สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ อนุกรมวิธาน และฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทย

Diversity of polyketide synthase genes, taxonomy and biological activities of endophytic actinomycetes isolated from Thai medicinal plants.

โดย

ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2558
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b 12781186
i

สขหมู่
เขทะเบียน 142896
วัน.เดือน.ปี - 6 มิ.ย. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	ความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบ โพลีคีไทด์ อนุกรมวิธาน และฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทย
(ภาษาอังกฤษ)	Diversity of polyketide synthase genes, taxonomy and biological activities of endophytic actinomycetes isolated from Thai medicinal plants.
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปี 2558	จำนวนเงิน 350,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี	เดือนตุลาคม 2557 ถึง กันยายน 2558
ผู้ดำเนินการวิจัย	ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
โทรศัพท์	02-3298400 ต่อ 235

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 100 ไอโซเลต แยกจากตัวอย่างขมิ้น (*Curcuma longa*) หน่อกะลา (*Alpinia nigra*) ไพล (*Zingiber montanum*) เปราะป่า (*Kaempferia marginata*) และกระชาย (*Bosenbergia rotunda*) เชื้อแอคติโนมัยสีทเหล่านี้สามารถถูกจัดกลุ่มโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี รวมทั้งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เป็น 8 กลุ่ม เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces iranensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.79 เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces graminisoli* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.55 เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces neopeptinius* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.06 เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces misionensis* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.86 เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 5 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces iranensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.65 เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 6 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces bungoensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.86 เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 7 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Asanoa ishikariensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.39 และเป็นสปีชีส์ใหม่ของเชื้อสกุล *Asanoa* ในชื่อ *Asaoa endophytica* sp. nov. เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 8 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Dactylosporangium sucinum* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาครั้งนี้ พบเชื้อที่แสดงกิจกรรมกระตุ้นการแตกแขนงของระบบประสาททั้ง 100 ไอโซเลต ในจำนวนนี้มีเชื้อจำนวน 15 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 15 ที่แสดงฤทธิ์ได้ดีมากที่ระดับความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากเชื้อแอคติโนมัยสีทจากเนื้อเยื่อพืชที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแตกแขนงของระบบประสาทที่แยกได้ในครั้งนี้อย่างมีศักยภาพ ต้องการการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะต่อไป

Abstract

One hundred actinomycete isolates were isolated from tissue of *Curcuma longa Alpinia nigra Zingiber montanum Kaempferia marginata and Bosenbergia rotunda*. These isolates could be grouped using morphological, physiological, biochemical characteristics including the antimicrobial activity into eight groups. The actinomycetes in group I were closely related to *Streptomyces iranensis* (99.79%). Group II were closed to *Streptomyces graminisoli* (99.55%). Group III were closely related to *Streptomyces neopeptinius* (99.06%). Group IV were closed to *Streptomyces misionensis* (99.86%). Group V were most closely related to *Streptomyces iranensis* (99.65%). Group VI were most closely related to *Streptomyces bungoensis* (99.86%). Group VII were most closely related to *Asanoa ishikariensis* (99.39%) and this isolate was proposed as new species in the genus Asanoa, namely *Asaoa endophytica* sp. nov. Group VIII were most closely related to *Dactylosporangium sucinum* (99.72%). In this study, all twenty seven actinomycete isolates exhibited the neuritogenic and neuroprotective activities. Nine actinomycete isolates displayed the significant neuritogenic and neuroprotective activities (15%) at the concentration of 1 ng/ml. Potential use to these endophytic actinomycete isolates need further study for antibiotic development.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการทดลอง	16
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	55
เอกสารอ้างอิง	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงรายละเอียดลักษณะของพืชตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้	16
2	ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ	36
3	แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต	39
4	แสดงผลการตรวจสอบยีนที่สร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ (PKS) ชนิดต่างๆ	47
5	แสดงผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ	49
6	การเปรียบเทียบข้อมูลของ ^{1}H and ^{13}C-NMR ระหว่างสาร **AG6-04C-1** และสารเจลดานามัยซิน	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG2-1	18
2	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG2-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	19
3	เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG3-1	20
4	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG3-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	21
5	เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG4-1	22
6	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG4-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	23
7	เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG5-1	24
8	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG5-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	26
9	เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG6-1	27
10	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG6-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	28
11	เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG2-6	29
12	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG2-6 บน phylogenetic tree (NJ method)	30
13	เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต BR3-1	31
14	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต BR3-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	32
15	เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต KE1-1	33
16	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KE1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	35
17	แสดงความสัมพันธ์ของยีน PKSI จากเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลต phylogenetic tree (NJ method)	48
18	TLC chromatogram of crude extract of AG6-1	49
19	ขั้นตอนการสกัดสารจากน้ำหมักของเชื้อ *Streptomyces* sp. AG6-1	51
20	ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตต ของเชื้อ *Streptomyces* sp. AG6-1	52
21	แสดงลักษณะโครงสร้างของสาร AG6-04C-1	53

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

IAA = Indole acetic acid

ISP = International *Streptomyces* Project

M. luteus = *Micrococcus luteus*

MHA = Mueller-Hinton Agar

nm = nanometer

NSA = Non-Streptomycete Actinomycetes

Ps. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

TSB = Triptic soy broth

UV = Ultraviolet

µL = microlitre

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำ รวมถึงปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดยังคงเป็นปัญหาของวงการสาธารณสุขในปัจจุบัน ทำให้การศึกษาค้นคว้าหาแหล่งของสารปฏิชีวนะชนิดใหม่มีความสำคัญมาก จุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารปฏิชีวนะ ท่ามกลางกลุ่มของจุลินทรีย์เหล่านี้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทจัดเป็นเชื้อกลุ่มสำคัญที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด (Bérdy, 2005)

แอคติโนมัยสีท (actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการสร้างเส้นใย (filamentous bacteria) และสามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ ทั้งแบบที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้มสปอร์ เรียกว่า โคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) หรือโคนิเดีย (conidia) และแบบที่มีถุงหุ้มสปอร์ (sporangium) เรียกว่า สปอแรงกิโอสปอร์ (sporangiospore) สปอร์ที่สร้างนี้ทนความร้อนได้ไม่มาก (ขึ้นอยู่กับแต่ละสกุล) แต่สามารถทนต่อความแห้งได้ดีจึงสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน ประโยชน์ของแอคติโนมัยสีทที่รู้จักกันดี คือ ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากเชื้อแอคติโนมัยสีทถึงร้อยละ 45 เชื้อราร้อยละ 38 และแบคทีเรียชนิดอื่นร้อยละ 17 (Bérdy, 2005) เชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ร้อยละ 70 (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยสีททั้งหมด รองลงมา คือ เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ร้อยละ 5 (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น เช่น *Streptoverticillium Kitasatospora Actinomadura Saccharothrix Microbispora Microtetraspora Nonomuraea Actinoplanes Dactylosporangium Thermomonospora Thermoactinomyces Nocardia Saccharopolyspora Amycolatopsis Kibdellosporangium Pseudonocardia Actinosporangium Streptosporangium Spirillospora Planobispora* และ *Planomonospora* เป็นต้น (Bérdy, 2005) จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าการค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อ แอคติโนมัยสีทหายากสกุลอื่นๆ นั้นยังมีค่อนข้างน้อยมาก เมื่อเทียบกับเชื้อสกุล *Streptomyces* ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการขาดการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคในการแยกเพื่อให้ได้เฉพาะเชื้อสกุลนั้นๆ รวมทั้งขาดการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อจากแหล่งธรรมชาติ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นค้นหาเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากสกุลอื่นๆ รวมทั้งสกุล *Streptomyces* เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ไม่ว่าจะเป็นพันธุ์ไม้ สัตว์ หรือจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จึงมีความเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทนั้นน่าจะมีการกระจายตัวอยู่มากในหลายพื้นที่และมีสายพันธุ์ที่หลากหลายเช่นกัน แอคติโนมัยสีทสามารถพบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ในดิน แหล่งน้ำ ฝุ่นละออง และยังสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเรียกว่า เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท (endophytic actinomycetes) โดยเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้เป็นแหล่งทรัพยากรที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากสามารถพบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* และเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทหายากสกุลอื่นๆ (Zhao *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ และค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จำนวนมากจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทในพืชหลายชนิด (Bieber *et al.*, 1998 ; Castillo *et al.*, 2002 ; Gu *et al.*, 2006 ; Duangmal *et al.*, 2008 ; Igarashi *et al.*, 2007)

พืชสมุนไพรไทยหลายชนิด เช่น ขมิ้น หน่อกะลา ไพล เปราะป่า เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย เช่น มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ต้านเชื้อวัณโรค ต้านเชื้อก่อโรคมาลาเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ต้านอนุมูลอิสระ ระงับอาการปวด และต้านการอักเสบ เป็นต้น (Rahman, 2000 ; Wilken *et al.*, 2011 ; Lakshmanan *et al.*, 2011) มีความเป็นไปได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรนี้จะมีส่วนร่วมในวิถีเมแทบอไลต์ (metabolic pathway) ของพืชสมุนไพร และสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดที่คล้ายกับพืชสมุนไพรหรือสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้ (Zhao *et al.*, 2011) ทำให้พืชสมุนไพรเหล่านี้เป็นพืชที่มีความน่าสนใจในการนำมาคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท ซึ่งในปัจจุบันยังมีการศึกษาอนุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเพียงเล็กน้อย ด้วยลักษณะอันจำเพาะของแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาตินี้อาจส่งผลให้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากสายพันธุ์ใหม่และ/หรือสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิชนิดใหม่ได้

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นสารประกอบในกลุ่มโพลีคีไทด์ (polyketide) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารทุติยภูมิที่มีความหลากหลายทางการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา โปรโตซัว เซลล์มะเร็ง และสามารถออกฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant) ได้ ตัวอย่างสารประกอบโพลีคีไทด์ที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสีท เช่น erythromycin มีสมบัติเป็นสารต้านการเจริญของแบคทีเรีย (Weber *et al.*, 1985) nystatin มีสมบัติเป็นสารต้านการเจริญของเชื้อรา (Hazen and Brown, 1951) avermectin มีสมบัติเป็นสารต้านการเจริญของปรสิต (Ikeda *et al.*, 1999) daunorubicin มีสมบัติเป็นสารต้านเซลล์มะเร็ง (Dimarco *et al.*, 1981) และ rapamycin มีสมบัติเป็นสารกดระบบภูมิคุ้มกัน (Melino and Sigal, 1990) เป็นต้น

โครงสร้างสารประกอบในกลุ่มโพลีคีไทด์ถูกสังเคราะห์มาจากโมเลกุลตั้งต้นคือ malonyl-CoA และเกิดการ decarboxylation condensation ทำให้ได้โครงสร้างสารแตกต่างกันไป การสร้างสารกลุ่มนี้มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ โพลีคีไทด์ซินเทส (polyketide synthase, PKS) ซึ่งเป็น mega-enzyme complex มี 3 ชนิด (class) คือ type I, II และ III ทั้งนี้เอนไซม์ดังกล่าวประกอบด้วยโดเมน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(domain) ซึ่งทำหน้าที่ต่างๆ เพื่อเพิ่มความหลากหลายของโมเลกุล โดเมนหลักของโพลีคีไทด์ซินเทส คือ คีโตซินเทส (ketosynthase, KS) เอซิลทรานสเฟอร์เรส (acyltransferase, AT) และเอซิลแคริเออร์โปรตีน (acyl carrier protein, ACP) (Hopwood and Sherman, 1990 ; Simpson, T.J. 1995; Caffrey, 2003) การคัดกรองเชื้อเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบความสามารถในการสร้างสาร โพลีคีไทด์สามารถทำได้โดยใช้กระบวนการทางชีวโมเลกุล คือ การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ (polyketide synthase genes) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อโดเมนหลักดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถคัดกรองเชื้อได้ในระยะเวลาสั้น และประหยัดแรงงาน

จากข้อมูลเบื้องต้นทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการศึกษาเพื่อคัดกรองเชื้อเอนโดไฟติก แอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรไทยที่สามารถสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์โดยใช้กระบวนการทางชีวโมเลกุล เพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ตลอดจนศึกษาอนุกรมวิธานในระดับสกุลและคัดเลือกไอโซเลตที่น่าสนใจมาศึกษาต่อจนถึงระดับสปีชีส์ รวมทั้งทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์เหล่านี้ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาและนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรของไทย

12.2 เพื่อตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ในเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ และศึกษาความหลากหลายของยีนที่โคลนได้ในแต่ละเชื้อจากการทำพีซีอาร์

1.2.3 เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ เช่น ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

1.2.4 เพื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ในระดับสกุลและคัดเลือกไอโซเลตที่น่าสนใจมาศึกษาต่อจนถึงระดับสปีชีส์

1.2.5 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น เช่น ^{1}H-NMR และ TLC ของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือก

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทประมาณ 100 ไอโซเลต จากพืชสมุนไพรไทย เช่น ขมิ้น หน่อกะลา ไพล เปราะป่า และกระชาย และคัดเลือกไอโซเลตซึ่งพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์มาเลี้ยงในอาหาร Yeast extract - malt extract broth เป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus subtilis* ATCC 6633

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Escherichia coli ATCC 25922 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 และ *Candida albicans* ATCC 10231 รวมทั้งศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ในระดับสกุล และคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลตที่น่าสนใจมาศึกษาต่อจนถึงระดับสปีชีส์ รวมทั้งคัดเลือกเอาเชื้อไอโซเลตที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุดมาเลี้ยงในอาหารเหลวและทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทิลอะซีเตต และนำสารสกัดหยาบที่ได้มาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น เช่น ^{1}H-NMR และ TLC ตลอดจนทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้นั้น

1.4 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสาธารณสุขด้านความหลากหลายและการค้นหาเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบในการค้นคว้าวิจัยหายาชนิดใหม่ เพื่อรองรับการรักษาโรคต่างๆและการระบาดของเชื้อโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขปัจจุบันและอนาคต เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยเริ่มต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เอนโดไฟต์ (endophytes) คือ จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืช โดยไม่ก่อให้เกิดผลกระทบในทางลบต่อพืช (Bacon และ White, 2000) ความสัมพันธ์ระหว่างเอนโดไฟต์กับพืชมีหลายแบบด้วยกัน เช่น การอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (mutualism neutral symbiotic) หรือ การเป็นปรปักษ์ต่อเชื้อโรค (antagonistic pathogen) โดยเอนโดไฟต์เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biological control) เป็นแหล่งของสารทุติยภูมิ (metabolites) ที่สำคัญในทางการแพทย์ และยังสามารถป้องกันโรคให้กับพืชที่พวกมันอาศัยอยู่ด้วย อีกทั้งเป็นต้นแบบในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ต่างๆ ในธรรมชาติบางชนิดนอกจากการผลิตสารปฐมภูมิ (primary metabolite) แล้วยังสามารถผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่มีคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น ต้านเชื้อรา (antifungal) และต้านแบคทีเรีย (antibacterial) ที่ก่อโรคในคน สัตว์ หรือในพืช (Brunner และ Pertrini, 1992) จุลินทรีย์เอนโดไฟต์เป็นเชื้อที่ไม่ทำอันตรายต่อพืชอาศัย และยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ และในทางตรงกันข้ามยังช่วยต้านทานหรือป้องกันการเกิดโรคพืชบางชนิดให้กับพืชที่จุลินทรีย์อาศัย จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ประกอบด้วยแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยสีท ซึ่งสามารถพบได้ในพืชเกือบทุกชนิดบนโลก (Strobel และ Daisy, 2003) เนื่องจากเอนโดไฟต์อาศัยอยู่กระจายในเนื้อพืช เอนโดไฟต์อาจจะสร้างสารที่มีศักยภาพมาใช้ในทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม โดยสารที่ค้นพบใหม่หลายชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะ ยาต้านเชื้อ ยากดภูมิคุ้มกัน และสารต้านเซลล์มะเร็ง ที่ค้นพบเมื่อไม่นานมานี้เป็นสารที่ได้มาจากจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ ดังนั้นเอนโดไฟต์จึงเป็นแหล่งทรัพยากรสำคัญสำหรับการค้นหายาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคในมนุษย์ สัตว์ และพืช ได้เป็นอย่างดี

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการสร้างเส้นใย (filamentous bacteria) มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (Mol% G+C) สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป (มากกว่าร้อยละ 55) สามารถสร้างสปอร์ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เชื้อแอคติโนมัยสีทมีลักษณะที่คล้ายกับเชื้อราเนื่องจากมีการสร้างเส้นใยและมีการสร้างสปอร์ แต่ก็มีลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อรา คือ เซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสจึงจัดเป็นสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอตต่างจากเซลล์ของเชื้อราที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยสีทยังมีการสร้างเส้นใยที่มีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของเชื้อรา (Coyne. 1999) โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทมีลักษณะที่จำเพาะและมีความแตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่น เนื่องจากในสภาวะที่ถูกนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เส้นใยมักเจริญอัดกันแน่นเป็นก้อนแข็งและมีบางส่วนฝังอยู่ในเนื้อวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทหลายสายพันธุ์ส่วนใหญ่มักปกคลุมไปด้วยเส้นใยอากาศที่มีลักษณะเป็นฝุ่นผงแห้ง เส้นใยอาหารและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นใยอากาศมักมีสีเฉพาะในแต่ละสายพันธุ์ บางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (soluble pigments) (Miyadoh. 1997) เชื้อแอคติโนมัย สีทส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ อาจสร้างเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ หรือสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวโดยไม่มีสิ่งห่อหุ้มสปอร์ เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) อยู่บนเส้นใยอากาศ หรือบางสกุลอาจสร้างสปอร์ภายในโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายถุงซึ่งห่อหุ้มสปอร์ไว้ เรียกว่า สปอร์แรงเจียม (sporangium) (Coyne. 1999) เชื้อแอคติโนมัยสีทมักจะสร้างสปอร์เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ แต่เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญ เช่น มีสารอาหารเพียงพอ มีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม สปอร์จะงอกและขยายไปเป็นเส้นใย (Miyadoh. 1997) เชื้อแอคติโนมัยสีทไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic) ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบอิสระ (saprophyte) สามารถเจริญได้โดยอาศัยการย่อยสลายสารอินทรีย์ มีบางชนิด เช่น ในสกุล *Frankia* จะอาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชและต้นไม้ใหญ่ช่วยในการตรึงไนโตรเจน (Coyne. 1999)

แอคติโนมัยสีทเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้โดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ทั้งใน อากาศ ดิน แหล่งน้ำ ตะกอน และบริเวณรากพืชแม้กระทั่งในเนื้อเยื่อพืช การค้นพบแอคติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endophytic actinomycetes) ถูกค้นพบมากขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบัน และกระจายอยู่ในหลายสกุลหลายสปีชีส์ เชื้อส่วนใหญ่ที่ค้นพบเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ เช่น *Actinoallomurus acaciae* (Thamchaipenet *et al.*, 2010), *Actinoallomurus oryzae* (Indananda *et al.*, 2011), *Actinophytocola oryzae* (Indananda *et al.*, 2010), *Amycolatopsis samaneae* (Duangmal *et al.*, 2011), *Kineococcus gynurae* (Duangmal *et al.*, 2008), *Leifsonia soli* (Madhaiyan *et al.*, 2010), *Micromonospora tulbaghiae* (Kirby and Meyers, 2010), *Nocardioides caricicola* (Song *et al.*, 2011), *Pseudonocardia adelaidensis* (Kaewkla and Franco., 2010), *Rhodococcus cercidiphylli* (Li *et al.*, 2008), *Saccharopolyspora endophytica* (Qin *et al.*, 2008), *Streptomyces alni* (Liu *et al.*, 2009), *Streptosporangium oxazolinicum* (Inahashi *et al.*, 2011) การค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เป็นแหล่งที่อยู่และความทนทานต่อสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นในเซลล์ แอคติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่ถูกค้นพบมีแนวโน้มเป็นเชื้อสกุลและสปีชีส์ใหม่สูง จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาเพื่อได้มาซึ่งสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง จากการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืช พบว่ามีเชื้อบางสกุลสามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และบางชนิดมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคได้สารสำคัญที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์นอกจากแสดงฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะแล้ว ยังมีรายงานว่ายังสามารถแสดงฤทธิ์ด้านต่างๆ ด้วยเช่น สารเจลดานามัยซินที่แยกจากเชื้อ *Streptomyces* sp. สามารถแสดงฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาทได้ที่ความข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ (Tadtong *et al.* 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอคติโนมัยสีทเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ สามารถสร้างสารที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุของโรคพืช สร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืช ผลิตเอนไซม์ใช้ย่อยสลายอินทรีย์สาร และมีบางชนิดมีประโยชน์ในแง่ของการตรึงไนโตรเจน (Valois และคณะ, 1996) ในธรรมชาติเชื้อแอคติโนมัยสีทมีความสามารถในการสร้างสารที่มีบทบาทต่อสิ่งแวดล้อมที่พวกมันอาศัยอยู่เพื่อเหตุผลในการดำรงชีวิตอยู่ของพวกมัน เช่น การสร้างสารยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตอื่น การสร้างเอนไซม์หลายชนิดเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ และการสร้างสารส่งเสริมการเจริญ เป็นต้น ซึ่งกิจกรรมเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ในหลายด้าน เช่น ทางการด้านการแพทย์ ทางด้านการเกษตร และทางด้านอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น การนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างสารปฏิชีวนะ แอคติโนมัยสีทเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด (Birdy, 2005) สารปฏิชีวนะที่เชื้อแอคติโนมัยสีทผลิตขึ้น มีความหลากหลายสูงทั้งด้านโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ชีวภาพ สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทมีหลายกลุ่ม โดยสารประกอบโพลีคีไทด์ (polyketide) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่เชื้อแอคติโนมัยสีทสร้างขึ้น และเป็นกลุ่มสารประกอบที่มีความหลากหลายทั้งทางโครงสร้างและสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การสังเคราะห์สารประกอบโพลีคีไทด์เริ่มจากการเชื่อมต่อสายคาร์บอนของสารในกลุ่ม acyl-coenzyme A ทีละ 2 คาร์บอนจนเป็นสายยาว โดยคาร์บอนที่เข้ามาต่อนั้นมีตำแหน่งเบตา (ß-carbon) เป็นหมู่คีโต (keto) เสมอ แต่อาจเกิดกระบวนการรีดักชัน (reduction) ที่หมู่คีโตนี้ ทำให้เปลี่ยนไปเป็นหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ การเกิดหมู่คีโตต่อกันเป็นโครงสร้างหลักเช่นนี้จึงเป็นที่มาของชื่อสารประกอบโพลีคีไทด์ (Hopwood and Sherman, 1990) การสร้างสารกลุ่มนี้มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง คือ โพลีคีไทด์ซินเทส (polyketide synthase, PKS) ซึ่งเป็น mega-enzyme complex มี 3 ชนิด (class) คือ type I, II และ III ทั้งนี้เอนไซม์ดังกล่าวประกอบด้วยโดเมน (domain) ซึ่งทำหน้าที่ต่างๆ เพื่อเพิ่มความหลากหลายของโมเลกุล โดเมนหลักของโพลีคีไทด์ซินเทส คือ คีโตซินเทส (ketosynthase, KS) เอซิลทรานสเฟอร์เรส (acyltransferase, AT) และเอซิลแคริเออร์โปรตีน (acyl carrier protein, ACP) (Hopwood and Sherman, 1990 ; Simpson, T.J. 1995; Caffrey, 2003)

กระบวนการสังเคราะห์สารประกอบโพลีคีไทด์มีความคล้ายคลึงกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาว (long chain fatty acid) (Hopwood and Sherman, 1990) โดยกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันนั้นจะมีการควบคุมการทำงานโดยเอนไซม์หลัก คือ fatty acid synthase (FAS) โดยการสังเคราะห์เริ่มจากโดเมน (domain) acyltransferase (AT) นำหน่วยเริ่มต้น (starter unit) คือ acetyl-CoA ซึ่งมีคาร์บอน 2 อะตอม ไปที่บริเวณแขน phosphopantetheine ของ acyl carrier protein (ACP) เกิดพันธะ thioester จากนั้น ACP จะส่งหน่วยเริ่มต้นไปที่เอนไซม์หลัก ß-ketoacylsynthase (KS) แล้ว AT จะนำหน่วยต่อเติม (extender unit) คือ malonyl-CoA ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม ไปยัง ACP ที่ว่างลง แล้วเกิดกระบวนการ decarboxylative condensation เชื่อม acetyl-CoA เข้ากับ malonyl-CoA บน ACP ได้สายคาร์บอนที่มีความยาวเพิ่มขึ้น 2 คาร์บอนจาก malonyl-CoA โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำจัดคาร์บอนออกไป 1 อะตอมในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นหมู่คีโตที่ตำแหน่งเบตาจะเกิดกระบวนการรีดักชัน 3 ขั้นตอน คือ ketoreduction dehydration และ enoyl reduction ขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเอนไซม์ ketoreductase (KR) dehydratase (DH) และ enoyl reductase (ER) ซึ่งเปลี่ยนหมู่คีโตนั้นให้เป็นหมู่ไฮดรอกซิล พันธะคู่ และพันธะเดี่ยว ตามลำดับ แล้วจึงกลับเข้าสู่การเชื่อม malonyl-CoA อีกตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นซ้ำกันอีกหลายรอบ จนได้สายกรดไขมันที่มีขนาดยาวตามความเหมาะสม แล้วจึงปล่อยกรดไขมันสายยาว โดยการทำงานของเอนไซม์ thioesterase (TE) ตัวอย่างเช่น palmitic acid ซึ่งมีความยาว 16 คาร์บอน และ stearic acid มีความยาว 18 คาร์บอน เป็นต้น

การสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์จะมีกระบวนการต่างๆ คล้ายกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันดังกล่าวไปแล้วโดยอาศัยเอนไซม์ polyketide synthase (PKS) แต่ในกระบวนการสร้างโพลีคีไทด์นั้นสามารถเลือกใช้หน่วยเริ่มต้นและหน่วยต่อเติมที่หลากหลายกว่า acetyl-CoA และ malonyl-CoA ที่ใช้ในการสร้างกรดไขมัน ซึ่งได้แก่ butyryl-CoA, isobutyryl-CoA, methylmalonyl-CoA, ethylmalonyl-CoA, acetoacetyl-CoA, propionyl-CoA, benzoyl-CoA และ haxanoyl-CoA เป็นต้น นอกจากนี้กระบวนการรีดักชันของหมู่คีโตอาจจะมีหรือไม่มีก็ได้ ถ้ามีก็อาจจะเกิดไม่ครบทั้งสามขั้นตอน ทำให้เกิดความหลากหลายทางโครงสร้างของสาร โดยหมู่คีโตอาจคงอยู่หรืออาจถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นหมู่ฟังก์ชันอื่น เช่น เปลี่ยนไปเป็นหมู่ไฮดรอกซิล โดย KR หรือเปลี่ยนไปเป็นพันธะคู่ โดย KR และ DH หรือเปลี่ยนไปเป็นพันธะเดี่ยวโดย KR DH และ ER โครงสร้างของโพลีคีไทด์จึงมี side chain ที่หลากหลาย นอกจากนี้ stereochemistry ของหมู่ฟังก์ชันก็มีผลให้เกิดความแตกต่างทางโครงสร้างของโมเลกุลด้วย เมื่อสายโพลีคีไทด์สังเคราะห์เสร็จก็จะเชื่อมต่อกันเป็นวงโดยเกิดกระบวนการ lactonization ได้เป็นวงแหวนแลคโตน (lactone ring) หรือการเกิดกระบวนการ aromatization ได้เป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ตัวอย่างสารโพลีคีไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนแลคโตนหรือโพลีคีไทด์ชนิดที่ 1 (Type I polyketide) ได้แก่ สารในกลุ่มแมคโครไลด์ (macrolide) และโพลีอีน (polyene) สำหรับโครงสร้างที่เป็นวงแหวนอะโรมาติกหรือโพลีคีไทด์ชนิดที่ 2 (Type II polyketide) ได้แก่ tetracycline และ antracycline เป็นต้น หลังจากได้วงแหวนโพลีคีไทด์แล้ว โมเลกุลส่วนใหญ่จะมีกระบวนการดัดแปลงภายหลัง (post-modification) ได้แก่ การเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation) การเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) การเติมหมู่เมธิล (methylation) หรือหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ เข้าไปในตำแหน่งต่างๆ ของสารโพลีคีไทด์เพื่อให้สารนั้นมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ที่สมบูรณ์ (Hopwood and Sherman, 1990; Simpson, 1995)

เนื่องจากสารประกอบโพลีคีไทด์เป็นสารประกอบที่มีความหลากหลายทางโครงสร้างสูง ดังนั้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ (polyketide synthases; PKSs) จึงมีความแตกต่างกันอย่างสูงทั้งทางด้านโครงสร้างและหน้าที่ การคัดกรองเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการสร้างสารโพลีคีไทด์เบื้องต้นสามารถทำได้โดยใช้กระบวนการทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวโมเลกุล คือ การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ (polyketide synthase genes) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อโดเมนหลัก ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถคัดกรองเชื้อได้ในระยะเวลาสั้น ประหยัดแรงงาน และสามารถทราบความหลากหลายของยีนเหล่านี้ได้

พืชสมุนไพรไทยหลายชนิด เช่น ขมิ้น หน่อกะลา ไพล เปราะป่า และกระชาย เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย เช่น มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ต้านเชื้อวัณโรค ต้านเชื้อก่อโรคมาลาเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ต้านอนุมูลอิสระ ระงับอาการปวด และต้านการอักเสบ เป็นต้น (Rahman, 2000 ; Wilken *et al.*, 2011 ; Lakshmanan *et al.*, 2011) มีความเป็นไปได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรนี้จะมีส่วนร่วมในวิถีเมแทบอไลต์ (metabolic pathway) ของพืชสมุนไพร และสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดที่คล้ายกับพืชสมุนไพรหรือสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้ (Zhao *et al.*, 2011) ทำให้พืชสมุนไพรเหล่านี้เป็นพืชที่มีความน่าสนใจในการนำมาคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท ซึ่งในปัจจุบันยังมีการศึกษาอนุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเพียงเล็กน้อย ด้วยลักษณะอันจำเพาะของแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาตินี้อาจส่งผลให้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากสายพันธุ์ใหม่และ/หรือสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิชนิดใหม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการเก็บรักษาเชื้อ

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร เช่น ขมิ้น หน่อกะลา ไพล เปราะป่า และกระชาย ที่มีการปลูกโดยไม่ใช้สารเคมี โดยเก็บตัวอย่างรากใต้ดิน ลำต้น และใบ ของพืชที่โตเต็มที่แล้วมาล้างด้วยน้ำสะอาด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงขั้นตอนการแยกเชื้อ

3.1.2 การแยกเชื้อ

(1) ทำการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของใบ ลำต้น ราก และเหง้าของพืช โดยนำมาล้างด้วยสารละลาย tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 1 และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นแช่ลงในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 (95% alcohol) และแช่ลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

(2) นำชิ้นส่วนของพืชวงศ์ขิงที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาบดให้ละเอียดโดยใช้โกร่งปราศจากเชื้อ จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร Humic acid vitamin agar starch casein agar และ Soil extract agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21-30 วัน

หลังจากบ่มครบเวลาที่กำหนด ทำการคัดเลือกโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยตรวจลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ระยะการทำงานสูง (Long working distance lens) จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract-Malt extract agar

3.1.3 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

ทำการเก็บรักษาเชื้อในรูปแบบอาหารเอียง (slant) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น working stock และทำการเก็บรักษาเชื้อเพื่อไว้ใช้เป็นเวลานานด้วยการเก็บลงในสารละลาย 15% glycerol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และการเก็บในรูปแบบ lyophilization

3.2 การตรวจสอบและการศึกษาความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ในเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

3.2.1 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์

นำ genomic DNA ที่แยกได้ มาเพิ่มปริมาณ DNA ในช่วง PKS gene type 1 และ PKS gene type 2 โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction ; PCR) ซึ่งใช้ไพรเมอร์จำเพาะ จากนั้นตรวจสอบปริมาณ DNA ในช่วง PKS gene type 1 และ PKS gene type 2 โดยวิธี gel electrophoresis และคัดเลือกแถบ (band) ที่คาดว่าเป็น DNA ในช่วง PKS gene type 1 และ PKS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gene type 2 นั้นๆ มาทำการ purify แล้วโคลนลงใน TA cloning kit (fermentas) นำ positive clone มาสกัดโดยใช้ plasmid miniprep restriction enzyme

3.2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence analysis)

นำ DNA ที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST ในฐานข้อมูลของ NCBI และจัดทำแผนภาพ Phylogenetic tree

3.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆของเชื้อดังนี้

3.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring and Gottlied, 1966) ตรวจผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจดูลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายไคติน การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975) การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟล์ การผลิตเมลานิน การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง และการใช้แหล่งคาร์บอน (Shiring and Gottlieb, 1966) จากการศึกษานี้จะสามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาศึกษาในขั้นต่อไป

3.3.2 ศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ (Komagata and Suzuki, 1987)

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

(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 พ่นแล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 2-3 นาที เพื่อดู spot ที่เกิดขึ้นเทียบกับ standard

(2) การวิเคราะห์ Whole cell sugar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเซลล์แห้งมาไฮโดรไลส์ด้วย 1N H_2SO_4 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) พ่นด้วย acid aniline phthalate อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เทียบ spot ที่ได้กับ standard

(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 F_{254}, 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) แล้วพ่นด้วย 50% sulfuric acid อบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สังเกต spot ที่เกิดขึ้น

(4) การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid)

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

(5) การวิเคราะห์ Isoprenoid quinone

นำเซลล์แห้งสกัดด้วย chloroform - methanol อัตราส่วน 2 :1 บนเครื่องเขย่า 1 คืน จากนั้นกรองและทำให้แห้ง นำส่วนที่ได้ละลายซ้ำด้วย acetone แล้วทำให้บริสุทธิ์บนแผ่น TLC (Merck. No. 1.05715 Kieselgel 60 F_{254}, 20x20 cm) เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.3.3 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การวิเคราะห์ DNA base composition (Tamaoka,1994.)

(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

(2) การวิเคราะห์

เตรียม nucleoside ของ DNA แต่ละไอโซเลต จากการไฮโดรไลส์ 10 μl heated DNA (1 mg/ml) ด้วย 10 μl nuclease P_1 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และไฮโดรไลส์ต่อด้วย 10 μl alkaline phosphatase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.3.5 Photobiotin labeling DNA-DNA Hybridization

(1) Immobilization of DNA in microtiter plate

หยด 100 μl ของสารละลาย heat – denatured DNA (1 μg 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

(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 ที่ติดฉลากแล้วไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วและนำไป sonicate แล้วนำไปผสมกับ hybridization solution

(3) Prehybridization

หยดสารละลาย prehybridization ลงแต่ละหลุมของ plate บ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิสำหรับ hybridize แล้วเทสารละลายนี้ทิ้ง

(4) Hybridization

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

(5) Detection of biotinylated – DNA annealing to immobilized – DNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเทสารละลาย hybridize ทิ้งแล้ว ล้างด้วย 0.2xSSC 3 ครั้ง เติมสารละลาย I (Bovine serun 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 – H_2O_2 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที จะเกิดสารละลายสีฟ้า แล้ววัดความเข้มของสีด้วย microplate reader (630 nm) หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 2M H_2SO_4 สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้ววัดความเข้มที่ 450 nm จะได้ค่าที่ต้องการ

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

ผลจากการศึกษา DNA relatedness จะสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อได้ หากเชื้อที่พบเป็นเชื้อที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานไว้จำเป็นต้องศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อใหม่ต่อไป โดยใช้วิธีการดังที่กล่าวมา

3.4 การหมักเพื่อผลิตสาร และการสกัดแยกสาร

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP2 (Yeast extract – Malt extract broth; pH 7.3) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน นำน้ำหมักเชื้อมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) นำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้

3.5.1 *ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์*

นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธี agar diffusion (Lorian, 1980) วิธีการทดสอบมีขั้นตอนดังนี้ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ โดยใช้เชื้อทดสอบชนิดเดียวกับในข้อ1.3 นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำ disc ที่หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 µl/disc ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำ disc control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 การแยกและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละชนิด นำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี เช่น TLC และพิสูจน์เอกลักษณ์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิคทาง spectroscopy เช่น ^{1}H-NMR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างต้นขมิ้น หน่อกะลา ไพล เปราะป่า และกระชาย นำมาทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท พบว่าได้เชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด 100 ไอโซเลต (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดลักษณะของพืชตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้

ชนิดของตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ขมิ้น	AG2	AG2-1 AG2-2 AG2-3 AG2-4 AG2-5 AG2-6 AG2-7 AG2-8 AG2-9 AG2-10 AG2-11 AG2-12 AG2-13 AG2-14 AG2-15
	AG3	AG3-1 AG3-2 AG3-3 AG3-4 AG3-5 AG3-6 AG3-7 AG3-8 AG3-9 AG3-10 AG3-11 AG3-12 AG3-13 AG3-14 AG3-15
	AG4	AG4-1 AG4-2 AG4-3 AG4-4 AG4-5 AG4-6 AG4-7 AG4-8 AG4-9 AG4-10 AG4-11 AG4-12 AG4-13 AG4-14 AG4-15
	AG5	AG5-1 AG5-2 AG5-3 AG5-4 AG5-5 AG5-6 AG5-7 AG5-8 AG5-9 AG5-10 AG5-11 AG5-12 AG5-13 AG5-14 AG5-15 AG5-16 AG5-17 AG5-18 AG5-19 AG5-20 AG5-21 AG5-22 AG5-23 AG5-24 AG5-25 AG5-26 AG5-27 AG5-28 AG5-29 AG5-30
หน่อกะลา	AG6	AG6-1 AG6-2 AG6-3 AG6-4 AG6-5 AG6-6 AG6-7 AG6-8 AG6-9 AG6-10 AG6-11 AG6-12 AG6-13 AG6-14 AG6-15
กระชาย	BR3	BR3-1
ไพล	KE1	KE1-1
เปราะป่า	PR2	PR2-1 PR2-2 PR2-3 PR2-4 PR2-5 PR2-6 PR2-7 PR2-8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

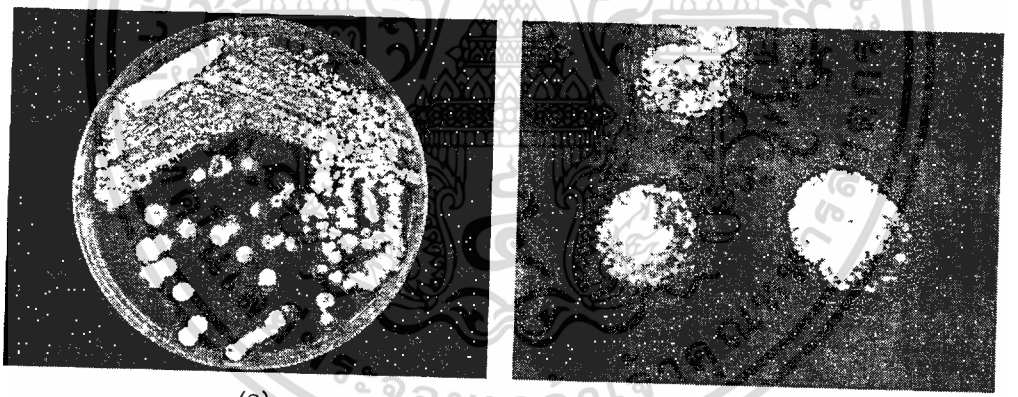
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ในจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด 100 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อออกเป็น 8 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวอมเทา (grayish greenish yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมเขียว (greenish gray) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์ที่มีลักษณะบิดเป็นเกลียว (รูปที่ 1) ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 15 ไอโซเลต ได้แก่ AG2-1 AG2-2 AG2-3 AG2-4 AG2-5 AG2-6 AG2-7 AG2-8 AG2-9 AG2-10 AG2-11 AG2-12 AG2-13 AG2-14 AG2-15

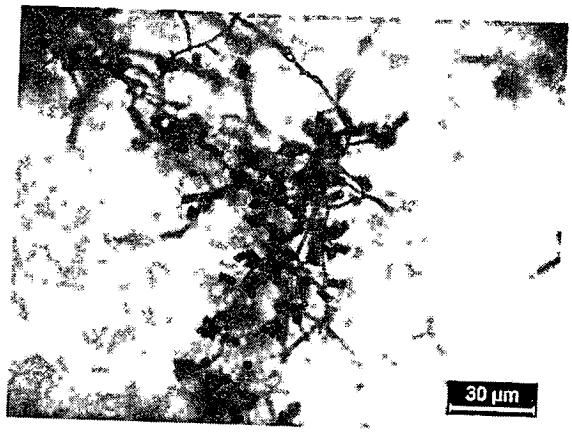
เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 7 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 5-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนม รวมทั้งเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus, B. subtilis, M. Luteus,* methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ vancomycin resistance *Enterococcus fecium* (VRE) ได้



(ก) (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

142896



(ค)

รูปที่ 1 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG2-1
ก และ ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG2-1
ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

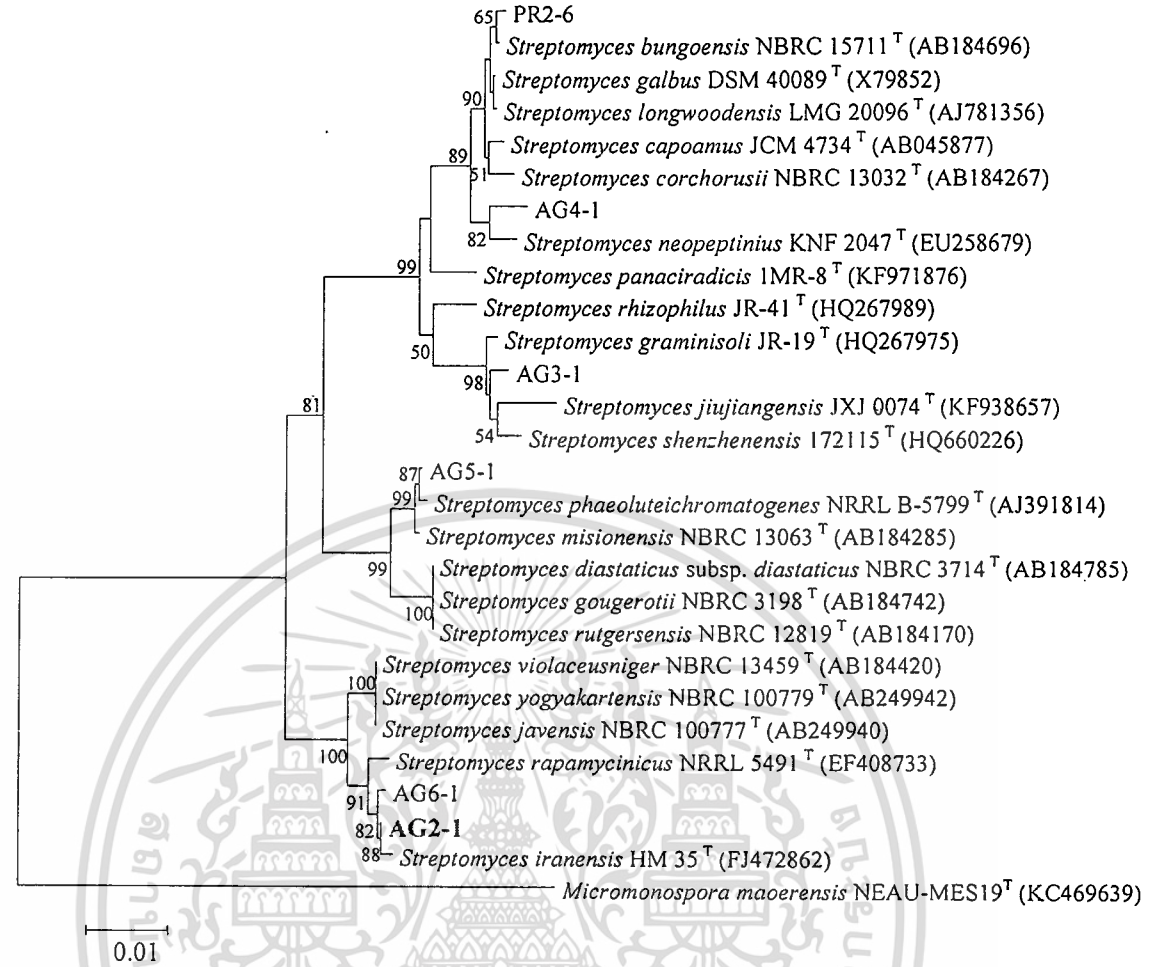
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 1

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดดีอะมิโนพิมีลิก แบบ *LL* (cell wall type I) พบน้ำตาลกลูโคส และไรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 70.9-71.7 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AG2-1

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG2-1 เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces iranensis* HM 35^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.79 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

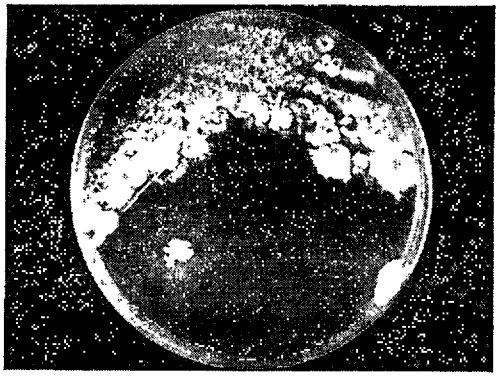


รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG2-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

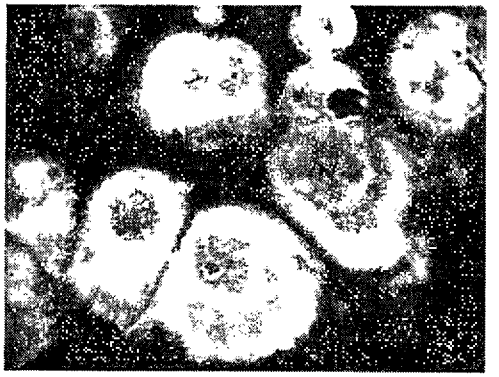
กลุ่มที่ 2เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลอมเหลือง (light yellowish brown) สร้างเส้นใยอากาศสีขาว (white) สร้างรงควัตถุสีเหลืองอมเทา (grayish yellow) สร้างสปอร์ที่มีลักษณะบิดเป็นเกลียว (รูปที่ 2) ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 15 ไอโซเลต ได้แก่ AG3-1 AG3-2 AG3-3 AG3-4 AG3-5 AG3-6 AG3-7 AG3-8 AG3-9 AG3-10 AG3-11 AG3-12 AG3-13 AG3-14 AG3-15

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 6 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 4-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนม รวมทั้งเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ ไม่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

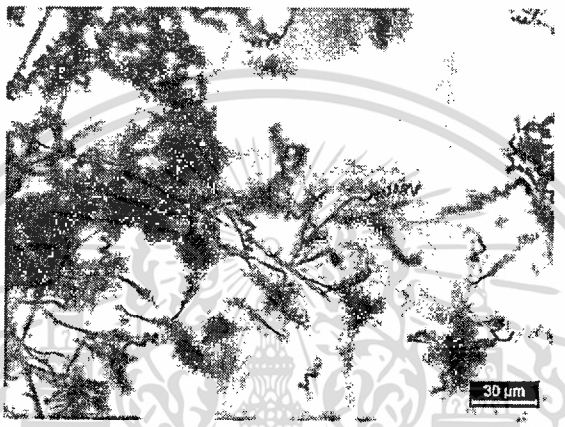
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 3 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG3-1
ก และ ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG3-1
ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

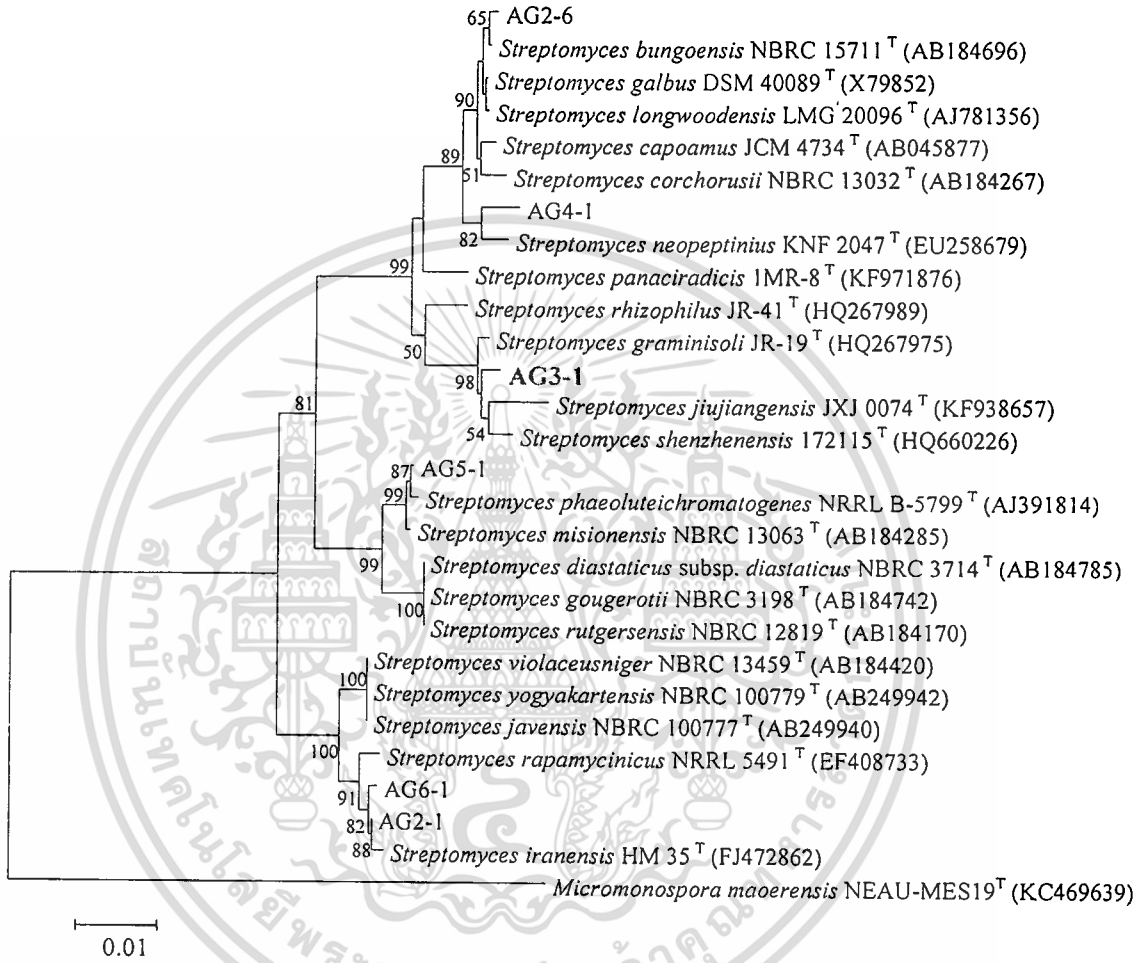
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมีลิก แบบ *LL* (cell wall type I) พบน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส แมนโนส แรมโนส และไรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และฟอสฟาติดิลอินโนซิตอล (phosphatidyinnositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 70.9-71.7 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AG3-1

เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG3-1 เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces graminisoli* JR-19 ^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.58 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 98



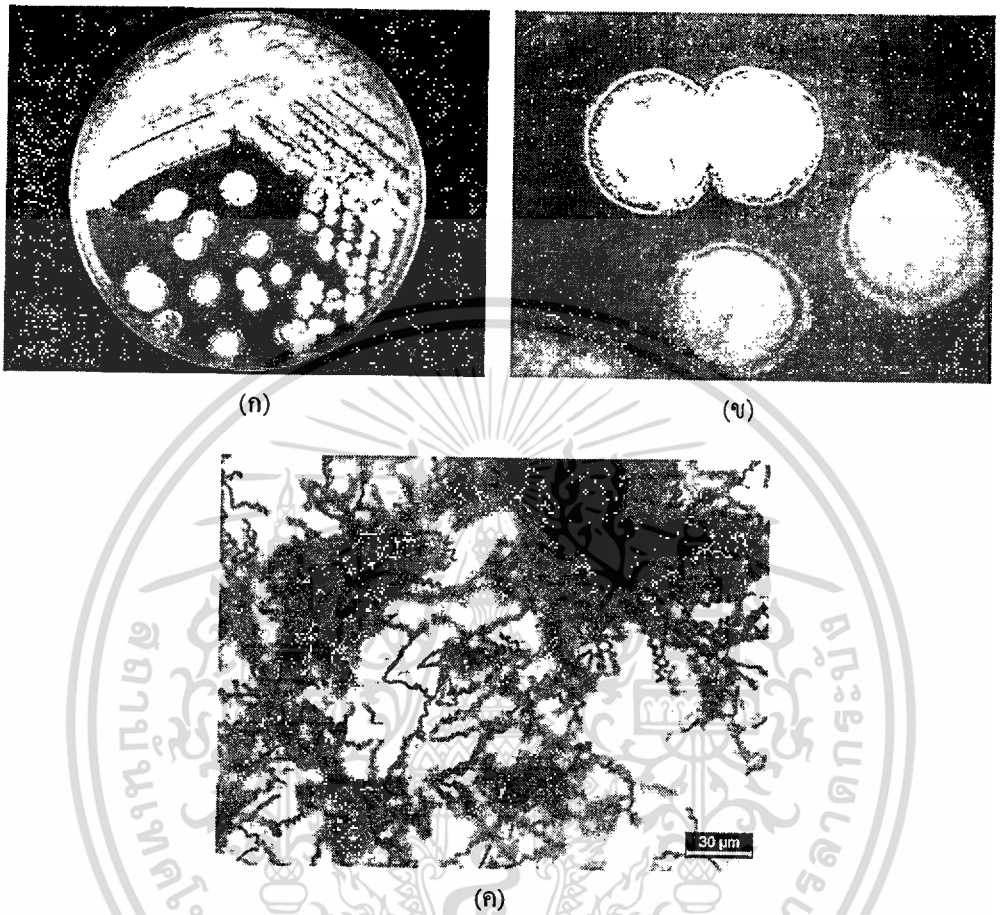
รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG3-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองอมเขียวอมเทา (grayish greenish yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีเทา (medium gray) ไม่สร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์ที่มีลักษณะบิดเป็นเกลียว (รูปที่ 5) ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 15 ไอโซเลต ได้แก่ AG4-1 AG4-2 AG4-3 AG4-4 AG4-5 AG4-6 AG4-7 AG4-8 AG4-9 AG4-10 AG4-11 AG4-12 AG4-13 AG4-14 AG4-15

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 10 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 5-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้คือ 40 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนม รวมทั้งเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ ไม่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ



(ก) (ข)

(ค)

รูปที่ 5 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG4-1
ก และ ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG4-1
ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3

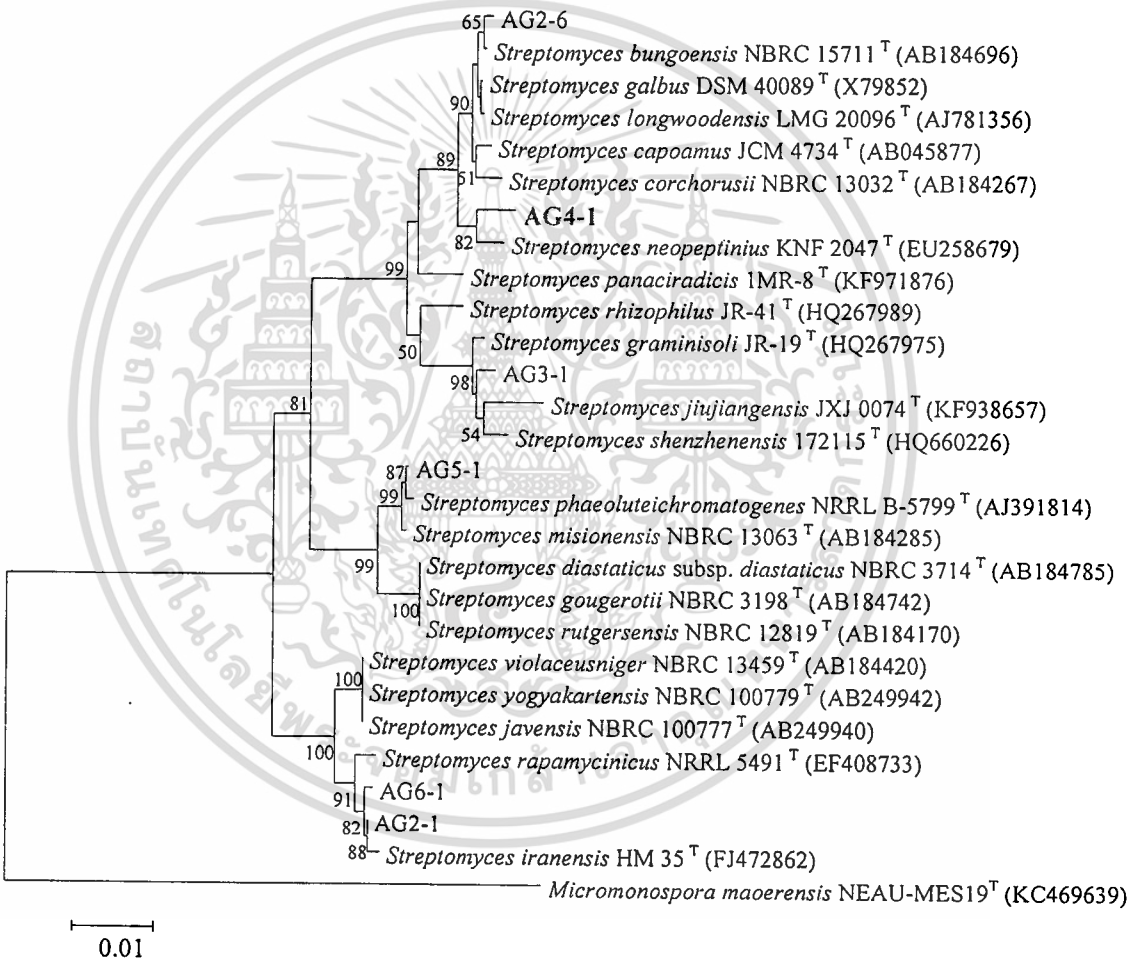
ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมีลิกแบบ *LL* (cell wall type I) พบน้ำตาลกลูโคส แม่นโนส และไรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และฟอสฟาติดิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อินโนซิตอล (phosphatidyinnositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 70.9-71.7 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AG4-1

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AG4-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces neopeptinius* KNF 2047^T มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.06 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 82

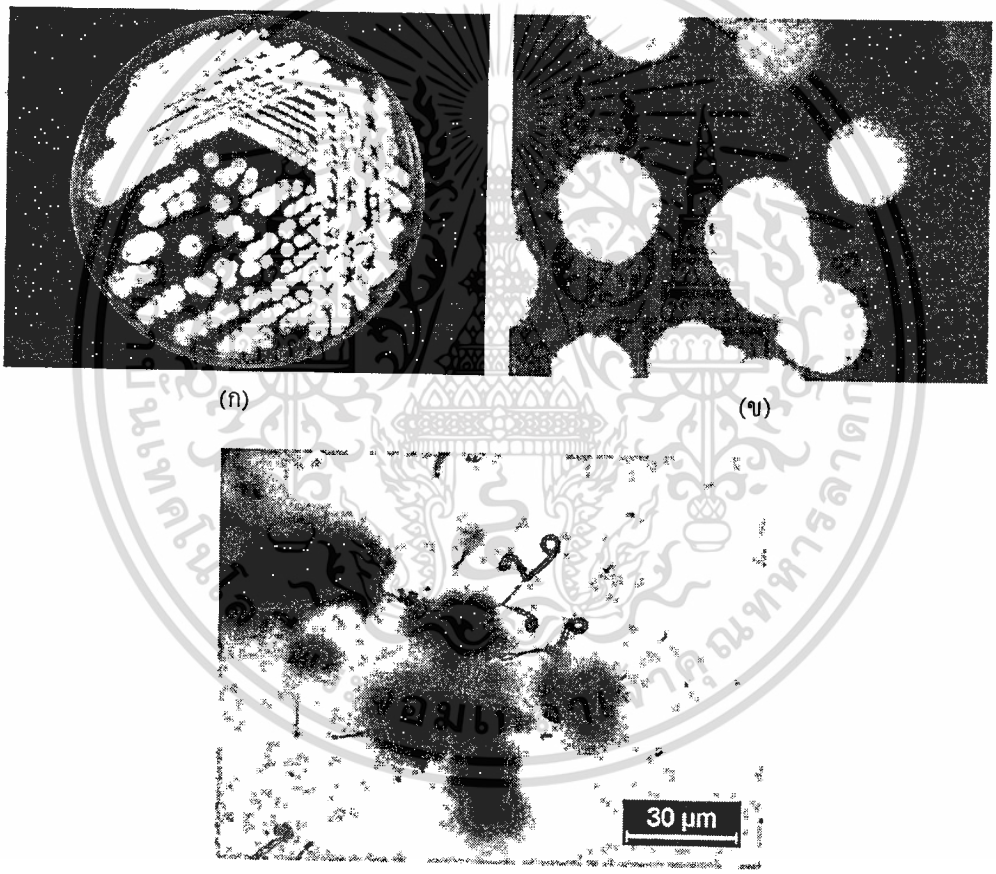


รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG4-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวอมเทา (grayish greenish yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมม่วง (Purplish Gray) ไม่สร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์ที่เรียงต่อกันเป็นสายสั้นๆ และตรงปลายหักงอเป็นรูปตะขอ (รูปที่ 7) ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 30 ไอโซเลต ได้แก่ AG5-1 AG5-2 AG5-3 AG5-4 AG5-5 AG5-6 AG5-7 AG5-8 AG5-9 AG5-10 AG5-11 AG5-12 AG5-13 AG5-14 AG5-15 AG5-16 AG5-17 AG5-18 AG5-19 AG5-20 AG5-21 AG5-22 AG5-23 AG5-24 AG5-25 AG5-26 AG5-27 AG5-28 AG5-29 AG5-30

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 5 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 4-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนม รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ ไม่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ



(ก) (ข)

(ค)

รูปที่ 7 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG5-1
ก และ ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG5-1
ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

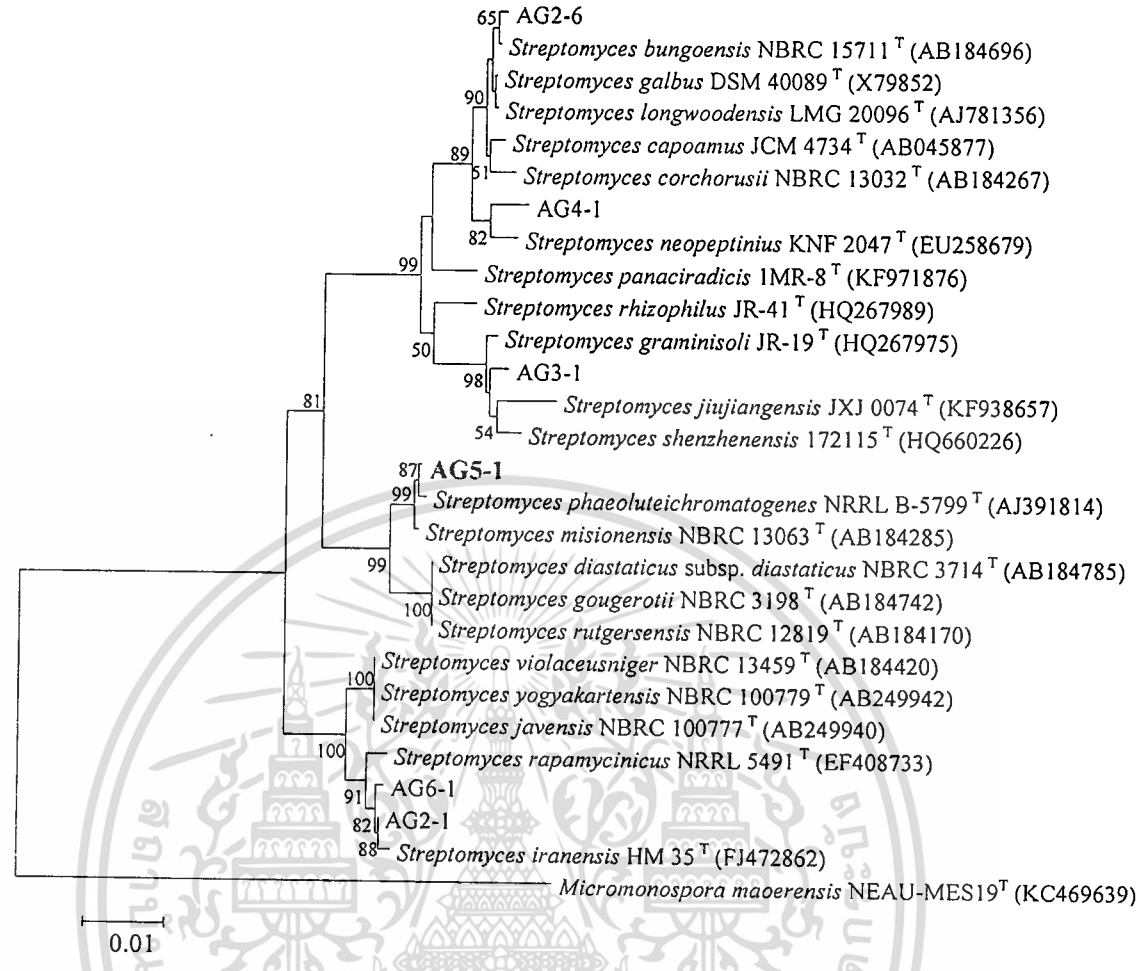
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 4

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมีลิก แบบ *LL* (cell wall type I) พบน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และไรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และฟอสฟาติดิลอินโนซิตอล (phosphatidyinnositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 70.9-71.7 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AG5-1

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AG5-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces misionensis* NBRC 13063 ^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.86 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

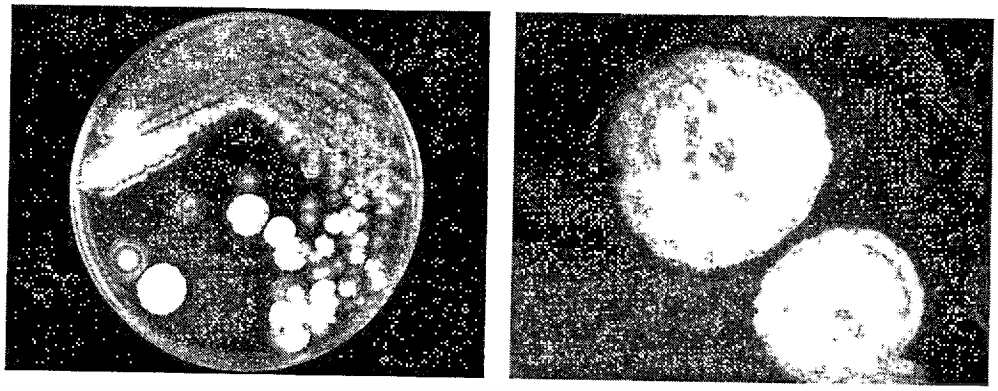


รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG5-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

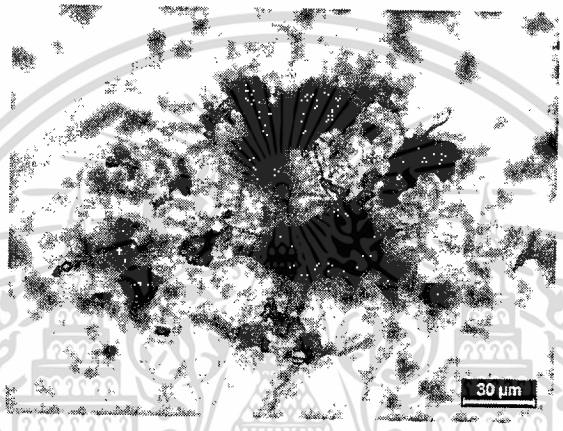
กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวอมเทา (grayish greenish yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีขาว (White) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์ที่มีลักษณะบิดเป็นเกลียว (รูปที่ 9) ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 15 ไอโซเลต ได้แก่ AG6-1 AG6-2 AG6-3 AG6-4 AG6-5 AG6-6 AG6-7 AG6-8 AG6-9 AG6-10 AG6-11 AG6-12 AG6-13 AG6-14 AG6-15

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 6 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 5-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนม รวมทั้งเจลาตินได้ และสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus, B. subtilis, M. Luteus,* methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ vancomycin resistance *Enterococcus fecium* (VRE) ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)



(ค)

รูปที่ 9.เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG6-1
ก และ ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต AG6-1
ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

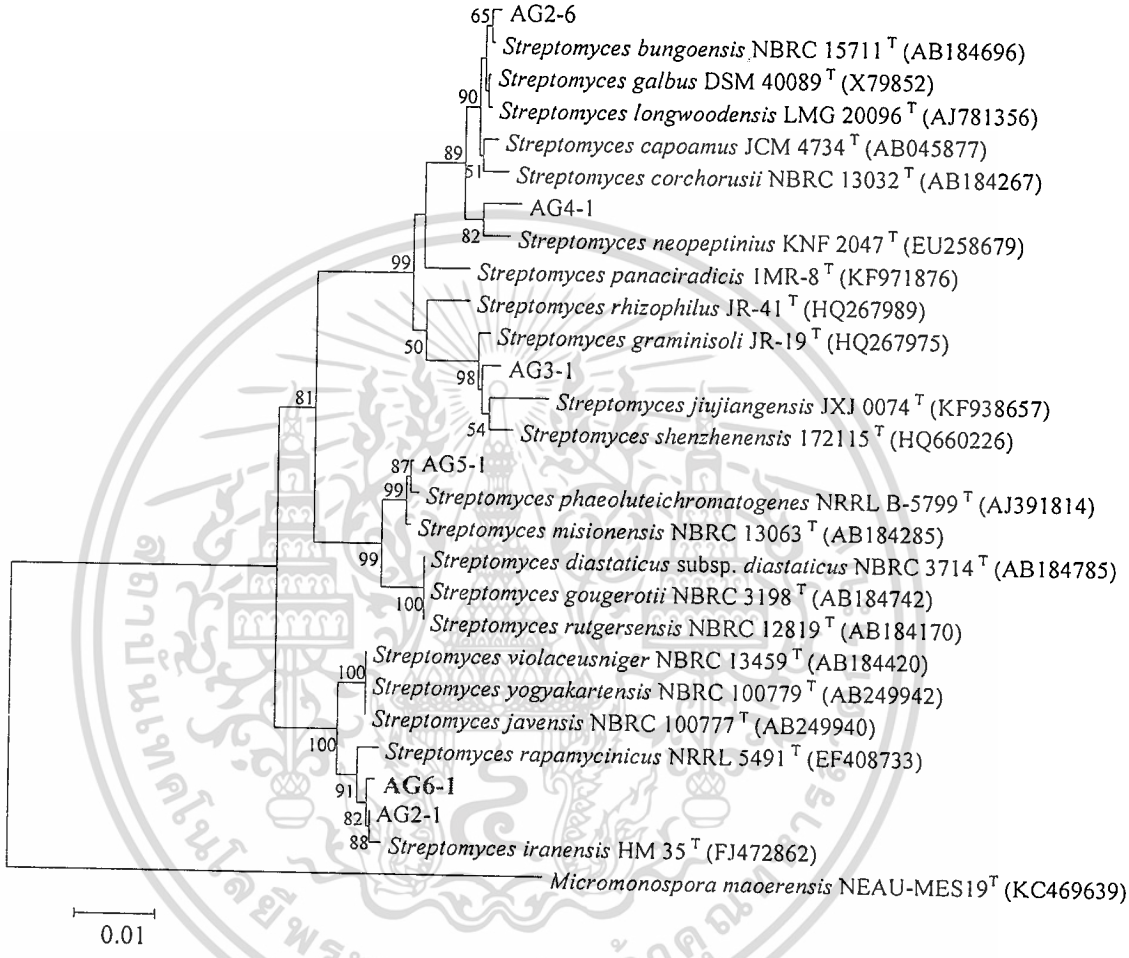
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมีลิก แบบ *LL* (cell wall type I) พบน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส และไรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) และฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 70.9-71.7 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AG6-1

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AG6-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces iranensis* HM 35 ^{T} (มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.65 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 82

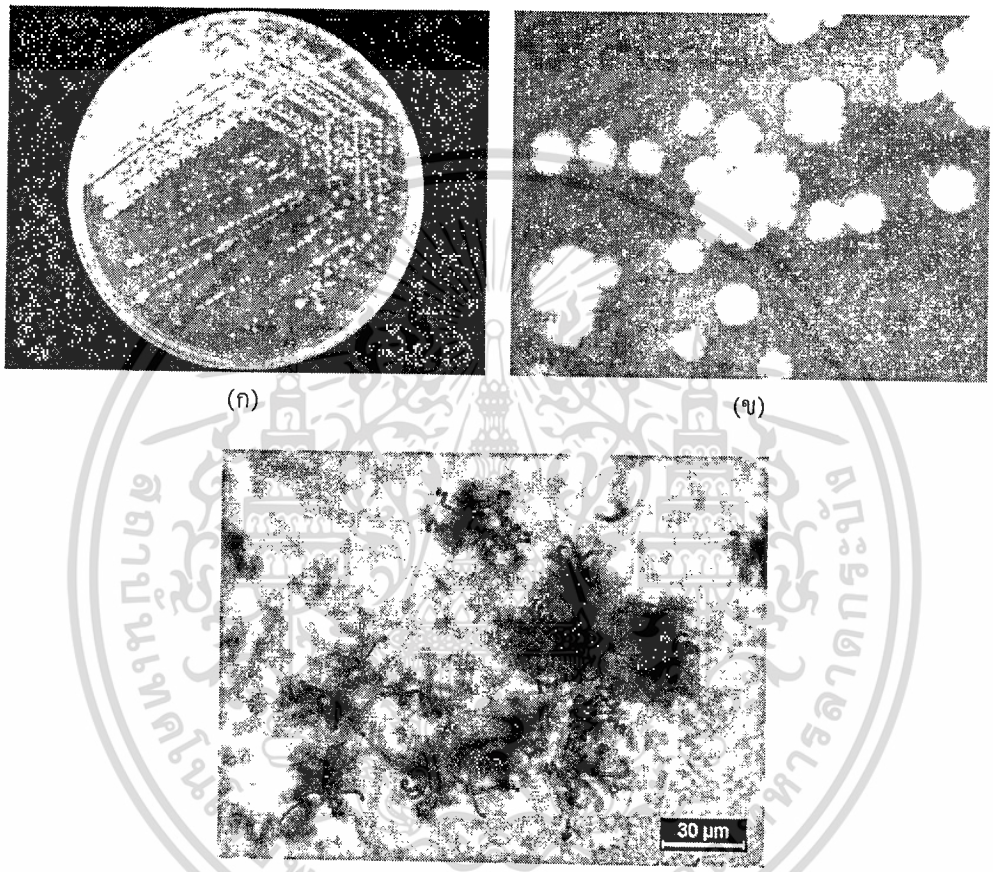


รูปที่ 10 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AG6-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองสด (vivid yellow) สร้างเส้นใยอากาศสีขาว (white) สร้างรงควัตถุสีเหลืองอ่อน (pale yellow) สร้างสปอร์ที่มีลักษณะบิดเป็นเกลียว (รูปที่ 11) ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ PR2-1 PR2-2 PR2-3 PR2-4 PR2-5 PR2-6 PR2-7 PR2-8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 5 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 4-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus, B. subtilis, M. Luteus,* methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ vancomycin resistance *Enterococcus fecium* (VRE) ได้



(ก) (ข)

(ค)

รูปที่ 11 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต PR2-6
ก และ ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต PR2-6
ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 6

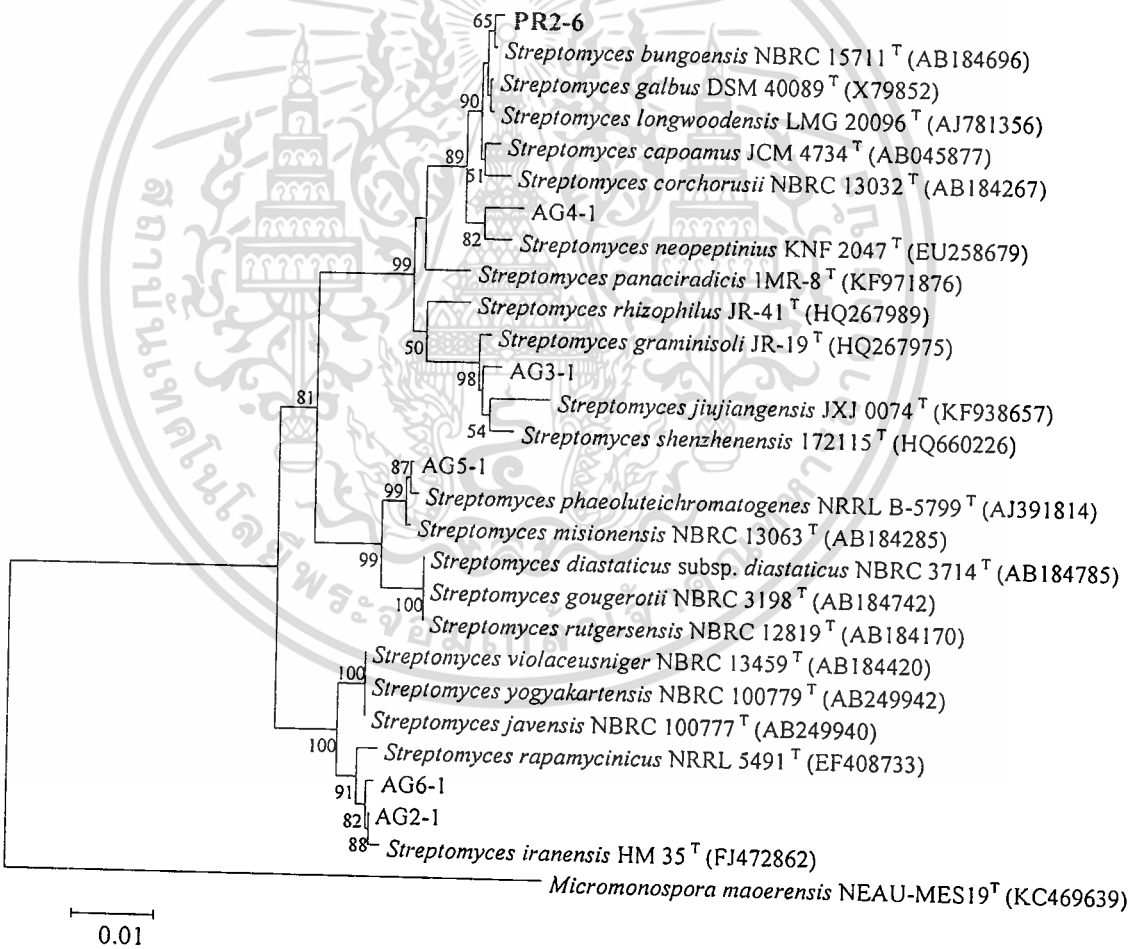
ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดดีอะมิโนพิมีลิกแบบ *LL* (cell wall type I) พบน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และไรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) และฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 70.9-71.7 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PR2-6

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PR2-6 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces bungoensis* NBRC 15711 ^{T} (มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.86 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 65

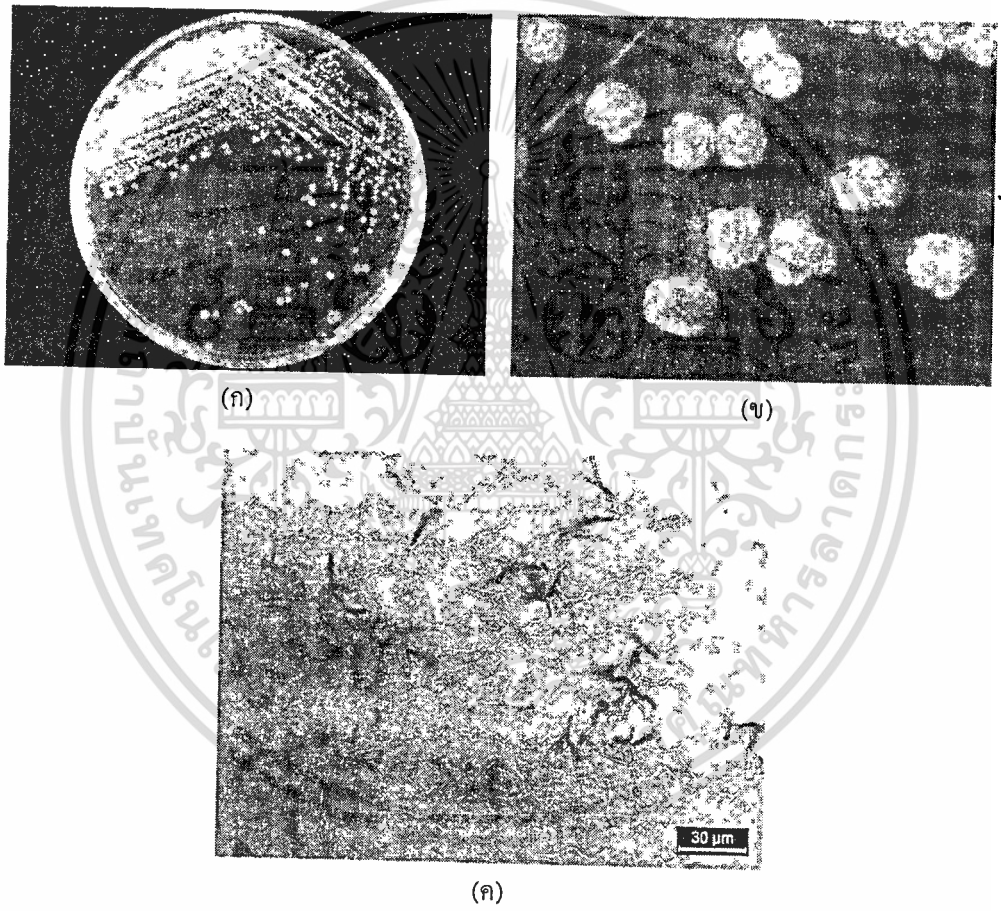


รูปที่ 12 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PR2-6 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 7 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มเข้ม (deep orange) ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างรงควัตถุสีส้มอมแดง (strong reddish orange) สร้างสปอร์เรียงต่อกันเป็นสายยาวอยู่บนก้านชูสปอร์ที่มีขนาดสั้น ซึ่งชูขึ้นมาจากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 13) ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ BR3-1

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 2 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 5-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง และโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ รวมทั้งไม่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้



(ก) (ข)

(ค)

รูปที่ 13 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต BR3-1
ก และ ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต BR3-1
ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

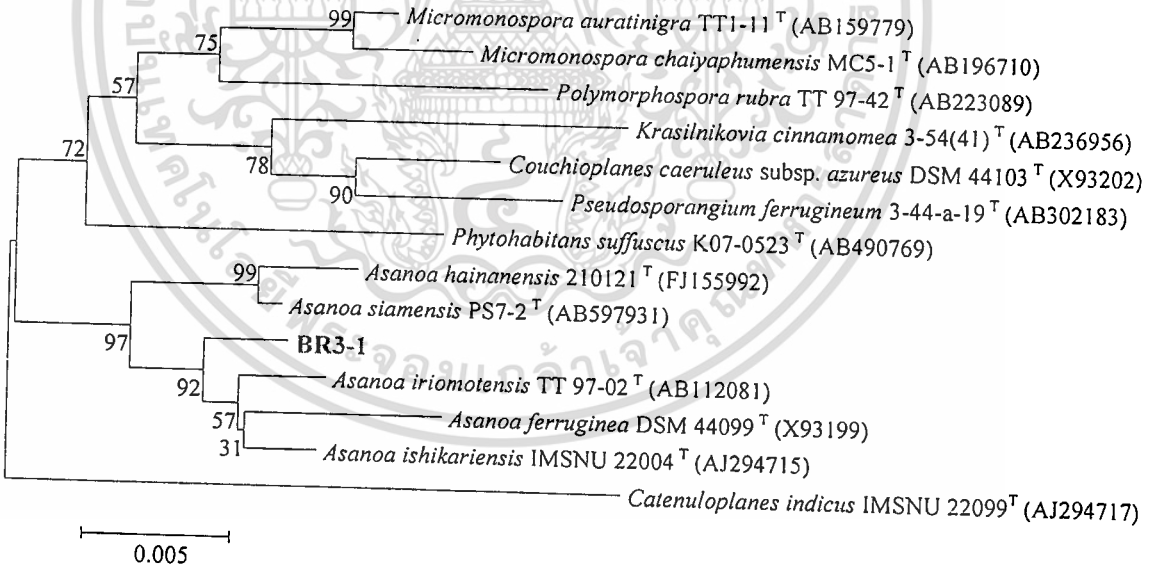
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 7

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมีลิกแบบ *meso* และ OH (cell wall type II, peptidoglycan type A1γ) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส แมนโนส แรมโนส และ ไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาติดิลอิโนซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositolmannoside) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ร้อยละ 71.4 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Asanoa*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BR3-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BR3-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Asanoa ishikariensis* IMSNU 22004^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.39 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 92 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต BR3-1 และเชื้อ type strain ของสกุล *Asanoa* ทั้งหมดมีค่าต่ำกว่า 70%

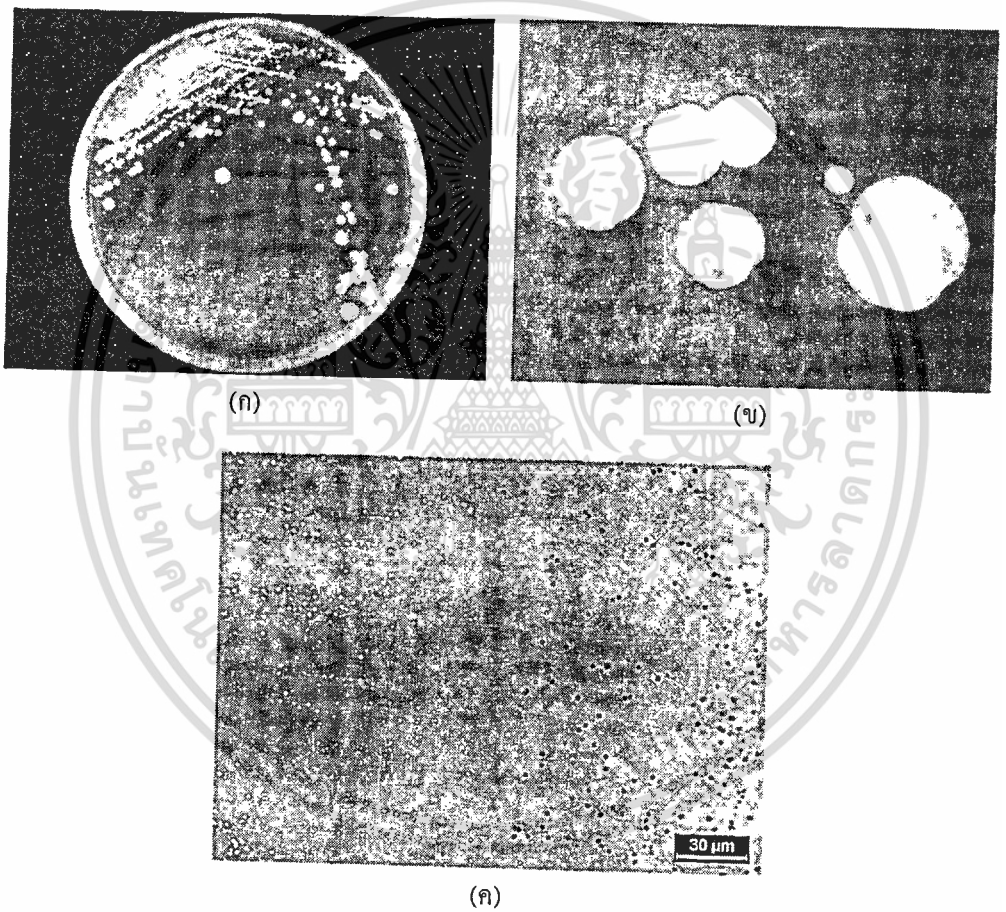


รูปที่ 14 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต BR3-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 8 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน (pale yellow) ไม่สร้างเส้นใยอากาศ และไม่สร้างรงควัตถุ สร้างโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่าโกลโบส บอดี้ (globose body) ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปกลม (รูปที่ 15) ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ KE1-1

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 2 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 5-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนม และสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus, B. subtilis, M. Luteus,* methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ vancomycin resistance *Enterococcus fecium* (VRE) ได้



(ก) (ข)

(ค)

รูปที่ 15 เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต KE1-1

ก และ ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลต KE1-1

ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

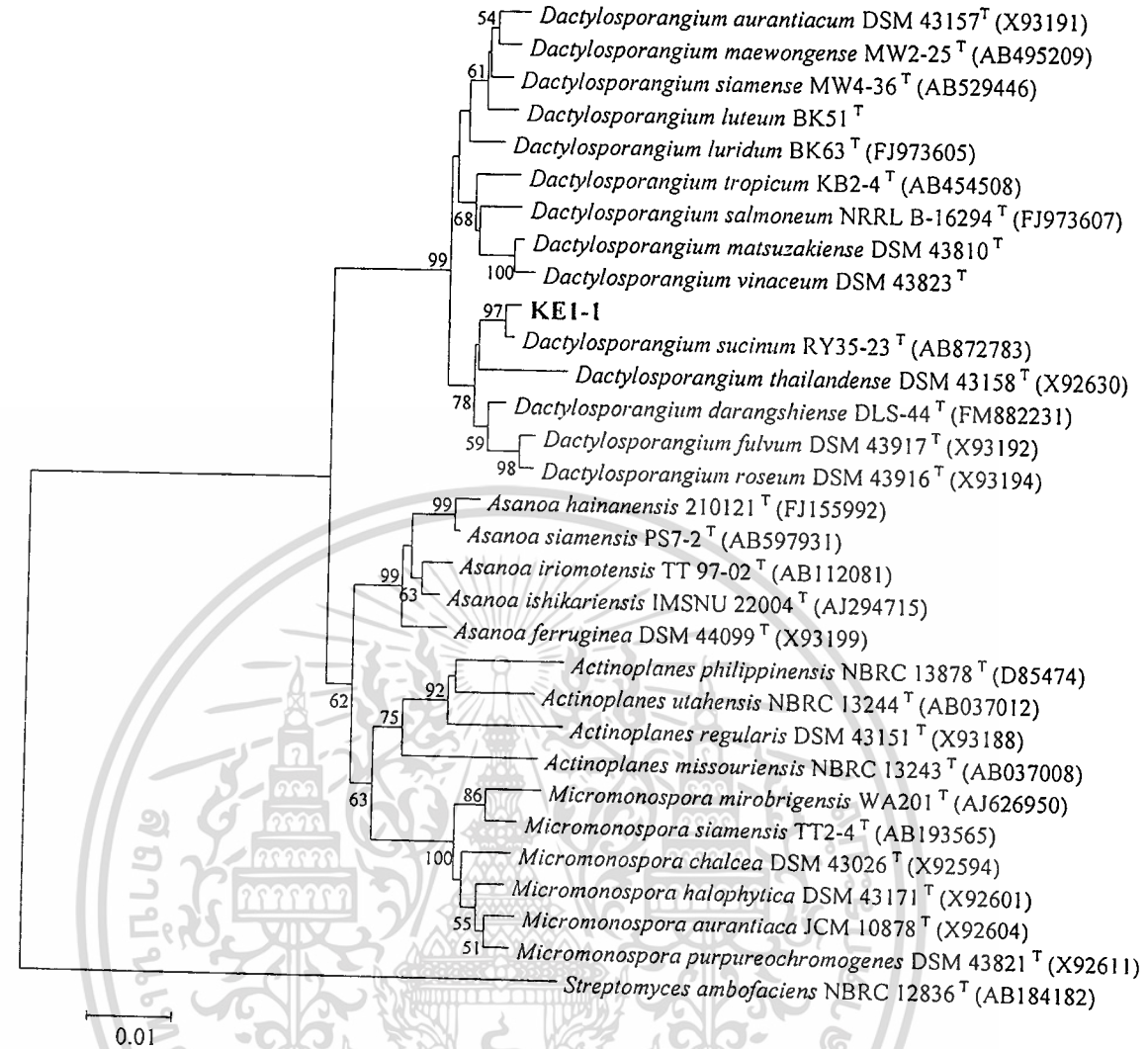
ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 8

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน กรดไดอะมิโนพิมีลิกแบบ *meso* และ OH (cell wall type II, peptidoglycan type A1γ) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส แมนโนส แรมโนส และ ไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาติดิลอิโนซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositolmannoside) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 71.9 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Dactylosporangium*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต KE1-1

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต KE1-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Dactylosporangium sucinum* RY35-23^T (มากที่สุดด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.72 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KE1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อตัวแทนกลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
AG2-1	ISP2	ดีมาก	Greenish Gray	Grayish Greenish Yellow	-
	ISP3	ดีมาก	Greenish Gray	Grayish Greenish Yellow	-
	ISP4	ดี	Grayish Purplish Blue	Yellowish White	-
	ISP5	ดี	White	Pale Greenish Yellow	-
	ISP6	ดี	Yellowish Gray	Yellowish Gray	-
	ISP7	ดี	Greenish Gray	Light Greenish Gray	-
	Glu.A.	ปานกลาง	White	Yellowish White	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Greenish Gray	Light Greenish Gray	-
	N.A.	ปานกลาง	White	Grayish Greenish Yellow	-
AG3-1	ISP2	ดี	–	Light Yellowish Brown	Grayish Yellow
	ISP3	ปานกลาง	White	Light Yellowish Brown	Light Grayish Yellowish Brown
	ISP4	ปานกลาง	Light Gray	Pale Yellow	–
	ISP5	ดีมาก	Light Gray	Grayish Yellow	Pale Yellow
	ISP6	ดี	–	Dark Grayish Olive	Grayish Olive
	ISP7	ดีมาก	White	Grayish Olive	Light Grayish Olive
	Glu.A.	ดี	–	Pale Greenish Yellow	–
	Cz.sucrose	น้อย	–	Grayish Greenish Yellow	–
	N.A.	ปานกลาง	Yellowish Gray	Grayish Greenish Yellow	–
AG4-1	ISP2	ดีมาก	Medium Gray	Grayish Greenish Yellow	–
	ISP3	ดีมาก	Medium Gray	Pale Greenish Yellow	–
	ISP4	ปานกลาง	Medium Gray	Pale Greenish Yellow	–
	ISP5	ดี	Light Gray	Pale Yellow	–
	ISP6	ดี	Light Grayish Olive	Olive Gray	–
	ISP7	ดี	Light Gray	Pale Greenish Yellow	–
	Glu.A.	ปานกลาง	–	Pale Greenish Yellow	–
	Cz.sucrose	น้อย	White	Yellowish Gray	–
	N.A.	ปานกลาง	White	Grayish Greenish Yellow	–

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
AG5-1	ISP2	ดี	Purplish Gray	Grayish Greenish Yellow	–
	ISP3	ปานกลาง	Light Olive Gray	Grayish Greenish Yellow	–
	ISP4	ปานกลาง	Light Olive Gray	Grayish Greenish Yellow	–
	ISP5	ดี	Purplish Gray	Yellowish White	–
	ISP6	ปานกลาง	White	Grayish Greenish Yellow	–
	ISP7	ดีมาก	Purplish Gray	Light Greenish Gray	–
	Glu.A.	น้อย	White	Yellowish White	–
	Cz.sucrose	น้อย	White	Yellowish White	–
	N.A.	ปานกลาง	Purplish Gray	Grayish Greenish Yellow	–
AG6-1	ISP2	ดีมาก	White	Grayish Greenish Yellow	–
	ISP3	ดีมาก	Greenish Gray	Grayish Yellow	–
	ISP4	ดี	White	Grayish Greenish Yellow	–
	ISP5	ดี	Yellowish White	Grayish Greenish Yellow	–
	ISP6	ปานกลาง	Light Olive Gray	Yellowish Gray	–
	ISP7	ดี	Greenish Gray	Light Olive Gray	Grayish Greenish Yellow
	Glu.A.	น้อย	White	Light Greenish Gray	–
	Cz.sucrose	น้อย	Greenish Gray	Light Greenish Gray	–
	N.A.	ปานกลาง	White	Grayish Greenish Yellow	–
PR2-6	ISP2	ดีมาก	White	Vivid Yellow	Pale Yellow
	ISP3	ดีมาก	Light Greenish Gray	Grayish Greenish Yellow	–
	ISP4	ดี	Pale Blue	Brilliant Yellow	–
	ISP5	ดี	Yellowish White	Brilliant Greenish Yellow	–
	ISP6	ดี	–	Light Olive	Light Grayish Olive
	ISP7	ดี	White	Grayish Greenish Yellow	–
	Glu.A.	ปานกลาง	–	Pale Greenish Yellow	–
	Cz.sucrose	ปานกลาง	Yellowish White	Yellowish White	–
	N.A.	ปานกลาง	White	Grayish Greenish Yellow	Pale Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อตัวแทนกลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
BR3-1	ISP2	ดี	–	Deep Orange	Strong Reddish Orange
	ISP3	ดี	–	Grayish Brown	–
	ISP4	น้อย	–	Pale Orange Yellow	–
	ISP5	น้อย	–	Pale Orange Yellow	–
	ISP6	ปานกลาง	–	Dark Orange Yellow	–
	ISP7	น้อย	–	Light Orange Yellow	–
	Glu.A.	น้อย	–	Pale Orange Yellow	–
	Cz.sucrose	น้อย	–	Pale Orange Yellow	–
	N.A.	ปานกลาง	–	Brilliant Orange Yellow	–
KE1-1	ISP2	ดี	–	Pale Yellow	–
	ISP3	ดี	–	Brilliant Orange Yellow	–
	ISP4	ดี	–	Vivid Yellow	–
	ISP5	น้อย	–	Pale Orange Yellow	–
	ISP6	ดี	–	Light Grayish Brown	–
	ISP7	ปานกลาง	–	Dark Yellow	–
	Glu.A.	น้อย	–	Light Yellow	–
	Cz.sucrose	น้อย	–	Moderate Greenish Yellow	–
	N.A.	ดี	–	Dark Yellow	–

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)										พีเอช							อุณหภูมิ (° C)							Skim milk		Starch hydrolysis	Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	4	5	6	7	8	9	10	20	25	30	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*E.coli*	*S.aureus*	*B.subtilis*	*Ps.aeruginosa*	*M.luteus*	*C.albicans*	MRSA	VRE
1	AG2-1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-12	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-13	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-14	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG2-15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)										พีเอช							อุณหภูมิ (° C)							Skim milk		Starch hydrolysis	liquefactio	Nitrate reduction	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	4	5	6	7	8	9	10	20	25	30	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*E.coli*	*S.aureus*	*B.subtilis*	*Ps.aeruginosa*	*M.luteus*	*C.albicans*	MRSA	VRE
2	AG3-1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-9	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-11	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-13	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-14	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+		-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG3-15	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)										พีเอช							อุณหภูมิ (° C)							Skim milk		Starch hydrolysis	Nitrate liquefactio	Nitrate reduction	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	4	5	6	7	8	9	10	20	25	30	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*E.coli*	*S.aureus*	*B.subtilis*	*Ps.aeruginusa*	*M.luteus*	*C.albicans*	MRSA	VRE
3	AG4-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+		-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG4-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)										พีเอช							อุณหภูมิ (° C)							Skim milk		Starch hydrolysis	liquefactio	Nitrate reduction	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	4	5	6	7	8	9	10	20	25	30	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*E.coli*	*S.aureus*	*B.subtilis*	*Ps.aeruginosa*	*M.luteus*	*C.albicans*	MRSA	VRE
4	AG5-1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-11	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-12	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-13	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-14	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-15	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)										พีเอช							อุณหภูมิ (° C)							Skim milk		Starch hydrolysis	liquefactio	Nitrate reduction	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	4	5	6	7	8	9	10	20	25	30	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*E.coli*	*S.aureus*	*B.subtilis*	*Ps.aeruginosa*	*M.luteus*	*C.albicans*	MRSA	VRE
4	AG5-16	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-17	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-18	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-19	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-20	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-21	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-22	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-23	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-24	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-25	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-26	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-27	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-28	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-29	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	AG5-30	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)										พีเอช							อุณหภูมิ (° C)							Skim milk		Starch hydrolysis	liquefactio	Nitrate reduction	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	4	5	6	7	8	9	10	20	25	30	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*E.coli*	*S.aureus*	*B.subtilis*	*Ps.aeruginosa*	*M.luteus*	*C.albicans*	MRSA	VRE
5	AG6-1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-9	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-11	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-13	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
	AG6-14	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
	AG6-15	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)										พีเอช							อุณหภูมิ (° C)							Skim milk		Starch hydrolysis	Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	4	5	6	7	8	9	10	20	25	30	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*E.coli*	*S.aureus*	*B.subtilis*	*Ps.aeruginosa*	*M.luteus*	*C.albicans*	MRSA	VRE
6	PR2-1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	PR2-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	PR2-3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	PR2-4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	PR2-5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	PR2-6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	PR2-7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
	PR2-8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)										พีเอช							อุณหภูมิ (° C)							Skim milk		Starch hydrolysis	Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	4	5	6	7	8	9	10	20	25	30	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*E.coli*	*S.aureus*	*B.subtilis*	*Ps.aeruginosa*	*M.luteus*	*C.albicans*	MRSA	VRE
7	BR3-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	KE1-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+

4.2 การตรวจสอบและการศึกษาความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ในเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

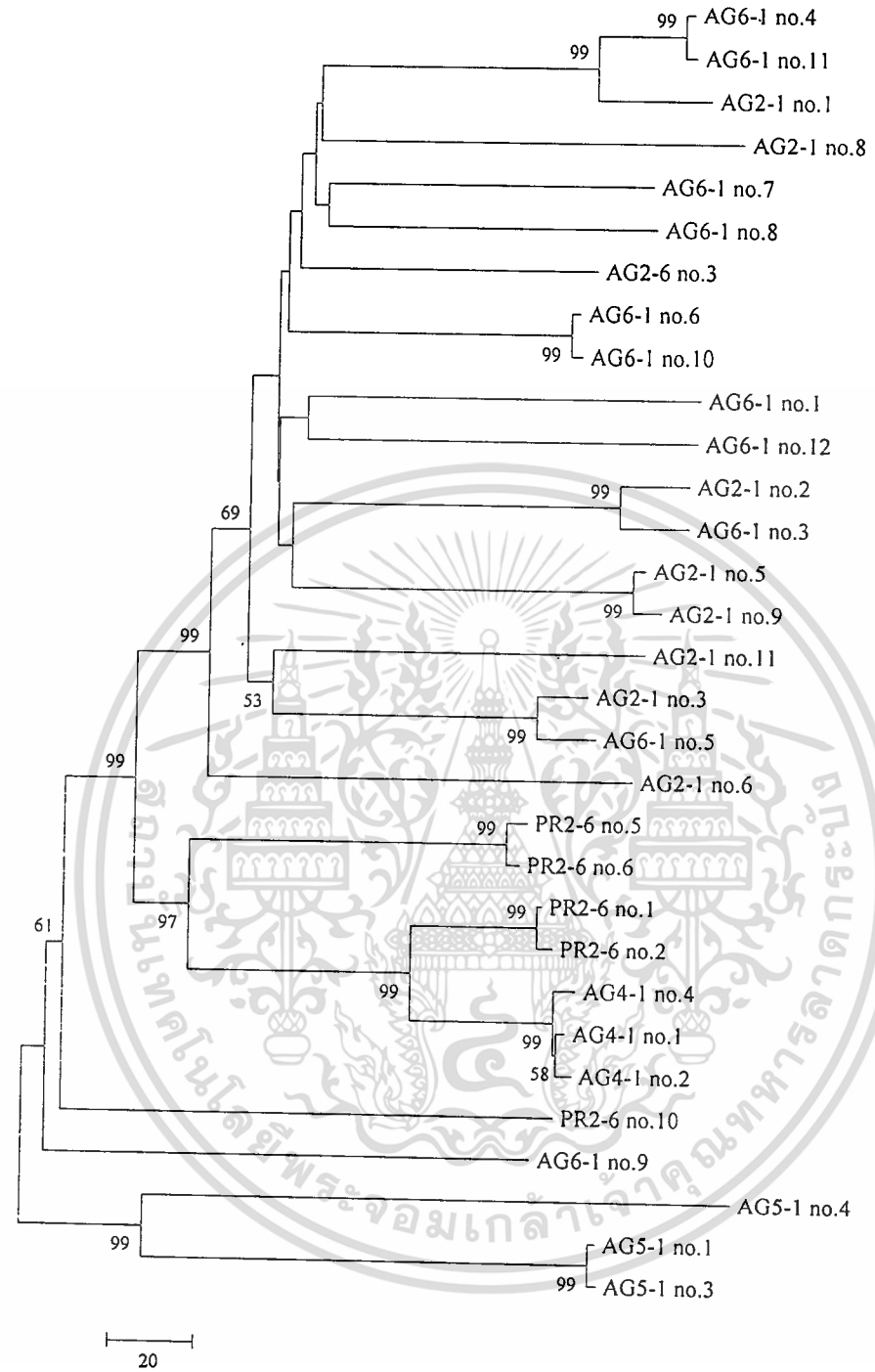
จากการตรวจสอบยีนที่สร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ (polyketide synthase ; PKS) ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ PKSI, PKSII และ PKSIII โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) พบว่าสามารถตรวจสอบพบ ยีน PKSI ในเชื้อจำนวน 6 กลุ่ม จาก 8 กลุ่ม แต่ตรวจสอบไม่พบยีน PKSII และ PKSIII ในเชื้อกลุ่มใดเลย ซึ่งผลแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบยีนที่สร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ (PKS) ชนิดต่างๆ

รหัสตัวอย่าง	PKS I	PKS II	PKS III
AG2-1	+	-	-
AG3-1	-	-	-
AG4-1	+	-	-
AG5-1	+	-	-
AG6-1	+	-	-
PR2-6	+	-	-
BR3-1	-	-	-
KE1-1	+	-	-

ทำการโคลนยีน PKSI ที่ตรวจพบในเชื้อที่แยกได้จากข่า จำนวน 5 กลุ่ม ได้แก่เชื้อไอโซเลต AG2-1, AG4-1, AG5-1, AG6-1 และ PR2-6 และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequicing) ของยีนที่โคลนได้ รวมทั้งหาความหลากหลายของยีน โดยการทำ Phylogenetic tree ได้ผลดังแสดงในภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ของยีน PKSI จากเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลต phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

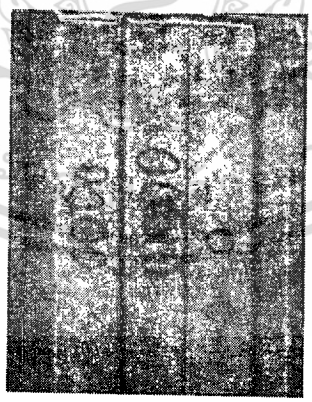
4.4 การทดสอบฤทธิ์ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากเชื้อแอคติโนมัยที่แยกได้จากต้นข่า กระชาย และว่านนกคุ้ม พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิล อะซีเตต (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของเชื้อจำนวน 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 5 กลุ่มที่ 6 และกลุ่มที่ 8 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 และ vancomycin resistance *Enterococcus fecium* ATCC 51559 ได้ ดังตาราง

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ

รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)							
	E. coli	*S. aureus*	*B. subtilis*	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*C. albicans*	MRSA	VRE
AG2-1	-	10	12	-	11	-	10	14
AG3-1	-	-	-	-	-	-	-	-
AG4-1	-	-	-	-	-	-	-	-
AG5-1	-	-	-	-	-	-	-	-
AG6-1	-	16	20	-	25	-	17	18
PR2-6	-	8	8	-	12	-	14	10
BR3-1	-	-	-	-	-	-	-	-
KE1-1	-	9	10	-	16	-	14	10

4.5 การแยกและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

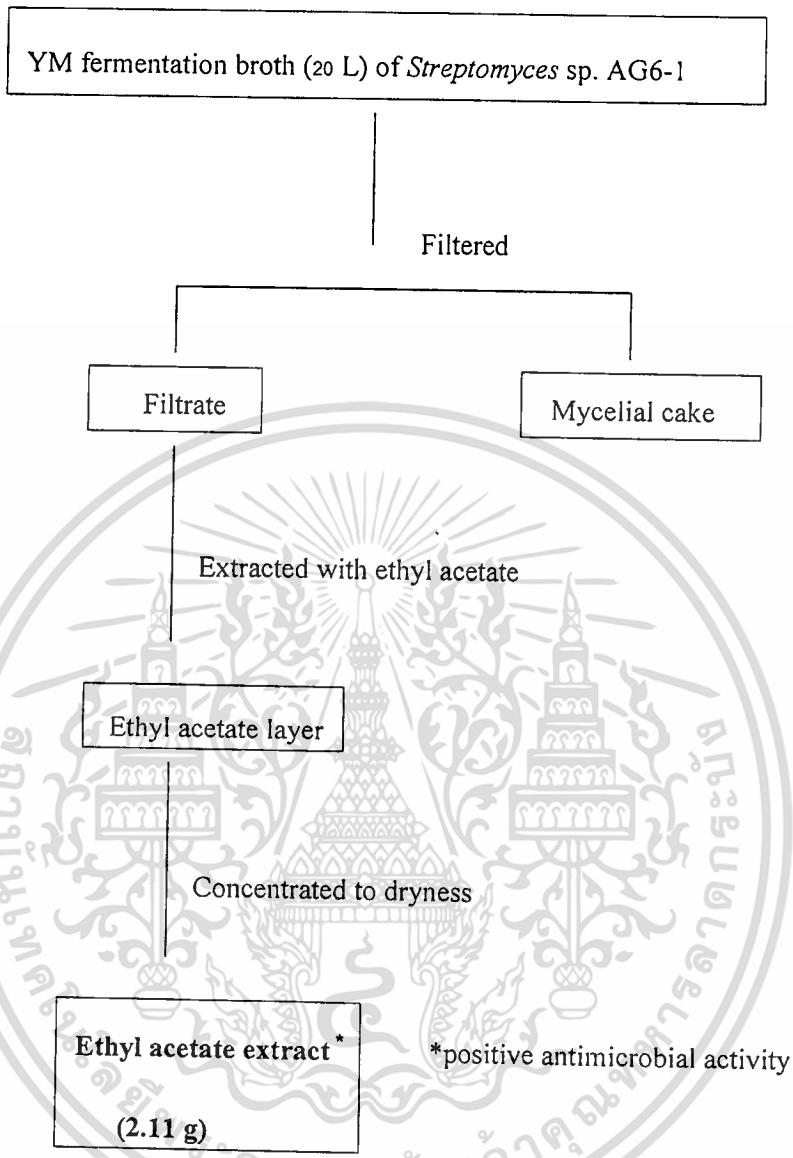


รูปที่ 18 TLC chromatogram of crude extract of AG6-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

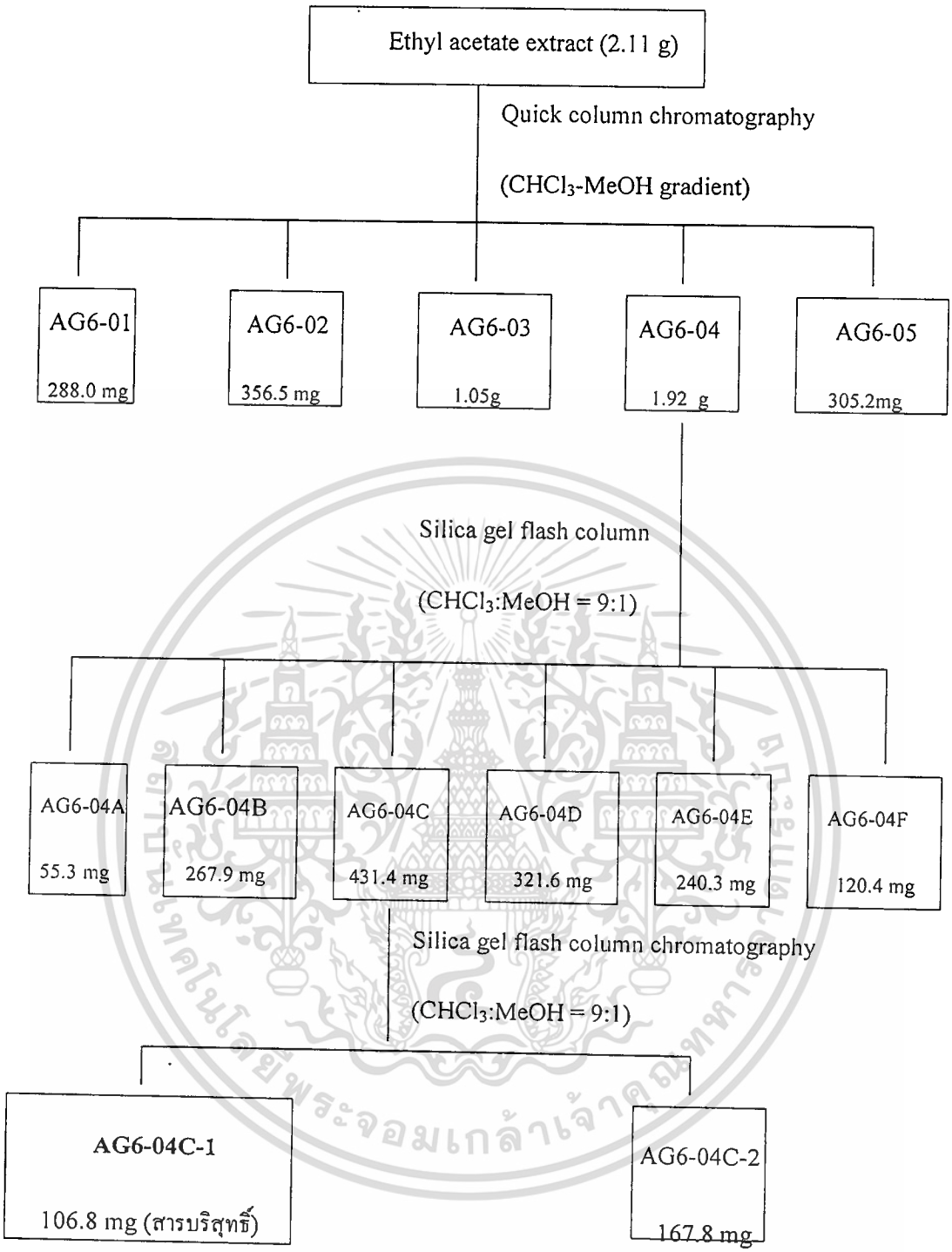
จากเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด 100 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 5 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี จึงเลือกเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract-Malt extract บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 20 ลิตร และนำน้ำหมักเชื้อมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อตัวแทนกลุ่ม 5 ปริมาณ 2.11 กรัม ได้ทำการแบ่งสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์พบว่าสารสกัดแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี จึงได้นำมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคแฟลสคอลั่มโครมาโตกราฟีโดยใช้ Silica gel 60 ขนาดอนุภาค 0.063-0.2 nm เป็นเฟสคงที่ และใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารบริสุทธิ์ AG6-04C-1 ปริมาณ 106.8 มิลลิกรัม จากนั้นได้ทำการนำสาร AG6-04C-1 มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า สารบริสุทธิ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 19 ขั้นตอนการสกัดสารจากน้ำหมักของเชื้อ *Streptomyces* sp. AG6-1

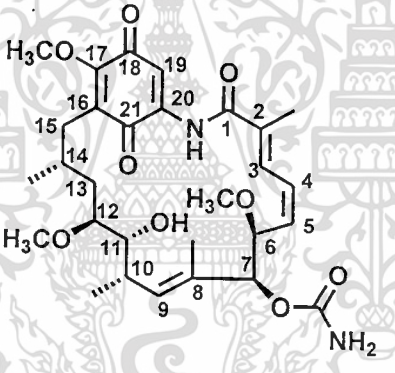
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อ *Streptomyces* sp. AG6-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร AG6-04C-1มีลักษณะเป็นผงสีส้มอมเหลือง เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย ESI-TOF mass ปรากฏ pseudomolecular ion peak ที่ m/z 583.2667 $(M+Na)^+$ ซึ่งสามารถระบุสูตรโมเลกุลได้เป็น $C_{29}H_{40}N_2O_9Na$ จากข้อมูลของ IR absorption spectrum แสดงข้อมูลของ 3,450 cm^{-1} (O-H stretching), 1,689 cm^{-1} (C=O stretching) and 1,649 cm^{-1} (C=O stretching, amide I band) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารนี้ด้วยเทคนิค NMR พบว่า ข้อมูลทาง ^1H NMR แสดงให้ทราบว่า สาร AG6-04C-1ประกอบไปด้วย 4 methyl protons, 3 methoxy protons, 2 methylene protons, 11 methine protons และ 3 exchangeable protons ข้อมูลทาง ^{13}C NMR สรุปได้ว่าสารนี้ประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอนจำนวน 29 อะตอม จากข้อมูลของ DEPT135 และ HMQC สามารถระบุชนิดของคาร์บอนของสาร AG6-04C-1ได้ว่า สารนี้ประกอบด้วย 4 methyl carbons, 3 methoxy carbons, 2 methylene carbons, 11 methine carbons และ 9 quaternary carbons นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของ^{13}C NMR พบว่าสารนี้แสดงสัญญาณของ 2 quinone carbonyl carbons, 1 amide carbonyl carbon และ 1 carbamate carbon จากการเปรียบเทียบข้อมูลในฐานข้อมูลสามารถระบุเอกลักษณ์ของสารนี้ได้เป็น สารเจลดานามัยซิน (ตารางที่ 7)



รูปที่ 21 แสดงลักษณะโครงสร้างของสาร AG6-04C-1

จากการนำสาร AG6-04C-1 มาทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าสารนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Candida albicans* ATCC10231 ที่ระดับความเข้มข้นน้อยที่สุด (MIC) ต่อการเจริญที่ 1, <0.03, 0.5, 4 และ 16 $\mu g\ ml^{-1}$ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบข้อมูลของ ^{1}H and ^{13}C-NMR ระหว่างสาร AG6-04C-1 และสารเจลดานามัยซิน

Position	AG6-04C-1[a]		Geldanamycin	
	δ_c (ppm)	δ_H (ppm), mult, (*J* in Hz)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm), mult[c]
1	167.91	-	169.1	-
2	134.56	-	133.2	-
2-Me	12.5	1.89, 3H, s	12.2	1.91, 3H
3	126.89	6.89, d, (12)	128.4	6.95, d
4	126.11	6.53, t, (12, 11)	125.7	6.56, t
5	136.2	5.83, t, (11, 10)	137.8	5.80, t
6	81.23	4.25, d, (10)	81.6	4.34, d
6-OMe	57.3	3.25, 3H, s	56	3.22, 3H, s*
7	81.62	5.14, brs	80.6	4.86, brs
7-OCONH$_2$	155.75	4.80, NH$_2$, brs	156	6.45, NH$_2$, brs
8	133.1	-	132.6	-
8-Me	13	1.75, 3H, s	12.5	1.61, 3H, brs
9	132.94	5.77, d, (10)	131.9	5.51, d
10	32.26	2.73, m	32.1	3.61
10-Me	12.66	0.93, 3H, d, (7)	23.3	0.97, 3H, d[r]
11	72.6	3.48, m	71.9	3.29**
11-OH	-	3.01, OH, brs	-	-
12	80.91	3.35, m	80.2	3.07**
12-OMe	56.75	3.31, 3H, s	56.5	3.23, 3 H, s*
13	34.74	1.73, 2H, m	31	1.45, 2H, brs
14	27.97	1.63, brs	26.6	1.91
14-Me	23.04	0.92, 3H, d (6)	13	0.76, 3H[r]
15	32.83	2.41, 2H, m	31.7	2.42, 2H, m
16	127.39	-	128.1	2.42, m
17	156.73	-	156.4	-
17-OMe	61.68	4.08, 3H, s	61	3.93, 3H, s
18	183.85	-	183.6	-
19	111.6	7.22, s	110.9	7.02, s
20	137.84	-	139.6	-
21	184.68	-	183.1	-
NH	-	8.67, NH, brs	-	9.14, NH, brs

[a]observed in CDCl3 and recorded at 300 MHz (1H) and 75 MHz (13C).

[b]observed in DMSO-*d6* (Omura *et al.*, 1979)

[c]observed in DMSO-*d6* (Rinehart, Jr. And Shield, 1976)

*,**,# interchangeable signals

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างต้นขมิ้น หน่อกะลา ไพล เปราะป่า สามารถทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลต และได้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อพบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้นั้นสามารถเจริญได้ดีในอาหาร yeast extract malt extract agar และสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ในโทนสีเหลือง ส้ม และน้ำตาล สร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ในโทนสีขาว และสีเทา แต่มีบางกลุ่มไม่สร้างเส้นใยอากาศ ลักษณะของสปอร์ที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายของภาพ 400 เท่า มีลักษณะต่อกันเป็นสาย บางกลุ่มบิดเป็นเกลียว บางกลุ่มโค้งงอเป็นรูปตะขอ บางกลุ่มเป็นเส้นตรง และเชื้อบางกลุ่มยังสามารถสร้างโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่าโกลโบสบอดี้ได้ ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทออกเป็น 8 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวอมเทา สร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมเขียว ไม่สร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์ที่มีลักษณะบิดเป็นเกลียว พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces iranensis* HM 35^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.79

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมเหลือง สร้างเส้นใยอากาศสีขาว สร้างรงควัตถุสีเหลืองอมเทา สร้างสปอร์ที่มีลักษณะบิดเป็นเกลียว พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces graminisoli* JR-19^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.58

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวอมเทา สร้างเส้นใยอากาศสีเทา ไม่สร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์ที่มีลักษณะบิดเป็นเกลียว พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces neopeptinius* KNF 2047^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.06

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวอมเทา สร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมม่วง ไม่สร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์ที่เรียงต่อกันเป็นสายสั้นๆ และตรงปลายหักงอเป็นรูปตะขอ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces misionensis* NBRC 13063^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.86

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเขียวอมเทา สร้างเส้นใยอากาศสีขาว ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์ที่มีลักษณะบิดเป็นเกลียว พบว่ามีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คล้ายคลึงกับ *Streptomyces iranensis* HM 35^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.65

กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองสด สร้างเส้นใยอากาศสีขาว สร้างรงควัตถุสีเหลืองอ่อน สร้างสปอร์ที่มีลักษณะบิดเป็นเกลียว พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces bungoensis* NBRC 15711^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.86

กลุ่มที่ 7 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มเข้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างรงควัตถุสีส้มอมแดง สร้างสปอร์เรียงต่อกันเป็นสายยาวอยู่บนก้านชูสปอร์ที่มีขนาดสั้น ซึ่งชูขึ้นมาจากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Asanoa ishikariensis* IMSNU 22004^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของ นิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.39 และพบว่าเชื้อนี้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Asanoa* และได้ตีพิมพ์ลงในวารสาร IJSEM ในชื่อ *Asanoa endophytica* sp. nov.

กลุ่มที่ 8 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน ไม่สร้างเส้นใยอากาศ และไม่สร้างรงควัตถุ สร้างโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่าโกลโบส บอดี้ ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปกลม พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Dactylosporangium sucinum* RY35-23^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิว คลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.72

จากการตรวจสอบยีนที่สร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ (polyketide synthase ; PKS) ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ PKSI, PKSII และ PKSIII โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) พบว่าสามารถตรวจสอบพบ ยีน PKSI ในเชื้อจำนวน 6 กลุ่ม จาก 8 กลุ่ม แต่ตรวจสอบไม่พบยีน PKSII และ PKSIII ในเชื้อกลุ่มใดเลย

การศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5 ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดีพบว่า เชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5 สามารถผลิตสารเจลดานามัยซิน (geldanamycin) ได้ จากงานวิจัยนี้ทำให้เห็นความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยสีทจากเนื้อเยื่อต้นขมิ้น หน่อกะลา ไพล เปราะป่า ถือเป็นทรัพยากรที่สำคัญและสามารถนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาได้ต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยครั้งนี้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถสร้างสารทุติยภูมิในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้เป็นอย่างดี จึงควรมีการวิจัยต่อเพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเหล่านี้ถึงระดับสกุลและสปีชีส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Bacon, C.W. and White, J.F. 2000. **Microbial endophytes.** Marcel Dekker Inc., New York.

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.

Brunner, F. and Petrini, O. 1992. "Taxonomics studies of *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isozymeeletrophoresis." **Mycological Research.** 96 : 723-733.

Caffrey, P. 2003. Conserved amino acid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases. **Chembiochem.** 4 : 654–657.

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.

Coyne, M.S. 1999. **Soil micrology : An exploratory approach delmar.** An International Thomson Publishing. USA.

Dimarco, A., G. Cassinelli and F. Arcamone. 1981. The discovery of duanorubicin. **Cancer Treatment Rep.** 65: 3-8.

Duangmal, K., Mingma, R., Pathom-aree, W., Thamchaipenet, A., Inahashi, Y., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2011. *Amycolatopsis samaneae* sp. nov., isolated from roots of *Samanea saman* (Jacq.) Merr. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61, 951-955.

Duangmal, K., Thamchaipenet, A., Ara, I., Matsumoto, A. and Takahashi. Y. 2008. *Kineococcus gynurae* sp. nov., isolated from a Thai medicinal plant. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58 : 2439–2442.

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.

Hazen, E.L. and R. Brown. 1951. Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. **Proc. Soc. Exp. Biol.** 76 : 93.

Hopwood, D.A. and Sherman, D.H. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. **Annu Rev Genet.** 24 : 37–66.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 17 : 3702–3705.

Inahashi, Y., Matsumoto, A., Õmura, S. and Takahashi, Y. 2011. *Streptosporangium oxazolinicum* sp. nov., a novel endophytic actinomycete producing new antitrypanosomal antibiotics, spoxazomicins. J. antibiot. 64, 297-302.

Indananda, C., Matsumoto, A., Inahashi, Y.,Takahashi, Y., Duangmal, K.and Thamchaipenet, A. 2010. *Actinophytocola oryzae* gen. nov., sp. nov., isolated from the roots of Thai glutinous rice plants, a new member of the family *Pseudonocardiaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 1141-1146.

Indananda, C., Thamchaipenet, A., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Duangmal, K. and Takahashi, Y. 2011. *Actinoallomurus oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from roots of a Thai jasmine rice plant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 61, 737-741.

Kaewkla, O. and Franco, C. M. M. 2010. *Pseudonocardia adelaidensis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of a grey box tree (*Eucalyptus microcarpa*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61, 105-109.

Kirby, B. M. and Meyers, P. R.. 2010. *Micromonospora tulbaghiae* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 1328-1333.

Ikeda, H., T. Nonomiya, M. Usami, T. Ohta and S. Omura. 1999. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 96: 9509-9514.

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.

Li, J., Zhao, G. Z., Chena, H. H., Qin, S., Xu, L. H., Jiang, C. L. and Li, W. J. 2008. *Rhodococcus cercidiphylli* sp. nov., a new endophytic actinobacterium isolated from a *Cercidiphyllum japonicum* leaf. Syst Appl Microbiol. 31, 108–113.

Liu, N., Wang, H., Liu, M., Gu, Q., Zheng, W., and Huang, Y. 2009. *Streptomyces alni* sp. nov., a daidzein-producing endophyte isolated from a root of *Alnus nepalensis* D. Don. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 254-258.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J-S. Senthilkumar, M., Lee, K. C. and Sundaram, S. 2010. *Leifsonia soli* sp. nov., a yellow-pigmented actinobacterium isolated from teak rhizosphere soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 1322-1327.

Melino, M.R. and N.H. Sigal. 1990. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. **J. Immunol.** 144: 251-258.

Miyadoh, S. 1997. **Atlas of Actinomycetes.** The Society for Actinomycetes Japan. Asakura Publishing.

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*. Syst Appl Microbiol. 31, 352-357.

Rahman, A. 2000. Bioactive natural products (part D) volume 23 : Studies in natural products chemistry. **Elsevier.**

Simpson, T.J. 1995. Polyketide biosynthesis. **Chem. Ind.** 11: 407-411.

Song, G. C., Yasir, M., Bibi, F., Chung, E. J., Jeon, C. O. and Chung, Y. R. 2011. *Nocardioides caricicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from a halophyte, *Carex scabrifolia* Steud. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61, 105-109.

Strobel, G. and Daisy, B. 2003. "Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products." **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 67 : 491–502.

Tadtong, S., Meksuriyen, D., Tanasupawat, S., Isobe, M., and Suwanborirux, K. 2007. Geldanamycin Derivatives and Neuroprotective Effect on Cultured P19-derived Neurons. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17(10): 2939-2943.

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. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 554–559

Valois, D., Fayad, K., Barasubiye, T., Garon, M., Dery, C., Brzezinski, R. and Beaulieu, C. 1996. "Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. rubi, the causal agent of raspberry root rot. **Applied environ microbiol.** 62 : 1630-1635.

Weber, J.M., C.K. Wierman and C.R. Hutchinson. 1985. Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythraea*. **J. Bacteriol.** 164: 425-433.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลผลิตจากงานวิจัย (Output)

บทความวิจัย

1. Nantawan Niemhom, Chanikul Chutrakul, Chanwit Suriyachadkun, and Chitti Thawai. 2015. *Asanoa endophytica sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the rhizome of Boesenbergia rotunda*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (Accepted) (Impact factor = 2.55)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Asanoa endophytica sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the rhizome of Boesenbergia rotunda

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	IJSEM-D-15-00850R1
Full Title:	Asanoa endophytica sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the rhizome of Boesenbergia rotunda
Short Title:	Asanoa endophytica sp. nov.
Article Type:	Note
Section/Category:	New taxa - Actinobacteria
Keywords:	Asanoa; Micromonosporaceae; endophytic actinomycete; Boesenbergia rotunda

Corresponding Author:	Chitti Thawai, Asst. Prof. Dr. King Mongkuts Institute of Technology Ladkrabang Bangkok, THAILAND
First Author:	Nantawan Niemhom
Order of Authors:	Nantawan Niemhom Chanikul Chutrakul Chanwit Suriyachadkun Chitti Thawai, Asst. Prof. Dr.
Manuscript Region of Origin:	THAILAND

Abstract:

A novel Gram-stain-positive, non motile endophytic actinomycete, designated strain BR3-1T, which produced spore chains borne on the tip of short sporophores was isolated from the rhizome of Boesenbergia rotunda collected from Udon Thani province, Thailand. This strain was investigated for its taxonomic position using polyphasic approach. The strain contained 3-hydroxy-diaminopimelic acid and meso-diaminopimelic acid in the cell-wall peptidoglycan. The whole-cell sugars contained glucose, mannose, rhamnose, ribose and xylose. Phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol mannosides were found as the characteristic phospholipids. The predominant menaquinones were MK-10(H8) and MK-10(H6). The major cellular fatty acids were iso-C16:0, iso-C15:0 and anteiso-C15:0. The G+C content of the genomic DNA was 71.4 mol%. On the basis of 16S rRNA gene sequences analysis revealed that strain BR3-1T belonged to the genus Asanoa and was most closely related to Asanoa ishikariensis (99.39%), Asanoa iriomotensis (99.31%), Asanoa siamensis (99.17%), Asanoa ferruginea (98.84%) and Asanoa hainanensis (98.71%). The DNA-DNA relatedness value between the strain BR3-1T and its phylogenetically closest relatives were in the range of 15.4% ± 1.2 to 45.8% ± 2.6. In addition, some physiological and biochemical properties indicated that strain BR3-1T could be readily distinguished from all type strains in the genus Asanoa. Thus, strain BR3-1T should be represented as a novel species, for which the name Asanoa endophytica sp. nov. is proposed. The type strain is BR3-1T (=BCC 66355T =NBRC 110002T).

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Revised manuscript of Asanoa endophytica sp. nov. Including References (Word document)
Click here to download Manuscript Including References (Word document) renamed_b39fa.doc

Asanoa endophytica sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the rhizome of *Boesenbergia rotunda*

Nantawan Niemhom,[1] Chanikul Chutrakul,[2] Chanwit Suriyachadkun,[3] and Chitti Thawai[1,4]

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

[2] Bioassay Laboratory, Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Thailand Science Park, Thanon Phahonyothin, Tambon Khlong Nueng, Amphoe Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

[3]BIOTEC Culture Collection, Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Thailand Science Park, Thanon Phahonyothin, Tambon Khlong Nueng, Amphoe Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

[4]Actinobacterial Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

Running title: *Asanoa endophytica* sp. nov.

Subject category: New taxa - Actinobacteria

Correspondence

Chitti Thawai

ktchitti@kmitl.ac.th

The DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain BR3-1^T is LC032127.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A novel Gram-stain-positive, non motile endophytic actinomycete, designated strain BR3-1^T, which produced spore chains borne on the tip of short sporophores was isolated from the rhizome of *Boesenbergia rotunda* collected from Udon Thani province, Thailand. This strain was investigated for its taxonomic position using polyphasic approach. The strain contained 3-hydroxy-diaminopimelic acid and *meso*-diaminopimelic acid in the cell-wall peptidoglycan. The whole-cell sugars contained glucose, mannose, rhamnose, ribose and xylose. Phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol mannosides were found as the characteristic phospholipids. The predominant menaquinones were MK-10(H_8) and MK-10(H_6). The major cellular fatty acids were iso-$C_{16:0}$, iso-$C_{15:0}$ and anteiso-$C_{15:0}$. The G+C content of the genomic DNA was 71.4 mol%. On the basis of 16S rRNA gene sequences analysis revealed that strain BR3-1^T belonged to the genus *Asanoa* and was most closely related to *Asanoa ishikariensis* (99.39%), *Asanoa iriomotensis* (99.31%), *Asanoa siamensis* (99.17%), *Asanoa ferruginea* (98.84%) and *Asanoa hainanensis* (98.71%). The DNA–DNA relatedness value between the strain BR3-1^T and its phylogenetically closest relatives were in the range of 15.4% ± 1.2 to 45.8% ± 2.6. In addition, some physiological and biochemical properties indicated that strain BR3-1^T could be readily distinguished from all type strains in the genus *Asanoa*. Thus, strain BR3-1^T should be represented as a novel species, for which the name *Asanoa endophytica* sp. nov. is proposed. The type strain is BR3-1^T (=BCC 66355^T =NBRC 110002^T).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The genus *Asanoa* (Lee & Hah, 2002) belongs to the family *Micromonosporaceae*. The type species is *Asanoa ferruginea*. Members of this genus usually form spore chains borne on the tip of short sporophores from the agar surface. This genus exhibited the main chemotaxonomic characteristics such as *meso*-diaminopimelic acid and 3-OH diaminopimelic acid in the cell wall, MK-10 (H_6, H_8) as the predominant menaquinones, the diagnostic fatty acid type 2d (Kroppenstedt, 1985) and phosphatidylethanolamine is the diagnostic phospholipid in the membrane. In the present time, the genus *Asanoa* contained five species: *Asanoa ferruginea* (basonym *Catellatospora ferruginea*; Asano & Kawamoto, 1986) *Asanoa ishikariensis* (formerly *Catellatospora ishikariense*; Lee & Hah, 2002), *Asanoa iriomotensis*, *Asanoa hainanensis* and *Asanoa siamensis*. The members of this genus normally distributed in the various soils i.e. mangrove soil, peat swamp forest soil and rhizosphere soil (Tamura & Sakane, 2005; Xu *et al.*, 2011; Niemhom *et al.*, 2013). In this paper, we describe the polyphasic characterization of strain BR3-1^T which isolated from the rhizome tissue of *Boesenbergia rotunda* and describe it as a novel species of the genus *Asanoa*.

Strain BR3-1^T was isolated from the rhizome of *Boesenbergia rotunda* collected from Udon Thani Province, Thailand. The healthy rhizome sample of this plant was washed in tap water until without the soil debris. Then, the rhizome was cut into small pieces. After cutting, the tissue of rhizome was washed in sterile 0.1% tween 20 in water for 30 sec followed by washing twice in sterile distilled water. The sample was then surface-sterilized with 95% ethanol for 13 min and subsequently with 1% sodium hypochlorite for 13 min and then washed in sterile distilled water for three times. Finally, the surface-sterilized rhizome tissue was ground with sterile distilled water in the sterile mortar and pestle after that the suspension was spread on starch casein agar (SCA) [10 g soluble starch, 2 g KNO_3, 0.3 g casein, 2 g K_2HPO_4, 0.05 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

70 $MgSO_4.7H_2O$, 2 g NaCl, 0.02 g $CaCO_3$, 0.01 g $FeSO_4.7H_2O$, 15 g agar, 1000 ml
71 distilled water, pH: 7.0] supplemented with 25 mg l^{-1} nalidixic acid, 50 mg l^{-1} nystatin
72 and 1 mg l^{-1} terbinafin and incubated at 30°C for 30 days. The final washing water
73 was spread on SCA as the control plates. The colony was transferred and purified on
74 yeast extract-malt extract agar [(International *Streptomyces* Project, ISP 2 medium);
75 Shirling & Gottlieb, 1966] and was preserved by freezing at -80 °C and freeze-drying.
76
77 Morphological characteristics of strain BR3-1^T grown on modified soil extract agar
78 (Suriyachadkun *et al.*, 2009) were observed using light and scanning electron
79 microscopy (model JSM-5410 LV; JEOL). The preparation of scanning electron
80 microscopic sample was followed as described previously (Thawai *et al.*, 2005).
81
82 The phenotypic characteristics were examined by using several standard methods.
83 Cultural characteristics were performed using 14 day cultures grown at 30°C on
84 various agar media. The ISCC–NBS Colour Charts standard was used for colour
85 determining (Kelly, 1964). The effect of temperature for growth (15- 50°C) was tested
86 on yeast extract-malt extract agar for 14 days. The NaCl tolerances (0-5%w/v) were
87 examined on ISP 2 medium at 30 °C for 14 days. The pH range for growth (pH 4.5–
88 10.5 at intervals of 0.5 pH units) was determined in ISP2 broth. The ISP 9 medium
89 (Shirling & Gottlieb, 1966) supplemented with a final concentration of 1% of the
90 carbon sources was used for testing of carbon source utilization. The peptonization
91 and coagulation of milk, gelatin liquefaction, hydrolysis of starch and nitrate
92 reduction were tested through cultivation on various standard media as described by
93 Arai (1975) and Williams & Cross (1971). The results are given in detail in the
94 species description and Table 1.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Biomass for use in chemotaxonomic determination was obtained from cultures grown in yeast extract-glucose broth on a rotary shaker (200 rpm) at 30 °C for 5 days. The isomer of peptidoglycan in cell wall was analyzed as described previously (Kawamoto *et al.*, 1981), and the amino acid composition was determined by thin layer chromatography (TLC) followed by the method of Lechevalier & Lechevalier, 1980. Acyl group of muramic acid was analysed as described by Uchida & Aida (1984). The type of sugars in whole-cell hydrolysates were examined by method of Komagata & Suzuki (1987). The type of membrane phospholipids were performed as described previously (Minnikin *et al.*, 1984). Fatty acid in cell was extracted following the method of Sasser, 1990 and was determined by GLC according to the instructions of the Microbial Identification System (MIDI) Sherlock version 6.2B (Kämpfer & Kroppenstedt, 1996) with the TSBA6 MIDI database. Mycolic acids were done using the method of Minnikin *et al.* (1975). Menaquinones in cell were extracted by the method of Collins *et al.* (1977) and were analyzed by HPLC equipped with a Cosmosil $5C_{18}$ column (4.6 × 150 mm; Nacalai Tesque). A mixture of methanol and 2-propanol (2:1, v/v) was used as the elution solvent.

Extraction of genomic DNA was done according to the method of Tamaoka (1994). The G+C content of the DNA was determined using the HPLC method of Tamaoka & Komagata (1984). Lambda DNA (Invitrogen, USA) was used as the standard. DNA–DNA hybridization was conducted in microdilution-well plates, as reported by Ezaki *et al.* (1989). DNA–DNA relatedness (%) was determined by using the colorimetric method (Verlander, 1992). The 16S rRNA gene was amplified using the universal primer, 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). The temperature profile for

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

120 PCR was as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min; 40 cycles of 94 °C for 30
121 s, 56 °C for 30 s and 72 °C for 90 s; and final extension at 72 °C for 5 min. The PCR
122 products were sequenced using universal primers as described previously (Thawai,
123 2015). Pairwise alignment of almost complete 16S rRNA gene sequence of strain
124 BR3-1^T and the values for sequence similarity among all recognized *Asanoa* species
125 was analysed using the EzTaxon server (Kim et al., 2012). The 16S rRNA gene
126 sequence was multiply aligned with the sequences of all type strains of the genus
127 *Asanoa* in GenBank/EMBL/DDBJ databases using the CLUSTAL W programme
128 version 1.81 (Thompson *et al.*, 1994). The alignment was manually verified and
129 adjusted prior to the construction of a phylogenetic tree. Phylogenetic analysis was
130 conducted using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987) based on
131 evolutionary distances calculated using the Kimura two-parameter model (Kimura,
132 1980), maximum parsimony (Fitch, 1972) and maximum-likelihood (Felsenstien,
133 1981) methods in the MEGA 6 software (Tamura *et al.*, 2013). Confidence values
134 were conducted using bootstrap analyses (Felsenstein, 1985) with 1,000 resamplings.
135
136 Strain BR3-1^T grew well on ISP2 and ISP 3, moderately on ISP6 and nutrient agar,
137 weakly on ISP 4, ISP 5, ISP 7, czapek's sucrose agar and glucose-asparagine agar.
138 The colour of substrate hyphae on these media was deep orange to pale orange
139 yellow. Aerial hyphae were not produced. A strong reddish orange soluble pigment
140 was produced on ISP2. Strain BR3-1^T produced spore chain on the tip of the substrate
141 mycelia on modified soil extract agar at 30 °C for 30 days (Fig. 1). This
142 morphological characteristic was consistent with their classification in the genus
143 *Asanoa* (Lee & Hah, 2002).
144

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

145 Chemotaxonomic characteristics of strain BR3-1^T were similar to those of members
146 of the genus *Asanoa*. The cell walls of strain BR3-1^T contained 3-hydroxy-
147 diaminopimelic acid and *meso*-diaminopimelic acid. The acyl type of cell wall
148 peptidoglycan was glycolyl. The reducing sugars in whole-cell hydrolysates were
149 glucose, mannose, rhamnose, ribose and xylose. The predominant menaquinones were
150 MK-10(H_8) (56.92%) and MK-10(H_6) (26.96%), small amounts of MK-10(H_4)
151 (7.55%), MK-9(H_8) (5.79%) and MK-9(H_6) (2.78%) were also present. The cellular
152 fatty acids profile contained iso-$C_{16:0}$, iso-$C_{15:0}$, anteiso-$C_{15:0}$, anteiso-$C_{17:0}$, iso-$C_{14:0}$,
153 iso-$C_{17:0}$, $C_{17:0}$, $C_{17:1}$ ω8c, $C_{16:0}$, $C_{16:1}$ 2OH, $C_{18:0}$ and iso-$C_{15:1}$ G (Supplementary
154 Table S1). Mycolic acids were absent. The diagnostic polar lipids were
155 diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine,
156 phosphatidylinositol, phosphatidylinositol mannosides, four unidentified
157 phospholipids and three unidentified lipids but phosphatidylcholine is not detected
158 (Supplementary Fig. S1). The G+C content (mol%) of the genomic DNA was 71.4%.
159 This data was consistent with the chemotaxonomic properties of the genus *Asanoa*
160 (Asano & Kawamoto, 1986; Lee & Hah, 2002; Tamura & Sakane, 2005; Xu *et al.*,
161 2011; Niemhom *et al.*, 2013).
162
163 Almost complete 16S rRNA gene sequence was obtained for strain BR3-1^T (1,495 nt).
164 Based on 16S rRNA gene sequence analysis, strain BR3-1^T exhibited a close
165 relationship with members of the family *Micromonosporaceae* and formed a
166 monophyletic cluster with the genus *Asanoa* (Fig. 2). The relationship between these
167 strains was supported by the results from the neighbour-joining, maximum-parsimony
168 and maximum-likelihood methods. This strain was most closely related to *Asanoa*
169 *ishikariensis* (99.39%), *Asanoa iriomotensis* (99.31%), *Asanoa siamensis* (99.17%),

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Asanoa ferruginea (98.84%) and *Asanoa hainanensis* (98.71%). Based on the morphological, chemotaxonomic and phylogenetic data, this strain should be judged as a member of genus *Asanoa*.

On the basis of chemotypic and phenotypic properties, strain BR3-1^T was clearly distinguishable from the reference strains, *A. ishikariensis* NBRC 14551^T, *A. iriomotensis* NBRC 100142^T, *A. siamensis* PS7-2^T, *A. ferruginea* NBRC 14496^T and *A. hainanensis* 210121^T. In particular, our strain has 3-hydroxy-diaminopimelic acid in cell wall whereas this diaminopimelic acid were not found in *A. iriomotensis* NBRC 100142^T and *A. hainanensis* 210121^T. Galactose was not detected in cell-hydrolysates of strain BR3-1^T but presented in cell-hydrolysates of its closest relative strains (*A. ishikariensis* NBRC 14551^T and *A. iriomotensis* NBRC 100142^T). Furthermore, the ability to reduce nitrate to nitrite, liquefy gelatin, coagulate milk, the maximum NaCl and the maximum temperature for growth and the utilization of glycerol, D-mannose, D-galactose, *myo*-inositol, L-rhamnose, D-cellobiose, D-ribose, L-arabinose, D-fructose, D-raffinose, D-melibiose, sucrose, D-salicin and lactose clearly distinguished strain BR3-1^T from all reference strains of the genus *Asanoa*. The DNA relatedness values among strain BR3-1^T and all reference strains of the genus *Asanoa*, *A. ishikariensis* NBRC 14551^T (45.8% ± 2.6), *A. iriomotensis* NBRC 100142^T (38.0% ± 4.3), *A. siamensis* PS7-2^T (34.5% ± 1.6), *A. ferruginea* NBRC 14496^T (29.5 ± 2.7) and *A. hainanensis* 210121^T (21.3 ± 4.6) (Supplementary Table S2) were below 70% cut-off point recommended for the assignment of strains to the same species (Wayne *et al.*, 1987).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

From the phenotypic, chemotaxonomic and genotypic data of strain BR3-1^T mentioned above, it could be distinguished from all recognize *Asanoa* species, which supports its classification as a novel species of the genus *Asanoa*, for which the name *Asanoa endophytica* is proposed. The type strain is strain BR3-1^T (=BCC 66355^T = NBRC 110002^T).

Description of *Asanoa endophytica* sp. nov.

Asanoa endophytica [en.do.phy'ti.ca. Gr. pref. *endo* within; Gr. n. *phyton* plant; L. fem. suff. *-ica* adjective suffix used with the sense of belonging to; N.L. fem. adj. *endophytica* within plant, endophytic pertaining to the isolation of the type strain from plant tissues].

Cells are Gram-stain-positive, mesophilic and non-motile actinomycete that forms the spore chain borne on the tip of the extensively branched substrate mycelia. The colour of soluble pigment on ISP2 is strong reddish orange. Utilizes D-glucose, D-cellobiose, D-xylose, mannitol, and sucrose as sole carbon sources, weakly utilizes D-mannose, D-galactose, L-rhamnose, D-ribose, L-arabinose and D-fructose, but not glycerol, *myo*-inositol, D-raffinose, D-melibiose, D-salicin and lactose. Peptonization of milk and hydrolysis of starch are positive but gelatin liquefaction, nitrate reduction and coagulation of milk are negative. The maximum temperature for growth is 40°C. The maximum NaCl concentration for growth is 2% (w/v). The pH range for growth is 5-10. The cell wall peptidoglycan contains 3-hydroxy-diaminopimelic acid and *meso*-diaminopimelic acid. The acyl type of the cell wall is glycolyl. The predominant menaquinones is MK-10(H_8) and MK-10(H_6). The characteristic whole-cell sugars are glucose, mannose, rhamnose, ribose and xylose. The polar lipid profile contains

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylinositol mannosides, four unidentified phospholipids and three unidentified lipids. The fatty acid pattern consists of iso-$C_{16:0}$, iso-$C_{15:0}$, anteiso-$C_{15:0}$, anteiso-$C_{17:0}$, iso-$C_{14:0}$, iso-$C_{17:0}$, $C_{17:0}$, $C_{17:1}$ ω8c, $C_{16:0}$, $C_{16:1}$ 2OH, $C_{18:0}$ and iso-$C_{15:1}$ G. Mycolic acids are absent. The G+C content of the DNA of type strain is 71.4 mol%. The type strain is BR3-1^T (=BCC 66355^T =NBRC 110002^T), which was isolated from a rhizome of *Boesenbergia rotunda* collected from Udon Thani Province, Thailand.

Acknowledgments

A scholarship from the Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST, TG-22-22-55-004D), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) and the office of the National Research Council of Thailand (NRCT) to N. N. are gratefully acknowledged. We also thank the Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, Kisarazu, Chiba, Japan, for cellular fatty acid analysis. This study was supported in part by Department of Biology and Actinobacterial Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology, Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

References

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

Asano, K. & Kawamoto, I. (1986). *Catellatospora*, a new genus of the *Actinomycetales*. *Int J syst Bacteriol* **36**, 512-517.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. (1977). Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* **100**, 221-230.

Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 224-229.

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**, 368–376.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.

Fitch, W. M. (1972). Toward defining the course of evolution: minimum change for a species tree topology. *Sys Zoo* **20**, 406-416.

Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996). Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989-1005.

Kawamoto, I., Oka, T. & Nara, T. (1981). Cell wall composition of *Micromonospora olivoasterospora, Micromonospora sagamiensis,* and related organisms. *J Bacteriol* **146**, 527-534.

Kelly, K. L. (1964). Inter-Society Color Council – National Bureau of Standard Color Name Charts Illustrated with Centroid Colors. Washington, DC: US Government Printing Office.

Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y, S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S. & Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: A Prokaryotic 16S rRNA Gene Sequence Database with Phylotypes that Represent Uncultured Species. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 716-721.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16,** 111-120.

Komagata, K. & Suzuki, K. I. (1987). Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol* **19,** 161-207.

Kroppenstedt, R. M. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, pp. 173–199. Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin. London: Academic Press.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, pp. 115–148. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: John Wiley & Sons.

Lee, S. D. & Hah, Y. C. (2002). Proposal to transfer *Catellatospora ferruginea* and '*Catellatospora ishikariense*' to *Asanoa* gen. nov. as *Asanoa ferruginea* comb. nov. and *Asanoa ishikariensis* sp. nov., with emended description of the genus *Catellatospora*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52,** 967-972.

Lechevalier, M. P. & Lechevalier, H. A. (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. In *Actinomycete Taxonomy*, pp. 227–291. Edited by A. Dietz & D. W. Thayer. Arlington, VA: Society for Industrial Microbiology.

Minnikin, D. E., Alshamaony, L. & Goodfellow, M. (1975). Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *J Gen Microbiol* **88,** 200–204.

Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. & Parlett, J. H. (1984). An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* **2,** 233-241.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Niemhom, N., Suriyachadkun, C., Tamura, T. & Thawai, C. (2013). *Asanoa siamensis* sp. nov., isolated from soil from a temperate peat swamp forest. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 66-71.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.

Sasser, M. (1990). *Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids* (MIDI Technical Note 101). Newark, DE: MIDI.

Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **16**, 313-340.

Suriyachadkun, C., Chunhametha, S., Thawai, C., Tamura, T., Potacharoen, W., Kirtikara, K. & Sanglier, J. J. (2009). *Planotetraspora thailandica* sp. nov., isolated from soil in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 992–997.

Tamaoka, J. (1994). Determination of DNA Base Composition. In *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*, pp. 463-470. Edited by M. Goodfellow & A. G. O'Donnell. Chichester: John Wiley & Sons.

Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984). Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* **25**, 25-128.

Tamura, T. & Sakane, T. (2005). *Asanoa iriomotensis* sp. nov., isolated from mangrove soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 725-727.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson D., Filipski, A., & Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725-2729.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K-I. & Kudo, T. (2005). *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 417-422.

Thawai, C. (2015). *Micromonospora costi* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus speciosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1456-1461.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gobson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

Uchida, K. & Aida, K. (1984). An improved method for the glycolate test for simple identification of acyl type of bacterial cell walls. *J Gen Appl Microbiol* **30**, 131–134.

Verlander, C. P. (1992). Detection of horseradish peroxidase by colorimetry. In *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, pp. 185–201. Edited by L. J. Kricka. New York: Academic Press.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R. & 9 other authors (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol 37*,463464.

Williams, S. T. & Cross, T. (1971). Actinomycetes. In *Methods in Microbiology*, vol. 4., pp. 295-334. Edited by C. Booth. London: Academic Press.

Xu, X. X., Qu, Z., Wang, H., Lin, H. P., Wang, C., Xie, Q. Y., Ruan, J. S. & Hong, K. (2011). *Asanoa hainanensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Acrostichum speciosum* in a mangrove, and emended description of the genus *Asanoa*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2384-2388.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1. Differential characteristics of strain BR3-1^T and all type strains of *Asanoa* species.

*Data for the reference species were taken from Asano & Kawamoto (1986), Lee & Hah (2002), Niemhom *et al.* (2013), Tamura & Sakane (2005) and Xu *et al.* (2011). All other phenotypic data were determined in this study. +, Positive; -, Negative; w, Weakly reaction; Glu, glucose; Gal, galactose; Rha, rhamnose; Rib, ribose; Man, mannose; Xyl, xylose; Ara, arabinose; DPG, diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PIMs, phosphatidylinositol mannosides; GL, glycolipid.

Characteristics	Strain BR3-1^T	*A. ishikariensis* NBRC 14551^T	*A. iriomotensis* NBRC 100142^T	*A. siamensis* PS7-2^T	*A. ferruginea* NBRC 14496^T	*A. hainanensis* 210121^T
The presence of 3-OH-diaminopemilic acid*	+	+	-	+	+	-
Whole-cell sugar*	Glu, Rha, Rib, Man, Xyl	Glu, Gal, Rha, Rib, Man, Xyl, Ara	Glu, Gal, Man, Xyl	Glu, Rha, Rib, Man, Xyl	Glu, Gal, Rha, Rib, Man, Xyl, Ara	Glu, Rib, Man, Xyl
DNA G+C content (mol%)*	71.4	71.1	69.0	72.3	71.5	70.3
Nitrate reduction	-	-	-	w	-	+
Gelatin liquefaction	-	+	-	-	-	+
Coagulation of milk	-	+	-	-	-	+
Maximum NaCl tolerance (%, w/v)	2	2	3	2	2	3
Maximum temperature for growth (°C)	40	30	30	37	37	37
Carbon utilization :						
Glycerol	-	-	-	w	-	w
myo-inositol	-	-	-	-	-	+
L-rhamnose	w	w	-	+	+	w
D-raffinose	-	+	+	w	+	-
D-melibiose	-	+	+	+	+	w
D-salicin	-	-	w	-	+	-
Lactose	-	+	-	+	+	+

338 **Figure legend**

339

340 **Fig. 1.** Scanning electron micrograph of strain BR3-1^T grown on modified soil extract
341 agar for 30 days at 30°C. Bar, 5 μm.

342

343 **Fig. 2.** Neighbour-joining tree (Saitou & Nei, 1987) based on almost-complete 16S
344 rRNA gene sequences (1,495 nt) showing the relationships between strain BR3-1^T and
345 the *Asanoa* species with validly-published names. *Catenuloplanes indicus* IMSNU
346 22099^T was used as an outgroup. Asterisks (*) indicating the branches of the tree that
347 were also found using the maximum-parsimony and maximum-likelihood methods;
348 and hashes (#) indicating the branches of the tree that were found in the neighbour-
349 joining and maximum-likelihood methods. The numbers on the branches indicate the
350 percentage bootstrap values of 1,000 replicates; only values ≥50% are indicated. Bar,
351 0.005 substitutions per nucleotide position.

352

353 **Table 1.** Differential characteristics of strain BR3-1^T and all type strains of *Asanoa*
354 species.

355

356 **Supplementary Fig. S1** Polar lipid appearing on a two-dimensional thin-layer
357 chromatograms of strain BR3-1^T.
358 (A) Phosphomolybdic acid's TLC chromatogram; (B) Dittmer & Lester's TLC
359 chromatogram; (C) Anisaldehyde's TLC chromatogram; (D) Ninhydrin's TLC
360 chromatogram; (E) Dragendrof's TLC chromatogram; Abbreviation: DPG,
361 diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PI,
362 phosphatidylinositol; PIMs, phosphatidylinositol mannosides; PL, phospholipid; L,
363 lipid.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Supplementary Table S1. Cellular fatty acid composition of strain BR3-1^T and all type strains of *Asanoa* species.

Cultures were grown in yeast extract-glucose broth on a rotary shaker at 30°C for 5 days.

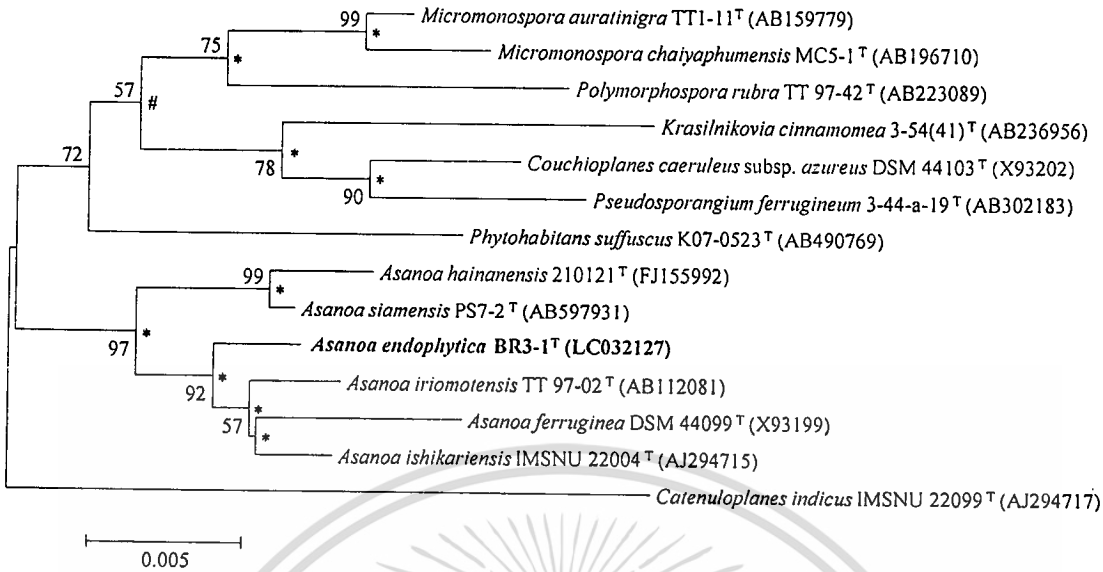
Supplementary Table S2. DNA–DNA relatedness among the strain BR3-1^T and all type strains of *Asanoa* species.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fig. 2. Neighbour-joining tree (Saitou & Nei, 1987) of strain BR3-1T

Click here to download Figure Fig. 2. Neighbour-joining tree (Saitou & Nei, 1987) of strain BR3-1T.pptx



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Supplementary Material Files

Click here to download Supplementary Material Files Revised Supplementary data of Manuscript of Asanoa endophytica

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)

Asanoa endophytica sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the rhizome of *Boesenbergia rotunda*

Nantawan Niemhom,[1] Chanikul Chutrakul,[2] Chanwit Suriyachadkun,[3] and Chitti Thawai[1,4]

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

[2] Bioassay Laboratory, Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Thailand Science Park, Thanon Phahonyothin, Tambon Khlong Nueng, Amphoe Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

[3]BIOTEC Culture Collection, Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Thailand Science Park, Thanon Phahonyothin, Tambon Khlong Nueng, Amphoe Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

[4]Actinobacterial Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

Correspondence

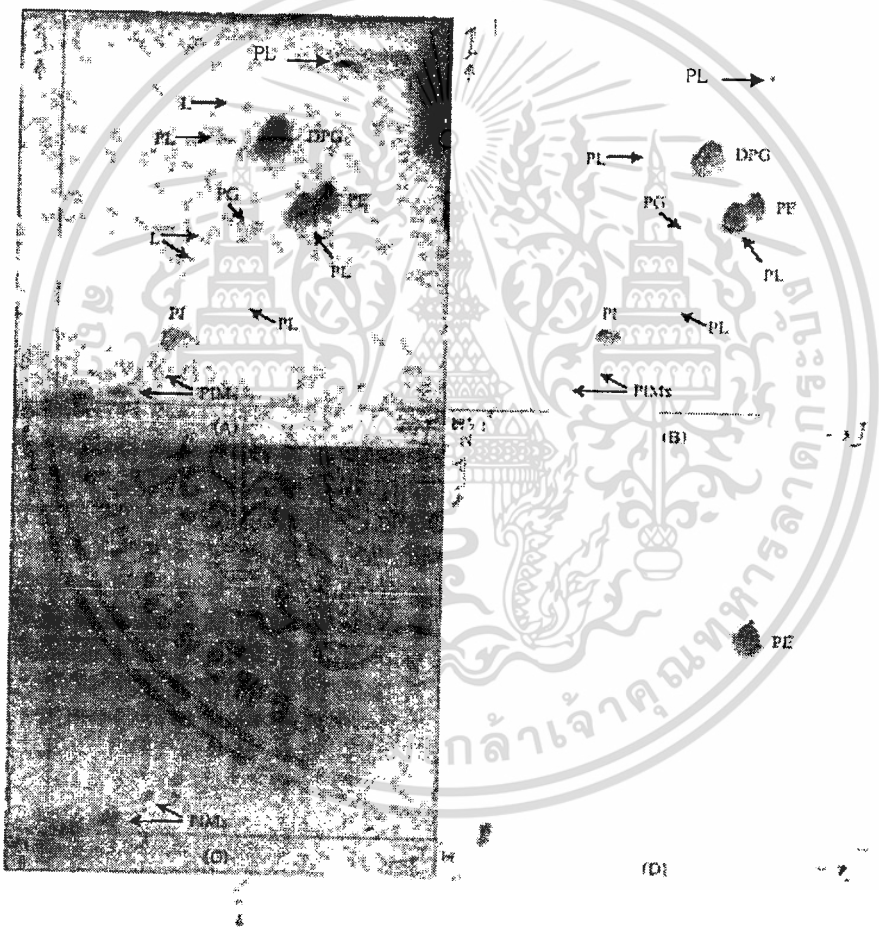
Chitti Thawai

ktchitti@kmitl.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Supplementary Fig. S1 Polar lipid appearing on a two-dimensional thin-layer chromatograms of strain BR3-1^T.

(A) Phosphomolybdic acid's TLC chromatogram; (B) Dittmer & Lester's TLC chromatogram; (C) Anisaldehyde's TLC chromatogram; (D) Ninhydrin's TLC chromatogram; (E) Dragendrof's TLC chromatogram; Abbreviation: DPG, diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PIMs, phosphatidylinositol mannosides; PL, phospholipid; L, lipi



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Supplementary Table S1. Cellular fatty acid composition of strain BR3-1^T and all type strains of *Asanoa* species.
Cultures were grown in yeast extract-glucose broth on a rotary shaker at 30°C for 5 days.

Fatty acids[a]	Strain BR3-1^T	*A. ishikariensis* NBRC 14551^T	*A. iriomotensis* NBRC 100142^T	*A. siamensis* PS7-2^T	*A. ferruginea* NBRC 14496^T	*A. hainanensis* 210121^T
Saturated fatty acids						
$C_{16:0}$	2.0	1.5	3.3	1.9	2.0	3.0
$C_{17:0}$	2.8	1.4	5.5	7.5	1.7	3.3
$C_{18:0}$	0.4	0.7	0.9	0.9	0.6	1.0
Unsaturated fatty acids						
iso-$C_{15:1}$ G	0.1	1.3	0.3	1.0	0.2	0.2
$C_{16:1}$ 2OH	1.8	-	-	-	-	-
$C_{17:1}$ ω8c	2.3	0.2	1.0	0.4	1.5	0.8
Branched fatty acids						
iso-$C_{14:0}$	4.9	3.5	2.7	1.2	3.9	3.6
iso-$C_{15:0}$	24.7	27.8	24.9	32.9	16.8	24.9
anteiso-$C_{15:0}$	15.2	29.1	33.9	31.1	28.1	30.3
iso-$C_{16:0}$	32.6	14.6	10.2	5.4	24.3	16.5
iso-$C_{17:0}$	3.6	5.5	3.2	5.2	3.2	4.6
anteiso-$C_{17:0}$	7.0	12.9	12.2	12.1	13.7	10.3

[a] Values are percentages of total cellular fatty acids.

Supplementary Table S2. DNA–DNA relatedness among the strain BR3-1^T and all type strains of *Asanoa* species.

Strains	DNA–DNA binding (%) with labelled DNA from*:					
	BR3-1^T	***A. ishikariensis* NBRC 14551^T**	***A. iriomotensis* NBRC 100142^T**	***A. siamensis* PS7-2^T**	***A. ferruginea* NBRC 14496^T**	***A. hainanensis* 210121^T**
BR3-1^T	100	41.8 ± 1.0	35.8 ± 1.7	28.1 ± 1.0	29.5 ± 2.7	15.4 ± 1.2
***A. ishikariensis* NBRC 14551^T**	45.8 ± 2.6	100	5.4 ± 2.6	31.4 ± 2.1	21.3 ± 2.1	31.7 ± 1.1
***A. iriomotensis* NBRC 100142^T**	38.0 ± 4.3	6.8 ± 1.0	100	15.7 ± 1.5	15.4 ± 3.0	3.7 ± 2.7
***A. siamensis* PS7-2^T**	34.5 ± 1.6	31.5 ± 2.9	31.6 ± 6.7	100	29.5 ± 2.2	26.5 ± 1.0
***A. ferruginea* NBRC 14496^T**	21.6 ± 5.9	27.7 ± 3.6	19.7 ± 2.1	32.3 ± 1.3	100	13.1 ± 2.0
***A. hainanensis* 210121^T**	21.3 ± 4.6	23.6 ± 2.6	8.4 ± 6.7	19.3 ± 1.3	23.4 ±.1.8	100

*average ± standard deviation of five replications of DNA-DNA relatedness data.

Click here to access/download
Response to Reviewer
Answer to reviewer points by points of Manuscript of Asanoa endophytica BR3-1T (For submit).docx

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้