



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความหลากหลายของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทในพืชวงศ์ขิงและसारออก  
ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากเชื้อที่คัดเลือก

Diversity of endophytic actinomycetes in Zingiberaceous plants  
and neuroprotective metabolite of the selected isolate

รศ.ดร. จิตติ ท้าไว  
คณะวิทยาศาสตร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย  
จาก กองทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	ความหลากหลายของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียในพืชวงศ์ขิงและสารออกฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากเชื้อที่คัดเลือก
(ภาษาอังกฤษ)	Diversity of endophytic actinomycetes in Zingiberaceous plants and neuroprotective metabolite of the selected isolate
แหล่งเงิน	ทุนพัฒนานักวิจัย กองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปีงบประมาณ 2559	จำนวนเงิน 891,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี	เดือนสิงหาคม 2559 ถึง สิงหาคม 2561
ผู้ดำเนินการวิจัย	รศ.ดร. จิตติ ท่าไว สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 02-3298400 ต่อ 235

### บทคัดย่อ

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยสียที่เกี่ยวข้องกับพืชมีเพิ่มมากขึ้นรวมถึงบทบาทของแอกติโนมัยสียเหล่านี้ที่มีผลกระทบในทางการแพทย์ หนึ่งในสารเมแทบอลิต์ที่สำคัญที่สร้างจากเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีย คือ สารประกอบโพลีคีโตนซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเป็นยาปฏิชีวนะ สารประกอบโพลีคีโตนเหล่านี้มีชีวสังเคราะห์มาจากเอนไซม์โพลีคีโตนซินเทสชนิดที่ 1 ซึ่งถอดรหัสมาจากยีนโพลีคีโตนซินเทสชนิดที่ 1 ดังนั้นการศึกษานี้มุ่งเน้นการคัดกรองเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียที่มีศักยภาพในการผลิตสารโพลีคีโตนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยการคัดกรองยีนโพลีคีโตนซินเทสชนิดที่ 1 (PKS I) การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียจำนวน 109 ไอโซเลตได้จากใบ ลำต้น เหง้า และราก ของพืชวงศ์ขิงที่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งเก็บได้จากหลายพื้นที่ในประเทศไทย จากการศึกษาลักษณะทางพีโนไทป์และการวิเคราะห์ 16S rRNA gene sequence พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (53 ไอโซเลต) *Microbispora* (17 ไอโซเลต) *Micromonospora* (12 ไอโซเลต) *Jishengella* (7 ไอโซเลต) *Nonomurea* (5 ไอโซเลต) *Actinomadura* (3 ไอโซเลต) *Jiangella* (2 ไอโซเลต) *Sphaerisorangium* (2 ไอโซเลต) *Streptosporangium* (2 ไอโซเลต) *Asanoa* (1 ไอโซเลต) *Dactylosporangium* (1 ไอโซเลต) *Kutzneria* (1 ไอโซเลต) *Phytohabitans* (1 ไอโซเลต) *Planotetraspora* (1 ไอโซเลต) และ *Saccharopolyspora* (1 ไอโซเลต) จากการศึกษาอนุกรมวิธานแบบพอลิฟาสิก (polyphasic taxonomy) พบว่าไอโซเลต BR3-1 KK1-3 และ SC1-1 เป็นแอกติโนมัยสียสายพันธุ์ใหม่และให้ชื่อว่า *Asanoa endophytica* *Phytohabitans kaempferiae* และ *Nonomurea atahianthi* ตามลำดับ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทที่สกัดได้จากเชื้อทุกไอโซเลต พบว่าจำนวนร้อยละ 25 (27 ไอโซเลต) มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบอย่างน้อยหนึ่งชนิด ผลการเพิ่มจำนวนยีนจากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียที่แยกได้ทั้งหมด มีมากกว่าครึ่งหนึ่ง (จำนวน 61 ไอโซเลต หรือร้อยละ 56) ที่พบว่ามียีนโพลีคีโตนซินเทสชนิดที่ 1 ผลการคัดกรองด้วยยีนแสดงให้เห็นว่าเชื้อจำนวนมากมีโอกาที่จะสร้างสารโพลีคีโตนได้ ผลการศึกษาความหลากหลายของยีนโพลีคีโตนซินเทสชนิดที่ 1 ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียในสกุล *Streptomyces* ที่แยกได้จาก *Alpinia*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*galanga* พบว่ามียีนที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับยีนสร้างสารปฏิชีวนะที่ปรากฏในฐานข้อมูลซึ่งคาดว่าผลิตสารโพลีคีไทด์ ซึ่งได้แก่ meridamycin nigericin rapamycin azalomycin herbimycin และ geldanamycin อย่างไรก็ตามจำนวนยีนมากกว่าครึ่งที่ได้จาก *Escherichia coli* 27 โคลน เป็นยีนที่พบว่าไม่มีความใกล้เคียงกับยีนใดในฐานข้อมูล ดังนั้นจากผลการศึกษารูปได้ว่าเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงของไทยมีความหลากหลายสูงและมีศักยภาพในการผลิตสารในกลุ่มโพลีคีไทด์ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนี้ น้ำหมักที่ได้จากเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตและนำไปทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์พบว่า เชื้อจำนวนมากกว่าร้อยละ 85 แสดงกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ได้ น้ำหมักเชื้อของเชื้อตัวแทนไอโซเลต AG2-1 ถูกสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตและแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีได้สารบริสุทธิ์และพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็นสารเจลดานามัยซินซึ่งแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ที่ระดับความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากข้อมูลที่ได้ศึกษาทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าเนื้อเยื่อสมุนไพรวงศ์ขิง เป็นแหล่งที่สามารถพบเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีและควรจัดเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญในการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยสีท ต่อไป

คำสำคัญ : พืชวงศ์ขิง ยีนโพลีคีไทด์ชนิดใหม่ชนิดที่ 1 ฤทธิ์ทางชีวภาพ อนุกรมวิธาน เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Abstract

Identification of plant associated actinomycetes has been substantially increased and their impacts on medical applications have been addressed. One of significant metabolites produced from endophytic actinomycetes is polyketides. Many of active polyketides are recognized as antibiotics which are bio-synthesized by type I polyketide synthase (*PKS I*). The enzyme is encoded by *PKS I* gene. Therefore, this study emphasized on screening of endophytic actinomycetes which were potential to produce active polyketides through the existence of *PKS I* genes. One hundred and nine strains of endophytic actinomycetes were isolated from sterilized healthy leaf, stem, rhizome and root of plants in the family *Zingiberaceae* collected from several areas in Thailand. Based on phenotypic characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis, these strains were identified as *Streptomyces* (53 isolates), *Microbispora* (17 isolates), *Micromonospora* (12 isolates), *Jishengella* (7 isolates), *Nonomuraea* (5 isolates), *Actinomadura* (3 isolates), *Jiangella* (2 isolates), *Sphaerisporangium* (2 isolates), *Streptosporangium* (2 isolates), *Asanoa* (1 isolate), *Dactylosporangium* (1 isolate), *Kutzneria* (1 isolate), *Phytohabitans* (1 isolate), *Planotetraspora* (1 isolate) and *Saccharopolyspora* (1 isolate). On the basis of polyphasic approach, strains BR3-1 KK1-3 and SC1-1 were proposed as novel species and named as *Asanoa endophytica*, *Phytohabitans kaempferiae* and *Nonomuraea stahlianthi*, respectively. Crude ethyl acetate extracts obtained from all strains were evaluated for antimicrobial activities. Of these, 25% (27 strains) were active against at least one of the test microorganisms. More than twice of bacterial isolates (61 strains, 56%) were found *PKS I* gene positive when using their genomic DNAs as templates. Genetic result indicated that many strains could be polyketide producers. Diversity of *PKS I* genes of *Streptomyces* spp. isolated from *Alpinia galanga* was shown. Some of the genes were highly similar to polyketide antibiotic genes in database involved in nigericin, rapamycin, azalomycin, herbimycin and geldanamycin production. However, more than half of the *PKS I* genes obtained from 27 *Escherichia coli* clones were unknown. Our results concluded that endophytic actinomycetes isolated from Thai zingiberaceous plants are diverse and many of them have potential to produce novel bioactive polyketide substances. Furthermore, the fermentation broths of these representative strains were extracted with ethyl acetate and were tested for anti-microbial activity. The results showed that more than 85% of actinomycete strains exhibited the anti-microbial activity. Antimicrobial assay-guided fractionation of the ethyl acetate extract of representative actinomycete isolate AG2-1 yielded the known compounds, geldanamycin, which exhibited the neuroprotective activity at very low concentration (1 ng/ml). Based on these results, it could be concluded that tissue of the Zingiberaceous plants is a one of interest source for the actinomycete investigation and should be represented an excellent source for the discovery of bioactive compounds.

**Keywords :** zingiberaceous plants, type I polyketide synthase (*PKS I*) gene, biological activities, taxonomy, endophytic actinomycetes

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2559 ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

รศ.ดร. จิตติ ทาไฉ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยสีท.....	4
2.2 การกระจายของแอกติโนมัยสีท.....	5
2.3 การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีท.....	7
2.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท.....	8
2.5 สารทุติยภูมิและการสังเคราะห์สารทุติยภูมิจากแอกติโนมัยสีท.....	14
2.6 พีชวงศ์ขิง.....	21
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>22</b>
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>45</b>
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>131</b>
<b>บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย.....</b>	<b>134</b>
<b>บรรณานุกรม.....</b>	<b>136</b>
<b>ภาคผนวก.....</b>	<b>152</b>
ภาคผนวก ก ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ.....	153
<b>ประวัติผู้เขียน.....</b>	<b>171</b>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนมัยสีท..... 9
2.2	รูปแบบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของแอกติโนมัยสีทซึ่งผนังเซลล์ประกอบ ด้วยกรดไดอะมีโนพิมิสิกแบบ <i>meso</i> ..... 10
2.3	ชนิดของฟอสโฟลิปิดที่พบในแอกติโนมัยสีท..... 11
3.1	ตัวอย่างพีชวงศ์ซึ่งที่เก็บได้จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย..... 23
3.2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์..... 41
4.1	เอนโดไฟติกแอกติโนมัยที่แยกได้จากพีชวงศ์ชนิดต่างๆ ..... 47
4.2	ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity)ของเอนโดไฟติก แอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากสายพันธุ์อ้างอิง..... 50
4.3	ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้..... 84
4.4	ลักษณะความแตกต่างของสายพันธุ์ BR3-1 <sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล <i>Asanoa</i> ..... 96
4.5	องค์ประกอบของกรดไขมันภายในเซลล์ของสายพันธุ์ BR3-1 <sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิง ในสกุล <i>Asanoa</i> ..... 97
4.6	ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างสายพันธุ์ BR3-1 <sup>T</sup> และสายพันธุ์อ้างอิง ในสกุล <i>Asanoa</i> ..... 98
4.7	ลักษณะความแตกต่างของสายพันธุ์ KK1-3 <sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล <i>Phytohabitans</i> ..... 102
4.8	ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างสายพันธุ์ KK1-3 <sup>T</sup> และสายพันธุ์อ้างอิง ในสกุล <i>Phytohabitans</i> ..... 103
4.9	ลักษณะความแตกต่างของสายพันธุ์ SC1-1 <sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล <i>Nonomureae</i> ..... 107
4.10	ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างสายพันธุ์ SC1-1 <sup>T</sup> และสายพันธุ์อ้างอิง สกุล <i>Nonomureae</i> ..... 108
4.11	แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar disc diffusion ความเป็นพิษต่อเซลล์ และผลการตรวจหายีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 ..... 113
4.12	แสดงค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนบริเวณ KS domain กับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 ..... 119

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อในอันดับ <i>Actinomycetales</i> .....	7
2.2 โครงสร้างของกรดมัยคอลลิก .....	12
2.3 โครงสร้างของมีนาควิโนน .....	12
2.4 โครงสร้างของสารกลุ่มอะโรมาติกโพลีคีไทด์ที่สร้างจากแอคติโนมัยซีท .....	15
2.5 โครงสร้างของสารกลุ่มแมคโครไลด์ที่สร้างจากแอคติโนมัยซีท.....	15
2.6 โครงสร้างของสารกลุ่มแมคโครไซคลิกโพลีอินที่สร้างจากแอคติโนมัยซีท.....	16
2.7 โครงสร้างของสารกลุ่มแอนซามัยซินที่สร้างจากแอคติโนมัยซีท.....	16
2.8 โครงสร้างของสารกลุ่มกลุ่มโพลีเอเทอร์ที่สร้างจากแอคติโนมัยซีท.....	17
2.9 โครงสร้างของสารกลุ่ม enediynes ที่สร้างจากแอคติโนมัยซีท .....	17
2.10 การสังเคราะห์ erythromycin และการเรียงตัวของเอนไซม์ DEBS.....	19
2.11 การสังเคราะห์ lovastatin และการเรียงตัวของเอนไซม์ .....	20
2.12 การสังเคราะห์ doxorubicin และการเรียงตัวของเอนไซม์.....	20
2.13 การสังเคราะห์ naringenin chalcone และการเรียงตัวของเอนไซม์.....	21
3.1 ตำแหน่งไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกบนแผ่น HPTLC.....	28
3.2 ตำแหน่งและสีของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์บนแผ่น HPTLC.....	29
3.3 ตำแหน่งของไขมันชนิดมีขั้วบนแผ่น TLC ที่ดีเวลลอปแบบ 2 มิติ.....	31
4.1 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ทั้งหมด บน phylogenetic tree .....	49
4.2 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต KE2-3 และ ZM2-6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ .....	54
4.3 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต KE2-3 และ ZM2-6 บน phylogenetic tree .....	55
4.4 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต BR3-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ .....	56
4.5 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต BR3-1 บน phylogenetic tree .....	56
4.6 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต KE1-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ .....	57
4.7 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต KE1-1 บน phylogenetic tree .....	58
4.8 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต AN1-5 AN1-14 AP1-2 AX1-4 CL2-1 CL2-5 และ CP1-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	59
4.9 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AN1-5 AN1-14 AP1-2 AX1-4 CL2-1 CL2-5 และ CP1-1 บน phylogenetic tree .....	60
4.10 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต AN1-19 AN1-32 AN1-37 AN2-6 AN3-10 และ AP1-5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	61
4.11 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต CZ1-1 (KG1-3 KK1-2 SC1-2 ZM2-2 และ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ZO1-2 ภายใต้อั้วจูลทรศรศน์.....	62
---------------------------------	----

## สารบัญญรพ (ต่อ)

รพที่	หน้า
4.12 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AN1-19 AN1-32 AN1-37 AN2-6 AN3-10 AP1-5 CZ1-1 KG1-3 KK1-2 SC1-2 ZM2-2 และ ZO1-2 บน phylogenetic tree.....	63
4.13 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต KK1-3 ภายใต้อั้วจูลทรศรศน์.....	64
4.14 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต KK1-3 บน phylogenetic tree.....	65
4.15 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต BR3-4 ภายใต้อั้วจูลทรศรศน์.....	66
4.16 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต BR3-4 บน phylogenetic tree.....	66
4.17 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต AK1-2 ภายใต้อั้วจูลทรศรศน์.....	67
4.18 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AK1-2 บน phylogenetic tree.....	68
4.19 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต BR3-3 KK1-10 ZZ1-4 และ ZZ2-2 ภายใต้อั้วจูลทรศรศน์.....	69
4.20 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AN2-5 AN2-7 BR3-3 CL1-1 CL2-2 KE1-2 KE1-3 KE2-2 KE2-4 KE2-5 KK1-10 KK1-11 KM1-1 KM1-2 ZO1-7 ZZ1-4 และ ZZ2-2 บน phylogenetic tree.....	70
4.21 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต AN1-36 AN3-11 HC1-7 และ SC1-1 ภายใต้อั้วจูลทรศรศน์.....	71
4.22 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AN1-27 AN1-36 AN3-11 HC1-7 และ SC1-1บน phylogenetic tree.....	72
4.23 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต BR3-1 ภายใต้อั้วจูลทรศรศน์.....	73
4.24 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต BR3-5 บน phylogenetic tree.....	74
4.25 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของเชื้อไอโซเลต AN1-28 และ KM1-3 ภายใต้อั้ว จูลทรศรศน์.....	75
4.26 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต KM1-3 และ KM1-28 บน phylogenetic tree.....	76
4.27 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของเชื้อไอโซเลต AN1-26 และ AN3-5 ภายใต้อั้ว จูลทรศรศน์.....	77
4.28 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AN1-26 และ AN3-5 บน phylogenetic tree.....	78
4.29 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของเชื้อไอโซเลต AN2-10 และ KG1-2 ภายใต้อั้วจูลทรศรศน์.	79
4.30 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AN2-10 CL3-1 และ KG1-2 บน phylogenetic tree.....	80
4.31 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต CZ1-3 HC1-4 AG2-4 ZM2-12 AG2-1 และ AG2-2 ภายใต้อั้วจูลทรศรศน์.....	82
4.32 แสดงตำแหน่งของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 53 ไอโซเลต บน phylogenetic tree.....	83
4.33 ลักษณะทางสัณฐรณวิทยาของสายพันธุ์ BR3-1 <sup>T</sup> .....	94
4.34 แสดงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ BR3-1 <sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล <i>Asanoa</i>	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้้ดัดแปลงเนื้อหา และตองอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรนำ้ไปใช้

บน phylogenetic tree ..... 95

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.35 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ KK1-3 <sup>T</sup> .....	100
4.36 แสดงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ KK1-3 <sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล <i>Phytohabitans</i> บน phylogenetic tree .....	101
4.37 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ SC1-1 <sup>T</sup> .....	105
4.38 แสดงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ SC1-1 <sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล <i>Nonomurea</i> บน phylogenetic tree .....	106
4.39 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส .....	111
4.40 แสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์กับผลการตรวจสอบยีน โพลีคีโตซินเทสชนิดที่ 1 .....	112
4.41 แสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนบริเวณ KS domain ที่เป็นส่วนประกอบของ โพลีคีโตซินเทสชนิดที่ 1 บน phylogenetic tree ที่ได้จาก <i>Streptomyces</i> spp. ที่แยกได้จากข่า ( <i>Alpinia galangal</i> ).....	123

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยมีการตื่นตัวในการนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มาพัฒนาต่อเป็นยาหรือเภสัชภัณฑ์มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ในเรื่องของทรัพยากรธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งทรัพยากรธรรมชาติทั้งจากพืช สัตว์หรือจุลินทรีย์ ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมามากมาย ตั้งแต่สมัยอดีตจนถึงปัจจุบัน สำหรับจุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งที่มีความสนใจอย่างยิ่งในปัจจุบัน เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีตจัดเป็นทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญเนื่องจากสามารถสร้างสารต้นแบบที่มีโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย และมีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด และจากรายงานการแยกสารจากแบคทีเรียที่ได้จากดินพบว่าสารสำคัญที่แยกได้จากมากกว่า 80% แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงยาหลายชนิดที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันโดยเฉพาะยาปฏิชีวนะมีจุดเริ่มต้นจากการศึกษาความหลากหลายและการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้นแบบจากเชื้อแอคติโนมัยซีตทั้งสิ้น ยกตัวอย่างเช่น amphotericin B gentamicin erythromycin chloramphenicol streptomycin เป็นต้น ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า เชื้อแอคติโนมัยซีตเป็นแหล่งธรรมชาติอีกแหล่งหนึ่งที่มีศักยภาพในการจะนำมาศึกษาวิจัยเพื่อค้นคว้าหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปใช้เป็นสารต้นแบบในการพัฒนายาใหม่ อันจะก่อให้เกิดประโยชน์มหาศาลทางด้านสาธารณสุข จากแนวโน้มที่ประชากรกลุ่มผู้สูงอายุมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นปัญหาที่เกี่ยวกับโรคผู้สูงอายุ เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน ย่อมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งจากปัญหาดังกล่าว นำไปสู่ความพยายามที่จะค้นคว้าวิจัยหาชนิดใหม่ เพื่อให้ได้ผลการรักษาที่ดีมีประสิทธิภาพและปลอดภัยกว่าที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยแนวทางการวิจัยแนวทางหนึ่ง คือการหาชนิดใหม่จากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติทั้งจากพืช สัตว์หรือจุลินทรีย์ เพื่อนำมาใช้รักษาและบรรเทาโรคต่างๆ ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงไม่ว่าจะเป็นพันธุ์ไม้ สัตว์ หรือจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จึงมีความเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีตนั้นน่าจะมีการกระจายตัวอยู่มากในหลายพื้นที่และมีสายพันธุ์ที่หลากหลายเช่นกัน แอคติโนมัยซีตสามารถพบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ในดิน แหล่งน้ำ ฝุ่นละออง และยังสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเรียกว่า เอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีต (endophytic actinomycetes) โดยเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีตเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้เป็นแหล่งทรัพยากรที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากสามารถพบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีตสกุล *Streptomyces* และเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีตหายากสกุลอื่นๆ (Zhao et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่และค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จำนวนมากจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีตในพืชหลายชนิด (Bieber et al., 1998 ; Castillo et al., 2002 ; Gu et al., 2006 ; Duangmal et al., 2008 ; Igarashi et al., 2007) สารสำคัญที่ผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีตนอกจากแสดงฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะแล้วยังมีรายงานว่ายังสามารถแสดงฤทธิ์ด้านต่างๆ ด้วยเช่น สารเจลดาโนมายซินที่แยกจากเชื้อ *Streptomyces* sp. สามารถแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ที่มีความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Tadtong et al. 2007) ประเทศไทยมีพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย เช่น มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ต้านเชื้อวัณโรค ต้านเชื้อก่อโรคมาลาเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ต้านอนุมูลอิสระ ระวังอาการปวด ต้านการอักเสบ และมีฤทธิ์ปกป้องและกระตุ้นเซลล์ประสาท เป็นต้น (Rahman, 2000 ; Wilken et al., 2011 ; Lakshmanan et al., 2011) มีความเป็นไปได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรเหล่านี้จะมีส่วนร่วมในวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) ของพืชสมุนไพร และสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดที่คล้ายกับพืชสมุนไพรหรือสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้ (Zhao et al., 2011) ในปัจจุบันงานวิจัยเพื่อค้นหาสารปกป้องเซลล์ประสาทจากเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่มีรายงานไม่มากนัก เช่น Geldanamycin (Tadtong et al. 2007), Flaviogeranin (Hayakawa et al., 2010) และ 3-normeridamycin (Summer et al., 2006) เนื่องจากประเทศไทยมีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีรายงานว่ามีการผลิตสารออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ดี โดยเฉพาะพืชวงศ์ขิง เช่น ขมิ้น ขิง เป็นต้น ทำให้พืชสมุนไพรเหล่านี้เป็นพืชที่มีความน่าสนใจในการนำมาคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท ซึ่งในปัจจุบันยังมีการศึกษาความหลากหลายและการกระจายตัวของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทในพืชวงศ์ต่างๆ เพียงเล็กน้อย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการวิจัยทางด้านความหลากหลาย และอนุกรมวิธานหลายส่วน เพื่อศึกษาการแยก คัดเลือกเชื้อ และศึกษาสารทุติยภูมิที่แสดงฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท ตลอดจนเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีประโยชน์จากแหล่งดังกล่าวในการนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการศึกษาและวิจัยเชิงพัฒนาต่อไป ดังนั้นการศึกษาวิจัยในโครงการนี้อาจทำให้เกิดการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทชนิดใหม่หรือสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารต้นแบบต่อการพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ ตลอดจนช่วยพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยก เพาะเลี้ยง อนุกรมวิธานและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีท อีกทั้งช่วยเพิ่มขีดความสามารถและเป็นทางเลือกของนักวิจัยไทย ในการเรียนรู้การวิจัยเกี่ยวกับการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งทรัพยากรในประเทศเพื่อเป็นการบริหารจัดการสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพอีกทางหนึ่งด้วย

#### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทจากเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิงของไทย
2. เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้
3. เพื่อทำการเลี้ยงและสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักแอคติโนมัยสีทที่แสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท
4. เพื่อทำการแยกสารออกฤทธิ์จากสารสกัดหยาบออกเป็นส่วนๆ นำส่วนที่แสดงฤทธิ์มาใช้ประโยชน์ ตลอดจนศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารที่อยู่ในส่วนที่แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุด
5. เพื่อศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากน้ำหมักแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายและการกระจายตัวของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสืตจากพืชวงศ์ขิงในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ได้แก่ ชม้น ขิง ข่า ไพล กระเทือ กระชาย ว่านชักมดลูก กะลา กระเจียว เป็นต้น ตลอดจนศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อนั้น เป้าหมายของโครงการวิจัยนี้คือ สามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยสืตจากเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิงให้ได้อย่างน้อย 100 ไอโซเลต ทำการจัดกลุ่มเชื้อเหล่านั้นศึกษาความหลากหลายและการกระจายตัวของเชื้อโดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 16S rRNA gene และศึกษาเพื่อให้ทราบลักษณะทางอนุกรมวิธานในระดับสกุลของเชื้อในแต่ละกลุ่ม จากนั้นคัดเลือกเชื้อตัวแทนเชื้อในกลุ่มที่น่าสนใจคือมีแนวโน้มเป็นเชื้อชนิดใหม่มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานจนถึงระดับสปีชีส์ ด้วยข้อมูลของลักษณะทางพีโนไทป์ เคมีไทป์ และจีโนมไทป์ร่วมกัน ตลอดจนคัดเลือกเอาเชื้อตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงในอาหารเหลวและทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทิลอะซีเตต นำสารสกัดหยาบที่ได้มาศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และเลือกสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อที่แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุดมาทำการแยกสารให้เป็นสารบริสุทธิ์ ตลอดจนศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีท (Actinomycetes) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content) ในดีเอ็นเอสูงมากกว่าร้อยละ 55 (Williams *et al.*, 1989) มีรูปร่างหลากหลาย เช่น รูปกลม รูปท่อน และเส้นใย แอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่สืบพันธุ์ด้วยการสร้างสปอร์ ซึ่งสปอร์ที่สร้างอาจอยู่บนเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) หรือเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) สปอร์เหล่านี้สามารถทนความร้อนได้เล็กน้อย (ขึ้นอยู่กับสกุล) แต่สามารถทนต่อความแห้งแล้งได้ดี จึงสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เป็นเวลานาน

แอกติโนมัยสีทพบกระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน (พบมากที่สุด) แหล่งน้ำ ทะเลทราย สัตว์ และพืช ส่วนมากดำรงชีวิตแบบแซปโรไฟต์ (saprophyte) เจริญเติบโตโดยการย่อยสลายสารอินทรีย์ (organic matters) แต่มีบางชนิดพบดำรงชีวิตแบบปรสิต (parasitism) หรือแบบพึ่งพาอาศัย (mutualism) กับพืชหรือสัตว์ (Goodfellow and Williams, 1983) บางชนิดก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Mycobacterium leprae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรื้อน และ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นสาเหตุของวัณโรค บางชนิดก่อโรคในพืช เช่น *Streptomyces scabies* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหูดมันฝรั่ง (potato scab) และบางชนิดก่อโรคในสัตว์ อย่างไรก็ตามแอกติโนมัยสีทที่พบในดินส่วนมากมักไม่ก่อโรค แอกติโนมัยสีทบางชนิด เช่น สกุล *Frankia* สามารถอาศัยอยู่กับรากพืชเพื่อช่วยตรึงไนโตรเจนได้ (Coyne, 1999) อัตราการพบแอกติโนมัยสีทขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เช่น สภาพภูมิศาสตร์ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณสารอินทรีย์ ปริมาณอากาศ และความชื้น (Goodfellow and Williams, 1983) แอกติโนมัยสีทจะเจริญได้ดีในดินเปียก เนื่องจากต้องการออกซิเจนในการเจริญ สามารถเจริญในสภาวะที่เป็นต่างได้ดี โดยแอกติโนมัยสีทร้อยละ 95 พบในดินที่มีสภาวะเป็นด่างและในขณะเดียวกันแอกติโนมัยสีทไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีความเป็นกรดได้ โดยเมื่อค่าความเป็นกรดต่างน้อยกว่า 5 จำนวนแอกติโนมัยสีทที่พบจะลดลง (Coyne, 1999) ในธรรมชาติสามารถพบประชากรของแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* ได้มากเมื่อเทียบกับสกุลอื่นๆ (Hayakawa, 2008) โดยเรียกแอกติโนมัยสีทในสกุลอื่นๆ นอกเหนือจาก *Streptomyces* ว่าแอกติโนมัยสีทหายาก (rare actinomycetes)

เป็นที่ทราบกันดีว่าแอกติโนมัยสีทเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิได้ดี เช่น ยาปฏิชีวนะ สารที่ใช้ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรม และการเกษตร โดยในหมู่ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากจุลินทรีย์ (ประมาณ 22,500 ชนิด) พบว่าร้อยละ 45 ผลิตโดยแอกติโนมัยสีท (Berdy, 2005)

## 2.2 การกระจายของแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทกระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์บางชนิดเป็นเชื้อก่อโรค ทั้งนี้แอกติโนมัยสีทสามารถอยู่อาศัยในธรรมชาติและบางชนิดอาศัยอยู่ในพืช

### 2.2.1 การกระจายของแอกติโนมัยสีทในธรรมชาติ

ดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งดินที่มีสารอินทรีย์หรือกรดฮิวมิกจะเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยทางธรรมชาติที่สำคัญที่สุดของแอกติโนมัยสีท แอกติโนมัยสีทเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยเฉพาะพวกที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น ลิกนิน และไคติน (Alexander, 1977) นอกจากนี้ในดินแล้วยังสามารถพบแอกติโนมัยสีทกระจายได้ทั่วไปในปุ๋ยหมัก ตะกอน น้ำโคลน และดินรอบรากพืช จำนวนของแอกติโนมัยสีทในตัวอย่างดินขึ้นอยู่กับชนิดของดิน ลักษณะทางกายภาพ เช่น ความเป็นกรดต่าง และปริมาณสารอินทรีย์ ในพื้นที่การเกษตรที่มีปริมาณฮิวมัสสูง จำนวนของแอกติโนมัยสีทที่พบจะสูงกว่าในพื้นที่ที่มีฮิวมัสปริมาณน้อย (Hayakawa *et al.*, 1988) แอกติโนมัยสีทที่พบมากในธรรมชาติ คือ สกุล *Streptomyces* ซึ่งพบกระจายตัวกว้างที่สุดและมีความหนาแน่นของประชากรสูงที่สุด (ประมาณร้อยละ 70-98 ของจำนวนประชากร) ส่วนสกุลอื่นๆ ที่พบรองลงมาคือ *Nocardia Actinomadura* และ *Micromonospora* โดยพบอยู่อย่างอุดมสมบูรณ์และสามารถพบได้ในดินทุกชนิด (Alexander, 1977)

แอกติโนมัยสีทสามารถพบได้ในแหล่งน้ำจืด โดย Waksman (1959) ได้อธิบายว่าในทะเลสาบน้ำจืดนั้นมีแอกติโนมัยสีทอยู่มากมาย ซึ่ง Cross (1981) ได้รายงานการแยกแอกติโนมัยสีทในสกุล *Actinoplanes Micromonospora Rhodococcus Thermoactinomyces* และ *Streptomyces* จากแหล่งน้ำจืด ซึ่งแอกติโนมัยสีทเหล่านี้อาจจะถูกชะล้างออกจากดินแล้วไปสะสมอยู่ในแหล่งน้ำจืด (Goodfellow and Haynes, 1984) ส่วนแอกติโนมัยสีทสกุล *Actinoplanes* จะสร้างสปอร์ซึ่งอยู่ในถุงหุ้ม ซึ่งสามารถทนต่อสภาวะแห้งแล้งได้เป็นเวลานาน และจะปลดปล่อยสปอร์เคลื่อนที่ออกมาเมื่ออยู่ในแหล่งน้ำ จึงเป็นเหตุผลที่สามารถพบแอกติโนมัยสีทสกุล *Actinoplanes* ได้ทั่วไปในดินจากแม่น้ำและทะเลสาบ (Makkar and Cross, 1982)

สิ่งแวดล้อมทางทะเล เช่น ตะกอน รวมทั้งสิ่งมีชีวิตในทะเล ไม่ว่าจะเป็น ฟองน้ำ สาหร่าย และเพรียงหัวหอม เป็นอีกแหล่งที่อยู่อาศัยของแอกติโนมัยสีทที่มีความหลากหลาย (Bull *et al.*, 2005) แอกติโนมัยสีททางทะเลสามารถพบได้ทั่วไป แต่จะพบได้มากที่สุดที่ตะกอน โดยเฉพาะตะกอนจากป่าชายเลน เนื่องจากมีสารอินทรีย์สูง โดยตะกอนสามารถพบสกุล *Micromonospora* ได้มาก (Bredholt, 2008) นอกจากนี้ยังสามารถพบแอกติโนมัยสีทสกุลใหม่จากสิ่งแวดล้อมทางทะเล ได้แก่ สกุล *Salinispora* และแอกติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ เช่น *Verrucosipora lutea* (Liao *et al.*, 2009) *Verrucosipora sediminicola* (Dai *et al.*, 2010) *Asanoa iriomotensis* (Tamara and Sakane, 2005) และ *Nonomurea maheshkhaliensis* (Ara *et al.*, 2007)

นอกจากการกระจายของแอกติโนมัยสีทในธรรมชาติแล้ว ยังพบว่าแอกติโนมัยสีทบางชนิดกระจายตัวบริเวณรอบรากพืช ซึ่งดินบริเวณรอบรากเป็นบริเวณที่มีอิทธิพลกับรากพืชและเป็นบริเวณที่มีกิจกรรมของจุลินทรีย์สูง โดยรากพืชจะหลั่งสารกระตุ้นการเจริญของแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรค ในขณะที่แอกติโนมัยสีทจะใช้สารที่หลั่งจากรากในการเจริญและสังเคราะห์สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Crawford *et al.*, 1993) สามารถพบแอกติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่จากรากพืชได้

เช่น *Pseudonocardia rhizophila* (Li et al., 2010) *Sphaerisporangium siamense* (Duangmal et al., 2011) และ *Nonomuraea rhizophila* (Zhao et al., 2011)

## 2.2.2 การกระจายของแอกติโนมัยสีทในพืช (endophytic actinomycetes)

แอกติโนมัยสีทที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพืช และสามารถพบได้ในส่วนต่างๆของพืช โดยไม่เป็นอันตราย เนื่องจากรากพืชสัมผัสกับดิน แอกติโนมัยสีทกลุ่มนี้เรียกว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท (endophytic actinomycetes) (Hasegawa et al., 2006) การคัดแยกสามารถทำได้โดยการฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเนื้อเยื่อพืชหรือสกัดจากเนื้อเยื่อพืชด้านใน (Hallmann et al., 1997)

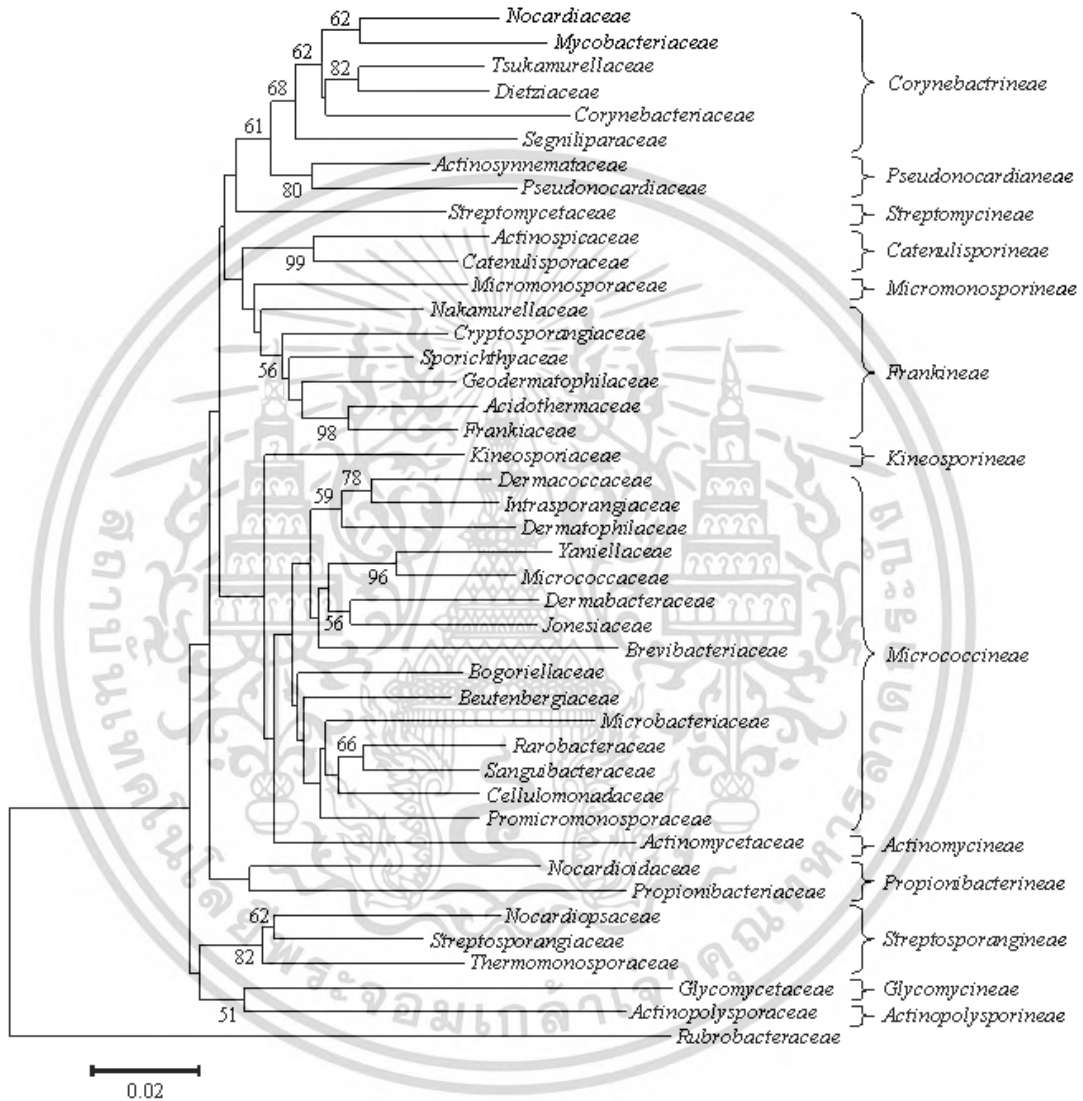
*Frankia* เป็นเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทสกุลแรกที่มีรายงานการค้นพบในปมรากของ *Comptonia peregrina* (Callaham, 1978) มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนในกลุ่มพืชที่ไม่ใช่ตระกูลถั่ว (non-leguminous plants) ส่วนเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทสกุลอื่นๆ ที่พบ เช่น *Nocardia Micromonospora Microbispora Actinoplanes Streptosporangium Streptoverticillium* และ *Saccharomonospora* เป็นต้น (Petrolini et al., 1991 ; Tian et al., 2004 ; Cao et al., 2005) ทั้งนี้สกุลที่พบได้มากที่สุดจากเนื้อเยื่อพืช คือ สกุล *Streptomyces* โดย Sardi et al. (1992) ได้แยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท จากรากพืชได้ จำนวน 49 ไอโซเลต พบว่าร้อยละ 96 เป็นสกุล *Streptomyces* ส่วนที่เหลือเป็นสกุล *Nocardia Micromonospora* และ *Streptosporangium* Taechowisan et al. (2003) ได้ทำการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท จำนวน 330 ไอโซเลต จากรากพืชสมุนไพรของไทย 26 ชนิด พบว่าส่วนใหญ่เป็นสกุล *Streptomyces* และส่วนที่เหลือเป็นสกุล *Microbispora Nocardia* และ *Micromonospora* Petrolini et al. (1991) ได้รายงานการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 1755 ไอโซเลต จากรากพืชจำนวน 205 ตัวอย่าง 156 ชนิด พบว่าร้อยละ 80 เป็นสกุล *Streptomyces* และที่เหลือพบเป็นสกุลอื่นๆ เช่น *Micromonospora Actinoplanes Streptosporangium Streptoverticillium* และ *Saccharomonospora* จากการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากรากข้าวสาลีของ Coombs and Franco (2003) พบว่าเชื้อที่แยกได้จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces Microbispora Micromonospora* and *Nocardiodes* นอกจากนี้ Cao et al. (2004) และ Tian et al. (2004) ยังพบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* พบมากในกล้วย (*Musa acuminata*) และข้าว

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะและสารทุติยภูมิอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ได้ โดย Vercesi et al. (1992) ได้คัดแยก *Streptomyces* spp. จากส่วนต่างๆ ของ grapevine berries ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งยีสต์และราที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน Taechowisan et al. (2003) ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราจากเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ จำนวน 330 ไอโซเลต ดังที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ พบว่าร้อยละ 0.6-13.2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum musae* และ *Fusarium oxysporum* นอกจากนี้ยังพบเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* สามารถสร้างสาร fistupyrone ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา และสารกลุ่ม munumbicins A B C และ D ที่มีฤทธิ์แบบกว้าง (broad spectrum) ต่อเชื้อแบคทีเรีย (Igarashi et al., 2000 ; Castillo et al., 2002)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทพบได้ในพืชหลายชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ได้ให้ความสนใจกับพืชสมุนไพรไทยคือพืชวงศ์ขิงซึ่งรายละเอียดของพืชในวงศ์นี้อยู่ในหัวข้อ 2.6 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน class *Actinobacteria* sub-class *Actinobacteridae* order *Actinomycetales* โดย Zhi *et al.* (2009) ได้จัดหมวดหมู่แบคทีเรียใน class *Actinobacteria* โดยใช้ 16S rRNA gene sequence เปรียบเทียบกันซึ่งสมาชิกของแอกติโนมัยสีท ถูกแบ่งออกเป็น 13 suborder และ 42 families ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของเชื้อในอันดับ *Actinomycetales*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) ทำโดยใช้วิธีการศึกษาอนุกรมวิธานแบบพอลิฟาสิก (polyphasic taxonomy) ซึ่งประกอบด้วยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics) การศึกษาลักษณะทางเคมีไทป์ (chemotaxonomic characteristics) และการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการจัดหมวดหมู่ (classification) ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทได้ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

### 2.4.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์

ลักษณะทางฟีโนไทป์ คือ ลักษณะต่างๆ ที่ปรากฏให้เห็น เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) ลักษณะการเจริญ (cultural characteristic) ลักษณะทางชีวเคมี และสรีรวิทยา (biochemical and physiological characteristic) โดยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของแอกติโนมัยสีท มีดังต่อไปนี้

#### 2.4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันมากที่สุด ในหมู่แบคทีเรียชนิดอื่น โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่นำมาศึกษา เช่น สีของเส้นใยทั้งเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (soluble pigment) การแตกกิ่งก้านของเส้นใย การสร้างเส้นใยอากาศ การแบ่งตัวของเส้นใย และการสร้างสปอร์ที่มีลักษณะแตกต่างกัน (เช่น ชนิดของสปอร์ ตำแหน่งของสปอร์ และการเรียงตัวของสปอร์) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันนี้สามารถนำมาใช้จัดหมวดหมู่แอกติโนมัยสีทในระดับสกุลได้ (Shirling and Gottlieb, 1966) โดยสามารถตรวจดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์ได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance objective lens) กำลังขยาย 40 เท่า และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (scanning electron microscope) ตรวจดูสีของเส้นใยและสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้โดยเลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหารต่างๆ ที่ระบุใน International *Streptomyces* Project (ISP) (Shirling and Gottlieb, 1966) แล้วเทียบสีกับ the NBS-ISCC Colour System (Kelly, 1958)

#### 2.4.1.2 ลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยา

การทดสอบลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยา เช่น การทดสอบความสามารถในการใช้หรือย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ การรีดิวซ์ไนเตรต การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ความสามารถในการเจริญในสภาวะความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ และการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ สามารถนำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยสีทได้ (Shirling and Gottlieb, 1966 ; Arai, 1975)

## 2.4.2 การศึกษาลักษณะทางเคมีทั่วไป

การวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ซึ่งเป็นพื้นฐานของอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomy) สามารถนำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์และจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทได้ (Komakata and Suzuki, 1987) โดยศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน (amino acid) น้ำตาล (sugar) ไขมันชนิดมีขั้ว (polar lipid) กรดไขมัน (fatty acid) กรดมัคคอลลิก (mycolic acid) มีนาควิโนน (menaquinone) และองค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอ (DNA base)

### (1) องค์ประกอบของผนังเซลล์

แอกติโนมัยซีทมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) โครงสร้างพื้นฐานของเปปติโดไกลแคนประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 2 ชนิด ได้แก่ *N*-acetylmuramic acid และ *N*-acetylglucosamine และมีกรดอะมิโนเชื่อมอยู่กับ *N*-acetylmuramic acid โดยจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนที่พบจะแตกต่างกันในแอกติโนมัยซีทแต่ละชนิด ซึ่งในการจัดหมวดหมู่แอกติโนมัยซีทจะใช้ลักษณะไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิก (diaminopimelic acid) และชนิดของเอซิล (*N*-acyl types) ของกรดมิวรามิค (muramic acid) ที่พบบริเวณผนังเซลล์มาใช้ในการจัดหมวดหมู่ โดยชนิดของกรดอะมิโนต่างๆ ที่พบแสดงในตารางที่ 2.1 (Lechevalier and Lechevalier, 1970) ชนิดของกรดอะมิโนที่พบในเปปติโดไกลแคนนี้เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการจัดหมวดหมู่ของแอกติโนมัยซีท โดยกรด 2, 6-ไดอะมิโนพิเมลิก (2, 6-diaminopimelic acid ; DAP) เป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ในเปปติโดไกลแคน มีไอโซเมอร์ 2 แบบ คือ แบบ *LL* และแบบ *meso* โดยในผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีทจะมีกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่มีไอโซเมอร์ได้เพียง 1 ชนิดเท่านั้น ซึ่งอาจจะเป็นชนิดใดชนิดหนึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของแอกติโนมัยซีท สามารถตรวจสอบกรดไดอะมิโนพิเมลิกได้โดยการวิเคราะห์จากทั้งเซลล์ ซึ่งไอโซเมอร์ของกรด ไดอะมิโนพิเมลิกจะถูกแยกโดยใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) หรือใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบเซลลูโลส (cellulose thin-layer chromatography) (Komagata and Suzuki, 1987)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนมัยซีท

Cell wall type	DAB	lysine	ornithine	aspartic acid	glycine	<i>meso</i> -DAP	<i>LL</i> -DAP	arabinose	galactose
I	-	-	-	-	+	-	+	-	-
II	-	-	-	-	+	+**	-	-	-
III	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IV	-	-	-	-	-	+	-	+	+
V	-	+	+	-	*	-	-	-	-
VI	-	+	-	+	*	-	-	-	-
VII	+	+	-	+	*	-	-	-	-
VIII	-	-	-	+	*	-	-	-	-

หมายเหตุ : + คือ แสดงการตรวจพบ, \* คือ อาจตรวจพบหรือไม่พบ glycine,

\*\* คือ อาจตรวจพบ hydroxy DAP, DAB คือ 2,4-diaminobutyric acid,

DAP คือ 2,6-diaminopimelic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### (2) น้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (Whole-cell sugars)

ชนิดของน้ำตาลที่พบในเซลล์เป็นข้อมูลที่มีถูกนำไปใช้ในการจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอคติโนมัยซีท สามารถตรวจสอบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ได้โดยการวิเคราะห์จากทั้งเซลล์ ซึ่งน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์จะถูกแยกโดยใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) หรือใช้แผ่นโครมาโตกราฟีแบบเซลลูโลส (cellulose thin-layer chromatography) (Komagata and Suzuki, 1987) ในการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดที่พบในเซลล์ รูปแบบชนิดของน้ำตาลที่พบสามารถช่วยในจำแนกลักษณะทางเคมีของผนังเซลล์ (Lechevalier and Lechevalier, 1970) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 รูปแบบชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ของแอคติโนมัยซีทซึ่งผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิมลิกแบบ *meso*

Type	Diagnostic sugar			
	arabinose	galactose	madurose	xylose
A	+	+	-	-
B	-	-	+	-
C	No diagnostic sugar			
D	+	-	-	+

### (3) ไขมันชนิดมีขั้ว (Phospholipids)

ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ มีความสัมพันธ์ต่อการควบคุมการเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ฟอสโฟลิปิดมีลักษณะเป็นแอมฟิพาติก (amphipatic) เนื่องจากในโมเลกุลมีทั้งส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ซึ่งประกอบด้วยกรดฟอสฟอริก (phospholic acid) การวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดนิยมทำโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ดีเวลอปแบบ 2 มิติ (two-dimention) ซึ่งจุด (spot) ของฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดที่ตรวจพบจะจำเพาะกับรีเอเจนต์ (reagent) ชนิดต่างๆ โดยชนิดของฟอสโฟลิปิดที่ตรวจพบสามารถใช้ในการจัดหมวดหมู่ของแอคติโนมัยซีทได้ (Komagata and Suzuki, 1987) โดยรูปแบบของฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ (Lechevalier *et al.*, 1977) แสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ชนิดของฟอสโฟลิปิดที่พบในแอคติโนมัยซีท

Phospholipids type	PIM	PI	PC	PG	PE	PME	GluNu	APG	DPG
I	+	+	-	V	-	-	-	V	V
II	+	+	-	V	+	-	-	V	+
III	V	+	+	V	V	+	-	V	V
IV	V	+	-	-	V	V	+	-	+
V	V	+	-	-	V	-	+	V	+

หมายเหตุ : PIMs, phosphatidyl inositol mannosides; PI, phosphatidyl inositol; PC, phosphatidyl choline; PE, phosphatidyl ethanolamine; PME, phosphatidyl methyl ethanolamine; GluNu, glucosamine containing unknown phospholipids; APG, acyl phosphatidyl glycerol; DPG, diphosphatidyl glycerol; V, variable; -, absent; +, present

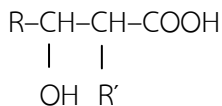
#### (4) กรดไขมันในเซลล์ (cellular fatty acid)

กรดไขมัน (fatty acid) เป็นองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นแอมฟิพาติก (amphipathic) คือ ปลายข้างหนึ่งประกอบด้วยกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ (hydrophilic head) และปลายอีกข้างหนึ่งประกอบด้วยกรดไขมัน 2 ตัว ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (hydrophobic tail) กรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) แอคติโนมัยซีทแต่ละสายพันธุ์จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันต่างชนิดกัน โดยรูปแบบของกรดไขมันที่พบสามารถใช้ในการจัดหมวดหมู่ของแอคติโนมัยซีทได้ (Komagata and Suzuki, 1987) สามารถแยกกรดไขมันที่พบในเซลล์ได้โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) และวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันเทียบกับฐานข้อมูลของ Microbial Identification System (MIDI)

#### (5) กรดมัคคอลลิก (mycolic acid)

กรดมัคคอลลิก คือ กรดไขมันที่มีหมู่แอลคิลเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และมีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (2-alkyl-3-hydroxy fatty acids) (รูปที่ 2.2) ประกอบด้วยคาร์บอน 24-90 อะตอม มักพบในสกุล *Mycobacterium* *Nocardia* *Rhodococcus* และ *Corynebacterium* กรดมัคคอลลิกจะพบอยู่ในแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์ชนิดที่ IV (มีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิมิลิกเป็นแบบ meso ที่ผนังเซลล์ และมีน้ำตาลอะราบิโนส และกาแลกโตสภายในเซลล์) กรดมัคคอลลิกสามารถใช้ในการจำแนกเชื้อในระดับสกุลได้ กรดมัคคอลลิกที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีหลายชนิด เช่น ไกลโคลิปิด (glycolipids) ฟีนอลิกไกลโคลิปิด (phenolic glycolipids) หรือไกลโคเปปติโดลิปิด (glycopeptidolipids) (Komagata and Suzuki, 1987)

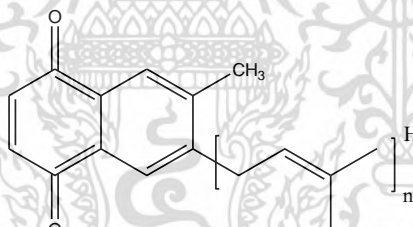
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของกรดมัยคอลลิก

### (6) ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinone)

ไอโซพรีนอยด์ควิโนน มีความสำคัญต่อระบบขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ ควิโนน (quinones) หลายชนิดพบในเซลล์แบคทีเรีย ไอโซพรีนอยด์ควิโนนชนิดที่พบได้มากที่สุด คือ มีนาควิโนน (menaquinones) (รูปที่ 2.3) และยูบิควิโนน (ubiquinones) ชนิดของควิโนนและจำนวนหน่วยของไอโซพรีน (isoprene units) ในสายโซ่ และระดับของการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) ของพันธะคู่ในหน่วยไอโซพรีน ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอคติโนมัยซีท การตรวจวิเคราะห์ชนิดของควิโนนและปริมาณหน่วยของไอโซพรีนทำได้โดยใช้เครื่องแมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry, MS) และพบว่าการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography, HPLC) ร่วมกับการใช้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางชนิดกลับเฟส (reverse-phase thin-layer chromatography) สามารถวิเคราะห์ควิโนนได้อย่างรวดเร็ว และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงยังใช้แยก และตรวจสอบองค์ประกอบที่มีปริมาณน้อย รวมทั้งยังใช้สำหรับการวิเคราะห์ควิโนนในเชิงปริมาณได้ (Komagata and Suzuki, 1987 ; Collins *et al.*, 1977)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของมีนาควิโนน

### (7) องค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอ (DNA base composition)

ดีเอ็นเอประกอบด้วยเบส 4 ชนิด คือ อะดีนีน (A) กวานีน (G) ไซโตซีน (C) และไทมีน (T) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการจำแนกและระบุชนิดของแอคติโนมัยซีทในระดับสกุล และอาจจะระบุได้ถึงระดับสปีชีส์ โดยทั่วไปองค์ประกอบพื้นฐานของจีโนมแบคทีเรียมีปริมาณเบส G+C ตั้งแต่ร้อยละ 25-80 ซึ่งแอคติโนมัยซีทมีปริมาณเบส G+C ในจีโนมสูง จึงสามารถแยกแอคติโนมัยซีทออกจากแบคทีเรียอื่นๆ ได้ นอกจากนี้องค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอของสายพันธุ์เดียวกันยังมีค่าอยู่ในช่วงแคบ (1 -3 mol% G+C) ดังนั้นความแตกต่างขององค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอจึงสามารถบอกความแตกต่างกันของจีโนม และสามารถบอกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ได้ (Tamaoka, 1994)

### 2.4.3 การศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์

ข้อมูลในสารพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อแบคทีเรีย มีความสำคัญต่อการศึกษาการจัดหมวดหมู่ (systemetic) ของแบคทีเรียเป็นอย่างมาก การจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียมักนิยมศึกษาข้อมูลของ 16S rRNA gene บนสายดีเอ็นเอ เพื่อสืบหาสายวิวัฒนาการของเชื้อโดยการวิเคราะห์จากต้นไม้แห่งสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

#### (1) ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene

สิ่งมีชีวิตสองชนิดอาจไม่ใกล้ชิดกันมากพอที่จะมีดีเอ็นเอที่คล้ายกันมาก แต่ก็ยังมีไรโบโซมที่คล้ายกัน ไรโบโซมเป็นโครงสร้างเล็กๆ ภายในเซลล์ ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมประกอบด้วยโปรตีนและไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (rRNA) ไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ สร้างโดยอาศัยคำสั่งจากดีเอ็นเอส่วนไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิสตรอน (rRNA cistron) ในแบคทีเรียทุกชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene พบว่ามีความคงตัวสูงมาก แม้จะมีวิวัฒนาการมานานแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์จะเปลี่ยนไปน้อยมาก ซึ่งหมายความว่าแม้สิ่งมีชีวิตสองตัวจะมีความใกล้ชิดกันน้อยและไม่ดีเอ็นเอที่คล้ายกัน แต่ก็ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอซิสตรอนคล้ายกัน ความคล้ายคลึงกันนี้สามารถใช้เป็นเครื่องวัดความใกล้ชิดระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ในระดับสกุล (genus) วงศ์ (family) และอันดับ (order)

#### (2) DNA-DNA hybridization

DNA-DNA hybridization เป็นวิธีทางอ้อมในการเปรียบเทียบจีโนมของเชื้อ 2 สายพันธุ์ ซึ่งปัจจุบันค่า DNA-DNA relatedness ที่สูงกว่าร้อยละ 70 ถูกใช้เป็นเกณฑ์ที่ยอมรับสำหรับการกำหนดสายพันธุ์ให้เป็นสายพันธุ์เดียวกัน (Wayne *et al.*, 1987)

## 2.5 สารทุติยภูมิและการสังเคราะห์สารทุติยภูมิจากแอคติโนมัยซีท

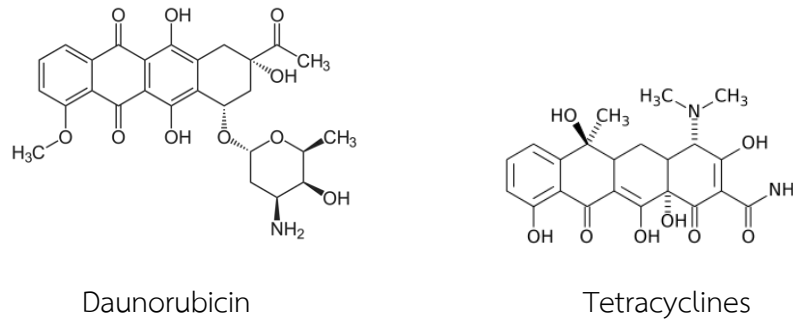
เป็นที่ทราบกันดีว่าแอคติโนมัยซีทสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย โดยในกลุ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มาจากจุลินทรีย์ประมาณ 22,500 ชนิดนั้น พบว่ามาจากแอคติโนมัยซีทประมาณ 10,100 ชนิด (Berdy, 2005 ; Dharmaraj, 2010) ซึ่งสารที่ได้จากแอคติโนมัยซีทนั้นส่วนใหญ่ได้มาจากสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นสกุลที่พบการกระจายตัวอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม รวมถึงมีจำนวนสปีชีส์มากที่สุดในบรรดาแอคติโนมัยซีททั้งหมด (Dharmaraj, 2010) โดยสารกลุ่มหลักที่แอคติโนมัยซีทสร้างขึ้นนั้น คือ สารในกลุ่มโพลีคีไทด์ (ร้อยละ 40 ของทั้งหมด) (Hranueli *et al.*, 2001) โดยโพลีคีไทด์เป็นสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างหลากหลายทั้งแบบวงแหวนอะโรมาติก (aromatic) ไปจนถึงวงแหวนแลคโตนที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่ (macrocyclic lactones) ซึ่งสารเหล่านี้เกิดขึ้นจากการควบแน่น (condensation) หน่วยของอะซิเตต (acetate) มาโลเนต (malonate) และโพรไพโอเนต (propionate) ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ที่เรียกว่า โพลีคีไทด์ซินเทส (polyketide synthases, PKSs) ซึ่งเอนไซม์โพลีคีไทด์ซินเทสนี้เป็นตัวกำหนดการสังเคราะห์สารตั้งแต่การเลือกหน่วยเริ่มต้น (starter unit) และหน่วยต่อเติม (extender unit) ความยาวของสายคาร์บอน การสร้างวงแหวนในโครงสร้างสาร ระดับของกระบวนการรีดักชัน และการสิ้นสุดการสังเคราะห์ เมื่อการทำงานของเอนไซม์โพลีคีไทด์ซินเทสสิ้นสุดลงจะเกิดกระบวนการต่อเติมโครงสร้างโดยเอนไซม์อื่นๆ ขึ้นภายหลัง เช่น การเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation) การเติมหมู่เอซิล (acylation) การเติมหมู่แอลคิล (alkylation) และกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ทำให้สารโพลีคีไทด์มีโครงสร้างที่หลากหลาย (Ridley and Khosla, 2009)

### 2.5.1 สารทุติยภูมิกลุ่มโพลีคีไทด์

ตัวอย่างของสารโพลีคีไทด์ที่ใช้เป็นยาที่มีประสิทธิภาพในทางคลินิก ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ (erythromycin A, rifamycin S) ยาต้านมะเร็ง (rapamycin) ยาต้านเชื้อรา (amphotericin B) ยาต้านปรสิต (ivermectin) และยาต้านมะเร็ง (doxorubicin) โดยกลุ่มของสารโพลีคีไทด์ที่สร้างจากแอคติโนมัยซีท มีดังนี้

#### 1) กลุ่มอะโรมาติกโพลีคีไทด์ (aromatic polyketides)

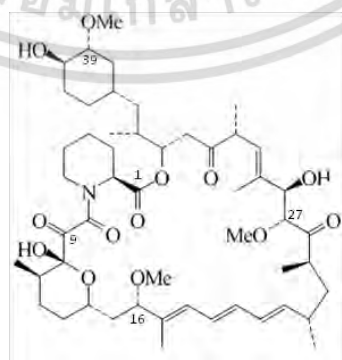
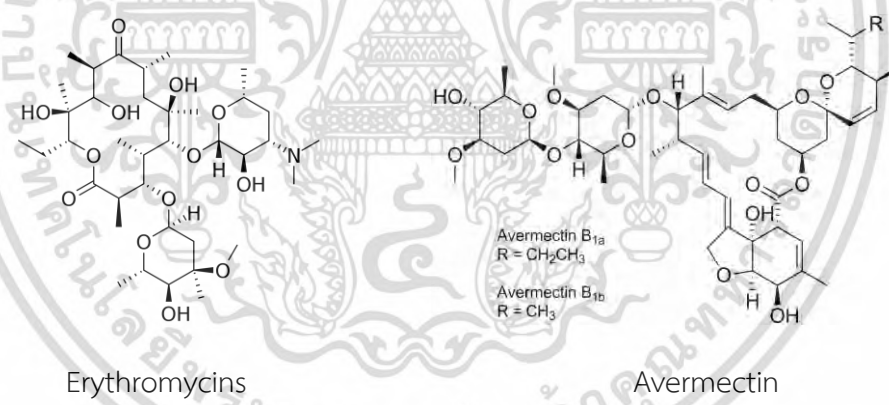
สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก โดยส่วนใหญ่ถูกสังเคราะห์โดยเอนไซม์โพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 2 จาก *Streptomyces* (Rohr and Hertwec, 2010) ตัวอย่างสารอะโรมาติกโพลีคีไทด์จากแอคติโนมัยซีท เช่น daunorubicin (รูปที่ 2.4) จาก *Streptomyces peuetius* ซึ่งใช้เป็นยาต้านเซลล์มะเร็ง (Weiss, 1992) สารกลุ่ม tetracyclines (รูปที่ 2.4) จาก *Streptomyces* เป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum) ออกฤทธิ์แบบยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic) โดยไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Finlay *et al.*, 1950 ; Sneader, 2005) และสารกลุ่ม pradimicins จาก *Actinomadura spinosa* และ *Actinomadura hibisa* มีฤทธิ์กว้างในการยับยั้งเชื้อราและไวรัส (Walsh and Giri, 1977)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของสารกลุ่มอะโรมาติกโพลีคีไทด์ที่สร้างจากแอคติโนมัยซีท

2) กลุ่มแมคโครไลด์ (macrolides)

สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างเป็นวงแหวนแลคโตนขนาดใหญ่ โครงสร้างมักมีโมเลกุลของน้ำตาลมาเชื่อมต่อ ตัวอย่างของสารกลุ่มแมคโครไลด์ที่สร้างจากแอคติโนมัยซีท เช่น erythromycins (รูปที่ 2.5) จาก *Saccharopolyspora erythraea* ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (El-Enshasy *et al.*, 2008) avermectin (รูปที่ 2.5) ซึ่งได้จาก *Streptomyces avermectinius* มีศักยภาพในการฆ่าพยาธิและเป็นสารฆ่าแมลง (Takahashi *et al.*, 2002) และ rapamycin (รูปที่ 2.5) มีฤทธิ์ดัดภูมิคุ้มกัน ซึ่งแยกได้ครั้งแรกจาก *Streptomyces hygroscopicus* (Vezina *et al.*, 1975)



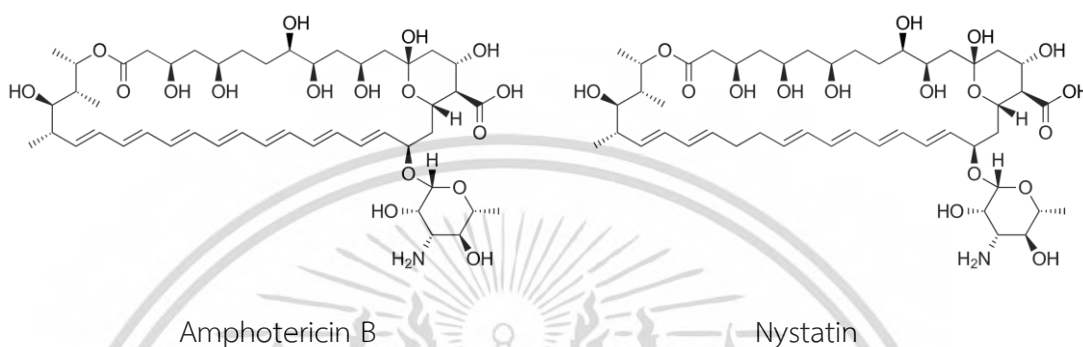
Rapamycin

รูปที่ 2.5 โครงสร้างของสารกลุ่มแมคโครไลด์ที่สร้างจากแอคติโนมัยซีท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3) แมคโครไซคลิกโพลีอิน (macrocyclic polyenes)

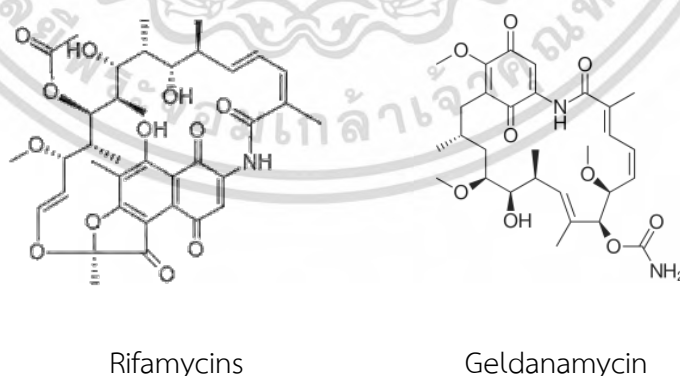
แมคโครไซคลิกโพลีอิน เป็นสารกลุ่มแมคโครไลด์ที่โครงสร้างมีพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยวหลายจุด (conjugated double bonds) ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ เช่น amphotericin และ nystatin (รูปที่ 2.6) จาก *Streptomyces nodosus* และ *Streptomyces noursei* ตามลำดับ ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อรา โดยออกฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์ (Hazen and Brown, 1950 ; Ab-Satah, 1996)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของสารกลุ่มแมคโครไซคลิกโพลีอินที่สร้างจากแอกติโนมัยซีท

### 4) กลุ่มแอนซามัยซิน (ansamycins)

โครงสร้างของสารกลุ่มแอนซามัยซินประกอบด้วยอะโรมาติกโมเอตี (aromatic moiety) เชื่อมต่อกันด้วยสายอะลิฟาติก (aliphatic chain) โดยสารตัวแรกในกลุ่มนี้ที่ถูกค้นพบ คือ rifamycins (รูปที่ 2.7) จาก *Streptomyces mediterranei* ซึ่งมีศักยภาพในการต้านเชื้อวัณโรค (Margalith and Beretta, 1960) นอกจากนี้ยังมี geldanamycin (รูปที่ 2.7) จาก *Streptomyces hygroscopicus* ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Vega and Maio, 2003) โดยสารกลุ่มนี้ถูกสังเคราะห์มาจากเอนไซม์โพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 (He *et al.*, 2006)

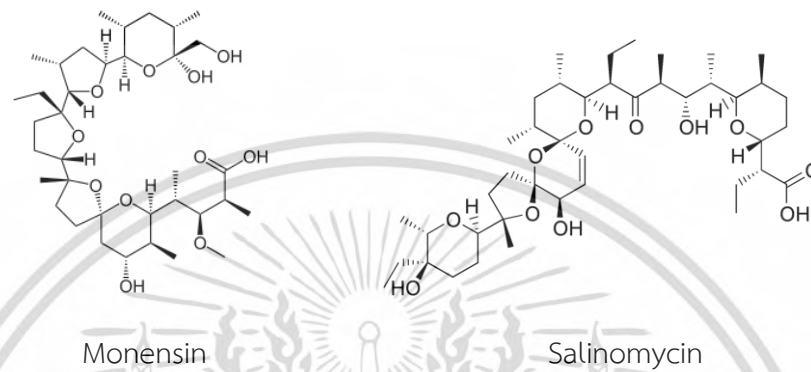


รูปที่ 2.7 โครงสร้างของสารกลุ่มแอนซามัยซินที่สร้างจากแอกติโนมัยซีท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 5) กลุ่มโพลีอีเทอร์ (polyethers)

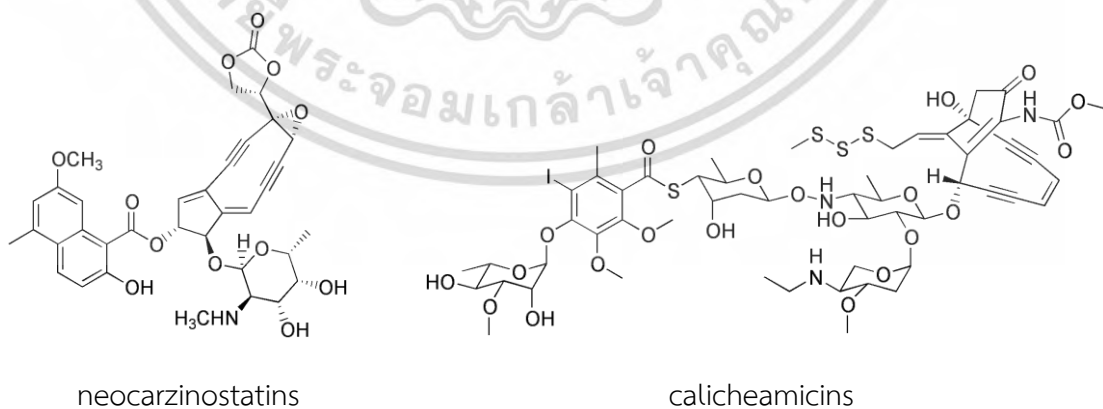
โครงสร้างของสารในกลุ่มโพลีอีเทอร์ประกอบด้วยอีเทอร์ (ether group) มากกว่าหนึ่ง พบว่าสร้างเฉพาะในแอกติโนไมซีท โดยมีฤทธิ์แบบกว้าง และมีศักยภาพที่โดดเด่นในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียดื้อยา ปรสิต และมะเร็ง ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ เช่น monensin (รูปที่ 2.8) จาก *Streptomyces cinnamomensis* และ salinomycin (รูปที่ 2.8) จาก *Streptomyces albus* และยังมี maduramycin จาก *Actinomadura rubra* (Droumev, 1983)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของสารกลุ่มโพลีอีเทอร์ที่สร้างจากแอกติโนไมซีท

### 6) กลุ่ม enediynes

enediynes เป็นกลุ่มสารจากธรรมชาติที่มีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็งและจุลินทรีย์ เช่น neocarzinostatins calicheamicins esperamicins dynemicins lidamycin และ kedarcidin เป็นต้น ตัวอย่างโครงสร้างของสารในกลุ่มนี้แสดงในรูปที่ 2.9 โดยสารกลุ่มนี้ถูกสังเคราะห์มาจากเอนไซม์โพลีคีโตนซินเทสชนิดที่ 1 แบบ Iterative แอกติโนไมซีทสกุลที่สร้างกลุ่มนี้ได้แก่ *Streptomyces Micromonospora* และ *Actinomadura* (Van-Lanen and Shen, 2008 ; Horsman et al., 2009)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของสารกลุ่ม enediynes ที่สร้างจากแอกติโนไมซีท

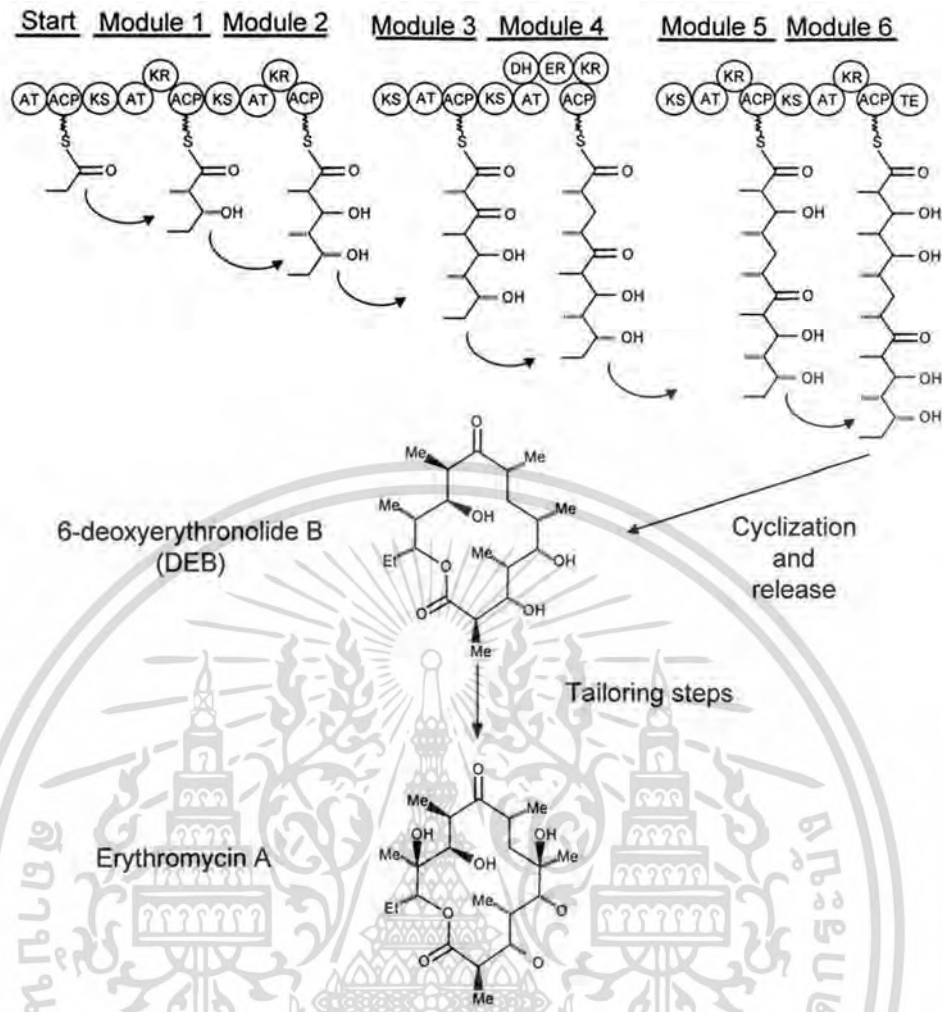
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5.2 เอนไซม์และยีนโพลีคีไทด์ซินเทส

เอนไซม์โพลีคีไทด์ซินเทส สามารถแบ่งกลุ่มได้ตามลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เอนไซม์เหล่านี้ถูกสังเคราะห์มาจากยีนโพลีคีไทด์ซินเทส โดยเอนไซม์แบ่งออกเป็น 3 ชนิด (Hill and Staunton, 2010 ; Hertweck, 2009) ดังนี้

2.5.2.1 เอนไซม์โพลีคีไทด์ซินเทส ชนิดที่ 1 (type I PKSs) เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

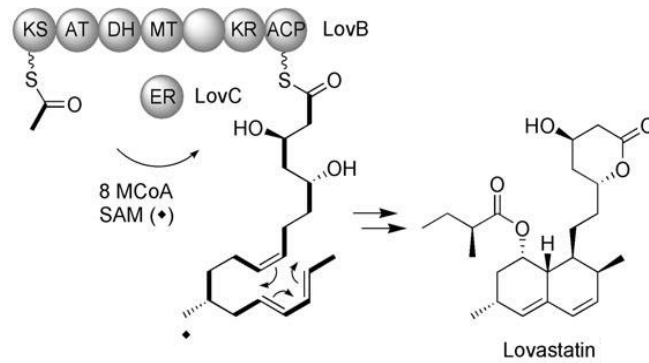
1) modular type I PKSs เอนไซม์นี้มีขนาดใหญ่และมีหลายหน้าที่ (multifunctional enzyme) ประกอบด้วยหลายโมดูล (module) แต่ละโมดูลประกอบด้วยโดเมน (domain) หลักอย่างน้อย 3 โดเมน ได้แก่ คีโตซินเทส (KS) เอซิลทรานสเฟอเรส (AT) และเอซิลแคริเออร์โปรตีน (ACP) แต่ละโมดูลอาจจะประกอบด้วยโดเมนที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการเกิดรีดักชันของหมู่คีโต ได้แก่ คีโตรีดักเทส (KR) ดีไฮดราเทส (DH) และอีโนอีลรีดักเทส (ER) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนหมู่คีโตเป็นไฮดรอกซิล (hydroxyl) อีโนอีล (enoyl) และอัลคิล (alkyl) ตามลำดับ โดยอาจมีหรือไม่มีโดเมนเหล่านี้ก็ได้ สารโพลีคีไทด์ที่สังเคราะห์ได้จากเอนไซม์นี้จะมีโครงสร้างเป็นวงแหวนแลคโตน ตัวอย่างของเอนไซม์นี้ คือ การสังเคราะห์ erythromycin (รูปที่ 2.10) โดยเอนไซม์ 6-deoxyerythronolide B synthase (DEBS) เริ่มจากการสร้างสายโพลีคีไทด์จากหน่วยเริ่มต้น 1 โมเลกุล คือ propionyl-CoA และหน่วยต่อเติม 6 โมเลกุล คือ methylmalonyl-CoA เรียงตามลำดับการทำงานของแต่ละโมดูลอย่างต่อเนื่องจนถึงโมดูลสุดท้าย โดยเอนไซม์นี้มี 6 โมดูล แต่ละโมดูลมีโดเมนหลัก คือ KS AT และ ACP นอกจากโดเมนหลักนี้แล้วในโมดูลที่ 1 2 5 และ 6 ยังมีโดเมน KR ซึ่งทำหน้าที่รีดิวซ์หมู่คีโตไปเป็นหมู่ไฮดรอกซิล ขณะที่โมดูลที่ 4 มีทั้งโดเมน DH ER และ KR ทำหน้าที่รีดิวซ์หมู่คีโตไปเป็นพันธะเดี่ยว แต่สำหรับโมดูลที่ 3 ไม่มีโดเมน KR ทำให้มีหมู่คีโตคงอยู่ ส่วนหน้าของโมดูลที่ 1 เป็นโดเมนเริ่มต้นประกอบด้วย AT และ ACP ทำหน้าที่ส่งหน่วยเริ่มต้นและหน่วยต่อเติมตัวแรกเข้ามาที่ DEBS ส่วนที่ปลายของโมดูลที่ 6 มีโดเมนไทโอเอสเทอเรส (TE) ทำหน้าที่ปล่อยสายโพลีคีไทด์ที่สังเคราะห์เสร็จสมบูรณ์แล้วเชื่อมกันเป็นวงแลคโตนของ 6-deoxyerythronolide B (6dEB) จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการดัดแปลงในตอนท้าย (post-modification) โดยเอนไซม์อื่นที่ไม่ใช่โพลีคีไทด์ซินเทส ได้แก่ การเติมหมู่ไฮดรอกซิล และน้ำตาลให้เป็น erythromycin A ซึ่งมีสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะต่อไป (Donadio *et al.*, 1991)



รูปที่ 2.10 การสังเคราะห์ erythromycin และการเรียงตัวของเอนไซม์ DEBS (Hopwood, 1997)

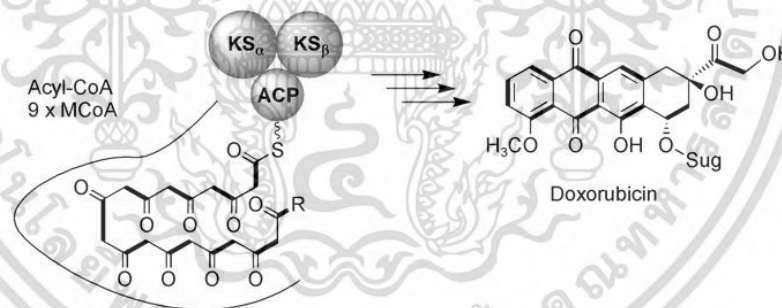
2) Iterative type I PKSs เอนไซม์ประกอบด้วยโดเมนที่เรียงต่อกัน ได้แก่ KS AT DH MT (methyl transferase) KR และ ACP โดยมีบางโดเมนทำหน้าที่สังเคราะห์สารซ้ำๆ ระดับการเกิดกระบวนการรีดักชันสามารถเปลี่ยนแปลงได้ในแต่ละหน่วยของการสังเคราะห์ โดยโครงสร้างที่สร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก เช่น สารกลุ่ม enediynes ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ คือ การสังเคราะห์ lovastatin ซึ่งพบในเชื้อรา (รูปที่ 2.11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 การสังเคราะห์ lovastatin และการเรียงตัวของเอนไซม์ (Hertweck, 2009)

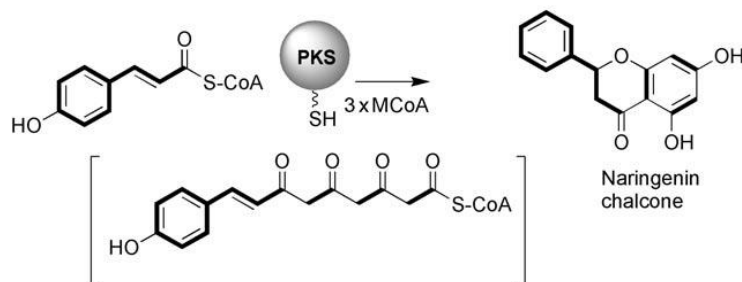
2.5.2.2 เอนไซม์โพลีคีไทด์ซินเทส ชนิดที่ 2 (type II PKSs) หรือ iterative polyketide synthases ประกอบด้วยโดเมนเดี่ยวหลายชนิดที่มีหน้าที่ต่างกัน โดยแต่ละโดเมนจะทำหน้าที่แยกออกจากกัน โดยมีเอนไซม์หลักคือ KS และ ACP สำหรับ KS จะมีสองหน่วยคือ  $KS_{\alpha}$  และ  $KS_{\beta}$  โดย  $KS_{\alpha}$  ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการควบแน่น ส่วน  $KS_{\beta}$  ทำหน้าที่เป็น chain length determination factor นอกจากนี้ยังประกอบด้วย KR และ cyclase/aromatase เพื่อสร้างวงแหวนอะโรมาติก เอนไซม์ชนิดนี้จะสร้างสายโพลีคีไทด์สั้นๆ ตามความยาวที่กำหนด สารโพลีคีไทด์ที่สังเคราะห์ได้จากเอนไซม์นี้จะมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกหลายวงต่อกัน ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ คือ การสังเคราะห์ doxorubicin จาก *Streptomyces peucetius* (รูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.12 การสังเคราะห์ doxorubicin และการเรียงตัวของเอนไซม์ (Hertweck, 2009)

2.5.2.3 เอนไซม์โพลีคีไทด์ซินเทส ชนิดที่ 3 (type III) ประกอบด้วยโดเมน KS เป็นหลัก ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการควบแน่น และไม่อาศัย ACP ในการทำงาน สามารถทำงานได้โดยตรงจากสารตั้งต้นซึ่งเป็น CoA-thioester เอนไซม์นี้คล้ายกับเอนไซม์ซาลโคเนซินเทส (chalcone synthase, CHS) ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์สารตั้งต้นของฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ในพืช สารโพลีคีไทด์ที่สังเคราะห์ได้จากเอนไซม์นี้จะมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกขนาดเล็ก ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ คือ การสังเคราะห์ naringenin chalcone ในพืช (รูปที่ 2.13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 การสังเคราะห์ naringenin chalcone และการเรียงตัวของเอนไซม์ (Hertweck, 2009)

## 2.6 พืชวงศ์ขิง

พืชวงศ์ขิง เป็นพืชในวงศ์ *Zingiberaceae* ที่มีสมาชิกมากที่สุดในอันดับ *Zingiberales* มีสมาชิกประมาณ 52 สกุล มากกว่า 1,300 ชนิด (Delin and Larsen, 2000) และในประเทศไทยพบว่ามีประมาณ 26 สกุล 300 ชนิด (Larsen and Larsen, 2006) พืชวงศ์ขิงเป็นพืชสมุนไพรที่มีกลิ่นหอม (aromatic herb) พบเจริญในพื้นที่ชุ่มชื้นเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ซึ่งมีความหลากหลายมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พืชวงศ์ขิงหลายชนิดมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ใช้สำหรับผลิตเป็นเครื่องเทศ น้ำหอม สีย้อม อาหาร และยา หลายชนิดใช้ปลูกเป็นไม้ประดับหรือเป็นไม้ตัดดอก ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา มีรายงานหลายฉบับที่ตีพิมพ์เกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชวงศ์ขิง เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดระบบภูมิคุ้มกัน (Norajit *et al.*, 2007 ; Sekiwa *et al.*, 2000 ; Nguefack *et al.*, 2004 ; Jirovetz *et al.*, 2003 ; Scartezini *et al.*, 2000 ; Negi *et al.*, 1999)

ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากพืชวงศ์ขิงที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น น้ำมันจากรากของข่า (*Alpinia galanga*) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticarcinogenic) (Zheng *et al.*, 1993) น้ำมันหอมระเหยจาก *Kaempferia galanga* มีที่มฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Asolkar, 1992) สารที่แยกได้จากขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoria*) คือ Ethyl-p-methoxy cinnamate มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Trichophyton rubrum* *Aspergillus niger* *Aspergillus fumigatus* *Epidermophyton floccosum* *Penicillium purpurogenum* *Saccharomyces cerevisiae* *Trignopsis variabilis* *Microsporum gypseum* *Sclerotium rolfsii* *Geotricular candidae* และ *Fusarium oxysporum* (Gupta *et al.*, 1976) สารที่ได้จากขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีที่เรียกว่า turmerin เป็นสารต้านมะเร็ง ลดไข้ และลดอาการแพ้ (anti-allergic) และ curcumin ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และต้านการอักเสบ (Srimal and Dhawan, 1973 ; Wilken *et al.*, 2011) และนอกจากนี้เหง้าของขมิ้นชันยังมีประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย (Velayudhan *et al.*, 1994)

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 และยังสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป้องกันโรคให้กับพืชที่พวกมันอาศัยอยู่ด้วย อีกทั้งเป็นต้นแบบในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ต่างๆ ในธรรมชาติบางชนิดนอกจากการผลิตสารปฐมภูมิ (primary metabolite) แล้วยังสามารถผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่มีคุณสมบัติด้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น ต้านเชื้อรา (antifungal) และต้านแบคทีเรีย (antibacterial) ที่ก่อโรคในคน สัตว์ หรือในพืช (Brunner และ Pertrini, 1992) จุลินทรีย์เอนโดไฟต์เป็นเชื้อที่ไม่ทำอันตรายต่อพืชอาศัย และยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้และในทางตรงกันข้ามยังช่วยต้านทานหรือป้องกันการเกิดโรคพืชบางชนิดให้กับพืชที่จุลินทรีย์อาศัย จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ประกอบด้วยแบคทีเรีย รา และแอกติโนมัยซีท ซึ่งสามารถพบได้ในพืชเกือบทุกชนิดบนโลก (Strobel และ Daisy, 2003) เนื่องจากเอนโดไฟต์อาศัยอยู่กระจายในเนื้อพืช เอนโดไฟต์อาจจะสร้างสารที่มีศักยภาพมาใช้ในทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม โดยสารที่ค้นพบใหม่หลายชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะ ยาต้านเชื้อ ยากดภูมิคุ้มกัน และสารต้านเซลล์มะเร็ง ที่ค้นพบเมื่อไม่นานมานี้เป็นสารที่ได้มาจากจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ ดังนั้นเอนโดไฟต์จึงเป็นแหล่งทรัพยากรสำคัญสำหรับการค้นหาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคในมนุษย์ สัตว์ และพืช ได้เป็นอย่างดี

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการสร้างเส้นใย (filamentous bacteria) มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (Mol% G+C) สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป (มากกว่าร้อยละ 55) สามารถสร้างสปอร์ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม แอกติโนมัยซีทมีลักษณะที่คล้ายกับเชื้อราเนื่องจากการสร้างเส้นใยและมีการสร้างสปอร์ แต่ก็มีลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อรา คือ เซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสจึงจัดเป็นสิ่งมีชีวิตพวกโพรคาริโอตต่างจากเซลล์ของเชื้อราที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส นอกจากนี้เชื้อแอกติโนมัยซีทยังมีการสร้างเส้นใยที่มีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของเชื้อรา (Coyne, 1999) โคลนินของแอกติโนมัยซีทมีลักษณะที่จำเพาะและมีความแตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่น เนื่องจากในสภาวะที่ถูกนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เส้นใยมักเจริญอัดกันแน่นเป็นก้อนแข็งและมีบางส่วนฝังอยู่ในเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ โคลนินของเชื้อแอกติโนมัยซีทหลายสายพันธุ์ส่วนใหญ่มักปกคลุมไปด้วยเส้นใยอากาศที่มีลักษณะเป็นฝุ่นผงแห้ง เส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศมักมีสีเฉพาะในแต่ละสายพันธุ์ บางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (soluble pigments) (Miyadoh, 1997) เชื้อแอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ อาจสร้างเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ หรือสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวโดยไม่มีสิ่งห่อหุ้มสปอร์ เรียกว่า โคนินเดี่ยว (conidia) อยู่บนเส้นใยอากาศหรือบางสกุลอาจสร้างสปอร์ภายในโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายถุงซึ่งห่อหุ้มสปอร์ไว้ เรียกว่า สปอร์แรงเจียม (sporangium) (Coyne, 1999) แอกติโนมัยซีทมักจะสร้างสปอร์เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญแต่เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญ เช่น มีสารอาหารเพียงพอ มีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม สปอร์จะงอกและขยายไปเป็นเส้นใย (Miyadoh, 1997) แอกติโนมัยซีทไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic) ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบอิสระ (saprophyte) สามารถเจริญได้โดยอาศัยการย่อยสลายสารอินทรีย์ มีบางชนิด เช่น ในสกุล Frankia จะอาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชและต้นไม้ใหญ่ช่วยในการตรึงไนโตรเจน (Coyne, 1999) แอกติโนมัยซีทมีการกระจายตัวอยู่มากในหลายพื้นที่ทั้งในดิน แหล่งน้ำ ฝุ่นละออง และยังสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเรียกว่า เอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีท (endophytic actinomycetes) โดยเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้เป็นแหล่งทรัพยากรที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากสามารถพบเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีท สกุล *Streptomyces* และเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โนมัยสีทหายากสกุลอื่นๆ (Zhao et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่และค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จำนวนมากจากเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทในพืชหลายชนิด (Bieber et al., 1998 ; Castillo et al., 2002 ; Gu et al., 2006 ; Duangmal et al., 2008 ; Igarashi et al., 2007) สารสำคัญที่ผลิตได้จากเชื้อแอกติโนมัยสีทนอกจากแสดงฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะแล้ว ยังมีรายงานว่ายังสามารถแสดงฤทธิ์ด้านต่างๆ ด้วยเช่น สารเจลดานามัยซินที่แยกจากเชื้อ *Streptomyces* sp. สามารถแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ที่ความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ (Tadtong et al. 2007) ประเทศไทยมีพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย เช่น มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ต้านเชื้อวัณโรค ต้านเชื้อก่อโรคมะเร็ง ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ต้านอนุมูลอิสระ ระงับอาการปวด ต้านการอักเสบ และมีฤทธิ์ปกป้องและกระตุ้นเซลล์ประสาท เป็นต้น (Rahman, 2000 ; Wilken et al., 2011 ; Lakshmanan et al., 2011) มีความเป็นไปได้ว่าเชื้อแอกติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรนี้จะมีส่วนร่วมในวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) ของพืชสมุนไพร และสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดที่คล้ายกับพืชสมุนไพรหรือสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้ (Zhao et al., 2011) ในปัจจุบันงานวิจัยเพื่อค้นหาสารปกป้องเซลล์ประสาทจากเชื้อแอกติโนมัยสีทแต่มีรายงานไม่มากนัก เช่น Geldanamycin (Tadtong et al. 2007), Flaviogeranin (Hayakawa et al., 2010) และ 3-normeridamycin (Summer et al., 2006) จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าประเทศไทยมีสมุนไพรหลายชนิดที่แสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ดี เช่น พืชวงศ์ขิง โดยเฉพาะขมิ้น พืชสมุนไพรดังกล่าวนี้มีการทำวิจัยเพื่อศึกษาความหลากหลายของเอนโดไฟติก แอกติโนมัยสีทอยู่น้อยมาก คาดว่าเชื้อเหล่านี้อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยโดยเนื้อเยื่อพืชเป็นแหล่งที่อยู่และแหล่งอาหาร ส่วนเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจะช่วยสร้างสารทุติยภูมิบางชนิดเพื่อป้องกันพืชจากเชื้อก่อโรคพืชหรือศัตรูพืชชนิดต่างๆ จากการศึกษาสารทุติยภูมิที่สร้างจากพืชและจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชพบว่าสารทุติยภูมิหลายชนิดที่สร้างจากพืชสมุนไพรมีเส้นทางการสร้างมาจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ที่คล้ายกันหรือเหมือนกันกับสารทุติยภูมิที่สร้างจากจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช จึงเป็นที่มาของแนวคิดที่ว่าสารทุติยภูมิที่สร้างจากพืชสมุนไพร แท้ที่จริงแล้วอาจสร้างมาจากจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นหากพืชสมุนไพรนั้นผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ ก็อาจจะเป็นว่าสารนั้นอาจสร้างหรือผลิตได้จากจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรนั้นได้เช่นกัน หากเป็นเช่นนั้นเมื่อเราสามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่สร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากพืชสมุนไพรได้ ก็ถือว่าเราค้นพบแหล่งทรัพยากรจุลินทรีย์ชั้นเยี่ยมในการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทนั้น เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนและมีอัตราการเจริญที่รวดเร็วกว่าพืชมาก ดังนั้นการสร้างสารทุติยภูมิก็สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็วนั่นเอง แอกติโนมัยสีทเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สามารถสร้างสารที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุของโรคพืช สร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืช ผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายอินทรีย์สาร และมีบางชนิดมีประโยชน์ในแง่ของการตรึงไนโตรเจน (Valois et al., 1996) ในธรรมชาติแอกติโนมัยสีทมีความสามารถในการสร้างสารที่มีบทบาทต่อสิ่งแวดล้อมที่พวกมันอาศัยอยู่ เพื่อเหตุผลในการดำรงชีวิตอยู่ของพวกมัน เช่น การสร้างสารยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตอื่น การสร้างเอนไซม์หลายชนิดเพื่อย่อยสลายอินทรีย์ต่างๆ และการสร้างสารส่งเสริมการเจริญ เป็นต้น ซึ่งกิจกรรมเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ในหลายด้าน เช่น ทางทางด้านการแพทย์ ทางด้านการเกษตร และทางด้านอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น การนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิชีวนะ แอคติโนมัยสีทเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด (Birdy, 2005) สารปฏิชีวนะที่เชื้อแอคติโนมัยสีทผลิตขึ้น มีความหลากหลายสูงทั้งด้านโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ชีวภาพ สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทมีหลายกลุ่ม โดยสารประกอบโพลีคีไทด์ (polyketide) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่เชื้อแอคติโนมัยสีทสร้างขึ้น และเป็นกลุ่มสารประกอบที่มีความหลากหลายทั้งทางโครงสร้างและสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การสังเคราะห์สารประกอบโพลีคีไทด์เริ่มจากการเชื่อมต่อสายคาร์บอนของสารในกลุ่ม acyl-coenzyme A ที่ละ 2 คาร์บอนจนเป็นสายยาว โดยคาร์บอนที่เข้ามาต่อนั้นมีตำแหน่งเบตา ( $\beta$ -carbon) เป็นหมู่คีโต (keto) เสมอ แต่อาจเกิดกระบวนการรีดักชัน (reduction) ที่หมู่คีโตนี้ ทำให้เปลี่ยนไปเป็นหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ การเกิดหมู่คีโตต่อกันเป็นโครงสร้างหลักเช่นนี้จึงเป็นที่มาของชื่อสารประกอบโพลีคีไทด์ (Hopwood and Sherman, 1990) แอคติโนมัยสีทเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้โดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ทั้งในอากาศ 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 tulbaghia* (Kirby and Meyers, 2010), *Nocardioides caricicola* (Song et al., 2011), *Pseudonocardia adelaidensis* (Kaewkla and Franco., 2010), *Phytohabitans suffuscus* (Inahashi et al., 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), *Jiangella alba* (Qin et al., 2009), *Kibdelosporangium phytohabitans* (Xing et al., 2012), *Pseudonocardia antimicrobica* (Zhao et al., 2012), *Allonocardiopsis opalescens* (Du et al., 2013), *Streptomyces zhaozhouensis* (He et al., 2014), *Sphaerisporangium rufum* (Mingma et al., 2014), *Micromonospora lycii* (Zhao et al., 2015) จากข้อมูลที่สืบค้นมายังไม่พบการรายงานการค้นพบเชื้อสปีชีส์ใหม่จากพืชวงศ์ขิงเลย การค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เป็นแหล่งที่อยู่และความทนทานต่อสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นในเซลล์ แอคติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่ถูกค้นพบมีแนวโน้มเป็นเชื้อสกุลและสปีชีส์ใหม่สูงจึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาเพื่อได้มาซึ่งสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง จากการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืช พบว่ามีเชื้อบางสกุลสามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และบางชนิดมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคได้ เช่น Alnumycin (Bieber et al., 1998), Cycloheximide (Huang et al., 2011), Antitumor anthraquinones (Igarashi et al., 2007), Spoxazomicins A–C (Inahashi et al., 2011), Linfuranone A (Indananda et al., 2013), Diastaphenazine (Li et al., 2015) Trehangelins A (Nakashima et al., 2013)

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคอุบัติใหม่ที่พบมากในกลุ่มผู้สูงอายุในปัจจุบันและพบได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โรคอัลไซเมอร์เกิดจากการที่เซลล์ประสาทถูกทำลายจากอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นจากการเหนี่ยวนำของเบต้า-อะไมลอยด์ ( $\beta$ -Amyloid ( $\beta$ A)- induced oxidative stress) ดังนั้นการป้องกันการเกิดโรคจึงมุ่งไปที่การเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สวนวลาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้านอนุมูลอิสระที่จะเกิดขึ้น (Kim *et al.*, 2001) สารที่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทมีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากสภาวะ oxidative stress ซึ่งส่งผลให้เซลล์ประสาทถูกทำลาย ดังเช่นที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นการเลือกนำเอาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ดี น่าจะส่งผลให้สารเหล่านั้นมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทที่ดีด้วยเช่นกัน การงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) มีผลต่อการทำงานของระบบประสาท โดยจะช่วยเพิ่มการส่งสัญญาณประสาทได้ (Lin *et al.*, 2009) โดยในร่างกายจะมีสาร nerve growth factor (NGF) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นให้มีการสร้าง microtubule และช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) (Yang *et al.*, 2008) สารชนิดนี้จะทำให้เซลล์ประสาทมีแขนงประสาทเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ระบบประสาทสามารถเกิด synapse ได้มากขึ้น การส่งสัญญาณประสาทก็จะเกิดได้ดีขึ้น การค้นหาสารที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ NGF นี้จะสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (neurodegenerative disorders) ได้ การศึกษาเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) นั้นนิยมใช้เซลล์เพาะเลี้ยง เช่น PC12 (Zhang, 2007), PC12D (Wang *et al.*, 2006) และ N2A (Mak *et al.*, 2000) เป็นแบบจำลองในการทดสอบ โดยจะวัดผลจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และการเกิดแขนงประสาทขึ้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการนำเอาเซลล์เพาะเลี้ยง P19 ซึ่งเป็น murine embryonic carcinoma cell มากระตุ้นด้วยวิตามินเอให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทมาใช้เป็นแบบจำลองในการทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวได้อีกด้วย (Mak *et al.*, 2000) ตัวอย่างสารที่มีการค้นพบว่ามีฤทธิ์ช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) เช่น scoparone เป็นสารที่แยกได้จากเปลือกของต้น *Liriodendron tulipifera* พบว่าสาร scoparone ความเข้มข้น 200  $\mu\text{M}$  สามารถทำให้เซลล์ PC12 เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) ได้ (Lin *et al.*, 2009) สาร panaxynol ที่แยกได้จาก *Panax notoginseng* ก็สามารถทำให้เซลล์ PC12D เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) ได้เช่นกัน โดยความเข้มข้นที่ให้ผลที่ดีที่สุดคือ 8  $\mu\text{M}$  เนื่องจากสามารถทำให้แขนงประสาทที่เกิดขึ้นมีความยาวมากที่สุดอีกด้วย (Zhang, 2007) สาร 1,4,5,6-tetrahydroxy-7,8-di(3-methylbut-2-enyl) xanthone ที่แยกได้จากเนื้อไม้ *Garcinia xanthochymus* ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  ก็สามารถทำให้เซลล์ PC12D เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) ได้เช่นกัน (Wang *et al.*, 2006) สารที่ช่วยทำให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาทนอกจากจะพบได้ในพืชแล้ว ยังมีรายงานการค้นพบสารเหล่านี้จากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในดินและเนื้อเยื่อพืชถูกค้นพบว่ามีแนวโน้มเป็นเชื้อสกุลและสปีชีส์ใหม่สูง จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาเพื่อได้มาซึ่งสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง จากการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทในดินพบว่ามีเชื้อบางสกุลสามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และบางชนิดมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคได้ (Tadtong *et al.* 2007) สารสำคัญที่ผลิตได้จากเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทนอกจากแสดงฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะแล้ว ยังมีรายงานว่ายังสามารถแสดงฤทธิ์ด้านต่างๆ ด้วยเช่น สารเจลดาโนมายซินที่แยกจากเชื้อ *Streptomyces* sp. (Tadtong *et al.* 2007), Flaviogeranin (Hayakawa *et al.*, 2010) และ 3-normeridamycin (Summer *et al.*, 2006) สามารถแสดงฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาทได้ สมุนไพรไทยหลายชนิด เช่น พืชวงศ์ขิง โดยเฉพาะขิง ไพล เปราะป่า ขมิ้น หน่อกะลาเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย เช่น มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ต้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้ท่านใช้ประโยชน์ในการศึกษาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไวรัสโรค ต้านเชื้อก่อโรคมาลาเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ต้านอนุมูลอิสระ ระวังอาการปวด ปกป้องเซลล์ประสาท และต้านการอักเสบ เป็นต้น (Rahman, 2000 ; Wilken et al., 2011 ; Lakshmanan et al., 2011) มีความเป็นไปได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรนี้จะมีส่วนร่วมในวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) ของพืชสมุนไพร และสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดที่คล้ายกับพืชสมุนไพรหรือสามารถสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้ (Zhao et al., 2011) ทำให้พืชสมุนไพรเหล่านี้เป็นพืชที่มีความน่าสนใจในการนำมาคัดแยกเพื่อศึกษาความหลากหลาย ตลอดจนคัดกรองฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท ซึ่งในปัจจุบันยังมีการศึกษาอนุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทเพียงเล็กน้อย ด้วยลักษณะอันจำเพาะของแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาตินี้อาจส่งผลให้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากสายพันธุ์ใหม่และ/หรือสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การเก็บตัวอย่างพืช การแยก และการเก็บรักษาเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

##### 3.1.1 การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างพืชวงศ์ขิงจำนวน 20 ชนิดจากหลายพื้นที่ใน 8 จังหวัดของประเทศไทย (ตารางที่ 3.1) โดยทำการเก็บตัวอย่างพืชที่มีความสมบูรณ์ปราศจากโรคลงในถุงพลาสติกสะอาดและนำกลับสู่ห้องปฏิบัติการ จากนั้นล้างเศษดินออกจากตัวอย่างพืชด้วยน้ำประปาและเก็บตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการแยกเชื้อ

##### 3.1.2 การแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

ตัดแบ่งชิ้นส่วนพืชวงศ์ขิงออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ ราก เหง้า ลำต้น และใบ จากนั้นทำการตัดแต่ละชิ้นส่วนให้มีขนาด 1×1×1 เซนติเมตร นำแต่ละชิ้นส่วนที่ตัดแล้วล้างด้วยสารละลาย tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 เป็นเวลา 30 วินาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อโดยล้างด้วยเอทานอล (ethanol) ความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 10 นาที (สำหรับใบและลำต้น) หรือ 13 นาที (สำหรับเหง้าและราก) แล้วล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 10 นาที (สำหรับใบและลำต้น) หรือ 13 นาที (สำหรับเหง้าและราก) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง บดตัวอย่างที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วด้วยโกร่งที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไปผสมเล็กน้อย ศึกษารายละเอียดที่ได้อีกที่ลงบนอาหาร starch casein agar (ภาคผนวก ก) อาหารสูตรดัดแปลง humic acid-vitamin agar (ภาคผนวก ก) และอาหารสูตรดัดแปลง soil extract agar (Suriyachadkun *et al.*, 2009; ภาคผนวก ก) ที่เติมยาปฏิชีวนะกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนสแตติน (nystatin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เทอไบนาฟิน (terbinafin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำน้ำที่ใช้ล้างชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อในครั้งสุดท้ายมาเพาะลงบนอาหารดั่งที่กล่าวมานี้ด้วยเพื่อเป็นชุดควบคุม (control) บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

หลังจากบ่มจานอาหารเพาะเชื้อจนครบเวลา 30 วันแล้ว ตรวจสอบและคัดเลือกโคโลนีของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า นำเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนและทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) โดยเลี้ยงบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP 2) (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างพืชวงศ์ขิงที่เก็บได้จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย

ตัวอย่างพืช	รหัส	แหล่งที่เก็บ
<i>Alpinia galangal</i> (Galangal ; ข่า)	AS1 AG2	อำเภอลาดบัวหลวง จังหวัดอยุธยา อำเภอไชยวาน จังหวัดอุดรธานี
<i>Amomum krevanh</i> (Cardamom ; กระวาน)	AK1	สวนสมุนไพร อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก
<i>Alpinia nigra</i> (Kala ; กะลา)	AN1, AN3 AN2	เกาะเกร็ด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี สวนสมุนไพรกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี
<i>Alpinia purpurata</i> (Red Ginger ; ขิงแดง)	AP1	สวนสมุนไพรกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี
<i>Amomum xanthioides</i> (เร่ว)	AX1	สวนสมุนไพร อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก
<i>Boesenbergia rotunda</i> (Fingerroot ; กระชาย)	BR2 BR3	อำเภอลาดบัวหลวง จังหวัดอยุธยา อำเภอไชยวาน จังหวัดอุดรธานี
<i>Curcuma longa</i> (Turmeric ; ขมิ้นชัน)	CL1 CL2 CL3	สวนสมุนไพร อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี อำเภอประจันตคาม จังหวัดปราจีนบุรี
<i>Curcuma parviflora</i> (กระเจียวขาว)	CP1	อำเภอไชยวาน จังหวัดอุดรธานี
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> (ว่านขี้มดลูก)	CX1	สวนสมุนไพร อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก
<i>Curcuma zedoaria</i> (Zedoary ; ขมิ้นอ้อย)	CZ1	อำเภอไชยวาน จังหวัดอุดรธานี
<i>Etilingera elatior</i> (Torch ginger ; ตาหาลา)	EE1	สวนสมุนไพร อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก
<i>Hedychium coronarium</i> (Butterfly lily ; มหาหงส์)	HC1	อำเภอไชยวาน จังหวัดอุดรธานี
<i>Kaempferia elegans</i> (ว่านนกคุ้ม)	KE1 KE2	อำเภอไชยวาน จังหวัดอุดรธานี อำเภอรัญบุรี จังหวัดปทุมธานี
<i>Kaempferia galanga</i> (Sand ginger ; เปราะหอม)	KG1	สวนสมุนไพร อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก
<i>Kaempferia larsenii</i> (เปราะราศี)	KK1	อำเภอศรีเมืองใหม่ จังหวัดอุบลราชธานี
<i>Kaempferia marginata</i> (เปราะป่า)	KM1	อำเภอม่วงสามสิบ จังหวัดอุบลราชธานี
<i>Stahlianthus campanulatus</i> (ว่านดอกดิน)	SC1	อำเภอไชยวาน จังหวัดอุดรธานี
<i>Zingiber montanum</i> (Phlai ; ไพล)	ZM1 ZM2 ZM3	สวนสมุนไพร อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก สวนสมุนไพรกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี อำเภอไชยวาน จังหวัดอุดรธานี
<i>Zingiber officinale</i> (Ginger ; ขิง)	ZO1	สวนสมุนไพร อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก
<i>Zingiber zerumbet</i> (Shampoo Ginger ; กระเทียม)		สวนสมุนไพร อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก อำเภอประจันตคาม จังหวัดปราจีนบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.3 การเก็บรักษาเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

เก็บรักษาเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่บริสุทธิ์แล้ว โดยเลี้ยงในหลอดอาหารเอียง (slant) yeast extract-malt extract agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ศึกษา (working stock) และเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง soil extract agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน เพื่อกระตุ้นให้เชื้อสร้างสปอร์ จากนั้นตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญเก็บลงในหลอดที่บรรจุ สารละลายกลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลานาน

## 3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

การศึกษานุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท ประกอบด้วยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics) การศึกษาลักษณะทางเคโมไทป์ (chemotypic characteristics) และการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics) โดยเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีททั้งหมดที่แยกได้จะถูกนำมาศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์เพื่อจัดบันทึกรายละเอียดของเชื้อ (ยกเว้นการใช้แหล่งคาร์บอนจะทดสอบเฉพาะเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่ถูกคัดเลือก) และนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับสกุล (genus) โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene คัดเลือกเชื้อที่น่าสนใจโดยดูจากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับสกุลมาศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับสปีชีส์ (species)

### 3.2.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics)

การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) การศึกษาลักษณะการเจริญ (cultural characteristics) และ การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (biochemical and physiological characteristics) (Arai, 1975 ; Shirling and Gottlieb, 1966) ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

#### 3.2.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

นำเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดมาเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง soil extract agar โดยวิธี crosshatch streaks (Shirling and Gottlieb, 1966) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน หลังจากบ่มตรวจดูลักษณะของสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ส่องระยะใกล้ (Leica DM750, Leica, Germany) ด้วยกำลังขยาย 400 เท่า นำเชื้อที่ถูกคัดเลือกมาตรวจดูลักษณะสัณฐานวิทยาเพิ่มเติมโดยนำโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารสูตรดัดแปลง soil extract agar มาเตรียมตัวอย่างตามวิธีการของ Itoh *et al.* (1989) จากนั้นเคลือบผิวตัวอย่างด้วยอนุภาคทองคำโดยใช้เครื่อง ion coater และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) (JSM-5410 LV, JEOL, Japan)

### 3.2.1.2 การศึกษาลักษณะการเจริญ

ตรวจสอบลักษณะการเจริญของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมด โดยเลี้ยงบนอาหารต่างๆ (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก) ได้แก่ อาหาร yeast extract - malt extract agar (ISP2) อาหาร oatmeal agar (ISP3) อาหาร inorganic salts - starch agar (ISP4) อาหาร glycerol-asparagine agar (ISP5) อาหาร peptone-yeast extract iron agar (ISP6) อาหาร tyrosine agar (ISP7) อาหาร glucose asparagines agar อาหาร czapek's sucrose agar และอาหาร nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบสีของเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (soluble pigments) กับกระดาศสีมาตรฐาน NBS/IBCC color system (Kelly, 1964)

### 3.2.1.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

#### 3.2.1.3.1 ความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

เลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดบนอาหาร inorganic salts-starch agar (ISP4) (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก) ที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เทสารละลายไอโอดีนลงบนผิวอาหาร หากเชื้อสามารถย่อยแป้งได้จะเกิดโซนใสรอบโคโลนี ส่วนบริเวณที่ไม่ถูกย่อยจะเกิดสีน้ำเงิน

#### 3.2.1.3.2 ความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

เลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดในอาหาร bouillon gelatin broth (Arai, 1975; ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ตรวจสอบผลโดยนำหลอดอาหารไปวางที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หากมีการย่อยเจลาตินอาหารจะมีลักษณะเหลว หากไม่มีการย่อยเจลาตินอาหารจะมีลักษณะแข็ง

#### 3.2.1.3.3 ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction)

เลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดในอาหาร peptone  $\text{KNO}_3$  broth (Arai, 1975; ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรตโดยหยด sulfanilic acid (ภาคผนวก ข) จำนวน 2 หยด และสารละลาย *N,N*-dimethyl-1-naphthylamine (ภาคผนวก ข) จำนวน 3 หยด หากเชื้อมีการเปลี่ยนรูปไนเตรต ( $\text{NO}_3^-$ ) เป็นไนไตรต์ ( $\text{NO}_2^-$ ) สีของอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือสีแดง

#### 3.2.1.3.4 ความสามารถในการย่อยโปรตีนในนม (milk peptonization)

เลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดในอาหารเหลว skim milk ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนในนมได้อาหารจะมีลักษณะใส

### 3.2.1.3.5 การใช้แหล่งคาร์บอน (carbon utilization)

เลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่ถูกคัดเลือกบนอาหาร basal agar medium (ISP9) (Shirling and Gottlieb, 1966; ภาคผนวก ก) ซึ่งเติมแหล่งคาร์บอน (carbon sources) ความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบ มีดังนี้

ชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) คือ ไม่เติมแหล่งคาร์บอน

ชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) คือ D-glucose

D-cellobiose	D-fructose	D-galactose	D-mannose
D-melibiose	D-raffinose	D-ribose	D-salicin
D-xylose	L-arabinose	L-rhamnose	Glycerol
Inositol	Lactose	Mannitol	Sucrose

เตรียมเซลล์ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่ต้องการทดสอบ โดยล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 2 รอบ เพื่อล้างอาหาร yeast extract-malt extract agar ที่เชื้อใช้ในการเจริญออก หลังจากนั้นละลายเชื้อในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำสารละลายเชื้อที่ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวอาหารที่ต้องการทดสอบแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ กับการเจริญบนอาหารชุดควบคุมเชิงลบและชุดควบคุมเชิงบวก โดยบันทึกผลการตรวจสอบดังนี้

1) ผลบวก (positive utilization, +) เมื่อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบได้เท่ากับหรือดีกว่าชุดควบคุมเชิงบวก

2) ผลบวกอย่างอ่อน (weakly positive utilization, w) เมื่อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบได้ดีกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงลบแต่เจริญได้น้อยกว่าอาหารชุดควบคุมเชิงบวก

3) ผลลบ (negative utilization, -) เมื่อเจริญบนอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบได้เท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมเชิงลบ

### 3.2.1.3.6 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ (NaCl tolerance)

เลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่เติม NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 1-15 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลการเจริญของเชื้อ

### 3.2.1.3.7 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างในระดับต่างๆ (pH tolerance)

เลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 5 6 7 8 9 และ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลการเจริญของเชื้อ

3.2.1.3.8 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (temperature tolerance)

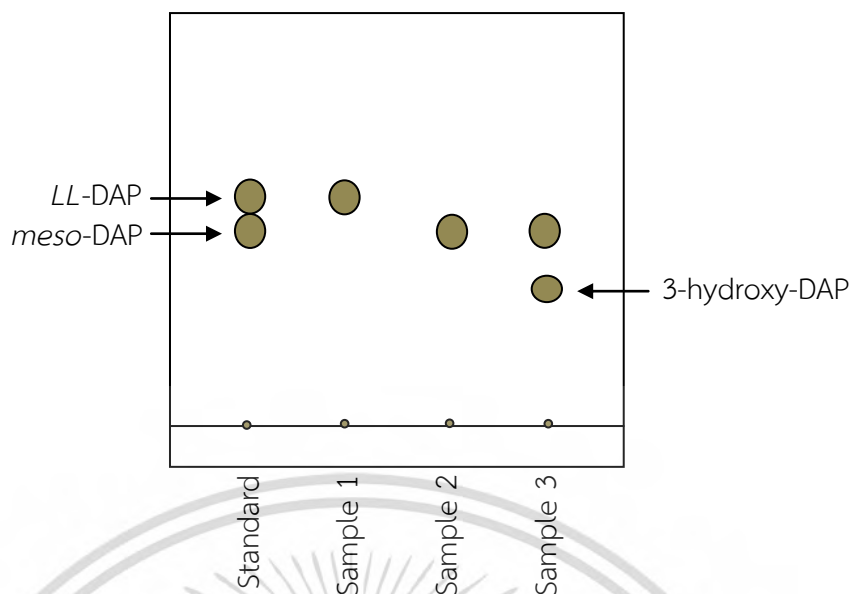
เลี้ยงเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 20 25 30 37 40 45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลการเจริญของเชื้อ

### 3.2.2 การศึกษาลักษณะทางเคมีโทป์ (chemotypic characteristics)

นำเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่ถูกคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหาร yeast extract-malt extract broth บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 5 ครั้ง และขั้นตอนสุดท้ายทำเซลล์ให้แห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) นำเซลล์แห้ง (freeze-dried cells) ที่ได้มาศึกษาลักษณะทางเคมีโทป์ในหัวข้อ 3.2.2.1 ถึง 3.2.2.7

#### 3.2.2.1 การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกที่ผนังเซลล์ (diaminopimelic acid analysis)

ย่อยเซลล์แห้งน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ด้วย 6N HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น จากนั้นกรอง แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยให้แห้งโดยเครื่อง rotary evaporator ละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไประเหยให้แห้งอีกครั้ง สุดท้ายละลายตัวอย่างที่แห้งด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน (2, 6-Diaminopimelic acid : mixture of *LL* and *meso* isomer ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จุดลงบนแผ่น HPTLC cellulose (Merck, no. 5716) ขนาด 10×10 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ที่ได้มาจุ่มลงในตัวทำละลายผสม methanol : water : 6N HCl : pyridine ในอัตราส่วน 80 : 26 : 4 : 10 ทิ้งไว้จนตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่ไปจนถึงขอบเขตที่กำหนด (ห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตร) รอให้แห้งแล้วดีเวลลอป (develop) ซ้ำอีก 1 ครั้ง นำแผ่น TLC ที่ได้มาฉีดพ่น (spray) ด้วย ninhydrin reagent (ภาคผนวก ข) รอให้แห้งแล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบจุดของสารที่เกิดขึ้นเทียบกับจุดของสารมาตรฐานกรดไดอะมิโนพิเมลิกไอโซเมอร์ต่างๆ (Komagata and Suzuki, 1987) โดยจุดของกรดไดอะมิโนพิเมลิกจะมีสีเขียวเข้ม ซึ่งตำแหน่งของ *meso*-DAP จะอยู่ต่ำกว่า *LL*-DAP และสูงกว่า 3-hydroxy-DAP ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ตำแหน่งไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมติกบนแผ่น HPTLC

### 3.2.2.2 การวิเคราะห์ชนิดของเอซิลที่ผนังเซลล์ (cell wall acyl type)

ย่อยเซลล์แห้งน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ด้วย 6N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากเย็นแล้วนำตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ที่บรรจุ Dowex ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$  form) ความสูง 5 เซนติเมตร ชะ (elute) ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 ไมโครลิตร 1 ครั้ง ตามด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง และสุดท้ายชะด้วย 0.5 N HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง นำสารละลายใน fraction สุดท้ายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลาย DON reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นผสมให้เข้ากันและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ให้เย็นในน้ำที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเย็นแล้วเติม 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน หากสารละลายที่ทดสอบมี glycolylmuramic acid สารละลายที่ทำการทดสอบจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ซึ่งจะมีค่าสูงกว่า 10 (Komagata and Suzuki, 1987)

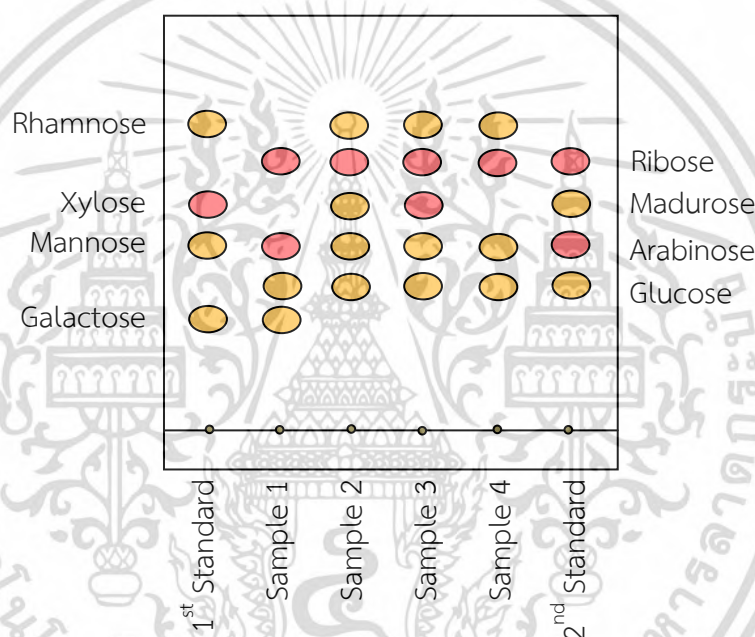
### 3.2.2.3 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (whole-cell sugar analysis)

ย่อยเซลล์แห้งน้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ด้วย 1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้สารละลายอิ่มตัวของแบเรียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ) จนมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.2-5.5 นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน แล้วนำส่วนใสด้านบนมาระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยเติมเอทานอล 1 ถึง 2 หยด ลงในตัวอย่าง เพื่อป้องกันการเกิดฟอง ละลายตัวอย่างที่แห้งแล้วด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้และสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จุดลงบนแผ่น HPTLC cellulose (Merck, no. 5716) ขนาด 10×10 เซนติเมตร นำแผ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ใช่อุปกรณ์ทางการแพทย์  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

: 6 : 1 ที่วิ่งตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่ไปจนถึงขอบเขตที่กำหนด (ห่างจากขอบ 1 มิลลิเมตร) รอให้แห้งแล้วตีเวลอปซ้ำอีก 1 ครั้ง นำแผ่น TLC ที่ได้มาฉีดยาด้วย aniline phthalate (ภาคผนวก ข) รอให้แห้งแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ตรวจสอบจุดและสีที่เกิดขึ้นเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน โดยน้ำตาลที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 5 อะตอม จะให้จุดสีชมพู ได้แก่ ribose xylose และ arabinose ส่วนน้ำตาลที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 6 อะตอม จะให้จุดสีเหลือง ได้แก่ rhamnose mannose glucose และ galactose (Komagata and Suzuki, 1987) ดังแสดงในรูปที่ 3.2

สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เตรียมเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย galactose mannose xylose และ rhamnose กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย glucose arabinose และ ribose



รูปที่ 3.2 ตำแหน่งและสีของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์บนแผ่น HPTLC

#### 3.2.2.4 การวิเคราะห์ไขมันชนิดมีขั้ว (polar lipid analysis)

ผสมเซลล์แห้งน้ำหนัก 150 มิลลิกรัม กับสารละลายผสม methanol :0.3%NaCl aq. (100:10) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียว จากนั้นเติม petroleum ether ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายด้านบนทิ้ง แล้ว petroleum ether ลงไปผสมอีก 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายด้านบนทิ้ง ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วแช่ให้เย็นในน้ำที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายผสม chloroform:methanol:water (90:100:30) ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันนาน 1 ชั่วโมง แยกเซลล์ออกจากส่วนใสโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเก็บลงในหลอดทดลองอันใหม่ สกัดส่วนเซลล์ซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายผสม chloroform:methanol:water (50:100:40) ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร นาน 30 นาที แล้วดูดส่วนใสที่

ได้ไปเก็บรวมกับส่วนใสในหลอดทดลองอันใหม่ข้างต้น ผสมส่วนใสที่ได้นี้กับ chloroform ปริมาตร

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายส่วนล่างไประเหยให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน

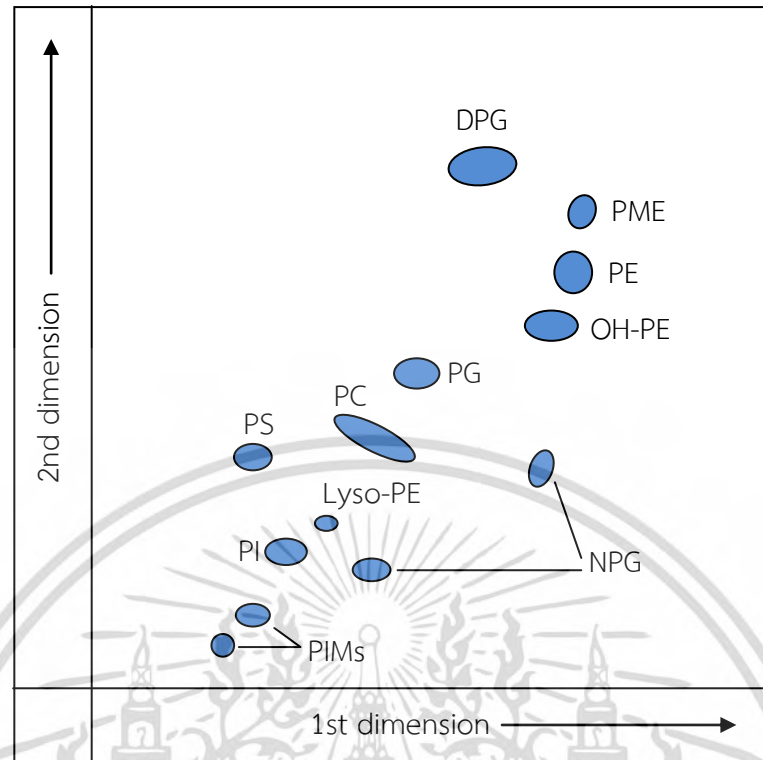
ละลายตัวอย่างด้วยสารละลายผสม chloroform:methanol (2:1) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร นำสารละลายไปจุดลงบนแผ่น TLC (silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck no. 105553) ขนาด 10x10 เซนติเมตร จำนวน 5 แผ่น นำแผ่น TLC ที่ได้มาตีเวลลอปแบบ 2 มิติ (two dimension) ในระบบตัวทำละลาย (solvent system) 2 ชนิด ดังนี้

ระบบตัวทำละลายที่ 1 : chloroform:methanol:water (65:25:4)

ระบบตัวทำละลายที่ 2 : chloroform:acetic acid:methanol:water (40:7.5:6:2)

ตรวจสอบจุดของไขมันชนิดมีขั้ว โดยการฉีดพ่นแผ่น TLC แต่ละแผ่นด้วยรีเอเจนต์ (reagent) ชนิดต่างๆ ดังแสดงด้านล่าง โดยตำแหน่งของไขมันชนิดมีขั้วบนแผ่น TLC เมื่อตีเวลลอปแบบ 2 มิติ แสดงดังรูปที่ 3.3

- 1) Phosphomolybdic acid (ภาคผนวก ข) เพื่อวิเคราะห์ไขมันทั้งหมด (จุดสีน้ำเงินเข้ม) โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากฉีดพ่น
- 2) Dittmer and Lester reagent (ภาคผนวก ข) เพื่อวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ทั้งหมด (จุดสีน้ำเงิน)
- 3) Ninhydrin reagent (ภาคผนวก ข) เพื่อวิเคราะห์ phosphatidylethanolamine (PE) และอนุพันธ์ เช่น lyso-PE OH-PE และ methyl-PE โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากฉีดพ่น
- 4) Anisaldehyde reagent (ภาคผนวก ข) เพื่อวิเคราะห์ glycolipids (จุดสีเขียวอมเหลือง) และไขมันชนิดอื่นๆ (จุดสีน้ำเงิน) โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากฉีดพ่น
- 5) Dragendroff's reagent (ภาคผนวก ข) เพื่อวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดที่มี choline เป็นส่วนประกอบ (phosphatidyl choline)



รูปที่ 3.3 ตำแหน่งของไขมันชนิดมีหัวบนแผ่น TLC ที่ดีเวลลอปแบบ 2 มิติ  
 คำย่อ : DPG, diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidylglycerol;  
 PME; phosphatidylmethylethanolamine;  
 PE; phosphatidylethanolamine;  
 OH-PE; hydroxyl-phosphatidylethanolamine;  
 Lyso-PE, lysophosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine;  
 PS, phosphatidylserine; PI, phosphatidylinositol;  
 PIMs; phosphatidylinositol mannosides;  
 NPG, ninhydrin-positive phosphoglycolipids

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.2.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (cellular fatty acid analysis)

เตรียม fatty acid methyl ester (FAME) ตามวิธีการมาตรฐานของ Sherlock Microbial Identification System (MIDI) (Sasser, 1990) โดยชั่งเซลล์แห้งน้ำหนัก 40 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่สะอาด เติม saponification reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมด้วยเครื่อง vortex นาน 5-10 วินาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วผสมอีกครั้ง 5-10 วินาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องด้วยการแช่ในน้ำ เติม methylation reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วผสมด้วยเครื่องเขย่า 5-10 วินาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องโดยแช่ในน้ำ เติม extraction reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และผสมด้วยเครื่องเขย่านาน 10 นาที ดูดสารละลายด้านบนใส่ลงในหลอดทดลองอันใหม่ แล้วผสมกับ base wash reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ถ้าเกิดอิมัลชันให้เติม saturated sodium chloride (ภาคผนวก ข) ลงไปเล็กน้อย นำส่วนใสด้านบนไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) Agilent 6850 series II (Agilent Technologies, USA) โดยใช้ HP-ULTRA2 column (25mx0.22mm i.d. x 0.33  $\mu$ m (film) capillary column (Agilent J&W GC Column, USA) มี hydrogen 99.999% เป็น carrier gas อัตราการไหล (flow rate) 30 มิลลิลิตร ต่อนาที มี nitrogen 99.999% เป็น makeup gas และมี air zero 99.999% ช่วยจุดเปลวไฟ สำหรับ flame ionization detector สำหรับโปรแกรมอุณหภูมิ (temperature program) ใช้ injector temperature ที่ 250 องศาเซลเซียส ส่วน oven temperature เริ่มต้นที่ 170 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 288 องศาเซลเซียส (อัตราการเพิ่ม 28 องศาเซลเซียสต่อนาที) หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 310 องศาเซลเซียส (อัตราการเพิ่ม 60 องศาเซลเซียสต่อนาที) แล้วค้างไว้ที่อุณหภูมิ 310 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.25 นาที และใช้ detector temperature ที่ 300 องศาเซลเซียส องค์ประกอบของ fatty acid methyl ester จะถูกเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Sherlock Microbial Identification System (MIDI) version 6.1.

### 3.2.2.6 การวิเคราะห์กรดมัคโคลิก (mycolic acid analysis)

ย่อยเซลล์แห้งน้ำหนัก 50-200 มิลลิกรัม ด้วย 10% KOH ใน MeOH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เติม 6 N HCl ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และสกัดด้วย n-hexane หรือ petroleum ether ปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดยใช้การเขย่า นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ลงในหลอดทดลองอันใหม่ สกัดสารละลายส่วนล่างซ้ำอีก 1 ครั้ง จากนั้นเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วละลายใน benzene : MeOH : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 : 20 : 1) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (methylation step) เมื่อเย็นแล้วผสมน้ำปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสกัดด้วย n-hexane โดยการเขย่า แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ แล้วสกัดสารละลายส่วนล่างซ้ำอีกครั้ง ระเหยสารละลายที่ได้ด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วละลายด้วย n-hexane ปริมาณเล็กน้อย จุดลงบนแผ่น Silica gel TLC (Merck 60 F254, 20x20 cm) ที่ได้ลงในตัวทำละลายผสม n-hexane : diethylether อัตราส่วน 4:1 แล้วรุมแผ่น TLC ด้วยควีนของไอโอดีน (I<sub>2</sub>) หรือฉีดพ่นด้วยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> แล้วอบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบโดยสังเกตจุดของสารที่เกิดขึ้น (Minnikin *et al.*, 1975)

### 3.2.2.7 การวิเคราะห์มีนาควิโนน (menaquinone analysis)

สกัดเซลล์แห้งน้ำหนัก 100-500 มิลลิกรัม ด้วยตัวทำละลายผสม chloroform:methanol (2:1) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน กรองตัวเซลล์ออกโดยใช้กระดาษกรอง whatman no.1 นำส่วนใสที่ได้มาทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส แล้วละลายด้วย acetone ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จุดสารละลายเป็นแถบยาวลงบนแผ่น silica gel TLC (Merck 60 F254, 20x20 cm) แล้วตีเวลลอปใน 100% benzene ตรวจสอบแถบของมีนาควิโนนภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จุด silica gel บริเวณที่ปรากฏแถบของมีนาควิโนน มาแช่ใน acetone ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองและเป่าให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนสุดท้ายละลายตัวอย่างที่แห้งด้วย acetone (HPLC grade) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้ COSMOSIL 5C<sub>18</sub> (4.6x150 mm) column (Nacalai Tesque, Japan) ใช้ตัวทำละลายผสม methanol:2-propanol (2:1) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ควบคุมอัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร (Collins *et al.* 1977)

### 3.2.2.8 การวิเคราะห์องค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอ (Analysis of DNA base composition)

#### 3.2.2.8.1 การสกัดและการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Tamaoka (1994) โดยนำเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่ถูกคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหาร yeast extract-malt extract broth บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 4-5 วัน จากนั้นเก็บเซลล์ลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ด้วย TE buffer (ภาคผนวก ข) 2 ครั้ง และละลายตัวเซลล์ใน TE buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติม lysozyme 20 มิลลิกรัม ลงไปผสมและบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หลังบ่มเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติม phenol:chloroform (1:1, v/v) (ภาคผนวก ข) แล้วผสมโดยการเขย่าด้วยมือเป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนและอื่นๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที จุดสารละลายด้านบนผสมกับ absolute ethanol ที่เย็นจัดในปริมาตร 2 เท่า เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ใช้แท่งแก้วพันเก็บดีเอ็นเอแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง เมื่อแห้งแล้วละลายลงใน TE buffer ทรีท (treat) ดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์ปราศจากอาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีน โดยเติม RNase A solution และ RNase T<sub>1</sub> solution (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 500 และ 5 ไมโครลิตร ตามลำดับ บ่มข้ามคืนใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติม proteinase K solution (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง กำจัดโปรตีนและอื่นๆ ด้วย phenol:chloroform แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้นอีกครั้ง ละลายดีเอ็นเอในสารละลาย 0.1X SSC (ภาคผนวก ข) แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.2.8.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ต้มลงในน้ำเดือดนาน 30 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว นำดีเอ็นเอนี้มาย่อยด้วย nuclease P<sub>1</sub> (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นย่อยด้วย alkaline phosphatase (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำดีเอ็นเอที่ย่อยแล้วไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้ Cosmosil 5C<sub>18</sub> (4.6IDx150 mm) column (Nacalai Tesque, Japan) ใช้ตัวทำละลายผสม 0.02 M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : acetonitrile (20:1, v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร (Tamaoka and Komagata, 1984) คำนวณองค์ประกอบของดีเอ็นเอเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard) ตามสูตรด้านล่าง ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ คือ Lambda DNA (Invitrogen, USA)

$$G+C \text{ mol\%} = \frac{100 \times (G_S/G_R + C_S/C_R)}{(A_S/A_R + G_S/G_R + C_S/C_R + T_S/T_R)} ; \begin{array}{l} S = \text{Peak area of sample} \\ R = \text{Peak area of standard} \end{array}$$

## 3.2.3 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics)

### 3.2.3.1 การวิเคราะห์ 16S rRNA gene

#### 3.2.3.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Tamaoka (1994) โดยนำเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหาร yeast extract-malt extract broth บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 4-5 วัน เก็บเซลล์ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ด้วย TE buffer และละลายใน TE buffer ปริมาตร 380 มิลลิลิตร เติม lysozyme ลงไปเล็กน้อยแล้วบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หลังจากบ่ม เติม 10% SDS ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม phenol:chloroform (1:1, v/v) (ภาคผนวก ข) ในปริมาตรเท่ากับสารละลายในหลอด แล้วเขย่าด้วยมือเป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนและอื่นๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที จากนั้นดูดสารละลายด้านบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ที่เย็นจัดในปริมาตร 2 เท่า ใช้แท่งแก้วพันเก็บดีเอ็นเอแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง เมื่อแห้งแล้วละลายใน Milli-Q water เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.2.3.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene ด้วยวิธี PCR โดยใช้ *Taq* DNA polymerase ตามวิธีการของ Trcek and Teuber (2002) ซึ่งสารที่ใช้ผสมใน 1 reaction (100 ไมโครลิตร) ประกอบด้วย DNA template ปริมาตร 2 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 units/ $\mu$ l) (Invitrogen, USA) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10x polymerase buffer (Invitrogen, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 25mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, USA) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร 2 mM dNTP (Invitrogen, USA) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร 10  $\mu$ M forward primer (20F: 5'-AGTTTGATCCTGGCTC-3') ปริมาตร 8 ไมโครลิตร 10  $\mu$ M reverse primers (1541R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') ปริมาตร 8 ไมโครลิตร และ Milli-Q water ปริมาตร 61.5 ไมโครลิตร นำสารผสมที่ได้มาทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยใช้เครื่อง T100™ thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, USA) โดยอุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละขั้น คือ initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing 52 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที เมื่อทำปฏิกิริยาครบ 40 รอบ ทำอุณหภูมิ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

นำผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ที่ได้ปริมาตร 3 ไมโครลิตร มาตรวจสอบโดยรันบน 0.8% agarose gel ที่ผสมสีย้อม SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA) (ภาคผนวก ข) รันใน 0.5X TBE buffer (ภาคผนวก ข) โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นตรวจสอบแถบ (band) ของ 16S rDNA โดยใช้เครื่อง UltraSlim® LED Illuminator (MaestroGen, USA)

### 3.2.3.1.3 การทำผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ให้บริสุทธิ์

ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ FavorPrep™ PCR purification kit (Favorgen, Taiwan) โดยนำ PCR product ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติม FADF Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายลงใน FADF column ที่มี collection tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้ง แล้วล้างด้วย Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งนาน 3 นาที เพื่อให้ FADF column แห้ง วาง FADF column ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์อันใหม่ สะดีเอ็นเอโดยหยด Elugation Buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงนาน 2 นาที เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.2.3.1.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene

นำ PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd (Malaysia) โดยใช้ BigDye® Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) เชื้อที่แยกได้ทั้งหมดจะใช้ไพรเมอร์ 518F (5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3') และ 800R (5'-TACCAGGGTA TCTAATCC-3') ส่วนเชื้อที่น่าสนใจจะเพิ่มไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')

#### 3.2.3.1.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และการสร้างแผนภาพสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกไพรเมอร์มาเชื่อมต่อกันโดยใช้โปรแกรม cap contig assembly ใน BioEdit (biological sequence alignment editor) software (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>; Hall, 1999) จากนั้นระบุตำแหน่งของเชื้อที่มีความใกล้เคียงโดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul *et al.*, 1997) เทียบกับฐานข้อมูลที่มีเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง (type strains) ใน EzTaxon-e server (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>; Kim *et al.*, 2012) ทำการจัดเรียง (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คัดเลือกจากฐานข้อมูลของ EzTaxon โดยใช้ CLUSTAL W version 1.81 (Thompson *et al.*, 1994) ใน BioEdit software จากนั้นลบช่องว่าง (gap) และนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ออก สุดท้ายสร้างแผนภาพสายวิวัฒนาการโดยใช้ neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) ใน MEGA 7 software (Kumar *et al.*, 2016) ซึ่งค่าความเชื่อมั่น (confidence values) ถูกกำหนดโดย bootstrap (Felsenstein, 1985) โดยทำการสุ่มเป็นจำนวน 1000 ครั้ง หาค่าความใกล้เคียงกัน (similarity) กับเชื้อสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด โดยใช้ EzTaxon-e server

#### 3.2.3.2 การทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชัน (DNA-DNA hybridization)

นำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ผ่านการทรีตด้วย RNaseA RNase T1 และ Proteinase K (ดูหัวข้อ 3.2.2.8.1) และละลายใน 0.1X SSC มาวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) โดยใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  $A_{260}$  และ  $A_{280}$  ซึ่งค่าของ  $A_{260}/A_{280}$  ที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง 0.56-0.59

1) การติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน (DNA labeling probe with photobiotin)

ผสม DNA solution (1 mg/ml) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับ photobiotin solution (1 mg/ml) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้ววางบนน้ำแข็ง จากนั้นส่องด้วยแสงจากหลอดไฟ (sunlamp) นาน 30 นาที เติม 0.1 M Tris-HCl buffer pH 9.0 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วกำจัด free photobiotin ออกโดยผสมกับ n-butanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 วินาที หลังจากนั้นดูดสารละลายด้านบนทิ้ง กำจัด free photobiotin ตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง จากนั้น

นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เมื่อครบเวลาทำให้เย็นลงทันทีโดยวางในน้ำแข็ง แล้วเติม hybridization solution (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2) ขั้นตอนการไฮบริไดเซชัน (Photobiotin labeling DNA-DNA hybridization)

ขั้นตอนการไฮบริไดเซชันทำตามวิธีการของ Ezaki *et al.* (1989) โดยนำ DNA (10 µg) ของเชื้อที่ต้องการทดสอบ เชื้อสายพันธุ์อ้างอิง และ DNA อ้างอิง (1 mg/ml of calf thymus in milli Q water) มาต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที และทำให้เย็นลงทันทีโดยวางบนน้ำแข็ง จากนั้นเติม 2xPBS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 0.1M MgCl<sub>2</sub> ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไปให้มีปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน เติมนสารละลายที่ได้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท (Nunc-Immuno™ plate, MaxiSorp™ surface; Thermo Fisher scientific, Denmark) และตรึงดีเอ็นเอโดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เติมนสารละลายทิ้ง แล้วเติม prehybridization solution (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม และบ่มที่อุณหภูมิ 53-55 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง จากนั้นเท prehybridization solution ทิ้ง แล้วเติม hybridization solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปแทนที่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 53-55 องศาเซลเซียส (คำนวณตามสูตรด้านล่าง) นาน 15-18 ชั่วโมง

$$\text{Hybridization temperature} = (T_m - 45) \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$T_m = 69.3 + [\%G+C] \times 0.41$$

3) การตรวจหาการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ (detection of biotin-containing hybrids)

ทำการล้างไมโครเพลทแต่ละหลุมด้วย 0.2X SSC buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติม solution I (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง เติมน solution II (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วล้างไมโครเพลทแต่ละหลุมด้วย 1X PBS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม solution III (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติม 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (Verlander, 1992) นำสารละลายในไมโครเพลทไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader (Microplate Manager<sup>R</sup> 4.0, Bio-Rad Laboratories, USA) คำนวณค่าร้อยละความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอ ตามสูตร ดังนี้

$$\% \text{ similarity of DNA} = [(X-N) / (P-N)] \times 100$$

X; ค่าที่วัดได้ของดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบ

P; ค่าที่วัดได้ของดีเอ็นเอที่เป็นโพรบ (probe)

N; ค่าที่วัดได้ของดีเอ็นเอที่ไม่มีความสัมพันธ์กับดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบ (calf thymus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้ใช้เป็นประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity)

นำเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหาร yeast extract-malt extract broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สกัดน้ำหมักเชื้อด้วย ethyl acetate จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำสารสกัดในขั้นนี้ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Methicillin resistance *aureus* (MRSA) DMST 20654 Vancomycin-resistance *Enterococcus fecium* (VRE) ATCC 51559 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity) Vero cells (African green monkey kidney) นอกจากนี้ยังนำสารสกัดหยาบจากเชื้อที่ถูกคัดเลือกมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคมalaria เรีย *Plasmodium falciparum* strain K1 และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ KB-oral cavity และ NCI-H187-small cell lung โดยส่งทดสอบที่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ประเทศไทย

#### 3.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activity)

นำสารสกัดหยาบจากเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี disc diffusion (Lorian, 1980) โดยทดสอบกับจุลินทรีย์ 8 ชนิด ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ทำการทดสอบโดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร Muller Hinton agar (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนยีสต์เลี้ยงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เตรียมสารละลายเชื้อแต่ละชนิดในสารละลาย 0.85% NaCl ให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5 ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) แล้วใช้ไม้พันสำลีป้ายเชื้อ (swab) ลงบนอาหาร Muller Hinton agar และ Sabouraud dextrose agar จากนั้นละลายสารสกัดหยาบด้วย methanol ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และดูดสารละลายปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น disc (Whatman, UK) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เมื่อแห้งแล้ววางแผ่น disc ลงบนผิวอาหาร ใช้แผ่น disc ซึ่งเติม methanol และยาปฏิชีวนะ (ampicillin ceftazidime gentamicin penicillin และ nystatin) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และชุดควบคุมเชิงบวกตามลำดับ บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สำหรับยีสต์ ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

### 3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคมาลาเรีย (anti-malarial activity)

นำสารสกัดหยาบจากเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่ถูกคัดเลือกมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* (K1, multidrug resistant strain) โดยเลี้ยง *Plasmodium falciparum* ตามวิธีการของ Trager and Jensen (1976) ซึ่งเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 medium ที่มี HEPES (N-2- hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ NaHCO<sub>3</sub> ความเข้มข้น 32 มิลลิโมลาร์ และ human serum ที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อน (มีเม็ดเลือดแดงร้อยละ 3) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีความชื้นและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ทำการถ่ายเชื้อทุกวันโดยใช้อาหารที่มีส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงที่สดใหม่เพื่อรักษาระดับการเจริญของเซลล์ ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคมาลาเรียโดยวิธี microculture radioisotope technique ตามวิธีการของ Desjardins *et al.* (1979) โดยผสมเม็ดเลือดแดงความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ซึ่งเป็นเม็ดเลือดแดงที่มีการติดเชื้อมาลาเรีย (parasitemia) ที่ระยะ early ring stage ร้อยละ 1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ให้สัมผัสกับอาหารที่มีสารสกัดหยาบที่ต้องการทดสอบซึ่งละลายใน 1% DMSO (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1%) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมส่วนผสมของ hypoxanthine (Amersham, USA) และ culture medium ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระวังการรวมตัวกันของ hypoxanthine ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีจะบ่งบอกการเจริญของเชื้อก่อโรคมาลาเรีย ซึ่งตรวจสอบโดยใช้เครื่อง TopCount microplate scintillation counter (Packard, USA) โดยค่าร้อยละการเจริญของเชื้อก่อโรคมาลาเรียคำนวณได้โดยใช้สัญญาณการนับต่อนาฬิกาของสถานะที่ถูก treat (CPM<sub>T</sub>) และสถานะที่ไม่ถูก treat (CPM<sub>U</sub>) ตามสูตร

$$\% \text{ parasite growth} = \text{CPM}_T / \text{CPM}_U \times 100$$

โดยสามารถแปลผลจากค่าร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) ได้ดังนี้ คือ

1. หากสามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าร้อยละ 50 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคมาลาเรีย (inactive)
2. หากสามารถยับยั้งเชื้อได้เท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 50 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคมาลาเรีย (active) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคมาลาเรียได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>)

การทดสอบนี้ใช้ 0.1% DMSO เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ส่วนชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) และค่าความเข้มข้นของชุดควบคุมเชิงบวกที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub> of positive control) ที่ใช้ คือ dihydroartemisinin ความเข้มข้น 2.79 นาโนโมลาร์ และ mefloquine ความเข้มข้น 0.0440 ไมโครโมลาร์

### 3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (anticancer activity)

นำสารสกัดหยาบจากเอนโดไฟติกแอกติโนไมยสีที่ถูกต้องเลือกมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ KB cell line (epidermoid carcinoma of oral cavity, ATCC CCL-17) และ NCI-H187 (small cell lung carcinoma, ATCC CRL-5804) ด้วยวิธี Resazurin microplate assay (REMA) (Brien *et al.*, 2000) โดยเก็บเซลล์ช่วง logarithmic growth phase มาเจือจางใน fresh medium ให้ได้ความเข้มข้น  $3.3 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมสารสกัดหยาบที่ต้องการทดสอบ ซึ่งเจือจาง 0.5% DMSO ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และสารละลายเซลล์ปริมาตร 45 ไมโครลิตร ลงใน 384-well plates จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 5 วัน เติม resazurin solution ความเข้มข้น 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence signal) โดยใช้เครื่อง SpectraMax M5 multi-detection microplate reader (Molecular Devices, USA) ที่ความยาวคลื่น 530 และ 590 นาโนเมตร ค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเซลล์คำนวณได้ตามสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$$

$FU_T$  คือ ค่าเฉลี่ยของหน่วยฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent unit) จากสถานะที่ใส่สารสกัด

$FU_C$  คือ ค่าเฉลี่ยของหน่วยฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent unit) จากสถานะควบคุม

พล็อตกราฟปริมาณที่ตอบสนองจากความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่เจือจาง 3 เท่า จำนวน 6 ความเข้มข้น และหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) ด้วยเครื่อง SOFTMax Pro software (Molecular Devices, USA) โดยสามารถแปลผลจากค่าร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) ได้ดังนี้ คือ

1. หากสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้น้อยกว่าร้อยละ 50 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (inactive)
2. หากสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้เท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 50 แสดงว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (active) ซึ่งจะรายงานผลเป็นค่าร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) เซลล์มะเร็ง

การทดสอบนี้ใช้ 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ส่วนชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) และค่าความเข้มข้นของชุดควบคุมเชิงบวกที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง KB cell line ได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub> of positive control) คือ ellipticine ความเข้มข้น 3.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ doxorubicin ความเข้มข้น 1.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นของชุดควบคุมเชิงบวกที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ได้ร้อยละ 50 คือ ellipticine ความเข้มข้น 3.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ doxorubicin ความเข้มข้น 0.140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)

นำสารสกัดหยาบจากเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความเป็นพิษต่อ Vero cells (African green monkey kidney fibroblasts, ATCC CCL-81) โดยวิธี green fluorescent protein (GFP)-based assay (Changsen *et al.*, 2003) ซึ่งปริมาณการเรืองแสงที่วัดได้จะสัมพันธ์กับปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดอยู่ โดยสามารถแปลผลจากค่าร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) ได้ดังนี้ คือ หากสามารถยับยั้งเซลล์ได้น้อยกว่าร้อยละ 50 แสดงว่าไม่มีความเป็นพิษต่อ Vero cells (non-cytotoxic) แต่หากสามารถยับยั้งเซลล์ได้เท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 50 แสดงว่ามีความเป็นพิษต่อ Vero cells (cytotoxic)

### 3.3.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์พีลิบเก้า (MacPherson *et al.*, 1995)

เซลล์พีลิบเก้าจะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด  $\alpha$ -MEM (alpha minimal essential medium) ที่ทำการเติม 7.5% newborn calf serum (NBCS) และ 2.5% fetal bovine serum (FBS) ในบรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการ subculture ทุก 2-3 วัน

การเหนี่ยวนำให้เซลล์พีลิบเก้าเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทพีลิบเก้า (MacPherson *et al.*, 1995; Parnas and Linial, 1995 )

นำเซลล์พีลิบเก้าที่เจริญเป็นผืนเดียวกันบนผิวภาชนะเพาะเลี้ยงมาเติม trypsin ให้กลายเป็นเซลล์เดี่ยว นำเซลล์มา  $2 \times 10^6$  cells/mL เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์  $\alpha$ -MEM ที่ทำการเติม 5% FBS และ 0.5  $\mu$ M all *trans*-retinoic acid (RA) ใน petridish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100-mm บรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C เซลล์จะรวมกลุ่มกันมีลักษณะเป็น embryoid bodies ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ทำการกระจาย embryoid bodies ให้กลายเป็นเซลล์เดี่ยวด้วย pipette แล้วนำเซลล์ที่ได้ไป เพาะเลี้ยงบน microtiter plate ที่ทำการเคลือบผิวภาชนะด้วย poly-L-lysine (ใช้ 50  $\mu$ g/mL poly-L-lysine ที่ละลายใน sterile phosphate buffer solution เติมลงในแต่ละหลุมของ plate เป็นเวลา 1 คืน แล้วค่อยนำสารละลายออก ปล่อยให้แห้งภายใต้รังสี UV ใน laminar flow hood เป็นเวลา 30 นาที) โดยเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น  $7 \times 10^4$  cells/mL (150  $\mu$ L/well สำหรับ 96-well plate และ 1.5 mL/well สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเป็น  $\alpha$ -MEM ที่ทำการเติม 10% FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในบรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นทำการเติม 10  $\mu$ M cytosine arabinoside (Ara-C) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2-3 วัน เซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทชนิดโคลิเนอร์จิก ที่สมบูรณ์พร้อมใช้ในการทดสอบในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

### การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท (Tadtong, 2013)

เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทรวมทั้งเพื่อหาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาทต่อไป โดยทำการทดสอบดังนี้

-นำสารทดสอบแต่ละชนิดมาละลายด้วย 10% DMSO/H<sub>2</sub>O เพื่อเตรียมความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ความเข้มข้น ดังนี้คือ 200  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ M, 0.02  $\mu$ M สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นสุดท้ายที่เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบคือ 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.001  $\mu\text{M}$  และความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้เป็นกลุ่มตัวทำละลายควบคุมคือ 0.5% DMSO - นำสารละลายที่เตรียมขึ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น มาทดสอบกับเซลล์ประสาทที่ลิบแก้ว แล้วบ่มเซลล์ที่ 37 °C ในบรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นตรวจดูอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทด้วยวิธี XTT reduction assay โดยใช้กลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบเป็นกลุ่มควบคุมและกำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของกลุ่มควบคุมคิดเป็น 100% ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ (n = 3, triplicate)

**การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (Tadtong, 2013; Iacovitti, 1997; López-Maderuelo, 2001)**

- นำเอาความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิต (% cell viability) มากกว่า 100% มาทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท โดยจะทำให้เซลล์ประสาทเกิดภาวะ oxidative stress ด้วยวิธี serum deprivation ทำการเติมสารละลายสารทดสอบในความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบลงไปเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติมซีรัม แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ในบรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย XTT reduction assay โดยกำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมแต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (กลุ่มควบคุม) มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็น 100% ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ (n = 3, triplicate)

#### **การวิเคราะห์ข้อมูล**

ใช้สถิติการวิเคราะห์โดยวิธี student's *t*-test เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมซีรัมและไม่ได้รับสารทดสอบ กำหนดค่า  $p < 0.05$  จึงถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

**การทดสอบฤทธิ์ในการงอกของแขนงประสาท ((Tadtong, 2013; Tangsaengvit, 2013)**

- นำเอาความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิต (% cell viability) มากกว่า 100% มาทดสอบ (ความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท และทำการทดสอบเฉพาะสารที่แสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ดีที่สุดเท่านั้น) และสังเกตลักษณะทางกายภาพของเซลล์ โดยสังเกตการเพิ่มขึ้นของแขนงเซลล์ประสาทและ/หรือ ความยาวที่เพิ่มขึ้นของแขนงประสาทภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รายงานจำนวนแขนงประสาท และค่าความยาวแขนงประสาท เฉลี่ยจากเซลล์ประสาท 30 เซลล์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการเติมสารทดสอบ โดยใช้สาร 1nM quercetin ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการช่วยให้เกิดการงอกของแขนงประสาทเป็นตัวควบคุมเชิงบวก

#### **การวิเคราะห์ข้อมูล**

ใช้สถิติการวิเคราะห์โดยวิธี student's *t*-test เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ กำหนดค่า  $p < 0.05$  จึงถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 การตรวจหา (detection) และศึกษาความหลากหลาย (diversity) ของยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1

#### 3.4.1 การตรวจหา (detection) ยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1

##### 3.4.1.1 การออกแบบไพรเมอร์

ทำการออกแบบไพรเมอร์บริเวณ ketosynthase (KS) domain ของยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าวจากเชื้อแอกติโนมัยสิตที่ปรากฏในฐานข้อมูลของ NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยออกแบบเป็น degenerate primers ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (primer sequences)

Primer name	Amplicon size	Primer sequence (5' → 3')
KS-F (sense strand)	740-780 bp	GAGCCSCACARCGGCTSBTKCRTCA
KS-R (anti-sense strand)		TGGCCSAKRTTGGWCTTSASGGWGCC

หมายเหตุ : S = C หรือ G  
 R = A หรือ G  
 B = C หรือ G หรือ T  
 K = G หรือ T  
 W = A หรือ T

##### 3.4.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณคีโตซินเทสโดเมน จากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสิตที่แยกได้ทั้งหมด (ดูหัวข้อ 3.2.3.1.1) โดยวิธี PCR ทำโดยเตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วยจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร primer (10 ไมโครลิตร) ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Thermo Scientific, USA) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร 10X *Taq* buffer (Thermo Scientific, USA) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร  $MgCl_2$  (25 มิลลิโมลาร์) (Thermo Scientific, USA) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร dNTP mixture (10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร และ Milli-Q water ปริมาตร 15.5 ไมโครลิตร นำสารผสมที่

ได้มาทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง DNA Engine DYAD ALD 1244 thermal cycler (MJ Research Inc., USA) โดยอุณหภูมิที่ใช้ คือ initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ โดยแต่ละรอบใช้อุณหภูมิเพื่อ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที เพื่อ annealing ที่ 61 องศาเซลเซียส 40 วินาที และเพื่อ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที เมื่อทำปฏิกิริยาครบ 40 รอบ ปรับอุณหภูมิเพื่อ extension รอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดโดยแยกบนแผ่นอะกาโรส ความเข้มข้น 1% ในบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข) โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที ย้อมเจลดด้วยสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจดูขนาดที่ถูกต้อง (740-780 bp) ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้

### 3.4.2 การศึกษาความหลากหลาย (diversity) ของยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1

#### 3.4.2.1 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (PCR product purification)

ทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAEX II gel extraction kit (Qiagen, USA) ทำโดยตัดเจลมาซึ่งน้ำหนักรวมในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer QX1 ในปริมาตร 3 เท่าของเจล เพื่อละลายอะกาโรส จากนั้นเติม QIAEXII beads ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (vortex นาน 30 วินาทีก่อนใช้ เพื่อไม่ให้ตกตะกอน) แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เพื่อให้จับกับดีเอ็นเอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และ ทำการ vortex ทุกๆ 2 นาที เพื่อให้ QIAEXII อยู่ในสภาวะสารละลาย โดยสีของสารละลายจะเป็นสีเหลือง (หากมีสีส้มหรือม่วง ให้เติม 3M sodium acetate, pH 5.0 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ดูส่วนใสทิ้งโดยใช้ปิเปต ละลายตะกอนแล้วล้างด้วย Buffer PE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งด้วยลม นาน 10-15 นาที หรือจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีขาว จากนั้นละลายใน Milli-Q water โดยใช้เครื่อง vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ดูส่วนใสซึ่งมีสารละลายดีเอ็นเอลงในหลอดอันใหม่ โดยใช้ปิเปต เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.4.2.2 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอ (DNA cloning)

ทำการเชื่อมต่อ (ligation) ดีเอ็นเอที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอพาหะ (vector) โดยใช้ TOPO TA cloning kit (Invitrogen, USA) โดยเตรียม TOPO cloning reaction mixture ปริมาตรสุทธิ 6 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร salt solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ pCR™8/GW/TOPO® vector ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสม TOPO cloning reaction mixture ให้เข้ากันเบาๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำ TOPO cloning reaction mixture ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Escherichia coli* คอมพิเทนต์เซลล์ (*E. coli* DH5 $\alpha$  ความเข้มข้น 10<sup>8</sup> เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่มีปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยวิธี heat-shock (Sambrook and Russell, 2001) โดยบ่มปฏิกิริยาที่ผสมกับเซลล์บนน้ำแข็งนาน 10 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที แล้วนำกลับไปวางบนน้ำแข็งทันที เติม S.O.C. medium (Invitrogen, USA) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงส่วนที่เหลือ แล้วจึงละลายเซลล์ให้ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำเซลล์ทั้งสองส่วนมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกลี่ยลงบนอาหาร LB agar ที่เติม spectinomycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารจำนวน 12 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่เติม spectinomycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนบนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) นำเชื้อที่เลี้ยงได้มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

#### 3.4.2.3 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA extraction)

สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, USA) โดยปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ของ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายยีนลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ใช้ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที นาน 3 นาที) จากนั้นละลายกลับใน Buffer P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วเติม Buffer P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เพื่อให้เซลล์แตกโดยกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง จนกระทั่งสารละลายกลับมาใส จากนั้นผสมกับ Buffer N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร โดยกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง เพื่อให้โปรตีนเสียสภาพ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ใช้ปิเปตดูดส่วนใสถ่ายลงใน QIAprep spin column ที่วางอยู่ใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง เพื่อให้ดีเอ็นเอถูกตรึงอยู่บนแผ่นเมมเบรนที่อยู่ในคอลัมน์ จากนั้นเติม Buffer PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเทของเหลวทิ้งเพื่อดึงน้ำออกจากดีเอ็นเอ จากนั้นปั่นเหวี่ยงอีก 1 นาที เพื่อกำจัดของเหลวที่ติดค้างอยู่ ย้ายคอลัมน์วางลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์อันใหม่ เติม Milli-Q water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงตรงกึ่งกลางคอลัมน์แล้วตั้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที พลาสมิดดีเอ็นเอจะถูกชะออกมา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.4.2.4 การย่อยพลาสมิด (plasmid digestion)

การตรวจสอบชั้นยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 ที่แทรกอยู่ใน pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> vector ทำโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsp143I* (*Sau3AI*) (Thermo Scientific, USA) ด้วยการเตรียม digestion reaction ปริมาตรสุทธิ 15 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย nuclease-free water ปริมาตร 12.75 ไมโครลิตร 10X Buffer *Bsp143I* ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร plasmid DNA ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ *Bsp143I* ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกย่อย บนอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer (ภาคผนวก ข) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นย้อมดีเอ็นเอใน ethidium bromide solution นาน 10 นาที แล้วตรวจดูโดยใช้เครื่อง UV-transilluminator (Ultra-Violet Products, UK) เลือกตัวอย่างที่แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป

#### 3.4.2.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

นำพลาสมิดดีเอ็นเอส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd (Malaysia) โดยใช้ BigDye<sup>®</sup> Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) ใช้ไพรเมอร์ M13F (-20) (5'-GTAAAACGACGGCC AGT-3') และ M13R (-24) (5' GGAAACAGCTATGACCATG 3')

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.2.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BioEdit (biological sequence alignment editor) software (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> ; Hall, 1999) โดยลบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของเวกเตอร์ออก นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปแปลรหัส (translation) เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วค้นหาลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกันโดยใช้โปรแกรม BlastX ใน NCBI web site (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) แล้วนำลำดับอะมิโนเหล่านั้นมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์กันโดยทำการจัดเรียงข้อมูล (alignment) ด้วย CLUSTAL W version 1.81 (Thompson *et al.*, 1994) ใน BioEdit software จากนั้นลบช่องว่าง (gap) แล้วสร้างแผนภาพวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยใช้ neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) ใน MEGA 7 software (Kumar *et al.*, 2016) ค่าความเชื่อมั่น (confidence values) ถูกกำหนดโดย bootstrap (Felsenstein, 1985) โดยทำการสุ่มเป็นจำนวน 1000 ครั้ง

### 3.5 การหมักเชื้อเพิ่มปริมาณเพื่อผลิตสารและการสกัดแยกสาร

ทำการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรมะละทิมใน Seed medium (Yeast extract – Malt extract broth; pH 7.3) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1% CaCO<sub>3</sub>; pH 7.3) โดยเติม 1% inoculum ของ seed medium ลงใน production medium บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้ง ภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) จากนั้นนำไปฤทธิ์ทางปกป้องเซลล์ประสาท เมื่อทราบผลการออกฤทธิ์จะทำการเลือกสารสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุดไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป

### 3.6 การสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 13.1.5 ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและนำมาสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี และเมื่อได้สารออกเป็นส่วน หรือสารบริสุทธิ์แล้ว จึงนำไปตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ต่อไป

#### 3.6.1 การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีและกำหนดเอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโตรสโคปี รวมทั้งหาเอกลักษณ์ และหาค่าคงที่ทางกายภาพที่สำคัญ เช่น จุดหลอมเหลว เป็นต้น เทคนิคทางสเปกโตรสโคปีที่จะนำมาใช้ในการศึกษา ได้แก่

##### 3.6.1.1 Ultraviolet – Visible (UV) spectrophotometry

วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น ultraviolet (200-400 นาโนเมตร) จนถึง visible (400-800 นาโนเมตร) จะทำให้ทราบถึงหมู่ฟังก์ชันที่ทำให้เกิดสีหรือดูดกลืนแสงในช่วงดังกล่าว หมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ ได้แก่ หมู่คาร์บอนิล หมู่ไฮดรอกซิลและหมู่อะมิโน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6.1.2 Infrared spectrophotometry (IR)

วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความถี่คลื่น infrared ( $400-4000\text{ cm}^{-1}$ ) ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นของแสงที่สามารถทำให้โมเลกุลเกิดการสั่นสะเทือน และสามารถบอกถึงหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ซึ่งมีการสั่นสะเทือนในรูปแบบจำเพาะเมื่อได้รับพลังงานจากแสงที่มีความยาวคลื่นหนึ่ง นอกจากนี้จะใช้ในการศึกษาหมู่ฟังก์ชันที่ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงแล้วสเปคตรัมที่ได้จะนำมาใช้อ้างอิงเพื่อช่วยในการหาเอกลักษณ์ของสารแต่ละชนิด เนื่องจากอินฟราเรดสเปคตรัมของสารแต่ละชนิดจะมีเอกลักษณ์ที่เฉพาะตัว และใช้เป็น finger print ของสารนั้นๆ ได้

### 3.6.1.3 Mass spectrometry (MS)

หาน้ำหนักโมเลกุล เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร

### 3.6.1.4 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

เป็นเทคนิคที่ทำให้ทราบถึงโครงสร้างของสาร โดยจะใช้ข้อมูลจาก 1-D NMR ( $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR) และ 2-D NMR (เช่น COSY, HMQC, HMBC เป็นต้น) อิทธิพลของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ในโครงสร้างจะมีผลต่อตำแหน่งของโปรตอน และ คาร์บอน โดยจะแสดงให้เห็นเป็นค่า chemical shift ของโปรตอนและคาร์บอนที่ตำแหน่งแตกต่างกันไป และ การเกิด splitting pattern รูปแบบต่างๆ รวมถึงค่า coupling constant จะเป็นองค์ประกอบในการหาโครงสร้างของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืชวงศ์ขิง

จากการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากตัวอย่างพืชวงศ์ขิงจำนวน 20 ชนิด ที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ ใน 8 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ อัญญา นนทบุรี ปทุมธานี สระบุรี นครนายก ปราจีนบุรี อุตรธานี และอุบลราชธานี ซึ่งแบ่งขึ้นส่วนตัวอย่างออกเป็น 4 ส่วน คือ ใบ ลำต้น เหง้า และราก สามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทได้จำนวน 109 ไอโซเลต รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.1

จากผลการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืชวงศ์ขิง พบว่าขึ้นส่วนของพืชวงศ์ขิงที่สามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทได้มากที่สุด คือ ราก จำนวน 67 ไอโซเลต (ร้อยละ 61) เหง้า 27 ไอโซเลต (ร้อยละ 25) ลำต้น 11 ไอโซเลต (ร้อยละ 10) และใบ 4 ไอโซเลต (ร้อยละ 4) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของแอกติโนมัยสีท คือ ดิน ดังนั้นแอกติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในจิ้งแพร่กระจายเข้าไปสู่ขึ้นส่วนพืชที่มีความใกล้ชิดกับดินมากที่สุด คือ ราก ถัดมาคือเหง้า ลำต้น และใบ ตามลำดับ แอกติโนมัยสีทเหล่านี้สามารถเข้าสู่พืชได้ทางช่องเปิดหรือขึ้นส่วนที่ได้รับบาดเจ็บของพืช (Kaur *et al.*, 2015) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Saini *et al.* (2016) ที่ทำการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากขึ้นส่วนราก ลำต้น และใบของ *Syzygium cumini* (หว่า) ซึ่งพบว่าร้อยละ 56 ของเชื้อแยกได้จากขึ้นส่วนราก มีเพียงร้อยละ 2 เท่านั้นที่แยกได้จากใบ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Passari *et al.* (2015) ที่ทำการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท จำนวน 42 ไอโซเลต ได้จากขึ้นส่วนพืชสมุนไพรรวม 7 ขึ้นส่วน พบว่าแยกได้จากรากมากที่สุด (ร้อยละ 52) ลำต้น (ร้อยละ 21) ใบ (ร้อยละ 14) ดอก (ร้อยละ 7) และก้านใบ (ร้อยละ 5) และนอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Taechowisan *et al.* (2003) ที่ทำการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรรวม 36 ชนิด ซึ่งมีพืชวงศ์ขิงรวมอยู่ 2 ชนิด (*Zingiber officinale* L. และ *Alpinia galanga* L.) พบว่าแยกเชื้อได้จำนวน 330 ไอโซเลต โดยแยกได้จากรากมากที่สุด (ร้อยละ 64.2) รองลงมาคือใบ (ร้อยละ 29.4) และลำต้น (ร้อยละ 6.4)

## 4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อในระดับสกุล (genus) โดยศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จำนวน 109 ไอโซเลต เป็นแอกติโนมัยสีทที่จัดอยู่ใน 6 วงศ์ (family) ได้แก่ *Micromonosporaceae* *Jiangellaceae* *Pseudonocardiaceae* *Streptosporangiaceae* *Thermomonosporaceae* และ *Streptomycetaceae* แบ่งเป็น 15 สกุล (genus) ได้แก่ *Jiangella* (2 ไอโซเลต) *Asanoa* (1 ไอโซเลต) *Dactylosporangium* (1 ไอโซเลต) *Jishengella* (7 ไอโซเลต) *Micromonospora* (12 ไอโซเลต) *Phytohabitans* (1 ไอโซเลต) *Kutzneria* (1 ไอโซเลต) *Saccharopolyspora* (1 ไอโซเลต) *Microbispora* (17 ไอโซเลต) *Nonomurea* (5 ไอโซเลต) *Planotetraspora* (1 ไอโซเลต) *Sphaerisporangium* (2 ไอโซเลต) *Streptosporangium* (2 ไอโซเลต) *Actinomadura* (3 ไอโซเลต) และ *Streptomyces* (53 ไอโซเลต) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 โดยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ที่มากที่สุดของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ในแต่ละไอโซเลตกับสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) แสดงในตารางที่ 4.2

จากผลการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีท พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Taechowisan *et al.* (2003) ที่สามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรหลายชนิดและพบว่าอยู่ในสกุล *Streptomyces* มากที่สุด รองลงมาคือ *Microbispora* *Nocardia* และ *Micromonospora* นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้ยังสามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทในสกุลอื่นๆ ได้อีกหลายสกุล ดังที่กล่าวมาแล้ว แสดงให้เห็นว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงในครั้งนี้มีความหลากหลายสูง

จากเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมด พบว่าจำนวนร้อยละ 37 (40 ไอโซเลต) แสดงค่า % similarity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ค่อนข้างต่ำ (ต่ำกว่าร้อยละ 99.5) เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในฐานข้อมูล เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจึงมีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่ ซึ่งสปีชีส์ที่ใกล้เคียงยังไม่พบว่าเป็นเอนโดไฟต์หรือเป็นเอนโดไฟต์ในพืชวงศ์ขิงมาก่อน แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาเบื้องต้นในครั้งนี้ อาจจะนำไปสู่สปีชีส์ใหม่ ดังกล่าว

ตารางที่ 4.1 เอนโดไฟติกแอกติโนมัยที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงชนิดต่างๆ

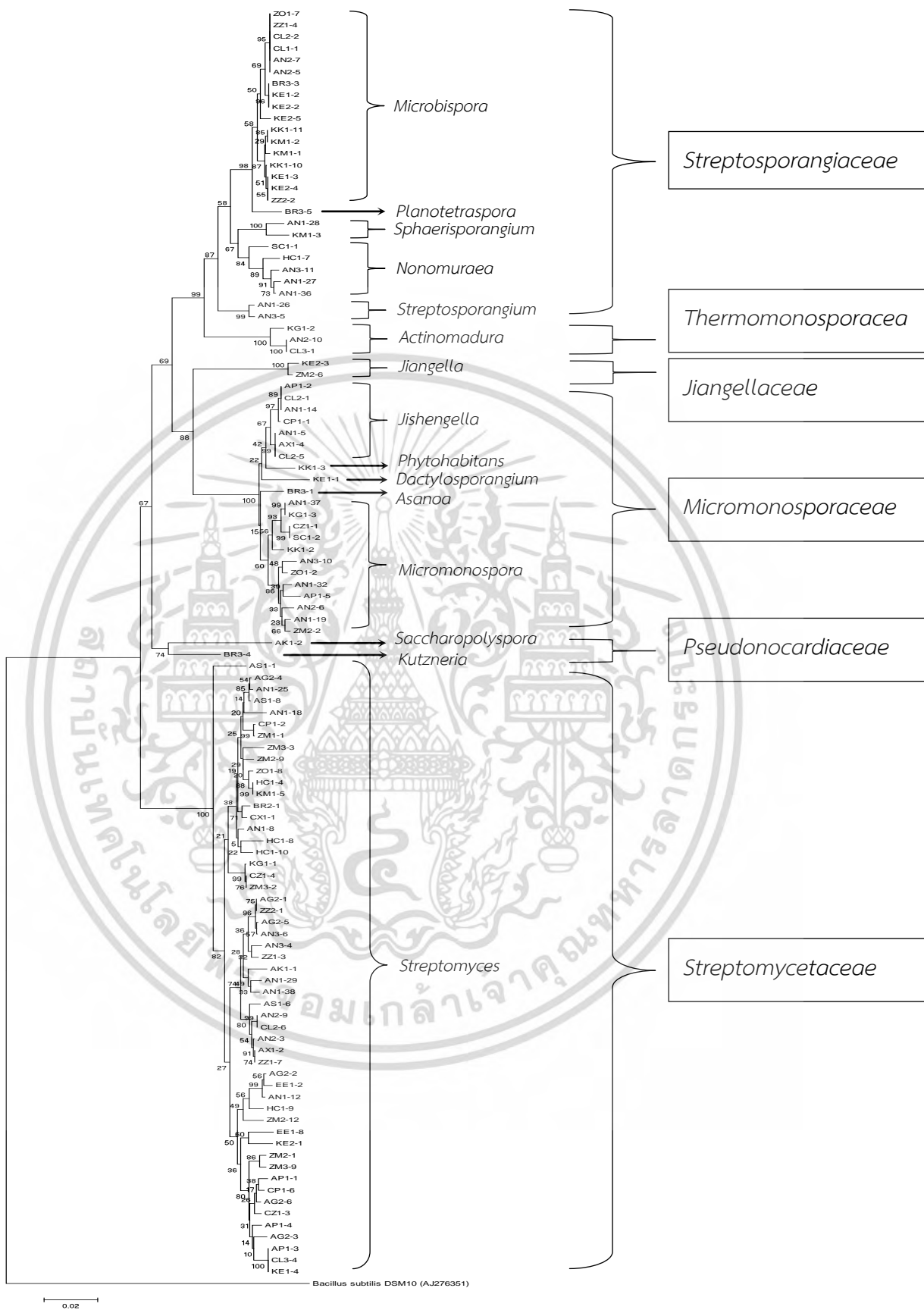
พืชวงศ์ขิง	จำนวนตัวอย่างพืช	ชิ้นส่วนพืช	สกุลที่แยกได้	จำนวนเชื้อที่แยกได้
<i>Alpinia galanga</i> (ข่า)	2	ราก	<i>Streptomyces</i>	9
<i>Amomum krervanh</i> (กระวาน)	1	ลำต้น	<i>Saccharopolyspora</i>	1
			<i>Streptomyces</i>	1
<i>Alpinia nigra</i> (กะลา)	3	เหง้า	<i>Jishengella</i>	1
			<i>Streptomyces</i>	2
			<i>Streptosporangium</i>	1
		ราก	<i>Actinomadura</i>	1
			<i>Jishengella</i>	1
			<i>Nonomuraea</i>	3
			<i>Microbispora</i>	2
			<i>Micromonospora</i>	5
			<i>Sphaerisporangium</i>	1
			<i>Streptosporangium</i>	1
<i>Streptomyces</i>	8			
<i>Alpinia purpurata</i> (ขิงแดง)	1	เหง้า	<i>Verrocosispora</i>	3
			<i>Streptomyces</i>	1
<i>Amomum xanthioides</i> (เร่ว)	1	ลำต้น	<i>Jishengella</i>	1
		เหง้า	<i>Streptomyces</i>	1
<i>Boesenbergia rotunda</i> (กระชาย)	2	เหง้า	<i>Asanoa</i>	1
			<i>Streptomyces</i>	1
		ราก	<i>Kutzneria</i>	1
			<i>Microbispora</i>	1
<i>Curcuma longa</i> (ขมิ้นชัน)		เหง้า	<i>Microbispora</i>	2
		ราก	<i>Actinomadura</i>	1
			<i>Jishengella</i>	2
<i>Curcuma parviflora</i> (กระเจียวขาว)	1	ใบ	<i>Jishengella</i>	1
		ลำต้น	<i>Streptomyces</i>	1
		ราก	<i>Streptomyces</i>	1
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> (ว่านชักมดลูก)	1	ใบ	<i>Streptomyces</i>	1
<i>Curcuma zedoaria</i> (ขมิ้นอ้อย)	1	ลำต้น	<i>Micromonospora</i>	1
<i>Etlingeria elatior</i> (ตาหลา)	1	ราก	<i>Streptomyces</i>	2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 เอนโดไฟติกแอกติโนมัยที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงชนิดต่างๆ (ต่อ)

พืชวงศ์ขิง	จำนวนตัวอย่างพืช	ชิ้นส่วนพืช	เชื้อสกุลที่แยกได้	จำนวนเชื้อที่แยกได้
<i>Hedychium coronarium</i> (มหาหงส์)	1	ราก	<i>Nonomuraea</i>	1
			<i>Streptomyces</i>	4
<i>Kaempferia elegans</i> (ว่านนกคุ้ม)	2	ลำต้น	<i>Dactylosporangium</i>	1
		เหง้า	<i>Jiangella</i>	1
			<i>Microbispora</i>	3
<i>Streptomyces</i>	1			
<i>Kaempferia galanga</i> (เปราะหอม)	1	ลำต้น	<i>Micromonospora</i>	1
		ราก	<i>Actinomadura</i>	1
<i>Streptomyces</i>	1			
<i>Kaempferia larsenii</i> (เปราะราศี)	1	ใบ	<i>Micromonospora</i>	1
			<i>Phytohabitans</i>	1
		เหง้า	<i>Microbispora</i>	1
ราก	<i>Microbispora</i>	1		
<i>Kaempferia marginata</i> (เปราะป่า)	1	ราก	<i>Microbispora</i>	2
			<i>Sphaerisporangium</i>	1
			<i>Streptomyces</i>	1
<i>Stahlianthus companulatus</i> (ว่านดอกดิน)	1	ลำต้น	<i>Micromonospora</i>	1
			<i>Nonomuraea</i>	1
<i>Zingiber montanum</i> (ไพล)	3	ลำต้น	<i>Streptomyces</i>	1
		เหง้า	<i>Jiangella</i>	1
			<i>Micromonospora</i>	1
		<i>Streptomyces</i>	1	
ราก	<i>Streptomyces</i>	5		
<i>Zingiber officinale</i> (ขิง)	1	เหง้า	<i>Microbispora</i>	1
			<i>Micromonospora</i>	1
		ราก	<i>Streptomyces</i>	1
<i>Zingiber zerumbet</i> (กระเทียม)	2	ลำต้น	<i>Streptomyces</i>	1
		เหง้า	<i>Microbispora</i>	2
			<i>Streptomyces</i>	1
ราก	<i>Streptomyces</i>	1		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับ phylogenetic tree (neighbor-joining method) กรุณาอย่าแก้ไขหรือลบข้อมูลใดๆ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ของเอนโดไฟติก  
แอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากสายพันธุ์อ้างอิง

รหัส	สายพันธุ์อ้างอิงที่ใกล้เคียงมากที่สุด	%similarity	ความยาว (bp)
KE2-3	<i>Jiangella muralis</i> DSM 45357 <sup>T</sup>	99.31	1508
ZM2-6	<i>Jiangella alba</i> DSM 45237 <sup>T</sup>	99.93	1437
BR3-1	<i>Asanoa ishikariensis</i> DSM 44718 <sup>T</sup>	99.37	1495
KE1-1	<i>Dactylosporangium fulvum</i> RY35-23 <sup>T</sup>	99.72	1503
AN1-5	<i>Jishengella endophytica</i> 202201 <sup>T</sup>	99.64	1432
AN1-14	<i>Jishengella endophytica</i> 202201 <sup>T</sup>	99.21	1406
AP1-2	<i>Jishengella endophytica</i> 202201 <sup>T</sup>	99.10	1473
AX1-4	<i>Jishengella endophytica</i> 202201 <sup>T</sup>	99.44	1475
CL2-1	<i>Jishengella endophytica</i> 202201 <sup>T</sup>	99.10	1473
CL2-5	<i>Jishengella endophytica</i> 202201 <sup>T</sup>	99.65	1475
CP1-1	<i>Jishengella endophytica</i> 202201 <sup>T</sup>	99.22	1411
AN1-19	<i>Micromonospora oryzae</i> CP2R9-1 <sup>T</sup>	100	1478
AN1-32	<i>Micromonospora schwarzwaldensis</i> HK10641 <sup>T</sup>	99.43	1405
AN1-37	<i>Micromonospora tulbaghia</i> DSM 45142 <sup>T</sup>	99.50	1420
AN2-6	<i>Micromonospora chokoriensis</i> DSM 45160 <sup>T</sup>	99.51	1478
AN3-10	<i>Micromonospora mirobrigensis</i> DSM 44830 <sup>T</sup>	99.86	1417
AP1-5	<i>Micromonospora wenchangensis</i> CCTCC AA 2012002 <sup>T</sup>	99.51	1475
CZ1-1	<i>Micromonospora tulbaghia</i> DSM45142 <sup>T</sup>	100	1472
KG1-3	<i>Micromonospora tulbaghia</i> DSM45142 <sup>T</sup>	99.50	1417
KK1-2	<i>Micromonospora yasonensis</i> DS3186 <sup>T</sup>	99.44	1474
SC1-2	<i>Micromonospora tulbaghia</i> DSM 45142 <sup>T</sup>	100	1436
ZM2-2	<i>Micromonospora carbonacea</i> DSM 43168 <sup>T</sup>	99.93	1464
ZO1-2	<i>Micromonospora maritima</i> D10-9-5 <sup>T</sup>	100	1475
KK1-3	<i>Phytohabitans houttuyniae</i> K11-0057 <sup>T</sup>	99.03	1485
BR3-4	<i>Kutzneria buriramensis</i> DSM 45791 <sup>T</sup>	99.64	1432
AK1-2	<i>Saccharopolyspora spongiae</i> CMAA 1452 <sup>T</sup>	99.93	1439
AN2-5	<i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>rosea</i> ATCC 12950 <sup>T</sup>	99.43	1415
AN2-7	<i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>rosea</i> ATCC 12950 <sup>T</sup>	99.50	1413
BR3-3	<i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>rosea</i> ATCC 12950 <sup>T</sup>	100	1478
CL1-1	<i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>rosea</i> ATCC 12950 <sup>T</sup>	99.58	1481
CL2-2	<i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>rosea</i> ATCC 12950 <sup>T</sup>	99.65	1479
KE1-2	<i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>rosea</i> ATCC 12950 <sup>T</sup>	99.93	1444
KE1-3	<i>Microbispora bryophytorum</i> NEAU-TX2-2 <sup>T</sup>	99.44	1480
KE2-2	<i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>rosea</i> ATCC 12950 <sup>T</sup>	100	1412
KE2-4	<i>Microbispora bryophytorum</i> NEAU-TX2-2 <sup>T</sup>	99.71	1407
KE2-5	<i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>aerata</i> ATCC 15448 <sup>T</sup>	99.22	1465

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากสายพันธุ์อ้างอิง (ต่อ)

รหัส	สายพันธุ์อ้างอิงที่ใกล้เคียงมากที่สุด	%similarity	ความยาว (bp)
KK1-10	<i>Microbispora bryophytorum</i> NEAU-TX2-2 <sup>T</sup>	99.51	1432
KK1-11	<i>Microbispora bryophytorum</i> NEAU-TX2-2 <sup>T</sup>	99.37	1479
KM1-1	<i>Microbispora bryophytorum</i> NEAU-TX2-2 <sup>T</sup>	99.65	1473
KM1-2	<i>Microbispora bryophytorum</i> NEAU-TX2-2 <sup>T</sup>	99.51	1478
ZO1-7	<i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>rosea</i> ATCC 12950 <sup>T</sup>	99.58	1479
ZZ1-4	<i>Microbispora hainanensis</i> 211020 <sup>T</sup>	99.79	1410
ZZ2-2	<i>Microbispora bryophytorum</i> NEAU-TX2-2 <sup>T</sup>	99.45	1480
AN1-27	<i>Nonomuraea kuesteri</i> NRRL B-24325 <sup>T</sup>	99.45	1482
AN1-36	<i>Nonomuraea jabiensis</i> A4036 <sup>T</sup>	99.28	1431
AN3-11	<i>Nonomuraea angiospora</i> IFO 13155 <sup>T</sup>	98.68	1369
HC1-7	<i>Nonomuraea bangladeshensis</i> 5-10-10 <sup>T</sup>	99.93	1480
SC1-1	<i>Nonomuraea dietziae</i> AJ278220 <sup>T</sup>	98.82	1488
BR3-5	<i>Planotetraspora phitsanulokensis</i> AT-1383 <sup>T</sup>	99.71	1444
AN1-28	<i>Sphaerisporangium rufum</i> R10-82 <sup>T</sup>	100	1411
KM1-3	<i>Sphaerisporangium krabiense</i> AT-0308 <sup>T</sup>	99.28	1440
AN1-26	<i>Streptosporangium saharensense</i> SG20 <sup>T</sup>	99.63	1355
AN3-5	<i>Streptosporangium terrae</i> VRC21 <sup>T</sup>	99.30	1492
AN2-10	<i>Actinomadura rugatobispora</i> IFO 14382 <sup>T</sup>	99.27	1403
CL3-1	<i>Actinomadura rugatobispora</i> IFO 14382 <sup>T</sup>	99.27	1400
KG1-2	<i>Actinomadura bangladeshensis</i> 3-46-b3 <sup>T</sup>	99.31	1509
AG2-1	<i>Streptomyces iranensis</i> HM35 <sup>T</sup>	99.79	1444
AG2-2	<i>Streptomyces hyaluromycini</i> NBRC 110483 <sup>T</sup>	99.93	1485
AG2-3	<i>Streptomyces bungoensis</i> DSM 41781 <sup>T</sup>	99.03	1483
AG2-4	<i>Streptomyces phaeoluteichromatogenes</i> NRRL 5799 <sup>T</sup>	99.86	1482
AG2-5	<i>Streptomyces iranensis</i> HM35 <sup>T</sup>	99.65	1415
AG2-6	<i>Streptomyces bungoensis</i> DSM 41781 <sup>T</sup>	99.86	1489
AK1-1	<i>Streptomyces sclerotialis</i> NRRL ISP-5269 <sup>T</sup>	98.41	1486
AN1-8	<i>Streptomyces tuius</i> NBRC 15617 <sup>T</sup>	99.44	1482
AN1-12	<i>Streptomyces shenzhenensis</i> 172115 <sup>T</sup>	99.93	1482
AN1-18	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 <sup>T</sup>	98.76	1482
AN1-25	<i>Streptomyces misionensis</i> DSM 40306 <sup>T</sup>	99.71	1393
AN1-29	<i>Streptomyces amphotericinicus</i> 1H-SSA8 <sup>T</sup>	98.53	1434
AN1-38	<i>Streptomyces qinglanensis</i> 172205 <sup>T</sup>	99.93	1484
AN2-3	<i>Streptomyces angustmycinicus</i> NRRL B-2347 <sup>T</sup>	100	1486
AN2-9	<i>Streptomyces sioyaensis</i> NRRL B-5408 <sup>T</sup>	99.72	1492
AN3-4	<i>Streptomyces amphotericinicus</i> 1H-SSA8 <sup>T</sup>	99.65	1484

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสิตที่แยกได้จากสายพันธุ์อ้างอิง (ต่อ)

รหัส	สายพันธุ์อ้างอิงที่ใกล้เคียงมากที่สุด	%similarity	ความยาว (bp)
AN3-6	<i>Streptomyces iranensis</i> HM35 <sup>T</sup>	99.65	1415
AP1-1	<i>Streptomyces griseoruber</i> NRRL B-1818 <sup>T</sup>	99.65	1486
AP1-3	<i>Streptomyces adustus</i> WH-9 <sup>T</sup>	99.31	1486
AP1-4	<i>Streptomyces cyaneus</i> NRRL B-2296 <sup>T</sup>	99.36	1439
AS1-1	<i>Streptomyces carpaticus</i> NBRC 15390 <sup>T</sup>	99.79	1446
AS1-6	<i>Streptomyces chattanoogensis</i> NRRL ISP-5002 <sup>T</sup>	99.10	1488
	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> NRRL B-1698 <sup>T</sup>	99.10	1488
	<i>Streptomyces lydicus</i> NBRC 13058 <sup>T</sup>	99.10	1488
AS1-8	<i>Streptomyces misionensis</i> DSM 40306 <sup>T</sup>	99.93	1485
AX1-2	<i>Streptomyces nigrescens</i> NBRC 12894 <sup>T</sup>	99.93	1489
	<i>Streptomyces libani</i> subsp. <i>libani</i> NBRC 13452 <sup>T</sup>	99.93	1489
BR2-1	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i> NRRL B-1773 <sup>T</sup>	99.65	1484
	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 <sup>T</sup>	99.65	1484
CL2-6	<i>Streptomyces sioyaensis</i> NRRL B-5408 <sup>T</sup>	99.72	1486
CL3-4	<i>Streptomyces adustus</i> WH9 <sup>T</sup>	99.31	1486
CP1-2	<i>Streptomyces xylanilyticus</i> SR2-123 <sup>T</sup>	100	1440
CP1-6	<i>Streptomyces capoamus</i> JCM 4734 <sup>T</sup>	100	1483
CX1-1	<i>Streptomyces parvulus</i> NBRC 13193 <sup>T</sup>	100	1483
CZ1-3	<i>Streptomyces cinnabargriseus</i> JS360 <sup>T</sup>	99.17	1483
	<i>Streptomyces canus</i> DSM 40017 <sup>T</sup>	99.17	1483
CZ1-4	<i>Streptomyces wuyuanensis</i> CGMCC 4.7042 <sup>T</sup>	100	1478
EE1-2	<i>Streptomyces jiujiangensis</i> JXJ 0074 <sup>T</sup>	99.31	1480
EE1-8	<i>Streptomyces sanglieri</i> NBRC 100784 <sup>T</sup>	99.38	1483
HC1-4	<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475 <sup>T</sup>	100	1484
	<i>Streptomyces daghestanicus</i> NRRL B-5418 <sup>T</sup>	100	1484
	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 <sup>T</sup>	100	1484
	<i>Streptomyces violascens</i> ISP 5183 <sup>T</sup>	100	1484
HC1-8	<i>Streptomyces lannensis</i> TA4-8 <sup>T</sup>	100	1481
HC1-9	<i>Streptomyces psammoticus</i> NBRC 13971 <sup>T</sup>	99.93	1484
HC1-10	<i>Streptomyces glomeratus</i> LMG 19903 <sup>T</sup>	99.93	1487
KE1-4	<i>Streptomyces adustus</i> WH-9 <sup>T</sup>	99.31	1486
KE2-1	<i>Streptomyces camponoticapitis</i> 2H-TWYE14 <sup>T</sup>	99.65	1484
KG1-1	<i>Streptomyces wuyuanensis</i> CGMCC 4.7042 <sup>T</sup>	99.86	1475

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ของเอนโดไฟติก แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากสายพันธุ์อ้างอิง (ต่อ)

รหัส	สายพันธุ์อ้างอิงที่ใกล้เคียงมากที่สุด	%similarity	ความยาว (bp)
KM1-5	<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475 <sup>T</sup>	100	1484
	<i>Streptomyces daghestanicus</i> NRRL B-5418 <sup>T</sup>	100	1484
	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 <sup>T</sup>	100	1484
	<i>Streptomyces violascens</i> ISP 5183 <sup>T</sup>	100	1484
ZM1-1	<i>Streptomyces xylanilyticus</i> SR2-123 <sup>T</sup>	99.17	1487
ZM2-1	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> DSM 40469 <sup>T</sup>	99.38	1483
ZM2-9	<i>Streptomyces cinereospinus</i> NBRC 15397 <sup>T</sup>	99.10	1482
ZM2-12	<i>Streptomyces racemochromogenes</i> NRRL B-5430 <sup>T</sup>	99.79	1481
	<i>Streptomyces polychromogenes</i> NBRC 13072 <sup>T</sup> 99.79%	99.79	1481
ZM3-2	<i>Streptomyces wuyuanensis</i> CGMCC 4.7042 <sup>T</sup>	100	1475
ZM3-3	<i>Streptomyces collinus</i> NBRC 12759 <sup>T</sup>	99.93	1438
ZM3-9	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> DSM 40469 <sup>T</sup>	100	1483
ZO1-8	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 <sup>T</sup>	99.79	1484
ZZ1-3	<i>Streptomyces amphotericinicus</i> 1H-SSA8 <sup>T</sup>	99.65	1427
ZZ1-7	<i>Streptomyces nigrescens</i> NBRC 12894 <sup>T</sup>	100	1486
	<i>Streptomyces libani</i> subsp. <i>libani</i> NBRC 13452 <sup>T</sup>	100	1486
ZZ2-1	<i>Streptomyces iranensis</i> HM35 <sup>T</sup>	99.65	1485

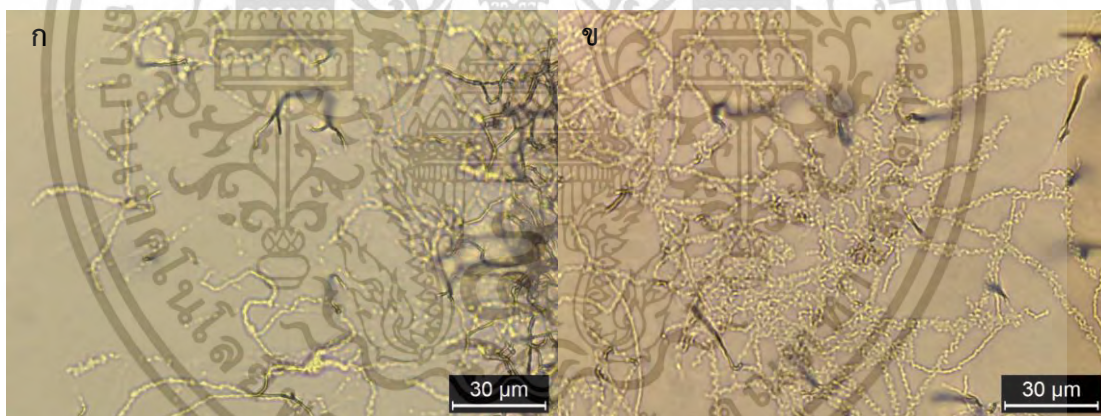
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.1 วงศ์ *Jiangellaceae*

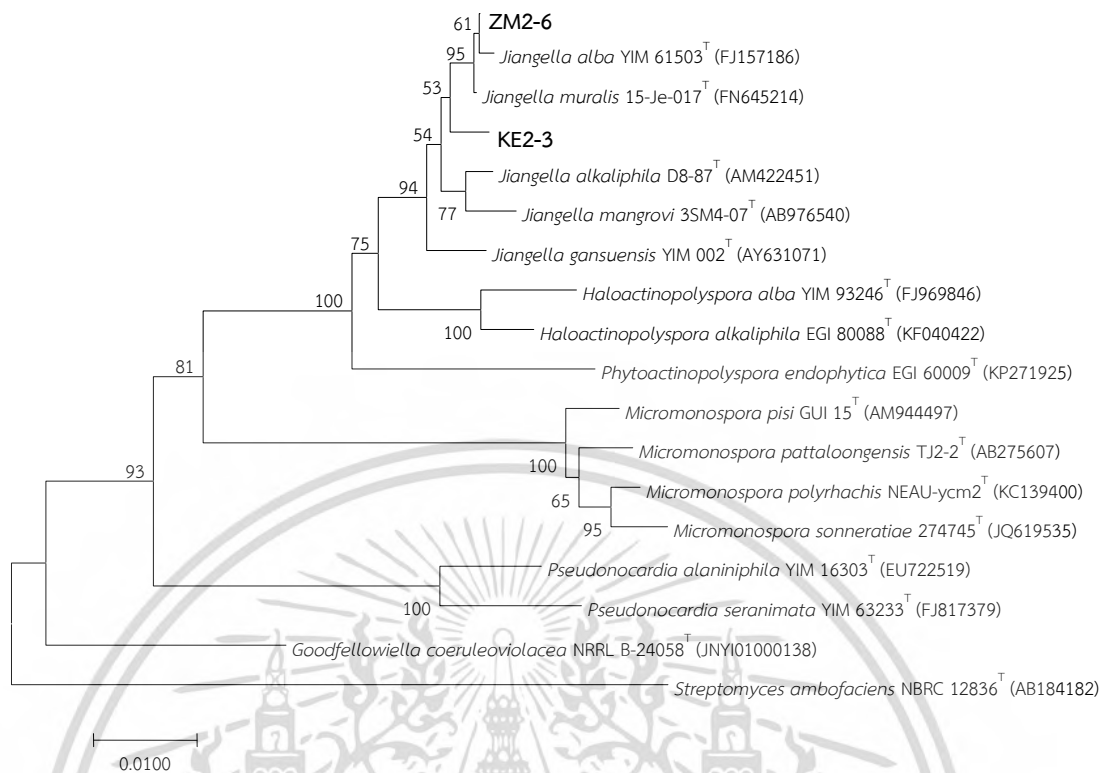
ประกอบด้วย 1 สกุล คือ *Jiangella* ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

##### (1) สกุล *Jiangella*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ KE2-3 และ ZM2-6 สร้างเส้นใยอาหารเป็นสายยาวและเส้นใยมักแตกหัก (fragment) เป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว สร้างเส้นใยอากาศได้ แต่ไม่พบการสร้างสปอร์ (รูปที่ 4.2) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 จะสร้างเส้นใยสีน้ำตาลอมเหลืองเข้ม (strong yellowish brown) และสีขาวอมเหลือง (yellowish white) (ภาคผนวก ค) ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำบนอาหารทดสอบทุกชนิด ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส แต่ไอโซเลต ZM2-6 เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้อยู่ในช่วง 6-10 และสามารถทนเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0-7 ได้ ส่วนไอโซเลต ZM2-6 ทนได้สูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 8 สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีน ไนวม และรีติวซ์ในเตรตได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลต KE2-3 และ ZM2-6 มีความคล้ายคลึงกับ *Jiangella muralis* DSM 45357<sup>T</sup> 99.31% และ *Jiangella alba* DSM 45237<sup>T</sup> 99.93% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลตนี้จัดอยู่ในสกุล *Jiangella* (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.2 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต KE2-3 (ก) และ ZM2-6 (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar



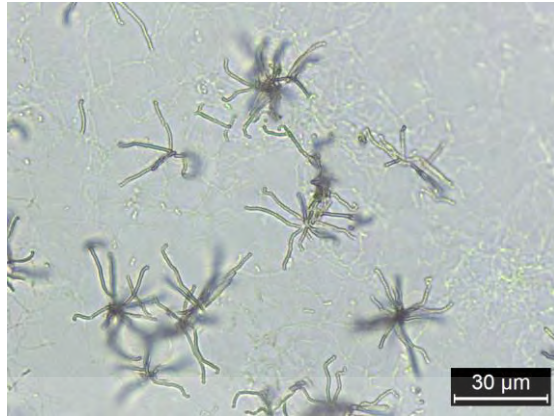
รูปที่ 4.3 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต KE2-3 และ ZM2-6 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

#### 4.2.2 วงศ์ *Micromonosporaceae*

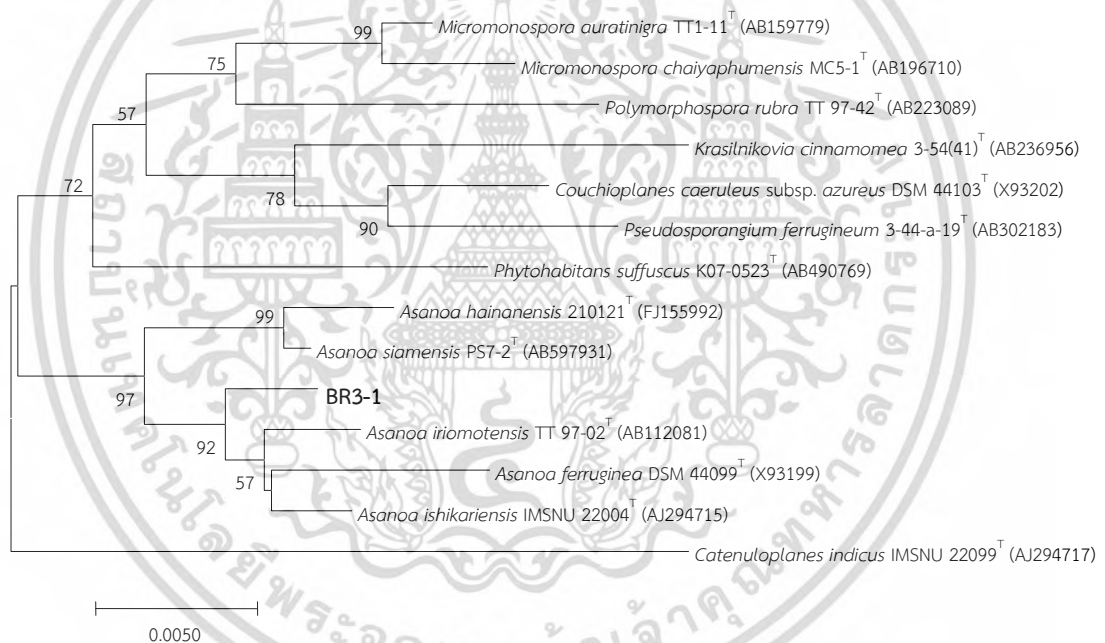
ประกอบด้วย 5 สกุล ได้แก่ *Asanoa* *Dactylosporangium* *Jishengella* *Micromonospora* และ *Phytohabitans* ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

##### (1) สกุล *Asanoa*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 1 ไอโซเลต คือ BR3-1 สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสาย (มีจำนวนสปอร์มากกว่า 10 สปอร์ต่อสาย) บนปลายของก้านชูสปอร์ขนาดสั้นซึ่งชูขึ้นมาโดยตรงจากผิวอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.4) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 จะสร้างเส้นใยอาหารสีส้ม (deep orange) และสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีส้มเข้มอมแดง (strong reddish orange) (ภาคผนวก ค) ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้อยู่ในช่วง 5-10 และสามารถทนเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0-2 ได้ สามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและรีดิวซ์ไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Asanoa ishikariensis* DSM 44718<sup>T</sup> 99.37% และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Asanoa* (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.4 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต BR3-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar



รูปที่ 4.5 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต BR3-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

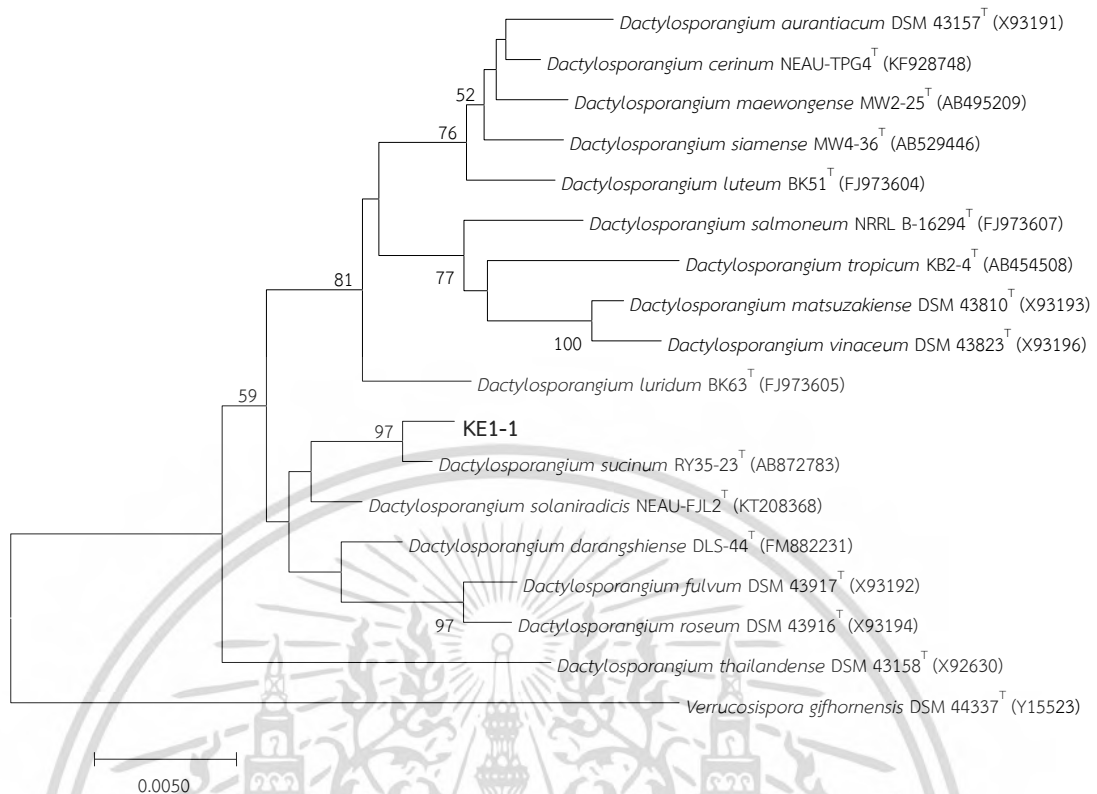
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) สกุล *Dactylosporangium*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 1 ไอโซเลต คือ KE1-1 มีการสร้างโครงสร้างลักษณะกลม (globose bodies) อยู่บนเส้นใยอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.6) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 จะสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน (pale yellow) (ภาคผนวก ค) ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำบนอาหารทดสอบทุกชนิด ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้อยู่ในช่วง 5-10 และสามารถทนเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0-2 ได้ สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนม และสามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Dactylosporangium sucinum* RY35-23<sup>T</sup> 99.72% และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Dactylosporangium* (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.6 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต KE1-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar

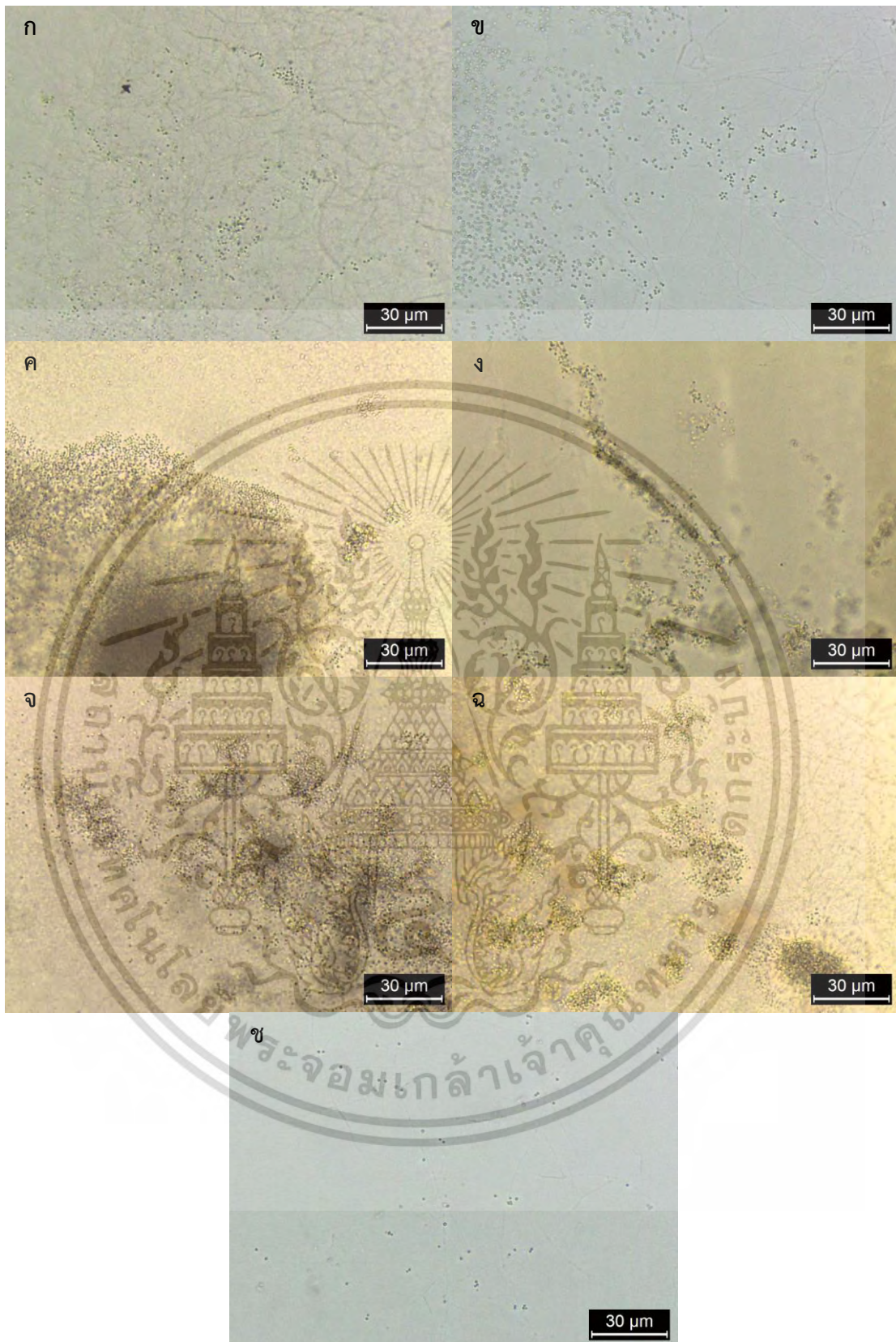


รูปที่ 4.7 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต KE1-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

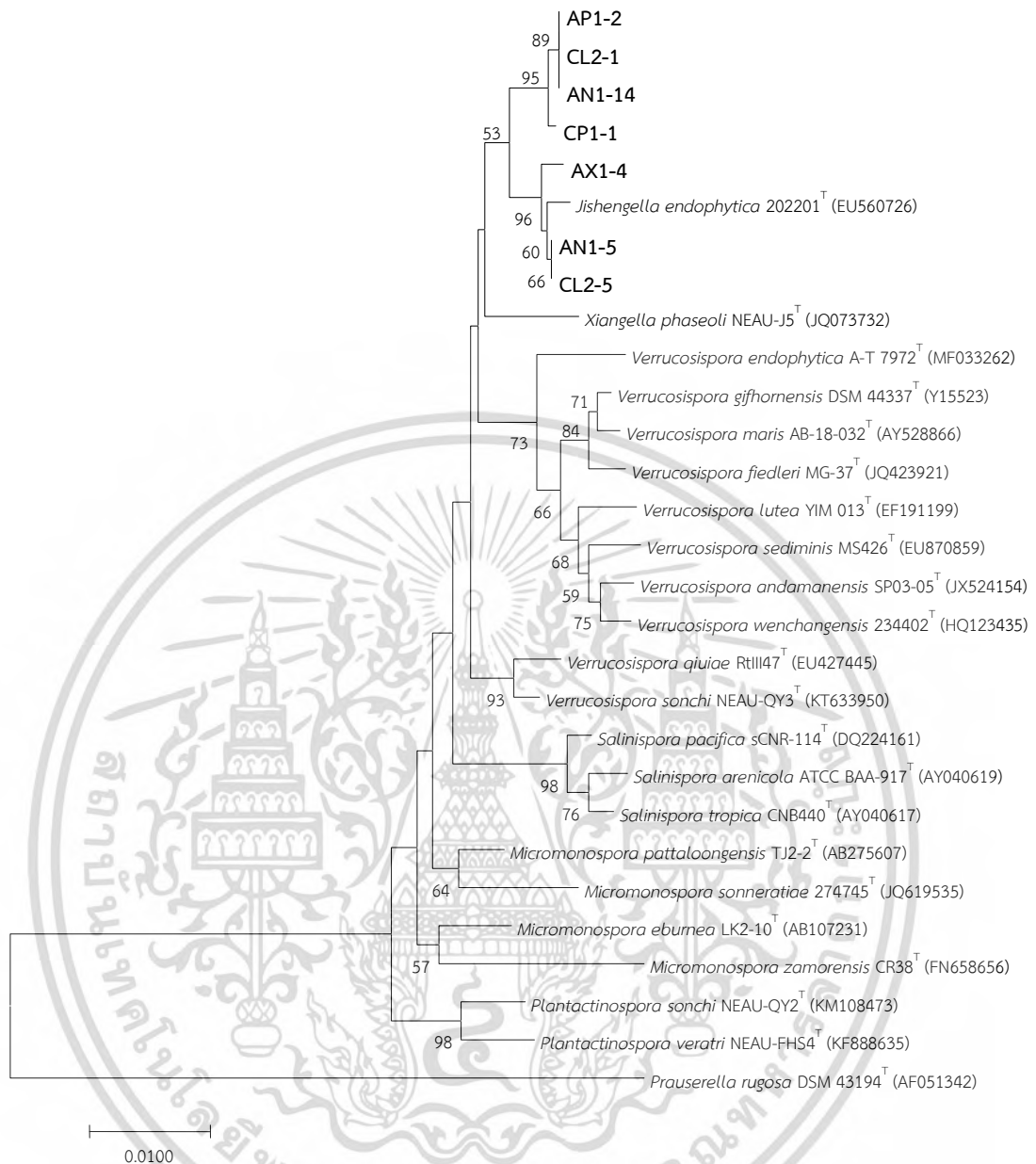
### (3) สกุล *Jishengella*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ AN1-5 AX1-4 CL2-5 CP1-1 AN1-14 AP1-2 และ CL2-1 สร้างสปอร์เดี่ยวรูปร่างกลมอยู่บนเส้นใยอาหารที่มีลักษณะแตกกิ่งก้าน ไม่สร้างเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.8) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 จะสร้างเส้นใยที่มีสีส้มเหลืองสดใส (vivid orange yellow) ไปจนถึงสีส้มเหลืองอ่อน (pale orange yellow) (ภาคผนวก ค) ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำบนอาหารทดสอบทุกชนิด ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส แต่มี 2 ไอโซเลต คือ AP1-2 และ CP1-1 ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสได้ และไอโซเลต AX1-4 เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 6-10 ไอโซเลต สามารถทนเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0-5 ได้ แต่มี 3 ไอโซเลต คือ AX1-4 CL2-1 และ CP1-1 ทนเกลือได้สูงสุดที่ความเข้มข้นเพียงร้อยละ 2 4 และ 3 ตามลำดับ ทุกไอโซเลตสามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ และมี 3 ไอโซเลต คือ AN1-14 AP1-2 และ CL2-1 สามารถย่อยสลาย เจลาตินได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับ *Jishengella endophytica* 202201<sup>T</sup> 99.10-99.56% (ตารางที่ 4.2) จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลตนี้จัดอยู่ในสกุล *Jishengella* (รูปที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.8** ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต AN1-5 (ก) AN1-14 (ข) AP1-2 (ค) AX1-4 (ง) CL2-1 (จ) CL2-5 (ฉ) และ CP1-1 (ช) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล เอกสารนี้เป็นเอกสารที่พิมพ์และแจกจ่ายฟรีในชื่อของมูลนิธิเพื่อประโยชน์ของสังคมไทย ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AN1-5 AN1-14 AP1-2 AX1-4 CL2-1 CL2-5 และ CP1-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

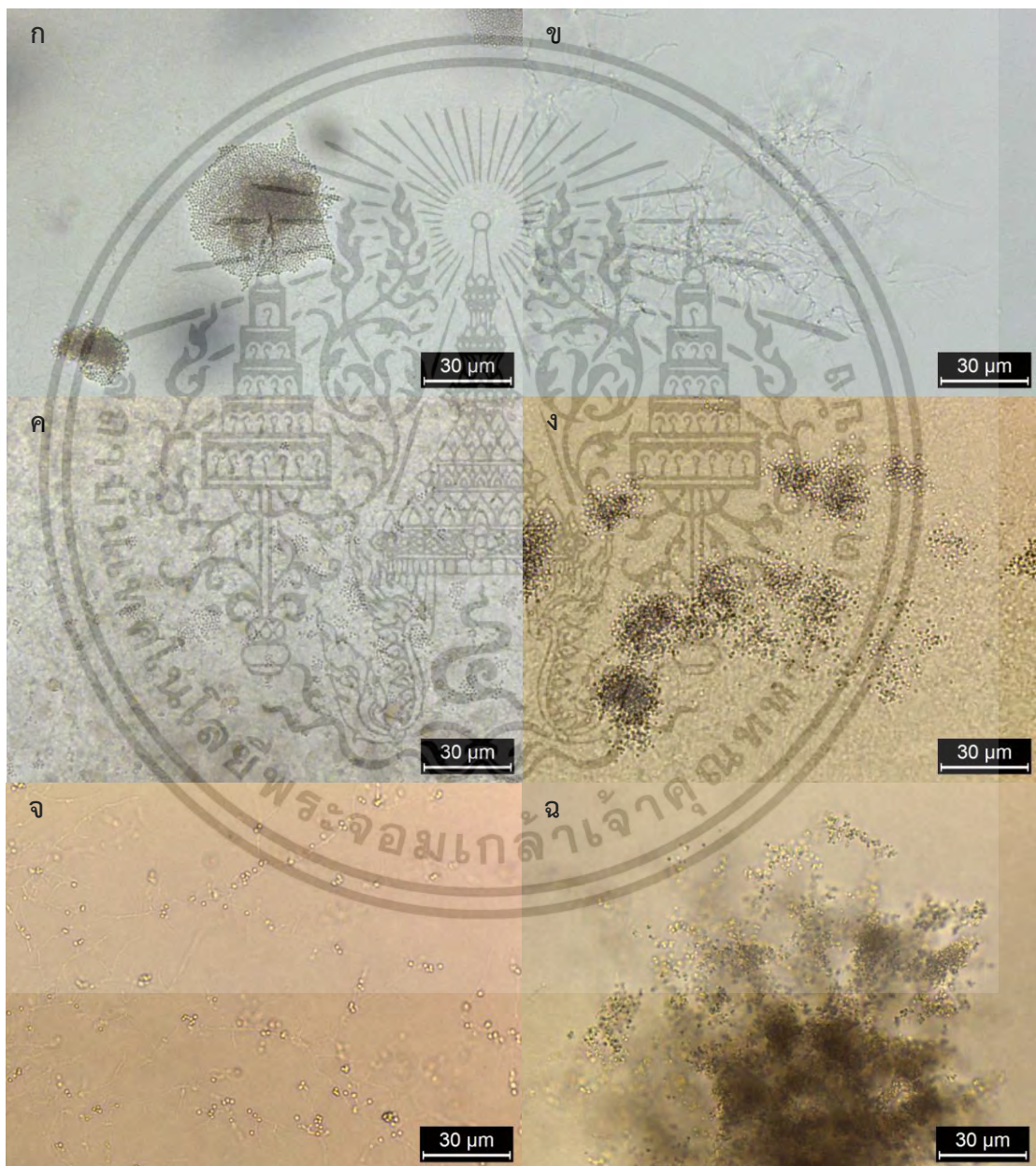
#### (4) สกุล *Micromonospora*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ AN1-19 AN1-32 AN1-37 AN2-6 AN3-10 AP1-5 CZ1-1 KG1-3 KK1-2 SC1-2 ZM2-2 และ ZO1-2 สร้างสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.10 และ 4.11) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 จะสร้างเส้นใยอาหารที่มีสีส้มเหลือง (vivid orange yellow) ไปจนถึงสีเขียวมะกอก (deep olive green) (ภาคผนวก ค) มีหลายไอโซเลตสามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ โดยมีสีเหลืองส้มอ่อน (pale orange yellow) ไปจนถึงสีเขียวมะกอก (moderate olive green) ลักษณะการเจริญบนอาหาร

ต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง หลายไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 40 องศาเซลเซียส และมี

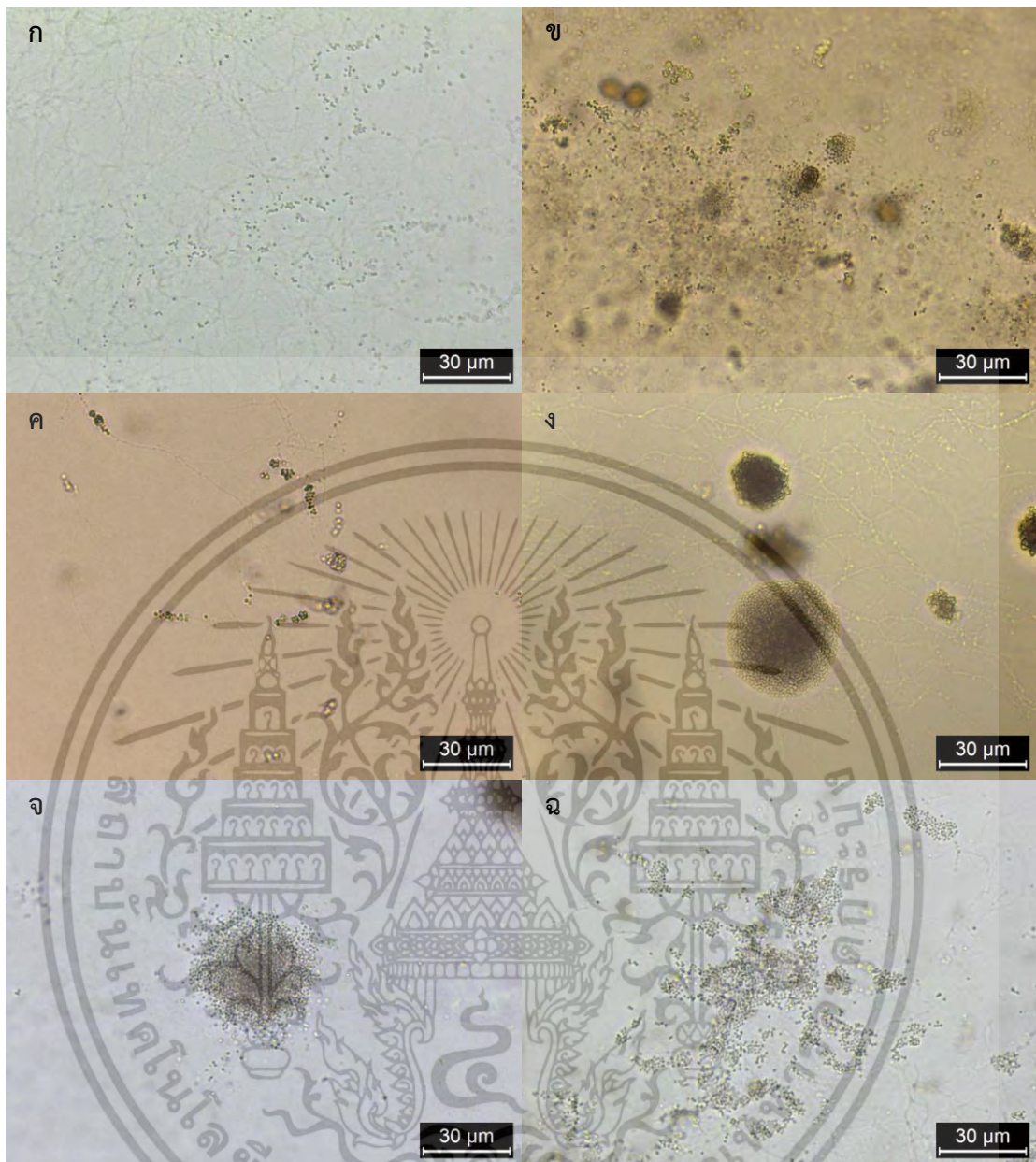
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 45 องศาเซลเซียส มีเพียง 1 ไอโซเลต คือ AN3-10 ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 5-10 และ 6-10 สามารถทนเกลือสูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 3-5 ทุกไอโซเลตสามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนมได้ เชื้อส่วนมาก (ยกเว้นไอโซเลต AN2-6 AP1-5 และ CZ1-1) สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ และเชื้อทุกไอโซเลต (ยกเว้น CZ1-1) ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับสกุล *Micromonospora* (99.43-100%) (ตารางที่ 4.2) และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าทั้ง 12 ไอโซเลตนี้จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* ดังแสดงในรูปที่ 4.12



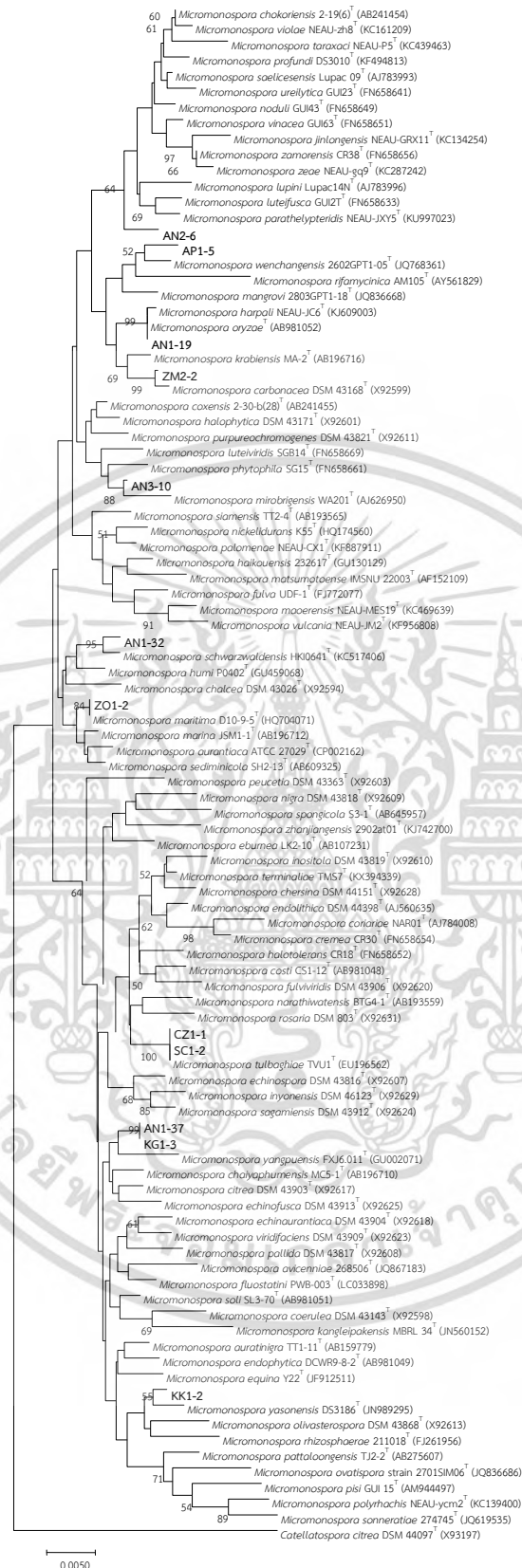
รูปที่ 4.10 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต AN1-19 (ก) AN1-32 (ข) AN1-37 (ค) AN2-6 (ง) AN3-10 (จ) และ AP1-5 (ฉ) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ในอินเทอร์เน็ตโดยไม่มีการคิดค่าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต CZ1-1 (ก) KG1-3 (ข) KK1-2 (ค) SC1-2 (ง) ZM2-2 (จ) และ ZO1-2 (ฉ) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



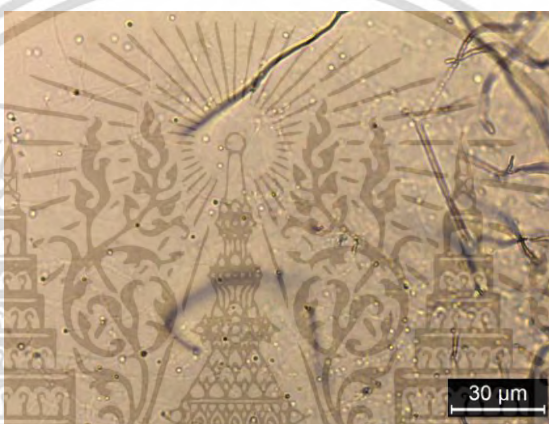
รูปที่ 4.12 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AN1-19 AN1-32 AN1-37 AN2-6 AN3-10 AP1-5 CZ1-1

KG1-3 KK1-2 SC1-2 ZM2-2 และ ZOI-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

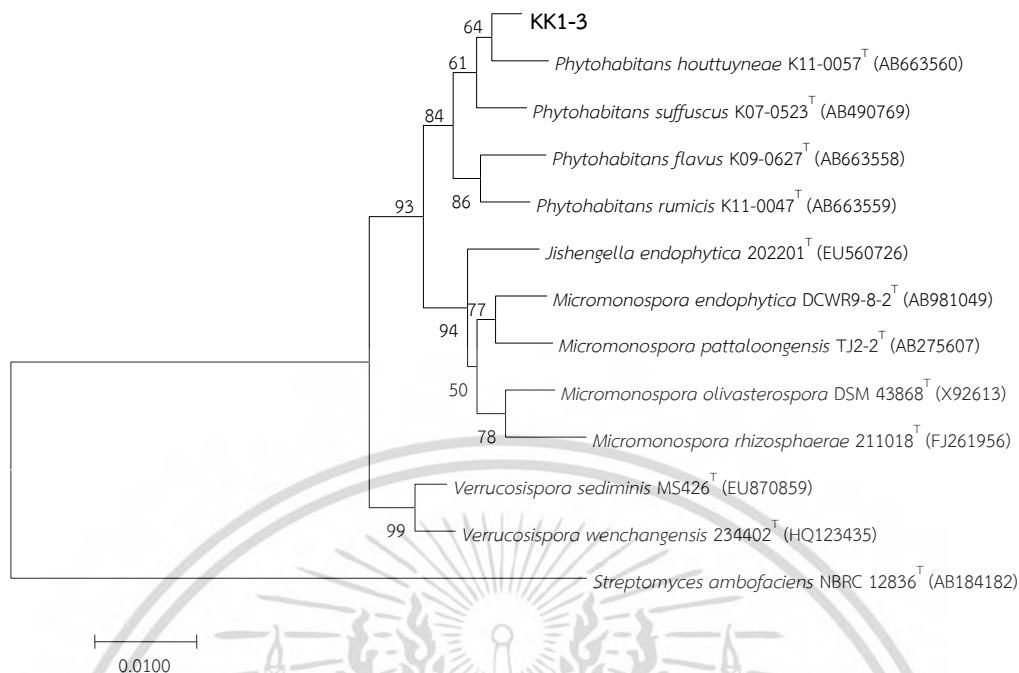
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(5) สกุล *Phytoh abitans*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 1 ไอโซเลต คือ KK1-3 สร้างทั้งสปอร์เดี่ยวรูปกลมและสปอร์สายยาว (มากกว่า 10 สปอร์) (รูปที่ 4.13) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองเข้ม (strong yellow) สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลืองอ่อน (pale yellow) (ภาคผนวก ค) ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้อยู่ในช่วง 6-10 และสามารถทนเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0-3 สามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและรีดิวซ์ไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Phytoh abitans houttuynae* K11-0057<sup>T</sup> 99.03% และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Phytoh abitans* (รูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.13 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต KK1-3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar



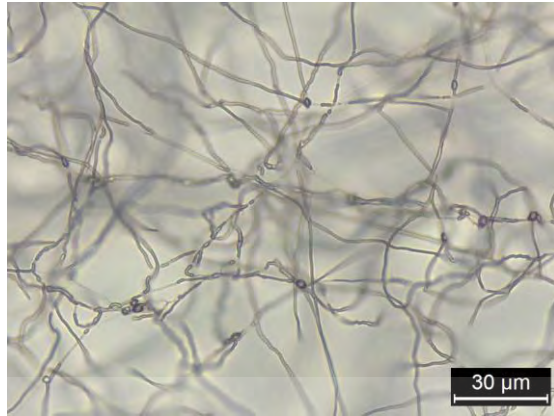
รูปที่ 4.14 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต KK1-3 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

#### 4.2.3 วงศ์ *Pseudonocardiaceae*

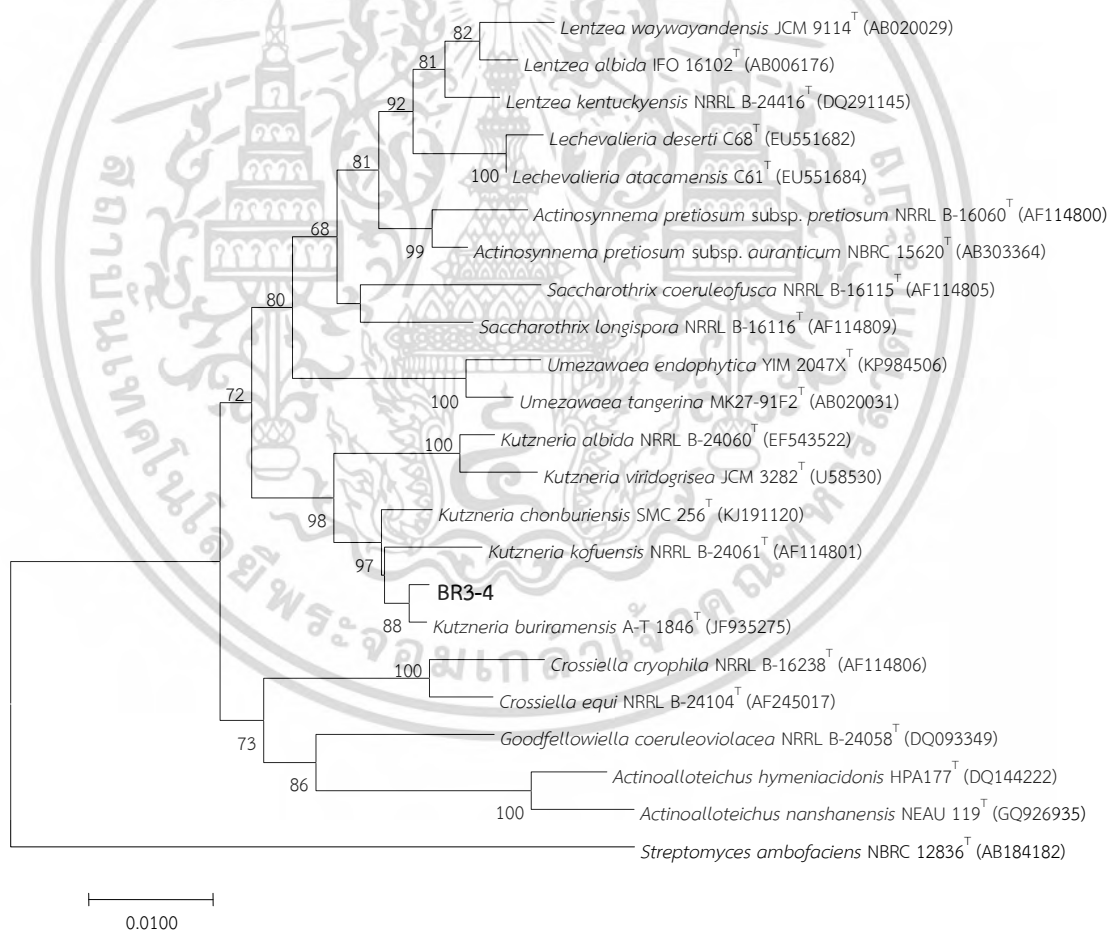
ประกอบด้วย 2 สกุล ได้แก่ *Kutzneria* และ *Saccharopolyspora* ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

##### (1) สกุล *Kutzneria*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 1 ไอโซเลต คือ BR3-4 สร้างเส้นใยอากาศที่แตกแขนงเป็นกิ่งก้าน และสร้างสปอร์ที่มีถุงหุ้ม (sporangium) ลักษณะกลมอยู่ที่ปลายของก้านชูสปอร์ ขนาดยาวบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.15) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 จะสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน (pale yellow) และสร้างเส้นใยอากาศสีขาว (white) (ภาคผนวก ค) สามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลืองบนอาหาร ISP5 ISP7 และ glucose asparagines agar ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้อยู่ในช่วง 4-10 และสามารถทนเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0-3 ได้ สามารถย่อยสลายแป้ง เจลาติน และโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Kutzneria buriramensis* DSM 45791<sup>T</sup> 99.64% และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Kutzneria* (รูปที่ 4.16)



รูปที่ 4.15 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต BR3-4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar



รูปที่ 4.16 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต BR3-4 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

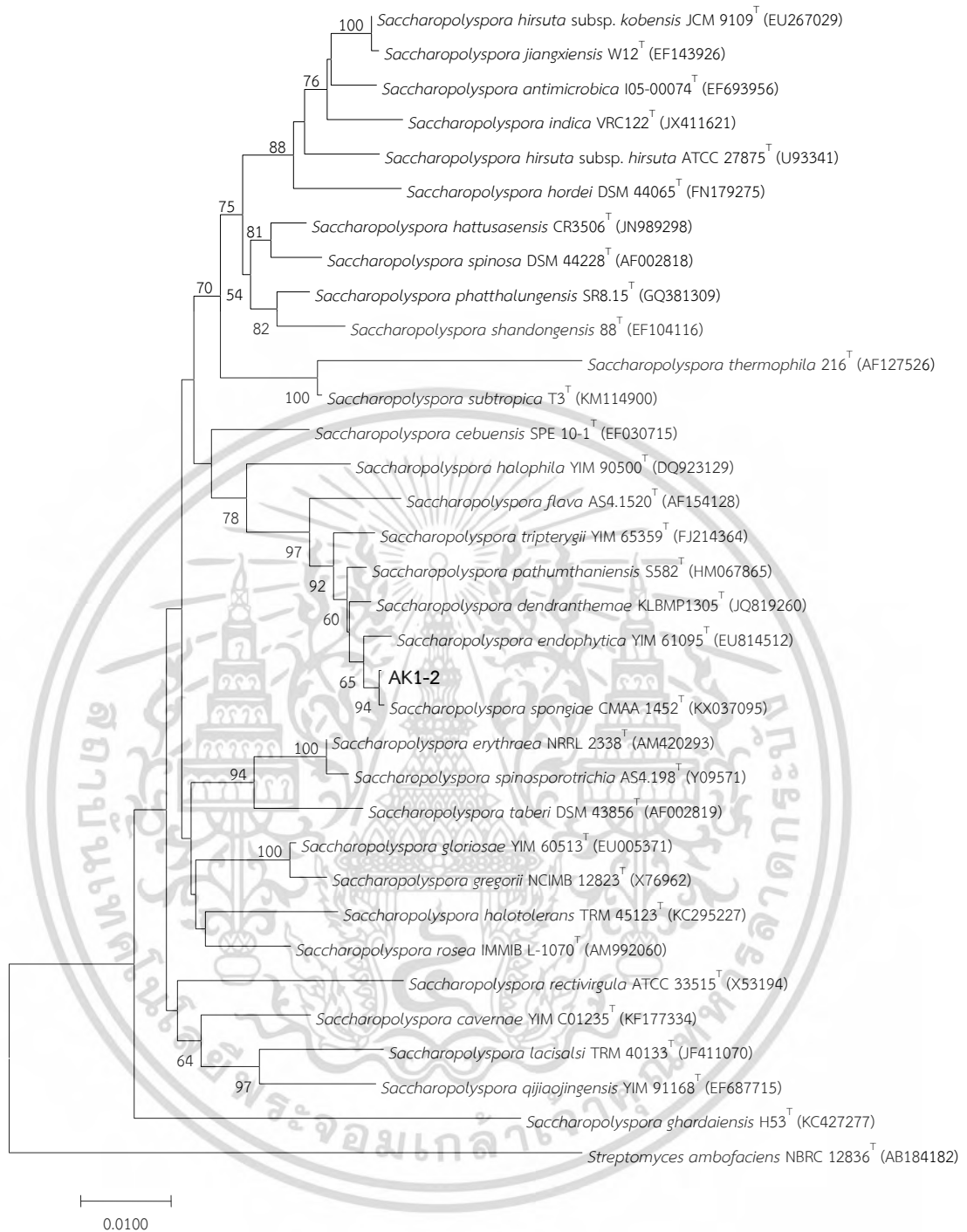
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) สกุล *Saccharopolyspora*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 1 ไอโซเลต คือ AK1-2 สร้างเส้นใยอาหารที่มีลักษณะแตกกิ่งก้าน และเส้นใยมักแตกหัก (fragment) เป็นท่อนสั้นๆ (รูปที่ 4.17) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 สร้างเส้นใยอาหารสีขาวอมเหลือง (yellowish white) (ภาคผนวก ค) ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำบนอาหารทดสอบทุกชนิด ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้อยู่ในช่วง 6-10 และสามารถทนเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0-14 ได้ สามารถย่อยสลายแป้ง เจลาติน และโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Saccharopolyspora spongiae* CMAA 1452<sup>T</sup> 99.93% และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Saccharopolyspora* (รูปที่ 4.18)



รูปที่ 4.17 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต AK1-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar



รูปที่ 4.18 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AK1-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

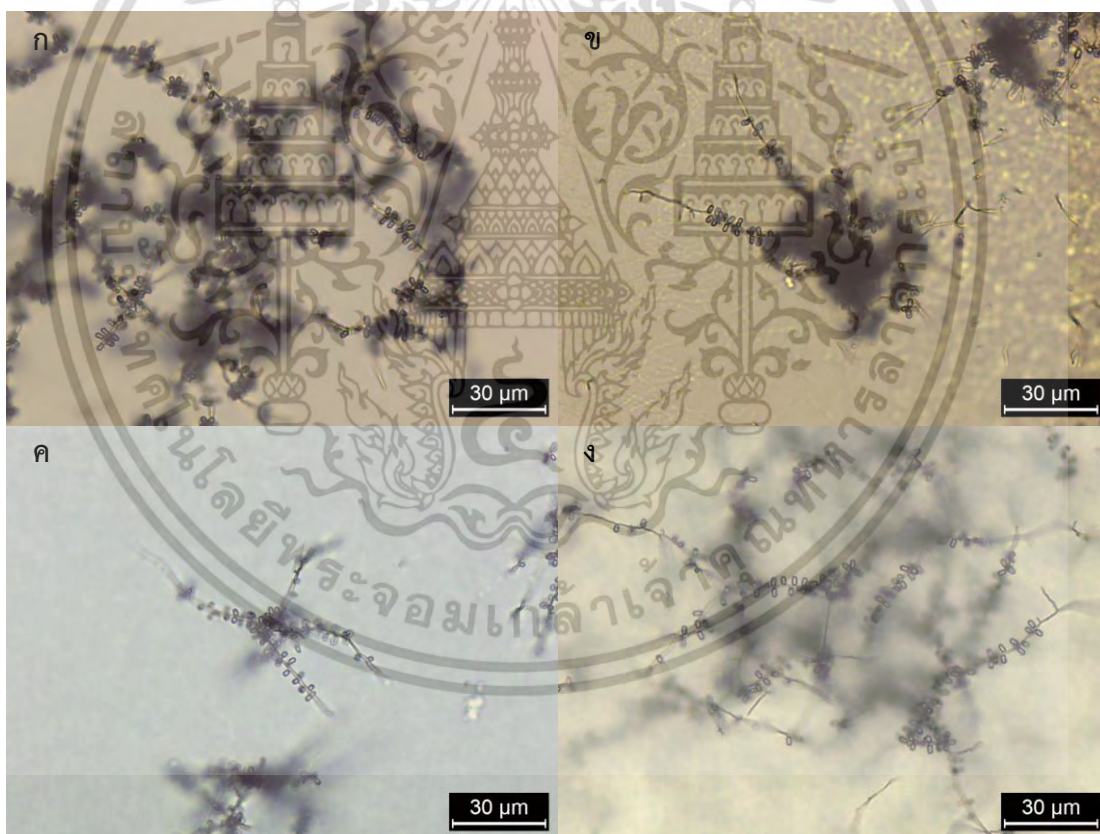
#### 4.2.4 วงศ์ Streptosporangiaceae

ประกอบด้วย 2 สกุล ได้แก่ *Microbispora* *Nonomurea* *Planotetraspora* *Sphaerisporangium* และ *Streptosporangium* ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

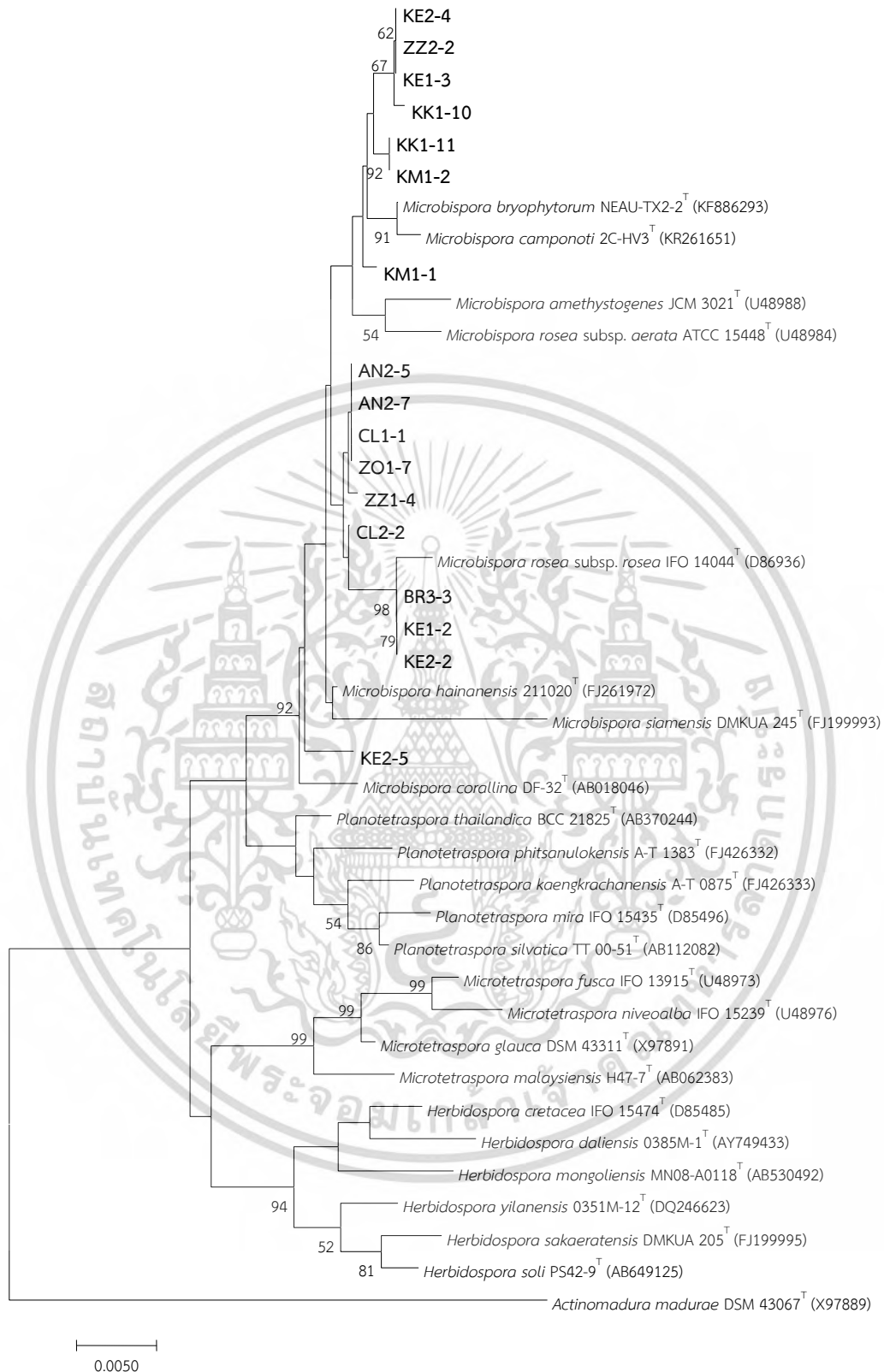
(1) สกุล *Microbispora*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 17 ไอโซเลต ได้แก่ AN2-5 AN2-7 BR3-3 CL1-1 CL2-2 KE1-2 KE1-3 KE2-2 KE2-4 KE2-5 KK1-10 KK1-11 KM1-1 KM1-2 ZO1-7 ZZ1-4 และ ZZ2-2 สร้างเส้นใยอาหารที่มีลักษณะแตกกิ่งก้านและสร้างสปอร์คู่อยู่บนก้านชูสปอร์สั้นๆ บนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.19) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 สร้างเส้นใยสีเหลืองอมเขียว (pale greenish yellow) ไปจนถึงสีน้ำตาล (moderate brown) (ภาคผนวก ค) เชื้อส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้อยู่ในช่วง 5-10 และ 6-10 สามารถทนเกลือได้สูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 ทุกไอโซเลตสามารถย่อยสลายแป้งได้ และเกือบทุกไอโซเลต (ยกเว้น ZZ1-4) สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมได้ ส่วนมากไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน (ยกเว้น AN2-7 KE1-3 และ KE2-4) และไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ (ยกเว้น AN2-7 KE2-2 KE2-4 และ ZZ2-2) (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับสกุล *Microbispora* (99.22-100%) และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Microbispora* (รูปที่ 4.20)



รูปที่ 4.19 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต BR3-3 (ก) KK1-10 (ข) ZZ1-4 (ค) และ ZZ2-2 (ง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

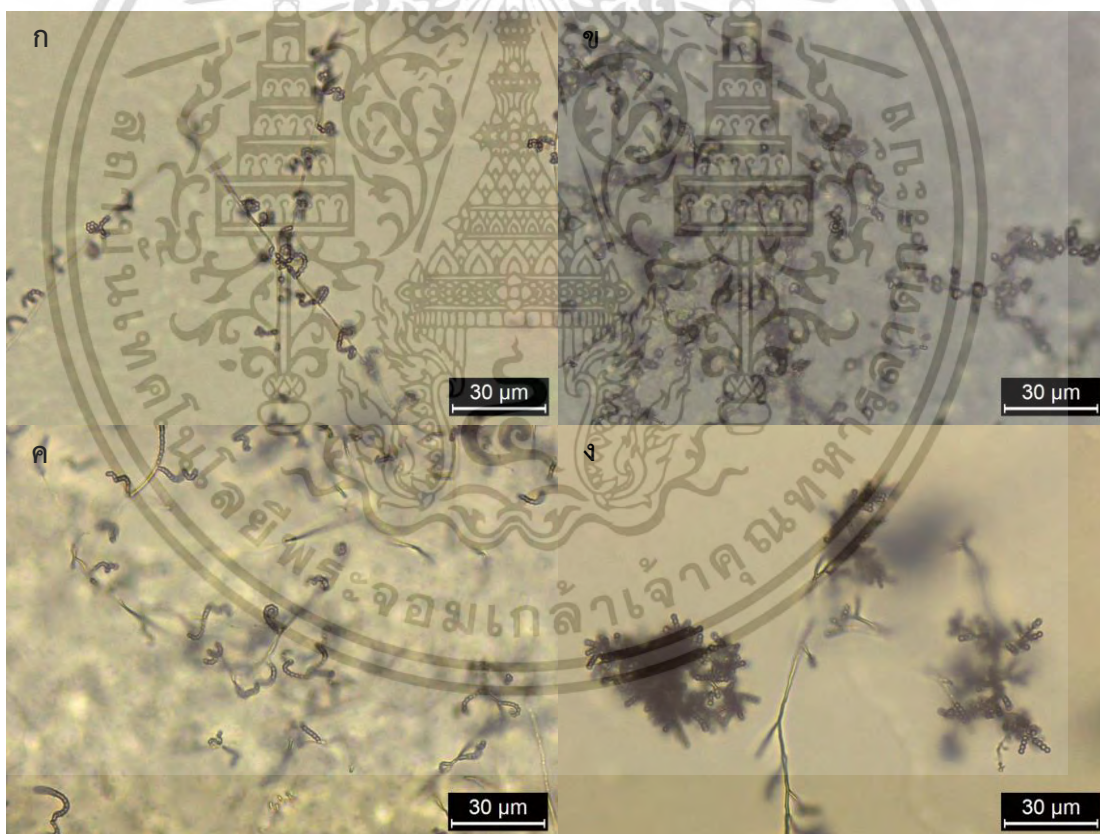


**รูปที่ 4.20** แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AN2-5 AN2-7 BR3-3 CL1-1 CL2-2 KE1-2 KE1-3 KE2-2 KE2-4 KE2-5 KK1-10 KK1-11 KM1-1 KM1-2 ZO1-7 ZZ1-4 และ ZZ2-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

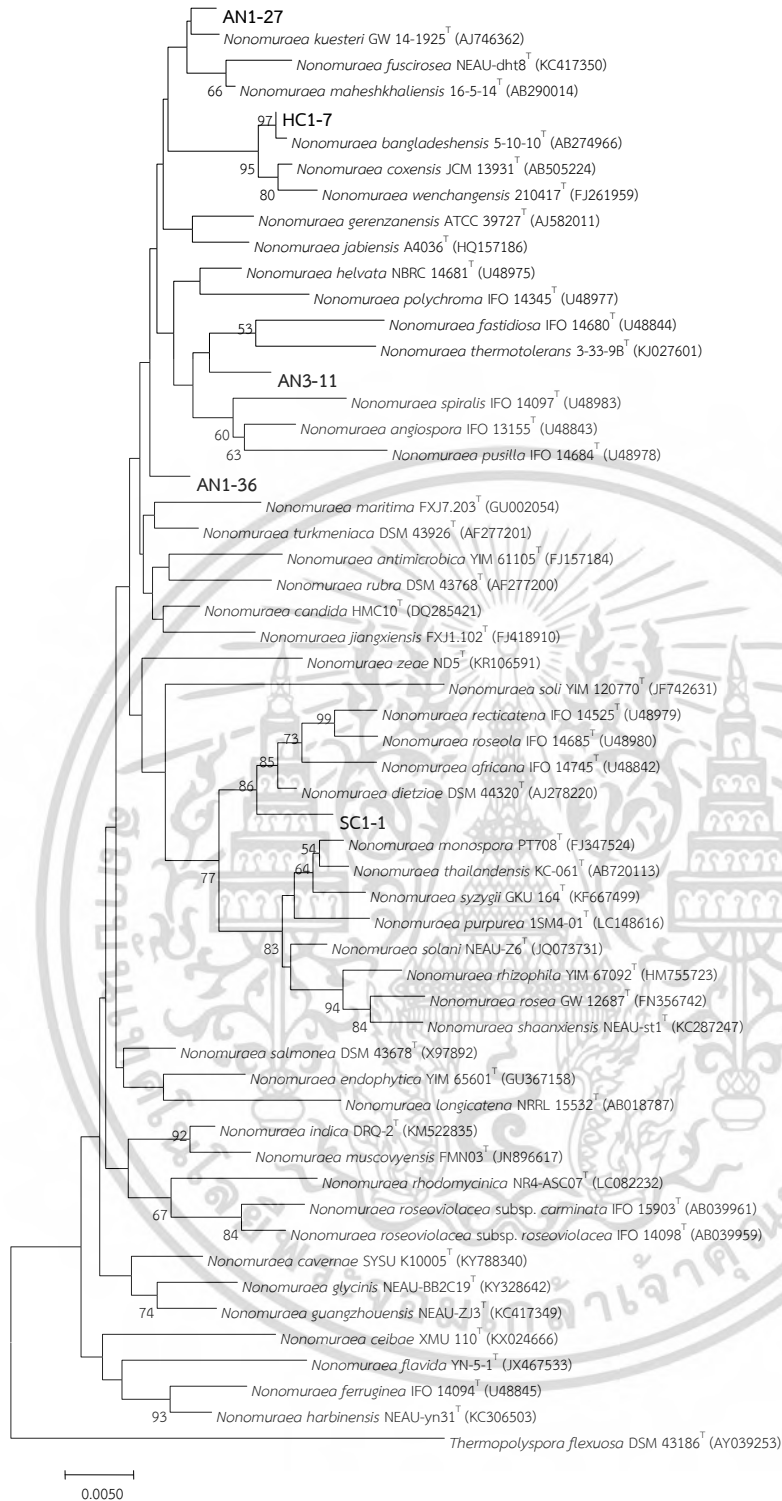
(2) สกุล *Nonomuraea*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ AN1-27 AN1-36 AN3-11 HC1-7 และ SC1-1 สร้างสปอร์สายสั้นบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.21) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 จะสร้างเส้นใยสีเหลืองอ่อน (pale yellow) ไปจนถึงสีดำม่วง (purplish black) (ภาคผนวก ค) เกือบทุกไอโซเลตไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ มีเพียงไอโซเลต SC1-1 ที่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเทาม่วง (purplish gray) บนอาหาร ISP3 ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง หลายไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 20-40 และ 20-45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 5-10 ยกเว้นไอโซเลต AN3-11 และ HC1-7 ที่เจริญได้ในช่วง 6-9 และ 6-10 ตามลำดับ ส่วนมากสามารถทนเกลือสูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ทุกไอโซเลตสามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนม และสามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ และมี 3 ไอโซเลต คือ AN1-27 AN3-11 และ HC1-7 สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับสกุล *Nonomuraea* (98.82-99.93%) (ตารางที่ 4.2) และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตนี้จัดอยู่ในสกุล *Nonomuraea* ดังแสดงในรูปที่ 4.22



รูปที่ 4.21 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต AN1-36 (ก) AN3-11 (ข) HC1-7 (ค) และ SC1-1 (ง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

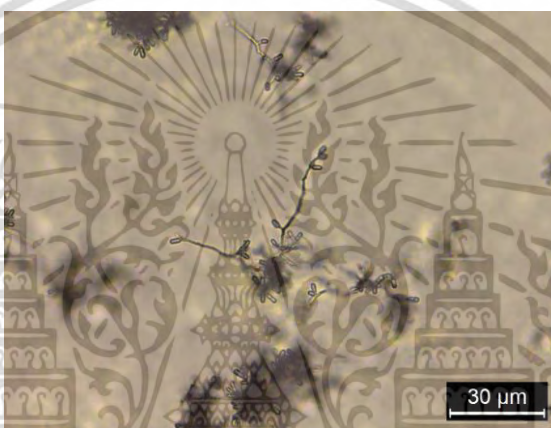


รูปที่ 4.22 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AN1-27 AN1-36 AN3-11 HC1-7 และ SC1-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

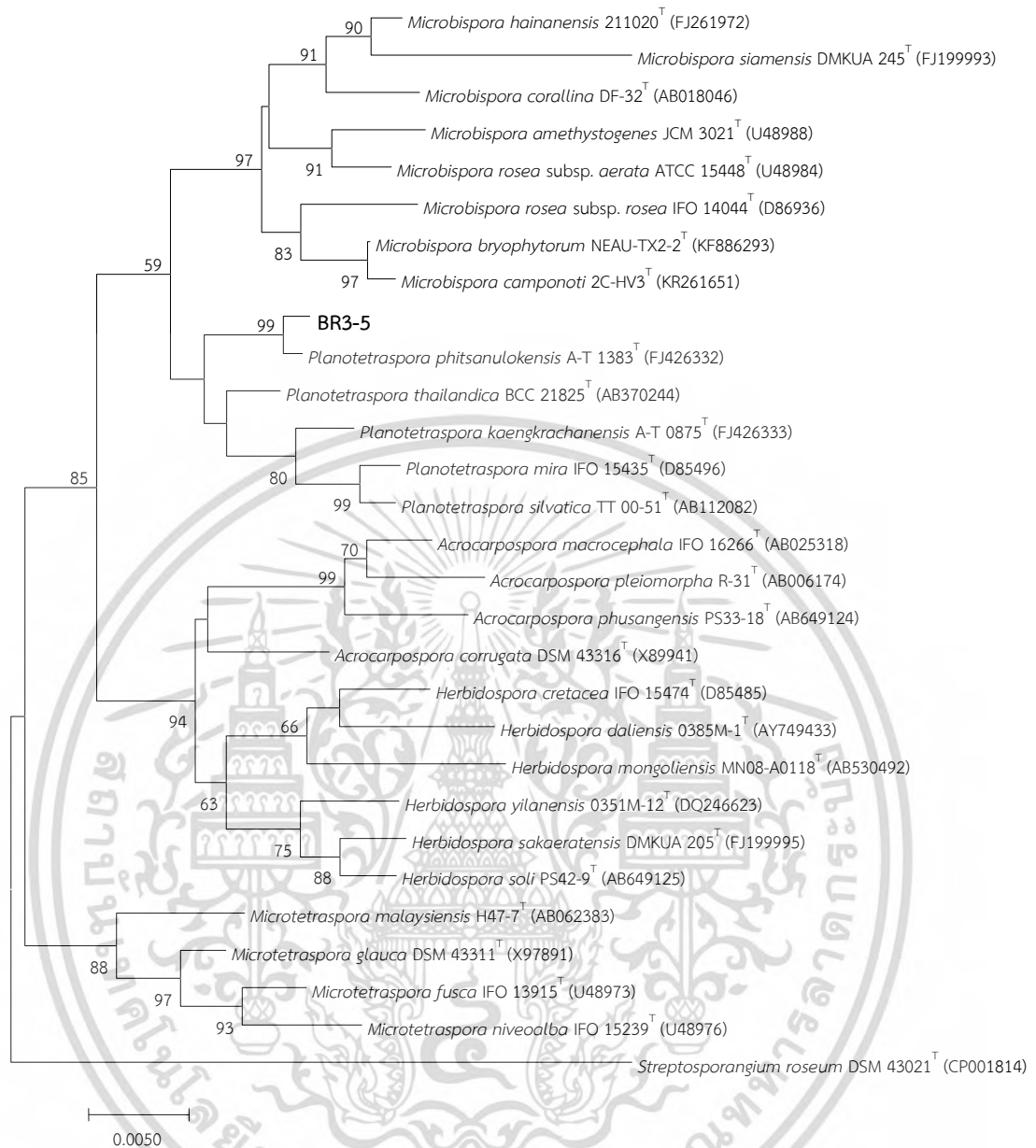
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) สกุล *Planotetraspora*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 1 ไอโซเลต คือ BR3-5 สร้างสปอร์ที่มีถุงหุ้มอยู่บนก้านชูสปอร์ขนาดสั้น ซึ่งภายในบรรจุสปอร์จำนวน 4 สปอร์ (รูปที่ 4.23) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 สร้างเส้นใยอาหารขาวอมเหลือง (yellowish white) (ภาคผนวก ค) ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำบนอาหารทดสอบทุกชนิด ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้อยู่ในช่วง 5-10 และสามารถทนเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0-1 ได้ สามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและรีดิวซ์ไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Planotetraspora phitsanulokensis* AT-1383<sup>T</sup> 99.71% และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Planotetraspora* (รูปที่ 4.24)



รูปที่ 4.23 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต BR3-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar

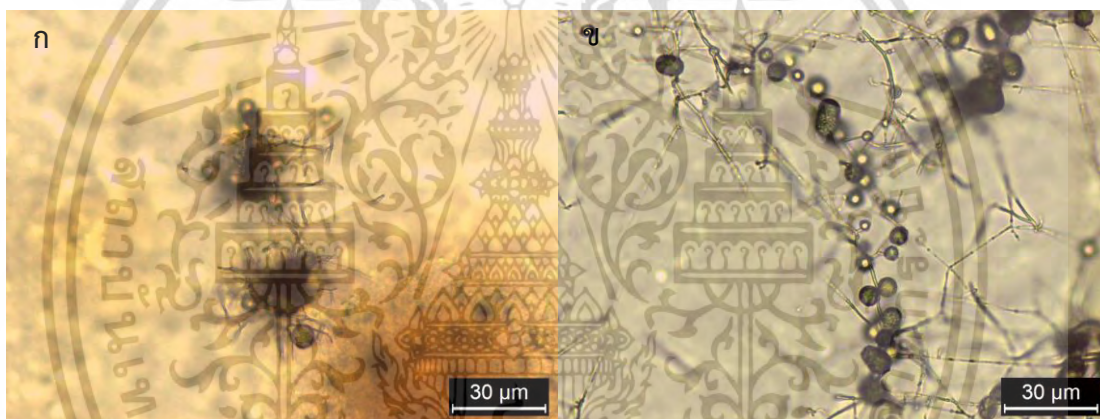


รูปที่ 4.24 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต BR3-5 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

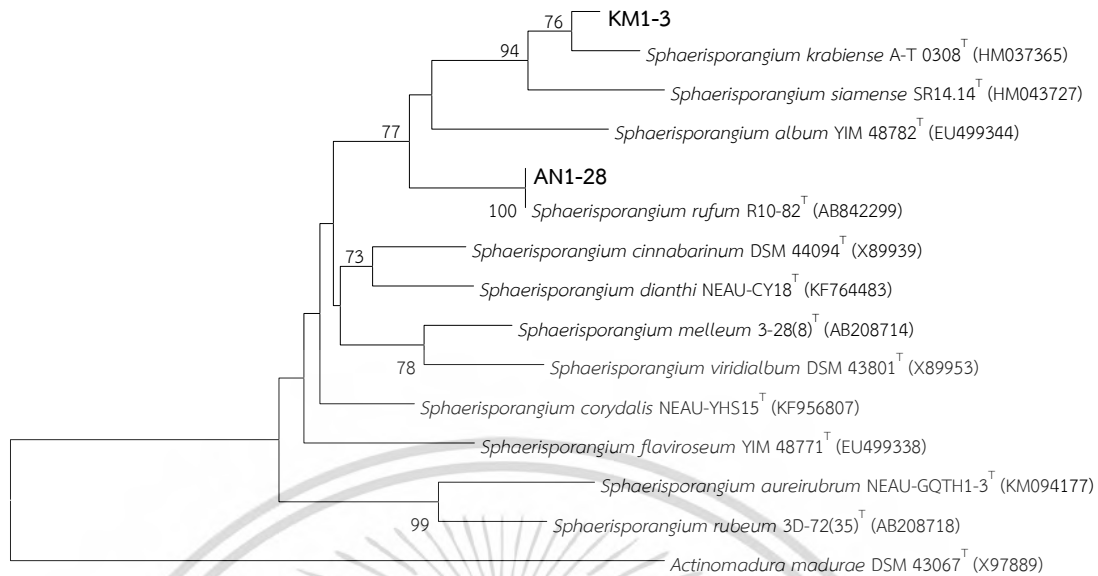
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(4) สกุล *Sphaerisorangium*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ AN1-28 และ KM1-3 สร้างสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้มทรงกลมบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.25) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 จะสร้างเส้นใยอาหารสีชมพูอมเหลือง (yellowish pink) (ภาคผนวก ค) ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำบนอาหารทดสอบทุกชนิด ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 20-40 และ 20-37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 6-10 สามารถทนเกลือสูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 2 ตามลำดับ ทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนมได้ ไอโซเลต AN1-28 ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ ส่วนไอโซเลต KM1-3 ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับ *Sphaerisorangium rufum* R10-82<sup>T</sup> 100% และ *Sphaerisorangium krabiense* AT-0308<sup>T</sup> 99.28% (ตารางที่ 4.2) และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลตนี้จัดอยู่ในสกุล *Sphaerisorangium* ดังแสดงในรูปที่ 4.26



รูปที่ 4.25 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของเชื้อไอโซเลต AN1-28 (ก) และ KM1-3 (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar

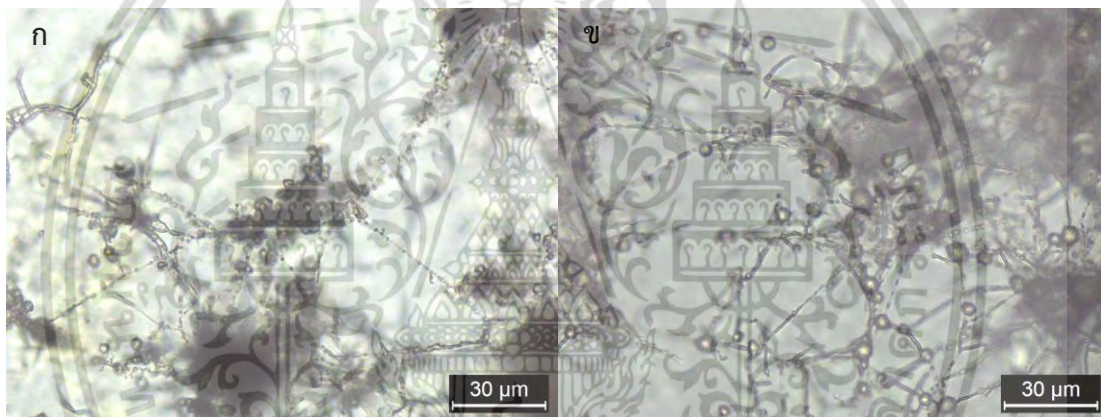


รูปที่ 4.26 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต KM1-3 และ KM1-28 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

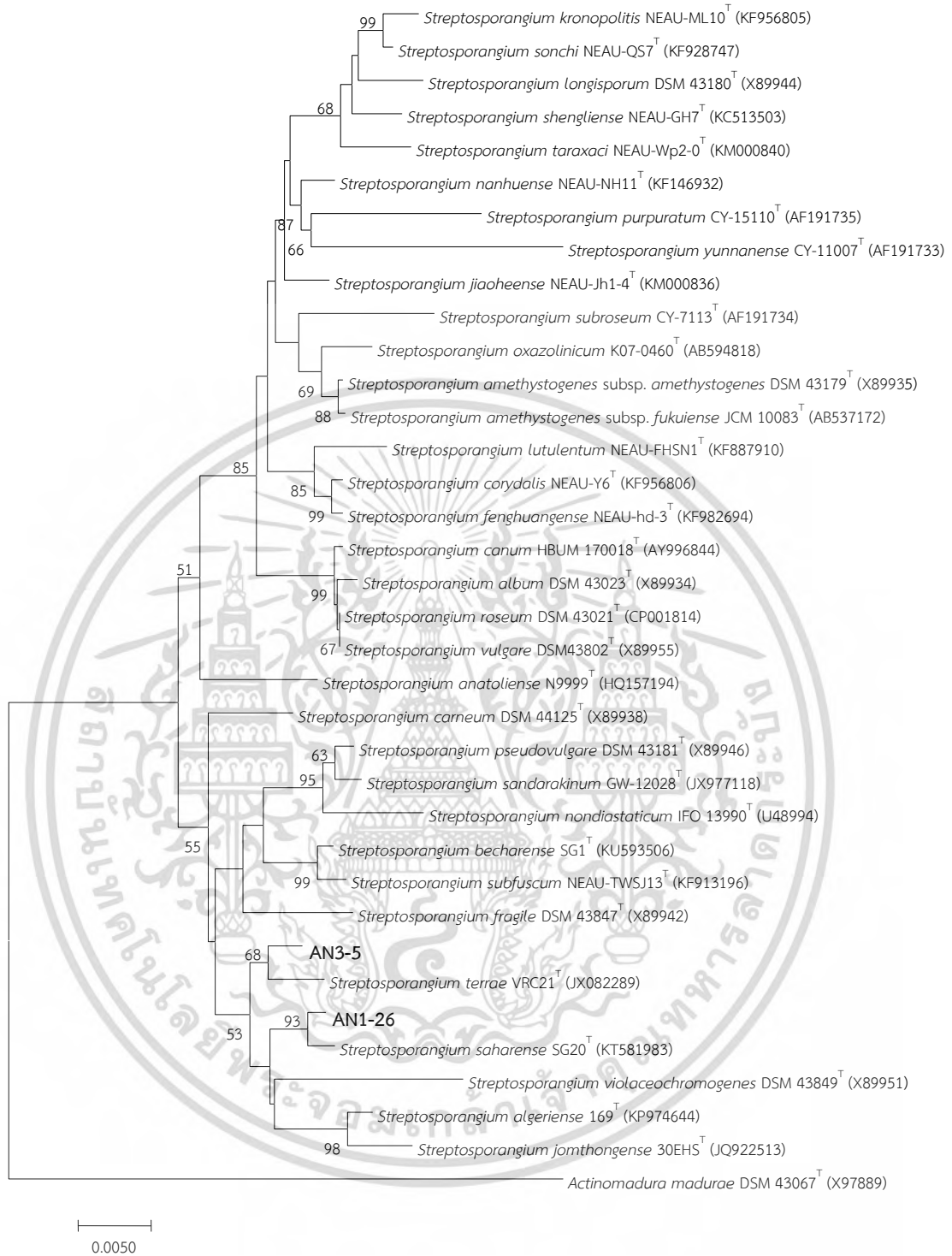
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(5) สกุล *Streptosporangium*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ AN1-26 และ AN3-5 สร้างสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้มทรงกลมบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.27) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 จะสร้างเส้นใยอาหารที่มีสีน้ำตาล (brown) สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมชมพู (pinkish white) (ภาคผนวก ค) ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำบนอาหารทดสอบทุกชนิด ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 20-40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สามารถเจริญได้ อยู่ในช่วง 5-10 สามารถทนเกลือสูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 สามารถย่อยสลายแป้ง เจลาติน โปรตีนในนมและรีดิซไนเตรตได้ ยกเว้นไอโซเลต AN1-26 ไม่สามารถย่อยสลายแป้งได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับ *Streptosporangium saharensis* SG20<sup>T</sup> 99.63% และ *Streptosporangium terrae* VRC21<sup>T</sup> 99.30% (ตารางที่ 4.2) และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลตนี้จัดอยู่ในสกุล *Streptosporangium* ดังแสดงในรูปที่ 4.28



รูปที่ 4.27 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของเชื้อไอโซเลต AN1-26 (ก) และ AN3-5 (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar



รูปที่ 4.28 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AN1-26 และ AN3-5 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

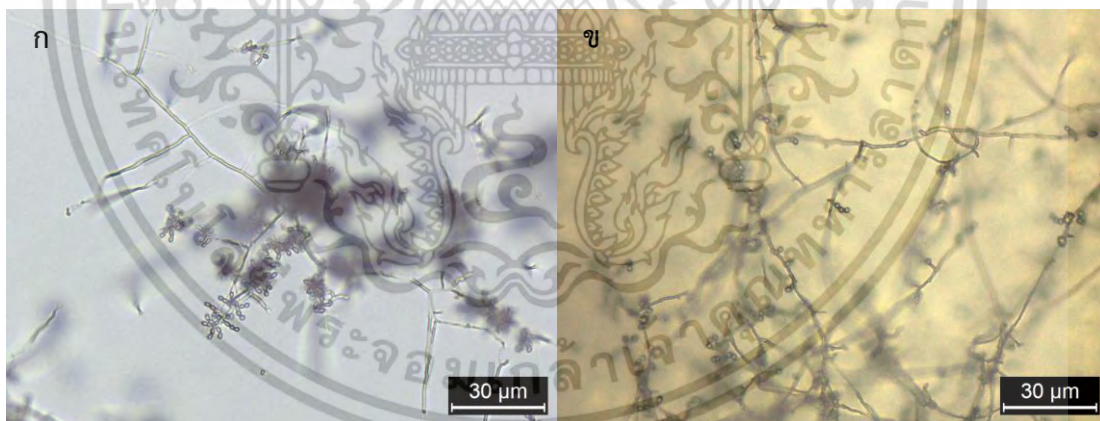
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.5 วงศ์ *Thermomonosporaceae*

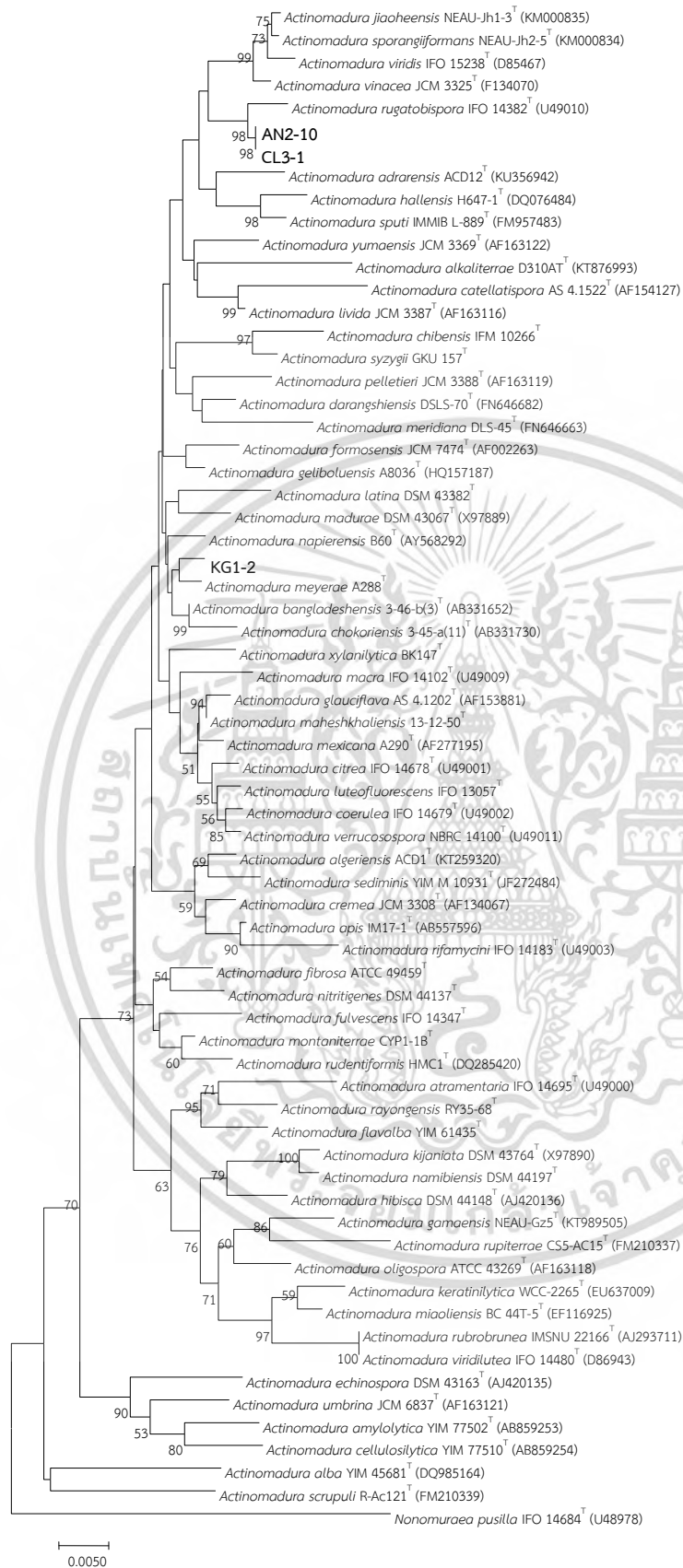
ประกอบด้วย 1 สกุล คือ *Actinomadura* ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

##### (1) สกุล *Actinomadura*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ AN2-10 CL3-1 และ KG1-2 สร้างเส้นใยอาหารแตกแขนงเป็นกิ่งก้าน และสร้างสปอร์สายสั้นๆ บนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.29) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 จะสร้างเส้นใยอาหารที่มีสีชมพูเข้ม (strong pink) ไปจนถึงเหลืองเขียวอ่อนๆ (light yellow green) (ภาคผนวก ค) ไอโซเลต KG1-2 สามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลืองอมเขียวอมเทา (grayish greenish yellow) บนอาหาร ISP7 ได้ ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 20-40 องศาเซลเซียส แต่ไอโซเลต KG1-2 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 5-10 และ 6-10 สามารถทนเกลือสูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 แต่ไอโซเลต KG1-2 ทนเกลือได้สูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 สามารถย่อยสลายแป้ง เจลาติน โปรตีนเนนม และรีดิวซ์ไนเตรตได้ ยกเว้น ไอโซเลต KG1-2 ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทไอโซเลต AN2-10 และ CL3-1 มีความคล้ายคลึงกับ *Actinomadura rugatobispora* IFO 14382<sup>T</sup> 99.27% และไอโซเลต KG1-2 มีความคล้ายคลึงกับ *Actinomadura bangladeshensis* 3-46-b3<sup>T</sup> 99.31% (ตารางที่ 4.2) จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลตนี้จัดอยู่ในสกุล *Actinomadura* ดังแสดงในรูปที่ 4.30



รูปที่ 4.29 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของเชื้อไอโซเลต AN2-10 (ก) และ KG1-2 (ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar



รูปที่ 4.30 แสดงตำแหน่งของไอโซเลต AN2-10 CL3-1 และ KG1-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

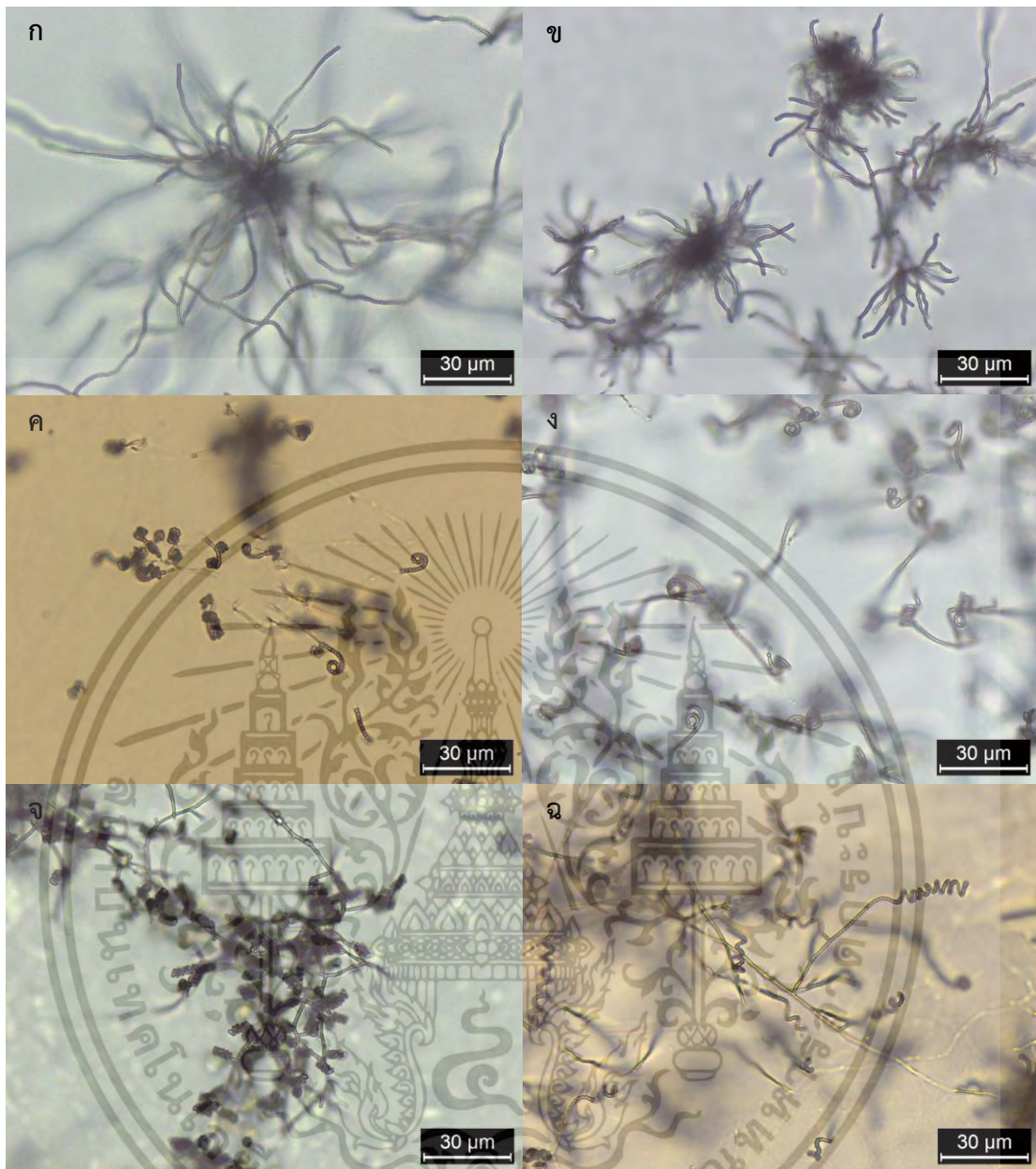
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้กับโรงเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.5 วงศ์ *Streptomycetaceae*

ประกอบด้วย 1 สกุล คือ *Streptomyces* ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

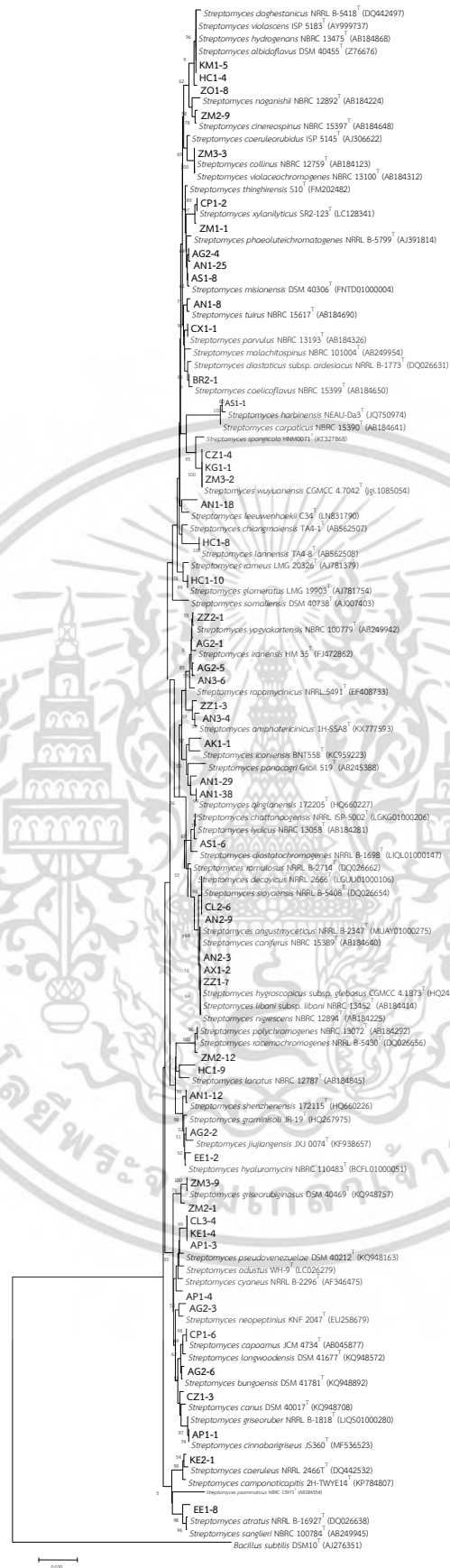
##### (1) สกุล *Streptomyces*

เอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 53 ไอโซเลต ได้แก่ AG2-1 AG2-2 AG2-3 AG2-4 AG2-5 AG2-6 AK1-1 AN1-8 AN1-12 AN1-18 AN1-25 AN1-29 AN1-38 AN2-3 AN2-9 AN3-4 AN3-6 AP1-1 AP1-3 AP1-4 AS1-1 AS1-6 AS1-8 AX1-2 BR2-1 CL2-6 CL3-4 CP1-2 CP1-6 CX1-1 CZ1-3 CZ1-4 EE1-2 EE1-8 HC1-4 HC1-8 HC1-9 HC1-10 KE1-4 KE2-1 KG1-1 KM1-5 ZM1-1 ZM2-1 ZM2-9 ZM2-12 ZM3-2 ZM3-3 ZM3-9 ZO1-8 ZZ1-3 ZZ1-7 และ ZZ2-1 สร้างเส้นใยอาหารแตกแขนงเป็นกิ่งก้านและสร้างเส้นใยอากาศปริมาณมาก สร้างสปอร์ที่ต่อกันเป็นสายยาว โดยจาก 53 ไอโซเลต พบการเรียงตัวของสปอร์ 3 รูปแบบ ได้แก่ สปอร์ที่มีลักษณะตรง (รูปที่ 4.31 ก และ ข) สปอร์ที่มีลักษณะคล้ายรูปตะขอ (รูปที่ 4.31 ค และ ง) สปอร์ที่มีลักษณะเป็นเกลียว (รูปที่ 4.31 จ และ ฉ) ลักษณะของเส้นใย สปอร์ และโคโลนีของแต่ละไอโซเลตแสดงในภาคผนวก ค สีและลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 5-10 และสามารถทนเกลือความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 14 เชื้อเกือบทั้งหมดสามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนมได้ และส่วนมากสามารถย่อยสลายเจลาตินได้ และจำนวนเกือบครึ่งหนึ่งสามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับสกุล *Streptomyces* (98.41-100%) และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 4.32)



รูปที่ 4.31 ลักษณะสปอร์และเส้นใยของไอโซเลต CZ1-3 (ก) HC1-4 (ข) AG2-4 (ค) ZM2-12 (ง) AG2-1 (จ) และ AG2-2 (ฉ) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า) ซึ่งเจริญบนอาหาร soil extract agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.32 แสดงตำแหน่งของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจำนวน 53 ไอโซเลต บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้

รหัส	ความเข้มข้นเกลือ (ร้อยละ)															ความเป็นกรด-ด่าง										อุณหภูมิ (°C)						Peptonization	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	4	5	6	7	8	9	10	20	30	37	40	45	50	55	60					
1. <i>Jiangella</i>																																			
KE2-3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+		
ZM2-6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+		
2. <i>Asanoa</i>																																			
BR3-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-		
3. <i>Dactylosporangium</i>																																			
KE1-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	
4. <i>Jishengella</i>																																			
AN1-5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
AN1-14	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	
AP1-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	
AX1-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-		
CL2-1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	
CL2-5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
CP1-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ (ต่อ)

รหัส	ความเข้มข้นเกลือ (ร้อยละ)															ความเป็นกรด-ด่าง										อุณหภูมิ (°C)						Peptonization	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	4	5	6	7	8	9	10	20	30	37	40	45	50	55	60					
5. <i>Micromonospora</i>																																			
AN1-19	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-		
AN1-32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-		
AN1-37	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-		
AN2-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-		
AN3-10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-		
AP1-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-		
CZ1-1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+		
KG1-3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-		
KK1-2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-		
SC1-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-		
ZM2-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	
ZO1-2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	
6. <i>Phytoh abitans</i>																																			
KK1-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ (ต่อ)

รหัส	ความเข้มข้นเกลือ (ร้อยละ)															ความเป็นกรด-ด่าง										อุณหภูมิ (°C)						Peptonization	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	4	5	6	7	8	9	10	20	30	37	40	45	50	55	60									
7. <i>Kutzneria</i>																																							
BR3-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-						
8. <i>Saccharopolyspora</i>																																							
AK1-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-					
9. <i>Microbispora</i>																																							
AN2-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-		
AN2-7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
BR3-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-				
CL1-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
CL2-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-				
KE1-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-				
KE1-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-			
KE2-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
KE2-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
KE2-5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ (ต่อ)

รหัส	ความเข้มข้นเกลือ (ร้อยละ)															ความเป็นกรด-ด่าง										อุณหภูมิ (°C)						Peptonization	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	4	5	6	7	8	9	10	20	30	37	40	45	50	55	60					
KK1-10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-		
KK1-11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-		
KM1-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-		
KM1-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-		
ZO1-7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-		
ZZ1-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-		
ZZ2-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+		
10. <i>Nonomuraea</i>																																			
AN1-27	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
AN1-36	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+		
AN3-11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+		
HC1-7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+		
SC1-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+		
11. <i>Planotetraspora</i>																																			
BR3-5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ (ต่อ)

รหัส	ความเข้มข้นเกลือ (ร้อยละ)															ความเป็นกรด-ด่าง										อุณหภูมิ (°C)						Peptonization	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	การสังเคราะห์ไนโตรต
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	4	5	6	7	8	9	10	20	30	37	40	45	50	55	60					
12. <i>Sphaerisporangium</i>																																			
AN1-28	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+		
KM1-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-		
13. <i>Streptosporangium</i>																																			
AN1-26	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	
AN3-5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+		
14. <i>Actinomadura</i>																																			
AN2-10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
CL3-1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
KG1-2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ (ต่อ)

รหัส	ความเข้มข้นเกลือ (ร้อยละ)															ความเป็นกรด-ด่าง										อุณหภูมิ (°C)						Peptonization	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	4	5	6	7	8	9	10	20	30	37	40	45	50	55	60					
15. <i>Streptomyces</i>																																			
AG2-1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-			
AG2-2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-		
AG2-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	
AG2-4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+		
AG2-5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+		
AG2-6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-		
AK1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	
AN1-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+		
AN1-12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+		
AN1-18	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+		
AN1-25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	
AN1-29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
AN1-38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
AN2-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
AN2-9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ (ต่อ)

รหัส	ความเข้มข้นเกลือ (ร้อยละ)															ความเป็นกรด-ด่าง										อุณหภูมิ (°C)						Peptonization	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	4	5	6	7	8	9	10	20	30	37	40	45	50	55	60						
AN3-4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+			
AN3-6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
AP1-1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+		
AP1-3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+		
AP1-4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+		
AS1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-		
AS1-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+		
AS1-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
AX1-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	
BR2-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
CL2-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	
CL3-4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CP1-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
CP1-6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
CX1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ (ต่อ)

รหัส	ความเข้มข้นเกลือ (ร้อยละ)															ความเป็นกรด-ด่าง										อุณหภูมิ (°C)						Peptonization	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	4	5	6	7	8	9	10	20	30	37	40	45	50	55	60						
CZ1-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+			
CZ1-4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-		
EE1-2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+		
EE1-8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+		
HC1-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+		
HC1-8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
HC1-9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
HC1-10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
KE1-4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	
KE2-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
KG1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	
KM1-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
ZM1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
ZM2-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	
ZM2-9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสัทที่แยกได้ (ต่อ)

รหัส	ความเข้มข้นเกลือ (ร้อยละ)															ความเป็นกรด-ด่าง										อุณหภูมิ (°C)						Peptonization	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	การรีดิวซ์ไนเตรต
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	4	5	6	7	8	9	10	20	30	37	40	45	50	55	60					
ZM2-12	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+		
ZM3-2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-		
ZM3-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+		
ZM3-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	
ZO1-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+		
ZZ1-3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	
ZZ1-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-		
ZZ2-1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	

หมายเหตุ : +, Positive reaction; -, Negative reaction; w, Weakly reaction

การศึกษาในครั้งนี้ได้คัดเลือกเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ (%similarity ต่ำกว่า 99.5%) จากแหล่งพืชที่น่าสนใจจำนวน 3 ไอโซเลต คือ BR3-1 KK1-3 และ SC1-1 ซึ่งแยกได้จากเหง้าของ กระชาย (*Boesenbergia rotunda*) ใบของเปราะราศี (*Phytohabitans kaempferiae*) และลำต้นของว่านดอกดิน (*Stahlianthus campanulatus*) ตามลำดับ มาทำการศึกษาอนุกรมวิธานแบบพอลิฟาสิก (polyphasic taxonomy) เพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

### 1. ลักษณะของ *Asanoa endophytica* BR3-1<sup>T</sup>

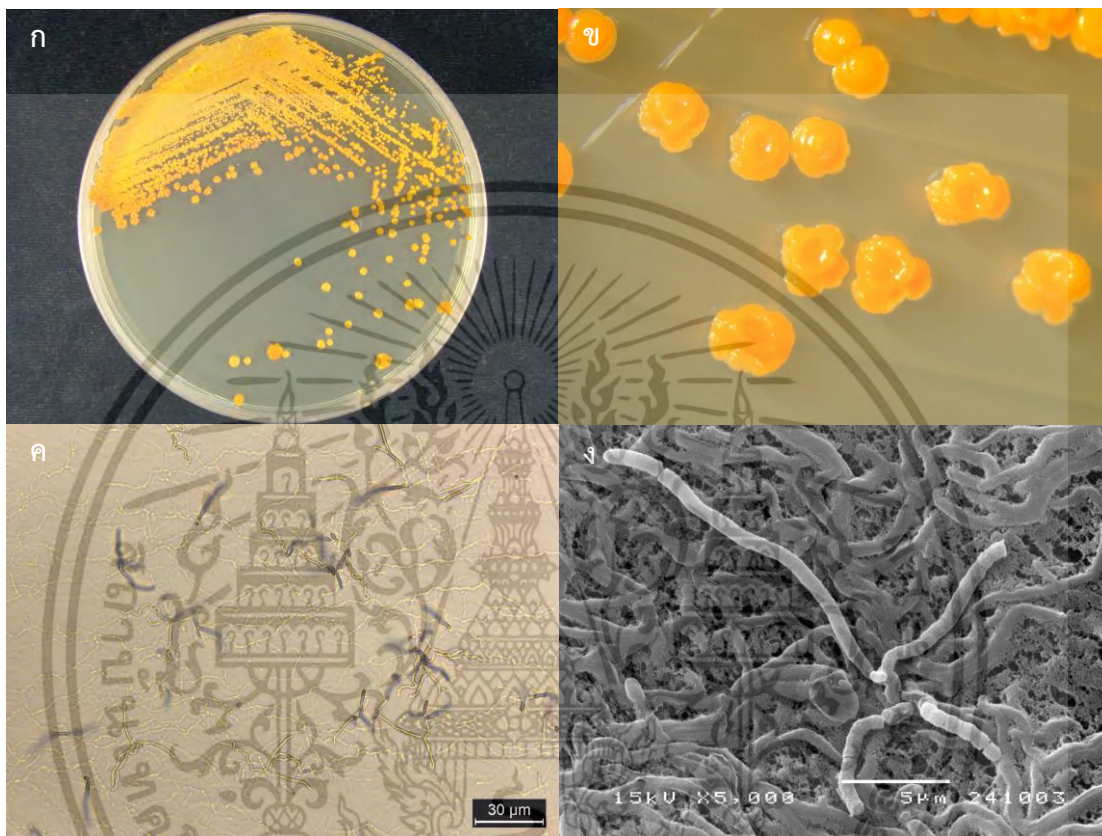
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียาสายพันธุ์ BR3-1<sup>T</sup> สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสาย (มีจำนวนสปอร์มากกว่า 10 สปอร์ต่อสาย) บนปลายของก้านชูสปอร์ขนาดสั้นซึ่งชูขึ้นมาโดยตรงจากผิวอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม (deep orange) และสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีส้มเข้มอมแดง (strong reddish orange) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.33) ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถใช้น้ำตาล D-glucose cellobiose D-xylose mannitol และ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ใช้น้ำตาล D-mannose D-galactose L-rhamnose D-ribose L-arabinose และ D-fructose ได้น้อย แต่ไม่สามารถใช้ glycerol myo-inositol raffinose melibiose D-salicin และ lactose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ สามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและรีติวชีในเตรตได้ (ตารางที่ 4.3) เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้อยู่ในช่วง 5-10 และสามารถทนเกลือสูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ได้

ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP และ 3-OH-DAP ชนิดของเอซิลของผนังเซลล์ คือ glycolyl ชนิดของมีนาควิโนน (menaquinone) ที่พบเป็นองค์ประกอบหลัก คือ MK-10(H<sub>8</sub>) และ พบ MK-10(H<sub>6</sub>) ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (whole cell sugar) ที่พบ คือ glucose mannose rhamnose ribose และ xylose ไขมันชนิดมีขั้ว (polar lipid) ที่พบเป็นองค์ประกอบในเซลล์ คือ diphosphatidylglycerol phosphatidylglycerol phosphatidylethanolamine phosphatidylinositol phosphatidylinositol-mannosides ฟอสโฟลิปิดที่ไม่ทราบชนิด 4 จุด และไขมันชนิดมีขั้วที่ไม่ทราบชนิด 3 จุด กรดไขมันที่พบในเซลล์ประกอบด้วย iso-C<sub>16:0</sub> iso-C<sub>15:0</sub> anteiso-C<sub>15:0</sub> anteiso-C<sub>17:0</sub> iso-C<sub>14:0</sub> iso-C<sub>17:0</sub> C<sub>17:0</sub> C<sub>17:1</sub> 18c C<sub>16:0</sub> C<sub>16:1</sub>-2-OH C<sub>18:0</sub> และ iso-C<sub>15:1</sub>G (ตารางที่ 4.5) ไม่พบกรดมััยคอลลิก (mycolic acid) มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content) ร้อยละ 71.4

เนื่องจากสายพันธุ์ BR3-1<sup>T</sup> มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ใกล้กับ *A. ishikariensis* (99.39 %) *A. iriomotensis* (99.31%) *A. siamensis* (99.17 %) *A. ferruginea* (98.84%) และ *A. hainanensis* (98.71 %) และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Asanoa* (รูปที่ 4.34) เมื่อศึกษาอนุกรมวิธานเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล *Asanoa* พบว่าสายพันธุ์ BR3-1<sup>T</sup> มีความแตกต่างจากสายพันธุ์อ้างอิง ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และจากผลการศึกษาการเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอ (DNA-DNA hybridization) ระหว่างสายพันธุ์ BR3-1<sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล *Asanoa* ทั้งหมด พบมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 21.3-45.8 (ตารางที่ 4.6) ซึ่งต่ำกว่าค่า cut-off ซึ่งมีค่าร้อยละ 70 (Wayne et al., 1987) จากข้อมูลทั้งหมดนี้สามารถยืนยันได้ว่าสายพันธุ์ BR3-1<sup>T</sup> เป็นแอกติโนมัยสียาสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Asanoa* โดยให้ชื่อว่า

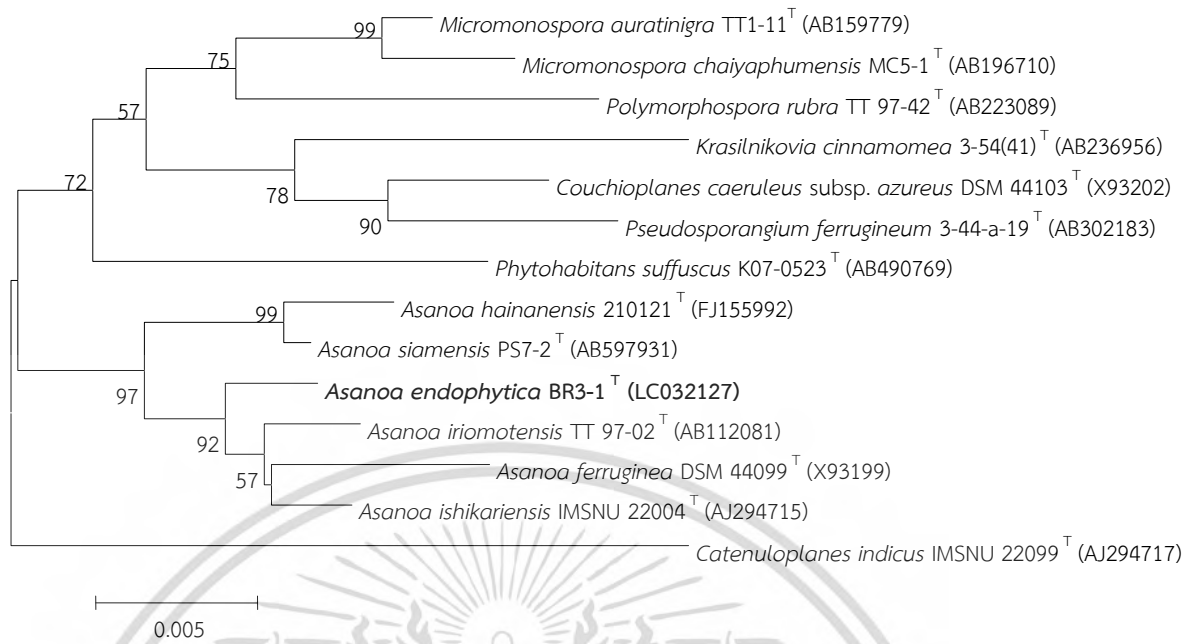
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Asanoa endophytica* สายพันธุ์อ้างอิง คือ BR3-1<sup>T</sup> (BCC 66355<sup>T</sup> และ NBRC 110002<sup>T</sup>) คัดแยกได้จากเหง้าของ *Boesenbergia rotunda* ซึ่งเก็บจากจังหวัดอุดรธานี ประเทศไทย ซึ่งข้อมูลของสายพันธุ์ BR3-1<sup>T</sup> นี้ได้รับการตีพิมพ์ลงในวารสาร International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (Niemhom *et al.*, 2016) โดยเป็นครั้งแรกที่รายงานการพบแอกติโนมัยสีทสกุล *Asanoa* ในเนื้อเยื่อพืช



รูปที่ 4.33 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ BR3-1<sup>T</sup>  
 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 (ค) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)  
 (ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (กำลังขยาย 5,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.34 แสดงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ BR3-1<sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) ในสกุล *Asanoa* บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ลักษณะความแตกต่างของสายพันธุ์ BR3-1<sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) ในสกุล *Asanoa*

ลักษณะ	BR3-1 <sup>T</sup>	<i>A. ishikariensis</i> NBRC 14551 <sup>T</sup>	<i>A. iriomotensis</i> NBRC 100142 <sup>T</sup>	<i>A. siamensis</i> PS7-2 <sup>T</sup>	<i>A. ferruginea</i> NBRC 14496 <sup>T</sup>	<i>A. hainanensis</i> 210121 <sup>T</sup>
3-OH-DAP	+	+	-	+	+	-
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 (°C)	40	30	30	37	37	37
Carbon utilization :						
Glycerol		-	-	w	-	w
<i>myo</i> -Inositol	-	-	-	-	-	+
L-Rhamnose	w	w	-	+	+	w
D-Raffinose	-	+	+	w	+	-
D-Melibiose	-	+	+	+	+	w
D-Salicin	-	-	w	-	+	-
Lactose	-	+	-	+	+	+

หมายเหตุ : +, Positive reaction; -, Negative reaction; 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, phosphatidylinositolmannosides; GL, glycolipid

ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบของกรดไขมันภายในเซลล์ของสายพันธุ์ BR3-1<sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) ในสกุล *Asanoa*

ชนิดของกรดไขมัน	ปริมาณกรดไขมัน (ร้อยละ)					
	BR3-1 <sup>T</sup>	<i>A. ishikariensis</i> NBRC 14551 <sup>T</sup>	<i>A. iriomotensis</i> NBRC 100142 <sup>T</sup>	<i>A. siamensis</i> PS7-2 <sup>T</sup>	<i>A. ferruginea</i> NBRC 14496 <sup>T</sup>	<i>A. hainanensis</i> 210121 <sup>T</sup>
<b>Saturated fatty acids</b>						
C <sub>16:0</sub>	2.0	1.5	3.3	1.9	2.0	3.0
C <sub>17:0</sub>	2.8	1.4	5.5	7.5	1.7	3.3
C <sub>18:0</sub>	0.4	0.7	0.9	0.9	0.6	1.0
<b>Unsaturated fatty acids</b>						
iso-C <sub>15:1</sub> G	0.1	1.3	0.3	1.0	0.2	0.2
C <sub>16:1</sub> 2OH	1.8	-	-	-	-	-
C <sub>17:1</sub> ω8c	2.3	0.2	1.0	0.4	1.5	0.8
<b>Branched fatty acids</b>						
iso-C <sub>14:0</sub>	4.9	3.5	2.7	1.2	3.9	3.6
iso-C <sub>15:0</sub>	24.7	27.8	24.9	32.9	16.8	24.9
anteiso-C <sub>15:0</sub>	15.2	29.1	33.9	31.1	28.1	30.3
iso-C <sub>16:0</sub>	32.6	14.6	10.2	5.4	24.3	16.5
iso-C <sub>17:0</sub>	3.6	5.5	3.2	5.2	3.2	4.6
anteiso-C <sub>17:0</sub>	7.0	12.9	12.2	12.1	13.7	10.3

หมายเหตุ : เลี้ยงเซลล์ในอาหาร yeast extract-glucose broth บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

ตารางที่ 4.6 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างสายพันธุ์ BR3-1<sup>T</sup> และสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) ในสกุล *Asanoa*

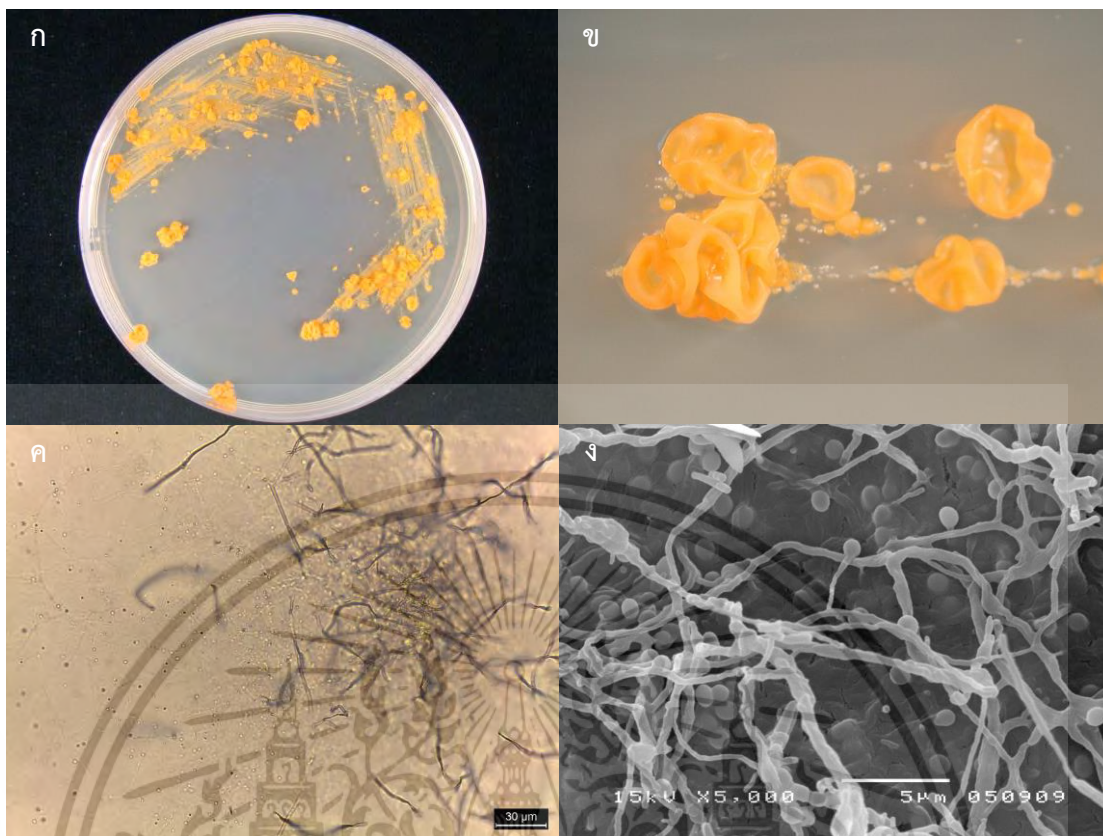
สายพันธุ์	ค่าความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอ (ร้อยละ)					
	BR3-1 <sup>T</sup>	<i>A. ishikariensis</i> NBRC 14551 <sup>T</sup>	<i>A. iriomotensis</i> NBRC 100142 <sup>T</sup>	<i>A. siamensis</i> PS7-2 <sup>T</sup>	<i>A. ferruginea</i> NBRC 14496 <sup>T</sup>	<i>A. hainanensis</i> 210121 <sup>T</sup>
BR3-1 <sup>T</sup>	100	21.8 ± 1.0	11.8 ± 1.7	28.1 ± 1.0	29.5 ± 2.7	15.4 ± 1.2
<i>A. ishikariensis</i> NBRC 14551 <sup>T</sup>	15.8 ± 2.6	100	5.4 ± 2.6	31.4 ± 2.1	21.3 ± 2.1	31.7 ± 1.1
<i>A. iriomotensis</i> NBRC 100142 <sup>T</sup>	18.0 ± 4.3	6.8 ± 1.0	100	15.7 ± 1.5	15.4 ± 3.0	3.7 ± 2.7
<i>A. siamensis</i> PS7-2 <sup>T</sup>	34.5 ± 1.6	31.5 ± 2.9	31.6 ± 6.7	100	29.5 ± 2.2	26.5 ± 1.0
<i>A. ferruginea</i> NBRC 14496 <sup>T</sup>	21.6 ± 5.9	27.7 ± 3.6	19.7 ± 2.1	32.3 ± 1.3	100	13.1 ± 2.0
<i>A. hainanensis</i> 210121 <sup>T</sup>	21.3 ± 4.6	23.6 ± 2.6	8.4 ± 6.7	19.3 ± 1.3	23.4 ± 1.8	100

## 2. ลักษณะของ *Phytohabitans kaempferiae* KK1-3<sup>T</sup>

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ KK1-3<sup>T</sup> สร้างทั้งสปอร์เดี่ยวรูปกลมและสปอร์สายยาว (มากกว่า 10 สปอร์) ผิวของสปอร์เรียบ สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองเข้ม (strong yellow) สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลืองอ่อน (pale yellow) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.35) ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถใช้น้ำตาล D-cellobiose D-glucose D-mannose D-xylose L-arabinose L-rhamnose และ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ใช้น้ำตาล D-fructose D-galactose และ lactose ได้น้อย แต่ไม่สามารถใช้ D-melibiose D-ribose D-salicin glycerol mannitol และ myo-inositol เป็นแหล่งคาร์บอนได้ สามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนมได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและรีตริวซ์ไนเตรตได้ เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้อยู่ในช่วง 6-10 และสามารถทนเกลือสูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ได้ (ตารางที่ 4.3)

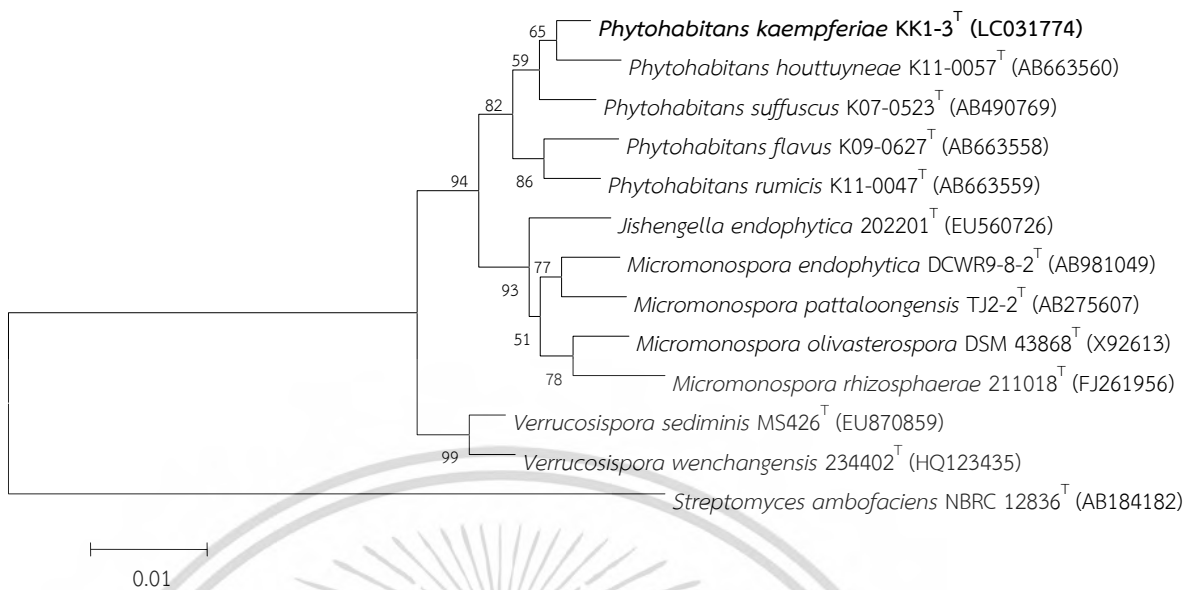
ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP และ 3-OH-DAP ชนิดของเอซิลของผนังเซลล์ คือ glycolyl ชนิดของมีนาควิโนน (menaquinone) ที่พบเป็นองค์ประกอบหลัก คือ MK-10(H<sub>2</sub>) MK-10(H<sub>4</sub>) และ MK-10(H<sub>6</sub>) ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (whole cell sugar) ที่พบ คือ glucose mannose rhamnose ribose galactose และ xylose รูปแบบของไขมันชนิดมีขั้วที่พบประกอบด้วย diposphatidylglycerol phosphatidylglycerol phosphatidylethanolamine phosphatidylmethylethanolamine phosphatidylinositol phosphoglycolipids ฟอสโฟลิปิดที่ไม่ทราบชนิด 7 จุด และไขมันชนิดมีขั้วที่ไม่ทราบชนิด 6 จุด กรดไขมันที่พบในเซลล์ (>5 %) ประกอบด้วย anteiso-C<sub>17:0</sub> iso-C<sub>16:0</sub> anteiso-C<sub>17:1</sub> C<sub>18:0</sub> และ iso-C<sub>16:1</sub> ไม่พบกรดมัคโคลิก (mycolic acid) มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content) ร้อยละ 71

สายพันธุ์ KK1-3<sup>T</sup> มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ใกล้กับ *P. houttuyniae* BCC 48147<sup>T</sup> (99.04%) *P. suffuscus* DSM 45306<sup>T</sup> (98.97%) *P. flavus* NBRC 107702<sup>T</sup> (98.62%) และ *P. rumicis* BCC 48146<sup>T</sup> (98.14%) และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Phytohabitans* (รูปที่ 4.36) เมื่อศึกษาอนุกรมวิธานเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล *Phytohabitans* พบว่าสายพันธุ์ KK1-3<sup>T</sup> มีความแตกต่างจากสายพันธุ์อ้างอิง ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และจากผลการศึกษาคู่กันของสายดีเอ็นเอ (DNA-DNA hybridization) ระหว่างสายพันธุ์ KK1-3<sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล *Phytohabitans* ทั้งหมด พบมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 14.3-38.1 (ตารางที่ 4.8) ซึ่งต่ำกว่าค่า cut-off ซึ่งมีค่าร้อยละ 70 (Wayne et al., 1987) จากข้อมูลทั้งหมดนี้สามารถยืนยันได้ว่าสายพันธุ์ KK1-3<sup>T</sup> เป็นแอกติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Phytohabitans* โดยให้ชื่อว่า *Phytohabitans kaempferiae* สายพันธุ์อ้างอิง คือ KK1-3<sup>T</sup> (BCC 66360<sup>T</sup> และ NBRC 110005<sup>T</sup>) คัดแยกได้จากใบของ *Kaempferia larsenii* ซึ่งเก็บจากจังหวัดอุบลราชธานี ประเทศไทย ซึ่งข้อมูลของสายพันธุ์ KK1-3<sup>T</sup> นี้ได้รับการตีพิมพ์ลงในวารสาร International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (Niemhom et al., 2016) โดยเป็นครั้งแรกที่รายงานการพบแอกติโนมัยสีทสกุล *Phytohabitans* ในประเทศไทย



รูปที่ 4.35 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ KK1-3<sup>T</sup>  
 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน  
 (ค) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)  
 (ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (กำลังขยาย 5,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.36 แสดงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ KK1-3<sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) ในสกุล *Phytohabitans* บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ลักษณะความแตกต่างของสายพันธุ์ KK1-3<sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) ในสกุล *Phytohabitans*

ลักษณะ	KK1-3 <sup>T</sup>	<i>P. houttuyniae</i> BCC 48147 <sup>T</sup>	<i>P. suffuscus</i> DSM 45306 <sup>T</sup>	<i>P. flavus</i> NBRC 107702 <sup>T</sup>	<i>P. rumicis</i> BCC 48146 <sup>T</sup>
Phosphatidylmethylethanolamine	+	-	-	+	-
Whole-cell sugar	Glu, Gal, Man, Rha, Rib, Xyl	Ara, Gal, Man, Rha, Rib, Xyl	Glu, Gal, Man, Rib, Xyl	Ara, Glu, Gal, Man, Rib, Xyl	Ara, Glu, Gal, Man, Rha, Rib, Xyl
DNA G+C content (mol%)	71	73	73	71	72
Nitrate reduction	-	-	-	-	+
Gelatin liquefaction	-	w	w	-	w
Maximum NaCl tolerance (%w/v)	3	2	2	1	1
Maximum temperature for growth (°C)	40	40	37	30	30
Enzyme activity :					
Esterase (C4)	-	w	w	-	w
Esterase Lipase (C8)	-	w	-	-	-
Valine arylamidase	-	-	-	-	+
$\alpha$ -galactosidase	-	-	-	-	+
$\alpha$ -mannosidase	+	-	-	-	-
Carbon utilization :					
D-Fructose	w	+	+	+	+
D-Galactose	w	+	+	w	w
D-Ribose	-	-	-	w	-
D-Salicin	-	w	-	w	-
Glycerol	-	+	+	-	+
Lactose	w	w	-	-	+
Mannitol	-	+	+	+	+

ตารางที่ 4.8 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างสายพันธุ์ KK1-3<sup>T</sup> และสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) ในสกุล *Phytohabitans*

สายพันธุ์	ค่าความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอ (ร้อยละ)				
	KK1-3 <sup>T</sup>	<i>P. houttuynae</i> BCC 48147 <sup>T</sup>	<i>P. suffuscus</i> DSM 45306 <sup>T</sup>	<i>P. flavus</i> NBRC 107702 <sup>T</sup>	<i>P. rumicis</i> BCC 48146 <sup>T</sup>
KK1-3 <sup>T</sup>	100	28.9 ± 1.5	33.3 ± 2.2	14.7 ± 4.1	20.4 ± 2.2
<i>P. houttuynae</i> BCC 48147 <sup>T</sup>	31.4 ± 2.4	100	32.8 ± 5.4	27.3 ± 4.3	14.5 ± 1.0
<i>P. suffuscus</i> DSM 45306 <sup>T</sup>	38.1 ± 0.9	27.3 ± 1.5	100	31.3 ± 3.5	32.9 ± 3.4
<i>P. flavus</i> NBRC 107702 <sup>T</sup>	31.2 ± 0.8	23.5 ± 1.4	29.4 ± 2.9	100	25.5 ± 6.9
<i>P. rumicis</i> BCC 48146 <sup>T</sup>	22.9 ± 0.6	19.2 ± 1.1	14.3 ± 3.4	16.2 ± 5.0	100

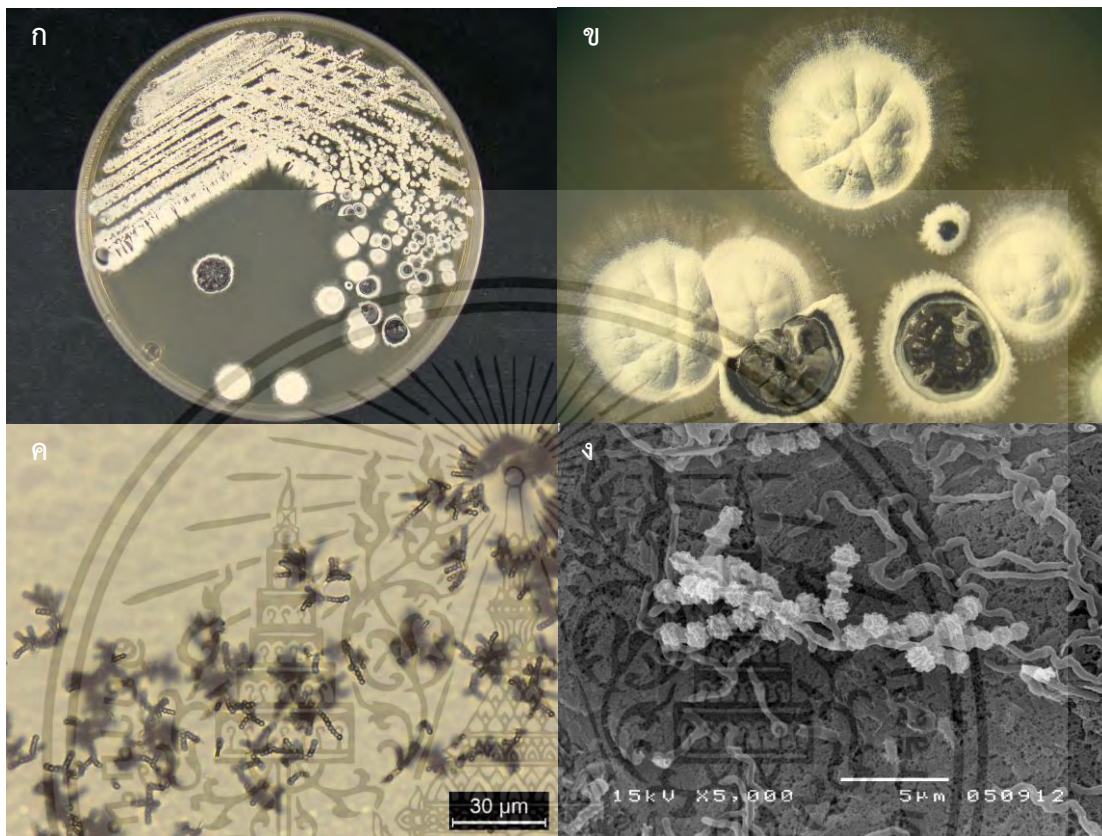
### 3. ลักษณะของ *Nonomurea stahlianthi* SC1-1<sup>T</sup>

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ SC1-1<sup>T</sup> สร้างสปอร์สายสั้นอยู่บนเส้นใยอากาศสีขาว (white) ผิวของสปอร์ขรุขระ สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอ่อนอมเหลือง (light yellowish brown) ไปจนถึงสีดำม่วง (purplish black) ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเทาอมม่วง (purplish grey) เมื่อเจริญบนอาหาร ISP3 (รูปที่ 4.37) ลักษณะการเจริญบนอาหารต่างๆ แสดงในภาคผนวก ง สามารถใช้น้ำตาล cellobiose D-fructose D-glucose D-galactose D-mannitol D-mannose melibiose D-ribose D-xylose L-rhamnose glycerol และ myo-inositol เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่ใช้น้ำตาล raffinose D-salicin L-arabinose lactose และ sucrose ได้น้อย สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนมและรีติวซ์ในเตรตได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.3) เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เจริญได้อยู่ในช่วง 5-10 และสามารถทนเกลือสูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ได้

ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP ชนิดของเอซิลของผนังเซลล์ คือ acetyl ชนิดของมีนาควิโนน (menaquinone) ที่พบเป็นองค์ประกอบหลัก คือ MK-9(H<sub>4</sub>) และ MK-9(H<sub>2</sub>) ชนิดของน้ำตาลทั้งหมดภายในเซลล์ (whole cell sugar) ที่พบ คือ glucose madurose mannose rhamnose และ ribose ไขมันชนิดมีหัวที่พบ คือ diphosphatidylglycerol phosphatidylethanolamine hydroxy-phosphatidylethanolamine phosphatidylinositol phosphatidylinositol-mannosides ninhydrin-positive phosphoglycolipids ninhydrin-positive phospholipid ฟอสโฟโกลโคลิปิดที่ไม่ทราบชนิด 1 จุด ฟอสโฟลิปิดที่ไม่ทราบชนิด 4 จุด โกลโคลิปิดที่ไม่ทราบชนิด 2 จุด และไขมันที่ไม่ทราบชนิด 1 จุด กรดไขมันที่พบมากในเซลล์ประกอบด้วย iso-C<sub>16:0</sub> 10-methyl-C<sub>17:0</sub> และ C<sub>17:1</sub> ω6c ไม่พบกรดมัยคอลลิก (mycolic acid) มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีน (G+C content) ร้อยละ 70.7

สายพันธุ์ SC1-1<sup>T</sup> มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ใกล้เคียงกับ *Nonomurea dietziae* DSM 44320<sup>T</sup> (98.82%) *Nonomurea africana* IFO 14745<sup>T</sup> (98.58%) *Nonomurea jabiensis* A4036<sup>T</sup> (98.43%) *Nonomurea endophytica* YIM 65601<sup>T</sup> (98.36%) *Nonomurea angiospora* IFO 13155T (98.29%) *Nonomurea roseola* IFO 14685T (98.23%) และ *Nonomurea recticatena* IFO 14525<sup>T</sup> (98.23%) และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Nonomurea* (รูปที่ 4.38) เมื่อศึกษาอนุกรมวิธานเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล *Nonomurea* ที่ใกล้เคียงกันใน phylogenetic tree พบว่าสายพันธุ์ SC1-1<sup>T</sup> มีความแตกต่างจากสายพันธุ์อ้างอิง ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และจากผลการศึกษาการเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอ (DNA-DNA hybridization) ระหว่างสายพันธุ์ SC1-1<sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล *Nonomurea* ที่มีความใกล้เคียงกัน พบมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 18.8-29.0 (ตารางที่ 4.10) ซึ่งต่ำกว่าค่า cut-off ซึ่งมีค่าร้อยละ 70 (Wayne et al., 1987) จากข้อมูลทั้งหมดนี้สามารถยืนยันได้ว่าสายพันธุ์ SC1-1<sup>T</sup> เป็นแอกติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Nonomurea* โดยให้ชื่อว่า *Nonomurea stahlianthi* สายพันธุ์อ้างอิง คือ SC1-1<sup>T</sup> (BCC 66361<sup>T</sup> และ NBRC 110006<sup>T</sup>) คัดแยกได้จากลำต้นของ *Stahlianthus campanulatus* ซึ่งเก็บจากจังหวัดอุดรธานี ประเทศไทย

ซึ่งข้อมูลของสายพันธุ์ SC1-1<sup>T</sup> นี้ได้รับการตีพิมพ์ลงในวารสาร International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (Niemhom *et al.*, 2017) โดยเป็นรายงานการพบเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจากพืชวงศ์ขิงสายพันธุ์ที่พบได้ค่อนข้างน้อย



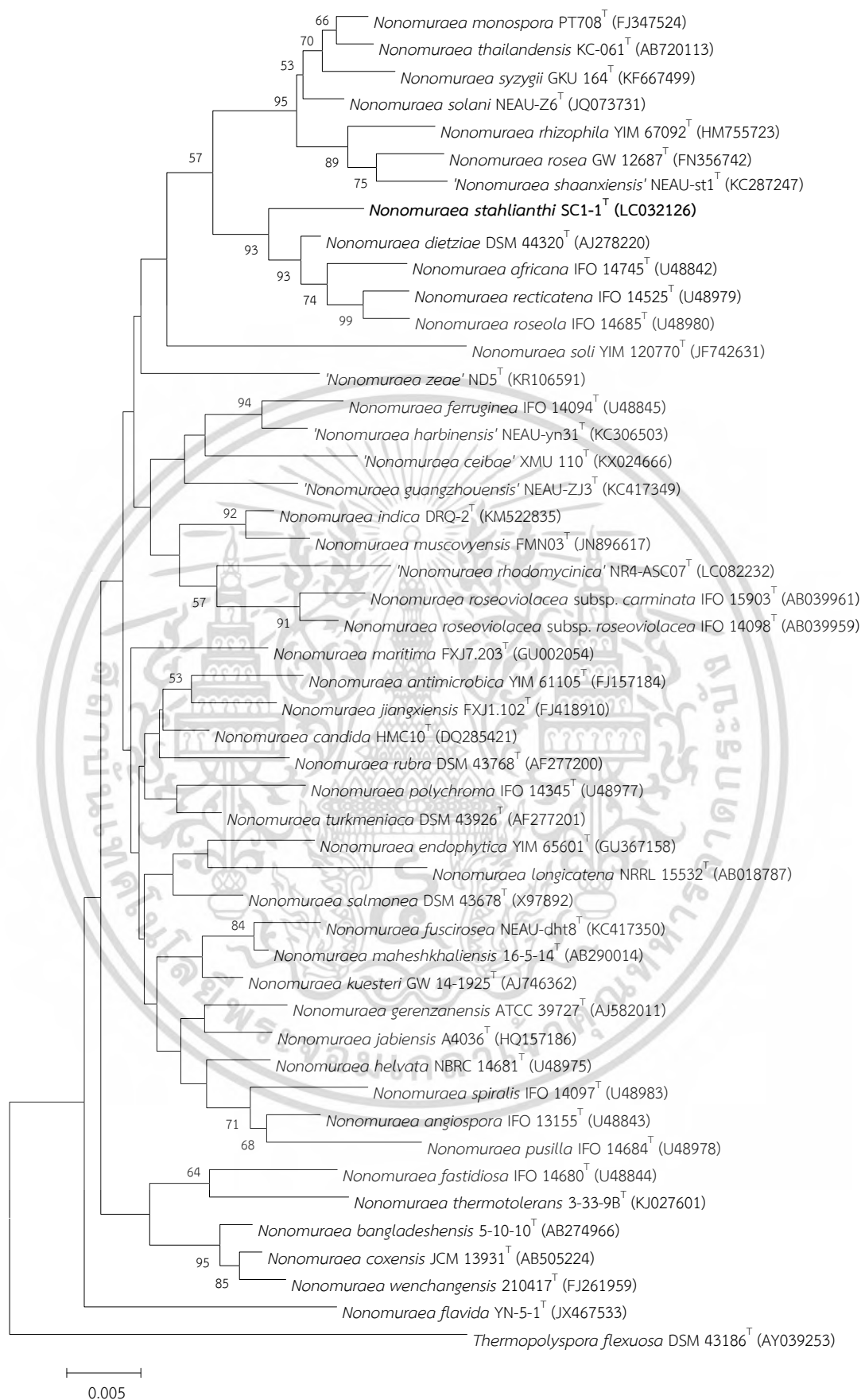
รูปที่ 4.37 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ SC1-1<sup>T</sup>

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) (กำลังขยาย 400 เท่า)

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (กำลังขยาย 5,000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.38 แสดงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ SC1-1<sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) ในสกุล *Nonomurea* บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือใช้เพื่อประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ลักษณะความแตกต่างของสายพันธุ์ SC1-1<sup>T</sup> กับสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) ในสกุล *Nonomureae*

ลักษณะ	SC1-1 <sup>T</sup>	<i>N. dietziae</i> NBRC 14309 <sup>T</sup>	<i>N. africana</i> NBRC 14745 <sup>T</sup>	<i>N. roseola</i> NBRC 14685 <sup>T</sup>	<i>N. recticatena</i> NBRC 14525 <sup>T</sup>
The pH range for growth	5-10	5-10	6-10	6-10	6-10
Nitrate reduction	+	-	-	-	-
Carbon utilization :					
D-Fructose	+	+	+	-	-
D-Galactose	+	w	w	+	w
D-Melibiose	+	w	+	+	w
D-Raffinose	w	-	+	-	-
D-Ribose	w	-	-	w	-
Glycerol	+	+	-	+	+
Mannitol	w	-	-	-	-
Sucrose	w	-	+	+	-

หมายเหตุ : +, Positive reaction; -, Negative reaction; w, Weakly reaction

ตารางที่ 4.10 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างสายพันธุ์ SC1-1<sup>T</sup> และสายพันธุ์อ้างอิง (type strain) ในสกุล *Nonomurea*

สายพันธุ์	ค่าความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอ (ร้อยละ)				
	SC1-1 <sup>T</sup>	<i>N. dietziae</i> NBRC 14309 <sup>T</sup>	<i>N. africana</i> NBRC 14745 <sup>T</sup>	<i>N. roseola</i> NBRC 14685 <sup>T</sup>	<i>N. recticatena</i> NBRC 14525 <sup>T</sup>
SC1-1 <sup>T</sup>	100	27.0 ± 2.1	23.2 ± 3.1	18.8 ± 0.9	22.1 ± 0.9
<i>N. dietziae</i> NBRC 14309 <sup>T</sup>	29.7 ± 0.4	100	37.8 ± 7.4	38.5 ± 2.7	42.6 ± 1.7
<i>N. africana</i> NBRC 14745 <sup>T</sup>	28.2 ± 1.1	37.9 ± 2.9	100	28.6 ± 1.0	29.2 ± 0.9
<i>N. roseola</i> NBRC 14685 <sup>T</sup>	20.7 ± 1.9	45.3 ± 6.2	26.6 ± 4.3	100	41.4 ± 1.8
<i>N. recticatena</i> NBRC 14525 <sup>T</sup>	19.7 ± 9.0	48.6 ± 3.9	25.1 ± 5.3	44.9 ± 3.3	100

### 4.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

#### 4.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์จากเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสปีท์ที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงจำนวน 109 ไอโซเลต โดยวิธี Disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสปีท์จำนวน 27 ไอโซเลต (ร้อยละ 25) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อย่างน้อย 1 ชนิด ในจำนวนนี้มี 23 ไอโซเลต (ร้อยละ 85) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 และ Vancomycin-resistance *Enterococcus fecium* (VRE) ATCC 51559 ได้ และจำนวน 12 ไอโซเลต (ร้อยละ 44) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ แต่ไม่มีเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสปีท์ไอโซเลตใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ (ตารางที่ 4.11) โดยเมื่อพิจารณาจากผลการทดสอบแล้ว พบว่าเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสปีท์จำนวน 13 ไอโซเลต (ร้อยละ 48) ได้แก่ KE1-1 AN2-10 CL3-1 AG2-1 AG2-5 AG2-6 AN1-38 AN3-6 CP1-6 KE2-1 KG1-1 ZM2-9 และ ZM3-2 มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์แบบกว้าง (broad activity) กับแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกคือยา มีจำนวน 8 ไอโซเลต (ร้อยละ 30) ได้แก่ BR3-4 AN2-7 ZO1-7 ZZ2-2 AK1-1 AN3-4 ZZ1-3 และ ZZ2-1 มีฤทธิ์แบบกว้างกับแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้งยีสต์ มีจำนวน 4 ไอโซเลต (ร้อยละ 15) ได้แก่ AN2-9 AX1-2 CL2-6 และ KM1-5 มีฤทธิ์แบบเฉพาะ (specific activity) กับยีสต์ และมีจำนวน 2 ไอโซเลต (ร้อยละ 7) ได้แก่ AN1-19 และ CL1-2 มีฤทธิ์เฉพาะกับแบคทีเรียแกรมบวก 1 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*

#### 4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคมalariaเรีย (anti-malarial activity)

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคมalariaเรีย *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ K1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด (multidrug resistant strain) ของสารสกัดหยาบจากเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสปีท์ที่แยกได้จาก *Alpinia galanga* (ข่า) ที่คัดเลือกมาศึกษาจำนวน 7 ไอโซเลต พบว่าสารสกัดหยาบของไอโซเลต AG2-1 AG2-5 และ AG2-6 สามารถต้านเชื้อก่อโรคมalariaเรียได้ โดยมีค่า  $IC_{50}$  คือ 0.03 0.15 และ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยชุดควบคุมเชิงบวกคือ dihydroartemisinin และ mefloquine มีค่า  $IC_{50}$  0.00079 และ 0.01665 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

#### 4.3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสปีท์ที่แยกได้จาก *Alpinia galanga* (ข่า) ที่คัดเลือกมาศึกษาจำนวน 7 ไอโซเลต พบว่าสารสกัดหยาบของไอโซเลต AG2-1 AG2-5 และ AG2-6 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187-small cell lung cancer) ได้ โดยมีค่า  $IC_{50}$  คือ 0.40 0.27 และ 0.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวก พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลต ให้ผลดีกว่า ellipticine ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 3.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ผลใกล้เคียงกับ doxorubicin ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารสกัดหยาบของไอโซเลต AG2-1 AG2-5 และ AG2-6 ยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) ได้ โดยมีค่า  $IC_{50}$  คือ 3.31 3.72 และ 0.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ผ่านการอนุมัติฯ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ โดยเมื่อเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวก พบว่าไอโซเลต AG2-1 AG2-5 ให้ผลใกล้เคียงกับ ellipticine ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 3.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไอโซเลต AG2-6 ให้ผลดีกว่า ellipticine และ doxorubicin ( $IC_{50}$  เท่ากับ 1.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

#### 4.3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อ Vero cell ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของ เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงจำนวน 109 ไอโซเลต พบว่าจำนวน 76 ไอโซเลต (ร้อยละ 70) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (ตารางที่ 4.11)

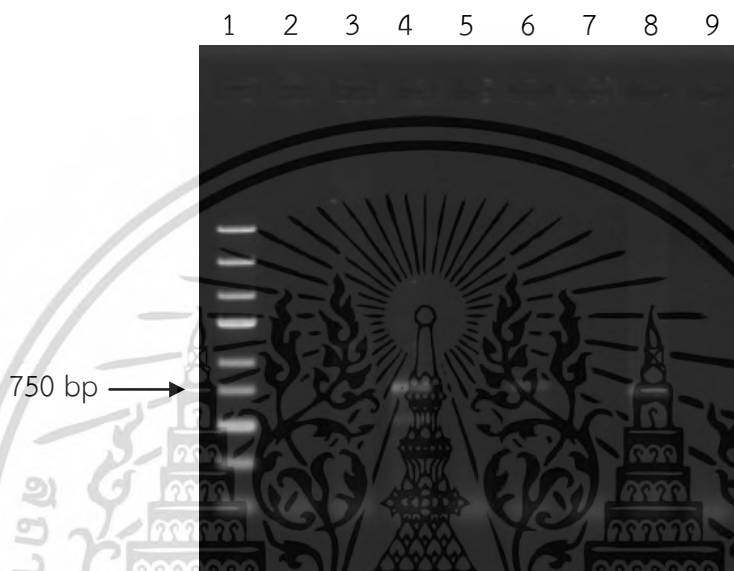
จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ส่วนมากจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (19 ไอโซเลต) รองลงมาคือ *Microbispora* (3 ไอโซเลต) *Actinomadura* (2 ไอโซเลต) *Dactylosporangium* (1 ไอโซเลต) *Micromonospora* (1 ไอโซเลต) และ *Kutzneria* (1 ไอโซเลต) สอดคล้องกับรายงานของ Bérdy (2005) ที่รายงานว่า *Streptomyces* เป็นสกุลที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุด รองลงมาคือ *Micromonospora* และสกุลอื่นๆ เช่น *Microbispora* *Actinomadura* *Dactylosporangium* *Kutzneria* ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะ *Streptomyces* เป็นสกุลที่มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในปริมาณมากและหลากหลาย เนื่องจากสามารถเจริญได้ในสภาวะและอาหารชนิดต่างๆ และเป็นเชื้อสกุลที่มีประชากรมากที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์กับผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) พบว่าไอโซเลตที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์มักมีความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นเดียวกัน โดยเมื่อดูจากผลของเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดจำนวน 27 ไอโซเลต นั้นพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มากถึง 21 ไอโซเลต (ร้อยละ 78) แต่มีจำนวน 6 ไอโซเลต (ร้อยละ 22) ได้แก่ AN2-7 AN2-10 CL3-1 KE2-1 KM1-5 และ ZM3-2 ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลต นี้ เป็นเชื้อที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อในแง่ของการพัฒนาเพื่อใช้เป็นยาต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์ในร่างกายของผู้รับยา

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* ที่แยกได้จาก *Alpinia galanga* (ข่า) ที่คัดเลือกมาศึกษาจำนวน 7 ไอโซเลต พบว่ามี 3 ไอโซเลต ได้แก่ AG2-1 AG2-5 และ AG2-6 มีฤทธิ์แบบกว้าง (broad activity) โดยมีฤทธิ์ทั้งกับแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมบวกดื้อยา เชื้อก่อโรคมะเร็ง เซลล์มะเร็งปอด และเซลล์มะเร็งช่องปาก แต่พบว่ามี cytotoxicity ส่วนเชื้ออีก 4 ไอโซเลต (AG2-3 AG2-4 AS1-6 และ AS1-8) พบว่าไม่มี bioactivity และไม่มี cytotoxicity ใดๆก็ตามได้นำ *Streptomyces* ทั้ง 7 ไอโซเลตนี้ไปศึกษาความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบโพลีคีไทด์ในขั้นตอนต่อไป

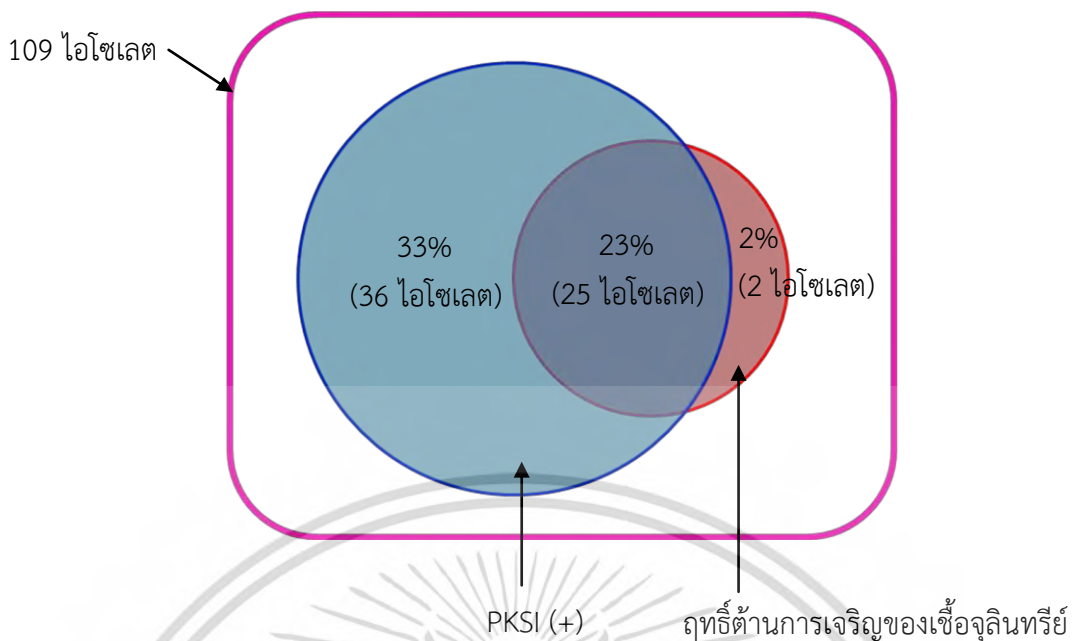
#### 4.4 การตรวจหายีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1

จากผลการเพิ่มปริมาณยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 บริเวณ KS domain จากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดโดยใช้ดีเจเนอเรทไพรเมอร์ (degenerate primers) และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังตัวอย่างรูปที่ 4.39 พบเชื้อที่ให้ผลบวกคือมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 740-780 bp จำนวน 61 ไอโซเลต จาก 109 ไอโซเลต (ร้อยละ 56) (ตารางที่ 4.11)



**รูปที่ 4.39** การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส  
 แถวที่ 1 คือ 1 kb DNA ladder  
 แถวที่ 2-5 คือ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 โดยแถวที่ 4 6 และ 8 เป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวก

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์กับผลการตรวจสอบยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 ดังแสดงในรูปที่ 4.40 พบว่าจากกลุ่มของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 27 ไอโซเลต (ร้อยละ 25) ตรวจพบยีน จำนวน 25 ไอโซเลต (ร้อยละ 23) มีเพียง 2 ไอโซเลต คือ AK1-1 และ ZM3-2 ที่ตรวจไม่พบยีนดังกล่าว ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของทั้ง 25 ไอโซเลต นั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับสารประกอบโพลีคีไทด์ ส่วนอีก 2 ไอโซเลต นั้นเป็นฤทธิ์ที่มีผลมาจากสารในกลุ่มอื่น ส่วนเชื้อไอโซเลตที่ตรวจพบยีน แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (ร้อยละ 33) นั้นเป็นไปได้ว่าเชื้อเหล่านี้ อาจสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มโพลีคีไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์หรือเกิดจากสภาวะการเพาะเลี้ยงยังไม่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารออกฤทธิ์ โดยกลุ่มของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียในวงกลมสีฟ้าทั้งหมดเป็นกลุ่มเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียที่น่าสนใจนำไปศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่นๆ และการศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป



รูปที่ 4.40 แสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์กับผลการตรวจสอบยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1

#### 4.5 การศึกษาความหลากหลายของยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1

การศึกษาความหลากหลายของยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 ทำในเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสียที่เป็นกลุ่มเชื้อ *Streptomyces* จำนวน 7 ไอโซเลต คือ AG2-1 AG2-3 AG2-4 AG2-5 AG2-6 AS1-6 และ AS1-8 ที่แยกได้จาก *Alpinia galanga* (ข่า) จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากจังหวัดอุดรธานีและจังหวัดอยุธยา โดยมีจำนวน 3 ไอโซเลต มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังที่แสดงไว้ในหัวข้อ 4.3 การศึกษาความหลากหลายของยีน ทำโดยนำชิ้นดีเอ็นเอของยีนที่บริเวณ KS domain มาทำการโคลน โดยได้โคลนทั้งหมด 43 ชนิด นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแต่ละโคลนมาแปลงให้เป็นลำดับกรดอะมิโน แล้วสร้างแผนภาพ phylogenetic tree (รูปที่ 4.41) และเปรียบเทียบความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนที่ปรากฏในฐานข้อมูล ดังแสดงในตารางที่ 4.12

จากผลการศึกษาความหลากหลายของยีน พบว่าได้ยีนที่แตกต่างกันทั้งหมด 43 ชนิด โดยเฉลี่ยแล้ว *Streptomyces* 1 ไอโซเลต พบยีนที่มีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันจำนวน 6 ชนิด โดยไอโซเลตที่มีความหลากหลายของยีนมากที่สุด คือ AG2-5 ซึ่งได้ยีนทั้งหมดจำนวน 11 ชนิด และไอโซเลตอื่นๆ เช่น AG2-1 AG2-6 และ AS1-6 ก็พบที่มีความหลากหลายของยีนเป็น 8 6 และ 9 ชนิดตามลำดับ จากการทดลองนี้กล่าวได้ว่าดีเอ็นเอเรพโรเมอร์ที่ออกแบบมา มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะจับกับยีนความหลากหลาย ในขณะเดียวกันไอโซเลต AG2-3 AG2-4 และ AS1-8 มีความหลากหลายของยีนต่ำกว่าที่คาดไว้ โดยแต่ละไอโซเลตพบยีนเพียง 3 ชนิด อาจเป็นเพราะเชื้อเหล่านี้มีจำนวนชนิดของยีนที่ต่ำ หรือยีนมีความจำเพาะสูงซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบมาไม่สามารถจับได้ นอกจากนี้ยังพบว่า *Streptomyces* ไอโซเลตที่ต่างกัน หรือแยกได้จากพืชในพื้นที่คนละจังหวัดกันแต่พบยีนที่อยู่ใน clade เดียวกัน เช่น ไอโซเลต AG2-6 no.10 และ AS1-6 no.3 ซึ่งอาจเกิดได้จากการถ่ายทอดยีนในแนวราบ (horizontal gene transfer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar disc diffusion ความเป็นพิษต่อเซลล์ และผลการตรวจหายีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1

สกุล	รหัส	PKS I gene	ความเป็นพิษต่อเซลล์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (มิลลิเมตร)							
				<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>C. albicans</i>	MRSA	VRE
<i>Jiangella</i>	KE2-3	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZM2-6	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Asanoa</i>	BR3-1	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dactylosporangium</i>	KE1-1	+	Cytotoxic	-	15	12	-	16	-	14	10
<i>Jishengella</i>	AN1-5	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN1-14	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AP1-2	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AX1-4	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	CL2-1	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	CL2-5	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i>	CP1-1	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN1-19	+	Cytotoxic	-	-	10	-	-	-	-	-
	AN1-32	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN1-37	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN2-6	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN3-10	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AP1-5	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	CZ1-1	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	KG1-3	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
KK1-2	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-	

ตารางที่ 4.11 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar disc diffusion ความเป็นพิษต่อเซลล์ และผลการตรวจหายีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 (ต่อ)

สกุล	รหัส	PKS I gene	ความเป็นพิษต่อเซลล์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (มิลลิเมตร)							
				<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>C. albicans</i>	MRSA	VRE
<i>Micromonospora</i>	SC1-2	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZM2-2	-	Cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZO1-2	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phytohabitans</i>	KK1-3	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kutzneria</i>	BR3-4	+	Cytotoxic	-	7	17	-	10	20	9	10
<i>Saccharopolyspora</i>	AK1-2	-	Non-cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microbispora</i>	AN2-5	+	Cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN2-7	+	Non-cytotoxic	-	-	10	-	8	11	-	-
	BR3-3	-	Non-cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
	CL1-1	+	Non-cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
	CL2-2	+	Non-cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
	KE1-2	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	KE1-3	+	Non-cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
	KE2-2	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	KE2-4	+	Non-cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
	KE2-5	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	KK1-10	+	Cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
	KK1-11	+	Non-cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
	KM1-1	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
KM1-2	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-	

ตารางที่ 4.11 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar disc diffusion ความเป็นพิษต่อเซลล์ และผลการตรวจหายีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 (ต่อ)

สกุล	รหัส	PKS I gene	ความเป็นพิษต่อเซลล์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (มิลลิเมตร)							
				<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>C. albicans</i>	MRSA	VRE
<i>Microbispora</i>	ZO1-7	+	Cytotoxic	-	-	9	-	8	10	-	-
	ZZ1-4	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZZ2-2	+	Cytotoxic	-	-	10	-	8	9	-	-
<i>Nonomuraea</i>	AN1-27	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN1-36	+	Cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN3-11	-	Non-cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
	HC1-7	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	SC1-1	-	Cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Planotatraspora</i>	BR3-5	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sphaerisporangium</i>	AN1-28	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	KM1-3	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptosporangium</i>	AN1-26	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN3-5	-	Cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinomadura</i>	AN2-10	+	Non-cytotoxic	-	7	-	-	17	-	-	-
	CL3-1	+	Non-cytotoxic	-	7	-	-	14	-	7	-
	KG1-2	-	Non-cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i>	AG2-1	+	Cytotoxic	-	29	31	-	30	-	28	26
	AG2-2	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG2-3	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AG2-4	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.11 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar disc diffusion ความเป็นพิษต่อเซลล์ และผลการตรวจหายีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 (ต่อ)

สกุล	รหัส	PKS I gene	ความเป็นพิษต่อเซลล์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (มิลลิเมตร)							
				<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>C. albicans</i>	MRSA	VRE
<i>Streptomyces</i>	AG2-5	+	Cytotoxic*	-	16	20	-	25	-	17	18
	AG2-6	+	Cytotoxic	-	21	22	-	25	-	23	20
	AK1-1	-	Cytotoxic	-	7	7	-	7	9	7	-
	AN1-8	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN1-12	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN1-18	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN1-25	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN1-29	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN1-38	+	Cytotoxic	-	7	7	-	7	-	7	-
	AN2-3	-	Non-cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
	AN2-9	+	Cytotoxic	-	-	-	-	-	25	-	-
	AN3-4	+	Cytotoxic	-	-	7	-	9	7	-	-
	AN3-6	+	Cytotoxic	-	21	26	-	30	-	24	21
	AP1-1	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AP1-3	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AP1-4	+	Cytotoxic*	-	-	-	-	-	-	-	-
	AS1-1	-	Cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AS1-6	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AS1-8	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	AX1-2	+	Cytotoxic	-	-	-	-	-	11	-	-

ตารางที่ 4.11 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar disc diffusion ความเป็นพิษต่อเซลล์ และผลการตรวจหายีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 (ต่อ)

สกุล	รหัส	PKS I gene	ความเป็นพิษต่อเซลล์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (มิลลิเมตร)							
				<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>C. albicans</i>	MRSA	VRE
<i>Streptomyces</i>	BR2-1	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	CL2-6	+	Cytotoxic	-	-	-	-	-	14	-	-
	CL3-4	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP1-2	+	Cytotoxic*	-	-	8	-	-	-	-	-
	CP1-6	+	Cytotoxic	-	9	14	-	13	-	10	11
	CX1-1	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	CZ1-3	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	CZ1-4	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	EE1-2	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	EE1-8	+	Cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	HC1-4	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	HC1-8	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	HC1-9	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	HC1-10	-	Cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	KE1-4	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	KE2-1	+	Non-cytotoxic	-	13	9	-	13	-	12	-
	KG1-1	+	Cytotoxic	-	-	17	-	-	-	-	10
	KM1-5	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	10	-	-
	ZM1-1	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZM2-1	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.11 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar disc diffusion ความเป็นพิษต่อเซลล์ และผลการตรวจหายีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 (ต่อ)

สกุล	รหัส	PKS I gene	ความเป็นพิษต่อเซลล์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (มิลลิเมตร)							
				<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>C. albicans</i>	MRSA	VRE
<i>Streptomyces</i>	ZM2-9	+	Cytotoxic	-	-	8	-	18	-	-	10
	ZM2-12	-	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZM3-2	-	Non-cytotoxic	-	-	11	-	17	-	10	-
	ZM3-3	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZM3-9	-	Cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZO1-8	+	Non-cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZZ1-3	+	Cytotoxic	-	18	20	-	26	8	18	15
	ZZ1-7	+	Cytotoxic	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZZ2-1	+	Cytotoxic	-	20	19	-	15	8	11	14

หมายเหตุ : *B. subtilis* ATCC 6633

*E. coli* ATCC 25922

*K. rhizophila* ATCC 9341

*P. aeruginosa* ATCC 27853

*S. aureus* ATCC 25923

*C. albicans* ATCC 10231

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

VRE คือ Vancomycin-resistance *Enterococcus fecium* (VRE) ATCC 51559

\* สารสกัดละลายได้บางส่วนใน 100% DMSO

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนบริเวณ KS domain กับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1

รหัส	<i>E. coli</i> clone no.	ความยาว (aa)	% similarity	ยีนในฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้อง (Accession no.)	สารโพลีคีไทด์ที่คาดว่าจะสร้างจากยีนในฐานข้อมูล	เอกสารอ้างอิง
AG2-1	1	259	95	MerC [ <i>Streptomyces violaceusniger</i> ] (ABJ97439)	Meridamycin	Sun <i>et al.</i> , 2006
	2	259	95	NigAll [ <i>Streptomyces violaceusniger</i> ] (ABC84457)	Nigericin	Harvey <i>et al.</i> , 2007
	3	260	95	polyketide synthase [ <i>Streptomyces</i> sp. PRh5] (EXU68742)	Nigericin Nocardamine	Yang <i>et al.</i> , 2014
	5	258	96	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces</i> sp. PRh5] (WP_051573878)	Unknown	-
	6	259	95	hypothetical protein M271_49110 [ <i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491] (AGP61184)	Rapamycin	Baranasic <i>et al.</i> , 2013
	8	260	78	polyketide synthase, partial [ <i>Streptomyces roseocinereus</i> ] (BAH67129)	Unknown	-
	9	257	95	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces</i> sp. PRh5] (WP_051573878)	Geldanamycin	-
	11	259	96	modular polyketide synthase [ <i>Streptomyces</i> sp. PRh5] (EXU68741)	Nigericin Nocardamine	Yang <i>et al.</i> , 2014
AG2-3	1	250	91	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces diastatochromogenes</i> ] (WP_094219157)	Unknown	-
	2	258	90	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces diastatochromogenes</i> ] (WP_094219157)	Unknown	-
	4	258	90	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces diastatochromogenes</i> ] (WP_094219157)	Unknown	-

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนบริเวณ KS domain กับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 (ต่อ)

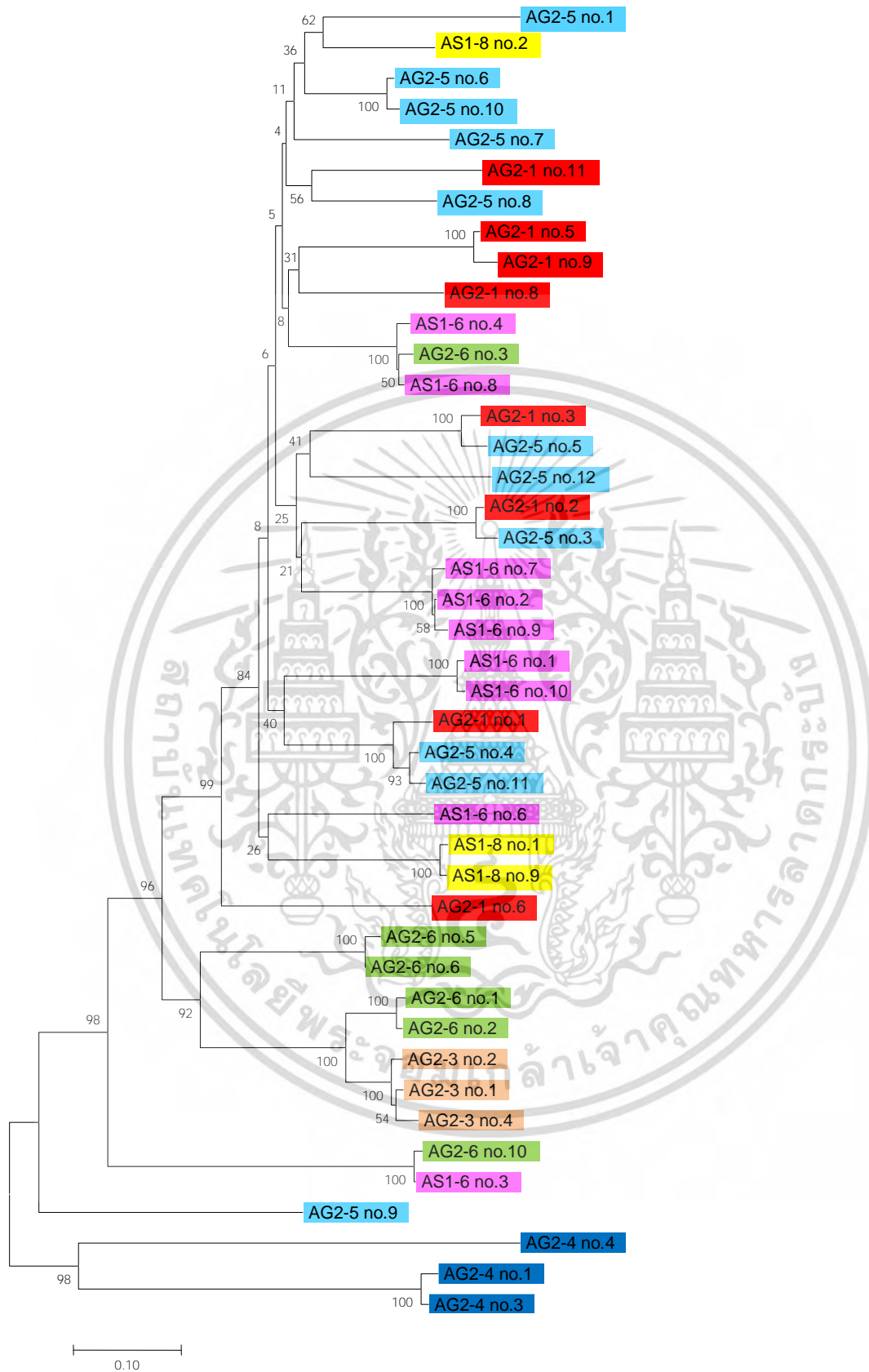
รหัส	<i>E. coli</i> clone no.	ความยาว (aa)	% similarity	ยีนในฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้อง (Accession no.)	สารโพลีคีไทด์ที่คาดว่าจะสร้างจากยีนในฐานข้อมูล	เอกสารอ้างอิง
AG2-4	1	257	96	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces misionensis</i> ] (WP_074993663)	Unknown	-
	3	257	96	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces misionensis</i> ] (WP_074993663)	Unknown	-
	4	253	73	hypothetical protein [ <i>Streptomyces</i> sp. NBS 14/10] (WP_089504844)	Unknown	-
AG2-5	1	260	99	polyketide synthase [ <i>Streptomyces</i> sp. 211726] (ARM20284)	Azalomycin	Xu <i>et al.</i> , 2017
	3	260	97	NigAll [ <i>Streptomyces violaceusniger</i> ] (ABC84457)	Nigericin	Harvey <i>et al.</i> , 2007
	4	260	97	polyketide synthase [ <i>Streptomyces</i> sp. NRRL 30748] (ABC87511)	Meridamycin	He <i>et al.</i> , 2006
	5	261	98	polyketide synthase [ <i>Streptomyces</i> sp. PRh5] (EXU68742)	Nigericin Nocardamine	Yang <i>et al.</i> , 2014
	6	260	97	polyketide synthase [ <i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491] (AGP57750)	Rapamycin	Baranasic <i>et al.</i> , 2013
	7	261	95	hypothetical protein M271_46360 [ <i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491] (AGP60637)	Rapamycin	Baranasic <i>et al.</i> , 2013
	8	261	96	hypothetical protein M271_46355 [ <i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491] (AGP60636)	Rapamycin	Baranasic <i>et al.</i> , 2013
	9	247	93	hypothetical protein M271_05860 [ <i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491] (AGP52798)	Rapamycin	Baranasic <i>et al.</i> , 2013
	10	260	97	polyketide synthase [ <i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491] (AGP57750)	Rapamycin	Baranasic <i>et al.</i> , 2013

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนบริเวณ KS domain กับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 (ต่อ)

รหัส	<i>E. coli</i> clone no.	ความยาว (aa)	% similarity	ยีนในฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้อง (Accession no.)	สารโพลีคีไทด์ที่คาดว่าจะสร้างจากยีนในฐานข้อมูล	เอกสารอ้างอิง
AG2-5	11	260	96	polyketide synthase [ <i>Streptomyces</i> sp. NRRL 30748] (ABC87511)	Meridamycin	He <i>et al.</i> , 2006
	12	260	93	HbmAll [ <i>Streptomyces hygrosopicus</i> ] (AAY28226)	Herbimycin	Rascher <i>et al.</i> , 2005
			93	GdmAll [ <i>Streptomyces hygrosopicus</i> ] (AAO06917)	Geldanamycin	Rascher <i>et al.</i> , 2003
			93	GelB [ <i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. <i>duamyceticus</i> ] (ABB86409)	Geldanamycin	Jin-Chul <i>et al.</i> , 2008
AG2-6	1	258	97	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces bungoensis</i> ] (WP_061917030)	Unknown	-
	2	258	97	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces bungoensis</i> ] (WP_061917030)	Unknown	-
	3	259	80	polyketide synthase, partial [ <i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. <i>hygrosopicus</i> ] (BAH67162)	Unknown	-
	5	258	96	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces bungoensis</i> ] (WP_061917030)	Unknown	-
	6	258	97	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces bungoensis</i> ] (WP_061917030)	Unknown	-
	10	261	97	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces bungoensis</i> ] (WP_061917030)	Unknown	-

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนบริเวณ KS domain กับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 (ต่อ)

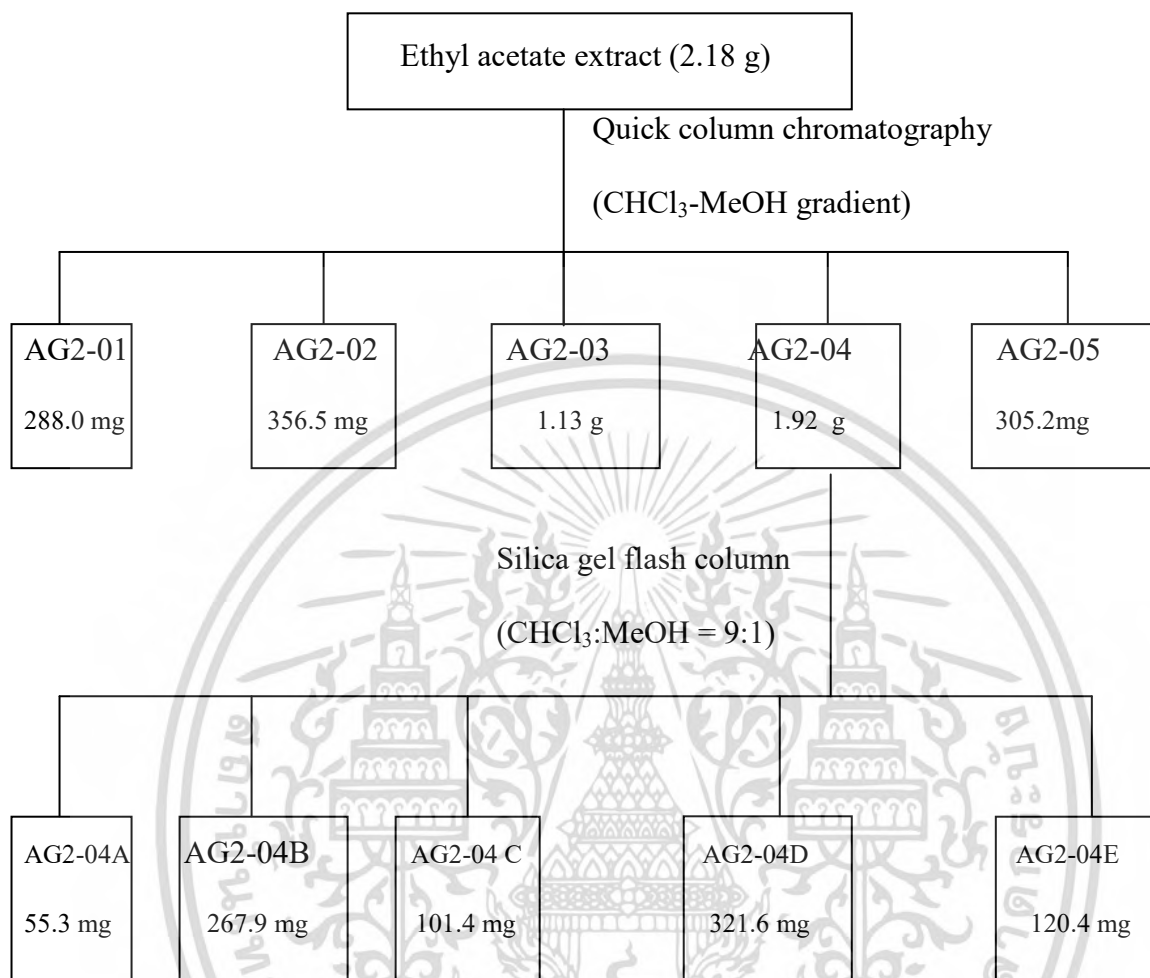
รหัส	<i>E. coli</i> clone no.	ความยาว (aa)	% similarity	ยีนในฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้อง (Accession no.)	สารโพลีคีไทด์ที่คาดว่าจะสร้างจากยีนในฐานข้อมูล	เอกสารอ้างอิง
AS1-6	1	260	83	type I polyketide synthase [ <i>Amycolatopsis australiensis</i> ] (WP_072480211)	Unknown	-
	2	260	76	polyketide synthase, partial [ <i>Streptomyces blastmyceticus</i> ] (BAH67198)	Unknown	-
	3	260	98	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces bungoensis</i> ] (WP_061914689)	Unknown	-
	4	259	79	polyketide synthase, partial [ <i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. <i>hygrosopicus</i> ] (BAH67162)	Unknown	-
	6	260	77	polyketide synthase, partial [ <i>Streptomyces</i> sp. ID05-A0263] (BAH67886)	Unknown	-
	7	258	75	polyketide synthase, partial [ <i>Streptomyces</i> sp. ID05-A0089] (BAH67675)	Unknown	-
	8	260	80	polyketide synthase, partial [ <i>Streptomyces blastmyceticus</i> ] (BAH67371)	Unknown	-
	9	260	76	polyketide synthase, partial [ <i>Streptomyces</i> sp. ID05-A0082] (BAH67666)	Unknown	-
	10	260	83	type I polyketide synthase [ <i>Amycolatopsis australiensis</i> ] (WP_072480211)	Unknown	-
	AS1-8	1	260	98	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces misionensis</i> ] (WP_074995146)	Unknown
2		260	99	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces misionensis</i> ] (WP_074995144)	Unknown	-
9		260	97	type I polyketide synthase [ <i>Streptomyces misionensis</i> ] (WP_074995146)	Unknown	-



**รูปที่ 4.41** แสดงความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนบริเวณ KS domain ที่เป็นส่วนประกอบของ โพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method) ที่ได้ จาก *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากข่า (*Alpinia galangal*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

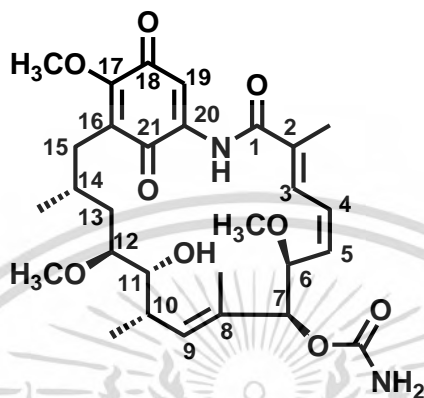
การสกัดและแยกสารทุติยภูมิของเชื้อที่คัดเลือก



ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อ *Streptomyces* sp. AG2-1

สาร AG2-04 C มีลักษณะเป็นผงสีส้มเหลือง 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  $3,450\text{ cm}^{-1}$  (O-H stretching),  $1,689\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretching) and  $1,649\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretching, amide I band) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารนี้ด้วยเทคนิค NMR พบว่า ข้อมูลทาง  $^1H$  NMR แสดงให้ทราบว่า สาร AG2-04 C ประกอบไปด้วย 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 สามารถระบุเอกลักษณ์เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของคาร์บอนของสาร AG2-04 C ได้ว่า สารนี้ประกอบด้วย 4 methyl carbons, 3 methoxy carbons, 2 methylene carbons, 11 methine carbons และ 9 quaternary carbons นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของ  $^{13}\text{C}$  NMR พบว่าสารนี้แสดงสัญญาณของ 2 quinone carbonyl carbons, 1 amide carbonyl carbon และ 1 carbamate carbon จากการเปรียบเทียบข้อมูลในฐานข้อมูลสามารถระบุเอกลักษณ์ของสารนี้ได้เป็น สารเจลดานามัยซิน (ตารางที่ 7)



รูปที่ 21 แสดงลักษณะโครงสร้างของสาร AG2-04 C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง การเปรียบเทียบข้อมูลของ  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR ระหว่างสาร AG2-04 C และสารเจลดานามัยซิน

Position	AG2-04 C <sup>a</sup>		Geldanamycin	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), mult, ( $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), mult <sup>c</sup>
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-OCNH <sub>2</sub>	155.75	4.80, NH <sub>2</sub> , brs	156	6.45, NH <sub>2</sub> , 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 <sup>#</sup>
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, 3H, 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 <sup>#</sup>
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

<sup>a</sup>observed in CDCl<sub>3</sub> and recorded at 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) and 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).

<sup>b</sup>observed in DMSO-*d*<sub>6</sub> (Omura *et al.*, 1979)

<sup>c</sup>observed in DMSO-*d*<sub>6</sub> (Rinehart, Jr. And Shield, 1976)

\*,\*\*, # interchangeable signals

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารที่แยกได้

สารสกัดที่แสดงศักยภาพในการทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% ได้แก่ AG2-04 A (ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml), AG2-04 B (ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml), AG2-04 C (ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml), AG2-04 D (ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml), AG2-04 E (ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml) และเมื่อพิจารณาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทพบว่าสารสกัดทั้งหมด แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทที่ต่ำ ( $IC_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$ ) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบ therapeutic index (TI) ระหว่างความเข้มข้นที่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตได้มากกว่า 100% กับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทแล้ว จึงเลือกเพียง AG2-04 C มาทำการศึกษาความสามารถในการกระตุ้นการงอกของแขนงประสาทที่ความเข้มข้น 1 ng/ml ต่อไป

ตารางแสดงผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัด

สารสกัด	ความเข้มข้น (ร้อยละการรอดชีวิต $\pm$ SEM)	
	เพิ่มอัตราการรอดชีวิต	ความเป็นพิษ
AG2-04 A	10 ng/ml (111.37 $\pm$ 4.03%)	> 10 µg/ml (95.90 $\pm$ 5.10%)
AG2-04 B	10 ng/ml (109.21 $\pm$ 1.09%)	> 10 µg/ml (114.75 $\pm$ 6.49%)
AG2-04 C	1 ng/ml (129.19 $\pm$ 1.66%)	> 10 µg/ml (80.30 $\pm$ 6.11%)
AG2-04 D	10 µg/ml (101.58 $\pm$ 6.44%)	> 10 µg/ml (129.78 $\pm$ 6.41%)
AG2-04 E	10 ng/ml (100.50 $\pm$ 4.21%)	> 10 µg/ml (94.89 $\pm$ 4.00%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3 ผลการทดสอบ neuritogenic activity ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes

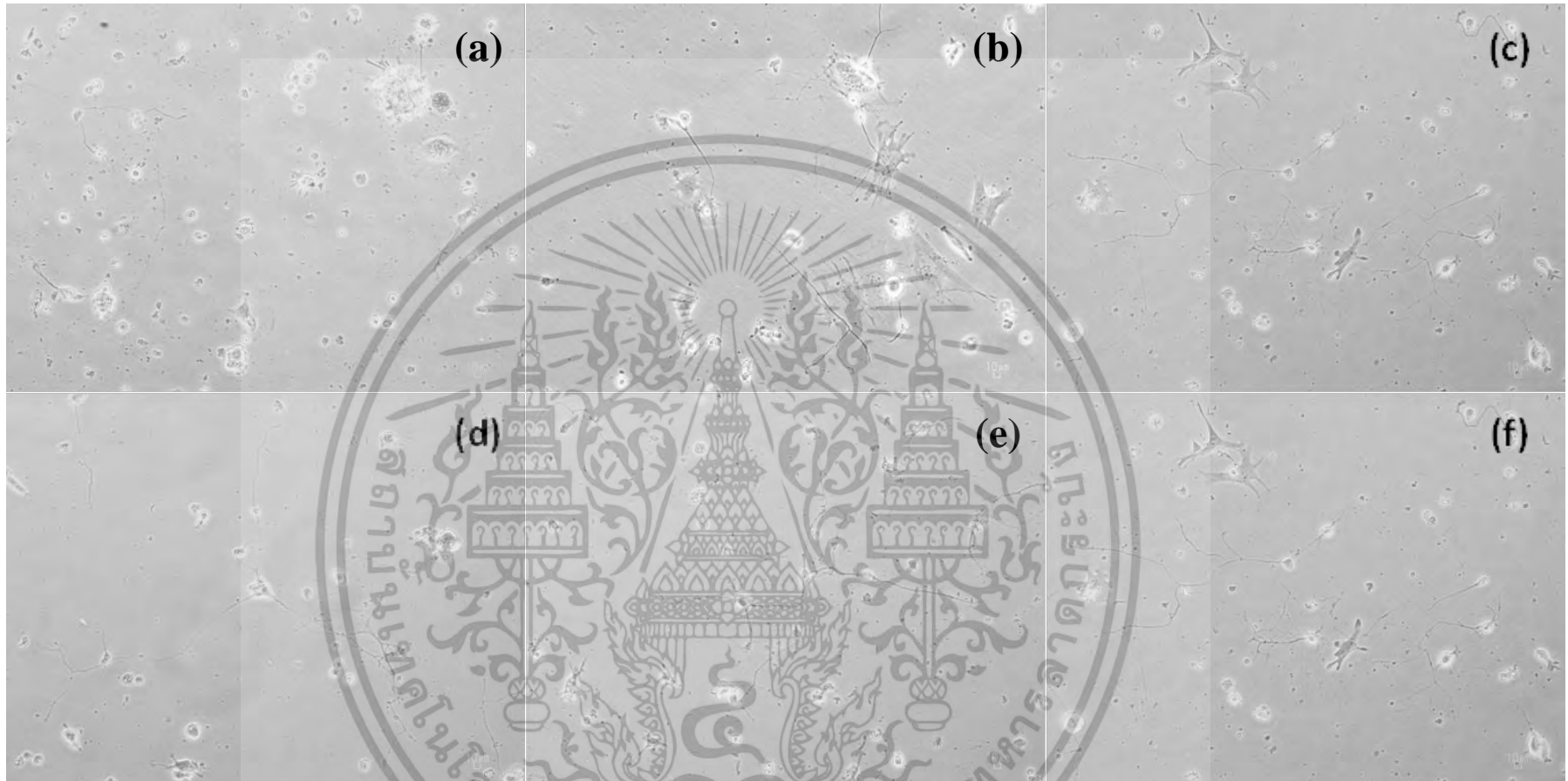
ตารางแสดงผลการทดสอบ neuritogenic activity ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ

สารสกัด	neuritogenicity	
	ความยาวของแขนงประสาท ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SEM	จำนวนของแขนงประสาท (เส้น) $\pm$ SEM
AG2-04 A (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง	
AG2-04 B (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง	
AG2-04 C (1 ng/ml) <sup>†</sup>	98.72 $\pm$ 8.14 <sup>*</sup>	4.18 $\pm$ 0.18 <sup>*,**</sup>
AG2-04 D (10 $\mu\text{g/ml}$ )	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ	
AG2-04 E (1 ng/ml) <sup>†</sup>	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ	
1 nM quercetin	88.33 $\pm$ 2.06 <sup>*,**</sup>	2.57 $\pm$ 0.64 <sup>*,**</sup>
0.5%DMSO in $\alpha$ -MEM + 10%FBS	62.53 $\pm$ 5.40	1.98 $\pm$ 0.10
Control ( $\alpha$ -MEM + 10%FBS)	46.79 $\pm$ 3.52	1.78 $\pm$ 0.13

\* $p < 0.05$  เปรียบเทียบกับ control; \*\* $p < 0.05$  เปรียบเทียบกับ 0.5%DMSO in  $\alpha$ -MEM + 10%FBS

<sup>†</sup> จะทำการทดสอบเนื่องจาก TI กว้าง; ใช้ quercetin เป็น positive control

จากข้อมูลพบว่า สารสกัด AG2-04 C ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml มีฤทธิ์กระตุ้นการงอกและเพิ่มจำนวนแขนงประสาท (neuritogenicity) โดยสารนี้สามารถเพิ่มจำนวนของแขนงประสาทได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวทำลายควบคุม และสามารถทำให้แขนงประสาทยาวมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปแสดงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ประสาทที่สืบเท้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100 เท่า) ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในบรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อทดสอบด้วย (a) ไม่เติมสารทดสอบ [control] (b) 1 ng/mL AG2-04 A (c) 1 ng/mL AG2-04 B (d) 1 ng/mL AG2-04 C (e) 1 ng/mL AG2-04 D และ (f) 1 ng/mL AG2-04 E

#### 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ neuroprotective activity ของสารที่แยกได้

ตารางแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ neuroprotective activity ของสารที่แยกได้

สารสกัด	ร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท $\pm$ SEM
AG2-04 A (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง
AG2-04 B (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง
AG2-04 C (1 ng/ml)	72.87 $\pm$ 1.12 <sup>*,**</sup>
AG2-04 D (10 $\mu$ g/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ
AG2-04 E (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ
0.5% DMSO in $\alpha$ -MEM	35.26 $\pm$ 4.23 <sup>*</sup>
$\alpha$ -MEM	41.12 $\pm$ 2.75 <sup>*</sup>
0.5%DMSO in $\alpha$ -MEM + 10%FBS	102.13 $\pm$ 1.81 <sup>*</sup>
Control ( $\alpha$ -MEM + 10%FBS)	100.00 $\pm$ 0.00

จากข้อมูลสรุปได้ว่าสาร AG2-04 C ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotective) โดยสารสกัดทุกชนิดสามารถป้องกันเซลล์ประสาทไม่ให้ตายจากการเกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีซีรัม (serum deprivation) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมซีรัม และกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมซีรัม

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกแอสโคไมซีตาไฟติกแอสโคสปอร์จำนวน 109 ไอโซเลตได้จากชิ้นส่วนใบ ลำต้น เหง้า และราก ของพืชวงศ์จิงที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 20 ชนิด ซึ่งเก็บได้จากหลายพื้นที่ใน 8 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ อุดรธานี นครพนม บึงกาฬ สระบุรี นครนายก ปราจีนบุรี อุดรธานี และอุบลราชธานี จากการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้น โดยการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าเป็นแอสโคสปอร์ที่จัดอยู่ใน 6 วงศ์ ได้แก่ *Jiangellaceae* *Micromonosporaceae* *Pseudonocardiaceae* *Streptosporangiaceae* *Thermomonosporaceae* และ *Streptomycetaceae* โดยแบ่งเป็น 15 สกุล ได้แก่ *Jiangella* *Asanoa* *Dactylosporangium* *Jishengella* *Micromonospora* *Phytohabitans* *Kutzneria* *Saccharopolyspora* *Microbispora* *Nonomuraea* *Planotetraspora* *Sphaerisporangium* *Streptosporangium* *Actinomadura* และ *Streptomyces* ซึ่งแต่ละสกุลมีลักษณะ ดังนี้

1. สกุล *Jiangella* เป็นแอสโคสปอร์ที่สร้างเส้นใยอาหารเป็นสายยาวและเส้นใยแตกหัก (fragment) เป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว สร้างเส้นใยอากาศได้ แต่ไม่พบการสร้างสปอร์ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ KE2-3 และ ZM2-6

2. สกุล *Asanoa* เป็นแอสโคสปอร์ที่สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสาย (มีจำนวนสปอร์มากกว่า 10 สปอร์ต่อสาย) บนปลายของก้านชูสปอร์ขนาดสั้นซึ่งชูขึ้นมาโดยตรงจากผิวอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลต คือ BR3-1

3. สกุล *Dactylosporangium* เป็นแอสโคสปอร์ที่สร้างโครงสร้างลักษณะกลม (globose bodies) อยู่บนเส้นใยอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลต คือ KE1-1

4. สกุล *Jishengella* เป็นแอสโคสปอร์ที่สร้างสปอร์เดี่ยวรูปร่างกลมอยู่บนเส้นใยอาหารที่มีลักษณะแตกกิ่งก้าน ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ AN1-5 AX1-4 CL2-5 CP1-1 AN1-14 AP1-2 และ CL2-1

5. สกุล *Micromonospora* เป็นแอสโคสปอร์ที่สร้างสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหาร ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ AN1-19 AN1-32 AN1-37 AN2-6 AN3-10 AP1-5 CZ1-1 KG1-3 KK1-2 SC1-2 ZM2-2 และ ZO1-2

6. สกุล *Phytohabitans* เป็นแอสโคสปอร์ที่สร้างทั้งสปอร์เดี่ยวรูปกลมและสปอร์สายยาว (มากกว่า 10 สปอร์) ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลต คือ KK1-3

7. สกุล *Kutzneria* เป็นแอสโคสปอร์ที่สร้างเส้นใยอากาศที่แตกแขนงเป็นกิ่งก้าน และสร้างสปอร์ที่มีถุงหุ้ม (sporangium) ลักษณะกลมอยู่ที่ปลายของก้านชูสปอร์ขนาดยาวบนเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลต คือ BR3-4

8. สกุล *Saccharopolyspora* เป็นแอสโคสปอร์ที่สร้างเส้นใยอาหารที่มีลักษณะแตกกิ่งก้านและมักแตกหัก (fragment) เป็นท่อนสั้นๆ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลต คือ AK1-2

9. สกุล *Microbispora* เป็นแอสโคสปอร์ที่สร้างเส้นใยอาหารที่มีลักษณะแตกกิ่งก้านและสร้างสปอร์คู่อยู่บนก้านชูสปอร์สั้นๆ บนเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 17 ไอโซเลต ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AN2-5 AN2-7 BR3-3 CL1-1 CL2-2 KE1-2 KE1-3 KE2-2 KE2-4 KE2-5 KK1-10 KK1-11 KM1-1  
KM1-2 ZO1-7 ZZ1-4 และ ZZ2-2

10. สกุล *Nonomuraea* เป็นแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์สายสั้นบนเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ AN1-27 AN1-36 AN3-11 HC1-7 และ SC1-1

11. สกุล *Planotetraspora* เป็นแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์ที่มีถุงหุ้มอยู่บนก้านชูสปอร์ขนาดสั้น ซึ่งภายในบรรจุสปอร์จำนวน 4 สปอร์ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลต คือ BR3-5

12. สกุล *Sphaerisporangium* เป็นแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้มทรงกลมบนเส้นใยอากาศ เส้นใยมีจุดโปร่งแสงและทึบแสงสลับกัน ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ AN1-28 และ KM1-3

13. สกุล *Streptosporangium* เป็นแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ทรงกลมบนเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ AN1-26 และ AN3-5

14. สกุล *Actinomadura* เป็นแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารแตกแขนงเป็นกิ่งก้าน และสร้างสปอร์สายสั้นๆ บนเส้นใยอากาศ ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ AN2-10 CL3-1 และ KG1-2

15. สกุล *Streptomyces* เป็นแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารแตกแขนงเป็นกิ่งก้านและสร้างเส้นใยอากาศปริมาณมาก สร้างสปอร์หลากหลายรูปแบบ เช่น สปอร์สายยาวที่มีลักษณะตรง สปอร์ที่มีลักษณะคล้ายรูปตะขอ สปอร์ที่มีลักษณะเป็นเกลียว ประกอบด้วยเชื้อจำนวน 53 ไอโซเลต ได้แก่ AG2-1 AG2-2 AG2-3 AG2-4 AG2-5 AG2-6 AK1-1 AN1-8 AN1-12 AN1-18 AN1-25 AN1-29 AN1-38 AN2-3 AN2-9 AN3-4 AN3-6 AP1-1 AP1-3 AP1-4 AS1-1 AS1-6 AS1-8 AX1-2 BR2-1 CL2-6 CL3-4 CP1-2 CP1-6 CX1-1 CZ1-3 CZ1-4 EE1-2 EE1-8 HC1-4 HC1-8 HC1-9 HC1-10 KE1-4 KE2-1 KG1-1 KM1-5 ZM1-1 ZM2-1 ZM2-9 ZM2-12 ZM3-2 ZM3-3 ZM3-9 ZO1-8 ZZ1-3 ZZ1-7 และ ZZ2-1

จากการศึกษาอนุกรมวิธานแบบพอลิฟาสิก (polyphasic taxonomy) ของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกมาจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ BR3-1 KK1-3 และ SC1-1 พบว่าเป็นแอคติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่และให้ชื่อว่า *Asanoa endophytica* *Phytohabitans kaempferiae* และ *Nonomuraea stahlianthi* ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ดังกล่าวได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (Niemhom et al., 2016a ; Niemhom et al., 2016b ; Niemhom et al., 2017)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc diffusion ของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตจากน้ำหมักของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 109 ไอโซเลต โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ 8 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Candida albicans* ATCC 10231 และ Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 พบว่าจำนวน 27 ไอโซเลต (ร้อยละ 25) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อย่างน้อย 1 ชนิด ในจำนวนนี้มี 23 ไอโซเลต (ร้อยละ 85) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ และจำนวน 12 ไอโซเลต (ร้อยละ 44) แสดงฤทธิ์ยับยั้ง

การเจริญของ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ แต่ไม่มีเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลตใด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลยที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ และจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัดหยาบจากเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทจำนวน 76 ไอโซเลต (ร้อยละ 70) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

จากผลการตรวจหายีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 โดยการออกแบบดีเจเนอเรทไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อยีนดังกล่าว และมีความหลากหลายเพียงพอสำหรับใช้ตรวจสอบยีนดังกล่าวได้ โดยพบว่ามีเชื้อที่ผลบวก 61 ไอโซเลต (ร้อยละ 56) และเชื้อกลุ่มนี้มีการแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคอีกด้วย ทั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือก *Streptomyces* ที่แยกได้จาก *Alpinia galanga* (ข่า) จำนวน 7 ไอโซเลต คือ AG2-1 AG2-3 AG2-4 AG2-5 AG2-6 AS1-6 และ AS1-8 มาศึกษาความหลากหลายของยีน เนื่องจากตรวจพบยีนทั้งหมด และมีเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลต คือ AG2-1 AG2-5 และ AG2-6 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติม พบว่า AG2-1 AG2-5 และ AG2-6 แสดงทั้งฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคมาลาเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด และเซลล์มะเร็งช่องปาก โดยผลการศึกษาคความหลากหลายของยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 โดยสร้างแผนภาพ phylogenetic tree พบว่า *Streptomyces* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ AG2-1 AG2-5 AG2-6 และ AS1-6 มีความหลากหลายของยีนสูง โดยมียีนที่มีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันไม่ต่ำกว่า 6 โคลนในหนึ่งไอโซเลต

สำหรับฤทธิ์การกระตุ้นการแตกแขนงและการปกป้องของระบบประสาท พบว่า สาร AG2-04 C แสดงฤทธิ์ดังกล่าวได้ในระดับความเข้มข้นต่ำ (1 ng/ml) เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างของสารนี้พบว่า สารนี้เป็นสารเจลคานามัยซิน

จากผลการศึกษาพบว่าพืชวงศ์ขิงเป็นแหล่งของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และยังเป็นแหล่งของเชื้อที่ไม่เคยมีการค้นพบมาก่อน นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ที่พบยังมีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มโพลีคีไทด์อีกด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมและการหาฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ ด้วย

งานวิจัยนี้ได้เก็บรวบรวมสายพันธุ์ ข้อมูลของฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆ และความรู้ทางด้านอนุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทที่พบจากพืชวงศ์ขิง รวมถึงห้องสมุดของยีนโพลีคีไทด์ซินเทสชนิดที่ 1 ที่ใช้เป็นฐานข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการสร้างสารประกอบในกลุ่มโพลีคีไทด์จาก *Streptomyces* ที่แยกได้จากข่า ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัยด้านอื่นเช่นทางด้านเภสัชศาสตร์ เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไปได้

บทที่ 6  
สรุปผลผลิตงานวิจัย

ผลงาน	ระบุรายละเอียดให้ชัดเจน	จำนวนที่คาดว่าจะได้/ ปีที่คาดว่าจะผลิตได้	จำนวนผลงานที่ผลิตได้จริง/ปีที่ผลิตได้
การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ (Publications)			
■ การประชุม / สัมมนา ระดับนานาชาติ (International Conference)	ร่วมเสนอผลงานการประชุมระดับนานาชาติ TSB	1 (2560)	0
■ วารสาร ระดับนานาชาติ (International Journal)	The new species of endophytic actinomycetes isolated from Zingiberaceous plants.  International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology (ISI, impact factor 2.1 Quartile 2 ปี 2017)	2 (2560-2561)	3
■ การผลิตบัณฑิต	นักศึกษาระดับปริญญาโท/เอก	1	1 นางสาวนันทวัน เนียมหอม (ปริญญาเอก)

\*\*\*เนื่องจากผลการวิจัยที่ได้ ได้ผลดีพอที่จะนำไปตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ฐาน ISI ที่อยู่ใน Quartile 1-4 ได้ จึงเปลี่ยนแผนที่จะนำไปร่วมเสนอผลงานการประชุม ระดับนานาชาติ TSB ออก เพื่อนำไปตีพิมพ์ ในวารสาร International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology (ISI, impact factor 2.1 Quartile 2 ปี 2017) แทน

ชื่อผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. Niemhom N, Chutrakul C, Suriyachadkun C, Thawai C. 2017. *Nonomuraea stahlianthi* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Stahlianthus campanulatus*. Int J Syst Evol Microbiol.67(8):2879-2884.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. **Thawai C**, He YW, Tadtong S. **2018**. *Jishengella zingiberis* sp. nov., isolated from root tissue of *Zingiber montanum*. Int J Syst Evol Microbiol. 68(10):3345-3350. doi: 10.1099/ijsem.0.002998. Epub 2018 Aug 31.
3. Niemhom N, Chutrakul C, Suriyachadkun C, Tadtong S, **Thawai C**. **2019**. *Jiangella endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the rhizome of *Kaempferia elegans*. Int J Syst Evol Microbiol. Feb;69(2):454-459. doi: 10.1099/ijsem.0.003175. Epub 2018 Dec 17.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- Arai, T. 1975. Culture Media for Actinomycetes. *The Society for Actinomycetes*. Japan.
- Bacon, C.W. and White, J.F. 2000. Microbial endophytes. Marcel Dekker Inc., New York.
- Barbara, S., Christine, B., Siegfried, D., Anne-Kartrin, R. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* 106, 996-1004.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiotics.* 58: 1-26.
- Bieber, B., Nuske, J., Ritzau, M. and Grafe, U. (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 isozyme electrophoresis.” *Mycological Research.* 96 : 723-733.
- 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 microbiology : An exploratory approach delmar. An International Thomson Publishing. USA.
- Enokita, R., Okazaki, T., Torikata, A. and Arai, M. 1986. Personal communication. Sankyo Fermentation Research Laboratories, Tokyo, Japan.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. and 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.
- Du, H., Zhang, Y., Liu, H., Su, J., Wei, Y., Ma, B., Guo, B. and Yu, L. (2013). *Allonocardiopsis opalescens* gen. nov., sp. nov., a new member of the suborder *Streptosporangineae*, from the surface-sterilized fruit of a medicinal plant. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 900–904.
- 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, 2493-2442.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Goodfellow, M., Williams, S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 189-216.

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.

Hayakawa, Y., Yamazaki, Y., Kurita, M., Kawasaki, T., Takagi, M., and Shin-ya, K. (2010). Flaviogeranin, a new neuroprotective compound from *Streptomyces* sp. *J Antibiot* 63, 379–380.

He, H., Liu, C., Zhao, J., Li, W., Pan, T., Yang, L., Wang, X. and Xiang, W. (2014). *Streptomyces zhaozhouensis* sp. nov., an actinomycete isolated from candelabra aloe (*Aloe arborescens* Mill). *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 1096–1101.

Holt, J. G. 1989. Filamentous Actinomycetes and Related Bacteria. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4, pp. 2333-2450. Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

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.

Huang, S., Yu, Z., Robert, F., Zhao, L., Jiang, Y., Duan, Y., Pelletier, J. and Shen, B. (2011). Cycloheximide and congeners as inhibitors of eukaryotic protein synthesis from endophytic actinomycetes *Streptomyces* sps. YIM56132 and YIM56141. *J Antibiot* 64, 163–166.

Iacovitti, L., Stull, N. D. and Johnston, K. 1997. Melatonin rescue dopamine neurons from cell death in tissue culture models of oxidative stress. *Brain Res.* 768:317-326.

Igarashi, Y., Trujillo, M. E., Molina, E. M., Yanase, S., Miyanaga, S., Obata, T., Sakurai, H., Saiki, I., Fujita, T. and Furumaia, T. 2007. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 3702–3705.

Inahashi, Y., Iwatsuki, M., Ishiyama, A., Namatame, M., Nishihara-Tsukashima, A., Matsumoto, A., Hirose, T., Sunazuka, T., Yamada, H., Otoguro, K., Takahashi, Y., Omura, S. and Shiomi, K. (2011). Spoxazomicins A–C, novel antitrypanosomal alkaloids produced by an endophytic actinomycete, *Streptosporangium oxazolinicum* K07-0460<sup>T</sup>. *J Antibiot* 64, 303–307.

Inahashi, Y., Matsumoto, A., Danbara, H., Omura, S. and Takahashi, Y. (2010). *Phytohabitans suffuscus* gen. nov., sp. nov., an actinomycete of the family *Micromonosporaceae* isolated from plant roots. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2652–2658.

Inahashi, Y., Matsumoto, A., Omura, 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., Igarashi, Y., Ikeda, M., Oikawa, T. and Thamchaipenet, A. (2013). Linfuranone A, a new polyketide from plant-derived *Microbispora* sp. GMKU 363. *J Antibiot* 66, 675–677.
- 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.
- Kim, D.S., Park, S.Y., and Kim, J.Y. 2001. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from  $\beta$ A (1-42) insult. *Neurosci. Lett.* 303: 57-61.
- Kirby, B. M. and Meyers, P. R. 2010. *Micromonospora tulbaghia* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1328-1333.
- Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. *Methods in Microbiology.* 19: 161-207.
- 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.
- Li, Y., Han, L., Rong, H., Li, L., Zhao, L., Wu, L., Xu, L., Jiang, Y. and Huang, X. (2015). Diastaphenazine, a new dimeric phenazine from an endophytic *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus*. *J Antibiot* 68, 210–212.
- Lin, L., Lesnick, T.G., Maraganore, D.M., and Isacson, O. 2009. Axon guidance and synaptic maintenance: preclinical markers for neurodegenerative disease and therapeutics. *Trends Neurosci.* 32(3): 142-149.

- 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.
- López-Maderuelo, M. D., Fernández-Renart, M., Moratilla, C. and Renart, J. 2001. Opposite effects of the Hsp90 inhibitor geldanamycin: induction of apoptosis in PC12, and differentiation in N2A cells. *FEBS Lett.* 490:23-27.
- Lorian, V. 1980. Antibiotics in laboratory medicine. pp. 161-207. Baltimore: The Williams & Wilkins.
- MacPherson, P. A. and McBurney MW. 1995. P19 embryonal carcinoma cells: a source of cultured neurons amenable to genetic manipulation. *Methods* 7:238-252.
- 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.
- Mak, N.K., Li, W.K., Zhang, M., Wong, R.N.S., Tai, L.S., Yung, K.K.L., and Leung, H.W. 2000. Effect of euxanthone on neuronal differentiation. *Life Sci.* 66(4): 347-354.
- Mingma, R., Duangmal, K., Trakulnaleamsai, S., Thamchaipenet, A., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. (2014). *Sphaerisorangium rufum* sp. nov., an endophytic actinomycete from roots of *Oryza sativa* L. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 1077–1082.
- Miyadoh, S. 1997. Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan. Asakura Publishing.
- Nakajima, Y., Kitpreechavanich, V., Suzuki, K.I. and Kudo, T. 1999. *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1761-1767.
- Nakashima, T., Okuyama, R., Kamiya, Y., Matsumoto, A., Iwatsuki, M., Inahashi, Y., Yamaji, K., Takahashi, Y. and Omura, S. (2013). Trehangelins A, B and C, novel photo-oxidative hemolysis inhibitors produced by an endophytic actinomycete, *Polymorphospora rubra* K07-0510. *J Antibiot* 66, 311–317.
- Parnas, D and Linial, M. 1995. Cholinergic properties of neurons differentiated from embryonal carcinoma cell-line (P19), *Int. J. Dev. Neurosci.* 13:767-781.
- 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.
- Qin, S., Zhao, G., Li, J., Zhu, W., Xu, L. and Li, W. (2009). *Jiangella alba* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Maytenus austroyunnanensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2162–2165.

- Rahman, A. 2000. Bioactive natural products (part D) volume 23 : Studies in Natural products chemistry. Elsevier.
- Shanson, D.C. 1982. *Microbiology in Clinical Practice*. Wright PSG, London., p. 36.
- Shiring, E.B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.
- Skehan, P., Storeng, R., Scdiero, D., Mark, S.A., McMahan, S., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82: 1107-1112.
- 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.
- Summers, M.Y., Leighton, M., Liu, D., Pong, K. and Graziani, E. I. (2006). 3-normeridamycin: a potent non-immunosuppressive immunophilin ligand is neuroprotective in dopaminergic neurons. *J Antibiot* 59, 184-189.
- Tadtong, S., Kanlayavattanaku, M., and Lourith, N. 2013. Neuritogenic and neuroprotective Activities of fruit residues. *Nat. Prod. Commun.* 8(11): 1583-1586.
- 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.
- Tamaoka, J. 1994. Determination of DNA Base Composition *In Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Edited by M. Goodfellow and A.G. O'Donnell. John Wiley and Sons Ltd. pp. 463-470.
- Tangsaengvit, N., Kitphati, W., Tadtong, S., Bunyaphrapsara, N., and Nukoolkarn V. 2013. Neurite outgrowth and neuroprotective effects of Quercetin from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. on cultured P19-derived neurons. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* Article ID 838051, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/838051>.
- 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.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. 1995. *Microbiology, An Introduction*. 5<sup>th</sup> ed. Bridge Parkway: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Umezawa, H. 1978. *Index of Actinomycetes Antibiotics*, USACO Corporation, Tokyo.

Valois, D., Fayad, K., Barasubiye, T., Garon, M., Dery, C., Brzezinski, R. and Beaulieu, C.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. rubi, the causal agent of raspberry root rot. *Applied environ microbiol.* 62 : 1630-1635.
- Verlander, C.P. 1992. Detection of horseradish peroxidase by colorimetry, *In Nonisotopic DNA Probe Technique*, pp.185-201. Edited by L.J. Kricka. New York: Academic Press.
- Wang, Z.J., Nie, B.M., Chen, H.Z., and Lu, Y. 2006. Panaxynol induces neurite outgrowth in PC12D cells via cAMP- and MAP kinase-dependent mechanisms. *Chem. Biol. Interact.* 159:58-64.
- Wilken, R., Veena, M.S., Wang, M.B. and Srivatsan, E.S. 2011. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer.* 10 : 12.
- Williams, S.T. and Cross, T. 1971. Actinomycetes : Physiological properties *In Method in Microbiology*, 4<sup>th</sup> edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.
- Williams, S.T. and Cross, T. 1977. Actinomycetes : Slide and coverslip methods *In Method in Microbiology*, 4<sup>th</sup> edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.
- Xing, K., Bian, G., Qin, S., Klenk, H., Yuan, B., Zhang, Y., Li, W. and Jiang, J. (2012). *Kibdelosporangium phytohabitans* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from oil-seed plant *Jatropha curcas* L. containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase. *Antonie van Leeuwenhoek* (2012) 101, 433–441.
- Yang, Y.J., Lee, H.J., Choi, D.H., Huang, H.S., Lim, S.C., and Lee, M.K. 2008. Effect of scoparone on neurite outgrowth in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 440: 14-18.
- Zhang, W.K., Xu, J.K., Zhang, X.Q., Yao, X.S., and Ye, W.C. 2007. Sphingolipids with neurotogenic activity from *Euphorbia sororia*. *Chem. Phys. Lipids* 148: 77-83.
- Zhao, G., Li, J., Qin, Y., Miao, C., Wei, D., Zhang, S., Xu, L. and Li, W. (2012). *Pseudonocardia antimicrobica* sp. nov., a novel endophytic actinomycete associated with *Artemisia annua* L. (sweet wormwood). *J Antibiot* 65, 469–472.
- Zhao, J., Guo, L., Liu, C., Zhang, Y., Guan, X., Li, J., Xu, S., Xiang, W. and Wang, X. (2015). *Micromonospora lycii* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from wolfberry root (*Lycium chinense* Mill). *J Antibiotics* (2015), 1–6.
- 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.
- Ab-Satah, K.M. 1996. “Amphotericin B: an update, Br.” *J Biomed Sci.* 53 : 122-133.
- Alexander, M. 1977. **Introduction to soil microbiology.** 2<sup>nd</sup> ed. New York : John Wiley and sons, Inc.

- Altschul, S.F. Madden, T.L. Schäffer, A.A. Zhang, J. Zhang, Z. Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25 : 3389-402.
- Ara, I. and Kudo, T. 2007. "*Sphaerosporangium* gen. nov., a new member of the family *Streptosporangiaceae*, with descriptions of three new species as *Sphaerosporangium melleum* sp. nov., *Sphaerosporangium rubeum* sp. nov. and *Sphaerosporangium cinnabarinum* sp. nov., and transfer of *Streptosporangium viridialbum* Nonomura and Ohara 1960 to *Sphaerosporangium viridialbum* comb. nov." *Actinomycetologica.* 21 : 11-21.
- Arai, T. 1975. **Culture Media for Actinomycetes.** Tokyo : The Society for Actinomycetes.
- Asolkar, L.V. Kakkar, K.K. and Chakre, O.J. 1992. **Second Supplement to Glossary of Indian Medicinal Plants with Active Principles Part I (A-K).** New Delhi : Publications and Informations Directorate (CSIR).
- Baranasic, D. Gacesa, R. Starcevic, A. Zucko, J. Blažič, M. Horvat, M. Gjuračić, K. Fujs, S. Hranueli, D. Kosec, G. Cullum, J. and Petkovic, H. 2013. "Draft Genome Sequence of *Streptomyces rapamycinicus* Strain NRRL 5491, the Producer of the Immunosuppressant Rapamycin." *Genome Announc.* 1(4) : e00581-13.
- Bérdy, J. 2005. "Bioactive microbial metabolites." *J Antibiot.* 58 : 1-26.
- Bieber, B. Nuske, J. Ritzau, M. and Grafe, U. 1998. "Alnumycin, a new naphthoquinone antibiotic, produced by an endophytic *Streptomyces* sp." *J Antibiot.* 51 : 381-382.
- Bredholt, H.E. Fjarvik, G.J. and Zotchev, S.B. 2008. "Actinomycetes from sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and biological activity." *Mar Drugs.* 6 : 12-24.
- Brien, J.O. Wilson, I. Orton, T. and Pognan, F. 2000. "Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity." *Eur J Biochem.* 267 : 5421-5426.
- Bull, A.T. Stach, J.E.M. Ward, A.C. and Goodfellow, M. 2005. "Marine actinobacteria: Perspectives, challenges, future directions." *Antonie Van Leeuwenhoek.* 87 : 65-79.
- Caffrey, P. 2003. "Conserved amino acid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases." *Chembiochem.* 4 : 654-657.
- Callaham, D. Del Tredici, P. and Torrey, J. G. 1978. "Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*." *Science.* 199 : 899-902.

- Cao, L. Qiu, Z. Dai, X. Tan, H. Lin, Y. and Zhou, S. 2004. "Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*." *World J Microbiol Biotechnol.* 20 : 501-504.
- Cao, L. Qiu, Z. You, J. Tan, H. and Zhou, S. 2005. "Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots." *FEMS Microbiol Lett.* 247 : 147-152.
- 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 nigricans*." *Microbiology.* 148(9) : 2675-2685.
- Changsen, C. Franzblau, S.G. and Palittapongarnpim, P. 2003. "Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screening for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter." *Antimicrob Agents Chemother.* 47 : 3682-3687.
- Collins, M.D. Pirouz, T. Goodfellow, M. and Minnikin, D.E. 1977. "Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria." *J Gen Microbiol.* 100 : 221-230.
- Coombs, J.T. and Franco, C.M.M. 2003. "Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots." *Appl Environ Microbiol.* 69 : 5603-5608.
- Coyne, M.S. 1999. **Soil microbiology : An exploratory approach delmar.** An International Thomson Publishing. USA.
- Crawford, D.L. Lynch, J.M. Whipps, J.M. and Ousley, M.A. 1993. "Isolation and characterization of actinomycete antagonists of fungal root pathogen." *Appl Environ Microbiol.* 59 : 3899-3905.
- Cross, T. 1981. "Aquatic actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats." *J Appl Bacteriol.* 50 : 397-423.
- Dai, H.Q. Wang, J. Xin, Y.H. Pei, G. Tang, S.K. Ren, B. Ward, A. Ruan, J.S. Li, W.J. and Zhang, L.X. 2010. "*Verrucosipora sediminis* sp. nov., a cyclodipeptide-producing actinomycete from deep-sea sediment." *Int J Syst Evol Microbiol.* 60 : 1807-1812.
- Delin, W. and Larsen, K. 2000. "Zingiberaceae." *Flora of China.* 24 : 322-377.
- Desjardins, R.E. Canfield, C.J. Haynes, J.D. and Chulay, J.D. 1979. "Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique." *Antimicrob Agents Chemother.* 16 : 710-718.
- Dharmaraj, S. 2010. "Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances." *World J Microbiol Biotechnol.* 26 : 2123-2139.

- Donadio, S. Busti, E. Monciardini, P. Bamonte, R. Mazza, P. Sosio, M. and Cavaletti, L. 2005. Sources of polyketides and nonribosomal peptides. *In* Wohlleben, W. Spelling, T. and Müller-Tiemann, B. (eds). **Biocombinatorial approaches for drug finding**, pp. 19-41. Berlin : Ernst Schering Research Foundation, Springer.
- Droumev, D. 1983. "Review of antimicrobial growth promoting agents available." *Vet Res Commun.* 7 : 85-99.
- Duangmal, K. Mingma, R. Pathom-Aree, W. Inahashi, Y. Matsumoto, A. Thamchaipenet, A. and Takahashi, Y. 2011. "*Sphaerisorangium siamense* sp. nov., an actinomycete isolated from rubber-tree rhizospheric soil." *J Antibiot.* 64(4) : 293-296.
- 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.
- El-Enshasy, H.A. Mohamed, N.A. Farid, M.A. and El-Diwany, A.I. 2008. "Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization." *Bioresource Technol.* 99 : 4263-4268.
- Ezaki, T. Hashimoto, Y. and 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. 1985. "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap." *Evolution.* 39 : 783-791.
- Finlay, A.C. Hobby, G.L. P'an, S.Y. Regna, P.P. Routien, J.B. Seeley, D.B. Shull, G.M. Sobin, B.A. Solomons, I.A. Vinson, J.W. and Kane, J.H. 1950. "Terramycin, a new antibiotic." *Science.* 111 : 85.
- Goodfellow, M. and Haynes, J.A. 1984. Actinomycetes in marine sediments. *In* Ortiz-ortiz, L. Bojalil, L.F. and Yokoleff, V. **Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes.** Orlando : Academic press.
- Goodfellow, M. and Williams, S.T. 1983. "Ecology of actinomycetes." *Annu Rev Microbiol.* 37 : 189-216.
- 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.
- Gupta, S.K. Banerjee, A.B. and Achari, B. 1976. "Isolation of ethyl-p methoxycinnamate, the major antifungal principle of *Curcuma zedoaria*." *Lloydia.* 39 : 218.

- Hall, T. A. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT." *Nucleic Acids Symp Ser.* 41 : 95-98.
- Hallmann, J. Quadt-Hallmann, A. Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W. 1997. "Bacterial endophytes in agricultural crops." *Can J Microbiol.* 43 : 895-914.
- Harvey, B.M. Mironenko, T. Sun, Y. Hong, H. Deng, Z. Leadlay, P.F. Weissman, K.J. and Haydock, S.F. 2007. "Insights into Polyether Biosynthesis from Analysis of the Nigericin Biosynthetic Gene Cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137." *Chem Biol.* 14 : 703-714.
- Hasegawa, S. Meguro, A. Shimizu, M. Nishimura, T. and Kunoh, H. 2006. "Endophytic actinomycetes and their interaction with host plants." *Actinomycetologica.* 20 : 72-81.
- Hayakawa, K.I. and Nonomura, H. 1988. "Distribution of rare Actinomycetes in Japanese Soils." *J Ferment Technol.* 66 : 361-373.
- Hayakawa, M. 2008. "Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil." *Actinomycetologica.* 22 : 12-19.
- He, M. Haltli, B. Summers, M. Feng, X. and Hucul, J. 2006. "Isolation and characterization of meridamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. NRRL 30748." *Gene.* 377 : 109-118.
- He, W. Wu, L. Gao, Q. Du, Y. and Wang, Y. 2006. "Identification of AHBA biosynthetic genes related to geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997." *Curr Microbiol.* 52 : 197-203.
- Hertweck, C. 2009. "The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity." *Angew Chem Int Ed.* 48 : 4688-4716.
- Hill, A.M. and Staunton, J. 2010. Type I modular PKS. 385-452. In Mander, L. and Liu, H.W. **Comprehensive natural products II: chemistry and biology, vol 1.** Oxford : Elsevier.
- Hopwood, D.A. Bibb, M.J. Chater, K.F. Kieser, T. Bruton, C.J. Kieser, H.M. Lydiate, D.J. Smith, C.P. Ward, J.M. and Schrempf, H. 1985. Preparation of Chromosomal, Plasmid and Phage DNA. pp. 70-74. In Hopwood, D.A. Bibb, M.J. Chater, K.F. Kieser, T. Bruton, C.J. Kieser, H.M. Lydiate, D.J. Smith, C.P. Ward, J.M. and Schrempf, H. **Genetic Manipulation of *Streptomyces* A Laboratory manual.** UK : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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.
- Horsman, G.P. Van Lanen, S.G. and Shen, B. 2009. "Iterative type I polyketide synthases for enediyne core biosynthesis." *Methods Enzymol.* 459 : 97-112.

- Hranueli, D. Perić, N. Borovića, B. Bogdan, S. Cullum, J. Waterman, P.G. and Hunter, I.S. 2001. "Molecular Biology of Polyketide Biosynthesis." *Food technol biotechnol.* 39(3) : 203-213.
- Igarashi, Y. Ogawa, M. Sato, Y. Saito, N. Yoshida, R. Kunoh, H. Onaka, H. and Furumai, T. 2000. "Fistupyrone, a novel inhibitor of the infection of Chinese cabbage by *Alternaria brassicicola*, from *Streptomyces* sp. TP-A0569." *J Antibiot.* 53(10) : 1117-1122.
- Igarashi, Y. Trujillo, M.E. Martinez-Molina, E. Miyanaga, S. Obata, T. Sakurai, H. Saiki, I. Fujita, T. and Furumai, T. 2007. "Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov." *Bioorg Med Chem Lett.* 17 : 3702-3705.
- Itoh, T. Kudo, T. Parenti, F. and Seino, A. 1989. "Amended description of the genus *Kineosporia*, based on chemotaxonomic and morphological studies. *Int J Syst Bacteriol.* 39 : 168-173.
- Jin Chul, S. Na, Z. Lee, D. Kim, W. Lee, K. Shen, Y. and Paik, S. 2008. "Characterization of Tailoring Genes Involved in the Modification of Geldanamycin Polyketide in *Streptomyces hygrosopicus* JCM4427." *J Microbiol Biotechnol.* 18(6) : 1101-1108.
- Jirovetz, L. Buchbauer, G. Shafi, M.P. Leela, N.K. 2003. "Analysis of the essential oils of the leaves, stems, rhizomes and roots of the medicinal plant *Alpinia galanga* from Southern India." *Acta Pharm.* 53 : 73-81.
- Kaur, H. Gangwar, M. and Kalia, A. 2015. "Diversity of actinomycetes from fodder leguminous plants and their biocontrol potential." *Int J Adv Res.* 3(8) : 1141-1151.
- Kelly, K.L. 1964. **Inter-Society Color Council-National Bureau of Standard Color Name Charts Illustrated with Centroid Colors.** Washington, DC : 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. and 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.
- Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. "Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics." *Methods Microbiol.* 19 : 161-207.
- Kumar, S. Stecher, G. and Tamura, K. 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." *Mol Biol Evol.* 33 : 1870-1874.
- Larsen, K. and Larsen, S.S. 2006. **Gingers of Thailand.** ChiangMai : Queen Sirikit Botanic Garden.

- Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A. 1970. "Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes." *Int J Syst Evol Microbiol.* 20 : 435-443.
- Lechevalier, M.P. DeBievre, C. and Lechevalier, H.A. 1977. "Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition." *Biochem Syst Ecol.* 5 : 249-260.
- Li, J. Zhao, G.Z. Huang, H.Y. Zhu, W.Y. Lee, J.C. Kim, C.J. Xu, L.H. Zhang, L.X. Li, W.J. 2010. "*Pseudonocardia rhizophila* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a rhizosphere soil." *Antonie Van Leeuwenhoek.* 98(1) : 77-83.
- Liao, Z.L. Tang, S.K. Guo, L. Zhang, Y.Q. Tian, X.P. Jiang, C.L. Xu, L.H. and Li, W.J. 2009. "*Verrucosispora lutea* sp. nov., isolated from a mangrove sediment sample." *Int J Syst Evol Microbiol.* 59 : 2269-2273.
- Lorain, V. 1980. **Antibiotics in laboratory medicine.** Baltimore : The Williams & Wilkins Co.
- Makkar, N.S. and Cross, T. 1982. "Actinoplanetes in soil and on plant litter from freshwater habitats." *J Appl Microbiol.* 52(2) : 209-218.
- Margalith, P. and Beretta, G. 1960. "Rifamycin. XI. Taxonomic study on *Streptomyces mediterranei* nov. sp." *Mycopathol Mycol Appl.* 8 : 321-30.
- Minnikin, D.E. O'Donnell, A.G. Goodfellow, M. Alderson, G. Athalye, M. Schaal, A. and Parlett, J.H. 1984. "An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids." *J Microbiol Methods.* 2 : 233-241.
- Minnikin, D.E. Alshamaony, L. and 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.
- Miyadoh, S. 1997. **Atlas of Actinomycetes.** The Society for Actinomycetes Japan. Asakura Publishing.
- Negi, P.S. Jayaprakasha, G.K. Jagan, L. Mohan, R. and Sakariah, K.K. 1999. "Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin." *J Agric Food Chem.* 47 : 4297-4300.
- Nguefack, J. Leth, V. Amvam Zollo, P.H. Mathur, S.B. 2004. "Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi." *Int J Food Microbiol.* 94 : 329-334.

- Niemhom, N. Chutrakul, C. Suriyachadkun, C. and Thawai, C. 2016a. “*Asanoa endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the rhizome of *Boesenbergia rotunda*.” *Int J Syst Evol Microbiol.* 66 : 1377-1382.
- Niemhom, N. Chutrakul, C. Suriyachadkun, C. and Thawai, C. 2016b. “*Phytohabitans kaempferiae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the leaf of *Kaempferia larsenii*.” *Int J Syst Evol Microbiol.* 66 : 2917-2922.
- Niemhom, N. Chutrakul, C. Suriyachadkun, C. and Thawai, C. 2017. “*Nonomuraea stahlianthi* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Stahlianthus campanulatus*.” *Int J Syst Evol Microbiol.* 67 : 2879-2884.
- Norajit, K. Laohakunjit, N. and Kerdchoechuen, O. 2007. “Antibacterial Effect of Five *Zingiberaceae* Essential Oils.” *Molecules.* 12 : 2047-2060.
- Oshima, K. Hattori, M. Shimizu, H. Fukuda, K. Nemoto, M. Inagaki, K. and Tamura, T. 2015. “Draft Genome Sequence of *Streptomyces incarnatus* NRRL8089, which Produces the Nucleoside Antibiotic Sinefungin.” *Genome Announc.* 3(4) : e00715-15.
- Parrot, D. Peresse, T. Hitti, E. Carrie, D. Grube, M. and Tomasi, S. 2015. “Qualitative and spatial metabolite profiling of lichens by a LC-MS approach combined with optimised extraction.” *Phytochem Anal.* 26 : 23-33.
- Passari, A.K. Mishra, V.K. Saikia, R. Gupta, V.K. and Singh, B.P. 2015. “Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their *in vitro* antimicrobial biosynthetic potential.” *Front Microbiol.* 6 : 273-285.
- Petrolini, B. Quaroni, S. Saracchi, M. and Sardi, P. 1996. “Studies on the streptomycete population inhabiting plant roots.” *Actinomycetes.* 7 : 66-78.
- Rascher, A. Hu, Z. Buchanan, G.O. Reid, R. and Hutchinson, C.R. 2005. “Insights into the Biosynthesis of the Benzoquinone Ansamycins Geldanamycin and Herbimycin, Obtained by Gene Sequencing and Disruption.” *Appl Environ Microbiol.* 71(8) : 4862-4871.
- Ridley, C.P. and Khosla, C. 2009. “Polyketides.” 472-481. In Schaechter, M. **Encyclopedia of Microbiology.** London : Academic Press.
- Rohr, J. and Hertweck, C. 2010. Type II PKS, pp. 227-303. In Mander, L. and Liu, H.W. (eds). *Comprehensive natural products II: Chemistry and biology, vol I.* Oxford : Elsevier.
- Saini, P. Gangwar, M. Kalia, A. Singh, N. and Narang, D. 2016. “Isolation of endophytic actinomycetes from *Syzygium cumini* and their antimicrobial activity against human pathogens.” *Journal of Applied and Natural Science.* 8(1) : 416-422.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. “The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.” *Mol Biol Evol.* 4 : 406-425.

- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3<sup>rd</sup> ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sardi, P. Saracchi, M. Quaroni, S. Petrolini, B. Borgonovi, E. and Merli, S. 1992. "Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots." *Appl Environ Microbiol.* 58 : 2691-2693.
- Sasser, M. 1990. **Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids (MIDI Technical Note 101)**. Newark, DE : MIDI.
- Scartezzini, P. and Speroni, E. 2000. "Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity." *J Ethnopharmacol.* 71 : 23-43.
- Sekiwa, Y. Kubota, K. and Kobayashi, A. 2000. "Isolation of novel glucosides related to gingerdiol from ginger and their antioxidative activities." *J Agric Food Chem.* 48 : 373-377
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D. 1966. "Methods for characterization of *Streptomyces* species." *Int J Syst Bacteriol.* 16 : 313-340.
- Simpson, T.J. 1995. "Polyketide biosynthesis." *Chem Ind.* 11 : 407-411.
- Sneider, W. 2005. **Drug discovery : A history**. John Wiley & Sons. UK.
- Srimal, R.C. Sharma, S.C. and Tandon, J.S. 1984. "Antiinflammatory and other pharmacological effects of *Hedychium spicatum*." *Indian J Pharmacol.* 16 : 143.
- Staunton, J. and Weissman, K. J. 2001. "Polyketide biosynthesis: a millennium review." *Nat Prod Rep.* 18 : 380-416.
- Sun, Y. Hong, H. Sambosky, M. Mironenko, T. Leadlay, P.F. and Haydock, S.F. 2006. "Organization of the biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM 4137 for the novel neuroprotectant polyketide meridamycin." *Microbiology.* 152 : 3507-3515.
- Suriyachadkun, C. Chunhametha, S. Thawai, C. Tamura, T. Potacharoen, W. Kirtikara, K. and Sanglier, J.J. 2009. "*Plansotetraspora thailasndica* sp. nov., isolated from soil in Thailand." *Int J Syst Evol Microbiol.* 59 : 992-997.
- Taechowisan, T. Peberdy, J.F. and Lumyong, S. 2003. "Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity." *World J Microbiol Biotechnol.* 19 : 381-385.
- Takahashi, Y. Matsumoto, A. Seino, A. Ueno, J. Iwai, Y. and Omura, S. 2002. "*Streptomyces avermectinius* sp. Nov., an avermectin-producing strains." *Int J Syst Evol MiCrobiol.* 52 : 2163-2168.
- Tamaoka, J. and Komagata, K. 1984. "Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography." *FEMS Microbiol Lett.* 25 : 25-128.

- Tamaoka, J. 1994. "Determination of DNA Base Composition." 463-470. In Goodfellow, M. and O'Donnell A.G. (eds.), **Chemical Methods in Prokaryotic Systematics**. Chichester : John Wiley and Sons.
- Tamura, T. and Sakane, T. 2005. "*Asanoa iriomotensis* sp. nov., isolated from mangrove soil." *Int J Syst Evol Microbiol.* 55 : 725-727.
- Thompson, J.D. Higgins, D.G. and Gibson, 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.
- Tian, X.L. Cao, L.X. Tan, H.M. Zeng, Q.G. Jia, Y.Y., Han, W.Q. and Zhou, S.N. 2004. "Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*." *World J Microbiol Biotechnol.* 20 : 303-309.
- Trager, W. and Jensen, J.B. 1976. "Human malaria parasites in continuous culture." *Science.* 193 : 673-675.
- Trcek, J. and Teuber, M. 2002. "Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria." *FEMS Microbiol Lett.* 19 : 69-75.
- Van Lanen, S.G. and Shen, B. 2008. "Biosynthesis of enediyne antitumor antibiotics." *Curr Top Med Chem.* 8 : 448-459.
- Vega, V.L. and Maio, A.D. 2003. "Geldanamycin Treatment Ameliorates the Response to LPS in Murine Macrophages by Decreasing CD14 Surface Expression." *Molecular Biology of the Cell.* 14 : 764-773.
- Velayudhan, K.C., Muralidharan, V.K., Amalraj, V.A., Rana, R.S., Singh, B. and Thomas, T.A. 1994. **Genetic resources of *Curcuma***. NBPGR : Thrissur.
- Verceisi, A. and Nasini, G. 1992. "Biological and chemical characterization of the antibiotic activity of *Streptomyces* species isolated from grapevine carposphere." *Actinomycetes.* 3 : 12-18.
- Verlander, C.P. 1992. "Detection of horseradish peroxidase by colorimetry." 185-201. In Kricka, L.J. **Nonisotopic DNA Probe Techniques**. New York : Academic Press.
- Vezina, C. Kudelski, A. and Sehgal, S.N. 1975. "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle." *J Antibiot.* 28 : 721-726.
- Waksman, S.A. 1959. **The Actinomycetes: Isolation, identification, cultivation and preservation**. Baltimore : Williams and Wilkins Company.
- Walsh, T.J. and Giri, N. 1997. "Pradimicins: a novel class of broad-spectrum antifungal compounds." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 16 : 93-97.

- Wayne, L.G. Brenner, D.J. Colwell, R.R. Grimont, P.A.D. Kandler, O. Krichevsky, M.I. Moore, L.H. Moore, W.E.C. Murray, R.G.E. Stackebrandt, E. Starr, M.P. and Trüper, H.G. 1987. "Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics." *Int J Syst Bacteriol.* 37 : 463-464.
- Weiss, R.B. 1992. "The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin." *Semin Oncol.* 19 : 670-686.
- Williams, S.T. Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1989. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Volume 4. Baltimore : Lippincott Williams and Wilkins Co.
- 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.* 1-19.
- Xu, W. Zhai, G. Liu, Y. Li, Y. Shi, Y. Hong, K. Hong, H. Leadlay, P.F. Deng, Z. and Sun, Y. 2017. "An Iterative Module in the Azalomycin F Polyketide Synthase Contains a Switchable Enoylreductase Domain Angew." *Chem Int Ed.* 56 : 5503-5506.
- Yang, H. Zhang, Z. Yan, R. Wang, Y. and Zhua, D. 2014. "Draft Genome Sequence of *Streptomyces* sp. Strain PRh5, a Novel Endophytic Actinomycete Isolated from Dongxiang Wild Rice Root." *Genome Announc.* 2(2) : e00012-14.
- Zhao, G.Z. Li, J. Huang, H.Y. Zhu, W.Y. Xu, L.H. and Li, W.J. 2011. "*Nonomuraea rhizophila* sp. nov., an actinomycete isolated from rhizosphere soil." *Int J Syst Evol Microbiol.* 61(9) : 2141-2145.
- Zhao, K. Penttinen, P. Guan, T. Xiao, J. Chen, Q. Xu, J. Lindstrom, K.M. 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.
- Zheng, G.Q. Kenney, P.M. and Lam, L.K.T. 1993. "Potential anti-carcinogenic natural products from lemongrass oil and galanga root oil." *J Agric Food Chem.* 41(2) : 153-156.
- Zhi, X.Y. Li, W.J. and Stackebrandt, E. 2009. "An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa." *Int J Syst Evol Microbiol.* 59 : 589-608.

The seal of Rajabhat Buriram University is a circular emblem. It features a central five-tiered stupa with a sunburst above it. The stupa is flanked by two smaller three-tiered stupas. The entire emblem is surrounded by a decorative border with Thai script. The text at the top of the seal reads 'มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์' (Mahavithayalai Rajabhat Buriram) and the text at the bottom reads 'พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง' (Phra Chomklao Chao Khan Thara Ladkrabang).

# ภาคผนวก ก

## ผลผลิตงานวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# *Nonomuraea stahlianthi* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Stahlianthus campanulatus*

Nantawan Niemhom,<sup>1</sup> Chanikul Chutrakul,<sup>2</sup> Chanwit Suriyachadkun<sup>3</sup> and Chitti Thawai<sup>1,4,\*</sup>

## Abstract

A novel endophytic actinomycete, designated strain SC1-1<sup>T</sup>, was isolated from sterilized stem tissue from *Stahlianthus campanulatus* collected in Udon Thani province, Thailand. The isolate formed short chains of spores on aerial mycelium and presented *meso*-diaminopimelic acid in the cell wall peptidoglycan. Glucose, madurose, mannose, rhamnose and ribose were observed as sugars in the cells. The cell membrane phospholipids were phosphatidylethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine, hydroxy-phosphatidylethanolamine, diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylinositol mannoside and ninhydrin-positive phosphoglycolipids. The major menaquinones were MK-9(H<sub>4</sub>) and MK-9(H<sub>2</sub>). The main cellular fatty acids were iso-C<sub>16:0</sub>, 10-methyl C<sub>17:0</sub> and C<sub>17:1ω6c</sub>. A high G+C content (70.7 mol%) was present in the genomic DNA. The taxonomic position based on the 16S rRNA gene sequence analysis revealed that strain SC1-1<sup>T</sup> belonged to the genus *Nonomuraea* and shared the highest 16S rRNA gene sequence similarity value with *Nonomuraea dietziae* DSM 44320<sup>T</sup> (98.82%), followed by *Nonomuraea africana* IFO 14745<sup>T</sup> (98.58%), *Nonomuraea jabiensis* A4036<sup>T</sup> (98.43%), *Nonomuraea endophytica* YIM 65601<sup>T</sup> (98.36%), *Nonomuraea purpurea* 1SM4-01<sup>T</sup> (98.34%), *Nonomuraea angiospora* IFO 13155<sup>T</sup> (98.29%), *Nonomuraea roseola* IFO 14685<sup>T</sup> (98.23%) and *Nonomuraea relictatena* IFO 14525<sup>T</sup> (98.23%). On the basis of the DNA–DNA hybridization relatedness and including the physiological and biochemical characteristics, strain SC1-1<sup>T</sup> should be judged as a novel species of the genus *Nonomuraea*, for which the name *Nonomuraea stahlianthi* sp. nov. is proposed. The type strain is strain SC1-1<sup>T</sup> (=BCC 66361<sup>T</sup>=NBRC 110006<sup>T</sup>).

Genus *Nonomuraea* was first described by Zhang *et al.* [1] and belongs to the family *Streptosporangiaceae*. The type species is *Nonomuraea pusilla* corrig. [2]. This genus generally forms extensively branched substrate and aerial mycelia. Hooked, spiral or straight chains of spores are observed directly on the aerial mycelium. The typical chemotaxonomic properties of this genus are: *meso*-diaminopimelic acid in peptidoglycan; madurose as the diagnostic sugar in cell hydrolysates; diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, hydroxylated phosphatidylethanolamine, ninhydrin-positive phospholipid and sugar-containing phospholipid as the major phospholipids in cell membrane; MK-9 (H<sub>4</sub>), MK-9 (H<sub>2</sub>) and MK-9 (H<sub>0</sub>) as the predominant menaquinones, and 10-methyl C<sub>17:0</sub> and iso-C<sub>16:0</sub> as the main fatty acids in cells. Members of this genus have

been found in a variety of samples, i.e. soil [3], marine environments [4], cave soil [5], mangrove rhizosphere [6] and plant tissue [7]. In the List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature ([www.bacterio.net/nonomuraea.html](http://www.bacterio.net/nonomuraea.html)), this genus currently contains 42 species and two subspecies. A new species, *Nonomuraea rhodomycinica*, was reported recently [8]. In the course of screening for endophytic actinomycetes from medicinal plants in Thailand, we isolated strain SC1-1<sup>T</sup>, which was genotypically and phenotypically distinguishable from all type strains of the genus *Nonomuraea*. Thus, we describe the strain SC1-1<sup>T</sup> as a novel species of this genus.

Strain SC1-1<sup>T</sup> was isolated from a stem of *Stahlianthus campanulatus* collected in Udon Thani province, Thailand. The rough surface stem sample of this plant was washed in tap

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand; <sup>2</sup>Bioassay Laboratory, Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Thailand Science Park, Phahonyothin Road, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand; <sup>3</sup>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, Phahonyothin Road, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand; <sup>4</sup>Actinobacterial Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.  
**\*Correspondence:** Chitti Thawai, [Chitti.th@kmitl.ac.th](mailto:Chitti.th@kmitl.ac.th)

**Keywords:** *Nonomuraea*; endophytic actinomycetes; *Stahlianthus campanulatus*.

**Abbreviations:** HPLC, high performance liquid chromatography; HV, humic acid-vitamin; ISP, International Streptomyces Project; MK, menaquinone; ML, maximum-likelihood; MP, maximum-parsimony; NJ, neighbour-joining; NNI, nearest-neighbour interchange; r.p.m., round per minute; SPR, sub-tree pruning regrafting; TLC, thin-layer chromatography.

The DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain SC1-1<sup>T</sup> is LC032126.

Five supplementary figures and two supplementary tables are available with the online Supplementary Material.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

water and then cut into small pieces (0.5–1 cm<sup>2</sup> each). After cutting, the samples were washed in sterile 0.1 % Tween 20 for 30 s and then washed twice in sterile distilled water. The plant samples were surface-sterilized with 95 % ethanol for 10 min and subsequently with 1 % sodium hypochlorite for 10 min, and then washed five times in sterile distilled water. Finally, the surface-sterilized samples were ground with a small amount of sterile distilled water by using a sterile mortar and pestle. The suspension was plated on humic acid–vitamin (HV) agar [9] supplemented with 25 mg l<sup>-1</sup> nalidixic acid, 50 mg l<sup>-1</sup> nystatin and 1 mg l<sup>-1</sup> terbinafine and incubated at 30 °C for 30 days. The final washing water was spread on HV agar as the control plates. The colonies of actinomycetes were removed from the isolation plate and purified on yeast extract–malt extract agar [International *Streptomyces* Project (ISP), ISP2 medium] [10]. The pure culture was preserved by freezing at –80 °C and freeze-drying.

In order to determine the morphological characteristics, strain SC1-1<sup>T</sup> was cultivated on modified soil extract agar [11] at 30 °C for 30 days. The colonies of the strain were first observed by light microscopy and then by scanning electron microscopy (model JSM-5410 LV; JEOL). The samples for scanning electron microscopy were prepared according to the method of Thawai *et al.* [12].

Standard methods were used for observing the phenotypic characteristics. ISP media, i.e. yeast extract–malt extract agar (ISP2), oatmeal agar (ISP3), inorganic salt–starch agar (ISP4), glycerol–asparagine agar (ISP5), peptone–yeast extract iron agar (ISP6), tyrosine agar (ISP7) including glucose–asparagine agar (ISP5 with 1 % glucose replacing glycerol), Czapek's sucrose agar [13] and nutrient agar (Difco), were used to investigate the cultural characteristics. The colours of the substrate mycelia, aerial mycelia and spores were judged by using ISCC–NBS Colour Charts, Standard Sample No. 2106 [14]. Reduction of nitrate to nitrite and decomposition of casein, gelatin and starch were determined by using the methods described by Arai [15] and Williams and Cross [16]. Utilization of carbon sources was performed on ISP9 supplemented with 1 % carbon sources at 30 °C for 14 days. The temperature tolerances (15, 20, 25, 30, 37, 40, 45 and 50 °C) were determined on ISP2 agar over 14 days. Tolerance of NaCl (0–5 %, interval of 1 unit) and pH range (3–11, interval of 1 pH unit) for growth were determined on ISP2 at 30 °C for 14 days. The results are shown in the species description and Table 1.

Chemotaxonomic analyses were conducted by using freeze-dried cells obtained from culture grown in ISP2 broth on a rotary shaker (200 r.p.m.) at 30 °C for 5 days. The isomer of diaminopimelic acid in the cell wall was determined by using the method of Hasegawa *et al.* [17]. The acyl type of muramic acid in the peptidoglycan was examined by using the method of Uchida and Aida [18]. The composition of cellular sugars was investigated by using the method of Komagata and Suzuki [19]. The phospholipids in the cell membrane were extracted and analysed by two-dimensional

thin-layer chromatography (TLC) according to the methods proposed by Minnikin *et al.* [20]. Fatty acid methyl ester analysis was performed by gas–liquid chromatography (GLC) according to the instructions of the Sherlock Microbial Identification System (MIDI) version 6.2B [21, 22] with the TSBA6 MIDI database. Mycolic acids were tested using the silica gel TLC method recommended by Minnikin *et al.* [23]. Menaquinones were extracted from freeze-dried cells by following the procedure of Collins *et al.* [24] and were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) using a Cosmosil 5C<sub>18</sub> column (4.6×150 mm; Nacalai Tesque). Mixtures of methanol and 2-propanol (2 : 1, v/v) were used as the elution solvent.

Genomic DNA was extracted using the method of Tamaoka [25]. The method of 16S rRNA gene amplification and its sequencing were performed according to Thawai [26]. The G+C content of the DNA was determined using the HPLC method of Tamaoka and Komagata [27]. Lambda DNA (Invitrogen, USA) was used as the standard. The DNA hybridization was performed in microdilution-well plates according to the method of Ezaki *et al.* [28].

The 16S rRNA gene sequence similarity value of strain SC1-1<sup>T</sup> (1485 bp) was reported with sequences of the type strains in the EzTaxon-e server (<http://eztaxon.ezbiocloud.net/>) from Kim *et al.* [29]. The multiple alignment of the sequence data was analysed using CLUSTAL W within BioEdit version 7.1.3.0 [30]. The phylogenetic tree was constructed by using the neighbour-joining (NJ) method [31] with distances computed by using Kimura's two-parameter model [32], the maximum-parsimony (MP) method with subtree pruning regrafting (SPR) and bootstrap statistical testing (1000 replicates) [33], the maximum-likelihood (ML) method [34] with nearest-neighbour interchange (NNI) and distances computed by using Kimura's two-parameter model in MEGA 6 software [35]. For the NJ and ML analyses, the complete deletion option was chosen before constructing the topology of the tree. Bootstrap analyses were used to evaluate the tree topology by means of 1000 resamplings [36].

Strain SC1-1<sup>T</sup> grew well on ISP2, ISP3 and ISP6, moderately on nutrient agar, and weakly on ISP4, ISP5, ISP7, Czapek's sucrose agar and glucose–asparagine agar. The colour of substrate hyphae on these media was light yellowish brown to purplish black. White aerial hyphae were observed on ISP2, ISP4, ISP5, ISP7, Czapek's sucrose agar and nutrient agar but a pale purplish blue aerial mycelium and a purplish grey soluble pigment were detected on ISP3 medium. Generally, strain SC1-1<sup>T</sup> produced short straight chains of spores (3–4 spores per chain) directly on aerial mycelia. An irregular spore surface was observed (see Fig. S5).

The chemotaxonomic properties of strain SC1-1<sup>T</sup> were the same as those of members of the genus *Nonomuraea*. The isomer of diaminopimelic acid in the peptidoglycan was *meso*-form. The acyl type of the cell wall peptidoglycan was acetyl. Whole-cell hydrolysates contained glucose, madurose, mannose, rhamnose and ribose. The major

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งาน ไม่นอนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

Downloaded from [www.microbiologyresearch.org](http://www.microbiologyresearch.org) by

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาหรือข้อมูลอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Table 1.** Differential characteristics of strain SC1-1<sup>T</sup> and its closest phylogenetic neighbours in the genus *Nonomuraea*

All phenotypic data were determined in this study. +, Positive; –, negative; w, weakly reactive.

Characteristics	Strain SC1-1 <sup>T</sup>	<i>N. dietziae</i> NBRC 14309 <sup>T</sup>	<i>N. africana</i> NBRC 14745 <sup>T</sup>	<i>N. roseola</i> NBRC 14685 <sup>T</sup>	<i>N. recticatena</i> NBRC 14525 <sup>T</sup>
Colour of substrate mycelium on ISP2 medium	Purplish black	Orange	Deep orange	Orange	Pale orange
pH range for growth	5–10	5–10	6–10	6–10	6–10
Nitrate reduction	+	–	–	–	–
Carbon utilization:					
D-Fructose	+	+	+	–	–
D-Galactose	+	w	w	+	w
D-Mannitol	+	–	–	–	–
Melibiose	+	w	+	+	w
Raffinose	w	–	+	–	–
D-Ribose	+	–	–	w	–
Glycerol	+	+	–	+	+
Sucrose	w	–	+	+	–

menaquinones were MK-9(H<sub>4</sub>) (72.67%), MK-9(H<sub>2</sub>) (21.35%) and a small amount of MK-9(H<sub>6</sub>) (5.98%) was observed. Iso-C<sub>16:0</sub>, 10-methyl C<sub>17:0</sub> and C<sub>17:1ω6c</sub> fatty acids were detected as the major cellular fatty acids (see Table S1, available in the online Supplementary Material). Mycolic acids were absent. The diagnostic polar lipids in the cell membrane were phosphatidylethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine, hydroxylated phosphatidylethanolamine, diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylinositol mannoside, ninhydrin-positive phosphoglycolipids, ninhydrin-positive phospholipid, an unidentified phosphoglycolipid, four unidentified phospholipids, two unidentified glycolipids and four unidentified lipids (see Fig. S1). The G+C content (mol%) of the genomic DNA was 70.7%.

Analysis of the nearly complete 16S rRNA gene sequence of strain SC1-1<sup>T</sup> revealed that the strain was a member of the genus *Nonomuraea* and shared the highest 16S rRNA gene sequence similarity value with *Nonomuraea dietziae* DSM 44320<sup>T</sup> (98.82%) followed by *Nonomuraea africana* IFO 14745<sup>T</sup> (98.58%), *Nonomuraea jabiensis* A4036<sup>T</sup> (98.43%), *Nonomuraea endophytica* YIM 65601<sup>T</sup> (98.36%), *Nonomuraea angiospora* IFO 13155<sup>T</sup> (98.29%), *Nonomuraea roseola* IFO 14685<sup>T</sup> (98.23%) and *Nonomuraea recticatena* IFO 14525<sup>T</sup> (98.23%). The taxonomic position appearing in the phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that this strain was placed in a distinct clade with *N. dietziae*, *N. africana*, *N. roseola* and *N. recticatena* with a high bootstrap value of 93% in the NJ tree (Fig. 1). This position was confirmed by the results obtained from all three tree-making algorithms (NJ, ML and MP) (see Figs S2 and S3). Thus, all four phylogenetic relatives were selected for DNA–DNA hybridization experiment and phenotypic comparison.

The differential characteristics (Table 1) of the phylogenetically related species, *N. dietziae* DSM 44320<sup>T</sup>, *N. africana*

14745<sup>T</sup>, *N. roseola* IFO 14685<sup>T</sup> and *N. recticatena* IFO 14525<sup>T</sup>, were the colour of substrate mycelium (see Fig. S4), the utilization of D-fructose, D-galactose, D-mannitol, melibiose, raffinose, D-ribose, glycerol and sucrose, and the ability to reduce nitrate to nitrite. Additionally, the DNA relatedness values between strain SC1-1<sup>T</sup> and the closely related species were 18.8±0.9% to 29.04±0.4%, which are lower than 70% of the recommended threshold value for the delineation of genomic species [37] (see Table S2).

Based on the phenotypic and genotypic data, it is concluded that strain SC1-1<sup>T</sup> can be distinguished from all recognized *Nonomuraea* species. Therefore, this strain should be judged as a new species of the genus *Nonomuraea*, for which the name *Nonomuraea stahlianthi* is proposed. The type strain is strain SC1-1<sup>T</sup> (=BCC 66361<sup>T</sup>=NBRC 110006<sup>T</sup>).

## DESCRIPTION OF *NONOMURAEA STAHLIANTHI* SP. NOV.

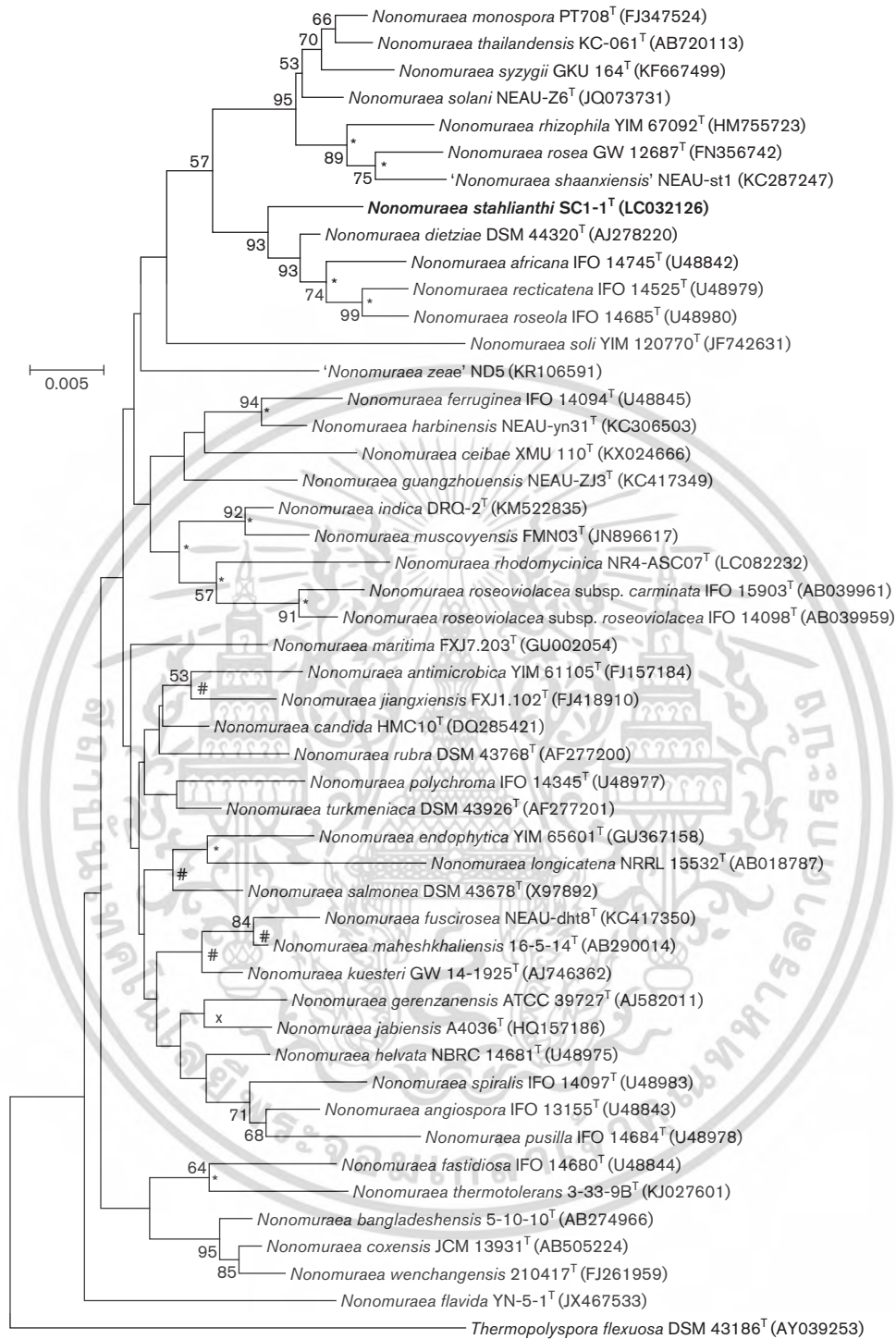
*Nonomuraea stahlianthi* (stah.li.an'thi. N.L. gen. n. *stahlianthi* of *Stahlianthus*, referring to the isolation of the strain from *Stahlianthus campanulatus*).

Gram-stain-positive and mesophilic actinomycete. The colour of substrate hyphae is light yellowish brown to purplish black, depending on the culture media. Short chains of spores form on white aerial mycelium. The surface of spores is irregular. Purplish grey soluble pigment is produced on ISP3 medium. Utilizes cellobiose, D-fructose, D-glucose, D-galactose, D-mannitol, D-mannose, melibiose, D-ribose, D-xylose, L-rhamnose, glycerol and *myo*-inositol as sole carbon sources, weakly utilizes raffinose, D-salicin, L-arabinose, lactose and sucrose. Positive for peptonization of milk, hydrolysis of starch and nitrate reduction. Gelatin liquefaction is negative. Optimal temperature for growth is between 30–37 °C. No growth is observed at 45 °C. The maximum NaCl concentration for growth is 3% (w/v). The pH range for growth is 5–10. The cell wall peptidoglycan contains *meso*-diaminopimelic acid. The acyl type of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากศูนย์วิจัยจุลชีววิทยา

Downloaded from www.microbiologyresearch.org by

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาหรือข้อมูลอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**Fig. 1.** Neighbour-joining tree [31] based on almost-complete 16S rRNA gene sequences (1485 nt) showing the relationships between strain SC1-1<sup>T</sup> and all other members of the genus *Nonomurea*. *Thermopolyspora flexuosa* was used as an outgroup. Asterisks (\*) indicate the branches of the tree that were also found using the maximum-parsimony and maximum-likelihood methods; hashes (#) indicate the branches of the tree that were found by using maximum-likelihood methods; and crosses (x) indicate the branches of the tree that were found by using maximum-parsimony methods. The numbers on the branches indicate the percentage bootstrap values of 1000 replicates; only values  $\geq 50\%$  are indicated. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

the cell wall is acetyl. The predominant menaquinones are MK-9(H<sub>4</sub>) and MK-9(H<sub>2</sub>). The characteristic whole-cell sugars are glucose, madurose, mannose, rhamnose and ribose. The phospholipid profile contains diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine, hydroxy-phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylinositol mannoside, ninhydrin-positive phosphoglycolipids, ninhydrin-positive phospholipid, unidentified phosphoglycolipid, four unidentified phospholipids, two unidentified glycolipids and four unidentified lipids. Phosphatidylcholine is not detected. The major fatty acids are iso-C<sub>16:0</sub>, 10-methyl C<sub>17:0</sub> and C<sub>17:1ω6c</sub>. Mycolic acids are absent. The G+C content of the DNA is 70.7 mol%. The type strain is SC1-1<sup>T</sup> (=BCC 66361<sup>T</sup>=NBRC 110006<sup>T</sup>), which was isolated from the stem of *Stahlianthus campanulatus* collected in Udon Thani province, Thailand.

#### Funding information

This research was supported by the Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) to N. N., C. C., C. S. and C. T. (TG-22-22-55-004D). C. T. was also supported in part by the King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Research Fund (KReF) (KREF045905).

#### Acknowledgements

We thank Mrs Pornpit Sriboran for helping to collect the plant sample and also thank the Biological Resource Centre, National Institute of Technology and Evaluation, Kisarazu, Chiba, Japan, for cellular fatty acid analysis.

#### Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### References

- Zhang Z, Wang Y, Ruan J. Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:411–422.
- Nonomura H, Ohara Y. Distribution of actinomycetes in soil. XI. Some new species of the genus *Actinomadura*. *J Ferment Technol* 1971;49:904–912.
- Ozdemir-Kocak F, Isik K, Veyisoglu A, Tatar D, Sahin N. *Nonomuraea muscovyensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:2467–2472.
- Xi L, Zhang L, Ruan J, Huang Y. *Nonomuraea maritima* sp. nov., isolated from coastal sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61:2740–2744.
- Nakaew N, Sungthong R, Yokota A, Lumyong S. *Nonomuraea monospora* sp. nov., an actinomycete isolated from cave soil in Thailand, and emended description of the genus *Nonomuraea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;62:3007–3012.
- Ara I, Kudo T, Matsumoto A, Takahashi Y, Omura S et al. *Nonomuraea maheshkhaliensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from mangrove rhizosphere mud. *J Gen Appl Microbiol* 2007;53:159–166.
- Li J, Zhao GZ, Huang HY, Zhu WY, Lee JC et al. *Nonomuraea endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from *Artemisia annua* L. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61:757–761.
- Sripreechak P, Phongsopitanun W, Supong K, Pittayakhajonwut P, Kudo T et al. *Nonomuraea rhodomycinica* sp. nov., isolated from peat swamp forest soil in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017, in press.10.1099/ijsem.0.001843.
- Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* 1987;65:501–509.
- Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 1966;16:313–340.
- Suriyachadkun C, Chunhametha S, Thawai C, Tamura T, Potacharoen W et al. *Planotetraspora thailandica* sp. nov., isolated from soil in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:992–997.
- Thawai C, Tanasupawat S, Itoh T, Suwanborirux K, Suzuki K et al. *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:417–422.
- Waksman SA. *The Actinomycetes*, vol. 2, *Classification, Identification and Description of Genera and Species*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1961.
- Kelly KL. *Inter-Society Color Council – National Bureau of Standard Color Name Charts Illustrated with Centroid Colors*. Washington, DC: US Government Printing Office; 1964.
- Arai T. *Culture Media for Actinomycetes*. Tokyo: The Society for Actinomycetes Japan; 1975.
- Williams ST, Cross T. Actinomycetes. In: Booth C (editor). *Methods in Microbiology*, vol. 4. London: Academic Press; 1971. pp. 295–334.
- Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* 1983;29:319–322.
- Uchida K, Aida KO. An improved method for the glycolate test for simple identification of the acyl type of bacterial cell walls. *J Gen Appl Microbiol* 1984;30:131–134.
- Komagata K, Suzuki KI. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol* 1987;19:161–207.
- Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M et al. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* 1984;2:233–241.
- Sasser M. *Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids*, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: Microbial ID, Inc; 1990.
- Kämpfer P, Kroppenstedt RM. Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* 1996;42:989–1005.
- Minnikin DE, Alshamaony L, Goodfellow M. Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *J Gen Microbiol* 1975;88:200–204.
- Collins MD, Pirouz T, Goodfellow M, Minnikin DE. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* 1977;100:221–230.
- Tamaoka J. Determination of DNA base composition. In: Goodfellow M and O'Donnell AG (editors). *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons; 1994. pp. 463–470.
- Thawai C. *Micromonospora costi* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus speciosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:1456–1461.
- Tamaoka J, Komagata K. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* 1984;25:125–128.
- Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. 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* 1989;39:224–229.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;62:716–721.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95–98.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า

Downloaded from www.microbiologyresearch.org by

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาหรือ 2883 ข้ออ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

32. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–120.
33. Fitch WM. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* 1971;20:406–416.
34. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 1981;17:368–376.
35. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725–2729.
36. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
37. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O et al. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:463–464.



#### Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at [microbiologyresearch.org](http://microbiologyresearch.org).

## *Jishengella zingiberis* sp. nov., isolated from root tissue of *Zingiber montanum*

Chitti Thawai,<sup>1,2,\*</sup> Ya-Wen He<sup>3</sup> and Sarin Tadtong<sup>4</sup>

### Abstract

A novel actinomycete, strain PLAI 1-1<sup>T</sup>, which formed spiny single spore directly on substrate mycelium was isolated from root tissue of *Zingiber montanum*. The isolate contained *meso*-diaminopimelic acid and 3-hydroxydiaminopimelic acid in the cell-wall peptidoglycan. The acyl type of the cell-wall muramic acid was glycolyl. The whole-cell sugars of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> were glucose, arabinose, xylose, ribose and a trace amount of mannose. The membrane phospholipids were diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and phosphatidylinositol. The major menaquinone was MK-9 (H<sub>4</sub>). The main cellular fatty acids were iso-C<sub>15:0</sub> and C<sub>17:1ω8c</sub>. The G+C content of the genomic DNA was 70.6 mol%. 16S rRNA gene sequence analysis revealed that strain PLAI 1-1<sup>T</sup> was a member of the genus *Jishengella* and had the highest 16S rRNA gene sequence similarity to *Jishengella endophytica* DSM 45430<sup>T</sup> (99.2%). Based on the data of physiological and biochemical tests, including the result of DNA–DNA hybridization, strain PLAI 1-1<sup>T</sup> represents a novel species of the genus *Jishengella*, for which the name *Jishengella zingiberis* sp. nov. is proposed. The type strain is PLAI 1-1<sup>T</sup> (=TBRC 7644<sup>T</sup>=NBRC 113144<sup>T</sup>).

The genus *Jishengella* was proposed as a new member of the family *Micromonosporaceae* [1] in 2011. Until now, this genus comprised only one species, *Jishengella endophytica*. Originally, this species was isolated from the root of *Acanthus illicifolius*. The colour of colonies is vivid orange to dull orange. Single spores on substrate mycelium are detected. The chemotaxonomic properties, i.e. *meso*-diaminopimelic acid in cell wall; xylose, mannose, arabinose, ribose and glucose as the characteristic whole-cell sugar; MK-9(H<sub>4</sub>), MK-9 (H<sub>6</sub>), MK-9(H<sub>8</sub>) and MK-10(H<sub>4</sub>) as the major cell menaquinones; and phosphatidylethanolamine, diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol mannosides and phosphatidylserine as diagnostic membrane phospholipids; are the important characteristics of this genus [1]. In this study, we found a *Jishengella*-like strain from the root tissue of *Zingiber montanum*. Polyphasic approaches were used to characterise the strain as a novel species of the genus *Jishengella*.

Strain PLAI 1-1<sup>T</sup> was isolated from the root of *Zingiber montanum*, a well-known herbal plant of Thailand. The isolation procedure and the maintenance suggestions of Niemhom *et al.* [2] were used for this study. Briefly, the

sample was gently washed in tap water and cut into small pieces. After cutting, the samples were surface-sterilized with 95% ethanol for 10 min and subsequently with 1% sodium hypochlorite for 10 min, and immediately washed in sterile distilled water five times. Finally, the surface-sterilized samples were ground with 0.5 ml sterile distilled water. The suspension (0.1 ml) was spread on humic acid–vitamin (HV) agar [3] supplemented with 25 mg l<sup>-1</sup> nalidixic acid and 50 mg l<sup>-1</sup> nystatin. The final washing water was spread on HV agar as the control plates. The pure culture was preserved by freezing at –80 °C and freeze drying. For the morphological observation of spores, strain PLAI 1-1<sup>T</sup> was cultivated on International *Streptomyces* Project (ISP) 2 agar at 30 °C for 30 days and a scanning electron microscope (JSM-6610 LV, JEOL) was used for this experiment. The cultural characteristics of the strain were tested on several ISP media (ISP 2–7), glucose–asparagine agar (ISP 5 with 1% glucose replacing glycerol), Czapek's sucrose agar [4] and nutrient agar (Difco). To assign the colours of the substrate mycelia and soluble pigments, chips from the Inter-Society Color Council–National Bureau of Standards colour charts were used [5]. The physiological and biochemical properties, i.e. nitrate reduction, gelatin liquefaction, acid

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand; <sup>2</sup>Actinobacterial Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand; <sup>3</sup>State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, PR China; <sup>4</sup>Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Nakhon nayok 26120, Thailand.

\*Correspondence: Chitti Thawai, chitti.th@kmitl.ac.th

**Keywords:** *Jishengella*; actinomycetes; 16S rRNA gene; *Zingiber montanum*.

**Abbreviations:** HV, humic acid–vitamin; ISP, International *Streptomyces* Project; TLC, thin-layer chromatography.

The DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> is LC333555.

Two supplementary tables and three supplementary figures are available with the online version of this article.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

production, urease activity and decomposition of casein (1%, w/v), adenine (1%, w/v), CM-cellulose (1%, w/v), hypoxanthine (0.5%, w/v), starch (1%, w/v), tyrosine (0.1%, w/v) or xanthine (0.5%, w/v) were characterised using the standard methods of Arai [6], Williams and Cross [7] and Gordon *et al.* [8]. Nitrogen source (1% w/v) utilisation was carried out using a basal liquid medium containing 0.5 g D-glucose, 0.05 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05 g NaCl, 0.001 g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1 l distilled water (pH 7.2) and the inoculum was cultivated at 30 °C for 14 days. Growth at 10, 12, 15, 20, 25, 30, 37, 40 and 45 °C and in NaCl (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10% w/v) were performed on ISP 2 agar for 14 days. The pH range (pH 4.0–11.0 at increments of 1.0 pH unit) for growth was tested at 30 °C in ISP2 broth. For testing the catalase and oxidase activities, 3% (v/v) hydrogen peroxide and 1% N, N', N', N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride solution were used for these experiments, respectively.

All chemotaxonomic tests of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> were performed using cells grown in ISP 2 broth on a rotary shaker (200 r.p.m.) at 30 °C for 5 days. The isomer of diaminopimelic acid in the cell wall, acyl type of muramic acid and the whole-cell sugars were evaluated using the standard methods described by Hasegawa *et al.* [9], Uchida and Aida [10], and Komagata and Suzuki [11], respectively. The menaquinones in the cells were extracted using the method of Collins *et al.* [12] and were analysed using high-performance liquid chromatography [13]. Phospholipids were extracted and evaluated by the protocol suggested by Minnikin *et al.* [14]. Fatty acids were extracted and methylated according to the methods of Sasser [15] and Kämpfer and Kroppenstedt [16]. A gas chromatograph (6890; Hewlett Packard) with the Microbial Identification software package based on Sherlock Aerobic Bacterial Database (TSBA6) was used for analysing the fatty acids. The presence of mycolic acids was investigated by using the method of Minnikin *et al.* [17].

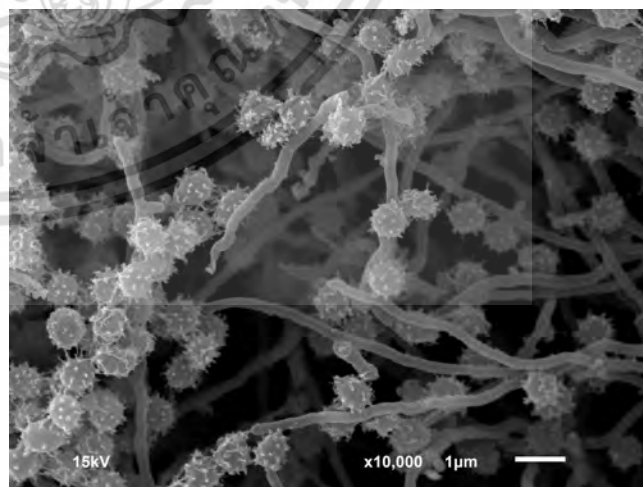
16S rRNA gene amplification was conducted using genomic DNA extracted by the method of Tamaoka [18]. The 16S rRNA gene amplification and sequencing were performed as described by Thawai [19]. G+C content of the genomic DNA was analysed by the method of Tamaoka and Komagata [20]. The DNA–DNA hybridization was carried out according to the procedure of Ezaki *et al.* [21].

The EzBioCloud ([www.ezbiocloud.net/](http://www.ezbiocloud.net/)) server [22] was used for calculation of the sequence similarity values and also used as the source of 16S rRNA gene sequence data for phylogenetic tree reconstruction. All 16S rRNA gene sequences of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> and the representative taxa of the member of the genera, i.e. *Jishengella*, *Verrucosipora*, *Micromonospora*, *Phytohabitans*, *Xiangella* and *Actinocatenispora* were aligned using CLUSTAL\_W multiple alignment mode within BioEdit version 7.1.3.0 [23]. The neighbour-joining [24], maximum-likelihood [25] and maximum-parsimony [26] algorithms in MEGA 6 programme [27] were selected for reconstruction of phylogenetic trees. To calculate the evolutionary distances, Kimura's two-parameter

model was used [28]. The complete deletion option was chosen before reconstructing the topology of the tree. Bootstrap value analysis based on 1000 replicates was used for evaluating the robustness of the topology of the phylogenetic tree [29].

Strain PLAI 1-1<sup>T</sup> exhibited good growth on ISP 2, ISP 3 and ISP 4, moderate growth on ISP 6, Czapek's sucrose agar and nutrient agar, poor growth on ISP 5, ISP 7 and glucose-asparagine agar. Pale orange to strong orange substrate mycelia was observed on these media. Aerial mycelia were not observed. Pale yellow soluble pigment was found on ISP 2 medium. Colonies became increasingly dark brownish with age on ISP 2 and ISP 3 media. Spores with spiny surfaces were borne singly on substrate mycelium (Fig. 1). The morphological characteristic of this strain is similar to those of the genus *Jishengella* [1]. The closest relative, *J. endophytica* DSM 45430<sup>T</sup>, unlike strain PLAI 1-1<sup>T</sup>, does not produce any soluble pigments in ISP 2 medium and does not grow on ISP 3 medium [1]. The spore surface of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> is useful for discriminating between the strain and *J. endophytica* DSM 45430<sup>T</sup>, the nearest phylogenetic relative. Strain PLAI 1-1<sup>T</sup> was aerobic, Gram-stain-positive, catalase-positive and oxidase-negative. Based on the differences of the physiological and biochemical characteristics such as the decomposition of tyrosine, the growth on the presence of 4% (w/v) NaCl in ISP 2 medium, the maximum temperature for growth, the acid production from carbon sources and the utilization of DL-aminobutyric acid, L-methionine, L-threonine and L-valine as sole nitrogen sources clearly separated this strain from *J. endophytica* DSM 45430<sup>T</sup>. The detailed phenotypic characteristics of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> are given in Table 1 and the species description.

The chemotaxonomic data of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> confirmed that the strain was a member of the genus *Jishengella*. The



**Fig. 1.** Scanning electron micrograph of the spiny spores borne singly on substrate mycelium of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> grown on ISP 2 agar for 30 days at 30 °C. Bar, 1 μm.

cell wall of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> had *meso*-diaminopimelic acid and 3-hydroxydiaminopimelic acid as the diagnostic diamino acids. The acyl type of the cell-wall muramic acid was glycolyl. The strain contained arabinose, ribose, xylose, glucose and a trace amount of mannose in the whole-cell hydrolysates. Arabinose, mannose, xylose and ribose were common sugars in the cell hydrolysates of *J. endophytica* DSM 45430<sup>T</sup> [1]. The major menaquinone was MK-9(H<sub>4</sub>) (76.0%), whereas MK-9(H<sub>2</sub>) (9.5%), MK-9(H<sub>6</sub>) (7.9%), MK-10(H<sub>4</sub>) (4.7%), MK-9(H<sub>8</sub>) (1.5%) and MK-10(H<sub>6</sub>) (0.4%) were detected as minor components. This major

**Table 1.** Differential characteristics of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> and its closest relatives

Strain: 1, PLAI1-1<sup>T</sup>; 2, *J. endophytica* DSM 45430<sup>T</sup>; 3, *Verrucosipora gifhornensis* DSM 44337<sup>T</sup>; 4, *Verrucosipora maris* DSM 45365<sup>T</sup>. All phenotypic data were determined in this study. +, Positive; –, Negative; w, Weakly positive.

Characteristic	1	2	3	4
Presence of 3-hydroxydiaminopimelic acid	+	–	–	–
Decomposition of:				
Tyrosine	–	+	+	+
Adenine	–	–	+	+
Xanthine	–	–	+	+
Urease activity	–	–	+	–
Peptonisation of milk	+	+	–	–
Maximum NaCl tolerance (%w/v)	4	2	3	5
Temperature range for growth (°C)	12–40	10–45	20–40	20–37
pH range for growth	4–11	4–11	7–9	7–10
Acid production from:				
Adonitol	–	+	–	–
Cellobiose	+	+	–	–
D-Fructose	+	+	–	–
D-Glucose	+	–	+	+
D-Galactose	–	+	+	–
D-Mannitol	+	+	–	–
Melibiose	–	+	–	–
D-Ribose	+	+	–	–
D-Xylose	+	+	–	+
D-Xylitol	+	–	–	–
Dextran	–	–	–	+
Glycerol	–	–	–	+
Lactose	–	+	+	–
Sucrose	+	+	–	–
Nitrogen utilization:				
DL-2-aminobutyric acid	–	+	+	w
Hydroxyl proline	–	–	–	+
L-Cysteine	+	+	–	+
L-Methionine	+	–	–	–
L-Phenylalanine	+	+	w	+
L-Serine	+	+	+	–
L-Threonine	–	+	+	+
L-Valine	–	+	+	+

menaquinone was similarly reported in the only one type strain of the genus *Jishengella*, *J. endophytica* DSM 45430<sup>T</sup>. The predominant fatty acids ( $\geq 10\%$ ) of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> were iso-C<sub>15:0</sub> (38.0%) and C<sub>17:1 $\omega$ 8c</sub> (10.3%; Table S1, available in the online version of this article). In this experiment, we found that strain PLAI 1-1<sup>T</sup> had the same predominant fatty acid that is found in its closest neighbour. Diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylserine, two unidentified phospholipids and one lipid were reported as polar lipids in the cell membrane (Fig. S1). These polar lipid components were also found in *J. endophytica* DSM 45430<sup>T</sup> with the exception of phosphatidylinositol mannosides. Mycolic acids were not found. The G+C content of the genomic DNA was 70.6 mol%. In contrast, some chemotaxonomic properties, i.e. the presence of 3-hydroxydiaminopimelic acid in cell wall and the absence of phosphatidylinositol mannosides are important evidence for differentiating between strain PLAI 1-1<sup>T</sup> and its nearest relative, *J. endophytica* DSM 45430<sup>T</sup>.

The nearly complete 16S rRNA gene sequence of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> (1411 bp) was first analysed using EzBioCloud server ([www.ezbiocloud.net/](http://www.ezbiocloud.net/)). The result obtained from this server exhibited that the strain was closely related to *J. endophytica* 202201<sup>T</sup> with the highest 16S rRNA sequence similarity value of 99.2% followed by *Verrucosipora gifhornensis* DSM 44337<sup>T</sup> (99.0%), *Verrucosipora maris* AB-18-032<sup>T</sup> (98.9%), *Verrucosipora sonchi* NEAU-QY3<sup>T</sup> (98.9%), *Verrucosipora fiedleri* MG-37<sup>T</sup> (98.8%) and *Micromonospora fluostatini* PWB-003<sup>T</sup> (98.8%). The neighbour-joining tree of strain PLAI 1-1<sup>T</sup> (Fig. 2) confirmed the taxonomic affiliation of this strain due to strain PLAI 1-1<sup>T</sup> forming a distinct clade with *J. endophytica* 202201<sup>T</sup>. Although a low bootstrap value (<50%) between both strains was observed, however, the cluster of the members of the genus *Jishengella* was clearly separated from the clusters of the closest genera, *Verrucosipora* (80% bootstrap value) and *Micromonospora* (52%). This indicated that strain PLAI 1-1<sup>T</sup> was a member of the genus *Jishengella* and was phylogenetically different from those of members of the genera *Verrucosipora* and *Micromonospora*. In addition, the phylogenetic position of the strain in the maximum-likelihood (Fig. S2) and maximum-parsimony trees (Fig. S3) demonstrated that strain PLAI 1-1<sup>T</sup> could also be differentiated from its closest genera. Furthermore, strain PLAI 1-1<sup>T</sup> could be readily distinguished from the most closely related genera by its chemotaxonomic properties. Members of the genus *Verrucosipora* were reported to have the 2d fatty acid type of Kroppenstedt [30], in contrast to the genus *Jishengella*, which was of type 3a [1] while the genus *Micromonospora* exhibited type 3b. In addition, strain PLAI 1-1<sup>T</sup> and *J. endophytica* DSM 45430<sup>T</sup>, unlike *V. gifhornensis* DSM 44337<sup>T</sup>, contained 10-methyl C<sub>17:0</sub> (Table S1). The diagnostic reducing sugars were also a significant point for discriminating the novel strain from its closest genera. Strain PLAI 1-1<sup>T</sup> comprised xylose, arabinose, ribose, glucose and a trace amount of mannose as characteristic sugars, which

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า

Downloaded from [www.microbiologyresearch.org](http://www.microbiologyresearch.org) by

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาหรือข้อมูล 3347% ของอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

On: Thu, 18 Oct 2018 06:51:41



**Fig. 2.** Neighbour-joining tree based on almost-complete 16S rRNA gene sequences (1411 nt) showing the relationships between strain PLAI 1-1<sup>T</sup>, the *Jishengella* species with validly published names and members of the genera *Verrucospora*, *Phytohabitans*, *Xiangella* and *Micromonospora*. *Actinocatenispora thailandica* was used as an outgroup. Asterisks indicate the branches of the tree that were also found using the maximum-parsimony and maximum-likelihood methods. The numbers on the branches indicate the percentage bootstrap values of 1000 replicates; only values  $\geq 50\%$  are indicated. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

was similar to *J. endophytica* DSM 45430<sup>T</sup>. On the other hand, the diagnostic sugars of the genus *Verrucospora* are xylose and mannose [31, 32] and the genus *Micromonospora* have arabinose and xylose as diagnostic sugars. Hence, the chemotaxonomic results and the analysis of 16S rRNA gene sequence showed that strain PLAI 1-1<sup>T</sup> was a member of the genus *Jishengella* and was clearly separated from the genera *Verrucospora* and *Micromonospora*. Nevertheless the phenotypic data showed that the novel strain could be delineated readily from the type strains of *Verrucospora* species, notably from its nearest phylogenetic neighbours, *V. gifhornensis* DSM 44337<sup>T</sup> and *V. maris* DSM 45365<sup>T</sup> (Table 1). Unlike *V. gifhornensis* DSM 44337<sup>T</sup>, strain PLAI 1-1<sup>T</sup> revealed negative results for the decomposition of tyrosine, adenine, xanthine and also urease activity. Moreover, the peptonisation of milk, pH range for growth, the utilisation of L-methionine, L-threonine, L-valine and the acid

production from cellobiose, D-fructose, D-mannitol, D-ribose, D-xylitol and sucrose, were effective data for discriminating the strain from both close relatives, *V. gifhornensis* DSM 44337<sup>T</sup> and *V. maris* DSM 45365<sup>T</sup>. It was interesting that the growth in the acidic condition (pH 4–5) and at low temperature (below 20 °C) were useful phenotypic characteristics to separate several members of the genus *Verrucospora* from the members of the genus *Jishengella* [33]. Furthermore, strain PLAI 1-1<sup>T</sup> showed low levels of DNA–DNA relatedness to *J. endophytica* DSM 45430<sup>T</sup> (48.9  $\pm$  0.9%), *V. gifhornensis* DSM 44337<sup>T</sup> (42.6  $\pm$  1.2%) and *V. maris* DSM 45365<sup>T</sup> (38.2  $\pm$  0.5%) (Table S2). These values were lower than 70% the cut-off level for assigning strains to the same species [34]. It is evident from the phenotypic and genotypic properties that strain PLAI 1-1<sup>T</sup> is representative of a novel species of the genus *Jishengella*, for which the name *Jishengella zingiberis* is proposed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า

Downloaded from www.microbiologyresearch.org by

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาหรือข้อมูลอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## DESCRIPTION OF *JISHENGELLA ZINGIBERIS* SP. NOV.

*Jishengella zingiberis* (zin.gi'be.ris. N.L. gen. n. *zingiberis* of *Zingiber*, referring to the isolation of the strain from *Zingiber montanum*).

A Gram-stain-positive, mesophilic, oxidase-negative and catalase-positive actinomycete that forms a single spore borne on the substrate mycelium. The spore surface is spiny. Aerial mycelia are not detected. Colonies on ISP 2 medium are strong orange and become increasingly dark brownish with age. Pale yellow soluble pigment is produced in ISP 2 medium. Peptonization of milk, gelatin liquefaction and the decomposition of starch are positive. Nitrate reduction, urease activity, decomposition of adenine, CM-cellulose, hypoxanthine, tyrosine and xanthine are negative. Acids are produced from cellobiose, D-fructose, D-glucose, trehalose, D-mannitol, D-ribose, D-xylitol, D-xylose and sucrose, but not adonitol, dextran, D-galactose, melezitose, glycerol, L-rhamnose or lactose. Utilizes L-arginine, L-asparagine, L-cysteine, L-histidine, L-methionine, L-phenylalanine, L-proline and L-serine as sole nitrogen sources, but not DL-2-amino-butyric acid, hydroxyl proline, L-threonine and L-valine. The temperature for growth is between 12–40 °C. The optimum temperature for growth is 30 °C. No growth is observed at 45 °C. The maximum NaCl concentration for growth is 4 % (w/v). The pH range for growth is pH 4–11. The cell-wall peptidoglycan contains *meso*-diaminopimelic acid and 3-hydroxydiaminopimelic acid. The acyl type of the cell-wall muramic acid is glycolyl. The predominant menaquinone is MK-9(H<sub>4</sub>), while MK-9(H<sub>2</sub>), MK-9(H<sub>6</sub>), MK-10(H<sub>4</sub>), MK-9(H<sub>8</sub>) and MK-10(H<sub>6</sub>) are present as minor components. The characteristic whole-cell sugars are arabinose, xylose, ribose, glucose and a trace amount of mannose. The polar lipid profile contains diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylserine, two unidentified phospholipids and one unidentified lipid. The major fatty acids are iso-C<sub>15:0</sub> and C<sub>17:1ω8c</sub>. Mycolic acids are absent. The DNA G+C content of the type strain is 70.6 mol%. The type strain is PLA1 1-1<sup>T</sup> (=TBRC 7644<sup>T</sup>=NBRC 113144<sup>T</sup>).

### Funding information

The authors gratefully acknowledge the financial support from King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Research Fund (KREF; KREF045905).

### Acknowledgements

We thank the Actinobacterial Research Unit (ARU), Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, for laboratory support.

### Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### References

- Xie QY, Wang C, Wang R, Qu Z, Lin HP *et al.* *Jishengella endophytica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61:1153–1159.
- Niemhom N, Chutrakul C, Suriyachadkun C, Thawai C. *Nonomurea stahlianthi* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from

the stem of *Stahlianthus campanulatus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;67:2879–2884.

- Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* 1987;65:501–509.
- Waksman SA. The Actinomycetes. In: *Classification, Identification and Description of Genera and Species*, vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins; 1961.
- Kelly KL. *Inter-Society Color Council – National Bureau of Standard Color Name Charts Illustrated with Centroid Colors*. Washington, DC: US Government Printing Office; 1964.
- Arai T. *Culture Media for Actinomycetes*. Tokyo: The Society for Actinomycetes Japan; 1975.
- Williams ST, Cross T. Actinomycetes. In: Booth C (editor). *Methods in Microbiology*, vol. 4. London: Academic Press; 1971. pp. 295–334.
- Gordon RE, Barnett DA, Handerman JE, Pang CH-N. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *Int J Syst Bacteriol* 1974;24:54–63.
- Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* 1983;29: 319–322.
- Uchida K, Aida KO. An improved method for the glycolate test for simple identification of the acyl type of bacterial cell walls. *J Gen Appl Microbiol* 1984;30:131–134.
- Komagata K, Suzuki KI. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol* 1987;19:161–207.
- Collins MD, Pirouz T, Goodfellow M, Minnikin DE. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* 1977;100:221–230.
- Tamaoka J, Katayama-Fujimura Y, Kuraishi H. Analysis of bacterial menaquinone mixtures by high performance liquid chromatography. *J Appl Bacteriol* 1983;54:31–36.
- Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M *et al.* An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* 1984;2: 233–241.
- Sasser M. *Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids*, MIDI Technical Note 101. Newark: Microbial ID, Inc; 1990.
- Kämpfer P, Kroppenstedt RM. Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* 1996;42:989–1005.
- Minnikin DE, Hutchinson IG, Caldicott AB, Goodfellow M. Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid-containing bacteria. *J Chromatogr A* 1980;188:221–233.
- Tamaoka J. Determination of DNA Base Composition. In: Goodfellow M and O'Donnell AG (editors). *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons; 1994. pp. 463–470.
- Thawai C. *Micromonospora costi* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus speciosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:1456–1461.
- Tamaoka J, Komagata K. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* 1984;25:125–128.
- Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. 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* 1989;39:224–229.
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y *et al.* Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67:1613–1617.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95–98.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

Downloaded from [www.microbiologyresearch.org](http://www.microbiologyresearch.org) by

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา 3349 หรืออ้างถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

On: Thu, 18 Oct 2018 06:51:41

24. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.
25. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 1981;17:368–376.
26. Fitch WM. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* 1971;20:406–416.
27. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725–2729.
28. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–120.
29. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
30. Kroppenstedt RM. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: Goodfellow M and Minnikin DE (editors). *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. New York: Academic Press; 1985. pp. 173–199.
31. Rheims H, Schumann P, Rohde M, Stackebrandt E. *Verrucosipora giffhornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:1119–1127.
32. Goodfellow M, Stach JE, Brown R, Bonda AN, Jones AL et al. *Verrucosipora maris* sp. nov., a novel deep-sea actinomycete isolated from a marine sediment which produces abyssomicins. *Antonie van Leeuwenhoek* 2012;101:185–193.
33. Goodfellow M, Brown R, Ahmed L, Pathom-Aree W, Bull AT et al. *Verrucosipora fiedleri* sp. nov., an actinomycete isolated from a fjord sediment which synthesizes proximicins. *Antonie van Leeuwenhoek* 2013;103:493–502.
34. Wayne LG, Moore WEC, Stackebrandt E, Kandler O, Colwell RR et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* 1987;37:463–464.



**Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal**

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

**Find out more and submit your article at [microbiologyresearch.org](http://microbiologyresearch.org).**

# *Jiangella endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the rhizome of *Kaempferia elegans*

Nantawan Niemhom,<sup>1</sup> Chanikul Chutrakul,<sup>2</sup> Chanwit Suriyachadkun,<sup>3</sup> Sarin Tadtong<sup>4</sup> and Chitti Thawai<sup>1,5,\*</sup>

## Abstract

An endophytic actinobacterium, designated strain KE2-3<sup>T</sup>, was isolated from surface-sterilised rhizome of *Kaempferia elegans*. The polyphasic approach was used for evaluating the taxonomic position of this strain. The taxonomic affiliation of this strain at genus level could be confirmed by its chemotaxonomic characteristic, i.e. the presence of LL-diaminopimelic acid in the cell peptidoglycan, MK-9(H<sub>4</sub>) as the major menaquinone, iso-C<sub>16:0</sub>, anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>14:0</sub> and iso-C<sub>15:0</sub> as the predominant fatty acids in cells, and the presence of diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol mannoside in its membranes. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, strain KE2-3<sup>T</sup> was identified as a member of the genus *Jiangella* and showed the highest similarities to *Jiangella muralis* DSM 45357<sup>T</sup> (99.3%) followed by *Jiangella alba* DSM 45237<sup>T</sup> (99.2%), *Jiangella alkaliphilia* DSM 45079<sup>T</sup> (99.0%), *Jiangella gansuensis* DSM 44835<sup>T</sup> (98.8%) and *Jiangella mangrovi* 3SM4-07<sup>T</sup> (98.6%). However, the draft genome sequence of strain KE2-3<sup>T</sup> exhibited low average nucleotide identity values to the reference strains (85.5–90.2%), which were well below the 95–96% species circumscription threshold. The DNA G+C content of genomic DNA was 72.3 mol%. With the differences of physiological, biochemical and genotypic data, strain KE2-3<sup>T</sup> could be discriminated from its closest neighbour. Thus, strain KE2-3<sup>T</sup> should be recognised as a novel species of genus *Jiangella*, for which the name *Jiangella endophytica* sp. nov. is proposed. The type strain is KE2-3<sup>T</sup> (=BCC 66359<sup>T</sup>=NBRC 110004<sup>T</sup>).

Genus *Jiangella* [1] is a group of Gram-stain-positive, aerobic and non-acid fast actinomycetes that form short mycelial fragment or elongated rods. The cell-wall structure contains LL-diaminopimelic acid incorporated in the peptidoglycan with the presence of MK-9(H<sub>4</sub>) as major the menaquinone. At present, five species, *Jiangella gansuensis* [1], *Jiangella alkaliphila* [2], *Jiangella alba* [3], *Jiangella muralis* [4] and *Jiangella mangrovi* [5] are reported as members of this genus. Isolation of the genus has been reported from various types of natural samples including desert soil [1], cave soil [2], mangrove soil [5], cellar wall [4] and plant tissue [3]. In the course of searching for non-*Streptomyces* strains from Thai medicinal plants, strain KE2-3<sup>T</sup> was isolated from the rhizome tissue of *Kaempferia elegans* and was taxonomically characterised as a novel species of the genus *Jiangella*.

Strain KE2-3<sup>T</sup> was isolated from surface-sterilised rhizome of *Kaempferia elegans*, collected from Pathum Thani province (14° 6' 52.9194" N 100° 23' 8.1234" E), Thailand. The healthy rhizome sample of this plant was washed in tap water to remove dirt and then cut into small pieces (1 cm<sup>2</sup> each). After cutting, the sample was washed in sterile 0.1% Tween 20 for 30 s and then washed twice in sterile distilled water. The sample was surface-sterilised with 95% ethanol for 13 min and subsequently with 1% sodium hypochlorite for 13 min, followed by washing in sterile distilled water three times. Finally, the surface-sterilised sample was ground with sterile mortar and pestle with 0.5 ml sterile distilled water, and the suspension (200 µl) was spread on starch casein agar (SCA; 10 g soluble starch, 2 g KNO<sub>3</sub>, 0.3 g casein, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g NaCl, 0.02 g

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand; <sup>2</sup>Bioassay Laboratory, Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Thailand Science Park, Phahonyothin Road, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand; <sup>3</sup>BIOTEC Culture Collection, Biodiversity and Biotechnological Resource Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Thailand Science Park, Phaholyothin Road, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand; <sup>4</sup>Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Nakhon nayok 26120, Thailand; <sup>5</sup>Actinobacterial Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

\*Correspondence: Chitti Thawai, chitti.th@kmitl.ac.th

**Keywords:** *Jiangella*; endophytic actinobacterium; 16S rRNA gene; *Kaempferia elegans*.

**Abbreviations:** ISP, International *Streptomyces* Project; MK, menaquinone.

The DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain KE2-3<sup>T</sup> is LC032128. The whole genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession QVAI00000000. The version described in this paper is version QVAI01000000.

Four supplementary tables and four supplementary figures are available with the online version of the article.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

**Table 1.** Differential characteristics of strain KE2-3<sup>T</sup> and its closest phylogenetic relatives

Strains: 1, KE2-3<sup>T</sup>; 2, *J. muralis* 15-Je-017<sup>T</sup> [4]; 3, *J. gansuensis* YIM 002<sup>T</sup> [1]; 4, *J. alba* YIM 61503<sup>T</sup> [3]; 5, *J. alkaliphila* D8-87<sup>T</sup> [2]; and 6, *J. mangrovi* 3SM4-07<sup>T</sup> [5]. \*Data from Suksaard *et al.* [5]. +, Positive; –, negative; w, weakly positive.

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Gelatin liquefaction	–	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	–	–	+	–	–
Maximum NaCl tolerance (%w/v)	7	10	5	10	3	6
Maximum temperature for growth (°C)	35	40	37	45	37	37
pH range for growth	6–10	6–9	6–9	6.5–9	6–10	6–8
Acid production from:*						
Adonitol	–	w	–	–	–	w
L-Arabinose	+	w	–	–	w	+
Cellobiose	+	w	–	w	w	+
D-Galactose	+	–	–	–	–	+
D-Glucose	–	+	w	w	w	+
Lactose	–	–	–	–	–	+
D-Mannitol	–	–	–	–	+	–
L-Rhamnose	+	w	+	–	+	+
D-Ribose	+	+	–	+	+	–
D-Xylose	–	w	–	w	–	+
Sucrose	+	+	–	w	w	w
The presence of mannose in cell hydrolysates	+	–	–	–	+	+

CaCO<sub>3</sub>, 0.01 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 g agar, 1000 ml distilled water, pH 7.0) supplemented with 25 mg l<sup>-1</sup> nalidixic acid, 50 mg l<sup>-1</sup> nystatin and 1 mg l<sup>-1</sup> terbinafin and incubated at 30 °C for 30 days. The final washing water was spread on the same agar medium as the control plates. The pure culture was preserved by freeze-drying at –80 °C.

Cell morphology of strain KE2-3<sup>T</sup> was observed by using scanning electron microscope (JSM-6610 LV, JEOL) after cultivation on International *Streptomyces* Project (ISP) 2 medium at 30 °C for 21 days. To determine the colour of substrate and aerial mycelia, including soluble pigments, the strain was cultivated on various ISP media (ISP 2–7) [6], glucose–asparagine agar (ISP 5 with 1 % glucose replacing glycerol), Czapek's sucrose agar [7] and nutrient agar (Difco) and the colour was compared by using the ISCC–NBS colour charts [8]. Testing for growth at different temperatures (10, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 45 and 50 °C), and 0–10 % w/v NaCl (at increment of 1 %) was determined on ISP 2 agar for 14 days. To determine the pH range (4.0–11.0 at increment of 0.5 pH unit) for growth, the strain was cultivated at 30 °C in ISP 2 broth for 14 days. Other biochemical and physiological properties of the strain, i.e. nitrate reduction, acid production, gelatin liquefaction, hydrolysis of casein (1 %, w/v) and starch (1 %, w/v), were evaluated by using the methods of Arai [9], Williams and Cross [10], and Gordon *et al.* [11].

General chemotaxonomic characteristics for investigating the taxonomic affiliation of the genus *Jiangella* were evaluated. Dried cells for chemotaxonomic analyses were obtained from the strain grown in ISP 2 broth on a rotary

shaker (200 r.p.m.) at 30 °C for 5 days. The cell-wall diaminopimelic acid isomer was determined using the standard method of Hasegawa *et al.* [12]. Whole cell reducing sugars were analysed by the protocol of Komagata and Suzuki [13]. The membrane polar lipids were extracted according to the methods of Minnikin *et al.* [14] and analysed by following the two-dimensional TLC technique of Collins and Jones [15]. Menaquinones were extracted from the dried cells by the protocol described by Collins *et al.* [16] and then were detected by HPLC [17]. The fatty acids were prepared and analysed according to the standard method of Sasser [18] and Kämpfer [19]. The composition of fatty acids was detected by gas chromatography (6890, Hewlett 107 Packard) with the Sherlock Aerobic Bacterial Database (TSBA6) in the Microbial Identification software package.

Extraction of genomic DNA was performed by following the method described by Tamaoka [20]. The protocols of Thawai [21] were used for 16S rRNA gene amplification and sequencing. To determine the G+C content of the genomic DNA, the standard method of Tamaoka and Komagata [22] was used. The DNA–DNA hybridization tests were conducted using the method of Ezaki *et al.* [23]. The almost-complete 16S rRNA gene sequence of strain KE2-3<sup>T</sup> (1508 bases) was first compared and the sequence similarity value was calculated through EzBioCloud ([www.ezbiocloud.net/](http://www.ezbiocloud.net/)) [24]. CLUSTAL\_W multiple alignment mode within BioEdit program version 7.1.3.0 was used for alignment of the 16S rRNA gene sequences of the strain and all type strains of the genus *Jiangella*. Phylogenetic trees were reconstructed using the neighbour-joining (NJ) [25], maximum likelihood (ML) [26] and maximum parsimony (MP) [27] algorithms

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

Downloaded from [www.microbiologyresearch.org](http://www.microbiologyresearch.org) by

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา หรือ 4558 หรือ 4558

On: Thu, 14 Mar 2019 06:55:18

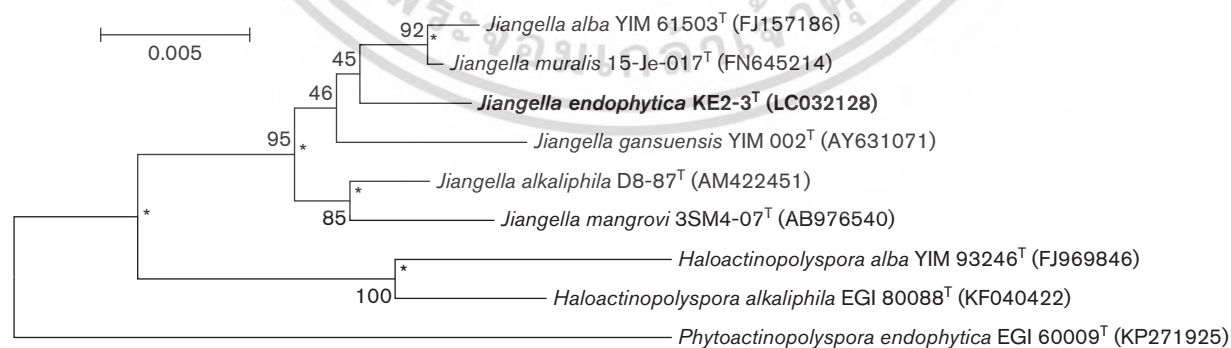
in the MEGA6 programme [28]. Kimura's two-parameter model [29] was selected for calculating evolutionary distances. The complete deletion option was chosen before reconstructing the tree. A bootstrap value analysis based on 1000 replicates was used for evaluating the robustness of the topology of the phylogenetic tree [30]. Genomic DNA for whole-genome sequencing of strain KE2-3<sup>T</sup> was extracted from 3-day-old cultures grown in ISP 2 broth at 30 °C and was purified following the protocol of the GeneJET Genomic DNA purification Kit (Thermo Scientific). The genomic DNA of strain KE2-3<sup>T</sup> was sequenced using an Illumina HiSeq 2000, MiSeq 1TB platform (Novogene AIT Genomics). The resulting 2×150 bp paired-end sequencing reads of strain KE2-3<sup>T</sup> were *de novo* assembled by using SPAdes [31]. The genome of strain KE2-3<sup>T</sup> was annotated using the PROKKA pipeline [32]. JSpecies was used to calculate the average nucleotide identity [33]. The digital DNA–DNA hybridization values between the genome of strain KE2-3<sup>T</sup> and the most closely related species were calculated using the Genome-to-Genome Distance Calculator, version 2.1 [34]. To predict gene clusters for natural products, the anti-SMASH programme was used [35].

Strain KE2-3<sup>T</sup> grew well on ISP 2, ISP 3 and ISP 7. Moderate growth was observed on ISP 4, ISP 6, nutrient agar and Czapek's sucrose agar. Poor growth occurred on ISP 5 and glucose–asparagine agar. No soluble pigment was observed on any media tested. This strain formed light yellowish brown to orange brown substrate mycelium. Scant white aerial mycelia were observed on ISP 2 and nutrient agar after 21 days of cultivation at 30 °C. Both aerial and substrate mycelia fragmented into elongated or short rods (Fig. S1, available in the online version of the article). These morphological characteristics were generally found in all members of genus *Jiangella* [1–5]. Unlike *J. muralis* DSM 45357<sup>T</sup> and *J. alba* DSM 45237<sup>T</sup>, strain KE2-3<sup>T</sup> grew in the presence of up to 7 % NaCl. The pH and temperature for cell growth were in the range of pH 6–10 and 15–35 °C, respectively.

Other physiological and biochemical properties that discriminated strain KE2-3<sup>T</sup> from the closest type strains of genus *Jiangella* are provided in Table 1.

Chemotaxonomic characteristics of strain KE2-3<sup>T</sup> were similar to those of all member of the genus *Jiangella*. LL-Diaminopimelic acid as the diagnostic diamino acid was observed in the cell-wall peptidoglycan of this strain. A major amount of menaquinone, MK-9(H<sub>4</sub>) (95.7 %), with small amounts of MK-9(H<sub>2</sub>) (2.8 %) and MK-9(H<sub>6</sub>) (1.5 %) were detected in cells. Both chemotaxonomic properties described above are commonly observed in all validly described *Jiangella* species [1–5]. Strain KE2-3<sup>T</sup> contained glucose, ribose, mannose and rhamnose as reducing sugars in cell hydrolysates. The sugar content of the strain made it different from the diagnostic sugars reported in *J. muralis* 15-Je-017<sup>T</sup>, which is designated as the closest relative [4]. Several polar lipids, i.e. diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylinositol mannoside, four unidentified phosphoglycolipids and three unidentified phospholipids were present in the membrane of strain KE2-3<sup>T</sup> (Fig. S2). These polar lipids are usually found in *J. muralis* 15-Je-017<sup>T</sup> [4] and *J. alba* YIM 61503<sup>T</sup> [3]. The fatty acid profile comprised major amounts (>10 %) of iso-C<sub>16:0</sub> (25.9 %), anteiso-C<sub>15:0</sub> (17.9 %), iso-C<sub>14:0</sub> (11.3 %) and iso-C<sub>15:0</sub> (10.7 %). Other fatty acid details are provided in Table S1. The four major fatty acids mentioned above are commonly reported in the two closest *Jiangella* species, *J. muralis* 15-Je-017<sup>T</sup> and *J. alba* YIM 61503<sup>T</sup>, with different proportions.

The similarity values of the 16S rRNA gene sequence of strain KE2-3<sup>T</sup> was reported using EzBioCloud (www.ezbiocloud.net/) [24]. Most closely related values were obtained from *J. muralis* DSM 45357<sup>T</sup> (99.3 %), *J. alba* DSM 45237<sup>T</sup> (99.2 %), *J. alkaliphila* DSM 45079<sup>T</sup> (99.0 %), *J. gansuensis* DSM 44835<sup>T</sup> (98.8 %), and *J. mangrovi* 3SM4-07<sup>T</sup> (98.6 %). The phylogenetic affiliation of this strain, as shown from the neighbour-joining (Fig. 1), maximum-likelihood (Fig.



**Fig. 1.** Neighbour-joining tree based on almost-complete 16S rRNA gene sequences showing the relationships between strain KE2-3<sup>T</sup>, the *Jiangella* species with validly published names and members of the genera *Haloactinopolyspora*, *Phytoactinopolyspora*. *Phytoactinopolyspora endophytica* was used as an outgroup. Asterisks (\*) indicating the branches of the tree that were also found using the maximum-parsimony and maximum-likelihood methods. The numbers on the branches indicate the percentage bootstrap values of 1000 replicates; only values ≥40 % are indicated. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

**Table 2.** Genome characteristics of strain KE2-3<sup>T</sup> and its closely relatives in the genus *Jiangella*

Attribute	Strain KE2-3 <sup>T</sup>	<i>J. muralis</i> DSM 45357 <sup>T</sup> (=15-Je-017 <sup>T</sup> )	<i>J. alba</i> DSM 45237 <sup>T</sup> (=YIM 61503 <sup>T</sup> )	<i>J. gansuensis</i> DSM 44835 <sup>T</sup> (=YIM 002 <sup>T</sup> )	<i>J. alkaliphila</i> DSM 45079 <sup>T</sup> (=D8-87 <sup>T</sup> )
Genome size (bp)	7 843 465	7 266 157	7 681 885	5 585 780	7 716 600
G+C content (%)	72.3	72.3	72.8	70.9	72.1
N50	2 98 984	3 24 980	3 325 316	5 585 780	7 716 600
Number of contigs	89	76	4	1	1
Number of coding sequences	6996	6617	6954	5166	7132
RNA genes	64	52	54	51	53
Genome coverage	62.9×	100.0×	332.0×	Unknown	223.0×
DDBJ/EMBL/GenBank assembly accession number	QVAI000000000	GCA_001270745.1	GCA_900106035.1	GCA_000515395.1	GCA_900105925.1

S3) and maximum-parsimony results (Fig. S4), showed that strain KE2-3<sup>T</sup> was a member of the genus *Jiangella*. Although strain KE2-3<sup>T</sup> revealed a high similarity of 16S rRNA gene sequence to *J. muralis* DSM 45357<sup>T</sup> and *J. alba* YIM 61503<sup>T</sup>, low average nucleotide identity values of draft genomic sequences (85.5–90.2%) with well below the 95–96% species circumscription threshold [36] were observed between the novel strain and its closest relatives. In addition, digital DNA–DNA hybridization analysis revealed low DNA–DNA relatedness values (<51%) between strain KE2-3<sup>T</sup> and its closest relatives (Table S3), which was less than the 70% cut-off point for assigning strains to the same species suggested by Wayne *et al.* [37]. Interestingly, the result of wet DNA–DNA hybridization (Table S2) exhibited a similar result to digital DNA–DNA hybridization analysis. *De novo* assembly of the genome sequencing data of strain KE2-3<sup>T</sup> resulted in 89 contigs, an N50 of 298 kb and a genome coverage of 62.9%. The draft genome of strain KE2-3<sup>T</sup> was 7 843 465 bp in total and was deposited to GenBank with the accession number QVAI000000000 (Table 2). According to the draft genome sequence, the genomic DNA G+C content of this strain was 72.3 mol%, which was close to those of the type strains of species of the genus *Jiangella* [1–5]. Of the 7206 genes predicted, 64 of them were assigned to RNA genes (60, 3 and 1 were predicted as tRNA, rRNA and mRNA genes, respectively). In addition, 6996 genes were identified as protein-coding sequences. Moreover, the results obtained from the antiSMASH server revealed that strain KE2-3<sup>T</sup> contained several putative biosynthesis gene clusters including type III polyketide synthase (T3PKS) genes. Others were associated with the synthesis of saccharides, fatty acids, siderophores, thiopeptide, bacteriocin, pristinamycin and lantipeptide compounds. The T3PKS gene found in this strain had 100% similarity to the alkylresorcinol biosynthetic gene cluster from *Streptomyces griseus* (GenBank accession AP009493, positions 5 48 718–5 51 330). Further studies are required to elucidate the mechanism for antibiotic production, which could facilitate biotechnological applications of this strain.

The gene composition of strain KE2-3<sup>T</sup> differed from the other four type strains of the genus *Jiangella* (Table S4). For example, strain KE2-3<sup>T</sup> possessed genes encoding gellan

lyase, glycerol dehydrogenase, endo-1,4-beta-xylanase/feruloyl esterase as well as pristinamycin IIA synthase subunits A (*snaA* gene) and B (*snaB* gene). The pristinamycin IIA synthase subunits A and B were used to catalyse the oxidation of the proline residue of pristinamycin IIB (PIIB) to pristinamycin IIA (PIIA). Both genes were also found in *Streptomyces pristinaespiralis* [38, 39]. Interestingly, among the four other type strains of the genus *Jiangella*, only strain KE2-3<sup>T</sup> possessed genes encoding pristinamycin IIA synthase.

Considering the physiological, biochemical and DNA–DNA relatedness data, strain KE2-3<sup>T</sup> should be considered as a novel species of the genus *Jiangella*, for which the name *Jiangella endophytica* sp. nov. is proposed.

## DESCRIPTION OF *JIANGELLA ENDOPHYTICA* SP. NOV.

*Jiangella 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 tissue).

Cells are Gram-stain-positive and aerobic. Light yellowish brown to orange brown substrate mycelia are observed. Both aerial and substrate mycelia are fragmented into short or elongated rod elements. White aerial mycelium forms scantily after 21 days cultivation on ISP 2 medium. No soluble pigment is produced in any test culture media. Hydrolysis of starch, casein and reduction of nitrate is positive. Gelatin liquefaction is negative. Acids are produced from culture grown in L-arabinose, cellobiose, D-galactose, glycerol, melibiose, L-rhamnose, D-ribose, sucrose and D-fructose, but not adonitol, dextran, D-glucose, *myo*-inositol, lactose, D-mannitol, melezitose, raffinose, D-salicin, trehalose, D-xylose and xylitol. The growth temperature is between 15–35 °C while the optimum range is 25–30 °C. Maximum NaCl for growth is 7% (w/v). The pH range for growth is pH 6–10. The cell-wall peptidoglycan contains LL-diaminopimelic acid. The major menaquinone is MK-9(H<sub>4</sub>), while MK-9(H<sub>2</sub>) and MK-9(H<sub>6</sub>) are minor components. Glucose, ribose, mannose and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งาน ไม่นอนุญาตให้ไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์

Downloaded from www.microbiologyresearch.org by

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา หรือ 4578 หรือ 4578

rhamnose are detected as reducing sugars of the cell. The polar lipid profile contains diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylinositol mannoside, four unidentified phosphoglycolipids and three unidentified phospholipids. The main fatty acids (>10%) are iso-C<sub>16:0</sub>, anteiso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>14:0</sub> and iso-C<sub>15:0</sub>. The DNA G+C content of the type strain is 72.3 mol%. The type strain is KE2-3<sup>T</sup> (=BCC 66359<sup>T</sup>=NBRC 110004<sup>T</sup>).

#### Funding information

The authors gratefully acknowledge financial support from King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Research Fund (KREF; KREF045905) and the Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) to N. N. (TG-22-22-55-004D).

#### Acknowledgements

We thank the Actinobacterial Research Unit (ARU), Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, for laboratory support. We also thank Mrs Pornpit Sriboran for helping to collect the plant sample.

#### Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### References

- Song L, Li WJ, Wang QL, Chen GZ, Zhang YS et al. *Jiangella gansuensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete from a desert soil in north-west China. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:881–884.
- Lee SD. *Jiangella alkaliphila* sp. nov., an actinobacterium isolated from a cave. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:1176–1179.
- Qin S, Zhao GZ, Li J, Zhu WY, Xu LH et al. *Jiangella alba* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Maytenus austroyunnanensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:2162–2165.
- Kämpfer P, Schäfer J, Ladders N, Martin K. *Jiangella muralis* sp. nov., from an indoor environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011; 61:128–131.
- Suksaard P, Duangmal K, Srivibool R, Xie Q, Hong K et al. *Jiangella mangrovi* sp. nov., isolated from mangrove soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:2569–2573.
- Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 1966;16:313–340.
- Waksman SA. *The Actinomycetes, Classification, Identification and Description of Genera and Species*, vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins; 1961.
- Kelly KL. *Inter-Society Color Council — National Bureau of Standard Color Name Charts Illustrated with Centroid Colors*. Washington, DC: US Government Printing Office; 1964.
- Arai T. *Culture Media for Actinomycetes*. Tokyo: The Society for Actinomycetes Japan; 1975.
- Williams ST, Cross T. Actinomycetes. In: Booth C (editor). *Methods in Microbiology*, vol. 4. London: Academic Press; 1971. pp. 295–334.
- Gordon RE, Barnett DA, Handerhan JE, Pang CH-N. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the *Nocardin* Strain. *Int J Syst Bacteriol* 1974;24:54–63.
- Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* 1983;29: 319–322.
- Komagata K, Suzuki KI. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol* 1987;19:161–207.
- Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M et al. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* 1984;2: 233–241.
- Collins MD, Jones D. Lipids in the classification and identification of coryneform bacteria containing peptidoglycans based on 2, 4-diaminobutyric acid. *J Appl Bacteriol* 1980;48:459–470.
- Collins MD, Pirouz T, Goodfellow M, Minnikin DE. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* 1977;100:221–230.
- Tamaoka J. Analysis of bacterial menaquinone mixtures by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1986;123:31–36.
- Sasser M. *Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids*, MIDI Technical Note 101. Newark: Microbial ID, Inc; 1990.
- Kämpfer P, Kroppenstedt RM. Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* 1996;42:989–1005.
- Tamaoka J. Determination of DNA Base Composition. In: Goodfellow M and O'Donnell AG (editors). *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons; 1994. pp. 463–470.
- Thawai C. *Micromonospora costi* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus speciosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:1456–1461.
- Tamaoka J, Komagata K. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* 1984;25:125–128.
- Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. 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* 1989;39:224–229.
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67:1613–1617.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.
- Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 1981;17:368–376.
- Fitch WM. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* 1971;20:406–416.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725–2729.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–120.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;19:455–477.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014;30:2068–2069.
- Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 2016;32: 929–931.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 2013;14:60–73.
- Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU et al. AntiSMASH 3.0: a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res* 2015;43:W237–W243.
- Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahall DR et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018;68:461–466.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

Downloaded from www.microbiologyresearch.org by

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา หรือ 4588 หรือ 4588

On: Thu, 14 Mar 2019 06:55:18

37. Wayne LG, Moore WEC, Stackebrandt E, Kandler O, Colwell RR et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* 1987;37:463–464.
38. Xu B, Jin Z, Jin Q, Li N, Cen P. Improvement of pristinamycin production by genome shuffling and medium optimization for *Streptomyces pristinaespiralis*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2009;14:175–179.
39. Sezonov G, Blanc V, Bamas-Jacques N, Friedmann A, Pernodet JL et al. Complete conversion of antibiotic precursor to pristinamycin IIA by overexpression of *Streptomyces pristinaespiralis* biosynthetic genes. *Nat Biotechnol* 1997;15:349–353.



**Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal**

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

**Find out more and submit your article at [microbiologyresearch.org](http://microbiologyresearch.org).**

# ประวัติผู้เขียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ประวัติคณะวิจัย

ข้อมูลเกี่ยวกับคณะผู้วิจัย (ข้อมูลย้อนหลัง 3 ปี)

#### 1. ประวัติ

ชื่อ-สกุล.....นายจิตติ ท่าวไผ่  
 หน้าที่การงานปัจจุบัน อาจารย์  
 ตำแหน่ง.....รองศาสตราจารย์.....  
 ประวัติการศึกษาสูงสุด

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.ด.	เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ ธรรมชาติ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2547
วท.บ.	เทคโนโลยีชีวภาพ (เกรียติ นิยม)	สจล.	2542

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอม  
 เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กทม. 10520

โทรศัพท์ 02-3298400-11 ต่อ 235 โทรสาร 02-3298412

E-mail: ktchitti@kmitl.ac.th, ktchitti@gmail.com

ประสบการณ์วิจัยหรือสาขาที่ชำนาญ อนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีท และ การศึกษาสาร  
 ทุกติยภูมิของเชื้อแอกติโนมัยสีทผลงาน

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์/สิ่งประดิษฐ์/สิทธิบัตร (โปรดระบุให้ชัดเจน)

- งานวิจัย ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ (3 ปี ย้อนหลัง)

1. Supong, K., Suriyachadkun, C., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Pittayakhajonwut, P., Kudo, T. and Thawai, C. 2013. *Micromonospora sedimicola* sp. nov., isolated from a marine sediment of the Andaman Sea of Thailand. Int J Syst Evol Microbiol. 63, 570-575.

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

3. Supong, K., Thawai, C., Suwanborirux, K., Choowong, W., Supothina, S.,

Pittayakhajonwut, P. 2012. Antimalarial and antitubercular C-glycosylated

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- benz[a]anthraquinones from the marine-derived *Streptomyces* sp. BCC45596. *Phytochemistry Letters*. 5, 651-656.
4. Thawai, C., Thamsathit, W. and Kudo, T. 2013. *Planosporangium thailandense* sp. nov., isolated from a Thai hot spring soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63, 1051-1055.
  5. Niemhom, N., Suriyachadkun, C., Tamura, T. and Thawai, C. 2013. *Acrocarpospora phusangensis* sp. nov., isolated from a temperate peat swamp forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63, 2174-2179.
  6. Suriyachadkun, C., Ngaemthao, W., Chunhametha, S., Thawai, C. and Sanglier, J. J. 2013. *Actinoplanes siamensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 60, 3037-3042.
  7. Supong, K., Suriyachadkun, C., Pittayakhajonwut, P., Suwanborirux, K., and Thawai, C. 2013. *Micromonospora spongicola* sp. nov., an actinomycete isolated from a marine sponge in the Gulf of Thailand. *J. antibiotics*. 66, 505-509.
  8. Kittiwongwattana, C. and Thawai, C. 2013. *Rhizobium paknamense* sp. nov., isolated from lesser duckweeds (*Lemna aequinoctialis*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 63, 3823-3828.
  9. Thawai, C. and Suriyachadkun, C. 2013. *Dactylosporangium siamense* sp. nov., isolated from a Thai soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63, 4033-4038.
  10. Supong, K., Suriyachadkun, C., Suwanborirux, K., Pittayakhajonwut, P. and Thawai, C. 2013. *Verrucosisspora andamanensis* sp. nov., isolated from the marine sponge collected in Andaman sea (Tao island), Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63, 3970-3974.
  11. Kittiwongwattana, C. and Thawai, C. 2014. *Rhizobium lemnae* sp. nov., a bacterial endophyte of *Lemna aequinoctialis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 2455–2460.
  12. Suriyachadkun, C., Ngaemthao, W., Chunhametha, S., Thawai, C., Sanglier, J. J., and Kitpreechavanich, V. 2014. *Sinosporangium siamense* sp. nov., isolated from soil in Thailand and emended description of the genus *Sinosporangium*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 64, 2828-2833.
  13. Ngaemthao, W., Suriyachadkun, C., Chunhametha, S., Niemhom, N., Thawai, C., Sanglier, J. J. 2014. *Planobispora takensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 64, 1180-1185.
  14. Phongsopitanun, W., Ohkuma, M., Thawai, C., Suwanborirux, K., Kudo, T., and Tanasupawat, S. 2014. *Streptomyces chumphonensis* sp. nov., isolated from marine sediments in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*. 64: 2605-2610.
  15. Kittiwongwattana, C. and Thawai, C. 2015. *Paenibacillus lemnae* sp. nov., an endophytic bacterium of duckweed (*Lemna aequinoctialis*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 65: 107–112.

■ ผลงานที่ได้รับการอ้างอิงในวงวิชาการ (จำแนกระดับชาติและระดับนานาชาติหรือเทียบเท่า)

1. Thawai, C., Kittakoop, P., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Sriklung, K., Thebtaranonth. 2004. Micromonosporin A, a Novel 24-Membered Polyene Lactam Macrolide from *Micromonospora* sp. isolated from Peat Swamp Forest. *Chemistry and Biodiversity*. vol. 1, 640-645.
2. Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., and Kudo, T. 2004. *Micromonospora aurantinigra* sp. nov., isolated from a Peat Swamp Forest in Thailand. *Actinomycetologica*. vol. 18 no.1, 8-14.
3. Seearunruangchai, A., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Thawai, C., Itoh, T., Yamada, Y. 2004. Identification of acetic acid bacteria isolated from fruits collected in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50, 47-53.
4. Tanasupawat, S., Thawai, C., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Itoh, T., Adachi, O., and Yamada, Y. 2004. *Gluconobacter thailandicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -*Proteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50: 159-167.
5. Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K., and Kudo, T. 2005. *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 417-422 (มี impact factor = 3.18)
6. Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., and Kudo, T. 2005. *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51: 229-234. (มี impact factor = 0.9)
7. Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T. and Kudo, T. 2006. *Actinocatenispora* gen. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*, with description of *Actinocatenispora thailandica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1789-1794. (มี impact factor = 2.3)
8. Tanasupawat, S., Pakdeeto, A., Namwong, S., Thawai, C., Kudo, T., and Itoh, T. 2006. *Lentibacillus halophilus* sp. nov., from fish sauce in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1859-1863.
9. Tanasupawat, S., Pakdeeto, A., Thawai, C., Yukphan, P., and Okada, S. 2007. Identification of lactic acid bacteria from fermented tea leaves (miang) in Thailand and proposals of *Lactobacillus thailandensis* sp. nov., *Lactobacillus camelliae* sp. nov., and *Pediococcus siamensis* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53, 7-15.
10. Pakdeeto, A., Tanasupawat, S., Thawai, C., Moonmangmee, S., Kudo, T., and Itoh, T. 2007. *Salinicoccus siamensis* sp. nov., isolated from fermented shrimp paste in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2004-2008.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. Thawai, C., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Itoh, T. and Kudo, T. 2007. *Micromonospora narathiwatensis* sp. nov., from Thai peat swamp forest soils. J. Gen. Appl. Microbiol. 53, 287-293. (Sci impact factor = 0.9)
12. Thawai, C., Tanasupawat, S. and Kudo, T. 2008. *Micromonospora pattaloongensis* sp. nov., isolated from a Thai mangrove forest. Int J Syst Evol Microbiol. 58: 1516 - 1521. (Sci impact factor = 2.3)
13. Thawai, C., Tanasupawat, S. and Kudo, T. 2010. *Actinaurispora* gen. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*, with description of *Actinaurispora siamensis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 60, 1660-1666.
14. Songsumanus, A., Tanasupawat, S., Thawai, C., Suwanborirux, K. and Kudo, T. 2011. *Micromonospora humi* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest soil. Int J Syst Evol Microbiol. 61, 1176-1181.
15. Tanasupawat, S., Thongsanit, J., Thawai, C., Lee, K. C. and Lee, J. S. 2011. *Pisciglobus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from fish sauce. Int J Syst Evol Microbiol. 61, 1688-1692.
16. Thawai, C., Tanasupawat, S. and Kudo, T. 2011. *Dactylosporangium tropicum* sp. nov., isolated from a Thai soil. Int J Syst Evol Microbiol. 61, 2358-2362.
17. Spong, K., Suriyachadkun, C., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Pittayakhajonwut, P., Kudo, T. and Thawai, C. 2013. *Micromonospora sediminicola* sp. nov., isolated from a marine sediment of the Andaman Sea of Thailand. Int J Syst Evol Microbiol. 63, 570-575.
18. Spong, K., Thawai, C., Suwanborirux, K., Choowong, W., Supothina, S., Pittayakhajonwut, P. 2012. Antimalarial and antitubercular C-glycosylated benz[a]anthraquinones from the marine-derived *Streptomyces* sp. BCC45596. Phytochemistry Letters. 5, 651-656.
19. *Micromonospora spongicola* sp. nov., an actinomycete isolated from a marine sponge in the Gulf of Thailand. J. antibiotics. 66, 505-509.
20. Kittiwongwattana, C. and Thawai, C. 2013. *Rhizobium paknamense* sp. nov., isolated from lesser duckweeds (*Lemna aequinoctialis*). Int J Syst Evol Microbiol. 63, 3823-3828.
21. Thawai, C. and Suriyachadkun, C. 2013. *Dactylosporangium siamense* sp. nov., isolated from a Thai soil. Int J Syst Evol Microbiol. 63, 4033-4038.
22. Kittiwongwattana, C. and Thawai, C. 2014. *Rhizobium lemnae* sp. nov., a bacterial endophyte of *Lemna aequinoctialis*. Int J Syst Evol Microbiol 64, 2455-2460.
23. Phongsopitanun, W., Ohkuma, M., Thawai, C., Suwanborirux, K., Kudo, T., and Tanasupawat, S. 2014. *Streptomyces chumphonensis* sp. nov., isolated from marine sediments in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol. 64: 2605-2610.
24. Kittiwongwattana, C. and Thawai, C. 2015. *Paenibacillus lemnae* sp. nov., an endophytic bacterium of duckweed (*Lemna aequinoctialis*). Int J Syst Evol Microbiol. 65: 107-112.

# รายงานการเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการ: ความหลากหลายของเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสีทในพืชวงศ์ขิงและสารออกฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทจากเชื้อที่คัดเ

รายงานสรุปการเงินปิดโครงการ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ผู้รับทุน รศ.ดร.จิตติ ท่าไ้

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1/8/59 ถึงวันที่ 31/7/61

หมวด	งบประมาณรวม ทั้งโครงการ (1)	ค่าใช้จ่าย จากรายงาน ครั้งก่อน (2)	ค่าใช้จ่าย งวดปัจจุบัน (3)	รวมค่าใช้จ่าย สะสมถึง ปัจจุบัน (4) = (2) + (3)	งบประมาณ คงเหลือ (5) = (1) - (4)
1. งบบุคลากร : ค่าจ้างผู้ช่วยนักวิจัย	280,320.00	260,460.00	19,860.00	280,320.00	0.00
2. งบดำเนินงาน					
ค่าใช้สอย	103,000.00	80,678.00	26,540.00	107,218.00	-4,218.00
ค่าวัสดุ	507,680.00	347,942.50	157,504.00	505,446.50	2,233.50
3. งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์					
<b>รวม</b>	<b>891,000.00</b>	<b>689,080.50</b>	<b>203,904.00</b>	<b>892,984.50</b>	<b>-1,984.50</b>

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับจาก

งวดที่ 1	จำนวน	548,660.00	บาท	
งวดที่ 2	จำนวน	311,806.00	บาท	
ดอกเบีย้ ครั้งที่ 1	จำนวน	914.44	บาท	
ดอกเบีย้ ครั้งที่ 2	จำนวน	216.88	บาท	
ดอกเบีย้ ครั้งที่ 3	จำนวน	81.70	บาท	
<b>รวมรับทั้งสิ้น</b>	<b>จำนวน</b>	<b>861,679.02</b>	<b>บาท</b>	<b>(1)</b>

ค่าใช้จ่ายรายงวด

งวดที่ 1	จำนวน	689,080.50	บาท	
งวดที่ 2	จำนวน	203,904.00	บาท	
<b>รวมจ่ายทั้งสิ้น</b>	<b>จำนวน</b>	<b>892,984.50</b>	<b>บาท</b>	<b>(2)</b>

จำนวนเงินคงเหลือ (1) - (2) =

**-31,305.48** บาท

ลบสามหมื่นหนึ่งพันสามร้อยห้าบาทสี่สิบแปดสตางค์