

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยา อุนุกรมวิธาน และองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น
ของสารสกัดหายาจากเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่แยกจากพืชวงศ์ขิง

Anti-multiple drug resistant microbial activities, taxonomy and
preliminary determination of chemical constituents of crude extracts
from endophytic actinomycetes isolated from zingiberaceous plants

โดย

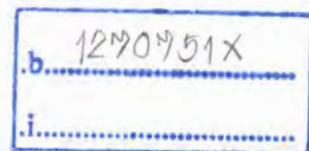
ผศ.ดร. จิตติ ท้าวไฉ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

MCH
94197
8556

ประจำปี 2556

เลขทะเบียน 138149
รับเดือนปี 18 ก.ย. 2558



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร. จิตติ ทำไฉ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยา อนุกรมวิธาน และองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหายาจากเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีท์ที่แยกจากพืชวงศ์ขิง
(ภาษาอังกฤษ)	Anti-multiple drug resistant microbial activities, taxonomy and preliminary determination of chemical constituents of crude extracts from endophytic actinomycetes isolated from zingiberaceous plants
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก	ทุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์
ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผู้ดำเนินการวิจัย	วันที่ 1 ตุลาคม 2555 ถึง 30 กันยายน 2557
	ผศ.ดร. จิตติ ท้าไว
	สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
โทรศัพท์	02-3298400 ต่อ 235

บทคัดย่อ

เชื้อแอกติโนมัยซีท์จำนวน 104 ไอโซเลต ถูกแยกได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชตระกูลขิง เชื้อไอโซเลตเหล่านี้ถูกนำมาจัดกลุ่มโดยลักษณะทางพีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ ได้เป็น 10 กลุ่ม จากลักษณะตำแหน่งบน phylogenetic tree ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางพีโนไทป์ของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มแสดงว่าเชื้อเหล่านั้นเป็นสมาชิกของเชื้อแอกติโนมัยซีท์สกุล *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Planotetraspora*, *Actinomadura*, *Pseudonocardia* และ *Jiangella* การวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อไอโซเลต CS1-12 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานเคมีคล้ายกับเชื้อสกุล *Micromonospora* แต่มีลักษณะทางจีโนไทป์และพีโนไทป์ที่แตกต่างไปจากเชื้อสปีชีส์มาตรฐานทั้งหมดที่เป็นสมาชิกในสกุล *Micromonospora* ดังนั้นเชื้อไอโซเลต CS1-12 จึงถูกตัดสินให้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Micromonospora* โดยให้ชื่อว่า *Micromonospora costii* นอกจากนี้น้ำหนักที่ได้จากเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและนำไปทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์พบว่า เชื้อจำนวนมากกว่าร้อยละ 9.6 แสดงกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี น้ำหนักเชื้อของเชื้อตัวแทนไอโซเลต AG2-1, AG2-5, AG2-6 และ BR2-2 แสดงรูปแบบสัญญาณของ ¹H-NMR ที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากเชื้อแอกติโนมัยซีท์

จากข้อมูลที่ได้ศึกษาทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าบริเวณบ่อน้ำร้อน เป็นอีกบริเวณหนึ่งที่สามารถพบเชื้อแอกติโนมัยซีท์ที่มีสามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีและควรจัดเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญในการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอกติโนมัยซีท์ต่อไป

Abstract

One hundred and four actinomycete strains were isolated from tissue of zingiberaceous plants. These strains were grouped using phenotypic, chemotypic and genotypic characteristics into 10 groups. Phylogenetic position, chemotaxonomic analyses including some phenotypic characterisation revealed that the representative strains in each group belonged to the members of the genera *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Planotetraspora*, *Actinomadura*, *Pseudonocardia* and *Jiangella*. Here, we found the strain CS1-12 showing morphological and chemotaxonomic characteristics typical of members of the genera *Micromonospora* but which was genotypically and phenotypically distinguishable from all recognized *Micromonospora* species. Therefore, the strain CS1-12 were judged to represent the novel species of the genus *Micromonospora* for which the name *Micromonospora costi* was proposed. Furthermore, the fermentation broths of these representative strains were extracted with ethyl acetate and were tested for anti-microbial activity. The results showed that more than 9.6% of actinomycete strains exhibited the anti-microbial activity. Antimicrobial assay-guided fractionation of the ethyl acetate extract of representative actinomycete isolate AG2-1, AG2-5, AG2-6 และ BR2-2 revealed the interesting $^1\text{H-NMR}$ profile that suitable for the chemical structure study. Based on these results, it could be concluded that the tissue of zingiberaceous plants is a one of interest source for the actinomycete investigation and should be represented an excellent source for the discovery of bioactive compounds.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ	8
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	13
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	63
เอกสารอ้างอิง	67
ภาคผนวก	71



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BR3-5 บนอาหาร ISP2	15
2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต BR3-5 บน phylogenetic tree (NJ method)	17
3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AN2-5 บนอาหาร ISP2	18
4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AN2-5 บน phylogenetic tree (NJ method)	20
5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AN2-10 บนอาหาร ISP2	21
6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AN2-10 บน phylogenetic tree (NJ method)	23
7 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AX1-5 บนอาหาร ISP2	24
8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AX14-5 บน phylogenetic tree (NJ method)	26
9 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต ZM2-6 บนอาหาร ISP2	27
10 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ZM2-6 บน phylogenetic tree (NJ method)	29
11 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AN1-19 บนอาหาร ISP2	30
12 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AN1-19 บน phylogenetic tree (NJ method)	32
13 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CS1-12 บนอาหาร ISP2	33
14 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CS1-12 บน phylogenetic tree (NJ method)	35
15 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AG2-1 บนอาหาร ISP2	36
16 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG2-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	38
17 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AN2-9 บนอาหาร ISP2	39
18 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AN2-9 บน phylogenetic tree (NJ method)	41
19 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AS1-8 บนอาหาร ISP2	42
20 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AS1-8 บน phylogenetic tree (NJ method)	44

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากเชื้อแอสคิโนมัยซีท	7
2 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่แยกได้	14
3 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิโนมัยซีทบนอาหาร-ISP ชนิดต่างๆ	45
4 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต	50
5 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสิ่งสกัทยาบในชั้นเอธิลอะซีเตตด้วยวิธี Agar disc diffusion	58



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC = American Type Culture Collection

B. subtilis = *Bacillus subtilis*

C. albicans = *Candida albicans*

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

E. coli = *Escherichia coli*

EtOAc = ethyl acetate

ISP = International *Streptomyces* Project

M. luteus = *Micrococcus luteus*

MHA = Mueller-Hinton Agar

MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

nm = nanometer

Ps. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

TSB = Tryptic soy broth

UV = Ultraviolet

VRE = vancomycin-resistant enterococci

μL = microlitre



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

โรคติดเชื้อจุลินทรีย์คือยาในโรงพยาบาล (nosocomial infection) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในปัจจุบันส่งผลทำให้อัตราการสูญเสียชีวิตในกลุ่มผู้ป่วยเด็ก ผู้สูงอายุ และกลุ่มผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องเพิ่มขึ้น อัตราการระบาดและการดื้อยาของเชื้อเหล่านี้นับวันยิ่งทวีความรุนแรงและครอบคลุมการคือยาในกลุ่มยาปฏิชีวนะหลายกลุ่ม แนวทางแก้ปัญหานี้แนวทางหนึ่ง คือเร่งหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์ เพื่อนำมาใช้ยับยั้งและกำจัดเชื้อ โรคคือยาเหล่านั้น จุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน การผลิตสารปฏิชีวนะเป็นประโยชน์ที่สำคัญด้านหนึ่ง เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลากหลายทั้งโครงสร้างและการออกฤทธิ์ รวมทั้งสามารถเพิ่มผลผลิตได้ง่าย เชื้อแอกติโนมัยสีทเป็นกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Bérdy, 2005)

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์สำคัญที่มีอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชทั้ง เชื้อแบคทีเรีย รา และแอกติโนมัยสีท สำหรับเชื้อแอกติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืช (endophytic actinomycetes) สามารถพบได้ในส่วนต่างๆของพืช ทั้งเมล็ด ผล ราก ใบ และลำต้น โดยการอยู่ร่วมกันจะไม่ทำให้เกิดความเสียหายหรือเป็นอันตรายใดๆกับต้นพืช รวมทั้งมีส่วนช่วยทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรค และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และยังมีมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชและป้องกันจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้เข้าสู่เนื้อเยื่อพืชโดยจะผลิตสารทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับความสำคัญทางการแพทย์และเภสัชกรรมเชื้อแอกติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืช (endophytic actinomycetes) สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญต่างๆ เช่น สารต้านมะเร็งและสารกดระบบภูมิคุ้มกัน สารปฏิชีวนะต่อต้านแบคทีเรียคือยา รา และไวรัส ด้านการเกษตรเชื้อแอกติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืช สามารถผลิตสารฆ่าแมลงและสารปราบวัชพืชได้ โดยสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่สร้างได้จากเชื้อแอกติโนมัยสีทในสกุลสเตรปโตมัยเซส (*Streptomyces*) ซึ่งสามารถสร้างสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุดประมาณร้อยละ 70 – 90 ของสารที่ผลิตได้ทั้งหมดจากเชื้อกลุ่มนี้

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ไม่ว่าจะเป็นพันธุ์ไม้ สัตว์ หรือจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จึงมีความเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยสีทนั้นน่าจะมีการกระจายตัวอยู่มากในหลายพื้นที่และมีสายพันธุ์ที่หลากหลายเช่นกัน เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้เป็นแหล่งทรัพยากรที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากสามารถพบเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces*

และเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทหายากสกุลอื่นๆ (Zhao *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ และค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จำนวนมาก (Bieber *et al.*, 1998 ; Castillo *et al.*, 2002 ; Gu *et al.*, 2006 ; Duangmal *et al.*, 2008 ; Igarashi *et al.*, 2007) จากเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทในพืชหลายชนิด

ความหลากหลายของพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในประเทศไทยมีอยู่สูงมาก พืชสมุนไพรมากกว่า 100 ชนิด มีรายงานว่าสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Rahman, 2000 ; Lakshmanan *et al.*, 2011) พืชสมุนไพรไทยจึงจัดเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่า และมีการนำส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพรมาใช้ทำการรักษาโรคติดเชื้อต่างๆ มากมาย เนื่องจากสารทุติยภูมิในพืชสมุนไพรแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย แต่ในการใช้พืชสมุนไพรที่มีข้อจำกัดบางประการคือสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้ช้า ทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการในการใช้คราวละมากๆ ได้ เพื่อเป็นการแก้ปัญหาในเรื่องข้อจำกัดดังกล่าว จึงเกิดแนวคิดในการหาวัตถุดิบแหล่งใหม่มาทดแทนโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืช (endophytic actinomycetes) เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารจำพวกสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี มีความเป็นไปได้ว่าเชื้อแอกติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรเหล่านี้จะมีส่วนร่วมในวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) ของพืชสมุนไพร และสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดที่คล้ายกับพืชสมุนไพรหรือสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้ (Zhao *et al.*, 2011) ดังนั้นจึงมีการศึกษาในด้านการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืช (endophytic actinomycetes) อย่างแพร่หลายโดยคัดเลือกมาจากพืชที่สมบูรณ์ ปราศจากโรคและแมลง โดยพืชสมุนไพรไทยในวงศ์ขิงขมิ้นเบอราซีอี (family Zingiberaceae) เป็นพืชสมุนไพรไทยกลุ่มหนึ่งที่มีสรรพคุณทางยาที่โดดเด่นและมีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย เช่น มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ต้านเชื้อวัณโรค ต้านเชื้อก่อโรคมัลตาเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ต้านอนุมูลอิสระ ระงับอาการปวด และต้านการอักเสบ เป็นต้น (Rahman, 2000 ; Wilken *et al.*, 2011 ; Lakshmanan *et al.*, 2011)

จากข้อมูลเบื้องต้นทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการศึกษาเพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืชวงศ์ขิงขมิ้นที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ดีดียวหรือสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ตลอดจนศึกษาอนุกรมวิธานในระดับสกุลและคัดเลือกไอโซเลตที่น่าสนใจมาศึกษาต่อจนถึงระดับสปีชีส์ รวมทั้งตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหายากจากเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาและนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืชวงศ์จิงของไทย
- 1.2.2 เพื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ในระดับสกุล และคัดเลือกไอโซเลตที่น่าสนใจมาศึกษาต่อจนถึงระดับสปีชีส์
- 1.2.3 เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แกรมบวกคือยาที่พบบ่อยทางคลินิก เช่น methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ vancomycin-resistant enterococci (VRE)
- 1.2.4 เพื่อกำหนดองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืชวงศ์จิง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืชวงศ์จิงประมาณ 100 ไอโซเลต ทำการคัดเลือกไอโซเลตซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แกรมบวกคือยาที่พบบ่อยทางคลินิก เช่น methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ vancomycin-resistant enterococci (VRE) มาทำการหมัก สกัดสารสกัดหยาบ และกำหนดองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีและspectroscopy เช่น ¹H-NMR รวมทั้งศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ในระดับสกุล และคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลตที่น่าสนใจมาศึกษาต่อจนถึงระดับสปีชีส์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของโครงการวิจัย

- 1.4.1 สามารถแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกคือยาจากพืชวงศ์จิงของไทย
- 1.4.2 สามารถเก็บรวบรวมความรู้ทางด้านอนุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืชวงศ์จิงเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาวิจัยด้านอื่นต่อไป
- 1.4.3 สามารถสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือก ตลอดจนตรวจสอบและกำหนด องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบนั้นๆ ได้
- 1.4.4 ทราบกิจกรรมการด้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบนั้นๆ
- 1.4.5 การวิจัยในครั้งนี้อาจค้นพบเชื้อแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่และ/หรือสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการสร้างสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ซึ่งอาจจะนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาต่อทางด้านเภสัชศาสตร์ เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไป

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

แบคทีเรียแกรมบวกคือยา เช่น methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ vancomycin-resistant enterococci (VRE) เป็นแบคทีเรียคือยาที่พบบ่อยทางคลินิกซึ่งเป็นต้นเหตุที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล เชื้อกลุ่มนี้เริ่มพบแพร่กระจายออกไปตามแหล่งชุมชน ทำให้การเลือกใช้ยาปฏิชีวนะแบบ empiric เปลี่ยนแปลงไปจากยามาตรฐาน ทำให้สถานการณ์การป้องกันและควบคุมโรคยากขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเหตุให้เชื้อกลุ่มนี้คือต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่ม

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่คือยามetilicillin (MRSA) ถูกค้นพบพร้อมๆ กับระยะที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะเมtilicillinเป็นครั้งแรกในทวีปยุโรป ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาเชื้อชนิดนี้ได้มีการแพร่ระบาดไปทั่วโลก (Francioli et al., 1991) เชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อที่มักพบการระบาดอยู่ในโรงพยาบาลทั่วโลกในปัจจุบัน และพบว่ามักติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ โดยเฉพาะโรคติดเชื้อในโพรงจมูกและแผลเปิดขนาดใหญ่ (Kim, 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากสัตว์และสิ่งแวดล้อมตามที่ที่มีการทำปศุสัตว์ด้วย ทั้งนี้อาจเกิดจากมีการใช้สารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agents) เป็นสารเติมแต่งเพื่อกระตุ้นการเจริญในสัตว์กันอย่างฟุ่มเฟือยจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อชนิดนี้เกิดขึ้น (Van den Boogaard and Stobberingh, 1996) ในการควบคุมการติดเชื้อชนิดนี้ในปัจจุบันมักใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม polyether ionophore เช่น monensin laidlomycin และ salinomycin เป็นต้น

เชื้อ enterococci เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร (GI tract flora) ในทศวรรษที่ผ่านมา มีรายงานว่าเชื้อนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อโรครุนแรงได้ ซึ่งเกิดจากการที่มียีนกำกับความรุนแรงในการก่อโรค (virulent gene) อยู่ เชื้อ *Enterococcus faecalis* เป็นเชื้อที่ไวต่อยา vancomycin (vancomycin-susceptible enterococci, VSE) และพบบ่อยที่สุดในห้องปฏิบัติการทางคลินิกและโรงพยาบาล ในขณะที่ *E. faecium* เป็นเชื้อคือยา vancomycin (vancomycin-resistant enterococci, VRE) ที่พบน้อยที่สุด แต่มักเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในกระแสเลือดที่เกิดในโรงพยาบาล (nosocomial bacterimia)

ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่ๆ เพื่อมาทดแทนยาปฏิชีวนะตัวเดิมเพื่อป้องกันการคือยาของเชื้อในอนาคต ทำให้เชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ถูกค้นพบมากขึ้น โดยเฉพาะเชื้อแอคติโนมัยซีทหายาก เนื่องจากมีเทคนิคใหม่ในการแยกเชื้อที่จำเพาะยังผลให้การค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีทเพิ่มสูงขึ้น โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด คือเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70%

(ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนมัยซีททั้งหมด เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น

จากการศึกษาทางด้านการกระจายตัวของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ผ่านมานั้นทำให้ทราบถึงว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพในเชิงประชากรของเชื้อแอกติโนมัยซีทค่อนข้างสูง เนื่องจากได้ทำการค้นพบเชื้อแอกติโนมัยซีทในสกุลและสปีชีส์ใหม่หลายชนิด เช่น *Actinocatenispora thailandica* (Thawai et al., 2006), *Micromonospora eburnea* (Thawai et al., 2004), *Micromonospora aurantinigra* (Thawai et al., 2004), *Micromonospora siamensis* (Thawai et al., 2005) เป็นต้น สำหรับเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทนั้นในปัจจุบันได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านทำการศึกษาและค้นพบเชื้อสปีชีส์ใหม่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เช่น Kaewkla และ Franco (2011) ได้ทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีท (endophytic actinomycetes) จากใบของต้น *Pittosporum phylliraeoides* พบเชื้อสปีชีส์ใหม่มีชื่อว่า *Actinopolymorpha pittospori* Qin และคณะ (2008) ได้ทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีท (endophytic actinomycetes) จากรากของ *Maytenus austroyunnanensis* พบเชื้อสปีชีส์ใหม่มีชื่อว่า *Saccharopolyspora endophytica* Thamchaipenet และคณะ (2010) ได้ทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีท (endophytic actinomycetes) จากรากของ *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. พบเชื้อสกุลใหม่มีชื่อว่า *Actinoallomurus acaciae* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ *Thermomonosporaceae* เป็นต้น นอกจากนั้นแล้วยังมีการพบสารทุติยภูมิชนิดใหม่ (Micromonosporin A) จากเชื้อ *Micromonospora aurantinigra* (Thawai et al., 2004) ด้วย ซึ่งในการรายงานการค้นพบเชื้อแอกติโนมัยซีทชนิดใหม่ในประเทศไทยถือว่าค่อนข้างน้อยเนื่องจากยังคงมีการทำการวิจัยในวงจำกัด เมื่อทราบข้อมูลเบื้องต้นที่น่าสนใจดังนี้แล้วการศึกษานุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยซีทนั้นจึงเป็นงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งที่ควรได้รับการสนับสนุนอย่างยิ่งเพื่อเป็นการดึงเอาทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญมาใช้ประโยชน์ให้ได้มากที่สุด สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยซีทในต่างประเทศนั้น ได้มีรายงานการค้นพบเชื้อแอกติโนมัยซีททั้งสกุลและสปีชีส์ใหม่อย่างต่อเนื่องซึ่งสามารถค้นคว้าได้จาก <http://ijs.sgmjournals.org/> ซึ่งเป็นเว็บไซต์ของวารสาร International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology ที่ตีพิมพ์เกี่ยวกับนุกรมวิธานของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ โดยตรง

การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทในระดับสกุลและสปีชีส์ อาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ลักษณะทางนุกรมวิธานเคมี (Chemotaxonomic characteristics) เช่น Cell wall chemotype, Whole-cell sugar, Phospholipid type ตลอดจน diaminopemilic acid type ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อนั้นๆ (Holt, 1989) ลักษณะความคล้ายคลึงทาง DNA (DNA-DNA hybridization) และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคในระดับโมเลกุล ได้แก่ การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA และ RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ตลอดจนการนำระบบ Bioinformatic มาเพื่อช่วยตัดสินการจัดนุกรมวิธานให้ถูกต้องและแม่นยำขึ้น

พืชวงศ์ขิง (*Zingiberaceae*) เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย เช่น มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ด้านเชื้อวัณโรค ด้านเชื้อก่อโรคมาลาเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ด้านอนุมูลอิสระ ระวังอาการปวด และด้านการอักเสบ เป็นต้น (Rahman, 2000 ; Wilken *et al.*, 2011 ; Lakshmanan *et al.*, 2011) มีความเป็นไปได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยสียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรนี้จะมีส่วนร่วมในวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) ของพืชสมุนไพร และสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดที่คล้ายกับพืชสมุนไพรหรือสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้ (Zhao *et al.*, 2011) ทำให้พืชในวงศ์ขิงนี้เป็นพืชที่มีความน่าสนใจในการนำมาคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีย ซึ่งในปัจจุบันยังมีการศึกษาอนุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสียเพียงเล็กน้อย ด้วยลักษณะอันจำเพาะของแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาตินี้อาจส่งผลให้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสียหายากสายพันธุ์ใหม่และ/หรือสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิชนิดใหม่ได้

การค้นพบยาชนิดต่างๆ ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดมีประวัติความเป็นมายาวนาน ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์และพืชซึ่งอาจได้จากการผ่าเหล่า (mutation) หรือจากวิวัฒนาการ หรือได้จากกระบวนการ detoxification การมีแหล่งจุลินทรีย์ที่ไม่จำกัดจะเพิ่มโอกาสในการค้นพบสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างหลากหลาย หรือสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ปัจจุบันมีการค้นพบสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมายหลายชนิดจากเชื้อแอคติโนมัยสียที่หายากหลายสกุล (ตารางที่ 1) ดังนั้นการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสียที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงจะเพิ่มโอกาสในการค้นพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่หรือเชื้อที่ผลิตสารที่แตกต่างไปจากสารที่มีอยู่เดิมและคาดว่าข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อและและวิทยาศาสตร์สาธารณสุขได้ต่อไป

ตารางที่ 1 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากเชื้อแอคติโนมัยซีท

Compound	Source	Activity	References
Diazepinomicin (ECO-4601)	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial Anticancer Anti-inflammatory	Charan <i>et al.</i> , 2004
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial	Bruntner <i>et al.</i> , 2005
Glaciapyrroles	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Macherla <i>et al.</i> , 2005
Gutingimycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Maskey <i>et al.</i> , 2004
Helquinoline	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacterial	Asolkar <i>et al.</i> , 2004
Cebulactams	<i>Saccharopolyspora</i> <i>cebuensis</i>	Antibacterial Antioxidant	Pimentel-Elardo <i>et al.</i> , 2008
Komodoquinone A	<i>Streptomyces</i> sp.	Neuritogenic activity	Itoh <i>et al.</i> , 2003
Marinomycins	' <i>Marinispora</i> '	Antibacterial Anticancer	Kwon <i>et al.</i> , 2006
Mechercharmycins	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer	Kanoh <i>et al.</i> , 2005
leucyl-4-hydroxyproline	<i>Sreptomyces</i> sp.	Antitumour	Hernández <i>et al.</i> , 2004
SalinosporamideA (NPI-0052)	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer	Feling <i>et al.</i> , 2003
Trioxacarcins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial Anticancer Antimalarial	Maskey <i>et al.</i> , 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างพืชวงศ์จิงทั้งต้น ได้แก่ จิง ข่า ขมิ้นชัน ไพล กระทือ ว่านชั๊กมุดลูก เปราะหอม ดาหลา และกระชาย เป็นต้น เขตป่าธรรมชาติในจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง เช่น จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ปราจีนบุรี สระบุรี นครบุรี อุรธานี และอุบลราชธานี ใส่งในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ แล้วนำมาทำการแยกเชื้อที่ห้องปฏิบัติการ

3.1.2 การแยกเชื้อ

ตัดชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชวงศ์จิง เช่น ราก ลำต้น ใบ ให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก นำมาล้างด้วยสารละลาย tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นแช่ลงในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 (95% alcohol) และแช่ลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำชิ้นส่วนของพืชวงศ์จิงที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วเหล่านี้ มาบดให้ละเอียดโดยใช้โกร่งปราศจากเชื้อ จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร Humic acid vitamin agar Starch-casein agar และ Soil extract agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

เมื่อบ่มเชื้อครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว เลือกเก็บ โคลนที่มีลักษณะของเชื้อแอสดีโนมัยสีท โดยตรวจลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ระยะการทำงานสูง (Long working distance lens) จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract-Malt extract agar และเก็บเชื้อไว้ในหลอดอาหารเลี้ยง (YM slant) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อดังนี้

3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring and Gottfried, 1966) ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของ โคลนிட้านบน สีของ โคลนிட้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจสอบลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อด้วย Scanning Electron

Microscope (SEM) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายโคติน การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิซในเตรท (Arai, 1975) การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ การผลิตเมลานิน การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง และการใช้แหล่งคาร์บอน (Shiring and Gottlieb, 1966) จากการศึกษานี้จะสามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาศึกษาในขั้นต่อไป

3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ (Komagata and Suzuki, 1987)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลตในอาหารเหลว Yeast extract – Malt extract บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการ centrifuge และทำให้เซลล์แห้งภายใต้ความเย็น (Freeze drying) นำเซลล์แห้งไปทดสอบทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อดังนี้

3.2.2.1 การวิเคราะห์ผนังเซลล์

ตรวจสอบ Diaminopimelic acid ของเชื้อ โดยย่อยสลายเซลล์แห้งด้วย 6N HCl ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไป spot บนแผ่น TLC (Merck No. 5716) Develop ด้วย methanol - water - 6N HCl - pyridine(80:26:4:10) ใช้ 0.5% ninhydrin solution ใน n-butanol ฟันแล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 2-3 นาที เพื่อดู spot ที่เกิดขึ้นเทียบกับ standard

3.2.2.2 การวิเคราะห์ Whole cell sugar

นำเซลล์แห้งมาไฮโดรไลส์ด้วย 1N H₂SO₄ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วจึงเติม Ba(OH)₂ และปรับ pH อยู่ในช่วง 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดเอาสารละลายส่วนบน (supernatant) มาทำให้แห้ง ละลายซ้ำด้วยน้ำ จากนั้น spot ลงบน cellulose TLC plate develop ด้วย butanol - water - pyridine - toluene (10:6:6:1) ฟันด้วย acid aniline phthalate อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เทียบ spot ที่ได้กับ standard

3.2.2.3 การวิเคราะห์ Polar lipid

นำเซลล์แห้งที่ได้มาสกัด polar lipid ด้วย methanol ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วสกัดต่อด้วย chloroform กรองกากเซลล์ (debris) ออก ทำการ partition ด้วย chloroform และ saline นำชั้น chloroform ไประเหยให้แห้ง ละลายซ้ำด้วย chloroform - methanol และดูดสารตัวอย่าง spot ลงบน HPTLC (Merck Kieselgel 60 F₂₅₄, 10x10 cm) ทำการ develop 2 ทิศทาง (two-dimensional development) ด้วย solvent system 2 ชนิด คือ chloroform - methanol - water (65:25:4) และ chloroform - acetic acid - methanol - water (80:18:12:5) แล้วฟันด้วย 50% sulfuric acid อบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สังเกต spot ที่เกิดขึ้น

3.2.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid)

เตรียม methyl ester ของกรดไขมัน จากเซลล์แห้งโดยไฮโดรไลส์ด้วยสารละลาย methanolic hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ แล้ววิเคราะห์ด้วย gas liquid chromatography

3.2.2.5 การวิเคราะห์ Isoprenoid quinone

นำเซลล์แห้งสกัดด้วย chloroform - methanol อัตราส่วน 2 : 1 บนเครื่องเขย่า 1 คืน จากนั้นกรองและทำให้แห้ง นำส่วนที่ได้ละลายซ้ำด้วย acetone แล้วทำให้บริสุทธิ์บนแผ่น TLC (Merck No. 1.05715 Kieselgel 60 F₂₅₄, 20x20 cm) เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.2.2.6 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

นำ DNA ที่แยกได้ มาเพิ่มปริมาณ DNA ในช่วง 16S rDNA โดยใช้ Universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) 16S rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการเปรียบเทียบ และ alignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank/EMBL/DDBJ โดยใช้ BLAST program และ alignment software (ในกรณีนี้ใช้ CLUSTAL W program package) จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ใน MEGA software program version 2.1 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้

3.2.2.7 การวิเคราะห์ DNA base composition (Tamaoka,1994.)

3.2.2.7.1 การแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเชื้อใน Yeast extract – Malt extract broth เป็นเวลา 4-5 วัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์และล้างด้วย saline-EDTA ทำให้เซลล์แตกด้วย lysozyme และ Tris-SDS solution จากนั้นสกัดด้วย phenol และ chloroform ตกตะกอน DNA ด้วย cool ethanol กำจัด RNA และโปรตีน โดยการเติม RNase solution และ proteinase K และเก็บ DNA ที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ใน ethanol

3.2.2.7.2 การวิเคราะห์

เตรียม nucleoside ของ DNA แต่ละไอโซเลต จากการไฮโดรไลส์ 10 μ l heated DNA (1 mg/ml) ด้วย 10 μ l nuclease P₁ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และไฮโดรไลส์ต่อด้วย 10 μ l alkaline phosphatase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.2.2.8 Photobiotin labeling DNA-DNA Hybridization

3.2.2.8.1 Immobilization of DNA in microtiter plate

หยด 100 μ l ของสารละลาย heat – denatured DNA (1 μ g DNA / well) ของ type strain, control DNA (calf thymus หรือ *E. coli*) และ DNA ของเชื้อ unknown บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง แล้วเทสารละลาย DNA นั้นทิ้ง ล้างด้วย PBS ปล่อยให้แห้งที่ 45-60 องศาเซลเซียส

3.2.2.8.2 DNA labeling with photobiotin (DNA probe)

เตรียมสารละลาย DNA ของ type strain ในหลอด eppendrot เติมสารละลาย photobiotin ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวางในน้ำแข็ง เปิดฝาไว้แล้วส่องด้วยแสงจากหลอด sunlamp เติม 0.1M Tris-HCl buffer (pH 9.0) และ n-butanol ปั่นด้วย vortex ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm นาน 20 นาที นำสารละลายชั้นบนทิ้ง เติม n-butanol และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทิ้งสารละลายชั้นบน นำ DNA ที่ติดฉากแล้วไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วและนำไป sonicate แล้วนำไปผสมกับ hybridization solution

3.2.2.8.3 Prehybridization

หยดสารละลาย prehybridization ลงแต่ละหลุมของ plate บ่มไว้ นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิสำหรับ hybridize แล้วเทสารละลายนี้ทิ้ง

3.2.2.8.4 Hybridization

หยดสารละลายที่ผสม DNA probe ของ type strain ลงแต่ละหลุม ปิด plate ด้วยแผ่นพลาสติก บ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม 12 ชั่วโมง แล้วทิ้งสารละลายนี้

3.2.2.8.5 Detection of biotinylated – DNA annealing to immobilized – DNA

เมื่อเทสารละลาย hybridize ทิ้งแล้ว ล้างด้วย 0.2xSSC 3 ครั้ง เติมสารละลาย I (Bovine serum albumin (Fraction V) , Triton X – 100, PBS) บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลาย I ทิ้ง

Colorimetric method : เติมสารละลาย streptavidin-peroxidase ใน PBS กับ 0.5 % BSA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง และล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย tetramethyl benzidine – H₂O₂ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที จะเกิดสารละลายสีฟ้า แล้ววัดความเข้มของสีด้วย microplate reader (630 nm) หยดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 2M H₂SO₄ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้ววัดความเข้มที่ 450 nm จะได้ค่าที่ต้องการ

$$\text{การคำนวณ Homology \%} = (V_{\text{sample}} - V_{\text{control}} / V_{\text{type strain}} - V_{\text{control}}) \times 100$$

ผลจากการศึกษา DNA relatedness จะสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อได้ หากเชื้อที่พบเป็นเชื้อที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานไว้จำเป็นต้องศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อใหม่ต่อไป โดยใช้วิธีการดังที่กล่าวมา

3.3 การหมักเพื่อผลิตสารและการสกัดแยกสาร

ทำการเลี้ยงเชื้อใน Seed medium (Yeast extract – Malt extract broth; pH 7.3) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1% CaCO₃; pH 7.3) โดยเติม inoculum 1% ของ seed medium ลงใน production medium บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไปประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) สารสกัดหยาบที่ได้แต่ละส่วนนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและอีกส่วนนำไปตรวจสอบลักษณะทางเคมีเบื้องต้น

3.4 การแยกและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแอสกีโตไมซีตาแต่ละชนิด นำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี เช่น TLC และพิสูจน์เอกลักษณ์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิคทาง spectroscopy เช่น ¹H-NMR

3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้

3.5.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคต่อยา

นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไปประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี agar diffusion (Lorian, 1980) วิธีการทดสอบมีขั้นตอนดังนี้ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาบบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำ disc ที่หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบ ปริมาณ 20 µl/disc ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำ disc control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

โดยทำการวิจัยที่หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างพืชวงศ์ขิงทั้งต้น ได้แก่ ขิง ข่า กะลา เร่ว ขมิ้นชัน ไพล กระเทียม ว่านชักมดลูก เปราะหอม ดาหลา เอื้องหมายนา และกระชาย จากจังหวัดพระนครศรีอยุธยา นครนายก สระบุรี นนทบุรี และอุดรธานี นำมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสปีท พบว่าได้เชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสปีท ทั้งหมด 104 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของพืชตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอกติโนมัยสปีทที่แยกได้

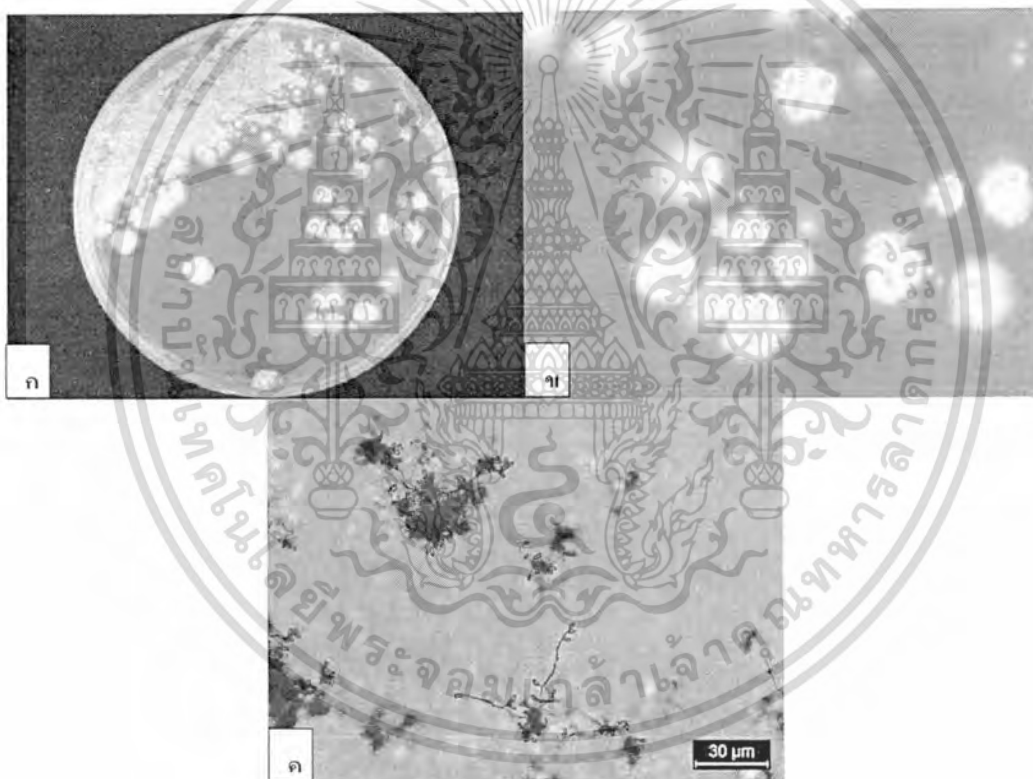
ชนิดของพืช		จังหวัด	รหัสเชื้อ
ชื่อทั่วไป	ชื่อวิทยาศาสตร์		
ข่า	<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.	อุดรธานี	AG1-1, AG2-1, AG2-2, AG2-3, AG2-4, AG2-5, AG2-6
กะลา	<i>Alpinia nigra</i> (Gaertn.) B.L. Burt	นนทบุรี	AN1-19, AN1-25, AN1-37, AN1-38, AN1-44, AN1-45, AN2-5, AN2-8, AN2-9, AN2-10
ข่า	<i>Alpinia siamense</i> K. Schum.	อยุธยา	AS1-1, AS1-2, AS1-3, AS1-4, AS1-5, AS1-6, AS1-7, AS1-8, AS1-9
เร่ว	<i>Amomum xanthioides</i> Wall	นครนายก	AX1-1, AX1-2, AX1-3, AX1-4, AX1-5, AX1-6
กระชาย	<i>Boesenbergia rotunda</i> (L.) Mansf.	อยุธยา	BR1-1, BR2-2, BR3-2, BR3-5
ขมิ้นชัน	<i>Curcuma Longa</i> Linn.	สระบุรี	CL1-1, CL2-1, CL2-2, CL2-3, CL2-4, CL2-5, CL2-6, CL2-7, CL2-8, CL3-1, CL3-2, CL3-3, CL3-4
เอื้องหมายนา	<i>Costus speciosus</i> (Koen.)	นครนายก	CS1-1, CS1-2, CS1-3, CS1-5, CS1-7, CS1-8, CS1-9, CS1-10, CS1-12
ว่านชักมดลูก	<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.	นครนายก	CX1-1
ดาหลา	<i>Etilingera elatior</i> (Jack) R.M. Smith	นครนายก	EE1-2, EE1-4, EE1-5, EE1-6, EE1-7, EE1-8
เปราะหอม	<i>Kaempferia galanga</i> L.	นครนายก	KG1-1, KG1-2, KG1-3
ไพล	<i>Zingiber montanum</i> (Koenig) Link ex Dietr.	อุดรธานี	ZM1-1, ZM2-1, ZM2-2, ZM2-3, ZM2-4, ZM2-5, ZM2-6, ZM2-7, ZM2-8, ZM2-9, ZM2-10, ZM2-11, ZM2-12, ZM2- 14, ZM2-15, ZM3-1, ZM3-2, ZM3-3, ZM3-4, ZM3-5, ZM3- 6, ZM3-7, ZM3-8, ZM3-9
ขิง	<i>Zingiber officinale</i>	นครนายก	ZO1-2, ZO1-4, ZO1-7, ZO1-8, ZO1-9
กระเทียม	<i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith	นครนายก	ZZ1-2, ZZ1-3, ZZ1-4, ZZ1-6, ZZ1-7, ZZ2-1, ZZ2-2

4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยซีท

4.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

ในจำนวนเชื้อแอกติโนมัยซีททั้งหมด 104 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดเชื้อออกเป็น 10 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน สร้างเส้นใยอากาศสีขาว ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์ที่มีถุงหุ้มอยู่บนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 1) เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 2 ไอโซเลต ได้แก่ BR3-2 และ BR3-5

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 1 ความเป็นกรดต่าง 5 ถึง 10 คลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรทได้ แต่สามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนมได้ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 1 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BR3-5 บนอาหาร ISP2

ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

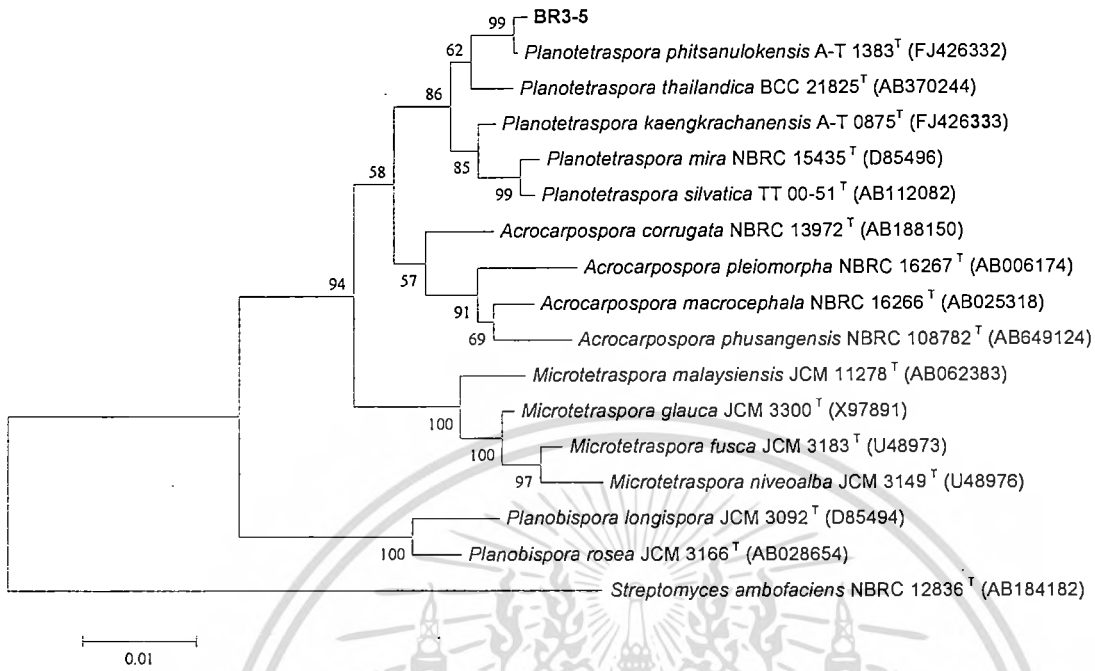
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 1

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิ-โนพิเมติกแบบ *meso* พบน้ำตาลไรโบส แมนโนส ไซโลส กลูโคส และมาลูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ พบ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาร์ลิปิดชนิดที่ 4) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Planotetraspora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BR3-5

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต BR3-5 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Planotetraspora phitsanulokensis* A-T 1383^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.7 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99 (รูปที่ 2)

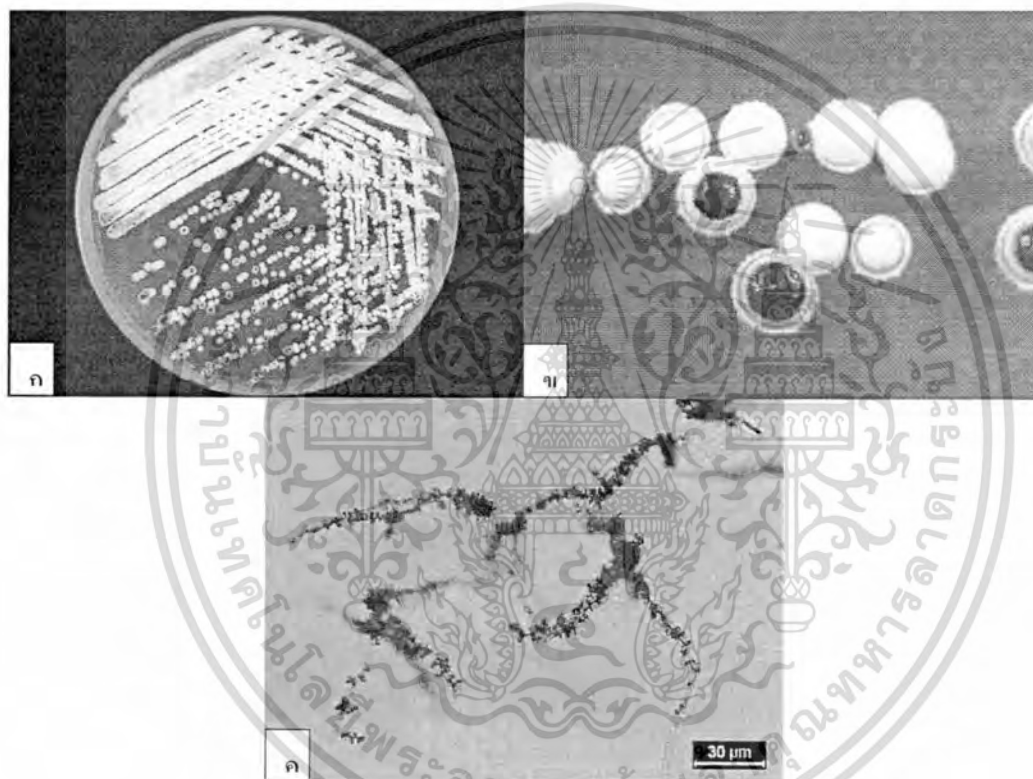




รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต BR3-5 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมชมพูและเส้นใยอาหารน้ำตาลเข้ม ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร และสร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่เกิดบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 3) เชื้อในกลุ่มนี้เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ISP3 และ Nutrient agar เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 9 ไอโซเลต ได้แก่ AN2-5, CL1-1, CL2-2, CL2-7, ZM2-3, ZO1-7, ZZ1-2, ZZ1-4 และ ZZ2-2

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 ในช่วงพีเอช 5 ถึง 10 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและโปรตีนในนม แต่สามารถย่อยสลายแป้ง รวมถึงสามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 3 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AN2-5 บนอาหาร ISP2
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

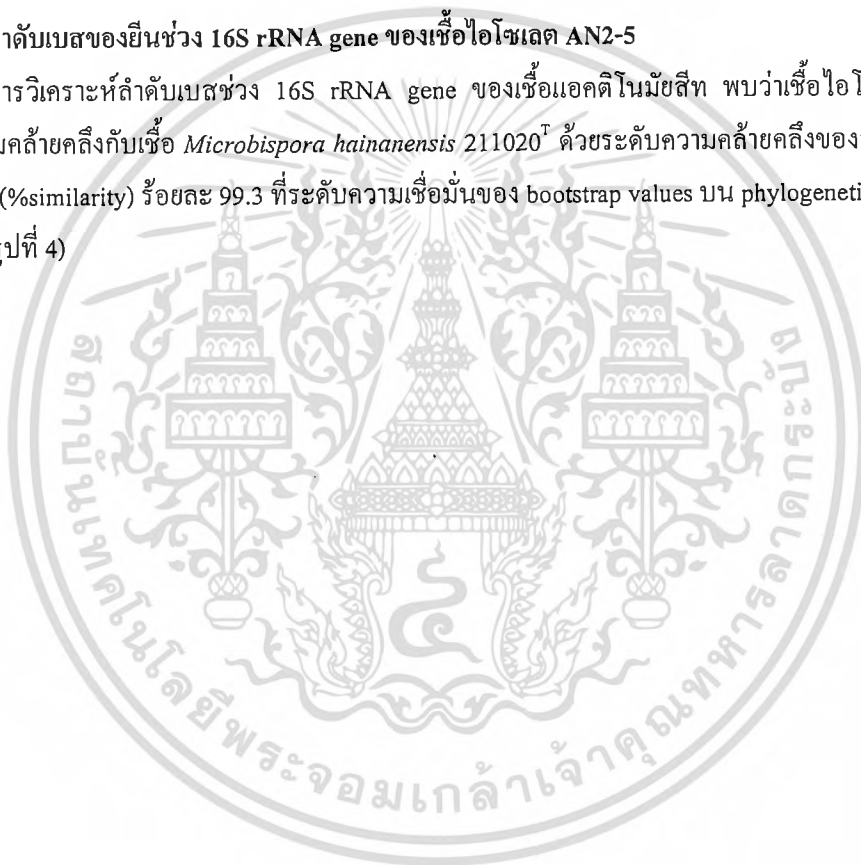
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

