

การผลิตเทโทรโดทอกซินในหอยทราาย *Asaphis violascens*  
หลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียทะเล

นางสาววรรณิ พจนสุนทร



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2539

ISBN 974-634-316-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**TETRODOTOXIN PRODUCTION IN SAND CLAM *Asaphis violascens* AFTER  
FEEDING ON MARINE BACTERIA**

**MISS WORRAPHANEE POJANASOONTORN**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science**

**Department of Microbiology**

**Graduate School**

**Chulalongkorn University**

**1996**

**ISBN 974-634-316-5**

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตเทโทรโดทอกซินในหอยทวาย *Asaphis violascens* หลังจาก  
การเลี้ยงด้วยแบคทีเรียทะเล

โดย นางสาววรพรรณี พจนสุนทร

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทร์ทอง

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.ประสาท กิตตะคุปต์

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

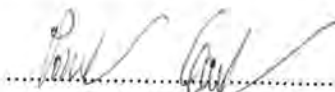
(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ฤงสูรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์




..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์วีระวุฒิ มหามนตรี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทร์ทอง)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ดร.ประสาท กิตตะคุปต์)



..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โภษิตานนท์)



พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

รศ.พรพรณี พจนสุนทร : การผลิตเทโทรโตทอกซินในหอยทราย *Asaphis violascens* หลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียทะเล (TETRODOTOXIN PRODUCTION IN SAND CLAM *Asaphis violascens* AFTER FEEDING ON MARINE BACTERIA) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.กาญจณา สันทองสิน, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ดร.ประลำท กิตตะคุปต์, 102 หน้า ISBN 974-634-316-5

ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารพิษวางช่องไข่เดี่ยวในปริมาณสูง และแบคทีเรียไม่สร้างสารพิษจากหอยทราย หอยกระปุก และทรายบริเวณเกาะสีชังเพื่อใช้เป็นอาหารให้หอยกิน พบว่าเชื้อ *Vibrio alginolyticus* มีความสามารถในการสร้างสารพิษดังกล่าวภายในเซลล์โดยการทดสอบกับเนื้อเยื่อได้สูงที่สุดภายในเวลา 24 ชั่วโมง และหลังจากการตรวจสอบยืนยันพบว่าสารพิษวางช่องไข่เดี่ยวนั้นอาจเป็นสารในกลุ่มอนุพันธ์เทโทรโตทอกซิน ชื่อ *Corynebacterium matrucotii* ไม่สามารถสร้างสารพิษได้ ในการตรวจสอบความเป็นพิษของเนื้อหอยทรายบริเวณเกาะสีชังที่ทำการเก็บตัวอย่างในเดือน มีนาคม 2538 ตรวจพบว่ามีความเป็นพิษ แต่ตรวจไม่พบความเป็นพิษในเดือนสิงหาคม 2538 ได้เลี้ยงหอยทราย และศึกษาเป็นเวลา 8 วัน โดยใช้อาหารชนิดต่าง ๆ 5 ชนิด ได้แก่แบคทีเรียสร้างพิษ (*V. alginolyticus*), แบคทีเรียไม่สร้างพิษ (*C. matrucotii*), สำหรับไม่สร้างพิษ (*Tetraselmis* sp.), สำหรับไม่สร้างพิษผสมกับแบคทีเรียสร้างพิษ และไม่มีอาหาร จากการทดลองพบว่าหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแบคทีเรียสร้างพิษจะสามารถสะสมสารพิษเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงปริมาณสูงที่สุดภายในเวลา 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกันทั้งในระยะพิษต่ำและพิษสูง แต่ความเป็นพิษในตัวหอยทรายลดลงเมื่อหยุดให้อาหาร ส่วนในกลุ่มที่ให้อาหารที่ไม่มีพิษและชุดควบคุมพบว่าอาหารเหล่านี้ไม่สามารถทำให้หอยทรายทั้งในระยะพิษสูง และพิษต่ำมีพิษเพิ่มขึ้นได้ จากการตรวจสอบอนุพันธ์ของสารพิษในหอยทรายภายหลังการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษด้วยวิธี เอช พี แอล ซี พบว่าเป็นสารใกล้เคียงกับอนุพันธ์ GTX2 และอนุพันธ์ C1 ส่วนในการวิเคราะห์ด้วยวิธีลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี พบสารที่อาจมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 300 ดาลตันเช่นเดียวกับที่ตรวจพบในแบคทีเรียสร้างพิษที่ใช้เป็นอาหาร ผลการทดลองแสดงว่าแบคทีเรียสร้างพิษมีบทบาทในการทำให้เกิดพิษทั้งอนุพันธ์เทโทรโตทอกซินและอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยในหอยทราย

ภาควิชา .....จุลชีววิทยา  
สาขาวิชา .....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม  
ปีการศึกษา ..... 2538

ลายมือชื่อนิสิต ..... พรพรณี พจนสุนทร  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... Monora  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ..... [Signature]

## C626390 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: TETRODOTOXINS / TOXIN-PRODUCING BACTERIA / *Asaphis violasence*  
WORRAPHANNEE POJANASOONTORN : TETRODOTOXIN PRODUCTION IN SAND CLAM  
*Asaphis violascens* AFTER FEEDING ON MARINE BACTERIA. THESIS ADVISOR:  
ASSO. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : PRASAT  
KITTAKOOP, Ph.D., 102 pp. ISBN 974-634-316-5.

Two bacteria, sodium channel blocker (SCB) and non-SCB producing strains, were isolated from sand clam, ridged venus clam, and surrounding sand collected from Sichang Island. *Vibrio alginolyticus* was isolated from these sources producing high level of intracellular toxin within 24 hours (by tissue culture assay), suggested that the SCB agents produced by *Vibrio alginolyticus* may be tetrodotoxin derivatives. *Corynebacterium matruchotii* was a non-SCB producing strain. Sand clam (*Asaphis violascense*) collected from Sichang Island, in March (1995), was able to accumulate the toxins but it was not found to possess SCB-substance in August (1995). A feeding test of sand clams was carried out for 8 days. The clams were fed separately with toxic bacteria (*V. alginolyticus*), nontoxic bacteria (*C. matruchotii*), nontoxic algae (*Tetraselmis* sp.), toxic bacteria mixed with nontoxic algae, and diet group used as a control. The clams fed with toxic bacteria rapidly accumulated toxin reaching a maximum toxin level after 48 hours (both in high and low toxicity periods), but the toxin concentration decreased after the cessation of feeding. The clams fed with the nontoxic bacteria, algae and control group did not increase toxicity level. HPLC analysis confirmed that the blockers produced after feeding were likely to be GTX2 and Cl, and liquid chromatography-mass spectrometry showed that they may be the substance (M.W. 300 daltons) found in the toxic bacteria. The results suggested a possible role of paralytic shellfish toxin and tetrodotoxin producing bacteria as causative agents in sand clam toxicity.

ภาควิชา..... จุลชีววิทยา  
สาขาวิชา..... จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม  
ปีการศึกษา..... 2538

ลายมือชื่อนิสิต..... วรพรมณี พงษ์อินทาส  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... มณฑล  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากท่านอาจารย์ที่  
ปรึกษารองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา จันทองจีน และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมดร.ประสพ  
กิตตะคุปต์ จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยี-  
ชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำแนวทางในการทำงานวิจัยข้อคิดเห็น  
ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้  
 ณ.ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์วิระวุฒิ มหามนตรี และผู้ช่วยศาสตราจารย์  
ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ ที่ได้กรุณารับเป็นประธานกรรมการ และกรรมการสอบแก้ไข  
วิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Professor Masaaki Kodama Laboratory of Marine Biological  
Chemistry, School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Sanriku, Iwate 022-01, Japan. ที่  
ให้ความกรุณาช่วยเหลือในด้านการวิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.  
อมร เพชรสม ที่ให้ความกรุณาช่วยเหลือในด้านการวิเคราะห์โดยวิธีลิวติโดโครมาโตกราฟี-  
แมสสเปคโตรเมตรี

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุน  
การศึกษา และทุนอุดหนุนการวิจัยบางส่วน

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกในด้าน  
ต่างๆ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่ได้ให้กำลังใจ และมีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัยนี้  
ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณย่า ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือ และ  
สนับสนุนในด้านต่างๆตลอดจนครู-อาจารย์ทุกท่านที่เคยสั่งสอนมาจนงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จ  
ลุล่วงไปด้วยดีและสำเร็จการศึกษา

