บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ ตามวิธี Numerical Taxonomy ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ ใช้เชื้อทั้งหมดจำนวน 100 สายพันธุ์ กับการทดลอง 163 ลำดับการทดสอบ ได้ผลการจัดแบ่งกลุ่ม ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2 และ 3 ผลการทดสอบกลุ่มลักษณะของเชื้อ Pseudomonas spp. แสดงไว้ในตารางที่ 5 สามารถแบ่งกลุ่มตามเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงได้จำนวน 13 กลุ่มตามวิธี S_j/UPGMA คือ กลุ่มที่ 1,2,3,4,5,7,8,9,10,11 และ 12 เป็นเชื้อ P. pseudomallei, P. cepacia ,P. putida, P. fluorescens, P. aeruginosa , P. pickettii,Pseudomonas species group VE-2, P. stutzeri, P. diminuta,P.maltophilia,P.alcaligenes และ P.acidovorans และอีก 1 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Unclassified Pseudomonas

เชื้อในกลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อ P. pseudomallei มีลักษณะเมื่อย้อมด้วยสีกรัมคล้ายเชื้อในกลุ่มที่ 2 P. cepacia ซึ่งจะติดสีหัวท้าย(bipalar) เหมือนกัน และ มีลักษณะโคโลนีคล้ายเชื้อในกลุ่มที่ 9 P. stutzeri โดยมีลักษณะโคโลนีที่เหี่ยวย่นเหมือนกัน ข้อแตกต่างของเชื้อดังกล่าว คือเชื้อในกลุ่มที่ 1(P. pseudomallei) และกลุ่มที่ 2 (P. cepacia) มีจำนวนแฟลกเจลลามากกว่าหนึ่งเส้น ส่วนกลุ่มที่ 9 (P. stutzeri)มีจำนวนแฟลกเจลลาหนึ่งเส้น เชื้อในกลุ่มที่ 1 ให้ผลบวกต่อการทดสอบ Arginine dihydrolase,กลุ่มที่ 2 ให้ผลลบ ส่วนกลุ่มที่ 9 มีเพียง 1 สายพันธุ์ที่ให้ผลบวก เชื้อในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 9 สามารถ Denitrification ส่วนกลุ่มที่ 2 ไม่สามารถ Denitrification กลุ่มที่ 1 สามารถ Hydrolyse gelatin ส่วนกลุ่มที่ 2และ 9 มีเพียงกลุ่มละ 1 สายพันธุ์ที่สามารถ Hydrolyse gelatin เชื้อในกลุ่มที่ 9 สามารถ Hydrolyse starch ส่วนกลุ่มที่ 1 และ 2 ให้ผลลบ เชื้อกลุ่มที่2 สามารถใช้ Adonitol , Saccharose , m-hydroxybenzoate เป็น

แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ส่วนเชื้อในกลุ่มที่ 1 สามารถใช้ Adonitol 17 สายพันธุ์ใน 43 สายพันธุ์ที่ทดสอบ,Saccharose 23 สายพันธุ์ใน 43 สายพันธุ์ที่ทดสอบ , และไม่สามารถใช้ m-hydroxybenzoate ส่วนกลุ่มที่ 9 ไม่สามารถใช้ Adonitol,Ribose , m-hydroxybenzoate และสามารถใช้ Saccharose และ Xylose เพียง 1 สายพันธุ์ สำหรับข้อแตกต่างระหว่าง P. pseudomallei, P. cepacia และ P. stutzeri แสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ลักษณะที่แตกต่างของเชื้อ P. pseudomallei, P. cepacia และ P. stutzeri

กลุ่มลักษณะ	P. pseudomallei (43 สายพันธุ์)	P. cepacia (5 สายพันธุ์)	P. stutzeri (5 สายพันธุ์)
-Number of flagella :			
1 flagella	- (0%)	- (0%)	+ (100%)
>1 flagellas	+ (100%)	+ (100%)	- (0%)
-Arginine dihydrolase	+ (100%)	- (0%)	- (20%)
-Denitrification	+ (100%)	- (0%)	+ (100%)
-Gelatin hydrolysis	+ (100%)	∓ (20%)	∓ (20%)
-Starch hydrolysis	- (0%)	- (0%)	+ (100%)
-Sole carbon source:			
Adonitol	∓ (39.5%)	+ (100%)	- (0%)
Ribose	+ (88.4%)	± (60%)	- (0%)

ตารางที่ 7 (ต่อ)

กลุ่มลักษณะ	P. pseudomallei (43 สายพันธุ์)	P. cepacia (5 สายพันธุ์)	P. stutzeri (5 สายพันธุ์)
Saccharose	± (53.5%)	+ (100%)	∓ (20%)
Xylose	- (9.3%)	± (80%)	∓ (20%)
m-hydroxybenzoate	- (0%)	+ (100%)	- (0%)

กลุ่มที่ 4 P. fluorescens จากตาราง Dendrogram (รูปที่ 3) เมื่อจัดแบ่งกลุ่มแบบ S_{sm} /UPGMA จะเห็นได้ว่าอยู่ในกลุ่มที่ 9 แบ่งออกเป็น 2 subclusters เมื่อตัดแบ่งกลุ่มที่ระดับความคล้ายคลึง 73 เปอร์เซนต์ได้ subcluster A ประกอบ P. fluorescens ATCC 13525 และ P80 กับเชื้อใน subcluster B ซึ่งประกอบด้วยเชื้อในสายพันธุ์ P81, P83, P82 เชื้อทั้ง 2 subclusters เป็นเชื้อ P. fluorescens สามารถสร้างรงควัตถุชนิด fluorescein ใน King B medium ไม่สามารถ denitrify ใน P. fluorescens สายพันธุ์ที่ P81, P82 และ P83 ส่วนสายพันธุ์ P80 และ P. fluorescens ATCC 13525 สามารถ denitrify Stanier และคณะ (26) ได้จัดสายพันธุ์ที่ไม่สามารถ denitrify ไว้ใน P. fluorescens biotype I ข้อแตกต่างระหว่างเชื้อ P. fluorescens biotype I,III และ IV ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงความแตกต่างกันของเชื้อ P. fluorescens biotype I, III และ IV

สายพันธุ์	P81,P82,P83	P. fluorescens ATCC 13525	P80
biotype	I	III	IV
Characters			
Denitrification	-	+	+
Sole carbon source :			
Arabinose	+	-	+
Adonitol	+	+	-
Butyrate	-	-	+
Saccharose	+	-	+
Sorbitol	+	-	+

เชื้อในกลุ่มที่ 3,4 และ5 มีลักษณะคล้ายกันในส่วนของความสามารถในการสร้างรงควัตถุชนิด Pyocyanin ใน King A medium และ fluorescein ใน King B medium มีข้อแตกต่างกันคือ เชื้อในกลุ่มที่ 3 และ 4 มีแฟลกเจลลามากกว่า 1 เส้น ส่วนกลุ่มที่ 5 มีเพียง 1 เส้น กลุ่มที่ 5 มีรงควัตถุชนิด Pyocyanin และไม่มีรงควัตถุชนิด Fluorescein ส่วนในกลุ่มที่ 3 มีรงควัตถุชนิด Pyocyanin 4 สายพันธุ์ จาก 5 สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ และมีรงควัตถุชนิด Fluorescein จำนวน 1 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ P57 จัดเป็น

P.putida biotype A Stanier และคณะ(26) ส่วนในกลุ่มที่ 4 ทุกสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุชนิด Fluorescein และไม่มีรงควัตถุชนิด Pyocyanin นอกจากนี้ในกลุ่มที่ 5 ให้การทดสอบที่เป็นบวกกับ Malonate test, Denitrification, Arginine dihydrolase, Gelatin liquefation, Polysorbate(Tween)80 hydrolysis, Growth at 42 C สำหรับข้อแตกต่างของเชื้อในกลุ่มที่3 (P. putida), กลุ่มที่ 4 (P.fluorescens) และ กลุ่มที่ 5 (P. aeruginosa) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงความแตกต่างของเชื้อ P. putida, P. fluorescens P. aeruginosa

สายพันธุ์	P.putida 5 สายพันธุ์	P. fluorescens 5 สายพันธุ์	P. aeruginosa 5 สายพันธุ์
Characters			
Number of flagella:			
1 flagella	- (0%)	- (0%)	+ (100%)
>1 flagellas	+ (100%)	+ (100%)	- (0%)
Pyocyanin	- (0%)	- (0%)	+ (100%)
Fluorescein	± (80%)	+ (100%)	- (0%)
Malonate test	± (60%)	± (60%)	+ (100%)
Denitrification	- (0%)	∓ (40%)	+ (100%)
Arginine dihydrolase	± (80%)	+ (100%)	+ (100%)

ตารางที่ 9 (ต่อ)

สายพันธุ์	P.putida 5 สายพันธุ์	P. fluorescens 5 สายพันธุ์	P. aeruginosa 5 สายพันธุ์
Gelatin liquefation	- (0%)	+ (100%)	+ (100%)
Polysorbate (Tween) 80 hydrolysis	∓ (20%)	± (80%)	+ (100%)
Growth at 4°C	± (80%)	+ (100%)	- (0%)
Growth at 42°C	- (0%)	- (0%)	+ (100%)

กลุ่มที่ 6 เป็นเชื้อ Pseudomonas sp. มีเพียง 2 สายพันธุ์ จากการศึกษาแบบ S_j และจัดกลุ่มโดยวิธี Unweight Pair Group Method with Arithmetic Average Linkage Technique รวมเป็นกลุ่มเดียวกันที่ระดับความคล้ายคลึง 56.5 % เนื่องจากมีเพียง 2 สายพันธุ์ จึงไม่สามารถสรุปเป็นสปีชีส์ใดได้(73)

เชื้อในกลุ่มที่ 10 (P. diminuta),12 (P. alcaligenes) และกลุ่มที่ 13 (P. acidovorans) คล้ายกันในส่วนของไม่สามารถผลิตกรดจากสารประกอบคาร์โบไฮเดรท และการทดสอบดูการผลิตกรดใน OF medium พบว่าทุกสายพันธุ์ให้ด่างต่อการทดสอบนี้ ข้อแตกต่างของเชื้อในกลุ่มเหล่านี้คือ เชื้อในกลุ่มที่ 10 ทุกสายพันธุ์มีแฟลกเจลลา 1 เส้นสามารถใช้ Phenol เป็นแหล่งพลังงาน สามารถเจริญได้ในปริมาณเกลือ NaCl 5 % และใน pH 5ในกลุ่มที่ 12 มีแฟลกเจลลา 1 เส้น สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 5 และ ในอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อในกลุ่มที่ 13 มีหนึ่งสายพันธุ์ที่มี แพลกเจลลา 1 เส้น และ 4 สายพันธุ์ที่มีแฟลกเจลลา มากกว่า 1 เส้น

สามารถผลิตกรดจาก Fructose, Mannitol สำหรับข้อแตกต่างของเชื้อในกลุ่มที่ 10,12 และ 13 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงความแตกต่างของเชื้อ P. diminuta, P. alcaligenes P. acidovorans

สายพันธุ์	P.diminuta 5 สายพันธุ์	P. alcaligenes 5 สายพันธุ์	P. acidovorans 5 สายพันธุ์
Characters			
Number of flagella:			
1 flagella	+ (100%)	+ (100%)	∓ (20%)
>1 flagellas	- (0%)	- (0%)	± (80%)
Acid production :			
Fructose	- (0%)	- (0%)	+ (100%)
Mannitol	- (0%)	- (0%)	+ (100%)
Sole carbon source:			
Phenol	+ (100%)	- (0%)	- (0%)
Growth at NaCl 5 %	+ (100%)	- (0%)	- (0%)
Growth at pH 5	+ (100%)	+ (100%)	- (0%)
Growth at 42° C	- (0%)	+ (100%)	- (0%)