รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

ผลของน้ำสกัดจากหอยทราย *(Asaphis Violascens)* ต่อการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรีย

ทส
วิท 15
008157

โดย

กาญจนา จันทองจีน
ทวีศักดิ์ ปียะกาญจน์

2536

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ผลของน้ำสกัดจากหอยทราย (Asaphis violascens) ต่อการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรีย

โดย

กาญจนา จันทองจีน
ทวีศักดิ์ ปิยะกาญจน์

มีนาคม 2536

12 ก.พ. 2541

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างหอยทรายจากสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์และศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ในด้านความช่วยเหลือในการวิเคราะห์สารพิษด้วย HPLC ผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Kouichi Ohwada แห่ง Ocean Research Institute, University of Tokyo และ Professor Masaaki Kodama แห่ง Marine Biological Chemistry, School of Fisheries Sciences, Kitasato University ผู้วิจัยขอขอบคุณอย่างยิ่งมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้จนสามารถสำเร็จลุล่วงตามความมุ่งหมายทุกประการ

เลขหมู่ จฬ
วท 15
เลขทะเบียน 008157
วัน.เดือน.ปี 12 ต.ค. 37

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย ผลของน้ำสกัดจากหอยทราย (Asaphis violascens) ต่อการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรีย

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ กาญจนา จันทองจีน
ศาสตราจารย์ ดร.ทวีศักดิ์ ปิยะกาญจน์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มกราคม 2536

บทคัดย่อ

เนื่องจากแบคทีเรียที่ผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการมักสร้างสารพิษนี้ได้ในระดับต่ำได้ทดลองนำหอยทราย (Asaphis violascens) ซึ่งพบว่ามีพิษสูงในระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมิถุนายน และมีพิษต่ำในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคม มาทำน้ำสกัด (infusion) โดยไม่ใช้ความร้อนในการทำให้ปราศจากเชื้อเพื่อนำไปใช้เลี้ยงแบคทีเรียนี้ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาปัจจัยบางอย่างในหอยทรายที่มีพิษต่างกัน ซึ่งอาจมีผลต่อการสร้างสารพิษของแบคทีเรีย และอาจเป็นสาเหตุของการมีระดับพิษต่ำในห้องปฏิบัติการ ได้ทดลองนำน้ำสกัดหอยทรายแต่ละระยะมาผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ L-medium, น้ำทะเล+0.2% กลูโคส, และน้ำทะเลอย่างเดียว แล้วนำมาเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Vibrio sp. 4 สายพันธุ์ และ Micrococcus sp. 1 สายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ใน L-medium ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ วัดความสามารถในการกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธี mouse neuroblastoma tissue culture assay ผลการทดลองพบว่าทุกสายพันธุ์ที่เลี้ยงใน 50% น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง จะสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมที่มีความเป็นพิษสูงที่สุด จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าเชื้อเกือบทุกสายพันธุ์จะสร้างอนุพันธุ์ Tetrodotoxins ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดดังกล่าวนี้ จากผลการทดลองนี้จะสามารถกล่าวได้ว่า น่าจะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพิษจากหอยทรายที่มีอิทธิพลต่อส่วนประกอบของสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ปัจจัยดังกล่าวจะพบได้ในหอยทรายระยะพิษสูง และปัจจัยนี้ไม่สามารถสร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title Effects of Sand Clam (Asaphis violascens) infusion on bacterial production of sodium channel blocking substances

Name of the Investigators Assoc. Prof. Kanchana Juntongjin
Prof. Twesukdi Piyakarnchana

Year 1993

Abstract

According to the low toxicity levels of sodium channel blocker (SCB) usually produced by bacteria cultivated in the laboratory artificial medium, sand clams (Asaphis violascens) which contained alternately different toxicity levels, high level during January to June and low level during July to December in a year were selected to make infusion without heat sterilization for culturing bacteria. The purpose is to study some factors in different toxicity clams which may affect on bacterial toxin productions and also the causes of low activities in the laboratory productions. Each infusion extracted from two different toxicity-level clams were mixed into L-medium, seawater+0.2% glucose, and seawater only. Four strains of Vibrio spp. and a strain of Micrococcus sp. were cultivated in the three media above. Their productions of toxins were compared with those in the laboratory L-medium. SCB activities were detected by using the mouse neuroblastoma tissue culture assay. The results showed that all strains cultivated in 50% infusion of high toxicity clams plus seawater could produced the highest activities. HPLC analyses indicated that tetrodotoxin derivatives were produced in most of the strains cultivated in this medium. The results suggested that there should be some toxin production enhancing factors from sand clams which affected the toxin compositions produced by bacteria. The factors can especially be found in the clams during their high toxicity periods which have not been able to provide in the laboratory.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
บทนำและการสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีการวิจัย	4
ผลของการวิจัย	7
อภิปรายผลและข้อสรุป	16
ข้อเสนอแนะ	19
เอกสารอ้างอิง	20

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงระดับความเป็นพิษของสารสกัดจากหอยทรายทั้งสองระยะ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำสกัดแล้ว โดยแสดงเป็นค่า MU/g ของน้ำหนักแห้ง 8

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์อนุพันธุ์ของสารพิษที่ผลิตจากแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในน้ำทะเลผสม 50% น้ำสกัดหอยทรายที่ได้จากหอยระยะที่มีพิษสูง และระยะที่มีพิษต่ำ โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC.....13

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์อนุพันธุ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารพิษ ที่ผลิตจากแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงใน L-medium, L-medium+10% น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง, น้ำทะเล+กลูโคส+10%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง, น้ำทะเล+50%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง โดย HPLC.....14

รายการภาพประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ : L-medium (A); L-medium+10% น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงและต่ำ (B); น้ำทะเล+0.2%กลูโคส+10%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงและต่ำ (C); น้ำทะเล+50%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงและต่ำ (D)..... 9

รูปที่ 2 แสดงค่าสารกีดขวางช่องโซเดียม (SCB) ของเชื้อ 5 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง : L-medium (A); L-medium+10%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงและต่ำ (B); น้ำทะเล+0.2%กลูโคส+10%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงและต่ำ; น้ำทะเล+50%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงและต่ำ (D).....11

รูปที่ 3 แสดงค่าความสามารถในการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (SCB) ต่อแบคทีเรีย 1 เซลล์ เมื่อเลี้ยงเชื้อ 5 สายพันธุ์ ใน : L-medium (A); L-medium+10%น้ำสกัดพิษสูงและต่ำ (B); น้ำทะเล+0.2%กลูโคส+10%น้ำสกัดพิษสูงและต่ำ (C); น้ำทะเล+50%น้ำสกัดพิษสูงและต่ำ (D).....12

รูปที่ 4 โครมาโตแกรมบางส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารพิษโดย HPLC
1.) โครมาโตแกรมของ TTX_s (A) GTX_s (B) และ STX_s (C) มาตรฐาน
2.) โครมาโตแกรมตัวอย่างของสายพันธุ์ St-1-1(D) และสายพันธุ์ VIB 11 (G)
แสดงการวิเคราะห์ TTX_s, โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ GTX_s ของสายพันธุ์ Sp-H-2(E) และ VIB 11 (H) และโครมาโตแกรมการวิเคราะห์ STX_s ของสายพันธุ์ Sp-H-2(F) และสายพันธุ์ St-1-1(I) ทุกตัวอย่างได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำสกัดหอยทรายในระยะพิษสูงเป็นส่วนประกอบ.....16

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บริการการอ้างอิงทางวิชาการ

บทนำและการสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารกีดขวางช่องโซเดียม (Sodium channel blocking substances; SCB) เป็นสารพิษที่พบในสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่น ปลาปักเป้า ปลาหมึกบางชนิด ปลาดาว ปูบางชนิด หอยบางชนิด (Hashimoto et al., 1990; Simidu et al., 1987) และยังพบในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังบางชนิด เช่น กบ Newt (Nagamura & Yasumoto, 1985) สารพิษที่กีดขวางช่องโซเดียมดังกล่าวนี้ประกอบด้วยสารพิษในกลุ่ม Tetrodotoxins (TTX_s) และ Paralytic Shellfish Poisons (PSP)

