รายงานผลการวิจัย

เงินอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2539

เรื่อง

ผลของน้ำสกัดจากหอยสองฝาต่อการสร้างเทโทรโดทอกซิน และพิษอัมพาตจากหอยโดยแบคทีเรีย

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน

จส
วท 15
010497

รายงานผลการวิจัย

เงินอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2539

เรื่อง

ผลของน้ำสกัดจากหอยสองฝาต่อการสร้างเทโทรโดทอกซินและพิษอัมพาตจากหอยโดยแบคทีเรีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน

I19578878 12 ก.ย. 2544

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ที่เชื้อแบคทีเรียสร้างพิษอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สัตว์ทะเลมีพิษได้ โดยใช้แบคทีเรีย 9 สายพันธุ์ 3 สายพันธุ์เป็นเชื้อที่สร้างพิษได้สูง อีก 3 สายพันธุ์สามารถสร้างพิษได้ในระดับต่ำ และอีก 3 สายพันธุ์ไม่สามารถสร้างพิษได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในห้องทดลอง นำเชื้อทั้ง 9 สายพันธุ์นี้มาเลี้ยงในน้ำสกัดหอยทรายซึ่งเก็บตัวอย่างในระยะพิษสูงและระยะพิษต่ำ (เดือนมกราคมและเดือนตุลาคม ตามลำดับ) รวมทั้งหอยกระปุกและหอยรูปหัวใจ จากการวิเคราะห์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเอช พี แอล ซี พบว่า แบคทีเรียกลุ่มที่สร้างพิษสูง (3 สายพันธุ์) และกลุ่มที่สร้างพิษต่ำ (3 สายพันธุ์) สามารถสร้างพิษเพิ่มขึ้นได้สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายที่อยู่ในระยะพิษสูง และพบอนุพันธ์กลุ่มเทโทรโดทอกซินและซัคซิทอกซิน โดยที่น้ำสกัดชนิดอื่นไม่มีผลดังกล่าว และพบว่าปริมาณฟอสเฟตในน้ำสกัดหอยทรายระยะพิษสูงมีปริมาณต่ำกว่าน้ำสกัดชนิดอื่นๆอย่างเห็นได้ชัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ จพ
ดก 15
เลขทะเบียน 010497
วัน.เดือน.ปี 23 พค. 44

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

เทโทรโดทอกซิน (Tetrodotoxins, TTXs)และพิษอัมพาตจากหอย (Paralytic Shellfish Poisons, PSPs) จัดอยู่ในกลุ่มของสารกีดขวางช่องโซเดียม (Sodium Channel Blocker, SCB) ซึ่งเป็นสารพิษชนิดที่ไม่ใช่โปรตีนและมีผลต่อระบบประสาท (nonpeptidic neurotoxin) โดยมีกลไกอย่างจำเพาะในการกีดขวางช่องโซเดียมการผ่านเข้าออกของช่องโซเดียมอิออน (Na^+)ทางช่องโซเดียมตรงบริเวณเยื่อหุ้มแอกซอนของเซลประสาทมีผลทำให้ไม่เกิดขบวนการดีโพลาไรเซชั่น (depolarization) ของการเกิดกระแสประสาท กล้ามเนื้อไม่สามารถทำงานได้ เกิดเป็นอัมพาตและถ้าได้รับสารนี้ในปริมาณมากอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ (Kao and Levinson, 1986)

เทโทรโดทอกซินพบครั้งแรกปี ค.ศ. 1964 พบในปลาวงศ์ Tetrodoniformes ซึ่งเป็นจำพวกปลาปักเป้า (Tsuda *et. al.*, 1964) และพบสารพิษนี้ในสัตว์วงศ์อื่นๆอีก เช่น วงศ์ Diodontidae, Canthigasteridae และMolidae เป็นต้น รวมไปถึงสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ แต่จากการศึกษาต่อมาสามารถแยกแบคทีเรียที่สร้างสารพิษได้จากสัตว์หลายชนิด และพบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุลต่างๆกัน ได้แก่ สกุล *Vibrio, Aeromonas, Bacillus* และ *Micrococcus* เป็นต้น (Simidu *et. al.*, 1987) ดังนั้นจึงคาดว่าสารพิษที่พบในสัตว์อาจมาจากแหล่งภายนอกมากกว่าสัตว์สร้างขึ้นมาเอง เนื่องจากสัตว์มีพิษแต่ละชนิดไม่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม

พิษอัมพาตจากหอยมีอนุพันธ์ที่สำคัญ 2 กลุ่มคือ ซัคซิทอกซิน (Saxitoxins, STXs) และโกนิออทอกซิน (Gonyautoxins, GTXs) แต่อนุพันธ์แรกที่พบ และมีการศึกษากันมากคือซัคซิทอกซิน ซึ่งพบครั้งแรกในหอยกาบน้ำเค็มชนิดหนึ่ง *Saxitoxinas gigantius* (Ghazarossian *et. al.*, 1974) ต่อมาพบสารพิษชนิดนี้ในสัตว์น้ำอีกหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นหอยสองฝาได้แก่ หอยกาบและหอยแมลงภู่เป็นต้น แต่ภายหลังพบสารพิษนี้ในไดโนแฟลกเจลเลตบางชนิด คือ *Alexandrium tamarense* (*Protogonyaulax tamarensis*) ซึ่งเป็นพวกแพลงตอนพืชและมีผู้สันนิษฐานว่าการที่หอยมีพิษเนื่องจากมีการกรองกินเอาไดโนแฟลกเจลเลตมีพิษเข้าไป แต่ต่อมา Kodama *et.al.* (1990) พบว่าภายในเซลล์ของไดโนแฟลกเจลเลตที่มีพิษนั้นมีแบคทีเรียสร้างพิษสกุล *Moraxella* ดังนั้นจึงคาดว่าแหล่งของสารพิษภายในเซลล์ของไดโนแฟลกเจลเลต อาจมาจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในไดโนแฟลกเจลเลต และเมื่อสัตว์กินไดโนแฟลกเจลเลตเหล่านี้เข้าไปจึงทำให้สัตว์มีพิษ

สำหรับการศึกษาในประเทศไทยผู้วิจัยได้ทำการแยกแบคทีเรียสร้างพิษจากสัตว์ต่างๆหลายชนิด และพบว่า หอยทราย (*Asaphis violascens*) ซึ่งเป็นสัตว์มีพิษชนิดหนึ่งที่มีรายงานว่ามีช่วงความเป็นพิษ 2 ช่วงคือช่วงพิษสูงและช่วงพิษต่ำ (Saitanu *et. al.*,1992) มีเชื้อแบคทีเรียที่ สร้าง

พิษ ดังนั้นจึงนำหอยทรายมาทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยทำการศึกษาร่วมกับศาสตราจารย์ทวีศักดิ์ ปิยะกาญจน์ โดยแยกแบคทีเรียสร้างพิษจากหอยทรายและพบว่าระยะที่หอยทรายมีพิษสูงคือช่วงระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมิถุนายนจะพบแบคทีเรียที่สร้างพิษได้ในหอย และดินตะกอนในบริเวณที่หอยอาศัยอยู่ในปริมาณสูง ซึ่งแตกต่างไปจากช่วงพิษต่ำที่อยู่ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคม จะพบแบคทีเรียดังกล่าวในตัวหอย และดินตะกอนน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด (Juntongjin *et. al.*, 1996) แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่นอนที่ทำให้ระดับพิษในหอยทรายแตกต่างกันในสองระยะเวลา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหอยทรายมีการกินอาหารแบบกรอง(filter feeding) โดยการกรองกินจึงได้รับแบคทีเรียสร้างพิษที่อยู่ตามดินตะกอน หรือในเซลล์ของแพลงตอนเข้าไปสะสมภายในตัวหอย จึงมีผลทำให้หอยทรายมีพิษ แต่จากการศึกษาพบว่าหอยสองฝาชนิดอื่นๆ ที่อาศัยอยู่บริเวณเดียวกัน และมีการกินอาหารแบบเดียวกับหอยทราย ในอาหารที่กินอาจมีแบคทีเรียสร้างพิษปนอยู่เช่นกัน แต่หอยเหล่านั้นไม่มีพิษจึงได้ตั้งสมมุติฐานว่าอาจมีปัจจัยร่วมบางอย่างระหว่างแบคทีเรียสร้างพิษกับสัตว์มีพิษที่มีผลไปส่งเสริมให้แบคทีเรียสร้างพิษได้สูงขึ้น หรือในอีกทางหนึ่งเชื้อแบคทีเรียอาจไปมีผลให้หอยมีพิษสามารถสร้างพิษได้สูงขึ้นกว่าเดิม ซึ่งสิ่งเหล่านี้ดังกล่าวไม่พบในสัตว์ไม่มีพิษ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาถึงผลของน้ำสกัดที่ผลิตโดยรักษาคุณสมบัติตามธรรมชาติจากหอยสองฝาชนิดมีพิษ (หอยทราย) และชนิดที่ไม่มีพิษ (หอยกระปุกและหอยคราง) เพื่อเปรียบเทียบผลต่อการสร้างพิษของแบคทีเรีย โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างสารพิษในปริมาณสูง สร้างได้ปริมาณต่ำ และไม่สร้างสารพิษในน้ำสกัดจากหอยสองฝาชนิดมีพิษและไม่มีพิษ นำมาตรวจวัดการเจริญ และปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธี tissue culture assay โดยใช้ mouse neuroblastoma cells และตรวจหาชนิดของอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารพิษ โดยวิธี เอช พี แอล ซี (HPLC) รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำสกัดจากหอยสองฝา ข้อมูลเหล่านี้จะนำมาเปรียบเทียบกันแล้ววิเคราะห์เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการศึกษาการเกิดพิษในสัตว์ชนิดอื่นๆด้วย กรณีสัตว์เหล่านั้นได้รับแบคทีเรียสร้างพิษเข้าไป การเกิดพิษในสัตว์ทะเลนี้ทำให้มีอุบัติการณ์ของโรคอาหารเป็นพิษ เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข ตลอดจนผลของการวิจัยจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาสาเหตุที่แบคทีเรียทำให้สัตว์บางชนิดเกิดพิษ แต่ในสัตว์บางชนิดไม่เกิดพิษทั้งๆที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน และนำไปสู่การศึกษาที่เกี่ยวกับการนำสารพิษไปใช้ประโยชน์ในขั้นสูงต่อไป

วิธีการวิจัย

หอยสองฝาที่นำมาทำน้ำสกัด

ได้เก็บตัวอย่างหอยสองฝา 3 ชนิด จากบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี คือ

หอยทราย (sand clam, *Asaphis violascens*)

หอยกระปุก (ridged venus clam, *Tapes turgidus*)

หอยรูปหัวใจ (heart shell, *Trachycardium flavum*)

หอยแต่ละชนิดเก็บขนาดลำตัวที่ใกล้เคียงกัน และทั้ง 3 ชนิดเก็บในบริเวณเดียวกัน คือ ชายหาดบริเวณ intertidal zone ของเกาะด้านติดแผ่นดินใหญ่ ได้เก็บตัวอย่างหอยดังกล่าว แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะที่หอยทรายพิษต่ำ คือในเดือนตุลาคม 2538 และเก็บในช่วงเวลาที่หอยทรายพิษสูงคือ เดือนมกราคม 2539 ทั้งสองระยะเก็บในขณะที่น้ำลง หอยที่เก็บจะพยายามรักษาสภาพให้หอยมีชีวิตอยู่จนกว่าจะเดินทางถึงห้องปฏิบัติการที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ยังได้เก็บตัวอย่างน้ำทะเล และทรายบริเวณที่เก็บตัวอย่างเพื่อใช้ประกอบการวิจัยด้วย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

มีทั้งสิ้น 9 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ในปี 1992-3

A. *Vibrio alginolyticus* (แยกได้จากหอยทราย)
B. *Bacillus cereus* (แยกได้จากหอยทราย)
C. *B. cereus* (แยกได้จากหอยทราย)
D. *B. megaterium* (แยกได้จากหอยกระปุก)
E. *Corynebacterium matruchotii* (แยกได้จากทราย)
F. *V. harveyi* (แยกจากน้ำทะเล)
G. *C. paurometabolum* (แยกได้จากหอยกระปุก)
H. *C. matruchotii* (แยกได้จากทราย)
I. *Escherichia coli* TISTR No. 780 (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

นำทั้ง 9 สายพันธุ์นี้มาตรวจสอบการสร้างสารพิษกีดขวางช่องโซเดียม เพื่อจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารพิษ โดยการนำแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว L-medium (โซเดียมคลอไรด์ 17.53 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต 2.46 กรัม, ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัม, โพลีเพปโตน 5.0 กรัม, ยีสต์สกัด 5.0 กรัม, กลูโคส 2.0 กรัม, น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร, ความเป็นกรดด่าง 7.5±0.1) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยการใช้หัวเชื้อจากอาหารเหลวชนิดเดียวกัน ที่ปรับความขุ่นให้ทุกสายพันธุ์มีค่า= 0.3 เลี้ยงโดยวิธีเขย่าที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ต่อจากนั้นจึงแยกเซลล์โดยการปั่นด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บเซลล์และล้างเซลล์ด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.3 M แล้วนำเซลล์ไปทำให้แตกด้วยเครื่องกำเนิดเครื่องเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) เพื่อแยกสารพิษออกจากเซลล์ นำไปแยกเศษเซลล์ออก แล้วนำส่วนน้ำใสซึ่งมีสารพิษไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) เก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ด้วยการทดสอบกับเนื้อเยื่อ(tissue culture assay) (Kogure *et. al.*, 1989) เพื่อหาระดับความเป็นพิษที่แบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์สร้างขึ้น

<u>การตรวจระดับพิษในเนื้อหอยสองฝา ตัวอย่างน้ำทะเลและทราย</u>

1. เนื้อหอยทั้ง 3 ชนิด ก่อนจะนำมาทำน้ำสกัดจะต้องตรวจระดับพิษในเนื้อหอยก่อน โดยนำหอยมาล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง แกะเนื้อหอยออก นำไปปั่นให้ละเอียด แล้วนำมาสกัดสารพิษออกโดยใช้ acid-methanol extraction 3 ครั้ง แล้วสกัดส่วนไขมันออกด้วย chloroform นำสารที่สกัดได้ผ่านคอลัมน์สำเร็จรูป Sep Pak C_{18} เพื่อทำให้สารที่สกัดมีความบริสุทธิ์มากขึ้น แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษโดยทดสอบกับเนื้อเยื่อ

2. ตัวอย่างน้ำทะเลที่เก็บตัวอย่างมาจากบริเวณเดียวกับที่อยู่ของหอยสองฝา จะต้องนำมาตรวจระดับพิษโดยใช้น้ำทะเล 200 มิลลิลิตร แบ่งออกเป็นสองส่วน ทั้งสองส่วน นำไปทำให้แห้งด้วยการระเหิดแห้ง แล้วเติม 0.1 % กรดน้ำส้มในเมทธานอล นำส่วนที่หนึ่งไปทำให้อนุภาคแตกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง สกัดสารพิษในส่วนทั้งสองนี้ด้วยวิธี acid-methanol extraction 2 ครั้ง นำส่วนของสารพิษที่สกัดได้ไปผ่าน Sep Pak C_{18} จากนั้นทำสารให้อยู่ในรูปของผง เพื่อนำไปทดสอบกับเนื้อเยื่อ

3. ตัวอย่างทรายที่เก็บพร้อมกับหอยสองฝา นำมาชั่ง 200 กรัม 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปเติม 0.1% กรดน้ำส้มในเมทธานอล เขย่านาน 5 นาที แล้วนำไปใส่เครื่องทำให้อนุภาคแตก ส่วนที่สองเติม 0.1 %กรดน้ำส้มในเมทธานอล ไม่ต้องนำไปเข้าเครื่องทำให้อนุภาคแตก ต่อจากนั้นทำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

acid-methanol extraction ซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำสารที่สกัดไปผ่านคอลัมน์ Sep Pak C_{18} เช่นเดียวกับข้อ 3

การเตรียมน้ำสกัดหอยสองฝา

นำตัวอย่างหอยสองฝาซึ่งทราบระดับความเป็นพิษจากการตรวจสอบแล้ว มาล้างด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ แกะเนื้อหอยออกและล้างด้วยน้ำทะเลปราศจากเชื้ออีก 3 ครั้ง ใช้เนื้อหอย 100 กรัม เติมน้ำทะเล 1000 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่อง homogenizer 5 นาที แล้วนำไปทำให้อนุภาคแตกโดยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงใช้เวลา 12 นาที นำไปปั่นแยกตะกอนทิ้งด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 °ซ เก็บส่วนน้ำใสมากรองด้วยกระดาษกรอง (membrane filter) ที่มีรูขนาด 8, 5, 3 และ 1.2 ไมครอน ตามลำดับ เก็บส่วนที่กรองได้ ไว้ที่ -20 °ซ เป็นเวลา 1 คืน วันต่อมานำมาละลายแล้วปั่นแยกตะกอนทิ้งอีก ต่อจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 ไมครอน ส่วนน้ำใสที่ได้จะเป็นน้ำสกัดหอยสองฝาที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย ทำหลายๆครั้งจนได้ปริมาตรที่ต้องการ เก็บรวมไว้ในตู้เย็น

การผลิตสารพิษจากแบคทีเรียในน้ำสกัดหอยสองฝา

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงในน้ำสกัดที่ได้จากหอยทราย หอยกระปุก และหอยรูปหัวใจ ซึ่งนำมาเจือจางให้เป็น 75 % ด้วยน้ำทะเลสังเคราะห์ นำหัวเชื้อของแต่ละสายพันธุ์มาเจือจางให้ได้ความขุ่น (OD=0.3) เท่ากัน แล้วถ่ายหัวเชื้อดังกล่าว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในน้ำสกัดจากหอยทั้ง 3 ชนิดที่ทำให้เจือจางเป็น 75% ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เลี้ยงโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดการเจริญโดยการวัด Optical Density และหาจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี spread plate technique บนอาหารแข็ง ORI (โพติโอสเพปโตน 1.0 กรัม, ผงสกัดจากยีสต์ 1 กรัม, ไฟโตน 0.5 กรัม, โซเดียมไทโอซัลเฟต 0.2 กรัม, โซเดียมซัลไฟต์ 0.05 กรัม, เฟอริกซิเตรต 0.04 กรัม, วุ้นผง 15 กรัม, น้ำทะเล 900 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร, ความเป็นกรดด่าง 7.0-8.0) และวัดค่าความกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อที่เลี้ยงในน้ำสกัดข้างต้นมาปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำสกัดและล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.3 M และนำส่วนของเซลล์มาสกัดสารพิษภายในเซลล์โดยการละลายในกรดน้ำส้ม 0.1% แล้วทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง เมื่อปั่นแยกเซลล์ออกแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์บาง

ส่วนโดยผ่านคอลัมน์ Sep Pak C_{18} ทำให้สารที่ได้อยู่ในรูปผงด้วยเครื่องระเหิดแห้ง แล้วเก็บไว้ที่ -20 °ซ

ส่วนน้ำสกัดที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียนั้น เมื่อแยกเซลออกไปแล้ว นำปริมาตร 60 มิลลิลิตร มาเติมกรดน้ำส้ม 0.1% จนได้ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 3-4 และนำไปต้มในน้ำเดือดนานประมาณ 20 นาที ทำให้เย็นลง แล้วปั่นแยกตะกอนที่เกิดขึ้นทิ้งไป นำส่วนน้ำใสมาทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง แล้วนำไปสกัดสารพิษโดยแยกส่วนที่เป็นเกลือออกด้วยวิธี acid-methanol extraction 3 ครั้ง นำสารที่สกัดได้ไปผ่านคอลัมน์ Sep Pak C_{18} เพื่อทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ทำให้สารที่สกัดแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง เก็บสารที่ได้ไว้ที่ -20 °ซ

นอกจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นน้ำสกัดหอยสองฝา 75% แล้วยังได้เลี้ยงเชื้อใน L-medium โดยวิธีเช่นเดียวกัน และสกัดสารพิษจากเซลและอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เป็นค่าควบคุม

<u>การตรวจหาระดับความเป็นสารพิษกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ</u>

โดยการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma cell line (Neuro-2A ATCC CCL 131) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม 10%Fetal bovine serum แล้วนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไปทำให้เจือจางโดยมีจำนวนเซลล์ 1.0-1.5x10^5 เซลล์/มิลลิลิตร นำเซลล์ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ดังกล่าวไปใส่ใน 96-well microtiter plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลายมาตรฐาน และสารพิษตัวอย่างที่ละลายแล้ว (1มก/10 ไมโครลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน เติม 10 mM Ouabain และ 1 mM Veratridine ลงไป 10 และ 20 ไมโครลิตรตามลำดับ ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทั้งสารมาตรฐานและสารพิษตัวอย่างจะทำอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตและจำนวนเซลล์ทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (Inverted microscope) โดยดูจากลักษณะของเซลล์

สารมาตรฐานที่ใช้เพื่อเป็นชุดควบคุม และเพื่อทำกราฟมาตรฐาน คือสารเทโทรโดทอกซิน (จาก Department of Domestic Science, Shikoku Women s University, Japan) โดยเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.011, 0.022, 0.044, 0.088, 0.176, 0.352 และ 0.715 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของสารพิษกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธี เอช พี แอล ซี

การวิเคราะห์ชนิดของสารหลังจากได้ทราบว่าเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียมจากวิธีทดสอบโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แบ่งวิธีวิเคราะห์เป็น 2 ระบบ คือ

1. ระบบการวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ใช้วิธีวิเคราะห์ของ Yasumoto และ Michisshita (1985)

2. ระบบการวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์กลุ่มซัคซิทอกซิน (saxitoxins, STXs) และกอนิออทอกซิน (gonyautoxins, GTXs) ใช้วิธีวิเคราะห์ตามวิธีของ Oshima และคณะ (1989)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัด

ได้นำน้ำสกัดที่เตรียมจากหอยสองฝาชนิดต่างๆมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่อไปนี้

1. โปรตีน

หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี่ (Lowry s method) ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

2. ไนโตรเจน

โดยวิธีแมคโครเจลดาลห์ (Macro Kjeldahl method) ตามวิธีของ AOAC (1990) (โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

3. คาร์โบไฮเดรท

ใช้วิธีแอนโทรน (Anthrone s method) ตามวิธีของ Scott และ Melvin (1953)

4. ไขมัน

ใช้วิธีการสกัดด้วยอีเทอร์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ AOAC (1990)

5. ฟอสเฟต

โดยวิเคราะห์หาในรูปของฟอสฟอรัส ด้วยวิธี ICP atomic emission spectrometry ตามวิธีของ Mc Laren และคณะ (1981) (วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

6. กรดอะมิโน

โดยวิธี acid hydrolysis (Spackman *et. al.*,1958) (วิเคราะห์โดยกองชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม)

ผลการทดลอง

การสร้างสารพิษของแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

แบคทีเรียที่นำมาใช้ทั้ง 9 สายพันธุ์นั้น หลังจากตรวจสอบการสร้างสารพิษแล้ว พบว่าสามารถสร้างสารพิษชนิดกีดขวางช่องโซเดียมได้ในระดับสูง 3 สายพันธุ์ ในระดับต่ำ 3 สายพันธุ์ และไม่สร้างสารพิษเลยจำนวน 3 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยแสดงเป็นค่า Optical Density และปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่เชื้อสร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ L-medium

แบคทีเรีย	การเจริญ (OD_{660})	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (ug/l medium)
A	0.610	3.12
B	0.525	2.76
C	0.430	2.15
D	0.515	0.17
E	0.510	0.08
F	0.580	0.13
G	0.470	0
H	0.551	0
I	0.616	0

ปริมาณสารพิษกีดขวางช่องโซเดียมในเนื้อหอยสองฝา ตัวอย่างน้ำทะเลและทราย

ก่อนที่จะนำเนื้อหอยสองฝาไปทำน้ำสกัด ได้ตรวจดูสารพิษในเนื้อหอย โดยตรวจดูทั้งในระยะที่หอยทรายพิษสูง ซึ่งเก็บตัวอย่างในเดือนมกราคม 2539 และในระยะที่หอยทรายพิษต่ำซึ่งเก็บตัวอย่างในเดือนตุลาคม 2538 ดังแสดงในตารางที่ 2 นอกจากนี้ยังได้ตรวจดูสารพิษในตัวอย่างน้ำทะเลและทรายที่เก็บจากบริเวณเดียวกันด้วย

ตารางที่ 2 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในเนื้อหอยทราย หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจ รวมทั้งน้ำทะเลและทราย ที่เก็บตัวอย่างในระยะที่หอยทรายมีพิษสูงและพิษต่ำ

ตัวอย่าง	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (ug/g)	
	ระยะหอยทรายพิษสูง	ระยะหอยทรายพิษต่ำ
หอยทราย	0.1106	0.0025
หอยกระปุก	0.0046	0
หอยรูปหัวใจ	0.0031	0
ทราย (sonicated)	7.44×10^{-3}	2.09×10^{-3}
ทราย (unsonicated)	1.17×10^{-3}	0
น้ำทะเล (sonicated)	0.0659 (ug/ml)	0.0108 (ug/ml)
น้ำทะเล (unsonicated)	9.24×10^{-3} (ug/ml)	0

จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่า หอยทรายในระยะพิษสูงจะมีปริมาณสารพิษสูงกว่าหอยกระปุก และหอยรูปหัวใจมาก (ประมาณ 30 เท่า) นอกจากนี้ตัวอย่างน้ำทะเลและทรายที่ผ่านการทำให้อนุภาคแตก (sonication) ก็จะมีปริมาณสารพิษสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้ทำให้อนุภาคแตก และเมื่อเปรียบเทียบกับระยะหอยทรายพิษต่ำ ตัวอย่างหอยสองฝาและตัวอย่างน้ำทะเลและทราย จะมีปริมาณพิษลดลงมาก ในหอยกระปุก หอยรูปหัวใจ ทรายและน้ำทะเลที่ไม่ทำให้อนุภาคแตกไม่มีสารพิษอยู่เลย แต่ในหอยทรายระยะนี้จะมีพิษลดลงประมาณ 50 เท่า

ปริมาณสารพิษกีดขวางช่องโซเดียมในน้ำสกัดหอยสองฝา

น้ำสกัดหอยทราย หอยกระปุก และหอยรูปหัวใจ ที่เก็บตัวอย่างในช่วงระยะเวลาที่หอยทรายพิษสูงและพิษต่ำ ก่อนที่จะนำไปใช้เลี้ยงแบคทีเรีย ได้นำมาตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม ได้ผลการทดลองดังในตารางที่ 3

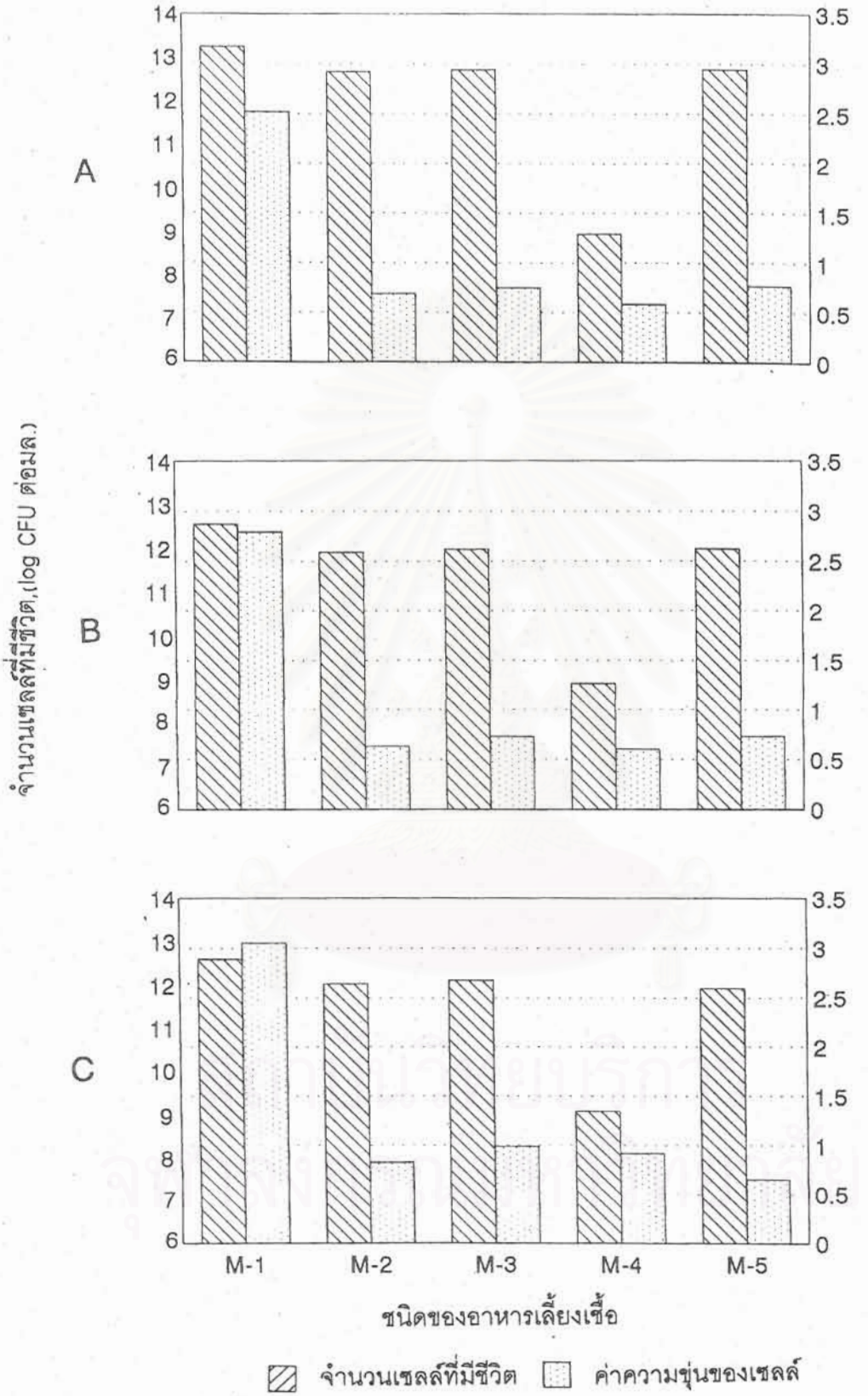
ตารางที่ 3 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในน้ำสกัดหอยทราย หอยกระปุก และหอยรูปหัวใจ ที่เก็บตัวอย่างในระยะหอยทรายพิษสูงและพิษต่ำ

ตัวอย่าง	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม(ug/l)	
	ระยะหอยทรายพิษสูง	ระยะหอยทรายพิษต่ำ
น้ำสกัดหอยทราย	0.0396	0
น้ำสกัดหอยกระปุก	0	0
น้ำสกัดหอยรูปหัวใจ	0	0

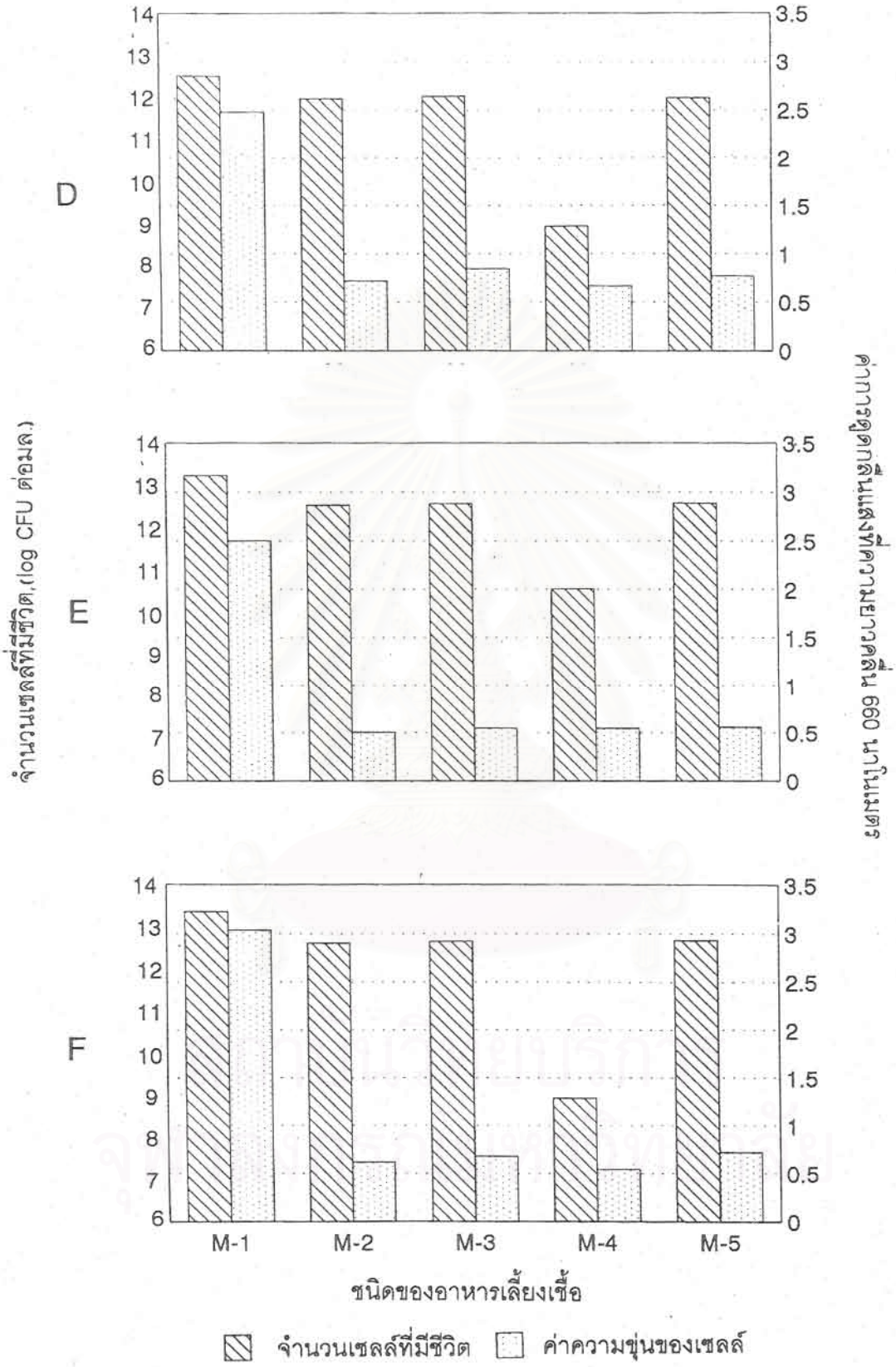
ในน้ำสกัดซึ่งจะนำมาใช้ทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย พบว่าน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงยังมีพิษอยู่ ส่วนในน้ำสกัดหอยสองฝาอื่นไม่มีความเป็นพิษเลย เนื่องจากในน้ำสกัดมีสภาพเจือจาง

สารกีดขวางช่องโซเดียมที่ผลิตจากแบคทีเรียที่เลี้ยงในน้ำสกัดหอยสองฝา

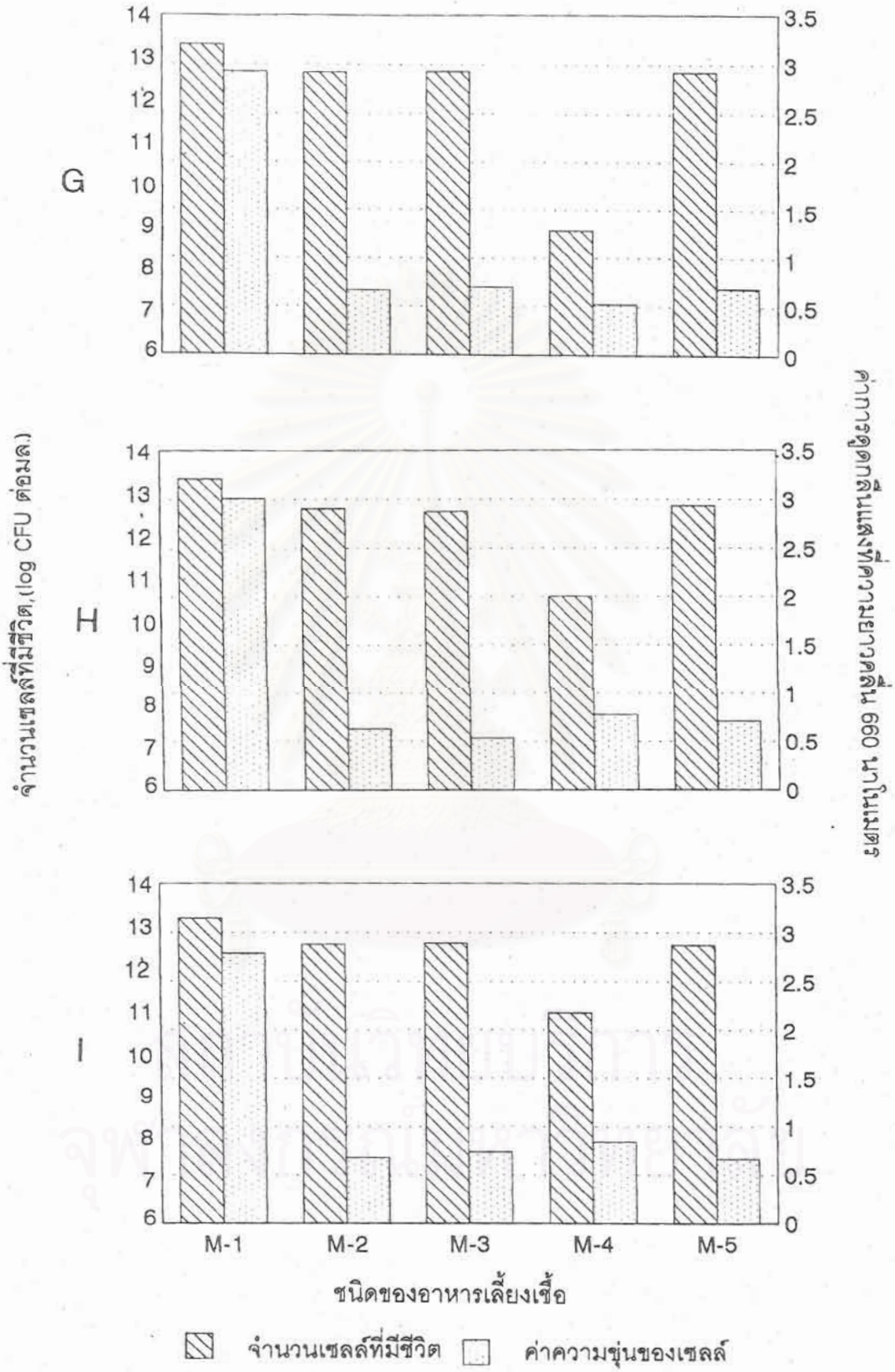
เชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่นำมาใช้เลี้ยงในน้ำสกัดหอยสองฝาที่เก็บตัวอย่างทั้งสองระยะ มีการเจริญและการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในแต่ละสายพันธุ์ ในรูปที่ 1-3 แสดงการเจริญของแบคทีเรีย ในรูปที่ 4 แ สดงการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในแบคทีเรียที่สร้างพิษสูง 3 สายพันธุ์ (A, B,C) ในรูปที่ 5, 6 แสดงการสร้างสารพิษในแบคทีเรียที่สร้างพิษได้ต่ำ 3 สายพันธุ์ (D, E, F) และแบคทีเรียที่ไม่สร้างสารพิษเลย (G, H, I) โ ดยใช้ M-1 แทนอาหารเหลว, M-2 แทนน้ำสกัดหอยทรายพิษสูง, M-3 แทนน้ำสกัดหอยกระปุก, M-4 แทนน้ำสกัดหอยรูปหัวใจ, M-5 แทนน้ำสกัดหอยทรายพิษต่ำ



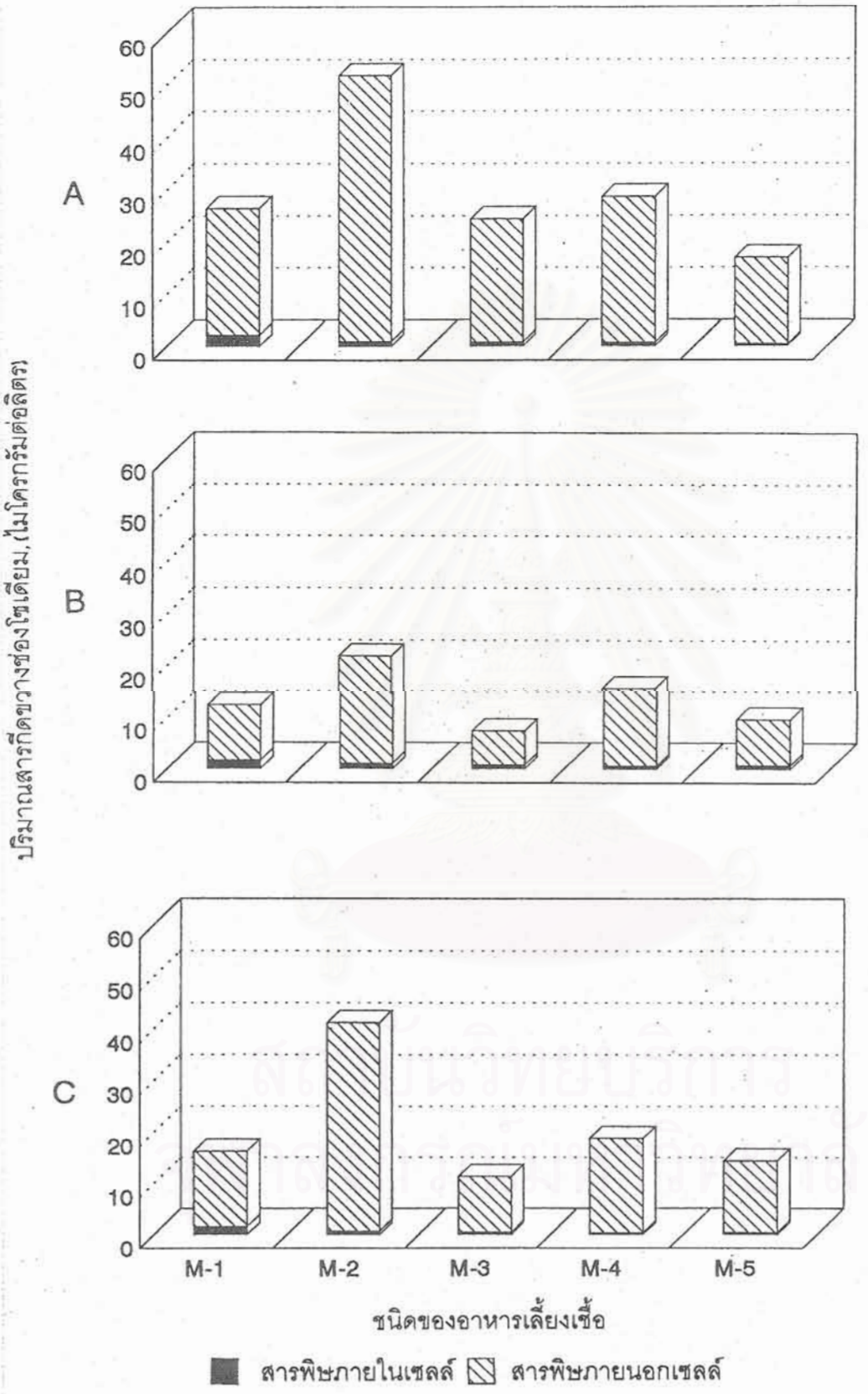
รูปที่ 1. การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูง



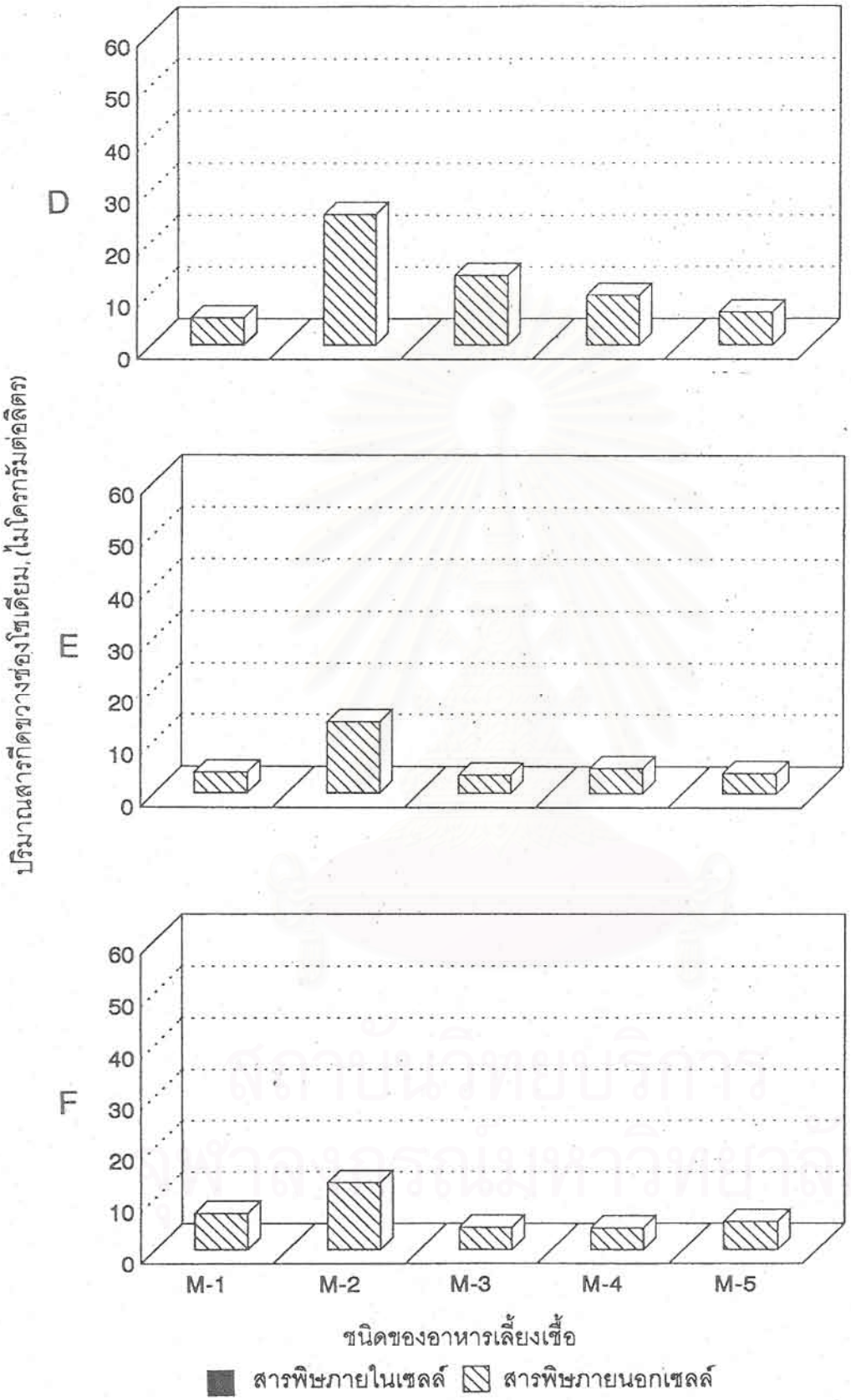
รูปที่ 2. การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษต่ำ



รูปที่ 3. การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษ

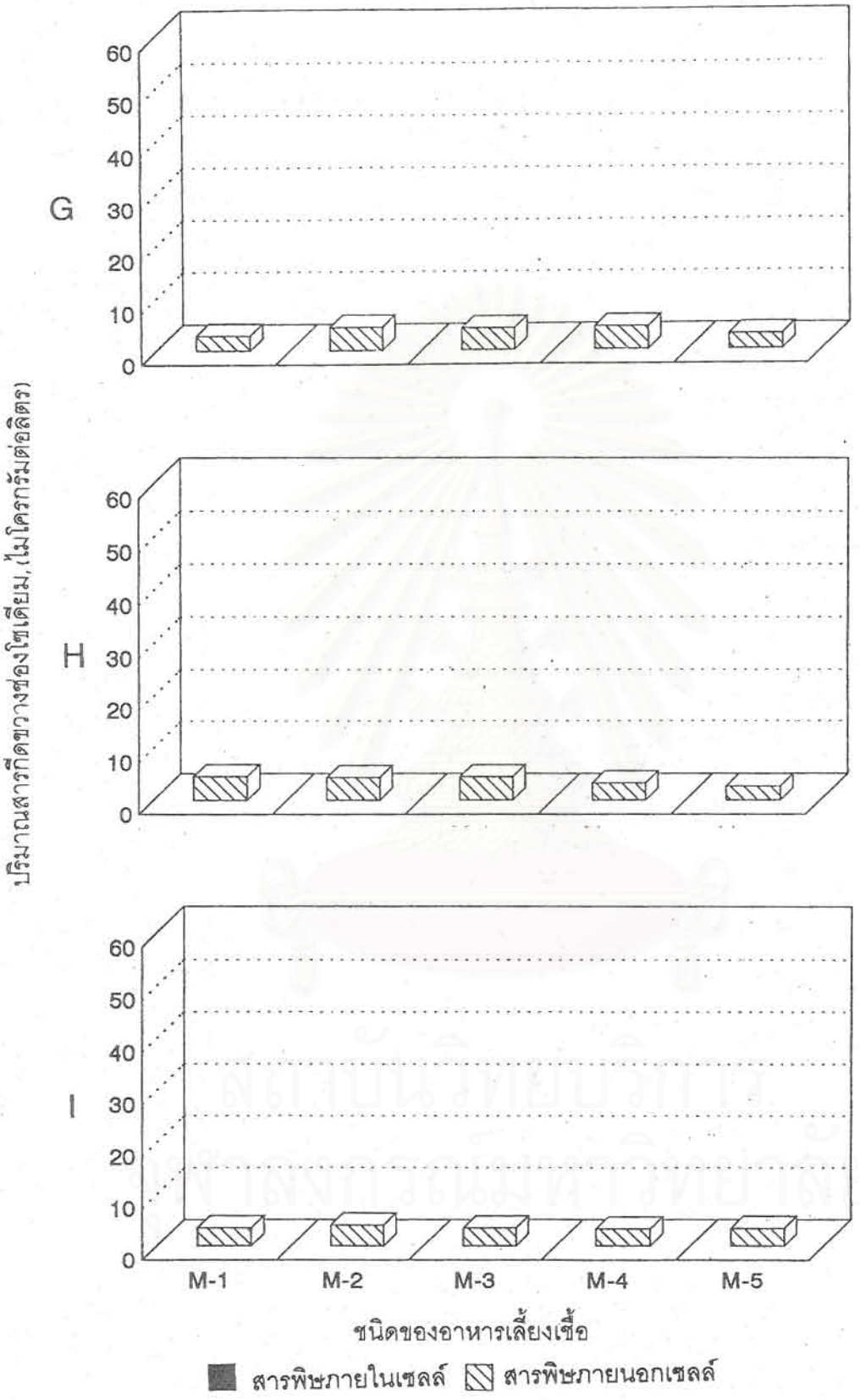


รูปที่ 4. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูง



รูปที่ 5. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษต่ำ

I19548848.



รูปที่ 6. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษ

การวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธี HPLC

1. จากการวิเคราะห์โดยการตรวจหาสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน

สารกีดขวางช่องโซเดียมที่พบภายในเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อนำมาวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน โดย HPLC พบว่า เชื้อแบคทีเรีย B และ C เมื่อเลี้ยงในน้ำสกัดหอยทรายพิษสูง สามารถสร้างสารพิษอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน รวมทั้ง D และ E ซึ่งอยู่ในกลุ่มสร้างพิษต่ำด้วย แต่ในกลุ่มไม่สร้างพิษจะตรวจไม่พบอนุพันธ์ใดเลย ดังแสดงในตารางที่ 4

ส่วนสารกีดขวางช่องโซเดียมที่พบภายนอกเซลล์ (ในอาหารเลี้ยงเชื้อ) ของแบคทีเรีย พบว่าในแบคทีเรีย B,C,E และ F พบสารอนุพันธุ์ในกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ส่วนสายพันธุ์อื่นไม่พบเลย ดังแสดงในตารางที่ 5

นอกจากนี้ได้แสดงตัวอย่างโครมาโตแกรมการวิเคราะห์ดังกล่าวข้างต้นในรูปที่ 7

2. จากการวิเคราะห์โดยการตรวจหาสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย

โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อตรวจหาสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย A และ D ใน L-medium จะพบสารในกลุ่มนี้เพียงเล็กน้อยภายนอกเซลล์ (ตารางที่ 6) แต่เมื่อนำเชื้อ A,D ไปเลี้ยงในน้ำสกัดหอยทรายที่อยู่ในระยะพิษสูงจะมีอนุพันธ์ในกลุ่ม STXs ซึ่งได้แก่ STX (saxitoxin), NSTX (neosaxitoxin) และ DSTX (decarbarmoylsaxitoxin) ส่วนในอนุพันธ์กลุ่ม GTXs พบบางอนุพันธ์เพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ในแบคทีเรีย G ก็พบอนุพันธ์ในกลุ่ม STXs ด้วย (ตารางที่ 7) ตัวอย่างโครมาโตแกรมการวิเคราะห์อนุพันธ์ STXs ดังแสดงในรูปที่ 8

ส่วนน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษต่ำ และน้ำสกัดหอยกระปุกและหอยรูปหัวใจ พบว่ามีอนุพันธ์ต่างๆกันออกไป ในแบคทีเรีย A และ D ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 8, 9, 10

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำสกัด

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำสกัดจากหอยสองฝา พบว่าในหอยทรายทั้งสองระยะ หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจ มีองค์ประกอบโปรตีนและไนโตรเจนใกล้เคียงกัน ส่วนหอยทรายระยะพิษต่ำมีคาร์โบไฮเดรทสูงกว่าชนิดอื่น หอยกระปุกมีไขมันต่ำที่สุด และพบฟอสเฟตในหอยทรายระยะพิษสูงมีปริมาณสูงกว่าหอยชนิดอื่นๆและหอยทรายพิษต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 11

และนอกจากนี้ปริมาณกรดอะมิโนบางชนิดในหอยทรายระยะพิษสูง พบว่ามีความแตกต่างจากหอยชนิดอื่นด้วย ดังแสดงในตารางที่ 12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ชนิดของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินที่พบภายในเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา

แบคทีเรีย	ชนิดของอนุพันธ์ TTXs ที่พบภายในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารแต่ละชนิด									
	อาหารเหลว		น้ำสกัดจากหอยมีพิษ				น้ำสกัดจากหอยไม่มีพิษ			
			หอยทราย,พิษสูง		หอยทราย,พิษต่ำ		หอยกระปุก		หอยรูปหัวใจ	
	TTX	anh-TTX	TTX	anh-TTX	TTX	anh-TTx	TTX	anh-TTX	TTX	anh-TTX
สร้างพิษสูง										
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
C	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
สร้างพิษต่ำ										
D	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
E	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ไม่สร้างพิษ										
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ชนิดของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินที่พบภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝา

แบคทีเรีย	ชนิดของอนุพันธ์ TTXs ที่พบภายนอกเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารแต่ละชนิด									
	อาหารเหลว		น้ำสกัดจากหอยมีพิษ				น้ำสกัดจากหอยไม่มีพิษ			
			หอยทราย,พิษสูง		หอยทราย,พิษต่ำ		หอยกระปุก		หอยรูปหัวใจ	
	TTX	anh-TTX	TTX	TTX	anh-TTX	TTX	TTX	anh-TTX	TTX	anh-TTX
สร้างพิษสูง										
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
สร้างพิษต่ำ										
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
ไม่สร้างพิษ										
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว

แบคทีเรีย	สาร	ชนิดของอนุพันธ์ PSPs ที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์											
	จาก	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
พิษสูง	ใน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	นอก	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
พิษต่ำ	ใน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	นอก	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

ตารางที่ 7 ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูง

แบคทีเรีย	สาร	ชนิดของอนุพันธ์ PSPs ที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์											
	จาก	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
พิษสูง	ใน	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
A	นอก	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
พิษต่ำ	ใน	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D	นอก	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ไม่มีพิษ	ใน	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	นอก	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

ตารางที่ ๘ ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษต่ำ

แบคทีเรีย	สาร	ชนิดของอนุพันธ์ PSPs ที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์											
	จาก	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
พิษสูง	ใน	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A	นอก	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
พิษต่ำ	ใน	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
D	นอก	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ ๙ ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยกระปุก

แบคทีเรีย	สาร	ชนิดของอนุพันธ์ PSPs ที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์											
	จาก	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
พิษสูง	ใน	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	นอก	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
พิษต่ำ	ใน	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
D	นอก	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

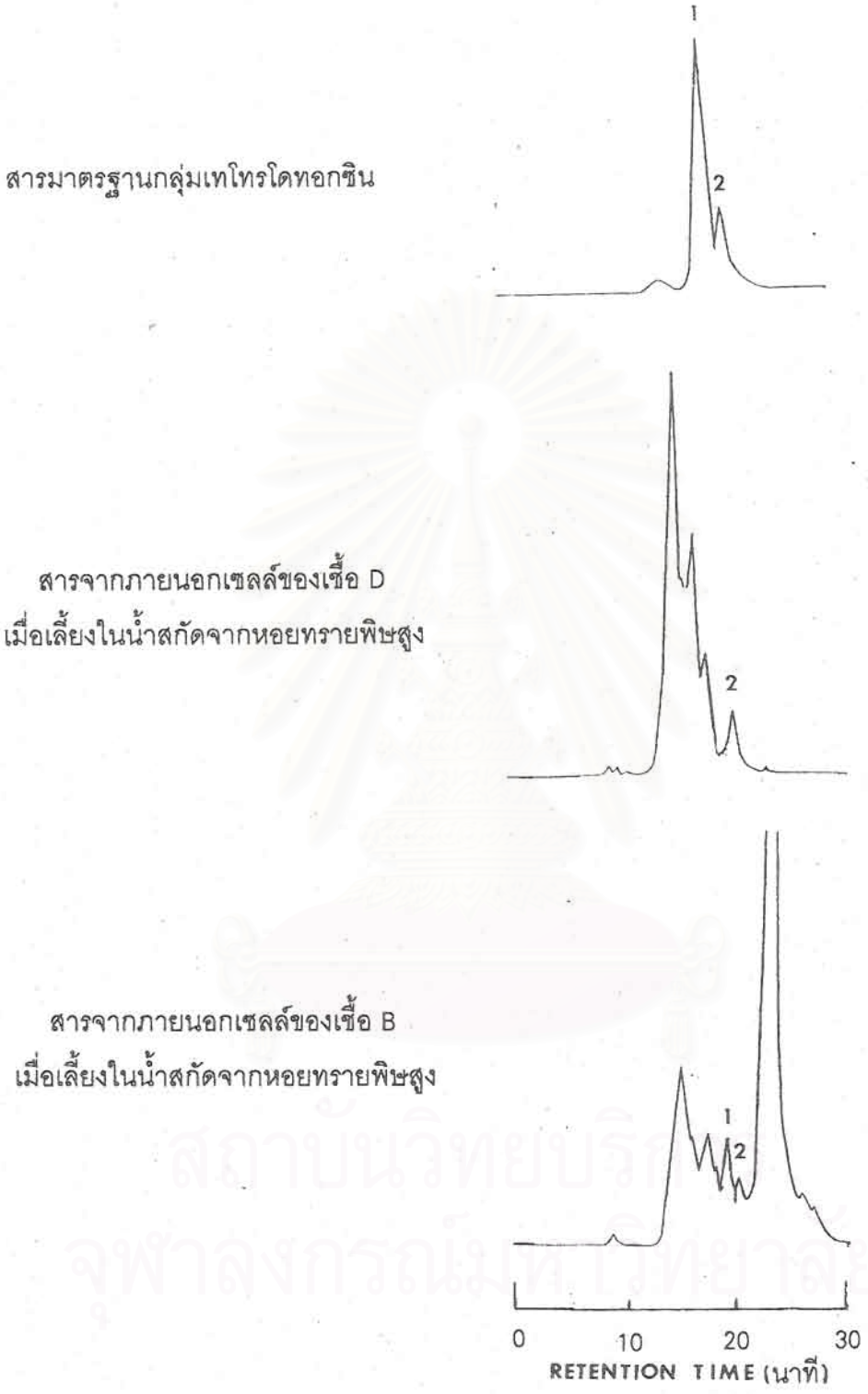
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10. ชนิดของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดจากหอยรูปหัวใจ

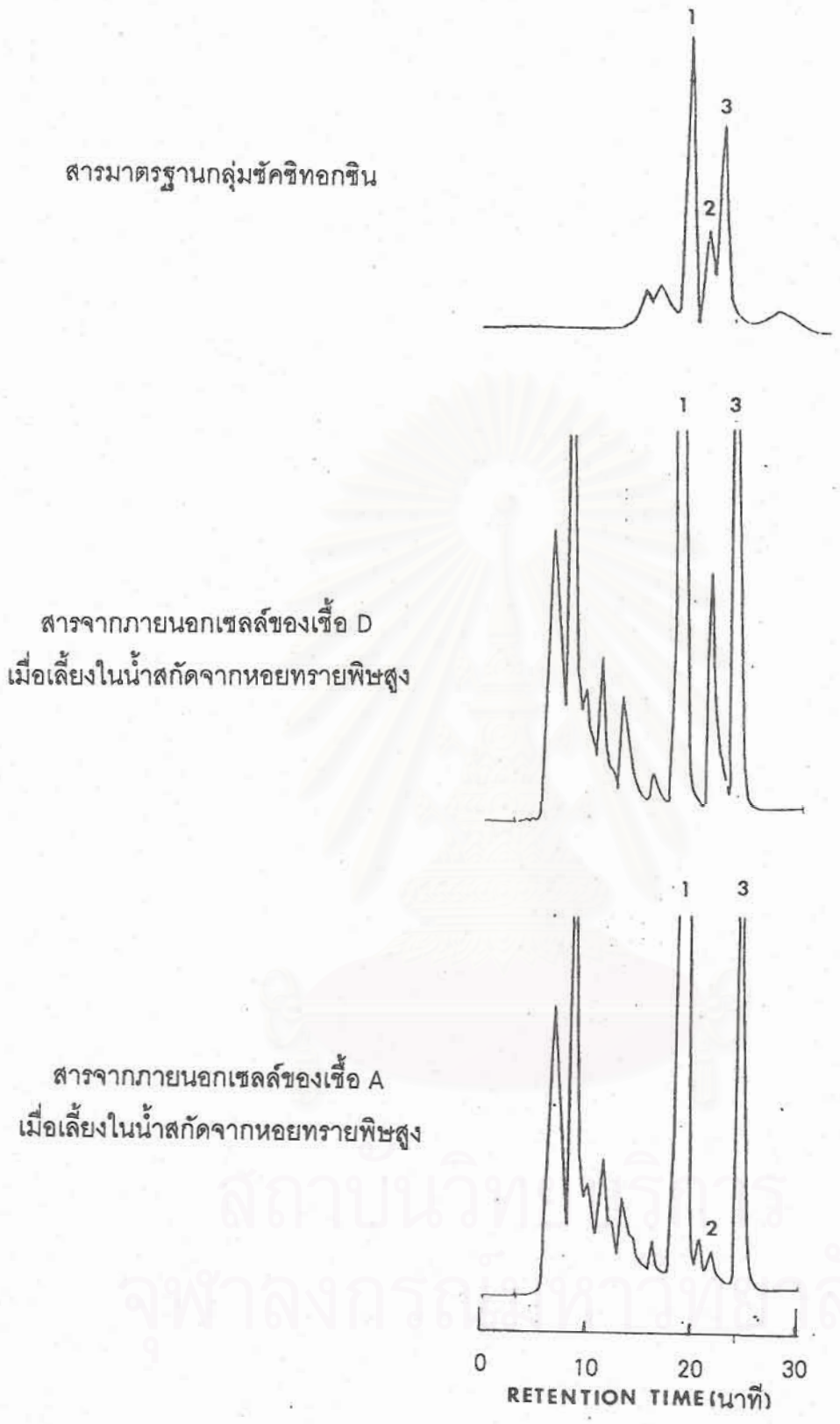
แบคทีเรีย	สาร	ชนิดของอนุพันธ์ PSPs ที่พบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์											
	จาก	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
พิษสูง	ใน	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
A	นอก	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
พิษต่ำ	ใน	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
D	นอก	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

ตารางที่ 11. ปริมาณโปรตีน ไนโตรเจน คาร์โบไฮเดรท ไขมัน และฟอสเฟตในน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิด

สารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำสกัดจากหอยสองฝา	ปริมาณสารในน้ำสกัดจากหอยสองฝา (กรัม/100 มล.)			
	หอยทรายระยะพิษสูง	หอยทรายระยะพิษต่ำ	หอยกระปุก	หอยรูปหัวใจ
โปรตีน	0.109	0.108	0.106	0.112
ไนโตรเจน	0.10	0.08	0.10	0.10
คาร์โบไฮเดรท	9.17×10^{-3}	9.92×10^{-2}	8.20×10^{-3}	7.92×10^{-3}
ไขมัน	0.323	0.458	0.168	0.378
ฟอสเฟต	8.40×10^{-3}	1.21×10^{-2}	1.11×10^{-2}	1.61×10^{-2}



รูปที่ 7. โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ เอช พี แอล ซี ของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน



รูปที่ 8. โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ เอช พี แอล ซี ของสารกลุ่มซัคซิทอกซิน

ตารางที่ 12. ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในน้ำสกัดจากหอยสองฝา

ชนิดของกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในน้ำสกัด (กรัมต่อน้ำสกัด 100 มล.)			
	หอยทราย, พิษสูง	หอยทราย, พิษต่ำ	หอยกระปุก	หอยรูปหัวใจ
กรดแอสพาติค	7.50×10^{-3}	1.48×10^{-2}	1.73×10^{-2}	1.01×10^{-2}
ทรีโอนีน	6.40×10^{-3}	7.70×10^{-3}	8.60×10^{-3}	5.80×10^{-3}
เซอรีน	3.20×10^{-3}	6.70×10^{-3}	5.80×10^{-3}	4.70×10^{-3}
กรดกลูตามิค	1.34×10^{-2}	2.11×10^{-2}	2.74×10^{-2}	1.49×10^{-2}
โพรลีน	trace	6.00×10^{-4}	trace	trace
ไกลซีน	9.00×10^{-3}	1.26×10^{-2}	2.34×10^{-2}	2.91×10^{-2}
อลานีน	3.40×10^{-3}	7.80×10^{-3}	1.50×10^{-2}	5.90×10^{-3}
วาลีน	5.20×10^{-3}	6.60×10^{-3}	8.00×10^{-3}	4.30×10^{-3}
ซีสทีน	1.80×10^{-3}	3.10×10^{-3}	3.80×10^{-3}	2.60×10^{-3}
เมทไธโอนีน	1.20×10^{-3}	2.80×10^{-3}	3.20×10^{-3}	1.00×10^{-3}
ไอโซลิวซีน	3.10×10^{-3}	5.40×10^{-3}	7.60×10^{-3}	3.60×10^{3}
ลิวซีน	4.50×10^{-3}	7.90×10^{-3}	1.09×10^{-2}	3.60×10^{-3}
ไทโรซีน	1.20×10^{-3}	2.90×10^{-3}	4.30×10^{-3}	1.30×10^{-3}
ฟีนิลอลานีน	2.00×10^{-3}	7.20×10^{-3}	7.40×10^{-3}	3.70×10^{-3}
ไลซีน	4.30×10^{-3}	7.90×10^{-3}	8.80×10^{-3}	3.30×10^{-3}
ฮีสทิดีน	1.00×10^{-3}	2.30×10^{-3}	1.70×10^{-3}	1.20×10^{-3}
อาร์จินีน	3.10×10^{-3}	5.40×10^{-3}	9.00×10^{-3}	2.10×10^{-3}

การอภิปรายผลและข้อสรุป

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองมี 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่สามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูง (A, B, C) กลุ่มที่สร้างสารนี้ได้ต่ำ (D, E, F) และกลุ่มที่ปรกติจะไม่สร้างสารพิษนี้เลย (G, H, I) โดยที่ตรวจสอบเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ คือ L-medium

