รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาการเลี้ยงฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xastosporgia* sp. ในโรงเรือน เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตสารต้านมะเร็ง Renieramycins

The cultural development of a blue marine sponge Xestospongia sp. in hatchery to enhance antitumor compound, renieramycins, production

พชร เพ็ชรประดับ และวัฒนา วัฒนกุล

Patchara Pedpradab and Wattana watanakul

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมงมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัย สถาบันทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ที่สนับสนุนเครื่องมือและห้องวิจัย

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. จำนวน 7 โคโลนี จากทะเลบริเวณจังหวัดสตูล ทำการอนุบาลในบ่อซิเมนต์ขนาด 130 ตารางเมตรเป็นเวลา 4 เดือน โดยระบบน้ำไหลผ่าน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสมบูรณ์ที่สุดจำนวน 1 โคโลนี ทำการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (ex-mother colony) ขนาด 1x1cm นำไปเลี้ยงในระบบน้ำไหลเวียนผ่าน โดยวิธีแขวนในแนวดิ่ง ซึ่งใช้ตาข่ายพลาสติกเป็นวัสดุยึดเกาะ ภาชนะที่ใช้เลี้ยงมี 3 ชนิด ได้แก่ ลังโฟม ตู้แก้ว และ ลังพลาสติก ผลการทดลองพบว่า ภาชนะตู้แก้วมีการเจริญเติบโตของฟองน้ำที่ดีที่สุด รองลงมาคือ ลังโฟมและลังพลาสติกตามลำดับ ประเภทลังโฟมในประเด็นการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิพบว่า สามารถเก็บรักษาอุณหภูมิได้ดีที่สุดเพราะมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงที่แคบ รองลงมาคือกล่องพลาสติกและตู้แก้ว การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำ แปรผันตรงกับอุณหภูมิของอากาศ หากฝนตกอุณหภูมิก็จะลดต่ำแต่ในทางกลับกันในวันที่อากาศร้อนอุณหภูมิในภาชนะก็จะเพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นกัน ตู้แก้วมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างรวดเร็วกว่าภาชนะอื่นๆ สืบเนื่องจากเป็นภาชนะใส โปร่งแสง ส่งผลให้ฟองน้ำมีการเติบโตได้ดีที่สุด โดยสามารถผลิตสาร renieramycin m ได้ 2.5 มิลลิกรัม คิดเป็น 25,000 บาทต่อหนึ่งหน่วยการทดลองในระยะ 1 เดือน

คำสำคัญ : *Xestospongia* sp., renieramycin

ABSTRACT

A blue marine sponge, *Xastospongia* was collected. For 7 colony from suture sea. The speciruns were primary cultured in 130 m² cement pourd for 4 monthes. The mothor colony was cut out in small pieces about 1x1 cm. which further cultivated in 3 kinde of containers with long line rope method. The ex-colonies were tied with plastic substrates. After 1 month cultured, If found that sponge in glass containers showed highest growth. And also highest renieramycin m production. This because if hight penetration and temperature fluctuation. This experiment we can produce 2.5 mg. RM per experimental unit. Pricing as 25,000 Thai baht

Keywords: *Xestospongia* sp., renieramycin

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่ทำวิจัย	8
ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	11
วิธีดำเนินการวิจัย	12
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	15
เอกสารอ้างอิง	24

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างสารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิจากฟองน้ำทะเลที่ได้รับการผลิตเป็นเวชภัณฑ์ขายในตลาดปัจจุบัน	9
2	โปรแกรมระบบเฟสเคลื่อนที่สำหรับวิเคราะห์สารด้วย HPLC	14
3	การตรวจวัดปัจจัยคุณภาพน้ำเบื้องต้น	22

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างสาร renieramycins และ saframycin	11
2	วัสดุยึดเกาะและลักษณะการประกอบเพื่อทำชุดเลี้ยงในแนวดิ่ง	12
3	แบบจำลองของหน่วยทดลอง	13
4	การเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเล	15
5	การพักฟื้นฟองน้ำทะเลในบ่อพักน้ำ	15
6	การเปลี่ยนแปลงของความเค็มและอุณหภูมิในรอบวันในบ่อพักฟื้น	16
7	ปริมาณสารอินทรีย์ละลายน้ำ	16
8	การประเมินการเจริญเติบโตในบ่ออนุบาลโดยเทคนิคการวัด	17
9	การวิเคราะห์สาร RM โดยใช้เครื่องมือ Liquid Chromatography mass spectrometry	18
10	การเตรียมตัวอย่างสำหรับเลี้ยงในระบบทดลอง	19
11	การเจริญเติบโตของฟองน้ำในภาชนะทั้ง 3 ชนิด	20
12	การตรวจสอบคุณภาพน้ำในระบบการทดลอง	20
13	การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในถังเลี้ยงทั้ง 3ชนิด	21
14	การวิเคราะห์สารเมแทโบไลด์ทุติยภูมิ	21

ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่ทำวิจัย

โรคที่มีความรุนแรงและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตเป็นอันดับ 1 ของประชากรโลกและประเทศไทยได้แก่ โรคมะเร็ง (IARC, 2014) ยาที่ใช้รักษาโรคชนิดนี้มีราคาแพง ผู้ป่วยบางรายไม่สามารถเข้าถึงยาที่มีประสิทธิภาพได้ ประกอบกับตัวยาที่ใช้รักษาหรือ lead compounds ที่จะพัฒนาเป็นยาก็ยังมีจำนวนมีน้อย ดังนั้นการค้นหาสารต้านมะเร็งเพื่อพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่จึงมีความสำคัญ การวิจัยยามีหลายขั้นตอน ขั้นตอนเริ่มต้นและมีความสำคัญมากคือการค้นหาโมเลกุลต้นแบบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือ lead molecules ซึ่งจะนำไปสู่การสังเคราะห์เลียนแบบโครงสร้างในขั้นตอนต่อไป แต่ปัจจุบันพบว่า การสังเคราะห์มีการลงทุนสูงและบางขั้นตอนใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายทั้งต่อผู้ทดลอง และการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม อีกทั้งไม่สามารถสังเคราะห์ได้ทั้งหมด ดังนั้นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหา คือ การเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตที่สร้างสารนั้นๆเองในธรรมชาติ เพื่อผลิตสารโดยตรง ที่พบมากและเป็นไปได้คือ การเพาะเลี้ยงฟองน้ำเพื่อผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารต้านมะเร็ง Renieramycins สร้างโดยฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xastosporngia* sp. พบได้ทั้งในทะเลฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน สารนี้กำลังอยู่ในขั้นตอนการพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งชนิดใหม่ (Perdicaris et al., 2013.) จึงมีราคาสูงและเป็นที่ต้องการของบริษัทยาและเคมีภัณฑ์ เช่น Pharmarma และ MERCK เป็นต้น และยังไม่พบรายงานการสังเคราะห์สารชนิดนี้ ดังนั้นการผลิตสารจากธรรมชาติจึงเป็นทางออกหนึ่งในการผลิตสารให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด

จากโครงการทดลองเลี้ยงฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xastosporgia* sp. ในสภาพธรรมชาติ เพื่อผลิตสารต้านมะเร็งในปี 2558 พบว่า ฟองน้ำชนิดนี้สร้างสารต้านมะเร็ง renieramycins ได้ดีในช่วงการเปลี่ยนผ่านจาก ฤดูฝนไปยังฤดูแล้งเท่านั้น และการสร้างสารเป็นไปในช่วงเวลาสั้นๆ กล่าวคือ เพียง 1 เดือนเท่านั้น (พชร และคณะ, 2559) และพบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสารในฟองน้ำได้แก่ อุณหภูมิ ออกซิเจนละลายน้ำ และปริมาณ ซิลิเกตในน้ำ ซึ่งจากโครงการวิจัยดังกล่าวสามารถสรุปประเด็นปัญหาได้ดังนี้

