

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการใช้การทดสอบกับเนื้อเยื่อเพื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรีย และหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสร้างสารกึ่งขวางช่องโซเดียมภายในเซลล์ได้สูงสุด พบว่าเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากหอยทราวยมีความสามารถในการสร้างสารกึ่งขวางช่องโซเดียมได้สูงสุดเท่ากับ 3.2564 ไมโครกรัมต่ออาหารเหลว 1 ลิตร ภายในเซลล์ภายในเวลา 24 ชม. ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อที่มีการเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งจากการตรวจสอบยืนยันขั้นต่อมาพบว่าสารกึ่งขวางช่องโซเดียมนั้นอาจเป็นอนุพันธ์เทโทรโดทอกซินหรืออนุพันธ์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับเทโทรโดทอกซิน (tetrodotoxin-like) เนื่องจากการตรวจสอบโดยวิธีลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสเปปโตเมตรีพบพีคที่ 320 และ 301 (M+1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Narita และคณะ (1987) ที่พบว่า *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของดาวทะเลมีความสามารถในการสร้างสารกึ่งขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน ในขณะที่ *C. matruchoyii* ที่แยกได้จากหอยกระปุกไม่พบการสร้างสารกึ่งขวางช่องโซเดียม

ในการทดสอบดูความเป็นพิษของเนื้อหอยทราวยทั้งในระยะพิษสูงและพิษต่ำพบความเป็นพิษในระยะพิษสูงเท่านั้น ส่วนในระยะพิษต่ำไม่สามารถตรวจสอบความเป็นพิษ ถึงแม้ว่าในระยะพิษสูงจะมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวหอยใกล้เคียงกับในระยะพิษต่ำก็ตาม แต่แบคทีเรียที่ตรวจพบทั้งหมดไม่ได้เป็นแบคทีเรียสร้างพิษทั้งสิ้น จากการศึกษาของ Juntongjin และคณะ (1996) พบว่าในระยะหอยทราวยพิษสูงจะพบแบคทีเรียสร้างพิษในหอยปริมาณสูง ส่วนในระยะหอยทราวยพิษต่ำจะพบแบคทีเรียดังกล่าวน้อยลงอย่างชัดเจนแหล่งกำเนิดของสารกึ่งขวางช่องโซเดียมในกลุ่มเทโทรโดทอกซินนี้ในสัตว์ยังคงพิศุจน์กันไม่ได้ว่าสารพิษนี้ถูกสร้างขึ้นได้อย่างไร หรือถูกชักนำให้มีการผลิตได้อย่างไร แต่อาจเป็นไปได้ว่าสารพิษนี้จะเกิดจากแหล่งภายนอกเนื่องจากมีผู้ศึกษาถึงแบคทีเรียที่แยกได้ในสัตว์พิษหลายชนิดที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษนี้โดยเฉพาะแบคทีเรียจากทะเล โดยสัตว์ที่มีการสะสมสารพิษนี้อาจมีการสะสมสารพิษหรือสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียง (related substances) ที่ถูกผลิตขึ้นโดยแบคทีเรีย และจากสมมุติฐานที่ว่าแบคทีเรียสร้างพิษที่เข้าไปในตัวสัตว์จะทำให้สัตว์ที่มีพิษอยู่แล้วสร้างพิษได้สูงขึ้น หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ที่มีพิษต่ำให้เป็นอนุพันธ์ที่มีพิษสูงขึ้น จึงได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียสร้างพิษกับสัตว์มีพิษโดยการเลี้ยง

หอยทรายด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 2 กลุ่มคือกลุ่มอาหารที่มีพิษได้แก่แบคทีเรียสร้างพิษ และแบคทีเรียสร้างพิษผสมกับสาหร่ายไม่สร้างพิษเปรียบเทียบกับกลุ่มอาหารไม่มีพิษได้แก่แบคทีเรียไม่สร้างพิษ, สาหร่ายไม่สร้างพิษ และชุดควบคุมคือไม่มีการให้อาหาร จากการทดลองพบว่าในระยะพิษสูงภายหลังจากการนำหอยลงไปแช่ในน้ำทะเลปราศจากเชื้อโดยไม่ให้อาหารเพื่อถ่ายเทอาหารเดิมในกระเพาะอาหารและแบคทีเรียที่สะสมอยู่ในตัวหอย ทำให้ระดับความเป็นพิษในเนื้อหอยทรายระยะพิษสูงลดลงจากการตรวจโดยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อ แต่ภายหลังจากให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษแล้วจะทำให้ระดับความเป็นพิษเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับระดับพิษสูงในธรรมชาติแต่จะลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังจากที่ไม่มีการให้อาหารอย่างต่อเนื่อง ส่วนกลุ่มที่ให้อาหารที่ไม่มีพิษระดับความเป็นพิษจะไม่เพิ่มขึ้นแต่จะลดลงอย่างช้า ๆ จนถึงวันที่ 3 ของการทดลองและจะเริ่มคงที่ไปจนจบการทดลอง ส่วนในระยะพิษต่ำซึ่งหอยทรายก่อนการทดลองเป็นหอยทรายที่ไม่สามารถตรวจความเป็นพิษได้แต่จะสามารถตรวจพบพิษขึ้นภายหลังจากให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษแต่พิษนี้จะลดลงภายหลังเช่นเดียวกับในระยะพิษสูง

เมื่อทำการเปรียบเทียบการสร้างสารกึ่งกลางของโซเดียมของหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) และการวิเคราะห์เปรียบเทียบภายหลัง (Duncan's multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติเท่ากับ 99% ($P < 0.01$) (ภาคผนวก ค ข้อ 8) แล้วพบว่าหอยในกลุ่มเดียวกัน คือกลุ่มที่ได้รับอาหารมีพิษได้แก่แบคทีเรียสร้างพิษและแบคทีเรียสร้างพิษผสมกับสาหร่ายไม่สร้างพิษความเป็นพิษจะไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกับในกลุ่มที่ให้อาหารที่ไม่มีพิษได้แก่แบคทีเรียไม่สร้างพิษ, สาหร่ายไม่สร้างพิษ และชุดควบคุมคือไม่มีการให้อาหารก็ไม่พบความแตกต่างแต่จะพบความแตกต่างของระดับความเป็นพิษอย่างมีนัยสำคัญระหว่างอาหารทั้งสองกลุ่มคืออาหารกลุ่มที่มีพิษและกลุ่มที่ไม่มีพิษเช่นเดียวกันทั้งในระยะพิษสูง และระยะพิษต่ำ

จากผลการทดลองแสดงว่าหอยทรายที่มีพิษเพิ่มขึ้นนั้นเกิดจากการได้รับอาหารที่มีพิษคือแบคทีเรียสร้างพิษและสารพิษที่เพิ่มขึ้นสูงสุดนั้นจะพบในช่วงวันที่ 2 หลังจากได้รับแบคทีเรีย นั้นแสดงว่าการสะสมพิษในหอยทรายส่วนกระเพาะอาหารจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังจากได้รับอาหารที่มีพิษและการลดลงของสารพิษภายหลังจากการให้อาหาร (วันที่ 4-8) แสดงให้เห็นว่าการให้อาหารอย่างต่อเนื่องและมากพอจะทำให้ระดับสารพิษภายในตัวหอยสูงและคงที่อยู่ตลอดการทดลองได้ มีรายงานของ Wissesang และคณะ (1991) พบว่าหอยแมลงภู่สามารถสะสมสารพิษได้ภายหลังจากให้อาหารด้วย *A. cohorticula* ซึ่งเป็นไดโนแฟลกเจลเลตสร้างพิษและพิษจะเพิ่มขึ้นทุกวันของการทดลองเมื่อมีการให้อาหารที่มีพิษอย่างต่อเนื่องตลอด

การทดลองแสดงให้เห็นว่า *A. coarctata* เป็นสาเหตุให้หอยแมลงภู่เกิดพิษเมื่อมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (bloom) ในสิ่งแวดล้อม แต่ในระยะหอยทรายพิษสูงถึงแม้จะทำการทดลองเลี้ยงหอยทรายเป็นเวลานานโดยไม่มีการให้อาหารอย่างต่อเนื่องจะพบว่าระดับสารพิษจะยังคงที่ไปจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีสารพิษอยู่ 2 ชนิดคือชนิดที่ถูกชะล้างออกไปได้หลังจากการไม่ได้รับอาหารที่มีพิษนั้นคือสารนั้นจะอยู่ภายในส่วนกระเพาะอาหารนั่นเอง และชนิดที่สามารถสะสมอยู่ตามอวัยวะอื่นๆ ในร่างกายของหอยได้เป็นระยะเวลาที่ไม่สามารถ ถูกชะล้างออกไปได้ ได้มีรายงานของ Boyer และคณะ (1985) ที่ทำการทดลองให้อาหาร copepod *Tigriopus californicus* ด้วยไดโนแฟลกเจลเลตสร้างพิษ *A. catenella* ซึ่งพบว่าจะมีการสะสมสารพิษได้อย่างรวดเร็ว และจะลดลงภายหลังที่ไม่มีการให้อาหารอย่างต่อเนื่อง ซึ่งแตกต่างกับในธรรมชาติที่สัตว์จะได้รับอาหารจากสิ่งแวดล้อมภายนอกอยู่ตลอดเวลาจึงทำให้มีพิษสูงอยู่ได้นาน และถ้าในสิ่งแวดล้อมมีจำนวนแบคทีเรียสร้างพิษน้อยลงก็ทำให้พิษในหอยลดลงด้วย

ในการตรวจสอบอนุพันธ์ของสารพิษที่เกิดขึ้นในหอยทรายภายหลังการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่าหอยทรายก่อนและหลังการให้อาหารด้วย (แบคทีเรียสร้างพิษนั้นมีระยะทางการเคลื่อนที่ในตัวพาได้แตกต่างกันต่อมาเมื่อทำการทดสอบสารสกัดจากเนื้อหอยทรายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษด้วยวิธีเฮกซ์ พี แอล ซี พบว่าตรวจพบอนุพันธ์ GTX2 และอนุพันธ์ C1 และมีพีคที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับพีคของสารมาตรฐานในกลุ่มอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน ซึ่งเบญจภรณ์ (2538) ตรวจสอบหอยทรายในระยะพิษสูงพบว่าอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน และแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซินแสดงว่าอนุพันธ์ของสารพิษที่เกิดขึ้นหลังจากการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษนั้นแตกต่างจากก่อนการให้อาหาร และจากการวิเคราะห์โดยวิธีเฮกซ์ พี แอล ซี พบว่ามีพีคที่มีขนาดใหญ่และใกล้เคียงกับพีคของสารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน จึงทำการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารพิษที่เกิดขึ้นโดยวิธีลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีต่อไป จากสเปกตรัมที่ได้พบว่าตรวจพบพีคที่ 301 (M+H) ในปริมาณสูงซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกับที่ตรวจพบในแบคทีเรียสร้างพิษที่ใช้เป็นอาหารซึ่งสารนี้น่าจะเกิดขึ้นจากแบคทีเรียที่ให้เป็นอาหาร โดยที่อาจมีปัจจัยร่วมบางประการระหว่างแบคทีเรียสร้างพิษกับหอยทรายที่ทำให้หอยทรายสามารถสะสมสารพิษน้ำหนักโมเลกุล 300 ดาลตัน (M) หลังจากได้รับแบคทีเรียสร้างพิษที่ตรวจพบอนุพันธ์นี้เช่นกัน โดยมีรายงานของเบญจภรณ์ (2538) ที่ทำการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษสูงมีสาร

บางชนิดที่มีผลไปส่งเสริมให้แบคทีเรียสร้างพิษสร้างพิษได้สูงขึ้น แต่จะไม่พบสารนี้ในน้ำสกัดจากหอยทรายในระยะพิษต่ำ

ดังนั้นพิษในหอยทรายจึงอาจเกิดมาจากสองส่วนคือส่วนที่อยู่ในกระเพาะอาหารซึ่งสามารถชะล้างออกไปได้ซึ่งควรจะเป็นเซลล์ของแบคทีเรียนั่นเอง พิษส่วนนี้จะเป็นส่วนใหญ่ของพิษทั้งหมด และยังมีพิษส่วนที่ชะล้างไม่ออกซึ่งเป็นส่วนที่กระจายไปตามอวัยวะต่าง ๆ ของหอยพิษส่วนนี้น่าจะเป็นส่วนที่มีการสะสม และอาจมีอนุพันธุ์ที่แตกต่างไปจากอนุพันธุ์ที่ตรวจพบในแบคทีเรียเนื่องจากอาจมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นโดยตัวหอยเอง

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบปริมาณของกรดอะมิโนในแบคทีเรียพิษสูง และแบคทีเรียพิษต่ำที่ใช้เป็นอาหารของหอยทราย เนื่องจากมีรายงานว่ากรดอะมิโนบางชนิดเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุพันธ์ซัคซิโทกซิน และนีโอซัคซิโทกซิน เช่น อาร์จินีน, ไกลซีน และเซอริน เป็นต้น (Shimizu et al., 1985) จากการทดลองพบว่าปริมาณของกรดแอสพาทิก ทรีโอนีน และฮีสทิดีน มีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อ *V. alginolyticus* สายพันธุ์ที่สร้างพิษกับเชื้อ *C. matruchoii* ที่ตรวจไม่พบการสร้างพิษซึ่งเป็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติเท่ากับ 95% ($P < 0.05$) ดังนั้นกรดอะมิโนทั้งสามชนิดนี้อาจเป็นปัจจัยอีกอย่างหนึ่งในการควบคุมการสังเคราะห์สารพิษแต่ต้องมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสารพิษประกอบไปด้วย

แหล่งกำเนิดหรือสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารเทโทรโดทอกซินในสัตว์นั้นยังคงพิสูจน์ไม่ได้ว่าถูกสร้างขึ้นมาได้อย่างไรหรือถูกชักนำด้วยสารใด แต่อาจเป็นไปได้ที่สารพิษนี้จะเกิดขึ้นจากแหล่งภายนอกเนื่องมาจากการกินอาหาร หรือผ่านทางห่วงโซ่อาหารเนื่องจากมีรายงานการพบแบคทีเรียสร้างพิษในสัตว์มีพิษหลายชนิดงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสร้างพิษนั้นมีความสามารถในการทำให้หอยในระยะพิษต่ำนั้นเกิดพิษขึ้นได้ภายหลังการกินแบคทีเรียสร้างพิษ ซึ่งแบคทีเรียไม่สร้างพิษจะไม่มีความสามารถดังกล่าวส่วนในหอยทรายระยะพิษสูงนั้นแบคทีเรียสร้างพิษไม่สามารถทำให้ระดับความเป็นพิษสูงขึ้น แต่พบว่าแบคทีเรียสร้างพิษนั้นจะสามารถทำให้พิษสะสมในตัวหอยได้ในระดับหนึ่งซึ่งอาจเป็นพิษส่วนที่กระจายไปตามอวัยวะต่างๆ หลังจากการย่อยที่กระเพาะอาหาร ส่วนพิษที่สะสมอยู่ในกระเพาะอาหารจะเป็นส่วนที่สามารถถูกชะล้างออกไปได้ ถ้าไม่มีการได้รับสารพิษจากแหล่งภายนอกอย่างต่อเนื่อง ส่วนในหอยที่ไม่มีพิษที่อาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกันและได้รับแบคทีเรียสร้างพิษเช่นกันแต่ไม่มีการสะสมสารพิษอาจเนื่องจากในหอยไม่มีพิษจะไม่มีกลไกที่ทำให้เกิดพิษจึงไม่มี

การสะสมแบคทีเรียสร้างพิษและไม่มีปัจจัยที่จะส่งเสริมระดับความเป็นพิษได้ ดังนั้นแบคทีเรียสร้างพิษจึงน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เกิดพิษในสัตว์ทะเล

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาถึงผลของแบคทีเรียสร้างพิษ ต่อการเกิดพิษในหอยทราย จากผลการวิจัยพบว่าแบคทีเรียสร้างพิษที่อยู่ในหอยทรายทำให้เกิดพิษในหอยทรายโดยตรง โดยหอยทรายจะได้รับแบคทีเรียสร้างพิษจากการกินอาหารโดยผ่านทางห่วงโซ่อาหาร ซึ่งเป็นการได้รับจากแหล่งภายนอก (exogenous) นอกจากนั้นการเปลี่ยนแปลงอนุพันธุสารพิษในเนื้อหอยทรายอันเนื่องมาจากหอยทรายมีผลทำให้แบคทีเรียสร้างพิษในตัวหอยทรายสร้างสารที่มีระดับพิษสูงขึ้น หรือแบคทีเรียสร้างพิษอาจมีผลทำให้หอยทรายที่มีพิษอยู่แล้วมีพิษสูงขึ้น ซึ่งควรทำการศึกษาการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียสร้างพิษกับหอยทรายแบบ symbiosis ต่อไป