9.00	0.00	0.00*
	5	4.50		
O	4	2.00	0.00	0.02*
	5	6.50		

หมายเหตุ : * $p<0.05$

ตารางที่ 7 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตด้านความยาวของฟองน้ำ

ความยาว รหัส	n	Mean rank	Mann-Whitney U test	p-value
M	4	2.50	0.00	0.01*
	5	7.00		
T	4	4.50	8.00	0.03*
	5	5.40		
O	4	2.50	0.00	0.01*
	5	7.00		

หมายเหตุ : * $p<0.05$

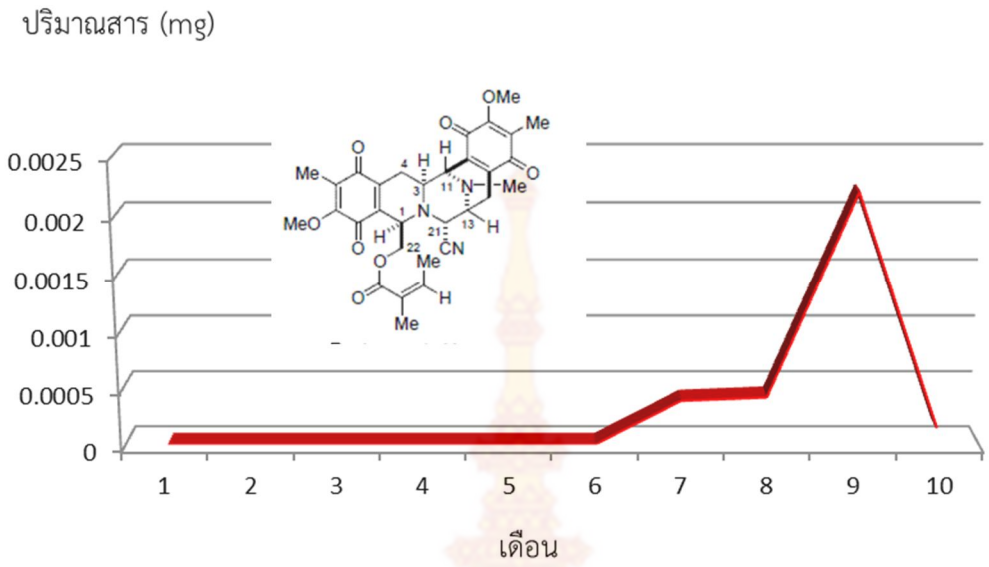
ตารางที่ 8 อิทธิพลของปริมาณซิลิเกตต่อการเจริญเติบโตด้านความยาวของฟองน้ำ

ความยาว รหัส	n	Mean rank	Mann-Whitney U test	p-value
M	4	2.50	0.00	0.01*
	5	7.00		
T	4	4.50	8.00	0.37
	5	5.40		
O	4	2.50	0.00	0.01*
	5	7.00		

หมายเหตุ : * $p<0.05$

4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

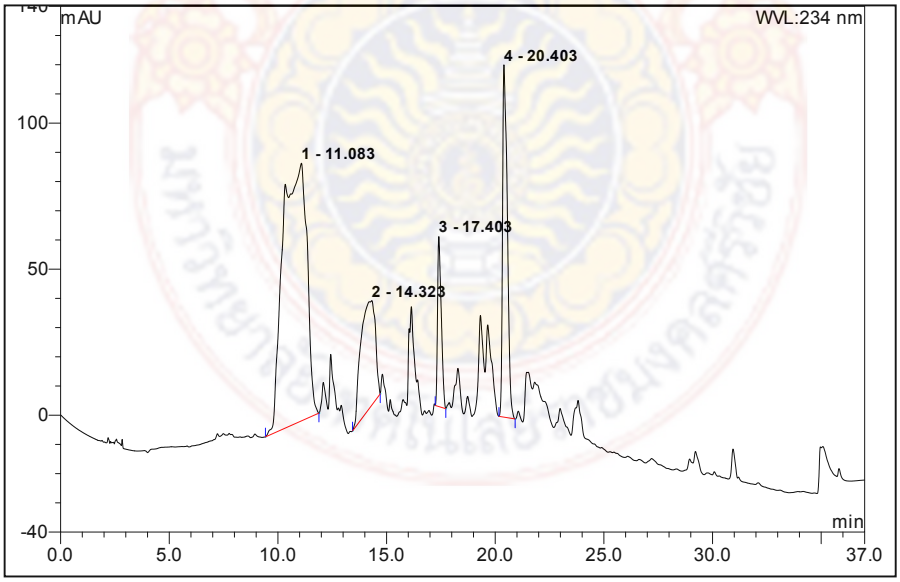
จากการทำสิ่งสกัดหยาบและวิเคราะห์องค์ประกอบสารต้านมะเร็ง renieramycin M พบมีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละเดือน โดยพบว่าเดือนตุลาคมมีความเข้มข้นสูงสุด (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ปริมาณการผลิตสารต้านมะเร็ง (mg) Renieramycin M ของฟองน้ำในแต่ละเดือน

5 ผลการวิเคราะห์สารทั้งหมดในสิ่งสกัดหยาบ

จากการสกัดสารโดยวิธีการเฉพาะสำหรับอัลคาลอยด์โดย HPLC พบสารกลุ่มอัลคาลอยด์หลายชนิดในสกัดหยาบจากฟองน้ำทะเล *Xestospongia* sp. สีน้ำเงิน (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 HPLC โครมาโทแกรมของสารกลุ่มอัลคาลอยด์ในสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำ

6. ผลการทกสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

สิ่งสกัดหยาบมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ทดลอง KB โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10 μg/ml

วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาปัจจัยสภาวะแวดล้อมบริเวณอ่าวมะขามซึ่งมีที่ตั้งอยู่บริเวณหาดปากเมง จ. ตรัง พบว่าอยู่ในเกณฑ์เดียวในมหาสมุทรอินเดียแลในทะเลอันดามัน (Beslin, 2014; Kathiravanl *et al*., 2014; Padmalal *et al*., 2012; Kumary *et al*., 2007) โดยพบว่าปัจจัยทางกายภาพของน้ำบริเวณชายฝั่ง จ. ตรัง ได้แก่ หาดปากเมง หาดเจ้าสำราญ หาดเจ้าไหม กับบริเวณอ่าวมะขามไม่แตกต่างกัน แต่ในทางตรงกันข้ามปัจจัยทางเคมี มีความแตกต่างกันบางประการ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปัจจัยสภาวะแวดล้อมระหว่างบริเวณเลี้ยงฟองน้ำและบริเวณชายฝั่งจังหวัดตรังโดยทั่วไป

ปัจจัยสิ่งแวดล้อม	หาดปากเมง	หาดเจ้าสำราญ	หาดเจ้าไหม	อ่าวมะขาม
ความเค็ม (ppt)	31.00-31.60	29.90-31.00	27.40-31.00	29.00-31.00
อุณหภูมิ (°C)	29.00-31.20	30.00-31.20	30.50-31.60	29.40-31.50
ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (mg/l)	5.70-6.40	4.30-5.40	5.80-6.20	6.58-8.95
ความเป็นกรด ด่าง (mg/l)	7.40-8.30	7.40-8.20	7.60-8.30	7.54-9.37
ความโปร่งแสง (m)	0.80-2.80	0.10-0.80	1.00-1.30	0.80-2.50
ซิลิเกต(mg/l)	-	-	-	0.34-0.65

ที่มา : ณิศรา (2550)

ผลการเจริญเติบโตในช่วงฤดูฝนมากที่สุดทั้งด้านความกว้างและความยาว (ภาพที่ 4) สอดคล้องกับการเลี้ยงฟองน้ำ *Coscinoderma* sp ในประเทศออสเตรเลีย (Duckworth and Wolff, 2007) ฟองน้ำ *Petrosia ficiformis* ในประเทศอิตาลี (Valisano *et al*., 2006) และการเลี้ยงฟองน้ำ *Psammocinia hawere* ในประเทศนิวซีแลนด์ โดยสันนิฐานว่าปริมาณน้ำฝนทำให้ความเค็มลดลง ฟองน้ำจึงมีการปรับตัวทางสรีระวิทยาต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว โดยการสร้างสารแทโบไลด์ทุติยภูมิเพิ่มขึ้น (Duckworth *et al*., 1997)

การศึกษาการเจริญเติบโตของฟองน้ำโดยใช้วัสดุยึดเกาะทั้ง 3 ประเภท ได้แก่ ซิเมนต์ก้อนเชือก และท่อพีวีซี พบว่า การใช้เชือกเป็นวัสดุยึดเกาะไม่เหมาะสมต่อการเติบโตของฟองน้ำชนิดนี้

เพราะลักษณะผิวเชือกมีพื้นที่หน้าตัดเล็กและการแขวนในแนวดิ่งทำให้สัมผัสโดยตรงกับสิ่งแขวนลอย ทำให้ระบบไหลเวียนน้ำอุดตันส่งผลให้ฟองน้ำไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนฟองน้ำที่ใช้วัสดุยึดเกาะทั้งซิเมนต์ก้อนและท่อพีวีซี ยังคงพบการเติบโตแต่มีอัตราการรอดค่อนข้างน้อย ทั้งนี้เพราะชนิดวัสดุเกาะมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ของฟองน้ำ (Osinga *et al*., 1998) (Duckworth *et al*., 1997) การตายของฟองน้ำจากการทดลองเกิดจากกระแสคลื่นลมแรง และปริมาณตะกอนดินบริเวณเลี้ยงมีมากเกินไป ลักษณะการตายจากสาเหตุดังกล่าวพบในฟองน้ำทะเลหลายชนิดเช่น *Chondrosia reniformis* ที่เลี้ยงแถบบริเวณตะวันออกของทะเลเมดิเตอร์เรเนียก็ถูกตะกอนทับถมจนตายเช่นกัน (Osinga *et al*., 2010)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสภาวะแวดล้อมต่อการเจริญเติบโต พบออกซิเจนละลายน้ำ อุณหภูมิและซิลิเกต มีผลต่อการเติบโตซึ่งสามารถอธิบายผลของปัจจัยดังกล่าวต่อการเจริญของฟองน้ำ *Xestospongia* sp. ดังนี้

<u>อุณหภูมิ</u>

อุณหภูมิมีผลต่อการเพิ่มขึ้นและลดลงของอัตราเมแทบอลิซึม โดยการควบคุมการผลิตไอออนและกรดอะมิโนอิสระของฟองน้ำ ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต (Yi *et al*., 2005) ในธรรมชาติฟองน้ำมีการปรับตัวทนต่ออุณหภูมิที่ลดลงได้ดีกว่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นอย่างกะทันหัน (Osinga *et al*., 1999) ลักษณะดังกล่าวพบในการเลี้ยงฟองน้ำทะเล *Mycale hentscheli* ในประเทศนิวซีแลนด์มีอัตราการรอดสูงถึงร้อยละ 90-100 ในสภาวะที่อุณหภูมิลดลง (Page *et al*., 2005) ในการทดลองครั้งนี้อุณหภูมิไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลันและช่วงกว้างแต่เปลี่ยนแปลงในช่วงแคบๆประมาณ 1-2 ^{o}C ดังนั้นอัตราเมแทโบลึซึมของฟองน้ำจึงน่าจะคงที่

<u>ออกซิเจน</u>

ฟองน้ำบางชนิดมีความไวต่อภาวะที่ขาดออกซิเจน (Osinga *et al*., 1999) ฟองน้ำแต่ละชนิดบริโภคออกซิเจนในปริมาณแตกต่างกัน อัตราการใช้ออกซิเจนที่เหมาะสมเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.2-25 $\mu molO_2h^{-1}/cm^3$ (ตารางที่ 9) และฟองน้ำบางชนิดได้รับผลกระทบจากออกซิเจนที่ต่ำกว่าระดับนี้ (Belarbi *et al*., 2003) ดังนั้นการเลี้ยงฟองน้ำจึงต้องคำนึงถึงปริมาณความต้องการออกซิเจนด้วย

ตารางที่ 10 อัตราการใช้ออกซิเจนในฟองน้ำทะเลแต่ละชนิด

ชนิด	อุณหภูมิ (°C)	อัตราการใช้ปริมาณออกซิเจน $\mu molO_2 h^{-1}/cm^3$		อ้างอิง
		ต่อน้ำหนักเปียก	ต่อปริมาตรเปียก	
Calcarea				
Garntia sp.		4.5-6.7		Hyman (1925)
Sycon ciliatum	12.3	24.7		Cotter (1978)
Demospongia				
Axinella polycapella	25–28	0.58	0.54	Osinga et al. (1998b)
Axinella waltonsmithi	25–28		0.72	Osinga et al. (1998b)
Carteriospongia foliascens	-	1.67	1.35	Wilkinson (1983)
Carteriospongia sp. fp	-	2.36	1.91	Wilkinson (1983)
Carteriospongia sp. fr	-	2.34	1.90	Wilkinson (1983)
Cinachyrella apion	25–28	0.56	0.64	Osinga et al. (1998b)
Hippospongia equina	-	0.24		Von Putter (1914)

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Osinga *et al*., 1999)