1. ไม่มีข้อมูลค่าปัจจัยสภาวะแวดล้อม (อุณหภูมิ ปริมาณ ออกซิเจนละลายน้ำ ปริมาณซิลิเกต) ที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงฟองน้ำทะเล *Xastosporgia* sp. สีน้ำเงินเพื่อผลิตสารต้านมะเร็ง renieramycins
2. การเลี้ยงในสภาพธรรมชาติไม่สามารถควบคุมปัจจัยดังกล่าวให้คงที่ได้ อีกทั้งประสบปัญหาตะกอนแขวนลอยอุดตันระบบท่อไหลเวียนภายใน ทำให้ฟองน้ำตายเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังประสบปัญหาด้านสังคม ได้แก่ การขโมย ความเสียหายของฟองน้ำจากเครื่องมือประมง ไม่สามารถหาพื้นที่ในธรรมชาติที่เหมาะสมได้

จากสภาพปัญหาที่กล่าวมาจึงนำไปสู่การแก้ปัญหาโดยการเลี้ยงฟองน้ำชนิดนี้ในโรงเรือนเพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมและควบคุมการผลิตสาร renieramycins ให้คงที่รวมทั้งจุดคุ้มทุนในการผลิตสาร renieramycin

ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

ฟองน้ำเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล อาศัยแบบยึดเกาะกับวัสดุหรือสิ่งยึดเกาะตามแนวปะการัง ฟองน้ำเป็นแหล่งผลิตของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ สารเหล่านี้เรียกว่า สารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิ ซึ่งถูกพัฒนาใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์และอุตสาหกรรมการผลิตยามากกว่า 2 ทศวรรษแล้ว (Osinga *et al*., 1999) โมเลกุลยาหลายชนิดในท้องตลาดแยกได้จากฟองน้ำ (ตารางที่ 1) โดยทั่วไปการผลิตสารเพื่อพัฒนาเป็นยาใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีเลียนแบบโครงสร้างที่มีฤทธิ์ในธรรมชาติแต่การสังเคราะห์ไม่สามารถทำได้หมดทุกโมเลกุลสาร อีกทั้งต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูงและใช้งบประมาณลงทุนมาก ใช้เวลานาน ทำให้ยามีราคาแพงและการเข้าถึงยาก็เป็นไปได้ยาก ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีการศึกษาเลี้ยงฟองน้ำ เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยาและการแพทย์ (Osinga *et al*., 2001)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิจากฟองน้ำทะเลที่ได้รับการผลิตเป็นเวชภัณฑ์ขายในตลาดปัจจุบัน

Compound name	Chemical class	Trademark	Disease area
Cytarabine (Ara-C)	nucleoside	Cytosar-U®	leukemia
Eribulin Mesylate (E7389)	macrolide	Halaven®	Cancer: Metastatic Breast Cancer
Vidarabine (Ara-A)	nucleoside	Vira-A®	Antiviral: Herpes Simplex Virus
PM060184	polyketide	-	Cancer: Solid Tumors

ที่มา: Jha and Zi-rong (2004)

การเลี้ยงฟองน้ำเพื่อผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ การเลี้ยงฟองน้ำในสภาพธรรมชาติ การเลี้ยงในโรงเรือน การเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) และการเลี้ยงเซลล์ฟองน้ำ ซึ่งการเลี้ยงแต่ละแบบขึ้นอยู่กับชนิดของฟองน้ำ การเลี้ยงแบบธรรมชาติเป็นวิธีการเลี้ยงแบบดั้งเดิม เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้น เช่น ปัจจัยสภาวะแวดล้อมทั่วไป เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างและสารอาหาร เป็นต้น (Nikel *et al.,* 2001) 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) การเลี้ยงฟองน้ำ *Axinella corrugate* เพื่อผลิตสาร stevensin (Duckworth et al., 2003) เป็นต้น

การเลี้ยงฟองน้ำในสภาพธรรมชาติมักประสบปัญหาเกี่ยวกับผลผลิตไม่คงที่ เพราะไม่สามารถควบคุมการแปรเปลี่ยนของปัจจัยสภาพแวดล้อมได้ และต้องใช้พื้นที่จำนวนมากรวมทั้งปัญหาด้านสังคม จึงแก้ไขโดยการตัดเนื้อเยื่อฟองน้ำ (explant) นำมาเลี้ยงในโรงเรือนแทนการเลี้ยงฟองน้ำในโรงเรือนสามารถควบคุมปัจจัยสภาพแวดล้อมได้ง่าย (Mendola, 2003) สะดวกและมีประสิทธิภาพ ซึ่งฟองน้ำแต่ละชนิดต้องการปัจจัยดังกล่าวแตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่มักได้ข้อมูลจากการเลี้ยงฟองน้ำในสภาพธรรมชาติ ปัจจัยที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของฟองน้ำ ได้แก่

1. อากาศ (Air) : ไม่ควรให้ฟองน้ำสัมผัสหรือตากอากาศนานๆ เนื่องจากฟองน้ำมีรูพรุนทั่วร่างกาย รูพรุนนี้เป็นทางเดินน้ำภายใน หากอยู่ในสภาพตากแห้งนานๆ อากาศจะเข้าไปแทนที่น้ำในช่องทางเดินน้ำ ทำให้ช่อง choanocyte เสียหายได้ ดังนั้นเราจึงพบการตายของฟองน้ำหลังตากอากาศเป็นเวลานาน แต่ในฟองน้ำ

ที่เจริญบริเวณชายฝั่งน้ำตื้นอาจมีการปรับตัวต่อการตากอากาศในช่วงน้ำลงต่ำสุดได้ เช่นฟองน้ำ *Halichondria panicea* (Vethaak *et al*., 1982)

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

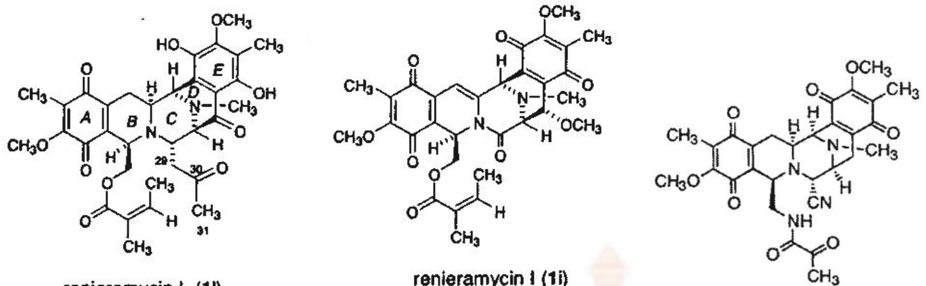
3. ความเค็มและอุณหภูมิ (Salinity and Temperature) : ปกติน้ำทะเลจะมีความเค็มโดยเฉลี่ย 35 ส่วนในพันส่วน (ppt) อุณหภูมิน้ำประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส (^{o}C) สิ่งมีชีวิตในทะเลทุกชนิดสามารถปรับตัวให้อยู่รอดที่ความเค็มและอุณหภูมิระดับนี้ ฟองน้ำมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มและอุณหภูมิแบบฉับพลันซึ่งทำให้เกิดการช็อก (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)

สาร Renieramycins (รูปที่ 2) ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นสารกลุ่มเตตร้าไฮโดรไอโซควิโนลีนอัลคาลอยด์ พบในฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xastospongia* sp. สายพันธุ์พบประเทศไทย ฟองน้ำชนิดนี้พบทั้งในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับสาร saframycin ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็งในปัจจุบัน (Perdicaris *et al*., 2013) สาร renieramycins บางอนุพันธ์กำลังได้รับการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ จึงเป็นที่ต้องการของบริษัทผลิตยา เพื่อศึกษาขั้นคลินิกและตอบสนองความต้องการของตลาดในอนาคต ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการสังเคราะห์สารดังกล่าว การเลี้ยงฟองน้ำชนิดนี้เพื่อผลิตสาร renieramycins จึงมีความจำเป็น



renieramycin L (1l) renieramycin I (1i) Saframycin A (1)