จากผลการทดลองในตารางที่ 2 น้ำสกัดจากหอยทราย หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจ ซึ่งได้ทำการทดสอบพิษก่อนที่จะนำมาทำน้ำสกัด โดยที่ในช่วงเดือนมกราคมซึ่งเก็บตัวอย่างเป็นช่วงที่หอยทรายมีพิษสูง จะเห็นว่า หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจ รวมทั้งตัวอย่างทรายและน้ำทะเล ก็จะมีปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในระดับที่สูง กว่าตัวอย่างหอยและน้ำทะเลและทรายที่เก็บในเดือนตุลาคมซึ่งเป็นช่วงหอยทรายพิษต่ำ และนอกจากนี้ตัวอย่างทรายและน้ำทะเลที่ได้นำไปทำให้อนุภาคแตกโดย ultrasonication ก็จะมีปริมาณสารพิษนี้สูงด้วย แสดงว่าในสภาพแวดล้อมของหอยสองฝา ในช่วงเดือนมกราคมนั้น น่าจะมีอนุภาคที่มีสารพิษนี้อยู่ภายในปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก อนุภาคที่มีสารพิษนี้จึงเป็นผลให้หอยกระปุกและหอยรูปหัวใจ ซึ่งมีการกินอาหารแบบ filter feeding มีสารพิษปริมาณน้อยแต่สามารถตรวจสอบได้พบ ทั้งๆที่เป็นหอยสองฝาชนิดไม่มีพิษ แต่หอยทรายซึ่งปรกติเป็นหอยที่มีพิษเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกันนั้นจะมีปริมาณพิษสูงกว่าหอยอื่นๆ แสดงว่าหอยทรายจะได้รับผลจากอนุภาคนั้น ซึ่งอาจเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม เนื่องจาก Hamasaki และคณะ (1994) ได้รายงานว่าในน้ำทะเลมีอนุภาคที่มีพิษสะสมแขวนลอยอยู่ โดยอนุภาคนี้เกิดจากมูลสัตว์ทะเลขนาดเล็ก บางส่วนอาจจมอยู่ใต้ทะเลรวมกับดินตะกอนอื่นๆ และบนอนุภาคนี้อาจเป็นที่อยู่ของแบคทีเรีย

เมื่อนำแบคทีเรียแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงในอาหารเหลวและน้ำสกัดจากหอยสองฝาแต่ละชนิด พบว่าแบคทีเรียทุกกลุ่มมีการเจริญสูงสุดในอาหารเหลว L-medium เนื่องจากอาหารเหลวมีแหล่งของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญครบถ้วน ส่วนในน้ำสกัดจากหอยสองฝาจะมีการเจริญต่ำกว่า นอกจากนี้ในน้ำสกัดหอยรูปหัวใจมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตน้อย แต่ค่าความขุ่นของเซลล์ใกล้เคียงกับในน้ำสกัดจากหอยชนิดอื่น ทั้งนี้ส่วนประกอบในน้ำสกัดหอยรูปหัวใจอาจมีผลกับการเจริญของเซลล์ เนื่องจากแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดลองจะได้ผลเช่นเดียวกันหมด โดยที่เชื้อจะมีมวลเซลล์เพิ่มขึ้น แต่จำนวนเซลล์อาจไม่มีการเพิ่มจำนวน จากรายงานของ Kogure และคณะ (1979) พบว่ากรดนาลิดิซิค (nalidixic acid) มีผลต่อการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้การแบ่งเซลล์ลดลงแต่ใน

ขณะเดียวกันมวลเซลล์จะเพิ่มขึ้น จึงคาดว่า ถ้ามีสารใดที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับสารนี้ในน้ำสกัดหอยรูปหัวใจ ก็จะทำให้ผลการทดลองเป็นไปดังกล่าวข้าวต้น

จากผลการวิจัยนี้พบว่าการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียกลุ่มสร้างพิษสูง (A, B, C) และสร้างพิษต่ำ (D, E, F) ที่เลี้ยงในน้ำสกัดจากหอยทรายที่เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนมกราคม (ช่วงหอยมีพิษสูง) สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ปริมาณสูงกว่าที่เลี้ยงในน้ำสกัดชนิดอื่นและในอาหารเหลว โดยจะสร้างสารออกมาภายนอกเซลล์ได้สูง แต่แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะมีสารพิษอยู่ภายในเซลล์มากกว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในน้ำสกัด แต่อย่างไรก็ดีพบว่าผลรวมของสารพิษที่เซลล์สร้างขึ้นทั้งที่อยู่ภายในเซลล์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำสกัดหอยทรายในระยะพิษสูงจะมีปริมาณสูงสุด

ในการตรวจหาชนิดอนุพันธ์สารพิษเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำสกัดหอยทรายพิษสูง พบว่าสามารถตรวจพบอนุพันธ์ TTX และตรวจพบอนุพันธ์ในกลุ่ม STXs คือ STX, NSTX และ DSTX โดยเฉพาะภายนอกเซลล์แบคทีเรียพบอนุพันธ์นี้มีปริมาณสูงมาก (การตรวจวิเคราะห์กลุ่ม STXs และ GTXs ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Masaaki Kodama แห่ง Kitasato University ประเทศญี่ปุ่น) สารพิษอนุพันธ์นี้เป็นกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษสูงมาก ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าน้ำสกัดจากหอยทรายระยะพิษสูงมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการสร้างอนุพันธ์กลุ่ม TTXs และกลุ่ม STXs ได้มากขึ้นกว่าองค์ประกอบชนิดอื่น

ส่วนแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างพิษ (G, H, I) ตรวจพบสารกีดขวางช่องโซเดียมได้เฉพาะภายนอกเซลล์และในปริมาณต่ำมาก ซึ่งผลที่ได้ไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่าเป็นสารที่สร้างจากแบคทีเรียนี้ เคยมีรายงานว่า *E. coli* สามารถสร้างสารพิษชนิดนี้ได้ (Hashimoto *et. al.*,1990) ซึ่งถ้าเป็นจริงแสดงว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้อาจถูกกระตุ้นให้สร้างสารพิษได้ แต่เมื่อสร้างแล้วจะไม่เก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ จะปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ทั้งหมด ดังนั้นจึงตรวจพบปริมาณเล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อภายนอกเซลล์

สรุปได้ว่าน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูงมีสารบางชนิดที่มีผลไปส่งเสริมให้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษอยู่แล้วมีความสามารถสร้างสารพิษได้สูงขึ้น แต่ไม่มีผลกับแบคทีเรียที่ไม่มีความสามารถสร้างสารพิษ น้ำสกัดหอยทรายพิษต่ำและน้ำสกัดหอยสองฝาชนิดอื่นจะไม่พบสารที่ผลดังกล่าวนี้

เอกสารอ้างอิง

กาญจณา จันทองจีน และ ทวีศักดิ์ ปิยะกายจน์. (2534) แบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในหอยทรายมีพิษที่เก็บจากบริเวณเกาะสีชัง. รายงานผลทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ, 1-29 หน้า.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis: Association of Official Analytical Chemists. In K.. Helrich (ed.), Virginia, USA. pp.1298.

Do, H.K., Kogure, K., and Simidu, U. (1990). Identification of deep-sea sediment bacteria which produced tetrodotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1162-1163.

Gallacher, S.,and Birkbeck, T.H. 1993. Effect of Phosphate concentration on production of tetrodotoxin by *Alteromonas tetraodonis*. Appl. Environ.Microbiol. 59(11):3981-3983.

Ghazarossian, V.E., Schant, E.J.,Schoes, H.K., and Strong, F.M. (1974). Identification of poison in toxic Scallops from *Gonylulax tamarensis* red tide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 59: 1219.

Hamasaki, K.,Kogure, K., Noguchi,T.,Shida, Y., and Ohwada, K. 1994. Tetrodotoxin in sinking particles from coastal waters. Marine Biology. 118: 761-765

Junthongjin, 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

_____.,Piyakarnchana,T., Kodama, M., Ohwada, K., and Simidu, U. 1995 Toxins similar to PSP and TTXs produced by bacteria associated with sand clam (*Asaphis violascens*) in the Gulf of Thailand. J. Mar. Biotechnol. 3:268-273

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. 479: 1-13

Kodama, M., Okata, T., Sato, S., and Sakamoto, S. (1990) Possible association of marine bacteria with paralyti shellfish toxicity of bivalves. Marine Ecology Progess Series. 61: 203-206

Kogure, K., Simidu, U., and Taga, N. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can. J. Microbiol. 25: 415-420

.,Tamplin, M. L., Simidu, U., and Colwell, R.R. (1989) A tissue culture assay for tetrodotoxins, saxitoxins and related toxins. Toxicon. 26: 191-197

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275

McLaren, J.W., Berman, S.S., Boyko, V.J., and Russel, D.S. 1981. Simultaneous determination of major, minor, and trace plasma atomic emission spectrometry. Anal. Chem. 53: 1802-1806

Oshima, Y., Sugino, K., and Yasumoto, T. (1989) Lastest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. In S. Natori, K., Hashimoto, and Y. Ueno (eds), Mycotoxins and Phycotoxin 88. pp. 319-326. Amsterdam : Elsevier.

Saitanu, K., Wisessang, S.,Yongvanich, T., Piyakarnchana, T., Ogata, T., Sato, S., and Kodama,M. (1992) Occurrence of toxins similar to paralytic shellfish toxins and tetrodotoxins in green mussel (*Perna viridae*) and Sand clam (*Asaphis violascens*) which are not associated with toxic dinoflagellates. P. Gopalakrishnakorn and C.K. Tan (eds.), Recent advance in Toxicology Research pp. 486-493. Venom and Toxin Research Group, National University of Singapore, Singapore.

Scott, T.A., and Melvin,E.H. 1953. Determination of dextran with anthrone. Anal. Chem. 25: 1656-1661

Shimizu,Y., Gupta, S., Norte, M., Hori, A., Genenah, A., and Kobayashi, M. 1985. Biosynthesis of paralytic shellfish toxins. In D.M. Anderson, A.W. White, and D.G. Baden (eds.) Toxic Dinoflagellate. New York, Elsevier : pp 271-274

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

Spackman, D.H., Stein,W.H., and Moore, S. 1958 Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30:1990

Tsuda, K., Ikuma, S., Kawamura, M., Tachikawa, R., Sakai, K., Tamura, C., and Amakasu, O. (1964) Tetrodotoxin VII : On the structure of tetrodotoxin and its derivatives. Chem. Pharm. Bull. 12(11) : 1357-1374

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

Yotsu, M., Yamasaki, T., Meguro, Y., Endo, A., Murata, M., Naoki, M., and Yasumoto, T. (1987) Production of tetrodotoxin and its derivatives by *Pseudomonas* sp. isolated from the skin of puffer fish. Toxicon. 25 : 225-228

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย