

2. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

เมื่อทำการจัดจำแนกในระดับสกุล (genera) ของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) และการเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่า แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ PR-2, MG-2, IFS-1 และ IG-3 ติดสีแกรมบวก ไอโซเลท PR-2 และ MG-2 มีรูปร่างกลม (cocci) หรือไข่ (ovoid) การเรียงตัวเป็นคู่ (pair) และกลุ่ม ในขณะที่ไอโซเลท IFS-1 และ IG-3 มีรูปร่างท่อนสั้น มักอยู่เป็นคู่และกลุ่ม แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์ ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท ดังแสดงในภาพที่ 6-9 ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ การทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) การผลิตเอนไซม์อะมัยเลส (catalase) และการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จากน้ำตาลกลูโคส ดังตารางที่ 5 เมื่อพิจารณาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสพบว่า มีเพียงไอโซเลท PR-2 เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบการเจริญของแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ได้แก่ PR-2 และ MG-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 6.5 เปอร์เซ็นต์ พบการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 18 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5 พบการเจริญของไอโซเลท PR-2, IFS-1 และ IG-3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 9.6 พบการเจริญของไอโซเลท PR-2 และ MG-2 แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท ให้ผลการทดสอบอะมัยเลสเป็นลบ และเมื่อทำการตรวจสอบความสามารถในการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จากกลูโคสพบว่า แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทนี้ ไม่สามารถสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคสได้ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทนี้ เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์อะมัยเลสได้ และเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่ม homofermentative

จากข้อมูลเบื้องต้นดังกล่าว เมื่อทำการจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก ตามวิธีของ Axelsson (2004) สันนิษฐานว่า ไอโซเลท PR-2 ซึ่งมีรูปร่างกลม สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5 และ 9.6 แต่ไม่เจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซ็นต์ มีความใกล้เคียงกับสกุล *Enterococcus* สำหรับไอโซเลท IFS-1 และ IG-3 ซึ่งมีรูปร่างท่อนสั้น เจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5 นั้น มีความใกล้เคียงกับสกุล *Lactobacillus* ในขณะที่ไอโซเลท MG-2 มีผลการทดลองที่ไม่สอดคล้องกับสกุลใด

แสดงให้เห็นว่า การจัดจำแนกเบื้องต้นไม่เพียงพอสำหรับการจัดจำแนกในระดับสกุล และระดับสปีชีส์ ดังนั้นจึงได้นำแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท มาจัดจำแนกในระดับโมเลกุลโดยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่สภาวะต่างๆ

ลักษณะการทดสอบ	ไอโซเลท			
	PR-2	MG-2	IFS-1	IG-3
เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์				
การติดสีแกรม ^a	+	+	+	+
รูปร่าง	กลม	กลม	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น
การเรียงตัว	คู่ และกลุ่ม	คู่ และกลุ่ม	คู่ และกลุ่ม	คู่ และกลุ่ม
การเคลื่อนที่ ^b	-	-	-	-
การสร้างสปอร์ ^c	-	-	-	-
การเจริญที่อุณหภูมิ ^d				
10 องศาเซลเซียส	+	-	-	-
45 องศาเซลเซียส	+	+	-	-
การเจริญในอาหารที่มี NaCl ^d				
6.5 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+
18 เปอร์เซ็นต์	-	-	-	-
การเจริญที่พีเอช ^d				
4.5	+	-	+	+
9.6	+	+	-	-
การทดสอบกะตะเลส ^e	-	-	-	-
การสร้าง CO ₂ จากกลูโคส ^f	-	-	-	-