การเกิดพิษทั้งสองกลุ่มในสัตว์ทะเลนี้แต่เดิมเป็นที่เข้าใจว่าเกิดขึ้นจากสัตว์นั้นสร้างพิษขึ้นเอง แต่ต่อมาความคิดดังกล่าวนี้ได้เปลี่ยนไป เนื่องจากมีผู้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างพิษชนิดนี้ได้จากสัตว์หลายชนิดทั้งชนิดที่มีพิษและไม่มีพิษ เช่น ปลาปักเป้า (Yotsu and Yasumoto, 1987), ปลาดาว (Narita et al., 1987) ปูมีพิษ (Xanthid crab) (Noguchi et al. 1986) ในประเทศไทย กาญจนา จันทองจีน (2533) ได้พบว่า สัตว์ทะเลหลายชนิดทั้งที่มีพิษและไม่มีพิษจะมีเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมอยู่ในร่างกาย นอกจากนี้การพบสารพิษจากในสัตว์หลาย ๆ ชนิดที่ไม่มีความใกล้ชิดกันทางด้านพันธุกรรม จึงอาจกล่าวได้ว่าสาเหตุที่ทำให้สัตว์มีพิษอาจมาจากแหล่งภายนอกร่างกายสัตว์ (Hashimoto et al., 1990)

หอยทราย (Asaphis violascens) เป็นหอยสองฝาที่มีพิษชนิดดังกล่าว หอยชนิดนี้พบว่ามีระดับความเป็นพิษไม่คงที่ในรอบปี กล่าวคือ ในระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมิถุนายนพบว่า ระดับความเป็นพิษจะสูง แต่ในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคมจะมีระดับความเป็นพิษต่ำ (Saitanu et al., 1992) กาญจนา จันทองจีน และทวีศักดิ์ ปิยะกาญจน์ (2534) พบว่า จำนวนแบคทีเรียที่สร้างพิษได้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพิษของหอยทรายเนื่องจากการพบจำนวนแบคทีเรียสร้างพิษในหอยทรายที่อยู่ในระยะพิษสูง มากกว่าจำนวนแบคทีเรียสร้างพิษในหอยทรายในระยะพิษต่ำอย่างเห็นได้ชัดเจนแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสร้างพิษน่าจะมีบทบาทในการทำให้หอยทรายมีพิษสูงขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าว และพบว่าแบคทีเรียที่สร้างพิษได้จากหอยทรายมีหลายสายพันธุ์ที่สามารถสร้างพิษได้ทั้งชนิด Tetrodotoxins และ Paralytic Shellfish toxins ซึ่งตรงกับที่ Saitanu et al. (1992) ได้รายงานว่า พิษในหอยทรายประกอบด้วยสารพิษใน 2 กลุ่มนี้เช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ได้มีหลักฐานสนับสนุนอื่น ๆ ที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียน่าจะเป็นสาเหตุของการเกิดพิษในสัตว์ เช่น ในกรณีของ Tetrodotoxins ที่มีในปลาปักเป้า พบว่าเมื่อนำปลาปักเป้าสายพันธุ์ที่มีพิษนี้ไปเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจะไม่พบการสร้างสารพิษนี้ในปลา แต่เมื่อนำปลากลับไปเลี้ยงในสภาวะธรรมชาติตามเดิมจะพบว่ามีการสร้างสาร Tetrodotoxins เกิดขึ้น (Yasumoto et al., 1986) ในกรณีของ Paralytic Shellfish Toxins ซึ่งพบในหอยสองฝา Kodama et al. (1990) ได้แยกเชื้อแบคทีเรีย Moraxella sp. ที่สร้างสารพิษชนิดนี้ได้จาก dinoflagellate Protogonyaulax tamarensis ซึ่งเป็น phytoplankton มีพิษที่ทราบกันดีว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดพิษในหอยสองฝา จากการพบแบคทีเรียนี้ทำให้ Kodama (1989) และ Kodama et al., (1990) พยายามแสดงหลักฐานที่สนับสนุนว่าแบคทีเรียน่าจะเป็นแหล่งของสารพิษชนิดนี้ โดยเขาได้พบว่าหอยพัด (Scallop) สามารถเกิดพิษขึ้นเองได้โดยไม่ต้องมี dinoflagellate ที่มีพิษอยู่ในบริเวณที่เพาะเลี้ยง

จนถึงปัจจุบันมีหลักฐานมากมายที่สนับสนุนว่าแบคทีเรียน่าจะมีส่วนในการทำให้เกิดพิษในสัตว์ หรือเป็นแหล่งของพิษที่จะเข้าไปสะสมอยู่ในสัตว์ ภาญจณา จันทองจีน และทวีศักดิ์ ปิยะกาญจน์ (2534) ได้แสดงผลการทดลองที่สนับสนุนว่า แบคทีเรียสร้างพิษอาจเข้าสู่ร่างกายหอยได้โดยตรงเนื่องจากหอยทรายเป็น filter feeder กินอาหารโดยการกรองตะกอนต่าง ๆ ซึ่งมีแบคทีเรียสร้างพิษอยู่แล้วเข้าไปสะสมทำให้เกิดพิษในร่างกาย ในระยะที่หอยมีพิษสูงจึงพบเชื้อแบคทีเรียในหอยปริมาณสูงและพบในดินตะกอนรอบบริเวณที่หอยทรายอยู่นั้นในปริมาณสูงด้วย ซึ่งแตกต่างจากช่วงพิษต่ำ ที่จำนวนแบคทีเรียสร้างพิษที่แยกจากในตัวหอยและในดินตะกอนจะมีปริมาณน้อยลงไปด้วยอย่างเห็นได้ชัด แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถจะบอกได้ว่าเหตุใดสัตว์หรือหอยสองฝาชนิดอื่นที่อยู่บริเวณเดียวกับหอยทรายและมีโอกาสกินอาหารที่มีแบคทีเรียสร้างพิษปนอยู่ด้วย เช่นเดียวกับหอยทรายจึงไม่มีพิษเกิดขึ้นในร่างกายเพียงแต่คาดการณ์ว่าสัตว์ที่ไม่พิษอาจมีกลไกบางอย่างในร่างกายที่แตกต่างจากสัตว์ที่มีพิษ

ในงานวิจัยนี้ ได้พยายามศึกษาถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกันระหว่างแบคทีเรียสร้างพิษ และสัตว์ที่มีพิษ โดยใช้หอยทรายซึ่งเป็นหอยสองฝามีพิษเป็นแบบในการทดลอง ปัญหาที่ผู้วิจัยจะสามารถตอบได้ในงานวิจัยนี้คือ

1. มีสารบางอย่างจากหอยทรายที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียสร้างพิษได้สูงขึ้นหรือไม่ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสร้างพิษในน้ำสกัดจากหอยทรายที่สกัดโดยวิธีที่ไม่ใช้สารเคมีแล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยไม่ใช้ความร้อน แล้วเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษของสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นกับการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารที่สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการ

2. หอยทรายในระยะพิษสูงจะมีสารบางอย่างที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างพิษในเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างจากหอยทรายในระยะพิษต่ำหรือไม่

3. เนื่องจากสารพิษที่ก็ดขวางช่องโซเดียมนี้มีทั้งพิษที่อยู่ในกลุ่ม Tetrodotoxins (TTX_s) ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธุ์ Tetrodotoxin (TTX) 4epi-tetrodotoxin (4-epiTTX) และ anhydrotetrodotoxin (anhTTX) และกลุ่ม Paralytic Shellfish Poisons (PSP) ซึ่งประกอบด้วยกลุ่ม Gonyautoxins (GTX_s) ที่มีอนุพันธุ์มากมายแต่จะวิเคราะห์อนุพันธุ์ Gonyautoxin 1 (GTX_1), Gonyautoxin 2 (GTX_2), Gonyautoxin 3 (GTX_3), Gonyautoxin 4 (GTX_4) และกลุ่ม Saxitoxins (STX_s) ซึ่งมีอนุพันธุ์ที่จะวิเคราะห์คือ Saxitoxin (STX) และ neosaxitoxin (neoSTX) แต่ละอนุพันธุ์ดังกล่าวจะมีระดับความเป็นพิษที่แตกต่างกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึงอนุพันธุ์ของสารพิษที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นด้วย โดยเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายที่มีพิษสูง เปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดหอยทรายที่มีพิษต่ำ

วิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่างหอยทราย

การเก็บตัวอย่างหอยทรายได้ทำเป็น 2 ระยะคือ

ในระยะที่หอยทรายมีพิษสูง ได้เก็บตัวอย่างหอยทรายจากบริเวณเกาะสีชังด้านที่ติดกับแผ่นดินใหญ่ จังหวัดชลบุรีในเดือนมีนาคม พ.ศ.2535 โดยใช้หอยขนาดลำตัวกว้าง 3-3.5 ซ.ม. และยาว 4-5 ซ.ม.