รูปที่ 1 โครงสร้างสาร renieramycins และ saframycin

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบปัจจัยเหนี่ยวนำให้ฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xastosporgia* sp. ผลิตสารต้านมะเร็ง renieramycins ได้ปริมาณสูงสุด

2. ได้สารต้านมะเร็ง renieramycins

3. ได้แนวทางการเลี้ยงฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน เพื่อผลิตสารต้านมะเร็ง renieramycin เชิงพาณิชย์

4. ได้เอกสารตีพิมพ์ เผยแพร่

5. หน่วยงานที่นำไปใช้ประโยชน์ได้แก่ กรมประมง หน่วยงานการศึกษาวิจัยด้าน การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ บริษัทเอกชนผู้ประกอบการด้านสัตว์น้ำและสารเคมีหรือเวชภัณฑ์

หน่วยงานที่นำการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.หน่วยงานการศึกษา ค้นคว้าวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การประมงและเกษตรศาสตร์

2.หน่วยงานการศึกษาระดับมหาวิทยาลัยและหน่วยงานวิจัยอื่นๆ

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

1.1 การเตรียมบ่อพักฟื้น

- ใช้บ่อซิเมนต์พักพื้นขนาด 2.5×4×1 เมตร สูบน้ำทะเลสดใส่ในบ่อประมาณ ร้อยละ 60 เติมลมด้วยหัวทรายเป็นเวลา 1 วัน เพื่อให้มีออกซิเจนในปริมาณมากเกินพอ

- ใช้ตัวอย่างฟองน้ำจากการเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ ณ หาดราชมงคล จังหวัดตรัง โดยการตัดเก็บ 1 ใน 4 ของโคโลนีทั้งหมดใส่ในถังขนส่ง ซึ่งด้านในมีน้ำปรับสภาพเช่นเดียวกับในบ่อพักฟื้น ทำการเลี้ยงฟองน้ำในบ่อพักฟื้นเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีการเปลี่ยนน้ำทุกวันๆละ 50 %

1.2 การเตรียมวัสดุยึดเกาะ (substrate)

เตรียมแท่งซีเมนต์ทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร และตาข่ายพลาสติกขนาด 5x5 เซนติเมตร ทำชุดเลี้ยงในแนวดิ่ง (รูปที่ 2)

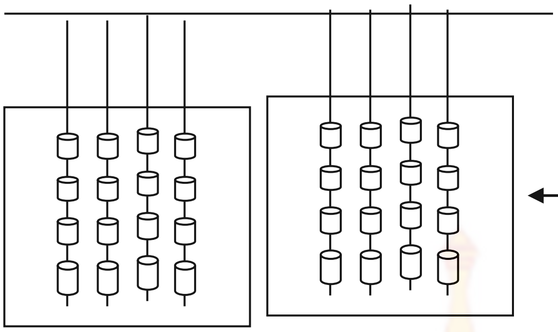
รูปที่ 2 วัสดุยึดเกาะและลักษณะการประกอบเพื่อทำชุดเลี้ยงในแนวดิ่ง

1.3 การเตรียมชิ้นส่วนฟองน้ำ

ตัดฟองน้ำให้มีขนาด 2×2 เซนติเมตร โดยทำการวัดและตัดในน้ำไม่ให้ฟองน้ำสัมผัสอากาศ เพราะอากาศจะเข้าไปอุดตันระบบไหลเวียนน้ำภายใน เป็นเหตุให้ฟองน้ำตายได้ จากนั้นทำการยึดชิ้นฟองน้ำให้เข้ากับวัสดุยึดเกาะ จำนวน 3 ชิ้นต่อวัสดุยึดเกาะ 1 ก้อน โดยใช้ลวดขนาดเล็ก

2. วิธีการเลี้ยงฟองน้ำ

ใช้วิธีการเลี้ยงแบบแขวน (long line method) ในถังไสขนาด ขนาด1 ตัน (ดัดแปลงจากวิธีของ Duckworth,2009) หนึ่งเส้นประกอบด้วยแท่งซิเมนต์ 4 ก้อน (รูปที่ 3และ 4) นับเป็น 1ชุด เลี้ยงจำนวน 3 ชุดต่อถัง โดยเลี้ยงในระบบเปิดถ่ายน้ำออกจากตู้เลี้ยงประมาณ 500 มิลลิลิตรต่อนาที (ml/min)



รูปที่ 3 แบบจำลองของหน่วยทดลอง

3. การออกแบบการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD กำหนด 2 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ (Temperature) และปริมาณซิลิเกตละลายน้ำ (Dissolve Silicate) 3 ทรีทเม้น โดยใช้การเลี้ยงในน้ำทะเลสดเป็นกลุ่มควบคุม โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 4 ซ้ำ (การวางแผนอาจเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับการทำ preliminary

4 การประเมินการเจริญเติบโต (Growth assessment)

โดยการชั่งน้ำหนักโคโลนีทั้งน้ำหนักเปียกและแห้ง ทั้งก่อนและสิ้นสุดการเลี้ยง การชั่งน้ำหนักแห้งทำโดยดึงน้ำออกจากเซลล์ฟองน้ำด้วยเครื่อง Freeze dryer ก่อนชั่ง ทำการชั่ง เดือนละครั้งกำหนดเวลาเลี้ยง 12 เดือน

5 การวิเคราะห์ปัจจัยสภาวะแวดล้อม

วิเคราะห์ปัจจัยทางกายภาพและเคมีของน้ำทะเลที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของฟองน้ำ ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง (pH) อุณหภูมิ ความเค็ม วิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ Multiprobe analyser YSI 556 ส่วนความเค็มวัดโดย reflecto salinometerปริมาณซิลิกา วิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานที่เสนอไว้คู่มือการวิเคราะห์น้ำทะเล (method of sea water analysis) โดย Stricland and Parson (1972)

6 การวิเคราะห์ปริมาณสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

แบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านมะเร็ง (renieramycins) ใช้วิธีของ Suwanborirux *et al.* (2003) โดยบดฟองน้ำตัวอย่างให้ละเอียดเติมสารละลายโพแทสเซียมไซยาไนด์จนชุ่ม จากนั้นสกัดด้วยเมทานอล เป็นเวลา 72 ชั่วโมง กรองแยกเอากากออก ระเหยส่วนที่เป็นของเหลวด้วยเครื่องลดความดัน จะได้ส่วนสกัดเรียกว่า aqueous methanol ซึ่งจะถูก partition ด้วยไดคลอโรมีเทนและบิวทานอลตามลำดับ สารละลายสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนและบิวทานอลจะถูกระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยลดความดัน ได้สิ่งสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทนและบิวทานอล ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC

การวิเคราะห์สิ่งสกัดหยาบด้วยวิธี HPLC (Dionex Ultimate 3000)

ละลายสิ่งสกัดหยาบด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 0.1 mg/ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลววิเคราะห์ด้วย HPLC ใช้คอลัมน์ RP-18 กำหนดอุณหภูมิ

คอลัมน์เท่ากับ 25 °C ระบบเฟสเคลื่อนที่ใช้เมทานอลและน้ำ (โปรแกรมตามตารางที่ 2) 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