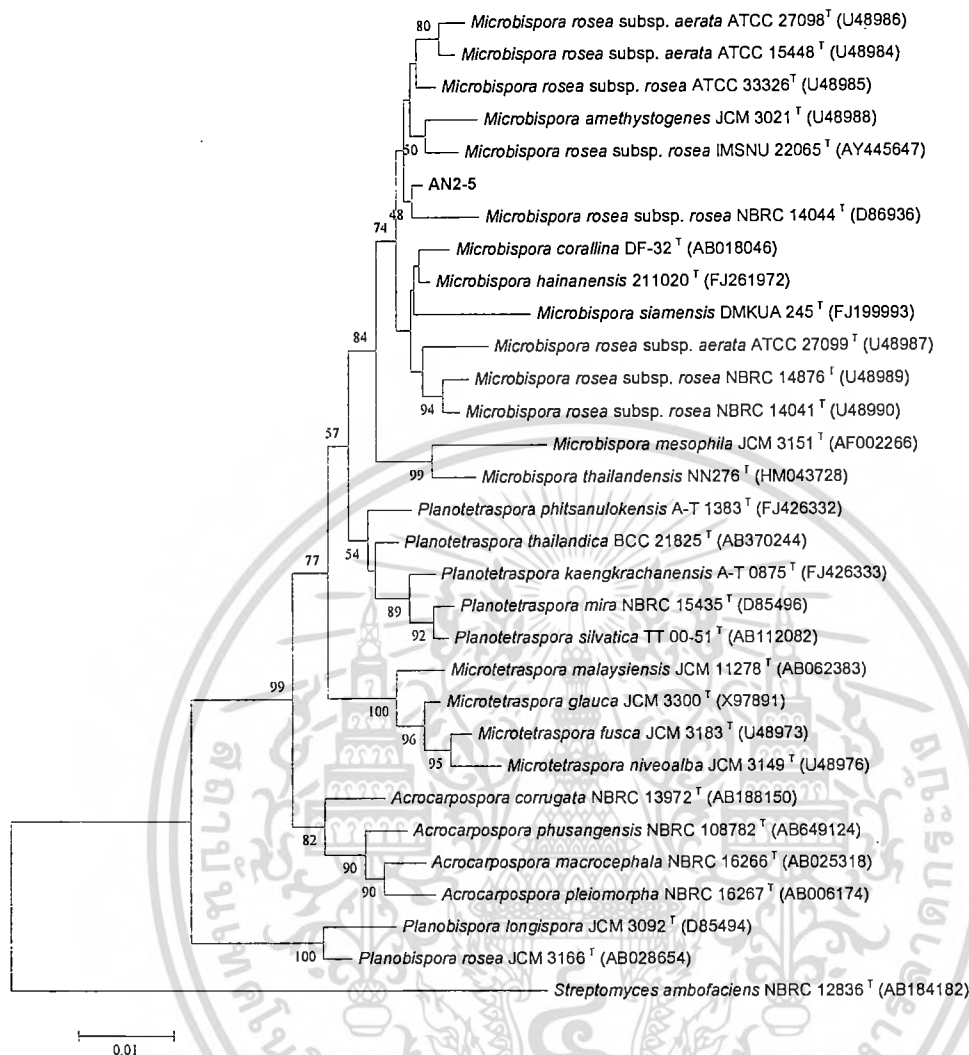
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิ-โนพิเมติกแบบ *meso* พบน้ำตาลไรโบส แมนโนส ซาโลส กลูโคส และมาดูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ พบ diposphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาร์ลิปิดชนิดที่ 4) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Microbispora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AN2-5

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต AN2-5 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora hainanensis* 211020^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.3 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 35 (รูปที่ 4)



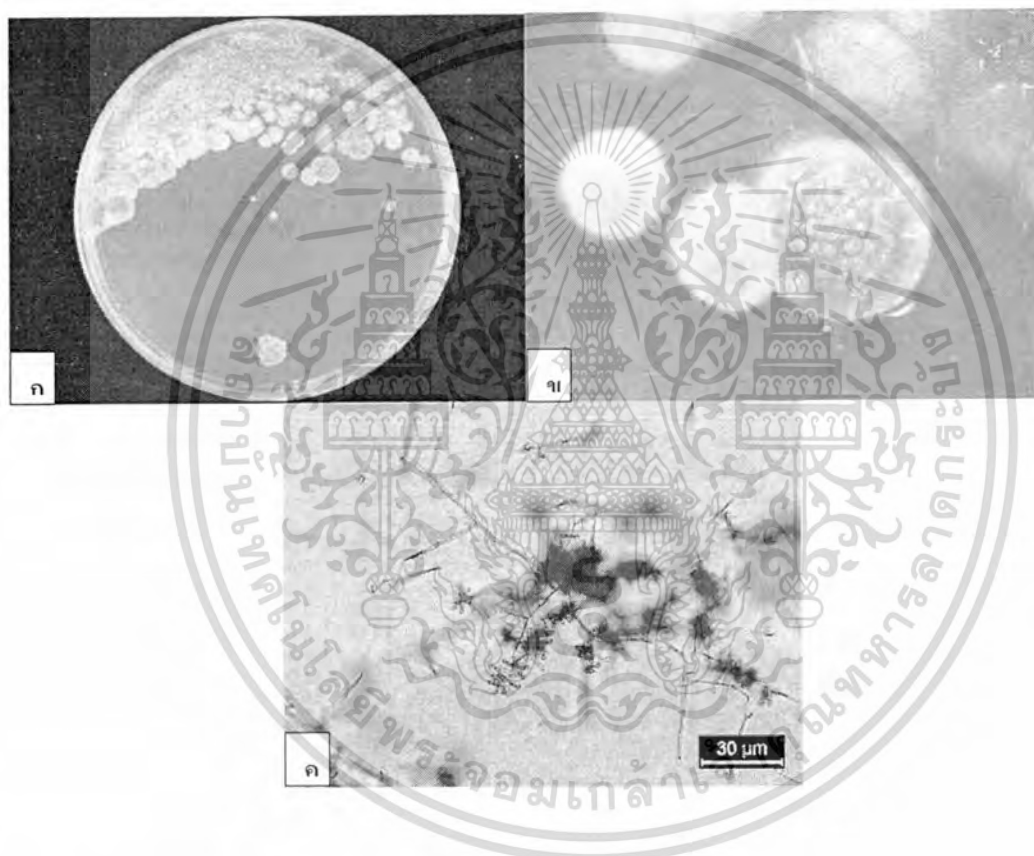


รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AN2-5 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีชมพูอ่อน และสร้างเส้นใยอาหารสีชมพู ไม่มีการสร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยอากาศ โดยสปอร์มีลักษณะแตกแขนง สลับกันคนละด้าน (รูปที่ 5) เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ประกอบด้วยสมาชิก 4 ไอโซเลต คือ AN2-10, CL3-1, KG1-2 และ CL2-3

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 5 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายแป้ง เจลาติน โปรตีนในนม และสามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 5. ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AN2-10 บนอาหาร ISP2

ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

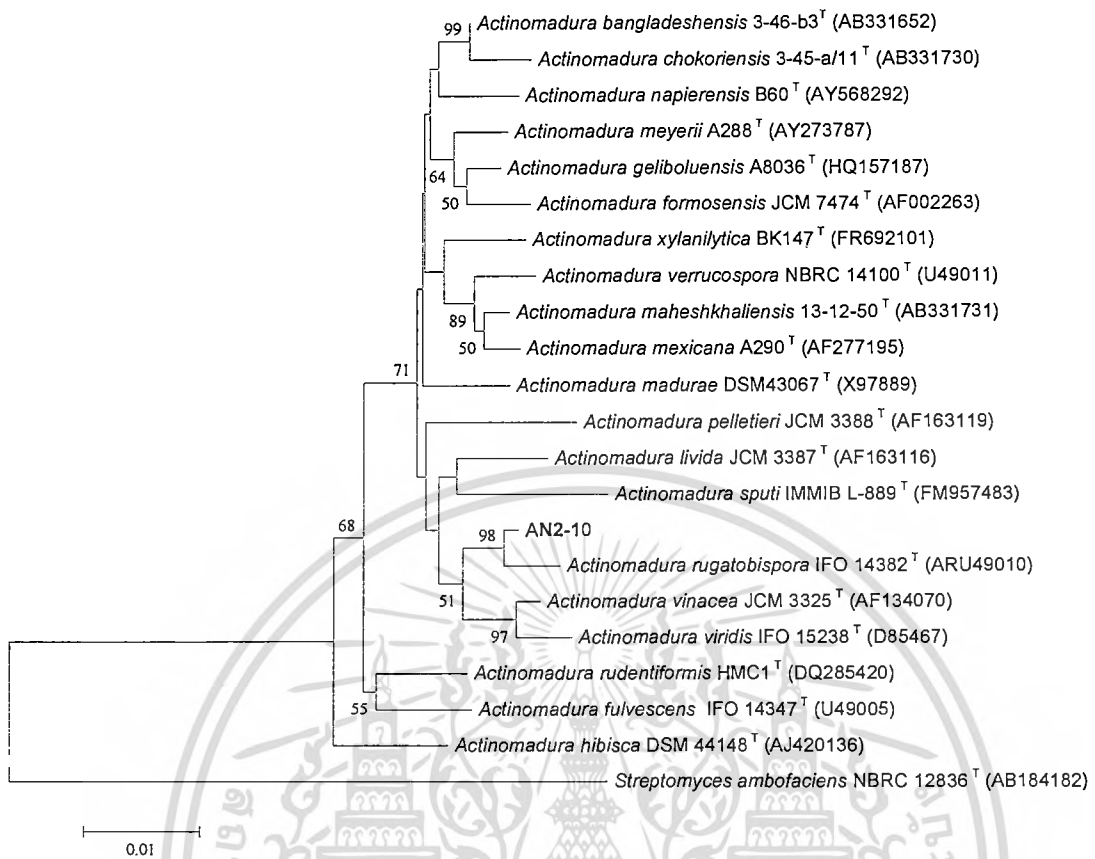
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพีมิดิกแบบ meso พบน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส แมนโนส ไรโบส และ มาดูโรส (เคโมไทป์ 3) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) และฟอสฟาติดีลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Actinomadura*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AN2-10

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต AN2-10 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Actinomadura rugatobispora* IFO 14382 ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.3 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 98 (รูปที่ 6)

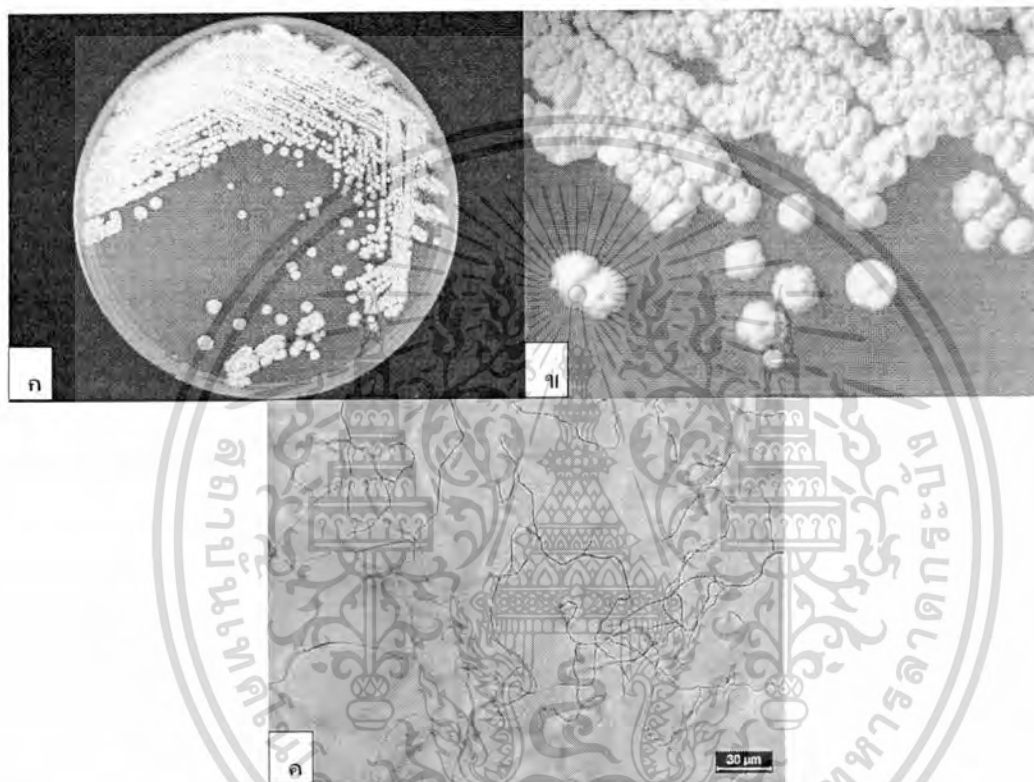


รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AN2-10 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 กลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเหลือง สร้างเส้นใยอาหารสีเหลือง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร และสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว (รูปที่ 7) เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ประกอบด้วยเชื้อ 3 ไอโซเลต คือ AX1-5, ZM2-4 และ ZM2-5

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 10 ความเป็นกรด-ด่าง 4 ถึง 10 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส สามารถย่อยแป้งและสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและโปรตีนในนมได้ (ตารางที่ 5)



รูปที่ 7 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ ไอโซเลต AX1-5 บนอาหาร ISP2
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

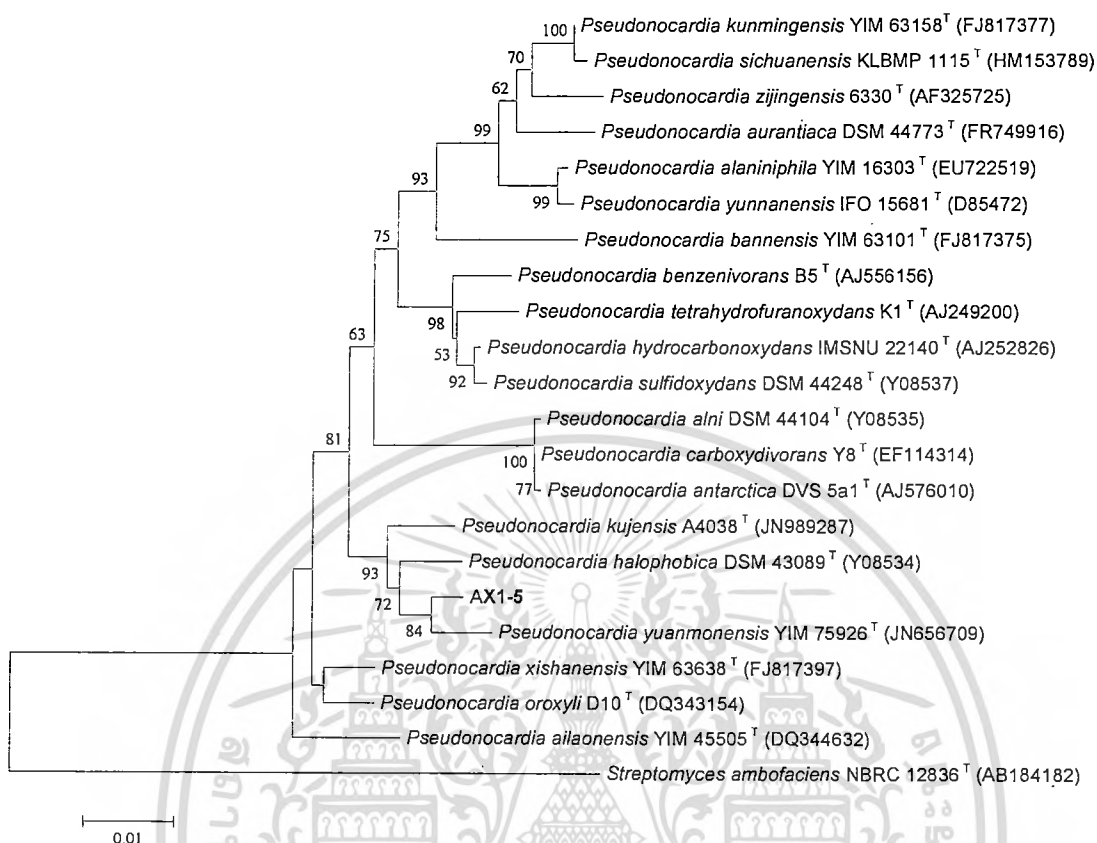
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 4

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิ-โนพิเมติกแบบ *meso* พบน้ำตาลอะราบินโนส ไรโบส กาแลคโตส และกลูโคส (รูปแบบน้ำตาลชนิด A) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) และฟอสฟาติดีลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ และฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine) (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 3) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Pseudonocardia*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AX1-5

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต AX1-5 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Pseudonocardia yuanmonensis* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 84 (รูปที่ 8)

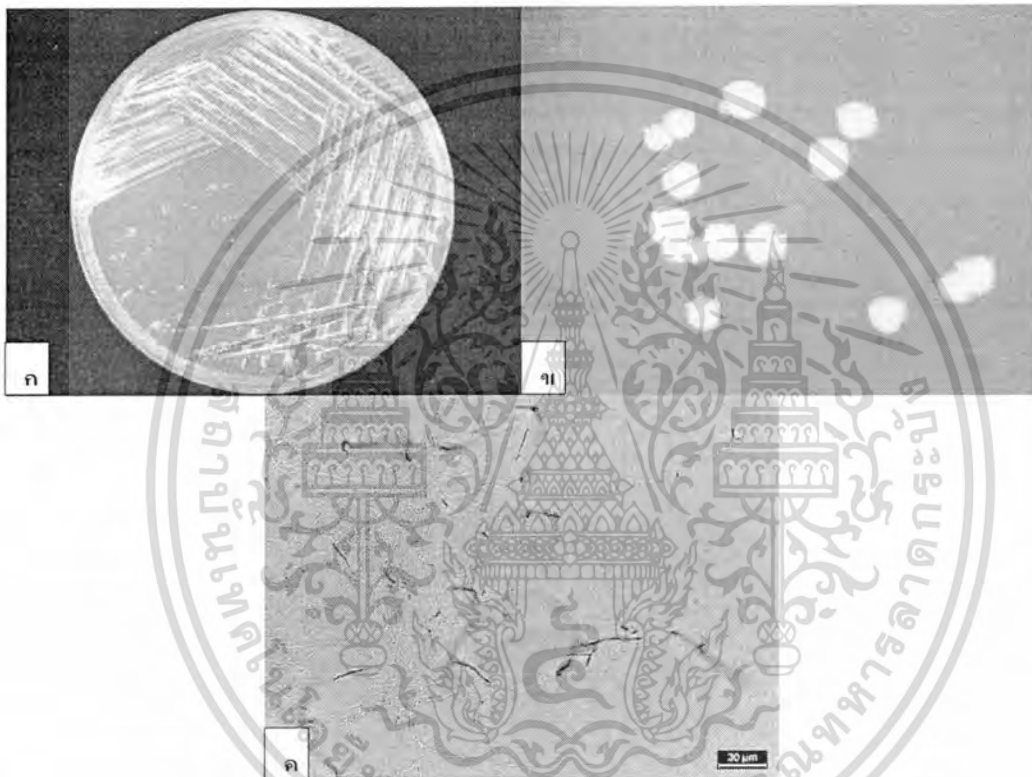




รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AX1-5 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวและสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นสายยาว (รูปที่ 9) เชื้อในกลุ่มนี้ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 4 ไอโซเลต ได้แก่ ZM2-6, ZM2-7, ZM2-10 และ ZM2-11 เชื้อกลุ่มนี้ เจริญได้ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 8 ในช่วงพีเอช 6 ถึง 10 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน แต่สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนม รวมถึงสามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 9 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต ZM2-6 บนอาหาร ISP2
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

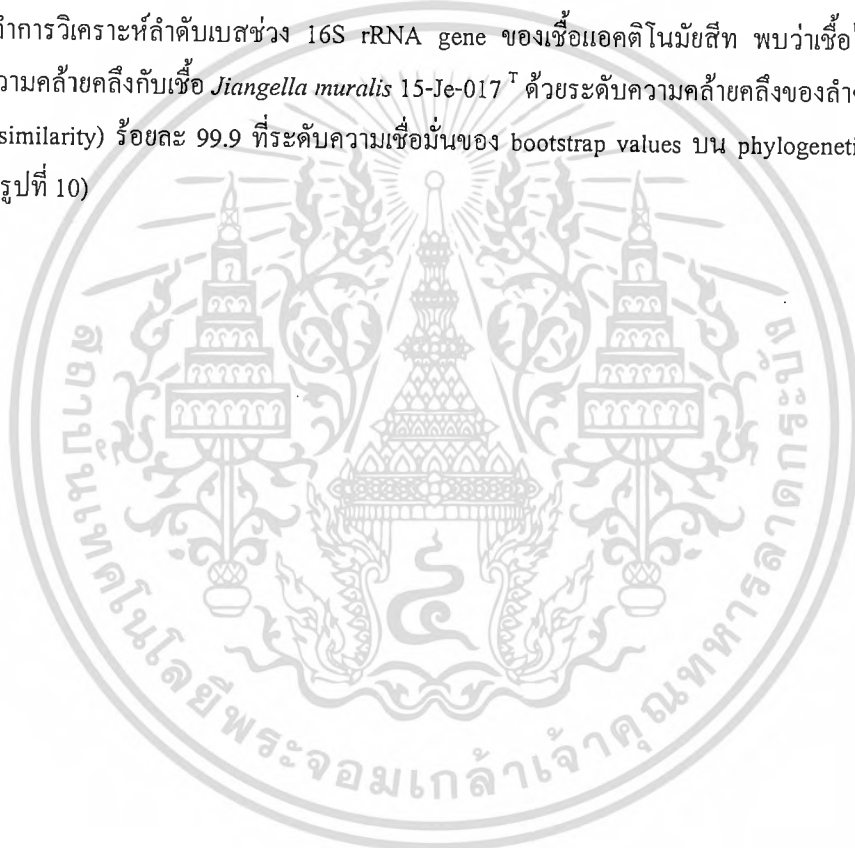
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

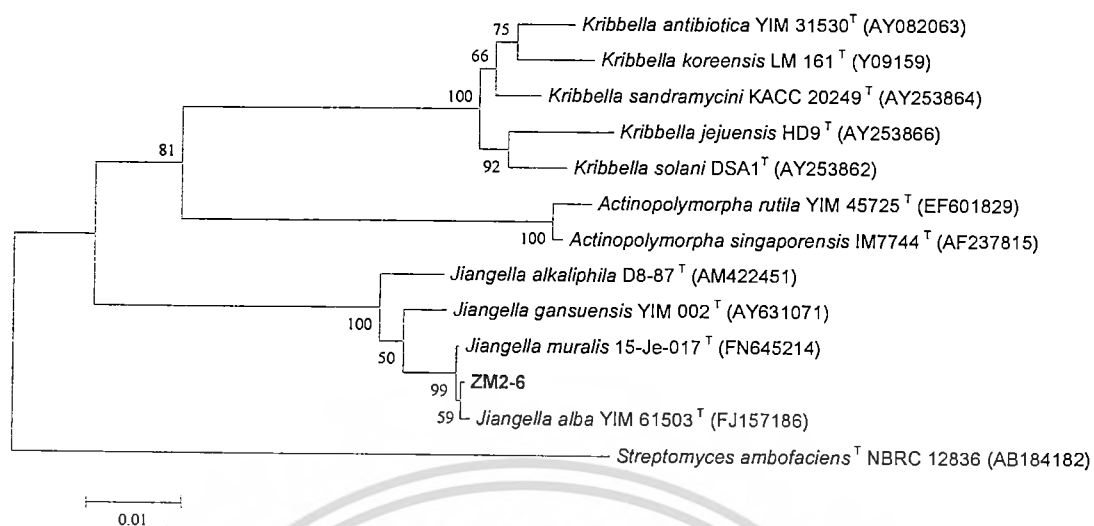
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิ-โนพิเมติกแบบ *LL* พบน้ำตาลแรมโนส ไรโบส แมนโนส และกลูโคส (รูปแบบน้ำตาลชนิด C) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ พบ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG) ฟอสฟาติดีลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลารลิปิดชนิดที่ 1) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Jiangella*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต ZM2-6

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต ZM2-6 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Jiangella muralis* 15-Je-017^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.9 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 59 (รูปที่ 10)



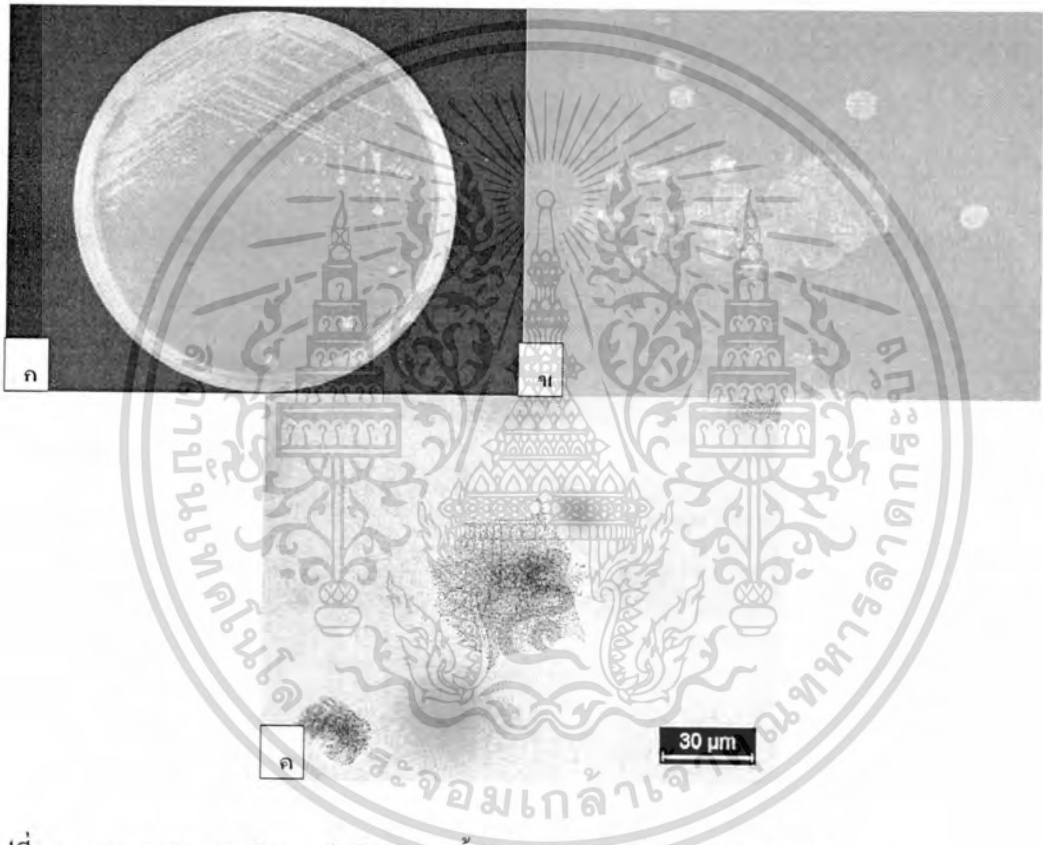


รูปที่ 10 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโรเลค ZM2-6 บน phylogenetic tree (NJ method)



กลุ่มที่ 6 กลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสิทที่ไมสร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำเมื่อสร้างสปอร์ ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 11) เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 ประกอบด้วย 14 ไอโซเลต คือ AN1-19, AN1-37, AN1-44, AN1-45, AX1-4, CL2-1, CL2-4, CL2-5, CL2-8, CS1-1, KG1-3, ZM2-2, ZO1-2 และ ZO1-4

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ด้วยความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 ความเป็นกรด-ด่าง 5 ถึง 10 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้ง เจลาติน และโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถรีเวิร์ซในเตรทได้ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 11 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AN1-19 บนอาหาร ISP2
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

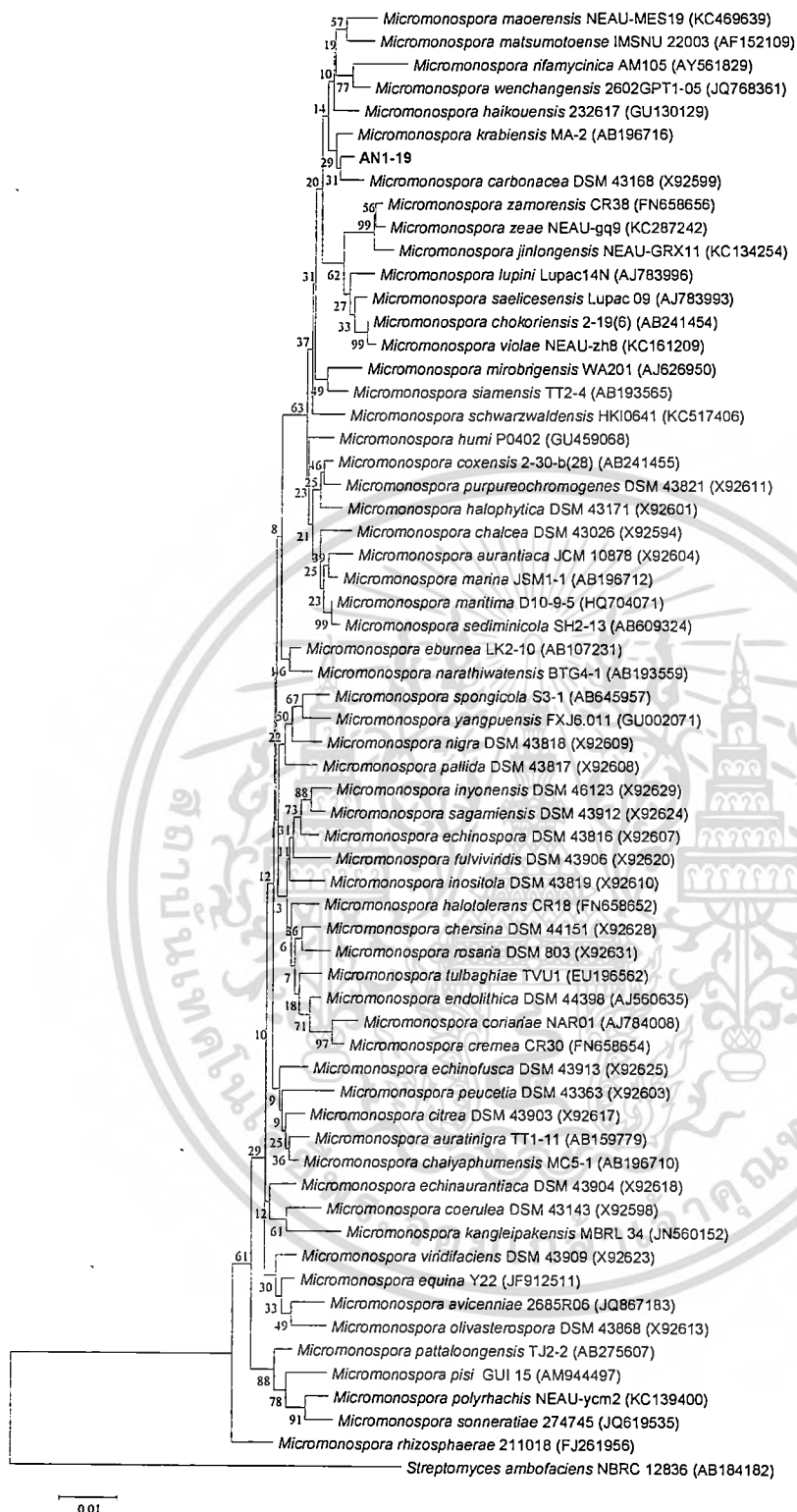
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดโคอะมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type II, peptidoglycan type A1Y) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แมนโนส กาแลคโตส และไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาติดีลอิโนซิทอล แมนโนไซด์ (phosphatidylinositol mannosides) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AN1-19

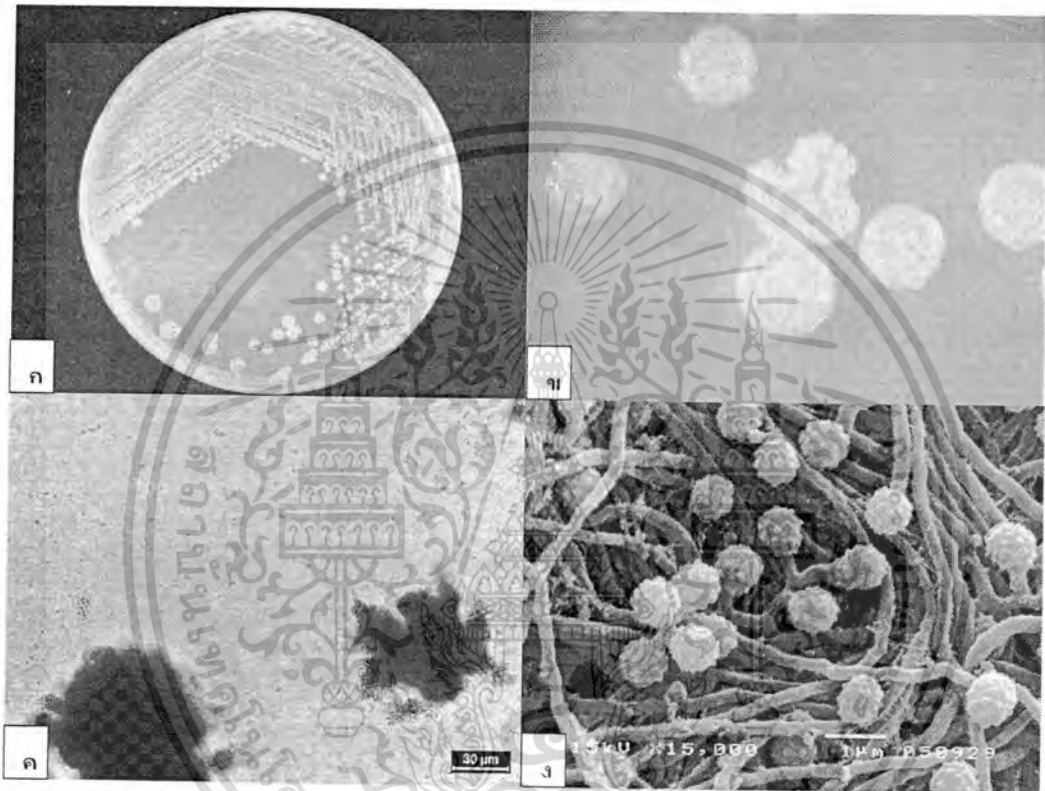
ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต AN1-19 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora haikouensis* 232617^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.4 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 31 (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AN1-19 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 7 กลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 13) เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 ประกอบด้วย 1 ไอโซเลต คือ CSI-12

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 ความเป็นกรดต่าง 5 ถึง 10 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้ง เจลาติน และโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 13 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CSI-12 บนอาหาร ISP2
 ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)
 ง รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(SEM)

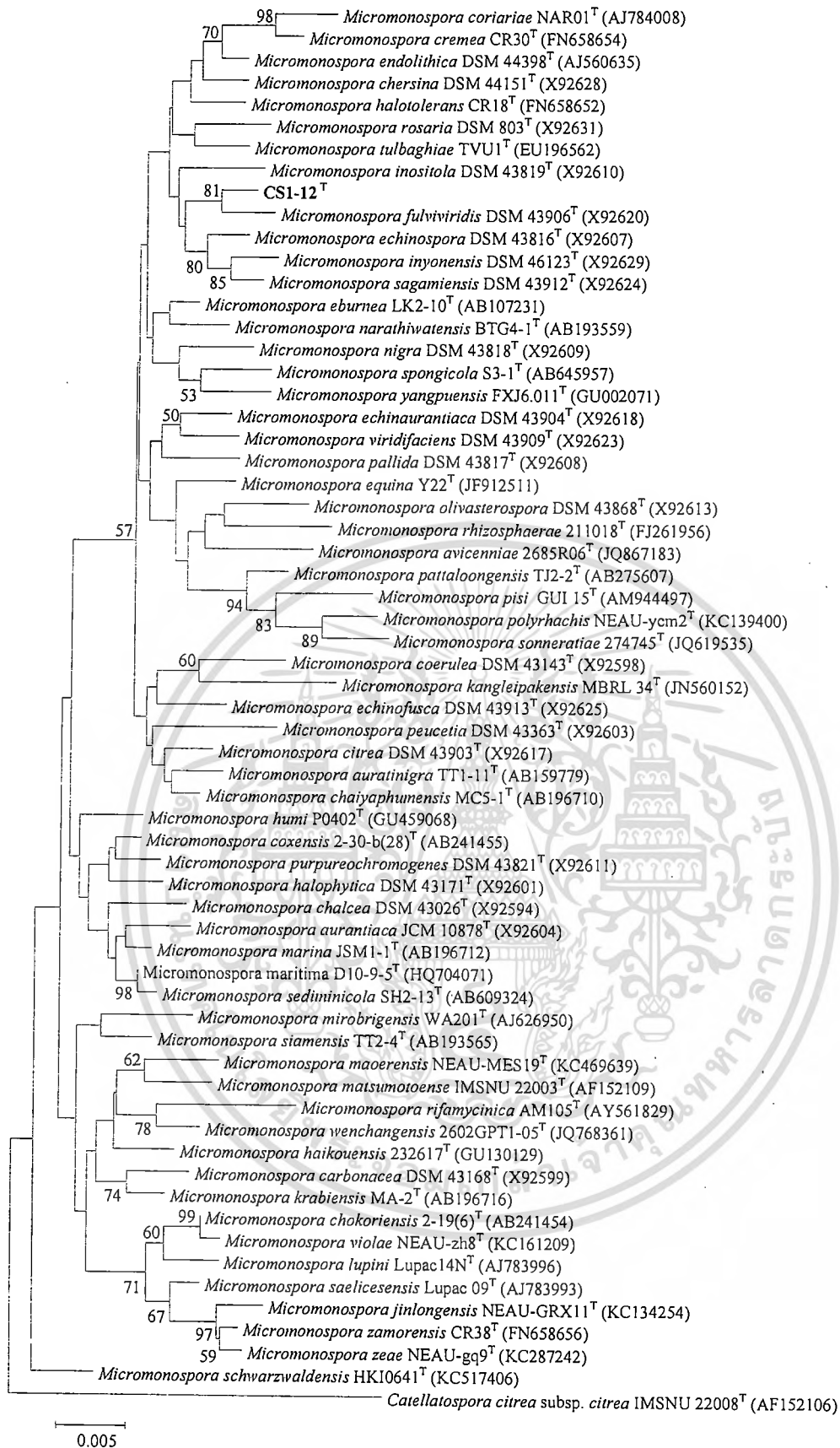
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพีมีติกแบบ meso (cell wall type II, peptidoglycan type A1Y) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แรมโนส และไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาติลอิโนซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositol mannosides) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CS1-12

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต CS1-12 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora fulviviridis* DSM 43906^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.3 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 81 (รูปที่ 14) ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต TR3-6 และเชื้อ type strain ของสกุล *Micromonospora* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Micromonospora fulviviridis* DSM 43906^T) มีค่าต่ำกว่า 70.0 %

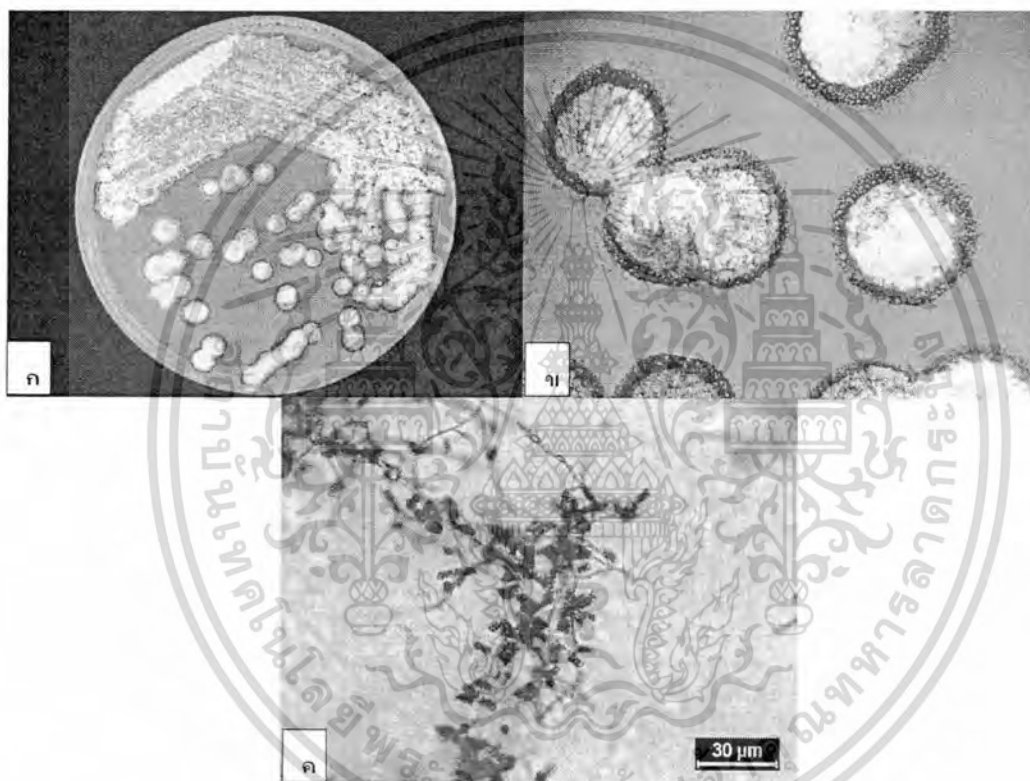


รูปที่ 14 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CS1-12 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 8 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมเขียว เส้นใยอาหารสีเหลืองอมเทาอมเขียว ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร ลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่พันกันเป็นเกลียว (รูปที่ 15) เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 มีสมาชิก 6 ไอโซเลต คือ AG2-1, AG2-5, AG2-6, BR2-2, ZZ1-3 และ ZZ2-1

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 7 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 5-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายแป้ง เจลาติน และโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4) สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.subtilis*, *M.luteus*, *S.aureus*, MRSA และ VRE ได้



รูปที่ 15 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AG2-1 บนอาหาร ISP2

ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

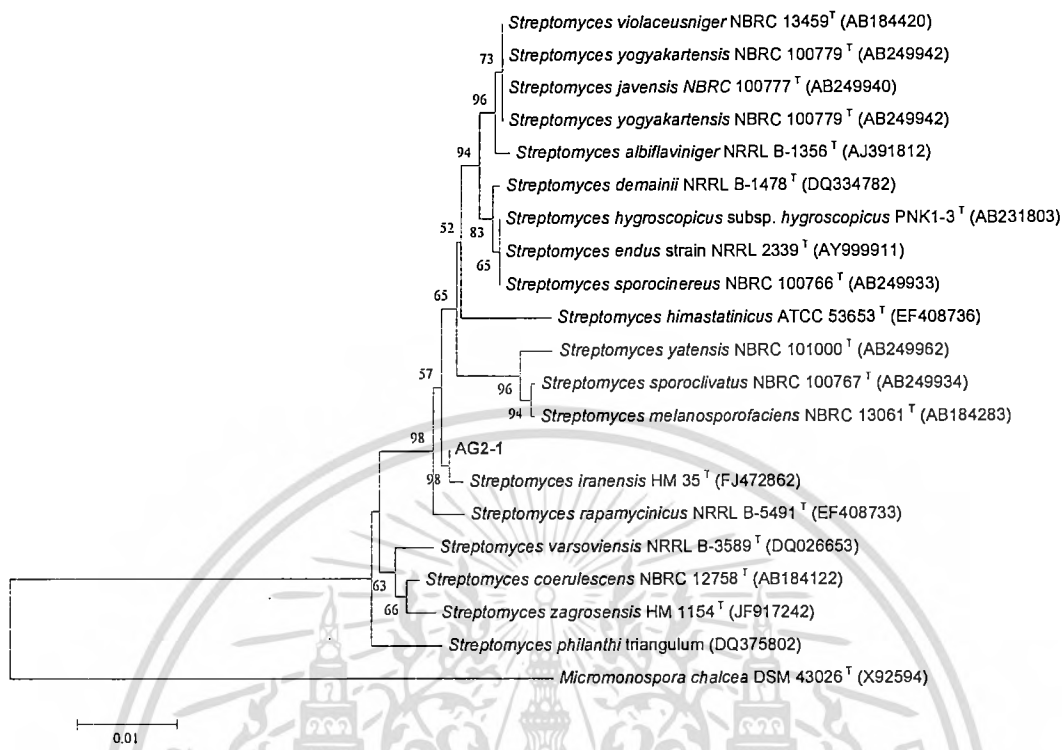
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 8

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพีมิดิกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติดีลอินโนซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositolmannoside), ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol), ฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AG2-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AG2-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces iranensis* HM 35^T มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.8 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 95 (รูปที่ 16)



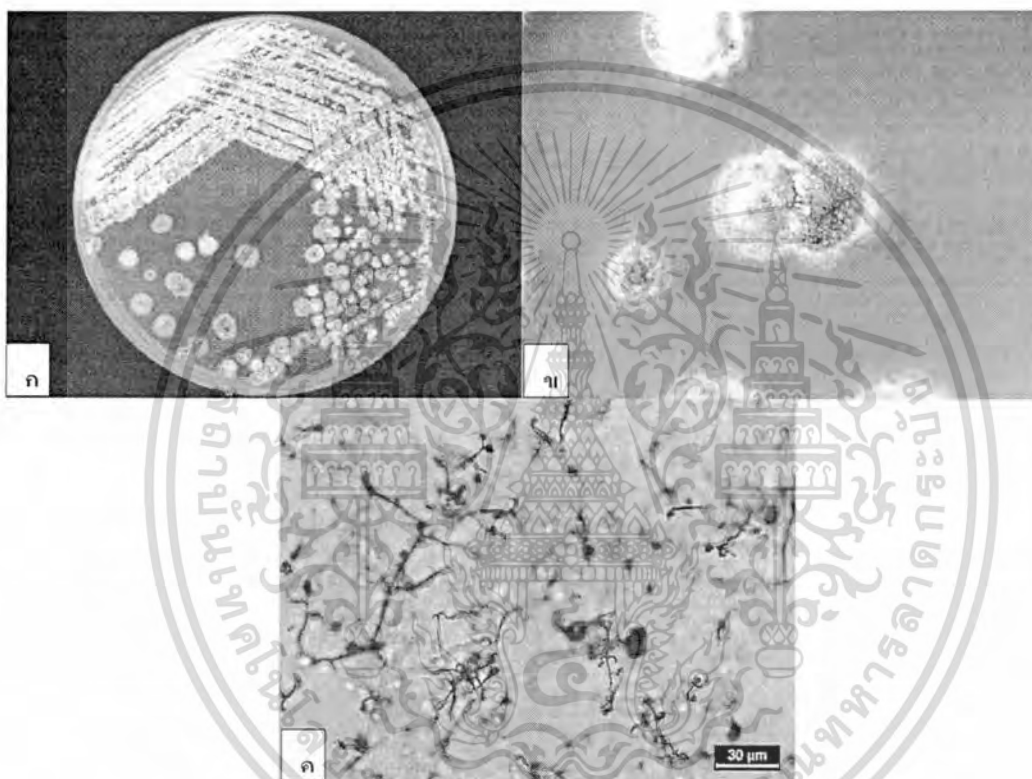


รูปที่ 16 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG2-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 9 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซิสที่สร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมเขียว เส้นใยอาหารสีเหลืองอมเทาอมเขียว สร้างรงควัตถุสีเหลืองอ่อน ลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว (รูปที่ 17) เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 มีสมาชิก 1 ไอโซเลต คือ AN2-9

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 5 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 5-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 30 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายแป้งและ โปรตีนในนมได้ แต่สามารถย่อยสลายเจลาตินและรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4) สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ได้



รูปที่ 17 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนิการเจริญของเชื้อไอโซเลต AN2-9 บนอาหาร ISP2
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

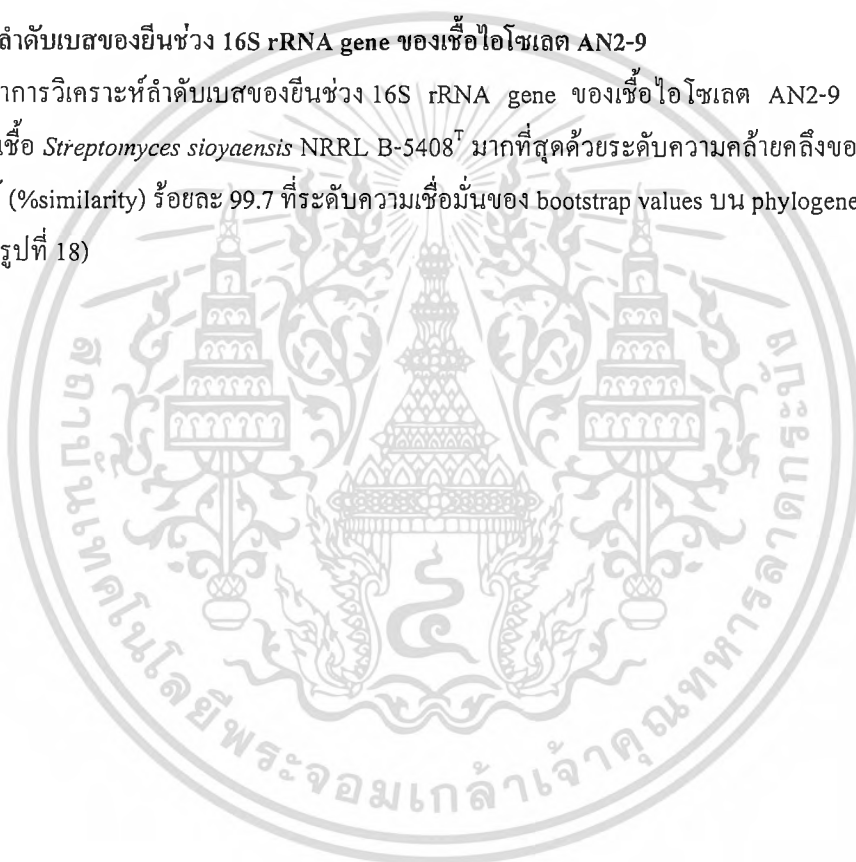
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

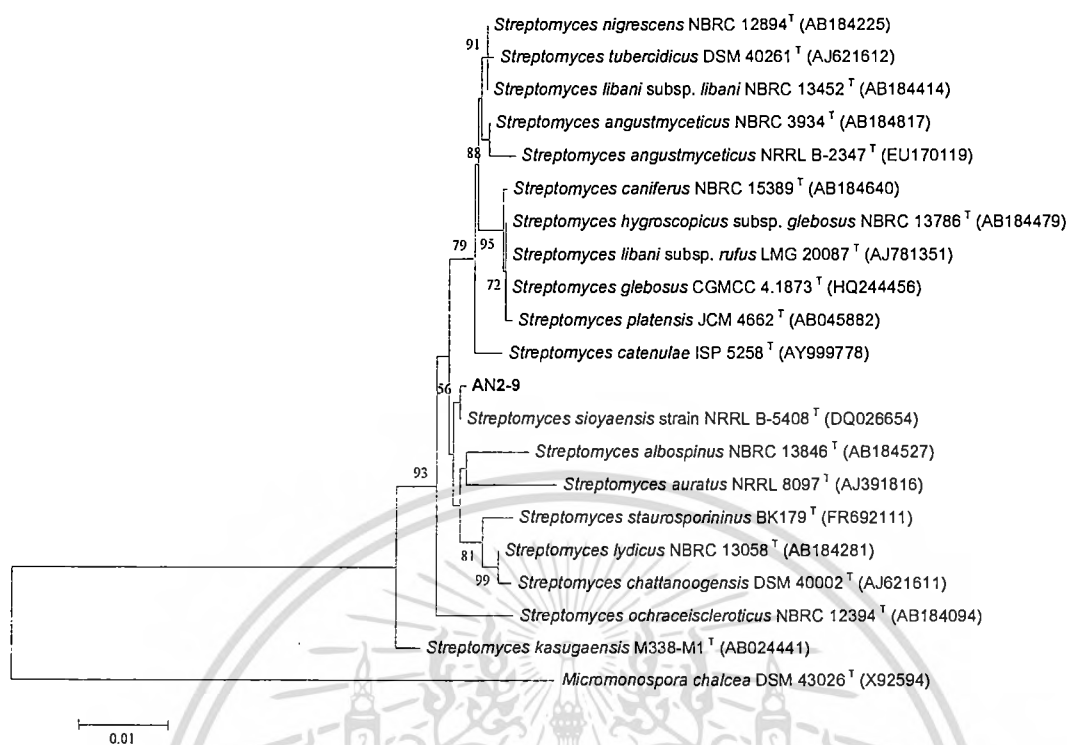
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 9

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไคอะมิโนพีมิดิกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติลอินโนซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositolmannoside), ฟอสฟาติลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol), ฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidylcholine) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AN2-9

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AN2-9 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces sioyaensis* NRRL B-5408^T มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.7 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 32 (รูปที่ 18)



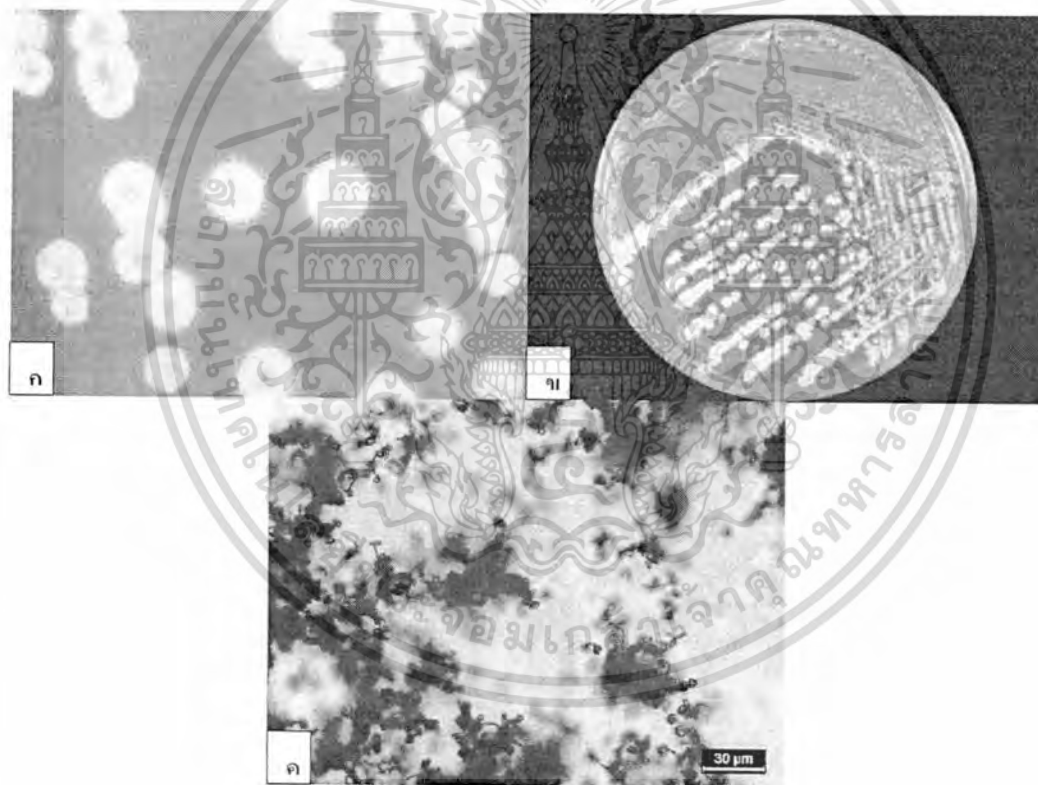


รูปที่ 18 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AN2-9 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 10 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมเขียว เส้นใยอาหารสีเหลืองอมเทาอมเขียว ไม่สร้างรงควัตถุบนอาหาร ISP2 ลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่พันกันเป็นเกลียว (รูปที่ 19) เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ISP3 ISP4 และ ISP5 มีสมาชิก 60 ไอโซเลต คือ AG1-1, AG2-2, AG2-3, AG2-4, AN1-25, AN1-38, AN2-8, AS1-1, AS1-2, AS1-3, AS1-4, AS1-5, AS1-6, AS1-7, AS1-8, AS1-9, AX1-1, AX1-2, AX1-3, AX1-6, BR1-1, CL2-6, CL3-2, CL3-3, CL3-4, CS1-2, CS1-3, CS1-5, CS1-7, CS1-8, CS1-9, CS1-10, CX1-1, EE1-2, EE1-4, EE1-5, EE1-6, EE1-7, EE1-8, KG1-1, ZM1-1, ZM2-1, ZM2-8, ZM2-9, ZM2-12, ZM2-14, ZM2-15, ZM3-1, ZM3-2, ZM3-3, ZM3-4, ZM3-5, ZM3-6, ZM3-7, ZM3-8, ZM3-9, ZO1-8, ZO1-9, ZZ1-6 และ ZZ1-7

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 9 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 4-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง เจลาติน โปรตีนในนม และสามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 19 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีการเจริญของเชื้อไอโซเลต AS1-8 บนอาหาร ISP2
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

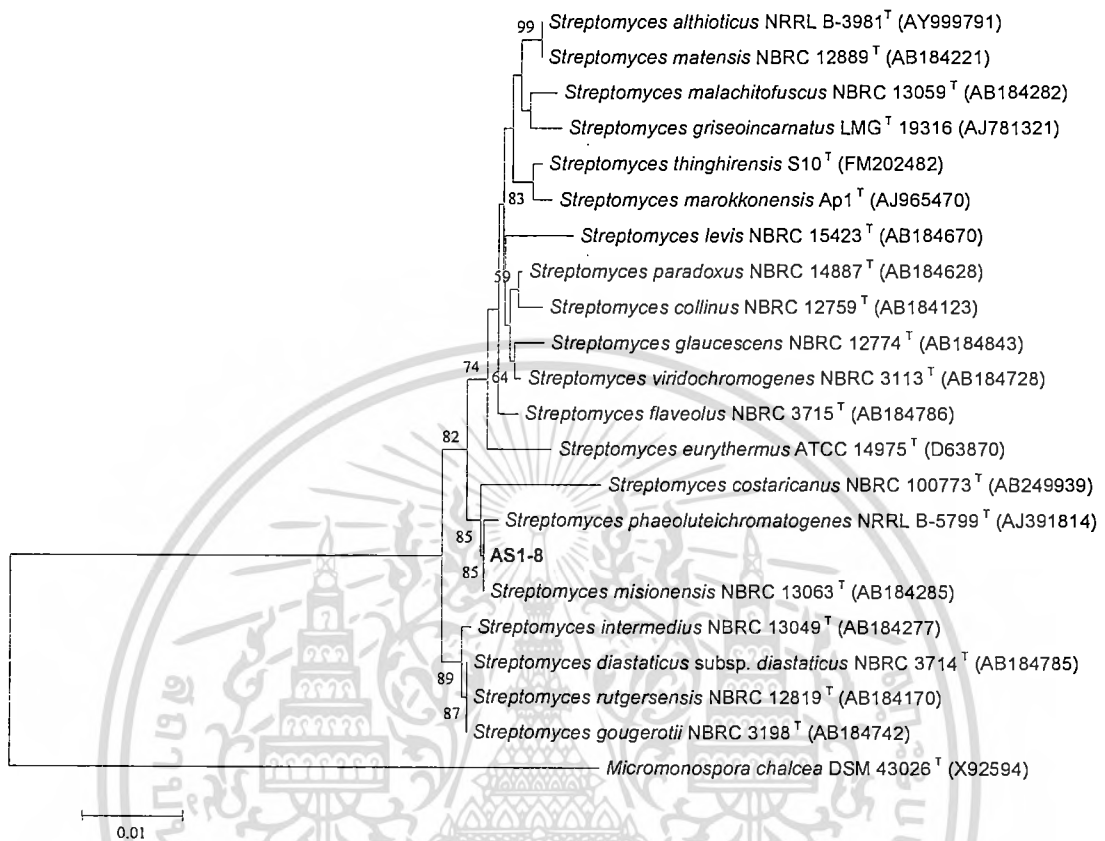
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 10

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพีมิดิกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติลอินโนซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositolmannoside), ฟอสฟาติลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol), ฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidylcholine) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AS1-8

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AS1-8 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces misionensis* NBRC 13063^T มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 100.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 85 (รูปที่ 20)





รูปที่ 20 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AS1-8 บน phylogenetic tree (NJ method)

ตารางที่ 3. ลักษณะการเจริญ และลักษณะวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
BR3-5	ISP2	ดี	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	ISP3	ดี	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	ISP4	น้อย	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	ISP5	น้อย	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	ISP6	น้อย	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	ISP7	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	เหลืองอ่อน	-
N.A.	น้อย	ขาว	เหลืองอ่อน	-	
AN2-5	ISP2	ดีมาก	ขาวอมชมพู	น้ำตาลเข้ม	-
	ISP3	ดี	ขาวอมชมพู	น้ำตาลอ่อน	-
	ISP4	น้อย	ขาวอมชมพู	ขาว	-
	ISP5	น้อย	ขาวอมชมพู	ขาว	-
	ISP6	ปานกลาง	ขาวอมชมพู	เหลืองอมเทา	-
	ISP7	น้อย	ขาวอมชมพู	ขาว	-
	Glu.A.	น้อย	ขาวอมชมพู	ขาว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาวอมชมพู	เทาอมชมพู	-
N.A.	ดี		เหลืองอมเทา	-	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3. ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
AN2-10	ISP2	ดี	ชมพูอ่อน	ชมพู	-
	ISP3	ดี	ชมพูอ่อน	ชมพู	-
	ISP4	ดี	ชมพูอ่อน	ชมพู	-
	ISP5	ปานกลาง	ชมพูอ่อน	ชมพู	-
	ISP6	น้อย	-	เหลืองอมเทา	-
	ISP7	ดี	ชมพูอ่อน	ชมพู	-
	Glu.A.	ไม่เจริญ	-	-	-
	Cz.sucrose	น้อย	ชมพูอ่อน	ขาวอมชมพู	-
N.A.	น้อย	ชมพูอ่อน	เหลืองอมเขียว	-	
AX1-5	ISP2	ดีมาก	ขาวอมเหลือง	เหลือง	-
	ISP3	น้อย	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	ISP4	น้อย	ขาว	เหลืองอ่อน	-
	ISP5	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมเทา	-
	ISP6	ดี	-	เหลือง	-
	ISP7	ปานกลาง	ขาว	เทาอมเหลือง	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมเทา	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	เหลืองอมเทา	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	เหลือง	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3. ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
ZM2-6	ISP2	ดี	ชมพูอ่อน	ชมพู	-
	ISP3	ปานกลาง	ชมพูอ่อน	ชมพู	-
	ISP4	ปานกลาง	ชมพูอ่อน	ชมพู	-
	ISP5	น้อย	ชมพูอ่อน	ชมพู	-
	ISP6	ปานกลาง	-	เหลืองอมเทา	-
	ISP7	ปานกลาง	ชมพูอ่อน	ชมพู	-
	Glu.A.	น้อย	-	-	-
	Cz.sucrose	น้อย	ชมพูอ่อน	ขาวอมชมพู	-
	N.A.	ปานกลาง	ชมพูอ่อน	เหลืองอมเขียว	-
ANI-19	ISP2	ดี	-	ส้ม	-
	ISP3	ดี	-	ส้ม	-
	ISP4	น้อย	-	ส้ม	-
	ISP5	ปานกลาง	-	ส้ม	-
	ISP6	ปานกลาง	-	ส้ม	-
	ISP7	ปานกลาง	-	ส้ม	-
	Glu.A.	น้อย	-	ส้ม	-
	Cz.sucrose	น้อย	-	ส้ม	-
	N.A.	ปานกลาง	-	ส้ม	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3. ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CS1-12	ISP2	ดี	-	ส้ม	-
	ISP3	ดี	-	ส้ม	-
	ISP4	น้อย	-	ส้ม	-
	ISP5	น้อย	-	ส้ม	-
	ISP6	ปานกลาง	-	ส้ม	-
	ISP7	น้อย	-	ส้ม	-
	Glu.A.	น้อย	-	ส้ม	-
	Cz.sucrose	น้อย	-	ส้ม	-
	N.A.	ดี	-	ส้ม	-
AG2-1	ISP2	ดีมาก	เทาอมเขียว	เหลืองอมเขียวอมเทา	-
	ISP3	ดีมาก	เทาอมเขียว	เหลืองอมเขียวอมเทา	-
	ISP4	ดี	ฟ้าม่วงอมเทา	ขาวอมเหลือง	-
	ISP5	ดี	ขาว	เหลืองอมเขียว	-
	ISP6	ดี	เทาอมเหลือง	เทาอมเหลือง	-
	ISP7	ดี	เทาอมเขียว	เทาอมเขียว	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ขาว	เทาอมเหลือง	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	เทาอมเขียว	เทาอมเขียว	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมเขียวอมเทา	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3. ลักษณะการเจริญ และลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
AN2-9	ISP2	ดีมาก	เทาอมเขียว	เหลืองอมเขียวอมเทา	เหลือง
	ISP3	ดีมาก	ขาว	เหลืองอมเขียวอมเทา	-
	ISP4	ดี	ขาว	ขาวอมเหลือง	-
	ISP5	ดี	ขาว	ขาวอมเหลือง	-
	ISP6	ดี	ขาว	เหลืองอมเขียวอมเทา	-
	ISP7	ดี	ขาว	เหลืองอมเขียวอมเทา	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ขาวอมเหลือง	ขาวอมเหลือง	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมเขียวอมเทา	-
	N.A.	ดี	ขาว	เหลืองอมเขียวอมเทา	-
AS1-8	ISP2	ดีมาก	เทาอมเขียว	เหลืองอมเขียวอมเทา	-
	ISP3	ดีมาก	เทา	น้ำตาลอมเทา	เทา
	ISP4	ดีมาก	เทา	เหลืองอมเขียวอมเทา	-
	ISP5	ดีมาก	เทา	เทาอมเหลือง	-
	ISP6	ดี	ขาว	เหลืองอมเขียวอมเทา	-
	ISP7	ดีมาก	เทา	เหลืองอมเขียวอมเทา	-
	Glu.A.	ดี	ขาว	เขียวเหลือง	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	ขาว	-
	N.A.	ดี	เทาอมเขียว	เหลืองอมเขียวอมเทา	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสิ่งสกัดยาบในชั้นเอธิลอะซีเตตด้วยวิธี
Agar disc diffusion

รหัส เชื้อ	ความ เข้มข้น	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)							
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	MRSA	VRE
AG2-1	1 mg/ml	-	27	22	-	33	-	30	20
AG2-5	1 mg/ml	-	23	29	-	25	-	25	27
AG2-6	1 mg/ml	-	20	20	-	25	-	22	20
AN2-9	1 mg/ml	-	-	-	-	-	8	-	-
AN3-6	1 mg/ml	-	29	23	-	35	7	30	22
BR2-2	1 mg/ml	-	22	20	-	35	-	18	20
KG1-1	1 mg/ml	-	-	12	-	-	-	-	15
ZM3-2	1 mg/ml	-	-	10	-	22	-	11	14
ZZ1-3	1 mg/ml	-	25	19	-	30	8	28	18
ZZ2-1	1 mg/ml	-	31	26	-	42	9	35	23

หมายเหตุ

B. subtilis ATCC 6633

E. coli ATCC 25922

M. luteus ATCC 9341

Ps. aeruginosa ATCC 27853

S. aureus ATCC 25923

C. albicans ATCC 10231

MRSA คือ Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654

VRE คือ Vancomycin-resistant enterococci (VRE) *Enterococcus fecium* ATCC 51559

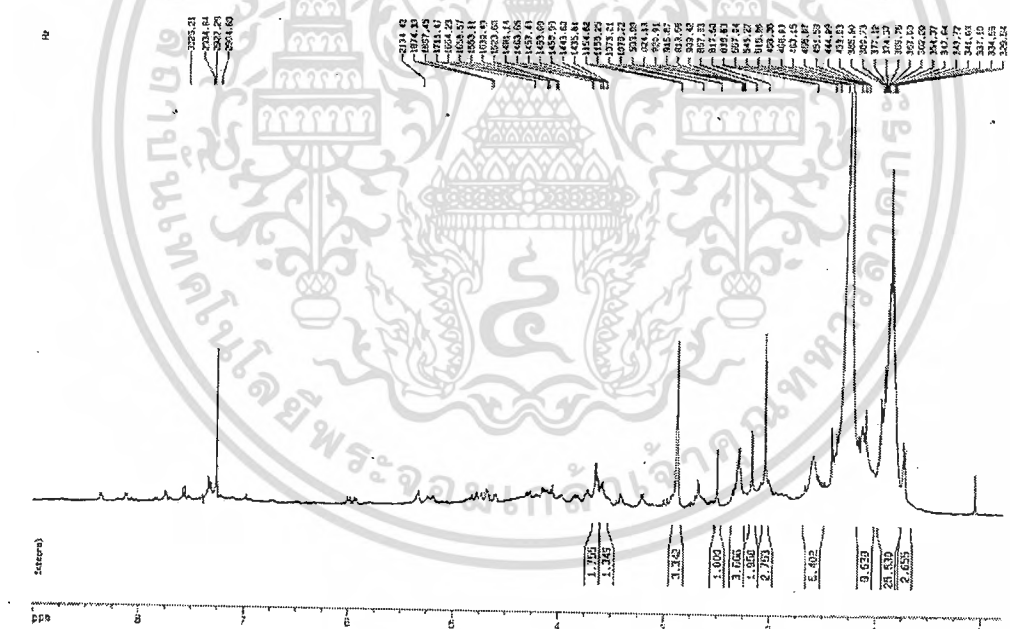
การแยกและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

ได้ทำการคัดเลือกสิ่งสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแอสคิโนไมซีทีสที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีมา พิสูจน์เอกลักษณ์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิคทาง spectroscopy เช่น $^1\text{H-NMR}$ พบว่า สิ่งสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อไอโซเลต AG2-1, AG2-5, AG2-6 และ BR2-2 แสดงลักษณะรูปแบบของ $^1\text{H-NMR}$ ที่น่าสนใจคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 21, 22) นั่นคือ พบสัญญาณของ aromatic proton ที่ช่วง δ_{H} 7.2-8.3, สัญญาณของ olefinic proton ที่ช่วง δ_{H} 6.0, สัญญาณของโปรตอนที่อยู่กับ Heteroatom ที่ช่วง δ_{H} 4.0-5.2 และสัญญาณของ sp^3 -proton ที่ช่วง δ_{H} 1.0-3.0

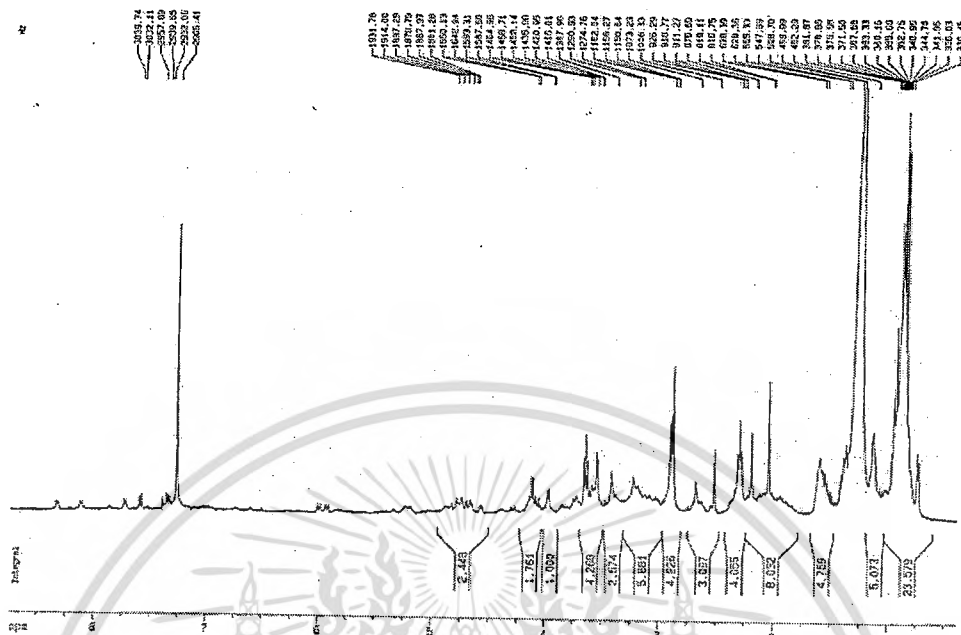
สำหรับสิ่งสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อไอโซเลต AN3-6, ZZ1-3 และ ZZ2-1 แสดงลักษณะรูปแบบของ $^1\text{H-NMR}$ ที่คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 23, 24 และ 25) นั่นคือ พบสัญญาณของโปรตอนที่อยู่กับ Heteroatom ที่ช่วง δ_{H} 4.1 และสัญญาณของ sp^3 -proton ที่ช่วง δ_{H} 1.0-3.0

สิ่งสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อไอโซเลต ZM3-2 แสดงลักษณะรูปแบบของ $^1\text{H-NMR}$ ของ aromatic proton ที่ช่วง δ_{H} 7.2, สัญญาณของโปรตอนที่อยู่กับ Heteroatom ที่ช่วง δ_{H} 4.2-4.9 และสัญญาณของ methyl และ methylene-proton ที่ช่วง δ_{H} 1.0-3.0 (รูปที่ 26)

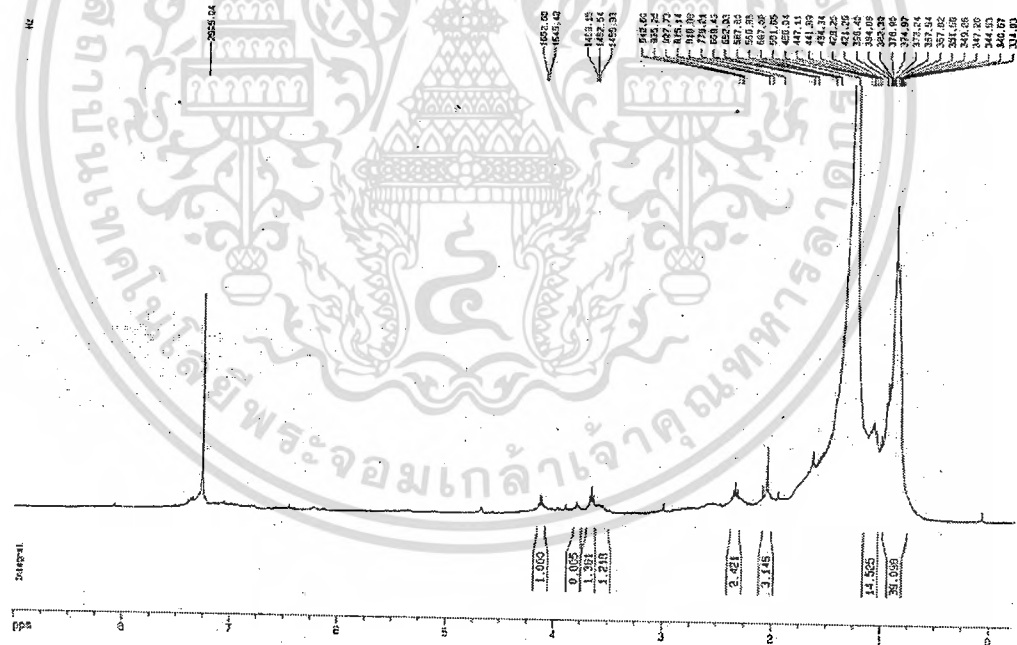
และสิ่งสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อไอโซเลต KG1-1 แสดงลักษณะรูปแบบของ $^1\text{H-NMR}$ ของ aromatic proton ที่ช่วง δ_{H} 7.8-8.1, สัญญาณของ olefinic proton ที่ช่วง δ_{H} 6.0-7.0, สัญญาณของโปรตอนช่วง δ_{H} 4.0-5.2 และสัญญาณของ sp^3 -proton ที่ช่วง δ_{H} 1.0-2.6 (รูปที่ 27)



รูปที่ 21 แสดงสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ จากสิ่งสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อแอสคิโนไมซีทีส ไอโซเลต AG2-1

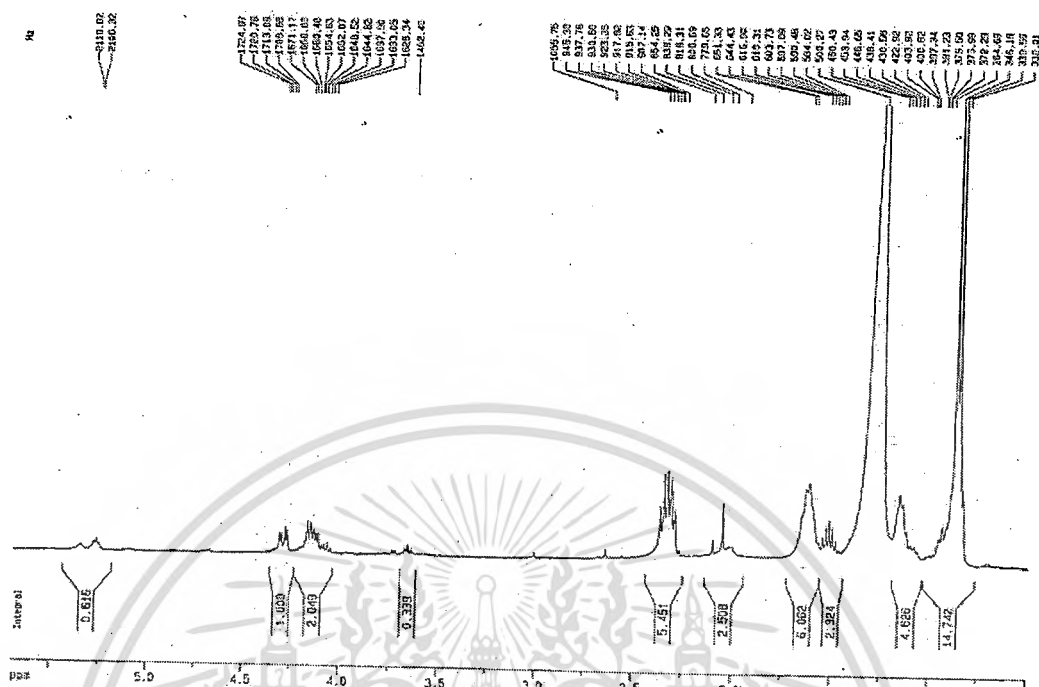


รูปที่ 22 แสดงสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ จากสิ่งสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อแอสคิตโนมัยสียไอโซเลต BR2-2

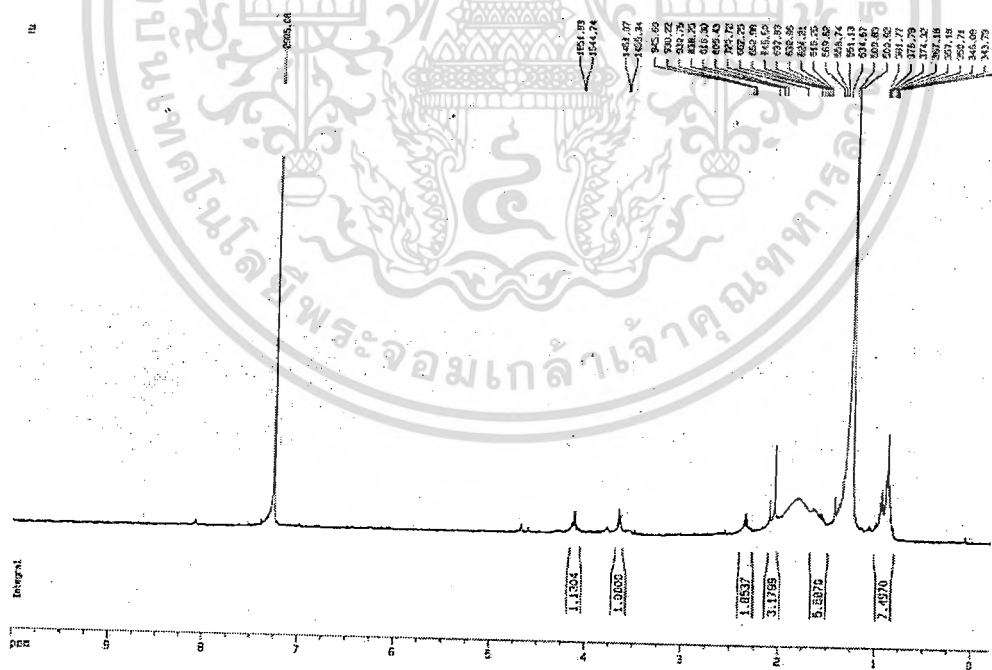


รูปที่ 23 แสดงสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ จากสิ่งสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อแอสคิตโนมัยสียไอโซเลต AN3-6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

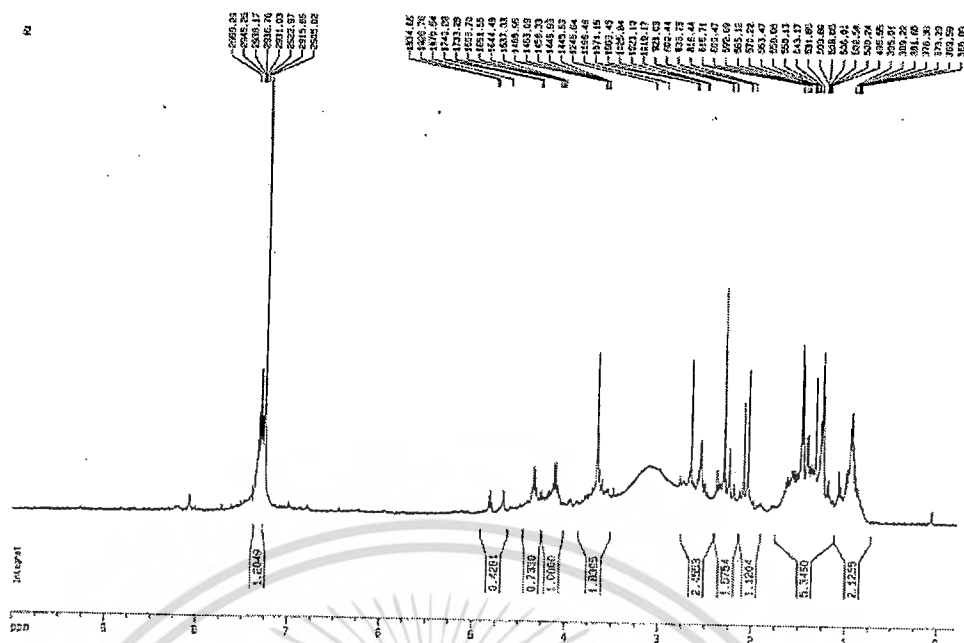


รูปที่ 24 แสดงสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ จากสิ่งสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อแอสคิโนไมซีทีสไอโซเลต ZZ1-3

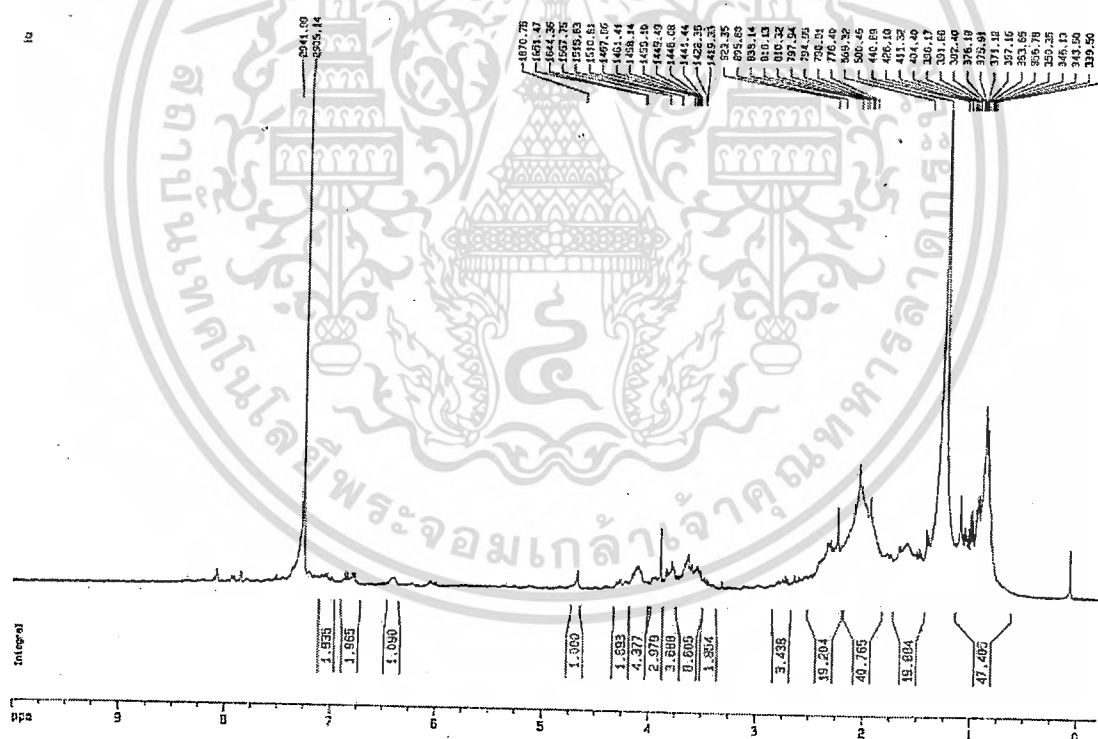


รูปที่ 25 แสดงสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ จากสิ่งสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อแอสคิโนไมซีทีสไอโซเลต ZZ2-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 26 แสดงสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ จากสิ่งสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อแอสคิโนไมซีทีสไอโซเลต ZM3-2



รูปที่ 27 แสดงสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ จากสิ่งสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อแอสคิโนไมซีทีสไอโซเลต KG1-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอสโคไมซีตจากตัวอย่างพืชวงศ์ขิง ได้แก่ ขิง ข่า กะลา เร่ว ขมิ้นชัน ไพล กระเทียม ว่านชักมดลูก เปราะหอม ดาหลา เอื้องหมายนา และกระชาย จากจังหวัดพระนครศรีอยุธยา นครนายก สระบุรี นนทบุรี และอุดรธานี สามารถแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอสโคไมซีตได้ทั้งหมดจำนวน 104 ไอโซเลต ได้ทำการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีระวิทยา ชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอสโคไมซีตหายากออกเป็น 10 กลุ่ม คัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาศึกษา ลักษณะทางเคโมไทป์ และจีโนมไทป์ พบว่า

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างสปอร์ที่มีถุงหุ้มอยู่บนเส้นใยอากาศ มีลักษณะทางเคโมไทป์ และจีโนมไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Planotetraspora*

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่สามารถสร้างสปอร์คู่อยู่บนก้านชูสปอร์สั้นๆ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนมไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Microbispora*

กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างสปอร์มีลักษณะแตกแขนงสลับกันคนละด้าน มีเส้นใยอากาศ สีขาวอมชมพู เส้นใยอาหารสีชมพู มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนมไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Actinomadura*

กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนมไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Pseudonocardia*

กลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นสายยาว มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนมไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Jiangella*

กลุ่มที่ 6 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนมไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Micromonospora*

กลุ่มที่ 7 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนมไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Micromonospora*

กลุ่มที่ 8 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสัทที่สร้างสปอร์เป็นสายโซ่พันกันเป็นเกลียว มีลักษณะทางเคโมไทป์ และจีโนมไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Streptomyces*

กลุ่มที่ 9 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสัทที่สร้างสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว มีลักษณะทางเคโมไทป์ และจีโนมไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Streptomyces*

กลุ่มที่ 10 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสัทที่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นสายโซ่พันกันเป็นเกลียว มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนมไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Streptomyces*

จากเชื้อแอกติโนมัยสัทข้างต้น ได้คัดเลือกเชื้อไอโซเลต CS1-12 มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานอย่างละเอียด พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ใกล้เคียงกับเชื้อ *Micromonospora fulviviridis* DSM 43906^T ในระดับ 99.3 เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์และจีโนมไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลตดังกล่าว นี้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Micromonospora* โดยให้ชื่อว่า *Micromonospora costi* sp. nov.

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยสัททั้ง 104 ไอโซเลต ด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231, Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654, Vancomycin-resistant enterococci (VRE) และ *Enterococcus faecium* ATCC 51559 พบว่า สิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อจำนวน 10 ไอโซเลต (9.6% ของเชื้อแอกติโนมัยสัททั้งหมด) แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ เมื่อนำสิ่งสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น พบว่า สิ่งสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแอกติโนมัยสัทไอโซเลต AG2-1, AG2-5, AG2-6 และ BR2-2 แสดงรูปแบบสัญญาณของ ¹H-NMR ที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากเชื้อแอกติโนมัยสัทที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป จากข้อมูลที่ได้ศึกษามาทั้งหมดนี้จะเห็นได้ว่าเนื้อเยื่อพืชตระกูลขิงเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่น่าสนใจแหล่งหนึ่งซึ่งมีความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์สูงสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี จึงเหมาะสำหรับการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารออก

ฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ รวมถึงการศึกษาความหลากหลายและอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสียเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไปในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลผลิตจากงานวิจัย (Output)

บทความวิจัย

1. Thawai, C. 2014. *Micromonospora costi* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus speciosus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. IJSEM-D-14-00357. (Minor revision, Revision step) (Impact factor = 2.79)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- Arai, T. 1975. **Culture Media for Actinomycetes**. Tokyo : The Society for Actinomycetes Japan.
- Asolkar, R. N., Schroder, D., Heckmann, R., Lang, S., Wagner-Dobler, L. H. 2004. Helquinoline, a new tetrahydroquinoline antibiotic from *Janibacter limosus* Hell. *J Antibiot* (Tokyo). 57:17-23.
- Bérdy, J. 2005. "Bioactive microbial metabolites." **Journal of Antibiotics**. 58 : 1-26.
- Bieber, B., J. Nuske, M. Ritzau, and U. Grafe. 1998. Alnumycin, a new naphthoquinone antibiotic, produced by an endophytic *Streptomyces* sp. **J. Antibiot**. 51 : 381–382.
- Bruntner, C., Binder, T., Pathomaree, W., Goodfellow, M., Bull, A. T, Potterat, O., Puder, C., Horer, S., Schmid, A., Bolek, W. 2005. Frigocyclinone, a novel angucyclinone antibiotic produced by a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica. *J Antibiot*. (Tokyo). 58:346-349.
- Castillo, U.F., Strobel, G.A., Ford, E.J., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Albert, H. and Robison, R. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**. 148 : 2675–2685.
- Charan, R. D., Schlingmann, G., Janso, J., Bernan, V., Feng, X., Carter, G. T. 2004. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from marine *Micromonospora* sp. *J Nat Prod*. 67:1431-1433.
- Duangmal, K., Thamchaipenet, A., Ara, I., Matsumoto, A. and Takahashi. Y. 2008. *Kineococcus gymurae* sp. nov., isolated from a Thai medicinal plant. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. 58 : 2439–2442.
- Feling, R. H., Buchanan, G.O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 42:355-357.
- Francioli, M., J. Bille, M. Glauser, and P. Moreill. 1991. Beta-lactam resistance mechanism of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis*. 163, 514-523.
- Gu, Q., Luo, H.L., Zheng, W., Liu, Z.H. and Huang, Y. 2006. *Pseudonocardia oroxyli* sp. nov., isolated from *Oroxylum indicum* root. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. 56 : 2193–2197.
- Hernández, I. L. C., Macedo, M. L., Berlinck, R. G. S., Ferreira, A. G. and Godinho, M. J. L. 2004. *J. Braz. Chem. Soc.*, 15, 441
- Holt, J. G. 1989. Filamentous Actinomycetes and Related Bacteria. *In* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4, pp. 2333-2450. Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

- Igarashi, Y., Trujillo, M.E., Martínez-Molina, E., Miyanaga, S., Obata, T., Sakurai, H., Saiki, I., Fujita, T. and Furumai, T. 2007. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 17 : 3702–3705.
- Itoh, T., Kinoshita, M., Aoki, S., Kobayashi, M. 2003. Komodoquinone A, a novel neutritogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. KS3. *J Nat Prod.* 66:1373-1377.
- Kaewkla, O. and Franco, C.M.M. 2011. Actinopolymorpha pittospori sp. nov., an endophyte isolated from surface-sterilized leaves of an apricot tree (*Pittosporum phylliraeoides*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 61: 2616–2620.
- Kanoh, K., Matsuo, Y., Adachi, K., Imagawa, H., Nishizawa, M., Shizuri, Y. 2005. Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. *J Antibiot (Tokyo).* 58:289-292.
- Kim, S.H., S.C. Kim, S.B. Gu, J.H. Shin, S.P. Shu, and D.W. Ryang. 1995. Four cases of vancomycin-resistant enterococci infection. *Kor. J. Clin. Pathol.* 15, S265.
- Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. *Methods in Microbiology.* 19: 161-207.
- Kwon, H. C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. 2006. Marinomycins a-d, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus 'Marinispota'. *J Am Chem Soc.* 128:1622-1632.
- Lakshmanan, D., Werngren, J., Jose, L., Suja, K.P., Nair, M.S., Varma, R.L., Mundayoor, S., Hoffner, S. and Kumar, R.A. 2011. Ethyl p-methoxycinnamate isolated from a traditional anti-tuberculosis medicinal herb inhibits drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. **Fitoterapia.** 82 : 757-761.
- Lorian, V. 1980. Antibiotics in laboratory medicine. pp. 161-207. Baltimore: The Williams & Wilkins.
- Macherla, V. R, Liu, J., Bellows, C., Teisan, S., Lam, K. S., Potts, B. C. M. 2005. Glaciapyrroles A, B and C, pyrrolesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. Isolated from an Alaskan marine sediment. *J Nat Prod.* 68:780-783.
- Maskey, R. P., Li, F. C., Qin, S., Fiebig, H. H., and Laatsch, H. 2003. Chandrananimycins A-C: Production of Novel Anticancer Antibiotics from a Marine *Actinomadura* sp. isolate M048 by Variation of Medium Composition and Growth Conditions. *J.Antibiotics.* 56: 622-629.

- Maskey, R. P, Sevvana, M., Uson, I., Helmke, E., Laatsch, H. 2004. Gutingimycin: a highly complex metabolite from a marine streptomycete. *Angew Chem Int Ed Engl.* 43:1281-1283.
- Pimentel-Elardo, S. M., Tobias, A. M., Gulder, J., Hentschel, U., Bringmann, G. 2008. Cebulactams A1 and A2, new macrolactams isolated from *Saccharopolyspora cebuensis*, the first obligate marine strain of the genus *Saccharopolyspora*. *Tetrahedron Letters.* 49:6889-6892.
- Qin, S., Li, J., Zhao, G.Z., Chen, H.H., Xu, L.H. and Li W.J. 2008. *Saccharopolyspora endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the root of *Maytenus austroyunnanensis*. *Systematic and Applied Microbiology.* 31: 352-357.
- Rahman, A. 2000. Bioactive natural products (part D) volume 23 : Studies in natural products chemistry. Elsevier.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D. 1996. "Methods for characterization of *Streptomyces* species." *International Journal of Systematic Bacteriology.* 16 : 313-340.
- Tamaoka, J. 1994. Determination of DNA Base Composition *In Chemical Methods in Prokaryotic Systematics.* Edited by M. Goodfellow and A.G. O'Donnell. *John Wiley and Sons Ltd.* pp. 463-470.
- Thamchaipenet, A., Indananda, C., Bunyoo, C., Duangmal, K., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2010. *Actinoallomurus acaciae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 60: 554-559.
- Thawai, C., Kittakoop, P., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Sriklung, K., Thebtaranonth. 2004. Micromonosporin A, a Novel 24-Membered Polyene Lactam Macrolide from *Micromonospora* sp. Isolated from Peat Swamp Forest. *Chemistry and Biodiversity.* vol. 1, 640-645.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., and Kudo, T. 2004. *Micromonospora aurantinigra* sp. nov., Isolated from a Peat Swamp Forest in Thailand. *Actinomycetologica.* vol. 18 no.1, 8-14.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K., and Kudo, T. 2005. *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 417-422 (มี impact factor = 3.18)
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., and Kudo, T. 2005. *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51: 229-234.

- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T. and Kudo, T. 2006. *Actinocatenispora* gen. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*, with description of *Actinocatenispora thailandica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1789-1794.
- Van den Boogaard, A.E. and E.E. Stobberingh. 1996. Time to ban all antibiotics as animal growth-promoting agents? *Lancet* 31, 619
- Wampler, J.L., S.A. Martin, and G.M. Hill. 1998. Effects of laidlomycin propionate and monensin on glucose utilization and nutrient transport by *Streptococcus bovis* and *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* 76, 2730-2736.
- Wilken, R., Veena, M.S., Wang, M.B. and Srivatsan, E.S. 2011. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. **Molecular Cancer.** 10 : 12.
- Williams, S.T. and Cross, T. 1971. Actinomycetes : Physiological properties *In Method in Microbiology*, 4th edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.
- Williams, S.T. and Cross, T. 1977. Actinomycetes : Slide and coverslip methods *In Method in Microbiology*, 4th edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.
- Zhao, K., Penttinen, P., Guan, T., Xiao, J., Chen, Q., Xu, J., Lindstrom, Km., Zhang, L., Zhang, X., Strobel, G.A. 2011. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. **Curr Microbiol.** 62 : 182-190.

ภาคผนวก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดต่อไปนี้เตรียมโดยใช้น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร อาหารส่วนใหญ่หนึ่งมาเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำร้อน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นการเตรียมน้ำตาลในการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยใช้ความร้อนมาเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1. Starch-casein agar

Soluble starch	10	กรัม
KNO ₃	2	กรัม
Casein sodium caseinate	0.3	กรัม
K ₂ HPO ₄	2	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	กรัม
NaCl	2	กรัม
CaCO ₃	0.02	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม
Agar	15	กรัม
pH 7.0		

2. Humic acid Vitamin Agar

Humic acid	1	กรัม
Na ₂ HPO ₄	0.5	กรัม
KCl	1.71	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50	มิลลิกรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10	มิลลิกรัม
CaCO ₃	20	มิลลิกรัม
Vitamin B	10	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
pH 7.3		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

** Humic acid ละลายใน 10 มล. 0.2 N NaOH

**Vitamin B

Thiamine-HCl	10	มิลลิกรัม
Riboflavin	10	มิลลิกรัม
Nicotinate	10	มิลลิกรัม
Pyridoxine-HCl	10	มิลลิกรัม
Inositol	10	มิลลิกรัม
Ca-Pantprenate	10	มิลลิกรัม
p-Aminobenzoate	10	มิลลิกรัม
d-Biotin	5	มิลลิกรัม
DW	200	มิลลิลิตร

3. Soil extract agar (สูตรดัดแปลง)

CaSO ₄ .2H ₂ O	0.5	กรัม
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0.25	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05	กรัม
K ₂ SO ₄	0.03	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.02	กรัม
NaHCO ₃	0.1	กรัม
Trace element mix 1	0.3	มิลลิลิตร
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.02	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Casamino acids	0.1	กรัม
Glucose	0.2	กรัม
Soil extract	100	มิลลิลิตร
Agar	18.0	กรัม
pH 7.0		

4. Yeast extract-malt extract agar (YMA), ISP medium no.2

Yeast extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glucose	4	กรัม
Agar	15	กรัม
pH 7.3		

5. Oatmeal agar, ISP medium no. 3

Oatmeal	20	กรัม
Agar	18	กรัม

6. Inorganic salts-starch agar, ISP medium no. 4

Soluble starch	10	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	กรัม
NaCl	1	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2	กรัม
$CaCO_3$	2	กรัม
Trace salts solution (A)	1	มิลลิลิตร
Agar	20	กรัม
pH 7.0-7.4		

7. Glycerol-asparagine agar, ISP medium no.5

Glycerol	10	กรัม
L-Asparagine	1	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
Trace salts solution (A)	1	มิลลิลิตร
Agar	20	กรัม

8. Tyrosine agar, ISP medium no. 7

Glycerol	15	กรัม
L-Tyrosine (Difco)	0.5	กรัม
L-Asparagine (Difco)	1	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1	กรัม
Trace salts solution (A)	1	มิลลิลิตร
Agar	20	กรัม

pH 7.2-7.4

Trace salt solution (A)

FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1	กรัม
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.1	กรัม
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

9. Peptone KNO₃ broth

Peptone	10	กรัม
KNO ₃	1	กรัม
NaCl	5	กรัม
pH 7.0		

10. Carbon utilization medium, ISP medium no. 9

Carbohydrate	1.0	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.264	กรัม
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.565	กรัม
KH ₂ PO ₄ anhydrous	0.238	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1	กรัม
Pridham and Gottlieb trace salts (B)	0.1	มิลลิลิตร
Agar	1.5	กรัม

pH 6.8-7.0

Trace salts solution (B)

CuSO ₄ .5H ₂ O	0.64	กรัม
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.11	กรัม
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.79	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.15	กรัม
--------------------------------------	------	------

11. Bouillon gelatin broth

Peptone	1.0	กรัม
Meat extract	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Gelatin	15.0	กรัม
pH 7.0-7.2		

12. Peptonization and Coagulation test medium

Skim milk (Difco)	100	กรัม
-------------------	-----	------

13. Mueller-Hinton agar (Difco)

Beef infusion from	300	กรัม
Casamino acid, Technical	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17	กรัม
pH 7.3		

14. Sabouraud's dextrose agar (Difco)

Neopeptone	10	กรัม
Dextrose	40	กรัม
Agar	15	กรัม
pH 5.6-5.8		

15. Peptone-yeast extract iron agar

Bacto-Peptone Iron Agar, dehydrated (Difco)	36	กรัม
Bacto-Yeast Extract (Difco)	1	กรัม
pH 7.0-7.2		

16. Glucose asparagines agar

Glucose	10	กรัม
Asparagine	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
Bacto-agar	15	กรัม
pH 6.8-7.0		

17. Nutrient agar

Meat extract	10	กรัม
Peptone	10	กรัม
NaCl	1-2	กรัม
Agar	15	กรัม

18. Czapek's sucrose agar

Sucrose	30	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4$	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$FeSO_4$	0.01	กรัม
Agar	15	กรัม
pH 7.0-7.2		

19. phosphate buffer

KH_2PO_4	0.680	กรัม
Na_2HPO_4	0.71	กรัม
DW.	1	ลิตร

**ใช้ KH_2PO_4 เป็นตัวปรับพีเอช

20. Seed medium

Yeast extract	4	กรัม
Glucose	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
pH 7.3		

21. Production medium

Yeast extract	4	กรัม
Glucose	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
CaCO ₃	1	กรัม
pH 7.3		



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Subject IJSEM paper no. IJS/2014/070631

Sender Ken-ichiro Suzuki

Recipient Chitti Thawai

Date 25.10.2014 02:43

Dear Dr Chitti Thawai

IJSEM paper no. IJS/2014/070631: *Micromonospora costusica* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus speciosus* Chitti Thawai

Thank you for submitting your paper to IJSEM. It has now been reviewed and I would like you to revise the paper in line with the reviewers' reports.

I apologize the delay of report. Your paper is acceptable with the review of the two experts of this taxon. Please refer to the nomenclature editor's comments. In addition to the comments of the reviewers, I would like request consideration to the following points:

1. Citation of Supplementary Table S2 in the text.
2. Cellular fatty acid composition table is shown only in on-line. The composition of the type strain must be mentioned in 149-151 and not in the description as the nomenclature editor pointed out. (Description is for species and not for strain).
3. Line 80-81: This sentence mentions the test for growth range in temp but "at 30C". Indicate the range of temp, pH and NaCl concentration tested.
4. Line 107: "Genomic used" --> "Genomic DNA used"
5. Line 128 and 234: (1972) --> (1971) Is it OK?

To view the reviewers' comments, please log on to Bench>Press (<http://submit-ijis.sgmjournals.org>) and visit the Manuscripts with Decisions queue in your Author area.

Please submit the revised version within 4 weeks; otherwise the paper will need to be submitted as a resubmission. If you need longer than this, please contact me to agree a different deadline.

Submitting a revised paper:

- Please use the [Submit Revised Manuscript] link available in your Submit a Revision queue. Please refer to <http://submit-ijis.sgmjournals.org/submission/submissionhelp> for guidance on submissions.
- The revised paper must be submitted via Bench>Press as a clean Word document consisting of the text and tables, plus separate figure files. Please see the Information for Authors (<http://ijis.sgmjournals.org/site/misc/ifa2a.html#preparation>) for guidance on file types. If you wish, you may also submit a marked-up version of the manuscript as a supplementary file to aid reviewers.
- Please be sure to include detailed Response to Reviewers' comments on the online submission form or upload as a supplementary file.
- Please note that any supplementary information must be uploaded as one combined PDF file and will be published without editing if the manuscript goes on to be accepted.
- Please submit a copyright form (<http://www.sgmjournals.org/site/misc/forms.html>) with your revised manuscript and upload it with the file type 'copyright file'.
- SGM allows authors to publish their work under the immediate Open Access model, called SGM Open. The SGM Open fee is £1750+VAT. For further information please see SGM's Open Access FAQs (www.sgmjournals.org/site/misc/open_access.html). If you would like to publish your manuscript with immediate open access you should upload a completed Article Processing Charge form (<http://www.sgmjournals.org/site/misc/forms.html>). You can upload it to the manuscript tracking system when you submit your revision: <http://submit-ijis.sgmjournals.org/> or, alternatively, please send it to the Editorial Office: submit_ijis@sgm.ac.uk. If your paper is accepted you will be contacted by Open Access Key (OAK, <http://www.openaccesskey.com>), a centralized secure platform that handles the fees incurred in open access publishing on our behalf.

Papers in Press

The journal has a Papers in Press feature where the converted PDF of the accepted manuscript will appear online within 3 working days of acceptance in an unedited format before it is scheduled to appear in an issue, online and in print. Please note that we cannot publish the accepted version of the manuscript without a completed copyright form. In addition, for papers reporting new sequence data, papers will not appear in Papers in Press until the sequence data are released in public databases.

1 *Micromonospora costi* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus*
2 *speciosus*

3 Chitti Thawai^{1,2}

4

5 ¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology
6 Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

7 ²Actinobacterial Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of
8 Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

9

10 **Correspondence**

11 Chitti Thawai

12 ktchitti@kmitl.ac.th

13

14 New taxa – Actinobacteria

15

16 Running title : *Micromonospora costi*

17

18

The DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain CS1-12^T is
AB981048.

19

20 An endophytic actinobacterial strain CS1-12^T, was isolated from a leaf of *Costus*
21 *speciosus*. The single spores were observed directly on the substrate mycelia. The
22 cell-wall peptidoglycan of this strain exhibited *meso*-diaminopimelic acid and 3-OH-
23 *meso*-diaminopimelic acid. Arabinose, glucose, ribose, xylose and rhamnose were
24 detected as whole-cell sugars of the strain. The diagnostic phospholipids of this strain
25 were phosphatidylethanolamine, diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol,
26 phosphatidylinositol, phosphatidylinositol mannosides. The predominant
27 menaquinone were MK-10(H₆), MK-10(H₈), MK-9(H₄) and MK-10(H₄). The main
28 components of cellular fatty acids (>10%) were iso-C_{15:0}, anteiso-C_{17:0}, iso-C_{16:0},
29 anteiso-C_{15:0}. The G+C content of the genomic DNA was 72.8 mol%. The data of
30 16S rRNA gene sequence analysis showed that strain CS1-12^T should be classified in
31 the genus *Micromonospora* and closely related to *Micromonospora fulviviridis* DSM
32 43906^T (99.3%). The physiological, biochemical and chemotaxonomic properties
33 including the DNA-DNA hybridization result exhibited that strain CS1-12^T could be
34 judged as a novel species for the genus *Micromonospora*, for which the name
35 *Micromonospora costi* CS1-12^T sp. nov. is proposed. The type strain is strain CS1-12^T
36 (=BCC 58124^T =NBRC 109518^T).

37
38

39 The genus *Micromonospora* Orskov (1923) belongs to the family
40 *Micromonosporaceae*. The type species is *Micromonospora chalcea*. The single spore
41 produced directly on the substrate mycelium and the absence of aerial mycelium are
42 the dominant morphological characteristic of this genus (Kawamoto, 1989). Members
43 of the genus *Micromonospora* exhibited meso-diaminopimelic acid in the cell wall
44 and arabinose and xylose as a characteristic sugar in the cell hydrolysates. The
45 phosphatidylethanolamine is the characteristic phospholipid in the membrane.
46 Recently, several new species of the *Micromonospora* were proposed, i.e.
47 *Micromonospora polyrhachis* (Xiang *et al.*, 2014), *Micromonospora violae* (Zhang *et al.*,
48 *et al.*, 2014), *Micromonospora jinlongensis* (Gao *et al.*, 2014), *Micromonospora zea*
49 (Shen *et al.*, 2014). In the course of our investigation for novel actinobacteria from the
50 tissue of Thai medicinal plants, we successfully isolated a strain, designated CS1-12^T
51 that exhibited the morphological characteristic typical of members of the genus
52 *Micromonospora* but showed the phenotypic, genotypic and some chemotaxonomic
53 properties distinguishable from all type strains of the genus *Micromonospora*. So, we
54 propose the strain CS1-12^T as a novel species of the genus *Micromonospora*.
55
56 Strain CS1-12^T was isolated from a leaf of *Costus speciosus* collected from the herb garden in
57 Nakornnayok province, Thailand. A Leaf of this plant was gently rinsed with tap water for three
58 times and was surface-sterilized with 70% ethanol for 10 min and subsequently with absolute
59 ethanol for 2 min in the sterilized bottle. A leaf was removed from the bottle and dried on
60 sterilized filter paper followed by surface-sterilization with 6% sodium hypochlorite and a few
61 drops of tween 20 for 5 min. Then, the plant tissue was rinsed with sterilized distilled water for 5
62 times and finally the surface-sterilized leaf was ground in sterilized distilled water, and the
63 suspension was spread on starch casein agar (SCA) [0.1% sodium caseinate, 1% soluble starch,

64 0.03% K₂HPO₄, 1.8% agar, pH 7.0-7.5] supplemented with 25 mg l⁻¹ nalidixic acid and 50 mg l⁻¹
65 cycloheximide and incubated at 30°C for 21 days. The final rinsing water was spread on SCA as
66 the control plates. The *Micromonospora* colonies were selected and purified by repetitive cross-
67 streaking on ISP2 medium [(International *Streptomyces* Project, ISP 2 medium); Shirling &
68 Gottlieb, 1966] and was preserved by freezing at -80 °C and freeze-drying.

69
70 Morphological properties of strain CS1-12^T grown on 1/10 strength starch casein agar
71 were observed by scanning electron microscopy (model JSM-5410 LV; JEOL). The
72 sample for scanning electron microscopy was prepared as described previously
73 (Thawai *et al.*, 2005).

74
75 The phenotypic properties were performed using several standard methods and
76 compared with those of the phylogenetically closed reference strains. Cultural
77 properties were examined using 14-day cultures grown at 30°C on various agar media.
78 The colour of the colonies was determined using the ISCC-NBS colour charts
79 standard sample no. 2106 (Kelly, 1964). The test for gelatin liquefaction,
80 peptonization of milk, nitrate reduction and starch hydrolysis were performed by
81 standard methods of Arai (1975) and Williams & Cross (1971).

82
83 The temperature (15-55 °C), pH (4-12) and NaCl (0-10 %w/v) tolerances for growth
84 were determined on ISP 2 medium for 14 days. The utilization of various carbon
85 sources was done by the method of Shirling & Gottlieb, 1966. The results are
86 indicated in detail in the species description and Table 1.

87

88 The freeze-dried cells of strain CS1-12^T used for chemotaxonomic analyses were
89 prepared from cultures grown in ISP 2 broth on a rotary shaker (180 rpm) at 30 °C for
90 5 days. The preparation of cell wall peptidoglycan was done by the methods of
91 Kawamoto *et al.* (1981), and the determination of amino acid composition in cell wall
92 was performed using the previously TLC method described by Lechevalier &
93 Lechevalier, 1980. The method of Uchida & Aida (1984) was used for analysis of the
94 acyl group of muramic acid in the peptidoglycan. The reducing sugars of cell
95 hydrolysates were performed according to the methods previously described
96 (Komagata & Suzuki, 1987). The determination of phospholipid types in cells were
97 analyzed using the standard method of Minnikin *et al.*, (1984). The cellular fatty acid
98 profile analysis was performed using GLC according to the instructions of the
99 Microbial Identification System (MIDI), Sherlock version 6.0 (Kämpfer &
100 Kroppenstedt, 1996; Sasser, 1990). The types of cellular fatty acid were identified
101 using the RTSBA6 database of the MIDI system (Sasser, 1990).

102
103 The presence of mycolic acids was investigated using the method of Minnikin *et al.*
104 (1975). The extraction method of isoprenoid quinones were followed by the method
105 of Collins *et al.* (1977). The analysis of isoprenoid quinones were performed using
106 reverse phase HPLC equipped with a Cosmosil 5C₁₈ column (4.6 by 150 mm; Nacalai
107 Tesque, Kyoto, Japan) at a flow rate of 0.6 mL/min. A mixture of methanol and 2-
108 propanol (2:1, v/v) was used as the elution solvent.

109
110 Genomic DNA used for the G+C content analysis and DNA-DNA hybridization was
111 prepared according to the method described by Tamaoka (1994). The G+C content of
112 the DNA was analyzed using the standard HPLC method of Tamaoka & Komagata

113 (1984). Lambda DNA (Invitrogen, USA) was used as the standard. DNA–DNA
114 hybridization was done using the method reported by Ezaki *et al.* (1989). The
115 colorimetric method of Verlander (1992) was used for determination of DNA–DNA
116 relatedness (%) value.

117

118 Genomic DNA used for 16S rRNA gene amplification was prepared as described by
119 (Suriyachadkun *et al.*, 2009). The sequence of the PCR product was obtained using
120 universal primers 27F (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 350F (5'-
121 TACGGGAGGCAGCAG-3'), 780F (5'-GATTAGATACCCTGGTAG-3'), 1100F (5'-
122 GCAACGAGCGCAACCC-3'), 350R (5'-CTGCTGCCTCCCGTAG-3'), 780R (5'-
123 CTACCAGGGTATCTAATCC-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')
124 (Lane, 1991). The nearly complete 16S rRNA gene sequence of strain CS1-12^T was
125 pairwise aligned using the EzTaxon server (Kim *et al.*, 2012). Partial sequences of the
126 16S rRNA genes of recognized *Micromonospora* species were obtained from the
127 GenBank/EMBL/DDBJ database for multiple alignment analyses using the
128 CLUSTAL W programme, version 1.81 (Thompson *et al.*, 1994). The alignment was
129 manually corrected to eliminate gaps and adjusted prior to the construction of a
130 phylogenetic tree. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining
131 (Saitou & Nei, 1987), maximum parsimony (Fitch, 1971) and maximum-likelihood
132 (Felsenstien, 1981) methods in the MEGA 6 software (Tamura *et al.*, 2013). The
133 evolutionary distances used in neighbor-joining method were calculated using the
134 Kimura two-parameter model (Kimura, 1980). The confidence values of the clusters
135 were judged using the bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) with 1,000 re-samplings.

136

137 Strain CS1-12^T grew well on ISP2, ISP 3 and nutrient agar, moderately on ISP 6,
138 weakly on ISP 4, ISP 5, ISP 7, czapek's sucrose agar and glucose-asparagine agar.
139 The colour of the colonies of this strain grown on these media was brilliant orange to
140 pale orange yellow. Aerial hyphae were not observed. Soluble pigments did not
141 produce on any of the media tested. Strain CS1-12^T produced single spore on the tip
142 of the substrate mycelia on 1/10 strength starch casein agar at 30 °C for 21 days (Fig.
143 1). Spore of this strain exhibited a rough and nodular surface (Fig. 1) and were non-
144 motile.

145
146 Chemotaxonomic properties of strain CS1-12^T indicated that this strain belonged to
147 the genus *Micromonospora*. Cell walls of strain CS1-12^T contained *meso*-
148 diaminopimelic acid and 3-OH-*meso*-diaminopimelic acid. The cell wall acyl type
149 was glycolyl. The strain contained arabinose, glucose, ribose, xylose and rhamnose in
150 whole-cell hydrolysates. The predominant menaquinone was MK-10(H₆) (49.6%),
151 MK-10(H₈) (15.9%), MK-9(H₄) (15.6%), MK-10(H₄) (13.9%) and small amount of
152 MK-10(H₂) (4.1%) and MK-9(H₆) (0.9%) were also detected. The main cellular fatty
153 acids in cells (≥1%) were iso-C_{15:0} (25.9%), anteiso-C_{17:0} (23.2%), iso-C_{16:0} (15.4%),
154 anteiso-C_{15:0} (12.5%), iso-C_{17:0} (9.6%), C_{17:0} (3.5%), 10-methyl-C_{17:0} (1.5%), C_{16:0}
155 (1.4%), C_{18:0} (1.3%) and C_{17:1} ω8c (1.2%) (Supplementary Table S1). Mycolic acids
156 were absent. The characteristic phospholipids are diphosphatidylglycerol,
157 phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol,
158 phosphatidylinositol mannosides, five unidentified phospholipids and one unidentified
159 lipid (Supplementary Fig. S1). The G+C content (mol%) of the DNA of strain CS1-
160 12^T was 72.8%.

161

162 The almost complete 16S rRNA gene sequence of strain CS1-12^T (1,503 nt) was
163 compared and deposited in DDBJ database. The 16S rRNA gene sequence tree
164 constructed by the neighbour-joining (Fig. 2), maximum-parsimony (Supplementary
165 Fig. S2) and maximum-likelihood (Supplementary Fig. S3) methods confirmed the
166 taxonomic position of strain CS1-12^T that this strain was a member of the genus
167 *Micromonospora* and formed a monophyletic clade to *M. fulviviridis* with high
168 bootstrap value (81%, 71% and 71%, respectively). The result obtained from
169 EzTaxon-e analysis also indicated that strain CS1-12^T belong to the genus
170 *Micromonospora*, being most closely related to the phylogenetically *Micromonospora*
171 species, *M. fulviviridis* DSM 43906^T (99.3%), *M. inositola* DSM 43819^T (98.8%), *M.*
172 *sagamiensis* DSM 43912^T (98.8%), *M. echinaurantiaca* DSM 43904^T (98.7%), *M.*
173 *inyonensis* DSM 46123^T (98.7%), *M. pallida* DSM 43817^T (98.6%) and *M.*
174 *echinospora* DSM 43816^T (98.2%). On basis of the morphological, chemotaxonomic
175 and phylogenetic properties, this strain should be classified in the genus
176 *Micromonospora*.

177
178 Although the G+C content (mol%) of the DNA and the predominant phospholipid of
179 strain CS1-12^T are similar to the phylogenetically closest relatives, *M. fulviviridis*, *M.*
180 *sagamiensis*, *M. echinaurantiaca*, *M. inyonensis*, *M. inositola*, *M. pallid* and *M.*
181 *echinospora* but some phenotypic and chemotaxonomic characteristics shown in
182 Table 1 could discriminate strain CS1-12^T from the phylogenetically closest relatives,
183 *M. fulviviridis*, *M. sagamiensis*, *M. echinaurantiaca* and *M. inyonensis*. In particular,
184 the strain CS1-12^T presented *meso*-diaminopimelic acid and 3-OH-*meso*-
185 diaminopimelic acid in its cell wall peptidoglycan while 3-OH-*meso*-diaminopimelic
186 acid did not observe in cell wall peptidoglycan of *M. fulviviridis*, *M. sagamiensis*, *M.*

187 *echinaurantiaca* and *M. inyonensis*. On the other hand, the composition of reducing
188 sugar of cell-hydrolystae of strain CS1-12^T was different from *M. fulviviridis* in term
189 of arabinose, rhamnose and ribose. Additionally, strain CS1-12^T exhibited MK-10
190 (H₆) as a predominant isoprenoid quinone in cell while *M. fulviviridis*, *M. sagamiensis*,
191 *M. echinaurantiaca* and *M. inyonensis* presented MK-9 (H₄) and *M. pallida* exhibited
192 MK-12 (H₆). In contrast to the closest relative, strain CS1-12^T utilized D-cellobiose,
193 D-galactose, D-mannose, D-melibiose, D-xylose as the sole carbon sources.
194 Furthermore, the result of DNA-DNA hybridization clearly distinguished strain CS1-
195 12^T from its phylogenetically closed relatives because the low DNA relatedness
196 values (18.3% ± 1.2-24.5% ± 0.8) was observed, which was below 70% threshold for
197 species delineation as reported by Wayne *et al.*, 1987 (Supplementary Table S2). It is
198 evident from phenotypic, chemotaxonomic and genotypic data that strain CS1-12^T
199 represents a new species of the genus *Micromonospora* and the name
200 *Micromonospora costi* is proposed for the strain.

201
202 **Description of *Micromonospora costi* sp. nov.**

203 *Micromonospora costi* (cost'i. N.L. gen. n. costi, of *Costus*, a botanical genus).

204
205 Gram-stain-positive, mesophilic actinomycete that forms single spore directly on the
206 substrate mycelia. No soluble pigment is produced in any test culture media. Nitrate is
207 not reduced to nitrite. Utilizes D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-cellobiose, L-
208 arabinose, D-fructose, D-raffinose, D-melibiose, D-xylose, mannitol, sucrose and
209 lactose as sole carbon sources, but not glycerol, *myo*-inositol, L-rhamnose, D-ribose,
210 and D-salicin. Peptonization of milk, hydrolysis of starch and gelatin liquefaction are
211 positive. The maximum temperature for growth is 45°C. The maximum NaCl

212 concentration for growth is 4% (w/v). The pH range for growth is 5-10. The cell wall
213 peptidoglycan contains *meso*-diaminopimelic acid and 3-OH-*meso*-diaminopimelic
214 acid. The acyl type of the cell wall is glycolyl. The predominant menaquinones is
215 MK-10(H₆). The characteristic whole-cell sugars are arabinose, glucose, ribose,
216 xylose and rhamnose. The phospholipid profile contains diphosphatidylglycerol,
217 phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol,
218 phosphatidylinositol mannosides, five unidentified phospholipids and one unidentified
219 lipid but phosphatidylcholine is not detected. The cellular fatty acid pattern (≥1%)
220 consists of iso-C_{15:0}, anteiso-C_{17:0}, iso-C_{16:0}, anteiso-C_{15:0}, iso-C_{17:0}, C_{17:0}, 10-methyl-
221 C_{17:0}, C_{16:0}, C_{18:0} and C_{17:1} ω8c. Mycolic acids are absent. The G+C content of the
222 DNA is 72.8 mol%. The type strain is CS1-12^T (=BCC 58124^T =NBRC 109518^T),
223 which was isolated from a leaf of *Costus speciosus* collected from the herb garden in
224 Nakornnayok province, Thailand.

225

226 **Acknowledgments**

227 A grant from the Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology
228 Ladkrabang is gratefully acknowledged. We also thank the Biological Resource
229 Center, National Institute of Technology and Evaluation, Kisarazu, Chiba, Japan, for
230 cellular fatty acid analysis. This study was supported in part by Department of
231 Biology and Actinobacterial Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's
232 Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

233

234 **References**

- 235 **Arai, T. (1975).** *Culture Media for Actinomycetes*. Tokyo: The Society for
236 Actinomycetes Japan.

- 237 **Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. (1977).** Distribution
238 of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* **100**, 221-230.
- 239 **Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989).** Fluorometric deoxyribonucleic
240 acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to
241 membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic
242 relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 224-229.
- 243 **Felsenstein, J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum
244 likelihood approach. *J Mol Evol* **17**, 368-376.
- 245 **Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the
246 bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- 247 **Fitch, W. M. (1971).** Toward defining the course of evolution: minimum change for a
248 species tree topology. *Sys Zoo* **20**, 406-416.
- 249 **Gao, R., Liu, C., Zhao, J., Jia, F., Yu, C., Yang, L., Wang, X. & Xiang, W. (2014).**
250 *Micromonospora jinlongensis* sp. nov., isolated from muddy soil in China and
251 emended description of the genus *Micromonospora*. *Antonie van Leeuwenhoek* **105**,
252 307-315.
- 253 **Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996).** Numerical analysis of fatty acid
254 patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989-1005.
- 255 **Kawamoto, I. (1989).** Genus *Micromonospora* Orskov 1923, 147^{AL}. In Bergey's
256 *Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 4, pp. 2442-2450. Edited by S. T. Williams,
257 M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- 258 **Kawamoto, I., Oka, T. & Nara, T. (1981).** Cell wall composition of
259 *Micromonospora olivoasterospora*, *Micromonospora sagamiensis*, and related
260 organisms. *J Bacteriol* **146**, 527-534.

- 261 **Kelly, K. L. (1964).** Inter-Society Color Council – National Bureau of Standard Color
262 Name Charts Illustrated with Centroid Colors. Washington, DC: US Government
263 Printing Office.
- 264 **Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y.,**
265 **S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S. & Chun, J. (2012).** Introducing EzTaxon-e: A
266 Prokaryotic 16S rRNA Gene Sequence Database with Phylotypes that Represent
267 Uncultured Species. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 716-721.
- 268 **Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base
269 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**,
270 111-120.
- 271 **Komagata, K. & Suzuki, K. I. (1987).** Lipid and cell-wall analysis in bacterial
272 systematics. *Methods Microbiol* **19**, 161-207.
- 273 **Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in*
274 *Bacterial Systematics*, pp. 115–148. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow.
275 Chichester: John Wiley & Sons.
- 276 **Lechevalier, M. P. & Lechevalier, H. A. (1980).** The chemotaxonomy of
277 actinomycetes. In *Actinomycete Taxonomy*, pp. 227–291. Edited by A. Dietz & D. W.
278 Thayer. Arlington, VA: Society for Industrial Microbiology.
- 279 **Minnikin, D. E., Alshamaony, L. & Goodfellow, M. (1975).** Differentiation of
280 *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of
281 whole-organism methanolysates. *J Gen Microbiol* **88**, 200–204.
- 282 **Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M.,**
283 **Schaal, A. & Parlett, J. H. (1984).** An integrated procedure for the extraction of
284 bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* **2**, 233-241.

- 285 **Orskov, J. (1923).** Investigations into the Morphology of the Ray Fungi. Levin and
286 Munksgaard, Copenhagen.
- 287 **Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for
288 reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- 289 **Sasser, M. (1990).** *Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty*
290 *acids* (MIDI Technical Note 101). Newark, DE: MIDI.
- 291 **Shen, Y., Zhang, Y., Liu, C., Wang, X., Zhao, J., Jia, F., Yang, L., Yang, D. &**
292 **Xiang, W. (2014).** *Micromonospora zeae* sp. nov., a novel endophytic actinomycete
293 isolated from corn root (*Zea mays* L.). *J Antibiot* **54**, 1-5.
- 294 **Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces*
295 species. *Int J Syst Bacteriol* **16**, 313-340.
- 296 **Suriyachadkun, C., Chunhametha, S., Thawai, C., Tamura, T., Potacharoen, W.,**
297 **Kirtikara, K. & Sanglier, J. J. (2009).** *Planotetraspora thailandica* sp. nov., isolated
298 from soil in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 992-997.
- 299 **Tamaoka, J. (1994).** Determination of DNA Base Composition. In *Chemical*
300 *Methods in Prokaryotic Systematics*, pp. 463-470. Edited by M. Goodfellow & A. G.
301 O'Donnell. Chichester: John Wiley & Sons.
- 302 **Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984).** Determination of DNA base composition by
303 reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* **25**,
304 25-128.
- 305 **Tamura, K., Stecher, G., Peterson D., Filipiski, A., & Kumar S. (2013).** MEGA6:
306 Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and*
307 *Evolution* **30**, 2725-2729.

- 308 **Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K-I. & Kudo,**
309 **T. (2005).** *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest.
310 *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 417-422.
- 311 **Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gobson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving
312 the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence
313 weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids*
314 *Res* **22**, 4673-4680.
- 315 **Uchida, K. & Aida, K. (1984).** An improved method for the glycolate test for simple
316 identification of acyl type of bacterial cell walls. *J Gen Appl Microbiol* **30**, 131-134.
- 317 **Verlander, C. P. (1992).** Detection of horseradish peroxidase by colorimetry. In
318 *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, pp. 185-201. Edited by L. J. Kricka. New York:
319 Academic Press.
- 320 **Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R. & 9 other authors (1987).** Report of
321 the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J*
322 *Syst Bacteriol* **37**, 463-464.
- 323 **Williams, S. T. & Cross, T. (1971).** Actinomycetes. In *Methods in Microbiology*,
324 vol. 4., pp. 295-334. Edited by C. Booth. London: Academic Press.
- 325 **Xiang, W., Yu, C., Liu, C., Zhao, J., Yang, L., Xie, B., Li, L., Hong, K. & Wang,**
326 **X. (2014).** *Micromonospora polyrhachis* sp. nov., an actinomycete isolated from
327 edible Chinese black ant (*Polyrhachis vicina* Roger). *Int J Syst Evol Microbiol* **64**,
328 495-500.
- 329 **Zhang, Y., Liu, H., Zhang, X., Wang, S., Liu, C., Yu, C., Wang, X. & Xiang, W.**
330 **(2014).** *Micromonospora violae* sp. nov., isolated from a root of *Viola philippica* Car.
331 *Antonie van Leeuwenhoek*. DOI 10.1007/s10482-014-0184-6.
- 332

333

334 **Figure legend**

335

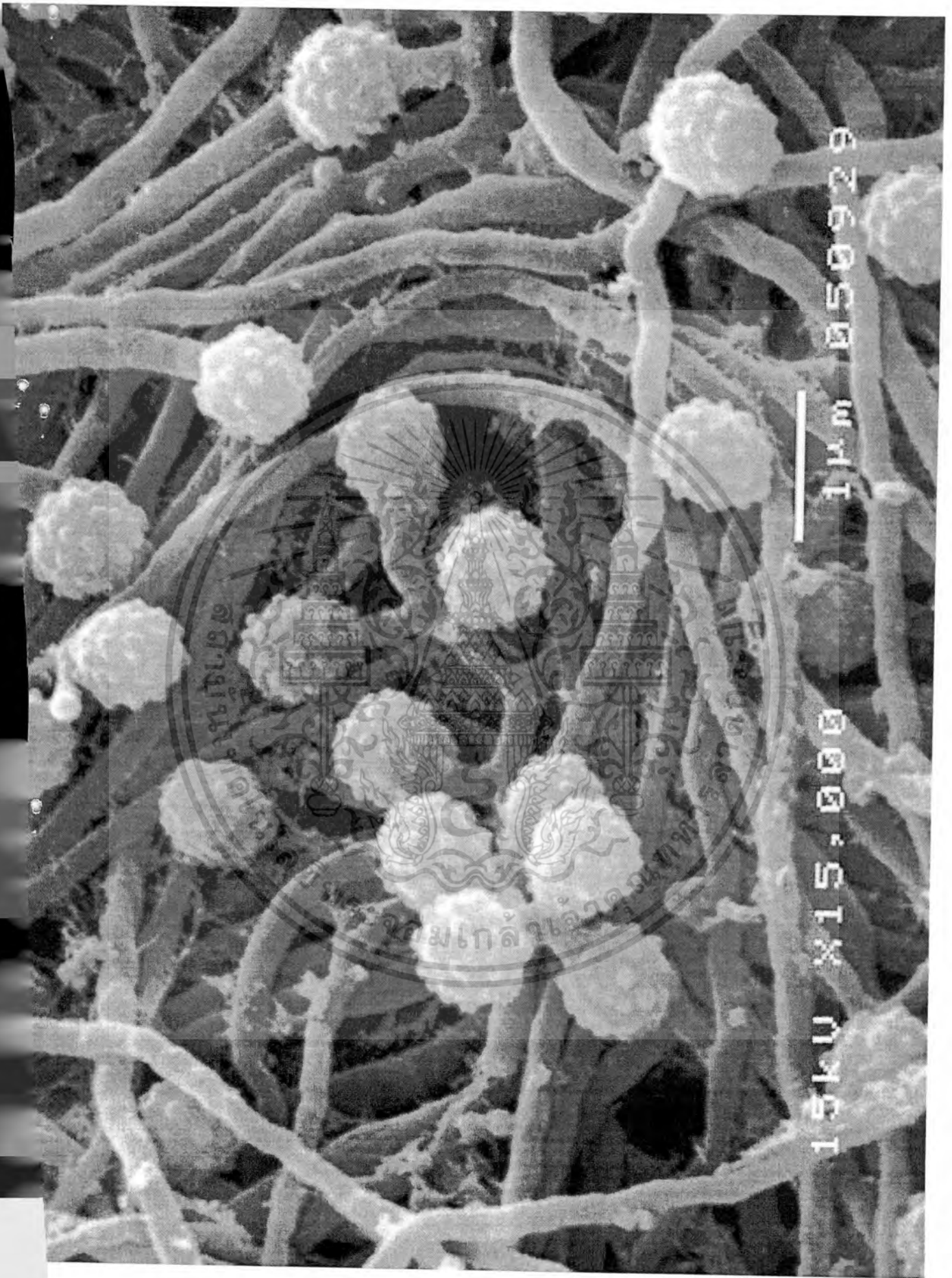
336 **Fig. 1.** Scanning electron micrograph of strain CS1-12^T grown on 1/10 strength starch
337 casein agar for 3 weeks at 30°C. Bar, 1 μm.

338

339 **Fig. 2.** Neighbour-joining tree (Saitou & Nei, 1987) based on almost-complete 16S
340 rRNA gene sequences (1,423 nt) showing the relationships between strain CS1-12^T
341 and the *Micromonospora* species with validly-published names. *Catellatospora citrea*
342 subsp. *citrea* IMSNU 22008^T was used as an outgroup. Asterisks (*) indicating the
343 branches of the tree that were also found using the maximum-parsimony and
344 maximum-likelihood methods. The numbers on the branches indicate the percentage
345 bootstrap values of 1,000 replicates; only values ≥50% are indicated. Bar, 0.005
346 substitutions per nucleotide position.

347

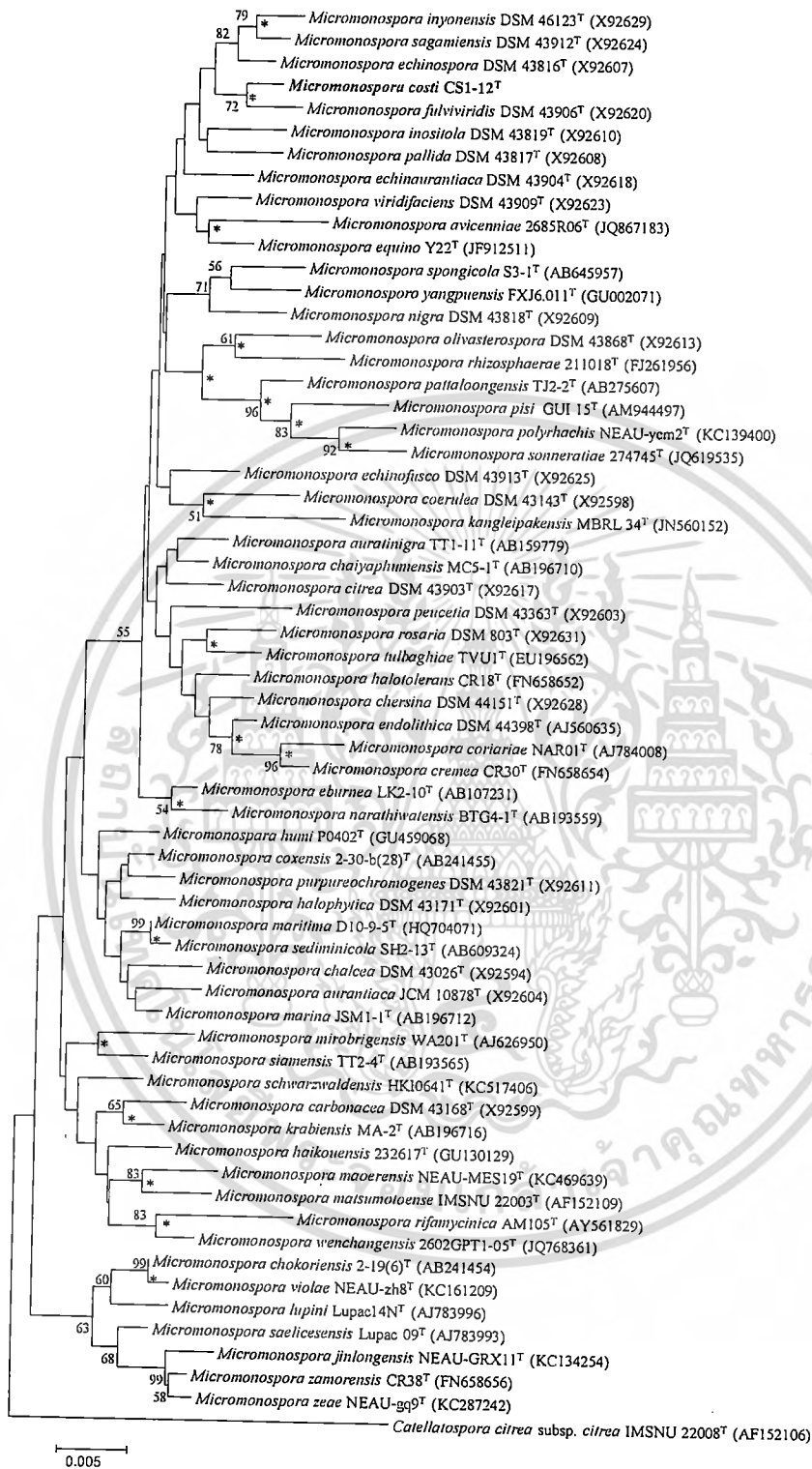
348



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Figure 2. Neighbour-joining tree of CS1-12

Figure 2. Neighbour-joining tree (Saitou & Nei, 1987) of strain CS1-12T.pptx



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1. Differential characteristics of strain CS1-12^T and the closest phylogenetically relative, *M. fulviviridis* DSM 43906^T.

All other phenotypic data were determined in this study. +, Positive; -, Negative; w, Weakly positive; Ara, arabinose; Glu, glucose; Man, mannose; Rib, ribose; Xyl, xylose; Rham, rhamnase.

Characteristics	Strain CS1-12 ^T	<i>M. fulviviridis</i> DSM 43906 ^T
Cell wall amino acids	meso-DAP and 3-OH-meso-DAP	meso-DAP
Whole-cell sugar	glu, xyl, ara, rib, rham	glu, xyl
Major menaquinone	MK-10(H ₆)	MK-9(H ₄)
Carbon utilization :		
D+Cellobiose	+	-
D+Galactose	+	-
D+Mannose	+	-
D-Melibiose	+	-
D-Salicin	-	w
Glycerol		+