P-ISSN 0858-4435
E-ISSN 2651-1231

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj
ปีที่ 30 ฉบับที่ 3 (พฤษภาคม-มิถุนายน 2565) หน้า [73-89]

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหา ในการยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเล

Efficacy of Soft Corals and Sea Fan Extracts for Inhibition of Marine Bacteria Attachment

พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธ์[1,*], อรรถวุฒิ กันทะวงศ์[2], ฤทธิรงค์ พรหมมาศ[1]

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

[2]สถานีวิจัยประมงศรีราชา คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ชลบุรี 20110

Puntip Wisespongpand[1,*], Attawut Khantavong[2], Ritthirong Prommas[1]

[1]Department of Marine Science, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900

[2]Sriracha Fisheries Research Station, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Chonburi 20110

Received 24 February 2022; Received in revised 1 April 2022; Accepted 21 April 2022

บทคัดย่อ

การเกาะติดของแบคทีเรียที่ผิวหน้าของวัตถุต่าง ๆ ในน้ำเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการลงเกาะในทะเล ซึ่งส่งผลกระทบต่อตัวสิ่งมีชีวิตและอุตสาหกรรมทางทะเล และได้มีการใช้สารเคมีที่เป็นพิษในการป้องกันการลงเกาะในอุตสาหกรรมทางทะเล จึงมีความต้องการสารต้านการลงเกาะจากธรรมชาติที่ปลอดภัยมาเพื่อใช้ทดแทน การศึกษานี้ได้ทำการคัดเลือกสารต้านการลงเกาะจากปะการังอ่อน 9 ชนิด และกัลปังหา 18 ชนิด โดยใช้วิธีการยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเล 4 สายพันธุ์ที่แยกจากผิวหน้าของปะการังอ่อนและกัลปังหา และจากน้ำทะเลในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง พบว่าสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหายับยั้งการลงเกาะแบคทีเรียทะเลได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกาะติดแบคทีเรียได้ดีและในวงกว้างมี 17 สาร คิดเป็นร้อยละ 62.96 สารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงโดยมีร้อยละของการยับยั้งการเกาะติดระหว่าง 80.31-94.47 ได้แก่ สารสกัดจากปะการังอ่อน *Chironepthya* sp., *Sarcophyton* sp. สารสกัดจากกัลปังหา *Dichotella* sp.1 และ sp.3, *Rumphella* sp.1 และ sp. 2, *Juncella* sp.3 และ sp.4, *Subergorgia* sp. และ Unidentified sea fan 1 โดยมีเพียงสารสกัดจากปะการังอ่อน *Sarcophyton* sp. และกัลปังหา *Rumphella* sp.1 และ sp.2 ที่แสดงความเป็นพิษต่อปลาสอดแบบเฉียบพลัน ทั้งนี้ประสิทธิภาพของการยับยั้งการเกาะติดแบคทีเรียทะเลขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด ในขณะที่ความเข้มข้นของสารสกัดในเนื้อเยื่อไม่มีความสัมพันธ์ต่อการยับยั้งการเกาะติดแบคทีเรียทะเล การศึกษานี้สามารถคัดเลือกปะการังอ่อนและกัลปังหาในน่านน้ำไทยที่เป็นแหล่งของสารยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นสารยับยั้งการลงเกาะที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมต่อไป

คำสำคัญ: ปะการังอ่อน; กัลปังหา; การต้านการลงเกาะ; การเกาะติดของแบคทีเรีย

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** ffisptp@ku.ac.th

doi: 10.14456/tstj.2022.34

Abstract

The bacterial attachment on the surface of the substrate is the initial step of biofouling in the marine environment, which causes issues for aquatic organisms and the marine industry. In the marine industry, hazardous substances have been utilized as antifouling agents. As a result, safe natural antifoulants are required to replace it. In this study, the screening for natural antifoulants was carried out from 9 soft corals and 18 sea fans. The extracts were tested against four marine bacteria isolated from soft coral and sea fan surfaces and sympatric seawater by means of inhibition of marine bacteria attachment. The results showed that the bacterial inhibitory attachment of the extracts against marine bacteria was significantly different ($p<0.05$). The effective extracts that inhibit bacterial attachment well and broadly were screened for 17 extracts (62.96%). The practical inhibitory activities against marine bacteria (80.31-94.47%) were obtained from the extracts of soft coral *Chironepthya* sp., *Sarcophyton* sp.; from sea fans *Dichotella* sp.1 and sp.3; *Rumphella* sp.1 and sp. 2; *Juncella* sp.3 and sp.4; *Subergorgia* sp., and unidentified sea fan 1. Among those extracts, only the extracts from soft coral *Sarcophyton* sp. and sea fans *Rumphella* sp.1 and sp.2 showed acute ichthyotoxicity against red swordtail fish. The inhibitory effect of the extracts on marine bacteria attachment varied depending on the strains of marine bacteria and their different chemical compositions. Meanwhile the inhibitory efficacy of the extracts was not related to the tissue's concentration. These results indicated that soft corals and sea fans in Thai waters are essential for effective marine bacteria attachment inhibitors in developing as environmentally-friendly antifoulants.

Keywords: Soft coral; Sea fan; Antifouling; Bacteria attachment

1. บทนำ

วัตถุใดๆ ก็ตามเมื่อจมลงสู่น้ำทะเลจะมีกระบวนการลงเกาะของสิ่งมีชีวิต (biofouling) เกิดขึ้นโดยทันที ซึ่งกระบวนการลงเกาะจะเริ่มจากการดูดซึมสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (biopolymer) จากในน้ำมาไว้ที่ผิวหน้า ส่งผลให้เกิดแรงทางกายภาพและเคมีที่เหนี่ยวนำให้มีการลงเกาะของสิ่งมีชีวิตกลุ่มแรกสุด คือ แบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียลงเกาะจะมีการสร้าง ไบโอฟิล์ม (biofilm) ที่ผิวหน้า [1,2] ซึ่งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียที่ผิวหน้าประกอบด้วย 4 ขั้นตอนต่อเนื่อง คือ การดูดซับ (adsorption) การเกาะติด (attachment) การเจริญเติบโต (growth) และการหลุดออกจากผิวหน้าบางส่วน (partial detachment) [2] จากนั้นแบคทีเรียในไบโอฟิล์มจะสร้างสารเหนี่ยวนำให้เกิดการลงเกาะของสปอร์ของสาหร่าย โปรโตซัว ตามด้วยตัวอ่อนของสัตว์ทะเล เช่น เพรียงหิน หอยแมลงภู่ ไบรโอซัว เพรียงหัวหอม เป็นต้น ในเวลาต่อมาจะทำให้บริเวณผิวหน้านั้นเกิดเป็นประชาคมสิ่งมีชีวิตที่สลับซับซ้อน และส่งผลกระทบต่อตัวสิ่งมีชีวิตที่ถูกลงเกาะ เช่น ต้องแบกรับน้ำหนัก ทำให้เคลื่อนที่ได้ช้า ทำให้ลอกคราบได้ยาก ขัดขวางการกินอาหารและแย่งอาหารในพวกที่กรองกินอาหาร และขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์แสงในพืช [1,3] กระบวนการลงเกาะยังส่งผลโดยตรงต่ออุตสาหกรรมทางทะเล ทำให้เกิดการผุกร่อนของสิ่งก่อสร้างต่างๆ เช่น เรือ เดินทะเล ท่าเทียบเรือ สะพานปลา แท่นขุดเจาะน้ำมัน กระชังเลี้ยงปลา และระบบหล่อเย็น ต่างๆ และต้อง

สูญเสียพลังงานไปกับเรือที่เคลื่อนที่ได้ช้าลงและมีแรงเสียดทานสูง รวมทั้งการอุดตันของกระชังที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทะเล ซึ่งได้มีการใช้สารเคมีมาป้องกันการลงเกาะที่รู้จักกันดี คือ สีกันเพรียง แต่พบว่ามีส่วนประกอบเป็นสารเคมีและโลหะหนักที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในทะเลและสภาพแวดล้อมเป็นอย่างมาก [4,5] ความต้องการสารต้านการลงเกาะที่มาจากธรรมชาติ (natural antifoulant) ที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมาใช้ทดแทนจึงมีมากขึ้น ซึ่งสิ่งมีชีวิตในทะเลเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านการลงเกาะที่มีการศึกษาพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง เพื่อนำไปใช้ในการป้องกันกระบวนการลงเกาะในอุตสาหกรรมทางทะเล [3,6,7,8,9]

