รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

แบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในหอยทรายมีพิษที่เก็บจากบริเวณเกาะสีชัง

โดย

กาญจนา จันทองจีน
หวีสักดิ์ บียะกาญจน์

จฬ
วน 15
008236

2534

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

แบคทีเรียที่สร้างสารกดขวางช่องโซเดียมในหอยทรายมีพิษที่เก็บจากบริเวณเกาะสีชัง

โดย

กาญจณา จันทองจีน และ
ทวีศักดิ์ ปิยะกาญจน์

กรกฎาคม 2534

I14748834X 13 ต.ค. 2541

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีโดยความช่วยเหลือของสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์และศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ในด้านการอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างหอยหราย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ที่ช่วยให้ความรู้และช่วยเหลือในด้านการวิเคราะห์สารพิษด้วย HPLC คือ Professor Usio Simidu แห่ง Ocean Research Institute, University of Tokyo, Professor Masaaki Kodama แห่ง Kitasato University และ Dr.Tamao Noguchi แห่ง University of Tokyo ประเทศญี่ปุ่น

ผู้วิจัยขอขอบคุณเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชที่สนับสนุนให้สามารถทำวิจัยนี้ได้สำเร็จตามความมุ่งหมายทุกประการทั้งในด้านวัสดุและครุภัณฑ์บางชนิด

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย แบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในหอยทรายมีพิษที่เก็บจากบริเวณเกาะสีชัง

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ กาญจนา จันทองจีน
ศาสตราจารย์ ดร.ทวีศักดิ์ ปิยะกาญจน์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ เมษายน 2534

บทคัดย่อ

หอยทรายมีพิษ (Asaphis violascens) จากเกาะสีชังได้ถูกนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยเก็บตัวอย่างใน 2 ระยะเวลาคือ ระยะพิษสูง (มกราคมถึงมิถุนายน) และระยะพิษต่ำ (กรกฎาคมถึงธันวาคม) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียจากอวัยวะต่าง ๆ 7 ส่วนของหอยทรายคือ siphon, mantle, foot, gill, gonad, hepatopancreas และ stomach แล้วคัดแยกเชื้อที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยใช้วิธี tissue culture assay พบว่าจำนวนเชื้อที่สร้างสารพิษในหอยทรายและบริเวณที่เก็บตัวอย่างในระยะพิษสูงจะมีถึง 25% (19 ชนิดจากทั้งหมด 76 ชนิดที่แยกได้) แต่จำนวนเชื้อนี้ในตัวอย่างที่เก็บในระยะพิษต่ำมีเพียง 5.6% (5 ชนิดจากทั้งหมด 89 ชนิดที่แยกได้) ความแตกต่างกันนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียน่าจะมีส่วนในสาเหตุที่ทำให้หอยทรายมีพิษสูงขึ้น ผลการศึกษาพิษในตัวหอยทรายพบว่า ช่วงพิษสูงจะพบสารพิษนี้มากในส่วนของ mantle และ foot ส่วนในอวัยวะอื่นมีจำนวนพิษน้อยกว่า แต่เมื่อถึงระยะพิษต่ำพบว่าที่อวัยวะทั้งสองส่วนนี้จะไม่มีพิษอยู่เลย เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในสองระยะของความเป็นพิษมีบางสายพันธุ์ที่คล้ายคลึงกันคือเป็นแบคทีเรีย Genus Vibrio แต่สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจาก Vibrio พบว่ามีความแตกต่างกัน จากการวิเคราะห์สารพิษที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียและในหอยทรายโดยวิธี HPLC พบว่าเป็นสารในกลุ่ม Paralytic Shellfish Poisons และกลุ่ม Tetrodotoxins

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title: Sodium-channel Blocker Producing Bacteria in Toxic Sand Clam Collected from Sichang Island

Name of the Investigator: Assoc. Prof. Kanchana Juntongjin
Prof.Dr.Twesukdi Piyakarnchana

Year: 1991

Abstract

Toxic sand clams (Asaphis violascens) collected from Sichang Island were examined for sodium channel blocker producing bacteria during a high and low toxicity periods. The bacteria were isolated from seven organs (siphon, mantle, foot, gill, gonad, hepatopancreas, and stomach) and screened for the toxins by a tissue culture assay. At the high toxicity period, 25% (19 out of 76 isolates) of the bacteria were found to contain the toxins while at the low toxicity period only 5.6% (5 out of 89 isolates) were found. The highest toxin levels were dectected in mantle and foot of clams collected at the high toxicity period but the toxins were undetectable in these organs during the low toxicity period. Many toxin producing bacterial strains were assigned to Genus Vibrio. The toxic substances extracted from the bacteria and the sand clams, analyzed by High Performance Liquid Chromatography, were found to contain Paralytic Shellfish Poisons and Tetrodoxins.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
รายการคำย่อ	ix
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	3
ผลของการวิจัย	10
อภิปรายผลและข้อสรุป	24
ข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	27

เลขหมู่ ศศ ๑๓ 15
เลขทะเบียน008236
วัน,เดือน,ปี 17 มิ.ย.39

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total count) และจำนวนสายพันธุ์ที่มีลักษณะโคโลนีต่าง ๆ กัน ซึ่งแยกจากอวัยวะต่าง ๆ ของหอยทราย 10

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดในหอยทรายและจำนวนสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างพิษได้ในหอยทรายทั้งในระยะพิษสูงและในระยะพิษต่ำ..... 14

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะของเชื้อที่สร้างพิษ และ Taxonomic reactions ของเชื้อที่แยกได้ในระยะพิษสูง..... 16

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะของเชื้อสร้างพิษ และ Taxonomic reactions ของเชื้อสร้างพิษในระยะพิษต่ำ..... 17

ตารางที่ 5 แสดงส่วนประกอบของ toxin ในตัวอย่างจากแบคทีเรียที่แยกจากหอยทรายและ toxin ในบางส่วนของหอยทราย..... 23

รายการภาพประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 ความเป็นพิษของอวัยวะต่าง ๆ ของหอยทราย ซึ่งเก็บในระยะพิษสูงและพิษต่ำ ช่วงเวลาน้ำขึ้น และความเป็นพิษของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากแต่ละส่วนของอวัยวะนั้น โดยคิดเป็นสามระดับของความเป็นพิษที่หาได้จากเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของ mouse neuroblastoma cells เมื่อเติมสาร Ouabain และ Veratridine

low : 20 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอด

medium : 40 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอด

high : 60 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอด 12

รูปที่ 2 ความเป็นพิษของอวัยวะต่าง ๆ ของหอยทรายซึ่งเก็บในระยะพิษสูงและพิษต่ำ ช่วงเวลาน้ำลง และความเป็นพิษของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้จากแต่ละส่วนของอวัยวะนั้น โดยคิดเป็นสามระดับของความเป็นพิษที่หาได้จากเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของ mouse neuroblastoma cells เมื่อเติมสาร Ouabain และ Veratridine

low : 20 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอด

medium : 40 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอด

high : 60 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอด 13

รูปที่ 3 A) Absorption spectra ของ DNA ที่แยกได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ Go-2-1 แสดงผลจากการวิเคราะห์ DNA ด้วย Spectrophotometer ความยาวคลื่น 230 nm, 260 nm และ 280 nm B) โครมาโตแกรมของ DNA มาตรฐานที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ nuclease P_1 C) โครมาโตแกรมของ DNA ที่สกัดจากสายพันธุ์ Go-2-1 เมื่อถูกย่อยด้วย nuclease P_1 18

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4 โครมาโตแกรมของ (A) standard toxin GTX, STX และ TTX โดยใช้ HPLC (B-D) โครมาโตแกรมโดยใช้ HPLC วิเคราะห์ toxin จาก (B) Vibrio sp. strain G-1-1 ซึ่งแยกจาก gill (C) Vibrio sp. strain St-1-1 ซึ่งแยกจาก stomach (D) Vibrio sp. strain Sp-H-2 ซึ่งแยกจาก siphon ของหอยหราย

GTX = gonyautoxin

STX = saxitoxin, NSTX = neosaxitoxin,

DSTX = decarbamoyl saxitoxin

TTX = tetrodotoxin, EPITTX = 4-epi tetrodotoxin,

ANHTTX = anhydrotetrodotoxin 21

รูปที่ 5 โครมาโตแกรมของ (A) standard toxin GTX และ TTX (B) toxin ที่สกัดจาก gill ของหอยหราย โดยใช้ HPLC

GTX = gonyautoxin

TTX = tetrodotoxin, EPITTX = 4-epi tetrodotoxin,

ANHTTX = anhydrotetrodotoxin 22

รายการคำย่อ

Abs	Absorbance
ANHTTX	Anhydrotetrodotoxin
A or H	Area or Hight
C	Cytosine
DAMP	2 -Deoxyadenosine 5 -monophosphate
DCMP	2 -Deoxycytosine 5 -monophosphate
DGMP	2 -Deoxyguanosine 5 -monophosphate
DTMP	2 -Deoxythymidine 5 -monophosphate
Dc STX	Decarbamoylsaxitoxin
EPITTX	4 epi-Tetrodotoxin
G	Gaunine
G + C content	Gaunine +Cytosinecontent
GTX	Gonyautoxin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HT	High Tide
LT	Low Tide
ND	not determined
Neo STX	Neosaxitoxin
nm	nanometre
OD	Optical Density
PSP	Paralytic Shellfish Poisons
RT	retention time
STX	Saxitoxin
TTX	Tetrodotoxin

