

บทที่ 3

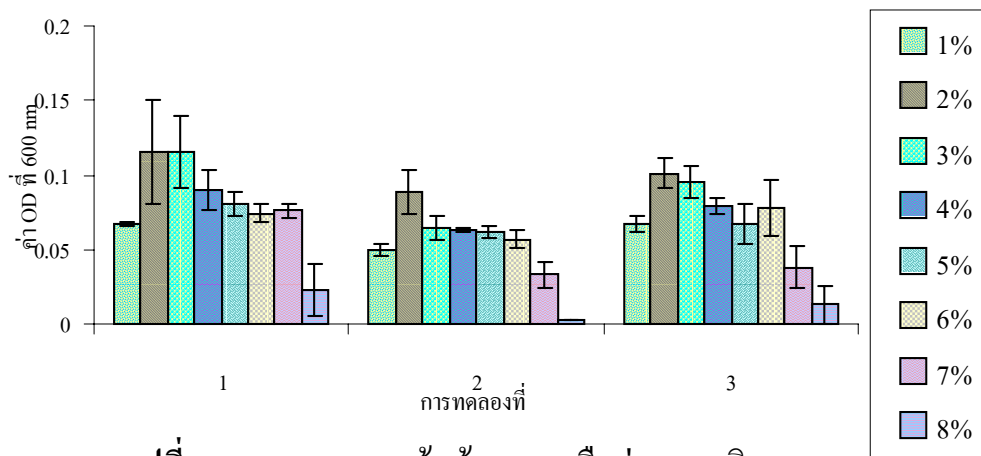
ผลการทดลอง

3.1 ผลของปริมาณเกลือ pH และสารยับยั้งต่อการเจริญของ *Vibrio hollisae*

จากการทดลอง เลี้ยงเชื้อ *V. hollisae* ใน 1% peptone ที่ปรับระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 1-8% พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2% เชื้อมีการเจริญสูงสุด (รูปที่ 3.1) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 0% และสูงกว่า 9% เชื้อจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (ข้อมูลไม่ได้แสดง) สำหรับการทดสอบค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *V. hollisae* ใน 1% peptone ที่ปรับค่า pH ตั้งแต่ 7.0-9.4 พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญสูงสุดคือ 8.2 (รูปที่ 3.2) แต่ pH ต่ำกว่า 6 เชื้อไม่สามารถเจริญได้ (ข้อมูลไม่ได้แสดง) และจากการทดลองใช้สารยับยั้งที่เคยมีรายงานว่าสามารถใช้ในอาหาร selective medium หลายชนิดเช่น taurocholic acid potassium tellurite sodium azide ซึ่งนิยมใช้ยับยั้งเชื้อแกรมลบ รวมทั้ง deoxycholic acid ที่นิยมใช้ยับยั้งเชื้อแกรมบวก และ malachite green และ lauryl sulphate ซึ่งใช้ยับยั้งเชื้อประจำถิ่นทั่วไป พบว่าสารยับยั้งที่นำมาทดสอบทั้ง 6 ชนิดล้วนมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสิ้น (รูปที่ 3.3) จึงไม่สามารถที่จะนำสารยับยั้งแต่ละชนิดมาเติมลงใน H agar เพื่อพัฒนาเป็น selective medium ดังนั้นในการนำ H agar มาใช้แยกเชื้อ *V. hollisae* ในอาหารทะเล จึงปรับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2% และ pH เป็น 8.2