ในระยะที่หอยทรายมีพิษต่ำ ได้เก็บตัวอย่างในบริเวณเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว ในเดือนกันยายน พ.ศ.2534 และในเดือนกรกฎาคม พ.ศ.2535 โดยใช้หอยขนาดกว้างและยาวใกล้เคียงกับหอยทรายระยะพิษสูง

หอยตัวอย่างที่เก็บได้นำมาที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทันที แล้วทำการทดลองในขณะที่หอยยังไม่ตาย ซึ่งเป็นการป้องกันไม่ให้มีเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ทำให้เกิดการเน่ามาปนเปื้อน

การสกัดสารพิษจากเนื้อหอยทราย

เนื้อหอยทรายที่เก็บตัวอย่างมาทำน้ำสกัดจะถูกแบ่งเนื้อ นำมาสกัดสารพิษออกจากเนื้อหอยโดยตรงด้วยวิธี Methanol extraction และสกัดเอาไขมันออกโดยใช้ Chloroform ต่อจากนั้นจึงนำไปทดสอบคุณสมบัติการกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธี tissue culture assay (Kogure et al., 1988)

การทำน้ำสกัด (infusion) จากหอยทราย

หอยทรายที่เก็บตัวอย่างได้ทั้ง 2 ระยะ นำมาทำน้ำสกัดโดยวิธีเดียวกันดังต่อไปนี้

1. ล้างหอยทรายทั้งหมดด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง แล้วเปิดฝาล้างอีก 3 ครั้ง จึงแกะเนื้อหอยออกทั้งหมด

2. เติมน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อลงในเนื้อหอย โดยมีสัดส่วนเนื้อหอย 10 กรัมต่อน้ำทะเล 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer)

3. เนื้อหอยที่ได้ยังไม่ละเอียดมากพอ จึงนำไปทำให้ละเอียดอีกด้วยเครื่อง Ultrasonicator เป็นเวลา 12 นาที

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. นำเนื้อหอยที่มีลักษณะเหลวมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

5. แยกส่วนน้ำใสออกจากส่วนตะกอน นำส่วนน้ำใสนี้ไปกรองตามลำดับขั้นด้วยเครื่องกรอง membrane filter ที่มีขนาดของช่อง (pore size) 8, 5, 3, 1.2 ไมครอนตามลำดับ แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20°ซ. เป็นเวลา 1 คืน

6. นำออกจากตู้เย็น ทิ้งไว้ให้ละลาย แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

7. แยกส่วนน้ำใสออกจากส่วนตะกอน นำส่วนน้ำใสไปกรองด้วย membrane filter ที่มีขนาดช่อง 0.45 ไมครอน แล้วเก็บส่วนที่กรองได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20°ซ. เป็นเวลา 1 คืน

8. นำออกจากตู้เย็น ทิ้งไว้ให้ละลาย แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที อีกครั้ง

9. แยกส่วนน้ำใสออกจากตะกอน นำไปกรองด้วย membrane filter ที่มีขนาดช่อง 0.22 ไมครอน ส่วนที่กรองได้จะเป็นน้ำสกัดที่ปราศจากเชื้อ นำไปเก็บไว้ในภาชนะที่ปราศจากเชื้อแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°ซ. เพื่อใช้เป็นน้ำสกัดตั้งต้นสำหรับผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อตามเปอร์เซนต์ที่ต้องการ การทำน้ำสกัดหอยทรายทั้งพิษสูงและพิษต่ำจะใช้วิธีการเช่นเดียวกัน

10. นำสารสกัดจากหอยทรายทั้งระยะมีพิษสูง และระยะมีพิษต่ำมาทดสอบคุณสมบัติการกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธี tissue culture assay

การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตสารพิษ

โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตสารพิษได้คือ Vibrio sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ และ Micrococcus sp. 1 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิดคือ

A L- medium (กรัม/ลิตร:NaCl 17.53, $MgSO_4.7H_2O$ 2.46, K_2HPO_4 1, Polypeptone 5, yeast extract 5, Glucose 2, Distilled water 1 ลิตร, pH 7.5-7.6)

B L-medium+10%น้ำสกัดหอยทราย

C น้ำทะเล+0.2%glucose+10%น้ำสกัดหอยทราย

D น้ำทะเล+50%น้ำสกัดหอยทราย

การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำสกัดหอยทรายลงไป 10% นั้น ได้เลือกใช้เพียงความเข้มข้นเดียวคือ 10% เนื่องจากไม่มีน้ำสกัดจำนวนมากพอที่จะนำไปหาความเข้มข้นที่เหมาะสมได้ จึงได้ใช้วิธีการคาดคะเนโดยคิดจากปริมาณของ peptone และ yeast extract ที่ใส่ลงไป

ใน L-medium เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนและ growth factor จำนวนทั้งสิ้น 10 กรัมต่อลิตร หรือ 1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร หอยทรายที่นำมาสกัดเป็นน้ำสกัดสำหรับใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 100 มิลลิลิตร ก็มีน้ำหนัก 1 กรัมเช่นเดียวกัน

ส่วนปริมาณกลูโคสที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ C นั้น ใช้ปริมาณ 0.2% เท่ากับปริมาณของกลูโคสใน L-medium เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมให้กับเชื้อแบคทีเรีย

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ D ใช้น้ำสกัด 50% ซึ่งหมายถึงใช้น้ำสกัด 50 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำทะเลอีก 50 มิลลิลิตร แสดงว่าในอาหารทั้งสิ้น 100 มิลลิลิตร จะมาจากเนื้อหอยทรายที่ใช้สกัด 5 กรัม ซึ่งเป็นน้ำหนักโดยเฉลี่ยของเนื้อหอยเปียก 1 ตัว

อาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดจะทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี tissue culture assay ก่อน จึงใส่เชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดซึ่งมีปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อโดยการเขย่าในเครื่องเขย่าที่ปรับอุณหภูมิ 28°ซ. ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

วัด Optical Density ที่ 660 nm. แล้วเก็บเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.3 M NaCl เพื่อขจัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจติดมากับเซลล์

การสกัดสารพิษจากภายในเซลล์ของแบคทีเรีย

โดยใช้ Ultrasonication เป็นเวลา 6 นาที ในขณะที่เซลล์แบคทีเรียแช่อยู่ใน 0.1% acetic acid แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเศษเซลล์ออก จะได้สารพิษปนอยู่กับสารที่เป็นส่วนประกอบภายในของเซลล์ นำไปทำให้แห้งโดย freeze dryer

การทดสอบคุณสมบัติการกีดขวางช่องโซเดียม (Sodium channel blocking activity)

โดยใช้สารตัวอย่างความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 mg/10 ul โดยให้สารที่อยู่ในลักษณะเป็นผงละลายในน้ำกลั่นสองครั้งที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นดังกล่าว ใช้วิธี tissue culture assay (Kogure et al., 1988) โดยใช้ neuroblastoma cells และสารเคมี 2 ชนิดคือ 10 mM Ouabain เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ Na^+ - K^+ ATPase และ 1 mM Veratridine เป็นสารที่ทำให้ Na^+ influx เข้าไปภายในเซลล์ สารกีดขวางช่องโซเดียมจะเข้าไปขวางที่ช่องโซเดียมทำให้ neuroblastoma cells สามารถรอดชีวิตได้เมื่อได้รับสารเคมีทั้งสอง ถ้าสารนั้นมีความเป็นพิษสูงจะสามารถทำให้เซลล์จำนวนมากต้านฤทธิ์ของสารเคมีและมีชีวิตรอดได้มาก การวัดปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมใช้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์เปรียบเทียบกับสารพิษ

มาตรฐานแล้วคำนวณเปรียบเทียบเป็นค่า Mouse Unit (MU) 1 MU หมายถึงปริมาณสารที่ทำให้หนูหนัก 20 กรัม ตายใน 30 นาที หลังจากฉีดเข้าทางช่องท้อง

การวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธ์อยู่ในสารกีดขวางช่องโซเดียม

นำตัวอย่างสารพิษที่ทดสอบคุณสมบัติการกีดขวางช่องโซเดียมแล้วพบว่ามีความเป็นพิษอยู่ในระดับสูงมาวิเคราะห์เพื่อหาชนิดของอนุพันธุ์ที่เป็นส่วนประกอบโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์หาอนุพันธ์ของ Paralytic Shellfish Toxins ซึ่งได้แก่ Gonyautoxins (GTX_5) และ Saxitoxins (STX_5) ตามวิธีของ Oshima et al. (1989) และวิเคราะห์หาอนุพันธุ์ของ Tetrodotoxins (TTX_5) ตามวิธีของ Yasumoto & Michishita (1985) โดยเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสาร GTX_5, STX_5 และ TTX_5 มาตรฐาน

