หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปริมาณเชื้อ Marine Vibrios ในธรรมชาติ จากตัวอย่างที่ทำการศึกษาจะแตกต่างกัน และ เมื่อ เรียงลำดับจากปริมาณสูงสุดไปจนถึงปริมาณต่ำสุดได้ดังนี้ คือ ตัวอย่างปลาทรายขาว, หอยแมลงภู่, ดิน, น้ำ และ หอยนางรม ตามลำดับ โดยจะมีปริมาณ 4.6×10^5 colony/g., 1.4×10^5 colony/g., 4.3×10^4 colony/g. 3.0×10^4 colony/ml, และ 4.1×10^3 colony/g.

จากผลการศึกษา แสดงให้เห็นว่า เชื้อ Marine Vibrios มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในธรรมชาติ

ในการศึกษาครั้งนี้ ปรากฏว่า ปริมาณเชื้อ Marine Vibrios ในดิน และ น้ำ มีปริมาณต่างกันเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพบปริมาณเชื้อ Vibrios ในน้ำมีปริมาณสูงในกลุ่ม Vp และ MV-2 คือ 1.3×10^5 colony/ml. และ 5.0×10^4 colony/ml. ตามลำดับ ในเดือนกันยายน 2528 บริเวณสถานี L_2 ซึ่งเป็นระยะที่อยู่ใน ช่วงฤดูฝนซึ่งจะมีคลื่นลมแรงจึงพัดพาเอาดินตะกอนมาปะปนรวมกับมวลน้ำจึงทำให้ปริมาณเชื้อสูงกว่าความเป็นจริง

ในตัวอย่างหอยแมลงภู่บริเวณสถานี L_3 ก็เช่นกัน พบว่ามีปริมาณเชื้อ Marine Vibrios ในกลุ่ม Vp สูงถึง 3.12×10^5 colony/g. ในช่วงเดือนกันยายน ก็อาจเนื่องมาจากสาเหตุเดียวกันกับที่พบเชื้อในกลุ่ม Vp และ MV-2 ในปริมาณสูงจากตัวอย่างน้ำข้างต้น

Oliver et al.(1983) รายงานว่า เชื้อ Vibrios จะมีปริมาณสูงในช่วงฤดูร้อน สำหรับ ผลการศึกษานี้ สอดคล้องกับ การศึกษาของ เกรียงศักดิ์ และ คณะ (2524) ที่รายงานว่า พบเชื้อ Marine Vibrios (ยกเว้น V. parahaemolyticus) ในดิน มากกว่าในน้ำ ส่วนในกลุ่ม V. parahaemolyticus นั้น El-Sahn et al.(1982) รายงานว่า พบเชื้อนี้ใน Invertebrates มากกว่าดิน และน้ำ ซึ่งจากการวิจัย พบว่า V. parahaemolyticus จะมีปริมาณ

มากในหอยแมลงภู่ แต่จะพบปริมาณต่ำ ในหอยนางรม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Thompson (1976) ที่รายงานว่า ปริมาณ V. parahaemolyticus ในตะกอนดิน มีมากกว่า ในหอยนางรม จากอ่าว Galveston

จากการศึกษาแยกเชื้อ Vibrios จากธรรมชาติ โดยใช้ selective media คือ TCBS จะพบลักษณะ colony ที่แตกต่างกัน ซึ่งจำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม ที่มีลักษณะ colony เป็น Vp , MV-1, MV-2, MV-3 และ MV-4 และ เมื่อพิจารณาลักษณะในการ ferment sucrose ของเชื้อ Vibrios บน TCBS พบว่า เชื้อ Vibrios สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่ไม่สามารถ ferment sucrose(sucrose-negative Vibrios) ให้ colony สีเขียวบน TCBS ประกอบด้วย กลุ่ม Vp และ MV-4
2. กลุ่มที่สามารถ ferment sucrose(sucrose-positive Vibrios) ให้ colony สีเหลืองบน TCBS ประกอบด้วย MV-1, MV-2 และ MV-3

ผลการศึกษาพบเชื้อที่มีลักษณะเป็น sucrose-negative Vibriosสูงใน น้ำ และ หอยแมงภู่ คือ 73.3% และ 69.7% ตามลำดับ ในขณะที่ sucrose-positive Vibrios จะมีปริมาณสูงใน ดิน หอยนางรม และ ปลาทรายขาว เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Oliver (1983) ที่รายงานว่า พบ sucrose-negative Vibriosในน้ำ, ดิน, หอยนางรม และ ปลา ในปริมาณ 51.6%,41%, 40% และ 69% ตามลำดับ ซึ่งผลการวิจัยนี้ ไม่สอดคล้องกับการรายงาน ดังกล่าวมากนัก แต่ก็แสดงให้เห็นว่า เชื้อในกลุ่ม sucrose-positive Vibrios มีปริมาณมากกว่า sucrose-negative Vibrios ในบริเวณอ่าวไทยตอนใน

การวิเคราะห์ทาง Numerical Taxonomy

Cluster A

เชื้อ Vibrios ใน Cluster A มีลักษณะ colony บน TCBS เป็นกลุ่ม MV-1 คือ สามารถ ferment sucrose ให้ colony สีเหลือง ขนาดใหญ่บน TCBS มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-6 มม. ลักษณะ mucoid ซึ่งลักษณะดังกล่าวตรงกับการรายงานของ Larsen et al. (1981)

