

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การแยกและตรวจสอบลักษณะของแอกติโนมัยซีทที่แยกจากดินและ
พืชสมุนไพร

Isolation and characterization of actinomycetes isolated
from soil and medicinal plants



ประจำปี 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การแยกและตรวจสอบลักษณะของแอกติโนมัยซีทที่แยกจากดินและ
พืชสมุนไพร

Isolation and characterization of actinomycetes isolated
from soil and medicinal plants

โดย

รศ.ดร. จิตติ ทาไว

คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปี 2560

600266291

RC00050

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2560 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

รศ.ดร. จิตติ ท่าไว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	การแยกและตรวจสอบลักษณะของแอกติโนมัยสีทที่แยกจากดินและพืชสมุนไพร
(ภาษาอังกฤษ)	Isolation and characterization of actinomycetes isolated from soil and medicinal plants
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก	ทุนงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปี 2560	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวนเงิน 375,775 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี	เดือนตุลาคม 2559 ถึง กันยายน 2560
ผู้ดำเนินการวิจัย	รศ.ดร. จิตติ ท่าไว สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
โทรศัพท์	02-3298400 ต่อ 235

บทคัดย่อ

แอกติโนมัยสีทจำนวน 71 ไอโซเลต ถูกแยกได้จากตัวอย่างดินในอุทยานแห่งชาติภูซาง จังหวัดพะเยาและเนื้อเยื่อชิงและวุ้นชั่งมดลูก เชื้อไอโซเลตเหล่านี้ถูกนำมาจัดกลุ่มโดยลักษณะทางพีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ ได้เป็น 5 กลุ่ม จากลักษณะตำแหน่งบน phylogenetic tree ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางพีโนไทป์ของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มแสดงว่าเชื้อเหล่านี้เป็นสมาชิกของเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* *Micromonospora* *Herbidospora* *Amycolatopsis* และ *Actinomadura* การวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อไอโซเลต PS42-9, DH51B-4-3 และ PCWR-4-6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานเคมีคล้ายกับเชื้อสกุล *Herbidospora* *Amycolatopsis* และ *Actinomadura* ตามลำดับ แต่มีลักษณะทางจีโนไทป์และพีโนไทป์ที่แตกต่างไปจากเชื้อสปีชีส์มาตรฐานทั้งหมดที่เป็นสมาชิกในสกุล *Herbidospora* *Amycolatopsis* และ *Actinomadura* ดังกล่าว ดังนั้นเชื้อไอโซเลต PS42-9, DH51B-4-3 และ PCWR-4-6 จึงถูกตัดสินให้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Herbidospora* *Amycolatopsis* และ *Actinomadura* โดยให้ชื่อว่า *Herbidospora soli* sp. nov., *Amycolatopsis rhizosphaerae* sp. nov. และ *Actinomadura rubra* sp. nov. ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำหมักที่ได้จากเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและนำไปทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์พบว่า เชื้อจำนวนมากกว่าร้อยละ 40 แสดงกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ได้

Abstract

Seventy one actinomycete strains were isolated from soil sample collected in Phu Sang National Park of Payao province and the tissue of *Zingiber officinale* and *Curcuma zanthorrhiza*, Thailand. These strains were grouped using phenotypic chemotypic and genotypic characteristics into 5 groups. Phylogenetic position, chemotaxonomic analyses including some phenotypic characterisation revealed that the representative strains in each group belonged to the members of the genera *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Herbidospira*, *Amycolatopsis* and *Actinomadura*. Here, we found the strain PS42-9, DH51B-4-3 and PCWR-4-6 showing morphological and chemotaxonomic characteristics typical of members of the genera *Herbidospira*, *Amycolatopsis* and *Actinomadura*, respectively but which was genotypically and phenotypically distinguishable from all recognized *Pseudonocardia* species. Therefore, the strains PS42-9, DH51B-4-3 and PCWR-4-6 were judged to represent a novel species of the genus *Herbidospira*, *Amycolatopsis* and *Actinomadura* for which the name *Herbidospira soli* sp. nov., *Amycolatopsis rhizosphaerae* sp. nov. และ *Actinomadura rubra* sp. nov. were proposed. Furthermore, the fermentation broths of these representative strains were extracted with ethyl acetate and were tested for anti-microbial activity. The results showed that more than 40% of actinomycete strains exhibited the anti-microbial activity.

สารบัญ

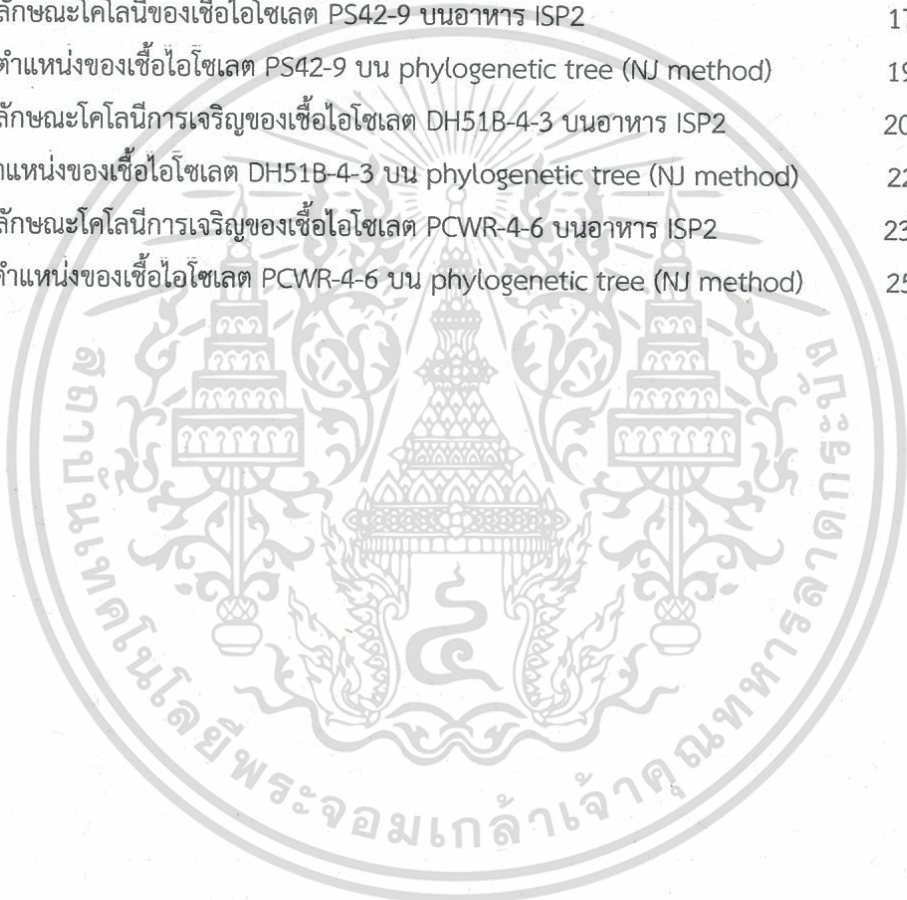
หน้า	
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ	5
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	10
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก	49



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต ZO4-1 บนอาหาร ISP2	12
2	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ZO4-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	13
3	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต CZ8-1 บนอาหาร ISP2	14
4	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CZ8-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	16
5	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PS42-9 บนอาหาร ISP2	17
6	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PS42-9 บน phylogenetic tree (NJ method)	19
7	แสดงลักษณะโคโลนีการเจริญของเชื้อไอโซเลต DH51B-4-3 บนอาหาร ISP2	20
8	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต DH51B-4-3 บน phylogenetic tree (NJ method)	22
9	แสดงลักษณะโคโลนีการเจริญของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 บนอาหาร ISP2	23
10	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 บน phylogenetic tree (NJ method)	25



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอกติโนมัยสัทที่แยกได้	10
2 แสดงรายละเอียดการกระจายของเชื้อแอกติโนมัยสัทที่แยกได้	11
3 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสัทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ	26
4 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสัทในแต่ละไอโซเลต	29
5 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอกติโนมัยสัทในแต่ละไอโซเลต	37
6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ antimicrobial activity ของสารสกัดจากเชื้อ actinomycetes ในกลุ่มต่างๆ	41



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC = American Type Culture Collection

B. subtilis = *Bacillus subtilis*

C. albicans = *Candida albicans*

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

E. coli = *Escherichia coli*

EtOAc = ethyl acetate

ISP = International *Streptomyces* Project

M. luteus = *Micrococcus luteus*

MHA = Mueller-Hinton Agar

nm = nanometer

NSA = Non-Streptomycete Actinomycetes

Ps. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

TSB = Tryptic soy broth

UV = Ultraviolet

μL = microlitre

MRSA = Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

ทรัพยากรจุลินทรีย์เป็นทรัพยากรที่สำคัญแหล่งหนึ่งต่อการพัฒนาด้านการเกษตร อุตสาหกรรม และทางการแพทย์ ด้วยข้อได้เปรียบของประเทศไทยที่ตั้งอยู่ในสภาพอากาศแบบร้อนชื้นทำให้อุดมไปด้วยทรัพยากรพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง การเก็บรวบรวมและคัดกรองจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จึงเป็นงานที่เร่งดำเนินการใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญต่อการแพทย์ เกษตร และอุตสาหกรรมในอนาคต

แอกติโนมัยสีทจัดเป็นทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญเนื่องจากสามารถสร้างสารต้นแบบที่มีโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย และมีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูง (Bérdy, 2005) ยาหลายชนิดที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะมีจุดเริ่มต้นจากการศึกษาความหลากหลายและการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้นแบบจากเชื้อแอกติโนมัยสีททั้งสิ้น ยกตัวอย่างเช่น amphotericin B gentamicin erythromycin chloramphenicol streptomycin เป็นต้น ดังนั้นการค้นหาเชื้อแอกติโนมัยสีทชนิดใหม่จากแหล่งธรรมชาติใหม่ๆ จึงมีความจำเป็นอย่างมากในการเพิ่มโอกาสถึงการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้นแบบตัวใหม่เพื่อรองรับการรักษาโรคต่างๆ และการระบาดของเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยาในอนาคต จึงเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจและท้าทาย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในด้านการวิจัยและพัฒนาสารต้นแบบจากทรัพยากรจุลินทรีย์ในประเทศไทยเพื่อผลิตเป็นยาตัวใหม่ในอนาคต

ส่วนใหญ่แล้วเชื้อแอกติโนมัยสีทมีกระจายตัวอยู่ในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติอื่นๆ ประชากรและชนิดของเชื้อแอกติโนมัยสีทในระบบนิเวศขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีววิทยาของสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นๆ การเพิ่มโอกาสเพื่อค้นพบเชื้อแอกติโนมัยสีทชนิดใหม่จึงควรเริ่มจากการศึกษาแหล่งธรรมชาติแหล่งใหม่ที่มีลักษณะทางระบบนิเวศแตกต่างจากแหล่งธรรมชาติทั่วไป พืชสมุนไพรไทยที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีจัดเป็นแหล่งที่น่าสนใจต่อการค้นหาเชื้อแอกติโนมัยสีท ด้วยความหวังว่าจะพบเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แสดงลักษณะจำเพาะที่โดดเด่นต่างไปจากจุลินทรีย์ที่พบในสิ่งแวดล้อมทั่วไปและแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีและเหมือนกับสารที่พบในพืชสมุนไพรนั้นๆ เพื่อใช้เป็นแหล่งทดแทนในการสร้างสารที่มีศักยภาพในการบำบัดโรคเหมือนที่พบในพืชสมุนไพร ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการวิจัยทางด้านความหลากหลาย และอนุกรมวิธานหลายส่วน เพื่อศึกษาการกระจายตัว คัดเลือกเชื้อ และเก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีประโยชน์จากแหล่งดังกล่าวในการนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการศึกษาและวิจัยเชิงพัฒนาต่อไป ดังนั้นการศึกษาวิจัยในโครงการนี้อาจทำให้เกิดการค้นพบเชื้อแอกติโนมัยสีทชนิดใหม่หรือสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารต้นแบบต่อการพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ และนวัตกรรมจากจุลินทรีย์ ตลอดจนช่วยพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยก เพาะเลี้ยง อนุกรมวิธานและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยสีท อีกทั้งช่วยเพิ่มขีดความสามารถและเป็นทางเลือกของนักวิจัยไทย ในการเรียนรู้การวิจัยเกี่ยวกับการหาสารที่มีฤทธิ์

ทางชีวภาพจากแหล่งทรัพยากรในประเทศเพื่อเป็นการบริหารจัดการสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพอีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาความหลากหลายและการกระจายตัวของแอกติโนมัยสีทในดินและเนื้อเยื่อสมุนไพรรตลอดจนคัดเลือกแอกติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
- 1.2.2 เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ การกระจายตัวและลักษณะทางอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีทในดินและพืชสมุนไพรร ขอบเขตของโครงการวิจัยนี้คือ สามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทในดินและเนื้อเยื่อสมุนไพรรได้อย่างน้อย 50-100 ไอโซเลต ทำการจัดกลุ่มเชื้อเหล่านั้นด้วยลักษณะทางพีโนไทป์ และศึกษาเพื่อให้ทราบลักษณะทางอนุกรมวิธานในระดับสกุลของเชื้อในแต่ละกลุ่ม จากนั้นคัดเลือกเชื้อตัวแทนเชื้อในกลุ่มทั้งหมดคือมีแนวโน้มเป็นเชื้อชนิดใหม่มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานจนถึงระดับสปีชีส์และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติทั้งป่าไม้ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ด้วยความหลากหลายของทรัพยากรธรรมชาติจึงเป็นแหล่งสำคัญของวัตถุดิบที่มีประโยชน์ต่อการพัฒนาด้านการเกษตร อุตสาหกรรม โดยเฉพาะทางการแพทย์ ยาหลายชนิดที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันไม่ว่าจะเป็นยาต้านมะเร็ง เอดส์ อัลไซเมอร์ ยาต้านการอักเสบ และยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ได้ดัดแปลงมาจากสารตั้งต้น (lead compound) จากธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารตั้งต้นที่ได้มาจากทรัพยากรจุลินทรีย์และพืชทั้งสิ้น ข้อจำกัดของสารตั้งต้นที่ได้จากพืช คือ สารตั้งต้นบางชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีมากแต่พบในพืชบางชนิดที่หายาก ใกล้เคียงสูญพันธุ์ และมีปริมาณน้อยในธรรมชาติ จึงทำให้ไม่เพียงพอต่อการศึกษาและพัฒนา ตรงกันข้ามกับทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สามารถขยายจำนวนและเก็บรักษาได้ง่าย ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจึงหันมามุ่งเน้นเพื่อเก็บรวบรวมและคัดกรองจุลินทรีย์กันอย่างกว้างขวาง ด้วยความได้เปรียบทางด้านทรัพยากรธรรมชาติของประเทศไทยที่ยังคงค่อนข้างสมบูรณ์ในปัจจุบัน การศึกษาความหลากหลายของทรัพยากรจุลินทรีย์และฤทธิ์ทางชีวภาพ ตลอดจนการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารตั้งต้นที่ได้มาจากจุลินทรีย์ จึงควรเร่งดำเนินการเพื่อเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญต่อการแพทย์ เกษตร และอุตสาหกรรมในอนาคต

การค้นพบแอกติโนมัยสิตที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (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 tulbaghiaae* (Kirby and Meyers, 2010), *Nocardioides caricicola* (Song et al., 2011), *Pseudonocardia adelaidensis* (Kaewkla and Franco., 2010), *Rhodococcus cercidiphylli* (Li et al., 2008), *Saccharopolyspora endophytica* (Qin et al., 2008), *Streptomyces alni* (Liu et al., 2009), *Streptosporangium oxazolinicum* (Inahashi et al., 2011) การค้นพบเชื้อแอกติโนมัยสิตที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เป็นแหล่งที่อยู่และความทนทานต่อสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นในเซลล์ แอกติโนมัยสิตที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่ถูกค้นพบมีแนวโน้มเป็นเชื้อสกุลและสปีชีส์ใหม่สูง จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาเพื่อได้มาซึ่งสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง จากการศึกษาเชื้อแอกติโนมัยสิตในเนื้อเยื่อพืช พบว่ามีเชื้อบางสกุลสามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และบางชนิดมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคได้ (ตารางที่ 1) เช่น lupinacidins A and B (Igarashi et al., 2007), Bafilomycins (Yu

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

et al., 2011), Cyclodipeptide (Chao et al., 2011), Lansai A-D (Tuntiwachwuttikul et al., 2008), Cycloheximide (Huang et al., 2011) เป็นต้น

จากลักษณะอันจำเพาะของพืชสมุนไพรไทย ที่ยังคงมีความหลากหลายสูง ดังนั้นแนวโน้มของการกระจายตัวและความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์จึงน่าจะมียู่สูงและมีความแตกต่างไปจากแหล่งธรรมชาติแหล่งอื่นเช่นกัน ด้วยเหตุนี้โอกาสที่จะค้นพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์ที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างแตกต่างจากสารเดิมที่เคยค้นพบมาก่อนจึงมีโอกาสมากขึ้นอย่างมาก นอกจากนี้แล้วยังพบว่า การศึกษาวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืชในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อยมากเมื่อเทียบกับต่างประเทศ ดังนั้นการศึกษาความหลากหลาย การกระจายตัวและคัดกรองเชื้อที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจและท้าทาย และน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการวิจัยและพัฒนาในการหาสารที่มีฤทธิ์ใหม่ๆ จากทรัพยากรจุลินทรีย์ของประเทศไทย

ดังที่กล่าวมาข้างต้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาทำการศึกษากการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทในดินและพืชสมุนไพรของประเทศไทย เพื่อตรวจสอบลักษณะทางอนุกรมวิธานระดับสกุลและเลือกเชื้อที่น่าสนใจมาศึกษาจนถึงระดับสปีชีส์ และคัดกรองเชื้อที่สามารถสร้างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ผลการศึกษาวิจัยที่ได้จากโครงการนี้ จะเป็นผลการวิจัยในเบื้องต้นที่จะช่วยคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรที่น่าสนใจ รวมทั้งได้ข้อมูลของการศึกษาการกระจายตัวและข้อมูลทางอนุกรมวิธานจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร รวมทั้งการศึกษาวินิจฉัยจะช่วยพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยก อนุกรมวิธาน การเพาะเลี้ยงและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร เพื่อช่วยเพิ่มขีดความสามารถหรือทางเลือกของนักวิจัยไทย ในการเรียนรู้การวิจัยเกี่ยวกับการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งทรัพยากรในประเทศอีกทางหนึ่ง

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ และการคัดเลือกเชื้อ

3.1.1.1 ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในการแยกเชื้อแอกติโนมัยสปีท

พืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยเป็นพืชสมุนไพรเช่น ชิง ว่านชั๊กมดลูก โดยเลือกพืชสมุนไพรที่มีการปลูกโดยไม่ใช้สารเคมี เก็บตัวอย่างรากใต้ดินลำต้น และใบของพืชที่โตเต็มที่แล้วมาล้างด้วยน้ำสะอาด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงขั้นตอนการแยกเชื้อ ส่วนดินที่เก็บเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์และเป็นธรรมชาติ

3.1.1.2 การแยกเชื้อ

นำตัวอย่างพืชจากข้อ 3.1.1.1 มาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1 x 1 เซนติเมตร และแช่ในสารละลาย 0.1% Tween 20 เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง นำชิ้นส่วนพืชแช่ลงใน 95% (v/v) ethanol เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาย้ายตัวอย่างพืชมาแช่ในสารละลาย 1% sodium hypochlorite เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ครึ่งละ 5 นาที ชิ้นส่วนพืชที่ได้จะถูกนำมาบดในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร และเกลี่ยลงบนอาหาร humic acid vitamin agar และ starch casein agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ นำจานอาหารมาบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เมื่อครบเวลาทำการเลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสปีท โดยตรวจลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ระยะการทำงานสูง (Long working distance lens) จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract-Malt extract agar และเก็บเชื้อไว้ในหลอดอาหารเลี้ยง (YM slant) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

ตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินบริเวณต่างๆ เช่น ดินบริเวณรากข้าว หรือดินทั่วไป มาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และผ่านกระบวนการ physical treatment และ chemical treatment ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละสกุลนั้นๆ จากนั้นทำการแยกเชื้อทำโดยวิธี Spread plate (Tortora *et al.*, 1995) โดยนำตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเจือจางถึงระดับ 100 และ 1000 เท่า ตูบสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ยบนอาหาร humic acid-vitamin agar และ/หรืออาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในแต่ละสกุลซึ่งผสมสารปฏิชีวนะ บ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 21 วัน เลือกเก็บโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละสกุล ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract – Malt extract agar

3.1.1.3 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast extract – malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยวยาวตามแนวอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิสารและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แพร่สารนั้นเข้าในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบการผลิิตสารที่มีฤทธิ์ด้วยจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 โดยลากจุลินทรีย์ทดสอบให้ชิดและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อมากที่สุด แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่จุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้

3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อดังนี้

3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (ISP) ชนิดต่างๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring and Gottlieb, 1966) ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจสอบลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายโคติน การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975) การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง และการใช้แหล่งคาร์บอน (Shiring and Gottlieb, 1966) จากการศึกษานี้จะสามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาศึกษาในขั้นต่อไป

3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ (Komagata and Suzuki, 1987)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อตัวแทนแต่ละกลุ่มในอาหารเหลว Yeast extract - Malt extract บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและทำให้เซลล์แห้งภายใต้ความเย็น (Freeze drying) นำเซลล์แห้งไปทดสอบทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อดังนี้

3.2.2.1 การวิเคราะห์ผนังเซลล์

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

3.2.2.2 การวิเคราะห์ Whole cell sugar

นำเซลล์แห้งมาไฮโดรไลส์ด้วย 1N H₂SO₄ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วจึงเติม Ba(OH)₂ และปรับ pH อยู่ในช่วง 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดเอาสารละลายส่วนบน

(supernatant) มาทำให้แห้ง ละลายซ้ำด้วยน้ำ จากนั้น spot ลงบน cellulose TLC plate develop ด้วย butanol - water - pyridine - toluene (10:6:6:1) ฟันด้วย acid aniline phthalate อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เทียบ spot ที่ได้กับ standard

3.2.2.3 การวิเคราะห์ Polar lipid

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

3.2.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid)

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

3.2.2.5 การวิเคราะห์ Isoprenoid quinone

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

13.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

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

3.2.4 การวิเคราะห์ DNA base composition (Tamaoka,1994.)

3.2.4.1 การแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์

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

3.2.4.2 การวิเคราะห์

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

3.2.5 Photobiotin labeling DNA-DNA Hybridization

3.2.5.1 Immobilization of DNA in microtiter plate

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

3.2.5.2 DNA labeling with photobiotin (DNA probe)

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

3.2.5.3 Prehybridization

หยดสารละลาย prehybridization ลงแต่ละหลุมของ plate บ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิสำหรับ hybridize แล้วเทสารละลายนี้ทิ้ง

3.2.5.4 Hybridization

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.5 Detection of biotinylated – DNA annealing to immobilized – DNA

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

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

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

ผลจากการศึกษา DNA relatedness จะสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อได้ หากเชื้อที่พบเป็นเชื้อที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานไว้จำเป็นต้องศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อใหม่ต่อไป โดยใช้วิธีการดังที่กล่าวมา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากข้าวและเนื้อเยื่อของขิงและว่านชักมดลูก นำมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทหายากและนำตัวอย่างดินมาวัดความเป็น กรด-เบส พบว่าได้เชื้อแอกติโนมัยสีททั้งหมด 71 ไอโซเลต จากดินตัวอย่างที่มีระดับความเป็นกรด-ด่างในช่วง 6.84- 7.14

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้

ชนิดของ ตัวอย่าง	จังหวัด	พีไอช	รหัส ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ขิง	กรุงเทพ	-	ZO4	ZO4-1, ZO4-2, ZO4-3, ZO4-4, ZO4-4, ZO4-5, ZO4-6, ZO4-7, ZO4-8 ZO4-9, ZO4-10, ZO4-11, ZO4-12, ZO4-13, ZO4-14, ZO4-15, ZO4-16, ZO4-17, ZO4-18, ZO4-19, ZO4-20, ZO4-21, ZO4-22, ZO4-23, ZO4-24, ZO4-25, ZO4-26, ZO4-27, ZO4-28
ว่านชักมดลูก	กรุงเทพ		CZ8	CZ8-1, CZ8-2, CZ8-3, CZ8-4,CZ8-5, CZ8-6, CZ8-7, CZ8-8, CZ8-9, CZ8-10, CZ8-11, CZ8-12, CZ8-13, CZ8-14, CZ8-15, CZ8-16, CZ8-17, CZ8-18, CZ8-19, CZ8-20, CZ8-21, CZ8-22, CZ8-23, CZ8-24, CZ8-25, CZ8-26, CZ8-27, CZ8-28, CZ8-29
ดิน	พะเยา	7.14	PS42	PS42-1, PS42-2, PS42-3, PS42-4, PS42-5, PS42-9
ดินบริเวณราก ข้าว	สุพรรณบุรี	6.84	DH51B- 4	DH51B-4-1, DH51B-4-2, DH51B-4-3, DH51B-4-4, DH51B-4-5, DH51B-4-6
ดินบริเวณราก ข้าว	สุพรรณบุรี	7.01	PCWR-4	PCWR-4-5, PCWR-4-6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดการกระจายเชื้อแอคติโนมัยสัที่แยกได้

ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัด	รหัสเชื้อ	รายละเอียดเชื้อ
ชิง	กรุงเทพ	ZO4-1, ZO4-2, ZO4-3, ZO4-4, ZO4-4, ZO4-5, ZO4-6, ZO4-7, ZO4-8 ZO4-9, ZO4-10, ZO4-11, ZO4-12, ZO4-13, ZO4-14, ZO4-15, ZO4-16, ZO4-17, ZO4-18, ZO4-19, ZO4-20, ZO4-21, ZO4-22, ZO4-23, ZO4-24, ZO4-25, ZO4-26, ZO4-27, ZO4-28	<i>Streptomyces</i>
ว่านชักมดลูก	กรุงเทพ	CZ8-1, CZ8-2, CZ8-3, CZ8-4, CZ8-5, CZ8-6, CZ8-7, CZ8-8, CZ8-9, CZ8-10, CZ8-11, CZ8-12, CZ8-13, CZ8-14, CZ8-15, CZ8-16, CZ8-17, CZ8-18, CZ8-19, CZ8-20, CZ8-21, CZ8-22, CZ8-23, CZ8-24, CZ8-25, CZ8-26, CZ8-27, CZ8-28, CZ8-29	<i>Micromonospora</i>
ดิน	พะเยา	PS42-1, PS42-2, PS42-3, PS42-4, PS42-5, PS42-9	<i>Herbidospora</i>
ดินบริเวณรากข้าว	สุพรรณบุรี	DH51B-4-1, DH51B-4-2, DH51B-4-3, DH51B-4-4, DH51B-4-5, DH51B-4-6	<i>Amycolatopsis</i>
ดินบริเวณรากข้าว	สุพรรณบุรี	PCWR-4-5, PCWR-4-6	<i>Actinomadura</i>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีท

4.2.1 ลักษณะทางพีโนไทป์

ในจำนวนเชื้อแอกติโนมัยสีททั้งหมด 71 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางพีโนไทป์ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดเชื้อออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวและจะกลายเป็นสีน้ำตาลอมดำเมื่ออายุมากขึ้น สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์สายเกลียวยาวเจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 (yeast extract – malt extract agar) เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 28 ไอโซเลต ได้แก่ ZO4-1, ZO4-2, ZO4-3, ZO4-4, ZO4-4, ZO4-5, ZO4-6, ZO4-7, ZO4-8 ZO4-9, ZO4-10, ZO4-11, ZO4-12, ZO4-13, ZO4-14, ZO4-15, ZO4-16, ZO4-17, ZO4-18, ZO4-19, ZO4-20, ZO4-21, ZO4-22, ZO4-23, ZO4-24, ZO4-25, ZO4-26, ZO4-27, ZO4-28 เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 5 ความเป็นกรด-ด่าง 6 ถึง 9 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้ง เกลาติน โปรตีนในนม และรีติวซ์ไนเตรทได้



รูปที่ 1. ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต ZO4-1 บนอาหาร ISP2

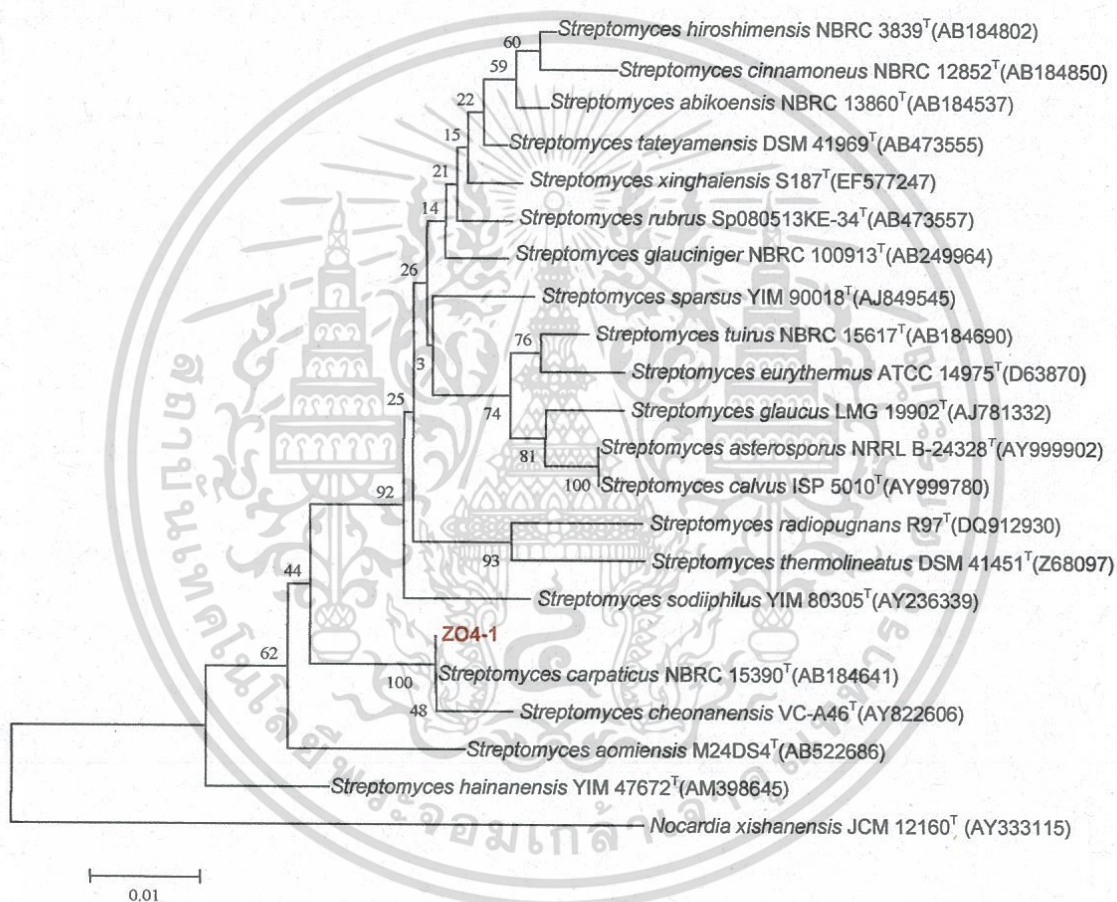
ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 1

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดโดอะมิโนพีมีลิกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลแรมโนส กลูโคส ไรโบส และอะราบิโนส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต ZO4-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยสีท พบว่าเชื้อไอโซเลต ZO4-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces carpaticus* NBRC 15390^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.89 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 100 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต ZO4-1 และเชื้อ type strain ของสกุล *Streptomyces* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Streptomyces carpaticus*) มีค่าเท่ากับ 92.4 % จากข้อมูลสามารถสรุปได้ว่าเชื้อไอโซเลต ZO4-1 เป็นเชื้อสปีชีส์เดียวกันกับ *Streptomyces carpaticus*

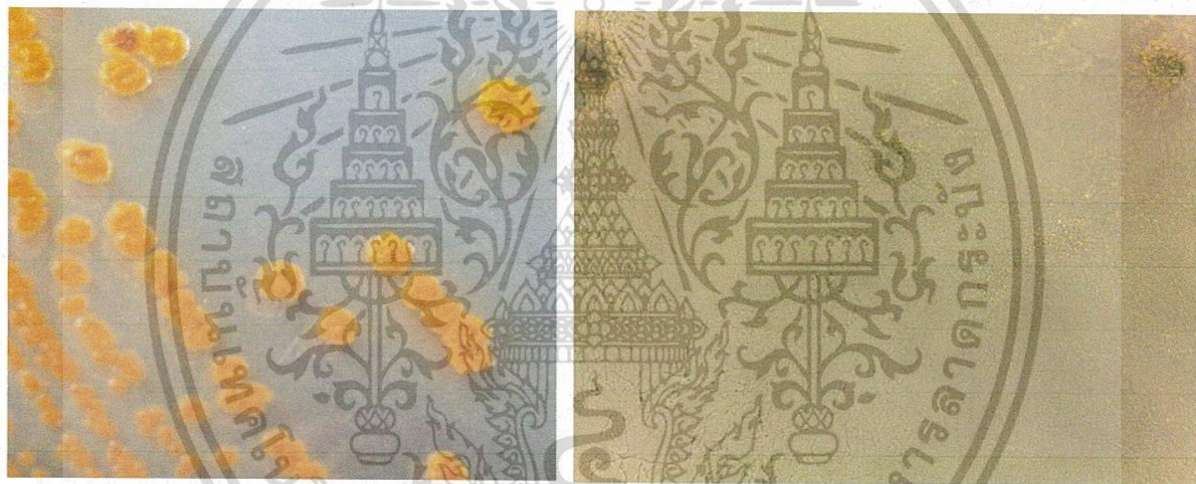


รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ZO4-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศแต่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองส้ม สร้างรงควัตถุสีเหลืองในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหารโดยตรง เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ประกอบด้วยเชื้อ 29 ไอโซเลตคือ CZ8-1, CZ8-2, CZ8-3, CZ8-4, CZ8-5, CZ8-6, CZ8-7, CZ8-8, CZ8-9, CZ8-10, CZ8-11, CZ8-12, CZ8-13, CZ8-14, CZ8-15, CZ8-16, CZ8-17, CZ8-18, CZ8-19, CZ8-20, CZ8-21, CZ8-22, CZ8-23, CZ8-24, CZ8-25, CZ8-26, CZ8-27, CZ8-28, CZ8-29

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 5 ความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนมและเจลาติน และริตวิซในเตรตเป็นไนโตรที่ได้ สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.subtilis*, *M.luteus*, *S.aureus* ได้



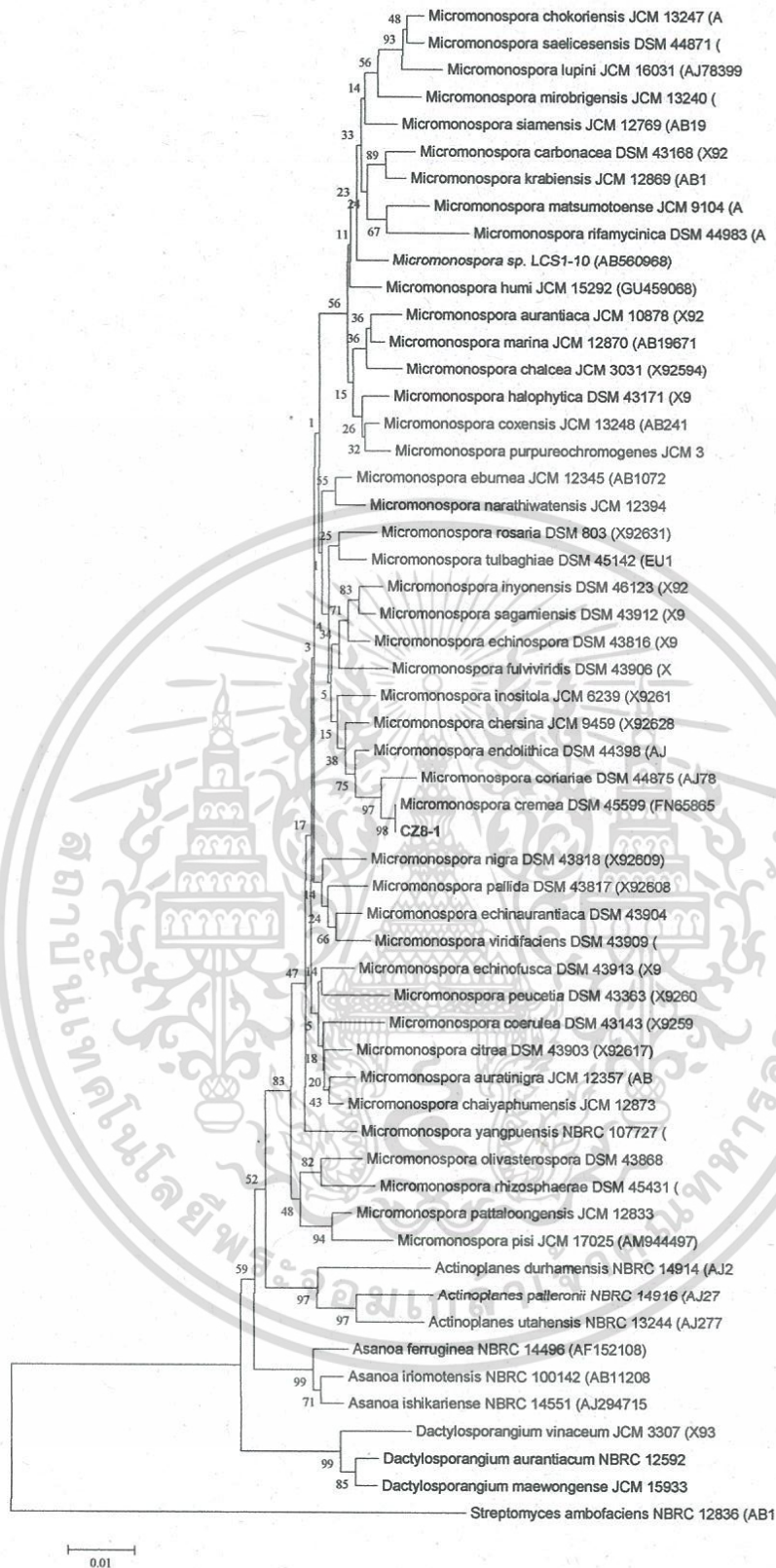
รูปที่ 3 ก แสดงลักษณะโคโลนีและการเจริญของเชื้อไอโซเลต CZ8-1 บนอาหาร ISP2
ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมีนที่มีลักษณะ *meso* (cell wall type II, peptidoglycan type A1γ) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แรมโนส และไรโบสเป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาติดีลอิโนซิทอล แมนโนไซด์ (phosphatidylinositol mannosides) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CZ8-1

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CZ8-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora cremea* DSM 45599^T มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.9 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 98 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต CZ8-1 และเชื้อ type strain ของสกุล *Micromonospora* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Micromonospora cremea*) มีค่าเท่ากับ 94.3% จากข้อมูลสามารถสรุปได้ว่าเชื้อไอโซเลต CZ8-1 เป็นเชื้อสปีชีส์เดียวกันกับ *Micromonospora cremea*



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CZ8-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสิต ที่สร้างเส้นใยอากาศและสปอร์สีขาว สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเทาเขียว ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์เป็นกลุ่มสายตรงเป็นกระจุกบนเส้นใยอาหาร เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ Oatmeal agar เชื้อในกลุ่มนี้มี 6 ไอโซเลตคือ PS42-1, PS42-2, PS42-3, PS42-4, PS42-5, PS42-9

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 1 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 30 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายแป้งและตกตะกอนในนม แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรท เจลาตินได้



รูปที่ 5 ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PS42-9 บนอาหาร ISP2
 ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)
 ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

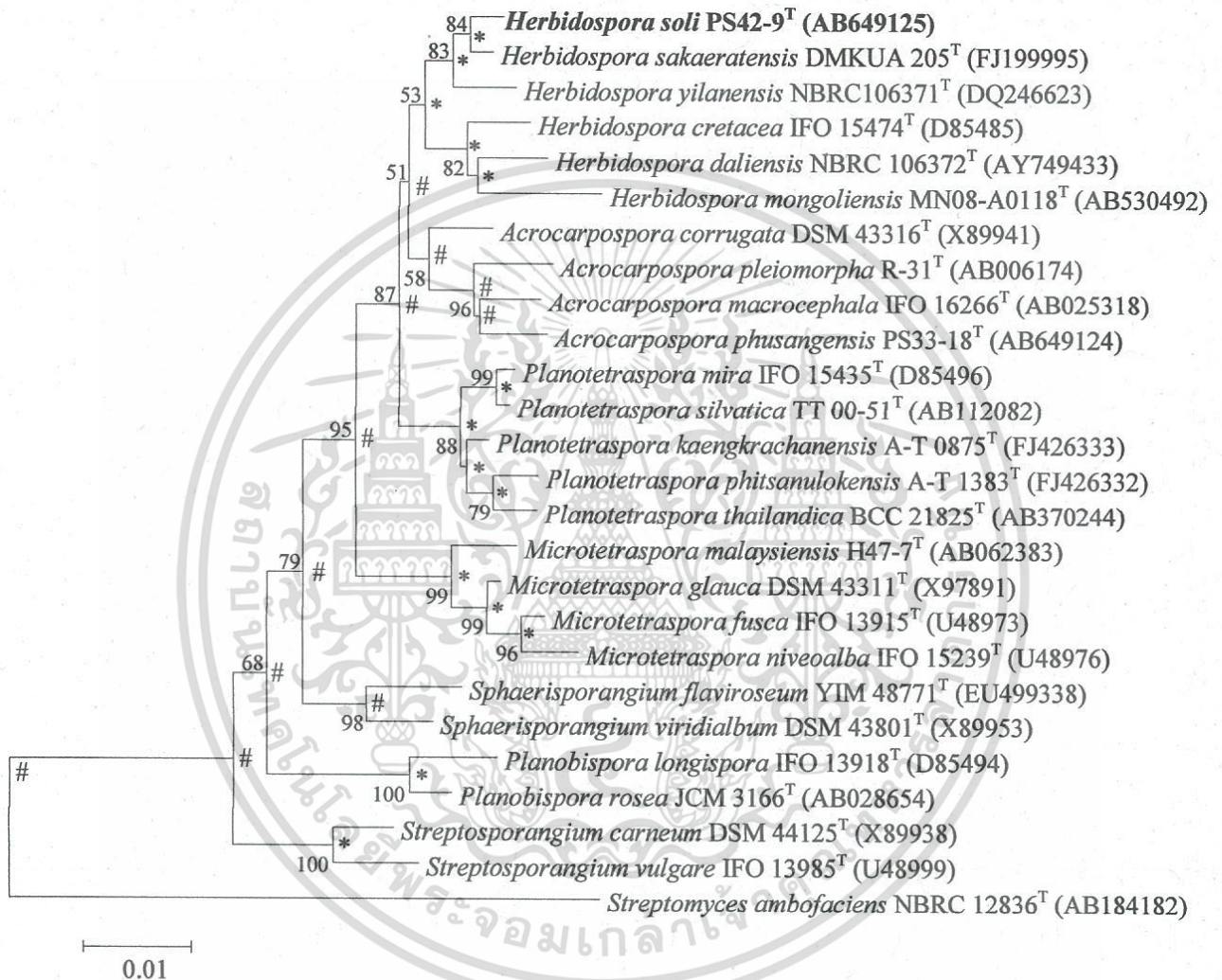
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพีมัลิกแบบ *meso* (cell wall type II) พบน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส แมนโนส มาตูโรส และไรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟดิกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลเมทิลเอทานอลามีน (phosphatidylmethylethanolamine) และไฮดรอกซีฟอสฟาติลเอทานอลามีน (Hydroxyphosphatidylethanolamine) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Herbidospora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PS42-9

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PS42-9 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *H. sakaeratensis* DMKUA 205^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.1 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 84 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต PS42-9 และเชื้อ type strain ของสกุล *Herbidospora* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Herbidospora sakaeratensis*) มีค่าเท่ากับ 39.7% จากข้อมูลสามารถสรุปได้ว่าเชื้อไอโซเลต PS42-9 เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Herbidospora* จึงได้ทำการตีพิมพ์ในวารสาร Internatioanl Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology โดยใช้ชื่อว่า *Herbidospora soli* sp. nov., isolated from soil



รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PS42-9 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสิท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมน้ำตาลอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์กลมต่อกันเป็นสายบนเส้นใยอากาศ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ Oatmeal agar เชื้อในกลุ่มนี้มี 6 ไอโซเลตคือ DH51B-4-1, DH51B-4-2, DH51B-4-3, DH51B-4-4, DH51B-4-5, DH51B-4-6

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 5 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส สามารถรีดิวซ์ไนเตรท ตกตะกอนในนม เจลาติน และนมได้ และย่อยแป้งได้



รูปที่ 7 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต DH51B-4-3 บนอาหาร ISP2
 ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

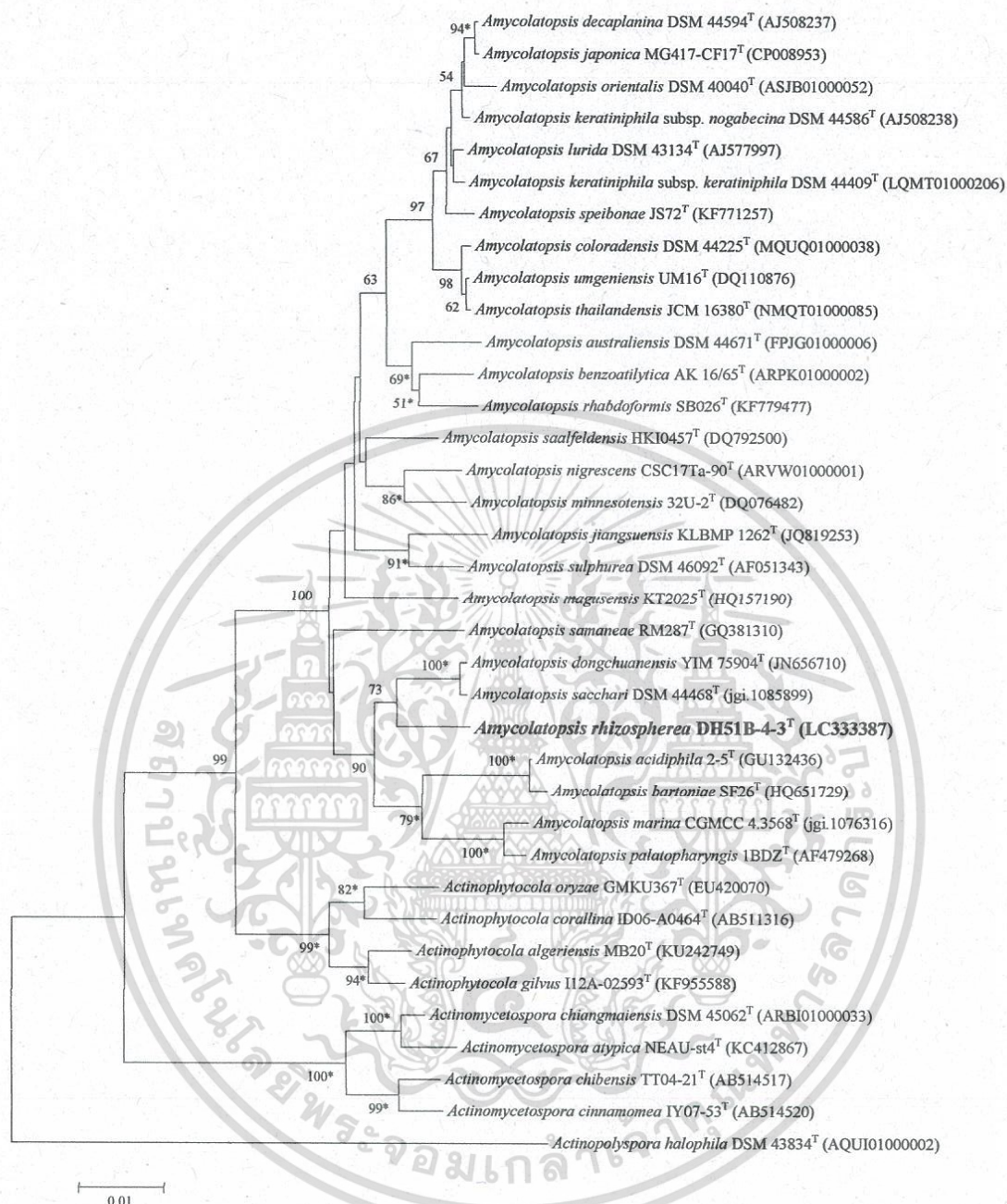
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 4

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีลักษณะ *meso* (cell wall type II) พบน้ำตาลกลูโคส แรมโนส อะราบิโนส กาแลคโตส และไรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) พบฟอสฟาติดีลเมทิลเอทานอลามีน (phosphatidylmethylethanolamine) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอินซิทอล (phosphatidylinositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Amycolatopsis*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต DH51B-4-3

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต DH51B-4-3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Amycolatopsis dongchuanensis* YIM 75904^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.06 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 73 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต DH51B-4-3 และเชื้อ type strain ของสกุล *Amycolatopsis* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Amycolatopsis dongchuanensis*) มีค่าเท่ากับ 27.1% จากข้อมูลสามารถสรุปได้ว่าเชื้อไอโซเลต DH51B-4-3 เป็นเชื้อคนละสปีชีส์กับ *Amycolatopsis dongchuanensis* จึงได้ทำการตีพิมพ์ในวารสาร International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology โดยใช้ชื่อว่า *Amycolatopsis rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rice rhizosphere soil



รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต DH51-4-3 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสีท ที่สร้างเส้นใยอากาศและสปอร์สีขาว สร้างเส้นใยอาหารสีชมพูแดง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์เป็นสายเกลียวบนเส้นใยอาหาร เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 เชื้อในกลุ่มนี้มี 2 ไอโซเลตคือ PCWR-4-5, PCWR-4-6

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-10 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส สามารถรื้อตัวขึ้นในตรรกะ ตกตะกอนในนม เจลาติน และนมได้ และย่อยแป้งได้



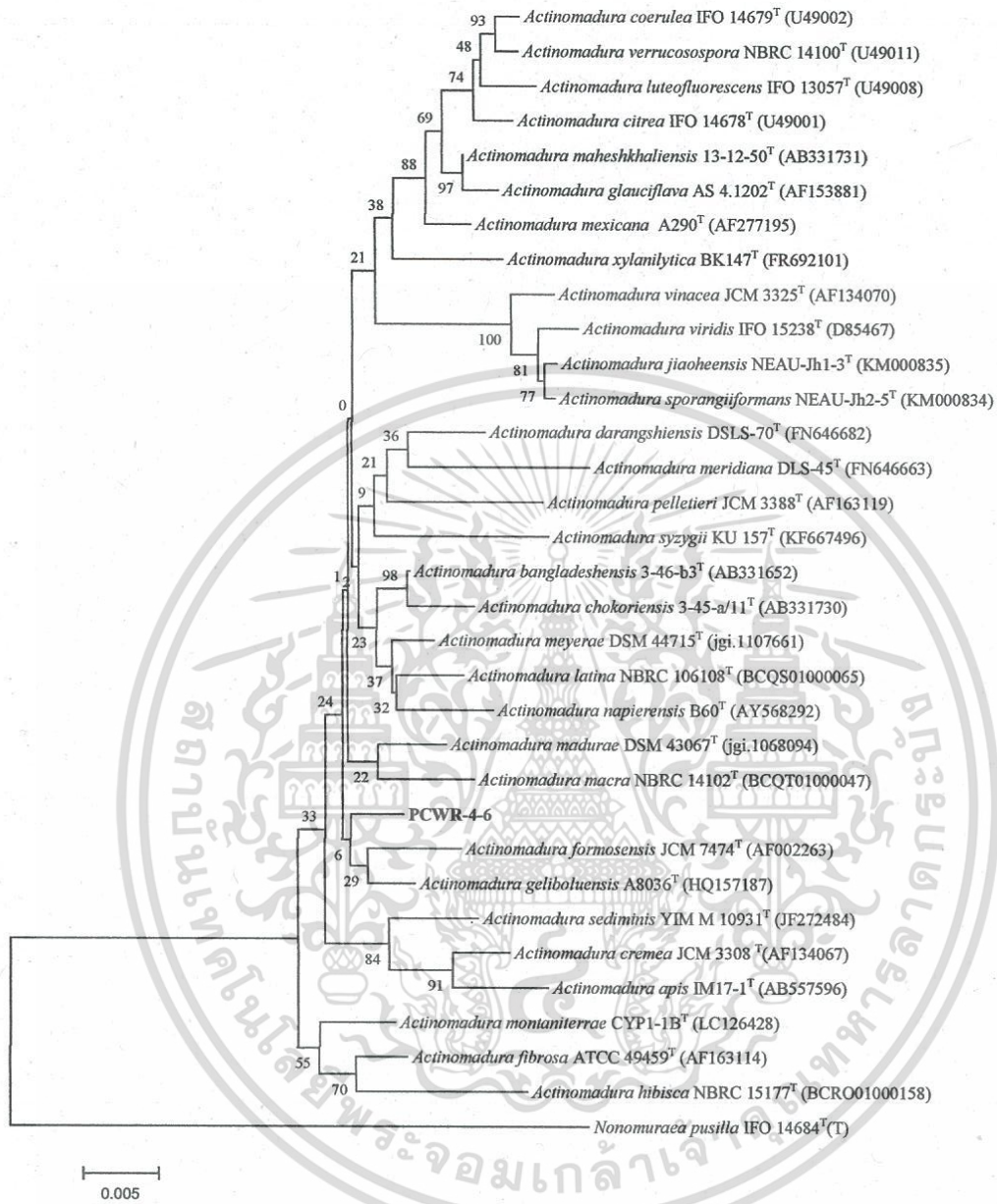
รูปที่ 9 ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 บนอาหาร ISP2
 ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)
 ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีลิพิดแบบ meso (cell wall type II) พบน้ำตาลกลูโคส แรมโนส มาดูโรส และไรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลอินซิทอล (phosphatidylinositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Actinomadura*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 พบว่าเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Actinomadura maheshkhaliensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.82 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่น้อยกว่าร้อยละ 50 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต PCWR-4-6 และเชื้อ type strain ของสกุล *Actinomadura* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Actinomadura maheshkhaliensis*) มีค่าเท่ากับ 40.1% จากข้อมูลสามารถสรุปได้ว่าเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 เป็นเชื้อคนละสปีชีส์กับ *Actinomadura maheshkhaliensis* จึงได้เตรียมทำการตีพิมพ์ในวารสาร Internatioanl Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology โดยใช้ชื่อว่า *Actinomadura rubra* sp. nov., isolated from rice rhizosphere soil.



รูปที่ 10 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
I/ZO4-1	Y.M.	ดีมาก	ขาวปนดำ	น้ำตาลอ่อน	-
	O.M.	ดีมาก	ดำ	น้ำตาลอ่อน	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาว	น้ำตาลอ่อน	-
	T.A.	น้อย	ขาว	เหลืองจาง	-
	Gly.A.	น้อย	ขาว	น้ำตาลอ่อน	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองจาง	-
	Cz.sucrose	ปานกลาง	ขาว	น้ำตาลอ่อน	-
	N.A.	ดี	ขาวปนดำ	น้ำตาลอ่อน	-
	P.I.A.	ดี	ขาวปนดำ	น้ำตาลอ่อน	-
II/CZ8-1	Y.M.	ดีมาก	-	เหลืองอมส้ม	เหลือง
	O.M.	ดีมาก	-	เหลืองอมส้ม	เหลือง
	I.S.	ดี	-	เหลืองอมส้ม	-
	T.A.	ปานกลาง	-	เหลืองอมส้ม	-
	Gly.A.	น้อย	-	เหลืองจาง	-
	Glu.A.	น้อย	-	เหลืองจาง	-
	Cz.sucrose	น้อย	-	เหลืองจาง	-
	N.A.	ดี	-	เหลืองอมส้ม	-
	P.I.A.	ปานกลาง	-	เหลืองอมน้ำตาล	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
III/PS42-9	Y.M.	ดีมาก	ขาว	เหลืองอมเทาเขียว	-
	O.M.	ดี	ขาว	เหลืองอมเทาเขียว	-
	I.S.	ดี	ขาว	เหลืองอมเทาเขียว	-
	T.A.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมเทาเขียว	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ขาวจาง	เหลืองอมเทาเขียว	-
	Glu.A.	ปานกลาง	ขาวจาง	เหลืองอมเทาเขียว	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	เหลืองอมเทาเขียว	-
	N.A.	ดี	ขาวอมชมพู	เหลืองอมเทาเขียว	-
	P.I.A.	ดี	ขาวจาง	เหลืองอมเทาเขียว	-
IV/DH51B-4-3	Y.M.	ดีมาก	ขาวอมเทา	เหลืองอมน้ำตาลอ่อน	-
	O.M.	ดี	ขาวv,gmk	น้ำตาลอ่อน	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาวอมเหลือง	เหลืองอมน้ำตาลอ่อน	-
	T.A.	ปานกลาง	ขาวอมเหลือง	เหลืองอ่อน	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ขาว	น้ำตาลอ่อน	-
	Glu.A.	น้อย	ขาวอมเหลือง	เหลืองอมน้ำตาล	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	เหลืองจาง	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาวอมเทา	เหลืองอมน้ำตาลอ่อน	-
	P.I.A.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมน้ำตาลอ่อน	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สิ่งควัดดู
V/PCWR- 4-6	Y.M.	ดี	ขาว	ชมพูแดง	-
	O.M.	ดี	ขาว	ชมพูแดง	-
	I.S.	ดี	ขาว	ชมพูแดง	-
	T.A.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมชมพู	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมชมพู	-
	Glu.A.	น้อย	ขาว	เหลืองอมชมพู	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	เหลืองอมชมพู	-
	N.A.	ดี	ขาวอมชมพู	ชมพูแดง	-
	P.I.A.	ปานกลาง	ขาวอมชมพู	ชมพูแดง	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทีในแต่ละไอโซเลต

แหล่งคาร์บอน	กลุ่มที่ 1																											
	Z04-1	Z04-2	Z04-3	Z04-4	Z04-5	Z04-6	Z04-7	Z04-8	Z04-9	Z04-10	Z04-11	Z04-12	Z04-13	Z04-14	Z04-15	Z04-16	Z04-17	Z04-18	Z04-19	Z04-20	Z04-21	Z04-22	Z04-23	Z04-24	Z04-25	Z04-26	Z04-27	Z04-28
Acid production from :																												
D-Mannitol	W	-	W	W	-	-	-	W	-	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	+	W	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	W	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทีในแต่ละไอโซเลต (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	กลุ่มที่															
	3						4						5			
Acid production from :																
D-Mannitol	+						+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
D-Ribose	-						-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
L-Rhamnose	+						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	-						-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D-Raffinose	-						-	-	-	-	-	-	W	W	W	W
Glycerol	W						W	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Salicin	-						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-						-	-	-	-	-	-	W	W	W	W
D-Galactose	+						+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L-Arabinose	-						-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Cellobiose	+						W	+	+	+	+	+	-	-	-	-
D-Fructose	W						+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
D-Xylose	+						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากน้ำหมักเชื้อแอสกีโนมัยสียที่คัดเลือก

จากเชื้อแอสกีโนมัยสียทั้งหมด 71 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแอสกีโนมัยสียกลุ่มที่ 2 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี จึงได้นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Agar Disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาดดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ดังแสดงในตาราง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์โดยวิธี Agar disc diffusion

เชื้อกลุ่มที่	สารสกัดหยาบส่วนเอทิลอะซิเตต (ETOAc) (1 มก/ดิส)	บริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone, mm*)					
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	MRSA	<i>Candida albicans</i>
	Z04-1	-	-	-	-	-	-
	Z04-2	-	-	-	-	-	-
	Z04-3	-	-	-	-	-	-
	Z04-4	-	-	-	-	-	-
	Z04-5	-	-	-	-	-	-
	Z04-6	-	-	-	-	-	-
	Z04-7	-	-	-	-	-	-
	Z04-8	-	-	-	-	-	-
	Z04-9	-	-	-	-	-	-
	Z04-10	-	-	-	-	-	-
	Z04-11	-	-	-	-	-	-
	Z04-12	-	-	-	-	-	-
	Z04-13	-	-	-	-	-	-
	Z04-14	-	-	-	-	-	-
	Z04-15	-	-	-	-	-	-
	Z04-16	-	-	-	-	-	-
	Z04-17	-	-	-	-	-	-
	Z04-18	-	-	-	-	-	-
	Z04-19	-	-	-	-	-	-
	Z04-20	-	-	-	-	-	-
	Z04-21	-	-	-	-	-	-
	Z04-22	-	-	-	-	-	-
	Z04-23	-	-	-	-	-	-
	Z04-24	-	-	-	-	-	-
	Z04-25	-	-	-	-	-	-
	Z04-26	-	-	-	-	-	-
	Z04-28	-	-	-	-	-	-

1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์โดยวิธี Agar disc diffusion

เชื้อกลุ่มที่	สารสกัดหยาบส่วนเอธิลอะซีเตต (EtOAc) (1 มก/มล)	บริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone, mm*)					
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	MRSA	<i>Candida albicans</i>
	CZ8-1	25	31	27	-	-	-
	CZ8-2	19	33	28	-	-	-
	CZ8-3	25	29	24	-	-	-
	CZ8-4	22	32	28	-	-	-
	CZ8-5	20	30	18	-	-	-
	CZ8-6	21	32	28	-	-	-
	CZ8-7	20	30	22	-	-	-
	CZ8-8	25	32	24	-	-	-
	CZ8-9	20	29	23	-	-	-
	CZ8-10	24	32	21	-	-	-
	CZ8-11	23	29	21	-	-	-
	CZ8-12	18	30	28	-	-	-
	CZ8-13	24	32	27	-	-	-
	CZ8-14	20	29	27	-	-	-
	CZ8-15	20	32	26	-	-	-
	CZ8-16	25	30	26	-	-	-
	CZ8-17	25	30	27	-	-	-
	CZ8-18	25	32	28	-	-	-
	CZ8-19	24	30	29	-	-	-
	CZ8-20	25	29	29	-	-	-
	CZ8-21	25	30	28	-	-	-
	CZ8-22	21	30	26	-	-	-
	CZ8-23	21	29	24	-	-	-
	CZ8-24	21	32	21	-	-	-
	CZ8-25	25	32	22	-	-	-
	CZ8-27	22	31	22	-	-	-
	CZ8-29	15	32	24	-	-	-

2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ โดยวิธี Agar disc diffusion

ชื่อกลุ่ม ที่	สารสกัดหยาบส่วนเอธิลอะ ซีเตต (EtOAc) (1 มก/มล)	บริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone, mm*)					
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	MRSA	<i>Candida albicans</i>
3	PS42-1	-	-	-	-	-	-
	PS42-2	-	-	-	-	-	-
	PS42-3	-	-	-	-	-	-
	PS42-4	-	-	-	-	-	-
	PS42-5	-	-	-	-	-	-
4	PS42-9	-	-	-	-	-	-
	CZ8-7	-	-	-	-	-	-
	CZ8-8	-	-	-	-	-	-
	CZ8-9	-	-	-	-	-	-
	CZ8-10	-	-	-	-	-	-
5	CZ8-11	-	-	-	-	-	-
	CZ8-12	-	-	-	-	-	-
	CZ8-13	-	-	-	-	-	-
	CZ8-14	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างตะกอนดินจากบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์ สามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลต ได้ทำการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ลักษณะ สัณฐานวิทยา การเจริญ สรีระวิทยา ชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอกติโนมัยซีทหายากออกเป็น 4 กลุ่ม คัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาศึกษาลักษณะทางเคโมไทป์ และจีโนไทป์ พบว่า

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวและจะกลายเป็นสีน้ำตาลอมดำเมื่ออายุมากขึ้น สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอ่อน สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์สายเกลียวยาว มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Streptomyces*

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศแต่สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองส้ม สร้างรงควัตถุสีเหลืองในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหารโดยตรง มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Micromonospora*

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีท ที่สร้างเส้นใยอากาศและสปอร์สีขาว สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมเทาเขียว ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์เป็นกลุ่มสายตรงเป็นกระจุกบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Herbidospora*

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมน้ำตาลอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์กลมต่อกันเป็นสายบนเส้นใยอากาศ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Amycolatopsis*

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีท ที่สร้างเส้นใยอากาศและสปอร์สีขาว สร้างเส้นใยอาหาร สีชมพู แดง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์เป็นสายเกลียวบนเส้นใยอาหาร มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Actinomadura*

จากเชื้อแอกติโนมัยซีทข้างต้น พบว่าเชื้อไอโซเลต PS42-9, DH51B-4-3 และ PCWR-4-6 มีความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ใกล้เคียงกับ *Herbidospora sakaeratensis* *Amycolatopsis dongchuanensis* *Actinomadura maheshkhaliensis* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.1 98.06 98.87 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 84 73 และ 50 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์และจีโนไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลต PS42-9, DH51B-4-3 และ PCWR-4-6 นี้เป็นเชื้อ สปีชีส์ใหม่ในสกุล *Herbidospora* *Amycolatopsis* และ *Actinomadura* โดยให้ชื่อว่า *Herbidospora soli* sp. nov., *Amycolatopsis rhizosphaerae* sp. nov. และ *Actinomadura rubra* sp. nov. ตามลำดับ

การศึกษากฎทางชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 71 ไอโซเลต ด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus*

luteus ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ MRSA พบว่า สิ่งสกปรกหลายชนิดในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อกลุ่มที่ 2 แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่

จากข้อมูลทั้งหมดทำให้ทราบว่าดินจากอุทยานแห่งชาติภูซาง จังหวัดพะเยาและเอนโดไฟติกแอกติโนมัยสปีทที่แยกจากเนื้อเยื่อขิงและวุ้นขี้มดลูก มีคุณค่าในเชิงความหลากหลายของเชื้อแอกติโนมัยสปีทที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี การทดลองต่อไปจึงควรค้นหาเชื้อในบริเวณอื่นที่ยังไม่สำรวจ ซึ่งอาจทำให้พบแอกติโนมัยสปีทที่มีความแตกต่างจากแอกติโนมัยสปีทเดิมและอาจสร้างสารที่มีโครงสร้างทางเคมีแปลกใหม่ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลผลิตจากงานวิจัย (Output)

บทความวิจัย

1. Niemhom, N., Thawai, C. 2017. *Herbidospora soli* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (In press) (Impact factor = 2.14)
2. Thawai, C. 2017. *Amycolatopsis rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rice rhizosphere soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (In press) (Impact factor = 2.14)
3. Thawai, C. 2017. *Actinomadura rubra* sp. nov., isolated from rice rhizosphere soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (Submitted) (Impact factor = 2.14)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- Chao, L., Qiong, Y. X., Tao, D. Z., Xing, Z. L., Ru, C. Y., Hua, X. L., Bin, Y. Y. 2011. Cyclodipeptides from the Secondary Metabolites of Two Novel Actinomycetes. *Chi. J. Nat. Med.* 9,78-80.
- Duangmal, K., Mingma, R., Pathom-aree, W., Thamchaipenet, A., Inahashi, Y., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2011. *Amycolatopsis samanae* 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.
- Huang, S. X., Yu, Z., Robert, F., Zhao, L. X., Jiang, Y., Duan, Y., Pelletier, J. and Shen, B. 2011. Cycloheximide and congeners as inhibitors of eukaryotic protein synthesis from endophytic actinomycetes *Streptomyces* spp. YIM56132 and YIM56141. *J. Antibiot.* 64, 163-166.
- 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., Matsumoto, A., Ōmura, 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., Thamchaipenet, A., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Duangmal, K. and Takahashi, Y. 2011. *Actinoalltomurus oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from roots of a Thai jasmine rice plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61, 737-741.
- 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.

- Kaewkla, O. and Franco, C. M. M. 2010. *Pseudonocardia adelaidensis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of a grey box tree (*Eucalyptus microcarpa*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 105-109.
- Kirby, B. M. and Meyers, P. R.. 2010. *Micromonospora tulbaghia* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1328-1333.
- Li, J., Zhao, G. Z., Chena, H. H., Qin, S., Xu, L. H., Jiang, C. L. and Li, W. J. 2008. *Rhodococcus cercidiphylli* sp. nov., a new endophytic actinobacterium isolated from a *Cercidiphyllum japonicum* leaf. *Syst Appl Microbiol.* 31, 108-113.
- Liu, N., Wang, H., Liu, M., Gu, Q., Zheng, W., and Huang, Y. 2009. *Streptomycesalni* sp. nov., a daidzein-producing endophyte isolated from a root of *Alnus nepalensis* D. Don. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 254-258.
- 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.
- 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.
- 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.
- Thamchaipenat, 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
- Tuntiwachwuttikul, P., Taechowisan, T., Wanbanjob, A., Thadaniti, T. and Taylor, W. C. 2008. Lansai A-D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC1. *Tetrahedron* 64 (2008) 7583-7586.
- Yu, Z., Zhao, L. X., Jiang, C. L., Duan, Y., Wong, L., Carver, K. C., Schuler, L. A. and Shen, B. 2011. Bafilomycins produced by an endophytic actinomycete *Streptomyces* sp. YIM56209. *J. Antibiot.* 64, 159-162.

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดต่อไปนี้เตรียมโดยใช้น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร อาหารส่วนใหญ่หนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำร้อน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นการเตรียมน้ำตาลในการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยใช้ความร้อนฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1. Sodium-caseinate agar (SCN)

Sodium caseinate	0.2	กรัม
Glucose	0.1	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.02	กรัม
MgSO ₄	0.02	กรัม
Agar	1.5-1.8	กรัม

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

Yeast extract	0.4	กรัม
Malt extract	1.0	กรัม
Glucose	0.4	กรัม
Agar	1.5	กรัม
pH 7.3		

3. Oatmeal agar, ISP medium no. 3

Oatmeal	2.0	กรัม
Agar	1.8	กรัม

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

Soluble starch	1.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.1	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1	กรัม
NaCl	0.1	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2	กรัม
CaCO_3	0.2	กรัม
Trace salts solution (A)	0.1	มิลลิลิตร
Agar	2.0	กรัม
pH 7.0-7.4		

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

Glycerol	1.0	กรัม
L-Asparagine	0.1	กรัม
K_2HPO_4	0.1	กรัม
Trace salts solution (A)	0.1	มิลลิลิตร
Agar	2.0	กรัม

6. Tyrosine agar, ISP medium no. 7

Glycerol	1.5	กรัม
L-Tyrosine (Difco)	0.05	กรัม
L-Asparagine (Difco)	0.1	กรัม
K_2HPO_4	0.05	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
NaCl	0.05	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
Trace salts solution (A)	0.1	มิลลิลิตร
Agar	2.0	กรัม
pH 7.2-7.4		

Trace salt solution (A)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. Peptone KNO₃ broth

Peptone	1.0	กรัม
KNO ₃	0.1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
pH 7.0		

8. Carbon utilization medium, ISP medium no. 9

Carbohydrate	1.0	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.264	กรัม
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.565	กรัม
KH ₂ PO ₄ anhydrous	0.238	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	กรัม
Pridham and Gottlieb trace salts (B)	0.1	มิลลิลิตร
Agar	1.5	กรัม
pH 6.8-7.0		
Trace salts solution (B)		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.64	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.11	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.79	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.15	กรัม

9. Boullion gelatin broth

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. Peptonization and Coagulation test medium

Skim milk (Difco)	10.0	กรัม
-------------------	------	------

11. Mueller-Hinton agar (Difco)

Beef infusion from	30	กรัม
Casamino acid, Technical	1.75	กรัม
Starch	0.15	กรัม
Agar	1.7	กรัม
pH 7.3		

12. Sabouraud's dextrose agar (Difco)

Neopeptone	1.0	กรัม
Dextrose	4.0	กรัม
Agar	1.5	กรัม
pH 5.6-5.8		

13. Seed medium

Yeast extract	0.4	กรัม
Glucose	0.4	กรัม
Malt extract	1.0	กรัม
pH 7.3		

14. Production medium

Yeast extract	0.4	กรัม
Glucose	0.4	กรัม
Malt extract	1.0	กรัม
CaCO ₃	0.1	กรัม
pH 7.3		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. Peptone-yeast extract iron agar

Bacto-Peptone Iron Agar, dehydrated (Difco)	3.6	กรัม
Bacto-Yeast Extract (Difco)	0.1	กรัม
pH 7.0-7.2		

16. Glucose asparagines agar

Glucose	1	กรัม
Asparagine	0.05	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.05	กรัม
Bacto-agar	1.5	กรัม
pH 6.8-7.0		

17. Nutrient agar

Meat extract	1	กรัม
Peptone	1	กรัม
NaCl	0.1-0.2	กรัม
Agar	1.5	กรัม

18. Czapek's sucrose agar

Sucrose	3	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.1	กรัม
MgSO ₄	0.05	กรัม
KCl	0.05	กรัม
FeSO ₄	0.001	กรัม
Agar	1.5-1.7	กรัม
pH 7.0-7.2		

19. phosphate buffer

KH ₂ PO ₄	0.680	กรัม
Na ₂ HPO ₄	0.71	กรัม
DW.	1	ลิตร

**ใช้ KH₂PO₄ เป็นตัวปรับพีเอช

20. Humic acid Vitamin Agar

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

เกลือ 3 เปอร์เซ็นต์

** Humic acid ละลายใน 10 มล. 0.2N NaOH

**Vitamin B

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Herbidospora soli sp. nov., isolated from soil

Nantawan Niemhom¹ and Chitti Thawai^{1,2,*}

Abstract

A novel actinomycete strain PS42-9^T, which formed short chains of spores borne on the tip of long sporophores arising from the substrate mycelium, was isolated from soil in Phu-Sang National Park, Phayao province, Thailand. The isolate contained meso-diaminopimelic acid in the cell-wall peptidoglycan. The whole-cell sugars of strain PS42-9^T were glucose, madurose, mannose, rhamnose and ribose. The characteristic phospholipids were phosphatidylethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine, hydroxyphosphatidylethanolamine and ninhydrin-positive glycopospholipids. The major menaquinone was MK-10(H₄). The main cellular fatty acids were C_{17:1ω8c} and C_{17:0}. The G+C content of the genomic DNA was 71.5 mol%. Phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequences revealed that strain PS42-9^T should be classified in the genus *Herbidospora* and was closely related to *Herbidospora sakaeratensis* DMKUA 205^T (99.10%) and *Herbidospora yilanensis* NBRC 106371^T (98.61%). The result of DNA-DNA hybridization and some physiological and biochemical properties indicated that strain PS42-9^T could be readily distinguished from its closest phylogenetic relatives. On the basis of these phenotypic and genotypic data, this strain represents a novel species, for which the name *Herbidosporasoli* sp. nov. is proposed. The type strain is PS42-9^T (=BCC 46909^T=NBRC 108780^T).

The genus *Herbidospora* [1] is a member of the actinomycetes which produce short chains of spores borne on the tip of long sporophores arising from the substrate mycelium, and belongs to the family *Streptosporangiaceae*. The type species is *Herbidospora cretacea*. Generally, this genus exhibits meso-diaminopimelic acid in the peptidoglycan, madurose as a characteristic sugar in whole-cell hydrolysates and phosphatidylethanolamine as the diagnostic phospholipid in membrane. At the present time, the genus *Herbidospora* contains five species: *Herbidospora cretacea* [1]; *Herbidospora yilanensis* and *Herbidospora daliensis* [2]; *Herbidospora sakaeratensis* [3] and *Herbidospora mongoliensis* [4]. Members of the genus *Herbidospora* are commonly found in soil [2–4]. During investigation of novel actinomycetes from soil samples in the northern area of Thailand, we isolated a strain, PS42-9^T, exhibiting morphological and chemotaxonomic characteristics typical of the members of the genus *Herbidospora* but which was genotypically and phenotypically distinguishable from all type strains of the genus *Herbidospora* species. Thus, the polyphasic characterization of strain PS42-9^T is presented.

Strain PS42-9^T was isolated from a soil sample collected from the Phu-Sang National Park in Phayao province, Thailand. The soil sample was air-dried at room temperature for 14 days. The dried soil sample was then ground and heated

at 100 °C for 1 h. The treated soil was serially diluted to 10⁻³ concentration in 0.01 % sterile sodium lauryl sulfate in distilled water and spread on humic acid-vitamin (HV) agar [5] supplemented with 50 mg l⁻¹ nalidixic acid and 50 mg l⁻¹ nystatin. The colony of actinomycetes was purified on yeast extract-malt extract agar (International *Streptomyces* Project, ISP; ISP2 medium) [6]. The pure culture was preserved by freeze-drying.

To observe the morphology, strain PS42-9^T was cultivated on soil extract agar at 30 °C for 30 days. First, the colonies of this strain were 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.* [7].

In order to determine the phenotypic characteristics, several ISP media (ISP 2–7), glucose-asparagine agar (ISP 5 with 1 % glucose replacing glycerol), Czapek's sucrose agar [6, 8] and nutrient agar (Difco) were used in the study of cultural characteristics. ISCC-NBS Colour Chart standard sample no. 2106 was used for determining the colour of substrate mycelium, aerial mycelium and spores [9]. The standard method of Arai [10] and Williams and Cross [11] were chosen for testing nitrate reduction and the decomposition of

Author affiliations: ¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand;

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

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

Keywords: *Herbidospora soli* sp. nov.; actinomycetes; 16S rRNA gene.

The DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain PS42-9^T is AB649125.

Two supplementary tables and four supplementary figures are available with the online Supplementary Material.

gelatin, starch and casein. The temperature (10, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 45 and 50 °C), NaCl (0, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 % w/v) and pH (4–11, interval of 1 pH unit) tolerances for growth were determined on ISP 2 agar for 14 days. Utilization of carbon sources was performed on ISP 9 supplemented with 1 % carbon sources at 30 °C for 14 days. The results are shown in the species description and Table 1.

Biomass used for chemotaxonomic analyses was obtained from cell culture 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 was analysed using the protocol of Hasegawa *et al.* [12]. The determination of the acyl type of muramic acid in the peptidoglycan was conducted by following the method of Uchida and Aida [13]. The whole-cell sugars were evaluated using the method of Komagata and Suzuki [14]. The polar lipids in the cell membrane were extracted and analysed by the methods proposed by Minnikin *et al.* [15]. The fatty acid composition was investigated by using a gas chromatograph (GC) and fatty acid methyl ester extraction was performed and analysed using the standard MIDI protocol [16, 17] with the TSBA6 MIDI database. Mycolic acids were determined using the method suggested by Minnikin *et al.* [18]. To evaluate menaquinones, freeze-dried cells of strain PS42-9^T were extracted by the method of Collins *et al.* [19] and analysed by high-performance liquid chromatography [20].

Table 1. Differential characteristics of strain PS42-9^T and the closest phylogenetic relative, *H. sakaeratensis* NBRC 102641^T and *H. yilanensis* NBRC106371^T

All other phenotypic data were determined in this study. +, Positive; –, negative; w, weakly positive; Glu, glucose; Gal, galactose; Rha, rhamnose; Rib, ribose; Mad, madurose; Man, mannose.

Characteristic	Strain PS42-9 ^T	<i>H. sakaeratensis</i> NBRC102641 ^T	<i>H. yilanensis</i> NBRC 106371 ^T
Whole-cell sugar	Glu, Rha, Rib, Mad, Man	Glu, Rib, Mad, Man*	Glu, Gal, Rib, Mad, Man†
The presence of hydroxyl-phosphatidylethanolamine	+	–*	–†
Gelatin liquefaction	–	–	+
Maximum NaCl tolerance (% w/v)	1	1.5	1
Maximum temperature for growth (°C)	30	40	40
The pH range for growth	6–9	6–9	6–10
Carbon utilization:			
L-Arabinose	w	+	–
L-Rhamnose	w	–	+
Cellobiose	+	w	–
D-Xylose	w	+	–
Glycerol	w	–	+
Sucrose	w	+	+

*Data for the reference species were taken from Boondaeng [3].

†Data for the reference species were taken from Tseng [2].

The method of Tamaoka [21] was used for genomic DNA extraction. The 16S rRNA gene amplification and sequencing were conducted according to the procedure described by Thawai [22]. The G+C content of the genomic DNA was judged by the standard method of Tamaoka and Komagata [23] with Lambda DNA (Invitrogen) used as the control. The DNA–DNA hybridization was done by following the procedure described by Ezaki *et al.* [24].

The 16S rRNA gene sequence similarity value of strain PS42-9^T (1450 bp) was calculated based on pairwise alignment using the EzBioCloud server (www.ezbiocloud.net/) [25]. The 16S rRNA gene sequences of strain PS42-9^T and all type strains of the genus *Herbidospora* were aligned using CLUSTAL W multiple alignment mode within BioEdit program version 7.1.3.0 [26]. The phylogenetic dendrograms between strain PS42-9^T and the closely related strains were reconstructed using the neighbour-joining (NJ) [27], maximum-likelihood (ML) [28] and maximum-parsimony (MP) methods [29] in the MEGA 6 software [30]. A distance matrix was computed by using Kimura's two-parameter model [31]. The complete deletion option was chosen before reconstructing the topology of the tree. The stability of the topology of the phylogenetic tree was evaluated using the bootstrap method with 1000 repetitions [32].

Strain PS42-9^T grew well on ISP 2, ISP 3 and ISP 7, moderately on ISP 5, weakly on ISP 4, ISP 6, Czapek's sucrose agar, glucose–asparagine agar and nutrient agar. The colour of substrate hyphae on these media was greyish greenish yellow. White spore masses formed on ISP 2, ISP 3, ISP 4, ISP 5, ISP 7 and Czapek's sucrose agar. Soluble pigments were not produced on any of the media tested. Strain PS42-9^T formed a group of short chains of spores borne on the tip of long sporophores arising from the substrate mycelium on soil extract agar at 30 °C for 30 days (Fig. S1, available in the online Supplementary Material). The morphological characteristics of this strain are similar to those of the genus *Herbidospora* [1].

The cell walls of strain PS42-9^T contained *meso*-diaminopimelic acid as the diagnostic diamino acid. The acyl type of the cell-wall muramic acid was *N*-acetyl. The reducing sugars in whole-cell hydrolysates were glucose, madurose, mannose, rhamnose and ribose. These sugars, with the exception of rhamnose, were observed in all members of the genus *Herbidospora* [1–4]. The predominant menaquinone was MK-10(H₄), while MK-10(H₆) was detected as a minor component (89:11). This result was identical to several *Herbidospora* species [1, 3, 4]. The major cellular fatty acids (≥5 %) were C_{17:1}ω8c, C_{17:0}, 10-methyl-C_{17:0}, C_{16:0} and iso-C_{16:0} (Table S1). Mycolic acids were absent. The polar lipid profile was characterized by the presence of phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylmethylethanolamine (PME), hydroxyphosphatidylethanolamine (OH-PE) and ninhydrin-positive glycopospholipids (Fig. S2). Three types of phospholipids, PE, PME and ninhydrin-positive glycopospholipids, were generally found in the members

of the genus *Herbidospora* [1–4]. In contrast, OH-PE was especially detected in strain PS42-9^T. The G+C content of the genomic DNA was 71.5 mol%. Chemotaxonomic characteristics of strain PS42-9^T were similar to those of members of the genus *Herbidospora*.

An almost-complete 16S rRNA gene sequence was obtained for strain PS42-9^T (1450 nt). The result of 16S rRNA gene sequence analysis showed that the strain exhibited a close relationship with members of the family *Streptosporangiaceae* and the strain formed a separate line of descent in the phylogenetic cluster of the genus *Herbidospora* (Fig. 1). The relationship between strain PS42-9^T and all type strains of the genus *Herbidospora* was supported by the results from the NJ, MP (Fig. S3) and ML methods (Fig. S4). 16S rRNA gene sequence similarity values showed that strain PS42-9^T was closely related phylogenetically to *H. sakaeratensis* DMKUA 205^T (99.10%), *H. yilanensis* NBRC 106371^T (98.61%), *H. cretacea* IFO 15474^T (97.98%), *H. daliensis* NBRC 106372^T (97.71%) and *H. mongoliensis* MN08-A0118^T (96.71%). Based on the morphological, chemotaxonomic and phylogenetic data, this strain should be classified in the genus *Herbidospora*.

Strain PS42-9^T could be differentiated from the closely related species, *H. sakaeratensis* and *H. yilanensis*, on the basis of several phenotypic differences, i.e. the ability to liquefy gelatin, the maximum temperature for growth, the maximum NaCl tolerance, the pH range for growth and utilization of L-arabinose, L-rhamnose, cellobiose, D-xylose, glycerol and sucrose. Furthermore, DNA–DNA relatedness values between strain PS42-9^T and these two closely related species ranged from 31.5±4.3–39.7±3.8%, which is well below 70% cut-off point recommended for the assignment of bacterial strains to the same genomic species [33] (Table S2).

Base on the polyphasic evidence, PS42-9^T should be assigned in the genus *Herbidospora* as *Herbidospora soli* sp. nov. The type strain is PS42-9^T (=BCC 46909^T=NBRC 108780^T).

DESCRIPTION OF HERBIDOSPORA SOLI SP. NOV.

Herbidospora soli (so'li. L. neut. gen. n. soli of soil, referring to the soil as the isolation source).

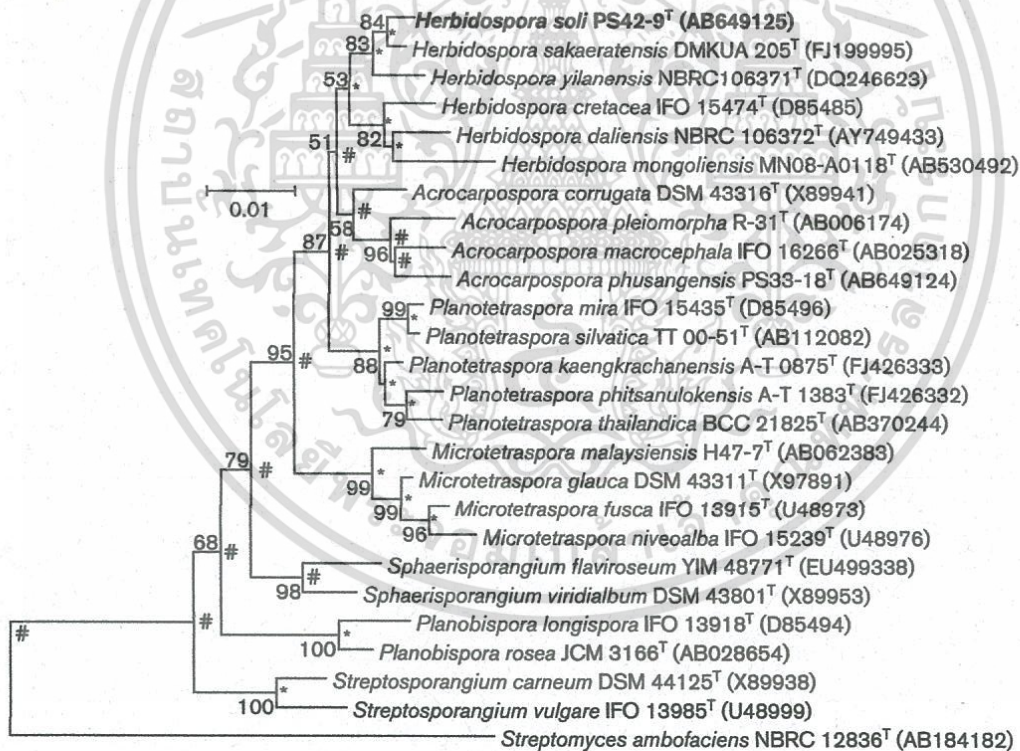


Fig. 1. Neighbour-joining tree [27] based on almost-complete 16S rRNA gene sequences (1450 nt) showing the relationships between strain PS42-9^T, the *Herbidospora* species with validly published names and members of the genera *Acrocarpospora*, *Planotetraspora*, *Microtetraspora*, *Planobispora*, *Sphaerisporangium* and *Streptosporangium*. *Streptomyces ambofaciens* was used as an outgroup. Asterisks (*) indicate 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 the maximum-parsimony method. The numbers on the branches indicate the percentage bootstrap values of 1000 replicates; only values ≥50% are indicated. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

A Gram-stain-positive, mesophilic actinomycete that forms short chains of spores borne on the tip of long sporophores arising from the substrate mycelium. No soluble pigment is produced in test culture media. Peptonization of milk and hydrolysis of starch are positive. Gelatin liquefaction and nitrate reduction are negative. Utilizes cellobiose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-mannose and mannitol as sole carbon sources; weakly utilizes L-arabinose, L-rhamnose, glycerol, sucrose and xylose as sole carbon sources, but not D-ribose, melibiose, raffinose, D-salicin, myo-inositol and lactose. The temperature for growth is between 15 and 30 °C. The optimum temperature for growth is 30 °C. The maximum NaCl concentration for growth is 1 % (w/v). The pH range for growth is 6–9. The cell-wall peptidoglycan contains meso-diaminopimelic acid. The acyl type of the cell-wall muramic acid is N-acetyl. The predominant menaquinone is MK-10(H₄); MK-10(H₆) is present as a minor component. The characteristic whole-cell sugars are glucose, madurose, mannose, rhamnose and ribose. The polar lipid profile contains phosphatidylethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine, hydroxyphosphatidylethanolamine and ninhydrin-positive glycerophospholipids as diagnostic polar lipids. The major fatty acids (>10 %) are C_{17:1}ω8c and C_{17:0}, while 10-methyl-C_{17:0}, C_{16:0}, iso-C_{16:0}, 2OH-C_{15:0}, 2OH-C_{17:0}, C_{13:0}, C_{14:0}, 2OH-C_{16:0}, iso-C_{15:0}, C_{18:1}ω9c, iso-C_{17:0}, C_{18:0}, C_{16:1}ω7c, 10-methyl-C_{18:0}, TBSA, 10-methyl-C_{16:0} and iso-C_{14:0} are detected as minor components. Mycolic acids are absent.

The type strain is PS42-9^T (=BCC 46909^T=NBRC 108780^T), which was isolated from soil of the Phu-Sang National Park in Phayao Province, Thailand. The DNA G+C content of the type strain is 71.5 mol%.

Funding information

This research was supported by the office of the National Research Council of Thailand (NRCT).

Acknowledgements

We 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

- Kudo T, Itoh T, Miyadoh S, Shomura T, Seino A. *Herbidospira* gen. nov., a new genus of the family Streptosporangiaceae Goodfellow et al. 1990. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:319–328.
- Tseng M, Yang SF, Yuan GF. *Herbidospira yilanensis* sp. nov. and *Herbidospira daliensis* sp. nov., from sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;60:1168–1172.
- Boondaeng A, Suriyachadkun C, Ishida Y, Tamura T, Tokuyama S et al. *Herbidospira sakaeratensis* sp. nov., isolated from soil, and reclassification of *Streptosporangium claviforme* as a later synonym of *Herbidospira cretacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61:777–780.
- Ara I, Tsetseg B, Daram D, Suto M, Ando K. *Herbidospira mongoliensis* sp. nov., isolated from soil, and reclassification of *Herbidospira osyris* and *Streptosporangium claviforme* as synonyms of *Herbidospira cretacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;62:2322–2329.
- 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.
- 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. 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.
- 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: 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, Katayama-Fujimura Y, Kuraishi H. Analysis of bacterial menaquinone mixtures by high performance liquid chromatography. *J Appl Bacteriol* 1983;54:31–36.
- 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.

27. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.
28. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 1981;17:368–376.
29. Fitch WM. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* 1972;20:406–416.
30. 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.
31. 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.
32. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
33. 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

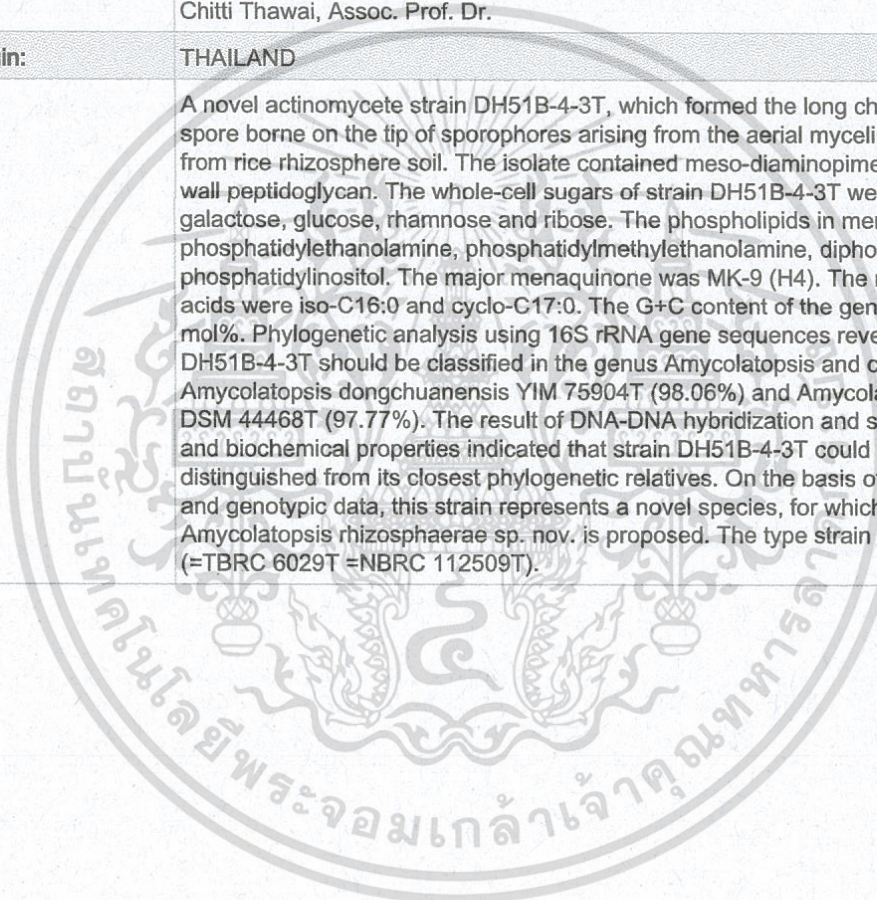
1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
Amycolatopsis rhizosphaerae sp. nov., isolated from rice rhizosphere soil
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	IJSEM-D-17-01122
Full Title:	Amycolatopsis rhizosphaerae sp. nov., isolated from rice rhizosphere soil
Article Type:	Taxonomic Description
Section/Category:	New taxa - Actinobacteria
Keywords:	Amycolatopsis, Actinomycetes, 16S rRNA gene, rice Rhizosphere soil
Corresponding Author:	Chitti Thawai, Assoc. Prof. Dr. King Mongkuts Institute of Technology Ladkrabang Bangkok, THAILAND
First Author:	Chitti Thawai, Assoc. Prof. Dr.
Order of Authors:	Chitti Thawai, Assoc. Prof. Dr.
Manuscript Region of Origin:	THAILAND
Abstract:	A novel actinomycete strain DH51B-4-3T, which formed the long chains of spherical spore borne on the tip of sporophores arising from the aerial mycelium was isolated from rice rhizosphere soil. The isolate contained meso-diaminopimelic acid in the cell-wall peptidoglycan. The whole-cell sugars of strain DH51B-4-3T were arabinose, galactose, glucose, rhamnose and ribose. The phospholipids in membrane were phosphatidylethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine, diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol. The major menaquinone was MK-9 (H4). The main cellular fatty acids were iso-C16:0 and cyclo-C17:0. The G+C content of the genomic DNA was 68.2 mol%. Phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequences revealed that strain DH51B-4-3T should be classified in the genus Amycolatopsis and closely related to Amycolatopsis dongchuanensis YIM 75904T (98.06%) and Amycolatopsis sacchari DSM 44468T (97.77%). The result of DNA-DNA hybridization and some physiological and biochemical properties indicated that strain DH51B-4-3T could be readily distinguished from its closest phylogenetic relatives. On the basis of these phenotypic and genotypic data, this strain represents a novel species, for which the name Amycolatopsis rhizosphaerae sp. nov. is proposed. The type strain is DH51B-4-3T (=TBRC 6029T =NBRC 112509T).



1 ***Amycolatopsis rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rice**
2 **rhizosphere soil**

3
4 Chitti Thawai^{1,2}

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

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

10
11 **Running title:** *Amycolatopsis rhizosphaerae* sp. nov.

12 **Subject category:** New taxa - Actinobacteria

13 **Correspondence**

14 Chitti Thawai

15 Chitti.th@kmitl.ac.th

16
17

The DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain DH51B-4-3^T
is LC333387.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18 A novel actinomycete strain DH51B-4-3^T, which formed the long chains of
19 spherical spore borne on the tip of sporophores arising from the aerial mycelium
20 was isolated from rice rhizosphere soil. The isolate contained *meso*-
21 diaminopimelic acid in the cell-wall peptidoglycan. The whole-cell sugars of
22 strain DH51B-4-3^T were arabinose, galactose, glucose, rhamnose and ribose. The
23 phospholipids in membrane were phosphatidylethanolamine,
24 phosphatidylmethylethanolamine, diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol.
25 The major menaquinone was MK-9 (H₄). The main cellular fatty acids were iso-
26 C_{16:0} and cyclo-C_{17:0}. The G+C content of the genomic DNA was 68.2 mol%.
27 Phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequences revealed that strain
28 DH51B-4-3^T should be classified in the genus *Amycolatopsis* and closely related to
29 *Amycolatopsis dongchuanensis* YIM 75904^T (98.06%) and *Amycolatopsis sacchari*
30 DSM 44468^T (97.77%). The result of DNA-DNA hybridization and some
31 physiological and biochemical properties indicated that strain DH51B-4-3^T could
32 be readily distinguished from its closest phylogenetic relatives. On the basis of
33 these phenotypic and genotypic data, this strain represents a novel species, for
34 which the name *Amycolatopsis rhizosphaerae* sp. nov. is proposed. The type strain
35 is DH51B-4-3^T (=TBRC 6029^T =NBRC 112509^T).
36 **Key words:** *Amycolatopsis*, Actinomycetes, 16S rRNA gene, rice Rhizosphere soil

37 Genus *Amycolatopsis* [1] is a member of actinomycetes that form squarish to rod-
38 shaped fragments on substrate and aerial mycelia, and belongs to the family
39 *Pseudonocardiaceae*. The type species is *Amycolatopsis orientalis* [2]. Typically, this
40 genus exhibits *meso*-diaminopimelic acid in the peptidoglycan, arabinose and
41 galactose as a characteristic sugar in whole-cell hydrolysates,
42 phosphatidylethanolamine as the diagnostic phospholipid in membrane. The major
43 menaquinone is generally MK- 9(H₄). The genomic DNA G+C contents range from
44 66 to 73 mol% [3, 4, 5]. Several environmental sources i.e. volcanic soil [6], ocean
45 sediment [7] and plant tissues [8, 9] including human specimens [10] have been
46 reported as the habitat of the members of the genus *Amycolatopsis*. At present time,
47 the genus *Amycolatopsis* contains more than 70 species with valid names (*List of*
48 *Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, www.bacterio.net) including the
49 recent two novel species, *A. deserti* [11] and *A. albispota* [12]. In this study, strain
50 DH51B-4-3^T was taxonomically characterized as a novel species of the genus
51 *Amycolatopsis*.

52
53 Strain DH51B-4-3^T was isolated from rice rhizosphere soil sample collected from the
54 paddy field in Suphanburi province, Thailand. The soil sample was air-dried at room
55 temperature for 5 days. The dried soil sample was then ground and heated at 100 °C
56 for 1 h. The treat soil was diluted 1000-fold with 0.01% sterile sodium lauryl sulfate
57 in distilled water and then 0.2 ml of the diluted sample on humic acid-vitamin (HV)
58 agar [13] supplemented with 20 mg l⁻¹ nalidixic acid and 50 mg l⁻¹ nystatin. The
59 isolation plates were incubated at 30°C for 10 days. The colony of strain DH51B-4-3^T
60 was selected and purified on yeast extract-malt extract agar (International

61 *Streptomyces* Project, ISP2 medium) [14]. The pure culture was stored in 20%, w/v
62 glycerol suspension at -80 °C.

63

64 Strain DH51B-4-3^T was cultivated on ISP2 agar at 30 °C for 14 days. Then, the
65 arrangement of spore was first observed by light microscopy and in a scanning
66 electron microscope (model JSM-6610 LV; JEOL). To evaluate the phenotypic
67 characteristics, several International *Streptomyces* Project (ISP) media (ISP 2-7),
68 glucose-asparagine agar (ISP 5 with 1% glucose replacing glycerol), Czapek's sucrose
69 agar [15] and nutrient agar (Difco) were used to study for the cultural characteristics.

70 The colours of the aerial and substrate mycelia and any soluble pigments were
71 recorded using the chips from the ISCC-NBS colour charts [16]. The standard method
72 of Arai [17] and Williams & Cross [18] were chosen for testing the nitrate reduction
73 and the decomposition of gelatin. Growth at various temperatures (12, 15, 20, 25, 30,
74 37, 40, 45 and 50 °C) and NaCl (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10% w/v) were determined
75 on ISP 2 agar for 14 days. pH range (4.0-11.0 at increment of 1.0 pH unit) for growth
76 was tested at 30 °C in ISP2 broth. pH was adjusted with citric acid/sodium citrate (pH
77 4.0-5.0), KH₂PO₄/NaOH (pH 6.0-8.0) and NaHCO₃/Na₂CO₃ (pH 9.0-10.0). Catalase
78 activity was observed by bubble production after the application of 3 % (v/v)
79 hydrogen peroxide solution. Test for oxidase activity was done by oxidation of 1 % *N*,
80 *N*, *N'*, *N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride. Acid production, urease
81 activity and hydrolysis of casein (1 %, w/v), adenine (1 %, w/v), CM-cellulose (1 %,
82 w/v), hypoxanthine (0.5 %, w/v), starch (1 %, w/v), tyrosine (0.1 %, w/v) or xanthine
83 (0.5 %, w/v) were tested by the method of Gordon *et al* [19]. Nitrogen source (1%
84 w/v) utilization was evaluated by using a basal liquid medium containing 0.5 g D-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

85 glucose, 0.05 g MgSO₄. 7H₂O, 0.05 g NaCl, 0.001 g FeSO₄.7H₂O, 0.01 g K₂HPO₄ and
86 1L distilled water (pH 7.2).

87

88 Biomass used for chemotaxonomic analyses was obtained from cell culture grown in
89 ISP 2 broth on rotary shaker (200 r.p.m.) at 30°C for 5 days. The isomer of
90 diaminopimelic acid in the cell wall was analysed using the protocol of Hasegawa *et*
91 *al.* [20]. Analysis of acyl type of muramic acid in the peptidoglycan was performed by
92 the method suggested by Uchida and Aida [21]. The method of Komagata and Suzuki
93 [22] was used for the whole cell sugar experiment. The polar lipids in the cell
94 membrane were extracted and analysed by the methods proposed by Minnikin *et al.*
95 [23]. The fatty acids were analyzed following the method of Sasser [24] and Kämpfer
96 [25]. The cellular fatty acids were saponified, methylated and extracted according to
97 the protocol of the Sherlock Microbial Identification System (MIDI). The
98 composition of fatty acids in cell was examined using gas chromatograph (GC) (6890;
99 Hewlett 107 Packard) with the Microbial Identification software package based on
100 Sherlock Aerobic Bacterial Database (TSBA6). To detect the menaquinones in cell,
101 the freeze-dried cells of strain were extracted by the method of Collins *et al.* [26] and
102 were analyzed by HPLC [27].

103

104 Genomic DNA for 16S rRNA gene amplification was extracted using the protocol of
105 Tamaoka [28]. The 16S rRNA gene amplification and sequencing were performed
106 using the method suggested by Thawai [29]. The method recommended by Tamaoka
107 and Komagata [30] was determined for the G+C content of the genomic DNA
108 analysis. The DNA-DNA hybridization was done by the suggestion of Ezaki *et al.*
109 [31].

110

111 The sequence similarity value of strain DH51B-4-3^T was calculated through
112 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>) [32]. To compare 16S rRNA gene
113 sequences between strain DH51B-4-3^T and the reference type strains, the EzBioCloud
114 server was used for the source of 16S rRNA gene sequence data. The 16S rRNA gene
115 sequences of strain DH51B-4-3^T and all type strains of the genus *Amycolatopsis* were
116 aligned using CLUSTAL W multiple alignment mode within BioEdit program version
117 7.1.3.0 [33]. The phylogenetic tree was reconstructed using MEGA 6 [34]. The
118 neighbor-joining [35], maximum likelihood [36] and maximum parsimony [37]
119 algorithms were used for the tree reconstruction. The Kimura's 2-parameter model [38]
120 was used to calculate evolutionary distances. The complete deletion option was
121 chosen before constructing the topology of the tree. A bootstrap value analysis based
122 on 1,000 replicates was used for evaluating the robustness of the topology of the
123 phylogenetic tree [39].

124

125 Strain DH51B-4-3^T exhibited good growth on ISP 2, ISP 3, ISP 4, ISP 5 and ISP 7,
126 moderate growth on ISP 6, nutrient agar and glucose-asparagine agar, poor growth on
127 Czapek's sucrose agar. Pale yellowish brown substrate hyphae and light gray to
128 medium gray aerial hyphae were observed on these media. Spore masses were
129 abundantly formed on ISP 2, ISP 3, ISP 4 and nutrient agar in gray to grayish black
130 colour. No soluble pigment was found on any of the media tested. Strain DH51B-4-3^T
131 produced the long chains of spherical spore borne on the tip of sporophores arising
132 from the aerial mycelium on ISP 2 agar at 30°C for 14 days (Supplementary Fig S1).
133 The morphological characteristic of this strain is similar to those of the genus
134 *Amycolatopsis* [1]. The spore shape of strain DH51B-4-3^T is clearly different from

135 *Amycolatopsis dongchuanensis* JCM 18054^T, the closest phylogenetic relative that
136 produced the ovoid spore-like structure on ISP 2 medium [40]. Strain DH51B-4-3^T
137 was aerobic, Gram-stain-positive, catalase-and oxidase-positive. Strain DH51B-4-3^T
138 could be differentiated from the closely related species on the basis of the phenotypic
139 characteristic differences i.e. oxidase activity, hydrolysis of starch and nitrate
140 reduction, maximum NaCl for growth, acid production from several carbon sources
141 and assimilation of methionine. The detailed phenotypic characteristics of strain
142 DH51B-4-3^T are given in the Table 1 and species description.

143
144 The chemotaxonomic data of strain DH51B-4-3^T confirmed that the strain was a
145 member of the genus *Amycolatopsis*. The cell walls of strain DH51B-4-3^T had *meso*-
146 diaminopimelic acid as the diagnostic diamino acid. The acyl type of the cell-wall
147 muramic acid was *N*-acetyl. Arabinose and galactose were observed as the
148 characteristic reducing sugars in whole-cell hydrolysates. Additionally, glucose,
149 rhamnose and ribose were also found in cell. Arabinose and galactose were reported
150 as the characteristic reducing sugars of the genus *Amycolatopsis* [1, 2, 3]. The major
151 menaquinone was MK-9(H₄) (82.7%) while MK-9(H₆) (12.8%), MK-9(H₈) (2.1%),
152 MK-10(H₆) (1.6%) and MK-10(H₂) (0.8%) were found as a minor components.
153 Several *Amycolatopsis* species i.e. *Amycolatopsis echigonensis* [6], *Amycolatopsis*
154 *marina* [7], *Amycolatopsis endophytica* [8], *Amycolatopsis jiangsuensis* [9] exhibited
155 MK-9(H₄) as the predominant menaquinone in cell. Thus, this report confirmed that
156 the strain was similar to those of *Amycolatopsis* species in case of the main
157 menaquinone in cell. The major fatty acids (≥20%) of the new strain were iso-C_{16:0}
158 and cyclo C_{17:0} (Supplementary Table S1). The highest amount of iso-C_{16:0} (30.3%)
159 found in strain DH51B-4-3^T was similar to those of the major fatty acid component

160 reported in several type strains of the genus *Amycolatopsis* [6, 7, 8, 9, 10, 40].
161 Mycolic acids were not found. The polar lipids comprised diphosphatidylglycerol
162 (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylmethylethanolamine (PME),
163 phosphatidylinositol (PI), one glycolipid, one unknown phospholipid, two ninhydrin-
164 positive lipids and nine lipids (Supplementary Fig. S2). The G+C content of the
165 genomic DNA was 68.2 mol%.

166
167 16S rRNA gene sequence of strain DH51B-4-3^T (1,411 bp) was analysed using
168 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>) server. The result revealed high sequence
169 similarity to species belonging to the genus *Amycolatopsis*. The highest similarity was
170 found to *Amycolatopsis dongchuanensis* YIM 75904^T (98.06%) and followed by
171 *Amycolatopsis sacchari* DSM 44468^T (97.77%). A phylogenetic tree, based on
172 neighbourjoining analysis [35] of *Amycolatopsis* 16S rRNA gene sequences, is shown
173 in Fig. 1, and the extended tree, ML [36] and MP [37] are available as supplementary
174 material in IJSEM Online. Several reports in *Amycolatopsis* taxonomy revealed that
175 the strains showing more than 98.5% of the 16S rRNA gene sequence similarity value
176 have been exhibited the DNA-DNA hybridization value below than 70% [7, 8, 40].
177 Additionally, the taxonomic reports of Stackebrandt [41] and Keswani [42] confirmed
178 the relationship between both important taxonomic value mention above that the
179 bacterial strains having low 16S rRNA gene sequence similarity value (<97%) was
180 not considered necessary to confirm the new lineage by DNA–DNA hybridization.
181 Even though, strain DH51B-4-3^T was confirmed for the new species of the genus
182 *Amycolatopsis* by DNA–DNA hybridization experiment. The result exhibited that the
183 range of DNA relatedness value between strain DH51B-4-3^T and both closely
184 relatives, *Amycolatopsis dongchuanensis* JCM 18054^T and *Amycolatopsis sacchari*

185 JCM 11272^T was 19.9%±0.7 to 27.1%±0.7 which was less than 70% cut-off point
186 suggested for the assignment of bacterial strains to the same genomic species [33]
187 (Supplementary Table S2) [43]. With these taxonomic data, strain DH51B-4-3^T merits
188 classification as a novel species of the genus *Amycolatopsis*, for which the name
189 *Amycolatopsis rhizosphaerae* is proposed.

190

191 **DESCRIPTION OF *AMYCOLATOPSIS RHIZOSPHAERAE* SP. NOV.**

192 *Amycolatopsis rhizosphaerae* (rhi.zo.spha.e'ra.e. Gr. n. *rhiza* root; L. n. *sphaera* a
193 ball, sphere; N.L. n. *rhizosphaera* rhizosphere; N.L. gen. n. *rhizosphaerae* of the
194 rhizosphere, pertaining to the soil from which the type strain was isolated).

195

196 Cells are Gram-stain-positive, mesophilic, catalase and oxidase positive actinomycete
197 that forms the long chains of spherical spore borne on the tip of sporophores arising
198 from the aerial mycelium. No soluble pigment is produced in test culture media.
199 Peptonization of milk, gelatin liquefaction, nitrate reduction, urease activity, the
200 hydrolysis of starch, tyrosine and hypoxanthine are positive. Hydrolysis of adenine,
201 CM-cellulose and xanthine are negative. Acids produce from D-cellobiose, D-
202 fructose, D-glucose, D-mannose, D-mannitol, D-ribose, D-xylose, glycerol, L-
203 rhamnose, sucrose but not D-galactose, D-raffinose, D-salicin, L-arabinose and
204 lactose. Utilizes DL-2-aminobutyric acid, L-arginine, L-asparagine, L-cysteine, L-
205 phenylalanine, L-proline, L-serine, L-threonine and L-valine as sole nitrogen sources,
206 but not L-methionine. The temperature for growth is between 15-45°C. The optimum
207 temperature for growth is 30°C. No growth is observed at 12°C. The maximum NaCl
208 concentration for growth is 5% (w/v). The pH range for growth is 5-10. The cell wall
209 peptidoglycan contains *meso*-diaminopimelic acid. The acyl type of the cell-wall

210 muramic acid is *N*-acetyl. The predominant menaquinone is MK-9(H₄) while MK-
211 9(H₆), MK-9(H₈), MK-10(H₆) and MK-10(H₂) are present as a minor component. The
212 characteristic whole-cell sugars are arabinose, galactose, ribose, glucose and
213 rhamnose. The polar lipid profile contains diphosphatidylglycerol,
214 phosphatidylethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine, phosphatidylinositol,
215 one glycolipid, one unknown phospholipid, two ninhydrin-positive lipids and nine
216 lipids. The major fatty acids (>10%) are iso-C_{16:0} and cyclo C_{17:0}. Mycolic acids are
217 absent. The DNA G+C content of the type strain is 68.2 mol%. The type strain is
218 DH51B-4-3^T (=TBRC 6029^T =NBRC 112509^T).

219

220 **Acknowledgements**

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

223

224 **Funding information**

225 This research was supported by the office of the National Research Council of
226 Thailand (NRCT).

227

228 **Conflicts of interest**

229 The authors declare that there are no conflicts of interest.

230

231 **References**

232 1. Pittinger RC, Brigham RB. *Streptomyces orientalis* n. sp., the source of
233 vancomycin. *Antibiot Chemother* 1956;6:642-647.

- 234 2. Lechevalier MP, Prauser H, Labeda DP, Ruan JS. Two new genera of
235 nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int J*
236 *Syst Bacteriol* 1986;36:29-37.
- 237 3. Yassin AF, Haggel B, Budzikiewicz H, Schaal KP. Fatty acid and polar lipid
238 composition of the genus *Amycolatopsis*: application of fast atom bombardment-mass
239 spectrometry to structure analysis of underivatized phospholipids. *Int J Syst Bacteriol*
240 1993;43:414-420.
- 241 4. Kim SB, Goodfellow M. Reclassification of *Amycolatopsis rugosa* Lechevalier et
242 al. 1986 as *Prauserella rugosa* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:
243 507-512.
- 244 5. Henssen A, Kothe HW, Kroppenstedt RM. Transfer of *Pseudonocardia azurea*
245 and “*Pseudonocardia fastidiosa*” to the genus *Amycolatopsis*, with emended species
246 description. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:292-295.
- 247 6. Ding L, Hirose T, Yokota A. *Amycolatopsis echigonensis* sp. nov. and
248 *Amycolatopsis niigatensis* sp. nov. novel actinomycetes isolated from a filtration
249 substrate. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:1747-1751.
- 250 7. Bian J, Li Y, Wang J, Song FH, Liu M et al. *Amycolatopsis marina* sp. nov. an
251 actinomycete isolated from an ocean sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:
252 477-481.
- 253 8. Miao Q, Qin S, Bian GK, Yuan B, Xing K et al. *Amycolatopsis endophytica* sp.
254 nov., a novel endophytic actinomycete isolated from oil-seed plant *Jatropha curcas* L.
255 *Antonie van Leeuwenhoek* 2011;100:333-339.
- 256 9. Xing K, Liu W, Zhang YJ, Bian GK, Zhang WD et al. *Amycolatopsis*
257 *jiangsuensis* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from a coastal plant in
258 Jiangsu, China. *Antonie van Leeuwenhoek* 2013;103:433-439.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 259 10. **Huang Y, Pasciak M, Liu Z, Xie Q, Gamian A.** *Amycolatopsis palatopharyngis*
260 sp. nov., a potentially pathogenic actinomycete isolated from a human clinical source.
261 *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:359–363.
- 262 11. **Busarakam K, Brown R, Bull AT, Tan GY, Zucchi TD et al.** Classification of
263 thermophilic actinobacteria isolated from arid desert soils, including the description
264 of *Amycolatopsis deserti* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 2016;109:319-334.
- 265 12. **Zhang G, Wang L, Li J, Zhou Y.** *Amycolatopsis albispora* sp. nov., isolated
266 from deep-sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:3860-3864.
- 267 13. **Hayakawa M, Nonomura H.** Humic acid-vitamin agar, a new medium for the
268 selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* 1987;65:501–509.
- 269 14. **Shirling EB, Gottlieb D.** Methods for characterization of *Streptomyces* species.
270 *Int J Syst Bacteriol* 1966;16:313-340.
- 271 15. **Waksman SA.** *The Actinomycetes, vol. 2, Classification, Identification and*
272 *Description of Genera and Species.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1961.
- 273 16. **Kelly KL.** *Inter-Society Color Council – National Bureau of Standard Color*
274 *Name Charts Illustrated with Centroid Colors.* Washington, DC: US Government
275 Printing Office; 1964.
- 276 17. **Arai T.** *Culture Media for Actinomycetes.* Tokyo: The Society for Actinomycetes
277 Japan; 1975.
- 278 18. **Williams ST, Cross T.** Actinomycetes. In: Booth C (editor). *Methods in*
279 *Microbiology*, vol. 4. London: Academic Press; 1971; pp:295-334.
- 280 19. **Gordon RE, Barnett DA, Handerhan JE, Pang CHN.** *Nocardia coeliaca,*
281 *Nocardia autotrophica,* and the nocardin strain. *Int J Syst Bacteriol* 1974;24:54–63.
- 282 20. **Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S.** A rapid analysis for chemical grouping of
283 aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* 1983;29:319–322.

- 284 21. **Uchida K, Aida K.** An improved method for the glycolate test for simple
285 identification of acyl type of bacterial cell walls. *J Gen Appl Microbiol* 1984;30:31–
286 134.
- 287 22. **Komagata K, Suzuki KI.** Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics.
288 *Methods Microbiol* 1987;19:161-207.
- 289 23. **Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M et al.** An
290 integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar
291 lipids. *J Microbiol Methods* 1984;2:233-241.
- 292 24. **Sasser M.** *Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty*
293 *acids.* MIDI Technical Note 101. Newark: Microbial ID, Inc; 1990.
- 294 25. **Kämpfer P, Kroppenstedt RM.** Numerical analysis of fatty acid patterns of
295 coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* 1996;42:989-1005.
- 296 26. **Collins MD, Pirouz T, Goodfellow M, Minnikin DE.** Distribution of
297 menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* 1977;100:221-
298 230.
- 299 27. **Tamaoka J, Katayama-Fujimura Y, Kuraishi H.** Analysis of bacterial
300 menaquinone mixtures by high performance liquid chromatography. *J Appl Bacteriol*
301 1983;54:31-36.
- 302 28. **Tamaoka J.** *Determination of DNA Base Composition.* In: Goodfellow M,
303 O'Donnell AG (editors). *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics.* Chichester:
304 John Wiley & Sons; 1994; pp:463-470.
- 305 29. **Thawai C.** *Micromonospora costii* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus*
306 *speciosus.* *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;55:1456-1461.

- 307 30. **Tamaoka J, Komagata K.** Determination of DNA base composition by reversed-
308 phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* 1984;25:125-
309 128.
- 310 31. **Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E.** Fluorometric deoxyribonucleic acid-
311 deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to
312 membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic
313 relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:224-229.
- 314 32. **Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y et al.** Introducing EzBioCloud: A
315 taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst*
316 *Evol Microbiol* 2017; 67:1613-1617.
- 317 33. **Hall TA.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
318 analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95-98.
- 319 34. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** MEGA6: Molecular
320 Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*
321 2013;30:2725-2729.
- 322 35. **Saitou N, Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing
323 phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-425.
- 324 36. **Felsenstein J.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood
325 approach. *J Mol Evol* 1981;17:368-376.
- 326 37. **Fitch WM.** Toward defining the course of evolution: minimum change for a
327 species tree topology. *Sys Zoo* 1972; 20: 406-416.
- 328 38. **Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rates of base
329 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*
330 1980;16:111-120.

- 331 39. **Felsenstein J.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.
332 *Evolution* 1985;39:783-791.
- 333 40. **Nie GX, Ming H, Li S, Zhou EM, Cheng J, Tang X et al.** *Amycolatopsis*
334 *dongchuanensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol*
335 *Microbiol* 2012;62:2650–2656.
- 336 41. **Stackebrandt E, Goebel BM.** Taxonomic note: a place for DNA–DNA
337 reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in
338 bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:846–849.
- 339 42. **Keswani J, Whitman WB.** Relationship of 16S rRNA sequence similarity to
340 DNA hybridization in prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:667–678.
- 341 43. **Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O et al.** Report
342 of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J*
343 *Syst Bacteriol* 1987;37:463-464.
- 344

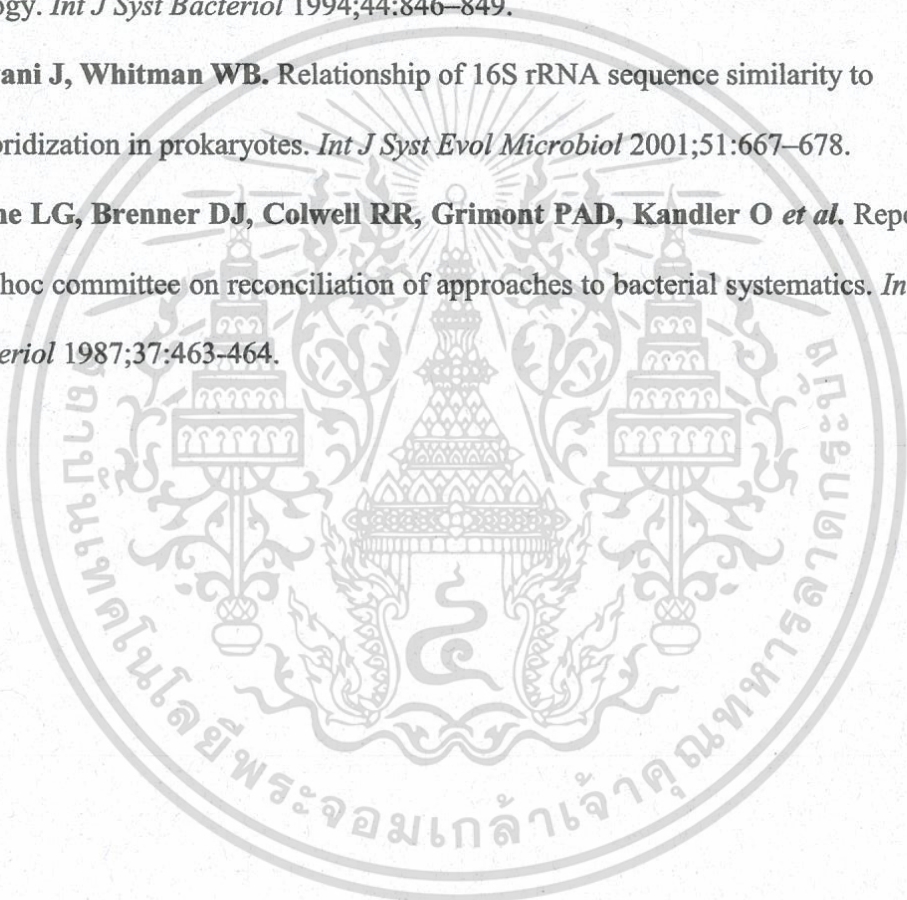


Table 1.

Characteristics	Strain DH51B-4-3 ^T	<i>A. dongchuanensis</i> JCM 18054 ^T	<i>A. sacchari</i> JCM 11272 ^T
Hydrolysis of starch	+	w	-
Nitrate reduction	+	-	+
Oxidase activity	+	-	-
Maximum NaCl tolerance (%w/v)	5	7	5
Minimum temperature for growth (°C)	15	12	12
The pH range for growth	5-10	5-10	5-8
Acid production from:			
D-cellobiose	+	-	+
D-galactose	-	+	+
D-mannitol	+	-	+
D-salicin	-	-	+
D-xylose	+	-	+
L-arabinose	-	+	+
L-rhamnose	+	-	+
Sucrose	+	-	+
Nitrogen utilization:			
L-methionine	-	+	-

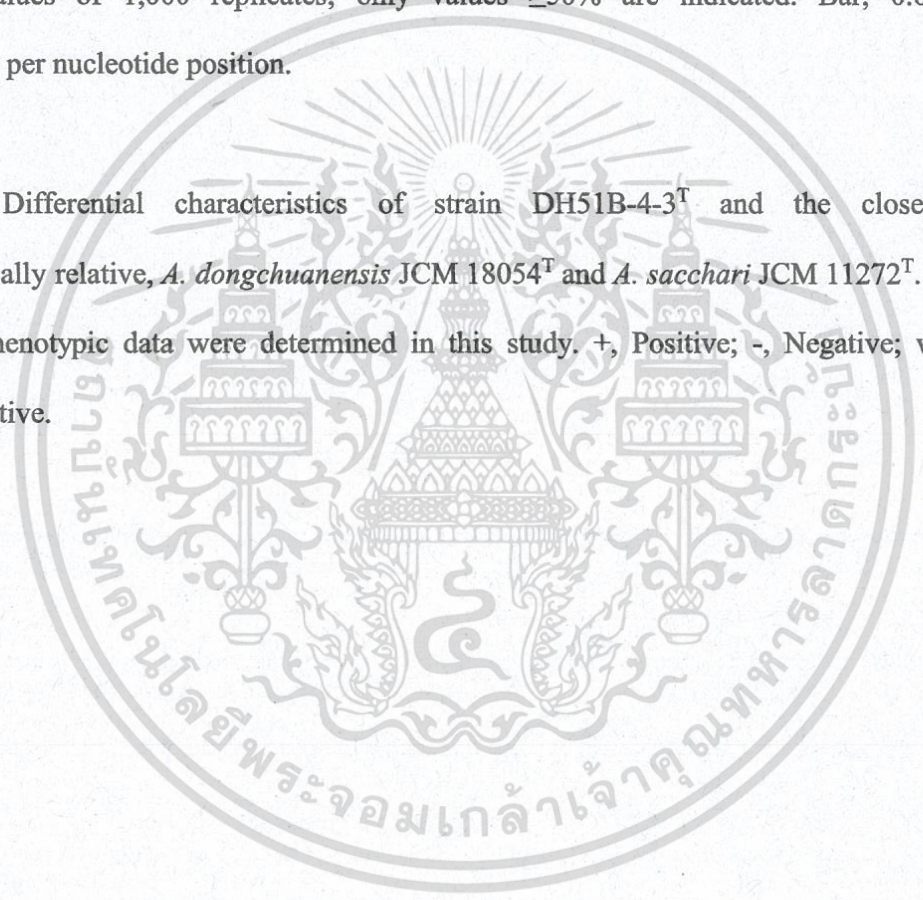
348 **Figure and Table legends**

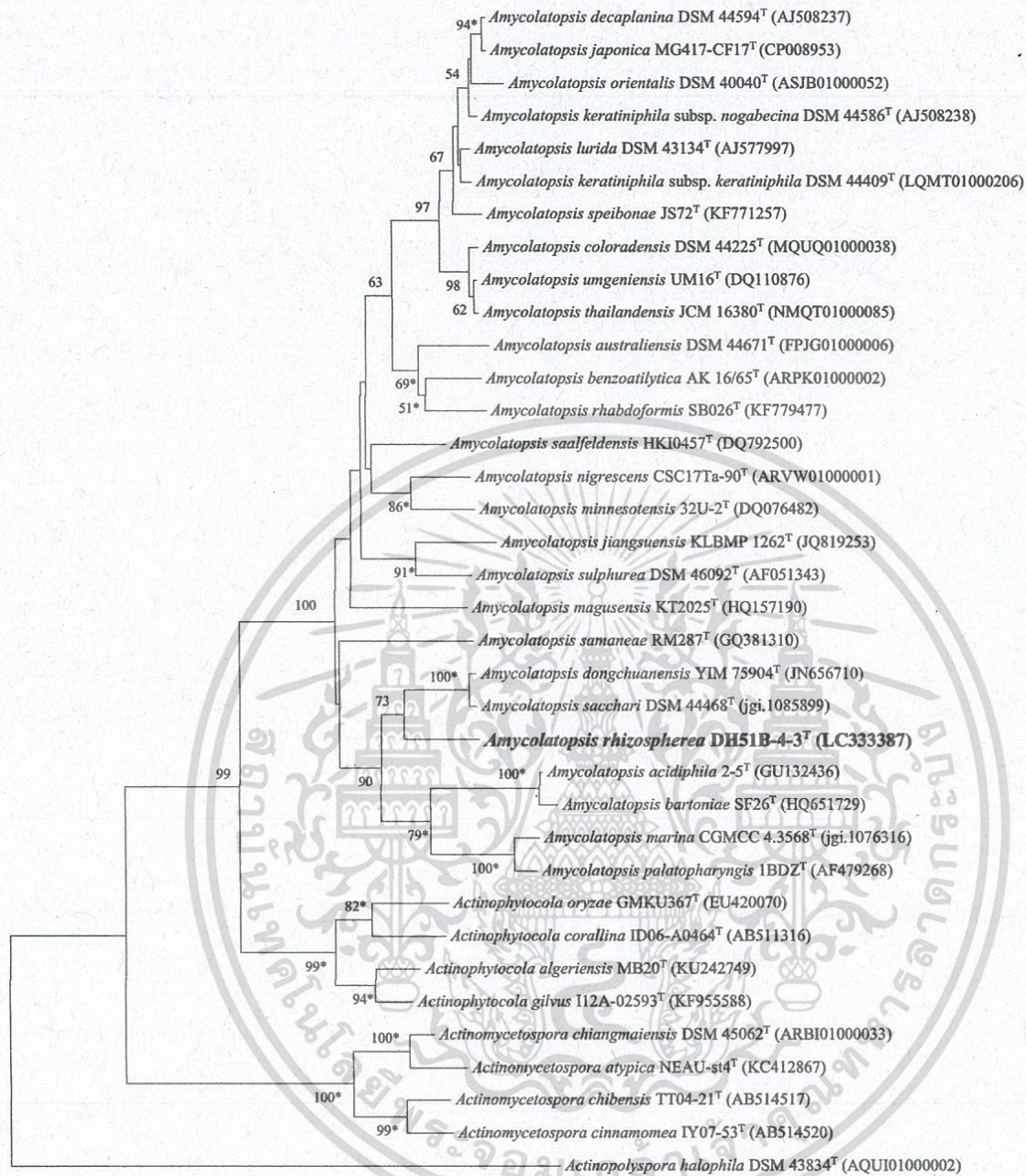
349 **Fig. 1.** Neighbour-joining tree [35] based on almost-complete 16S rRNA gene sequences
350 (1,411 nt) showing the relationships between strain DH51B-4-3^T, the *Amycolatopsis*
351 species with validly-published names and members of the genera *Actinophytocola* and
352 *Actinomycetospora*. *Actinopolyspora halophila* was used as an outgroup. Asterisks (*)
353 indicating the branches of the tree that were also found using the maximum-parsimony
354 and maximum-likelihood methods. The numbers on the branches indicate the percentage
355 bootstrap values of 1,000 replicates; only values $\geq 50\%$ are indicated. Bar, 0.01
356 substitutions per nucleotide position.

357

358 **Table 1.** Differential characteristics of strain DH51B-4-3^T and the closest
359 phylogenetically relative, *A. dongchuanensis* JCM 18054^T and *A. sacchari* JCM 11272^T.

360 All other phenotypic data were determined in this study. +, Positive; -, Negative; w,
361 Weakly positive.





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)

Amycolatopsis rhizosphaerae sp. nov., isolated from rice rhizosphere soil

Chitti Thawai^{1,2}

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

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

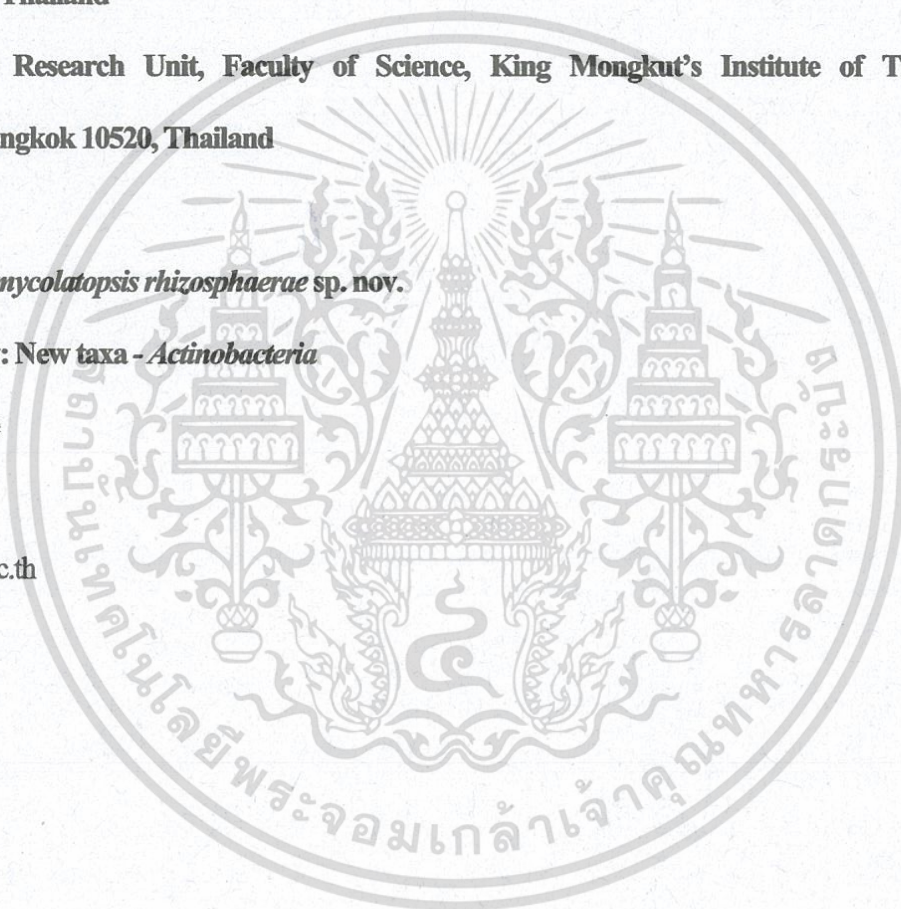
Running title: *Amycolatopsis rhizosphaerae* sp. nov.

Subject category: New taxa - *Actinobacteria*

Correspondence

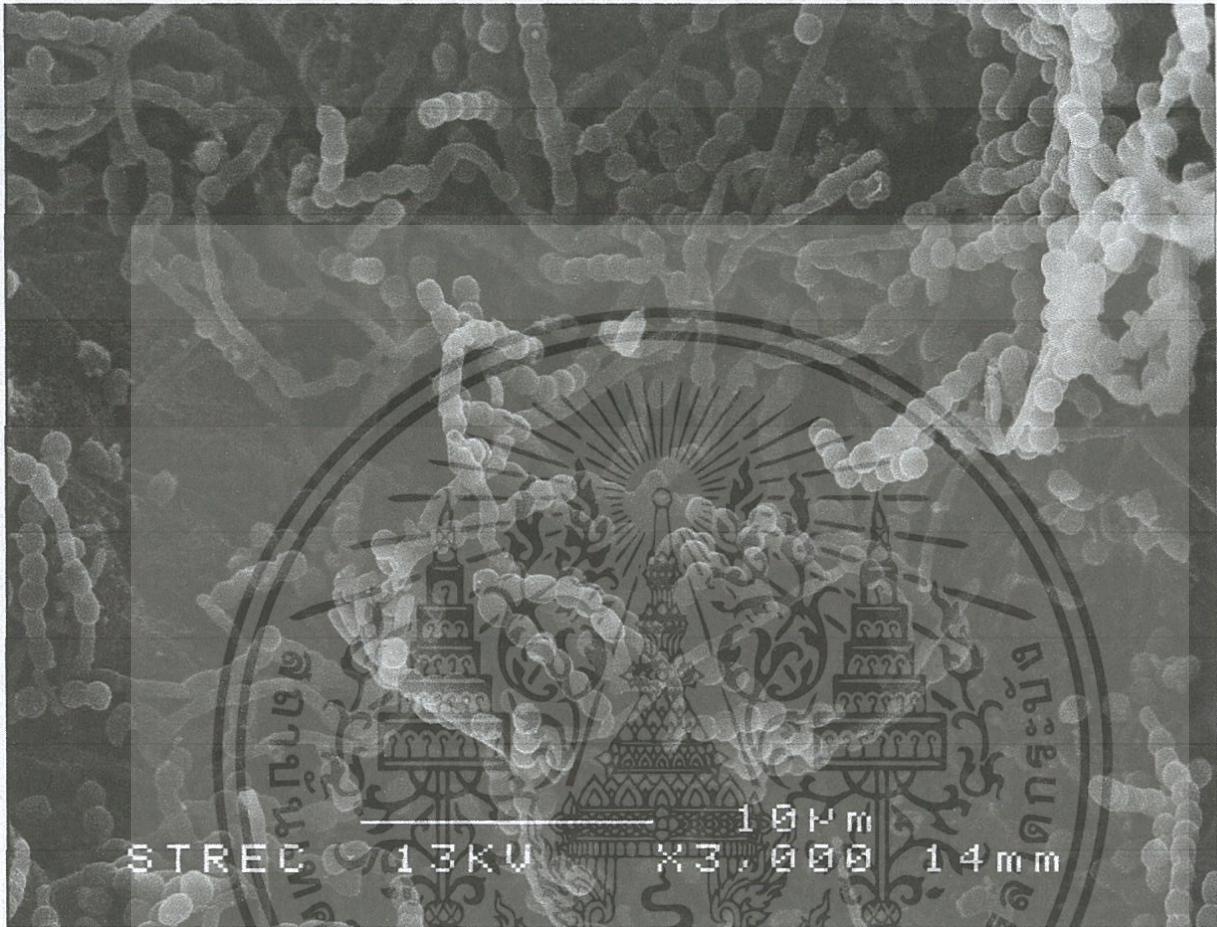
Chitti Thawai

Chitti.th@kmitl.ac.th



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

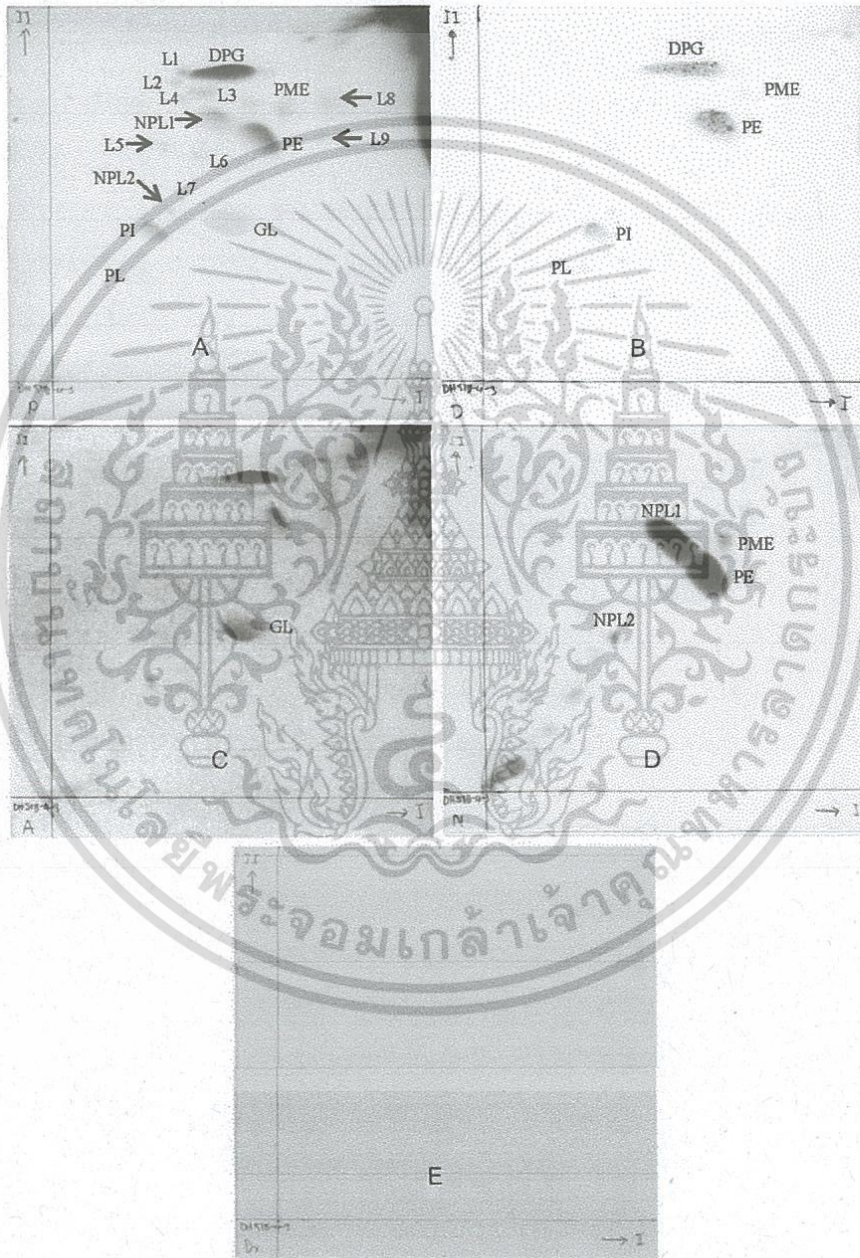
Supplementary Fig. S1. Scanning electron micrograph of strain DH51B-4-3^T grown on ISP2 agar for 14 days at 30°C. Bar, 10 μm.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

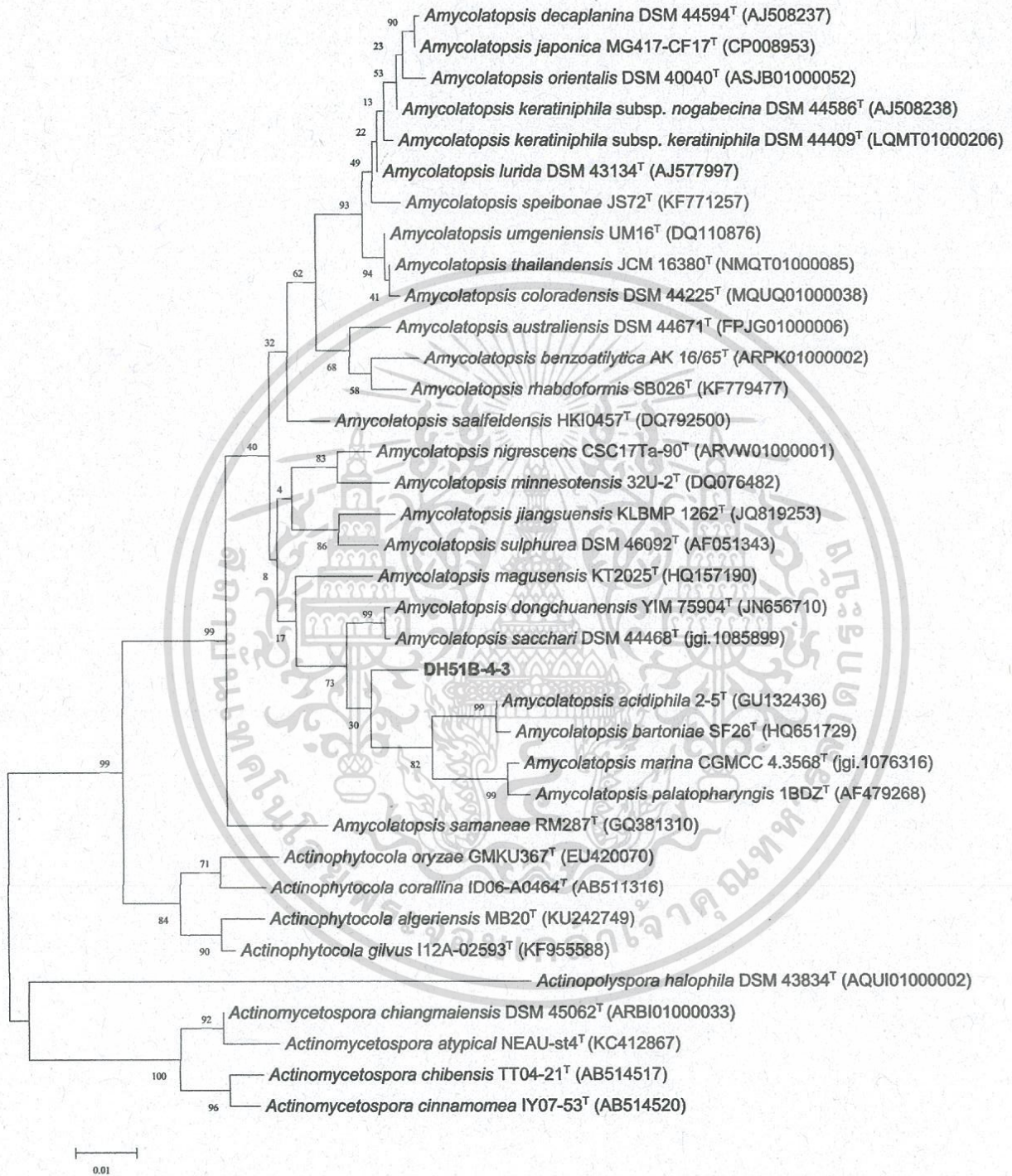
Supplementary Fig. S2 (A) Polar lipid appearing on the two-dimensional thin-layer chromatograms of strain DH51B-4-3^T

(A) Phosphomolybdic acid's TLC chromatogram; (B) Dittmer & Lester's TLC chromatogram; (C) Anisaldehyde's TLC chromatogram; (D) Ninhydrin's TLC chromatogram; (E) Dragendrof's TLC chromatogram; Abbreviation: PE= phosphatidylethanolamine; PME= phosphatidylmethylethanolamine; NPL = ninhydrin positive lipid; GL = Glycolipid; PL, phospholipid; L, lipid.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Supplementary Fig. S3 Phylogenetic tree based on the nearly complete 16S rRNA gene sequences (1411 nt) of strain DH51B-4-3^T and other members of the genus *Amycolatopsis*. The tree was reconstructed with the maximum-likelihood method. *Actinopolyspora halophila* DSM 43834^T was used as outgroup. Numbers on branches represent the bootstrap values as the percentage of 1000 replicates. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Supplementary Fig. S4 Phylogenetic tree based on the nearly complete 16S rRNA gene sequences (1411 nt) of strain DH51B-4-3^T and other members of the genus *Amycolatopsis*. The tree was reconstructed with the maximum-parsimony method. *Actinopolyspora halophila* DSM 43834^T was used as outgroup. Numbers on branches represent the bootstrap values as the percentage of 1000 replicates.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Supplementary Table S1. Cellular fatty acid composition of strain DH51B-4-3^T

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

Fatty acids	Strain DH51B-4-3 ^T
Saturated fatty acids	
C _{12:0}	0.5
C _{14:0}	1.1
C _{16:0}	8.7
C _{16:0} 3-OH	0.6
C _{17:0}	0.4
C _{17:0} 2-OH	0.4
C _{18:0}	2.7
Unsaturated fatty acids	
C _{16:1} G	2.7
C _{16:1} ω6c	2.2
C _{16:1} ω7c	1.2
anteiso-C _{17:1} ω9c	0.4
C _{18:1} ω7c	1.5
C _{18:1} ω9c	0.4
Branched fatty acids	
iso-C _{14:0}	0.7
iso-C _{15:0}	6.4
anteiso-C _{15:0}	2.2
iso-C _{16:0}	30.3
anteiso-C _{16:0}	0.6
iso-C _{17:0}	5.2
C _{17:0} cyclo	22.9
anteiso-C _{17:0}	8.2
iso-C _{17:0} 3OH	0.4
iso-C _{18:0}	0.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Supplementary Table S2. DNA–DNA relatedness among the strain DH51B-4-3^T and its closest phylogenetic neighbours in the genus *Amycolatopsis*.

Strains	DNA–DNA binding (%) with labelled DNA from*:		
	1	2	3
1. DH51B-4-3 ^T	100	27.1 ± 0.7	21.4 ± 0.9
2. <i>A. dongchuanensis</i> JCM 18054 ^T	25.3 ± 0.6	100	46.2 ± 1.2
3. <i>A. sacchari</i> JCM 11272 ^T	19.9 ± 0.7	45.9 ± 0.9	100

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้