

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรมบวก (Genus *Corynebacterium* *Arthrobacter* *Brevibacterium* *Micrococcus*)

↓ 695 ไอโซเลต

Gelatin liquification – (Genus *Corynebacterium*)

↓ 58 ไอโซเลต

↓ 53 ไอโซเลต

↓ 5 ไอโซเลต

Urease+/ Hydrolysis of esculin –

C. glutamicum, *C. callunae*, *C. ammoniagenes*

C. kutcheri, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. cystidis*, *C. renale* และ *C. pilosum*

(B89, B97, B101, B651, B677, BS6, BS13, C188, C189, C238, C239, C250, C251, C264, C271, C272, C291, C296,

C301, C304, C306, C307, CS1, CS7, CS10, CS12, CS14, CS144, CS147, CS149, CS155, CS162, CS168, CS176, CS188, CS189,

CS190, CS191, CS192, CS204, CS215, CS224, CS254, CS255, CS274, CS282, CS315, CS421, CS497, CS501, DS3, DS7 และ DS50)

↓

Acid from glucose+/Casein digestion-

C. glutamicum, *C. callunae*, *C. ammoniagenes*

↓ 53 ไอโซเลต

Nitrate+

C. glutamicum, *C. ammoniagenes*

53 ไอโซเลต

↓

ทดสอบสมบัติอื่นๆเพิ่มเติม เช่น การสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดอื่น ความสามารถในการใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ เป็นต้น

ภาพที่ 11 การจำแนกแบคทีเรีย *C. glutamicum*, *C. ammoniagenes*, *C. callunae* และ *C. efficiens* เบื้องต้น โดยใช้สมบัติทางชีวเคมี

Nitrate-

C. callunae

Urease±/ Hydrolysis of esculin±

C. ammoniagenes, *C. efficiens*, *C. matruchoi*, *C. vitarumen*

C. paurometalobolum, *C. minutissimum*, *C. flavaescens*

C. diphtheria, *C. xerosis*, *C. bovis* และ *C. mycetoides*

(B717, BS9, BS11, C234 และ CS203)

↓

Nitrate+/Acid from salicin+

C. ammoniagenes, *C. matruchoi*, *C. vitarumen*

C. paurometalobolum, *C. minutissimum*, *C. flavaescens*

C. diphtheria, *C. xerosis*, *C. bovis* และ *C. mycetoides*

Nitrate+/Acid from salicin-

C. ammoniagenes, *C. efficiens*

5 ไอโซเลต

↓

ทดสอบสมบัติอื่นๆเพิ่มเติม เช่น การสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดอื่น ความสามารถในการใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ เป็นต้น

การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิกที่อยู่ในกลุ่มแรก คือ *C. glutamicum*, *C. callunae* และ *C. ammoniagenes* ออกจากสปีชีส์อื่นอีก 5 สปีชีส์ คือ *C. kutcheri*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. cystidis*, *C. renale* และ *C. pilosum* ใช้การทดสอบการสร้างกรดจากกลูโคส และความสามารถในการย่อยเคซีนเป็นสมบัติในการจำแนก โดยทั้งสามสปีชีส์ สามารถสร้างกรดจากกลูโคส และไม่สามารถย่อยเคซีนได้ (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2) และจากผลการทดสอบ พบว่า ไอโซเลตทั้งหมด 53 ไอโซเลต สามารถสร้างกรดจากกลูโคส และไม่สามารถย่อยเคซีนได้ จึงคาดว่าจะอยู่ในสามสปีชีส์นี้ สำหรับการจำแนกแบคทีเรีย *C. callunae* ออกจาก *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* ใช้สมบัติการรีดิวซ์ไนเตรต โดย *C. callunae* ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ จากการทดสอบ พบว่า ทุกไอโซเลตสามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ จึงคาดว่าน่าจะอยู่ในสปีชีส์เดียวกับ *C. glutamicum* หรือ *C. ammoniagenes* (ภาพที่ 11) จากนั้นทำการทดสอบเพิ่มเติม ได้แก่ การสร้างกรดจากน้ำตาลต่างๆ การทดสอบ MR การเจริญในสภาวะต่างๆ เช่น ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH 6.0, อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์, การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส และการใช้กรดแลกติก และกรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ เมื่อเปรียบเทียบสมบัติทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบของทั้ง 53 ไอโซเลตกับ *C. glutamicum* ATCC 13032^T และ *C. glutamicum* KY9002 (แบคทีเรียเปรียบเทียบ) ผลแสดงดังตารางที่ 7 พบว่า มี 9 ไอโซเลต คือ C304, CS1, CS7, CS10, CS12, CS14, CS162, CS188 และ CS204 ที่มีสมบัติที่ทดสอบทั้งหมดเหมือนกับ *C. glutamicum* ATCC 13032^T และมี 11 ไอโซเลต คือ BS6, BS13, C306, C307, C238, C239, CS144, CS147, CS149, CS155 และ CS168 ที่มีสมบัติเหมือนกับ *C. glutamicum* KY9002 โดยสร้างกรดจากเด็กทรีน ซึ่งเป็นสมบัติที่แตกต่างจาก *C. glutamicum* ATCC 13032^T นอกจากนั้นอีก 33 ไอโซเลตมีสมบัติบางประการที่แตกต่างไปจากทั้งสองสายพันธุ์ โดยสามารถจัดเป็นกลุ่มได้ดังนี้