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

สารกีดขวางช่องโซเดียมเป็นสารพิษที่มีคุณสมบัติสำคัญคือ จะยับยั้งการทำงานของประสาท โดยจะเข้าไปกีดขวางที่ช่องโซเดียมอย่างจำเพาะของเซลล์ประสาทไม่มีผลต่อช่องอิออนชนิดอื่น จะมีผลให้กล้ามเนื้อ (skeletal muscle) ทำงานไม่ได้ ร่างกายจะเป็นอัมพาต (Kao and Levinson, 1986)

สารชนิดนี้พบได้ในสารพิษ 2 กลุ่มใหญ่คือ Tetrodotoxins (Puffer toxin, TTX, พิษปลาปักเป้า) และ Paralytic Shelfish Poisons (PSP, พิษอัมพาตจากหอย) สารพิษทั้งสองนี้ประกอบด้วยอนุพันธุ์ (derivatives) หลายชนิด ซึ่งมีความเป็นพิษสูงมากน้อยแตกต่างกัน

กลุ่ม Tetrodotoxins มี 4 อนุพันธุ์ ที่เป็นที่รู้จักกันดีคือ

Tetrodonic acid	ไม่มีพิษ
4-epi Tetrodotoxin	มีพิษเล็กน้อย
Anhydrotetrodotoxin	มีพิษกลาง
Tetrodotoxin (TTX)	มีพิษมากที่สุด (Nagamura and Yasumoto, 1985)

กลุ่ม Paralytic Shellfish Poisons ประกอบด้วยอนุพันธุ์ต่าง ๆ คือ

Gonyantoxin (GTX) 1, GTX 2, GTX 3, GTX 4, GTX 5, GTX 6, epi-GTX 8, GTX 8 และอื่น ๆ

Saxitoxin (STX), Neosaxitoxin (NeoSTX), Decarbamoylsaxitoxin (DcSTX) แต่ละอนุพันธุ์จะมีระดับความเป็นพิษแตกต่างกัน โดยที่ GTX 3 มีความเป็นพิษสูงที่สุด รองลงมาคือ STX และ GTX 1 พวกที่มีความเป็นพิษต่ำคือ GTX 5 จนถึง GTX 8 (Oshima, et al., 1987)

กาญจนา จันทองจีน (2533) พบว่า สัตว์ทะเลหลายชนิดมีแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยไม่จำกัดว่าจะเป็นสัตว์ชนิดที่มีพิษหรือสัตว์ที่ไม่มีพิษ และพบว่าหอยทราย ซึ่งเป็นหอยสองฝาที่มีพิษก็มีเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารดังกล่าวได้

หอยทรายมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Asaphis violascens Saitanu et al. (1991) พบว่า สารพิษในหอยทรายประกอบด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียมทั้งสองกลุ่มคือ

Tetrodotoxins และ Paralytic Shellfish Poisons (Toxins) โดยประกอบด้วยอนุพันธุ์หลายชนิดของสารทั้งสองกลุ่มนี้

งานวิจัยที่ศึกษาแบคทีเรียในหอยทรายยังไม่มีผู้ใดทำมาก่อน แต่มีผู้ศึกษาแบคทีเรียในหอยสองฝาชนิดอื่น ๆ ได้แก่ หอยแมลงภู่ หอยพัด (scallop) หอยแครง โดยเชื่อว่าแบคทีเรียน่าจะเป็นสาเหตุให้เกิดพิษในหอยเหล่านี้ แต่เดิมนั้นมีความเข้าใจว่าพิษในหอยเกิดจาก dinoflagellate สายพันธุ์ที่มีพิษ โดยที่หอยจะกรองกินเข้าไป แต่เมื่อพบว่าในเซลล์ของ dinoflagellate ที่มีพิษนั้นมีเชื้อแบคทีเรียอยู่ภายใน จึงเริ่มมีความคิดว่าเชื้อแบคทีเรียน่าจะมีส่วนในการสร้างพิษมากกว่า (Kodama, et al., 1990) ยิ่งกว่านั้นเมื่อได้ทดลองเลี้ยงหอยพัดในสภาพที่ไม่มี dinoflagellate อยู่ด้วยโดยเลี้ยงในน้ำกรองที่กรองเฉพาะเซลล์ของ dinoflagellate ออกไปแต่ยังคงมีเซลล์ของแบคทีเรียเหลืออยู่ พบว่าความเป็นพิษของหอยก็สามารถสูงขึ้นได้ (Kodama, 1989)

ผลของการวิจัยดังกล่าวมาแล้วแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของแบคทีเรียที่จะเป็นสาเหตุให้เกิดพิษขึ้นในสัตว์ทะเลประเภทหอยสองฝา นอกจากนี้ Saitanu, et al. พบว่าหอยทรายซึ่งมีระดับพิษที่แตกต่างกันในรอบปีก็อาจจะมีแบคทีเรียเป็นสาเหตุได้ ระดับพิษที่แตกต่างกันในหอยทรายนั้นพบว่าระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมิถุนายน ระดับความเป็นพิษในหอยจะสูงและจะสูงกว่าในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคม ซึ่งระยะนี้ระดับพิษบางช่วงจะต่ำมาก

สาเหตุที่ทำให้ระดับพิษในหอยทรายแตกต่างกันดังกล่าวยังไม่ทราบแน่นอน นอกจากนี้ยังพบว่า ในบริเวณที่พบหอยทรายมีพิษยังมีหอยอีกชนิดหนึ่งคือ หอยกระปุก ซึ่งเป็นหอยสองฝาและมีลักษณะใกล้เคียงกับหอยทรายอาศัยอยู่ด้วย แต่พบว่าหอยชนิดนี้เป็นหอยที่ไม่มีพิษเลย ทั้ง ๆ ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน

ดังนั้นการกล่าวว่าแบคทีเรียจะเป็นสาเหตุให้เกิดพิษเพียงอย่างเดียวก็ยังไม่สามารถกล่าวได้อย่างเฉพาะ Mosher and Fubrman (1984) ได้รวบรวมความเป็นไปได้ของการเกิดสารพิษ Tetrodotoxin ดังนี้

1. Endogenous เกิดจากสัตว์ผลิตขึ้นมาเองซึ่งอาจเป็นผลผลิตที่ไม่ได้เกิดขึ้นตามปรกติ แต่เกิดเพื่อให้สัตว์นั้นอยู่รอด หรืออาจเป็นสารที่ควบคุมได้โดยสร้างเพื่อ physiological function ที่มีประโยชน์บางอย่างในสัตว์นี้

2. Exogenoous สัตว์อาจไม่ได้ผลิตสารพิษ แต่ได้รับจากโซ่อาหาร เช่น ในเรื่องของ saxitoxin ที่ถูกทำให้เข้มข้นขึ้น โดยหอยที่กิน dinoflagellate ที่มีพิษเข้าไปทำให้หอยนั้นมีพิษ

3. Symbiotic microorganisms สารพิษอาจได้มาจากจุลินทรีย์ที่อยู่รวมกับสัตว์ชนิดนั้น

4. Multiple origins สารพิษนั้นอาจเกิดได้จากสาเหตุรวมของทั้ง 3 สาเหตุแรก

ดังนั้นการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารกึ่งกวางช่องโซเดียมนี้จะช่วยคลี่คลายปัญหาได้ส่วนหนึ่ง แต่ในสาเหตุส่วนอื่น ๆ นั้นจำเป็นที่จะต้องศึกษาให้แน่ชัดในขั้นต่อไป

งานวิจัยนี้จะได้ศึกษาแบคทีเรียที่อยู่ภายในหอยทราย ซึ่งอาจอยู่โดยการเกาะอยู่ที่บริเวณอวัยวะ และภายในอวัยวะของหอย รวมทั้งตรวจความเป็นพิษในแต่ละอวัยวะนั้นด้วย ในการศึกษาพิษที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรีย และพิษที่สกัดได้จากส่วนของหอยทราย จะทำการจำแนกว่าพิษที่เป็นสารกึ่งกวางช่องโซเดียมนั้นเป็น *Tetrodotoxins* หรือ *Saxitoxins* หรือ Gonyautoxins

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

ได้เก็บตัวอย่างที่เกาะสีชังในวันที่ 29 พฤษภาคม 2533 ซึ่งเป็นช่วงที่หอยมีพิษสูง และในวันที่ 4 สิงหาคม 2533 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่หอยมีพิษต่ำ โดยเก็บตัวอย่างทั้งในเวลาที่น้ำขึ้น ซึ่งมีน้ำทะเลอยู่ท่วมหอยทราย และในเวลาน้ำลงซึ่งเป็นเวลาที่ไม่มีน้ำทะเลอยู่ในบริเวณที่เก็บตัวอย่างเก็บหอยที่มีขนาดความกว้างระหว่าง 3.2-3.7 ซ.ม ความยาวระหว่าง 4.8-5.4 ซ.ม จำนวนครั้งละ 5 ตัว นอกจากนี้ได้นำทรายจากบริเวณที่เก็บตัวอย่างมาทำการทดลองด้วย

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากส่วนของอวัยวะหอยทราย

การแยกเชื้อจากอวัยวะต่าง ๆ จากหอยโดยวิธีต่อไปนี้

1. ล้างหอย 5 ตัว ด้วย sterile sea water 3-5 ครั้ง
2. ตัดส่วนกล้ามเนื้อเพื่อเปิดฝา 2 ข้างออกด้วยมีด sterile

3. ล้างหอยที่เปิดฝาแล้วด้วย sterile sea water อีก 3 ครั้ง

4. นำหอยมาผ่าตัดด้วยกรรไกรและปากคีบที่ปราศจากเชื้อ แยกอวัยวะหอยออกเป็นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ siphon, mantle, gill, gonad, foot, hepatopancreas และ stomach

5. ส่วนของ siphon mantle, foot นำไป homogenized รวมกันทั้ง 5 ตัว ใช้ความเร็ว 5000 rpm 5 นาที

ส่วนของ gill gonad hepatopancrease และ stomach ใช้บดด้วยโกร่งปราศจากเชื้อ

6. ละลายแต่ละส่วนใน sterile sea water 10 ml

7. ทำ dilution 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, ใช้ 0.1 ml จากทุก dilution ไป spread plate บน ORI medium ที่มีความเข้มข้นอาหาร 1.5 เท่า

8. incubate ที่ 27°C

9. แยกเชื้อแบคทีเรียจาก ORI plate และนับจำนวน colony

10. นำแบคทีเรียมาทำเป็น pure culture

นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดไปสกัดส่วนประกอบภายในเซลล์

ส่วนอวัยวะของหอยหรายส่วนที่เหลือนำไปสกัดทอกซินดังวิธีที่จะกล่าวต่อไป

การสกัดส่วนประกอบภายในเซลล์ (cellular components) ของแบคทีเรีย

มีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

bacterial culture

↓

50 ml. liquid medium (seed culture)

↓

shaking 100 rpm at 27°C, 24 hr

↓

150 ml liquid medium

↓

stationed incubation at 27°C 48 hr

↓

measured optical density at 550 nm

↓

centrifuged 10,000 rpm at 0°C 15 min

- bacterial cells → +0.3M NaCl 10 ml → centrifuged 10,000 rpm 0°C 15 min
  - supernatant → discarded
  - bacterial cells → +0.1% Acetic acid → sonicated 6 min → centrifuged 10,000 rpm
    - cell debris → discarded
    - supernatant → freeze dried → powder
- supernatant → discarded

<u>การสกัด toxin จากอวัยวะต่าง ๆ ของหอยทราย</u>

อวัยวะส่วนที่เหลือจากทำ dilution เพื่อแยก bacteria

↓

freeze dried

↓

methanol extraction 3 ครั้ง

- powder จาก siphon, mantle gonad, gill, foot → ↓ → toxin assay
- powder จาก stomach และ hepatopancreas → ↓ defatted ด้วย chloroform → ↓ toxin powder → assay

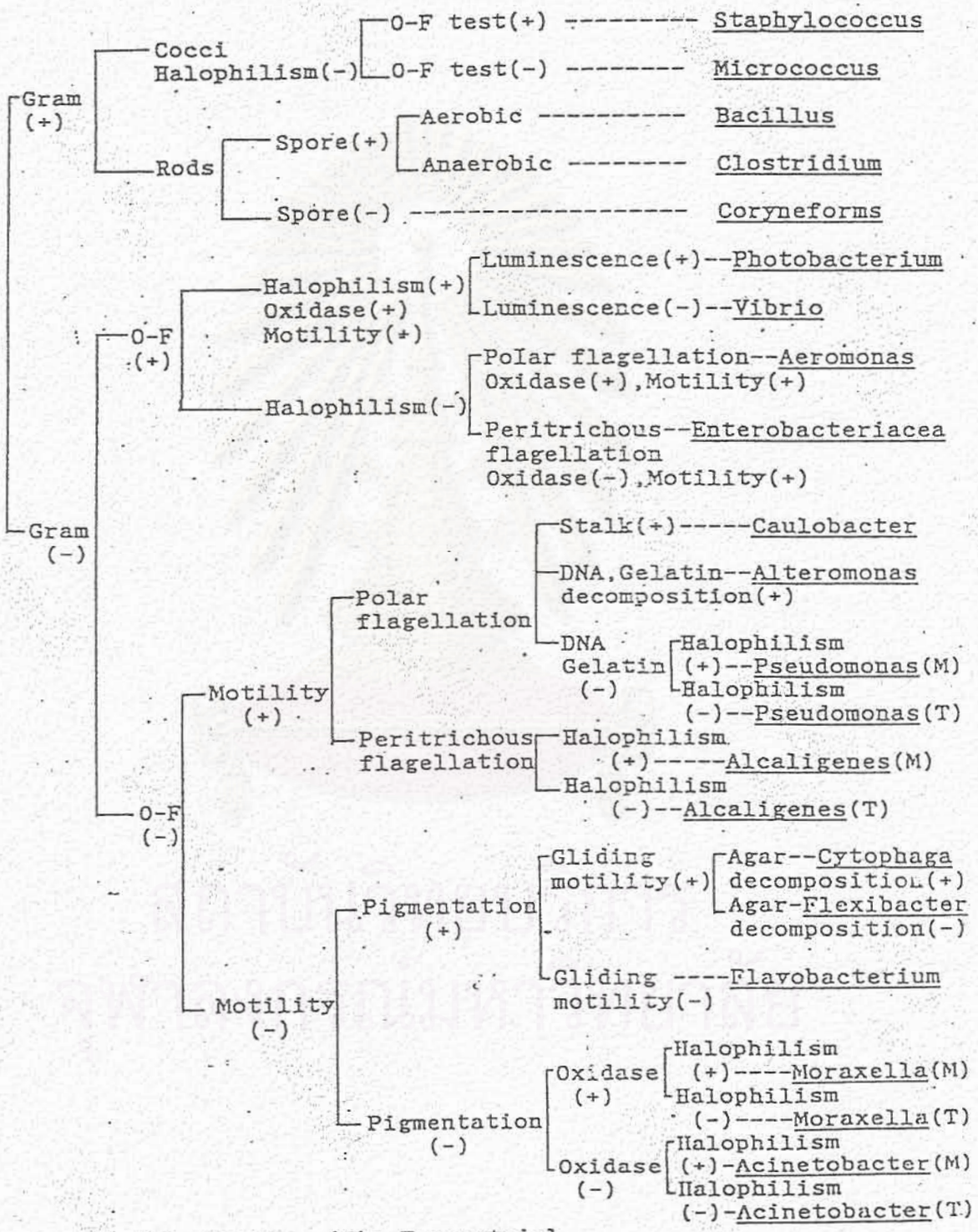
การตรวจสอบเพื่อหาคุณสมบัติการกีดขวางช่องโซเดียม

ใช้วิธีตรวจสอบของ Kogure., et al. (1989) โดยใช้ mouse neuroblastoma cell culture assay เพื่อหาว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใดที่สามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม และดูว่าอวัยวะหอยทรายส่วนใดมีปริมาณสารชนิดนี้

การศึกษาเพื่อจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้าง toxin

ใช้วิธีของ Simidu and Ezura (1988) ดังไดอะแกรมต่อไปนี้

Identification scheme of bacteria



* (M); Marine, (T); Terrestrial

การศึกษาปริมาณ guanine (G) และ cytosine (C)

เพื่อยืนยันการจำแนกแบคทีเรียซึ่งใช้ลักษณะของเซลล์และปฏิกริยาเคมีชนิดต่าง ๆ ให้แน่นอนยิ่งขึ้น จึงได้ใช้เชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากหอยทรายส่วน gonad ในระยะพิษสูง และจาก gill ของหอยทรายในระยะพิษต่ำมาทำการทดลองดังนี้

1. เลี้ยงเชื้อใน liquid medium ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าที่อุณหภูมิ 27°C แล้วนำไปล้าง 2 ครั้ง ด้วย saline-EDTA

2. สกัด DNA และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีของ Maumer (1961)

3. เมื่อได้ DNA บริสุทธิ์จึงนำไปละลายใน saline-citrate buffer เพื่อหาค่า optical density ที่ wave length 280 nm 260 nm และ 230 nm หาค่า $\frac{OD260}{OD280}$ เพื่อดูความบริสุทธิ์ของ DNA ถ้าได้ค่า = 1.8 หรือใกล้เคียงแสดงว่าได้ DNA บริสุทธิ์ จึงนำมาย่อยด้วย nuclease P_1

4. โดยตกตะกอน DNA ด้วย ethanol ที่แช่ใน freezer แล้วนำไปทำให้แห้งใน desicator แล้วเติม 10 mM phosphate buffer แล้วต้มที่ 100°C 5 นาที ทำให้เย็นโดยเร็วใน ice bath

5. เติม nuclease P_1 solution และ veronal-acetate buffer ที่เติม $ZnCl_2$ pH 5 ลงไป incubate ที่ 50°C 1 ชั่วโมง จะได้ nucleotides ที่เป็น solution สำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC

6. หาค่า cytosine, quanine จาก HPLC โดยวิธีของ Tamaoka and Komagata (1984)

การวิเคราะห์สารกึ่งระเหยด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์แบ่งออกเป็น 2 ระบบคือ

1. การวิเคราะห์เพื่อตรวจสารกลุ่ม tetrodotoxins

โดยใช้วิธีของ Yasumoto and Michishita (1985) ดังนี้

Column : Develosil ODS column ขนาด 0.8 25 ซม.

Mobile phase : ใช้สารละลาย 3% acetonitrile + 0.005 N heptafluorobutyric acid + 0.05 N acetic acid

ปรับ pH 5.0 ด้วย NH_4OH เข้มข้น

Reagent : 4N NaOH ใช้ flowrate 0.5 ml/min

Reaction : 65°C in 10 m. Teflon tubing

Damper coil : 10°C in Teflon capillary tubing (0.5 mmx10 m.)

Detection : excitation wavelength 365 nm.

emission wavelength 510 nm.

2. การวิเคราะห์เพื่อตรวจสารกลุ่ม Paralytic Shellfish Poisons ในวิธีของ Oshima et al. (1989) แบ่งออกเป็น 2 ระบบคือ

2.1 สารกลุ่ม GTX_1 - GTX_4

Column : Develosil ODS column ขนาด 4.6x25 ซ.ม.

Mobile phase : 2mM sodium 1-heptanesulfonate in 10 mM ammonium phosphate pH 7.2

flowrate 0.8 ml/min.

Oxidizing reagent : 7mM periodic acid in 50 mM Sodium phosphate buffer (pH 9.0)

flow rate 0.4 ml/min.

Acidifying reagent : 0.5 M acetic acid

flow rate 0.4 ml/min.

Reaction : 65°C in 10 m. Teflon tubing

Detection : excitation wavelength 330 nm.

emission wave length 390 nm.

2.2 สารกลุ่ม STX และ NeO STX

ใช้วิธีเดียวกับการวิเคราะห์ GTX แต่ mobile phase ใช้ acetonitril (9:1)

ผลของการวิจัย

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากส่วนต่าง ๆ ของหอยหรายในระยะเวลาที่มีพิษสูง และในระยะเวลาที่มีพิษต่ำ จำนวนเชื้อจากแต่ละส่วนซึ่งแสดงในตารางที่ 1 ได้คำนวณจากจานเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในระหว่าง 30-300 โคโลนี และจำนวนสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันเป็นการตัดสินในการแยกแต่ละสายพันธุ์

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total count) และจำนวนสายพันธุ์ที่มีลักษณะโคโลนีต่าง ๆ กัน ซึ่งแยกจากอวัยวะต่าง ๆ ของหอยหราย

	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด		จำนวนสายพันธุ์ (strain)	
อวัยวะของหอยหราย	ระยะที่มีพิษสูง	ระยะที่มีพิษต่ำ	ระยะที่มีพิษสูง	ระยะที่มีพิษต่ำ
High tide				
Siphon	5.2×10^8	1.5×10^6	3	3
Mantle	1.2×10^8	7.0×10^6	5	5
Foot	7.8×10^8	-	6	0
Gill	$1 \times 5 \times 10^8$	2.0×10^6	4	4
Gonad	6.0×10^7	9.5×10^5	5	3
Hepatopancreas	5.0×10^6	1.6×10^6	3	3
Stomach	3.0×10^6	7.0×10^6	4	7
ดินหรายบริเวณที่เก็บตัวอย่าง 1 กรัม	1.0×10^8	2.9×10^6	9	10
low tide				
Siphon	3.5×10^8	5.9×10^5	3	10
Mantle	5.0×10^7	1.0×10^6	2	8
Foot	2.4×10^8	4.0×10^4	5	1
Gill	3.0×10^4	1.5×10^6	3	8

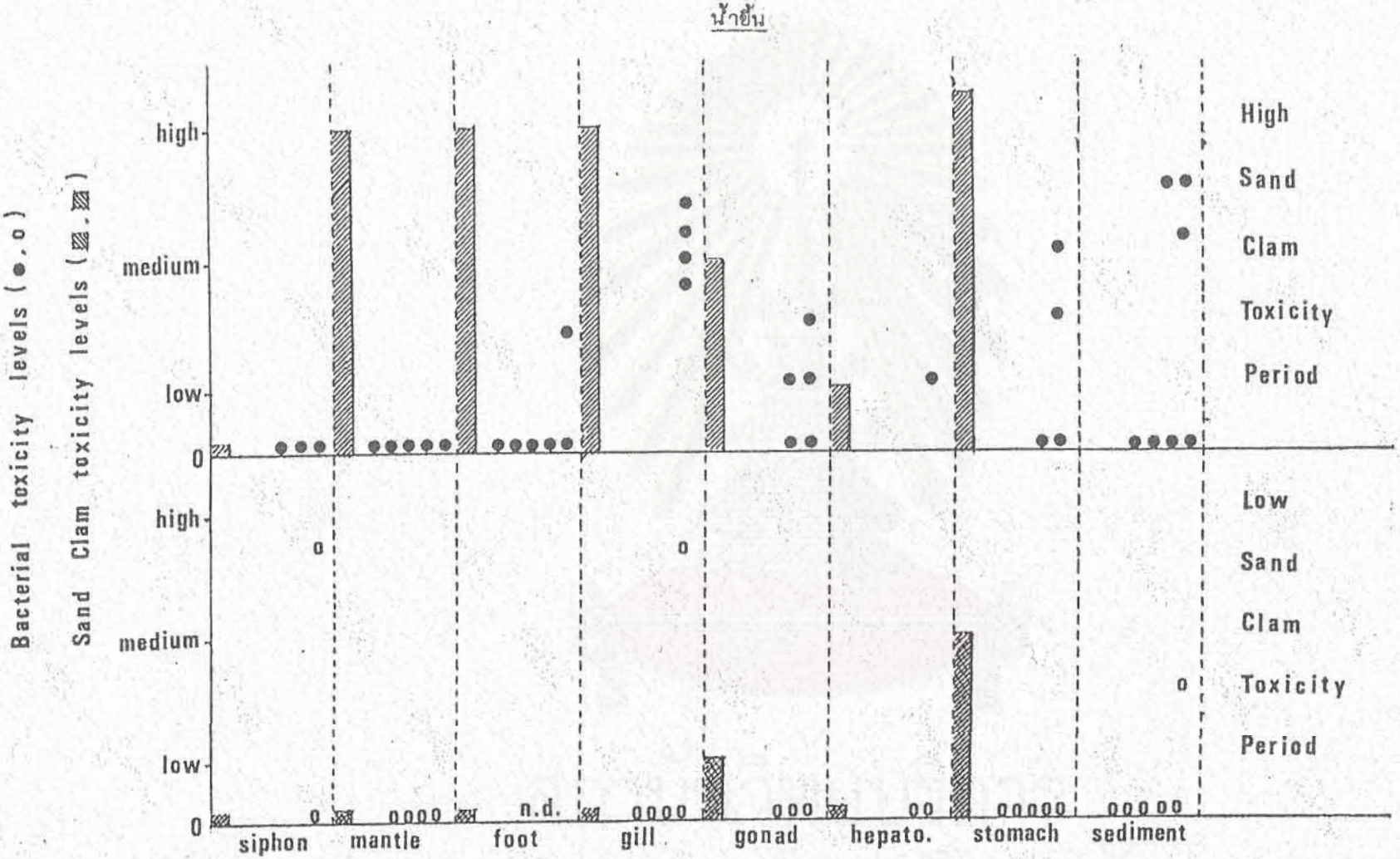
อวัยวะของหอยทราย	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด		จำนวนสายพันธุ์ (strain)	
	ระยะที่มีพิษสูง	ระยะที่มีพิษต่ำ	ระยะที่มีพิษสูง	ระยะที่มีพิษต่ำ
Gonad	3.0×10^7	1.5×10^6	3	9
Hepatopancreas	2.0×10^7	6.0×10^6	2	4
Stomach	8.0×10^7	1.2×10^7	5	10
ดินทรายบริเวณที่เก็บตัวอย่าง 1 กรัม	1.9×10^7	3.3×10^6	10	9

แบคทีเรียที่พบทั้งในระยะพิษสูง และในระยะพิษต่ำเมื่อนำมาตรวจสอบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม จะพบว่าจำนวนสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างสารพิษได้แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดในระหว่างระยะพิษต่ำและระยะพิษสูง ความเป็นพิษ (toxicity) ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ได้คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ที่สารพิษสามารถทำให้ mouse neuroblastoma cell อยู่รอดเมื่อเติมสาร Ouabain และ Veratridine ดังแสดงในรูปที่ 1 และรูปที่ 2

นอกจากนี้ในรูปที่ 1 และรูปที่ 2 ยังได้แสดงผลการตรวจความเป็นพิษภายในอวัยวะต่าง ๆ ของหอยทรายด้วย โดยได้ศึกษาทั้งในระยะพิษสูงและระยะพิษต่ำ รวมทั้งแสดงความเป็นพิษของตัวอย่างทั้งที่เก็บในระยะน้ำขึ้นและระยะน้ำลงด้วย

