รายงานผลการวิจัย

เงินทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ.2538

เรื่อง

ความสัมพันธ์ระหว่างระยะการเจริญและการผลิตสารพิษอัมพาตและสารเทโทรโดท็อกซินในเชื้อ Vibrio spp.

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ภาญจณา จันทองจีน

615.942
ก419ค

รายงานผลการวิจัย

เงินทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ.2538

เรื่อง

ความสัมพันธ์ระหว่างระยะการเจริญและการผลิตสารพิษอัมพาตและสารเทโทรโดท็อกซินในเชื้อ Vibrio spp.

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน

I20880595 14 มี.ค. 2547

กองส่งเสริมและประสานงานวิจัย
ฝ่ายวิจัย สุพร
มอบให้หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7 , มิ.ย. , 2539

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี โดยความช่วยเหลือวิเคราะห์สารด้วยวิธี HPLC จาก Professor M. Kodama แห่ง Kitasato University และวิเคราะห์ด้วยวิธี GC–MS จาก Professor T. Noguchi แห่ง University of Tokyo ประเทศญี่ปุ่น

ผู้วิจัยขอขอบคุณเงินทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดินที่สนับสนุนงานวิจัยนี้ให้สำเร็จสมตามความมุ่งหมาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

615.942
ก1419 ก

บทคัดย่อ

ได้ทดลองหาแบบการเจริญของเชื้อ Vibrio spp. 2 สายพันธุ์ คือ St–1–1 และ Sp–H–2 โดยนำมาสัมพันธ์กับการผลิตสารพิษอัมพาตจากหอย (PSP_S) และสารเทโทรโดท็อกซิน (TTX_S) ของเชื้อทั้งสอง พบว่าเชื้อทั้งสองแสดงลักษณะ viable but non–culturable ในช่วง declining phase มีการสร้างทั้ง PSP_S และ TTX_S ภายในเซลล์ในช่วงระยะ exponential phase และสร้างด้วยปริมาณที่ไม่คงที่ไปจนถึงระยะ stationary phase และ declining phase พบว่ามีการปล่อยสารพิษอนุพันธุ์ซัคซิท็อกซิน (STX_S) และกอนิออท็อกซิน (GTX_S) ออกมาสู่อาหารเลี้ยงเชื้อภายนอกเซลล์ทันทีที่สารนี้ถูกสร้างขึ้น ไม่พบสารอนุพันธุ์ TTX_S ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่พบว่ามีสารนี้ปริมาณสูงอยู่ภายในเซลล์ ในบางระยะเชื้อสามารถผลิตสารทั้ง 3 อนุพันธุ์ได้พร้อมกัน หรือบางครั้งอาจสร้างพร้อมกันเพียง 2 อนุพันธุ์ พบว่าภาวะกรด–ด่างในขณะที่มีการผลิตสารพิษจะมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อซึ่งมีผลให้สารพิษที่ปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์สูญเสียคุณสมบัติจึงไม่สามารถตรวจพบสารเหล่านี้เมื่อเลี้ยงเชื้อไว้ตั้งแต่เวลา 168 ชั่วโมงเป็นต้นไป แต่ในเวลาดังกล่าวยังคงสามารถตรวจพบสารพิษภายในเซลล์ได้ จึงอาจเป็นการแสดงให้เห็นว่า pH น่าจะไม่มีอิทธิพลต่อการสร้างสารพิษของเซลล์ ผลการทดลองยืนยันว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างสารพิษทั้ง 3 อนุพันธุ์ ได้ในเชื้อเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

พิษอัมพาตจากหอย (Paralytic Shellfish Poisons, PSP_S) และเทโทรโดท็อกซิน (Tetrodotoxins, TTX_S) เป็นสารพิษชนิดที่ไม่ใช่โปรตีนมีผลทำให้เกิดอาการต่อระบบประสาทส่วนกลางในคนหรือสัตว์เมื่อได้รับสารพิษนี้โดยการรับประทานจะก่อให้เกิดอาการชาที่ปาก ลิ้น ขากรรไกร แน่นหน้าอก หายใจลำบาก คลื่นไส้ ปวดและเวียนศีรษะ ถ้าได้รับพิษปริมาณมากจะถึงแก่ความตายได้ สารพิษนี้อยู่ในกลุ่มสารกีดขวางช่องโซเดียม (Sodium channel blockers) ซึ่งมีคุณสมบัติสำคัญคือการยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาท โดยเข้าไปกีดขวางที่ช่องโซเดียมอย่างจำเพาะบนเยื่อหุ้ม axon ของเซลล์ประสาทเป็นผลให้ polalization ของการเกิดกระแสประสาทไม่เกิดขึ้น ทำให้ skeletal muscle ไม่ทำงาน ร่างกายจะเป็นอัมพาต (Kao and Levinson, 1986) สารพิษทั้งสองกลุ่มนี้พบได้อย่างกว้างขวางตั้งแต่สิ่งที่มีชีวิตขนาดใหญ่ไปจนถึงสิ่งที่มีชีวิตขนาดเล็ก เช่น เชื้อแบคทีเรียและพบว่ามีการกระจายทั่วไปทั้งในเขตอบอุ่น และเขตร้อนทั่วโลก ในแง่ความเป็นพิษนี้จึงนับว่าก่อให้เกิดปัญหาใหญ่ทางด้านสาธารณะสุขและเศรษฐกิจของโลก

ในขณะเดียวกันทางด้านการแพทย์พบว่า สารทั้งสองกลุ่มนี้มีคุณสมบัติสำคัญที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ นั่นคือความสามารถที่มีความจำเพาะสูงในการกีดขวางช่องโซเดียมที่เซลล์ประสาทนั้นสามารถนำมาใช้เป็นสารระงับความเจ็บปวด หรือใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ธารา ตริตระการ และคณะ, 2523) นอกจากนี้ในการศึกษาวิจัยทางด้านประสาทสรีรวิทยา (Neurophysiology) และประสาทเภสัชวิทยา (Neuropharmacology) ก็มีความต้องการใช้สารนี้เพื่อศึกษาทดลองเช่นเดียวกัน

ดังนั้นในด้านการแพทย์ เภสัชวิทยา ประสาทวิทยา จะให้ความสำคัญแก่สารดังกล่าว แต่เนื่องจากขบวนการผลิตเพื่อให้ได้สารนี้มาใช้ยังไม่มีวิธีที่เหมาะสม และต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง โดยมักจะได้จากการสกัดจากสัตว์มีพิษ หรือใช้วิธีสังเคราะห์ทางเคมี โดยวิธีที่ยุ่งยากซับซ้อน

สารพิษอัมพาตจากหอย (PSP_S) พบในหอยกาบ หอย 2 ฝาน้ำเค็ม ซึ่งมีการกินอาหารแบบ filter feeding พบว่า ต้นเหตุสำคัญของการเกิดพิษในหอย คาดว่ามาจากไดโนแฟลกเจลเลท (dinoflagellate) ชนิด Alexandrium tamarense และ A. cohorticula ซึ่งเป็นชนิดที่มีพิษ (Kodama, et al., 1988) แต่ต่อมาเมื่อได้ตรวจดูภาคตัดขวางของเซลล์ A. tamarense โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบเซลล์แบคทีเรียอยู่ภายใน (Kodama and Ogata, 1988) และเมื่อ

แยกแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษา พบว่า เป็นแบคทีเรียในสกุล Moraxella ซึ่งสามารถสร้างสารพิษในกลุ่ม PSP_S ได้ (Kodama et al., 1990)

ส่วนสารเทโทรโดท๊อกซิน (TTX_S) มีชื่อเรียกแต่เดิมว่า พิษปลาปักเป้า (Puffer toxin) เนื่องจากพบครั้งแรกในปลาวงศ์ Tetraodontiformes ต่อมาพบว่าในสัตว์ทะเลชนิดอื่น รวมทั้งสัตว์เลื้อยคลานบางชนิดก็มีพิษชนิดนี้ เป็นการชี้ให้เห็นว่า การเกิดพิษในสัตว์อาจไม่ใช่มาจากพันธุกรรมเป็นปัจจัยหลัก ต่อมามีผู้พบแบคทีเรียที่สร้างเทโทรโดท๊อกซินในสัตว์ต่าง ๆ หลายชนิดเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในสกุลต่าง ๆ กันคือ Vibrio Pseudomonas Aeromonas Photobacterium Alteromonas และ Plesiomonas ซึ่งเป็น marine bacteria (Simidu et al., 1987)

ในประเทศไทยได้มีผู้แยกเชื้อแบคทีเรีย Vibrio sp. ได้จากบริเวณลำไส้และไข่ของแมงดาทะเลชนิดมีพิษ (Carcinoscorpins rotundicanda) และเชื้อนี้ผลิตสาร TTX_S ได้ (Kungsuwan et al., 1988) แต่ยังไม่ได้มีการศึกษาในรายละเอียดของแบคทีเรียชนิดนี้

ส่วนแบคทีเรียที่สร้างสารพิษอัมพาตจากหอยนั้น Kodama และ Ogata (1988) ได้แยกเชื้อสกุล Moraxella sp. ได้จาก dinoflagellate สายพันธุ์ที่มีพิษ ซึ่งพบว่าถ้ามีเชื้อแบคทีเรียนี้อยู่ใน culture ของ dinoflagellate จะทำให้ dinoflagellate มีพิษมาก นอกจากนี้ Kodama et al. (1990) ได้ทดลองเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำทะเล โดยไม่ผสมสารอาหารใด พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในสภาพ starvation จะสร้างสารที่มีความเป็นพิษสูง และมีความบริสุทธิ์สูงด้วย สำหรับงานวิจัยในประเทศไทยเกี่ยวกับ PSP_S นี้ยังไม่มีผู้ใดศึกษารายละเอียดในเรื่องของแบคทีเรียที่สร้างสารนี้ได้

จากการพบแบคทีเรียดังที่กล่าวมาแล้ว ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาสัตว์ทะเลในประเทศไทย จึงได้พบว่า มีสัตว์ทะเลหลายชนิดที่มีแบคทีเรียสร้างพิษนี้อยู่ในร่างกาย และสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ โดยพบเชื้อในสกุล Vibrio Pseudomonas Micrococcus และยังมีสายพันธุ์อื่นที่ยังมิได้จำแนกอีกด้วย (Juntongjin et al., 1993) เป็นการแสดงให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียสร้างพิษนี้มีการกระจายอยู่อย่างกว้างขวางมิได้มีแต่ในเขตอบอุ่นเท่านั้น ผู้วิจัยได้นำเชื้อสร้างพิษที่แยกได้มาศึกษาขบวนการสร้างสารพิษ จึงพบว่า ในเชื้อแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษได้ทั้งสองกลุ่มในเวลาเดียวกัน และในสภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกัน การพบนี้แตกต่างจากนักวิทยาศาสตร์อื่นที่ได้เผยแพร่ผลงานมาแล้ว เนื่องจากท่านเหล่านั้นมักจะพบว่า แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะสร้างสารพิษในกลุ่ม TTX_S หรือ PSP_S อย่างใดอย่างหนึ่ง จึงนับได้ว่าการพบแบคทีเรียสร้างพิษได้ทั้งสองกลุ่มนี้เป็นการพบครั้งแรกทีเดียว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการสร้างสารพิษทั้งสองกลุ่มของแบคทีเรีย โดยศึกษาช่วงระยะการเจริญของเชื้อ Vibrio sp. ที่ผู้วิจัยแยกได้ ว่าเวลาใดที่เชื้อจะสร้าง PSP_S และเวลาใดที่เชื้อจะสร้าง TTX_S หรือทั้งสองชนิดพร้อมกัน พร้อมกับทราบแบบของการเจริญของเชื้อ และสามารถตรวจดูว่าสารพิษที่สร้างจะหลั่งออกมาภายนอกเซลล์หรือเก็บไว้ภายในเซลล์ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของการเจริญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิจัย

การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

โดยใช้เชื้อแบคทีเรียทะเล Vibrio sp. 2 สายพันธุ์ คือ St-1-1 และ Sp-H-2 ซึ่งแยกได้จากหอยทรายที่เก็บจากเกาะสีชังจังหวัดชลบุรี

เลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ใน precultivation medium ซึ่งใช้ L-medium ที่ประกอบด้วย (กรัมในน้ำกรอง 1 ลิตร) : NaCl 17.53, $MgSO_4.7H_2O$ 2.46, K_2HPO_4 1.0, polypeptone 5, yeast extract 5, glucose 2 ปรับ pH 7.5-7.6 เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่า 200 rpm 28°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใช้เชื้อที่เลี้ยงได้จำนวน 10 มล. ใส่ลงใน cultivation medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกับ precultivation medium จำนวน 14 ขวดต่อเชื้อ 1 สายพันธุ์ นำขวดทั้งหมดไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm ที่ 28°ซ. เป็นเวลา 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 และ 240 ชั่วโมง แบ่งเชื้อเฉพาะขวดที่เขย่า 216 ชั่วโมง ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ 2 ขวด ๆ ละ 10 ml นำไปเขย่าที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แต่ละช่วงเวลา (เริ่มต้นจาก 0 ชั่วโมง) จะเก็บขวดที่เลี้ยงเชื้อแต่ละขวด แล้วนำมาทำการทดลองดังนี้

1. วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)
2. วัดการเจริญ โดยวิธีหาทั้ง cell mass และ cell number โดยวิธีวัดค่า optical density และ viable plate count รวมทั้ง Direct count
3. สกัดสารพิษจากเซลล์ของแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. ทดสอบคุณสมบัติการกีดขวางช่องโซเดียม (Sodium channel blocking, SCB) และวิเคราะห์ชนิดของสารพิษโดยวิธีเอชพีแอลซี (HPLC)

การทำ viable plate count (VC)

นำส่วนหนึ่งของเชื้อ Vibrio spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ จากขวดที่เพาะเลี้ยงแต่ละขวดที่เก็บในช่วงเวลาต่าง ๆ มาทำ 10-fold dilution แล้วใช้ตัวอย่างที่เจือจางแล้วนี้ไปกระจายบน ORI agar plate (Simidu et al., 1983) โดยทำ 2 ซ้ำ นำไปบ่มเชื้อที่ 27°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกที่มีจำนวนอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี แล้วนำมา

คำนวณหาจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียโดยใช้หน่วย CFU (colony forming unit) ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร

การทำ Direct count (DC) โดยใช้วิธี epifluorescence microscopy

โดยใช้ส่วนหนึ่งของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งเก็บจากแต่ละขวดเพาะเลี้ยงในช่วงเวลาต่าง ๆ เช่นเดียวกับในการทำ VC จำนวน 10 มล. fix ด้วย 20% formalin แล้วใช้เชื้อที่ fix แล้วนี้จำนวน 2 มล. ย้อมด้วยสี acridine orange (AO) จำนวน 0.2 มล. เป็นเวลา 1–2 นาที แล้วกรองด้วยแผ่น nuclepore ซึ่งแช่ไว้ใน 0.2% Irgalan black solution เป็นเวลา 10–20 ชั่วโมง วางแผ่นกรองนี้บนแผ่นสไลด์แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใส่ immersion oil ไว้ด้วย แล้วนำแผ่นกรองไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ epifluorescent โดยใช้ ultra–high mercury lamp ที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยใช้ B2 เป็น excitation filter และ BA520 เป็น barrier filter การตรวจดูใช้เปรียบเทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำทะเลที่กรองแล้วแทนตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

การสกัดสารพิษจากเซลล์แบคทีเรีย

นำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในขวดส่วนที่เหลือจากการทำ VC และ DC แต่ละช่วงเวลาจำนวน 200 มล. ไปปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 0^{o}ซ. เป็นเวลา 15 นาที แยกตะกอนเซลล์มาล้างด้วย 0.3 M NaCl แล้วละลายใน 0.1% acetic acid นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Ultrasonication แล้วแยกเศษเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง ส่วนสารพิษจะละลายอยู่ในส่วนน้ำใส นำไปทำให้แห้งเป็นผงโดยใช้ freeze–dryer แล้วเก็บไว้ที่ -20^{o}ซ. เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

การสกัดสารพิษจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว

ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว ในทุกตัวอย่างนำมาทำให้แห้งโดยวิธี freeze–dry แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธี acid–methanol extraction 3 ครั้ง (Noguchi et al., 1987) จะได้สารพิษอยู่ในลักษณะผง นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20^{o}ซ. เพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์คุณสมบัติในการกีดขวางช่องโซเดียม (SCB)

นำสารพิษตัวอย่างที่อยู่ในลักษณะผงที่สกัดได้จากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว ไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยผ่านคอลัมน์สำเร็จรูป Sep Pak C_{18} (Waters Associates, Milford, Massachusetts) แล้วนำไปแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งใช้ตรวจหาคุณสมบัติในการเป็น SCB อีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์ด้วยเอช พี แอล ซี คุณสมบัติการเป็น SCB ตรวจโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(Kogure et al., 1988) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทหนู (mouse neuroblastoma cell culture) และอาศัยหลักการที่ว่าเมื่อใช้สารละลาย Ouabain (10mM) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ Na^+-K^+ ATPase และสารละลาย Veratridine (1mM) ซึ่งเป็น Na^+ influx agent ใส่ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง จะทำให้ Na^+ ไหลเข้าสู่ภายในเซลล์โดยไม่มีความจำกัด ทำให้เซลล์บวมและตายในที่สุด แต่ถ้าใส่สารที่มีคุณสมบัติเป็น SCB ลงไปก่อน จะมีการกีดขวาง (block) ตรงบริเวณช่องโซเดียมของเซลล์ จึงทำให้ไม่เกิดการไหลของ Na^+ เข้าสู่เซลล์ และเซลล์ไม่ได้รับผลจากสารสองชนิดดังกล่าวจึงยังคงมีชีวิตอยู่ได้ เมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่อยู่รอดที่เกิดจากสารพิษตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารพิษมาตรฐาน (ใช้เทโทโดท็อกซินที่ใช้ในการค้าเป็นสารพิษ SCB มาตรฐาน) จะสามารถทราบปริมาณสาร SCB ที่สร้างจากแบคทีเรียได้

<u>การวิเคราะห์ชนิดของสาร SCB โดยใช้เอช พี แอล ซี</u>

ใช้สารพิษส่วนที่นำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยผ่านคอลัมน์สำเร็จรูป Sep Pak C_{18} แล้วมาวิเคราะห์หาชนิดของอนุพันธุ์ของ PSP_sซึ่งได้แก่ GTX 1-4, STX และ neoSTX โดยใช้เอช พี แอล ซีตามวิธีวิเคราะห์ของ Oshima et al. (1989) และชนิดของอนุพันธุ์ในกลุ่ม TTX_s ซึ่งได้แก่ TTX, anhydro TTX และ 4-epi-TTX โดยใช้เอช พี แอล ซีตามวิธีของ Yasumoto and Michishita (1985)

ผลของการวิจัย

แบบของการเจริญของ Vibrio sp. สายพันธุ์ St–1–1 และ Sp–H–2 โดยการศึกษาจากการวัดการเจริญ 3 วิธี คือวัดค่า OD VC และ DC พบว่าเชื้อทั้งสองมีลักษณะการเจริญเป็นแบบ viable but non–culturable ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง หลังใส่เชื้อโดยสังเกตจากค่า VC ที่ลดลง โดยเฉพาะเชื้อ Sp–H–2 ค่า VC ลดลงจนเป็นศูนย์ แต่ค่า OD และ DC ยังคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 1,2 ระยะ exponential phase เริ่มต้นจาก 12 ถึง 18 ชั่วโมงของการบ่มเชื้อไปจนถึง 24 ถึง 48 ชั่วโมง การเจริญในช่วง stationary phase ของเชื้อทั้งสองโดยการวัดด้วย OD และDC พบว่าช่วงการเจริญนี้มีความยาวไปจนถึง 240 ชั่วโมง แต่โดยการวัดด้วยวิธี VC พบว่าระยะ stationary phaseมีความยาวเพียงแค่ 48 ถึง 72 ชั่วโมง แล้วจะเริ่มต้นเป็น declining phase โดยเฉพาะเชื้อสายพันธุ์ Sp–H–2 ไม่สามารถพบโคโลนีบนจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทำ VC เลยจนกระทั่ง 240 ชั่วโมง แต่พบว่าที่ 24' และ 48' ซึ่งใส่อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ลงไปในเชื้อที่มีอายุ 216 ชั่วโมง พบว่าเชื้อนี้จะกลับมีการเจริญบนจานเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง

กิจกรรมในการกีดขวางช่องโซเดียมของสารพิษที่เชื้อผลิตขึ้น โดยสัมพันธ์กับแบบของการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ดังแสดงในรูปที่ 3, 4 พบว่าสารพิษที่มีคุณสมบัติกีดขวางช่องโซเดียมจะเกิดขึ้นภายในเซลล์ในระยะ late exponential phase คือที่ 24 ชั่วโมงหลังใส่เชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อสายพันธุ์ St–1–1 สร้างสารพิษภายในเซลล์ได้สูงในระหว่าง 72 ถึง 144 ชั่วโมง ส่วน Sp–H–2 สร้างได้สูงในระหว่าง 92 ถึง 120 ชั่วโมงของการเจริญ (รูปที่ 3, 4) แต่สามารถพบภายในเซลล์ได้จนถึง 240 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

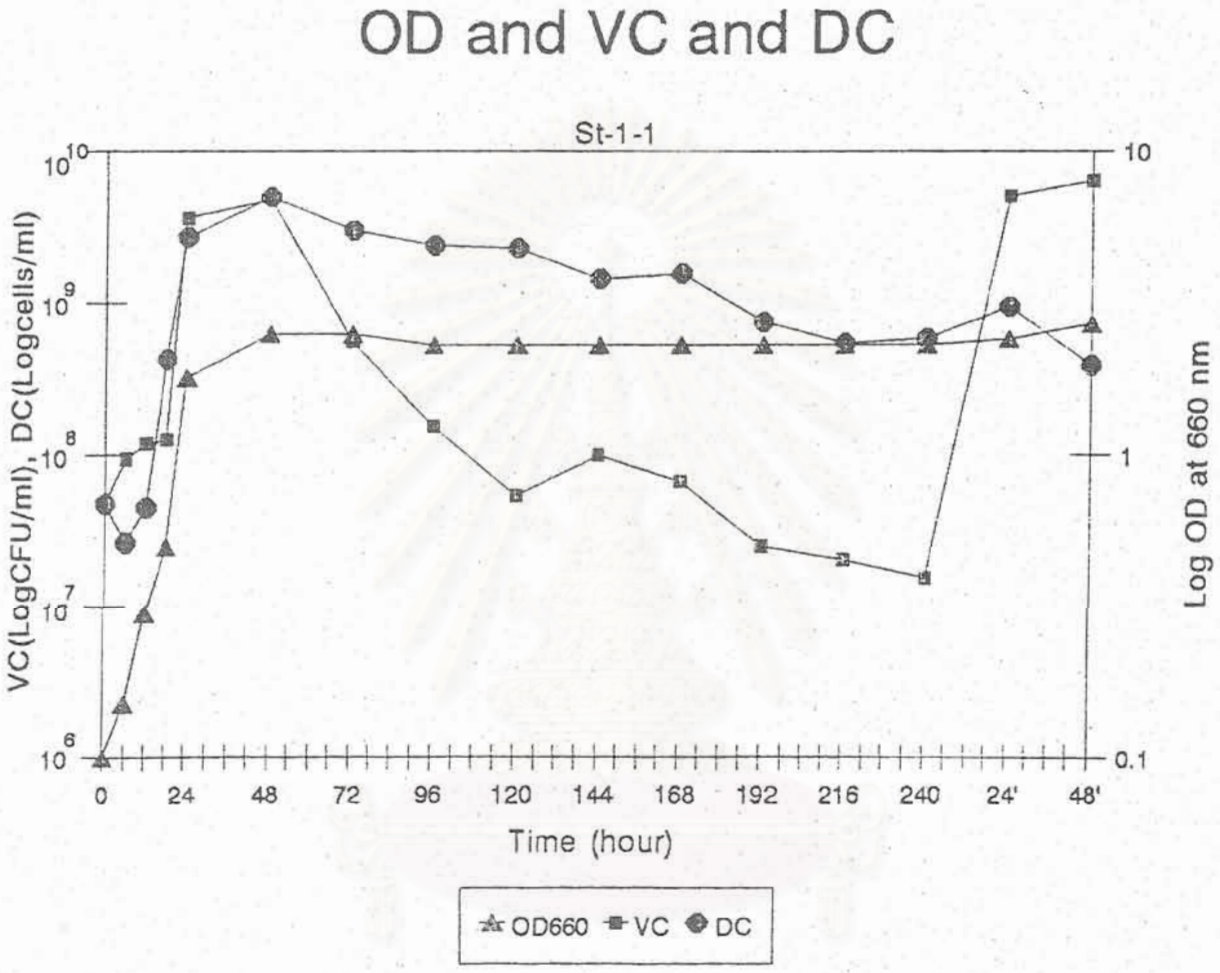
ส่วนภายนอกเซลล์คือในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าในเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ปริมาณลดลงและบางช่วงเวลาจะไม่พบเลย โดยเกิดขึ้นตั้งแต่เวลา 168 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป (รูปที่ 3, 4) เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด–ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ภายนอกเซลล์จะเห็นว่า ค่า pH จะสูงขึ้นประมาณ 9 ในขวดที่เลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เวลา 144 ชั่วโมงเป็นต้นไป (รูปที่ 5, 6, 7, 8)และพบว่า ตั้งแต่ 168 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ไม่สามารถพบสารพิษภายนอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเลย (รูปที่ 6, 8) แต่ยังคงพบได้ภายในเซลล์ในช่วงเวลาตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง 240 ช.ม. (รูปที่ 5, 7) ถึงแม้ว่า pH จะเพิ่มสูงขึ้นก็ตาม

ส่วนในเวลา 24' และ 48' ที่ใช้เชื้อจากระยะเวลาการเลี้ยง 216 ชั่วโมง ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขวดใหม่ สายพันธุ์ Sp-H-2 ซึ่งแต่เดิมไม่สามารถเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ พบว่าเชื้อนี้จะกลับไปมีคุณสมบัติในการทำให้เกิดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้ และสามารถสร้างสารพิษในระยะ late log phase หรือ early stationary phase ได้ (รูปที่ 3, 4)

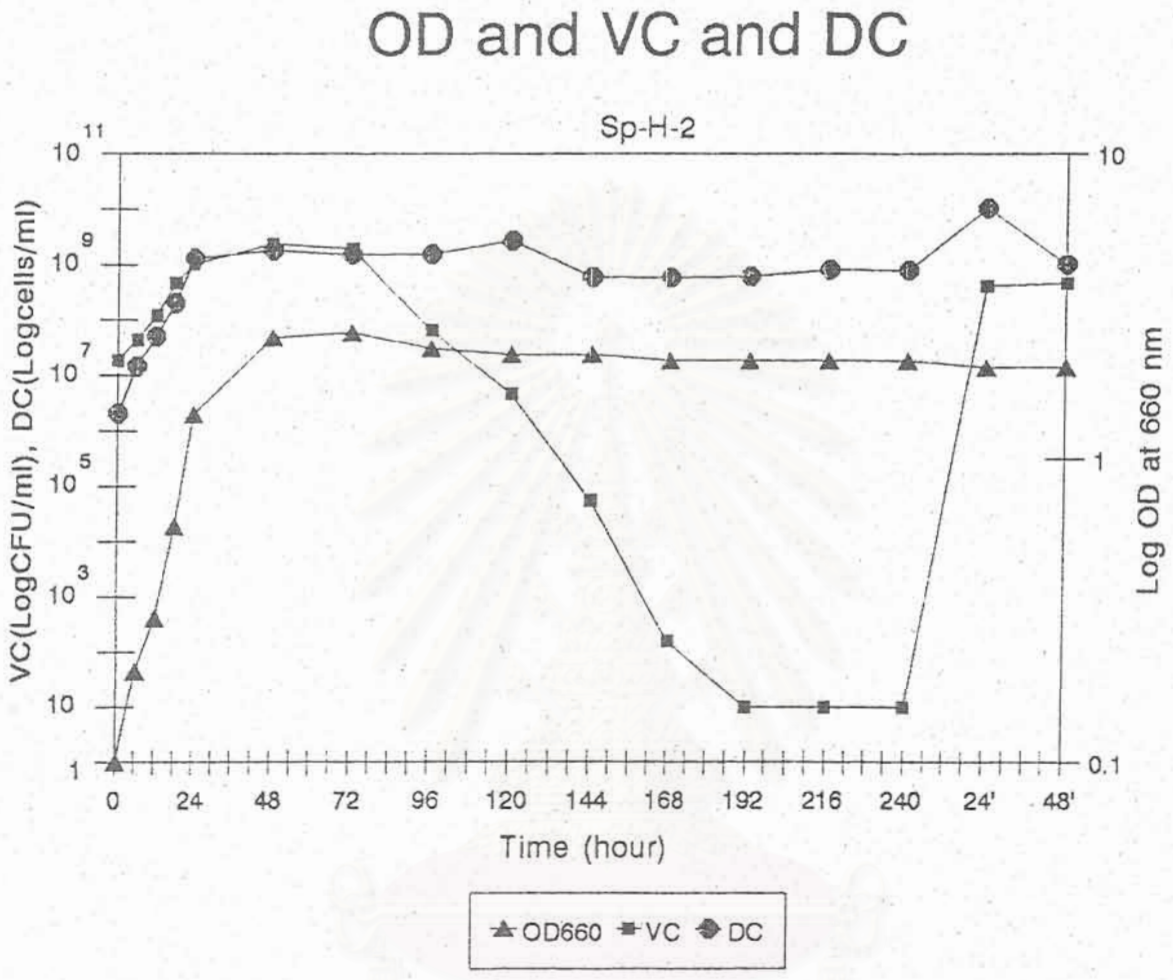
ส่วนประกอบของอนุพันธุ์สารพิษสร้างขึ้นในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ทั้งสอง โดยการวิเคราะห์ด้วยเอช พี แอล ซี แสดงในรูปที่ 5, 6, 7, 8 พบว่าสารพิษที่พบก่อนในช่วง 24 ชั่วโมงภายในเซลล์ของสายพันธุ์ St-1-1 คืออนุพันธุ์ STX_S (รูปที่ 5) และพบในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลานี้ด้วย (รูปที่ 6) ส่วน TTX_S นั้นพบภายในเซลล์ในช่วงหลังของการเจริญ แต่ไม่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วน GTX_S นั้นอาจเป็นอนุพันธุ์ที่จะปล่อยออกภายนอกเซลล์หลังจากถูกสร้างขึ้น เพราะพบในอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนมาก

สำหรับสายพันธุ์ Sp-H-2 พบว่าสารพิษทั้ง 3 กลุ่มถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ตั้งแต่เลี้ยงเชื้อได้ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 7) และพบเฉพาะอนุพันธุ์ GTX_S เท่านั้นที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 8) หลังเลี้ยงเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมงจะพบทั้ง 3 อนุพันธุ์ ในบางเวลาเมื่อตรวจดูจากเซลล์ แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีอนุพันธุ์ GTX_S เป็นส่วนใหญ่ แต่ทุกอนุพันธุ์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อจะหายไปหลัง 168 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเนื่องจาก pH ในช่วงนั้นสูงถึง 9

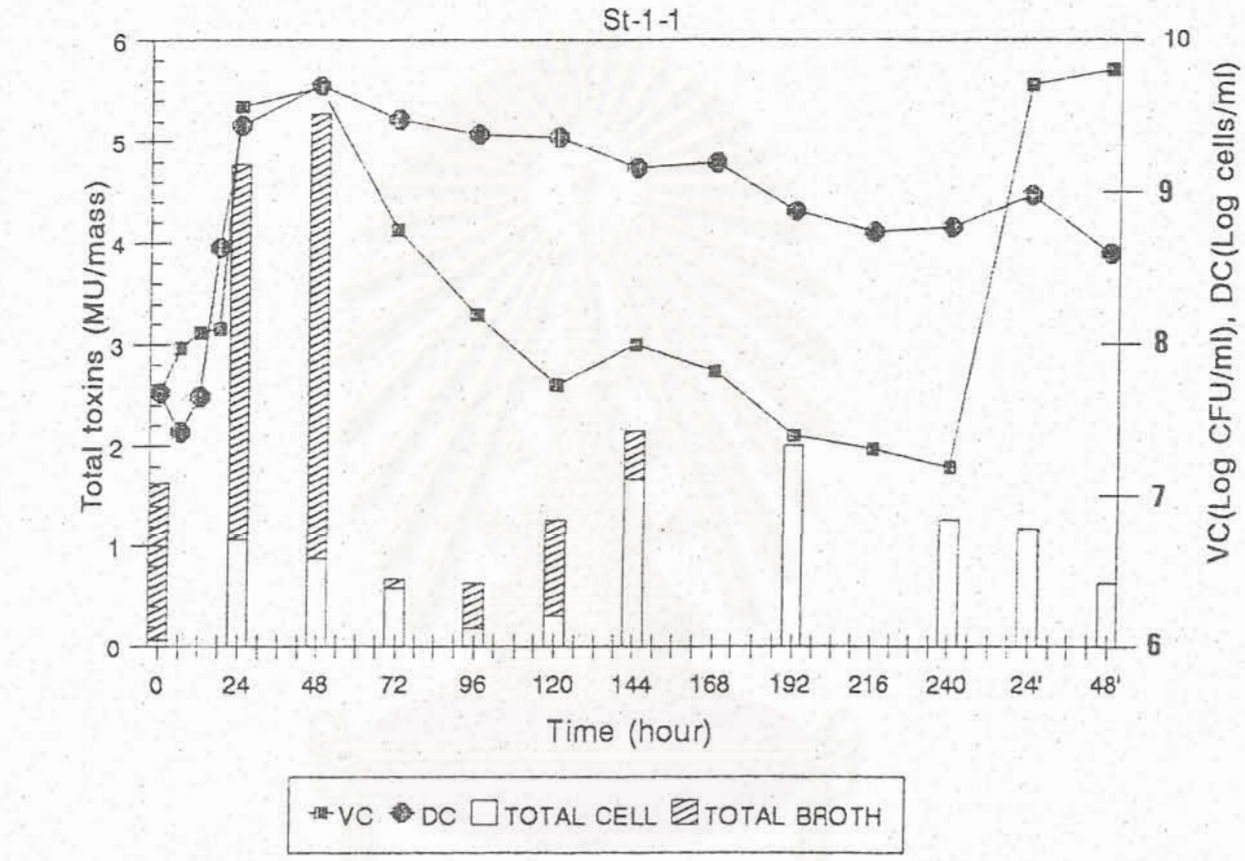
โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ด้วยเอช พี แอล ซี ของบางตัวอย่าง สารพิษที่สร้างจากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ ทั้งจากภายในเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในรูปที่ 9, 10, 11



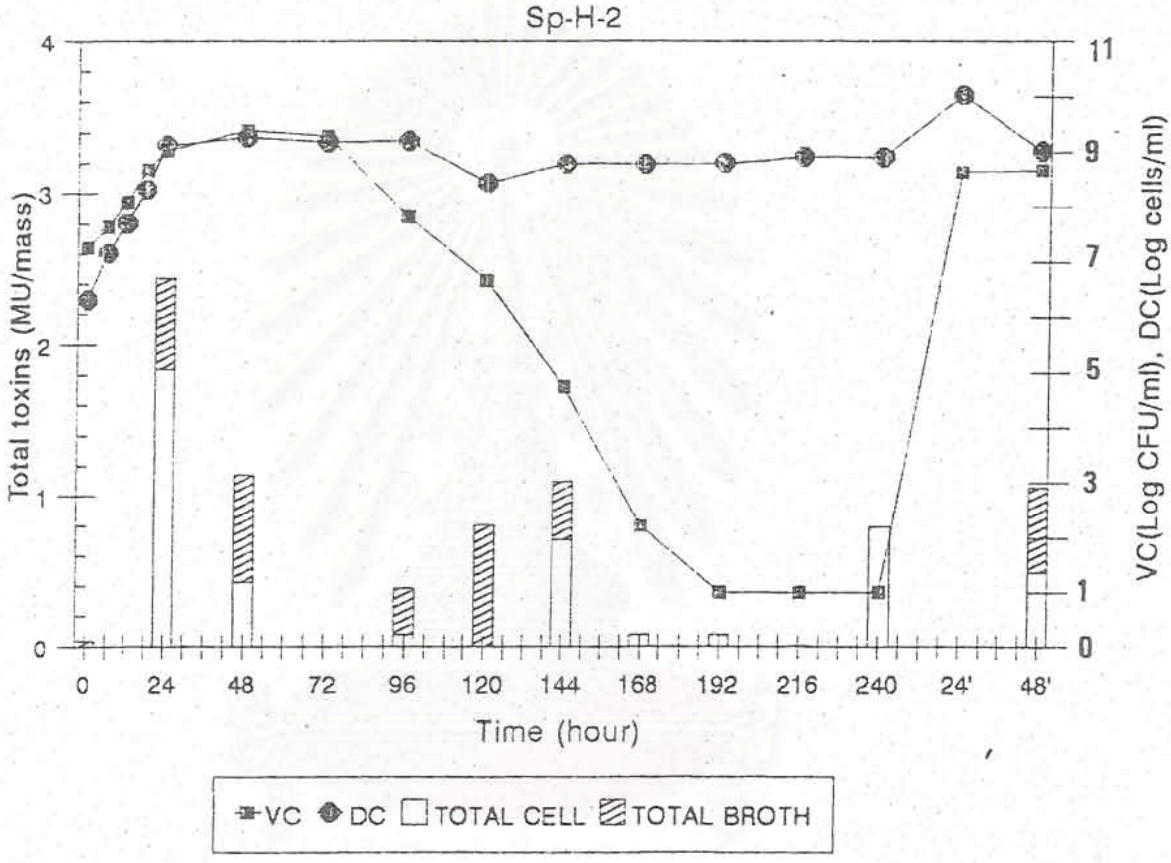
รูปที่ 1 แบบของการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Vibrio sp. สายพันธุ์ St-1-1 โดยวัดการเจริญด้วยวิธีวัดค่า optical density (OD), การทำ Viable plate count (VC) และการทำ Direct count (DC) โดย epifluorescence microscopy



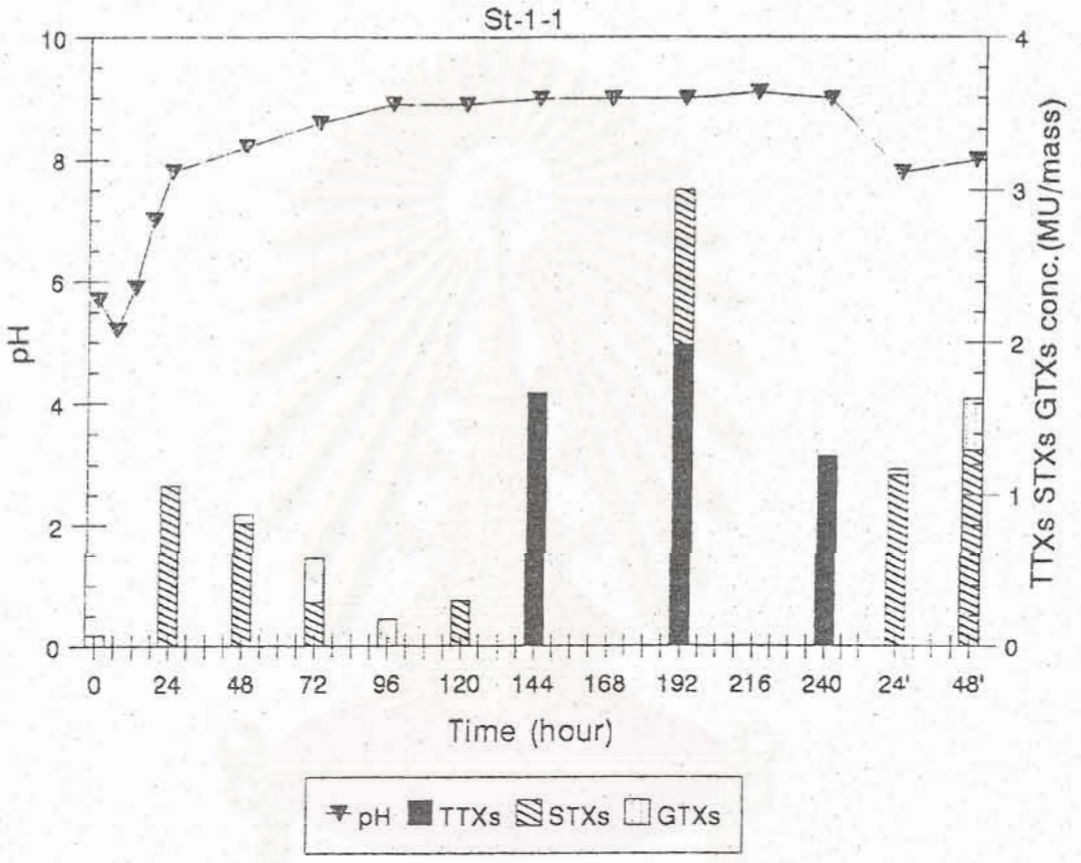
รูปที่ 2 แบบของการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Vibrio sp. สายพันธุ์ Sp-H-2 โดยวัดการเจริญด้วยวิธีวัดค่า optical density (OD), การทำ Viable plate count (VC) และการทำ Direct count (DC) โดย epifluorescence microscopy



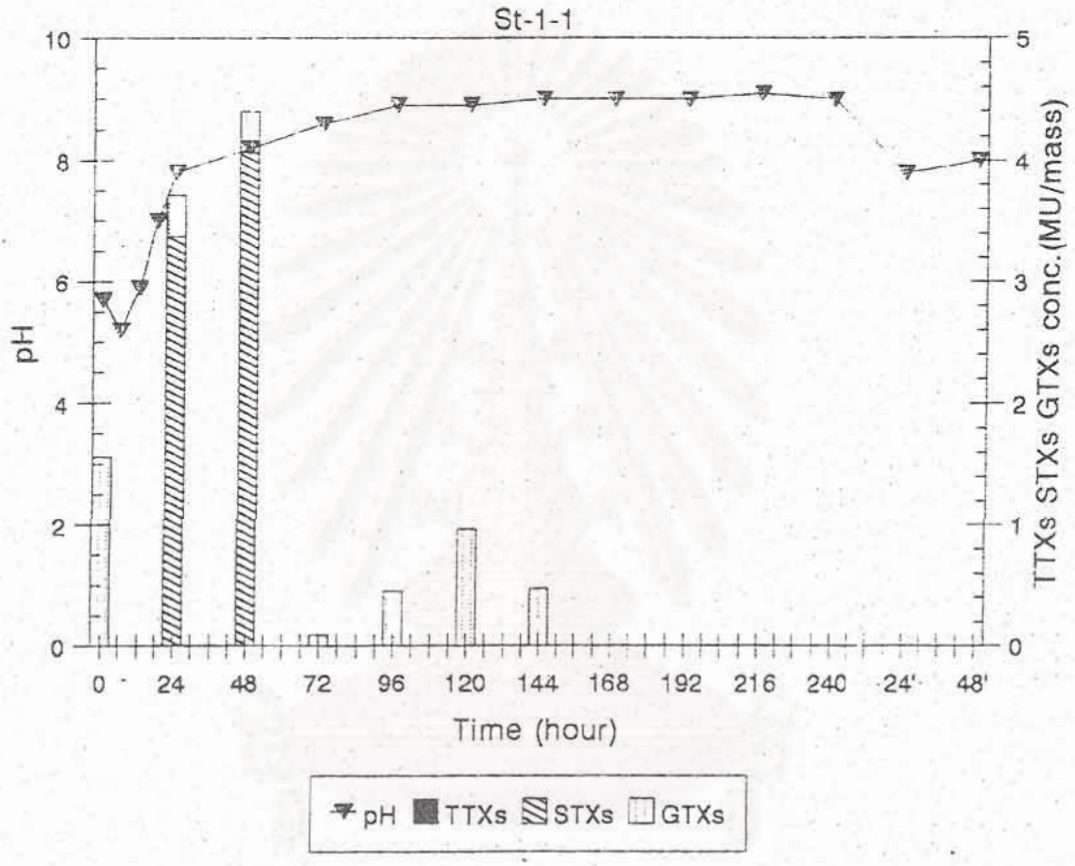
รูปที่ 3 แบบของการเจริญและการสร้างสารพิษที่ผลิตภายในเซลล์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย Vibrio sp. สายพันธุ์ St–1–1



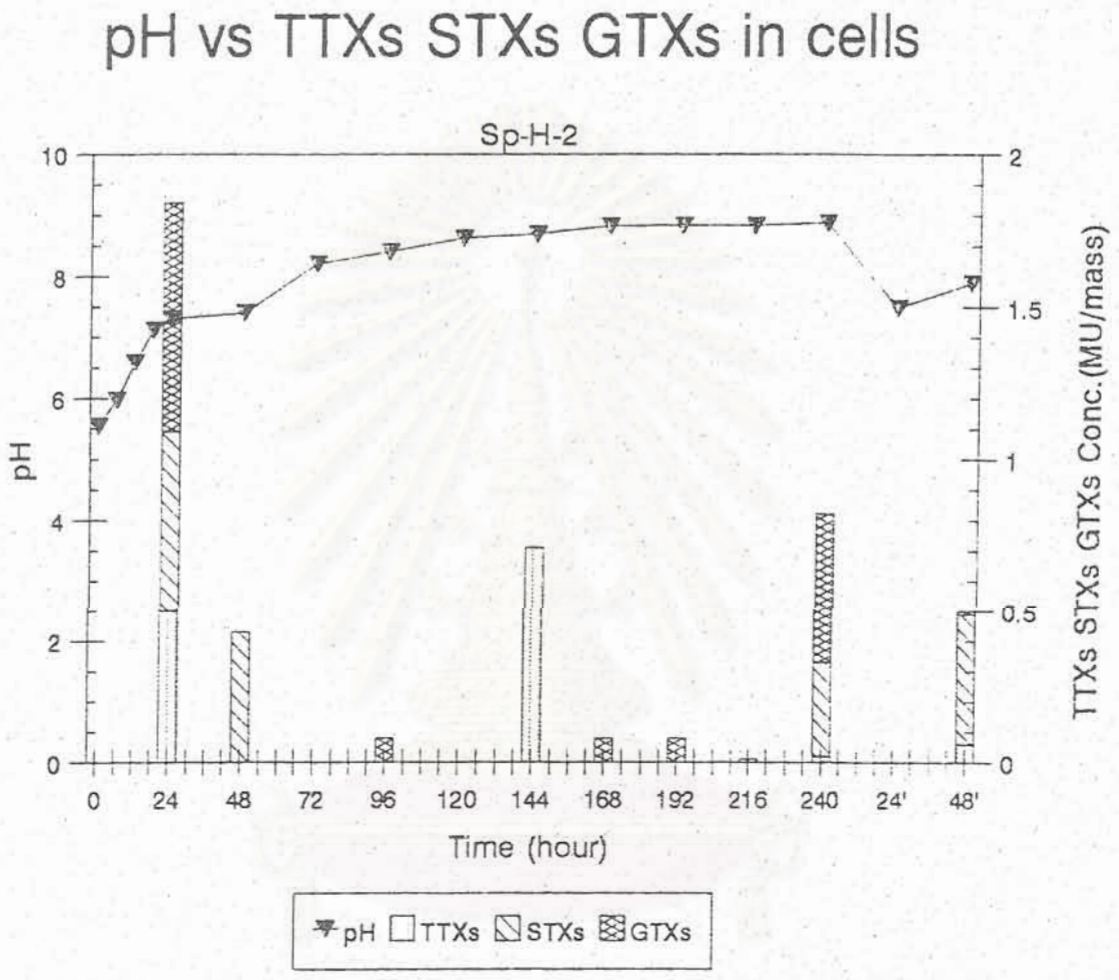
รูปที่ 4 แบบของการเจริญ และการสร้างสารพิษที่ผลิตภายในเซลล์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย Vibrio sp. สายพันธุ์ Sp-H-2



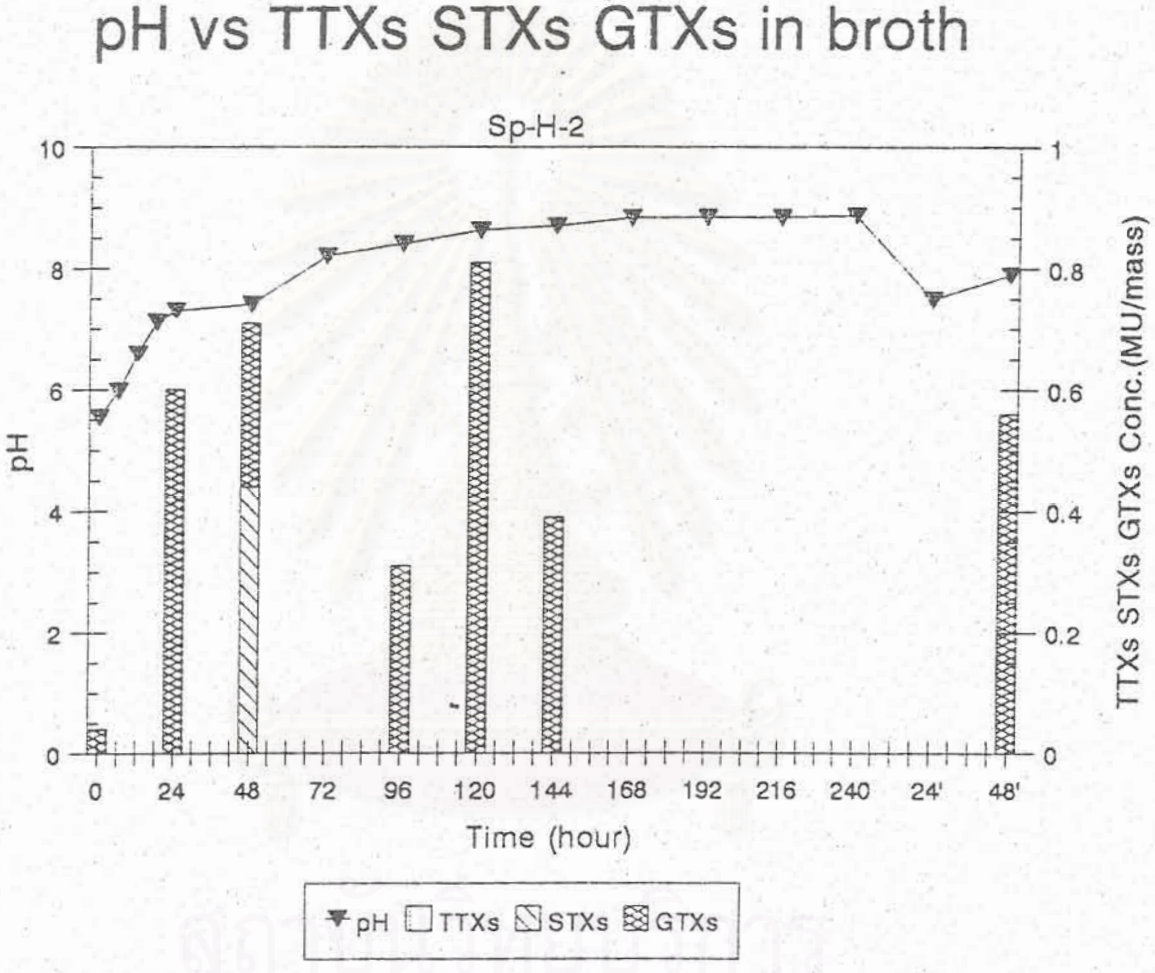
รูปที่ 5 สารพิษที่วิเคราะห์และจำแนกชนิดโดยวิธี เอช พี แอล ซี จากภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ St–1–1 โดยวัดความเข้มข้นของสารพิษเป็น mouse unit ต่อมวลของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว 200 มิลลิลิตร พร้อมทั้งแสดงค่า pH ในระหว่างการเพาะเลี้ยง



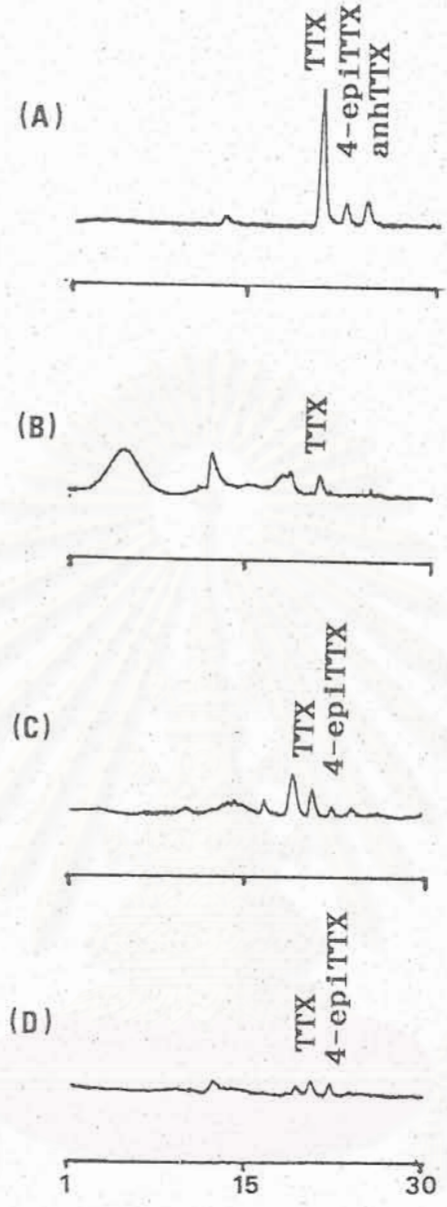
รูปที่ 6 สารพิษที่วิเคราะห์และจำแนกชนิดโดยวิธี เอช พี แอล ซี จากภายนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ St–1–1 โดยวัดความเข้มข้นของสารพิษเป็น mouse unit ต่อปริมาตรอาหารเหลว 200 มิลลิลิตร พร้อมทั้งแสดงค่า pH ในระหว่างการเพาะเลี้ยง



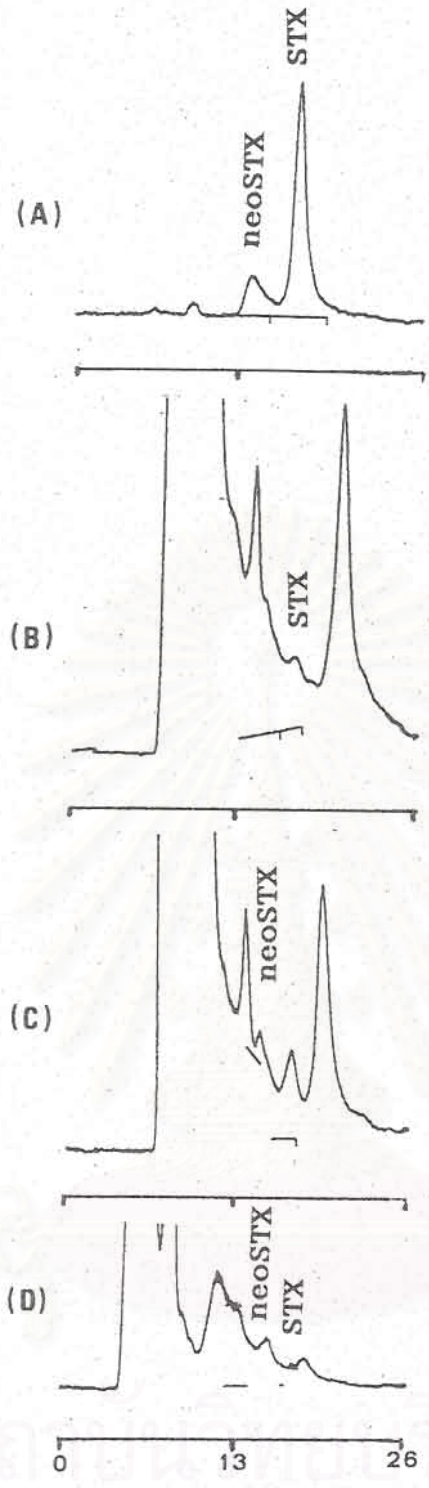
รูปที่ 7 สารพิษที่วิเคราะห์และจำแนกชนิดโดยวิธี เอช พี แอล ซี จากภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Sp-H-2 โดยวัดความเข้มข้นของสารพิษเป็น mouse unit ต่อมวลของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว 200 มิลลิลิตร พร้อมทั้งแสดงค่า pH ในระหว่างการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 8 สารพิษที่วิเคราะห์และจำแนกชนิดโดยวิธี เอช พี แอล ซี จากภายนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ Sp-H-2 โดยวัดความเข้มข้นของสารพิษเป็น mouse unite ต่อปริมาตรอาหารเหลว 200 มิลลิลิตร พร้อมทั้งแสดงค่า pH ในระหว่างการเพาะเลี้ยง

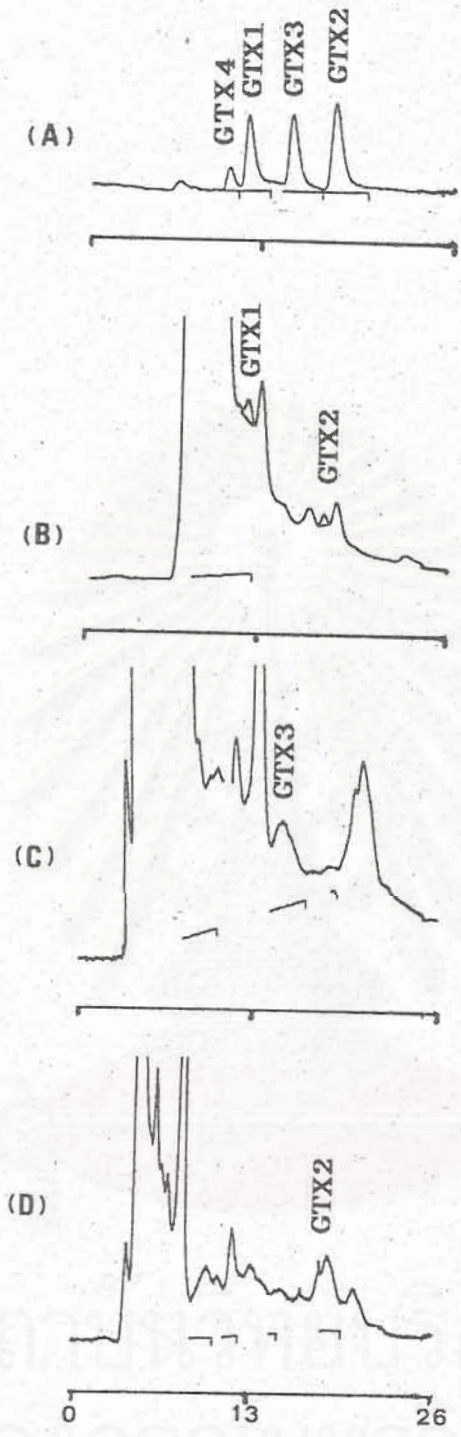


รูปที่ 9 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์เอช พี แอล ซี ของ (A) TTX_S มาตรฐาน, (B) อนุพันธุ์ TTX ที่สกัดจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ St–1–1 ซึ่งเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง, (C) (D) อนุพันธุ์ TTX และ 4 epi–TTX ที่สกัดจากเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Sp–H–2 ซึ่งเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ



รูปที่ 10 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์เอช พี แอล ซี ของ (A) STX_S มาตรฐาน, (B) อนุพันธุ์ STX ที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Sp–H–2 ที่เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24' ชั่วโมง, (C) อนุพันธุ์ neoSTX ที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ St–1–1 ซึ่งเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง, (D) อนุพันธุ์ STX และ neo STX ที่สกัดจากเซลล์ของ St–1–1 ซึ่งเลี้ยงเป็นเวลา 24' ชั่วโมง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์เอช พี แอล ซี ของ (A) GTX_5 มาตรฐาน, (B) อนุพันธุ์ GTX_1 และ GTX_2 (C) อนุพันธุ์ GTX_3, (D) อนุพันธุ์ GTX_2 และ GTX_4 ที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Sp-H-2 ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 192, 216 และ 24' ชั่วโมงตามลำดับ

การอภิปรายผลและข้อสรุป

ในการวัดการเจริญของเชื้อ Vibrio spp. 2 สายพันธุ์คือ St-1-1 และ Sp-H-2 โดยใช้ 3 วิธีเพื่อเปรียบเทียบกันคือ การวัด optical density (OD) การทำ viable plate count (VC) และการทำ direct count (DC) โดยวิธี epifluorescence microscopy พบว่าการทำ VC นั้นมีข้อจำกัดเนื่องจากเชื้อพวกที่เป็นแบคทีเรียทะเล และเชื้อแบคทีเรียกรัมลบบางชนิดจะมีช่วงระยะที่เป็น viable but non-culturable stage (Rosak and Colwell, 1987) และพบว่าในงานวิจัยนี้เชื้อทั้งสองที่ศึกษาจะแสดงคุณสมบัตินี้ โดยเฉพาะเชื้อสายพันธุ์ Sp-H-2 จะไม่มีการสร้างโคโลนีเกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อเลยเมื่อทำ VC ในระยะหลัง late stationary phase ดังนั้นจึงได้ใช้การวัดโดยวิธี DC เพื่อเปรียบเทียบ จึงพบว่าในระยะที่ไม่มีโคโลนีเกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะพบว่าเซลล์ยังคงเป็นเซลล์ที่มีชีวิตแต่ไม่สามารถทำให้เกิดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นผลการทดลองนี้สามารถชี้ให้เห็นว่าสารพิษที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อภายนอกเซลล์ เกิดมาจากการหลั่ง (excrete) ของเซลล์ที่มีชีวิต มิได้เกิดจากเซลล์ที่ตายแล้วเกิด autolysis นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียที่ใช้จะกลับมีความสามารถในการทำให้เกิดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้เมื่อได้รับสารอาหารใหม่อีกครั้ง

โดยการตรวจสอบคุณสมบัติ SCB ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture assay) พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สร้างสารพิษ SCB ได้ในช่วง 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และการสร้างจะเพิ่มขึ้นไปจนถึง 144 ชั่วโมง ปริมาณ SCB เล็กน้อยที่พบในระยะ 0 ชั่วโมง คาดว่ามาจากเชื้อตั้งต้น (inoculum) จากผลการทดลองที่พบการสร้างสารพิษ SCB ในระยะ exponential phase ของการเจริญ และเพิ่มขึ้นจนถึงระยะ stationary phase นี้ได้รับการวิเคราะห์ยืนยันโดยวิธีเอช พี แอล ซี เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5, 6, 7, 8) ได้มีรายงานเกี่ยวกับการผลิตสารเทโทรโดท็อกซิน โดยแบคทีเรีย Vibrio nereis ว่าพบสารพิษนี้ในระยะ exponential phase เช่นกัน (Kobayashi et al., 1992) นอกจากนี้ Kodama et al (1990) ก็พบว่าเชื้อแบคทีเรีย Moraxella sp. สามารถสร้างสารพิษกลุ่ม PSP_S โดยการตรวจสอบคุณสมบัติการเป็น SCB ได้ในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ จึงอาจกล่าวได้ว่าสารพิษ SCB ซึ่งอยู่ในกลุ่ม TTX_S และ PSP_S เริ่มสร้างขึ้นจากเซลล์ในระยะที่เซลล์ active ในการเจริญ

จากการจำแนกชนิดของสารพิษ SCB โดยการวิเคราะห์ด้วยเอช พี แอล ซี พบว่าสาร SCB ประกอบด้วยอนุพันธุ์ต่าง ๆ ที่แตกต่างกันในเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ (รูปที่ 5, 6, 7, 8) ดังต่อไปนี้

1. สายพันธุ์ St–1–1 จะสร้างสารพิษในกลุ่ม PSP_S คืออนุพันธุ์ในกลุ่มซัคซิท็อกซิน (STX_S) และกอนิออท็อกซิน (GTX_S) เป็นกลุ่มแรกที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์คือในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบในระยะ exponential phaseตอนปลาย ส่วนอนุพันธุ์ในกลุ่มเทโทรโดท็อกซิน (TTX_S) พบภายในเซลล์เท่านั้น ในระยะ stationary phase ตอนปลาย ไม่พบภายนอกเซลล์ แสดงว่าอนุพันธุ์ TTX_S จะสร้างช้ากว่า และอาจไม่ปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ การตรวจไม่พบสาร TTX_S และอนุพันธุ์ PSP_S ภายนอกเซลล์ในระยะการเจริญช่วงหลังอาจมี pH เข้ามาเกี่ยวข้อง เนื่องจาก pH ขึ้นสูงถึง >9 เนื่องจากสารพิษทั้งในกลุ่ม PSP_S และ TTX_S จะถูกทำลายในภาวะที่มีด่างสูง (Evans, 1972) แต่สารพิษภายในเซลล์ยังคงสามารถตรวจพบได้ แสดงว่าภาวะ pH สูงภายนอกไม่มีผลต่อการสร้างสารพิษภายในเซลล์

2. สายพันธุ์ Sp–H–2 จะสร้างสารพิษในกลุ่ม PSP_S และ TTX_S พร้อมกันในช่วง 24 ชั่วโมงของการเจริญ ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ St–1–1 สารพิษที่ผลิตขึ้นจะไม่สม่ำเสมอทั้งภายในและภายนอกเซลล์ และพบว่า pH สูงมีผลต่อสารพิษภายนอกเซลล์ เนื่องจากไม่สมารถตรวจพบตั้งแต่ 168 ชั่วโมงเป็นต้นไป ส่วนภายในเซลล์ไม่มีผลที่สังเกตได้

การเปลี่ยนแปลง pH ในทั้งสองสายพันธุ์ภายหลังที่มีการเจริญและการสร้างสารพิษนี้ โดยทั่วไปอาจควบคุมได้ด้วยระบบ buffer ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็น phosphate buffer system แต่พบว่าระบบนี้ไม่เพียงพอที่จะควบคุมให้อาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ใน pH ที่ค่อนข้างคงที่ได้ ดังนั้นปัญหาหนึ่งในการผลิตสารพิษคือ การเลือกระบบ buffer ที่สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลง pH ได้และไม่มีผลต่อการเจริญ และความสามารถในการสร้างสารพิษของเชื้อแบคทีเรีย

จากผลของการวิจัยนี้อาจสรุปได้ว่า เชื้อ Vibrio sp. สามารถผลิต PSP_S และ/หรือ TTX_S ได้โดยเริ่มตั้งแต่ช่วงระยะ exponential phase ตอนปลาย ปริมาณสารพิษที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้นในระยะต่อมาของการเจริญ แต่ในระหว่างเวลาดังกล่าวจะไม่คงที่บางครั้งจะสามารถตรวจพบได้มาก บางครั้งพบได้น้อยหรือหายไปเลยในบางเวลา ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากภาวะของเซลล์ในช่วงที่เกิด metabolic reaction สารพิษที่ปล่อยออกภายนอกเซลล์จะถูกทำลายโดย alkaline pH ที่เกิดขึ้นจากการสร้างสารพิษของเซลล์ แต่พบว่า pH ที่เพิ่มขึ้นนี้ไม่มีผลที่สังเกตเห็นได้ชัดเจนต่อการผลิตสารพิษภายในเซลล์

ผลการวิจัยนี้จะเป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างสารพิษทั้ง 2 กลุ่มได้ในเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน แต่ภาวะของเซลล์ขณะที่สร้างสารทั้ง 2 กลุ่มอาจแตกต่างกัน การพบครั้งนี้นับเป็นครั้งแรกที่มีการรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างสารพิษได้ทั้งกลุ่ม PSP_S และ TTX_S และจากการวิเคราะห์ด้วย GC–MS (ผลการทดลองไม่ได้ใส่ในรายงานนี้) โดย Dr.T.Noguchi แห่งมหาวิทยาลัยโตเกียวได้ยืนยันว่าสารที่ได้เป็นไปตามผลการวิจัยจริง

เอกสารอ้างอิง

ธารา ตริตระการ, เทพกร สาธิตการมณี, บุญเจือ ธรณินทร์, ประดิษฐ์ เจริญไทยวี. 2523. ฤทธิ์ยาชาเฉพาะที่ของพิษปลาปักเป้า (Long acting local anesthetic propertics of tetrodotoxin for epidural and spinal anesthesia in dogs) วิสัญญีสาร 7:125–134.

Evans, M. H (1972). Tetrodotoxin, saxitoxin and related substances : their applications in neurobiology. International Review of Neurobiology. 15:83–166.

Juntongjin, K., Piyakarnchana, T., Kogure, K., Simidu, U. and Ohwada, K. (1993) Sodium channel blocker–producing bacteria isolated from the Gulf of Thailand. J. Mar. Biotechnol., 1:93–96.

Kao, C.Y. and levinson, S.R. (1986). Tetrodotoxin, Saxitoxin and the Molecular Biology of the Sodium Channel. Anuals of the New York Academy of Sciences. vol.479, 1–13

Kobayashi, T., Shiomi, K., Nagashima, Y., Fujii, T. and Okuzumi, M. (1992). Effect of culture conditions on bacterial production of tetrodotoxins. Nippon Suisan Gakkaishi. 58(7):1365–1370.

Kodama, M., Ogata, T., Fukuyo, Y., Ishimaru, T., Wisessung, S., Saitanu, K., Panichyakarn, V. and Piyakarnchana, T. (1988). Protogonyaulax cohorticular, a toxic dinoflagellate found in the Gulf of Thailand. Toxicon 26, 707–712.

Kodama, M. and Ogata, T. (1988). Toxification of bivalves by Paralytic Shellfish toxins. Asia Pacific Journal of Pharmacology 3:99–109.

Kodama, M., Ogata, T., Sakamoto, S., Honda, T. and Miwatani, T. (1990). Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium Moraxella sp. isolated from Protogonyaulax tamarensis. Toxicon 28:707-714.

Kogure, K., Tamplin, M.L., Simidu, U. and Colwell, R.R. (1989). A tissue culture assay for Tetrodotoxin, Saxitoxin and Related toxins. Toxicon. 26, 191-197.

Kungsuwan, A., Noguchi, T., Arakawa, O., Simidu, U., Tsukamoto, K., Shida, Y. and Hashimoto, K. (1988) Tetrodotoxin-producing bacteria from the horseshoe crab Carcinoscorpius rotundicauda. Nippon Suisan Gakkaishi. 54(10):1799-1802.

Noguchi, T., Hwang, D.F., Arakawa, O., Sugita, H., Deguchi, Y., Shida, Y. and Hashimoto, K. (1987). Vibrio alginolyticus, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of fish Fugu vermicularis. Mar. Biol. 94:625-630.

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.

Rosak, D.B. and Colwell, R.R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiological Reviews. 51(3):365-379.

Simidu, U., Lee, W. and Kogure, K. (1983). Comparison of different techniques for detecting plate counts of marine bacteria. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 49:1199-1203.

Simidu, U., Noguchi, T., Hwang, D.F., Shida, Y. and Hashimoto, K. (1987). Marine bacteria which produced tetrodotoxin. Appl. Env. Microbiol. 53:1714-1715.

Yasumoto, T. and Michishita, T. (1985). Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem. 49:3077-3080.