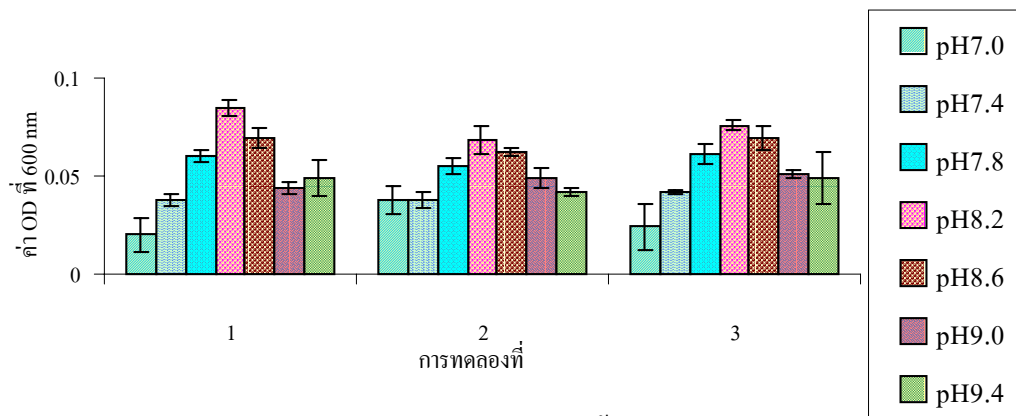
3.2 ผลการเจริญของ *V. hollisae* บน H agar เปรียบเทียบกับการเจริญบน Sporosarcina agar และ Mannitol maltose agar

จากการเปรียบเทียบการเจริญของ *V. hollisae* สายพันธุ์มาตรฐาน 1613 บน H agar กับ Sporosarcina agar และ Mannitol maltose agar พบว่า *V. hollisae* สามารถเจริญบน H agar ได้ดีกว่า Mannitol maltose agar และ Sporosarcina agar ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1) แต่ไม่พบว่ามีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามได้เลือกใช้ H agar ในการ



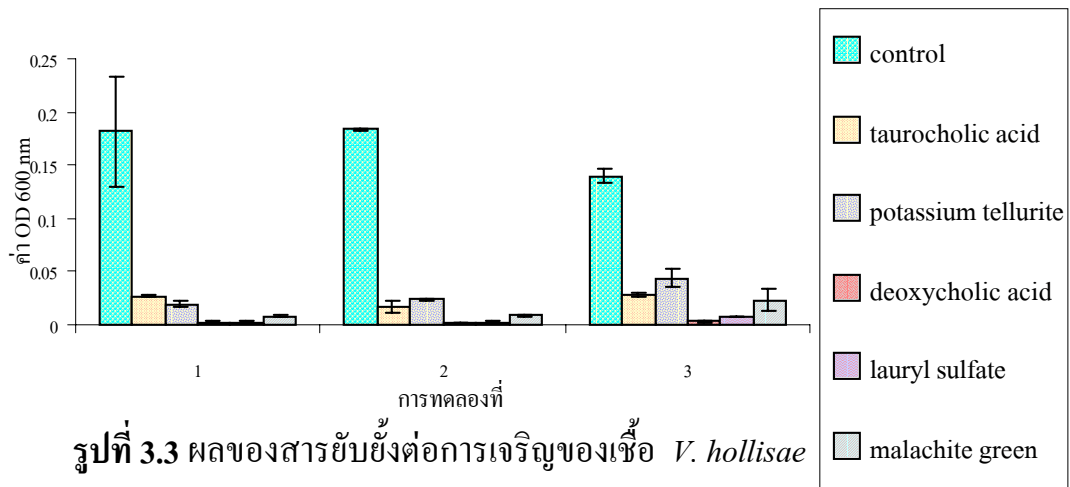
รูปที่ 3.1 ผลของความเข้มข้นของกลีโคต่อการเจริญของเชื้อ *V. hollisae*

หมายเหตุ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) ของแต่ละการทดลอง



รูปที่ 3.2 ผลของ pH ต่อการเจริญของเชื้อ *V. hollisae*

หมายเหตุ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) ของแต่ละการทดลอง



รูปที่ 3.3 ผลของสารยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อ *V. hollisae*

หมายเหตุ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) ของแต่ละการทดลอง

ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบการเจริญของ *V. hollisae* บน H agar กับ Sporosarcina agar และ Mannitol maltose agar

ชนิดของอาหาร	ปริมาณเชื้อที่นับได้ (CFU/ml)		
	การทดลองที่1	การทดลองที่2	การทดลองที่3
H agar	2.1×10^7	2.7×10^7	1.8×10^6
Sporosarcina agar	1.6×10^6 *	2.2×10^6 *	1.2×10^5 *
Mannitol maltose agar	8.7×10^6 *	2.4×10^6 *	7.3×10^5 *