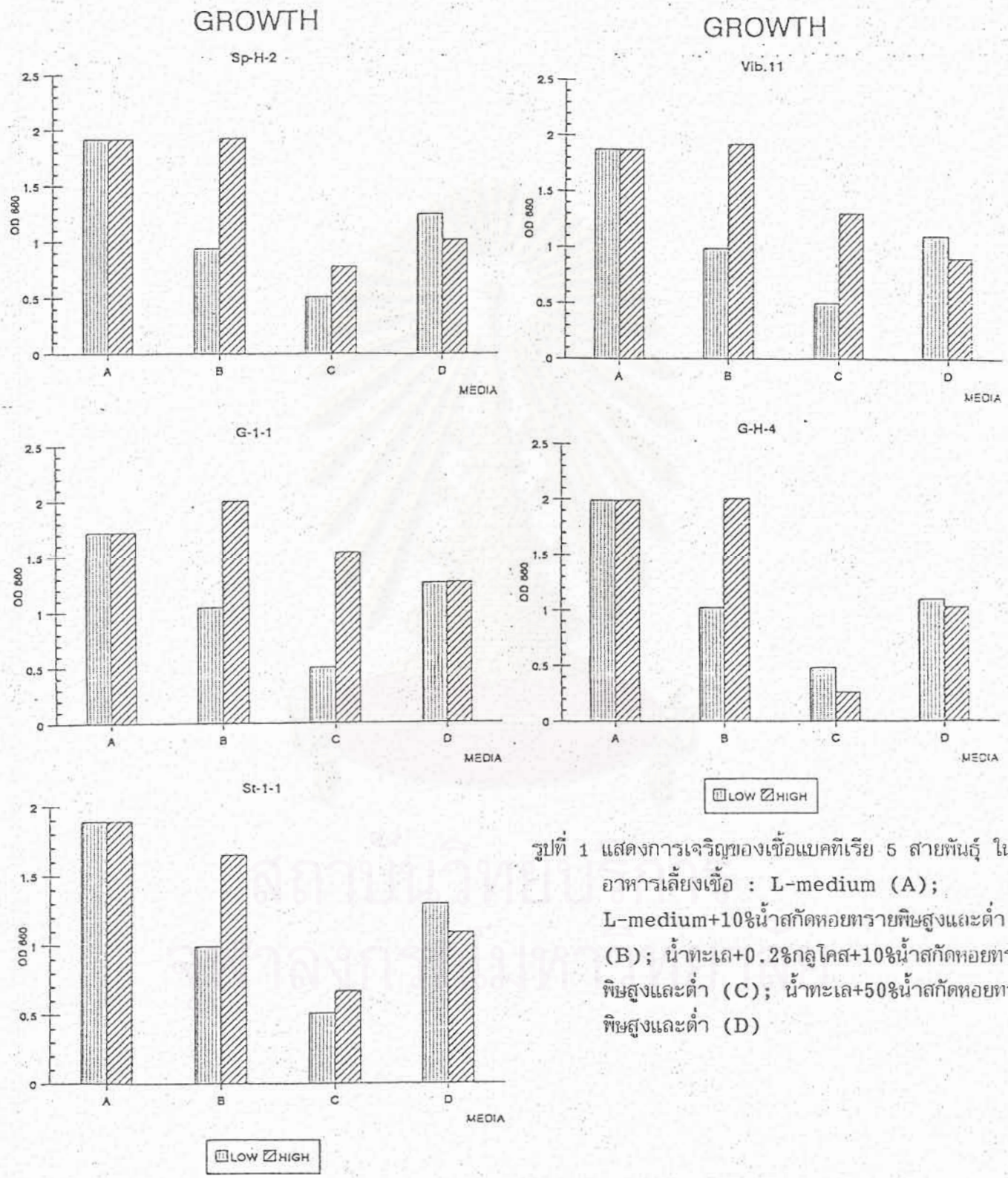
ผลการวิจัย

ในการทดสอบความเป็นพิษจากคุณสมบัติการกีดขวางช่องโซเดียมของน้ำสกัดจากหอยทรายและสารที่สกัดจากเนื้อหอยโดยวิธี methanol extraction เพื่อทดลองว่าเป็นไปตามที่คาดไว้หรือไม่ พบว่า ในน้ำสกัดและในเนื้อหอยที่เก็บตัวอย่างในช่วงพิษสูง จะแสดงผลของการมีสารกีดขวางช่องโซเดียมจริงทั้งสองวิธี แต่ในตัวอย่างที่เก็บในช่วงที่หอยมีพิษต่ำจะไม่พบว่ามีความเป็นพิษในการกีดขวางช่องโซเดียมเลย นอกจากนี้เมื่อนำเอาน้ำสกัดมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่าทั้งน้ำสกัดที่ได้จากหอยทรายระยะพิษสูงไม่มีความเป็นพิษที่สามารถตรวจสอบได้ ทั้งนี้เนื่องจากได้นำมาทำให้เจือจางลงโดยผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อนั่นเอง ความเป็นพิษของน้ำสกัดและเนื้อหอยรวมทั้งความเป็นพิษในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำสกัดแล้ว แสดงเป็น Mouse unit/gram (MU/g) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงระดับความเป็นพิษของสารสกัดจากหอยทรายทั้งสองระยะ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำสกัดแล้ว โดยแสดงเป็นค่า Mu/g ของน้ำหนักแห้ง

ตัวอย่างที่ทดสอบ	ความเป็นพิษ (Mouse unit/g)
น้ำสกัดหอยทรายระยะพิษต่ำ (10 ก.:100 มล.น้ำทะเล)	0
น้ำสกัดหอยทรายระยะพิษสูง (10 ก.:100 มล.น้ำทะเล)	7.8
เนื้อหอยทรายระยะพิษต่ำสกัดด้วย methanol	0
เนื้อหอยทรายระยะพิษสูงสกัดด้วย methanol	7.5
L-medium+10%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง (B)	0
น้ำทะเล+0.2%กลูโคส+10%น้ำสกัดหอยพิษสูง (C)	0
น้ำทะเล+50%น้ำสกัดหอยพิษสูง (D)	0

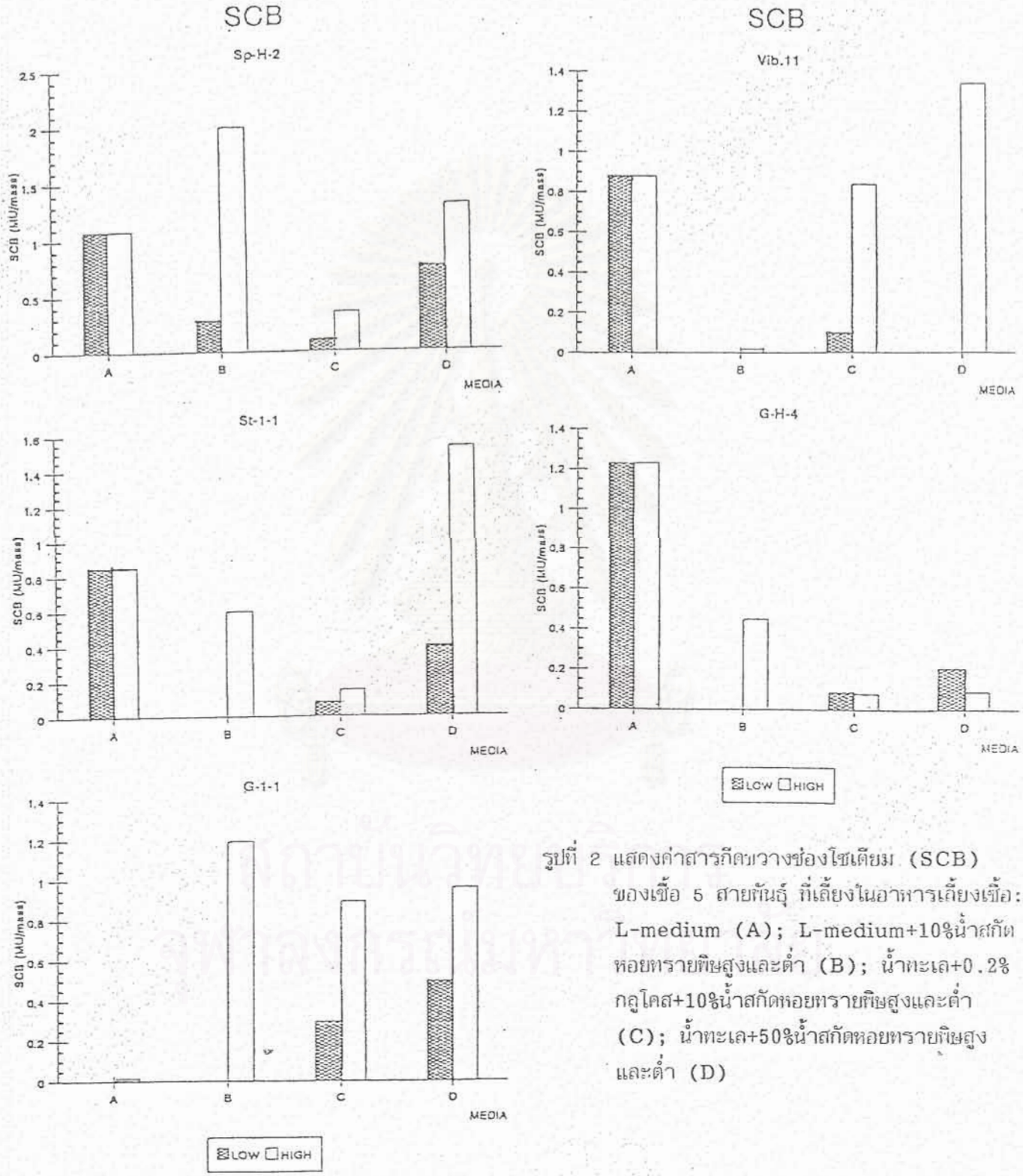
เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อ L-medium ซึ่งไม่มีน้ำสกัดเลย และอาหารเลี้ยงเชื้อ B, C และ D ซึ่งมีน้ำสกัดทั้งที่ได้จากหอยทรายในระยะพิษสูงและในระยะพิษต่ำผสมอยู่ พบว่าการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ให้ผลดังรูปที่ 1 แบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดมีการเจริญสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อ l-medium และ L-medium+น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง ส่วนน้ำสกัดหอยทรายทั้งสองระยะเมื่อผสมกับน้ำทะเลพบว่า เชื้อแบคทีเรียเจริญได้ในอาหารทั้งสองนี้ใกล้เคียงกัน ในอาหารชนิดอื่นการเจริญมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ : L-medium (A); L-medium+10%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงและต่ำ (B); น้ำทะเล+0.2%กลูโคส+10%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงและต่ำ (C); น้ำทะเล+50%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงและต่ำ (D)

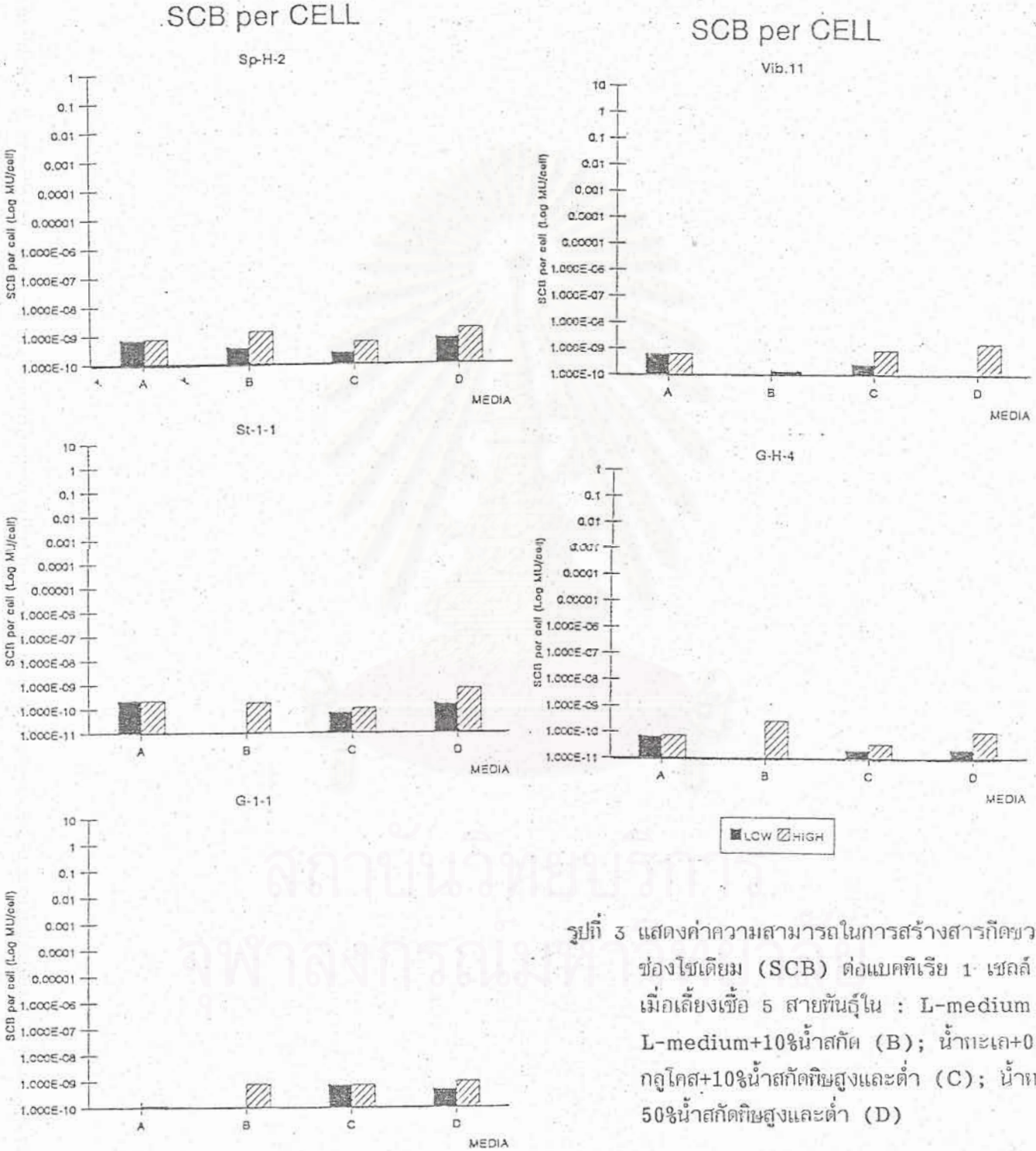
ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (Sodium channel blocker or SCB) เชื้อผลิตขึ้นคิดเป็นจำนวน MU/mass ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร พบว่าเชื้อที่เลี้ยงใน 50% น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง จำนวน 4 สายพันธุ์ จะผลิต SCB ได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงใน L-medium ส่วนเชื้อที่เลี้ยงใน L-medium+10% น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงจะผลิต SCB ได้สูงกว่าเชื้อที่เลี้ยงใน L-medium+10% น้ำสกัดหอยทรายพิษต่ำจำนวน 4 สายพันธุ์เช่นกัน ส่วนเชื้อที่เลี้ยงใน น้ำทะเล+0.2% กลูโคส+10% น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงจำนวน 4 สายพันธุ์ก็สามารถผลิต SCB ได้สูงกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารนี้ที่ผสมกับน้ำสกัดหอยทรายพิษาต่ำ (รูปที่ 2)

ได้ทดลองนำค่า OD ที่วัดได้ไปคาดคะเนกับผลการทดลองที่ได้นับจำนวนเซลล์โดยวิธี Viable count (ข้อมูลไม่ได้แสดง) แล้วสามารถคำนวณหาจำนวนเซลล์โดยประมาณจากค่า OD ที่วัดนี้ได้ พบว่าเมื่อนำจำนวนเซลล์ไปคำนวณเพื่อหาค่าสาร SCB/cell พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสาร SCB เมื่อเลี้ยงใน 50% น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงใน 50% น้ำสกัดหอยทรายพิษต่ำ ใน L-medium+10% น้ำสกัดและในน้ำทะเล+0.2% กลูโคส+10% น้ำสกัดก็ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 2 แสดงค่าสารภีดขวางช่องโซเดียม (SCB) ของเชื้อ 5 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ: L-medium (A); L-medium+10%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงและต่ำ (B); น้ำทะเล+0.2% กลูโคส+10%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงและต่ำ (C); น้ำทะเล+50%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงและต่ำ (D)

1174387283



รูปที่ 3 แสดงค่าความสามารถในการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (SCB) ต่อแบคทีเรีย 1 เซลล์ เมื่อเลี้ยงเชื้อ 5 สายพันธุ์ใน : L-medium (A) L-medium+10%น้ำสกัด (B); น้ำทะเล+0.2% กลูโคส+10%น้ำสกัดพิษสูงและต่ำ (C); น้ำทะเล+50%น้ำสกัดพิษสูงและต่ำ (D)