ตารางที่ 2 โปรแกรมระบบเฟสเคลื่อนที่สำหรับวิเคราะห์สารด้วย HPLC

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

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการวิจัย

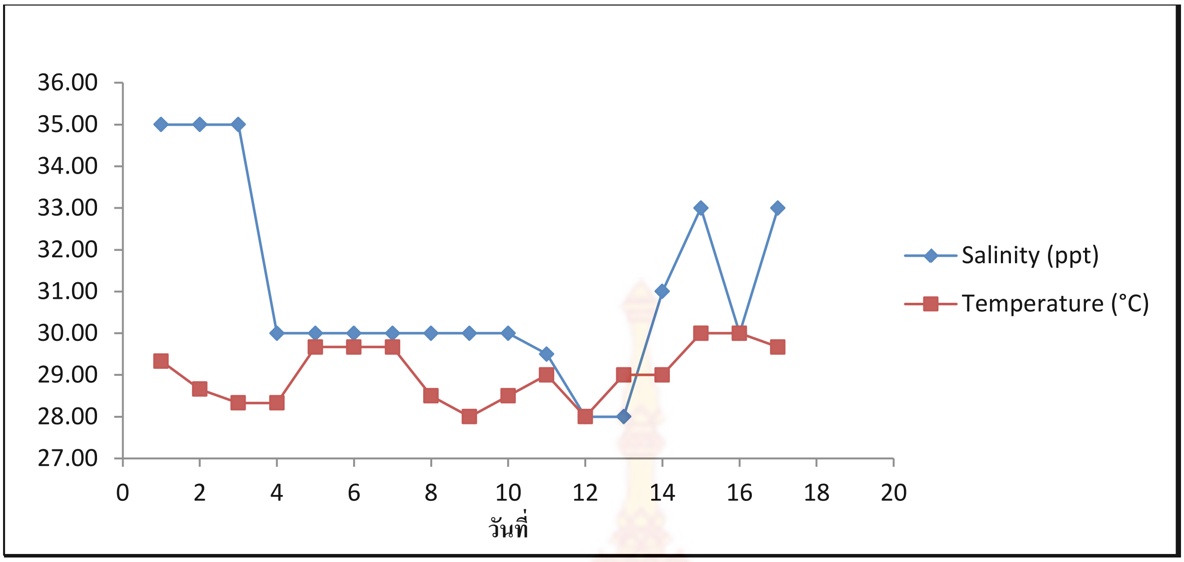
ตอนที่ 1 การเก็บและอนุบาลฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. สายพันธุ์พ่อแม่

เก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลจำนวน 7 โคโลนี แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ใช้เลี้ยงในโรงเรือน (รูปที่ 4) ซึ่งจะถูกใส่ในลังโฟมที่ติดตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิ และส่วน 2 ใช้ในการวิเคราะห์การสร้างสาร renieramycins โดยการตัดจากโคโลนีพ่อแม่ ใส่รหัสให้ตรงกันกับตัวอย่างที่ใช้เลี้ยงใส่ถุงซิปปิดสนิทรักษาตัวอย่างในตู้แช่แข็ง

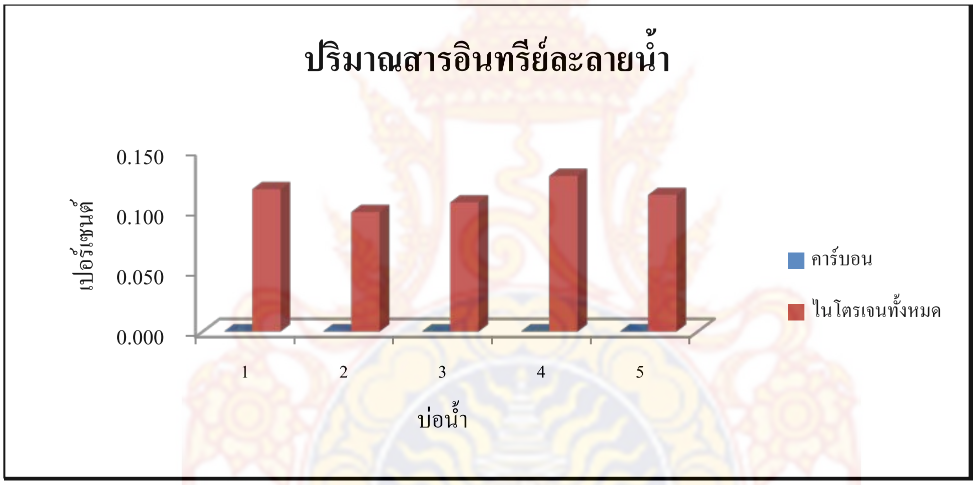
รูปที่ 4 การเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเล
(ก) ตัวอย่างสำหรับการเลี้ยงในบ่ออนุบาล (ข) ตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์การสร้างสาร

ตัวอย่างที่ใช้ในการเลี้ยงทั้งจำนวน 7 ตัวอย่าง ถูกพักฟื้นในบ่อซิเมนต์อนุบาลใส่ในตะกร้าที่มีวัสดุยึดเกาะแขวนลอยในบ่ออนุบาล (รูปที่ 5) เปลี่ยนน้ำทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 17 สัปดาห์ มีการตรวจวัดความเค็ม อุณหภูมิ (รูปที่ 6) และปริมาณสารอินทรีย์ละลายน้ำ (รูปที่ 7)

รูปที่ 5 การพักฟื้นฟองน้ำทะเลในบ่อพักน้ำ



รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของความเค็มและอุณหภูมิในรอบวันในบ่อพักฟื้น



รูปที่ 7 ปริมาณสารอินทรีย์ละลายน้ำ

ค่าของความเค็มน้ำในบ่ออนุบาลอยู่ในช่วง 28-35 ppt ซึ่งในช่วงหน้าร้อนน้ำจะมีการระเหยทำให้ค่าความเค็มสูง และในบางครั้งความเค็มในบ่ออนุบาลจะลดลงเนื่องจากน้ำที่สูบเติมในระบบอนุบาลมีการปนเปื้อนน้ำจืดจากแม่น้ำจาก 35 ppt เป็น 30 ppt