* $P > 0.05$ (F - test)

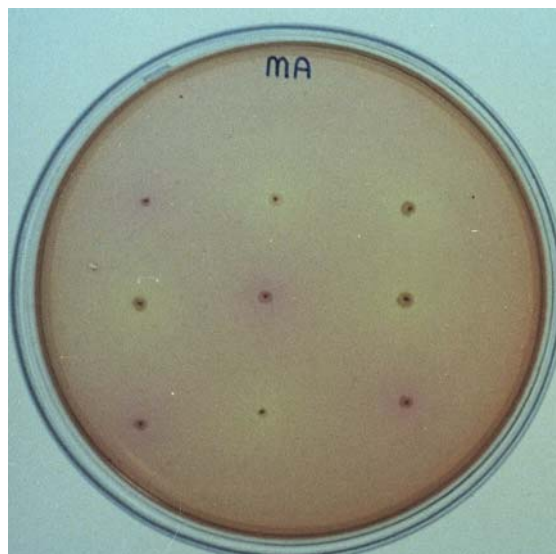
แยกเชื้อ *V. hollisae* จากอาหารทะเล เนื่องจากในการแยกเชื้อจากธรรมชาติหรือสิ่งแวดล้อม มีโอกาสที่จะพบเชื้อได้น้อย จึงจำเป็นที่ต้องเลือกใช้อาหารที่มีโอกาสแยกเชื้อให้ได้มากที่สุด

3.3 การเจริญของ *V. hollisae* บน H agar และ Maltose agar เปรียบเทียบกับ *Vibrio* species และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ

ได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *V. hollisae* 11 สายพันธุ์ กับเชื้อ *Vibrio* 21 สปีชีส์ และเชื้อแบคทีเรียในจิ้นส์อื่น 4 จิ้นส์ บน H agar พบว่าเชื้อ *V. hollisae* ทั้ง 11 สายพันธุ์ สามารถเจริญบน H agar และหมักน้ำตาล arabinose ทำให้โคโลนีมีสีเหลือง (ตารางที่ 3.2) และทุกสายพันธุ์จะให้ลักษณะโคโลนีที่กลม แบน ขอบเรียบ โปร่งใส เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1 - 0.3 มิลลิเมตร เมื่อทิ้งไว้นานเกิน 24 ชั่วโมง จะมีรอยนูนตรงกลาง (รูปที่ 3.4) ส่วน *Vibrio* อีก 22 สปีชีส์พบว่าสามารถเจริญบน H agar ได้ทั้งหมด แต่มีเพียง 4 สปีชีส์เท่านั้นที่สามารถหมักน้ำตาล arabinose (ตารางที่ 3.2) สำหรับแบคทีเรียในจิ้นส์อื่นที่นำมาทดสอบได้แก่ *S. aureus* *E. coli* *S. enteritidis* และ *S. dysenteriae* พบว่าสามารถเจริญได้บน H agar ทั้งหมด แต่มีเพียง *E. coli* และ *S. enteritidis* เท่านั้นที่สามารถหมักน้ำตาล arabinose ซึ่งเชื้อทั้งสองมีลักษณะโคโลนีใหญ่ และกลมมน ซึ่งแตกต่างจาก *V. hollisae* สำหรับการเจริญบน Maltose agar พบว่า *V. hollisae* และ *Vibrio* species ทุกตัวที่ทดสอบ รวมทั้ง *S. aureus* *E. coli* *S. enteritidis* และ *S. dysenteriae* สามารถเจริญได้ทุกตัว แต่ *Vibrio* ทุกตัวที่สามารถหมักน้ำตาล arabinose จะสามารถหมักน้ำตาล maltose ได้ ยกเว้น *V. hollisae* ที่ไม่สามารถหมักน้ำตาล maltose ได้และให้โคโลนีสีชมพู (รูปที่ 3.5) ทำให้สามารถใช้ Maltose agar คัดเลือก *V. hollisae* ออกจาก *Vibrio* species อื่นได้



รูปที่ 3.4 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *V. hollisae* บน H agar



รูปที่ 3.5 โคโลนีของเชื้อ *V. hollisae* ซึ่งไม่สามารถหมักน้ำตาล maltose บนอาหาร Maltose agar เปรียบเทียบกับเชื้อที่สามารถหมักน้ำตาล maltose

ตารางที่ 3.2 ผลการเพาะเชื้อ *V. hollisae* 11 สายพันธุ์ บน H agar และ Maltose agar เปรียบเทียบกับ *Vibrio* species และแบคทีเรียในจลิน์อื่นๆ

เชื้อ	การเจริญบน H agar	การหมักน้ำตาล arabinose	การเจริญบน Maltose agar	การหมักน้ำตาล maltose
<i>V. hollisae</i> 1613 (C)	+	AF	+	NMF
<i>V. hollisae</i> 1614 (C)	+	AF	+	NMF
<i>V. hollisae</i> 1615 (C)	+	AF	+	NMF
<i>V. hollisae</i> 1616 (C)	+	AF	+	NMF
<i>V. hollisae</i> 1617 (C)	+	AF	+	NMF
<i>V. hollisae</i> 1618 (C)	+	AF	+	NMF
<i>V. hollisae</i> 1619 (C)	+	AF	+	NMF
<i>V. hollisae</i> 1626 (C)	+	AF	+	NMF
<i>V. hollisae</i> 1627 (C)	+	AF	+	NMF
<i>V. hollisae</i> 1628 (C)	+	AF	+	NMF
<i>V. hollisae</i> 3209 (E)	+	AF	+	NMF
<i>V. fluvialis</i>	+	AF	+	MF
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	AF	+	MF
<i>V. vulnificus</i>	+	NF	+	MF
<i>V. damsela</i>	+	NF	+	MF
<i>V. furnissii</i>	+	AF	+	MF
<i>V. alginolyticus</i>	+	NF	+	NMF
<i>V. mimicus</i>	+	NF	+	MF
<i>V. metschnikovii</i>	+	NF	+	MF
<i>V. navarrensis</i>	+	NF	+	NMF
<i>V. cincinnatiensis</i>	+	AF	+	MF
<i>V. cholerae</i> O1	+	NF	+	MF
<i>V. cholerae</i> O139	+	NF	+	MF
<i>V. cholerae</i> non-O1	+	NF	+	MF
<i>V. carchariae</i>	+	NF	+	MF

เชื้อ	การเจริญบน H agar	การใช้น้ำตาล arabinose	การเจริญบน Maltose agar	การหมักน้ำตาล maltose
<i>V. harveyi</i>	+	NF	+	MF
<i>V. orientalis</i>	+	NF	+	NMF
<i>V. splendidus</i>	+	NF	+	MF
<i>V. pelagius</i>	+	NF	+	NMF
<i>V. mytilii</i>	+	NF	+	MF
<i>V. proteolyticus</i>	+	NF	+	NMF
<i>V. nereis</i>	+	NF	+	ND
<i>V. mediterranei</i>	+	NF	+	ND
<i>V. ordalii</i>	+	NF	+	ND
<i>V. campbellii</i>	+	NF	+	MF
<i>S. aureus</i>	+	NF	+	MF
<i>E. coli</i>	+	AF	+	NMF
<i>S. enteritidis</i>	+	AF	+	ND
<i>S. dysenteriae</i>	+	NF	+	ND

(C) = Clinical strain

(E) = Environmental strain

+ = growth

AF = Arabinose Fermenter

NAF = Non Arabinose Fermenter

MF = Maltose Fermenter

NMF = Non Maltose Fermenter

ND = Not Done

3.4 ผลการแยกเชื้อ *V. hollisae* ในอาหารทะเลโดยใช้ H agar

ได้ทำการแยกเชื้อ *V. hollisae* จากตัวอย่างอาหารทะเลทั้งสิ้น 448 ตัวอย่าง เป็นปลา 191 ตัวอย่าง หอย 237 ตัวอย่าง ปู 13 ตัวอย่าง กุ้ง 4 ตัวอย่าง และกิ้ง 3 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2543 - เดือนกุมภาพันธ์ 2544 พบเชื้อที่สามารถ

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างอาหารทะเลที่นำมาตรวจหาเชื้อ *V. hollisae* และผลการทดสอบ

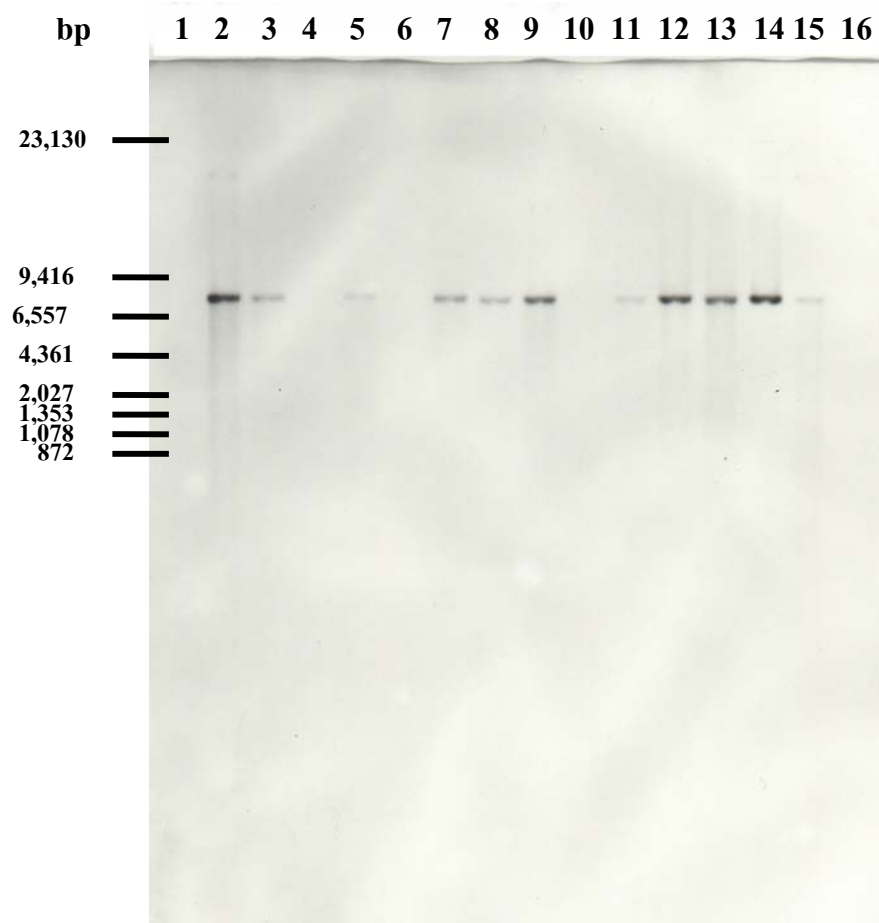
ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (%)	arabinose fermenter และ maltose-nonfermenter		จำนวนสายพันธุ์ที่ให้ผลบวก			จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ (ผล PCR ใน APW ให้ผลบวก)
		จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก(%)	จำนวนสายพันธุ์ที่ให้ผลบวก(%)	TSI (K/A)	ชีวเคมี	PCR	
ปลา	191(42.6)	76(46.6)	177(45.2)	50	5	0	96(1)
หอย	237(52.9)	77(47.3)	197(50.2)	28	3	0	111(0)
ปู	13(2.9)	7(4.3)	11(2.8)	2	0	0	10(0)
กุ้ง	4(0.9)	1(0.6)	1(0.3)	1	1	0	4(0)
กิ้ง	3(0.7)	2(1.2)	6(1.5)	1	0	0	3(0)
รวม	448(100)	163(100)	392(100)	82	9	0	224(1)

หมักน้ำตาล arabinose แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาล maltose ในตัวอย่างหอยมากที่สุดคือ 77 ตัวอย่าง รองลงมาคือปลา ปู กุ้ง และกุ้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 3.3) จำนวนสายพันธุ์พบมากที่สุดในตัวอย่างหอย 197 สายพันธุ์ รองลงมาคือปลา 177 สายพันธุ์ ปู 11 สายพันธุ์ กุ้ง 6 สายพันธุ์ และกุ้ง 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบ TSI พบว่าจำนวนสายพันธุ์ที่ให้ผล TSI เป็นแบบ alkaline slant acid butt (K/A) มีเพียง 82 สายพันธุ์ โดยพบในปลามากที่สุดคือ 50 สายพันธุ์ รองลงมาคือหอย 28 สายพันธุ์ แต่เมื่อนำสายพันธุ์ทั้งหมดมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกจากตัวอย่างปลา 5 สายพันธุ์ จากตัวอย่างหอย 3 สายพันธุ์ และจากตัวอย่างกุ้ง เพียง 1 สายพันธุ์ เท่านั้นแต่เมื่อนำไปตรวจยืนยัน โดยวิธี PCR พบว่าให้ผลลบทุกสายพันธุ์

และจากการตรวจหาเชื้อ โดยตรงจาก APW ที่ผ่านการบ่มเพาะเชื้อมานาน 6 ชั่วโมง เมื่อนำมาทำ PCR โดยตรงและทำ electrophoresis พบผลบวกจากปลาหัวอ่อนเพียง 1 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างที่นำมาทดสอบทั้งสิ้น 224 ตัวอย่าง แต่ไม่สามารถแยกเชื้อดังกล่าวออกมาได้

3.5 ผลการตรวจหาจีน *tdh* บนโครโมโซมอลดีเอนเอและพลาสมิดของเชื้อ *V. hollisae*

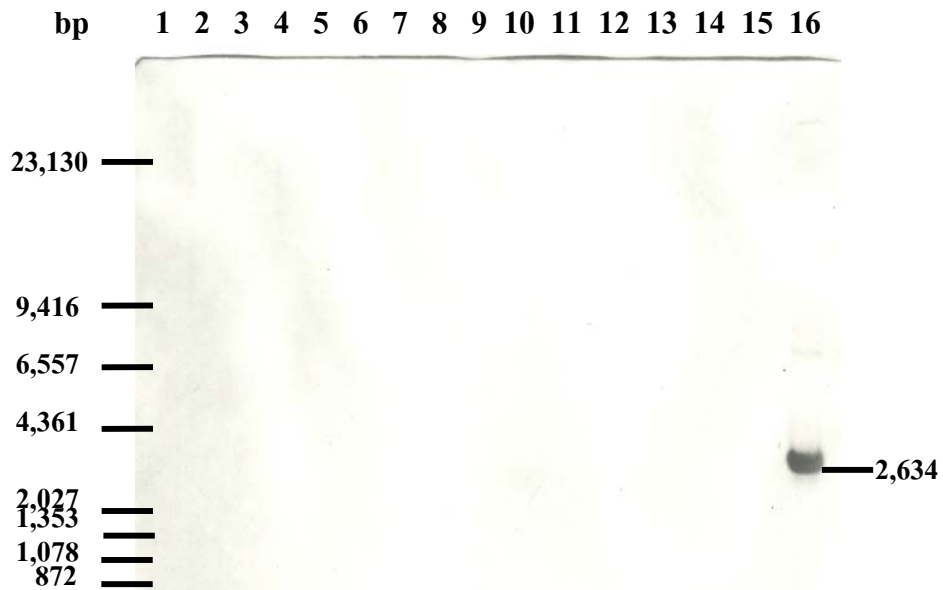
จากการตรวจหาจีน *tdh* บนโครโมโซมอลดีเอนเอของเชื้อ *V. hollisae* 11 สายพันธุ์คือ *V. hollisae* 1613 *V. hollisae* 1614 *V. hollisae* 1615 *V. hollisae* 1616 *V. hollisae* 1617 *V. hollisae* 1618 *V. hollisae* 1619 *V. hollisae* 1626 *V. hollisae* 1627 *V. hollisae* 1628 และ *V. hollisae* 3209 และจากพลาสมิดของเชื้อ *V. hollisae* 1614 *V. hollisae* 1615 *V. hollisae* 1618 และ *V. hollisae* 3209 โดยวิธี Southern blot hybridization พบจีน *tdh* บนโครโมโซมอลดีเอนเอของเชื้อ *V. hollisae* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ แต่ไม่พบจีน *tdh* บนส่วนของพลาสมิด (รูปที่ 3.6)



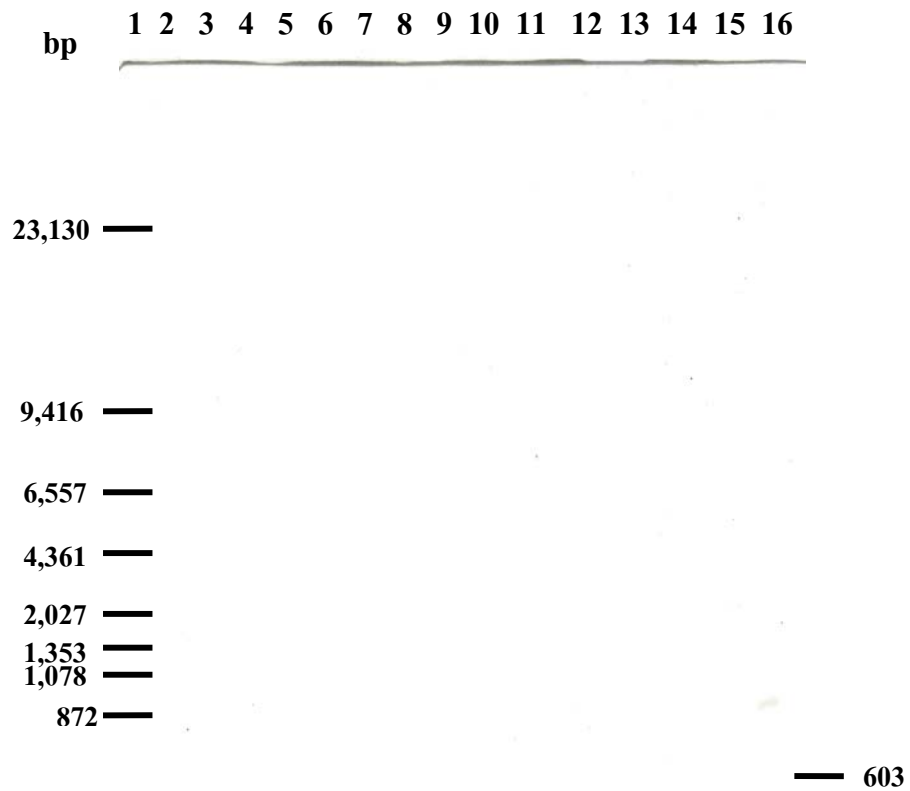
รูปที่ 3.6 ผลการตรวจหาจีน *tdh* บนโครโมโซมและพลาสมิดของ *V. hollisae*

3.6 ผลการตรวจหาจีโนมของ phage Vf33 บนโครโมโซมอลดีเอนเอและพลาสมิดของ *V. hollisae*

จากการตรวจหาจีโนมของ phage Vf33 ตรงตำแหน่ง conserved region ขนาด 2,634 bp (Vf1) และ distinctived region ขนาด 579 bp (Vf2) บนโครโมโซมอลดีเอนเอและพลาสมิดของเชื้อ *V. hollisae* 11 สายพันธุ์ ไม่พบส่วนของ conserved region และ distinctived region ของ bacteriophage Vf33 ทั้งในส่วนของโครโมโซมอลดีเอนเอและพลาสมิดของเชื้อ *V. hollisae* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ (รูปที่ 3.7 และ 3.8)



รูปที่ 3.7 ผลการตรวจหาจีโนม bacteriophage Vf 33 ส่วนที่เป็น conserve region (Vf1) บนโครโมโซมและพลาสมิดของ *V. hollisae*



รูปที่ 3.8 ผลการตรวจหาจีน bacteriophage Vf 33 ส่วนที่เป็น distinctive region (Vf2) บนโครโมโซมและพลาสมิดของ *V. hollisae*