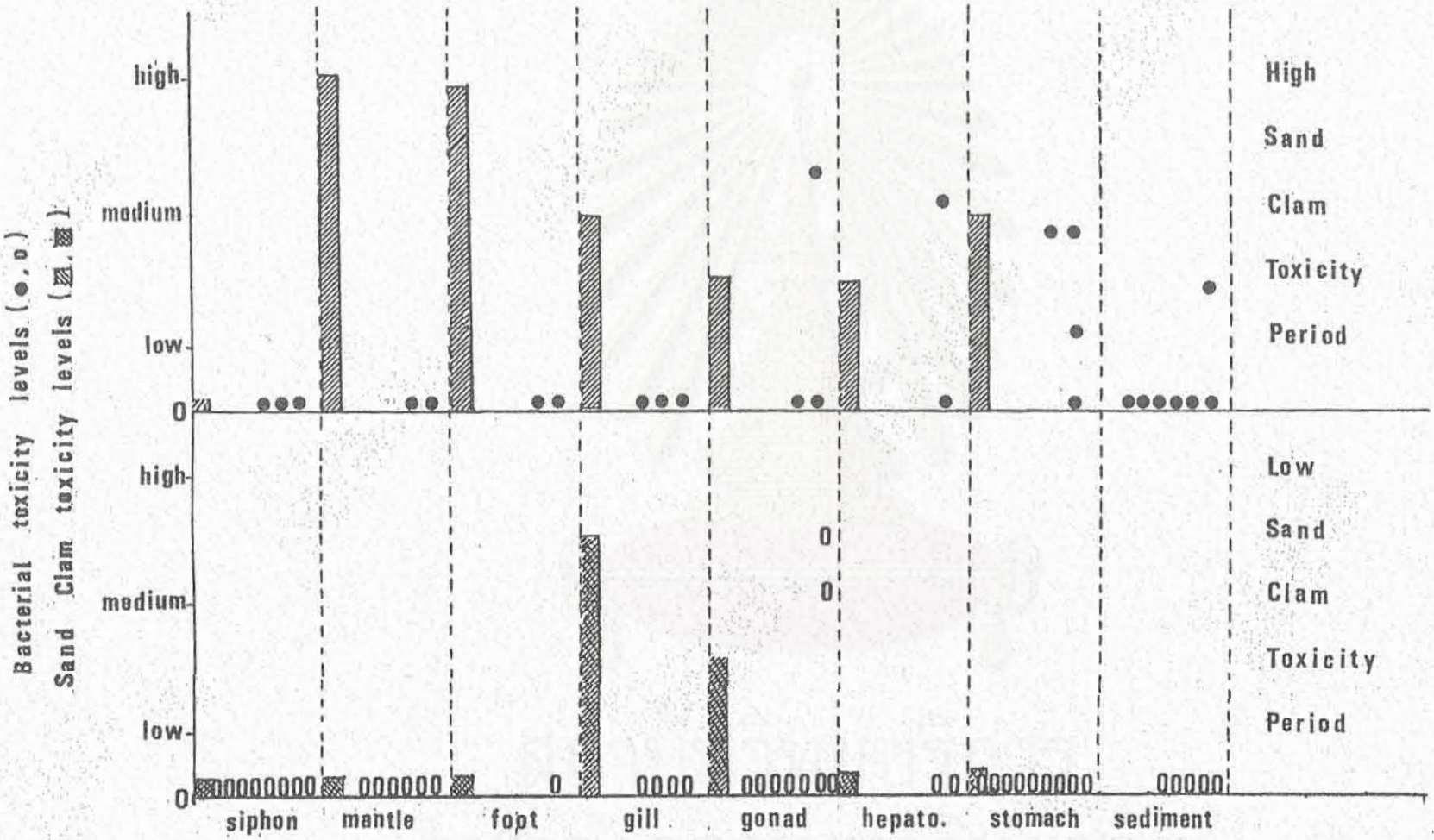
ในระยะพิษสูงสามารถพบความเป็นพิษในอวัยวะเกือบทุกชนิดที่ตรวจสอบ ยกเว้น siphon ส่วนในระยะพิษต่ำจะพบความเป็นพิษอยู่ในบางอวัยวะเท่านั้นคือที่ stomach และ gonad ของหอย ตัวอย่างที่เก็บในระหว่างน้ำขึ้นและพบที่ gill และ gonad ในหอย ตัวอย่างที่เก็บในระหว่างน้ำลง

นอกจากนี้พบว่าอวัยวะที่มีพิษสูงได้แก่ stomach, mantle และ foot ซึ่งในอวัยวะเหล่านี้ในช่วงระยะพิษต่ำจะไม่พบว่ามีพิษเลยยกเว้นส่วนของ stomach ในช่วงน้ำขึ้นพบว่ามีพิษแต่ไม่สูงมาก



รูปที่ 1 ความเป็นพิษของอวัยวะต่าง ๆ ของหอยทราย ซึ่งเก็บในระยะพิษสูงและพิษต่ำช่วงเวลาน้ำขึ้น และความเป็นพิษของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากแต่ละส่วนของอวัยวะนั้น โดยคิดเป็นสามระดับของความเป็นพิษที่หาได้จากเปอร์เซ็นความอยู่รอดของ mouse neuroblastoma cells เมื่อเติมสาร Ouabain และ Veratridine
low : 20 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอด medium : 40 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอด high : 60 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอด

น้ำลง



รูปที่ 2 ความเป็นพิษของอวัยวะต่าง ๆ ของหอยทรายซึ่งเก็บในระยะพิษสูงและพิษต่ำ ช่วงเวลาน้ำลง และความเป็นพิษของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้จากแต่ละส่วนของอวัยวะนั้น โดยคิดเป็นลำดับของความเป็นพิษที่หาได้จากเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของ mouse neuroblastoma cells เมื่อเติมสาร Ouabain และ Veratridine

low : 20 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอด medium : 40 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอด high = 60 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอด

จำนวนสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างพิษได้ในหอยทรายทุก ๆ อวัยวะและจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดของแบคทีเรียในทุก ๆ อวัยวะสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดในหอยทรายและจำนวนสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างพิษได้ในหอยทรายทั้งในระยะพิษสูง และในระยะพิษต่ำ

ชนิดตัวอย่าง	ระยะพิษสูง		ระยะพิษต่ำ	
	จำนวนเชื้อที่แยกได้	จำนวนเชื้อที่สร้างพิษ	จำนวนเชื้อที่แยกได้	จำนวนเชื้อที่สร้างพิษ
Siphon (HT)	3	-	2	1
(LT)	3	-	10	-
Mantle (HT)	6	-	6	-
(LT)	3	-	8	-
Foot (HT)	6	1	-	-
(LT)	5	-	1	-
Gill (HT)	4	4	4	1
(LT)	3	-	8	-
Gonad (HT)	6	3	3	-
(LT)	3	1	9	2
Hepato. (HT)	3	1	3	-
(LT)	2	1	2	-
Stomach (HT)	5	2	5	-
(LT)	5	3	9	-
Sediment (HT)	9	3	10	1
(LT)	10	1	9	-
Total	76	19	89	5
%ของเชื้อที่สร้างพิษ	25		5.6	

HT = ระยะที่มีน้ำขึ้นสูงสุด LT = ระยะที่มีน้ำลงต่ำสุด

จากตารางที่ 2 เมื่อรวมจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่สร้างพิษได้ในระยะที่หอยทรายมีพิษสูง จะเห็นว่ามีจำนวนสายพันธุ์มากกว่าในระยะพิษต่ำมากอย่างเห็นได้ชัด แต่จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total count) จะพอ ๆ กันทั้ง 2 ระยะ

ได้นำเชื้อแบคทีเรียที่สร้างพิษในระดับสูงเกิน 30% survival neuroblastoma cells และมี growth ที่ดี ทั้งในระยะพิษสูงและในระยะพิษต่ำมาทำการจำแนกรวม 12 เชื้อ เพื่อศึกษา Morphology, Staining characteristics และ Biochemical and Physiological reaction ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3 และ 4

I17728374X

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะของเชื้อสร้างพิษ และ Taxonomic reactions ของเชื้อที่แยกได้ในระยะพิษสูง

	Strains					
	G0-2-1	St-1-1	St-2-1	G-1-1	Sd-1-5	Sd-1-7
Toxicity(%survival)	45.42	35.95	36.39	38.22	40.43	53.73
Gram reaction	-	-	-	-	-	-
Cell shape	rod	rod	rod	rod	rod	curved rod
Spore forming	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+
O-F test	+	+	+	+	-	-
Growth in NaCl :-						
0%	-	-	-	-	-	-
0.5%	-	-	-	-	-	-
1%	-	-	+++	+	-	-
2%	+++	+++	+++	+++	+	+
3%	+++	+++	+++	+++	+	++
6%	++	++	++	+	-	+
8%	+	+	-	+	-	-
12%	-	-	-	-	-	-
Genus ที่คาดเดา	Vibrio	Vibrio	Vibrio	Vibrio	Moraxella	Moraxella

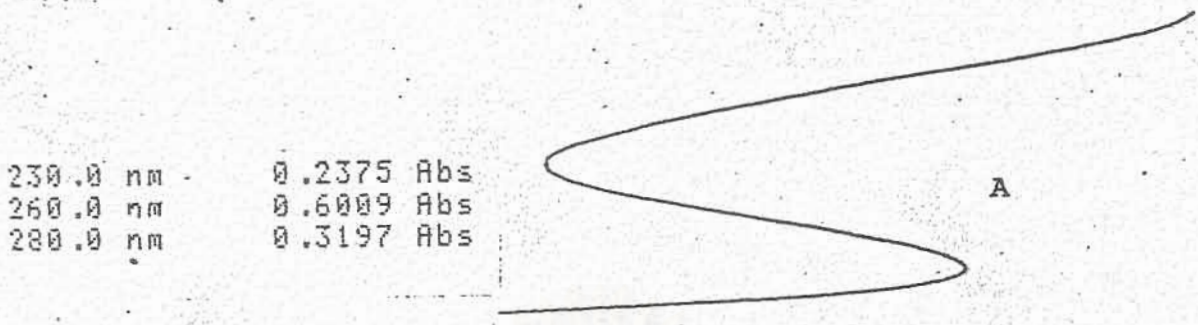
- = negative + = positive

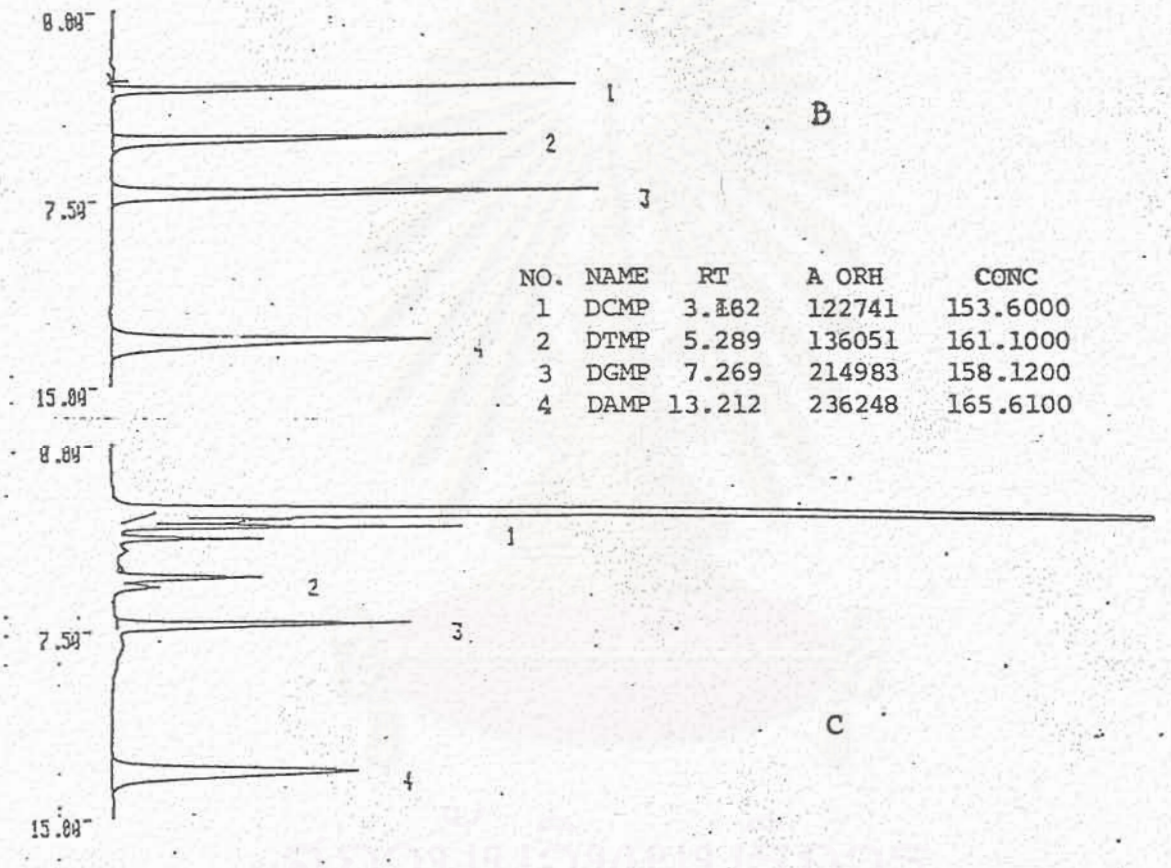
ตารางที่ 4 แสดงลักษณะของเชื้อสร้างพิษและ Taxonomic reactions ของเชื้อสร้างพิษในระยะที่หอยทรายมีพิษต่ำ

	Strains				
	G-H-4	Go-L-2	GO-L-5	Sp-H-2	Sd-H-8
Toxicity (%survival of neuroblastoma cells)	72.30, 52.64	38.02, 39.50	31.84, 50.13	64.16, 52.93	38.12, 37.43
Gram reaction	+	+	-	-	-
cell shape	cocci	rod	rod	rod	rod
Spore forming	ND	-	ND	ND	ND
Oxidase	-	+	-	+	+
Motility	-	-	-	+	+
O-F test	-	-	-	+	+
Growth in NaCl :-					
0%	++++	++++	-	-	-
0.5%	++++	++++	++	++	++
1.0%	++++	+++	+++	++	++
2.0%	++++	+++	++++	++++	++++
3.0%	+++	+++	++++	++++	++++
6.0%	-	-	-	++	++
8.0%	-	-	-	++	++
12.0%	-	-	-	++	++
Genus ที่คาดเป็น	Micrococcus	Coryneforms	Acinetobacter	Vibrio	Vibrio

ND = not determined + = positive - = negative

เพื่อศึกษาให้แน่ใจว่าเชื้อที่จำแนกได้ดังในตารางที่ 5 และ 6 ดังกล่าวแล้วมีความถูกต้องแม่นยำเพียงใด ได้ทดลองเลือกสายพันธุ์ GO-2-1 และ G-H-4 มาศึกษา G+C content ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3





CAL..METHOD 04

	SF	PA	PB
	.100000$_{10}$+01	.100000$_{10}$+01	.100000$_{10}$+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	DCMP	3.244	58709		73.4695
2	DTMP	5.284	46467		55.0222
3	DGMP	7.274	127520		93.7912
4	DAMP	13.189	191436		134.1970
	TOTAL		424134		356.4801

รูปที่ 3 A) Absorption spectra ของ DNA ที่แยกได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ Go-2-1 แสดงผลจากการวิเคราะห์ DNA ด้วย Spectrophotometer ความยาวคลื่น 230 nm, 260 nm. และ 280 nm. B) โครมาโตแกรมของ DNA มาตรฐานที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ nuclease P_1 C) โครมาโตแกรมของ DNA ที่สกัดจากสายพันธุ์ Go-2-1 เมื่อถูกย่อยด้วย nuclease P_1

จากรูปที่ 3 A) หาค่า Optical density ที่ wave length 260 nm และ 280 nm แล้วนำมาหาอัตราส่วนระหว่างค่า OD ของทั้งสอง wave length นี้

สายพันธุ์ Go-2-1 $\frac{OD\ 260}{OD\ 280} = \frac{0.6009}{0.3197}$

$= 1.8796$

จะเห็นว่าอัตราส่วนระหว่างค่า OD ของ 2 wave-length ใกล้เคียงกับ 1.8 มาก แสดงว่า DNA ที่สกัดได้ค่อนข้างบริสุทธิ์สามารถนำไปทดลองต่อไปได้

ส่วนสายพันธุ์ G-H-4 นั้น ไม่สามารถแยก DNA เป็นสายขึ้นมาได้ สาเหตุอาจเนื่องจากเชื้อสายพันธุ์นี้มี DNase สูง จึงไม่สามารถแยก DNA ได้ จะได้ทดลองเชื้อสายพันธุ์นี้ต่อไป

จากรูปที่ 3 ได้ค่า Guanine content = 127520

Cytosine content = 58709

จึงนำมาคำนวณได้จากสูตร

$$G+C\ content = \frac{Cx/Cs+Gx/Gs}{Cx/Cs+Ax/As+Gx/Gs+Tx/Ts} \times 100\%$$

Cx, Gx, Ax, Tx = peak area of dCMP, dGMP, dAMP, dTMP ของตัวอย่างตามลำดับ

C_S, G_S, A_S, T_S = peak area of dCMP, dGMP, dAMP, dTMP ของ standard DNA ตามลำดับ

$$G+C\ content = \frac{58709/122741+127520/214983}{58709/122741+191436/23648+127520/214983+46467/136051} \times 100\%$$

$= 48\%$

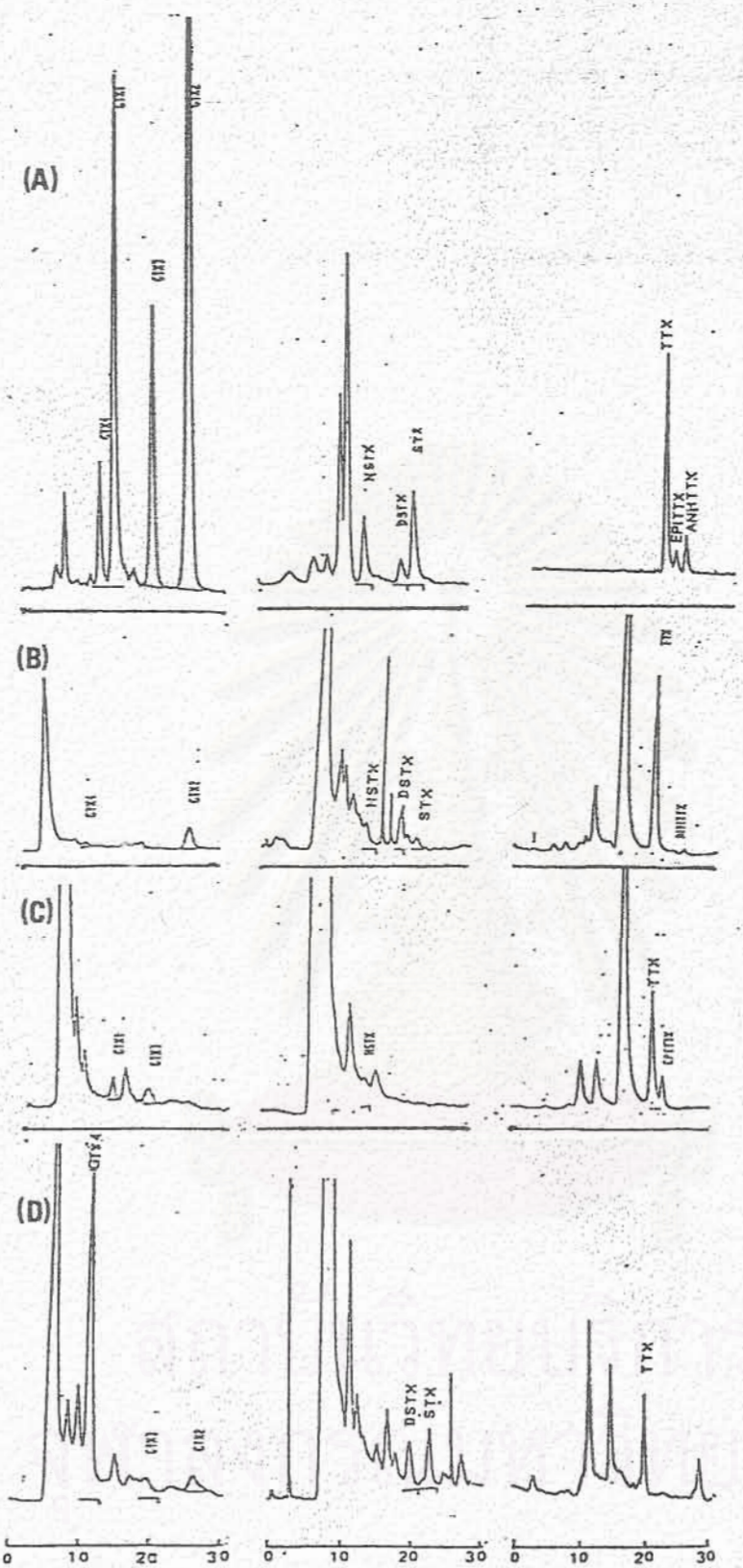
ค่า G+C content ของสายพันธุ์ Go-2-1= 48% นำไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ Owen (1982)

