บทที่ 3

ผลการทดลอง

ผลการทดสอบการสร้างสารพิษของแบคทีเรีย และหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม เพื่อนำมาใช้เตรียมเชื้อแบคทีเรียตามกำหนดเวลาที่มีการสะสมสารพิษได้สูงสุดภายในเซลล์ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

แบคทีเรียตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ที่แยกได้จาก หอยทราย, หอยกระปุก, ทราย และน้ำทะเล โดยศึกษาในช่วงเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับผลการทดสอบพบว่า *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากหอยทรายสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ปริมาณสูงสุดภายในเซลล์ เท่ากับ 3.2564 ไมโครกรัมต่ออาหารเหลว 1 ลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง *B. cereus* และ *C. paurometabolum* ที่แยกได้จากหอยทรายและหอยกระปุกสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้เท่ากับ 0.7817 และ 0.0414 ไมโครกรัมต่ออาหารเหลว 1 ลิตรภายในเวลา 72 และ 96ชั่วโมงตามลำดับ ส่วน *C. matruchotii* ที่แยกได้จากทรายไม่พบว่ามีการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมดังแสดงในตารางที่ 3.

ตารางที่ 3 การเจริญ และปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (SCB) ที่สร้างโดยแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว

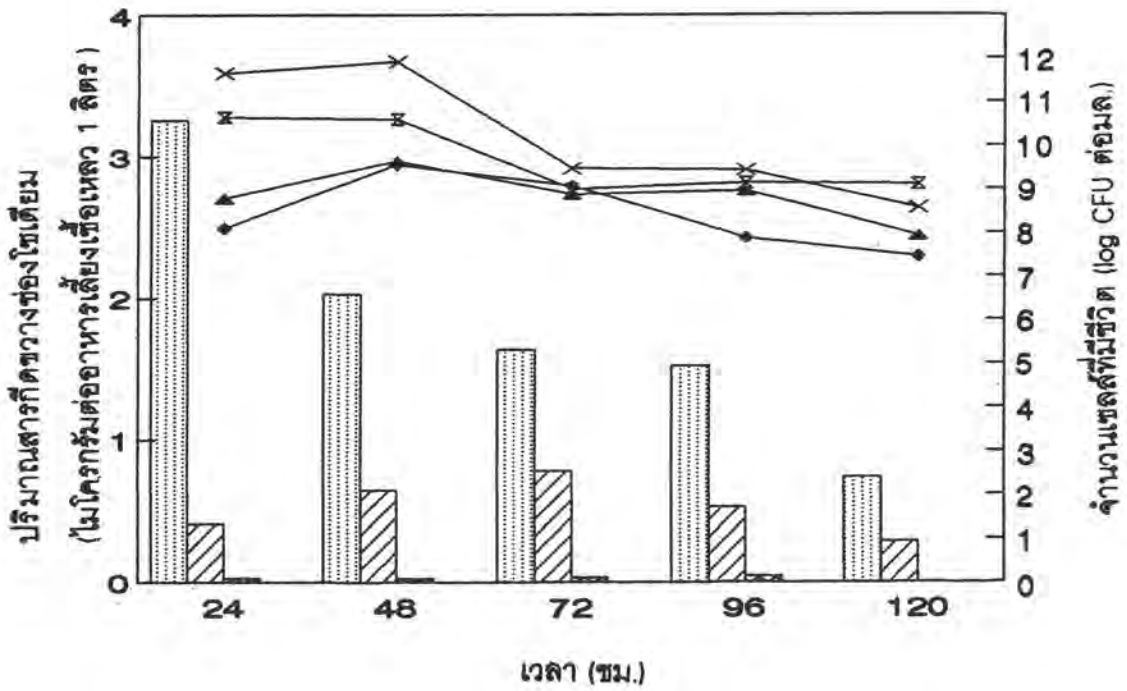
แบคทีเรีย	ระยะเวลา (ชม.)	pH	[1]จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/มล.)	[2]ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (μg/อาหารเหลว 1ลิตร)
V. alginolyticus	24	7.80	$4.7x10^{11}$	3.2564
	48	8.29	$8.6x10^{11}$	2.0311
	72	8.83	$3.0x10^{8}$	1.6358
	96	8.80	$2.8x10^{9}$	1.5193
	120	9.06	$3.7x10^{8}$	0.7390
B. cereus	24	6.99	$1.3x10^{8}$	0.4092
	48	7.79	$3.7x10^{8}$	0.6455
	72	8.53	$1.2x10^{9}$	0.7817
	96	8.69	$7.8x10^{7}$	0.5251
	120	9.07	$2.9x10^{7}$	0.2865
C. paurometabolum	24	7.76	$6.3x10^{8}$	0.0264
	48	8.15	$4.5x10^{9}$	0.0244
	72	8.42	$7.7x10^{8}$	0.0310
	96	8.47	$9.2x10^{8}$	0.0414
	120	8.31	$8.6x10^{7}$	0
C. matruchotii	24	7.02	$4.6x10^{10}$	0
	48	7.97	$4.1x10^{10}$	0
	72	8.03	$1.0x10^{9}$	0
	96	8.35	$1.4x10^{9}$	0
	120	8.84	$1.3x10^{9}$	0

หมายเหตุ

[1] จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต (CFU, colony forming unit) บนอาหารแข็ง ORI เมื่อทำการนับจำนวนแบคทีเรียบนจานเพาะเชื้อ

[2] ค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ที่ยังมีชีวิตกับปริมาณสารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน(ภาคผนวก ค ข้อ 1)เมื่อใช้สารเทโทรโดทอกซินเป็นตัวแทนของสารกีดขวางช่องโซเดียม

เมื่อนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมภายในเซลล์ต่ออาหารเหลว 1 ลิตรและจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต กับระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบในเชื้อแต่ละชนิดแสดงผลดังรูปที่ 7.



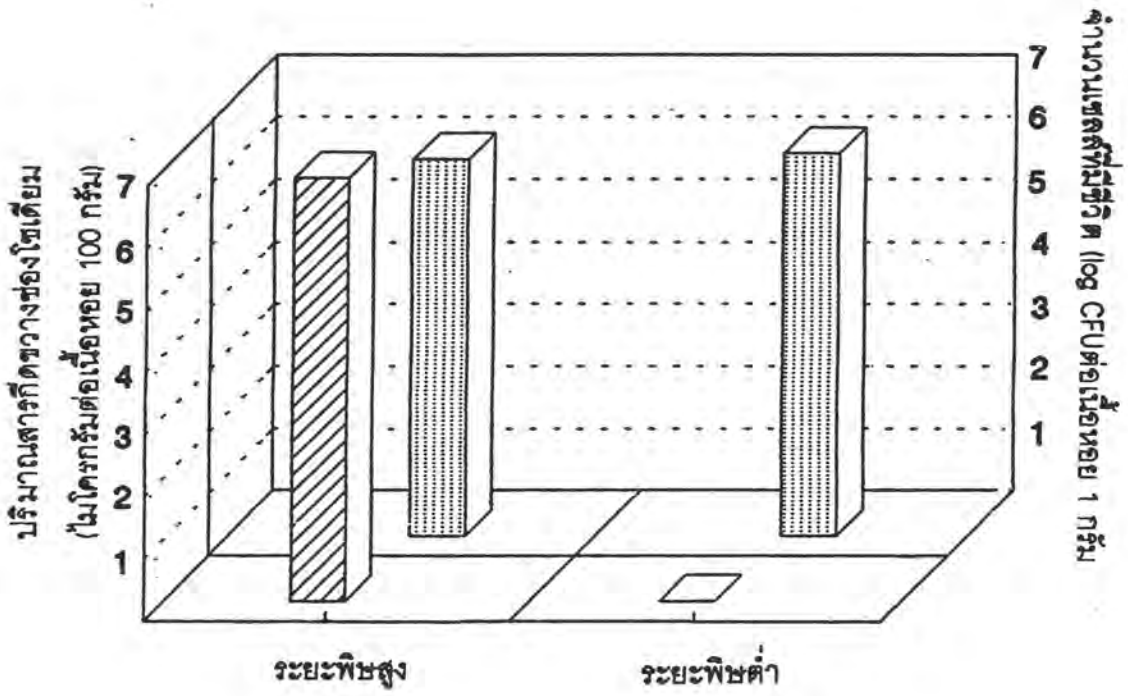
รูปที่ 7 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่มีชีวิต และปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมภายในเซลล์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหาร เหลวตรวจสอบที่ระยะเวลาต่าง ๆ

- *V. alginolyticus*
- *B. cereus*
- *C. paurometabolum*
- *C. matruchotii* (ตรวจไม่พบความเป็นพิษ)

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 พบว่าเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากหอยทรายมีความสามารถในการสะสมสารพิษสูงสุดในเซลล์ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และเชื้อ *C. matruchotii* ที่แยกได้จากทรายเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม ดังนั้นจึงเลือกใช้เชื้อทั้งสองนี้นำมาเตรียมเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับใช้ในการเลี้ยงหอยทรายในการทดลองขั้นต่อไป

ผลการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม และจำนวนแบคทีเรียในเนื้อหอยทรายทั้งในระยะพิษสูง และระยะพิษต่ำก่อนการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ

จากการตรวจวัดปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อจากสารที่สกัดได้จากหอยทรายที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูง (เดือนมีนาคม 2538) และในระยะหอยทรายมีพิษต่ำ(เดือนสิงหาคม 2538) พบว่าเนื้อหอยทรายที่เก็บในระยะพิษสูงมีปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมสูงสุดเท่ากับ 6.80 ไมโครกรัมต่อเนื้อหอย 100 กรัม และมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่นับจำนวนบนจานเพาะเชื้อโดยอาหารแข็ง ORI เท่ากับ 1.14×10^6 เซลล์ต่อเนื้อหอย 1 กรัม สำหรับเนื้อหอยทรายที่เก็บในระยะพิษต่ำตรวจไม่พบความเป็นพิษและมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 1.4×10^6 เซลล์ต่อเนื้อหอย 1 กรัม แสดงผลในรูปที่ 8



รูปที่ 8 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม และจำนวนแบคทีเรียในเนื้อหอยทรายในระยะพิษสูง และพิษต่ำ ก่อนการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ

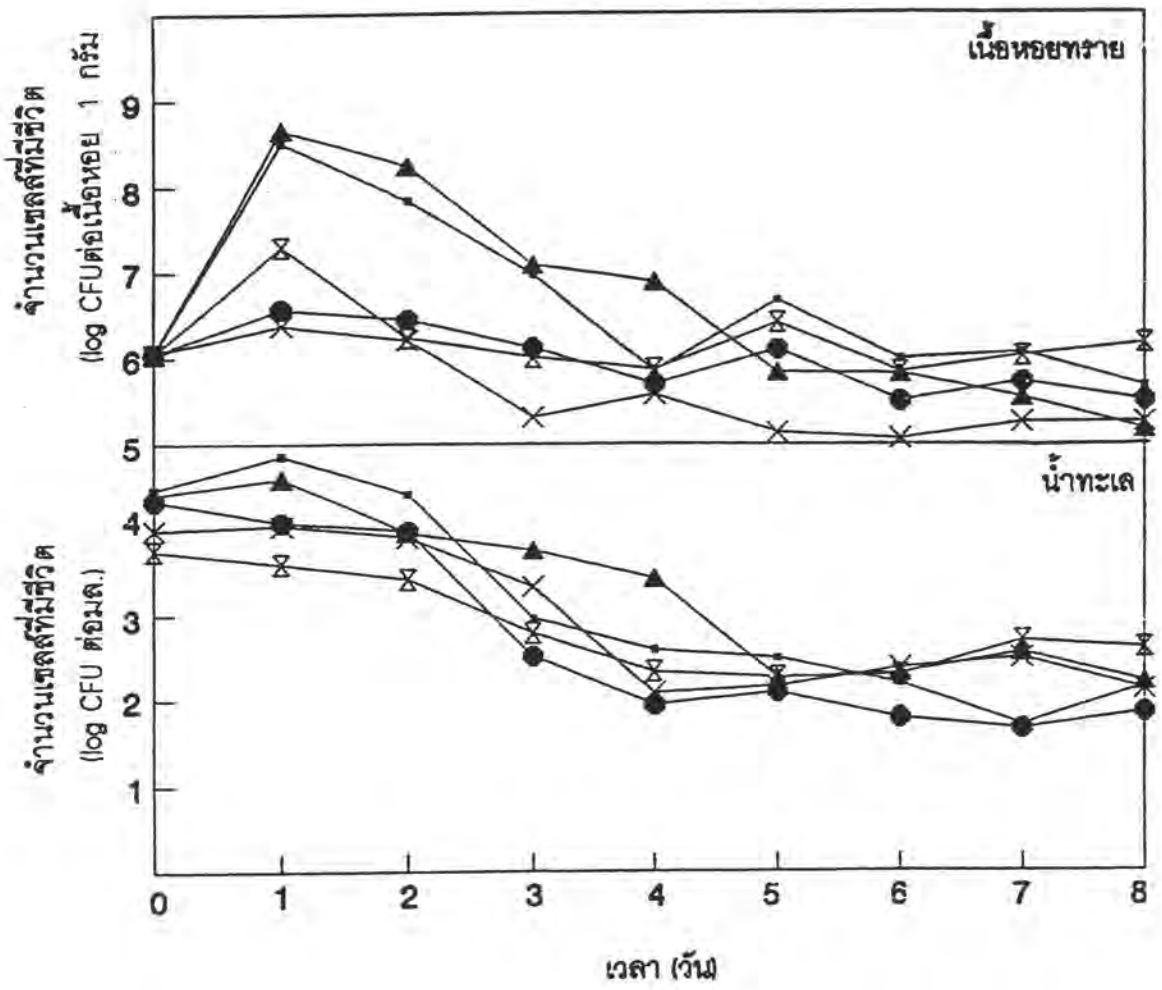
▨ ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

▦ จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต

ผลการเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรีย และปริมาณสารกึดขวางช่องโซเดียมที่สกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูงและระยะพิษต่ำ ที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ, แบคทีเรียไม่สร้างพิษ, สาหร่ายไม่สร้างพิษผสมกับแบคทีเรียสร้างพิษ, สาหร่ายไม่สร้างพิษอย่างเดียว และไม่มีการให้อาหารซึ่งเป็นชุดควบคุม

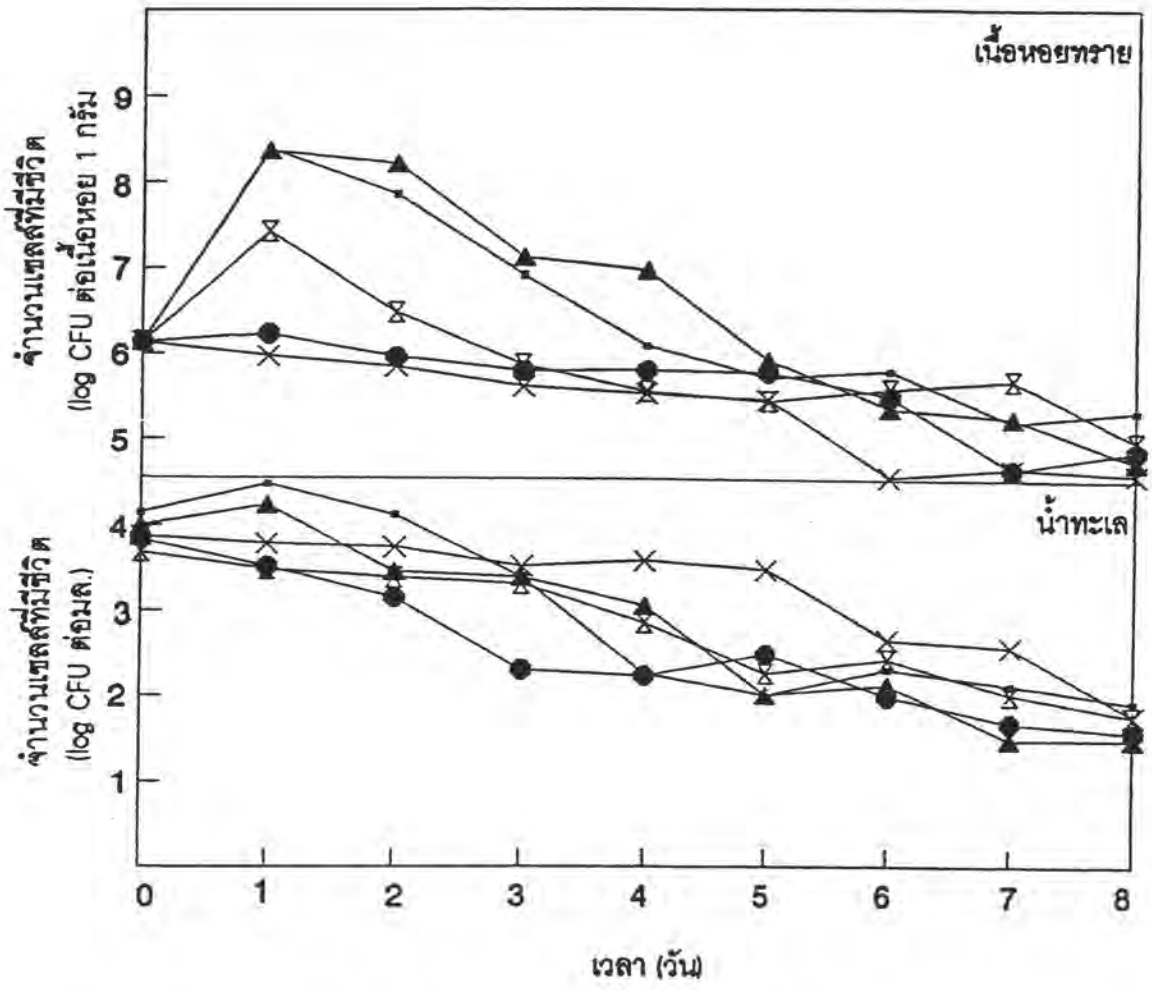
ผลการตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียในน้ำ และในเนื้อหอยทรายที่เก็บตัวอย่างในแต่ละวันของหอยทรายระยะพิษสูงและระยะพิษต่ำ