หมายเหตุ ^a + ติดสีแกรมบวก, - ติดสีแกรมลบ

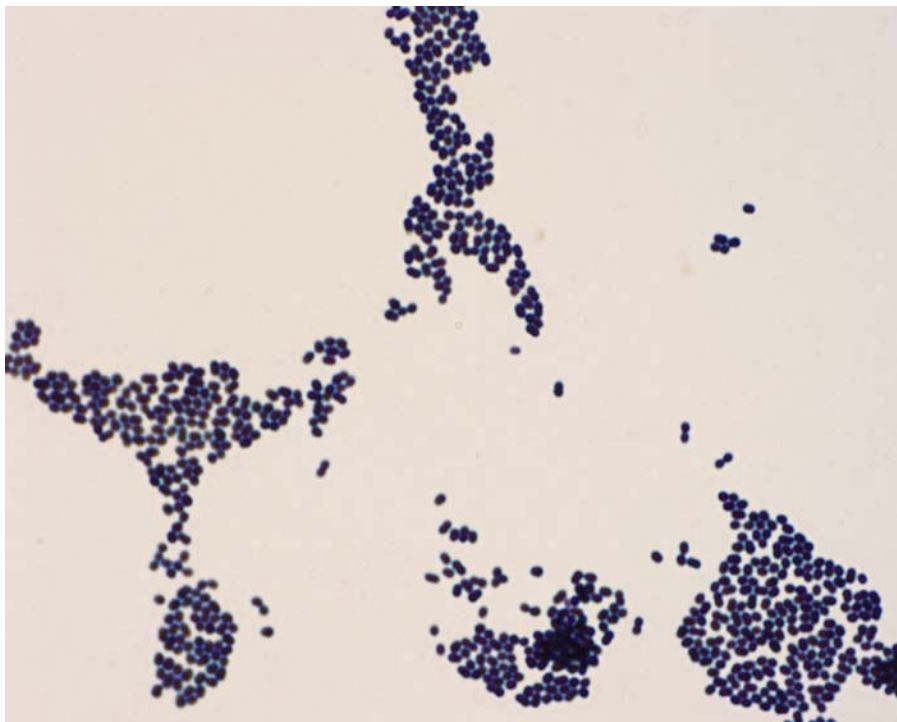
^b + เคลื่อนที่, - ไม่เคลื่อนที่

^c + สร้างสปอร์, - ไม่สร้างสปอร์

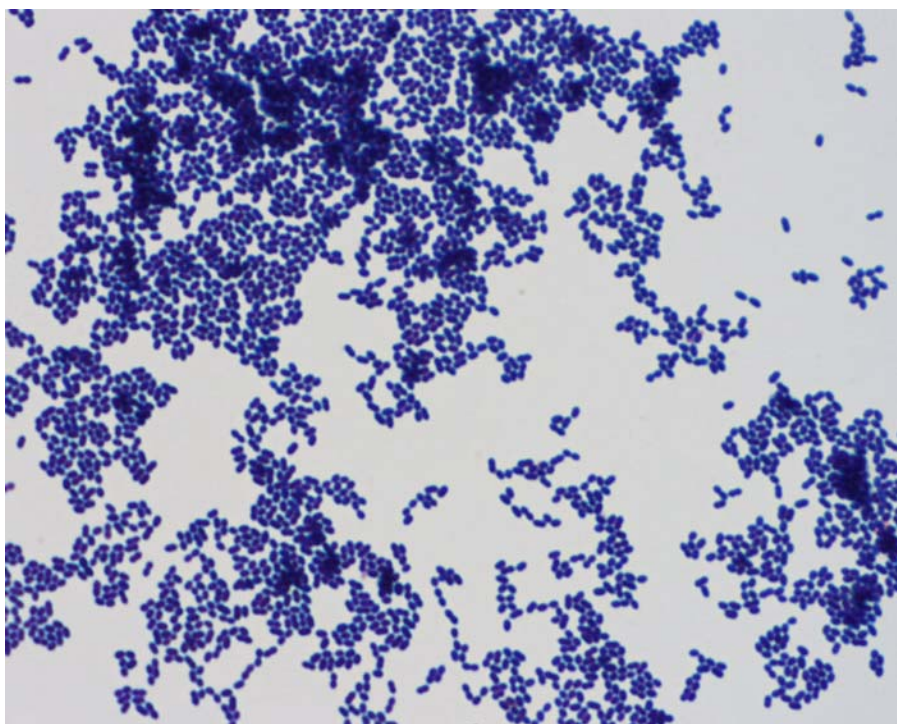
^d + เจริญ, - ไม่เจริญ

^e + สร้างกะตะเลส, - ไม่สร้างกะตะเลส

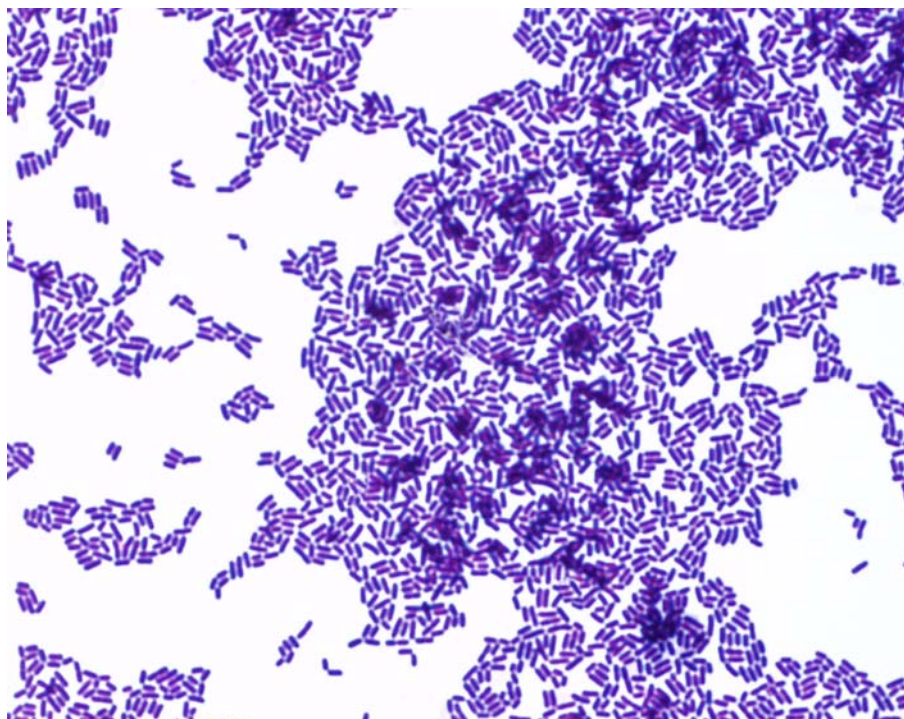
^f + สร้าง CO₂, - ไม่สร้าง CO₂



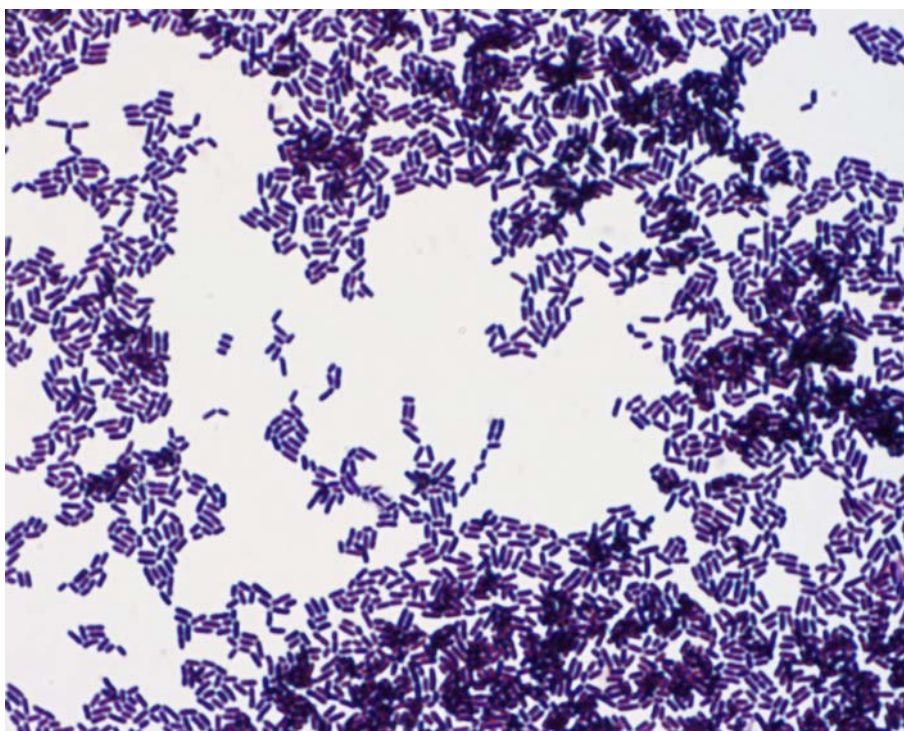
ภาพที่ 6 ลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ PR-2 และการเรียงตัวของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 7 ลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ MG-2 และการเรียงตัวของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 8 ลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ IFS-1 และการเรียงตัวของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 9 ลักษณะของแบคทีเรียสายพันธุ์ IG-3 และการเรียงตัวของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ PR-2, MG-2, IFS-1 และ IG-3 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA หลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มีดังนี้ ทำการเพิ่มขยาย DNA บางส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคเพิ่มขยายจำนวน DNA แบบปฏิกิริยาลูกโซ่(Polymerase Chain Reaction; PCR) โดยใช้ Forward primer คือ 27 F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ Reverse primer คือ 1389 R (5'-ACGGGCGGTG TGTACAAG-3') ซึ่ง primers นี้เป็น universal primers สำหรับ eubacteria ในการเพิ่มจำนวน ชิ้นส่วนของ 16S rDNA สำหรับ primer ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ครั้งนี้ คือ 520 F (5'-ATTGGATCCCAGCMGCCGCGG TAA-3') แทน M ด้วย A หรือ C เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank จาก National Center for Biotechnology Information server (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLASTn ผลการวิเคราะห์เมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2550 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลดังนี้ ไอโซเลท PR-2 มีความคล้ายคลึงกับ *Enterococcus faecium* (Accession number AY653231) 100 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท IFS-1 และ IG-3 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* (Accession number AY823498) 100 เปอร์เซ็นต์ และ ไอโซเลท MG-2 มีความคล้ายคลึงกับ Rumen bacterium (Accession number DQ393004) 97 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในตารางที่ 6 สำหรับผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในภาคผนวก ง