ลักษณะสำคัญของเชื้อ Vibrios ใน Cluster นี้ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 10 และ เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะต่างๆของเชื้อ Vibrios เหล่านี้ ปรากฏว่า มีลักษณะต่างๆตรงกันกับลักษณะของเชื้อ V. alginolyticus ดังที่ West & Colwell(1984)และ Baumann et al. (1984) รายงาน

จากการศึกษา Numerical Taxonomy ปรากฏว่าเชื้อ Vibrios ใน ClusterA จำนวน 23 strains จะเข้ารวมเป็นกลุ่มเดียวกันที่ระดับ 76 % โดยมีลักษณะที่สำคัญของเชื้อ V. alginolyticus ใน Cluster นี้ คือ

1. เชื้อ V. alginolyticus สามารถ swarm ได้บน solid media คือ 3% NA และ MA ซึ่งตรงกับการรายงานของ Larsen et al.(1981) ที่รายงานว่าเชื้อนี้สามารถ swarm ได้บน solid media หลายชนิด
2. เชื้อ V. alginolyticus สามารถทนเกลือได้ที่ 10% NaCl ซึ่งสอดคล้องกันกับการศึกษาของ Larsen et al.(1981), West & Colwell (1984) และ Baumann et al. (1984) แต่ขัดแย้งกับผลการศึกษาของ Schmidt et al. (1979) ที่รายงานว่า เชื้อนี้ สามารถทนเกลือได้เพียง 6 % NaCl เท่านั้น
3. เชื้อ V. alginolyticus ให้ผลการทดสอบ Voges-Proskauer ไม่แน่นอน ในขณะที่ Larsen et al.(1981) West & Colwell (1984) รายงานว่า เชื้อนี้ให้ผลการทดสอบนี้เป็นบวก แต่ Schmidt et al.(1979) รายงานว่า

เชื้อนี้ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

เนื่องจากเชื้อ Vibrios ที่มีลักษณะ colony บน TCBS เป็น MV-1 มีเพียง 22 strains จากจำนวน 27 strains ที่จัดเข้าอยู่ใน Cluster A ซึ่งพบว่า เชื้อที่เหลือจำนวน 5 strains จะถูกจัดเข้าอยู่ใน Cluster B 1 strain, Cluster I 1 strain และ Cluster J 3 strain ซึ่งจะกล่าวโดยละเอียดตามลำดับต่อไป

Cluster B

เชื้อ Vibrios ที่ถูกจัดอยู่ใน Cluster B มีลักษณะ colony บน TCBS เป็นสีเขียวใส เนื่องจากไม่สามารถ ferment sucrose ได้ (sucrose-negative Vibrio) จำนวน 17 strains และ มีลักษณะเป็นกลุ่ม MV-1 จำนวน 1 strain คือ LMV-12306 ซึ่งจะมีลักษณะ colony สีเหลืองปนขาวขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มม. เมื่อเจริญบน TCBS, swarm บน 3% NA ซึ่งคล้ายกับ V. alginolyticus ใน Cluster A แต่ให้ผลลบต่อปฏิกิริยา Voges-Proskauer และ ferment arabinose ได้ ซึ่งเป็นลักษณะที่ต่างกับ Cluster A แต่ คล้ายกับ Cluster B

เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ Vibrios ใน Cluster B กับการรายงานของ West & Colwell(1984) และ Baumann et al.(1984) พบว่า เชื้อใน Cluster B มีลักษณะต่างๆเหมือนกับเชื้อ V. parahaemolyticus ยกเว้น Strain LMV-12306:MV-1

จากผลการศึกษา Numerical Taxonomy พบว่า เชื้อ V. parahaemolyticus จะเข้ารวมเป็นกลุ่มเดียวกันที่ระดับ 77 % ซึ่งใกล้เคียงกับที่ McNicol et al.(1983) รายงานว่า V. parahaemolyticus จะเข้ารวมเป็นกลุ่มเดียวกันที่ระดับ 75 % โดยลักษณะที่สำคัญของ เชื้อ V. parahaemolyticus ใน Cluster B

1. เชื้อ V. parahaemolyticus ใน Cluster นี้ ไม่สามารถ ferment sucrose แต่จะ ferment arabinose ได้ ซึ่งลักษณะดังกล่าว ตรงกับการรายงานของ McNicol et al.

(1983)

2. เชื้อ V. parahaemolyticus ใน Cluster B ไม่สามารถเจริญได้ในที่ไม่มีเกลือ (0% NaCl) และ สามารถทนเกลือได้สูงถึง 8% NaCl ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Baumann et al. (1984), Johnson et al.(1984), West & Colwell (1984).

3. เชื้อนี้สามารถ swarm ได้บน 3% NA และ MA ซึ่งเป็นลักษณะที่ขัดแย้งกันกับการรายงานของ Johnson et al. (1984) แต่ สอดคล้องกันกับการศึกษาของ Lam & Monteiro (1984) ที่รายงานว่า V. parahaemolyticus บาง strains มีลักษณะเป็น mucoid strains

4. เชื้อนี้จะให้ผลลบต่อปฏิกิริยา Voges-Proskauer และไม่สร้าง H_2S จาก TSI ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของของ Kaneko & Colwell (1973)

เชื้อ V. alginolyticus ใน Cluster A และ V. parahaemolyticus ใน ClusterB มีลักษณะต่างๆที่ทำการศึกษาคล้ายคลึงกันมาก และ จะเข้ารวมเป็นกลุ่มเดียวกันที่ระดับ 73 % โดยจะมีลักษณะที่แตกต่างกันระหว่าง Cluster นี้ คือ

1. เชื้อ V. parahaemolyticus ไม่สามารถ ferment sucrose ได้ ในขณะที่เชื้อ V. alginolyticus ferment sucrose ได้