จากการตรวจสอบหาปริมาณสารพิษในน้ำทะเล และทรายที่ใช้ในการเลี้ยงหอยทรายโดยวิธีสกัดด้วยเมธานอล และทดสอบกับเนื้อเยื่อไม่พบว่ามีความเป็นพิษในทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ จากนั้นจึงนำมาใช้ในการเลี้ยงหอยทรายโดยทำการทดลองให้อาหารหอยทรายในระยะพิษสูงและพิษต่ำด้วยอาหารชนิดต่างๆได้แก่แบคทีเรียสร้างพิษ(*V. alginolyticus*)แบคทีเรียไม่สร้างพิษ (*C. matruchotii*), สาหร่ายไม่สร้างพิษที่เป็นอาหารตามปกติของหอยทราย (*Tetraselmis* sp.), แบคทีเรียสร้างพิษผสมกับสาหร่ายไม่สร้างพิษ และชุดควบคุมคือไม่มีการให้อาหาร ทำการให้อาหารในวันแรกของการทดลองและนับจำนวนแบคทีเรียในน้ำ และในเนื้อหอยที่เก็บตัวอย่างในแต่ละวันโดยการนับจำนวนบนจานเพาะเชื้อโดยอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI จากการนับจำนวนแบคทีเรียในเนื้อหอยทรายในระยะพิษสูงพบว่ามีการสะสมแบคทีเรียในตัวหอยปริมาณสูงสุดเท่ากับ 4.5×10^{8} CFUต่อเนื้อหอย 1 กรัม หลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษผสมกับสาหร่ายไม่สร้างพิษในวันที่ 1 ของการทดลอง และในระยะพิษต่ำจำนวนแบคทีเรียในตัวหอยจะมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 2.4×10^{8} CFUต่อเนื้อหอย 1 กรัม หลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษในวันที่ 1 ของการทดลองเช่นกัน เมื่อนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเล และในเนื้อหอยทรายทั้งในระยะพิษสูง และระยะพิษต่ำ กับระยะเวลาในการเลี้ยงหอยทรายเปรียบเทียบในอาหารชนิดต่าง ๆ แสดงผลดังรูปที่ 9 และ 10



รูปที่ 9 จำนวนแบคทีเรียในน้ำทะเล และในเนื้อหอยทรายที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูง หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 8 วัน (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

- แบคทีเรียสร้างพิษ
- แบคทีเรียไม่สร้างพิษ
- สาหร่ายไม่สร้างพิษ
- แบคทีเรียสร้างพิษผสมกับสาหร่ายไม่สร้างพิษ
- ไม่มีการให้อาหาร

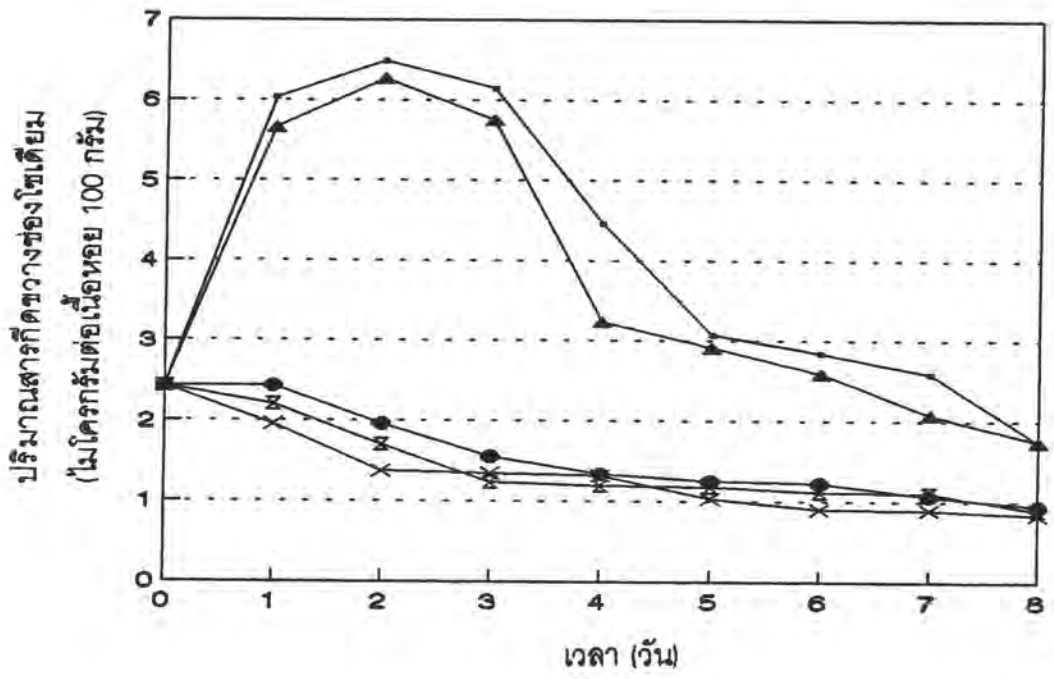


รูปที่ 10 จำนวนแบคทีเรียในน้ำทะเล และในเนื้อหอยทรายที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษต่ำ หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 8 วัน (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

- แบคทีเรียสร้างพิษ
- แบคทีเรียไม่สร้างพิษ
- สาหร่ายไม่สร้างพิษ
- แบคทีเรียสร้างพิษผสมกับสาหร่ายไม่สร้างพิษ
- ไม่มีการให้อาหาร

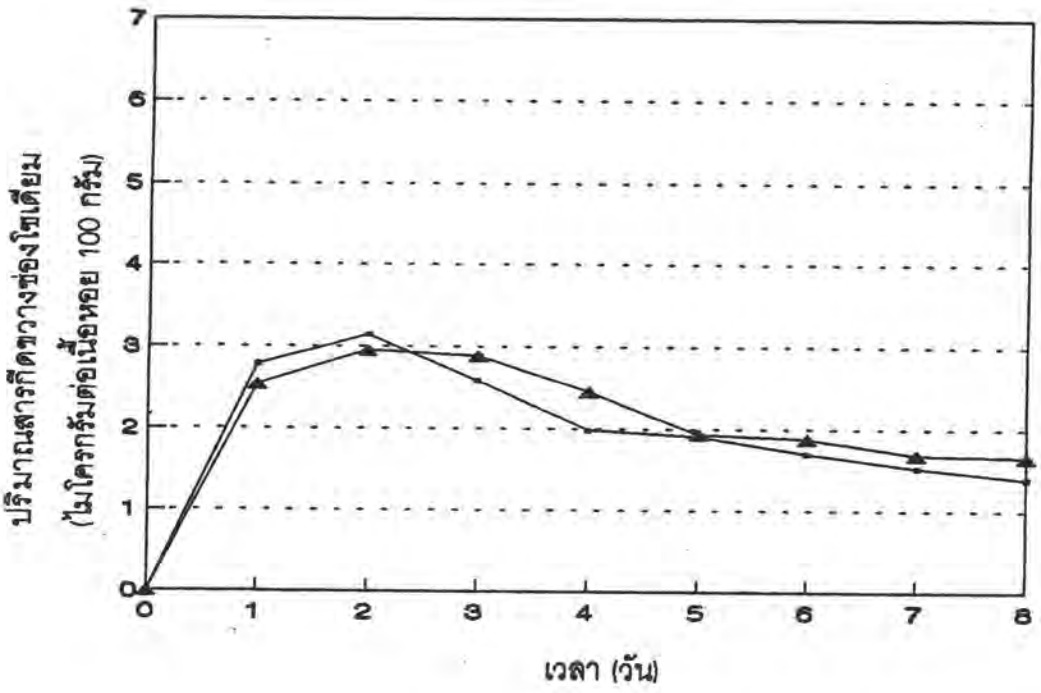
ผลการวิเคราะห์ระดับความเป็นพิษในเนื้อหอยทราย หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ โดยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อ

เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์สารสกัดจากเนื้อหอยทรายที่เก็บในระยะพิษสูงและพิษต่ำ พบว่า หลังจากการนำหอยลงไปแช่ในน้ำทะเลปราศจากเชื้อโดยไม่ให้อาหารเพื่อถ่ายเทอาหารเดิมในกระเพาะอาหารรวมทั้งแบคทีเรียภายในตัว เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วทำให้ระดับความเป็นพิษในเนื้อหอยทรายระยะพิษสูงลดลงจาก 6.80 เป็น 2.43 ไมโครกรัม ต่อเนื้อหอย 100 กรัม และหลังจากการให้อาหารในวันแรกของการทดลองแล้วเก็บตัวอย่างหอยในแต่ละวันเพื่อนำมาสกัดสารพิษและวิเคราะห์ปริมาณสารพิษพบว่าในตัวอย่างสารสกัดจากเนื้อหอยทรายที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษจะตรวจพบปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมสูงสุดในวันที่ 2 ของการทดลองเท่ากับ 6.49 ไมโครกรัมต่อเนื้อหอย 100 กรัม ส่วนหอยที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษผสมกับสาหร่ายที่เป็นอาหารตามปกติของหอยทราย ตรวจพบปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 2 ของการทดลอง เช่นเดียวกันเท่ากับ 6.27 ไมโครกรัมต่อเนื้อหอย 100 กรัม ส่วนในหอยที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรียไม่สร้างพิษ,สาหร่ายไม่สร้างพิษที่เป็นอาหารตามปกติของหอยทราย และหอยที่ไม่มีการให้อาหาร พบว่าปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในเนื้อหอยทรายจะลดลงทุกวันที่ทำการเก็บตัวอย่างมาทดสอบ จนกระทั่งลดลงต่ำสุดในวันสุดท้ายของการทดลองเท่ากับ 0.89, 0.83, และ0.94 ไมโครกรัมต่อเนื้อหอย 100 กรัม ตามลำดับ แสดงผลดังรูปที่ 11 สำหรับหอยทรายในช่วงพิษต่ำนั้นไม่พบความเป็นพิษก่อนการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ แต่เมื่อให้อาหารหอยทรายในระยะพิษต่ำนี้ด้วยแบคทีเรียสร้างพิษและแบคทีเรียสร้างพิษผสมสาหร่ายแล้วตรวจพบสารกีดขวางช่องโซเดียมในเนื้อหอยทรายสูงสุดเท่ากับ 3.14 และ2.95 ไมโครกรัมต่อเนื้อหอย 100 กรัม ในวันที่ 2 ของการทดลอง และตรวจไม่พบพิษในเนื้อหอยทรายพิษต่ำ หลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียไม่สร้างพิษ, สาหร่ายไม่สร้างพิษ และชุดควบคุม คือไม่มีการให้อาหาร แสดงผลดังรูปที่ 12



รูปที่ 11 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในเนื้อหอยทรายที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูง หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ (ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

- แบคทีเรียสร้างพิษ
- แบคทีเรียไม่สร้างพิษ
- สาหร่ายไม่สร้างพิษ
- แบคทีเรียสร้างพิษผสมกับสาหร่ายไม่สร้างพิษ
- ไม่มีการให้อาหาร



รูปที่ 12 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม ในเนื้อหอยทรายที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษต่ำหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ

- แบคทีเรียสร้างพิษ
- แบคทีเรียไม่สร้างพิษ
- สาหร่ายไม่สร้างพิษ (ตรวจไม่พบการสร้างพิษ)
- แบคทีเรียสร้างพิษผสมกับสาหร่ายไม่สร้างพิษ (ตรวจไม่พบการสร้างพิษ)
- ไม่มีการให้อาหาร (ตรวจไม่พบการสร้างพิษ)

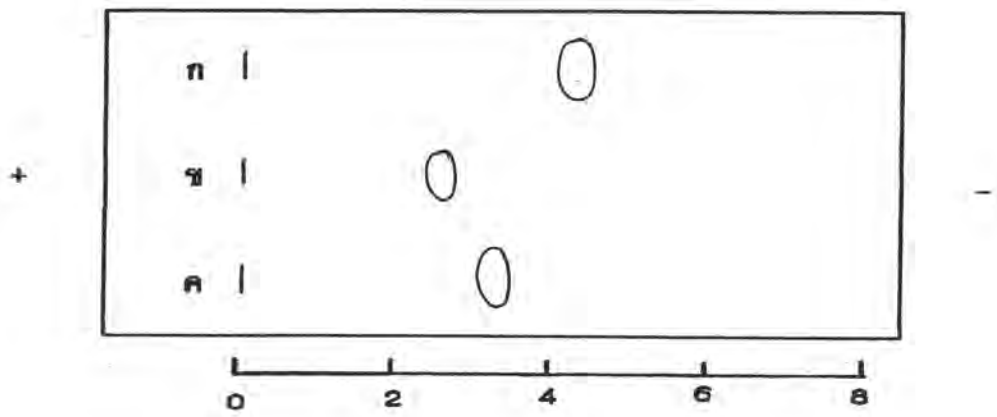
ผลการวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของเทโทรโดทอกซินและพิษอัมพาตจากหอยโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis)

ผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกึดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน

จากการวิเคราะห์พิษในเนื้อหอยทรายก่อน และหลังการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ พบว่าสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบโดยสารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน เคลื่อนที่ได้ระยะทาง 4.7 เซนติเมตร ส่วนสารตัวอย่างเนื้อหอยทรายก่อน และหลังการเลี้ยงแบคทีเรียสร้างพิษเคลื่อนที่ได้ระยะทาง 2.6 และ 3.2 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยให้ผลการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์สีเหลืองอมเขียว แสดงผลดังรูปที่ 13

ผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกึดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย

จากการวิเคราะห์พิษในเนื้อหอยทรายก่อน และหลังการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ พบว่าสารมาตรฐานกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยได้แก่ กอนิออทอกซิน 1, 2 และ4 และสารตัวอย่างเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบโดยสารมาตรฐานกอนิออทอกซิน 1, 2 และ 4 เคลื่อนที่ได้ระยะทาง 2.2, 5.7 และ 3.5 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนสารตัวอย่างเนื้อหอยทรายก่อน และหลังการเลี้ยงแบคทีเรียสร้างพิษเคลื่อนที่ได้ระยะทาง 2.1 และ 2.3 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยให้ผลการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์สีเหลืองอมเขียว แสดงผลดังรูปที่ 14

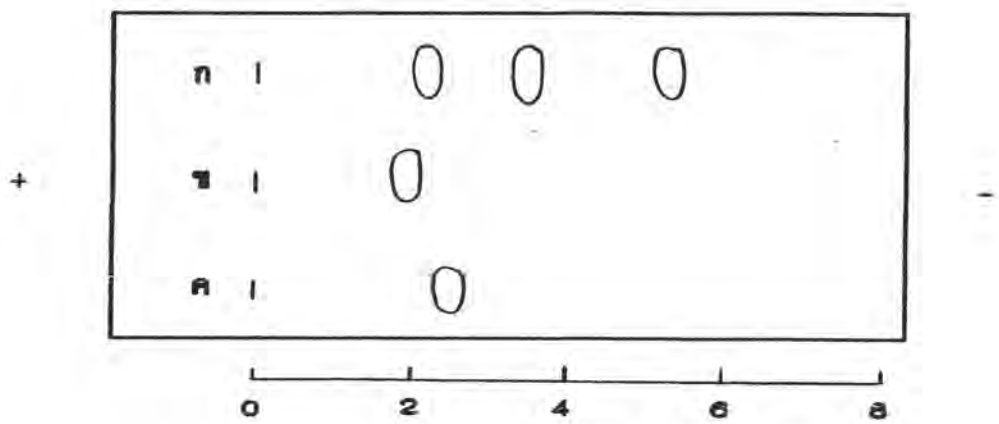


รูปที่ 13 แสดงผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซีส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน

ก คือ สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน
ข คือ สารตัวอย่างเนื้อหอยในระยะพิษสูงก่อนการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ
ค คือ สารตัวอย่างเนื้อหอยในระยะพิษสูงหลังการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ

บัฟเฟอร์	:	ทริส 0.08 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.7
กระแสไฟ	:	0.8 มิลลิแอมแปร์ ต่อความกว้างของแผ่นเซลลูโลสอะซิเตต 1 ซม.
ตัวออกซิไดซ์	:	โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์
เวลา	:	30 นาที
ปฏิกิริยา	:	160^{0} ซ 3 นาที

ดูตำแหน่งสารที่เคลื่อนที่ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร



รูปที่ 14 แสดงผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซีส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย

ก คือ สารมาตรฐานกอนิออทอกซิน 1, 3 และ 2

ข คือ สารตัวอย่างเนื้อหอยในระยะพิษสูงก่อนการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ

ค คือ สารตัวอย่างเนื้อหอยในระยะพิษสูงหลังการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ

บัฟเฟอร์	:	ทริส 0.08 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.7
กระแสไฟ	:	0.8 มิลลิแอมแปร์ต่อความกว้างของแผ่นเซลลูโลสอะซิเตต 1 ซม.
ตัวออกซิไดซ์	:	ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1เปอร์เซนต์
เวลา	:	30 นาที
ปฏิกิริยา	:	160^{0} ซ 3 นาที

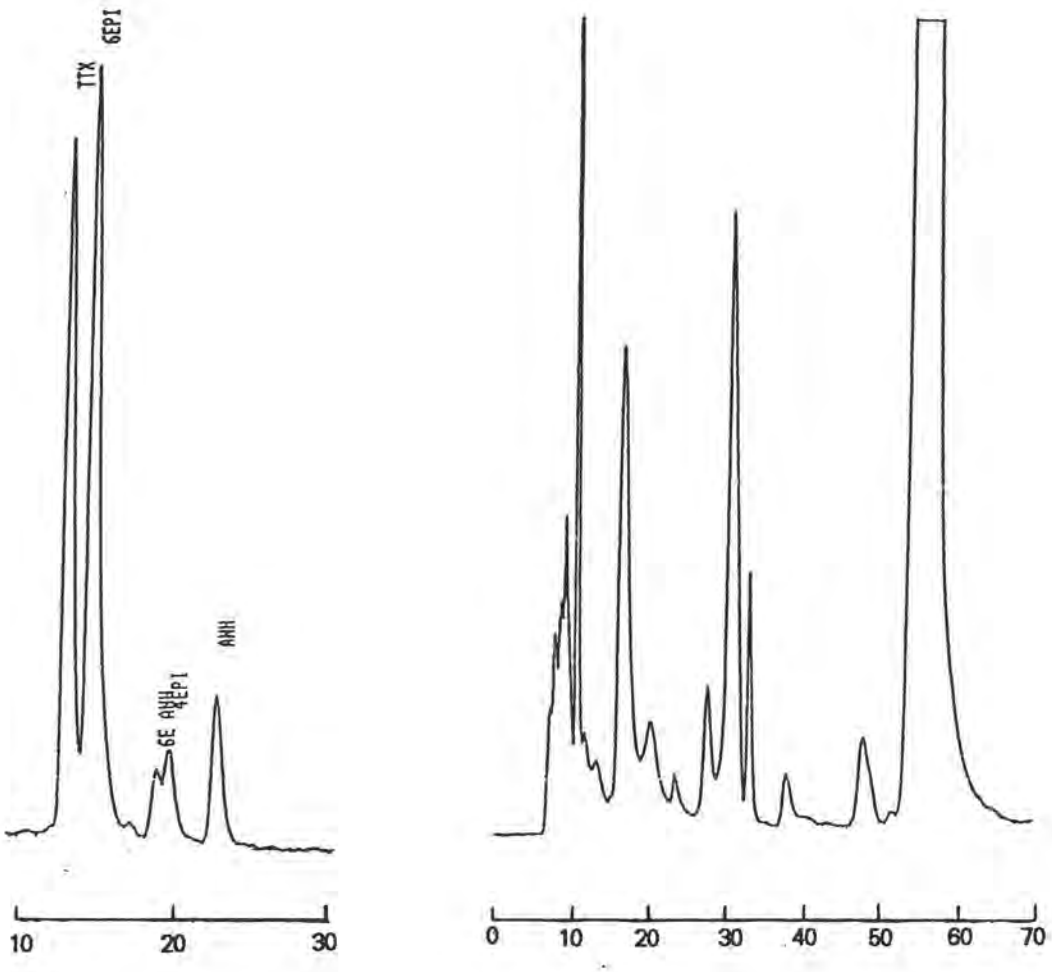
ดูตำแหน่งสารที่เคลื่อนที่ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

จากการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมในสารสกัดที่มีพิษในเนื้อหอยทรายทั้งก่อนและหลังการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ ทั้งระยะพิษสูง และพิษต่ำด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส ผลการตรวจสอบไม่พบสารพิษอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน และสารพิษกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยอนุพันธ์GTX1,2,3 ในทุกตัวอย่างที่มีคุณสมบัติเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียมจากการทดสอบด้วยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อแต่ปรากฏสารที่มีการเคลื่อนที่ได้ระยะใกล้เคียงกับสารอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน และGTX1,2,3 ซึ่งได้นำไปตรวจสอบด้วยวิธี เอช พี แอล ซี และลิควิดโครมาโตกราฟฟี-แมสเปคโตรเมตรีในขั้นต่อไป

ผลการวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของเทโทรโดทอกซิน และพิษอัมพาตจากหอยจากพิษที่เกิดขึ้นในหอยหลังจากการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ โดยวิธี เอช พี แอล ซี

ผลการวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซินในเนื้อหอยสองฝาหลังจากการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ

ทำการวิเคราะห์สารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษในระยะพิษสูงที่พบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียมจากการทดสอบกับเนื้อเยื่อ และให้ผลการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานในกลุ่มอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินจากการทดสอบโดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส นำมาทำการวิเคราะห์หาอนุพันธ์ของสารกลุ่มเทโทโทรโดทอกซิน ได้แก่เทโทรโดทอกซิน (TTX) , 6-อิพิเทโทรโดทอกซิน (6EPI-TTX)อิพิแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน(6E ANH-TTX), 4-อิพิเทโทรโดทอกซิน(4EPI-TTX),แอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน (ANH-TTX) จากการวิเคราะห์ไม่พบอนุพันธ์กลุ่มนี้ในสารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ แต่พบอนุพันธ์ที่มีค่าretention timeใกล้เคียงกับอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินมากและมีปริมาณสูง โครมาโตแกรมของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินจากสารสกัดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ 15



สารมาตรฐานกลุ่มเทโทรโดทอกซิน สารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ

รูปที่ 15 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มเทโทรโดทอกซิน และสารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษวิเคราะห์โดยวิธี เอช พี แอล ซี

TTX = เทโทรโดทอกซิน 6EPI-TTX = 6-อิพิเทโทรโดทอกซิน

6E ANH-TTX = อิพิแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน 4EPI-TTX = 4-อิพิเทโทรโดทอกซิน

ANH-TTX = แอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน

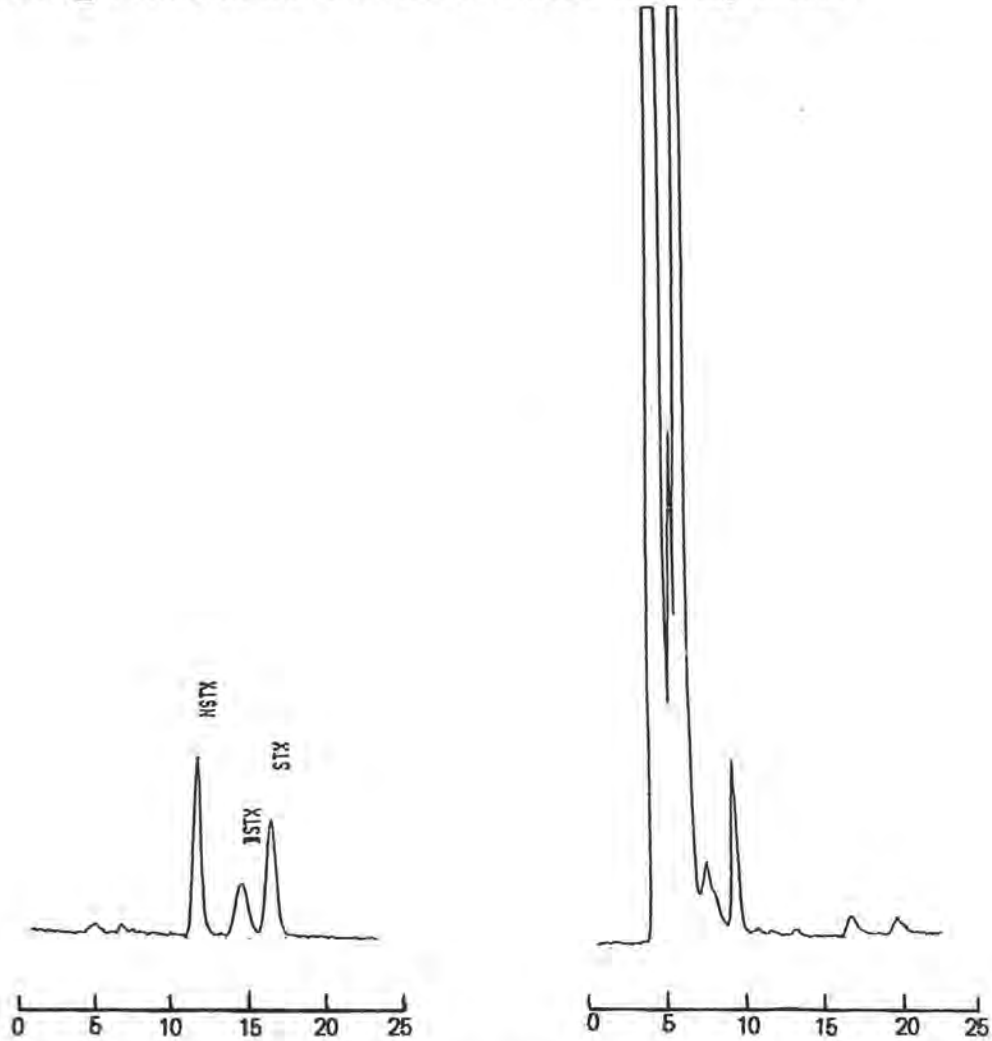
ผลการวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกลุ่มพิษอัมพาตในเนื้อหอยสองฝาหลังจากการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ

ทำการวิเคราะห์สารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากทำการวิเคราะห์สารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษในระยะพิษสูงที่พบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียมจากการทดสอบกับเนื้อเยื่อ และให้ผลการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานในกลุ่มอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอย โดยอนุพันธ์กลุ่มพิษอัมพาตจากหอยที่ทำการวิเคราะห์ได้แก่กลุ่มซัคซิทอกซิน (STXs) ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน(STX), นีโอซัคซิทอกซิน(NSTX), ดีคาร์บาโมอิลซัคซิทอกซิน(DSTX), และกลุ่มกอนิ-ออทอกซิน(GTXs)ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์กอนิออทอกซิน1,2,3,4, และ5(GTX1,GTX2,GTX3,GTX4 และ GTX5) และกลุ่มซี(C) ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์ซี 1,2,3 และ4 (C1,C2,C3 และC4) พบว่าตรวจพบอนุพันธ์GTX2และC1ในสารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ โครมาโตรแกรมของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยแต่ละกลุ่มได้แก่อนุพันธ์กลุ่ม STXs, GTXs, และ C จากสารสกัดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน แสดงในรูปที่16-18

ผลการวิเคราะห์ชนิดของสารพิษที่สกัดจากแบคทีเรียชนิดสร้างพิษ หอยสร้างพิษก่อนและหลังการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษในหอยระยะพิษสูง และพิษต่ำ ด้วยวิธีลิควิดโครมาโตกราฟฟี-แมสเปคโตรเมตรี

นำสารสกัดในเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียมจากแบคทีเรียชนิดสร้างพิษมาตรวจสอบหาชนิดของสารพิษที่สร้างโดยแบคทีเรียในเวลา 24 ชั่วโมง สารเทโทรโดทอกซินมีน้ำหนักโมเลกุล (M) 319 ซึ่งจะปรากฏค่าในสเปคตรัมของสารมาตรฐาน (รูปที่ 19) ที่ 320 ซึ่งเป็นค่าของM+1(M+H) และเมื่อตรวจสอบสารสกัดที่ได้จากแบคทีเรียสร้างพิษ พบสารที่มี M+1 ที่320แต่เนื่องจากพีคของ 320 ต่ำมากจึงสรุปไม่ได้อย่างแน่ชัดว่ามีสารเทโทรโดทอกซินในสารสกัดถ้าพีคที่ 320 เป็นของสารเทโทรโดทอกซินก็สามารถกล่าวได้ว่าแบคทีเรียนี้สร้างพิษในปริมาณเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสารอื่น ๆ ที่ผลิตเช่นสารที่พีค 301 เป็นต้นส่วนหอยทรายในระยะพิษสูงที่ตรวจพบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อนั้นตรวจไม่พบอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน และในตัวอย่างสารสกัดจากหอยทรายหลังจากให้แบคทีเรียสร้างพิษกับหอยทรายในระยะพิษสูงและระยะพิษต่ำ ตรวจไม่พบอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน แต่พบ

สารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 301 เช่นเดียวกับในสารสกัดจากแบคทีเรียสร้างพิษ โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน และสารสกัดบางตัวอย่างแสดงในรูปที่ 19-23

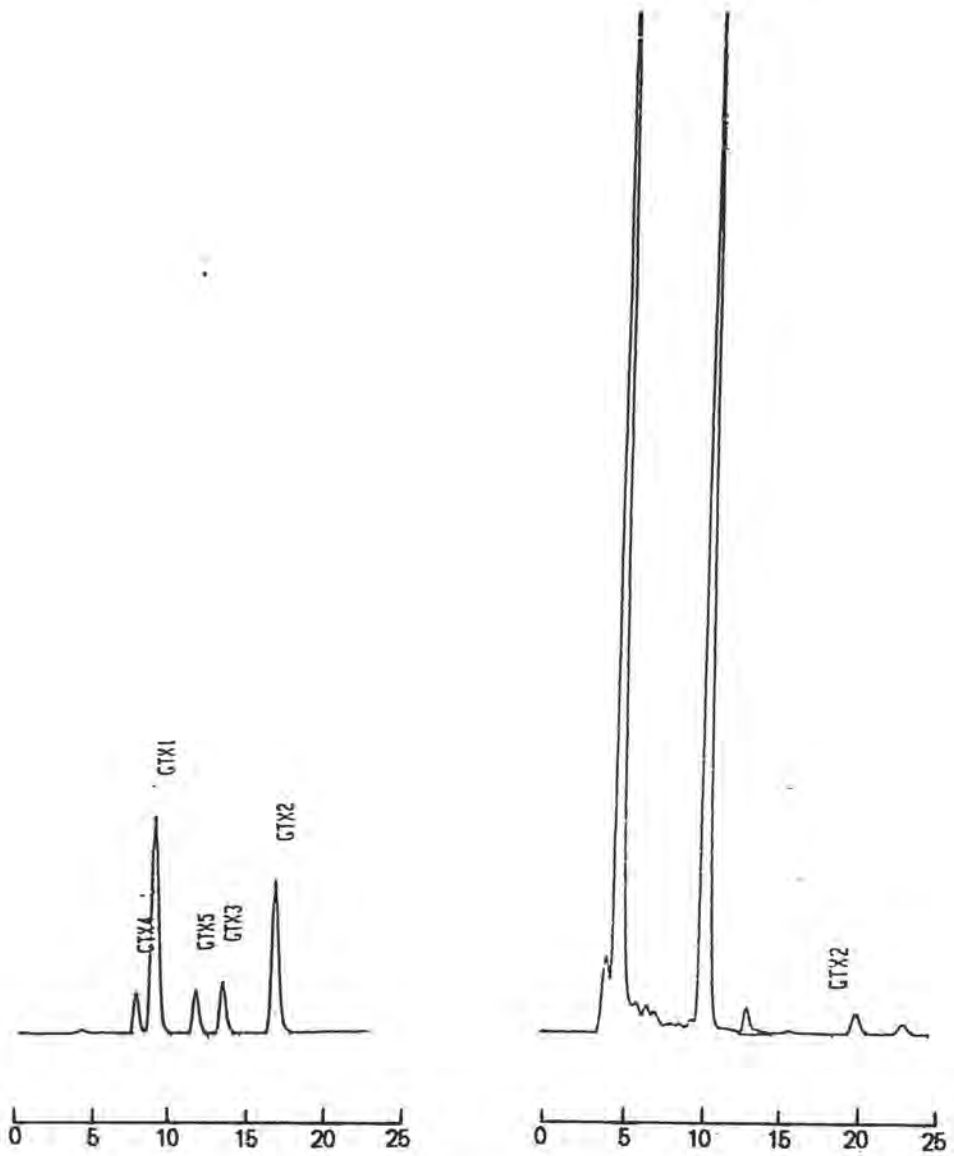


สารมาตรฐานกลุ่มซัคซิทอกซิน

สารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ

รูปที่ 16 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มซัคซิทอกซิน และสารสกัดจากหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษวิเคราะห์โดยวิธี เอช พี แอล ซี

STX = ซัคซิทอกซิน NSTX = นีโอซัคซิทอกซิน DSTX = ดีคาร์บาโมอิลซัคซิทอกซิน

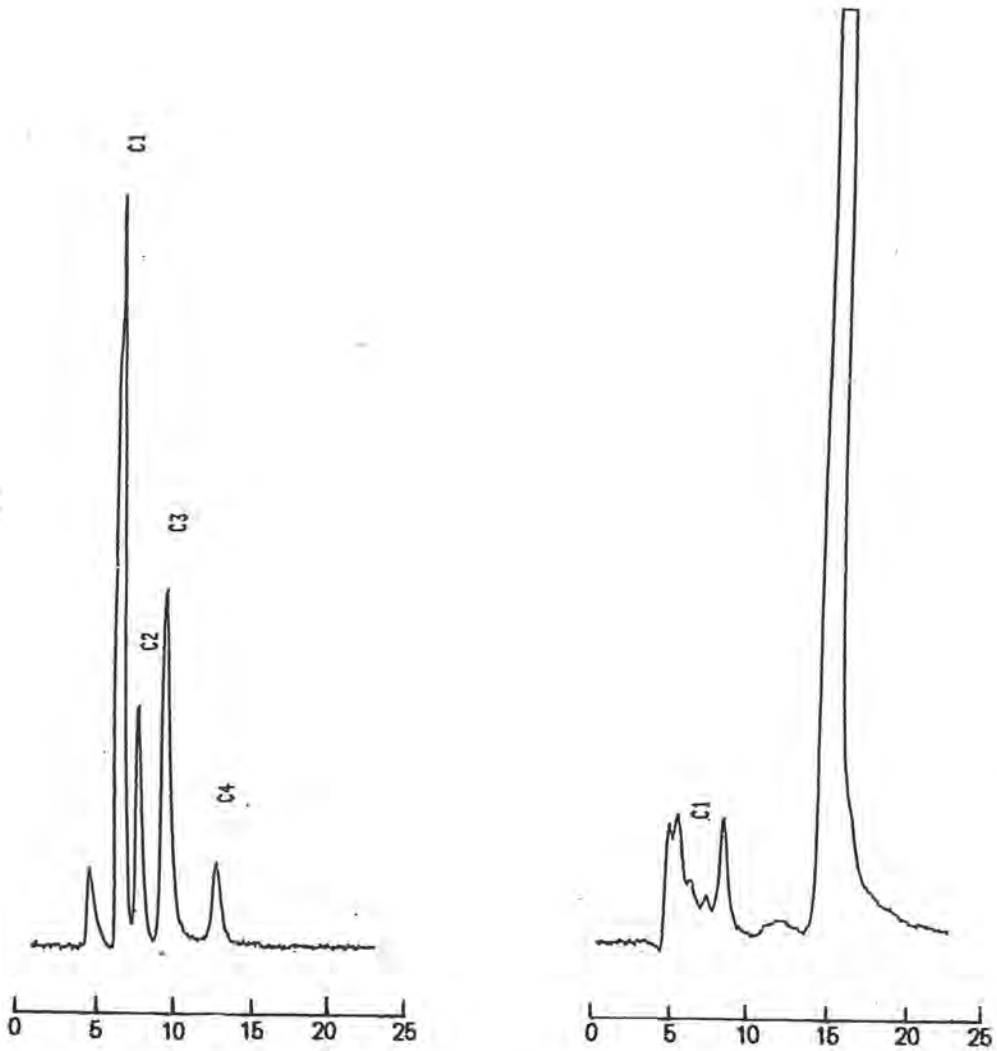


สารมาตรฐานกลุ่มกอนิออทอกซิน สารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ

รูปที่ 17 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มกอนิออทอกซิน และสารสกัดจากหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษวิเคราะห์โดยวิธี เอช พี แอล ซี

GTX1= กอนิออทอกซิน 1 GTX2 = กอนิออทอกซิน 2 GTX3 = กอนิออทอกซิน 3

GTX4 = กอนิออทอกซิน 4 GTX5 = กอนิออทอกซิน 5

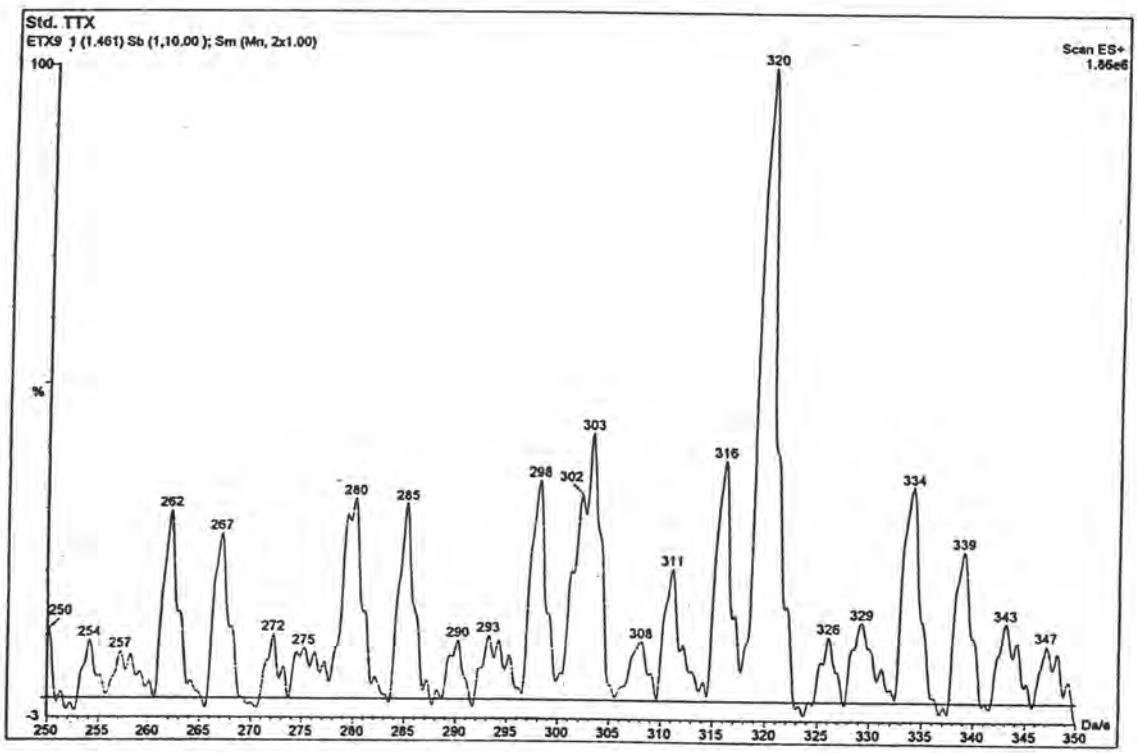


สารมาตรฐานกลุ่มซี

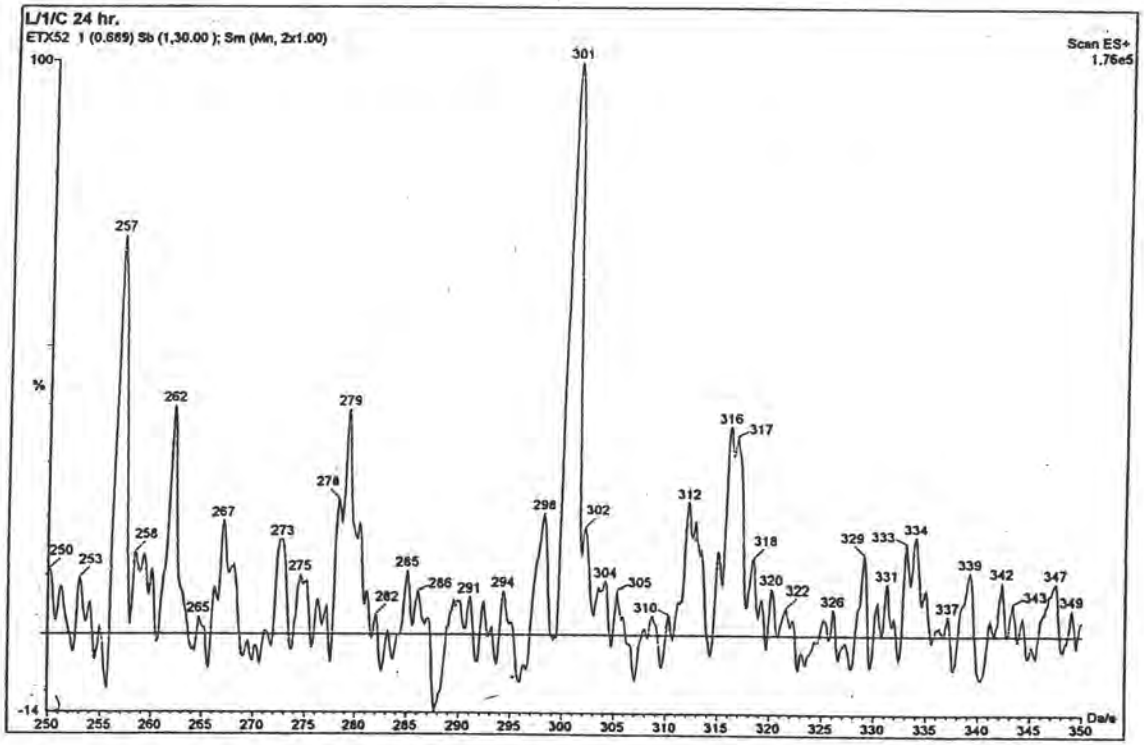
สารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ

รูปที่ 18 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มซี และสารสกัดจากเนื้อหอยหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษวิเคราะห์โดยวิธี เอช พี แอล ซี