ผลการศึกษาชนิดของสารพิษจากเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์และจากอวัยวะของหอยทรายบางส่วน โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography เพื่อยืนยันถึงสารพิษชนิดที่ตัดขวางช่องโซเดียมว่าเป็นจริงหรือไม่ โดยวิธีนี้จะทราบได้ว่าสารพิษนั้นเป็น TTX หรือ STX หรือ GTX

จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้โครมาโตแกรมของตัวอย่างต่าง ๆ ดังแสดงในรูป 4, 5 และได้สรุปผลจากการวิเคราะห์ HPLC ในตัวอย่างทั้งที่ได้จากในระยะพิษสูงและในระยะพิษต่ำว่ามีสารใดเป็นส่วนประกอบของสารพิษที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นรวมทั้งในบางอวัยวะของหอยทราย ดังแสดงในตารางที่ 5

ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC นี้ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย genus Vibrio หลายสายพันธุ์ที่แยกได้จากหอยทราย สามารถสร้างสารพิษได้ทั้งชนิด PSP และ TTX แต่ส่วนประกอบของอนุพันธุ์ในสารพิษจะแตกต่างกันออกไป และยังมีแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มิได้นำมาจำแนกก็สามารถผลิตได้ แต่มักจะผลิตได้เฉพาะ PSP หรือ TTX อย่างใดอย่างหนึ่ง และอวัยวะบางส่วนของหอยทรายก็ประกอบด้วยสารพิษทั้งสองกลุ่ม บางส่วนก็ประกอบด้วยกลุ่มเดียว (ตารางที่ 5)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



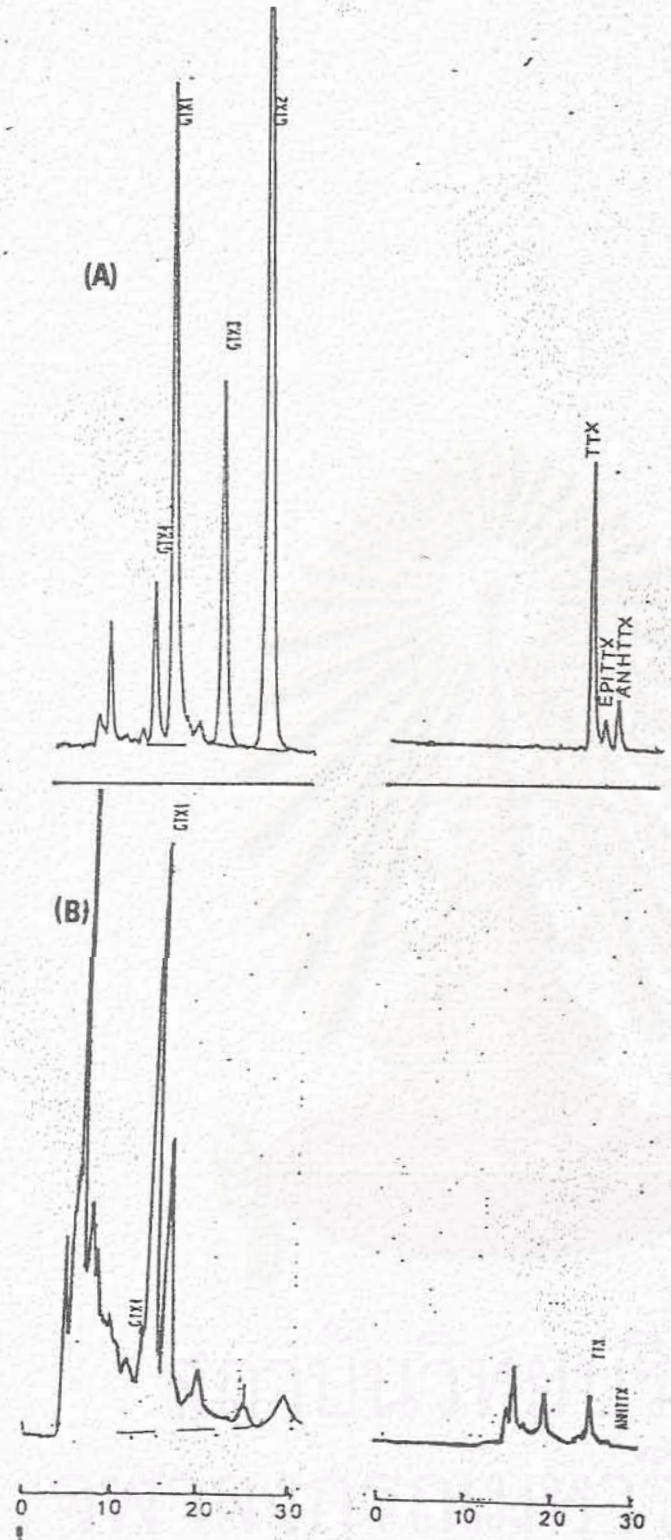
รูปที่ 4 โครมาโตแกรมของ (A) standard toxin GTX, STX และ TTX โดยใช้ HPLC (B-D) โครมาโตแกรมโดยใช้ HPLC วิเคราะห์ toxin จาก (B) Vibrio sp. strain G-1-1 ซึ่งแยกจาก gill (C) Vibrio sp. strain St-1-1 ซึ่งแยกจาก stomach (D) Vibrio sp. strain Sp-H-2 ซึ่งแยกจาก siphon ของหอยทราย

GTX = gonyautoxin

STX = saxitoxin, NSTX = neosaxitoxin, DSTX = decarbamoyl saxitoxin

TTX = tetrodotoxin, EPITTX = 4-epi tetrodotoxin,

ANHTTX = anhydrotetrodotoxin



รูปที่ 5 โครมาโตแกรมของ (A) standard toxin GTX และ TTX (B) toxin ที่สกัดจาก gill ของหอยหราย โดยใช้ HPLC

GTX = gonyautoxin

TTX = tetrodotoxin, EPITTX = 4-epi tetrodotoxin,

ANHTTX = anhydrotetrodotoxin

ตารางที่ 5 แสดงส่วนประกอบของ toxin ในตัวอย่างจากแบคทีเรียที่แยกจากหอยทราย และ toxin ในบางส่วนของหอยทราย

Sample name	GTX_1	GTX_2	GTX_3	GTX_4	STX	NeoSTX	TTX	4 epiTTX	anh.TTX
Toxic period :-									
G-1-1	±	-	-	-	-	+	+	-	+
G0-1-4	-	-	-	-	-	-	±	-	-
G0-2-1	+	-	+	-	-	+	±	-	+
H-1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H-2-1	-	-	-	-	±	±	-	-	-
F-1-1	-	-	-	-	-	+	-	-	-
St-1-1	+	-	+	-	-	+	+	+	-
St-2-1	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Sd-1-7	+	-	-	-	±	+	±	-	-
Mantle 2	+	-	-	-	-	±	+	-	-
Stomach 1	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Stomach 2	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Gill 1	±	-	-	-	-	-	+	-	-
Gill 2	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Non-toxic period									
G-H-4	-	+	+	-	+	-	±	-	-
G0-L-2	+	±	+	+	+	+	-	-	-
G0-L-5	±	-	-	-	±	±	-	-	-
Sp-H-2	+	-	±	-	+	-	+	+	-
Sd-H-8	-	-	+	-	-	+	-	-	-

การอภิปรายผลและข้อสรุป

จากผลการทดลอง Total plate count ของแบคทีเรียจากอวัยวะต่าง ๆ ของหอยทราย 7 ส่วน และดินทรายบริเวณที่เก็บตัวอย่าง (ตารางที่ 1) โดยเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากหอยทรายที่เก็บในระยะพิษสูง และในระยะพิษต่ำ พบว่าจำนวนแบคทีเรียในหอยทรายในระยะพิษสูงจะมากกว่าจำนวนแบคทีเรียในหอยทรายในระยะพิษต่ำ แต่พบว่าชนิดของแบคทีเรียในทั้งสองระยะจะมีจำนวนชนิดใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนมกราคมสภาพแวดล้อมบริเวณเกาะสีชังแตกต่างจากเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมิถุนายน ความแตกต่างนี้อาจเกิดเนื่องจากกระแสน้ำ กระแสลม อุณหภูมิ pH ปริมาณสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่ละลายในน้ำ ซึ่งสาเหตุของความแตกต่างนี้จำเป็นต้องอาศัยการศึกษาทางนิเวศน์วิทยาเป็นหลักในการศึกษาต่อไป ปัจจัยต่าง ๆ ที่เปลี่ยนแปลงนี้ทำให้การเจริญของแบคทีเรียในช่วงพิษต่ำมีจำนวนลดลงทำให้การทำ total plate count ของแบคทีเรียมีจำนวนน้อยลง แต่เมื่อศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย ก็พบว่ามีลักษณะที่สามารถจำแนกความแตกต่างออกเป็นสายพันธุ์ที่มีจำนวนสายพันธุ์หอ ๆ กับจำนวนสายพันธุ์ที่แยกได้จากในระยะพิษสูง แสดงว่าชนิดของแบคทีเรียยังมีความหลากหลายคงเดิม แต่จำนวนของเซลล์แบคทีเรียจะลดลงในระยะเวลาที่หอยมีพิษต่ำ

จำนวนเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างพิษได้เมื่อแยกจากหอยทรายในระยะพิษสูงพบว่ามีจำนวนสายพันธุ์ถึง 19 สายพันธุ์ คิดเป็น 25% ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด แต่ในระยะพิษต่ำพบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์ คิดเป็น 5.6% ของเชื้อที่แยกทั้งหมด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน (ตารางที่ 2) ความแตกต่างนี้อาจเป็นข้อที่แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของหอยทรายที่เพิ่มขึ้นในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมิถุนายน อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียสายพันธุ์สร้างพิษได้ซึ่งมีอยู่จำนวนมากในระยะนั้น และผลการทดลองดังกล่าว แสดงความแตกต่างของจำนวนแบคทีเรียชนิดนี้ได้อย่างชัดเจน

ในการตรวจพิษในอวัยวะต่าง ๆ ของหอยทราย (รูปที่ 1, 2) ผลการทดลองพบว่าในอวัยวะที่เคยมีพิษสูง เช่น mantle foot กลับไม่มีพิษในระยะพิษต่ำ แต่ในบางอวัยวะ เช่น gonad, gill และ stomach ซึ่งเป็นอวัยวะที่ไม่สามารถจะนำเอาเฉพาะส่วนภายในของอวัยวะมาใช้แยกได้ และ stomach ยังถือว่าเป็นส่วนที่เปิดรับอาหารจากภายนอก จึงอาจเป็นไปได้ว่าส่วนของอวัยวะเหล่านี้อาจมีแบคทีเรีย phytoplankton อื่น ๆ มาจับ

อยู่กับส่วนที่เป็นเมือก ดังนั้นเมื่อนำมาทดสอบพิษจึงพบว่าปริมาณพิษยังมีอยู่โดยเฉพาะส่วน gill ที่เก็บตัวอย่างในระยะน้ำลง แต่ในตัวอย่างที่เก็บตอนน้ำขึ้นไม่พบพิษเลย ดังนั้นหอยทรายแต่ละตัวอาจมีความแตกต่างกันออกไปได้ใน stomach ที่เก็บในระหว่างน้ำขึ้นพบพิษบ้างแต่ไม่สูงนัก เป็นไปได้ว่าจะมีพวก phytoplanton มีพิษเข้ามากับอาหารที่หอยกรองกิน เมื่อตรวจดูส่วน content ใน stomach จึงพบว่ามีพิษ แต่ในระยะน้ำลงก็ไม่พบพิษใน stomach เลย

จากการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสร้างพิษใน 2 ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง (ตารางที่ 3, 4) จะเห็นว่า เชื้อแบคทีเรียที่พบในทั้งสองระยะคือแบคทีเรียใน genus Vibrio แต่เนื่องจากไม่ได้จำแนก species ของแบคทีเรียนี้จะบอกไม่ได้ว่าเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ ส่วนชนิดอื่นนอกเหนือจาก Vibrio จะมีความแตกต่างกันในระหว่างเวลาพิษสูงและเวลาพิษต่ำ จึงเป็นไปได้ว่าในระหว่าง 2 ระยะเวลาดังกล่าวชนิดของแบคทีเรียก็มีการเปลี่ยนแปลงไปด้วย เป็นการชี้ให้เห็นว่าผลการทดลองในตารางที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดสร้างพิษได้จะมีสายพันธุ์น้อยลง และชนิดของสายพันธุ์ก็เปลี่ยนไปด้วยในระหว่างเดือนที่หอยทรายมีพิษต่ำ ผลการทดลองนี้จะเป็นเครื่องแสดงให้เห็นถึงการที่เชื้อแบคทีเรียอาจมีส่วนร่วมในการทำให้หอยทรายมีพิษเพิ่มมากขึ้น และอาจเป็นแนวทางที่ทำให้คิดว่าในสัตว์ทะเลที่มีพิษอื่นก็อาจมีเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีพิษขึ้นได้

ผลการทดลองนี้สนับสนุนงานของ Kodama (1989) และ Kodama et al (1990) ที่พบว่าในหอยพัด (Scallop) ก็สามารถสร้างเกิดสารพิษขึ้นได้โดยไม่มี dinoflagellate ที่มีพิษซึ่งแต่เดิมเข้าใจว่าคือสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดพิษในหอยนี้ และเขาได้สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญ

การวิเคราะห์ชนิดของสารพิษที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียและสารที่แยกได้จากอวัยวะบางส่วนของหอยทราย โดยใช้ HPLC (รูปที่ 4-5) โครมาโตแกรมได้แสดงให้เห็นว่าสารพิษจากทั้งแบคทีเรีย และอวัยวะต่าง ๆ ของหอยทรายประกอบด้วยสารพิษทั้งชนิดที่อยู่ในกลุ่ม PSP (Paralytic Shellfish Poisions) และ TTX (Tetrodotoxins) การพบสารพิษทั้งสองชนิดในส่วนที่ผลิตจากแบคทีเรียเป็นสิ่งที่ยังไม่เคยมีผู้พบมาก่อน และผลการทดลองก็สอดคล้องกับการวิเคราะห์สารพิษในตัวหอยทราย (Saitanu, 1991) ซึ่งผู้วิจัยได้ทดลองใช้ส่วนของ gill, mantle และ Stomach ก็พบสารพิษทั้งสองกลุ่มในส่วน gill และ mantle เช่นกัน

การตรวจพิษในอวัยวะต่าง ๆ ของหอยทรายทำให้ทราบได้ว่าอวัยวะส่วนที่จะสะสมสารพิษนั้นอยู่ที่ mantle, foot, stomach ซึ่งจะมีพิษสูงกว่าอวัยวะอื่น ๆ ส่วน siphon ของหอยทรายทุกตัวอย่างไม่มีพิษสะสมอยู่เลยซึ่งแตกต่างจากหอยสองฝาบางชนิดที่พบว่า siphon ก็เป็นที่สะสมของสารพิษ (Barnes, 1980)

การศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารพิษทั้งสองกลุ่มดังกล่าวในหอยทรายทั้งในระยะพิษสูงและระยะพิษต่ำเป็นหลักฐานสำคัญที่จะชี้ให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียจะมีส่วนร่วมในการทำให้หอยทรายมีพิษอย่างแน่นอน และยังเป็นการสนับสนุนงานของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านที่กล่าวว่าเชื้อแบคทีเรียอาจเป็นสาเหตุให้ปลาปักเป้ามีพิษ รวมทั้งสัตว์ทะเลอื่นมีพิษด้วย (Yasumoto et al., 1986, Yotsu and Yasumoto, 1987, Simidu et al., 1987)

แบคทีเรียจึงอาจเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดพิษในสัตว์ สัตว์หลายชนิดที่มีพิษประเภทนี้ไม่ได้มีความเกี่ยวข้องในด้านพันธุกรรม (Yasumoto et al., 1986) แต่สามารถสร้างพิษได้ สาเหตุจึงน่าจะมาจากสาเหตุภายนอกร่างกายสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามอาจเป็นได้ทั้งสาเหตุภายนอกและภายในร่างกายของสัตว์เอง ซึ่งการศึกษาค้นคว้าต่อไปจะสามารถบอกได้ถึงสาเหตุที่แท้จริง

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดพิษของหอยทราย และแบคทีเรียที่สร้างสารกัดขวางช่องโซเดียมเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากคุณลักษณะของการสร้างพิษในหอยทรายที่แตกต่างกันไปในระหว่างปี และโดยเฉพาะอย่างยิ่งการพบว่า ปริมาณแบคทีเรียสร้างพิษที่อยู่ในหอยมีความแปรผันตามความเป็นพิษของหอยด้วย จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาให้ลึกลงไปกว่านี้จะทำให้สามารถทราบถึงการมีส่วนร่วมของแบคทีเรียชนิดนี้ต่อการสร้างพิษในหอย ซึ่งจะเป็นแนวทางให้ทราบถึงสาเหตุของการมีพิษของสัตว์ทะเลชนิดอื่น ๆ ได้

งานวิจัยที่หาความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างพิษได้กับความเป็นพิษที่เกิดขึ้นในสัตว์ต่าง ๆ ยังไม่เคยมีผู้ใดทำมาก่อน ดังนั้นสิ่งที่ควรศึกษาต่อไปในแนวทางนี้จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

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

2. 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.

3. 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.

4. Kodama, M., Okata, 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.

5. Kogure, K., Tamplin, M.L., Simidu, U. and Colwell, R.R. (1989) A tissue culture assay for Tetrodotoxin, Saxitoxin and Related Toxins. Toxicon, Vol.26, No. pp.191-197.

6. Mosher, H. and Fu hrman, F.A. (1984). Occurrence and Origin of Tetrodotoxin. Sea Food Toxins. Chapter 28, American Chemical Society, 333-344.

7. Marmur, J. (1961) : A procedure for the isolation of Deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. 3, 208-218.

8. Tamaoka, J. and Komagata, K. (1984) : Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. FEMS Microbiology Letters 25, 125-128.

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

10. Oshima, Y., Hasegawa, M., Yasumoto,T., Hallegraeff, G. and Blackburn, S. (1987). Dinoflagellate Gymnodinium catenatum as the source of Paralytic Shellfish. Toxins in Tasmanian shellfish. Toxicon 25, No.11, 1105-1111.

11. Oshima, Y., Sugino, K. and Yasumoto,T. (1989) Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxin. (Mimeograph)

12. Saitanu, K., Wisessang, S., Yongvanich, T., Piyakarnchana, T., Ogata, T Sato, S. and Kodama, M. (1991) 10th World Congress on Animal Plant and Microbial Toxins.

13. Owen, R.J. (1982). G+C ratios of genera and type species of bacteria. National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, London.

14. Simidu, U., Ezura, A. (1988). Identification of marine bacteria. In kaiyo biseibutsu kenkyuho (methods for investigation of marine microorganisms). Japan Scientific Societies Press. (in Japanese) 228.

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

16. Barnes, R.D. (1980) : Invertebrate Zoology Saunders College/Holt, Rinehart and Winston, 296-409.

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

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