

อนุกรมวิธานแบบนิวเมอริคัลของเชื้อจุลินทรีย์ในสกุลลิวรีโอจากอ่าวไทยตอนใน



นางสาวหทัย อังกูระ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974-567-635-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012882

I10299543

NUMERICAL TAXONOMY OF MARINE BACTERIA IN GENUS VIBRIO
FROM THE INNER GULF OF THAILAND

MISS PATCHAREE ANGKURA

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Department of Marine science

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-567-635-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์ อนุกรมวิธานแบบนิวเมอริคัลของเชื้อจุลินทรีย์ในสกุล *Vibrio* จาก
 อ่าวไทยตอนใน
 ชื่อนิสิต นางสาวพัชรี อังฤทธิ์
 อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.เกรียงศักดิ์ สายธนู
 ศาสตราจารย์ ดร.ทวีศักดิ์ ปิยะกาญจน์
 ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล
 ปีการศึกษา 2529



บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาอนุกรมวิธานแบบนิวเมอริคัลของเชื้อ *Vibrios* ที่แยกได้จาก
 สิ่งแวดล้อมในธรรมชาติจากอ่าวไทยตอนใน จำนวน 97 สายพันธุ์ (strains) และ
 เชื้อที่ได้ทำการพิสูจน์แล้วจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 15 สายพันธุ์ (strains)
 โดยทำการศึกษาลักษณะทั้งสิ้น 160 ลักษณะ การคำนวณค่าความคล้ายคลึงกันระหว่าง
 สายพันธุ์ (strains) ใช้ Jaccard coefficient จัดกลุ่มโดยใช้ Unweight
 average linkage ผลการศึกษาพบว่า ที่ระดับความคล้ายคลึงกัน 75% เชื้อจะ
 รวมกลุ่มกันได้ 10 กลุ่ม มีจำนวน 104 สายพันธุ์ (strains) จากจำนวนเชื้อทั้งหมด
 112 สายพันธุ์ (strains) โดยพบว่า Cluster A คือ *Vibrio*
alginolyticus, Cluster B คือ *V. parahaemolyticus*, Subcluster 1D
 คือ *V. vulnificus*, Cluster E คือ *V. cholerae* และ Cluster I คือ
V. fluvialis สำหรับ Cluster C, Subcluster 2D, 3D, Cluster F, G
 H และ J ไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็นเชื้อ *Vibrios* ชนิดใด ซึ่งอาจเป็นเชื้อ
Vibrios ชนิดใหม่

เชื้อ *Vibrios* ที่ตรวจสอบบน Thiosulfate-citrate-bile salt-
 sucrose agar (TCBS) ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเล, ตะกอนดิน, หอยแมลงภู่, หอย-
 นางรม และ ปลาทรายขาว จำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม ตามลักษณะของ colony คือ
 กลุ่มแรก เป็นกลุ่มที่มี colony เป็นสีเขียวใส มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-4
 มม. (Vp) กลุ่มที่สอง มี colony เป็นสีเหลืองปนขาว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ

4 - 6 มม. (MV-1) กลุ่มที่สาม มี colony สีเหลือง ตรงกลางยกนูนขึ้นเป็นปุ่ม (umbonate) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มม. (MV-2) กลุ่มที่สี่ มี colony สีเหลืองใสขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 มม. (MV-3) กลุ่มที่ห้า มี colony สีเขียวใส ขนาดเล็กกว่ากลุ่มแรก คือ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5-2 มม.

ปริมาณค่าเฉลี่ยเชื้อ Marine Vibrios ที่พบในตัวอย่าง เรียงลำดับจากมากไปหาน้อย คือ ปลาทรายขาว, หอยแมลงภู, กุ้ง, น้ำ และ หอยนางรม ซึ่งจะมีปริมาณ 4.6×10^5 colony/g., 1.4×10^5 colony/g., 4.3×10^4 colony/g., 3.0×10^4 colony/g., และ 4.1×10^3 colony/g. ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Numerical Taxonomy of Marine Bacteria in Genus
Vibrio from the Inner Gulf of Thailand

Name Miss Patcharee Angkura

Thesis Advisor Instructor Kriengsag Saitanu DVM., Ph.D.
Professor Twesukdi Piyakarnchana, Ph.D.

Department Marine Science

Academic Year 1986




Abstract

A total of 97 strains of Marine Vibrios isolated from environmental source in the Inner Gulf of Thailand and confirmed Vibrios strains from Department of Medical Scientist 15 strains were compared in Numerical Taxonomyic study using 160 characters. Similarity between strains were computed by using the Jaccard coefficient. Strains were clustered by unweight average linkage. A total of 104 strains from 112 strains studied were divided into 10 clusters at 75 % level of similarity. Cluster A was identified as Vibrio alginolyticus, Cluster B as V. parahaemolyticus, Subcluster 1D as V. vulnificus, Cluster E as V. cholerae and Cluster I as V. fluvialis. Cluster C, Subcluster 2D, 3D, Cluster F, G, H and J were unidentified Vibrios which may be new Vibrio spp.

Marine Vibrios isolated from sea water, sediment, green mussel, oyster, and marine fish (Lattice monocle bream) by spreading plate on Thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose agar (TCBS) were divided into 5 groups. Colonies of the first group were green, 2-4 mm. in diameter(Vp). Colonies of the second group

were yellowish white, 4-6 mm. in diameter (MV-1). Colonies of the third group were yellow, umbonate, 3-5 mm. in diameter (MV-2). Colonies of the fourth group were yellow, 1.5 mm. in diameter (MV-3). Colonies of the fifth group were green, 1.5-2 mm. in diameter (MV-4).

The average number of Marine Vibrios in marine fish, green mussel, sediment, sea water and oysters were 4.6×10^5 colony/g., 1.4×10^5 colony/ g., 4.3×10^4 colony/g., 3.0×10^4 colony/ ml. and 4.1×10^3 colony/ g. respectively.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.เกรียงศักดิ์ สายธนู อาจารย์
ที่ปรึกษา และ ควบคุมงานวิจัย ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ทวีศักดิ์ ปิยะกาญจน์
อาจารย์ที่ปรึกษาภาควิชา และ ควบคุมงานวิจัย ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์
สุทธิชัย เตมีวรรณชัย ผู้ล่วงลับไปแล้ว ที่ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่าง และ ให้ความสนับสนุน
เป็นอย่างดี ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพล สุการา และ แพทย์หญิง
มล. รัตนสุภา พันธุ์ไธโร ที่ได้กรุณาให้ค่าปรึกษาแนะนำ และ แก้ววิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุเมธ วัชรระชัยสุรพล ขอขอบคุณ คุณสมศักดิ์
เหรียญทอง ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เครื่อง -
คอมพิวเตอร์

ขอขอบคุณ คุณชวนชื่น ทองจันทร์ ที่ได้ช่วยเหลือในการพิมพ์วิทยานิพนธ์ให้สำเร็จ
ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่านในสังกัดหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับคำปฏิบัติ-
การในระหว่างการวิจัย

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในการ
ทำวิทยานิพนธ์

ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ บิคา-มารคา ซึ่งสนับสนุนด้านการเงินแก่ผู้วิจัย
จนสำเร็จการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ



	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
รายการตารางประกอบ	ญ
รายการรูปประกอบ	ฉ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 อุปกรณ์ และ วิธีการ	15
3 ผลการทดลอง	50
4 วิเคราะห์ผลการทดลอง	85
5 สรุปผลการทดลอง และ ข้อเสนอแนะ	105
บรรณานุกรม	109
ภาคผนวก ก	121
ข	125
ค	144
ประวัติ	149

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

รูปที่

	หน้า
1 ลักษณะต่างๆที่ใช้ในการพิสูจน์เชื้อ Vibrios	12-14
2 ลักษณะ colony ของเชื้อ Vibrios 5 กลุ่ม ที่จำแนก ได้บน TCBS	26
3 จำนวนเชื้อ Vibrios แต่ละกลุ่มตามลักษณะครั้งแรกที่พบ (Primary culture) จากตัวอย่างชนิดต่างๆ	27
4 แหล่งที่มาของเชื้อที่ทำการศึกษา	28-32
5 รายละเอียดของเชื้อ Vibrios ที่พิสูจน์แล้ว และ Reference strain.....	33
6 ลำดับการทดสอบทางชีวเคมี และจำนวนลักษณะที่ทำการศึกษา..	47-48
7 ปริมาณเชื้อ sucrose-negative Vibrios และ sucrose-positive Vibrios ในตัวอย่างต่างๆ.....	51
8 ปริมาณเชื้อ vibrios ที่ได้จากการลุ่มตัวอย่าง Marine Vibrios แต่ละกลุ่ม ของตัวอย่างในธรรมชาติ.....	52-54
9 ลักษณะของ เชื้อ Vibrios ทั้ง 10 Clusters	58-71
10 ลักษณะสำคัญของ เชื้อ Vibrios ทั้ง 10 Clusters ..	72-73
11 เชื้อ Vibrios ใน Cluster A	74
12 เชื้อ Vibrios ใน Cluster B	76
13 เชื้อ Vibrios ใน Cluster C,E,F&H	77
14 เชื้อ Vibrios ใน Subcluster 1D, 2D และ 3D	78
15 เชื้อ Vibrios ใน Cluster G	81
16 เชื้อ Vibrios ใน Cluster I และ J	82
17 เชื้อ Vibrios ที่ไม่รวมกับ Clusters อื่นๆ	84

รายการรูปประกอบ

รูปที่

หน้า

1	Scheme for preliminary identification of species of Vibrionaceae	11
2	แผนที่แสดงสถานีเก็บตัวอย่าง หอยแมลงภู่น้ำ และ กิน ในบริเวณอ่าวบ้านแหลม จ. เพชรบุรี.....	19
3	แผนที่แสดงสถานีเก็บตัวอย่าง หอยแมลงภู่น้ำ และ หอยนางรม ในบริเวณอ่างศิลา, อ. เมือง จ. ชลบุรี.....	20
4	แผนที่แสดงสถานีเก็บตัวอย่าง กิน และ น้ำ ในบริเวณ ปากแม่น้ำปราณบุรี อ. ปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์	21
5	แผนที่แสดงสถานีเก็บตัวอย่าง ปลาทรายขาว, โคยการ ลากอวน ในบริเวณอ่าวไทยตอนใน (zone A).....	22
6	Dendrogram สร้างจาก Jaccard coefficient โดยใช้ Unweight average linkage.....	56
7	Simplified dendrogram ของเชื้อ Vibrios ที่ทำการศึกษา โดยใช้ Unweight average linkage.....	57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย