บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

สารกีดขวางช่องโซเดียมจากแบคทีเรียทะเล *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยทราย (*Asaphis violascens*) บริเวณเกาะสีชัง อ่าวไทย พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงและเมื่อตรวจสอบอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่แบคทีเรียสร้างขึ้นด้วยวิธี HPLC พบทั้งสารกลุ่มอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินและกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (Juntongjin et al., 1996) และนันทวัน ฤทธิ์เดช (2539) ได้ศึกษาองค์ประกอบของอาหารและภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในระดับขวดเขย่า

จากผลการทดลองสกัดสารกีดขวางช่องโซเดียมจากภายในเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีความเป็นพิษสูงกว่าภายในเซลล์ ทั้งนี้เพราะสารพิษที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นพิษรวม 227.2090 MUต่อลิตร (ความเป็นพิษจำเพาะ 0.0125 MUต่อมก.) มีค่ามากกว่าความเป็นพิษรวมของสารพิษจากเซลล์ซึ่งมีค่า 13.3234 MUต่อลิตร (ความเป็นพิษจำเพาะเท่ากับ 0.0096 MUต่อมก.) อาจเกิดจากการที่เซลล์สร้างและสะสมสารนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่สูงกว่าหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารพิษที่อยู่ในรูปอนุพันธ์ที่มีความเป็นพิษมากกว่า สอดคล้องกับรายงานของ Kodama (1989) ที่พบว่าเมื่อนำแบคทีเรีย *Moraxella* sp. ที่แยกจากไดโนแฟลกเจลเลต *P. tamarensis* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ marine broth ไม่สามารถตรวจพบความเป็นพิษภายในเซลล์แบคทีเรียแต่สามารถพบได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยงเชื้อนี้ในอาหาร heart infusion medium

เพื่อเป็นการศึกษาสมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่แบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 สร้างขึ้น จึงต้องมีการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์ การหาวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้บริสุทธิ์เปรียบเทียบระหว่าง 2 แบบคือ แบบที่ 1 การใช้ผงถ่านกัมมันต์ดูดซับสารพิษและผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 และแบบที่ 2 การใช้คอลัมน์ไบโอเจล พี 2 และคอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 ซึ่งวิธีการในแบบที่ 1 สารพิษที่มีหมู่กัวนิดิเนียมภายในโมเลกุลหรือบางอนุพันธ์มีหมู่อื่น เช่น หมู่ซัลโฟคาร์บาโมอิล (Sulfocarbamoyl group) ทำให้เกิดสภาพที่มีขั้วในโครงสร้างภายในโมเลกุลและถูกดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ และเมื่อใช้ตัวชะที่เหมาะสมคือ

สารละลายกรดน้ำส้ม 1 เปอร์เซนต์ในเอทธานอลเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ (Narita et al., 1981 ; Noguchi et al., 1984) ก็จะสามารถแยกสารพิษออกมาจากผงถ่านกัมมันต์ จากการทดลองใช้ผงถ่านกัมมันต์ 2 ชนิดคือ ผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Sigma chemical, USA และผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Riedel-de- Haën , Germany ในการดูดซับสารพิษ พบว่าผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Sigma ให้ปริมาณสารพิษที่สกัดได้มากกว่าการใช้ผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Riedel-de- Haën เมื่อวัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำสุดท้ายที่ใช้ล้างผงถ่านกัมมันต์ทั้งสองชนิดเห็นได้ว่า น้ำล้างผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Riedel-de- Haën มีสภาพเป็นกรดมากกว่าผงถ่านกัมมันต์ของบริษัท Sigma แสดงว่าผงถ่านกัมมันต์ที่มีสภาพเป็นกรดน้อยกว่าจะทำให้สกัดสารพิษได้ดีกว่า และนอกจากนั้นเมื่อเตรียมสารละลายสารพิษตั้งต้นให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในการใช้ผงถ่านกัมมันต์ดูดซับสารพิษ พบว่าเปอร์เซนต์ความเป็นพิษที่สกัดได้ก็เพิ่มขึ้นด้วย ทั้งนี้สันนิษฐานว่าที่ความเข้มข้นน้อยๆ โมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของสารพิษมีมากกว่าโอกาสที่สารพิษจะสัมผัสกับผงถ่านกัมมันต์มีน้อยกว่าทำให้ถูกดูดซับได้น้อยกว่าสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งมีโมเลกุลของน้ำล้อมรอบน้อยกว่า ในการทดลองนี้ใช้ปริมาณผงถ่านกัมมันต์ประมาณ 10 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ของสารละลายสารพิษ ได้เปอร์เซนต์ความเป็นพิษของสารสกัดสูงสุดประมาณ 21 เปอร์เซนต์ มีการสูญเสียพิษไปมาก ดังนั้นจึงได้ทดลองใช้ผงถ่านกัมมันต์ดูดซับสารพิษในอัตราส่วน น้ำหนักผงถ่านกัมมันต์ต่อปริมาตรสารละลายสารพิษเป็น 1 ต่อ 2 และทำการดูดซับ 2 ครั้ง พบว่าสามารถสกัดสารพิษได้ เปอร์เซนต์ความเป็นพิษเพิ่มขึ้นเป็น 84.08 เปอร์เซนต์ สารพิษที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.68 เท่า ซึ่งเทคนิคการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์นี้นิยมใช้เป็นขั้นตอนแรกในการทำให้สารกึ่งบริสุทธิ์ เนื่องจากสามารถใช้เทคนิคนี้กับสารได้ปริมาณมากด้วย เช่น Narita และคณะ (1981) ใช้เป็นขั้นตอนหนึ่งในการทำให้เทโทรโดทอกซินจาก trumpet shell , *Charonia sauliae* มีความบริสุทธิ์คงเหลือความเป็นพิษ 85.56% นอกจากนั้น Noguchi และคณะ (1984) ได้นำไปใช้ในการทำให้สารพิษจาก gastropod mollusk (*Tutufa lissostoma*) มีความบริสุทธิ์ได้สารสกัดสารพิษจากขั้นตอนนี้เหลือเปอร์เซนต์ความเป็นพิษ 71.43 เปอร์เซนต์

ต่อจากนั้นนำสารพิษที่สกัดจากผงถ่านกัมมันต์ไปผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 ซึ่งแยกสารออกจากกันได้โดยอาศัยหลักการแยกสารที่มีขนาดต่างกัน คอลัมน์นี้จะสามารถแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลช่วง 100 - 2000 ดาลตัน (daltons) ได้ จากผลการทดลองในรูปที่ 6 ตรวจพบความเป็นพิษที่ลำดับส่วนที่ 17-19 และลำดับส่วนที่ 25-28 และจากการวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์ด้วยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีสพบสารพิษที่อาจเป็นอนุพันธ์ GTX 4 และGTX 2 ที่ลำดับส่วนที่ 17-19 ส่วนลำดับส่วนที่ 25-28 ไม่พบการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เมื่อตรวจหาชนิดอนุพันธ์ด้วยวิธีอิเลกโทรโฟรีซิสทั้งสองระบบ สันนิษฐานว่าสารอาจอยู่ในรูปอื่นที่ไม่ใช่รูปอนุพันธ์ของสารพิษที่สามารถใช้ระบบตรวจ

สอบ 2 ระบบนี้ได้ แต่อย่างไรก็ดีสารที่อยู่ในลำดับส่วนที่ 25-28 นี้มีผลในการกีดขวางช่องโซเดียมเมื่อตรวจสอบความเป็นพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สรุปผลการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์โดยวิธีการในแบบที่ 1 พบว่าสามารถทำให้สารพิษมีความบริสุทธิ์ขึ้น 21.6 เท่า ได้สารพิษที่มีความเป็นพิษจำเพาะ 0.1726 MUต่อมก. ความเป็นพิษเหลืออยู่หลังทำให้บริสุทธิ์เท่ากับ 21.83 เปอร์เซนต์ ซึ่งตรงกับผลงานของ Kodama, Ogata และ Sato (1988) ซึ่งใช้เทคนิคในแบบที่ 1 ในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมสกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่แยกจาก ไดโนแฟลกเจลเลต *Protogonyaulax tamarensis* พบว่าเทคนิคดังกล่าวนี้ไม่เหมาะสมในการทำให้สารพิษจากเซลล์แบคทีเรียมีความบริสุทธิ์เพราะทำให้เสียสารพิษในแต่ละขั้นตอนมาก

วิธีการทำให้สารพิษมีความบริสุทธิ์แบบที่ 2 ได้นำสารสกัดสารพิษไปผ่านคอลัมน์ไบโอเจลพี 2 ในขั้นตอนนี้สามารถทำให้สารพิษมีความบริสุทธิ์ขึ้นได้ 4.9 เท่าและพบสารพิษที่คล้ายอนุพันธ์ GTX 4 และ GTX 2 ในลำดับส่วนที่ 25-28 และเมื่อนำลำดับส่วนเหล่านี้รวมกันและนำไปผ่านคอลัมน์ซีเอ็มเซฟาเด็กซ์ ซี 25 ที่เป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคบวก (cation exchanger) นั้น สารพิษที่มีหมู่กัวนิดิเนียมภายในโมเลกุลทำให้มีประจุเป็นบวกจะถูกจับโดยตัวกลางชนิดนี้ ในขั้นตอนนี้จึงสามารถกำจัดสารที่มีประจุเป็นลบได้ นอกจากนั้นเมื่อใช้ตัวชะคือเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 ถึง 0.4 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 สามารถแยกสารที่มีประจุต่างกับสารพิษมากๆออกไปได้เช่นกัน ในการใช้คอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 นี้ สารพิษถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตประมาณ 0.15ถึง0.20 โมลาร์ เปรียบเทียบกับรายงานการใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุภาคบวกชนิดอื่นในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์ เช่น ไบโอเร็กซ์ 70 ซึ่งสารพิษจะถูกชะออกมาด้วยกรดน้ำส้มเข้มข้น 0.10-0.15 นอร์มัล (Kodama et al., 1983 ; Noguchi et al., 1984) จากการทดลองขั้นนี้ได้สารพิษที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 65.5 เท่า เหลือความเป็นพิษ 35.87 เปอร์เซนต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.3 เท่า สูญเสียสารพิษไป 18.23 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบจากขั้นตอนการใช้คอลัมน์ไบโอเจล พี 2 ซึ่งถือได้ว่าเทคนิคขั้นนี้ทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจากแบคทีเรียมีความบริสุทธิ์ขึ้นและไม่สูญเสียสารพิษมากไป เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิคนี้ในการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจากสัตว์บริสุทธิ์ เช่น Narita และคณะ (1981) เมื่อใช้คอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25ต่อจากการใช้เทคนิคดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ในการทำให้เทโทรโดทอกซินจาก trumpet shell, *Charonia sauliae* บริสุทธิ์ หลังจากผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 ได้สาร

พิษมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 22 เท่า และสูญเสียสารพิษ 14.0 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับขั้นการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการทำให้บริสุทธิ์ทั้งสองแบบ เห็นได้ว่าแต่ละขั้นตอนมีส่วนในการทำให้สารมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นทั้งสิ้นคือ การใช้ขั้นตอนดูดซับสารพิษด้วยผงถ่านกัมมันต์ก่อนผ่านคอลัมน์ ไบโอเจล พี2 จะช่วยทำให้ความบริสุทธิ์ของสารที่ผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 เพิ่มขึ้นประมาณ 16.7 เท่า การใช้คอลัมน์ไบโอเจลจะช่วยแยกสารโมเลกุลใหญ่ๆออกไปได้ และการใช้คอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 ต่อจากคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 จะช่วยทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น นอกจากนั้นวิธีการทั้งสองแบบสามารถแยกสารได้อนุพันธ์ของสารพิษคล้ายกัน แสดงว่าเทคนิคต่างๆไม่มีผลต่อการแยกอนุพันธ์ เนื่องจากในการทดลองขั้นนี้ใช้สารสกัดจากภายในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อรวมกัน เพื่อให้ได้สารพิษที่แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สร้างขึ้นทั้งหมดใช้ใน การเปรียบเทียบวิธีการทำให้บริสุทธิ์ทั้งสองแบบ จึงได้รวมเทคนิคทั้ง 3 ขั้นตอนมาใช้ในการทำให้สารพิษจากแบคทีเรียสายพันธุ์ St-1-1 มีความบริสุทธิ์

การทำสารกีดขวางช่องโซเดียมจากเซลล์และจากอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความบริสุทธิ์ โดยนำสารพิษสกัดจากเซลล์ไปผ่านการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ได้สารพิษมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อผ่านขั้นตอนนี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า และเมื่อนำสารพิษจากแหล่งทั้งสองไปผ่านคอลัมน์ไบโอเจลพี 2 สารสกัดจากเซลล์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.7 เท่า มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.4 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการสกัดสารพิษจากเซลล์แบคทีเรียนั้นมีขั้นตอนทำให้เซลล์แตกและปั่นแยกเก็บส่วนน้ำใสมาทำให้แห้งโดยวิธีระเหิดแห้ง ซึ่งอาจมีส่วนประกอบภายในเซลล์ซึ่งมีขนาดเล็กใกล้เคียงกับโมเลกุลของสารพิษปนมาในสารสกัด คอลัมน์ไบโอเจลพี 2 จะช่วยแยกส่วนประกอบของเซลล์เหล่านั้นออกไปทำให้ได้สารพิษมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นมาก แต่ในสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อการสกัดสารพิษเริ่มโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปต้ม ดังนั้นโปรตีนบางส่วนจะถูกทำลายไป ต่อมาจึงสกัดด้วยเมทธานอล methanol extraction เป็นการแยกสารพิษที่สามารถละลายในเมทธานอลด้วยขั้นหนึ่ง ดังนั้นเมื่อนำไปผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 ความบริสุทธิ์เมื่อเทียบกับสารสกัดตั้งต้น จึงเพิ่มขึ้นน้อยกว่าสารสกัดจากเซลล์ ผลการวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธ์ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซีส พบว่าสารพิษจากภายในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเชื้อมีชนิดอนุพันธ์ของสารพิษที่คล้ายกัน อาจเป็นอนุพันธ์กลุ่มพิษอัมพาตจากหอย คือ GTX4 และอนุพันธ์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้มากกว่า GTX3 เมื่อวิเคราะห์ด้วยอิเลคโตรโฟริซีส ซึ่งอาจเป็น GTX2 แต่ยังไม่สามารถสรุปได้แน่นอนเนื่องจากการสารมาตรฐาน GTX2 ไม่เกิดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ และการที่สารมาตรฐาน GTX2 ไม่เรืองแสงนั้นอาจ

เกิดจากการเปลี่ยนรูปของอนุพันธ์ GTX2 ไปเป็น GTX3 ในระหว่างการเก็บรักษา เนื่องจากทั้งสองอนุพันธ์นี้เป็น epimer กัน มีการเปลี่ยนรูปกลับไปมาได้ ทำให้อนุพันธ์ GTX2 มีเหลือน้อยเกินที่จะตรวจสอบพบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซีส มีหลักฐานจาก Lassus และคณะ (1993) พบว่าอัตราส่วนของGTX2ต่อGTX3มีการเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลาของการตรวจสอบความเป็นพิษของหอยที่ปนเปื้อนพิษจากไดโนแฟลกเจลเลต *A. tamarense* ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนนี้มีข้อสันนิษฐานได้หลายอย่าง คือ

1. เกิดจากเอนไซม์เปลี่ยนรูปของอนุพันธ์ GTX1 และ GTX4 ไปเป็น GTX2 และ GTX3
2. การปล่อย GTX1 และ GTX4 ในระยะแรกของการปนเปื้อน และมีแนวโน้มในการสะสม GTX2 และ GTX3
3. การไฮโดรไลส์อนุพันธ์ GTX8 และ epi GTX8 ซึ่งเป็นสารพิษที่ไม่รุนแรง(weakly toxic) และเป็นสารพิษกอนิออทอกซินที่พบมากใน *A. tamarense* สายพันธุ์นี้ (MOG 835) ไปสร้าง GTX2 และ GTX3

จากเหตุผลทั้งสามข้อสรุปได้ว่า อาจมีการเปลี่ยนรูปอนุพันธ์ของสารพิษในระหว่างการเก็บรักษาและการทดลองได้

นอกจากนั้นยังสังเกตได้ว่าเมื่อสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี 2 แล้วตรวจพบลำดับส่วนที่มีความเป็นพิษอีกส่วนหนึ่งได้โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.2 เท่า และในการทดลองเปรียบเทียบวิธีทำให้บริสุทธิ์ทั้งสองแบบในตอนต้นก็พบเช่นนี้ การที่พบความเป็นพิษนี้ไม่น่าเกิดจากความผิดพลาดของวิธีตรวจสอบพิษโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพราะสามารถพบได้ทั้งสองครั้ง จึงอาจเป็นไปได้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียสร้างพิษชนิดนี้มีสารพิษหรือสารที่คล้ายสารพิษอีกชนิดหนึ่งซึ่งแบคทีเรียสร้างขึ้นและปล่อยออกมาสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ให้ผลทางบวกกับวิธีตรวจสอบทางชีวภาพแต่ไม่ให้ผลต่อวิธีการตรวจโดยอิเลคโทรโฟรีซิสทั้งสองระบบอนุพันธ์ที่ใช้อยู่ ในรายงานผลการวิจัยของเบญจมาภรณ์ รุ่งพิทักษ์ไชย (2538) พบว่าในน้ำสกัดหอยทรายระยะพิษสูงมีสารบางชนิดที่มีผลไปส่งเสริมให้แบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูงและสร้างพิษต่ำสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงขึ้นแต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษ และสารนี้ไม่พบในน้ำสกัดหอยทรายในระยะพิษต่ำและน้ำสกัดจากหอยไม่มีพิษ หรืออาจมีสารจากหอยทรายไปเปลี่ยนรูปสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของสารพิษที่มีความเป็นพิษเพิ่มขึ้น ซึ่งสารจากแบคทีเรียที่กล่าวถึงนั้นอาจอยู่ในลำดับส่วนที่ตรวจพบนี้ นอกจากนั้นผลการทดลองพบว่าสารจากแบคทีเรียในลำดับส่วนเหล่านี้ออกมาหลังอนุพันธ์กลุ่ม

กอนิออทอกซินซึ่งเป็นสารพิษที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 400 ดาลตัน ดังนั้นสารในลำดับส่วนหลังต้องมีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่า 400 สอดคล้องกับการศึกษาของ วรพรรณี พจนสุนทร (2539) ที่พบสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 300 ดาลตัน ในหอยทรายและแบคทีเรียที่ให้เป็นอาหารเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี LC-MS

ในขั้นต่อไปนำสารพิษจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อถูกนำไปผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม เซฟาเด็กซ์ ซี 25 พบว่าสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นพิษจำเพาะมากกว่าสารพิษจากเซลล์ และเมื่อนำสารพิษที่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นั้นไปตรวจสอบชนิดของอนุพันธ์อีกครั้งโดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส พบอนุพันธ์ GTX4 เพียงชนิดเดียว และไม่พบอนุพันธ์อื่น ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่อนุพันธ์อื่นมีเหลือปริมาณน้อยจนไม่อาจตรวจพบโดยวิธีดังกล่าวหรืออาจมีการเปลี่ยนแปลงรูปอนุพันธ์

ผลการศึกษาสมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน GTX4 ซึ่งเป็นสารที่ตรวจพบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสในขั้นตอน สุดท้าย พบว่าสารพิษจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St--1-1 มีความเป็นพิษจำเพาะน้อยกว่าสารมาตรฐาน GTX4 ที่ผลิตจากไดโนแฟลกเจลเลตมาก และสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นพิษจำเพาะสูงกว่าสารพิษจากภายในเซลล์ สอดคล้องกับรายงานของ Kodama Ogata และ Sato (1983) ว่าการสร้างพิษโดยแบคทีเรียที่แยกได้จาก *P. tamarensis* จะมีค่าต่ำกว่าในไดโนแฟลกเจลเลตชนิดนี้ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการอยู่ร่วมกันแบบเกื้อกูลหรือพึ่งพา (symbiosis or parasitism)ของแบคทีเรียที่ต้องอาศัย *P. tamarensis* ช่วยทำให้แบคทีเรียสามารถสร้างสารพิษได้สูงขึ้น

ปรากฏการณ์เช่นนี้น่าจะคล้ายกับแบคทีเรีย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ต้องอาศัยสารจากหอยทรายมาทำให้แบคทีเรียสร้างพิษได้สูงขึ้น อีกเหตุผลหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือในแบคทีเรียสร้างสารที่อยู่ในรูปสารพิษในปริมาณน้อยสารส่วนใหญ่อยู่ในรูปสารที่คล้ายสารพิษเมื่อแบคทีเรียอยู่ตามลำพัง แต่ถ้าจะสร้างสารที่มีความเป็นพิษสูงขึ้นต้องอาศัยสารจาก host มาเปลี่ยนรูปเพื่อให้ได้สารอนุพันธ์ที่มีพิษสูงขึ้น

เมื่อทดสอบความเสถียรของสารพิษที่ทำให้บริสุทธิ์ในสภาวะความเป็นกรดด่างพบว่าสารพิษที่คล้าย GTX4 จากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมีสมบัติการทนอุณหภูมิ 100°ซ ได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน GTX4 ในสภาพกรด คือ pH 3 เนื่องจากสารพิษจะคงสภาพความเป็นพิษได้ถึง 3 ชั่วโมงในขณะที่ต้มที่อุณหภูมิ 100 °C แต่จะเสียสภาพความเป็นพิษอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ใน

สภาพสารละลายที่เป็นด่าง ซึ่งตรงกับคุณสมบัติของสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยที่กล่าวไว้โดย Evan (1972) ว่าสารในกลุ่มนี้จะเสถียรในสารละลายกรดแต่จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วในสารละลายด่าง

เมื่อทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิที่สภาพกรดด่างเท่ากับ 3 สารพิษจากเซลล์ยังคงความเป็นพิษได้ดีกว่าสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 80 °ซ และเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 100 °ซ สารพิษจากเซลล์ทนต่อความร้อนได้ดีที่สุดและใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน GTX4 สารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อทนต่อความร้อนได้น้อยที่สุด และสารพิษทั้งหมดเสียสภาพที่อุณหภูมิ 100 °ซ เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชม. แต่ที่อุณหภูมิ 80 °ซ สารพิษจากเซลล์ยังเหลือความเป็นพิษเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าสารพิษจากเซลล์น่าจะมีความเป็นพิษใกล้เคียงกับ GTX4 แต่สารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นสารที่มีส่วนประกอบของอนุพันธ์อื่นปะปนอยู่ หรืออาจมีโมเลกุลที่มีโครงสร้างแตกต่างไปจากสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยเล็กน้อย ซึ่งโดยทั่วไปจะเป็นสารที่มีสมบัติในการทนต่อความร้อน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย