2. <u>การจัดจำแนกแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิค</u>

การจัดจำแนกแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิค การคัดเลือกในขั้นแรกโดยใช้ลักษณะ และสีของโคโลนี ซึ่งโคโลนีของแบคทีเรีย *Corynebacterium* มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีเหลือง เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร จากนั้นทำการคัดเลือกในขั้นที่สองโดยใช้ลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการติดสีแกรม ซึ่งเซลล์ของแบคทีเรีย *Corynebacterium* ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ไม่แน่นอน มีการเรียงตัวเดี่ยว คู่รูปตัววี หรือกลุ่มขนานกันคล้ายรั้ว นำไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือกทั้งสองขั้นตอนมาจัดจำแนกชนิด โดยใช้วิธีการทดสอบทางชีวเคมีเปรียบเทียบผลการทดสอบกับ type strain ของแต่ละสปีชีส์ (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) ซึ่งได้แก่ การทดสอบการย่อยเจลาติน เอสคูลิน และเคซีน การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส การรีดิวซ์ไนเตรต การสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดต่างๆ รวมทั้งการทดสอบคุณสมบัติด้านการเจริญในสภาวะต่างๆ ได้แก่ การเจริญที่ pH 6.0 การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และการใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ และโดยวิธีการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR ทำการเปรียบเทียบลำดับเบส กับข้อมูลจากฐานข้อมูล ขั้นตอนการคัดเลือก และจัดจำแนก แสดงในภาพที่ 8

การ Enrichment ตัวอย่างในอาหารเหลว D2 ร่วมกับการเติม nalidixic acid และ NaN_3

↓

การคัดเลือกในขั้นแรกโดยใช้ลักษณะ และสีของโคโลนี

↓

การคัดเลือกในขั้นที่สองโดยใช้ลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการติดสีแกรม

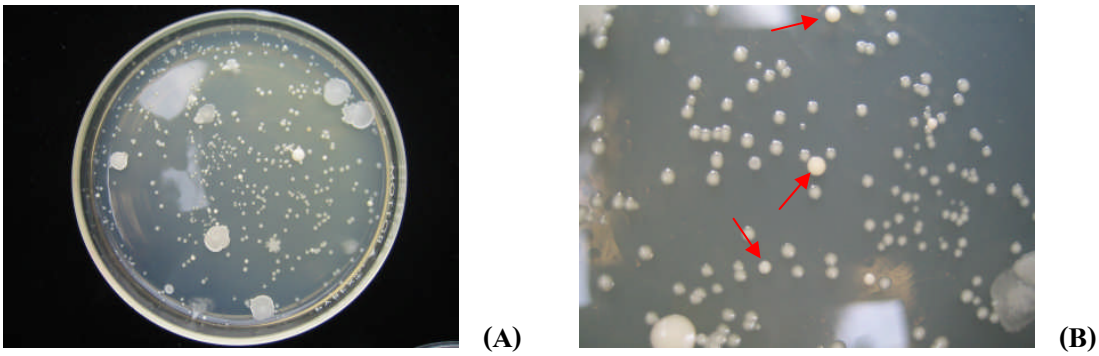
↓

การจัดจำแนกโดยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี และวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA

<u>ภาพที่ 8</u> ขั้นตอนการแยก คัดเลือก และจัดจำแนกแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิค

2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่ม *Corynebacterium* โดยใช้ลักษณะของโคโลนี

เมื่อทำการ enrichment ตัวอย่างในอาหารเหลว D2 ที่มีการเติม nalidixic acid และ NaN_3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เกลี่ยซัสเพนชั่นที่เจือจางให้เหมาะสมบนอาหารแข็ง D2 ที่มีการเติม nalidixic acid (10 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ NaN_3 (2 มิลลิกรัมต่อลิตร) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส จากการสังเกตลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นทุกวัน เป็นเวลา 5-7 วัน พบว่า ในวันแรกโคโลนีที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มีสีขาว มีลักษณะกลม นูน หรือแบนราบ เป็นมันหรือเยิ้ม ผิวหน้าด้าน ส่วนโคโลนีของแบคทีเรียในกลุ่ม *Corynebacterium* ซึ่งมีสีครีม หรือสีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตรจะสังเกตเห็นได้ในวันที่ 2-3 ลักษณะโคโลนีที่ขึ้น และลักษณะโคโลนีที่ต้องการ แสดงดังภาพที่ 9 จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการมีการเจริญช้ากว่ากลุ่มที่พบในวันแรก จากผลการทดลอง พบว่า สามารถแยกไอโซเลตที่มีลักษณะโคโลนีที่ตรงกับแบคทีเรีย *Corynebacterium* จำนวน 2,067 ไอโซเลต ซึ่งส่วนใหญ่แยกได้จากมูลสัตว์ปีก และมูลสัตว์ปีกปนดิน จากนั้นเก็บโคโลนีลักษณะที่ต้องการลงบนอาหารแข็ง A1 โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อ เพื่อนำไปคัดเลือกในขั้นที่สองโดยใช้รูปร่างลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการติดสีแกรม

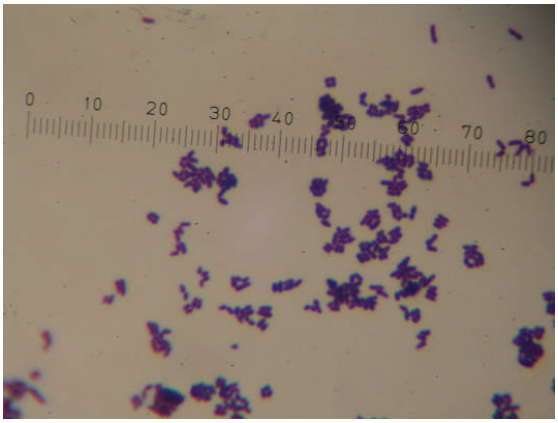


(A) **(B)**

ภาพที่ 9 ลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็ง D2 ที่มีการเติม nalidixic acid และ NaN_3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน (A) ตัวอย่างลักษณะโคโลนีที่ต้องการ (ลูกศรชี้) (B)

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่ม *Corynebacterium* ในขั้นตอนที่สอง โดยใช้ลักษณะรูปร่างของเซลล์ และการติดสีแกรม

เมื่อนำไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นแรกทั้ง 2,067 ไอโซเลต มาคัดเลือกในขั้นที่สอง โดยการใช้ลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการย้อมแกรม พบว่า ส่วนใหญ่ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างและการเรียงตัวหลายลักษณะ ได้แก่ กลุ่มแรกมีรูปร่างกลม มีการเรียงตัวเป็นกลุ่ม ไม่สร้างสปอร์ กลุ่มที่สองมีรูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ กลุ่มที่สามมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น มีการเรียงตัวเป็นกลุ่ม และกลุ่มสุดท้ายมีรูปร่างเป็นท่อนไม่แน่นอน ไม่สร้างสปอร์ มีการเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่รูปตัววี และเป็นกลุ่มเรียงตัวกันคล้ายรั้ว ซึ่งรูปร่าง และการเรียงตัวในกลุ่มสุดท้ายนี้ตรงกับลักษณะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Corynebacterium* และ *C. glutamicum* KY9002 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียเปรียบเทียบ ลักษณะรูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องของแบคทีเรียในกลุ่ม *Corynebacterium* แสดงดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการติดสีแกรมบวกของแบคทีเรียกลุ่ม *Corynebacterium* ที่เจริญบนอาหารแข็ง A1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

นำไอโซเลตที่แยกได้จำนวน 695 ไอโซเลต ซึ่งผ่านการคัดเลือกทั้งสองขั้นตอน ซึ่งมีลักษณะโคโลนีกลม นูน ขอบเรียบ สีครีมหรือสีเหลือง และเซลล์ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นท่อนไม่แน่นอน มีการเรียงตัวเดี่ยว คู่รูปตัววี หรือกลุ่มขนานกันคล้ายรั้ว ไปทำการจัดจำแนกชนิดโดยการทดสอบทางชีวเคมี และการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA

2.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการทดสอบทางชีวเคมี

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียในกลุ่ม *Corynebacterium* พบว่า แบคทีเรียใน genus *Corynebacterium* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกับหลาย ๆ จีนัส เช่น genus *Brevibacterium*, *Arthrobacter* และ *Microbacterium* เป็นต้น ดังนั้นจึงใช้สมบัติทางชีวเคมี โดยการทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาตินในการแยก genus *Corynebacterium* ออกจากจีนัสอื่น โดย genus *Corynebacterium* ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (อ้างอิงจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2) จากการทดสอบ พบว่า มี 58 ไอโซเลต จาก 695 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ จึงคาดว่าจะอยู่ใน genus *Corynebacterium*

จากนั้นทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่สามารถผลิตกรดกลูตามิค ได้แก่ *C. glutamicum*, *C. callunae*, *C. ammoniagenes* และ *C. effiens* เพื่อแยกแบคทีเรียในกลุ่มนี้ออกจากสปีชีส์อื่นใน genus *Corynebacterium* โดยใช้การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส และความสามารถในการย่อยเอสคูลิน เป็นคุณสมบัติในการจำแนกขั้นแรก ซึ่งแบ่งได้เป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรก คือ กลุ่มที่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส และไม่สามารถย่อยเอสคูลิน ซึ่ง *C. glutamicum*, *C. callunae* และ *C. ammoniagenes* ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มนี้ร่วมกับสปีชีส์อื่นอีก 5 สปีชีส์ คือ *C. kutcheri*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. cystidis*, *C. renale* และ *C. pilosum* (อ้างอิงจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2) และกลุ่มที่สอง (กลุ่มที่ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสและการย่อยเอสคูลินแตกต่างไปจากกลุ่มแรก) ประกอบด้วย *C. efficiens* และ *C. ammoniagenes* นอกจากนั้นยังประกอบด้วยสปีชีส์อื่นอีก 9 สปีชีส์ คือ *C. matruchoii*, *C. vitarumen*, *C. paurometalobolum*, *C. minutissimum*, *C. flavaescens*, *C. dipththeria*, *C. xerosis*, *C. bovis* และ *C. mycetoides* ซึ่ง *C. efficiens* ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มแรกได้ เนื่องจาก *C. efficiens* มีสมบัติของการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส และความสามารถในการย่อยเอสคูลินมีความหลากหลาย (Fudou *et al*., 2002) ส่วน *C. ammoniagenes* ถูกจัดให้อยู่ในทั้งสองกลุ่ม เนื่องจากสามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ แต่ขาดข้อมูลของการย่อยเอสคูลิน (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2) ซึ่งก็อาจจะย่อยเอสคูลินได้หรือไม่ก็ได้ และจากการทดสอบทั้ง 58 ไอโซเลต พบว่า มี 53 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส และไม่สามารถย่อยเอสคูลิน จึงจัดให้อยู่ในกลุ่มแรก ส่วนอีก 5 ไอโซเลตมีผลการทดสอบแตกต่างไปจากกลุ่มแรก โดย B717 และ C234 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส และไม่สามารถย่อยเอสคูลิน BS9 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส แต่สามารถย่อยเอสคูลิน BS11 และ CS203 สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส และสามารถย่อยเอสคูลินได้ จึงจัดให้อยู่ในกลุ่มที่สอง จากผลการทดสอบข้างต้น พบว่า ไอโซเลตส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส แต่ไม่สามารถย่อยเอสคูลิน ขั้นตอนในการจำแนกแสดงในภาพที่ 11