ตารางที่ 6 แสดง % similarity ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PR-2, MG-2 IFS-1 และ IG-3 โดยใช้โปรแกรม BLASTn เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

Isolates	Organisms	Accession number	% similarity
PR-2	<i>Enterococcus faecium</i>	AY653231	481/481 (100%)
MG-2	Rumen bacterium	DQ393004	462/474 (97%)
IFS-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AY823498	474/474 (100%)
IG-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AY823498	474/474 (100%)

เมื่อพิจารณาผลการจัดจำแนกเบื้องต้น และผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถสรุปได้ว่า ไอโซเลท PR-2 คือ สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* ไอโซเลท IFS-1 และ IG-3 คือ สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* สำหรับไอโซเลท MG-2 นั้น เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบความสามารถในการเจริญ และการทดสอบทางเคมีเบื้องต้น ไม่สามารถระบุได้ว่า ไอโซเลท MG-2 จัดอยู่ในสกุลใด และจากผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA ทำให้ทราบว่า ไอโซเลท MG-2 มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ Rumen bacterium (Accession number DQ393004) เพียง 97 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงยังไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่า ไอโซเลท MG-2 เป็นแบคทีเรียในสกุลใด เพื่อให้มีความถูกต้อง และน่าเชื่อถือสำหรับการจัดจำแนกไอโซเลท MG-2 จึงควรทำการศึกษาลักษณะอื่นๆเพิ่มเติม เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกสายพันธุ์ต่อไป เช่น การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน 16S rRNA หรือหาวิธีการของการเกิดสายผสม (hybridization) โดยการทำให้ DNA-DNA hybridization เป็นต้น และควรมีการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL โดยมีแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียง เช่น Rumen bacterium DQ393004 ซึ่งมีความคล้ายคลึง 97 เปอร์เซ็นต์ และ *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* ซึ่งมีความคล้ายคลึง 91.2 เปอร์เซ็นต์ มาร่วมทดสอบกับไอโซเลท MG-2 ด้วย เพื่อจะได้เปรียบเทียบผลการทดลองได้ชัดเจนมากขึ้น แต่เนื่องจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ครั้งนี้ไม่มีเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจึงไม่สามารถทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบได้ ดังนั้นในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ครั้งนี้จึงได้ใช้ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งจำแนกไอโซเลท MG-2 เป็นสายพันธุ์ Rumen bacterium ในการทดลองต่อไป สำหรับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ดังแสดงในภาพที่ 10-13

```

1  GAAAGCCTTC GGCTCAACCG AAGAAGTGCA TCGGAACTG GGAACTTGA GTGCAGAAGA
61  GGACAGTGGA ACTCCATGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAT ATATGGAAGA ACACCAAGTGG
121 CGAAGGCGGC TGTCTGGTCT GTAACGTACG CTGAGGCTCG AAAGTATGGG TAGCAAACAG
181 GATTAGATAC CCTGGTAGTC CATACCGTAA ACGATGAATG CTAAGTGTTG GAGGGTTTCC
241 GCCCTTCAGT GCTGCAGCTA ACGCATTAAG CATTCCGCCT GGGGAGTACG GCCGCAAGGC
301 TGAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTCTGA
361 AGCTACGCGA AGAACCTTAC CAGGTCTTGA CATACTATGC AAATCTAAGA GATTAGACGT
421 TCCCTTCGGG GACATGGATA CAGGTGGTGC ATGGTTGTCT TCAGCTCGTG TCGTGAGATG
481 TTGGGTAAAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC TTATTATCAG TTGCCAGCAT TAAGTTGGGC
541 ACTCTGGTGA GACTGCCGGT GACAAACCGG AGGAAGGTGG GGATGACGTC A

```

ภาพที่ 10 Partial 16S rDNA sequence ของแบคทีเรียสายพันธุ์ IFS-1

```

1 GAAAGCCTTC GGCTCAACCG AAGAAGTGCA TCGGAAACTG GGAAACTTGA GTGCAGAAGA
61 GGACAGTGGA ACTCCATGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAT ATATGGAAGA ACACCAGTGG
121 CGAAGGCGGC TGTCTGGTCT GTAAC TGACG CTGAGGCTCG AAAGTATGGG TAGCAAACAG
181 GATTAGATAC CCTGGTAGTC CATACCGTAA ACGATGAATG CTAAGTGTTG GAGGGTTTCC
241 GCCCTTCAGT GCTGCAGCTA ACGCATTAA GATTCCGCCT GGGGAGTACG GCCGCAAGGC
301 TGAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTAATTCTGA
361 AGCTACGCGA AGAACCTTAC CAGGTCTTGA CATACTATGC AAATCTAAGA GATTAGACGT
421 TCCCTTCGGG GACATGGATA CAGGTGGTGC ATGGTTGTCTG TCAGCTCTGTG TCGTGAGATG
481 TTGGGTTAAG TCCCGCAACG AGCGCAACCC TTATTATCAG TTGCCAGCAT TAAGTTGGGC
541 ACTCTGGTGA GACTGCCGGT GACAAACCGG AGGAAGGTGG GGATGACGTC A

```

ภาพที่ 11 Partial 16S rDNA sequence ของแบคทีเรียสายพันธุ์ IG-3

```

1 GTTGCCTAAT ACATGCAAGT CGAACGCTTC TTTTTCACC GGAGCTTGCT CCACCGGAAA
61 AAGAGGAGTG GCGAACGGGT GAGTAACACG TGGGTAACCT GCCCATCAGA AGGGGATAAC
121 ACTTGGAAC AGGTGCTAAT ACCGTATAAC AATCGAAACC GCATGGTTTT GATTTGAAAG
181 GCGCTTTCGG GTGTCGCTGA TGGATGGACC CGCGGTGCAT TAGCTAGTTG GTGAGGTAAC
241 GGCTCACCAA GGCCACGATG CATAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ATTGGGACTG
301 AGACACGGCC CAAACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAGGGAA TCTTCGGCAA TGGACGAAAG
361 TCTGACCGAG CAACGCCGCG TGAGTGAAGA AGGTTTTCGG ATCGTAAAC TCTGTTGTTA
421 GAGAAGAACA AGGATGAGAG TAACTGTTCA TCCCTTGACG GTATCTAACC AGAAAGCCAC
481 GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGTGG CAAGCGTTGT CCGGATTTAT
541 TGGGCGTAAA GCGAGCGCAG GCGGTTTCTT AAGTCTGATG TGAAAGCCCC CGGCTCAACC
601 GGGGAGGGTC ATTGGAACT GGGAGACTTG AGTGCAGAAG AGGAGAGTGG AATTCCATGT
661 GTAGCGGTGA AATGCGTAGA TATATGGAGG AACACCAGTG GCGAAGGCGG CTCTCTGGTC
721 TGTAAGTAC GCTGAGGCTC GAAAGCGTGG GGAGCAAACA GGATTAGATA CCTGGTAGT
781 CCACGCCGTA AACGATGAGT GCTAAGTGTT GGAGGGTTTC CGCCCTTCAG TGCTGCAGCT
841 AACGCATTAA GCACTCCGCC TGGGGAGTAC GACCGCAAGG TTGAACTCA AAGGAATTGA
901 CGGGGGCCCG CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTCG AAGCAACGCG AAGAACCTTA
961 CCAGGTCTTG ACATCCTTTG ACCACTCTAG AGATAGAGCT TCCCCTTCGG GGGCAAAGTG
1021 ACAGGTGGTG CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC
1081 GAGCGCAACC CTTATTGTTA GTTGCCATCA TTCAGTTGGG CACTCTAGCA AGACTGCCGG
1141 TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAATCATCA TGCCCCTTAT GACCTGGGCT
1201 ACACACGTGC TACAATGGGA AGTACAACGA GTCGCGAAGT CGCGAGGCTA AGCTAATCTC
1261 TTAAAGCTTC TCTCAGTTCT GATTGCAGGC TGCAACTCGC CTGCATGAAG CCGGAATCGC
1321 TAGTAATCGC GG

```

ภาพที่ 12 Partial 16S rDNA sequence ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PR-2

```

1  GACGAACGCT GGC GGCGTGC CTAATACATG CAAGTCGAAC GAACTCTGGT ATTGATTGGT
61 GCTTGCATCA TGATTTACAT TTGAGTGAGT GGCGAACTGG TGAGTAACAC GTGGGAAAYC
121 TGCCCAGAAG CRGGGGATAA CACCTGGAAA CAGATGCTAA TACCGCATAA CAACTTGGAC
181 CGCATGGTCC GAGYTTGAAA GATGGCTTCG GCTATCACTT TTGGATGGTC CCGCGGCGTA
241 TTAGCTAGAT GGTGGGGTAA CGGCTCACCA TGGCAATGAT ACGTAGCCGA CCTGAGAGGG
301 TAATCGGCCA CATTGGGACT GAGACACGGC CCAAACCTCT ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA
361 ATCTTCCACA ATGGACGAAA GTCTGATGGA GCAACGCCGC GTGAGTGAAG AAGGGTTTCG
421 GCTCGTAAAA CTCTGTTGTT AAAGAAGAAC ATATCTGAGA GTAAGTGTTC AGGTATTGAC
481 GGTATTTAAC CAGAAAGCCA CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGTG
541 GCAAGCGTTG TCCGGATTTA TTGGGCGTAA AGCGAGCGCA GGCGGTTTTT TAAGTCTGAT
601 GTGAAAGCCT TCGGCTCAAC CGAAGAAGTG CATCGGAAAC TGGGAAACTT GAGTGCAGAA
661 GAGGACAGTG GAACTCCATG TGTAGCGGTG AAATGCGTAG ATATATGGAA GAACACCAGT
721 GGCGAAGGCG GCTGTCTGGT CTGTAAGTGA CGCTGAGGCT CGAAAGTATG GGTAGCAAAC
781 AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCATRCCGT AAACGATGAA TGCTAAGTGT TGGAGGGTTT
841 CCGCCCTTCA GTGCTGCAGC TAACGCATTA AGCATTCCGC CTGGGGAGTA CGGCCGCAAG
901 GCTGAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT GGTTTAATTC
961 GAAGCTACGC GAAGAACCTT ACCAGGTCTT GACATACTAT GCCAATCTAA GAGATTAGAC
1021 GTTCCCTTCG GGGACATGGA TACAGGTGGT GCATGGTTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA
1081 TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTATTATC AGTTGCCAGC ATTAAGTTGG
1141 GCACTCTGGT GAGACTGCCG GTGACAAACC GGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAATCATC
1201 ATGCCCTTA TGACCTGGGC TACACACGTG CTACAATGGA TGGTACAACG AGTTGCGAAC
1261 TCGCGAGRGT AAGCTAATCT CTTAAAGCCA TTCTCAGTTC GGATTGTAGG CTGCAACTCG
1321 CCTACATGAA GTYGGAATCG CTAGTAATCG CGGATCAGCA TGCCGCGGTG AATACGTTCC
1381 CGGGCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA TGAGAGTTTG TAACACCCAA AGTCGGTGGG
1441 GTAACCTTTT AGGAACCAGC CGCCTAAGGT GGGACAGATG ATTAGGGTGA AGTCGTAACA
1501 AGGTAGCCGT AGGAGAACC

```

ภาพที่ 13 Partial 16S rDNA sequence ของแบคทีเรียสายพันธุ์ MG-2