2. เชื้อ V. parahaemolyticus สามารถ ferment arabinose ได้ แต่เชื้อ V. alginolyticus ไม่สามารถ ferment arabinoseได้

3. เชื้อ V. parahaemolyticus ให้ผลลบต่อปฏิกิริยา Voges-Proskauer ในขณะที่เชื้อV. alginolyticus ให้ผลไม่แน่นอน(V 65 %)

4. เชื้อ V. alginolyticus สามารถทนเกลือได้ที่ 10 % NaCl

ในขณะที่ เชื้อ V. parahaemolyticus ให้ผลไม่แน่นอน เนื่องจาก เชื้อ V. alginolyticus และ เชื้อ V. parahaemolyticus มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันหลายประการ เช่น

1. ให้ผลบวกต่อ การทดสอบ L-lysine และ L-ornithine decarboxylation แต่ให้ผลลบต่อ การทดสอบ L-arginine decarboxylation
2. สามารถ ferment carbohydrates ชนิดต่างๆแล้วให้ผลเป็นกรด คล้ายคลึงกัน ยกเว้น การ ferment sucrose และ arabinose
3. ไม่ให้ H_2S จาก TSI

จากลักษณะต่างๆที่คล้ายคลึง ระหว่างเชื้อ 2 ชนิดนี้ ในอดีตจึงเคยจัดเชื้อ V. alginolyticus ไว้ว่าเป็น V. parahaemolyticus biotype II (Sakazaki et al., 1968a,b)

Cluster C

เชื้อ Vibrios ใน Cluster C จะเข้ารวมเป็นกลุ่มใหญ่กับ Cluster A และ B ที่ระดับ 68 % โดยเชื้อใน Cluster C แยกได้จากน้ำ และ หอยแมลงภู่ จำนวนทั้งสิ้น 6 strains มีลักษณะ colony บน TCBS เป็นกลุ่ม MV-2 ซึ่งจะมีลักษณะต่างๆที่คล้ายคลึง และ แตกต่างกับ Cluster A และ B ดังนี้ คือ

1. เชื้อ Vibrios ใน Cluster C ให้ผลไม่แน่นอนต่อการทดสอบ L-lysine decarboxylase ในขณะที่เชื้อ Vibrio alginolyticus และ เชื้อ V. parahaemolyticus ใน Cluster A และ B ให้ผลบวก และ จะให้ผลเหมือนเหมือนกันทั้ง 3 Cluster ในการทดสอบ L-ornithine decarboxylase คือ ให้ผลไม่แน่นอน
2. เชื้อ Vibrios ใน Cluster C มีลักษณะคล้ายกับ Cluster A คือ สามารถ ferment sucrose ได้ แต่ไม่

ferment arabinose ซึ่งเป็นลักษณะที่ต่างจาก Cluster B

3. เชื้อ Vibrios ใน Cluster C มีลักษณะคล้ายกับ Cluster B คือ ให้ผลลบต่อการทดสอบ Voges-Proskauer

4. เชื้อ Vibrios ใน Cluster C สามารถทนเกลือได้ที่ 6 % NaCl เท่านั้น ซึ่งต่างจาก Cluster A และ B ที่สามารถทนเกลือได้ที่ 10 % NaCl และ 8% NaCl ตามลำดับ

5. Cluster ทั้ง 3 นี้ ไม่สามารถสร้าง H_2S จาก TSI ได้เหมือนกัน

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ Vibrios ใน Cluster C ลักษณะของเชื้อ Vibrios ชนิดต่างๆ จากตารางที่ 1 ปรากฏว่าไม่ตรงกับลักษณะของเชื้อ Vibrios ทั้ง 20 species จึงยังไม่สามารถทำการพิสูจน์เชื้อ Vibrios ใน Cluster C ได้ว่า เป็นชนิดใด จึงคาดว่า เชื้อนี้อาจจะเป็น Species ใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

Cluster D

เชื้อ Vibrios ใน Cluster D จำแนกได้เป็น 3 Subcluster คือ Subcluster 1 D, Subcluster 2 D & Subcluster 3D ซึ่งรายละเอียดของแต่ละ Subcluster มีดังนี้ คือ

Subcluster 1D

Subcluster 1D ประกอบด้วยเชื้อ Vibrios ที่พิสูจน์แล้วจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2 strains คือ V. vulnificus และ V. mimicus และ เชื้อที่แยกได้จากธรรมชาติ คือ หอยแมลงภู่ จำนวน 2 strains ได้แก่ LMP-2102 : Vp และ LMP -2306 : Vp จากผลการศึกษาลักษณะต่างๆ พบว่า เชื้อ V. vulnificus , LMP-2102: Vp และLMP-2306: Vp Vp มีลักษณะเป็นเชื้อ V. vulnificus ซึ่งลักษณะของเชื้อนี้ จะตรงกับการรายงานของ Tison & Kelly (1986) และ West & Colwell (1984) และ

Baumann et al. (1984) ซึ่งเชื้อ V. vulnificus ใน Subcluster 1D มีลักษณะที่สำคัญ ดังนี้ คือ

1. ไม่ ferment sucrose และ arabinose แต่สามารถ ferment lactose
2. ให้ผลลบต่อปฏิกิริยา Voges-Proskauer แต่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ Indole
3. ไม่สร้าง H_2S จาก TSI
4. ทุก strain เจริญได้ที่ 6 % NaCl

ส่วน V. mimicus 1 strain ที่ถูกจัดเข้าอยู่ใน Subcluster 1D พบว่าลักษณะของเชื้อนี้สอดคล้องกับที่ Tacket et al. (1982) รายงานไว้ ซึ่งจากผลการวิจัยนี้ ปรากฏว่า เชื้อ V. mimicus มีลักษณะที่สำคัญ คือ

1. ไม่ ferment sucrose, arabinose ,lactose
2. เจริญได้ที่ 0% NaCl, 3% NaCl แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 6% NaCl ในขณะที่ Tacket et al.(1982) รายงานว่าเชื้อ V. mimicus จะให้ผลไม่แน่นอน
3. ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาการทดสอบ Indole และ ให้ผลลบต่อการทดสอบ Voges- Proskauer.

จากการศึกษาวิเคราะห์หาง Numerical Taxonomy ในครั้งนี้ ปรากฏว่าเชื้อทั้ง 2 species คือ V. vulnificus และ V. mimicus จะเข้ารวมเป็นกลุ่มเดียวกันที่ระดับ 79% โดยแท้จริงแล้ว V. mimicus ไม่ควรจะเข้ารวมกับ V. vulnificus ใน Subcluster 1D ทั้งนี้เนื่องจาก พบว่ามีลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อทั้ง 2 species นี้ คือ

1. ขนาดของ colony บน TCBS กล่าวคือ V. mimicus บน TCBS จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพียง 1 มม. แต่ V. vulnificus จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่แน่นอน คือ มีขนาดตั้งแต่ 1 - 4 มม.
2. เชื้อ V. vulnificus สามารถ ferment lactose ได้

แต่เชื้อ V. mimicus ไม่ สามารถ ferment lactose ได้

3. เชื้อ V. mimicus สามารถเจริญได้ที่ 0 % NaCl และ 3% NaCl แต่ เชื้อ V. vulnificus มีเพียง 1 ใน 3 strain ที่สามารถเจริญได้ที่ 0 % NaClและ ทุก strain เจริญได้ที่ 6 % NaCl

อย่างไรก็ตาม การเข้ารวมกลุ่มของเชื้อทั้ง 2 species ใน Subcluster 1D อาจเกิดขึ้นเนื่องจากความผิดพลาดบางประการ โดยเฉพาะอาจเกิดขึ้นได้ในกรณีที่ จำนวนเชื้อที่ทำการศึกษาทั้ง 112 strains มีเพียง 1 strain ที่เป็นเชื้อ V. mimicus จึงเข้าจับกับกลุ่มที่มีลักษณะใกล้เคียงที่สุด คือ V. vulnificus นั้น แทนที่จะเข้ารวมกับ เชื้อ V. cholerae ใน Cluster E ซึ่ง McNicol et al. (1983) รายงานว่า เชื้อ V. choleraeและ เชื้อ V. mimicus จะมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก และ จะแตกต่างกันเพียง 2 ลักษณะ คือ

1. การ ferment sucrose โดย เชื้อ V. cholerae จะสามารถ ferment sucrose ได้ ในขณะที่ เชื้อ V. mimicus ไม่สามารถ ferment sucrose
2. เชื้อทั้ง 2 species นี้ จะให้ผลต่างกัน ในปฏิกิริยา Voges-Proskauer กล่าวคือ เชื้อ V. cholerae จะให้ผลเป็น บวก ในขณะที่เชื้อ V. mimicus ให้ผลเป็นลบ

Subcluster 2D

เชื้อ Vibrios ใน Subcluster 2Dมีลักษณะต่างๆ คล้ายกับเชื้อ V. parahaemolyticus ใน Cluster B หลายประการ คือ

1. ความสามารถในการเจริญได้ที่ 8% NaCl
2. ไม่สามารถ ferment sucrose ให้ลักษณะ colony สีเขียวบน TCBS
3. ผลการทดสอบ amino acid decarboxylase คล้ายคลึงกันมาก โดยจะให้ผลลบต่อปฏิกิริยา L-arginine decarboxylase บวกต่อปฏิกิริยา L-lysine และ ให้ผลไม่แน่นอนต่อ

ปฏิกิริยา L-ornithine decarboxylase

ส่วนลักษณะที่ต่างกัน ระหว่าง เชื้อ Vibrios ใน Subcluster2Dและ เชื้อ V. parahaemolyticus ใน Cluster B คือ

1. การ swarm บน solid media คือ 3% NA และ MA กล่าวคือ Cluster B สามารถ swarm ได้บน solid media ในขณะที่ เชื้อใน Subcluster 2D แสดงลักษณะการ swarm ไม่แน่นอน
2. เชื้อ Vibrios ใน Subcluster 2D ferment arabinose ให้ผลไม่แน่นอน ในขณะที่เชื้อ V. parahaemolyticus ใน Cluster B ให้ผลเป็นบวก
3. การสร้าง H_2S จาก TSI พบว่า เชื้อ Vibrios ใน Subcluster 2D บาง strains สามารถสร้าง H_2S ได้จึงให้ผลการทดสอบไม่แน่นอน ในขณะที่ Kampelmacher et al.(1970) รายงานว่า เชื้อ V. parahaemolyticus ไม่สามารถสร้าง H_2S ได้ ซึ่งขัดแย้งกับที่ Colwell (1970) ได้รายงานว่า พบเชื้อ V. parahaemolyticus 32 strains (100%) ที่สามารถสร้าง H_2S ได้

เชื้อ V. parahaemolyticus ที่ได้รับจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คือ CFS-80003 ไม่ถูกจัดเข้ารวมกลุ่มกับเชื้อ V. parahaemolyticus ใน Cluster B แต่จัดเข้า Subcluster 2D ทั้งนี้เนื่องมาจาก เชื้อ strain นี้ มีลักษณะต่างกับ เชื้อ V. parahaemolyticus ใน Cluster B คือ ให้ผลลบต่อ L-arginine และ L- ornithine decarboxylase ให้ผลบวกต่อ L- lysine decarboxylase ซึ่งปกติเชื้อ V. parahaemolyticus จะให้ผลบวกต่อ L-ornithine decarboxylase

ดังนั้น เชื้อ V. parahaemolyticus strain จึงน่าจะนำกลับมาศึกษาลักษณะต่างๆให้แน่ชัดว่า เป็นเชื้อ V. parahaemolyticus หรือไม่ เนื่องจากถูกจัดไว้ใน Subcluster 2D ซึ่งมีลักษณะต่างๆ ไม่ตรงกับเชื้อ V. parahaemolyticus ดังกล่าวข้างต้นแล้ว

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบลักษะของเชื้อ Vibrios ใน Subcluster 2D กับ เชื้อ V. vulnificus พบว่า มีลักษณะที่แตกต่างกัน โดย Tison et al. (1982) และ Tison & Kelly (1986) รายงานว่า V. vulnificus จะ ferment lactose และ เจริญได้ที่ 6% NaCl ในขณะที่เชื้อใน Subcluster 2D ไม่สามารถ ferment lactose ได้ และ เจริญได้ที่ 8 % NaCl นอกจากนี้ Tison et al.(1982) ก็ได้รายงานว่า เชื้อ V. vulnificus จะไม่สร้าง H_2S จาก TSI แต่เชื้อใน Subcluster 2 D สร้าง H_2S ได้ให้ผลไม่แน่นอน

จากผลการศึกษาวิเคราะห์ทาง Numerical Taxonomy ในครั้งนี้ พบว่า เชื้อใน Subcluster 2D มีลักษณะต่างๆแตกต่างจากเชื้อ Vibrios ทั้ง 20 species ที่ปรากฏในตารางที่ 1 เชื้อ Vibrios ใน Subcluster 2D จึงเป็นกลุ่มที่น่าสนใจ เนื่องจากอาจเป็น Vibrio species ใหม่ ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ที่แยกได้จากธรรมชาติใน ดิน น้ำ หอยแมลงภู่ และ ปลาทรายขาว

Subcluster 3D

เชื้อ Vibrios ใน Subcluster 3D มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อ V. vulnificus เมื่อเปรียบเทียบกับตารางที่ 1 คือ

1. สามารถทนได้ที่ 6 % NaCl
2. ไม่ ferment sucrose และ arabinose
3. การ ferment lactose ของ เชื้อ Vibrios ใน Subcluster 3D ให้ผลไม่แน่นอน

แต่ลักษณะสำคัญของเชื้อใน Subcluster 3D ที่แตกต่างจากเชื้อ V. vulnificus คือ การสร้าง H_2S กล่าวคือ Tison et al.(1982) ได้รายงานว่า เชื้อ V. vulnificus ไม่สามารถสร้าง H_2S ได้จาก TSI ในขณะที่ Oliver et al. (1982) รายงานว่า เชื้อ V. vulnificus บางสามารถสร้าง H_2S ได้จาก TSI และลักษณะที่สร้าง H_2S ก็ไม่ใช่เป็นลักษณะของเชื้อ V. harveyi ด้วยเช่นกัน และ ได้เสนอว่า เชื้อ Vibrios ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อ V. vulnificus แต่แตกต่างกันที่การสร้าง H_2S นั้น

อาจเป็น luminescent Vibrios ชนิดใหม่

นอกจากลักษณะการสร้าง H_2S ที่นำมาพิจารณาแล้ว พบว่า เชื้อ Vibrios ใน Subcluster 3D สามารถสร้าง Urease ได้ให้ผลไม่แน่นอน (66%) ซึ่งสอดคล้องกับที่ Oliver et al.(1983) ได้รายงานไว้ว่า เป็นลักษณะของเชื้อ luminescent Vibrios ที่ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็นเชื้อ Vibrios ชนิดใด อีกทั้งยังมีลักษณะ สามารถ ferment lactose ได้ ซึ่งลักษณะการสร้าง H_2S ,การผลิต Urease และ การ ferment lactose ได้นั้นเป็นลักษณะที่คล้ายคลึงกับเชื้อ Vibrios ใน Subcluster3D ทั้งสิ้น

จากการศึกษาทาง Numerical Taxonomy ในครั้งนี้ ปรากฏว่า ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเชื้อ Vibrios ใน Subcluster 3D เป็น speciesใด จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจว่า อาจพบเชื้อ Vibrio speciesใหม่ ที่แยกได้จากธรรมชาติใน ดิน น้ำ และ หอยแมลงภู่ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Oliver et al. (1983) ว่า พบเชื้อที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ เชื้อ Vibrios ใน Subcluster3D นี้ประมาณ 60% ใน น้ำทะเล ตะกอนดิน และ สัตว์ทะเล

เชื้อ Vibrios ใน Subcluster 2D และ 3D มีลักษณะต่างๆคล้ายคลึงกัน เช่น ความสามารถในการทนเกลือในช่วงเดียวกัน คือ สามารถทนได้ตั้งแต่ 0.5-6% NaCl, amino acid decarboxylation, glycerol fermantation เป็นต้น แต่ต่างกันเล็กน้อย ด้านการ ferment lactose และ arabinose การสร้าง H_2S ทำให้เชื้อ Vibrios ใน Subcluster 2Dและ 3D เข้าจับกันก่อนที่ระดับ 77% แล้วจึงเข้ารวมกับ Subcluster 1D ที่ ระดับ 75% รวมกันทั้ง 3 Subcluster เป็น Cluster D

Cluster E

ประกอบด้วยเชื้อ V. cholerae และ NAG รวม 3 strains โดยเชื้อทั้ง 3 strains จะเข้ารวมเป็นกลุ่มเดียวกันที่ระดับ 85 % ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ McNicol et al. (1983) ที่รายงานว่า เชื้อ V. cholerae จะ form cluster ที่ 2 ระดับ คือ ที่ระดับ 77% และ 74% และ พบว่า เชื้อ V. cholerae และ NAG ไม่มีความแตกต่างกัน

เชื้อ V. cholerae ใน Cluster E มีลักษณะที่สำคัญ คือ

1. สามารถเจริญได้ใน media ที่ไม่เติมเกลือ (0 % NaCl) จึงถูกจัดเป็น nonhalophilic Vibrios (Tacket et et al.,1982) ในขณะเดียวกันก็สามารถต้านทานความเค็มได้ค่อนข้างสูง คือ สามารถเจริญได้ที่ 6% NaCl ซึ่งลักษณะประการหลังนี้จะสอดคล้องกับการรายงานของ Kaper et al. (1979)
2. ให้ผลบวกต่อ L-lysine และ L- ornithine decarboxylase และ ให้ผลลบต่อ L-arginine decarboxylase
3. ไม่ ferment arabinose, lactose
4. Tacket et al. (1982) รายงานว่า เชื้อV. cholerae จะให้ผลบวกต่อปฏิกิริยา Voges-Proskauer แต่จากการศึกษาพบว่า มีเชื้อ V. cholerae เพียง 1 strain จาก 3 strain ที่ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยานี้ ซึ่งผลการวิจัยเกี่ยวกับลักษณะนี้ จะสอดคล้องกับการรายงานของ Kaper et al. (1979) ที่รายงานว่า พบเชื้อV. cholerae เพียง 28 strains จาก 65 strains ที่ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยานี้
5. เชื้อ V. cholerae ใน Cluster E ไม่สามารถย่อยสลาย Tyrosine ได้ ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่พบใน Vibrios ที่เหลือ 9 cluster

เชื้อ Vibrios ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ ไม่จัดเข้ารวมในกลุ่มนี้ ซึ่งเชื้อ Vibrios ใน ClusterE จะเข้ารวมกับ เชื้อ Vibrios ในCluster F ที่ระดับ 74%

Cluster F

เชื้อ Vibrios ใน Cluster Fมีลักษณะ colony เป็นกลุ่ม MV-2 สามารถ ferment sucrose ได้ ให้ colony สีเหลือง ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกับเชื้อ V. cholerae ใน Cluster E คือ

1. เชื้อ V. cholerae ใน Cluster E เจริญได้ใน media ที่ขาดเกลือ (0% NaCl) ในขณะที่เชื้อ Vibrios ใน Cluster F ไม่สามารถเจริญได้ในที่ขาดเกลือ
2. เชื้อ V. cholerae ใน Cluster E ไม่สามารถย่อยสลาย Tyrosine ได้ ในขณะที่ เชื้อ Vibrios ใน Cluster F สามารถย่อยสลายได้
3. เชื้อ V. cholerae ใน Cluster E ไม่สามารถใช้ n-valerate เป็น carbon source ในขณะที่เชื้อ Vibrios ใน Cluster F สามารถนำมาใช้ได้

ส่วนลักษณะที่คล้ายคลึงกันระหว่างเชื้อ V. cholerae ใน Cluster E และ เชื้อ Vibrios ใน Cluster F คือ

1. สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแกะได้
2. เจริญได้ใน media ที่เติมเกลือ 6 % NaCl
3. Ferment saccharose, glycerol แต่ไม่ ferment lactose, arabinose

เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะต่างๆของเชื้อ Vibrios ใน Cluster F กับ ลักษณะของเชื้อ Vibrios ทั้ง 20 speciesที่ปรากฏในตาราง ที่ 1 พบว่า ไม่ตรงกับลักษณะของเชื้อ Vibrios เหล่านั้น ดังนั้น เชื้อ Vibrios ใน Cluster F จึงอาจเป็นเชื้อ Vibrios species ใหม่ ที่แยกได้ จากธรรมชาติ ในหอยแมลงภู่ และ ดิน

Cluster G & H

เชื้อ Vibrios ใน Cluster G และ H มีลักษณะ colony บน TCBS เป็นกลุ่ม MV-2 เหมือนกัน และ เข้ารวมเป็นกลุ่มใหญ่ กับ Cluster E และ F ที่ระดับ 73 % ซึ่งลักษณะของเชื้อ Vibrios ทั้ง 2 Cluster จะคล้ายคลึงกันมาก ยกเว้นลักษณะดังต่อไปนี้ คือ

1. การสร้าง H_2S จาก TSI

เชื้อ Vibrios บาง Strain ใน Cluster H

สามารถสร้าง H_2S จาก TSI ให้ผลไม่แน่นอน ในขณะที่เชื้อ Vibrios ใน Cluster Gไม่สามารถสร้าง H_2S ได้

2. Ferment lactose

เชื้อ Vibriosใน ClusterH บาง strain สามารถ ferment lactose ได้ให้ผลไม่แน่นอน (33%) ในขณะที่เชื้อ Vibrios ใน Cluster G ไม่สามารถ ferment lactose ได้

3. Ferment melibiose

เชื้อ Vibrios ใน ClusterH ทุก strain สามารถ ferment melibioseได้ ส่วนเชื้อ Vibrios ในCluster G สามารถ ferment ได้บาง strain (29%)