ได้ทดลองนำสารพิษตัวอย่างจากการผลิตของเชื้อทั้งที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำสกัดที่มีพิษสูง และที่มีน้ำสกัดพิษต่ำ เฉพาะบางตัวอย่างที่ให้ระดับความเป็นพิษที่สูงและค่อนข้างสูง ไปวิเคราะห์โดยใช้ HPLC โดยวิเคราะห์หาอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารพิษนี้ ซึ่งจะวิเคราะห์หาสาร 3 กลุ่ม คือ Tetrodotoxins, Gonyautoxins และ Saxitoxins ในตารางที่ 2 เป็นการเปรียบเทียบอนุพันธุ์ของสารพิษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในน้ำทะเล+50% น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง และพิษต่ำ เพื่อวิเคราะห์ว่าพิษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในน้ำสกัดพิษสูงจะมีอนุพันธุ์ใดที่ได้รับผลจากน้ำสกัดหอยทรายพิษสูงบ้าง

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารพิษที่ผลิตจากแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในน้ำทะเลผสม 50% น้ำสกัดหอยทรายที่ได้จากหอยระยะที่มีพิษสูงและระยะที่มีพิษต่ำ โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC

อาหารเลี้ยงเชื้อ	สายพันธุ์	TTX	epiTTX	anhTTX	GTX_1	GTX_2	GTX_3	GTX_4	STX	neoSTX
	Sp-H-2	+	+	-	-	+	+	-	-	-
น้ำทะเล+	St-1-1	+	+	-	-	-	+	-	-	-
50%น้ำสกัดหอย	G-1-1	+	+	+	-	-	+	-	+	-
ทรายระยะพิษสูง	VIB 11	+	-	-	+	+	+	-	-	-
	G-H-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Sp-H-2	-	+	-	+	-	+	-	+	+
น้ำทะเล+	St-1-1	-	-	-	-	-	+	-	-	+
50%น้ำสกัดหอย	G-1-1	-	-	+	+	-	+	-	-	+
ทรายระยะพิษต่ำ	VIB 11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	G-H-4	-	+	-	+	-	+	-	+	+

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากตัวอย่างสารพิษหมด

\+ หมายถึง พบสารอนุพันธุ์

\- หมายถึง ไม่พบสารอนุพันธุ์

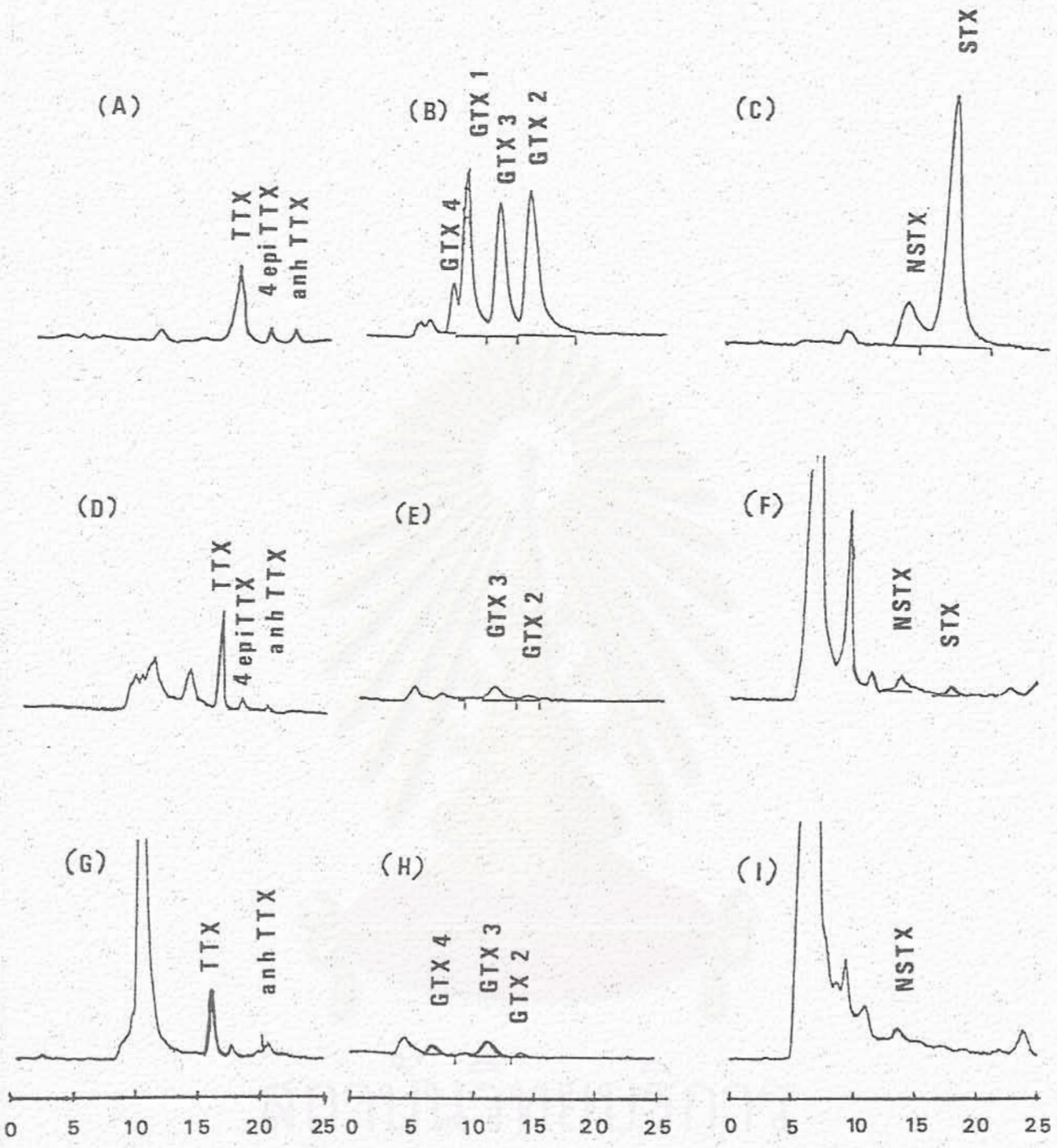
ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์อนุพันธุ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารพิษที่ผลิตจากแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่เลี้ยงใน L-medium, L-medium+10% น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง, น้ำทะเล+กลูโคส+10%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง, น้ำทะเล+50%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง โดย HPLC

อาหารเลี้ยงเชื้อ	สายพันธุ์	TTX	epiTTX	anhTTX	GTX_1	GTX_2	GTX_3	GTX_4	STX	neoSTX
L-medium	Sp-H-2	+	-	+	-	-	-	-	-	+
	St-1-1	+	-	+	+	-	+	-	-	+
	G-1-1	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	VIB 11	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	G-H-4	-	-	-	+	+	+	-	-	+
L-medium	Sp-H-2	-	-	+	+	+	+	-	-	+
+10%น้ำสกัด	St-1-1	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	G-1-1	-	-	+	+	+	-	-	+	+
	VIB 11	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	G-H-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
น้ำทะเล+	Sp-H-2	+	-	-	-	-	-	+	+	+
กลูโคส+	St-1-1	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10%น้ำสกัด	G-1-1	+	-	-	-	+	+	+	-	-
	VIB 11	+	-	-	-	-	+	-	-	-
	G-H-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
น้ำทะเล+	Sp-H-2	+	+	-	-	+	+	-	-	-
50%น้ำสกัด	St-1-1	+	+	-	-	-	+	-	-	-
	G-1-1	+	+	+	-	-	+	-	+	-
	VIB 11	+	-	-	+	+	+	-	-	-
	G-H-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากตัวอย่างสารพิษหมด
\+ หมายถึง พบสารอนุพันธุ์
\- หมายถึง ไม่พบสารอนุพันธุ์

นอกจากนี้ได้ทดลองเปรียบเทียบสารอนุพันธุ์ที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่ผสมกับน้ำสกัดหอยทรายพิษสูง จะเห็นว่าเมื่อใช้ปริมาณน้ำสกัด 50% จะพบว่ามีอนุพันธุ์ TTX ที่ได้รับอิทธิพลจากน้ำสกัดนี้เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดสร้างสารพิษที่มี TTX เป็นส่วนประกอบ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำสกัด 10% ไม่ได้รับอิทธิพล (ตารางที่ 3)

การวิเคราะห์ด้วย HPLC ในกลุ่ม TTX_s, GTX_s และ STX_s ได้แสดงตัวอย่างโครมาโตแกรมของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 โครมาโตแกรมบางส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์อนุพันธุ์ของสารพิษโดย HPLC

1.) โครมาโตแกรมของ TTX_s(A) GTX_s(B) และ STX_s(C) มาตรฐาน

2.) โครมาโตแกรมตัวอย่างของสายพันธุ์ St-1-1(D) และสายพันธุ์ VIB 11(G) แสดงการวิเคราะห์ TTX_s โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ GTX_s ของสายพันธุ์ Sp-H-2(E) และ VIB 11(H) และโครมาโตแกรมการวิเคราะห์ STX_s ของสายพันธุ์ Sp-H-2(F) และสายพันธุ์ St-1-1(I) ทุกตัวอย่างได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำสกัดหอยทรายในระยะพิษสูงเป็นส่วนประกอบ

การอภิปรายผลและข้อสรุป

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 จะเห็นว่าความเป็นพิษของน้ำสกัดหอยทรายที่ความเข้มข้น 10 กรัมเนื้อหอย:100 มิลลิลิตรน้ำทะเล เป็นไปตามที่คาดไว้ คือน้ำสกัดจากหอยทรายพิษต่ำจะไม่มีความเป็นพิษที่สามารถพบได้โดยการทดสอบด้วย tissue culture assay รวมทั้งเนื้อหอยที่สกัดพิษโดยใช้วิธี methanol extraction ก็ให้ผลตรงกัน ส่วนในน้ำสกัดหอยทรายพิษสูง ก็จะแสดงความเป็นพิษที่ใกล้เคียงกับเนื้อหอยที่สกัดด้วย methanol เช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำสกัดหอยทรายไปผสมน้ำทะเลเท่าตัว พบว่าความเป็นพิษลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ ดังนั้นจึงถือว่าในน้ำทะเล+50%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง ไม่มีความเป็นพิษ และไม่น่าจะมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้โดยการที่พิษติดเซลล์แบคทีเรียเข้าไปโดยตรง และนอกจากนี้หลังจากเก็บเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารนี้แล้วจะได้ทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.3M NaCl ซึ่งจะเป็นการล้างเอาส่วนของอาหารที่อาจติดมากับเซลล์ออกไปด้วย

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด พบว่า L-medium และ L-medium+10% น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงจะมีการเจริญสูงใกล้เคียงกัน และสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกสองชนิด แต่สิ่งที่แปลกคือ L-medium+10% น้ำสกัดหอยทรายพิษต่ำ มีการเจริญของเชื้อในอาหารชนิดนี้ต่ำกว่าใน L-medium แต่พบว่าการเจริญจะใกล้เคียงกันในน้ำทะเล+50% น้ำสกัดทั้งสองชนิด แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของหอยทรายทั้งสองระยะเมื่อมีสารอินทรีย์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าไปรวมด้วยอาจมีผลให้เกิดสารประกอบบางอย่างที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญได้ไม่ดีในหอยทรายพิษต่ำ ทั้งนี้ได้สังเกตจากอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำทะเล+0.2% กลูโคส+10% น้ำสกัดทั้งสองระยะก็ให้ผลทำนองเดียวกันนี้ ในเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่ทดลอง (รูปที่ 1) อย่างไรก็ดีการเจริญในน้ำทะเล+50% น้ำสกัด โดยไม่มีสารอินทรีย์เข้าไปผสมพบว่าจะใกล้เคียงกันในหอยทรายพิษสูงและพิษต่ำ อาจวิเคราะห์ถึงสาเหตุได้ว่าอาจเนื่องมาจากสารที่อยู่ในน้ำสกัดหอยทรายพิษต่ำและกลูโคสเมื่ออยู่ด้วยกัน

ถ้าเปรียบเทียบความเป็นพิษที่เชื้อแบคทีเรียสร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด โดยเปรียบเทียบกับ L-medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจะพบว่า (รูปที่ 2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ L-medium+10%น้ำสกัด พบว่าในน้ำสกัดพิษสูงเชื้อบางสายพันธุ์จะสร้างพิษได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงด้วย L-medium เพียงอย่างเดียว แต่เชื้อบางสายพันธุ์ก็สร้างพิษต่ำมาก และถ้าเป็น L-medium+10%น้ำสกัดพิษต่ำ เชื้อทุกสายพันธุ์จะสร้างพิษได้ต่ำมาก ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าความสมบูรณ์ของอาหารที่มากจะทำให้การสร้างพิษที่ลดลง และจะเห็นว่าเชื้อมีการเจริญสูงมากใน L-medium+น้ำสกัดพิษสูงจึงอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อเชื้อเจริญมาก ทำให้การสร้างสารพิษลดลง

ในน้ำทะเล+กลูโคส+10%น้ำสกัด พบว่าในน้ำสกัดพิษสูงเชื้อทุกสายพันธุ์จะสร้างพิษได้พอ ๆ กับใน L-medium และสายพันธุ์ G-1-1 ก็สามารถสร้างพิษได้ในขณะที่ถ้าเลี้ยงด้วย L-medium จะให้ความเป็นพิษที่ต่ำมาก ส่วนในน้ำสกัดพิษต่ำเชื้อ 4 สายพันธุ์จะสร้างพิษได้หมดแต่อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงด้วย L-medium แสดงว่า การให้กลูโคสผสมในน้ำสกัดที่ผสมน้ำทะเลยังไม่สามารถที่จะช่วยให้มีการสร้างสารพิษได้สูงขึ้น แต่น้ำสกัดหอยทรายมีพิษสูงจะแสดงการมีส่วนร่วมในการสร้างสารพิษได้ดีกว่า

ในน้ำทะเล+50%น้ำสกัด พบว่าในน้ำสกัดพิษสูงเชื้อทุกสายพันธุ์จะสร้างสารที่มีความเป็นพิษได้สูงที่สุด แต่ในขณะเดียวกันการเจริญของเชื้อจะต่ำเมื่อเทียบกับเชื้อที่เลี้ยงใน L-medium ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำสกัดพิษต่ำ จะเห็นว่าเชื้อทุกสายพันธุ์จะสร้างสารที่มีความเป็นพิษต่ำกว่าใน L-medium ยกเว้นสายพันธุ์ G-1-1 เท่านั้นที่สร้างพิษได้สูงกว่าใน L-medium มาก

เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของสารพิษ (ตารางที่ 2, 3) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าสิ่งที่น่าสังเกตคือ ทุกสายพันธุ์จะสามารถสร้าง TTX ได้หมดเมื่อเลี้ยงใน 50% น้ำสกัดหอยทรายพิษสูง นอกจากนี้ในอาหารอื่น เช่น L-medium+10%น้ำสกัดหอยทรายพิษสูงก็จะมีการสร้างอนุพันธุ์ anhTTX ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็น TTX ได้ ในทุกสายพันธุ์ ส่วนในน้ำทะเล+กลูโคส+น้ำสกัดพิษสูงก็จะมีการสร้างอนุพันธุ์ TTX ได้หลายสายพันธุ์ จึงอาจเป็นไปได้ว่าน้ำสกัดหอยทรายพิษสูงจะมีบทบาทในการสร้างสารพิษในแบคทีเรีย ส่วนในสารพิษกลุ่มอื่นคือ GTX_3 พบว่าเชื้อสร้าง GTX_3 ได้ทุกสายพันธุ์เมื่อถูกเลี้ยงด้วยน้ำสกัดพิษสูงและพิษต่ำ แต่ในอาหารอื่นที่มี 10%น้ำสกัดผสมอยู่จะแสดงไม่ชัดเจน ซึ่งอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของน้ำสกัดมีน้อยเกินไป ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าน้ำสกัดจากหอยทรายพิษสูงจะมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เชื้อสร้างสารพิษในกลุ่ม TTX_3 ได้มากขึ้น และในน้ำสกัดทั้งที่ได้จากหอยทรายพิษสูงและพิษต่ำอาจมีบทบาทในการกระตุ้นให้เชื้อสร้างสารพิษ GTX_3 แต่องค์ประกอบที่เป็นตัวกระตุ้นนั้นอาจเป็นองค์ประกอบที่คนละชนิดกันกับองค์ประกอบที่กระตุ้นให้สร้าง TTX

สิ่งที่น่าสังเกตคือ การเจริญของเชื้อแบคทีเรียพบว่า ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญสูง จะพบว่าสารพิษที่ได้มีความเป็นพิษที่ไม่สูง ในการใช้ 50%น้ำสกัดหอยทรายพบว่าการเจริญของเชื้อต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงใน L-medium มาก แต่ความเป็นพิษจะสูงกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในเซลล์แบคทีเรียในสภาพที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์น้อย จะมีการเจริญต่ำแต่สามารถสร้างสารพิษที่มีความเป็นพิษสูงจะเห็นจากปริมาณ SCB/cell สูงดังแสดงในรูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าในแต่ละเซลล์ของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงไปสภาพที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติที่มีอยู่ในตัวหอยที่สุด คือมีน้ำ

สกัดถึง 50% เซลล์จะมีประสิทธิภาพในการสร้างสารพิษที่มีระดับความเป็นพิษสูง (รูปที่ 3) ยิ่งกว่านั้นพบว่าสารพิษที่ได้จากเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงใน 50%น้ำสกัดจะมีสารอื่นที่เซลล์สร้างขึ้นเป็นส่วนประกอบ (cellular component) ที่ปะปนมากับสารพิษน้อย ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าสารพิษที่สกัดจากเชื้อที่เลี้ยงในอาหารนี้ไม่มีความจำเป็นต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Sep-Pak C_{18} cartridge ก่อนที่จะฉีดเข้าในเครื่อง HPLC และพบว่าพีค (peak) ที่ปรากฏในโครมาโตแกรมมีส่วนที่เป็นของสารอื่นอยู่น้อย ซึ่งตรงกันข้ามกับเชื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารที่อุดมสมบูรณ์ เช่น L-medium พบว่ามีพีคของส่วนที่เป็นสารอื่นที่เชื้อสร้างปะปนมาอยู่ด้วยจำนวนมาก และสารที่สกัดจากเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงสภาวะแบบนี้จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Sep-Pak C_{18} cartridge

อย่างไรก็ตามผลการทดลองในรูปที่ 3 ถึงแม้ว่าค่า SCB/cell ของการเลี้ยงเชื้อใน 50% น้ำสกัดพิษสูง จะสูงกว่าค่า SCB/cell เมื่อเลี้ยงใน L-medium แต่ค่าไม่สูงกว่ามาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสร้างพิษของเชื้อแบคทีเรียในตัวหอยทรายในธรรมชาติยังมีอีกหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ, ความเค็ม, pH และปัจจัยอื่นที่ยังไม่ทราบในตัวหอยมีอิทธิพลต่อเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ไม่สามารถทำให้เหมือนได้ในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ดีผลการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลที่แสดงถึงอิทธิพลของสัตว์ที่จะเกิดพิษชนิดกีดขวางช่องโซเดียมต่อการสร้างพิษชนิดเดียวกันนี้ในเชื้อแบคทีเรีย

ดังนั้นอาจกล่าวโดยสรุปได้ว่า ความเป็นพิษของหอยทรายจะมีส่วนร่วมในการทำให้เชื้อแบคทีเรียสร้างสารพิษได้สูงขึ้นอย่างแน่นอน โดยเฉพาะในฤดูที่หอยมีพิษสูง การมีส่วนรวมนี้อาจเกิดได้ 2 ทางคือเมื่อหอยทรายได้รับปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างพิษเข้าสู่ร่างกายจำนวนมากกว่าในฤดูที่มีพิษต่ำ (กาญจนา จันทองจีนและทวีศักดิ์ ปิยะกาญจน์, 2534) จึงเกิดการสะสมแบคทีเรียสร้างพิษในร่างกายจำนวนมาก และแบคทีเรียที่อยู่ในร่างกายหอยอาจได้รับสารบางอย่างในหอยที่มีผลทำให้เชื้อสามารถสร้างสารพิษที่มีความเป็นพิษสูงขึ้นกว่าสภาพปรกติได้ จึงมีผลทำให้หอยทรายในฤดูพิษสูง มีปริมาณสารพิษในร่างกายสูงมากกว่าในฤดูอื่น นอกจากนี้ผลของสารบางอย่างในหอยที่มากระตุ้นการสร้างพิษในเชื้อแบคทีเรียพบว่า จะมีอิทธิพลต่อการสร้าง TTX_s มากที่สุด

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สนับสนุนความคิดที่ว่าเชื้อแบคทีเรียมีส่วนร่วมในการเกิดพิษในสัตว์ทะเลโดยใช้หอยทรายเป็นสัตว์ในการทดลอง เนื่องจากหอยทรายเป็นหอยสองฝาที่มีพิษถึงแม้ว่าระดับความเป็นพิษจะไม่สูงถึงขั้นทำให้คนที่บริโภคหอยเข้าไปแล้วตายก็ตาม สิ่งที่น่าสงสัยคือหอยสองฝาชนิดอื่นที่อยู่ในบริเวณเดียวกับหอยทรายและเป็น filter feeder เช่นเดียวกับหอยทราย ดังนั้นย่อมจะกรองกินเชื้อแบคทีเรียสร้างพิษจากสิ่งแวดล้อมเข้าไป แต่หอยเหล่านั้นก็ไม่มีพิษ ดังนั้นสิ่งที่ควรวิจัยในขั้นต่อไปคือ มีสภาวะใดในหอยอื่น ๆ ที่แตกต่างจากหอยทรายที่ทำให้เมื่อได้รับแบคทีเรียสร้างพิษเข้าสู่ร่างกายแล้ว แต่หอยนั้นคงสภาพไม่มีพิษ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. กาญจนา จันทองจีน. (2533). แบคทีเรียทะเลที่สร้างเทโทรโดท็อกซิน (tetrodotoxin): การแยกเชื้อ การหาเชื้อ และการหาท็อกซินโดยวิธี tissue culture assay. รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช. 11-20.

2. กาญจนา จันทองจีน และทวีศักดิ์ ปิยะกาญจน์. (2534). แบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในหอยทรายมีพิษที่เก็บจากบริเวณเกาะสีชัง. รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช. 10-26.

3. Hashimoto, K., Noguchi, T. and Watabe, S. (1990). New aspects of tetrodotoxin. Microbial Toxins in Foods and Feeds. Edited by AE Pohland et al., Plenum Press, New York, 575-588.

4. Kodama, M. (1989). Possible association of paralytic shellfish toxins-producing bacteria with bivalve toxicity. A collection of invited papers presented at the Seventh International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Tokyo, Japan, 16-19 August 1988. page 391-398.

5. Kodama, M., Ogata, T., Sato, S. and Sakamoto, S. (1990). Possible association of marine bacteria with paralytic shellfish toxicity of bivalves. Marine Ecology Progress Series. Vol.61, 203-206.

6. Kogure, K., Tamplin, M.L., Simidu, U. and Colwell, R.R. (1988). A tissue culture assay for Tetrodotoxin, Saxitoxin and Related toxins. Toxicon, Vol.26, 191-197.

7. Nagamura, M. and Yasumoto, T. (1985). Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. Toxicon 23, 271.

8. Narita H., Matsubara, S., Miwa, N., Akahane, S., Murakami, M., Goto, T., Nara, M., Noguchi, T., Sato, T., Shida, Y., Hashimoto, K. (1987). Vibrio alginolyticus, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish Astropecton polycanthus. Nippon Suisan Gakkaishi. 53:617-621.

9. Noguchi, T., Seon, J.K., Arakawa, O., Sugita, H., Deguchi, Y., Shida, Y. and Hashimoto, K. (1986). Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in Vibrio sp. isolated from the intestines of a Xanthid crab, A tergatis floridus. J. Biochem. 99, 311-314.

10. Oshima, Y., Sugino, K. and Yasumoto, T. (1989). Latest advance in HPLC analysis of Paralytic shellfish toxins. Mycotoxins and Phycotoxin' 88, S. Natori, K. Hashimoto and Y. Ueno (eds.). Elsevier, Amsterdam, 319-326.

11. Saitanu, K., Wisessang, S., Yongvanich, T., Piyakarnchana, T., Ogata, T., Sato, S. and Kodama, M. (1991). Occurrence of toxins similar to paralytic shellfish toxins and tetrodotoxin in Green Mussel (Perna viridis) and Sand Clam (Asaphis violascens) which are not associated with toxic dinoflagellates. *Recent Advance in Toxinology Research*, vol.2. Edited by P. Gopalakrishnakone and C.K. Tan, Venom and Toxin Research Group, National University of Singapore, Singapore

12. Simidu, U., Noguchi, T., Hwang, D-F, Shida, Y. and Hashimoto, K. (1987). Marine bacteria which produce tetrodotoxin. Appl. Envir. Microbiol. 53, 1714.

13. Yasumoto, T. and Michishita, T. (1985). Fluorometric Determination of TTX by HPLC. Agric. Biol. Chem., 49, 3077-3080.

14. Yasumoto, T., Yasumura, D., Yotsu, M., Michishita, T., Endo, A. and Kotaki, Y. (1986). Bacterial production of tetrodotoxin. Agric. Biol. Chem. 50, 793-795.

15. Yotsu, H. and Yasumoto, T. (1987). Production of tetrodotoxin and its derivatives by Pseudomonas sp. isolated from the skin of a puffer fish. Toxicon 25, 225.