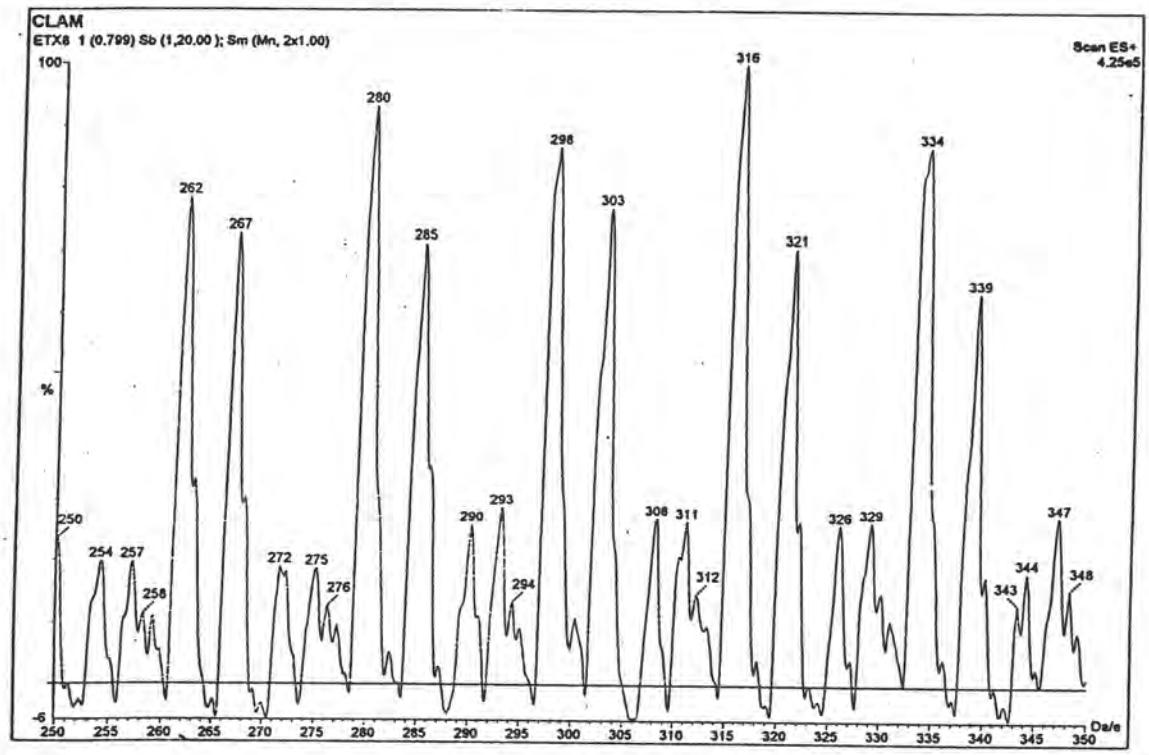
C1 = ซี1 C2 = ซี2 C3 = ซี3 C4 = ซี4



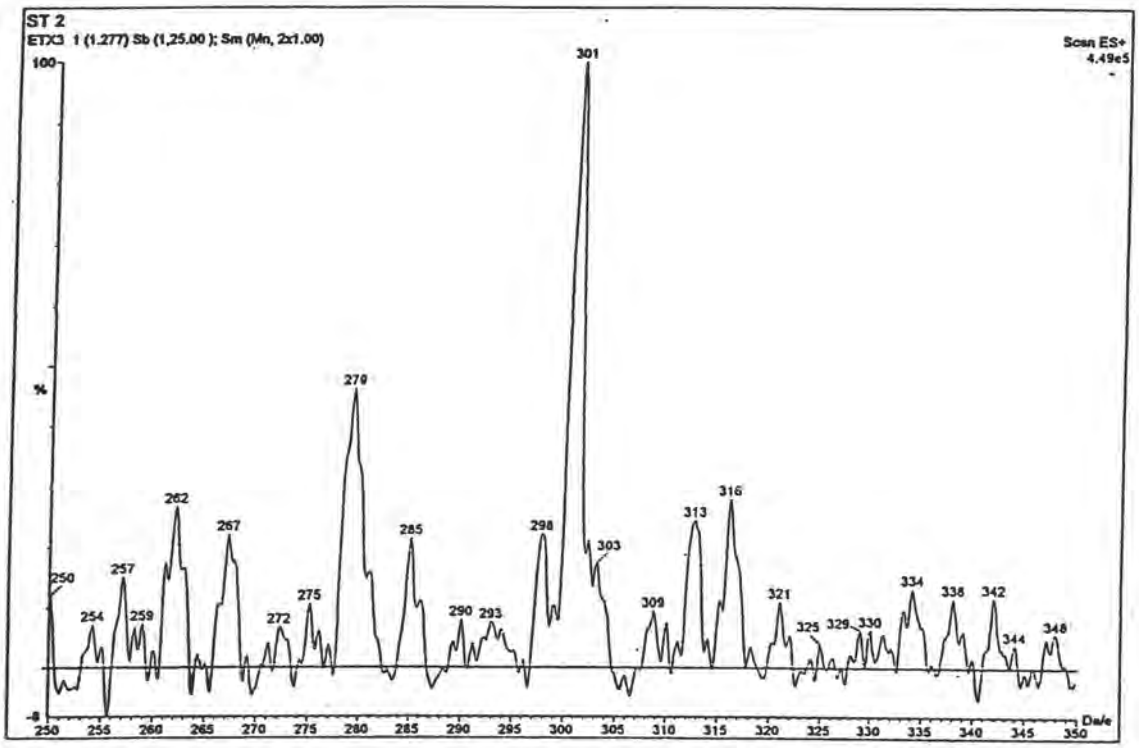
รูปที่ 19 สเปคตรัมที่ได้จากแมสสเปคโตมิเตอร์ของสารมาตรฐานเทโทรโดทอกซินซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 319 ค่าของ M/e ที่ 320 คือค่า (M+1) เมื่อ M = Mass, e = electron



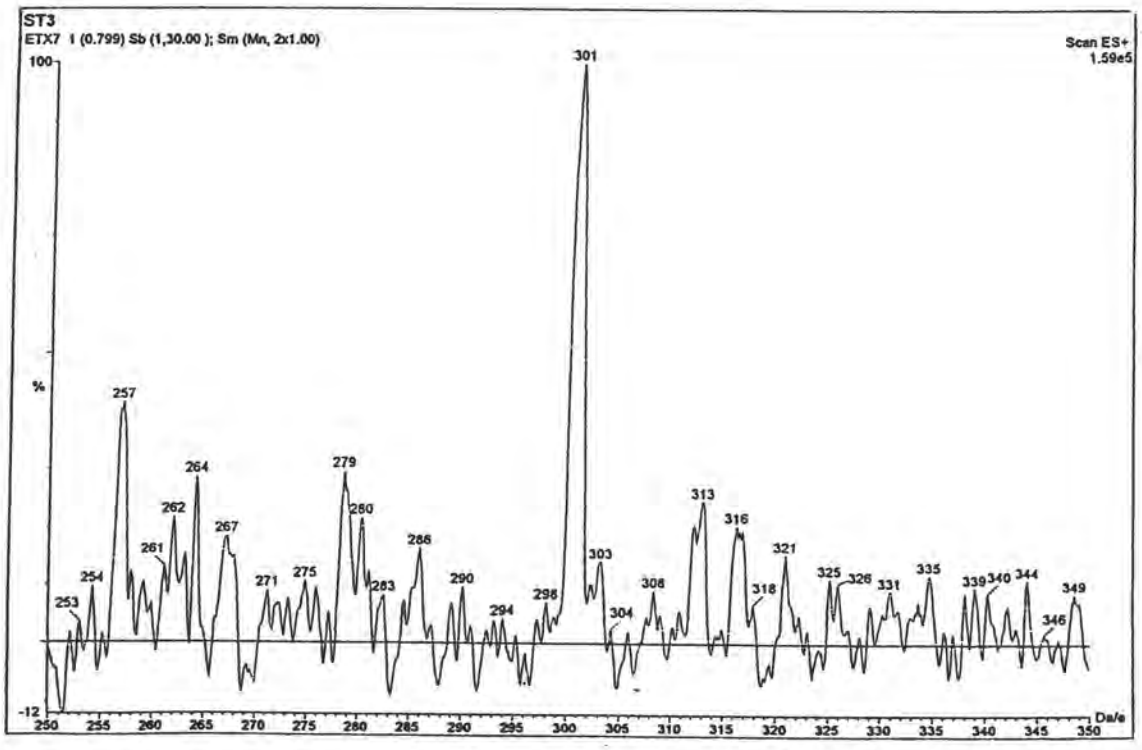
รูปที่ 20 สเปคตรัมที่ได้จากแมสสเปคโตมิเตอร์ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียสร้างพิษ



รูปที่ 21 สเปคตรัมที่ได้จากแมสสเปคโตมิเตอร์ของสารสกัดจากเนื้อหอยทรายระยะพิษสูงก่อนการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ



รูปที่ 22 สเปคตรัมที่ได้จากแมสสเปคโตมิเตอร์ของสารสกัดจากเนื้อหอยระยะพิษสูงหลังจากการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ



รูปที่23 สเปคตรัมที่ได้จากแมสสเปคโตมิเตอร์ของสารสกัดจากเนื้อหอยทรายระยะพิษต่ำ หลังจากการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในแบคทีเรียสร้างพิษ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียไม่สร้างพิษ

จากการวัดปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในแบคทีเรียสร้างพิษเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไม่สร้างพิษโดยวิธี acid hydrolysis และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิด พบว่ามีความแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่3โดยในแบคทีเรียที่ไม่สร้างพิษจะมีกรดแอสพาติก ทรีโอนีนและฮีสทิดีนต่ำกว่าในแบคทีเรียสร้างพิษซึ่งพบว่าเป็นความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติเท่ากับ 95% ($P<0.05$)

ตารางที่ 3 ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในแบคทีเรียชนิดสร้างพิษ และไม่สร้างพิษ

ชนิดของกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิด (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1 กรัม)	
	แบคทีเรียสร้างพิษสูง *(V. alginolyticus)*	แบคทีเรียไม่สร้างพิษ *(C. matruchotii)*
กรดแอสพาติก	24.03	15.44
ทรีโอนีน	27.94	18.75
กรดกลูตามิก	20.06	25.71
ไกลซีน	15.00	13.59
อลานีน	30.84	26.79
ฮีสทิดีน	27.29	19.11
อาร์จินีน	39.82	36.73
แอสพาราจีน	16.84	11.45
ไฮดรอกซีโพรลีน	trace	trace
โพรลีน	trace	trace
เซอรีน	trace	trace