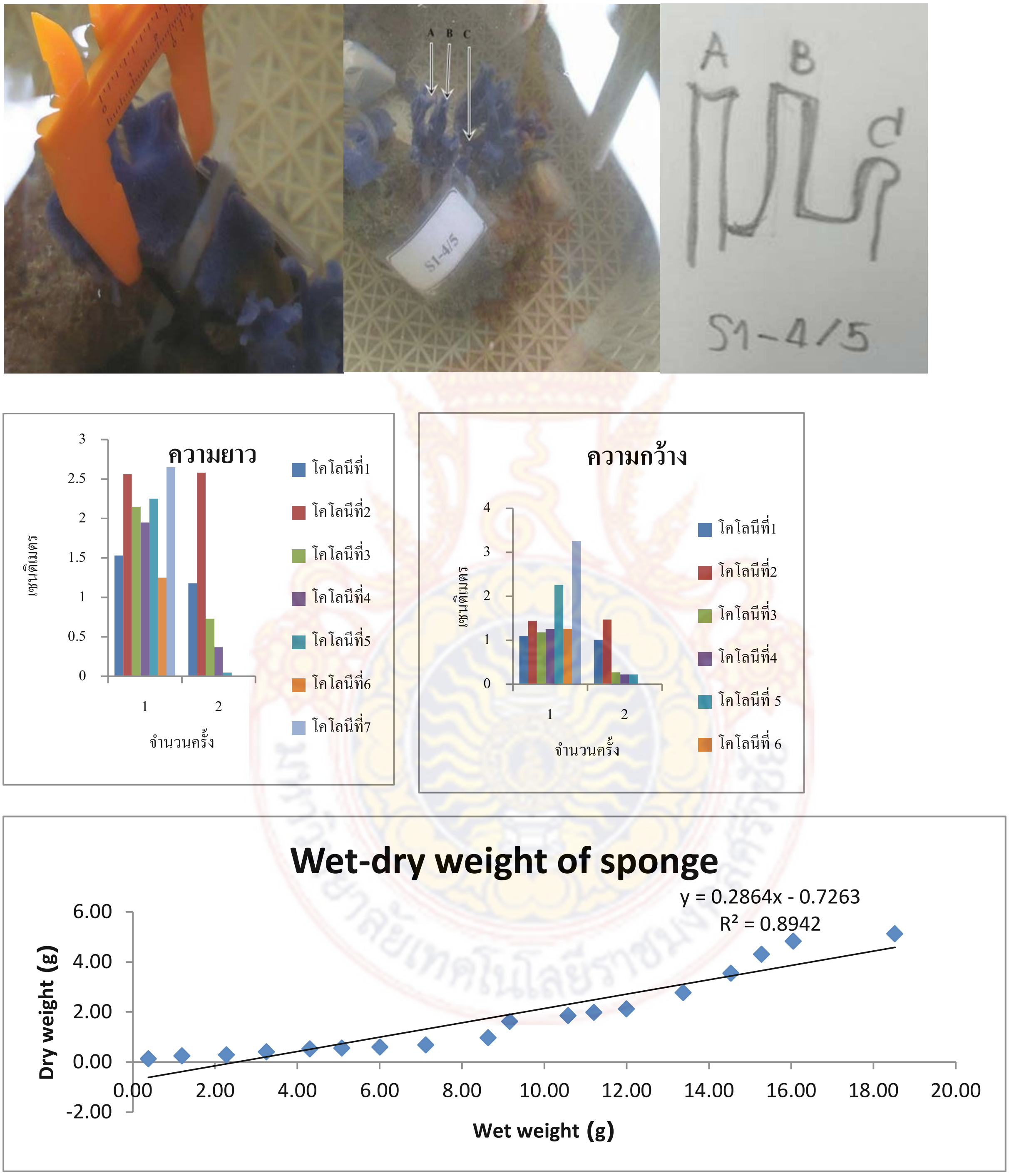
ค่าของอุณหภูมิในบ่ออนุบาลอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงไปตามรอบวันขึ้นอยู่กับสภาวะของอากาศ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในรอบวันส่งผลให้ฟองน้ำมีสีจางและเริ่มตาย

ปริมาณสารอินทรีย์ละลายน้ำนั้นพบว่ามีคาร์บอน 0% ส่วนค่าไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.099-0.129 เปอร์เซ็นต์

<u>การประเมินการเจริญเติบโต</u>

การวัดการเจริญเติบโต ทำ 2 วิธี ได้แก่ การวัดขนาดและการวัดน้ำหนักเปียก ซึ่งจะถูกนำไปเปรียบเทียบหาน้ำหนักแห้งจากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 8)

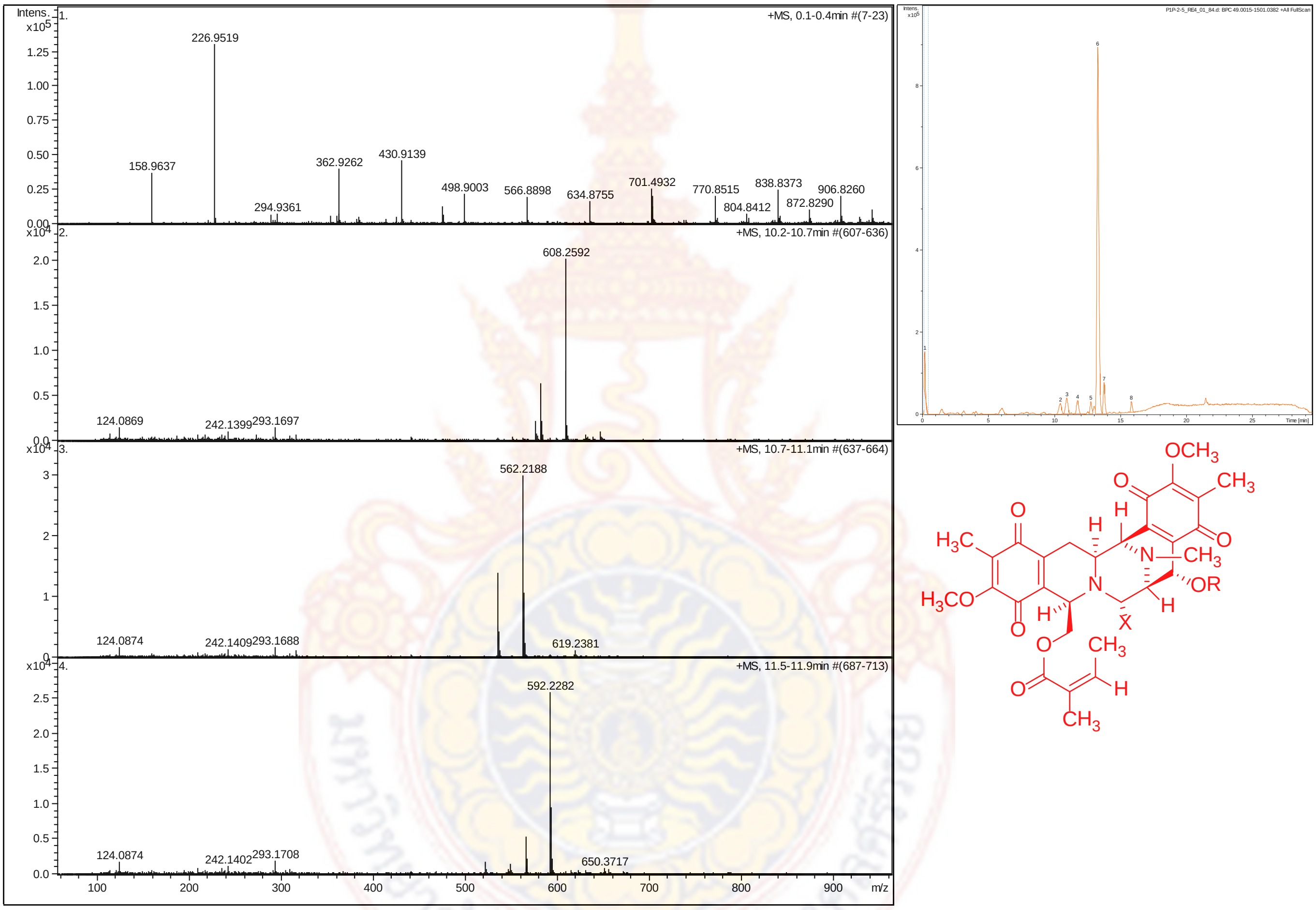
การวัดขนาดทำโดยการวัดความกว้างและความยาวทะเลสีน้ำเงินทุกๆ 2 สัปดาห์ ควบคู่ไปกับการวาดรูปประกอบของโคโลนีฟองน้ำที่มีการงอกใหม่ขึ้นมา (รูปที่ 8) เมื่อทำการเปรียบเทียบการเติบโตครั้งแรกและครั้งที่ 2 พบว่า มีการตายของฟองน้ำเพิ่มขึ้น เนื่องจากปัจจัยของความเค็มและอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบฉับพลัน ทำให้ฟองน้ำปรับตัวไม่ทันจึงเกิดการช็อค (shock) และมีการตายเกิดขึ้น ภายหลังจากการตายจะมีการสลัดสีออกมาก่อน ต่อมามีกลิ่นเหม็นและตายภายใน 24 ชั่วโมง



รูปที่ 8 การประเมินการเจริญเติบโตในบ่ออนุบาลโดยเทคนิคการวัดและเทียบน้ำหนัก

การตรวจวิเคราะห์สาร renieramycins ของฟองน้ำสายพันธุ์พ่อแม่

เมื่อทำการวิเคราะห์สาร renieramycins ในสายพันธุ์ พ่อแม่โดยเทคนิค LCMS หรือ HPLCMS พบสาร renieramycins มากกว่า 4 อนุพันธ์ ได้แก่ renieramycins m,n,Q,J ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นอนุพันธุ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้งนั้น โดยเฉพาะสารอนุพันธุ์ mมีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ผลการวิเคราะห์สาร RM โดยใช้เครื่องมือ Liquid Chromatography mass spectrometry (LCMS) ของสายพันธุ์แม่ในธรรมชาติ มีศักยภาพในการสร้างสารต้านมะเร็ง renieramcins ได้หลายอนุพันธ์ได้แก่ m,n,j (รูปที่ 9)

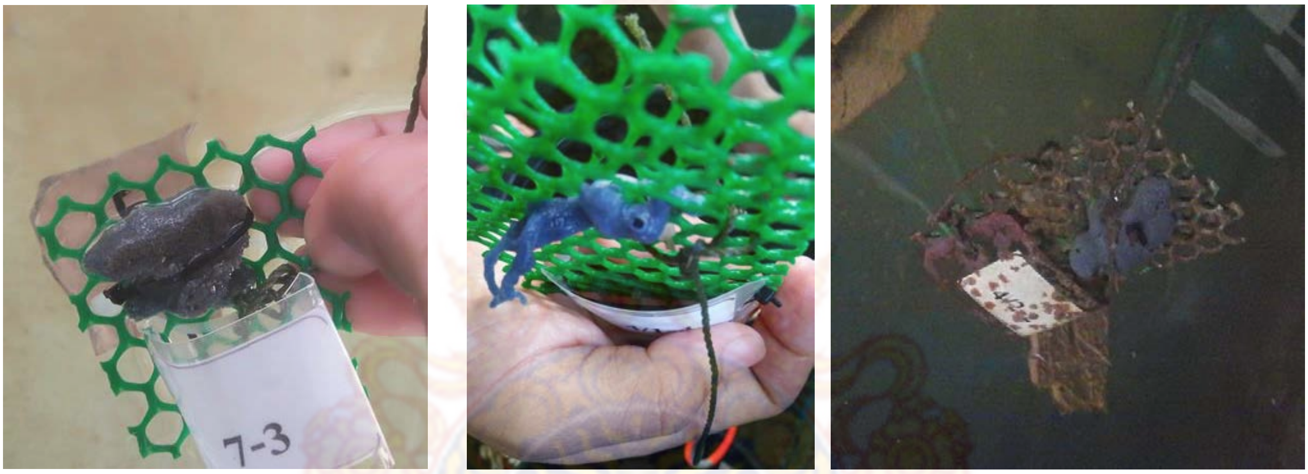


รูปที่ 9 การวิเคราะห์สาร RM โดยใช้เครื่องมือ Liquid Chromatography mass spectrometry (LCMS)

ตอนที่ 2 การเลี้ยงฟองน้ำเพื่อผลิตสาร reniermycins ในถังเลี้ยงต่างชนิดกัน

จากการทดลองเบื้องต้น (preliminary study) ในบ่อพักฟื้นและเก็บผลการวิเคราะห์ พบว่าปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต คือ อุณหภูมิน้ำ ความเข้มแสง ส่วนฟองอากาศในน้ำทำให้ฟองน้ำตายแบบกระทันหัน จากการทดลองหาวัสดุยึดเกาะ พบว่าฟองน้ำยึดเกาะกับแท่งซิเมนต์ได้ช้าและน้อยมาก ยิ่งไปกว่านั้นอัตราการเจริญเติบโตก็ช้า ในทางตรงกันข้าม ฟองน้ำกลับยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีกับแผ่นพลาสติก ดังนั้นจึงเลือกตาข่ายพลาสติกเป็นวัสดุยึดเกาะแทนแท่งซิเมนต์ ซึ่งมีราคาแพงกว่าและติดตั้งในระบบทำได้ยาก

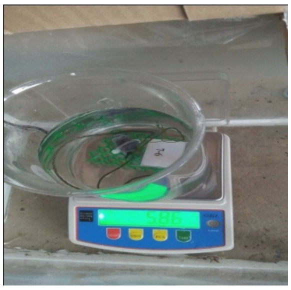
เมื่อผนวกข้อมูลทั้งหมดพบว่ามีความจำเป็นต้องเลือกภาชนะในการเลี้ยงให้เหมาะสม โดยคำนึงถึงอุณหภูมิและปริมาณแสงเป็นหลัก จึงเลือกภาชนะที่ทำจากวัสดุ 3 ชนิด ได้แก่ แก้ว พลาสติก และโฟม โดยออกแบบการเลี้ยงแบบน้ำไหลผ่านตลอด (รูปที่10) ทำการเลี้ยง 35 วัน เก็บข้อมูล การเจริญเติบโต คุณภาพน้ำและปริมาณการสร้างสาร renieramycins ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปสู่การเลี้ยงในภาชนะที่ถูกต้องต่อไป เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's Test และวิธี Duncan’s multiple range test

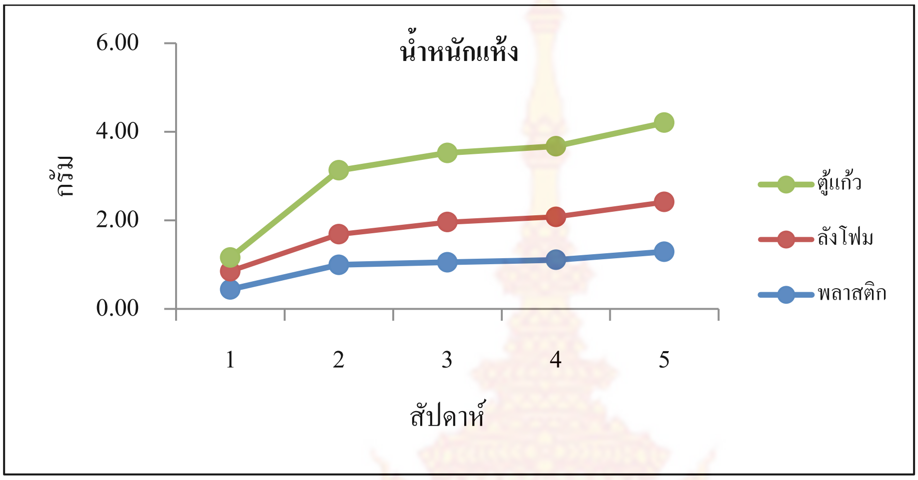


รูปที่ 10 การเตรียมตัวอย่างสำหรับเลี้ยงในระบบทดลอง

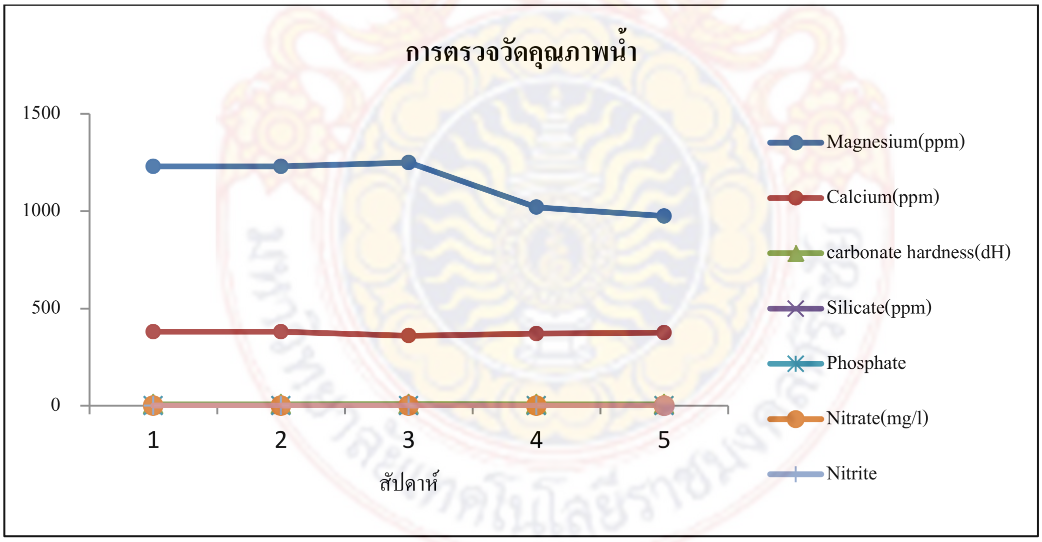
ทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโตและวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ ความเค็ม อุณหภูมิในอากาศ อุณหภูมิในน้ำ และความเป็นกรด-ด่างทุกๆวัน ตรวจวัดปริมาณฟอสเฟต ความกระด้างของคาร์บอเนต ปริมาณไนไตรท์ ไนเตรท แอมโมเนีย แคลเซียม แมกนีเซียม และปริมาณซิลิกา ทุกๆสัปดาห์ (รูปที่ 12) ผลการทดลองพบว่าฟองน้ำที่เลี้ยงในตู้แก้วมีดารเจริญเติบโตดีที่สุด (รูปที่ 11) รองลงมาคือกล่องพลาสติกและลังโฟม ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำพบว่าทุกพารามิเตอร์อยู่ในระดับต่ำกว่าความเป็นพิษ ยกเว้นอุณหภูมิช่วงระว่างวันที่ 4 มีการเปลี่ยนแปลงในรอบวันค่อนข้างมาก โดยตู้แก้วมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำมากที่สุด คือช่วง 27°C - 34°C

ผลการวิเคราะห์สาร renieramycins โดยใช้เครื่อง LCMS พบว่าฟองน้ำมีการสร้างสาร renieramycins M สูงสุด (รูปที่ 14)

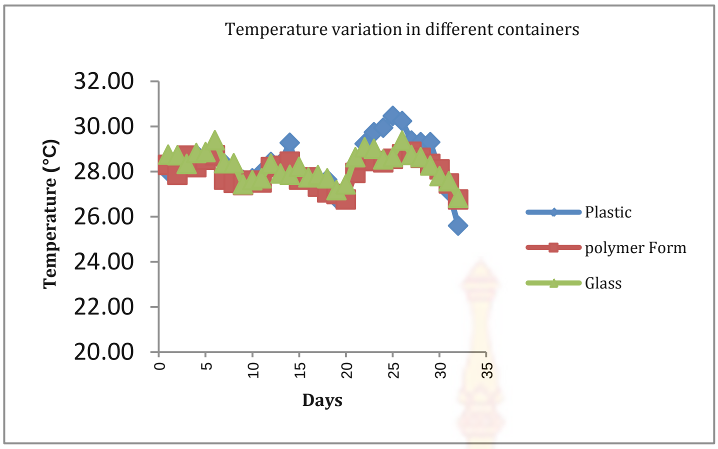




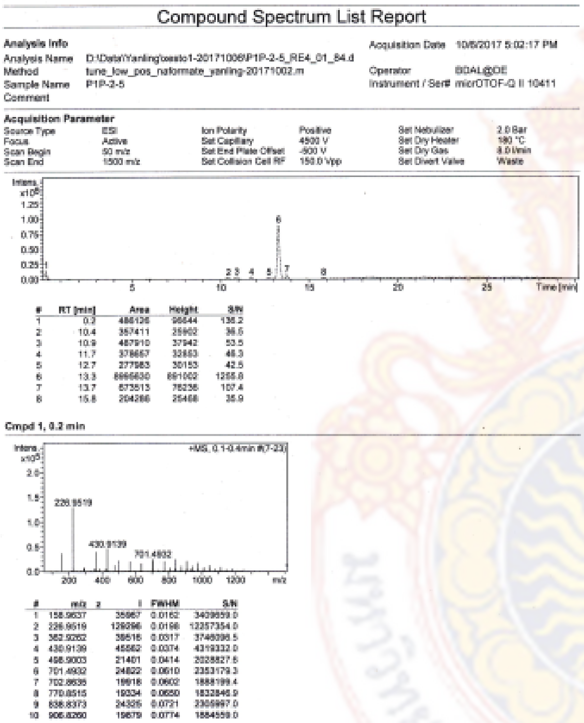
รูปที่ 11 การเจริญเติบโตของฟองน้ำในภาชนะทั้ง 3 ชนิด



รูปที่ 12 การตรวจสอบคุณภาพน้ำในระบบการทดลอง



รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในถังเลี้ยงทั้ง 3ชนิด



Compound Spectrum List Report

Analysis Info		Acquisition Date	10/6/2017 5:02:17 PM
Analysis Name	D:\Data\Yanling\oasto1-20171006\P1P-2-5_RE4_01_84.d		
Method	tune_low_pos_naformate_yanling-20171002.m	Operator	BDAL@DE
Sample Name	P1P-2-5	Instrument / Ser#	micrOTOF-Q II 10411
Comment			

Acquisition Parameter

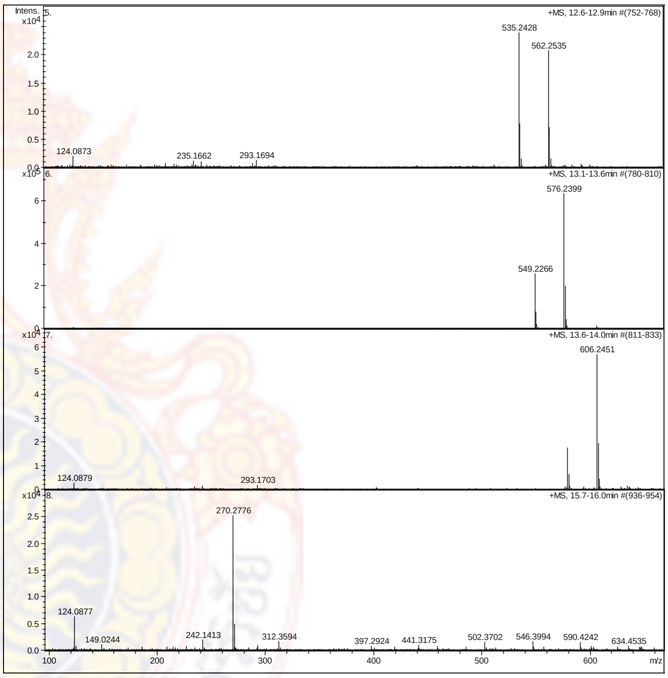
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	2.0 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Collision Cell RF	150.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

#	RT [min]	Area	Height	S/N
1	0.2	486126	96644	135.2
2	10.4	357411	25902	36.5
3	10.9	487910	37942	53.5
4	11.7	378657	32853	46.3
5	12.7	277983	30153	42.5
6	13.3	8866630	891002	1255.8
7	13.7	873513	76236	107.4
8	15.8	204266	25468	35.9

Cmpd 1, 0.2 min

+MS, 0.1-0.4min #(7-23)

#	m/z	z	I	FWHM	S/N
1	158.9637		35967	0.0162	3409859.0
2	226.9519		129396	0.0198	12257354.0
3	362.9262		39516	0.0317	3746396.5
4	430.9139		45562	0.0374	4319332.0
5	498.9003		21401	0.0414	2028827.6
6	701.4932		24822	0.0610	2353179.3
7	702.8636		19918	0.0602	1888199.4
8	770.8515		19334	0.0650	1832846.9
9	838.8373		24325	0.0721	2305997.0
10	906.8260		19879	0.0774	1884559.0



รูปที่ 14 การวิเคราะห์สารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิ reniermycins โดย เครื่อง HPLCMS

วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการเลี้ยงฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. ในบ่อพักฟื้นพบว่า อุณหภูมิน้ำและปริมาณแสงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและสร้างสาร renieramycins เมื่อนำมาเลี้ยงในภาชนะที่แตกต่างกัน พบว่า ตู้แก้วให้การเจริญเติบโตมากที่สุด รองลงมาคือกล่องพลาสติกและลังโฟม เนื่องจากตู้แก้วมีลักษณะโปร่งแสง แสงสามารถส่องผ่านได้ทุกทิศทาง แต่ภาชนะอื่นๆ แสงเข้าได้เพียงทางเดียวคือด้านบน แสงมีความจำเป็นต่อการอยู่รอดของฟองน้ำเพราะสิ่งมีชีวิตอาศัยร่วมสามารถสังเคราะห์แสงสร้างอาหาร ซึ่งจะถูกขับออกมาเป็นสารอินทรีย์ให้ฟองน้ำกินเป็นอาหารอีกทอดหนึ่ง นอกจากนี้แสงยังส่งผลต่อเซลล์ฟองน้ำโดยตรง โดยฟองน้ำแต่ละชนิดต้องการความเข้มแสงและความยาวคลื่นแสงต่างกัน ขึ้นอยู่กับรงควัตถุภายใน กรณีฟองน้ำทะเล *Xestospongia* sp. มีรงควัตถุสีฟ้าสามารถดูดกลืนแสงในช่วงแสงยูวี (320-400 nm) ดังนั้นหากแสงไม่พอจะมีการสลัดรงควัตถุออกก่อนจากนั้นตัวจะซีดขาวและตายในที่สุด

การตรวจวัดปัจจัยคุณภาพน้ำเบื้องต้นได้แก่ ความเค็ม อุณหภูมิในอากาศ อุณหภูมิในน้ำและความเป็นกรด-ด่างทุกๆวัน ตรวจวัดปริมาณฟอสเฟต ความกระด้างของคาร์บอเนต ปริมาณไนไตรท์ ไนเตรท แอมโมเนีย แคลเซียม แมกนีเซียม และปริมาณซิลิกา สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในระยะเวลา 1 เดือน ผลการวิเคราะห์ดังนี้

ตารางที่ 3 การตรวจวัดปัจจัยคุณภาพน้ำเบื้องต้น

พารามิเตอร์	ค่าที่วัดได้
ความเค็ม (ppt)	25-31
อุณหภูมิในอากาศ(°C)	26-32
อุณหภูมิในน้ำ (°C)	27-31
ความเป็นกรด-ด่าง	7.80-8.40
ฟอสเฟต (ppm)	0.00
ความกระด้างของคาร์บอเนต (dH)	7-8
ไนไตรท์ (ppm)	0.00
ไนเตรท (mg/l)	0.00
แอมโมเนีย (mg/l)	0.25
แคลเซียม (ppm)	360-380
แมกนีเซียม (ppm)	975-1230
ซิลิกา (ppm)	0.00

ลังโฟมสามารถเก็บรักษาอุณหภูมิได้ดีที่สุดเพราะมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงที่แคบ รองลงมาคือกล่องพลาสติกและตู้แก้วตามลำดับ สำหรับตู้แก้วมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงกว้าง ภาชนะทั้ง 3 ชนิด มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำ โดยจะแปรผันตรงกับอุณหภูมิของอากาศ หากฝนตกอุณหภูมิก็จะลดต่ำ แต่ในทางกลับกันในวันที่อากาศร้อนอุณหภูมิในภาชนะก็จะเพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นกัน

กรณีที่อุณหภูมิ ฟองน้ำเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 27 ℃ - 30 ℃ และเริ่มตายที่อุณหภูมิ 31 ℃ ฟองน้ำเป็นสัตว์ไม่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงกว้าง การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจนเกินขีดทนทาน ฟองน้ำจะแสดงอาการช็อค (shock) โดยการสลัดสีออกและตายอย่างรวดเร็ว แต่หากอุณหภูมิเปลี่ยนในช่วงแคบจะส่งผลดีต่อการสร้างสาร renieramycin m เพราะฟองน้ำมีการปรับตัวโดยการกระตุ้นเซลล์ให้สร้างสารและสะสมสารมากขึ้น ดังนั้นปัจจัยกระตุ้นการสร้างสาร จึงน่าจะเป็นอุณหภูมิ แต่ต้องไม่เกินจุดสมดุล เมื่อพิจารณามีปัจจัยคุณภาพน้ำชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 3) พบว่า ทุกพารามิเตอร์อยู่ในระดับต่ำกว่าค่าที่เป็นพิษต่อฟองน้ำ ดังนั้นการตายของฟองน้ำและปริมาณการสร้างสาร renieramycins ไม่มีความเกี่ยวข้องกับคุณภาพน้ำดังกล่าว

สรุป

1. จากการทดลองในปีที่ 1 พบว่าฟองน้ำเจริญเติบโตและสร้างสาร renieramycins ได้ดีในที่มีแสงและอุณหภูมิที่เหมาะสม (27 ℃-30 ℃)

2. การวิจัยตอบจุดประสงค์ข้อ 1 และ 2 ในโครงการได้

3. สามารถพัฒนาการเลี้ยงและคัดเลือกสายพันธุ์ได้เป็นผลสำเร็จ ซึ่งอยู่ในขั้นตอนการวิจัยด้าน molecular biology ต่อเนื่อง เพื่อหาคุณลักษณะสายพันธุ์และขึ้นทะเบียนลิขสิทธิ์สายพันธุ์

4. จากข้อมูลวิจัยในปีที่ 1คาดว่าจะวิจัยต่อเนื่องและสามารถบรรลุวัตถุประสงค์ข้อ3 และ 4 ได้

เอกสารอ้างอิง

Caralt S., Agell G., and Uriz M.J. 2003. Long-term culture of sponge explants: conditions enhancing survival and growth, and assessment of bioactivity. **Biomolecular Engineering**. 20, 339-347.

Duckworth A. 2009. Farming Sponges to Supply Bioactive Metabolites and Bath Spongrs: A Review. **Marine Biotechnology**. 11, 669-679.

Duckworth A.R., Sample G.A., Wright A.E., and Pomponi S.A. 2003. In Vitro Culture of Tropical Sponge Axinella corrugate (Demospongiae): Effect of Food Cell Concentration on Growth, Clearance Rate, and Biosynthesis of Stevensine. **Marine Biotechnology**. 5, 519-527.

Hanson J. 2003. **Natural products: secondary metabolites**.The royal Society of Chemistry. Northampton UK. 147 p.

IARC. 2014. **World cancer factsheet**. World Health Organization. 1-4.

Mendola D. 2003. Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economics. **Biomolecular Engineering**. 20, 441-458.

Nickel M., Leininger S., Proll G., and Brummer F. 2001. Comparative studies on two potential methods for the Biotechnological production of sponge biomass. **Journal of Biotechnology**. 92, 169-178.

Osinga R., Beukelaer P.B., Meijer E.M., Tramper J., and Wijffels R.H. 1999. Growth of the sponge *Pseudosuberites* (aff.) *andrewsi* in a closed system. **Journal of Biotechnology**. 70, 155-161.

Osinga R., Kleijn R., Groenendijk E., Niesink P., Tramper J., and Wijffels R.H. 2001. Development of in Vivo Sponge Cultures: Particle Feeding by the Tropical Sponge *Pseudosuberites* aff. *andrewsi*. **Marine Biotechnology**. 3, 544-554.

Perdicaris S., Vlachogianni T., and Valavanidis A. 2013. Bioactive Natural Substances from Marine Sponges: New Developments and Prospects for Future Pharmaceuticals. **Natural Products Chemistry and Research**. 1:3-12.

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. **Journal of Natural Products**. 66:1441-1446.