กลุ่มปะการังอ่อน (Alcyonacea) และกัลปังหา (Gorgonacea) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีอวัยวะและรยางค์ที่จะใช้ในการป้องกันตัว บนผิวของปะการังอ่อนมักไม่พบมีสิ่งมีชีวิตใดมาเกาะติด และยังสามารถเจริญเบียดบังสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในแนวปะการัง กัลปังหาก็สามารถแผ่เป็นแผ่นเหมือนพัดขนาดใหญ่ โดยที่ปราศจากสิ่งมีชีวิตใดๆ ที่จะมาลงเกาะที่ผิวหน้าเช่นกัน ด้วยลักษณะที่กล่าวมาจึงเชื่อว่าปะการังอ่อนและกัลปังหาน่าจะมีกลไกทางเคมีในการป้องกันตัว (chemical defense) โดยเฉพาะการสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการลงเกาะสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่ผิวหน้า (antifouling) [10,11] ซึ่งมีการศึกษาที่ชี้ให้เห็นว่าปะการังอ่อนเป็นแหล่งสำคัญของสารสารยับยั้งการลงเกาะ โดยสร้างสารยับยั้งการลงเกาะของแบคทีเรียตัวอ่อนของเพรียงหิน และหอยแมลงภู่ได้เป็นอย่างดี [12,13,14,15,16,17] ส่วนกัลปังหาก็มีรายงานว่ามีการสร้างสารยับยั้งการลงเกาะของแบคทีเรีย ไดอะตอมและตัวอ่อนของเพรียงได้ดี [18,19,20,21,22] ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของปะการังอ่อนและกัลปังหาในการพัฒนาเป็นสารต้านการลงเกาะที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเพื่อใช้ทดแทนสารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในทะเลและสิ่งแวดล้อม

การลงเกาะของกลุ่มของแบคทีเรียและสร้างไบโอฟิล์มเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของกระบวนการลงเกาะที่ผิวหน้า โดยขั้นตอนการเกาะติดของแบคทีเรียเป็นขั้นตอนที่สำคัญของการสร้างไบโอฟิล์ม [2] ดังนั้นสารที่สามารถยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียได้ ก็สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและยับยั้งการลงเกาะของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ที่จะตามมาด้วย ประกอบกับน่านน้ำไทยมีปะการังอ่อนและกัลปังหากว่า 40 ชนิด [23] การศึกษานี้จึงทำการคัดเลือกแหล่งของสารต้านการลงเกาะจากปะการังอ่อนและกัลปังหาที่เก็บตัวอย่างจากทะเลไทย 27 ชนิด โดยศึกษาประสิทธิภาพของสารด้วยวิธียับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเล โดยใช้แบคทีเรียทะเลที่เป็นแบคทีเรียที่ลงเกาะและแยกมาจากบริเวณเก็บตัวอย่างโดยตรง ซึ่งจะใกล้เคียงกับสภาวะธรรมชาติในการเกาะติดของแบคทีเรียบนผิววัตถุในน้ำ รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษเบื้องต้นของปะการังอ่อนและกัลปังหา เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นสารต้านการลงเกาะที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในทะเลและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมทางทะเลต่อไป ทั้งนี้ความต้องการสารต้านการลงเกาะที่ปลอดภัยมาทดแทนสีกันเพรียงที่มีใช้กันอยู่ในอุตสาหกรรมทางทะเลที่มีสารพิษที่เป็นโละหนัก ซึ่งสามารถปนเปื้อนในทะเลและทำลายสิ่งแวดล้อมทางทะเล ถือว่าสอดคล้องกับนโยบายความมั่นคงแห่งชาติทางทะเลในส่วนของการปกป้องทรัพยากรธรรมชาติทางทะเลรวมถึงการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติที่มีชีวิตในทะเลด้วย [24]

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเก็บตัวอย่างและเตรียมสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหา

เก็บตัวอย่างปะการังอ่อน 9 ชนิดและกัลปังหา 18 ชนิด (Table 2) จากแนวปะการัง 2 บริเวณ คือ เกาะไข่และเกาะกำใหญ่ จ.ระนอง (พิกัด 09°28′44.6″N และ 098°21′07.9″E) และบริเวณเกาะคลุ้ม เกาะมะปลิง

และเกาะสองพี่น้อง จ.ตราด (พิกัด 12°6′13.6″N และ 102°21′07.1″E) โดยวิธีการดำน้ำแบบ SCUBA จากนั้นล้างตัวอย่างด้วยน้ำจืดแล้วแยกเศษตะกอนทรายออก นำไปผึ่งแห้งในที่ร่ม 6-8 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่างมา 20 กรัม ตัดให้เป็นขนาดเล็ก แล้วนำไปสกัดอย่างต่อเนื่องด้วยไดคลอโรมีเทน อะซีโตน และเมทานอลตามวิธีของ Henrikson *et al.* [25] แยกส่วนที่สกัดและกากด้วย centrifuge (NUVE : NF1200) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไประเหยแห้งภายใต้ความดันสุญญากาศด้วย rotary evaporator (Buchi : R200) ได้สารสกัดหยาบ (crude extract) 27 สาร ชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้และนำไปเทียบกับน้ำหนักของปะการังอ่อนและกัลปังหาที่นำมาสกัด คิดเป็นค่าร้อยละของความเข้มข้นของสารสกัดที่พบในเนื้อเยื่อของปะการังอ่อนและกัลปังหา (tissue concentration) เท่ากับที่พบในธรรมชาติ (Table 2) นำสารสกัดของปะการังอ่อนและกัลปังหาแต่ละชนิดไปละลายในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้นตามตารางที่ 2 และเก็บรักษาในขวด vial ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การคัดแยกแบคทีเรียทะเล

การศึกษานี้ใช้แบคทีเรียทะเลที่เกาะติดอยู่บนผิวปะการังอ่อนและกัลปังหา (fouling bacteria) และจากน้ำทะเลในบริเวณเกาะไข่ที่เก็บตัวอย่าง (sympatric bacteria) โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียทะเลจากปะการังอ่อน *Alcyonium* sp. ซึ่งเป็นชนิดที่มีเมือกมาก และในเมือกมักมีแบคทีเรียจำนวนมาก และจากกัลปังหา *Dichotella* sp.1 ซึ่งเป็นชนิดที่พบเป็นจำนวนมาก โดยมีขั้นตอนการแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ตามวิธีมาตรฐานด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ [26] คือ เตรียมสารละลายจากเนื้อเยื่อปะการังอ่อน *Alcyonium* sp. และกัลปังหา *Dichotella* sp.1 ที่บดในน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อความเค็ม 30 ส่วนในพัน และจากน้ำทะเลที่เก็บตัวอย่าง นำมาตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตรแล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ตามลำดับ จากนั้นนำไปเกลี่ยในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง Marine agar (MA) แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทำการแยกซ้ำ (reisolate) จนได้แบคทีเรียบริสุทธิ์รวม 23 สายพันธุ์ ศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้น ได้แก่ สีและรูปร่างโคโลนี รูปร่างแบคทีเรีย การติดสีแกรม และการสร้าง inhibition zone

2.3 การทดสอบการยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเล

ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Leroy *et al.* [27] ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เพื่อคัดเลือกสารต้านการลงเกาะ ซึ่งใกล้เคียงกับสภาวะในธรรมชาติในการเกาะติดของแบคทีเรียที่ผิวหน้าวัตถุต่างๆ ในน้ำ โดยนำสารสกัดไปเคลือบบนแผ่นปิดสไลด์ที่เป็นแผ่นเรียบ แล้วนำไปใส่ในจานหลุมที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียที่เกาะติดแพร่กระจายเป็นเนื้อเดียวกัน เหมาะกับการส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การทดสอบการยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเลทุกขั้นตอนทำการทดสอบด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ในตู้ปลอดเชื้อระบบ Laminar flow โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 การเตรียมแบคทีเรียทะเล

คัดเลือกแบคทีเรียทะเลมา 4 สายพันธุ์ (Table 1) มาเลี้ยงในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเหลว Marine broth (MB) 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี drop count method [26] แล้วทำการเจือจางแบคทีเรียทะเลทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยน้ำทะเลให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 4 X 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดเชื้อแบคทีเรียทะเลแต่ละสายพันธุ์ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microtiter plate (Nunclon) แบบ 12 ช่อง ที่มีน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพันอยู่ 2 มิลลิลิตร

2.3.2 การเตรียมสารสกัดบนแผ่นปิดสไลด์

ดูดสารสกัดที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 มาตัวอย่างละ 25 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นปิดสไลด์แบบกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร เกลี่ยสารสกัดให้ทั่วทั้งแผ่น เตรียมสารสกัดบนแผ่นปิดสไลด์ตัวอย่างละ 3 แผ่น (3 replication) และหยดเฉพาะเมทานอลเพื่อใช้เป็นตัว

Table 1 The sources and characteristics of four marine bacteria used for inhibition attachment assay.

Sources	Bacteria codes	Color	Colony form	Colony edge	Shape	Gram	Inhibition zone formation
Soft coral (*Alcyonium* sp.)	Soft07_02	purple	circular	entire	sphere	+	✓
Sea fan (*Dichotella* sp.1)	Sfan01_05	cream	circular	entire	sphere	+	X
Seawater (Ko Kai)	SeaKai_03	yellow	irregular	undulate	rod	+	✓
Seawater (Ko Kam)	SeaKam_02	cream	irregular	undulate	rod	-	X

Table 2 The percentages of inhibiting attachment of four marine bacteria by extracts of soft corals and sea fans.

Groups	Scientific names	Tissue concentration (%)	Marine bacteria (source)			
			Soft07_02 (Soft coral)	Sfan01_05 (Sea fan)	SeaKai_03 (Seawater)	SeaKam_02 (Seawater)
Soft corals	*Alcyonium* sp.**	2.93	65.68±6.82^{bcdefg}	74.71±7.94^{cd}	15.42±5.43^{jkl}	43.26±15.31^{d}
	Chironephthya sp.*	1.18	64.78±8.86 ^{bcdefgh}	77.00±5.03^{abc}	94.47±1.61^{a}	*NI*
	Cladiella sp.**	5.78	65.12±4.78^{bcdefgh}	51.30±2.79^{ef}	53.23±9.90^{ef}	70.82±13.90^{ab}
	Klyxum sp.	3.82	34.42±9.77^{jk}	*NI*	50.39±9.40^{fgh}	16.42±9.22^{e}
	Lobophytum sp.**	1.45	14.24±11.39^{l}	32.67±8.83^{h}	11.47±3.82^{kl}	8.94±5.09^{e}
	Sarcophyton sp.*, **	2.49	40.99±3.22^{ijk}	85.18±7.61^{abc}	18.17±7.64^{jkl}	11.26±7.80^{e}
	Sinularia sp.1**	1.77	51.85±8.89^{fghij}	54.50±9.87^{e}	68.49±8.99^{bcdef}	22.17±7.89^{e}
	Sinularia sp.2**	1.53	69.74±11.83^{abcdef}	79.25±7.63^{abc}	51.38±11.82^{fgh}	42.27±7.49^{d}
	Sinularia sp.3**	2.19	49.65±8.35^{ghij}	69.78±4.51^{d}	58.12±13.33^{defg}	22.60±5.18^{e}
Sea fans	*Annella* sp.	1.49	77.31±16.08^{abc}	35.48±6.77^{gh}	79.63±11.23^{abc}	*NI*
	Ctenotella sp.1	2.61	71.44±6.68^{abcde}	46.14±8.25^{efg}	63.57±14.07^{cdef}	*NI*
	Ctenotella sp.2	1.53	53.48±12.61^{defgi}	*NI*	64.95±10.18 ^{cdef}	*NI*
	Dichotella sp.1**	2.55	65.12±8.34^{bcdefgh}	19.04±1.81^{i}	85.63±2.19^{ab}	42.13±7.41^{d}
	Dichotella sp.2**	3.48	62.41±12.64^{cdefgh}	40.85±6.47^{fgh}	55.66±12.88^{efg}	14.78±3.29^{e}
	Dichotella sp.3*, **	6.89	86.45±4.11^{a}	80.31±1.94^{abc}	26.30±7.51^{ijk}	49.57±5.55^{cd}
	Dichotella sp.4	1.57	73.92±8.09^{abcd}	71.36±2.08^{d}	*NI*	*NI*
	Echinogorgia sp.	1.5	58.41±12.99^{cdefghi}	55.56±8.14^{e}	*NI*	60.40±9.79^{bc}
	Euplexaura sp.	1.54	66.70±7.49^{bcdefg}	*NI*	43.27±7.96^{ghi}	*NI*
	Junceella sp.1	2.26	58.18±11.98^{defghi}	78.34±7.21^{abc}	75.33±6.57^{bcd}	*NI*
	Junceella sp.2	1.4	69.80±11.39^{abcdef}	18.28±2.60^{i}	1.63±7.67^{l}	*NI*
	Junceella sp.3*, **	1.96	85.89±3.07^{a}	76.50±9.49^{bcd}	71.22±11.29^{bcde}	39.06±9.36^{d}
	Junceella sp.4*, **	0.6	82.50±5.44^{ab}	69.71±3.57^{d}	56.19±11.70^{defg}	16.52±15.11^{e}
	Muricella sp.	1.19	46.48±8.21^{hij}	55.57±12.24^{e}	62.73±10.94^{cdef}	*NI*
	Rumphella sp.1*	2.23	25.21±9.13^{kl}	89.52±5.82^{ab}	33.64±10.10^{hij}	*NI*
	Rumphella sp.2*	6.58	64.43±12.44^{bcdefgh}	89.99±0.52^{a}	*NI*	*NI*
	Subergorgia sp.*	1.13	67.10±9.11^{bcdefg}	82.24±8.57^{abc}	17.15±1.85^{jkl}	69.80±8.97^{ab}
	Unidentified sea fan 1*	1.7	60.21±11.92^{cdefg}	73.95±9.41^{cd}	30.95±8.17^{ij}	84.76±5.14^{a}

Values within a column superscripted with different lowercase letters are significantly different ($p<0.05$);
* the extracts that showed high activity (>80%); ** the extracts that showed broad activity; NI = not inhibition

ควบคุมลบ (negative control) และ Sodium hypochlorite 10% เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) นำไปวางไว้ในตู้ปลอดเชื้อจนสารสกัดและสารที่ใช้เป็นตัวควบคุมบนแผ่นปิดสไลด์แห้ง จึงนำไปใส่ลงไปในแต่ละช่องของ microtiter plate ที่เตรียมแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบในข้อ 2.3.1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.3.3 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่เกาะติด

ดูดแบคทีเรียที่อยู่ในแต่ละช่องของ microtiter plate ในข้อ 2.3.2 ออก แล้วเติมฟอร์มาลิน 4% ลงไป 1 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ 10 นาที แล้วดูดฟอร์มาลินออก จากนั้นเติมสีย้อมแบคทีเรีย DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole) ซึ่งเป็นสีย้อมติด DNA ความเข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วน ลงไปช่องละ 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วดูดสีย้อม DAPI ออกให้หมด ล้างแผ่นปิดสไลด์ด้วยน้ำกลั่นและวางทิ้งให้แห้ง จากนั้นตรวจนับจำนวนแบคทีเรียบนแผ่นปิดสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus : BX60) ซึ่งจะเห็นการเรืองแสงสีน้ำเงินได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 3) สุ่มนับจำนวนแบคทีเรียบนแผ่นปิดสไลด์แต่ละแผ่น 5 จุด นำค่าเฉลี่ยของแบคทีเรียที่เกาะติดบนแผ่นปิดสไลด์ไปคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนแผ่น (เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) แล้วคำนวณหาค่าร้อยละการเกาะติดของแบคทีเรียสัมพัทธ์กับชุดควบคุมการทดสอบ จากนั้นนำไปคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียสัมพัทธ์กับชุดควบคุมการทดสอบ

2.4 การทดสอบความเป็นพิษของปะการังอ่อนและกัลปังหา

สารจากสิ่งมีชีวิตที่จะนำไปพัฒนาเป็นสารยับยั้งการลงเกาะนั้น นอกจากจะต้องสามารถยับยั้งการลงเกาะได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้ว จะต้องคำนึงถึงความเป็นพิษของสารที่อาจมีต่อสิ่งมีชีวิตในทะเลและสภาพแวดล้อมด้วย การทดสอบความเป็นพิษยังสามารถใช้ในการศึกษาบทบาทของสารในทางนิเวศวิทยาเพื่อใช้ในการป้องกันตัวด้วย ทำการทดสอบความเป็นพิษของปะการังอ่อนและกัลปังหาต่อปลา (ichthyotoxicity) โดยใช้วิธีการทดสอบที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Coll *et al.* [28] โดยชั่งตัวอย่างปะการังอ่อนและกัลปังหามาตัวอย่างละ 15 กรัม สกัดโดยปั่นให้ละเอียดด้วยน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร แล้วแยกส่วนที่สกัดได้ด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แบ่งส่วนที่สกัดได้เป็น 3 ส่วน นำไปทดสอบกับปลาสอดแดง (Red swordtail; *Xiphophorus hellerii*) ที่มีความยาว 4.0-4.5 เซนติเมตร โดยนำปลาสอดจำนวน 3 ตัวใส่ลงในตู้ทดสอบขนาด 7x7x12 เซนติเมตรที่มีน้ำตู้ละ 200 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 3 ตู้ (replication) และเตรียมตู้ทดสอบที่ไม่ได้สารใดๆ เป็นชุดควบคุมการทดสอบลบ และตู้ทดสอบที่ใช้ $CuSO_4$ 1% เป็นชุดควบคุมบวก ตรวจนับจำนวนปลาที่ตายที่เวลา 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

2.5 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วย Thin layer chromatography (TLC)

นำสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหามาตรวจสอบความแตกต่างเบื้องต้นขององค์ประกอบทางเคมีจากโครมาโตแกรมที่ได้จาก TLC โดยใช้แผ่น TLC (Si60, F254) ที่ทำการแยกสารด้วยเฮกเซนและเอทธิลอะซีเตท (3:1) จากนั้นตรวจหากลุ่มของสารที่คาดว่าทำหน้าที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารประกอบอะโรมาติก หรือสารประกอบ conjugated หรือสาร polycyclic โดยการส่องดูภายใต้แสง UV (254 และ 365 นาโนเมตร) และตรวจสอบหมู่ Terpene และ Nitrogen-compound โดยการพ่นด้วยสาร Vanillin-sulfuric acid และสาร Dragendorff ตามลำดับ [29]

2.6 การวิเคราะห์สถิติ

ข้อมูลร้อยละของการเกาะติดของแบคทีเรียและร้อยละการยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียแสดงด้วยค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) การทดสอบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของร้อยละการยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย โดยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) จากนั้นเปรียบเทียบค่าความแตกต่างโดยการเปรียบ

เทียบพหุคูณด้วยวิธี Tukey Post-Hoc test ส่วนการเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการเกาะติดของแบคทีเรียกับตัวควบคุมการทดสอบใช้วิธี Dunnett test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($p<0.01$) สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดในเนื้อเยื่อของปะการังอ่อนและกัลปังหาและค่าร้อยละการยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทดสอบด้วยพหุสัมพันธ์ของ Pearson correlation (r) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic Standard V.27

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเล

ในกระบวนการลงเกาะของสิ่งมีชีวิตที่ผิวหน้า (biofouling) แบคทีเรียเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตกลุ่มแรกที่ลงเกาะและสร้างไบโอฟิล์ม โดยขั้นตอนการเกาะติดของแบคทีเรียเป็นขั้นตอนสำคัญในการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งจะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้สิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ ได้แก่ สาหร่าย และตัวอ่อนของสัตว์ทะเล ลงเกาะตามมา เกิดเป็นประชาคมที่สลับซับซ้อนขึ้น ดังนั้นสารที่สามารถยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียได้ ก็คาดว่าน่าจะมีผลต่อการยับยั้งการลงเกาะของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ที่จะตามมาด้วย [2,27] โดยในการศึกษานี้ได้เตรียมสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาให้ได้ความเข้มข้นของสารเท่ากับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อของปะการังอ่อนและกัลปังหาแต่ละชนิด ซึ่งพบว่ามีค่าความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 0.6-6.89 (Table 2) สำหรับแบคทีเรียทะเลที่แยกจากตัวอย่างปะการังอ่อนและกัลปังหา ซึ่งถือว่าเป็นแบคทีเรียที่เกาะติดอยู่บนสิ่งมีชีวิต (fouling bacteria) รวมทั้งแบคทีเรียจากน้ำทะเลในบริเวณเก็บตัวอย่าง ได้คัดเลือกมา 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีคุณลักษณะแตกต่างกัน (Table 1) โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแกรมบวก ทั้งนี้แบคทีเรียที่เป็นแกรมลบมีเพียงแบคทีเรียสายพันธุ์ SeaKam_02 เท่านั้น การเลือกใช้แบคทีเรียที่มีคุณลักษณะแตกต่างกันจากแหล่งที่มาแตกต่างกัน ซึ่งมักจะมีความอ่อนไหวต่อสารสกัดแตกต่างกัน โอกาสที่จะพบสารยับยั้งการเกาะติดที่มีประสิทธิภาพน่าจะมีมากขึ้น

การศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหา 27 ชนิดสามารถยับยั้งการเกาะติดแบคทีเรียทะเลได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Table 2) โดยส่วนใหญ่ยับยั้งการเกาะติดแบคทีเรียทะเลได้อย่างน้อย 3 สายพันธุ์ สารสกัดที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นสารต้านการลงเกาะที่ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเลได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่าร้อยละของการยับยั้งการเกาะติดสูงกว่าร้อยละ 80 มีจำนวน 11 สาร ได้แก่ สารสกัดที่ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย Soft07_02 สูงมี 3 สาร คือ สารสกัดจากกัลปังหา *Dichotella* sp.3 แส้ทะเล *Juncella* sp.3 และ *Juncella* sp.4 สำหรับสารสกัดที่ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย Sfan01_05 ได้สูงมีมากที่สุดถึง 5 สาร คือ สารสกัดจากกัลปังหา *Rumphella* sp.2, *Rumphella* sp.1 ปะการังอ่อน *Sarcophyton* sp. กัลปังหา *Subergorgia* sp. และ *Dichotella* sp.3 ส่วนสารสกัดที่ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียที่แยกมาจากน้ำทะเลได้ดีมีน้อยกว่าที่แยกจากปะการังอ่อนและกัลปังหา โดยสารสกัดที่ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย SeaKai_03 ได้สูงมี 2 สาร คือ สารสกัดจากปะการังอ่อน *Chironephthya* sp. และกัลปังหา *Dichotella* sp.1 โดยสารสกัดจากปะการังอ่อน *Chironephthya* sp. เป็นสารสกัดที่ยับยั้งการเกาะติดได้ดีที่สุดในการศึกษานี้ และสารสกัดที่ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย SeaKam_02 ได้ดีมีจำนวนน้อยที่สุดเพียง 1 สาร คือ สารสกัดจากกัลปังหา Unidentified sea fan1 ซึ่งถือว่าเป็นสารสกัดที่มีความน่าสนใจเนื่องจากยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเลที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ดีที่สุด ในขณะที่มีสารสกัดจำนวนน้อยมากที่สามารถยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเลชนิดนี้ได้ นอกจากนั้นยังมีสารสกัดจากปะการังอ่อน *Cladiella* sp. อีกหนึ่งชนิดที่ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียแกรมลบ SeaKam_02 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับ

การศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าปะการังอ่อน *Cladiella* มีการสร้างสารต้านแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด เช่น *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* [30] และยังมีรายงานว่าปะการังอ่อน *Cladiella* sp. สร้างสารที่ชื่อว่า hexadecyl palmitate ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเลแกรมลบ ได้แก่ *Cytophaga* sp., *Pseudomonas* sp., *Psychrobacter* sp. และ *Shewanella* sp. ซึ่งผู้วิจัยเชื่อว่าปะการังอ่อน *Cladiella* sp. สร้างสารดังกล่าวเพื่อใช้ในการยับยั้งการลงเกาะของแบคทีเรียที่จะมาลงเกาะที่ผิวหน้าอย่างแท้จริง เนื่องจากความเข้มข้นของสาร hexadecyl palmitate ที่พบในเนื้อเยื่อของปะการังอ่อน *Cladiella* sp. มีค่าสูงกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการลงเกาะของแบคทีเรียทะเลที่ทำการทดสอบถึง 1,000 เท่า [15] นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าสารสกัดจากปะการังอ่อน *Alcyonium paessleri* และ *Gersemia antartica* สร้างสารยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย และเชื่อว่าสารดังกล่าวทำหน้าที่ยับยั้งการลงเกาะด้วย [12] ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าปะการังอ่อน *Alcyonium* sp. เป็นปะการังอ่อนที่มีเมือกมาก ยับยั้งการเกาะติดแบคทีเรีย Sfan01_05 ได้ดีที่ร้อยละ 74.71±7.94 ซึ่งไม่สูงมากนัก อาจเป็นเพราะว่าปะการังอ่อนสกุลนี้ใช้วิธีการสร้างเมือกเป็นกลไกทางกายภาพในการยับยั้งการลงเกาะด้วยอีกกลไกหนึ่ง [31]

สารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาหลายชนิดยังสามารถยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียได้ในวงกว้าง โดยยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ (Table 2) ได้แก่ สารสกัดจากปะการังอ่อนถึง 7 ชนิด คือ *Alcyonium* sp., *Cladiella* sp., *Lobophytum* sp., *Sarcophyton* sp., *Sinularia* sp.1, sp.2 และ sp.3 ซึ่งมีรายงานว่าปะการังอ่อนหลายชนิดมีการสร้างสารยับยั้งการลงเกาะได้ดีเช่นกัน เช่น ปะการังอ่อน *Sinularia rigida* สร้างสารยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนของเพรียงและไบรโอซัวได้ดี [32] และปะการังอ่อน *Sarcophyton glaucum* สร้างสาร Sarcoglaucin B และ E ที่สามารถยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนของเพรียงได้ดี [33] ส่วนสารสกัดจากกัลปังหาที่สามารถยับยั้งการเกาะติดกัลปังหาในวงกว้างมี 7 ชนิด คือ *Dichotella* sp.1, sp.2 และ sp.3, *Juncella* sp.3 และ sp.4, *Subergorgia* sp. และ Unidentified sea fan 1 ซึ่งจะพบว่าสารสกัดที่มาจากกัลปังหาในสกุลเดียวกันก็มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ได้แตกต่างกันไป โดยสกุลที่น่าสนใจ คือ กัลปังหาในสกุล *Dichotella* และแส้ทะเลในสกุล *Junceella* (Table 2) ทั้งนี้มีการรวบรวมรายงานที่ชี้ให้เห็นว่าแส้ทะเลในสกุล *Junceella* สร้างสารกว่า 82 สารและเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารวมทั้งสารต้านการลงเกาะ [22] โดยมีรายงานว่าสารสกัดจากแส้ทะเล *Junceella* สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษานี้ [34] และมีการศึกษาที่ชี้ให้เห็นว่าแส้ทะเล *Junceella juncea* สร้างสารที่ชื่อว่า juncinZII, gemmacolide B, gemmacolide A และ junceellolide D ที่สามารถยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนของเพรียงหินได้เป็นอย่างดีและยับยั้งการกินเป็นอาหารของหนอนกระทู้ผักด้วย [35] และกัลปังหาอีกกลุ่มที่น่าสนใจ คือ สกุล *Dichotella* ซึ่งมีรายงานว่ากัลปังหา *Dichotella gemmacea* สร้างสารสารไดเทอร์ปีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและลบได้ดี [36] เช่นเดียวกับกัลปังหาทั้ง 3 ชนิดในสกุล *Dichotella* ที่ใช้ในการศึกษานี้ และยังยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงได้เป็นอย่างดี [37] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากกัลปังหา *Subergorgia suberosa*, *Leptogorgia virgulata* และ *Muricea fruticosa* [38,18,19] สามารถยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนของเพรียงหินได้ดีเช่นกัน

ในการศึกษานี้ยังพบว่าสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาบางชนิดไม่สามารถยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย แต่ไปเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มาเกาะติดมากกว่าชุดควบคุมการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Figure 1) โดยสารสกัดส่วนใหญ่ไปกระตุ้นการเกาะติดของแบคทีเรียสายพันธุ์ SeaKam_02 มาก

ที่สุด ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ถูกยับยั้งการเกาะติดได้น้อยที่สุด (Table 2) ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากปะการังอ่อน *Chironepthya* sp. ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย SeaKai_03 ได้ดีที่สุด และยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย Soft07_02 และ Sfan01_05 ได้ในระดับปานกลาง แต่ไปกระตุ้นการเกาะติดของแบคทีเรีย SeaKam_02 แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรียมีผลต่อกระบวนการเกาะติดของแบคทีเรีย ซึ่งอาจจะยับยั้งหรือกระตุ้นการเกาะติดบนผิววัตถุในน้ำได้

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกาะติดของสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาที่มีต่อแบคทีเรียทะเลแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน จากตารางที่ 2 พบว่าจำนวนสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาที่ยับยั้งแบคทีเรียทะเลสายพันธุ์ Soft07_02, Sfan01_05 SeaKai_03 และ SeaKam_02 ได้สูงกว่าร้อยละ 80 มีจำนวน 3, 5, 2 และ 1 สารตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทะเลแต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบถูกยับยั้งการเกาะติดมีความอ่อนไหวต่อสารสกัดแตกต่างกันไป จากการวิเคราะห์การกระจายของค่าร้อยละการยับยั้งการลงเกาะของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ดังแสดงในภาพที่ 2 พบว่าแบคทีเรีย Soft01_05 ซึ่งแยกจากปะการังอ่อนมีความอ่อนไหวต่อสารสกัดมากที่สุด โดยถูกยับยั้งการเกาะติดด้วยสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาได้ดีที่สุด ในขณะที่แบคทีเรีย SeaKam_02 ซึ่งแยกจากน้ำทะเลมีความทนทานต่อสารสกัดมากที่สุด ซึ่งน่าจะเป็นเพราะว่าแบคทีเรีย SeaKam_02 เป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิดเดียวที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบเป็นแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์หนา ทำให้สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี [26] สิ่งที่น่าสนใจอีกประการหนึ่ง คือ แบคทีเรียที่เกาะติดบนปะการังอ่อนและกัลปังหาที่นำมาใช้ในการทดสอบนี้ คือ Soft07_02 และ Sfan01_05 อาจมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านการลงเกาะได้เช่นกัน เนื่องจากมีรายงานที่ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวหน้าของปะการังอ่อน *Dendronepthya* เป็นแหล่งสำคัญในการพัฒนาเป็นสารยับยั้งการลงเกาะโดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์ม หนอนท่อ และไบรโอซัวได้ [15,39] และแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* ที่แยกจากผิวหน้าของแส้ทะเล *J. juncea* ก็สามารถยับยั้งแบคทีเรียและตัวอ่อนของไบรโอซัวได้ [40] นอกจากนั้นในการศึกษานี้ยังพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดในเนื้อเยื่อของปะการังอ่อนและกัลปังหาในสภาวะในธรรมชาติ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 0.6-6.89 (Table 2) ไม่มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเลแต่ละชนิด คือ Soft07_02, Sfan01_05 SeaKai_03 และ SeaKam_02 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่า r เท่ากับ 0.121, 0.151, -0.263 และ 0.260 ตามลำดับ แสดงว่าการออกฤทธิ์ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร แต่น่าจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในสารสกัดนั้นมากกว่า

การศึกษานี้สามารถคัดเลือกสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเลได้รวม 17 สาร คิดเป็นร้อยละ 62.96 ของสารสกัดทั้งหมด (Table 2) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาในน่านน้ำไทยเป็นแหล่งที่สำคัญของสารยับยั้งการเกาะติดแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านการลงเกาะเพื่อใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมต่อไป

3.2 ความเป็นพิษของสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหา

ความต้องการสารต้านการลงเกาะจากธรรมชาติ (natural antifoulant) เพื่อใช้แก้ปัญหาในอุตสาหกรรมทางทะเล ซึ่งมีสาเหตุสำคัญมาจากสารที่มีใช้กันอยู่โดยเฉพาะที่ผสมอยู่ในสีกันเพรียงมักมีโลหะหนักที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมในทะเล [4,5,7,8] ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาที่มีต่อปลาสอดแดง ซึ่งพบว่าสารสกัดจากปะการังอ่อน *Sarcophyton* sp.

มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน ทำให้ปลาตายภายใน 30 นาที โดยปลาตอบสนองต่อสารด้วยการว่ายน้ำไปมาอย่างรวดเร็ว และหายใจผิดปกติ แต่สารสกัดจากปะการังอ่อน *Chirohephthya* sp. ที่ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียได้ดีและในวงกว้างในการศึกษานี้ มีความเป็นพิษต่ำกว่าปะการังอ่อนชนิดอื่นๆ ส่วนกลุ่มกัลปังหาพบว่าสารสกัดจากกัลปังหา Unidentified sea fan 1 ซึ่งยับยั้งการเกาะติดได้ดีและในวงกว้างก็มีความเป็นพิษต่ำกว่ากัลปังหาชนิดอื่นๆ มีเพียงสารสกัดจากกัลปังหา *Rumphella* sp.1 และ sp.2 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกาะติดแบคทีเรีย Sfan01_05 ได้ดีแต่มีความเป็นพิษต่อปลาแบบเฉียบพลัน โดยปลาตอบสนองต่อสารสกัดโดยการกระโดดออกจากขวดทันที ซึ่งจากการพิจารณาโครงสร้างภายนอกของกัลปังหาชนิดนี้พบว่ามีความอ่อนนุ่มกว่ากัลปังหาชนิดอื่นๆ จึงอาจต้องสร้างสารที่มีความเป็นพิษขึ้นมาเพื่อใช้ป้องกันตัว [10] อย่างไรก็ตามการทดสอบความเป็นพิษต่อปลาในการศึกษานี้ใช้สารสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้นค่อนข้างสูง คือ 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตร จึงอาจแสดงความเป็นพิษอย่างชัดเจน ทั้งนี้มีรายงานที่น่าสนใจที่พบว่าปะการังอ่อนและกัลปังหาเป็นแหล่งสำคัญของสารที่สามารถยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนของเพรียงได้ดีกว่า $CuSO_4$ และ TBTO ซึ่งเป็นสารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในทะเลสูงมาก [3,4,5] นั่นคือสาร 13 α-acetoxypukalide จากปะการังอ่อน *Sinularia* sp. [42] ซึ่งในการศึกษานี้มีปะการังอ่อนในสกุล *Sinularia* ถึง 3 ชนิดที่ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเลได้ในวงกว้าง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสาร Trigonelline จากปะการังอ่อน *Dendronephthya* sp. ที่สามารถยับยั้งการลงเกาะของตัวอ่อนของเพรียงได้ดี เป็นสารที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไป ที่ใช้เป็นอาหารในประเทศญี่ปุ่น จึงน่าจะมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมเช่นกัน [42] ดังนั้นสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาในการศึกษานี้จึงน่าจะเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านการลงเกาะที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

การสร้างสารที่เป็นพิษของปะการังอ่อนและกัลปังหา เชื่อว่ามีขึ้นเพื่อใช้ในการป้องกันตัวด้วยกลไกทางเคมีที่เรียกว่า chemical defense ซึ่งถือว่าเป็นบทบาทที่สำคัญมากในทางนิเวศวิทยา [10,11] มีรายงานการศึกษาความเป็นพิษของปะการังอ่อนกว่า 350 ชนิดใน Great barrier reef พบว่าปะการังอ่อนร้อยละ 50 มีการสร้างสารที่เป็นพิษต่อปลา และร้อยละ 90 สร้างสารยับยั้งการถูกกินเป็นอาหารโดยผู้ล่า ตัวอย่างเช่น ปะการังอ่อน *Lobophytum, Sarcophyton, Cladiella, Sinularia* และ *Lemnalia* [28,43] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ที่พบว่าปะการังอ่อนส่วนใหญ่แสดงความเป็นพิษ ทั้งนี้มีความสัมพันธ์ระหว่างรูปร่างลักษณะและความเป็นพิษของปะการังอ่อน เช่น ปะการังอ่อนในวงศ์ Neptheidae ที่โพลิปมีแคลเซียมหุ้ม จะมีการสร้างสารที่มีความเป็นพิษน้อยกว่าพวกที่โพลิปไม่มีแคลเซียมหุ้ม หรือปะการังอ่อนสกุล *Sinularia* จะที่มีโครงร่างหนาแน่น (coenenchymal mass) จะไม่สร้างสารพิษป้องกันตัว [44] การที่ปะการังอ่อนสร้างสารที่มีความเป็นพิษต่อปลาได้ดีกว่ากัลปังหาน่าจะเกิดจากลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน โดยปะการังอ่อนมีเนื้อเยื่อที่อ่อนนุ่มอยู่ภายนอก ในขณะที่กัลปังหามีโครงร่างแข็งหุ้มเป็นกลไกทางกายภาพในการป้องกันตัวในระดับหนึ่งแล้ว การสร้างสารที่เป็นพิษในปะการังอ่อนและกัลปังหาจึงถือว่าเป็นกลไกทางเคมีในการป้องกันตัวทั้งจากผู้ล่าและจากการลงเกาะของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ซึ่งมีความสำคัญต่อการอยู่รอดของปะการังอ่อนและกัลปังหาในระบบนิเวศทางทะเล [10,11,28,43,44] การศึกษาการยับยั้งการลงเกาะและการศึกษาความเป็นพิษของปะการังอ่อนและกัลปังหา ยังทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับบทบาทของสารในทางนิเวศวิทยา เช่น การสร้างสารป้องกันตัว (chemical defense) ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจในพฤติกรรม โครงสร้างของประชากรและประชาคมในระบบนิเวศทางทะเลเพิ่มมากขึ้น [10,11]

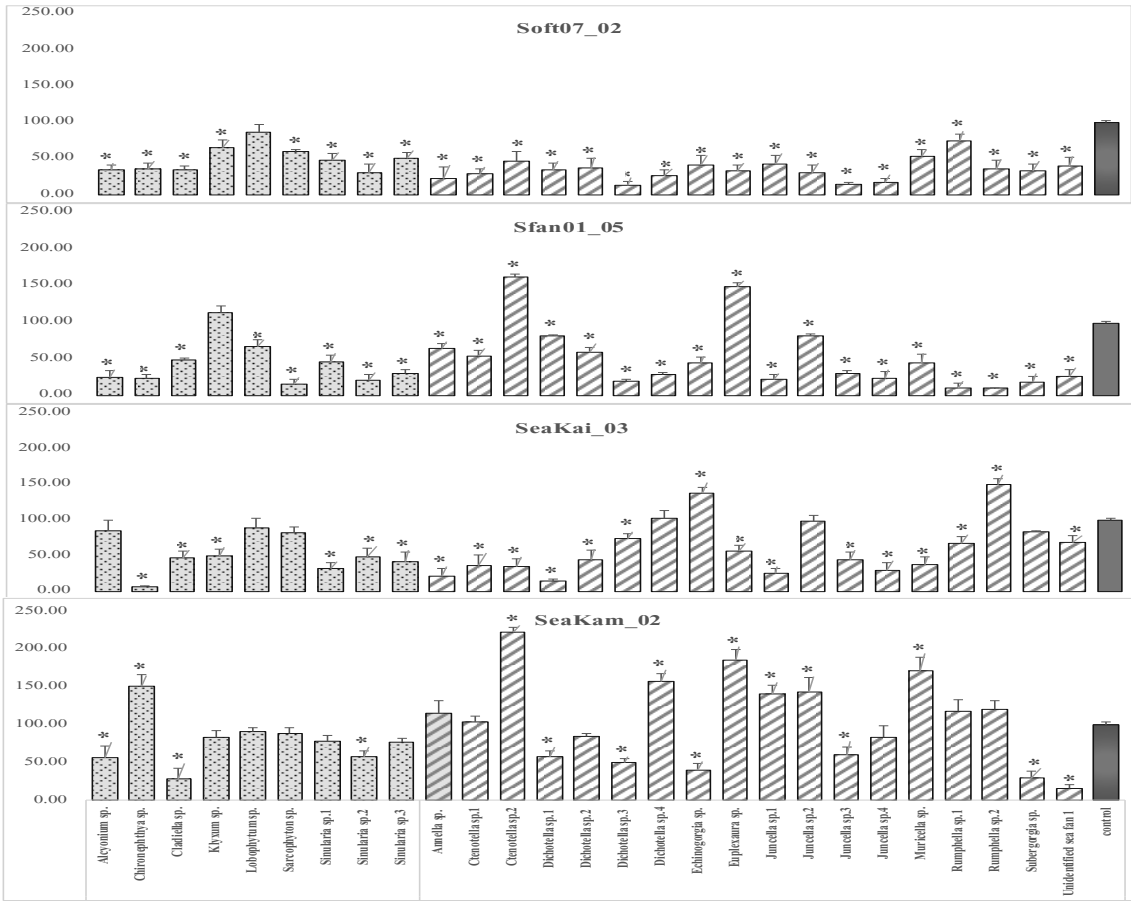


Figure 1 The percentages of bacterial attachment by extracts of soft corals and sea fans against 4 marine bacteria.

* = significantly different from control ($p<0.01$)

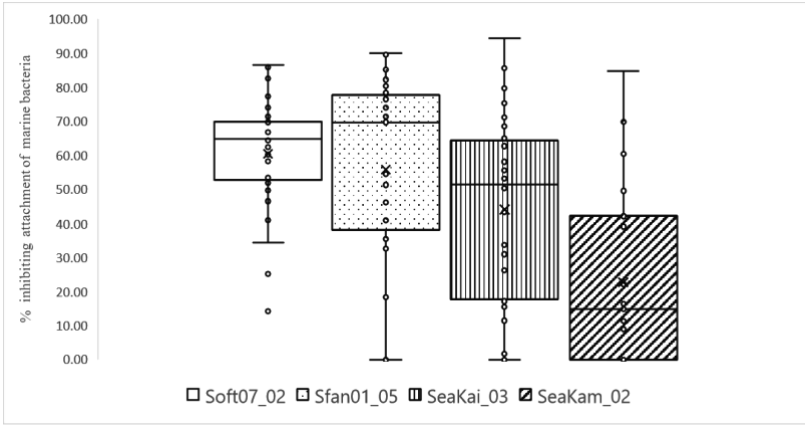
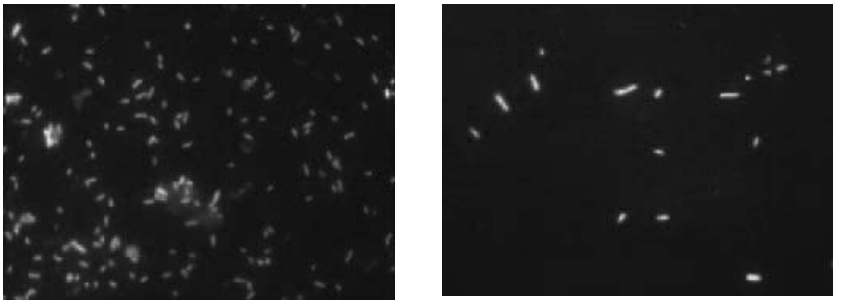


Figure 2 The suscepsibility of four marine bacteria against extracts from soft corals and sea fans.



a b

Figure 3 The tested bacteria on coverslip stained with DAPI were appeared clearly under fluorescent microscope; control (a); treated with active extracts (b).

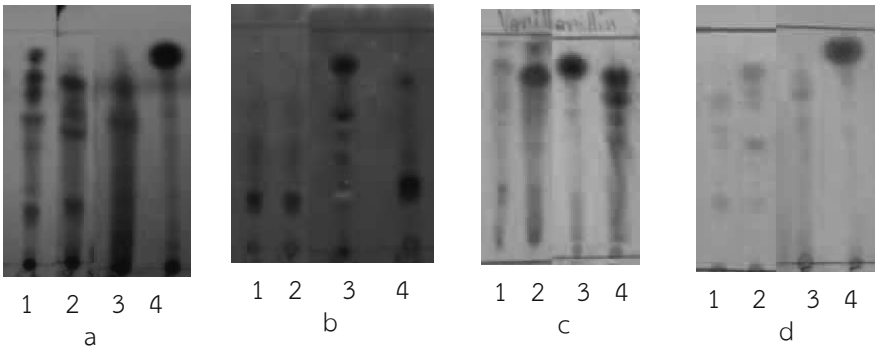


Figure 4 The TLC chromatogram of some extracts from soft corals and sea fans;

a. under UV 254 nm detected aromatic and conjugated compounds appeared brown spot : 1 = *Sarcophyton* sp.; 2 = *Chironephthya* sp.; 3 = unidentified sea fan 1; 4 = *Subergorgia* sp.

b. under UV 365 nm detected fluorescent substances: 1 = *Sarcophyton* sp.; 2 = *Cladiella* sp.; 3 = *Junceella* sp.3 ; 4 = *Junceella* sp.4

c. vanillin-sulphuric reagent ; detected terpene appeared blue spots and polyphenol appeared pink spot : 1 = *Chironephthya* sp.; 2 = *Sinularia* sp.3; 3 = *Subergorgia* sp.; 4 = *Junceella* sp.3

d. Dragendorff reagent : detected N-compound appeared orange spots : 1 = *Sarcophyton* sp.; 2 = *Cladiella* sp.; 3= unidentified sea fan 1; 4 = *Subergorgia* sp.

3.3 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหา

จากการศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหา ด้วยการเปรียบเทียบโครมาโตแกรมที่ได้จาก TLC ปรากฏว่าสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาแต่ละชนิดมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถสังเกตได้อย่างชัดเจนจากโครมาโตแกรมที่ปรากฏภายใต้ UV 254 และ 365 นาโนเมตร (Figure 4a, 4b) ซึ่งพบสารที่มีพันธะแบบไม่อิ่มตัว สารอะโรมาติกจำนวนมาก เมื่อทำการตรวจสอบหมู่ของสารที่คาดว่าทำหน้าที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกาะติดมักมี Terpene เป็นองค์ประกอบ เช่น ในสารสกัดจากปะการังอ่อน *Chironephthya* sp. และในกัลปังหา *Sinularia* sp.3, *Subergorgia* sp. และ *Junceella* sp.3 (Figure 4C) ทั้งนี้จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารจากปะการังอ่อนและกัลปังหาส่วนใหญ่จะเป็นสารกลุ่มไดเทอร์ปีน (diterpene) ที่มักมีโครงสร้างพิเศษที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะกลุ่ม เช่น cremebranes และ briaranes ซึ่งทำให้เป็นสารไดเทอร์ปีนที่มีศักยภาพในทางยา [16,17,22,30,32,33,35,36,37] และยังพบจุดสีชมพูบานเย็นในสารสกัดจากกัลปังหาหลายชนิด เช่น *Subergorgia* sp. และ *Junceella* sp.3 (Figure 4c) ซึ่งหมู่ของสารที่ให้สีชมพูบานเย็นกับสาร Vanillin-sulphuric acid คาดว่าจะเป็นหมู่ 1,3,5 trihydroxyphenol [45] สำหรับการทดสอบสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะปรากฏสีส้มกับสาร Dragendorff พบว่าสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาหลายสารที่ปรากฏสีส้ม เช่น สารสกัดจากปะการังอ่อน *Sarcophyton* sp. และ *Cladiella* sp. และสารสกัดจากกัลปังหา Unidentified sea fan 1 และ *Subergorgia* sp. (Figure 4d) ซึ่งมีรายงานว่าสารจากปะการังอ่อนหลายชนิดมีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ steroids, alkaloids, terpenoids, prostaglandins, sterols และ steroid glycosides ทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้าน เช่น ต้านแบคทีเรียและรา เป็นพิษต่อเซลล์ และยับยั้งเนื้องอก [16] องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาในการศึกษานี้มีความแตกต่างกัน ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้สารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาในการศึกษานี้มีการออกฤทธิ์ยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียทะเลได้แตกต่างกัน ข้อมูลในส่วนขององค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นนี้ จะต่อยอดไปยังงานวิจัยการแยกสารบริสุทธิ์ และศึกษาโครงสร้างทางเคมี เพื่อพัฒนาเป็นสารต้านการลงเกาะที่สามารถสังเคราะห์ได้ และนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ซึ่งจะเป็นงานวิจัยที่จะทำให้ไม่เกิดปัญหาการทำลายทรัพยากรปะการังอ่อนและกัลปังหาในธรรมชาติในปริมาณมาก

4. สรุป

ปะการังอ่อนและกัลปังหาในทะเลไทยเป็นแหล่งสำคัญของสารยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ โดยมีทั้งที่สามารถยับยั้งการเกาะติดได้สูงกว่าร้อยละ 80 และยับยั้งแบคทีเรียในวงกว้างทั้ง 4 สายพันธุ์ รวม 17 สาร คิดเป็นร้อยละ 62.96 ของสารสกัดทั้งหมด และมีเพียง 3 ชนิดที่มีความเป็นพิษต่อปลาสอดแดงแบบเฉียบพลัน ความสามารถในการยับยั้งการเกาะติดแบคทีเรียทะเลของสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหา ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์แบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดสอบ และองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดในปะการังอ่อนและกัลปังหาแต่ละชนิด แต่ไม่สัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของสารที่พบในเนื้อเยื่อของปะการังอ่อนและกัลปังหา ผลการศึกษานี้สามารถคัดเลือกแหล่งของสารสกัดจากปะการังอ่อนและกัลปังหาที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทะเล ซึ่งจะนำไปสู่การศึกษาต่อยอดในการแยกสารบริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างของสาร และที่สำคัญคือการศึกษากระบวนการลงเกาะและเกาะติดของแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่ผิวหน้าอย่างชัดเจน เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นสารต้าน

การลงเกาะที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (environmentally-friendly antifoulant) ที่สามารถสังเคราะห์ได้ เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทางทะเล ทดแทนการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในทะเลและสภาพแวดล้อมทางทะเลต่อไป และเป็นการรักษาทุนทรัพยากรธรรมชาติในทะเลให้มีการใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่าและยั่งยืนต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่องการศึกษาสารยับยั้งการลงเกาะจากปะการังอ่อนและกัลปังหา รหัสโครงการวิจัย ก-ษ(ด) 18.49 ซึ่งได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีงบประมาณ 2549

6. References

[1] Wahl, M., 1989, Marine epibiosis. I. fouling and antifouling : some basic aspects, Mar. Ecol. Prog. Ser. 58: 175-189.

[2] Characklis, W.G., 1990, Microbial Fouling, pp. 523-584, In Characklis, W.G. and Marshall, K.C. (Eds.), Biofilms, Wiley, NewYork.

[3] Fusetani, N., 2004, Biofouling and antifouling. Nat. Prod. Rep. 21: 94-104.

[4] Yebra, D.M., Kiil, S. and Dam-Johansen, K., 2004, Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings, Prog. Org. Coat. 50: 75–104.

[5] Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J. and de Nys, R., 2012, The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. Biofouling 28(7): 649-669.

[6] Raveendran, T.V. and Mol, V.P.L., 2009, Natural product antifoulants, Curr. Sci. 97: 508–520.

[7] Qian, P.Y., Xu, Y. and Fusetani, N., 2010, Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives, Biofouling 26(2): 223-234.

[8] Qian, P.Y., Li, Z., Xu, Y., Li, Y. and Fusetani, N., 2015, Mini-review: Marine natural products and their synthetic analogs as antifouling compounds: 2009–2014, Biofouling 31: 101–122.

[9] Qi, S.H. and Ma, X., 2017, Antifouling compounds from marine invertebrates, Mar. Drugs 15(9): 263-283.

[10] Pawlik, J.R., 1993, Marine invertebrate chemical defenses, Chem. Rev. 5: 1911–1922.

[11] Paul, V.J., Ritson-Williams, R. and Sharp, K., 2011, Marine chemical ecology in benthic environments, Nat. Prod. Rep. 28(2): 345-387.

[12] Slattery, M., McClintock, J.B. and Heine, J.N., 1995, Chemical defenses in Antarctic soft corals: evidence for antifouling compounds, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 190(1): 61-77.

[13] Kelman, D., Kashman, Y., Rosenberg, E., Kushmaro, A. and Loya, Y., 2006, Antimicrobial activity of Red Sea corals, Mar. Biol. 149: 357-363.

[14] Goh, B.P.L., Tan, G.E. and Tan, L.T., 2009, Diversity, distribution and biological activity of soft corals (Octocorallia, Alcyonacea) in Singapore, J. Coast. Dev. 12(2): 89-98.

[15] Dobretsov, S., Al-Wahaibi, A.S.M., Lai, D., Al-Sabahi, J., Claereboudt, M., Proksch, P. and Soussi, B., 2015, Inhibition of bacterial fouling by soft coral natural products, Int. Biodeterior. Biodegradation, 98:53-58.

[16] Kasimala, M., Babub, B.H., Awet, B.A., Henok, G.G., Hailed, A.H. and Hishame, O.M., 2020, A review on bioactive secondary metabolites of soft corals (Octocorallia) and their distribution in Eritrean coast of Red Sea, Indian J. Mar. Sci. 49(12): 1793-1800.

[17] Yan, X., Liu, J., Leng, X. and Ouyang, H., 2021, Chemical diversity and biological activity of secondary metabolites from soft coral genus *Sinularia* since 2013, Mar. Drugs 19(6): 335-360.

[18] Rittschof, D., Hooper, I.R., Branscomb, E.S. and Costlow, J.D., 1985, Inhibition of barnacle settlement and behavior by natural products from whip corals, *Leptogorgia virgulata* (Lamarck, 1815), J. Chem. Ecol. 11(5): 551-563.

[19] Bandurraga, M.M. and Fenical, W., 1985, Isolation of the muricins: evidence of a chemical adaptation against fouling in the marine octocoral *Muricea fruticosa* (Gorgonacea). Tetrahedron 41: 1057-1065.

[20] Wilsanand, V., Wagh, A.B. and Bapuji, M., 2001, Antifouling activities of octocorals on some marine microfoulers, Microbios. 104(409): 131-140.

[21] Qi, S.H., Zhang, S., Yang, L.H. and Qian P.Y., 2008, Antifouling and antibacterial compounds from the gorgonians *Subergorgia suberosa* and *Scripearia gracillis,* Nat. Prod. Res. 2(22): 154–166.

[22] Chung, H.-M., Wang, Y.-C., Tseng, C.-C., Chen, N.-F., Wen, Z.-H., Fang, L.-S., Hwang, T.-L., Wu, Y.-C. and Sung, P.-J., 2018, Natural product chemistry of gorgonian corals of genus *Junceella*–part III. Mar. Drugs 16: 339-349.

[23] Worachananant, S., 2000, Study of Soft Corals and Gorgonians Distribution in Thai seas, Master Thesis, Kasetsart University, Bangkok, 210 p. (in Thai)

[24] Khaowised, W., 2020, Barnacles and the attachments, RTNA J. Sci & Tech. 3(1): 74-82. (in Thai)

[25] Henrikson, A.A. and Pawlik, J.R., 1995, A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 194(2): 157-165.

[26] Wangkobkiat, D., 1999, Microbiology : Laboratory Manual 3rd ed., Department of Microbiology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 330 p. (in Thai)

[27] Leroy, C., Delbarre-Ladrat, C., Ghillebaert, F., Rochet, M.J., Compère, C. and Combes, D., 2007, A marine bacterial adhesion microplate test using the DAPI fluorescent dye: a new method to screen antifouling agents, Lett. Appl. Microbiol. 44(4): 372-378.

[28] Coll, J.C., La Barre, S., Sammarco, P.W., William, W.T. and Bakus, G.J., 1982, Chemical defenses in soft corals (Coel-

enterata: Octocorallia) of the Great Barrier Reef: a study of comparative toxicities, Mar. Ecol. Prog. Ser. 8: 271-278.

[29] Touchstone, J.C. and Dobbins, M.F., 1978, Practice of Thin Layer Chromatography, John Wiley & Sons, Inc., New York, 383 p.

[30] Ata, A., Ackerman, J., Bayoud, A. and Radhika, P., 2003, Bioactive chemical constituents of Cladiella species, Helv. Chim. Acta 87: 592-597.

[31] Núñez-Pons, L., Carbone, M., Vázquez, J., Gavagnin, M. and Avila, C., 2013, Lipophilic defenses from Alcyonium soft corals of Antarctica, J. Chem. Ecol. 39: 675–685.

[32] Lai, D., Geng, Z., Deng, Z., Van, Ofwegen L., Proksch, P. and Lin, W., 2013, Cembranoids from the soft coral *Sinularia rigida* with antifouling activities, J. Agric. Food Chem. 61: 4585–4592.

[33] Zhang, J., Tang, X., Han, X., Feng, D., Luo, X., Ofwegen, L.P., Li, P. and Li, G., 2019, Sarcoglaucins A-I, new antifouling cembrane-type diterpenes from the South China Sea soft coral *Sarcophyton glaucum,* Org. Chem. Front. 6(12): 2004-2013.

[34] Kumar, P., Selvi, S.S. and Govindaraju, M., 2012, In vitro anti-biofilm and anti-bacterial activity of *Junceella juncea* for its biomedical application, Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2(12): 930-935.

[35] Qi, S.H., Zhang, S., Qian, P.Y. and Xu, H.H., 2009, Antifeedant and antifouling briaranes from the South China Sea gorgonian *Junceella juncea,* Chem. Nat. Compd. 45(1): 49-54.

[36] Li, C., La, M.P., Tang, H., Sun, P., Liu, B.S., Zhuang, C.L., Yi, Y.H. and Zhang, W., 2016, Chemistry and bioactivity of briaranes from the South China Sea gorgonian *Dichotella gemmacea,* Mar. Drugs 14(11): 201-212.

[37] Sun, J.F., Han, Z., Zhou, X.F., Yang, B., Lin, X., Liu, J. Peng, Y., Yang, X.W. and Liu, Y., 2013, Antifouling briarane type diterpenoids from South China Sea gorgonians *Dichotella gemmacea,* Tetrahedron 69(2): 871-880.

[38] Zhang, J., Liang, Y., Liao, X.J., Deng, Z. and Xu, S.H., 2014, Isolation of a new butenolide from the South China Sea gorgonian coral *Subergorgia suberosa.* Nat. Prod. Res. 28: 150–155.

[39] Dobretsov, S. and Qian, P., 2004, The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya* sp. in the inhibition of larval settlement, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 299(1): 35-50.

[40] Gao, C.H., Tian, X.P., Qi, S.H., Luo, X.M., Wang, P. and Zhang, S., 2010, Antibacterial and antilarval compounds from marine gorgonian-associated bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SCSIO 00856, J. Antibiot. 63: 191-193.

[41] Mizobuchi, S., Kon-Ya, K., Adachi, K., Sakai, M. and Miki, W., 1994, Antifouling substances from a Palauan octocoral *Sinularia* sp., Fish. Sci. 60(3): 345-346.

[42] Miki, W., Kon-ya, K. and Mizubuchi, S., 1996, Biofouling and marine biotechnology: new antifoulants from marine invertebrates, Mar. Biotechnol. 4: 117-120.

[43] La Barre, S.C., Coll, J.C. and Sammarco, P.W., 1986, Defensive strategies of soft corals (Coelenterata: Octocorallia) of the Great Barrier Reef. II. The relationship between toxicity and feeding deterrence, Biol. Bull. 171(3): 565-576.

[44] Sammarco, P.W., La Barre, S. and Coll, J.C., 1987, Defensive strategies of soft corals (Coelenterate : Octocorallia) of the Great Barrier Reef III. The relationship between ichthyotoxicity and morphology, Oecologia 74: 93-101.

[45] Wisespongpand, P. and Kuniyoshi, M., 2003, Bioactive phloroglucinols from the brown alga *Zonaria diesingiana*, J. Appl. Phycol. 15: 225-228.