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะต่างๆของเชื้อ Vibrios ใน Cluster G และ H จากตารางที่ 1 ปรากฏว่า ไม่มีลักษณะตรงกับเชื้อ Vibrios ทั้ง 20 Species จึงคาดว่า เชื้อในCluster G และ H เป็น เชื้อ Vibrios ชนิดใหม่ ที่แยกได้จากธรรมชาติ

Cluster I

เชื้อ Vibrios ในCluster I ประกอบด้วย เชื้อ Vibrios ที่ได้รับจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 3 strains และ เชื้อ Vibrios ที่มีลักษณะเป็นกลุ่ม MV-1 1 strain คือ IMV-12301:MV-1 เชื้อ Vibrios ใน Cluster I มีลักษณะตรงกับเชื้อ V. fluvialis ที่ปรากฏในตารางที่ 1 โดยจะมีลักษณะที่สำคัญของเชื้อ V. fluvialis ใน Cluster นี้ คือ

1. สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งสอดคล้องกับ การรายงานของ Lee et al. (1981)
2. เชื้อ V. fluvialis จะ decarboxylated amino acid ได้ผลต่างจาก sucrose-positive Vibriosใน Clusterอื่นๆ คือ จะให้ผลบวก ต่อ L-arginine decarboxylase แต่จะให้ผลลบต่อ L- ornithine และ L-lysine

decarboxylase นอกจากนี้ V. fluvialis ยังสามารถ ferment arabinose ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Huq et al.(1980), Seidler et al. (1980), Lee et al.(1981), Hickmann-Brenner et al.(1984)

3. เชื้อ V. fluvialis สามารถทนเกลือได้ที่ 6 % NaCl ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tacket et al.(1982)

ผลการวิจัยนี้ ปรากฏว่า มีเชื้อ Vibrios เพียง 1 strain ที่จัดเข้ารวมกลุ่มกับ V. fluvialis ในCluster I ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Lee et al. (1981) ที่รายงานว่า สามารถแยก V. fluvialis ได้จากสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติทั่วไป เช่น แม่น้ำ, น้ำกร่อย และ สัตว์ทะเลบางชนิด แต่ จะสอดคล้องกับการศึกษาของ Nishibuchi et al.(1983) ที่รายงานว่า เป็นการยากมาก ในการแยกเชื้อ V. fluvialis จากสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ โดยใช้วิธีการ spreading plate บน TCBS โดยตรง

เชื้อ V. fluvialis ใน Cluster I จะเข้ารวมเป็นกลุ่มใหญ่กับเชื้อ Vibrios ใน Cluster E, F, G และ H ที่ระดับ 72 % ทั้งนี้ เนื่องจาก เชื้อ V. fluvialis มีลักษณะคล้ายคลึงกับ เชื้อ Vibrios ใน 4 Cluster หลายประการ คือ

1. การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง
2. ferment sucrose ให้ colony สีเหลืองบน TCBS umbonate
3. ไม่ swarm บน 3% NA, MA
4. สามารถทนเกลือได้ ตั้งแต่ 0.5%-6% NaCl

ส่วนลักษณะที่แตกต่างกันของ Vibrios ทั้ง 5 Cluster คือ

1. Decarboxylated animo acid

2. การใช้ L-histidine เป็น carbon source

ดังปรากฏรายละเอียดในตารางที่ 10

Cluster J

เชื้อ Vibrios ใน Cluster J ประกอบด้วยเชื้อในกลุ่ม MV-1 จำนวน 3 strains เป็นเชื้อที่แยกได้จาก ดิน และ หอยแมลงภู่ ซึ่งจะมีลักษณะ colony บน TCBS , การ swarm บน 3% NA ให้ผลไม่แน่นอน (33%) ความสามารถทนเกลือได้ถึง 10% NaCl คล้ายคลึงกับ V. alginolyticus ใน Cluster A ในขณะเดียวกัน ก็มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเชื้อ Vibrios ใน Cluster E, F, G, H, และ I ในบางลักษณะ คือ

1. สามารถ ferment lactose ได้บาง strain เช่นเดียวกับเชื้อ Vibrios ใน Cluster H
2. ไม่สร้าง H_2S เช่นเดียวกับเชื้อ Vibrios ใน Cluster E, F, G, H
3. ไม่ ferment arabinose เช่นเดียวกับเชื้อ Vibrios ใน Cluster E, F, G, H

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ Vibrios ใน Cluster J กับลักษณะของเชื้อ Vibrios ทั้ง 20 Species ปรากฏว่าไม่ตรงกับลักษณะของเชื้อเหล่านี้ ดังนั้น เชื้อ Vibrios ในCluster J จึงอาจเป็นเชื้อ Vibrios ชนิดใหม่ ที่ยังไม่มีการรายงานไว้ก่อนหน้าการวิจัยนี้

เชื้อ Vibrios ทั้ง 10 Cluster จะเข้ารวมกันเป็นกลุ่มใหญ่ที่ระดับ 62 % โดย จะมีเชื้อ Vibrios ที่ไม่ถูกจัดเข้ารวมกับ 10 Cluster นี้อีกจำนวน 8 strains และ V. anguillarum ATCC 19264 1 strain

เชื้อ V. anguillarum ATCC 19264 ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะต่างๆ พบว่าตรงกับการศึกษาของ Chart (1983) และ จากตารางที่ 1 โดยมีลักษณะที่สำคัญ คือ

1. สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้
2. ทนเกลือได้ที่ 6% NaCl
3. ให้ผลลบต่อปฏิกิริยา Indole, methyl red, gluconate และ urease
4. สามารถ ferment sucrose ได้ และ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 °C
5. ไม่ swarm บน 3% NA, MA

ลักษณะที่ให้ผลบวกในเชื้อ Vibrios ที่ทำการศึกษาทั้ง 10 Cluster นี้ คือ

1. ลักษณะ colony บน TCBS ได้แก่
   1.1 เนื้อของ colony(texture) คือ แบบเหนียวหนืด (viscid)
   1.2 การติดผิวของ media (adhesive to media)
2. ลักษณะ colony บน Blood agar ได้แก่
   2.1 ขอบ (edge) คือ แบบเรียบ (entire)
   2.2 รูปร่าง (shape) คือ แบบโค้งนูน (convex)
3. gram negative
4. flagella
5. pH tolerance ที่ pH 7, pH 10 และ pH 11
6. salt tolerance ที่ 3% (w/v) NaCl
7. catalase
8. oxidase
9. O/129 sensitivity
10. nitrate reduction
11. fermentative from oxidative-fermentative test
12. motility
13. acid production from glucose, mannose, fructose, galactose, maltose, saccharose, mannitol, starch

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14. organic acid as carbon source :- citrate

ลักษณะที่ให้ผลลบในเชื้อ Vibrios ที่ทำการศึกษาทั้ง 10 Cluster คือ

1. ลักษณะ colony บน TCBS ได้แก่
   1.1 รูปร่าง (shape) คือ แบบแบนราบ (flat) และ ยกนูนแต่เรียบ (raise)
   1.2 ความหนาแน่น (density) คือ แบบโปร่งแสง (transparence) และ ทึบ (opaque)
   1.3 เนื้อของ colony (texture) คือ แบบเม็ดเล็กๆ (granular) และ เป็นแผ่น (membranous)
2. ลักษณะ colony บน Blood agar ได้แก่
   2.1 ขอบ (edge) คือ แบบหยัก (undulate)
   2.2 รูปร่าง (shape) คือ แบบแบนราบ (flat)
   2.3 ความหนาแน่น (density) คือ แบบทึบ (opaque)
3. ลักษณะ colony บน 3% (w/v) Nacl NAB % NA) ได้แก่
   3.1 ความหนาแน่น (density) คือ แบบโปร่งใส (transparence) และ เมือกขึ้น (mucoid)
4. ลักษณะ colony บน Marine agar ได้แก่
   4.1 ความหนาแน่น (density) คือ แบบโปร่งใส (transparence)
5. gram positive
6. gas from nitrate reduction
7. oxidative test & No. reaction from oxidation-fermentative test.
8. gas from glucose, mannose, fructose, galactose, maltose, saccharose, mannitol, starch
9. fermentation of melezitose, adonitol, dulcitol, inocitol, sorbose

ในการศึกษาวิจัยนี้ แยกเชื้อ Marine Vibrios จากตัวอย่างในธรรมชาติ โดยใช้วิธี spreading plate บน TCBS เมื่อศึกษา Numerical Taxonomy ของเชื้อ Vibrios จำนวน 97 strains และ เชื้อ Vibrios ที่ได้รับจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สามารถจัดกลุ่มได้ 10 Cluster ที่ระดับ 75 % ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้แน่ชัดว่าเป็นชนิดใด จำนวน 5 species คือ V. alginolyticus, V. parahaemolyticus, V. cholerae, V. vulnificus, V. fluvialis และ เป็น Vibrios species ใหม่ 6 กลุ่ม ทั้งนี้ เนื่องจาก การแยกเชื้อจากธรรมชาติ โดยใช้ selective media คือ TCBS นั้น Sakazaki & Balows(1981) รายงานว่า TCBS เป็น high selective media ของ Vibrios โดยจะยับยั้งเชื้อที่เป็น gram-positive, enteric bacteria และ Pseudomonas นอกจากนี้ เชื้อ Vibrios บางชนิด ก็ไม่สามารถเจริญได้บน TCBS เช่น V. hollisae (Hickman et al., (1982), V. cholerae บาง strains, V. anguillarum เกือบทุก strains (Sakazaki & Balows, 1981) ซึ่ง Lee, et al. (1981) รายงานว่า เชื้อ V. anguillarum จะเจริญได้ดีบน TCBS ที่เติม 3 % NaCl ดังนั้น จึงพบเชื้อดังกล่าวที่ทราบแน่ชัดเพียง 4 Cluster

นอกจากนี้เชื้อ Vibrios หลายชนิด ต้องการ enrichment media ที่เหมาะสม จึงจะสามารถแยกเชื้อได้ ดังเช่น Nishibuchi et al.(1983) ได้รายงานว่า เชื้อ V. fluvialis ต้องการ enrichment media ที่ประกอบด้วย 1% peptone, 4% NaCl และ Novobiocin 5 μg/ml. pH 8.5 ซึ่งจะได้ผลดีกว่า enrich เชื้อ ด้วย Alkaline peptone water

ส่วนเชื้อ V. cholerae ต้องการ Alkaline peptone waterเป็น enrichment media (West & Lee, 1982) และ media ที่เหมาะสม สำหรับการแยกเชื้อนี้ คือ Vibrio agar(Tamura et al., 1971)

อย่างไรก็ตาม การใช้ TCBS ในการแยกเชื้อ Vibrios จากธรรมชาติ ก็ยังเป็นที่น่าสนใจในกรณีที่ได้พบว่า มีเชื้อVibrios species ใหม่ถึง 6 Cluster ในบริเวณอ่าวไทยตอนใน