1. กลุ่มที่ไม่สร้างกรดจากมอลโตส คือ B677
2. กลุ่มที่สร้างกรดจากเด็กทรีน และการทดสอบ MR ให้ผลลบ คือ CS189, CS191, CS192 และ DS7
3. กลุ่มที่ไม่สร้างกรดจากมอลโตส และการทดสอบ MR ให้ผลลบ คือ CS190
4. กลุ่มที่สร้างกรดจากซาลิซิน และการทดสอบ MR ให้ผลลบ คือ DS3

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของทั้ง 53 ไอโซเลตที่แยกได้จาก *C. glutamicum* ATCC 13032^T

Characteristics	Isolates																			
	C 304	CS 1	CS 7	CS 10	CS 12	CS 14	CS 162	CS 188	CS 204	BS 6	BS 13	C 238	C 239	C 306	C 307	CS 144	CS 147	CS 149	CS 155	CS 168
Hydrolysis of:																				
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from:																				
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose*	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrin*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casein digestion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate to nitrite	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth:																				
at pH 6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
at 45 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
at 30% glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Assimilation of:																				
Lactic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Characteristics	Isolates																
	CS 189	CS 191	CS 192	DS 7	C 250	C 251	C 264	C 272	C 291	C 301	CS 274	B 651	C 271	C 296	CS 254	CS 255	DS 50
Hydrolysis of:																	
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from:																	
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose*	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(+)	+	+
Sucrose*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin*	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin*	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red*	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casein digestion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate to nitrite	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth:																	
at pH 6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
at 45 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
at 30% glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Assimilation of:																	
Lactic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Characteristics	Isolates																<i>C. glutamicum</i> KY 9002	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 ^{T**}
	CS 190	CS 176	B 677	DS 3	B 97	B 89	B 101	C 188	C 189	CS 215	CS 224	CS 282	CS 315	CS 421	CS 497	CS 501		
Hydrolysis of:																		
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from:																		
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose*	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose*	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Sucrose*	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin*	-	-	-	+	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrin*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red*	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Casein digestion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate to nitrite	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth:																		
at pH 6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
at 45 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
at 30% glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Assimilation of:																		
Lactic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ: + = ให้ผลบวก, - = ให้ผลลบ, (+) = weak acid, ND = No data, * = สมบัติที่ให้ผลแตกต่างกับ Type strain, KY9002 = แบคทีเรียเปรียบเทียบกับ

ที่มา: ** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2

5. กลุ่มที่ไม่สร้างกรดจากมอลโตส แต่สร้างกรดจากอะราบีโนส คือ CS176
6. กลุ่มที่สร้างกรดจากซาลิซิน คือ B651, C271, C296, CS254, CS255 และ DS50
7. กลุ่มที่ไม่สร้างกรดจากมอลโตส แต่สร้างกรดจากซาลิซิน คือ C250, C251, C264, C272, C291, C301 และ CS274
8. กลุ่มที่การทดสอบ MR ให้ผลลบ คือ B97
9. กลุ่มที่ไม่สร้างกรดจากซูโครส มอลโตส และการทดสอบ MR ให้ผลลบ คือ B89, B101, C188, C189, CS215, CS224, CS282, CS315, CS421, CS497 และ CS501

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติทางชีวเคมีที่ทดสอบของทั้ง 53 ไอโซเลตกับ *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T แต่เนื่องจากข้อมูลทางชีวเคมีของ *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T มีน้อย ดังนั้นสมบัติที่สามารถเปรียบเทียบได้มีเพียงการย่อยเจลาติน และเคซีน การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส การรีดิวซ์ไนเตรต และการสร้างกรดจากกลูโคส จากผลการทดสอบ พบว่า ทั้ง 53 ไอโซเลตมีสมบัติทางชีวเคมีที่เปรียบเทียบทั้งหมดเหมือนกับ *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T

จากการเปรียบเทียบสมบัติที่ทดสอบทั้งหมดคาดว่า ทั้ง 53 ไอโซเลตน่าจะอยู่ในสปีชีส์เดียวกับ *C. glutamicum* แต่ก็มีโอกาสที่จะอยู่ในสปีชีส์เดียวกับ *C. ammoniagenes* ได้เช่นกัน เนื่องจากข้อมูลทางชีวเคมีของ *C. ammoniagenes* ในการใช้เปรียบเทียบมีน้อยมาก ซึ่งถ้ามีข้อมูลในการเทียบเคียงน้อย ผลการจัดจำแนกอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้

สำหรับกลุ่มที่สอง ประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิก 2 สปีชีส์ คือ *C. ammoniagenes* และ *C. efficiens* และสปีชีส์อื่นๆ อีก 9 สปีชีส์ คือ *C. matruchoi*, *C. vitarumen*, *C. paurometalobolum*, *C. minutissimum*, *C. flavaescens*, *C. diptheria*, *C. xerosis*, *C. bovis* และ *C. mycetoides* การจำแนก *C. efficiens* ออกจากสปีชีส์อื่น ยกเว้น *C. ammoniagenes* ใช้สมบัติการรีดิวซ์ไนเตรต และการสร้างกรดจากซาลิซินเป็นสมบัติในการจำแนก ซึ่ง *C. efficiens* สามารถรีดิวซ์ไนเตรต และไม่สามารถสร้างกรดจากซาลิซิน สำหรับการจำแนก *C. ammoniagenes* ซึ่ง

สามารถรีดิวิซ์ในเตรตได้ แต่เนื่องจากขาดข้อมูลของการสร้างกรดจากซาลิซิน จึงจัดให้อยู่ร่วมกับ *C. efficiens* และยังสามารถจัดให้อยู่ร่วมกับอีก 9 สปีชีส์ (*C. matruchonii*, *C. vitarumen*, *C. paurometalobolum*, *C. minutissimum*, *C. flavaescens*, *C. dipththeria*, *C. xerosis*, *C. bovis* และ *C. mycetoides*) ได้เช่นกัน การจำแนก *C. ammoniagenes* ออกจาก 9 สปีชีส์นี้ โดยการใช้สมบัติทางชีวเคมี ไม่สามารถจำแนกได้ เนื่องจากข้อมูลทางชีวเคมีของ *C. ammoniagenes* มีไม่เพียงพอ (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2) จากการทดสอบพบว่า ทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถรีดิวิซ์ในเตรต และไม่สามารถสร้างกรดจากซาลิซินได้ จึงคาดว่าไอโซเลตทั้งหมดน่าจะอยู่ในสปีชีส์เดียวกับ *C. efficiens* หรือ *C. ammoniagenes* หรือสปีชีส์อื่นจาก 9 สปีชีส์ที่กล่าว (ภาพที่ 11) จากนั้นทดสอบสมบัติทางชีวเคมีอื่นๆ เพิ่มเติม และเปรียบเทียบกับ *C. efficiens* YS-314^T และ *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T ผลแสดงดังตารางที่ 8 โดยเมื่อพิจารณาการสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดต่างๆ ยกเว้น อะราบิโนส แรมโนส ซูโครส และราฟิโนส ซึ่ง *C. efficiens* YS-314^T ไม่มีข้อมูลสำหรับเปรียบเทียบ พบว่ามี 4 ไอโซเลต คือ BS9, BS11, CS203 และ C234 ที่ผลการทดสอบทั้งหมดเหมือนกับ type strain และอีก 1 ไอโซเลต คือ B717 ที่มีสมบัติแตกต่างไป โดยสามารถสร้างกรดจากกาแลคโตสได้เล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติในการเจริญที่สภาวะต่างๆ และการใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ พบว่า ไอโซเลตทั้งหมดมีคุณสมบัติที่แตกต่างจาก type strain อย่างชัดเจน โดยสามารถเจริญได้ที่ pH 6.0 เจริญได้ในอาหารที่มีกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส และสามารถใช้กรดแลกติก และกรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ เมื่อเปรียบเทียบสมบัติทางชีวเคมีของทั้ง 5 ไอโซเลตกับ *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T สมบัติทางชีวเคมีที่สามารถเปรียบเทียบกันได้มีเพียงความสามารถในการย่อยเจลาติน และเคซีน การรีดิวิซ์ในเตรต การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส และการสร้างกรดจากกลูโคส ซึ่งจากการเปรียบเทียบ พบว่ามี 2 ไอโซเลต คือ BS11 และ CS203 ที่มีสมบัติที่ทดสอบทั้งหมดเหมือนกับ type strain คือ ไม่สามารถย่อยเจลาติน และเคซีน สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส รีดิวิซ์ในเตรต และสร้างกรดจากกลูโคสได้ ส่วนอีก 3 ไอโซเลตได้แก่ B717, BS9 และ C234 มีสมบัติที่แตกต่างไป โดยไม่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบทั้งหมดกับทั้งสองสปีชีส์ พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตไม่น่าจะจัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกับ *C. efficiens* เนื่องจากผลการทดสอบคุณสมบัติด้านการเจริญมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด (ตารางที่ 8) ดังนั้นจึงคาดว่าทั้ง 5 ไอโซเลตน่าจะจัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกับ *C. ammoniagenes* หรือสปีชีส์อื่นๆ ในกลุ่มที่กล่าวข้างต้น

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของ 5 ไอโซเลตที่แยกได้กับ *C. efficiens* YS-314^T และ *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T

Characteristics	Isolates					<i>C. efficiens</i> YS-314 ^{T**}	<i>C. ammoniagenes</i> ATCC 6871 ^{T***}
	B 717	BS 9	BS 11	CS 203	C 234		
Hydrolysis of:							
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	+	+	+	-	v	ND
Urease*	-	-	+	+	-	v	+
Acid from:							
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	ND	ND
Xylose	-	-	-	-	-	-	ND
Rhamnose	-	-	-	-	-	ND	ND
Fructose	+	+	+	+	+	+	ND
Galactose*	(+)	-	-	-	-	-	ND
Mannose	+	+	+	+	+	+	ND
Lactose	-	-	-	-	-	-	ND
Maltose	+	+	+	+	+	+	ND
Sucrose	-	+	+	+	+	ND	ND
Raffinose	-	-	-	-	-	ND	ND
Salicin	-	-	-	-	-	-	ND
Dextrin	+	+	+	+	+	+	ND
Starch	-	-	-	-	-	-	ND
Methyl red	-	+	+	+	+	ND	ND
Casein digestion	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate to nitrite	+	+	+	+	+	+	+
Growth:							
at pH 6.0*	+	+	+	+	+	-	ND
at 45°C*	-	-	-	-	-	+	ND
at 30% glucose*	+	+	+	+	+	-	ND
Assimilation of:							
Lactic acid*	+	+	+	+	+	-	ND
Succinic acid*	+	+	+	+	+	-	ND

หมายเหตุ: + = ให้ผลบวก, - = ให้ผลลบ, (+) = weak acid, ND = No data, v = variable characters, * = สมบัติที่ให้ผลแตกต่างกับ Type strain

ที่มา: ** Fudou *et al.* (2002), *** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2

จากปัญหาของการที่ไม่สามารถจัดจำแนก *C. ammoniagenes* ได้อย่างชัดเจน โดยใช้วิธีทางชีวเคมี จึงได้ใช้วิธีในระดับโมเลกุลในการจำแนก

2.4 การจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA

นำทั้ง 5 ไอโซเลตไปหาลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA จาก PCR product ความยาว 1.3 kb โดยใช้ 520 F เป็น primer และเปรียบเทียบลำดับเบสส่วนที่ variable จำนวน 550 เบส

กับข้อมูลจากฐานข้อมูล ซึ่งแบคทีเรียที่จะจัดให้อยู่ในสปีชีส์เดียวกันต้องมี % similarity มากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ (Medigan *et al.*, 2003) ผลการจำแนกของทั้ง 58 ไอโซเลตแสดงดังตารางที่ 9 พบว่ามี 41 ไอโซเลตที่จัดให้อยู่ในสปีชีส์เดียวกับ *C. glutamicum* ATCC 13032^T ซึ่งทั้งหมดมี % similarity เท่ากับ 99-100 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ 35 ไอโซเลตมี % similarity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ คือ B677, BS6, BS13, C238, C239, C250, C251, C271, C296, C304, C306, C307, CS1, CS7, CS10, CS12, CS14, CS144, CS147, CS149, CS155, CS162, CS168, CS176, CS188, CS189, CS190, CS191, CS192, CS204, CS254, CS255, DS3, DS7 และ DS50 และอีก 6 ไอโซเลต มี % similarity เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ คือ B651, C264, C272, C291, C301 และ CS274

ตารางที่ 9 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA กับฐานข้อมูลของทั้ง 58 ไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่าง

รหัสไอโซเลต	closest sequence	% similarity	Accession No.
B677	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
BS6	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
BS13	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
C238	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
C239	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
C250	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
C251	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
C271	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
C296	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
C304	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
C306	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
C307	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS1	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS7	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS10	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS12	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS14	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156

ตารางที่ 9 (ต่อ)

รหัสไอโซเลต	closest sequence	%similarity	Assession No.
CS144	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS147	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS149	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS155	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS162	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS168	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS176	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS188	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS189	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS190	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS191	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS192	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS204	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS254	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
CS255	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
DS3	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
DS7	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
DS50	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
B651	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	551/552 99%	BX927156
C264	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	549/555 99%	BX927156
C272	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/553 99%	BX927156
C291	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	551/552 99%	BX927156
C301	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	551/552 99%	BX927156
CS274	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	551/552 99%	BX927156
B89	<i>C. ammoniagenes</i> CIP 101283	552/552 100%	X84440
B101	<i>C. ammoniagenes</i> CIP 101283	552/552 100%	X84440

ตารางที่ 9 (ต่อ)

รหัสไอโซเลต	closets sequence	%similarity	Accession No.
CS215	<i>C. ammoniagenes</i> CIP 101283	552/552 100%	X84440
CS224	<i>C. ammoniagenes</i> CIP 101283	552/552 100%	X84440
B97	<i>C. ammoniagenes</i> CIP 101283	548/552 99%	X84440
B717	<i>C. ammoniagenes</i> CIP 101283	547/552 99%	X84440
BS9	<i>Corynebacterium</i> sp. 61722	550/551 99%	AF227828
C234	<i>Corynebacterium</i> sp. 61722	550/551 99%	AF227828
CS203	<i>Corynebacterium</i> sp.	548/552 99%	X89778
BS11	<i>Corynebacterium</i> sp.	504/505 99%	X89778
C188	<i>B. stationis</i> LMG 21670 ^T	552/552 100%	AJ620367
C189	<i>B. stationis</i> LMG 21670 ^T	552/552 100%	AJ620367
CS282	<i>B. stationis</i> LMG 21670 ^T	552/552 100%	AJ620367
CS315	<i>B. stationis</i> LMG 21670 ^T	552/552 100%	AJ620367
CS421	<i>B. stationis</i> LMG 21670 ^T	552/552 100%	AJ620367
CS497	<i>B. stationis</i> LMG 21670 ^T	552/552 100%	AJ620367
CS501	<i>B. stationis</i> LMG 21670 ^T	552/552 100%	AJ620367
<i>C. glutamicum</i> KY9002 (wild type)	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156
<i>C. glutamicum</i> KY9714 (lysozyme sensitive mutant)	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	552/552 100%	BX927156

ผลจากการจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่ามี 6 ไอโซเลตที่จัดให้อยู่ในสปีชีส์เดียวกับ *C. ammoniagenes* CIP 101283 ซึ่งทั้งหมดมี % similarity เท่ากับ 99-100 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ 4 ไอโซเลตมี % similarity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ คือ B89, B101, CS215 และ CS224 และอีก 2 ไอโซเลตที่มี % similarity เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ คือ B97 และ B717

นอกจากนี้ อีก 7 ไอโซเลตจัดเป็น *Brevibacterium stationis* LMG 21670^T โดยมี % similarity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ คือ C188, C189, CS282, CS315, CS421, CS497 และ CS501 และ 4 ไอโซเลตจัดเป็น *Corynebacterium* sp. โดยมี % similarity เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ คือ BS9, BS11, CS203 และ C234

ผลจากการจัดจำแนกโดยใช้ 2 วิธีร่วมกันทำให้ได้ข้อสรุปว่า ทั้ง 58 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกเป็น *C. glutamicum* 41 ไอโซเลต *C. ammoniagenes* 6 ไอโซเลต *Corynebacterium* sp. 4 ไอโซเลต และ *Brevibacterium stationis* 7 ไอโซเลต

ผลจากการจำแนกโดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ของทั้ง 53 ไอโซเลตที่จำแนกโดยวิธีทางชีวเคมีว่าเป็น *C. glutamicum* พบว่า มีเพียง 41 ไอโซเลตที่ถูกจัดจำแนกว่าเป็น *C. glutamicum* โดยใช้ 16S rDNA ส่วนอีก 12 ไอโซเลตที่เหลือถูกจัดจำแนกว่าเป็นชนิดอื่น คือ *C. ammoniagenes* 5 ไอโซเลต และ *Brevibacterium stationis* 7 ไอโซเลต ซึ่งพบว่า ทั้ง 12 ไอโซเลต มีสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างไปจาก *C. glutamicum* ATCC 13032^T โดยจัดอยู่ในกลุ่มที่ 8 และ 9 (หน้า 87 คือ กลุ่มที่การทดสอบ MR ให้ผลลบ และกลุ่มที่ไม่สร้างกรดจากซูโครส มอลโตส และการทดสอบ MR ให้ผลลบ) จะเห็นได้ว่าในกลุ่มที่ 9 จะประกอบด้วย *C. ammoniagenes* และ *Brevibacterium stationis* ซึ่งข้อมูลจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology พบว่าทั้งสองสปีชีส์นี้มีความคล้ายกันมาก โดยมีคุณสมบัติหลายด้านที่คล้ายกัน (phenetic similarity) ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และเดิม *C. ammoniagenes* ก็เคยถูกจัดอยู่ใน genus *Brevibacterium* (*Brevibacterium ammoniagenes*) มาก่อน Jone and Keddie (1986) สนับสนุนว่า ควรจะจัด *Brevibacterium stationis* ให้อยู่ใน genus *Corynebacterium* และอยู่ในสปีชีส์เดียวกันกับ *C. ammoniagenes*

เมื่อพิจารณาคุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของ *C. glutamicum* ทั้ง 41 ไอโซเลตที่แยกได้ แสดงดังตารางที่ 10 พบว่า ทั้งหมดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มี pH 6.0 เจริญได้ในอาหารที่มีกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ ใช้กรดแลกติก และกรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยเจลาติน เคซีน และเอสคูลิน สร้างเอนไซม์ยูรีเอส ริควิว์ไนเตรต สร้างกรดจากกลูโคส ฟรุกโตส แมนโนส และซูโครส ไม่สร้างกรดจากไซโลส แรมโนส กาแลกโตส แลคโตส ราฟิโนส และแป้ง ได้เหมือนกับ type strain คือ *C. glutamicum* ATCC 13032^T (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2) โดยมี 9 ไอโซเลตที่มีสมบัติทั้งหมดเหมือนกับ type strain 11 ไอโซเลตมีสมบัติเหมือนกับ

ตารางที่ 10 คุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของ *C. glutamicum* ที่ 41 ไอโซเลตที่แยกได้จากการวิจัยครั้งนี้ เปรียบเทียบกับ *C. glutamicum* ATCC 13032^T

Characteristics	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ^T *	<i>C. glutamicum</i> จากการวิจัยครั้งนี้
Hydrolysis of:		
Gelatin	-	-
Esculin	-	-
Urease	+	+
Acid from:		
Glucose	+	+
Arabinose	-	-/+ ^b
Xylose	-	-
Rhamnose	-	-
Fructose	+	+
Galactose	-	-
Mannose	+	+
Lactose	-	-
Maltose	+	+/- ^{a,b,c,d}
Sucrose	+	+
Raffinose	-	-
Salicin	-	-/+ ^{a,c,e}
Dextrin	-	-/+ ^{a,f}
Starch	-	-
Methyl red	+	+/- ^{d,e,f}
Casein digestion	-	-
Nitrate to nitrite	+	+
Growth:		
at pH 6.0	+	+
at 45 °C	-	-
at 30% glucose	+	+
Assimilation of:		
Lactic acid	+	+
Succinic acid	+	+

หมายเหตุ: + = ให้ผลบวก (positive), - = ให้ผลลบ (negative), a-f = สมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างจาก *C. glutamicum* ATCC 13032^T; a = สมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างในลักษณะเดียวอย่างใดอย่างหนึ่ง, b-f = สมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างในสองลักษณะ โดยสมบัติทางชีวเคมีที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน หมายถึง สมบัติทางชีวเคมีที่พบความแตกต่างร่วมกัน และแตกต่างไปจากไอโซเลตที่แยกได้

ที่มา: * Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2 และ Fodou *et al*, 2002

C. glutamicum KY9002 และอีก 21 ไอโซเลตที่มีสมบัติบางประการที่แตกต่างจากทั้งสองสายพันธุ์ โดยอยู่ใน 7 กลุ่มแรก (อ้างอิงจากหน้า 83 และ 87) ซึ่งสามารถสรุปความแตกต่างของสมบัติทางชีวเคมีใน *C. glutamicum* 41 ไอโซเลตที่แยกได้ และแตกต่างไปจาก type strain โดยพบความแตกต่างในลักษณะเดียว ได้แก่ การไม่สร้างกรดจากมอลโตส หรือการสร้างกรดจากซาลิซิน หรือการสร้างกรดจากเด็กทรีนอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือพบความแตกต่างสองลักษณะร่วมกัน ได้แก่ การไม่สร้างกรดจากมอลโตสพบร่วมกับการสร้างกรดจากอะราบิโนส หรือการสร้างกรดจากซาลิซิน หรือการทดสอบ MR ให้ผลลบ นอกจากนี้ไอโซเลตที่การทดสอบ MR ให้ผลลบมักจะพบร่วมกับการสร้างกรดจากซาลิซิน หรือการสร้างกรดจากเด็กทรีน ซึ่งความแตกต่างของสมบัติทางชีวเคมีเหล่านี้ แม้ว่าจะมีความแตกต่างไปจาก type strain แต่ก็ยังคงจัดอยู่ในสปีชีส์ *C. glutamicum*

ผลจากการจำแนกโดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ของทั้ง 5 ไอโซเลตที่จำแนกโดยวิธีทางชีวเคมีว่าเป็น *C. ammoniagenes* หรือสปีชีส์อื่นๆ ใน 9 สปีชีส์ที่กล่าวในหน้า 82 พบว่า จำแนกได้เป็น *Corynebacterium* sp. 4 ไอโซเลต คือ BS9, BS11, CS203 และ C234 และ *C. ammoniagenes* 1 ไอโซเลต คือ B717 ดังนั้นในการจำแนกโดยใช้ 16S rDNA จึงสามารถจำแนก *C. ammoniagenes* ได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลต คือ B89, B97, B101, B717, CS215 และ CS224 และเมื่อพิจารณาสมบัติทางชีวเคมีของทั้ง 6 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับ *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T ได้แก่ ความสามารถในการย่อยเจลาติน เคซีน การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส การรีดิวซ์ไนเตรต และการสร้างกรดจากกลูโคส พบว่า 5 ไอโซเลต คือ B89, B97, B101, CS215 และ CS224 มีสมบัติทางชีวเคมีเหมือนกับ type strain ส่วนอีก 1 ไอโซเลต คือ B717 มีสมบัติที่แตกต่างไปจาก type strain คือ ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 11 โดยจะเห็นได้ว่า ข้อมูลทางชีวเคมีของ *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T ที่ใช้เปรียบเทียบมีน้อย ส่งผลให้การใช้วิธีทางชีวเคมีในการจำแนกไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน แต่การจำแนกโดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA สามารถจำแนกได้ และสามารถสรุปคุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของ *C. ammoniagenes* ที่แยกได้ แสดงดังตารางที่ 12 โดยทั้ง 6 ไอโซเลตไม่สามารถย่อยเจลาติน และเคซีน รีดิวซ์ไนเตรต สร้างกรดจากกลูโคส ได้เหมือนกับ type strain แต่สมบัติทางชีวเคมีบางประการมีความแตกต่าง คือ การไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส โดยพบร่วมกับการสร้างกรดจากกาแลคโตส (ได้เล็กน้อย) มอลโตส และเด็กทรีน และเมื่อพิจารณาคุณสมบัติอื่นๆ จาก 6 ไอโซเลตที่แยกได้ พบว่า สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี pH 6.0 เจริญได้ในอาหารที่มีกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ ใช้กรดแลกติก และกรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การทดสอบ MR ให้ผลลบ สร้างกรดจากฟรุกโตส และแมนโนส ไม่สร้างกรดจาก

ตารางที่ 11 สมบัติทางชีวเคมีของ *C. ammoniagenes* ที่แยกได้ทั้ง 6 ไอโซเลตเปรียบเทียบกับ *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T

Characteristics	<i>C. ammoniagenes</i> ATCC 6871 ^{T**}	<i>C. ammoniagenes</i> B89	<i>C. ammoniagenes</i> B101	<i>C. ammoniagenes</i> CS215	<i>C. ammoniagenes</i> CS224	<i>C. ammoniagenes</i> B97	<i>C. ammoniagenes</i> B717
Hydrolysis of:							
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	ND	-	-	-	-	-	-
Urease*	+	+	+	+	+	+	-
Acid from:							
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	ND	-	-	-	-	-	-
Xylose	ND	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	ND	-	-	-	-	-	-
Fructose	ND	+	+	+	+	+	+
Galactose*	ND	-	-	-	-	-	(+)
Mannose	ND	+	+	+	+	+	+
Lactose	ND	-	-	-	-	-	-
Maltose*	ND	-	-	-	-	+	+
Sucrose*	ND	-	-	-	-	+	-
Raffinose	ND	-	-	-	-	-	-
Salicin	ND	-	-	-	-	-	-
Dextrin*	ND	-	-	-	-	-	+
Starch	ND	-	-	-	-	-	-
Methyl red	ND	-	-	-	-	-	-
Casein digestion	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate to nitrite	+	+	+	+	+	+	+
Growth:							
at pH 6.0	ND	+	+	+	+	+	+
at 45 °C	ND	-	-	-	-	-	-
at 30 % glucose	ND	+	+	+	+	+	+
Assimilation of:							
Lactic acid	ND	+	+	+	+	+	+
Succinic acid	ND	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ: + = ให้ผลบวก, - = ให้ผลลบ, (+) = weak acid, ND = No data, * = สมบัติที่แตกต่างกัน

ที่มา: ** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2

ตารางที่ 12 คุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของ *C. ammoniagenes* ทั้ง 6 ไอโซเลตที่แยกได้จากการวิจัยครั้งนี้ เปรียบเทียบกับ *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T

Characteristics	<i>C. ammoniagenes</i> ATCC 6871 ^T *	<i>C. ammoniagenes</i> จากการวิจัยครั้งนี้
Hydrolysis of:		
Gelatin	-	-
Esculin	ND	-
Urease	+	+/- ^a
Acid from:		
Glucose	+	+
Arabinose	ND	-
Xylose	ND	-
Rhamnose	ND	-
Fructose	ND	+
Galactose	ND	-/(+) ^a
Mannose	ND	+
Lactose	ND	-
Maltose	ND	-/+ ^{a, b}
Sucrose	ND	-/+ ^b
Raffinose	ND	-
Salicin	ND	-
Dextrin	ND	-/+ ^a
Starch	ND	-
Methyl red	ND	-
Casein digestion	-	-
Nitrate to nitrite	+	+
Growth:		
at pH 6.0	ND	+
at 45°C	ND	-
at 30% glucose	ND	+
Assimilation of:		
Lactic acid	ND	+
Succinic acid	ND	+

หมายเหตุ: + = ให้ผลบวก (positive), - = ให้ผลลบ (negative), (+) = weak acid, ND = No data, a-b = สมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างจาก *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T โดยสมบัติทางชีวเคมีที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน หมายถึง สมบัติทางชีวเคมีที่พบความแตกต่างร่วมกัน และแตกต่างไปจากไอโซเลตที่แยกได้

ที่มา: * Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2

ไซโลส แรมโนส อะราบีโนส แล็กโตส ราฟิโนส ซาליซิน และแป้ง แต่สมบัติทางชีวเคมีบางประการมีความแตกต่าง คือ การสร้างกรดจากซูโครสพบร่วมกับการสร้างกรดจากมอลโตส

นอกจากนั้น เมื่อเปรียบเทียบสมบัติทางชีวเคมีของ *Corynebacterium* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลต (BS9, BS11, CS203 และ C234) กับคุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของ *C. glutamicum* (ตารางที่ 10) พบว่า ทั้ง 4 ไอโซเลตมีสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างไป โดย BS9 ไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส และย่อยเอสคูลิน BS11 และ CS203 ย่อยเอสคูลิน และ C234 ไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของ *C. ammoniagenes* (ตารางที่ 12) พบว่า ทั้ง 4 ไอโซเลตมีสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างไปเช่นกัน โดย BS9, BS11 และ CS203 ย่อยเอสคูลิน และการทดสอบ MR ให้ผลบวก ส่วน C234 มีการทดสอบ MR ให้ผลบวก ซึ่งจากสมบัติที่มีความแตกต่างทั้ง *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* จึงไม่จัดทั้ง 4 ไอโซเลตให้อยู่ในสปีชีส์ทั้งสอง

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติทางชีวเคมีของ *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* ที่แยกได้ พบว่า ทั้งสองสปีชีส์มีสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่า สมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างส่วนใหญ่เป็นการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต โดย *C. glutamicum* ที่แยกได้ทุกไอโซเลตสามารถสร้างกรดจากซูโครสได้ ส่วน *C. ammoniagenes* ที่แยกได้ส่วนใหญ่ไม่สามารถสร้างกรดจากซูโครสได้ แต่มีบางไอโซเลตที่สร้างกรดได้ เช่น B97 แต่พบร่วมกับการสร้างกรดจากมอลโตส โดยไม่พบความแตกต่างในลักษณะเดียว หรือ *C. glutamicum* ส่วนใหญ่มีการทดสอบ MR ให้ผลบวก แต่ก็มีบางไอโซเลตที่ให้ผลลบ แต่พบร่วมกับสมบัติอื่น และไม่พบความแตกต่างในลักษณะเดียวเช่นกัน ส่วน *C. ammoniagenes* ทุกไอโซเลตการทดสอบ MR ให้ผลลบ หรือบางสมบัติ เช่น การสร้างกรดจากมอลโตส ซึ่งทั้งสองสปีชีส์มีความแตกต่างกัน คือ *C. glutamicum* ส่วนใหญ่สามารถสร้างกรดจากมอลโตสได้ แต่มีบางไอโซเลตไม่สร้างกรด ซึ่งสมบัตินี้พบความแตกต่างได้ทั้งในลักษณะเดียวหรือสองลักษณะร่วมกับสมบัติอื่นก็ได้ ส่วน *C. ammoniagenes* เกือบทั้งหมดไม่สร้างกรดจากมอลโตส แต่มีบางไอโซเลตสร้างกรด โดยพบร่วมกับสมบัติอื่น และไม่พบความแตกต่างในลักษณะเดียว

ตารางที่ 13 สมบัติทางชีวเคมีบางประการที่มีความแตกต่างกันระหว่าง *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* ที่แยกได้

สมบัติทางชีวเคมีที่มีแตกต่าง	<i>C. glutamicum</i>	<i>C. ammoniagenes</i>
urease	+	+/- ^h
Acid from		
Arabinose	-/+ ^b	-
Galactose	-	-/(+) ^h
Maltose	+/- ^{a,b,c,d}	-/+ ^{g,h}
Sucrose	+	-/+ ^g
Salicin	-/+ ^{a,b,e}	-
Dextrin	-/+ ^{a,f}	-/+ ^h
MR	+/- ^{c,e,f}	-

หมายเหตุ: + = ให้ผลบวก (positive), - = ให้ผลลบ (negative), (+) = weak acid, a-f = สมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างจาก *C. glutamicum* ATCC 13032^T; a = สมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างในลักษณะเดียวอย่างใดอย่างหนึ่ง, b-f = สมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างในสองลักษณะ; g-h = สมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างจาก *C. ammoniagenes* ATCC 6871^T โดยสมบัติทางชีวเคมีที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน หมายถึง สมบัติทางชีวเคมีที่พบความแตกต่างร่วมกัน และแตกต่างไปจากไอโซเลตอื่นที่แยกได้

เมื่อพิจารณาถึงความแตกต่างของคุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีที่พบใน genus *Corynebacterium* ที่แยกได้ทั้งสองสปีชีส์ โดยส่วนใหญ่พบความแตกต่างของสีของโคโลนี และการสร้างกรดจากน้ำตาล ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Abe and Takayama (1972) รายงานว่า แบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิกที่แยกได้ทั้ง 208 สายพันธุ์ พบความหลากหลายของคุณสมบัติหลายอย่าง เช่น สีของโคโลนี หรือสมบัติทางชีวเคมี เช่น การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต ซึ่งส่วนใหญ่สร้างกรดได้จากกลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส ซูโครส มอสโตส บางสายพันธุ์ก็สร้างกรดจาก อะราบิโนส แมนนิทอล ซาลิซิน หรือเอสคูลินได้ นอกจากนี้การทดสอบ MR การสร้างเอนไซม์ ยูรีเอส และการรีดิวซ์ไนเตรต ก็พบว่าสามารถมีความหลากหลายได้เช่นกัน และรายงานของบริษัท Shionogi (1972) พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตกรดกลูตามิกที่แยกได้ 64 สายพันธุ์ ซึ่งอยู่ใน genus

Corynebacterium พบความหลากหลายของสมบัติทางชีวเคมีเช่นกัน โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกสามารถรีดิวซ์ไนเตรต และสร้างกรดจากมอลโตส กลุ่มที่สองรีดิวซ์ไนเตรต แต่ไม่สร้างกรดจากมอลโตส กลุ่มที่สามไม่รีดิวซ์ไนเตรต แต่สร้างกรดจากมอลโตส และกลุ่มสุดท้ายไม่รีดิวซ์ไนเตรต และไม่สร้างกรดจากมอลโตส นอกจากนั้นระหว่างสายพันธุ์ในแต่ละกลุ่มก็ยังพบความหลากหลายอื่นๆ เช่น สีของโคโลนี การสร้างกรดจากทรีฮาโลส แมนนิทอล ซาลิซิน แป้ง เด็กทรีน กลีเซอรอล และความต้องการวิตามิน จากการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีอื่น ๆ ของ *C. ammoniagenes* ที่แยกได้สามารถให้ข้อมูลเพิ่มเติมจาก type strain ได้แก่ สร้างกรดจากฟรุกโตส และแมนโนส ไม่สร้างกรดจากอะราบิโนส ไซโลส แรมโนส แลกโตส ราฟิโนส ซาลิซิน และแป้ง การทดสอบ MR ให้ผลลบ ไม่ย่อยเอสคูลิน เจริญได้ที่ pH 6.0 เจริญได้ที่กลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส สามารถใช้กรดแลกติก และกรดซัคซินิกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ และข้อมูลของสมบัติทางชีวเคมีเหล่านี้สามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการจำแนก *C. glutamicum* และ *C. ammoniagenes* ได้ต่อไปในอนาคต

สรุปได้ว่า การจำแนกแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิก โดยใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน สามารถจำแนกได้ *C. glutamicum* 41 ไอโซเลต และ *C. ammoniagenes* 6 ไอโซเลต ซึ่งในแต่ละสปีชีส์สามารถเกิดความแตกต่างของสมบัติทางชีวเคมีได้ แสดงดังตารางที่ 10 และ 12 ตามลำดับ นอกจากนั้น สามารถแยก *Corynebacterium* sp. 4 ไอโซเลต และ *Brevibacterium stationis* 7 ไอโซเลต

3. การคัดเลือกแบคทีเรีย *Corynebacterium* ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง

นำ *C. glutamicum* 41 ไอโซเลต และ *C. ammoniagenes* 6 ไอโซเลต มาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 35, 37, 39, 40, 41, 42, 43 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเลี้ยงในอาหารเหลว A2 ที่ปรับให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที สังเกตการเจริญโดยใช้สายตาเทียบกับหลอดควบคุม ซึ่งมีความขุ่นของเชื้อเท่ากับชั่วโมงเริ่มต้น และยับยั้งการเจริญโดยเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 14 และ 15 พบว่า *C. glutamicum* ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับ Nishio *et al.* (2003) รายงานว่า อุณหภูมิสูงสุดที่ *C. glutamicum* สามารถเจริญได้ คือ 40 องศาเซลเซียส ดังนั้น *C. glutamicum* ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสจัดเป็นพวกทนอุณหภูมิสูง จากการทดลอง พบว่า *C. glutamicum* ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสมี 6 ไอโซเลต คือ