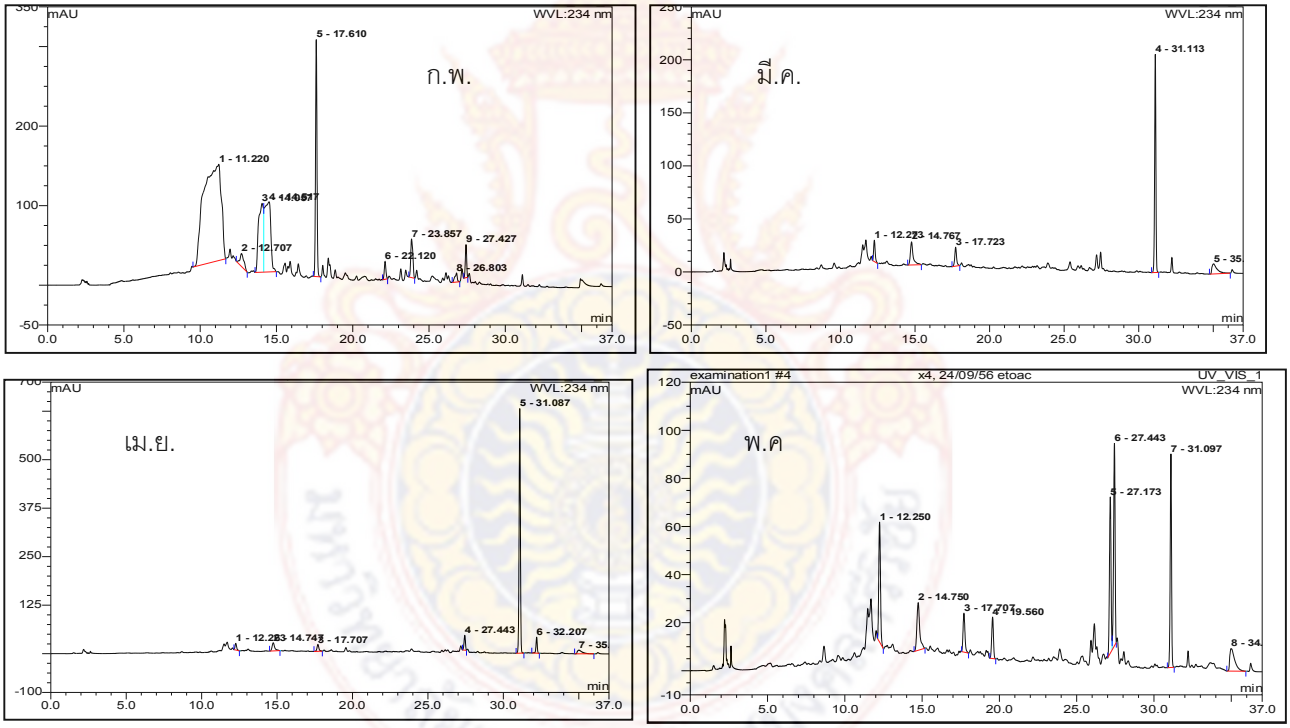
<u>ซิลิเกต</u>

ฟองน้ำจำเป็นต้องใช้ซิลิเกตในการสร้างโครงร่างแข็ง (spicule) ซึ่งซิลิเกตเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของฟองน้ำในอันดับ Haplosclerida ร้อยละ 62.3 (ซึ่งฟองน้ำ *Xestospongia* sp. ก็จัดอยู่ในอันดับนี้) และเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 90 ของฟองน้ำบางชนิด การสร้างโครงร่างแข็งได้เกิดขึ้นในช่วงที่มีความเข้มข้นของซิลิเกตสูง หากขาดซิลิเกตที่ละลายในน้ำ การเจริญเติบโตของ

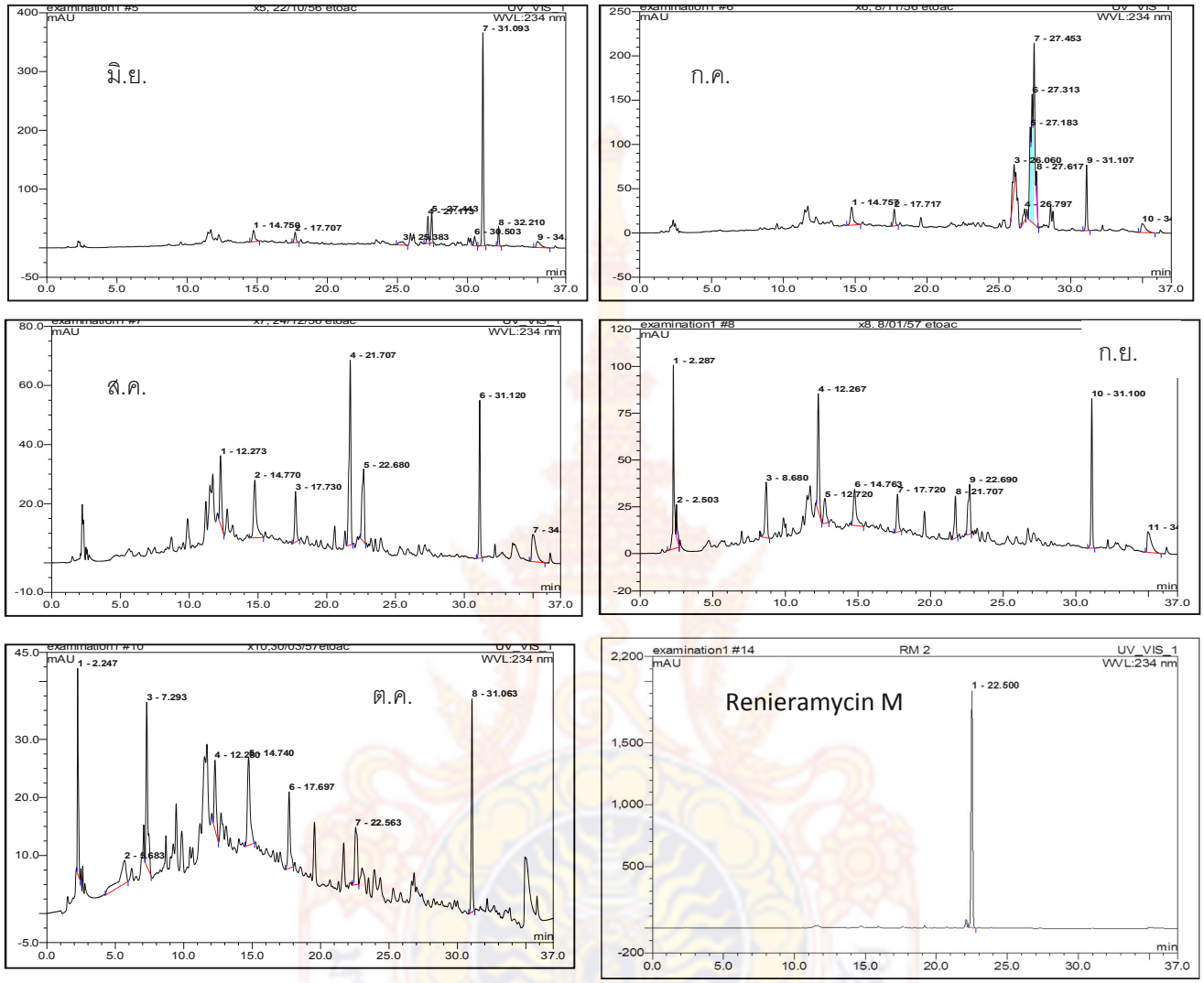
ฟองน้ำก็จะหยุดชะงัก ซึ่งลักษระดังกล่าวนี้พบในการทดลองเลี้ยงฟองน้ำทะเล *Suberites domuncula* ฟองน้ำกลุ่ม demosponges และฟองน้ำแก้ว (Osinga *et al*., 1999) นอกจากนี้ยังพบหลักฐานการสูญพันธุ์ของฟองน้ำหลายชนิดในยุคครีเทเชียส (Cretaceous) เนื่องจากปริมาณซิลิเกตละลายน้ำลดลง (Belarbi *et al*., 2003; Sipkema, 2004))

การสร้างสารต้านมะเร็งตามฤดูกาลของฟองน้ำ *Xestospongia* sp.

จากการติดตามวิเคราะห์ปริมาณการสร้างสารต้านมะเร็งของฟองน้ำ *Xestospongia* sp. โดยใช้สาร renieramycin M ซึ่งสร้างโดยฟองน้ำชนิดนี้เป็นตัวติดตาม พบการสร้างสารปริมาณน้อยในฤดูร้อนและฤดูฝน ในทางกลับกันปริมาณสารจะถูกสร้างมากในช่วงการเปลี่ยนแปลงผ่านฤดูกาล (ภาพที่ 6



ภาพที่ 6 HPLC โครมาโทแกรมแสดงการสร้างสารแต่ละเดือน



ภาพที่ 6 HPLC โครมาโทแกรมแสดงการสร้างสารแต่ละเดือน (ต่อ)

ลักษณะดังกล่าวแสดงว่าการเปลี่ยนแปลงปัจจัยสภาวะแวดล้อมเป็นสิ่งกระตุ้นหรือเร้าให้ฟองน้ำสร้างสารมากขึ้นและความหลากหลายของสารก็มีความแตกต่างกัน จากข้อมูลการวิเคราะห์ปัจจัยสภาวะแวดล้อมพบความโปร่งใสในเดือนตุลาคมมากกว่าเดือนอื่นๆ (ภาพที่ 4) แสดงว่าปริมาณสารแขวนลอยลดลง การมีปริมาณตะกอนหรือสารแขวนลอยในน้ำมากเกินไปจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของฟองน้ำ เพราะตะกอนแขวนลอยจะปิดกั้นช่องไหลเวียนน้ำ (water pore) ทำให้น้ำไหลเวียนไม่สะดวก ส่งผลต่อการนำส่งออกซิเจนและอาหารไปสู่เซลล์ ซึ่งข้อมูลนี้สอดคล้องกับการเจริญเติบโตที่ลดลงในเดือนตุลาคม (ภาพที่ 3) สันนิษฐานว่า เมื่อฟองน้ำมีการเจริญเติบโตลดลงอันเนื่องมาจากความเครียด จะเกิดการปรับตัวทางชีวเคมีของเซลล์ฟองน้ำโดยสร้างสาร renieramycin M ในปริมาณสูงขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่าความโปร่งแสง เป็นปัจจัยหลักในการ

สร้างสาร renieramycin M เพราะค่าความโปร่งแสงในเดือนตุลาคมเท่ากับเดือนกุมภาพันธ์ (ตารางที่ 1) เมื่อพิจารณาปัจจัยร่วมอื่นๆ ทั้งสองเดือนนี้ พบว่าอุณหภูมิน้ำเดือนกุมภาพันธ์มีค่าสูงกว่าเดือนตุลาคม ดังนั้นอุณหภูมิก็น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งในการสร้างสารของฟองน้ำ *Xestospongia* sp. สันนิษฐานว่าหากต้องการให้ฟองน้ำสร้างสารเพิ่มขึ้น ไม่ควรเลี้ยงในที่อุณหภูมิสูงกว่า 30.0 °C เพราะฟองน้ำมีความว่องไวสูงต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Osinga *et al*., 1999)

สรุป

การศึกษาปัจจัยสภาวะแวดล้อม บริเวณอ่าวมะขามพบว่า อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานเดียวกับสภาวะสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไปในมหาสมุทรอินเดียและชายฝั่งอันดามัน แสดงว่าปัจจัยสิ่งแวดล้อมบริเวณอ่าวมะขามยังอยู่ในเกณฑ์ปกติ และฟองน้ำสามารถเติบโตได้สูงสุดในช่วงฤดูฝน การเจริญเติบโตของฟองน้ำกับวัสดุยึดเกาะทั้ง 3 ประเภท ได้แก่ ซิเมนต์ก้อน เชือก และท่อพีวีซี พบว่าฟองน้ำที่ใช้วัสดุยึดเกาะด้วยเชือกจะไม่สามารถเติบโตได้ ส่วนฟองน้ำที่ใช้วัสดุยึดเกาะทั้งซิเมนต์ก้อนและท่อพีวีซี ยังคงพบการเติบโตแต่มีอัตราการรอดน้อย และพบว่าซิเมนต์ก้อนมีความเหมาะในการใช้เป็นวัสดุยึดเกาะมากที่สุด

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ปัจจัยสภาวะแวดล้อมต่อการเจริญเติบโต พบว่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ อุณหภูมิ และซิลิเกต มีผลต่อการเจริญเติบโตของฟองน้ำ *Xestospongia* sp. สีน้ำเงิน ฟองน้ำชนิดนี้สร้างสารต้านมะเร็งหลายชนิด สารที่โดดเด่นคือ renieramycin M ซึ่งถูกใช้เป็นตัวติดตาม (marker) ในการศึกษาครั้งนี้ โดยพบว่าฟองน้ำสร้างสาร renieramycin M ได้ดีในฤดูฝนและสร้างมากในเดือนตุลาคมซึ่งเป็นช่วงเปลี่ยนผ่านฤดูกาล สันนิษฐานว่าความโปร่งใสและอุณหภูมิน้ำเป็นปัจจัยกระตุ้นการสร้างสาร ซึ่งการสร้างสารมากขึ้นเมื่อการเจริญเติบโตลดลงสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำ *Xestospongia* sp มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ทดลอง KB (IC_{50} = 3 μg/ml)

เอกสารอ้างอิง

ณิศรา ถาวรโตส. 2550. **ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสิ่งแวดล้อมทางน้ำและการแพร่กระจายของแพลงก์ตอนพืช ของทะเลอันดามัน: กรณีศึกษาชายฝั่ง จังหวัดพังงา จังหวัดภูเก็ต จังหวัดกระบี่ และจังหวัดตรัง.** ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทางทะเล) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล. 264 น.

ธีรเดช ฉายอรุณ. 2555. **เอกสารประกอบการสอนวิชา กระบวนการแสวงหาความรู้ ด้วยการวิจัย.** หลักสูตรปริญญาเอก สาขาวิชาประชากรศึกษา ภาควิชาศึกษาศาสตร์ คณะสังคมศาสตร์และมนุษยศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.

Abdo, D.A., Motti, C.A., Battershill C.N., and Harvey, E.S., 2007, Temperature and spatiotemporalvariability of salicylihalamide A in the sponges *Haliclona* sp., **J. Chem. Ecol.** 33: 1635-1645.

Belarbi, L.H., GoMez A.C., Chisti Y., Camacho F.G., and Grima, E.M., 2003, Producing drug from marine sponges. **Biotechnol. Adv.** 21:585-598.

Beslin, L.G., 2014, Water and Sediment Quality Assesment of Poonthura Backwater in the Southwest Coast of India. **Am. J. Mar. Sci.** 2:43-46.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Muro, M. H. G., Northcote, P.T., and Prinsep, M. R., 2009, Marine
natural products. **Nat. Prod. Rep.** 22:170-244.

Brusca, R.C., and Brusca G.J., 1990, **Invertebrate phylum porifera : The sponges.** Sunderland,
Mass. Sinauer Associates Inc., 181-210.

Chanas, B., Pawlik, J.R., Lindel, T., and finical W., 1996, Chemical defense of the Carribean
sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 208:185-198.

Changsen, C., Franzblau, S.G.., and Palittapongarnpim, P., 2003, Improved Green Fluorescent Protein Reporter Gene-Based Microplate Screening for Antituberculosis Compounds by Utilizing an Acetamidase Promoter. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 47:3682–3687.

Duckworth, A.R, 2009, Farming sponge to supply bioactive metabolites and bath sponges: a review. **Mar. Biotechnol.** 11:669-679.

Duckworth, A.R., and Battershill, C. N., 2003, Developing farming structures of production of biologically active metabolites. **Aquaculture.** 217:139-156.

Duckworth A.R., Battershill C.N., Bergquist, P.R., 1997, Influence of explant procedures and environmental factors on culture success of three sponges. **Aquaculture.** 156:251- 267.

Duckworth, A.R., and Wolff, C., 2007, Bath sponge aquaculture in Torres Strait, Australia: Effect of explant. **Aquaculture.** 271:188–195.

Hadas, E., Shipigel M., and Iian, M., 2004, Sea ranching of the marine sponge *Negombata magnifica* (Demospongia, Latrunculiidae) as a first step for latrunculin B mass production. **Aquaculture.** 11:585-598.

Hunt, G.L., Mehlum, F., Russell, R.W., Irons, D., Decker, M.B., and Becker, P.H. 1999, Physical processes, prey abundance, and the foraging ecology of seabirds. In: Adams, N.J. & Slotow, R.H. (eds) Proc. **Int. Ornithol. Congr.** 22:2040-2056.

Kathiravan, K., Usha, N., and Vishnunath, R., 2014, Water Quality of Rameswaram Island, Southeast Coast of India – A Statistical Assessment. **Int. Res. J. Env. Sci.** 3:12-23.

Kumary, K.S.A., Azis P.K.A., Natarajan, P., 2007, Water quality of the Adimalathura Estuary, southwest coast of India. **J. Mar. Biol. Ass. India.** 49:01–06.

MacMillan, S.M., 1996, Starting a successful commercial sponge aquaculture farm. **Center for tropical and subtropical aquaculture.** University of Hawaii. Honolulu. 1 p.

Orabi, K.Y., Sayed, K.E., Hamann, M., Dunbar, C., Al-Said, M.S., Higa, H., and Kelly, M., 2002, Araguspongines K. L., Bioactive Bis-1-1Oxaquinolizidine N-Oxide alkaloids from Red Sea speciment sponge of *Xestospongia exigura*. **J. Nat. Prod.** 65:1782-1785.

Osinga, S., Tramper, J., and Wijffel, S., 1999, Cultivation of marine sponges. **Mar. Biotechnol.** 1:509-532.

Osinga, R., Tramper J., and Wijffels, R.H., 1998, Cultivation of marine sponges for metabolite production: application for biotechnology. **TIBTECH.** 16:130-134.

Osinga, R., Sidri, M., Cerig, E., Gokalp, S.Z., and Gokalp, M., 2010, Sponge Aquaculture Trials in the East-Mediterranean Sea: New Approaches to Earlier Ideas. **Open. Mar. Biol. J.** 4:74-81.

Page, M.J., Northcote, P.T., Webb, V. L., Mackey S., and Handley, S.J., 2005, Aquaculture trials for the production of biologically active metabolites in the New Zealand sponge *Mycale hentscheli* (Demospongiae: Poecilosclerida). **Aquaculture.** 250:256-269.

Padmalal, D., Remya, S.I., Jyothi, S.J., Baijulal B., Babu, K.N., and Baiju, R.S., 2012, Water quality and dissolved inorganic fluxes of N, P, SO_4, and K of a small catchment river in the Southwestern Coast of India. **Environ. Monit. Assess.** 184:1541–1557.

Pawlik, J.R., Chanas, B., Toonen, R.j., and Fenical, W., 1995, Defends of Carribean sponges against predatory fish, I: Chemical deterency. **Mar. Eco. Prog. Ser.** 127:183-194.

Sipkema, D., 2004. **Cultivation of Marine Sponges : From Sea to Cell.** Ponsen & Looijen BV. Wageningen University. The Netherlands. 184 p.

Storr, J.F., 1964. **Defends of Carribean sponges against predatory fish, I: Chemical deterency Scientific report fisherys n.466.** Washington D.C., United State, Department of the interior. pp.1.

Strickland, J.D.H., and Parsons, I.R. 1972. **A practicalhandbook of seawater analysis.** Fisheries Research Board of Canada. Bulletin. 167 p.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren J.T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M.R., 1990, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Nat. Can. Inst.** 82:1107-1112.

Suwanborirux, K., Amnuoypol, S., Plubrukarn, A., Pummangura, S., Kubo, A., Tanaka, C., and Saito, A., 2003, Chemistry of Renieramycins. Part 3. Isolation and structure of stabilized renieramycins type derivative possessing antitumor activity from Thai sponge *Xestospongia species* pretreat with potassium cyanite. **J. Nat. Prod.** 66:1441-1446.

Valisano, L., Bavestrello, G., Giovine, M., Arillo, A. and Cerrano, C., 2006, Seasonal production of primmorphs from the marine sponge *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789) and new culturing approaches. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 337:171–177.

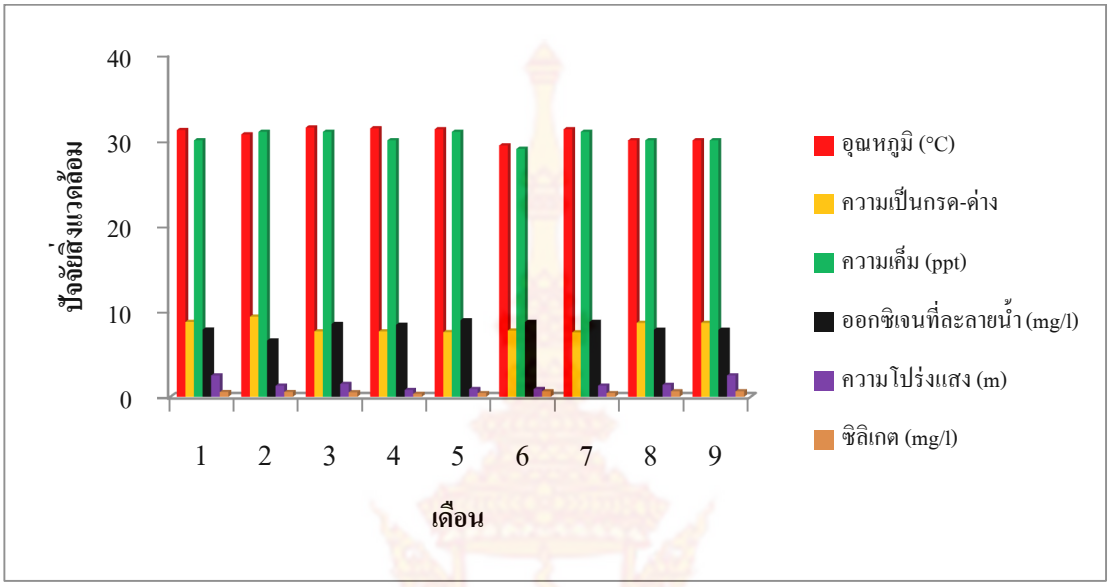
Treeck, P.V., Eisinger, M., Muller, J., Paster M., and Schuhmacher, H., 2003, Mariculture trials with Mediterranean sponge species the exploitation of an old resource with sustainable and novel Methods. **Aquaculture.** 218:439-455.

Vethaak, A.D., Cronie, R.J.A., and Van Soest, R.W.M., 1982, Ecology and distribution of two sympatric related sponge species, *Halichondria panica* (Pallas., 1766) and H. bowerbanki (Burton, 1930) (Porifera, Demospongiae) with remarks on their speciation. **Bijdr. Dierk.** 52:82-102.

Yi, Q., Wei, Z., Hua, L., Xingju, Y., and Meifang J., 2005, Cultivation of marine sponges. **Chi. J. Oceanol. Limn.** 23: 194-198.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปัจจัยสภาวะแวดล้อมในรอบ 1 ปี



หมายเหตุ : 1-9 คือ เดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนตุลาคม

ภาพผนวกที่ 1 การวัดการเจริญเติบโตด้านความกว้างและความยาวของฟองน้ำที่ใช้วัสดุยึดเกาะด้วยเชือก (ก) ท่อพีวีซี (ข) และซิเมนต์ก้อน(ค)