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฅ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	18
3. ผลการทดลอง.....	38
4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	64
เอกสารอ้างอิง.....	69
ภาคผนวก ก.....	79
ภาคผนวก ข.....	84
ภาคผนวก ค.....	92
ประวัติผู้เขียน.....	102

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. สิ่งมีชีวิตที่มีผู้รายงานว่าการสะสมสารพิษกลุ่มเทโทรโดทอกซิน.....	5
2. สิ่งมีชีวิตที่มีผู้รายงานว่าการสะสมสารพิษกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย.....	11
3. การเจริญ และปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (SCB) ที่สร้างโดย แบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว.....	39
4. ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในแบคทีเรียชนิดสร้างพิษ และไม่สร้างพิษ .....	63



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. โครงสร้างทางเคมีของเทโทรโดทอกซิน และพิษอัมพาตจากหอย.....	1
2. โครงสร้างทางเคมีอนุพันธ์ของเทโทรโดทอกซิน.....	3
3. โครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซินในสารละลาย.....	4
4. โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ของพิษอัมพาตจากหอย และหมู่ข้างเคียง.....	10
5. โครงสร้างของช่องโซเดียมที่ถูกกีดขวางด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียม ของเซลล์ประสาทหนู.....	13
6. ปฏิกิริยาของ phenylisothiocyanate กับกรดอะมิโน.....	36
7. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ผลิตโดยแบคทีเรียแต่ละชนิด ในอาหารเหลวตรวจสอบที่ระยะเวลาต่าง ๆ.....	40
8. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม และจำนวนแบคทีเรียในเนื้อหอยทราย ในระยะพิษสูง และพิษต่ำก่อนการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ.....	42
9. จำนวนแบคทีเรียในน้ำทะเล และในเนื้อหอยทรายที่เก็บในระยะหอยทราย มีพิษสูงหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 8 วัน.....	44
10. จำนวนแบคทีเรียในน้ำทะเล และในเนื้อหอยทรายที่เก็บในระยะหอยทราย มีพิษต่ำหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 8 วัน.....	45
11. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในเนื้อหอยทรายที่เก็บในระยะ หอยทรายมีพิษสูงหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ .....	47
12. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในเนื้อหอยทรายที่เก็บในระยะหอยทราย มีพิษต่ำหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ .....	48
13. ผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน.....	50
14. ผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย.....	51

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
15. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มเทโทรโตทอกซิน และสารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษวิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี.....	53
16. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มซัคซิโทกซิน และสารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ วิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี.....	55
17. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มกอนิออทอกซิน และสารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ วิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี.....	56
18. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มซี และสารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ วิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี.....	57
19. สเปกตรัมที่ได้จากแมสสเปคโตรมิเตอร์ของสารมาตรฐานเทโทรโตทอกซิน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 319 ค่าของM/e ที่ 320 คือค่า (M+1).....	58
20. สเปกตรัมที่ได้จากแมสสเปคโตรมิเตอร์ของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียสร้างพิษ.....	59
21. สเปกตรัมที่ได้จากแมสสเปคโตรมิเตอร์ของสารสกัดจากเนื้อหอยทรายระยะพิษสูงก่อนการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ.....	60
22. สเปกตรัมที่ได้จากแมสสเปคโตรมิเตอร์ของสารสกัดจากเนื้อหอยทรายระยะพิษสูงหลังจากการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ.....	61
23. สเปกตรัมที่ได้จากแมสสเปคโตรมิเตอร์ของสารสกัดจากเนื้อหอยทรายระยะพิษต่ำหลังการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ.....	62
24. กราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิตกับปริมาณเทโทรโตทอกซิน (ไมโครกรัมต่อ 10 <sup>6</sup> ไมโครลิตร) โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	92

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
25. ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ATCC CCL 131 ที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณสารก่อกวนของไขเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast กำลังขยาย 500 เท่า.....	93
26. หอยทราย (sand clam : <i>Asaphis violascens</i> ).....	95

**สัญลักษณ์และคำย่อ**

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

ซม. = เซนติเมตร

มม. = มิลลิเมตร

° = องศาเซลเซียส

% = เปอร์เซ็นต์

M = โมลาร์

mM = มิลลิโมลาร์

$\mu$ M = ไมโครโมลาร์

$\mu$ g = ไมโครกรัม