

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก  
ทะเลไทย

Isolation and selection of bioactive compounds producing actinomycetes  
isolated from Thai sea

โดย

รศ.ดร. จิตติ ทาไว  
คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปี 2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก  
ทะเลไทย

Isolation and selection of bioactive compounds producing actinomycetes  
isolated from Thai sea

โดย

รศ.ดร. จิตติ ทำไว  
คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปี 2559

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 145201

รับเดือนปี 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากทุนรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

รศ.ดร. จิตติ ทำไว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

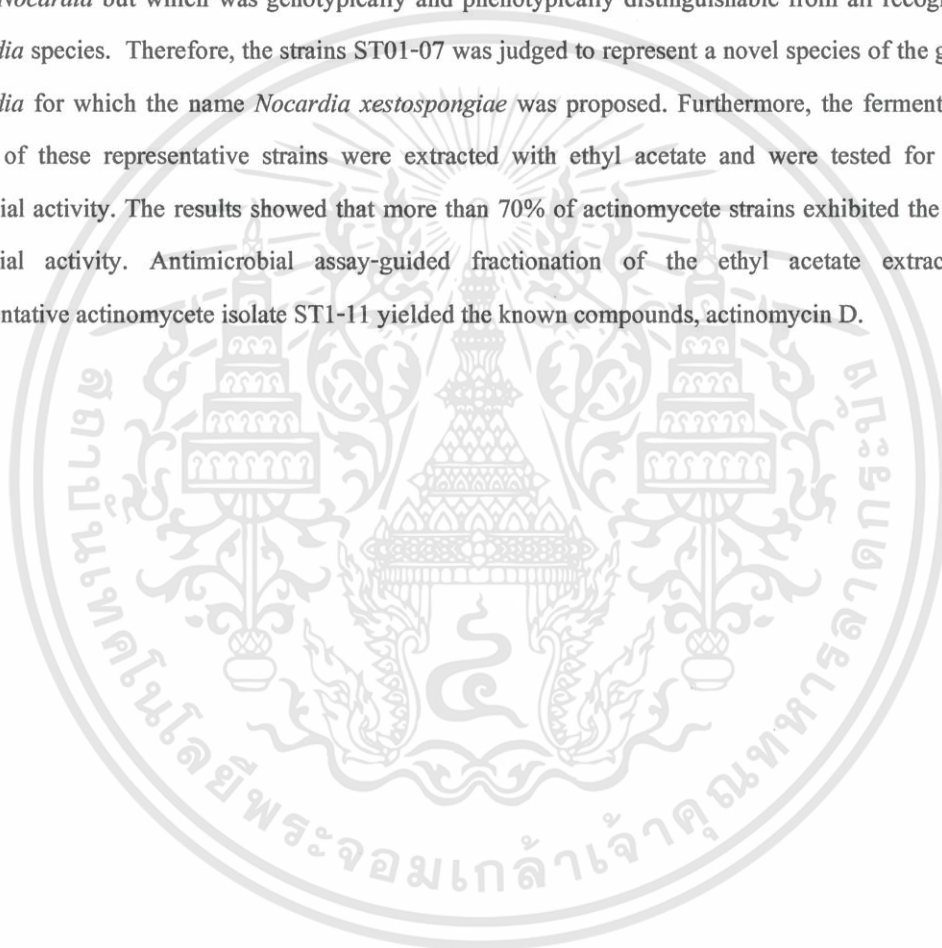
ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	การแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทะเลไทย
(ภาษาอังกฤษ)	Isolation and selection of bioactive compounds producing actinomycetes isolated from Thai sea
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก	ทุนรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปี 2559	จำนวนเงิน 300,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี	เดือนตุลาคม 2559 ถึง กันยายน 2559
ผู้ดำเนินการวิจัย	รศ.ดร. จิตติ ท่าไว สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
โทรศัพท์	02-3298400 ต่อ 235

#### บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 102 ไอโซเลต ถูกแยกได้จากตัวอย่างทางทะเลในจังหวัดตรังและภูเก็ต ประเทศไทย เชื้อไอโซเลตเหล่านี้ถูกนำมาจัดกลุ่มโดยลักษณะทางพีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ ได้เป็น 4 กลุ่ม จากลักษณะตำแหน่งบน phylogenetic tree ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางพีโนไทป์ของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มแสดงว่าเชื้อเหล่านี้เป็นสมาชิกของเชื้อแอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* *Micromonospora* *Salinispora* และ *Nocardia* การวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อไอโซเลต ST01-07 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานเคมีคล้ายกับเชื้อสกุล *Nocardia* แต่มีลักษณะทางจีโนไทป์และพีโนไทป์ที่แตกต่างไปจากเชื้อสปีชีส์มาตรฐานทั้งหมดที่เป็นสมาชิกในสกุล *Nocardia* ดังนั้นเชื้อไอโซเลต ST01-07 จึงถูกตัดสินให้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Nocardia* โดยให้ชื่อว่า *Nocardia xestospongiae* นอกจากนี้ น้ำหมักที่ได้จากเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตและนำไปทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์พบว่า เชื้อจำนวนมากกว่าร้อยละ 70 แสดงกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี น้ำหมักเชื้อของเชื้อตัวแทนไอโซเลต ST1-11 ถูกสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตและแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีได้สารบริสุทธิ์ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็นสารแอคติโนมัยซิน ดี (actinomycin D)

## Abstract

One hundred and two actinomycete strains were isolated from marine samples of Trang and Phuket provinces, Thailand. These strains were grouped using phenotypic chemotypic and genotypic characteristics into 4 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* *Salinispora* and *Nocardia*. Here, we found the strain ST01-07 showing morphological and chemotaxonomic characteristics typical of members of the genus *Nocardia* but which was genotypically and phenotypically distinguishable from all recognized *Nocardia* species. Therefore, the strains ST01-07 was judged to represent a novel species of the genus *Nocardia* for which the name *Nocardia xestospongiae* was proposed. Furthermore, the fermentation broths of these representative strains were extracted with ethyl acetate and were tested for anti-microbial activity. The results showed that more than 70% of actinomycete strains exhibited the anti-microbial activity. Antimicrobial assay-guided fractionation of the ethyl acetate extract of representative actinomycete isolate ST1-11 yielded the known compounds, actinomycin D.



## 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	13
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	58
เอกสารอ้างอิง	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AL6-1 บนอาหาร ISP2	21
2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AL6-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	24
3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต S1-1 บนอาหาร ISP2	24
4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต S1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	25
5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต ST1-11 บนอาหาร ISP2	26
6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ST1-11 บน phylogenetic tree (NJ method)	28
7 แสดงลักษณะโคโลนีการเจริญของเชื้อไอโซเลต ST01-07 บนอาหาร ISP2	29
8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ST01-07 บน phylogenetic tree (NJ method)	31
9 ขั้นตอนการสกัดสารจากน้ำหมักของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. ST1-11	52
10 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. ST1-11	53
11 แสดงลักษณะโครงสร้างของสาร ST1-11A	54

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยซีททางทะเลแต่ละสกุลในทะเล	4
2 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากเชื้อแอคติโนมัยซีททางทะเล	7
3 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้	19
4 แสดงรายละเอียดการกระจายของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้	20
5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ	32
6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต	34
7 แสดงการให้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต	46
8 $^1\text{H}$ และ $^{13}\text{C}$ NMR spectral (in $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร ST1-11A และ actinomycin D	55



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา 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*

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

ในปัจจุบันมนุษย์มีความต้องการยาใหม่ เพื่อนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมาเร็ง เอชส์ อัด ไซเมอร์ ซ้ออักเสบ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคติดเชื้อที่ติดต่อทางปฏิบัติวิณะ เนื่องจากเชื้อก่อโรคได้มีการพัฒนาขบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์จนสามารถต้านยาที่ใช้กันอยู่ได้มากขึ้น ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จึงหันมาทำการแสวงหาวัตถุดิบหรือทรัพยากรธรรมชาติที่มีศักยภาพในการผลิตยาต้นแบบชนิดใหม่เพื่อรองรับการระบาดของโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์คือยา จุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้เป็นอย่างดี ท่ามกลางกลุ่มของจุลินทรีย์เหล่านี้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทจัดเป็นเชื้อกลุ่มสำคัญที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด (Bérdy, 2005) ยาปฏิชีวนะหลายตัวที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันมีจุดเริ่มต้นจากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้นแบบจากเชื้อแอคติโนมัยซีท เช่น Amphotericin B, gentamicin, erythromycin, chloramphenicol, streptomycin เป็นต้น ดังนั้นการค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการเพิ่มโอกาสถึงการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้นแบบตัวใหม่เพื่อรองรับการระบาดของเชื้อจุลินทรีย์คือยาในอนาคต ดังนั้นการศึกษาวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่จึงมีความน่าสนใจและท้าทาย และน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการวิจัยและพัฒนาในการหาสารที่มีฤทธิ์ใหม่ๆ จากทรัพยากรในประเทศไทย

เชื้อแอคติโนมัยซีทมักกระจายตัวอยู่ในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติอื่นๆ ประชากรและชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทในระบบนิเวศขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีววิทยาของสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นๆ การเพิ่มโอกาสเพื่อค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่จึงควรเริ่มจากการศึกษาแหล่งธรรมชาติแหล่งใหม่ที่มีลักษณะทางระบบนิเวศแตกต่างจากแหล่งธรรมชาติทั่วไป ทะเลจัดเป็นแหล่งธรรมชาติที่น่าสนใจเนื่องจากมีลักษณะทางกายภาพที่เป็นเอกลักษณ์และแตกต่างจากแหล่งธรรมชาติทั่วไป ดังนั้นจึงน่าจะมีหลากหลายของทรัพยากรจุลินทรีย์สูงและแสดงลักษณะจำเพาะที่โดดเด่นต่างไปจากจุลินทรีย์ที่พบในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการวิจัยคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทในบริเวณดังกล่าวเพื่อนำมาศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีท ฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์คือยา และตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหายาจากเชื้อแยกได้นั้น การศึกษาวินิจฉัยนี้อาจทำให้เกิดการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่หรือสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารต้นแบบเพื่อพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ตลอดจนช่วยพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยก เพาะเลี้ยง อนุกรมวิธานและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท ช่วยเพิ่มขีดความสามารถ ทางเลือกของนักวิจัยไทย ในการเรียนรู้การวิจัยเกี่ยวกับการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งทรัพยากรในประเทศอีกทางหนึ่งด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อแยกแบคทีเรียในกลุ่มแอสกีโนมัยซีทจากตัวอย่างทางทะเล จังหวัดสตูล ภูเก็ต ตรังและพังงา ตลอดจนคัดเลือกเชื้อ

แอสกีโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.2.2 เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มแอสกีโนมัยซีทที่คัดเลือกโดยอาศัยข้อมูลของ 16S rRNA gene ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree)

1.2.3 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น เช่น  $^1\text{H-NMR}$  ของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแอสกีโนมัยซีทที่คัดเลือก

1.2.4 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์คือยา เช่น Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อก่อโรคอื่นๆ

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อแยกเชื้อแอสกีโนมัยซีท ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน ฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีจากเชื้อแอสกีโนมัยซีททางทะเลฝั่งอันดามัน ดังนั้นเป้าหมายของโครงการวิจัยนี้คือ สามารถแยกเชื้อแอสกีโนมัยซีทจากทะเลฝั่งอันดามันได้อย่างน้อย 100 ไอโซเลต ทำการจัดกลุ่มเชื้อเหล่านั้น และศึกษาเพื่อให้ทราบลักษณะทางอนุกรมวิธานในระดับสกุลของเชื้อในแต่ละกลุ่ม จากนั้นคัดเลือกเชื้อตัวแทนเชื้อในกลุ่มที่น่าสนใจคือมีแนวโน้มเป็นเชื้อชนิดใหม่มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานจนถึงระดับสปีชีส์ รวมทั้งคัดเลือกเอาเชื้อไอโซเลตที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุดมาเลี้ยงในอาหารเหลวและทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทิลอะซิเตต และนำสารสกัดหยาบที่ได้มาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น เช่น  $^1\text{H-NMR}$  ตลอดจนทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจากสารสกัดที่แยกได้นั้น

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและหลักการ

ทะเลเป็นแหล่งธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยใต้ท้องทะเลและมหาสมุทรนั้นเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด พบว่ามีสัตว์ชนิดต่าง ๆ มากกว่า 95% ส่วนใหญ่เป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ ฟองน้ำ ปะการัง เพรียงหัวหอม เป็นต้น สัตว์น้อยใหญ่เหล่านี้เป็นผู้ให้อาศัยแก่สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กชนิดต่างๆ รวมถึงสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีตทางทะเล (marine actinomycetes) นั้นพบได้ทั่วไปในท้องทะเล และการกระจายตัวของเชื้อแอกติโนมัยซีตในแต่ละแหล่งก็แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในท้องทะเล และสิ่งมีชีวิตที่เป็นผู้ให้อาศัย (ตารางที่ 1) เช่น แอกติโนมัยซีตที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ และสาหร่าย แบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) ได้แก่เชื้อในสกุล *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora* และ *Salinispora* (Jensen et al., 2005) หรือแอกติโนมัยซีตที่อาศัยเป็นอิสระทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายสารพบในซากตะกอน (sediment) ต่างๆ ใต้ท้องทะเล ได้แก่ เชื้อในสกุล *Actinomadura*, *Actinosynnema*, *Amycolatopsis*, *Frankia*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Streptomyces*, *Streptosporangium* และ *Verrucosispora* (Gandhimathi et al., 2008)

ตารางที่ 1 แสดงการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยซีททางทะเลแต่ละสกุลในทะเล

Actinomycete genera	Species affiliation	Source
<i>Actinomadura</i>	<i>A. formosans</i> , <i>A. fulvescens</i>	Japan Trench, Canary Basin, fjord site.
<i>Actinosynnema</i>	<i>Actinosynnema</i> sp. IM-1402	Deep sea sediment 3800 m
<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis</i> sp. GY109	Deep sea sediment 3800 m
<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter</i> sp. "SMCCG960", <i>A. agilis</i> , <i>A. nitroguajacolicus</i>	Deep sea sediment 3800m
<i>Dietzia</i>	<i>D. maris</i>	Japan Trench, Canary Basin, fjord site Deep sea sediment 3800 m. Barcelona neuston
<i>Frankia</i>	<i>Frankia</i> sp.	Deep sea sediment 3800 m
<i>Kitasatospora</i>	<i>Kitasatospora</i> sp. IM-6832	Deep sea sediment 3800 m
<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i> sp. strain I M-7020, <i>M. rhodorangea</i> , <i>M. halophytica</i>	Deep sea sediment 3800 m. Sediment Papua New Guinea
<i>Nocardioides</i>	<i>Nocardioides</i> sp.V4,BO.15, <i>N. jensenii</i>	Deep sea sediment 3800 m. Barcelona neuston
<i>Nocardioopsis</i>	<i>N. dassonvillei</i>	Ovaries of Puffer fish, Bohai Sea of China
<i>Nonomuraea</i>	<i>Nonomuraea</i> sp.	Japan Trench, Canary Basin, fjord site
<i>Pseudonocardia</i>	<i>P. alaniphila</i> , <i>P. aurantiaca</i> , <i>P. alnii</i>	Deep sea sediment 3800 m
<i>Saccharopolyspora</i>	<i>Saccharopolyspora</i> sp.	Japan Trench, Canary Basin and fjord site
<i>Salinispora</i>	<i>S. arenicola</i> , <i>S. tropica</i>	Sub-tropical sediment
<i>Streptosporangium</i>	<i>Streptosporangium</i> sp.	Japan Trench ,Canary Basin and fjord site

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยซีททางทะเลแต่ละสกุลในทะเล (ต่อ)

Actinomycete genera	Species affiliation	Source
<i>Streptomyces</i>	<i>S. capensis</i> , <i>S. giseus</i> (MAR4),  <i>S. maritimus</i> , <i>S. pallidus</i> ,  <i>S. somaliensis</i> ,  <i>S. thermocarboxydovorans</i>	Deep sea sediment 3800 m
<i>Verrucosipora</i>	<i>Verrucosipora</i> sp. AB-18-032,IM-6907	Japan Trench, Canary Basin and fjord site
<i>Williamsia</i> ,	<i>W. maris</i> <i>W. marianensis</i>	Japan Trench, Canary Basin and fjord site

ที่มา Ward and Bora., 2006

จากการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทในทะเล พบว่ามีเชื้อบางสกุลสามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และบางชนิดมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคได้ (Kin, 2006) เช่น สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ได้แก่ aureovorticillactam (Mitchell *et al.*, 2004), caprolactones (TRitzke *et al.*, 2004), 3,6-disubstituted indoles (Sanchez *et al.*, 2003) สารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้แก่ frigocyclinone (Bruntnet *et al.*, 2005), glaciapyrroles (Macherla *et al.*, 2005), และ gutingimycin (Maskey *et al.*, 2004), สาร bonactin (Schumacher *et al.*, 2003) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และเชื้อรา ซึ่งผลิตได้จากเชื้อในสกุล *Streptomyces* และสาร chandananimycin (Maskey *et al.*, 2003) ผลิตได้จากเชื้อในสกุล *Actinomadura* มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย รา และมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีสาร salinosporamide A (Feling *et al.*, 2003) ผลิตได้จากเชื้อ *Salinispora* มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง สาร diazepinomicin (Charan *et al.*, 2004) ผลิตจากเชื้อ *Micromonospora* มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย มะเร็ง และต้านการอักเสบ สาร mechercharmycin (Kanoh *et al.*, 2005) ผลิตจากเชื้อ *Thermoactinomyces* มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และสาร abyssomicins (Riedlinger *et al.*, 2004) ผลิตจากเชื้อ *Verrucosipora* มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เป็นต้น (ข้อมูลในปี 2003-2008, ตารางที่ 2)

การศึกษาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากเชื้อแอคติโนมัยซีทมีความน่าสนใจอีกประการตรงที่สามารถเพิ่มผลผลิตของสารสำคัญเหล่านี้ได้ในห้องปฏิบัติการ ในบางครั้งการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทจากทะเลนั้นอาจจะมีข้อจำกัด เนื่องจากมีความแตกต่างกันทางด้านที่อยู่อาศัย ดังนั้นเทคนิควิธีการ และสารอาหารที่จะใช้เพาะเลี้ยงจึงมีความแตกต่างจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกจาก

พื้นดิน ซึ่งบางครั้งอาจต้องใช้กระบวนการต่างๆ ทั้งทางกายภาพและเคมีก่อนที่จะทำการแยกเชื้อ เพื่อที่จะแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีทออกมาให้ได้จำนวนมากที่สุดจากตัวอย่างทางทะเล

จากลักษณะอันจำเพาะของทะเลไทย ที่ยังคงความเป็นธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ กอปรกับมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีสัตว์และพืชทะเลจำนวนมาก ดังนั้นแนวโน้มของการกระจายตัวและความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์จึงน่าจะมียูสูง และมีความแตกต่างไปจากแหล่งธรรมชาติแหล่งอื่น โอกาสที่จะค้นพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์ที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างแตกต่างจากสารเดิมที่เคยค้นพบมาก่อนจึงมีโอกาสด้านข้างมาก นอกจากนี้แล้วยังพบว่า การศึกษาวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอสคิโนมัยซีททางทะเลในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อยมากเมื่อเทียบกับต่างประเทศ ดังนั้น การศึกษาการกระจายตัวและคัดกรองเชื้อที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจและท้าทาย และน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการวิจัยและพัฒนาในการหาสารที่มีฤทธิ์ใหม่ๆ จากทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

ดังที่กล่าวมาข้างต้น โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาทำการศึกษการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอสคิโนมัยซีททางทะเลของประเทศไทย เพื่อตรวจสอบลักษณะทางอนุกรมวิธานระดับสกุลและเลือกเชื้อที่น่าสนใจมาศึกษาจนถึงระดับสปีชีส์ และคัดกรองเชื้อที่สามารถสร้างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจมาทำการเลี้ยง แยก และศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ ตลอดจนทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเหล่านั้น ผลการศึกษาวิจัยที่ได้จากโครงการนี้ จะเป็นผลการวิจัยในเบื้องต้นที่จะช่วยคัดเลือกเชื้อแอสคิโนมัยซีททางทะเลที่น่าสนใจ รวมทั้งได้ข้อมูลของการศึกษการกระจายตัวและข้อมูลทางอนุกรมวิธาน ข้อมูลทางโครงสร้างทางเคมีของสารทุติยภูมิ ตลอดจนข้อมูลของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอสคิโนมัยซีททางทะเล รวมทั้งการศึกษวิจัยนี้จะช่วยพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยก อนุกรมวิธาน การเพาะเลี้ยงและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอสคิโนมัยซีททางทะเล เพื่อช่วยเพิ่มขีดความสามารถหรือทางเลือกของนักวิจัยไทย ในการเรียนรู้การวิจัยเกี่ยวกับการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งทรัพยากรในประเทศอีกทางหนึ่งด้วย

ตารางที่ 2 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากเชื้อแอคติโนมัยซีททางทะเล

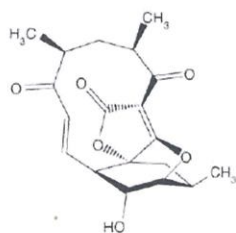
Compounds	TRains	Activity	References
Abyssomicins (1)	<i>Verrucospora</i> sp.	Antibacterial	Riedlinger <i>et al.</i> , 2004
Aureoverticillactam (2)	<i>TReptomycetes aureoverticillatus</i>	Anticancer	Mitchell <i>et al.</i> , 2004
Cebulactams (3)	<i>Saccharopolyspora cebuensis</i>	Antibacterial; Antioxidant	Pimentel-Elardo <i>et al.</i> , 2008
Caprolactones (4)	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer	TRitzke <i>et al.</i> , 2004
Chandrananimycins (5)	<i>Actinomadura</i> sp.	Antialagl; Antibacterial; anticancer; antifungal	Maskey <i>et al.</i> , 2003
Geldanamycin (6)	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Suchada <i>et al.</i> , 2006
Proximicin (7)	<i>Verrucospora</i> sp.	Antiicancer	Philip <i>et al.</i> , 2008
Ikarugamycin (8)	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial, antiprotozoal, Antiulcer	Bruntner <i>et al.</i> , 2005
Chloro-dihydroquinones (9)	<i>Novel actinomycete</i>	Antibacterial; Anticancer	Soria-Mercado <i>et al.</i> , 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

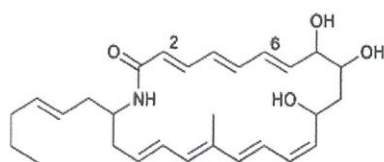
ตารางที่ 2 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากเชื้อแอคติโนมัยซีททางทะเล (ต่อ)

Compound	Source	Activity	References
Diazepinomicin (ECO-4601) (10)	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial; Anticancer; Anti-inflammatory	Charan <i>et al.</i> , 2004
3,6-disubstitutedindoles (11)	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer	Sanchez Lopez <i>et al.</i> , 2003
Frigocyclinone (12)	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial	Bruntner <i>et al.</i> , 2005
Glaciapyrroles (13)	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Macherla <i>et al.</i> , 2005
Gutingimycin (14)	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Maskey <i>et al.</i> , 2004
Helquinoline (15)	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacterial	Asolkar <i>et al.</i> , 2004
8-amino-[1,4]diazonane-2,5-dione (16)	<i>Streptomyces acrimycini</i>	Antitumour	Hernández <i>et al.</i> , 2004
Saliniketal (17)	<i>Salinispora arenicola</i>	Cancerchemoprevention	Jensen <i>et al.</i> , 2006
Komodoquinone A (18)	<i>Streptomyces</i> sp.	Neuritogenic activity	Itoh <i>et al.</i> , 2003
Lajollamycin (19)	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacterial	Manam <i>et al.</i> , 2005
Marinomycins (20)	' <i>Marinispora</i> '	Antibacterial; Anticancer	Kwon <i>et al.</i> , 2006
Mechercharmucins (21)	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer	Kanoh <i>et al.</i> , 2005
leucyl-4-hydroxyproline (22)	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumour	Hernández <i>et al.</i> , 2004
Salinosporamide A (NPI-0052) (23)	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer	Feling <i>et al.</i> , 2003
Sporolides (24)	<i>Salinispora tropica</i>	Unknown biological activity	Buchanan <i>et al.</i> , 2005
Trioxacarcins (25)	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; Anticancer; Antimalarial	Maskey <i>et al.</i> , 2004
Neomarinone (26)	<i>Streptomyces maritimus</i>	Anticancer	Moore <i>et al.</i> , 2005

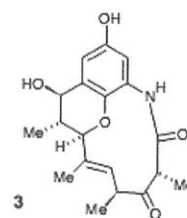
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



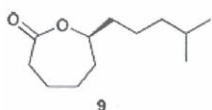
Abyssomicins (1)



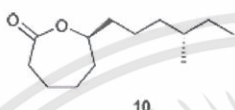
Aureovercillactam (2)



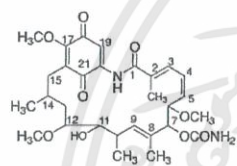
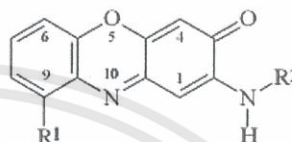
Cebulactams(3)



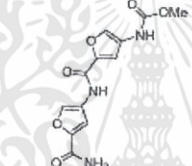
Caprolactones (4)



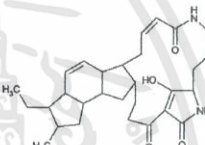
Chandrananimycins (5)



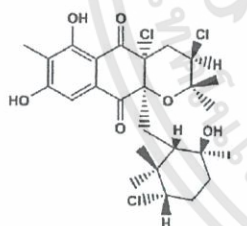
Geldanamycin (6)



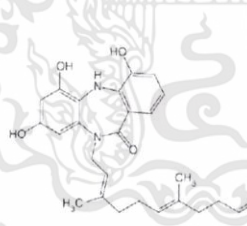
Proximicin (7)



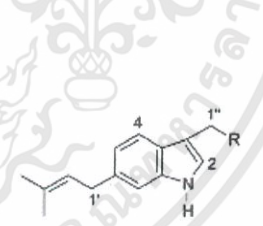
Ikarugamycin (8)



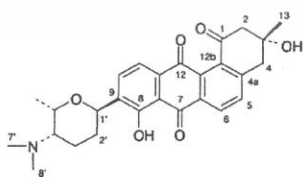
Chloro-dihydroquinones (9)



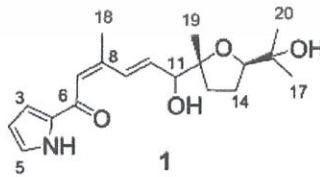
Diazepinomicin (10)



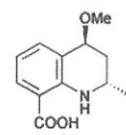
3,6-disubstitutedindoles (11)



Frigocyclinone (12)

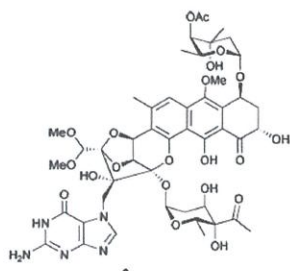


Glaciapyrroles (13)

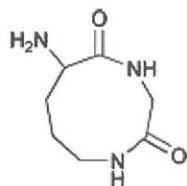


Helquinoline (15)

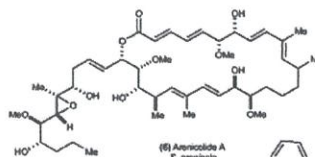
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



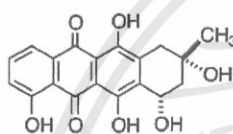
Gutingimycin (14)



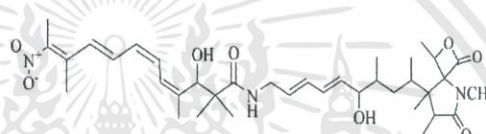
8-amino-[1,4]diazonane-2,5-dione (16)



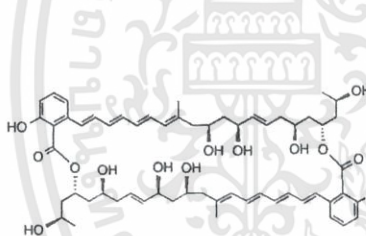
Saliniketol (17)



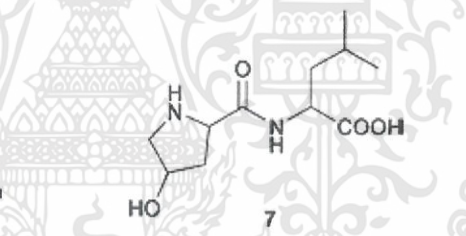
Komodoquinone A (18)



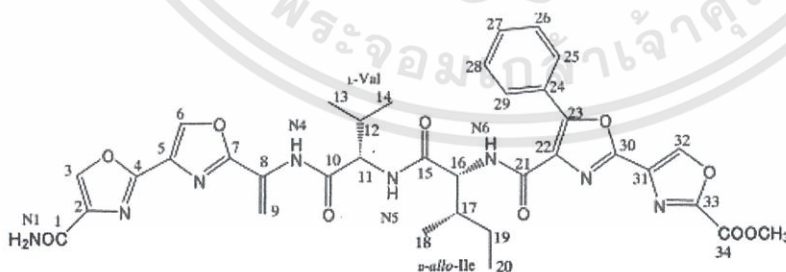
Lajollamycin (19)



Marinomycins (20)

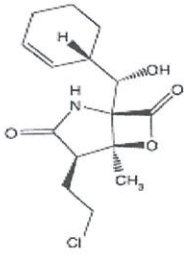


leucyl-4-hydroxyproline (22)

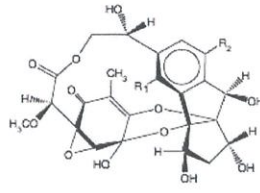


Mechercharmucins (21)

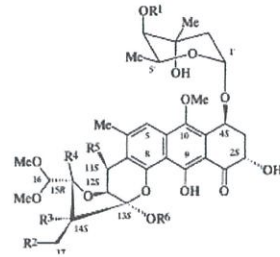
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



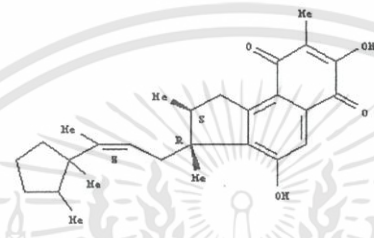
Salinosporamide A (23)



Sporolides (24)



Trioxacarcins (25)



Neomarinone (26)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ

##### 3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดิน ซากตะกอน และสิ่งมีชีวิตในทะเล เช่น ฟองน้ำ สาหร่าย จากบริเวณใต้ท้องทะเล และชายฝั่ง จังหวัดสตูล พังงา ตรังและภูเก็ต จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบ่งดินบางส่วนส่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ถึง 3 วันหรือจนกว่าดินจะแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างดินที่แห้งแล้วบดให้ละเอียดเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป ส่วนตัวอย่างที่เป็นฟองน้ำ และสาหร่าย จะทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยใช้ตัวอย่างสด

##### 3.1.2 การแยกเชื้อ

การแยกเชื้อแบ่งได้เป็น 2 วิธีหลักคือการแยกเชื้อจากตัวอย่างสดที่เป็นฟองน้ำและสาหร่าย และการแยกเชื้อจากตัวอย่างแห้ง

##### 3.1.2.1 การแยกเชื้อจากตัวอย่างสดที่เป็นฟองน้ำ และสาหร่าย

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาล้างด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งตัวอย่างมา 1 กรัมใส่ในน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร จากนั้นบดตัวอย่างให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด (Homogenizer) และ เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ให้ได้ความเจือจางที่  $10^{-2}$   $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  จากนั้นนำแต่ละความเจือจางมาเกลี่ย ลงในอาหาร Humic acid vitamin agar AV-agar และ Soil extract agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

3.1.2.2 การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างแห้งแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ กระบวนการทางกายภาพ (Physical treatment) และกระบวนการทางเคมี (Chemical treatment)

##### 3.1.2.2.1 กระบวนการทางกายภาพ ได้แก่

##### 1 การผึ่งตัวอย่างดินที่อุณหภูมิห้อง (Air dry treatment)

นำตัวอย่างดินที่ตากแห้งมาบดจนละเอียด จากนั้นชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัมใส่ในสารละลาย Basic lauryl sulfate ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดย Vortex นาน 1 นาที และ Sonicate 30 วินาที เจือจางตัวอย่างในสารละลาย Basic lauryl sulfate ให้ได้ระดับความเจือจาง  $10^{-2}$  ถึง  $10^{-5}$  และเลือกนำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง  $10^{-3}$   $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  มาเกลี่ยลงบนอาหาร Humic acid vitamin agar AV-agar และ Marine soil extract agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

## 2 การอบตัวอย่างดิน (Dry heat treatment)

นำตัวอย่างดินที่ตากแห้งและบดจนละเอียดแล้ว 1 กรัม ใส่ลงในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Basic lauryl sulfate ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการ Vortex 1 นาที และ Sonicate 30 วินาที เจือจางตัวอย่างในสารละลาย Basic lauryl sulfate ให้มีระดับความเจือจาง  $10^{-2}$  ถึง  $10^{-4}$  นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง  $10^{-2}$   $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  มากลี่ยลงบนอาหาร Humic acid vitamin agar AV-agar และ Marine soil extract agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

## 3 การต้มตัวอย่างดิน (Moist heat treatment)

ชั่งตัวอย่างดินที่บดละเอียดแล้ว 1 กรัม ใส่ในสารละลาย Basic lauryl sulfate ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการ Vortex นาน 1 นาที และ Sonicate 30 วินาที ต้มส่วนผสมที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเจือจางตัวอย่างในสารละลาย Basic lauryl sulfate ให้มีระดับความเจือจาง  $10^{-2}$  จนถึง  $10^{-4}$  นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง  $10^{-2}$   $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  มากลี่ยลงบนอาหาร Humic acid vitamin agar AV-agar และ Marine soil extract agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

### 3.1.2.2 กระบวนการทางเคมี

นำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยการ Vortex นาน 1 นาที จากนั้นบ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เจือจางตัวอย่างในสารละลาย Basic lauryl sulfate ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับความเจือจาง  $10^{-2}$  จนถึง  $10^{-4}$  นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง  $10^{-2}$   $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  มากลี่ยลงบนอาหาร Humic acid Vitamin agar AV-agar และ Marine soil extract agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

เมื่อบ่มเชื้อครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว เลือกลูกโค โคลินที่มีลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยสีท โดยตรวจลักษณะโค โคลินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ระยะการทำงานสูง (Long working distance lens) จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract-Malt extract agar และเก็บเชื้อไว้ในหลอดอาหารเฉียง (YM slant) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

### 3.1.3 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast extract – malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยวยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มเฉียงที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสารและแพร่สารนั้นเข้าไปในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ด้วยจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* โดยลาก

จุลินทรีย์ทดสอบให้ซิคและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อมากที่สุด แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่จุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้

### 3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อดังนี้

#### 3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญ โดยเลี้ยงเชืบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (ISP) ชนิดต่างๆ โดยวิธี Crossstatch TReak (Shiring and Gottlieb, 1966) ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและแรงควัตุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจสอบลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อด้วย Scanning EleTRon Microscope (SEM) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายโคติน การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิคซ์ในเตรท (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 ฟั่นแล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 2-3 นาที เพื่อดู spot ที่เกิดขึ้นเทียบกับ standard

##### 3.2.2.2 การวิเคราะห์ Whole cell sugar

นำเซลล์แห้งมาไฮโดรไลส์ด้วย 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วจึงเติม Ba(OH)<sub>2</sub> และปรับ pH อยู่ในช่วง 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดเอาสารละลายส่วนบน (supernatant) มาทำให้แห้ง ละลายซ้ำด้วยน้ำ จากนั้น spot ลงบน cellulose TLC plate develop ด้วย

butanol - water - pyridine - toluene (10:6:6:1) ฟันด้วย acid aniline phthalate อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เทียบ spot ที่ได้กับ standard

### 3.2.2.3 การวิเคราะห์ Polar lipid

นำเซลล์แห้งที่ได้มาสกัด polar lipid ด้วย methanol ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วสกัดต่อด้วย chloroform กรองกากเซลล์ (debris) ออก ทำการ partition ด้วย chloroform และ saline นำชั้น chloroform ไประเหยให้แห้ง ละลายซ้ำด้วย chloroform - methanol และดูดสารตัวอย่าง spot ลงบน HPTLC (Merck Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 10x10 cm) ทำการ develop 2 ทิศทาง (two-dimensional development) ด้วย solvent system 2 ชนิด คือ chloroform - methanol - water (65:25:4) และ chloroform - acetic acid - methanol - water (80:18:12:5) แล้วฟันด้วย 50% sulfuric acid อบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สังเกต spot ที่เกิดขึ้น

### 3.2.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid)

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

### 3.2.2.5 การวิเคราะห์ Isoprenoid quinone

นำเซลล์แห้งสกัดด้วย chloroform - methanol อัตราส่วน 2 :1 บนเครื่องเขย่า 1 คืน จากนั้นกรองและทำให้แห้ง นำส่วนที่ได้ละลายซ้ำด้วย acetone แล้วทำให้บริสุทธิ์บนแผ่น TLC (Merck No. 1.05715 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20x20 cm) เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC

## 3.2.3 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 จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ และล้างด้วย 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  $10 \mu\text{l}$  heated DNA ( $1 \text{ mg/ml}$ ) ด้วย  $10 \mu\text{l}$  nuclease  $P_1$  บ่มที่อุณหภูมิ  $50$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา  $1$  ชั่วโมง และไฮโดรไลส์ต่อ ด้วย  $10 \mu\text{l}$  alkaline phosphatase ที่อุณหภูมิ  $37$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา  $1$  ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ ด้วย HPLC

### 3.2.5 Photobiotin labeling DNA-DNA Hybridization

#### 3.2.5.1 Immobilization of DNA in microtiter plate

หยด  $100 \mu\text{l}$  ของสารละลาย heat – denatured DNA ( $1 \mu\text{g DNA / well}$ ) ของ type TRain, 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 TRain ในหลอด eppendrot เติมสารละลาย photobiotin ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวางในน้ำแข็ง เปิดฝาไว้แล้วส่องด้วยแสงจากหลอด sunlamp เติม  $0.1\text{M Tris-HCl buffer (pH 9.0)}$  และ *n*-butanol บั่นด้วย vortex บั่นเหวี่ยงที่  $12000 \text{ rpm}$  นาน  $20$  นาที นำสารละลายชั้นบนทิ้ง เติม *n*-butanol และบั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทิ้งสารละลายชั้นบน นำ DNA ที่ติดฉลากแล้วไปคัมในน้ำเคือด  $15$  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 TRain ลงแต่ละหลุม ปิด plate ด้วยแผ่นพลาสติก บ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม  $12$  ชั่วโมง แล้วทิ้งสารละลายนี้

#### 3.2.5.5 Detection of biotinylated – DNA annealing to immobilized – DNA

เมื่อเทสารละลาย hybridize ทิ้งแล้ว ล้างด้วย  $0.2\times\text{SSC}$   $3$  ครั้ง เติมสารละลาย I (Bovine serum albumin (Fraction V) , Triton X – 100, PBS) บ่มไว้ที่  $30$  องศาเซลเซียส นาน  $10$  นาที เทสารละลาย I ทิ้ง

**Colorimetric method :** เติมสารละลาย TReptavidin-peroxidase ใน PBS กับ 0.5 % BSA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง และล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย tetramethyl benzidine – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที จะเกิดสารละลายสีฟ้า แล้ววัดความเข้มของสีด้วย microplate reader (630 nm) หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้ววัดความเข้มที่ 450 nm จะได้ค่าที่ต้องการ

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

ผลจากการศึกษา DNA relatedness จะสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อได้ หากเชื้อที่พบเป็นเชื้อที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานไว้จำเป็นต้องศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อใหม่ต่อไป โดยใช้วิธีการดังที่กล่าวมา

### 3.3 การหมักเพื่อผลิตสารและการสกัดแยกสาร

ทำการเลี้ยงเชื้อใน Seed medium (Yeast extract – Malt extract broth; pH 7.3) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1% CaCO<sub>3</sub>; pH 7.3) โดยเติม 1% inoculum ของ seed medium ลงใน production medium บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน — นำน้ำหมักเชื่อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) ในส่วนของเซลล์นำมาแช่ใน MeOH และ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ตามลำดับ จากนั้นระเหยภายใต้ความดัน และนำส่วนที่เหลือมาทำการสกัดด้วย EtOAc 3 ครั้ง จะได้สารสกัดหยาบในส่วนของเซลล์ เปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบในส่วนของน้ำใสและส่วนของเซลล์ จากนั้นเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีนำไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป

### 3.4. การสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 3.3 ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและนำมาสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี และเมื่อได้สารบริสุทธิ์แล้ว จึงนำไปตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ต่อไป

### 3.5. การแยกและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีตแต่ละชนิดนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิคทาง spectroscopy เช่น <sup>1</sup>H-NMR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้

#### 3.6.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 10.3 ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยวิธี agar diffusion (Lorian, 1980) วิธีการทดสอบมีขั้นตอนดังนี้ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ โดยใช้เชื้อทดสอบชนิดเดียวกับในข้อ 3.1.3 นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้ปั่นสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำ disc ที่หยคสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20  $\mu$ l/disc ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำ disc control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด



## บทที่ 4

### ผลการดำเนินการวิจัย

#### 4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างดิน ดินตะกอน และสิ่งมีชีวิตในทะเล เช่น ฟองน้ำ สาหร่าย รวมถึงพืช น้ำแต่ละชนิด จากบริเวณใต้ท้องทะเลและชายฝั่ง จังหวัดตรังและภูเก็ต นำมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสปีทหายากและนำตัวอย่างดินมาวัดความเป็น กรด-เบส พบว่าได้เชื้อแอกติโนมัยสปีททั้งหมด 102 ไอโซเลต จากดินตัวอย่างที่มีระดับความเป็นกรด-ด่างในช่วง 6.84- 7.95 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอกติโนมัยสปีทที่แยกได้

ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัด	พีเอช	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ฟองน้ำ 1 ( <i>Xestospongia</i> )	ตรัง	8.06	ST11	ST11-1, ST11-2, ST11-3, ST11-4, ST11-5, ST11-6, ST11-7, ST11-8, ST11-9, ST11-10, ST11-11, ST11-12, ST11-13, ST11-14, ST11-15, ST11-16, ST11-17, ST11-18, ST11-19, ST11-20, ST11-21, ST11-22, ST11-23, ST11-24, ST11-25, ST11-26, ST11-27, ST11-28, ST11-29, ST11-30, ST11-31, ST11-32, ST11-33, ST11-34, ST11-35, ST11-36, ST11-37, ST11-38, ST11-39, ST11-40, ST11-41, ST11-42, ST11-43, ST11-44, ST11-45, ST11-46, ST11-47, ST11-48, ST11-49, ST11-50, ST11-51, ST11-52, ST11-53, ST11-54, ST11-55, ST11-56, ST11-57, ST11-58, ST11-59, ST11-60
ฟองน้ำ 2 ( <i>Xestospongia</i> )	ภูเก็ต	7.91	ST07	ST07-01, ST07-2, ST07-3, ST07-4, ST07-5, ST07-6, ST07-7, ST07-8, ST07-9, ST07-10, ST07-11, ST07-12, ST07-13, ST07-14, ST07-15, ST07-16, ST07-17, ST07-18, ST07-19, ST07-20, ST07-21, ST07-22, ST07-23, ST07-24, ST07-25, ST07-26, ST07-27, ST07-28, ST07-29, ST07-30, ST07-31
สาหร่าย	พังงา	8.14	AL6	AL6-1, AL6-2, AL6-3, AL6-4
ดินเลน	สตูล	7.88	S1	S1-1, S1-2, S1-3, S1-4, S1-5, S1-6, S1-7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดการกระจายเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่แยกได้

ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัด	รหัสเชื้อ	สกุลของเชื้อ
ฟองน้ำ 1 ( <i>Xestospongia</i> )	ตรัง	ST11-1, ST11-2, ST11-3, ST11-4, St11-5, ST11-6, ST11-7, ST11-8, ST11-9, ST11-10, ST11-11, ST11- 12, ST11-13, ST11-14, ST11-15, ST11-16, ST11-17, ST11-18, ST11-19, ST11-20, ST11-21, ST11-22, ST11-23, ST11-24, ST11-25, ST11-26, ST11-27, ST11-28, ST11-29, ST11-30, ST11-31, ST11-32, ST11-33, ST11-34, ST11-35, ST11-36, ST11-37, ST11-38, ST11-39, ST11-40, ST11-41, ST11-42, ST11-43, ST11-44, ST11-45, ST11-46, ST11-47, ST11-48, ST11-49, ST11-50, ST11-51, ST11-52, ST11-53, ST11-54, ST11-55, ST11-56, ST11-57, ST11-58, ST11-59, ST11-60	<i>Streptomyces</i>
ฟองน้ำ 2 ( <i>Xestospongia</i> )	ภูเก็ต	ST01-07	<i>Nocardia</i>
ฟองน้ำ 2 ( <i>Xestospongia</i> )	ภูเก็ต	ST01-02, ST01-03, ST01-04, ST01-05, ST01-06, ST01-01, ST01-08, ST01-09, ST01-10, ST01-11, ST01-12, ST01-13, ST01-14, ST01-15, ST01-16, ST01-17, ST01-18, ST01-19, ST01-20, ST01-21, ST01-22, ST01-23, ST01-24, ST01-25, ST01-26, ST01-27, ST01-28, ST01-29, ST01-30, ST01-31	<i>Streptomyces</i>
สาหร่าย	พังงา	AL6-1, AL6-2, AL6-3, AL6-4	<i>Micromonospora</i>
ดินเลน	สตูล	S1-1, S1-2, S1-3, S1-4, S1-5, S1-6, S1-7	<i>Salinispora</i>

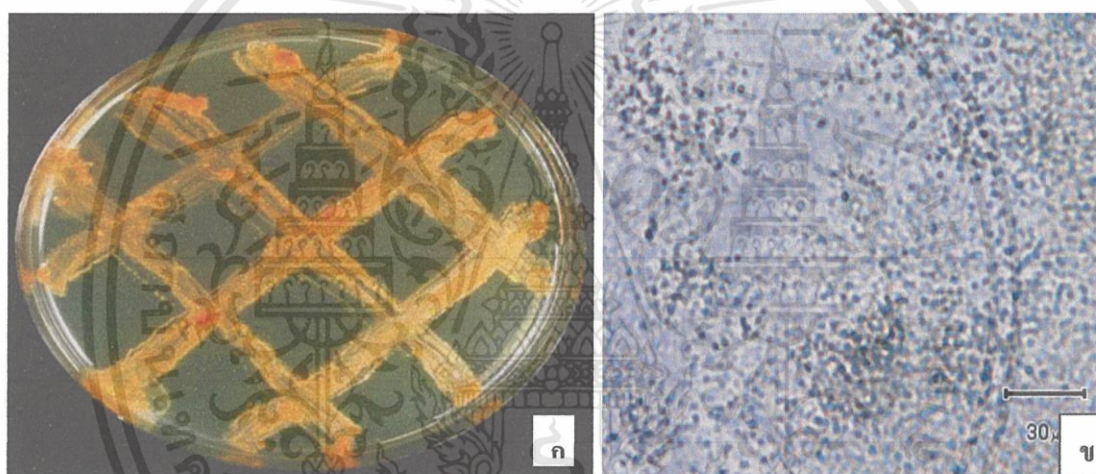
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีท

### 4.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

ในจำนวนเชื้อแอกติโนมัยสีททั้งหมด 102 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดเชื้อออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้

**กลุ่มที่ 1** กลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศแต่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 (yeast extract – malt extract agar) เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 4 ไอโซเลต ได้แก่ AL6-1, AL6-2, AL6-3, AL6-4 เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 6 ความเป็นกรด-ด่าง 6 ถึง 9 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้ง เจลาติน โปรตีนในนมและรีควิวซ์ในเครทได้



รูปที่ 1. ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AL6-1 บนอาหาร ISP2

ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(SEM)

### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 1

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดโคอะมิโนพีมีติกแบบ *meso* (cell wall type II, peptidoglycan type A1 $\gamma$ ) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส กาแลคโตส และ ไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอินซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาติดีลอินซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositol mannosides) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทาง

อนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า

เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล

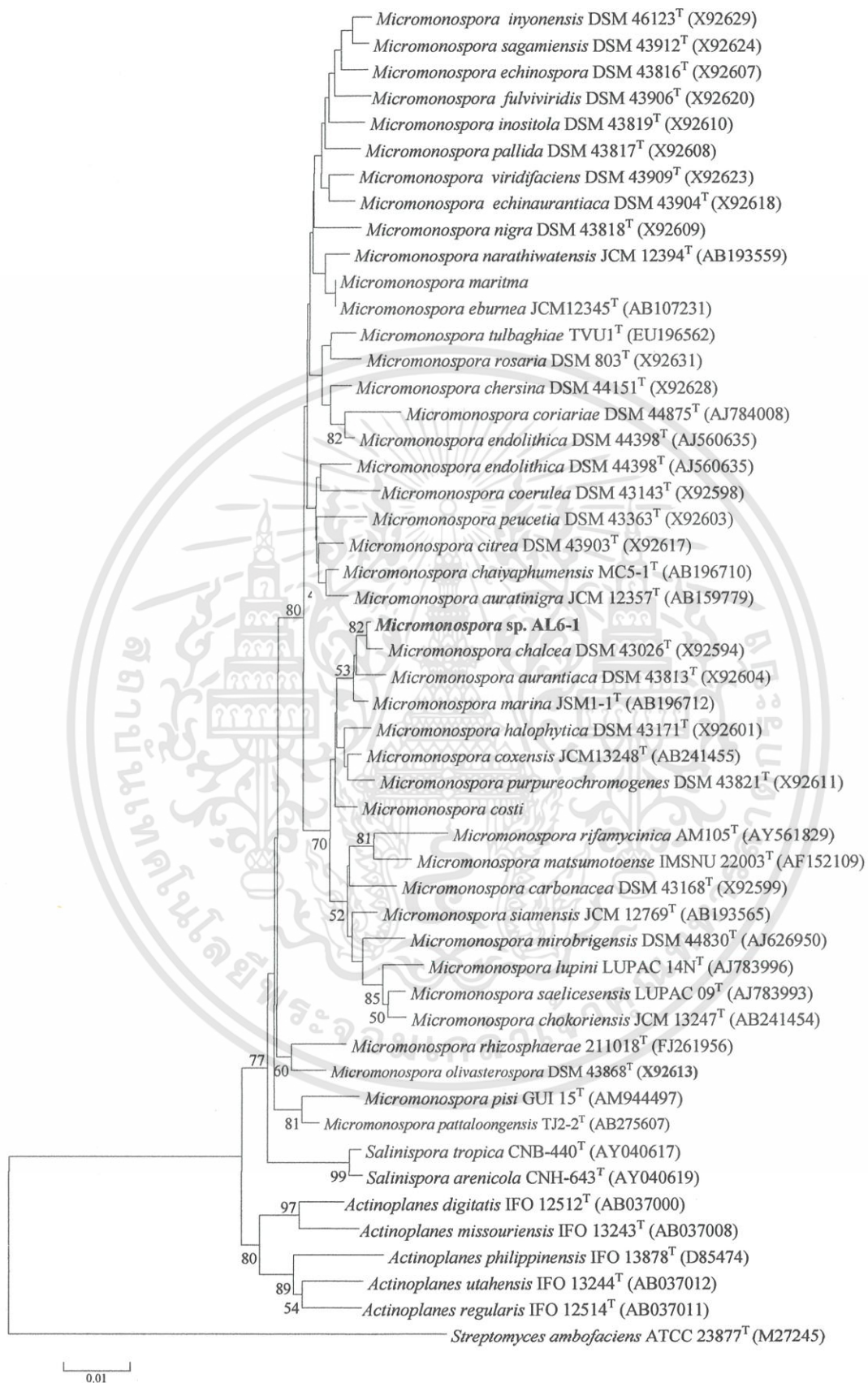
*Micromonospora*

#### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AL6-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอสคิโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต AL6-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora chalybeata* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.8 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 82 (รูปที่ 4) ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต AL6-1 และเชื้อ type strain ของสกุล *Micromonospora* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Micromonospora chalybeata*) มีค่าเท่ากับ 82.8 %



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

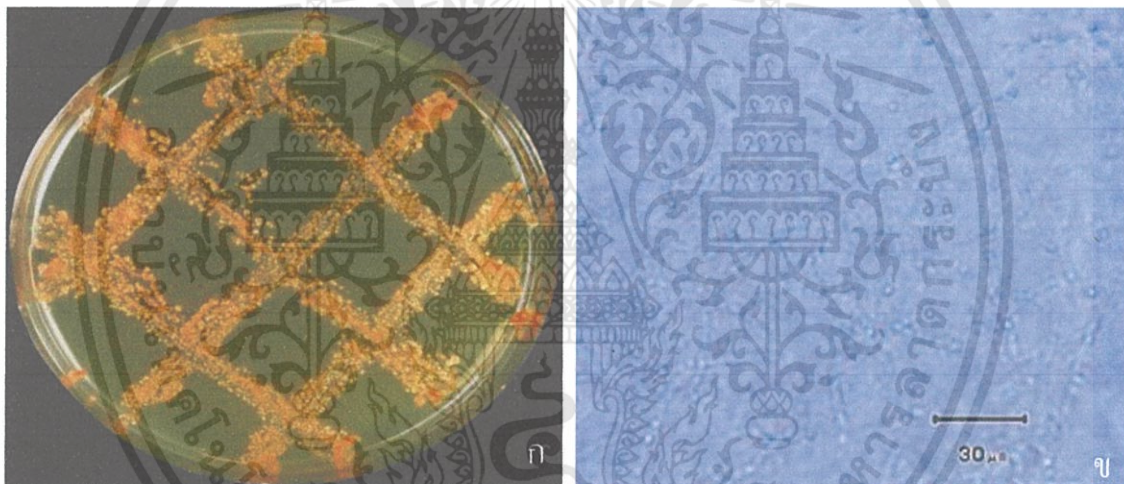


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AL6-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีตที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีส้ม ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร เจริญได้ดีบนอาหาร YM ประกอบด้วยเชื้อ 7 ไอโซเลต คือ S1-1, S1-2, S1-3, S1-4, S1-5, S1-6, S1-7

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 ความเป็นกรด-ด่าง 6 ถึง 9 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในนมได้ สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลดี-แมนนิทอล แอล-แรมโนส ดี-มิลิไบโอส ดี-เรพิโนส แลคโตส ดี-กาแลคโตส แอล-อะราบิโนส เซลโลไบโอส ดี-ฟรักโตส ดี-ไซโลส



## รูปที่ 3. ก แสดงลักษณะ โคลนินของเชื้อไอโซเลต S1-1 บนอาหาร ISP2

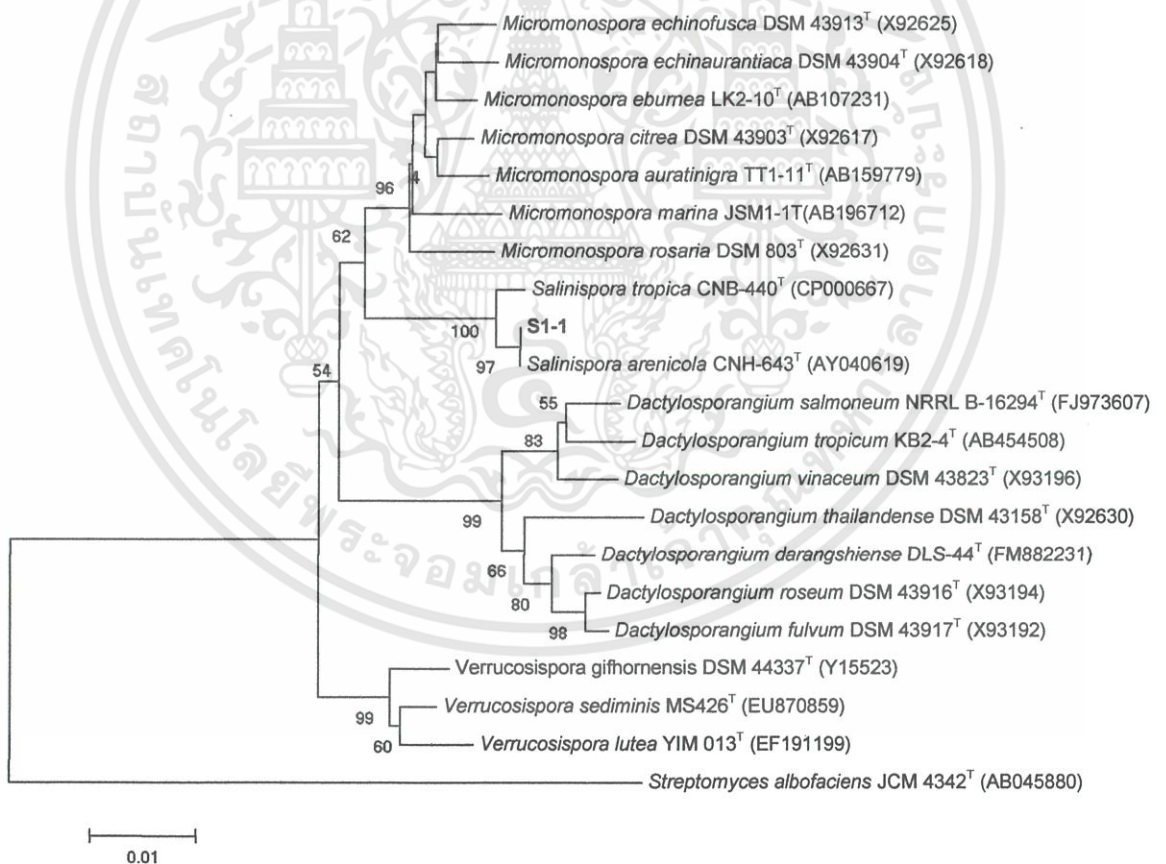
ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

**ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2**

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมีโนพีมิลิกแบบ meso พบน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส แรมโนส ไฮโลส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Salinispora*

**การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต S1-1**

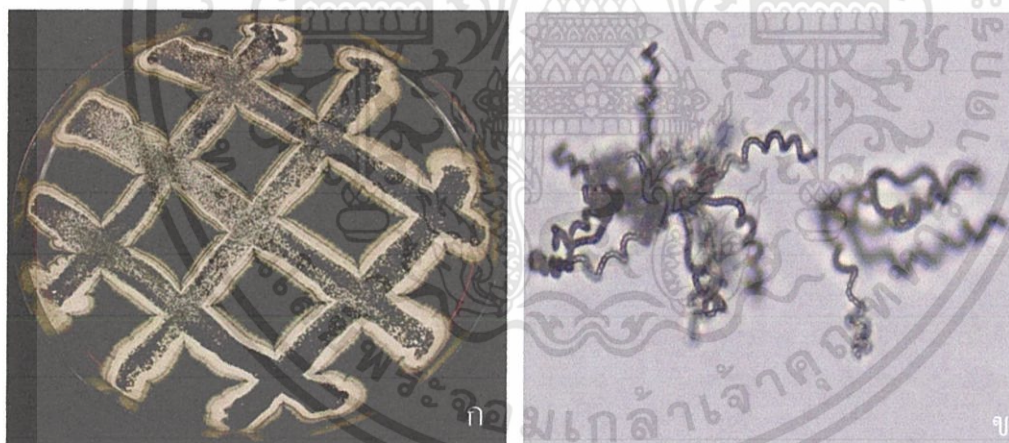
ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต TR9-5 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Salinispora arenicola* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 100 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 97 (รูปที่ 6) ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต S1-1 และเชื้อ type strain ของสกุล *Salinispora* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Salinispora arenicola*) มีค่าเท่ากับ 87.6 %



**รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต S1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)**

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสัที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาว เส้นใยอาหารน้ำตาลแดงเข้ม สร้างรงควัตถุน้ำตาลแดง ลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว (Spiral type) เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ Oat meal agar มีสมาชิก 90 ไอโซเลต คือ ST11-1, ST11-2, ST11-3, ST11-4, St11-5, ST11-6, ST11-7, ST11-8, ST11-9, ST11-10, ST11-11, ST11-12, ST11-13, ST11-14, ST11-15, ST11-16, ST11-17, ST11-18, ST11-19, ST11-20, ST11-21, ST11-22, ST11-23, ST11-24, ST11-25, ST11-26, ST11-27, ST11-28, ST11-29, ST11-30, ST11-31, ST11-32, ST11-33, ST11-34, ST11-35, ST11-36, ST11-37, ST11-38, ST11-39, ST11-40, ST11-41, ST11-42, ST11-43, ST11-44, ST11-45, ST11-46, ST11-47, ST11-48, ST11-49, ST11-50, ST11-51, ST11-52, ST11-53, ST11-54, ST11-55, ST11-56, ST11-57, ST11-58, ST11-59, ST11-60, ST01-02, ST01-03, ST01-04, ST01-05, ST01-06, ST01-01, ST01-08, ST01-09, ST01-10, ST01-11, ST01-12, ST01-13, ST01-14, ST01-15, ST01-16, ST01-17, ST01-18, ST01-19, ST01-20, ST01-21, ST01-22, ST01-23, ST01-24, ST01-25, ST01-26, ST01-27, ST01-28, ST01-29, ST01-30, ST01-31

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 7 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 6-12 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลาย โปรตีนในนม แป้ง เจลาติน และสามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ และสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *MRSA*, *B.subtilis*, *M.luteus*, *S.aureus* ได้



รูปที่ 5 ก แสดงลักษณะโคโลนีการเจริญของเชื้อไอโซเลต ST1-11 บนอาหาร ISP2

ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

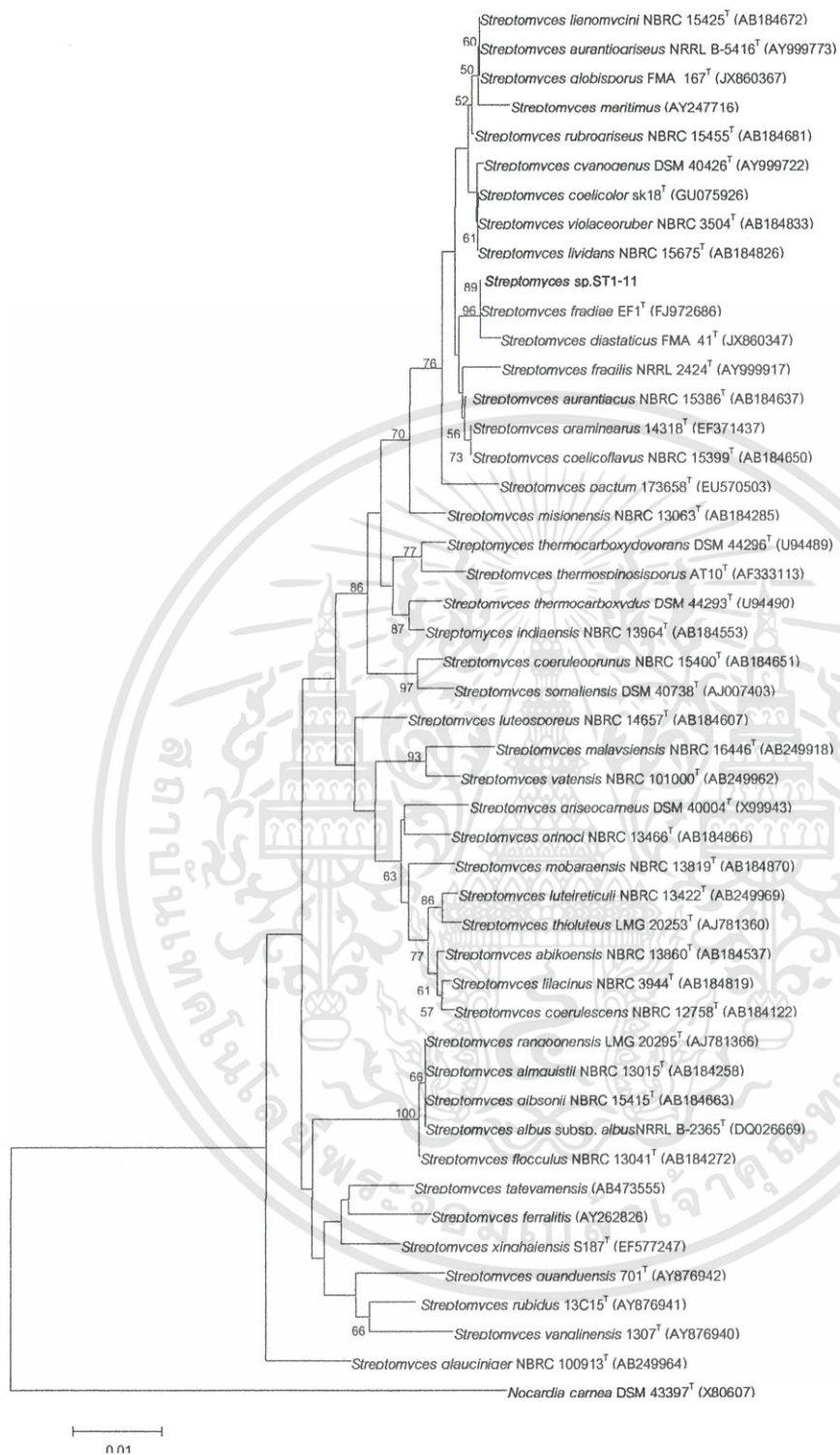
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3

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

### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต ST1-11

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต TR6-3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces fradiae* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.9 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 89 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต ST1-11 และเชื้อ type strain ของสกุล *Streptomyces* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Streptomyces fradiae*) มีค่าเท่ากับ 89.9 %

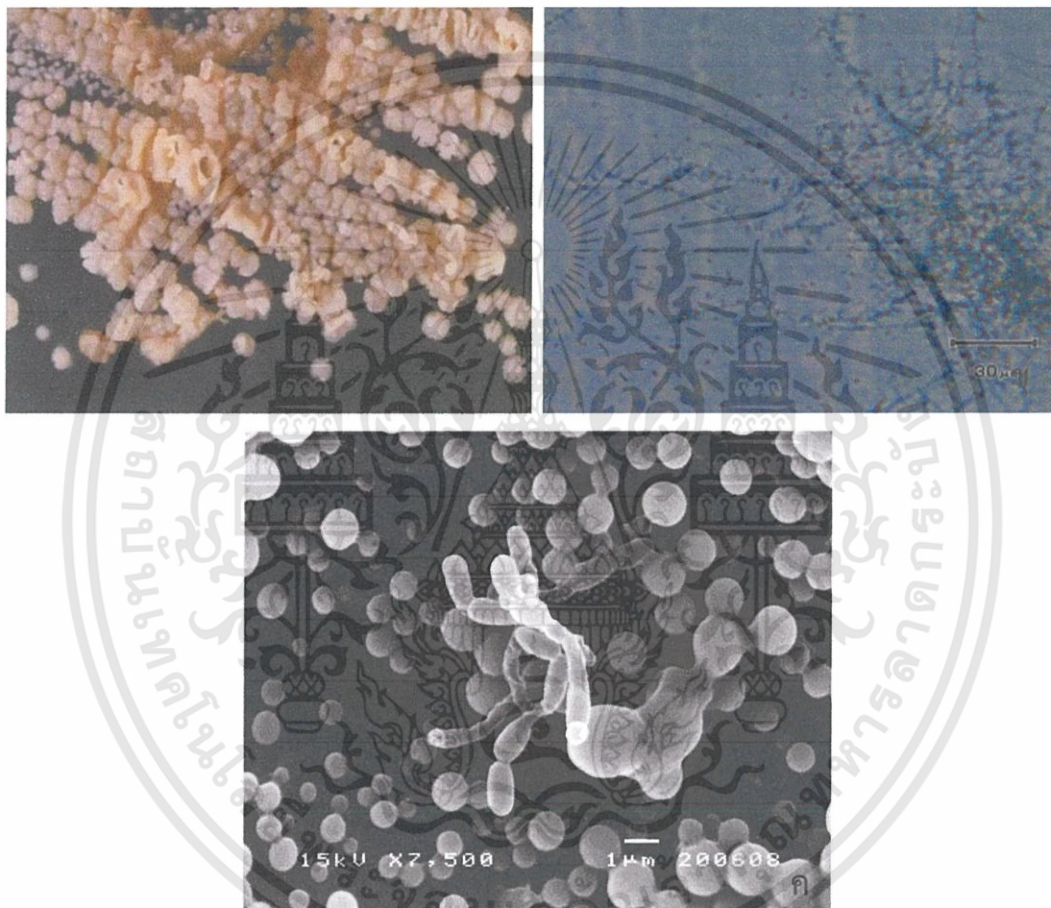


รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ST1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ แต่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์ยาก สปอร์มีลักษณะเป็นช่อ รูปรี และสร้างชิ้นส่วนรูปกลม (globose body) เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ Oatmeal agar เชื้อในกลุ่มนี้มี 1 ไอโซเลตคือ ST01-07

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ด้วยความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-12 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส ริคิวิชไนเตรท ตกตะกอนในนม แต่ไม่สามารถย่อยสลายแป้ง เจลาติน และนมได้



รูปที่ 7 ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต ST01-07 บนอาหาร ISP2  
 ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)  
 ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

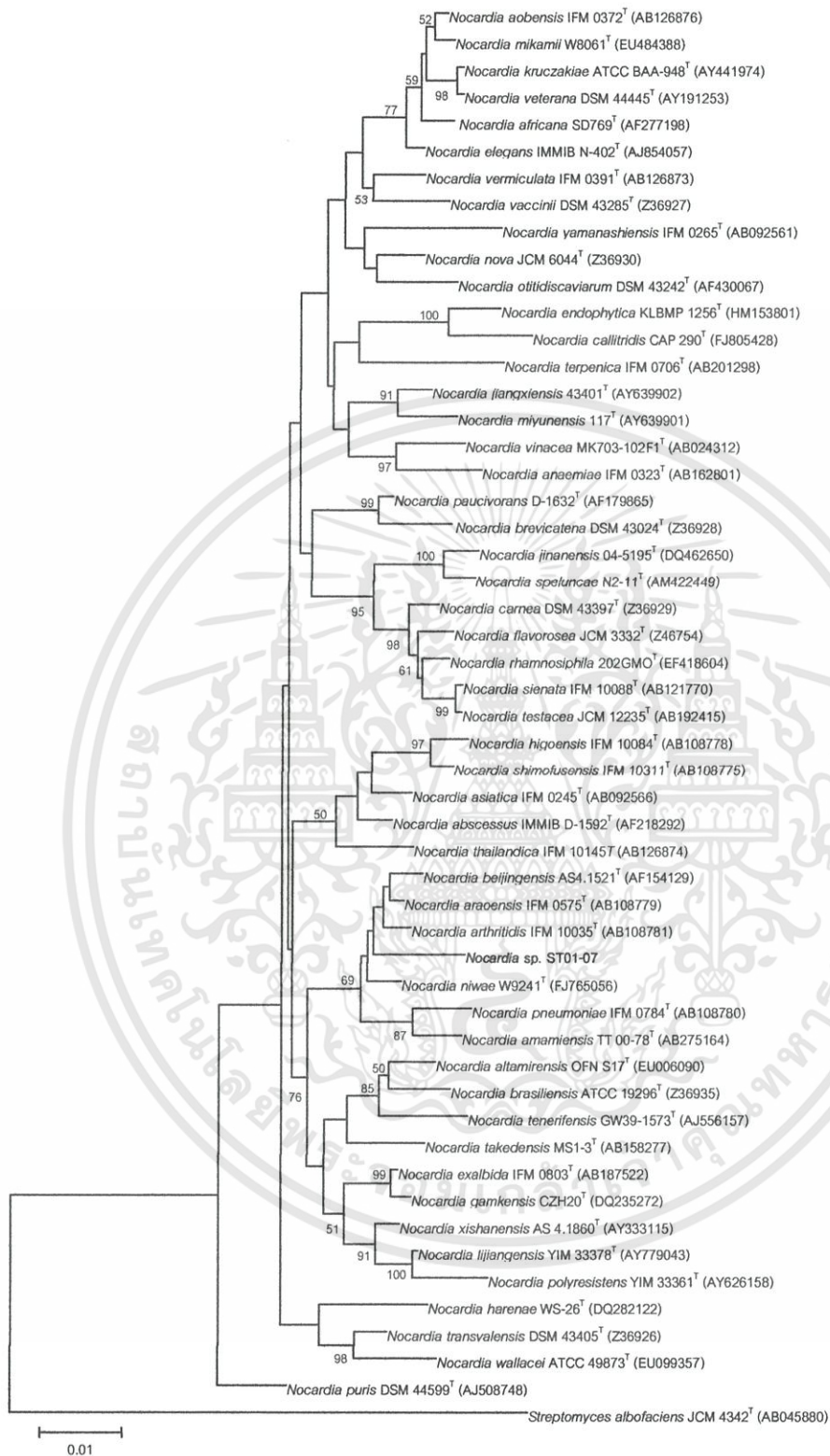
#### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 4

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดไคอะมิโนพีมิดิกแบบ *meso* (cell wall type II) พบน้ำตาลกลูโคส อะราบีโนส แมนโนส กาแลคโตส และไรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอิโนซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาติดีลอิโนซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositol mannosides) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Nocardia*

#### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต ST01-07

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต ST01-07 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Nocardia niwae* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.5 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 69





รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต ST01-07 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5. ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
I/AL6-1	Y.M.	ดี	-	ส้ม	-
	O.M.	ดี	-	ส้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	-	ส้ม	-
	T.A.	น้อย	-	ส้มจาง	-
	Gly.A.	น้อย	-	ส้มจาง	-
	Glu.A.	ดี	-	ส้มจาง	-
	Cz.sucrose	ดี	-	ส้มจาง	-
	N.A.	ปานกลาง	-	ส้ม	-
	P.I.A.	ดีมาก	-	ส้ม	-
II/S1-1	Y.M.	ดี	-	ส้มอมน้ำตาล	-
	O.M.	ดี	-	ส้มอมน้ำตาล	-
	I.S.	ปานกลาง	-	ส้ม	-
	T.A.	น้อย	-	ส้ม	-
	Gly.A.	น้อย	-	ส้มจาง	-
	Glu.A.	ดี	-	ส้มจาง	-
	Cz.sucrose	ดี	-	ส้มจาง	-
	N.A.	ปานกลาง	-	ส้ม	-
	P.I.A.	ดี	-	ส้มอมน้ำตาล	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
III/ST1-11	Y.M.	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลแดง	น้ำตาล แดง
	O.M.	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลแดง	น้ำตาล แดง
	I.S.	ปานกลาง	ขาวอมเทา	น้ำตาลแดง	-
	T.A.	น้อย	ขาว	น้ำตาลแดง	-
	Gly.A.	น้อย	ขาวอมเทา	น้ำตาลแดง	-
	Glu.A.	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลแดง	น้ำตาล แดง
	Cz.sucrose	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาลแดง	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาวอมเทา	น้ำตาลแดง	น้ำตาล แดง
	P.I.A.	ปานกลาง	ขาวอมเทา	น้ำตาลแดง	น้ำตาล แดง
IV/ST01-07	Y.M.	ดี	-	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาล เหลือง
	O.M.	ดี	-	น้ำตาลอ่อน	-
	I.S.	ปานกลาง	-	น้ำตาลอ่อน	-
	T.A.	น้อย	-	เหลืองอ่อน	-
	Gly.A.	น้อย	-	น้ำตาลอ่อน	-
	Glu.A.	ดี	-	น้ำตาลอ่อน	-
	Cz.sucrose	ดี	-	เหลืองจาง	-
	N.A.	ปานกลาง	-	น้ำตาลอ่อน	-
	P.I.A.	ดี	-	น้ำตาลอ่อน	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอสคิโทไมซีตาในแต่ละไอโซเลต

กลุ่มที่	รหัสชื่อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)										พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Starch hydrolysis	Nitrate reduction	Gelatin liquefaction	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)							
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>				<i>MRSA</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>					
1	AL6-1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	AL6-2	+	+	+	w	w	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	AL6-3	+	+	+	+	w	w	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	AL6-4	+	+	+	w	w	w	-	-	+	+	+	w	w	w	w	-	-	-	+	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีตาในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)**

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)								พีเอช								อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)											
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA				<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>										
2	S1-1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	S1-2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	S1-3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	S1-4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	S1-5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	S1-6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	S1-7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอสทีโคโมนิสที่นำในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)												พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)				
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	12	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation	<i>B.subtilis</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	MRSA	<i>P.aeruginosa</i>				<i>C.albicans</i>				
3	ST11-1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	16	20	21	18	-	-			
	ST11-2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	18	21	16	-	-			
	ST11-3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	21	23	16	-	-			
	ST11-4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	19	22	18	-	-			
	ST11-5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	15	21	18	-	-			
	ST11-6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	22	23	18	-	-			
	ST11-7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	20	23	18	-	-			
	ST11-8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	16	23	18	-	-			
	ST11-9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	18	21	18	-	-			
	ST11-10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	21	21	17	-	-			







ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียในยีสต์ในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)												พีเอช					อุณหภูมิ (°C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)				
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	1	2	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA				<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>			
3	ST11-41	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	16	20	21	18	-	-		
	ST11-42	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	18	21	16	-	-		
	ST11-43	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	21	23	16	-	-		
	ST11-44	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	19	22	18	-	-		
	ST11-45	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	15	21	18	-	-		
	ST11-46	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	22	23	18	-	-		
	ST11-47	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	20	23	18	-	-		
	ST11-48	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	16	23	18	-	-		
	ST11-49	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	18	21	18	-	-		
	ST11-50	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	21	21	17	-	-		

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียชนิดโมนัสทีฟาในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)												พีเอช						อุณหภูมิ (°C)						Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (inhibition zone, mm)				
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	1	2	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>								
3	ST11-51	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	16	20	21	18	-	-	-			
	ST11-52	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	14	18	21	16	-	-	-		
	ST11-53	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	17	21	23	16	-	-	-		
	ST11-54	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	15	19	22	18	-	-	-		
	ST11-55	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	13	15	21	18	-	-	-		
	ST11-56	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	15	22	23	18	-	-	-		
	ST11-57	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	17	20	23	18	-	-	-		
	ST11-58	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	14	16	23	18	-	-	-		
	ST11-59	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	14	18	21	18	-	-	-		
	ST11-60	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	19	21	21	17	-	-	-		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียชนิดโพลีแซคคาไรด์

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)												พีเอช						อุณหภูมิ (°C)						Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)				
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	1	2	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>									
	ST01-02	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	16	20	21	18	-	-					
	ST01-03	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	W	-	-	-	+	+	+	+	+	+	14	18	21	16	-	-					
	ST01-04	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	17	21	23	16	-	-					
	ST01-05	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	15	19	22	18	-	-					
	ST01-06	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	W	-	-	-	+	+	+	+	+	+	13	15	21	18	-	-					
	ST01-01	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	15	22	23	18	-	-					
	ST01-08	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	17	20	23	18	-	-					
	ST01-09	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	W	-	-	+	+	+	+	+	+	14	16	23	18	-	-					
	ST01-10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	14	18	21	18	-	-					
	ST01-11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	19	21	21	17	-	-					

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอสคิตาโนมีซีทาโนแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)										พีเอช						อุณหภูมิ (°C)						Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)				
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	7	1	2	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation	<i>B.subtilis</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>				MRSA	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>		
3	ST01-12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	16	20	21	18	-	-	
	ST01-13	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	W	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	14	18	21	16	-	-
	ST01-14	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	17	21	23	16	-	-
	ST01-15	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	W	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	15	19	22	18	-	-
	ST01-16	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	W	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	13	15	21	18	-	-
	ST01-17	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	15	22	23	18	-	-
	ST01-18	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	17	20	23	18	-	-
	ST01-19	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	14	16	23	18	-	-
	ST01-20	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	14	18	21	18	-	-
	ST01-21	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	19	21	21	17	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 6** แสดงลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอสคาติโนมัยซีทีทีในแต่ละไอโซเลต(ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)												พีเอช						อุณหภูมิ (°C)						Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm)				
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	1	2	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation	<i>B.subtilis</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	MRSA	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>								
3	ST01-22	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	16	20	21	18	-	-	-		
	ST01-23	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	18	21	16	-	-	-	
	ST01-24	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	21	23	16	-	-	-	
	ST01-25	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	19	22	18	-	-	-	
	ST01-26	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13	15	21	18	-	-	-	
	ST01-27	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	22	23	18	-	-	-	
	ST01-28	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17	20	23	18	-	-	-	
	ST01-29	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	16	23	18	-	-	-	
	ST01-30	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14	18	21	18	-	-	-	
	ST01-31	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19	21	21	17	-	-	-	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ตารางที่ 7 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อเอกติโนมัยซิต้าในแต่ละไอโซเลต

แหล่งคาร์บอน	กลุ่มที่												
	1				2				3				
Acid production from :													
D-Mannitol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	AL6-1	AL6-2	AL6-3	AL6-4	S1-1	S1-2	S1-3	S1-4	S1-5	S1-6	S1-7	S1-8	S1-9
	ST11-1	ST11-2	ST11-3	ST11-4	ST11-5	ST11-6	ST11-7	ST11-8	ST11-9	ST11-10			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีตาในแต่ละไฮโซเลต (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	กลุ่มที่																													
	3						3						3																	
Acid production from :	ST11-11	ST11-12	ST11-13	ST11-14	ST11-15	ST11-16	ST11-17	ST11-18	ST11-19	ST11-20	ST11-21	ST11-22	ST11-23	ST11-24	ST11-25	ST11-26	ST11-27	ST11-28	ST11-29	ST11-30	ST11-31	ST11-32	ST11-33	ST11-34	ST11-35	ST11-36	ST11-37	ST11-38	ST11-39	
D-Mannitol	+		w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	w	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีตาในแต่ละไอโซเลต (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	กลุ่มที่																														
	3												3																		
Acid production from :	ST11-40	ST11-41	ST11-42	ST11-43	ST11-44	ST11-45	ST11-46	ST11-47	ST11-48	ST11-49	ST11-50	ST11-51	ST11-52	ST11-53	ST11-54	ST11-55	ST11-56	ST11-57	ST11-58	ST11-59	ST11-60	ST01-02	ST01-03	ST01-04	ST01-05	ST01-06	ST01-08	ST01-01	ST01-09		
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-Ribose	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L-Rhamnose	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-Raffinose	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Silicic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lactose	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-Galactose	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cellulose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีตาในแต่ละไอโซเลต (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	กลุ่มที่ 3														กลุ่มที่ 3						กลุ่มที่ 3					
	ST01-10	ST01-11	ST01-12	ST01-13	ST01-14	ST01-15	ST01-16	ST01-17	ST01-18	ST01-19	ST01-20	ST01-21	ST01-22	ST01-23	ST01-24	ST01-25	ST01-26	ST01-27	ST01-28	ST01-29	ST01-30	ST01-31				
Acid production from :																										
D-Mannitol	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
D-Ribose	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	w	w	+	+	+	+	+	w	w	+	+	w			
L-Rhamnose	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w			
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
D-Raffinose	+	+	+	w	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+			
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Lactose	w	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	w	+	+	+	w	w	+	+			
D-Galactose	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+			
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+			
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต (ต่อ)

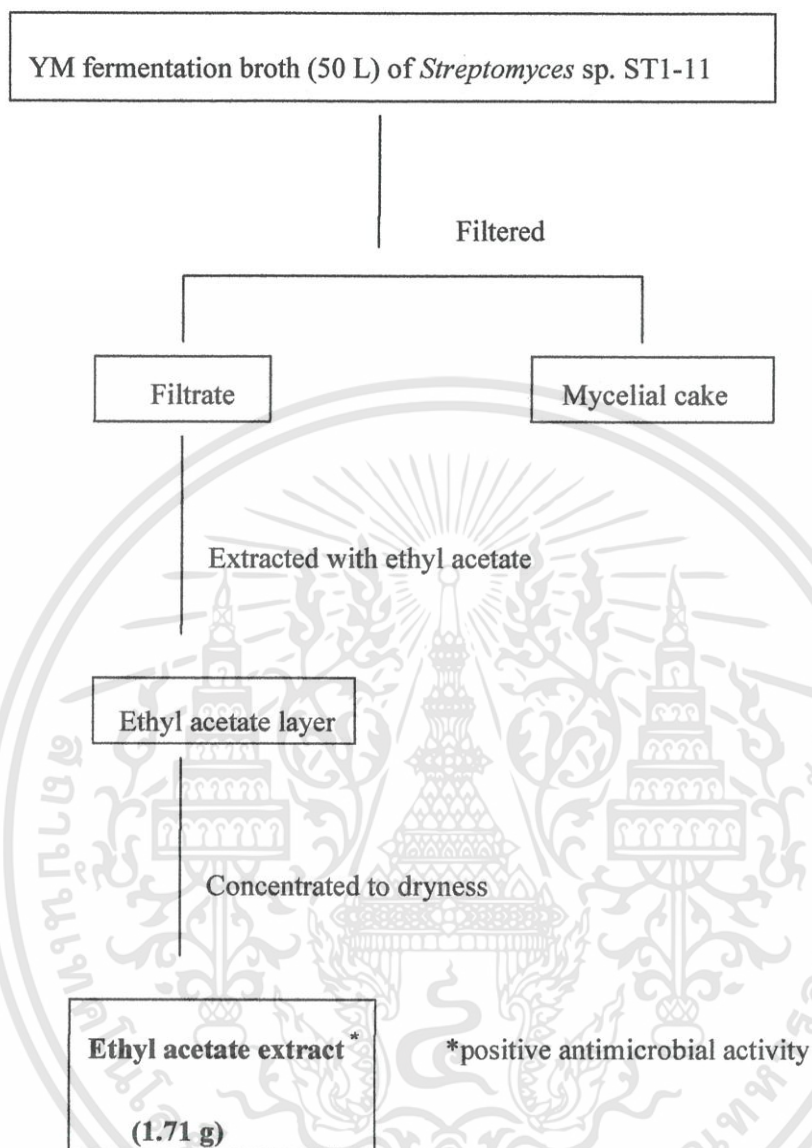
แหล่งคาร์บอน	กลุ่มที่															
	4															
Acid production from :	ST01-07															
D-Mannitol	w															
D-Ribose	-															
L-Rhamnose	-															
D-Melibiose	w															
D-Raffinose	-															
Glycerol	+															
Silicic	w															
Lactose	+															
D-Galactose	+															
L-Arabinose	-															
Cellobiose	+															
D-Fructose	-															
D-Xylose	+															

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตสารทุติยภูมิ การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีและกำหนดเอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือก

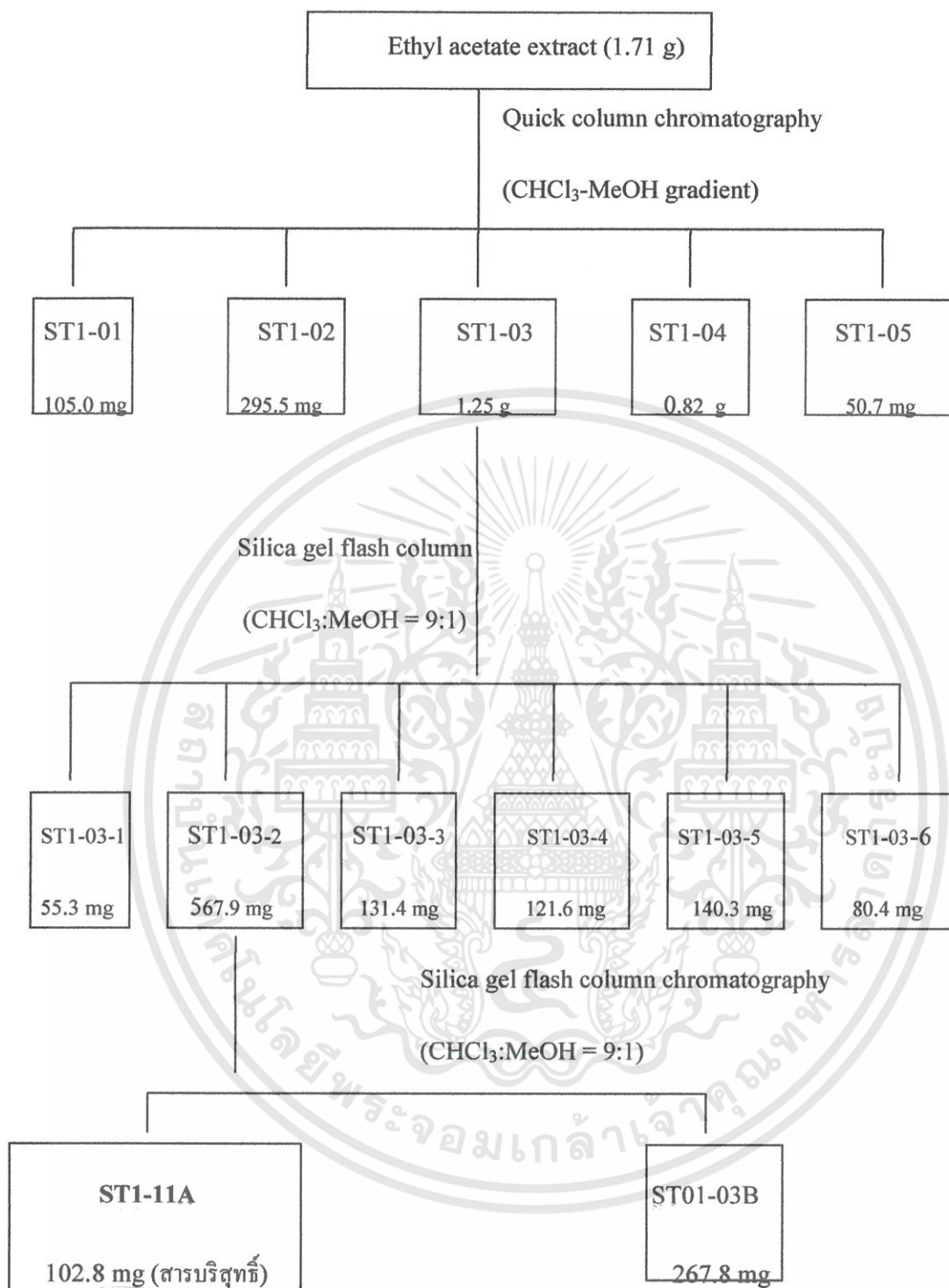
จากเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด 102 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 3 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้ดี จึงเลือกเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract-Malt extract บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 20 ลิตร และนำน้ำหมักเชื้อมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อตัวแทนกลุ่ม 3 ปริมาณ 1.71 กรัม ได้ทำการแบ่งสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์พบว่าสารสกัดแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้งเชื้อ MRSA ทดสอบได้ดี จึงได้นำมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเฟลสคอลลัมโครมาโตกราฟีโดยใช้ Silica gel 60 เป็นเฟสคงที่ และใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ และแยกต่อด้วยเทคนิค Gel filtration chromatography โดยใช้ sephadex\_LH20 เป็นเฟสคงที่และ 100% methanol เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารบริสุทธิ์ ST1-11A ปริมาณ 102.8 มิลลิกรัม ดังแสดงในรูปที่ 22 จากนั้นได้ทำการนำสาร ST1-11A มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า สารบริสุทธิ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* ได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 ขั้นตอนการสกัดสารจากน้ำหมักของเชื้อ *Streptomyces* sp. ST1-11

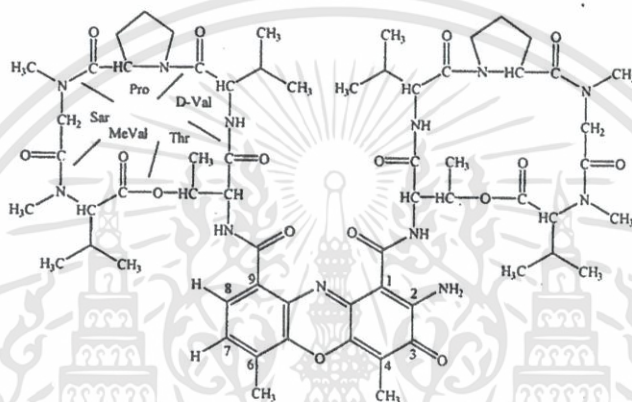
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อ *Streptomyces* sp. ST1-11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร ST1-11A มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีส้ม เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย ESI-TOF mass ปรากฏ pseudomolecular ion peak ที่  $m/z$  1255.2243  $(M+H)^+$  ซึ่งสามารถระบุสูตรโมเลกุลได้เป็น  $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$  สารนี้ให้ UV spectrum (in MeOH) ที่  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) ที่ 240 (4.35) และ 442 (4.20) nm สารนี้แสดงหมู่ amide carbonyl ( $\nu_{max}$  1636  $cm^{-1}$ ) และ lactone carbonyl ( $\nu_{max}$  1751  $cm^{-1}$ ) และมี optical rotation  $[\alpha]_D^{25}$  -181.7° ( $c = 0.132$  in MeOH) เมื่อนำสารมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค  $^1H$  และ  $^{13}C$  NMR ได้ข้อมูลที่มีลักษณะคล้ายสาร actinomycin D ดังตารางที่ 8



รูปที่ 11 แสดงลักษณะโครงสร้างของสาร ST1-11A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR spectral (in  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร ST1-11A และ actinomycin D

	Position	ST1-11 A		Actinomycin D (in $\text{CDCl}_3$ )	
		$d_c$ (ppm)	$d_H$ (ppm), mult, ( $J$ in Hz)	$d_H$ (ppm), mult, ( $J$ in Hz) <sup>a</sup>	$d_H$ (ppm), mult, ( $J$ in Hz) <sup>b</sup>
Sar	1	165.83/166.07	-	-	-
(1,2)	2	51.40/51.44	3.61, 1H, d (18.31)	3.63 (17.8)	3.61 (18)
			4.69, 1H, d (18.31)	4.79 (17.8)	4.73 (18)
			3.59, 1H, d (18.31)	3.63 (17.8)	3.62 (18)
			4.76, 1H, d (18.13)	4.72 (17.8)	4.79 (18)
	N-CH <sub>3</sub>	34.92/34.98	2.85, 6H, s	2.89/2.94	2.87
MeVal	1	167.32/167.41	-	-	-
(1,2)	2	71.27/71.43	2.64, 2H, m	6.03 (7.5)/5.95 (7.5)	2.67, m
	3	26.96	2.64, 2H, m	2.60-2.75	2.67, m
	3-Me	21.70/21.80	0.92, 3H, d (5.64)	0.96	0.95 (5.3)
			0.94, 3H, d (5.25)		
	4	19.37/19.42	0.71, 6H, d (5.06)	0.76	0.74 (5.2)
	N-CH <sub>3</sub>	39.27	2.87, 3H, s	2.89	2.88
		39.38	2.87, 3H, s		2.93
Val	1	173.10/173.48	-	-	-
(1,2)	2	58.74/58.91	3.49, 2H, m	3.62	3.53 (5.6), 3.55
	3	31.63/31.91	2.14, 2H, br s	2.2	2.17 (M)
	3-Me	19.22/19.24	0.86, 3H, d (6.79)	0.91(6.5)	0.89 (6.5)
			0.88, 3H, d (6.87)		0.90 (6.5)
	4	19.12-19.18	1.10, 3H, d (6.34)	1.13 (6.5)	1.11 (6.4)
			1.09, 3H, d (6.38)		
	NH	-	8.09, 1H, d (5.85)	8.19 (5.7)	8.10 (5.6)
		-	7.94, 1H, d (6.19)	7.94 (6.0)	7.94 (5.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR spectral (in  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร ST1-11A และ actinomycin D (ต่อ)

	Position	ST1-11A		Actinomycin D (in $\text{CDCl}_3$ )	
		$d_c$ (ppm)	$d_H$ (ppm), mult, ( $J$ in Hz)	$d_H$ (ppm), mult, ( $J$ in Hz) <sup>a</sup>	$d_H$ (ppm), mult, ( $J$ in Hz) <sup>b</sup>
Pro	1	173.02/2CO	-	-	-
(1,2)	2	56.22/56.38	5.94, 1H, d (9.08)	3.9	5.98 (8.0)
			6.00, 1H, d (9.05)	4	6.03 (8.0)
	3	31.05/31.37	1.79, 1H, m	2.1-2.2	1.7-2.4/2.70, m
			2.67, 1H, m		
			1.84, 1H, m		
			2.95, 1H, m		1.7-2.4/2.90, m
	4	22.98/23.14	2.05, 2H, m	1.85	1.7-2.4
			2.26, 2H, m		
	5	47.38	3.70, 1H, m	3.70-3.75	3.4-4.2
			3.94, 1H, m	2.67	
		47.64	3.70, 1H, m		
			3.80, 1H, m		
Chrom	1	101.59	-	-	-
	2	147.47	-	-	-
	3	178.85	-	-	-
	4	111.38	-	-	-
	4a	145.69	-	-	-
	5a	140.29	-	-	-
	6	127.42	-	-	-
	7	130.1	7.34, 1H, d (7.77)	7.37	7.37 (8.0)
	8	125.72	7.62, 1H, d (7.77)	7.64	7.64 (8.0)
	9	132.48	-	-	-
	9a	128.95	-	-	-
	10a	144.92	-	-	-
	4-CH <sub>3</sub>	7.93	2.22, 3H	2.24	2.27
	6-CH <sub>3</sub>	15.17	2.53, 3H	2.56	2.55
	1-CO/9-CO	166.24/166.28	-	-	-
	2-NH	-	-	7.3-7.4	7.0-7.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR spectral (in  $\text{CDCl}_3$ ) ของสาร ST1-11A และ actinomycin D (ต่อ)

	Position	ST1-11A		Actinomycin D (in $\text{CDCl}_3$ )	
		$d_c$ (ppm)	$d_H$ (ppm), mult, ( $J$ in Hz)	$d_H$ (ppm), mult, ( $J$ in Hz) <sup>a</sup>	$d_H$ (ppm), mult, ( $J$ in Hz) <sup>b</sup>
Thr	1	166.24/166.28	-	-	-
(1,2)	2	54.93	4.46, 1H, dd (6.68, 2.10)	4.51 (2.0-2.5)	4.50, (6.8/2)
		55.3	4.57, 1H, dd (6.34, 1.80)	4.62 (6.5)	4.60, (6.6)
	3	74.97/75.04	5.15, 2H, dq	5.21 (2.0-2.5)/5.15	5.21 (6.1/2), 5.17 (6.1/2)
	4	17.53/17.93	1.22, 6H,d (5.04)	1.27 (6.0)	1.26, (6.2)
	NH	-	7.15, 1H,d (6.68)	7.20 (6.8)	7.21, (6.8)
		-	7.76, 1H, d (6.34)	7.82 (6.2)	7.84, (6.6)

<sup>a</sup>from Arison and Hoogsteen., 1970

<sup>b</sup>from Lackner, 1971

จากการนำสาร ST1-11A มาทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าสารนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่ระดับความเข้มข้นน้อยที่สุด (MIC) ต่อการเจริญที่ 2.5, 16, 16 และ 32  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ตามลำดับ

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างตะกอนดิน และสิ่งมีชีวิตในทะเล เช่น ฟองน้ำ สาหร่าย จากบริเวณใต้ท้องทะเลและชายฝั่ง จังหวัดสตูล พังงา ภูเก็ตและตรัง สามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 102 ไอโซเลต ได้ทำการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีระวิทยา ชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอกติโนมัยซีทหายากออกเป็น 4 กลุ่ม คัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาศึกษาลักษณะทางเคโมไทป์ และจีโนไทป์ พบว่า

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหารโดยตรง มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Micromonospora*

กลุ่มที่ 2 เชื้อแอกติโนมัยซีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีส้มเหลือง ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหารมีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Salinispora*

กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศในโตนสีขาวอมเทาจนถึงเทา เส้นใยอาหารขาวจนถึงสีน้ำตาลแดง และลักษณะสปอร์เป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Streptomyces*

กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีท ที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ แต่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์ยาก สปอร์มีลักษณะเป็นช่อ รูปรี และสร้างชิ้นส่วนรูปกลม (globose body) มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Nocardia*

จากเชื้อแอกติโนมัยซีทข้างต้น ได้คัดเลือกเชื้อไอโซเลต ST01-07 มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานอย่างละเอียด พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ใกล้เคียงกับ *Nocardia niwae* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.5 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 69 เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์และจีโนไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลต ST01-07 นี้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Nocardia* โดยให้ชื่อว่า *Nocardia xestospongiae*

การศึกษาดูฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 102 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 สิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อกลุ่มที่ 3 แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ การศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3 ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดีพบว่า เชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3 สามารถผลิตสารแอกติโนมัยซิน ดี (actinomycin D) ได้

จากข้อมูลทั้งหมดทำให้ทราบว่าท้องทะเลไทยมีความหลากหลายของเชื้อแอกติโนมีซีทที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี แต่การคัดกรองเชื้อบริเวณชายฝั่งหรือฟองน้ำในเขตน้ำตื้น อาจค้นพบเชื้อที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อที่พบตามดินบนบก ทั้งนี้อาจเกิดจากการชะตะกอนดินบนบกลงไปยังบริเวณชายฝั่ง เลยทำให้ได้เชื้อและสารออกฤทธิ์ที่คล้ายคลึงกัน การทดลองต่อไปจึงควรค้นหาเชื้อในบริเวณทะเลน้ำลึก ซึ่งอาจจะค้นพบแอกติโนมีซีทที่มีความแตกต่างจะแอกติโนมีซีทบนบกและอาจสร้างสารที่มีโครงสร้างทางเคมีแปลกใหม่กว่าเดิม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ผลผลิตจากงานวิจัย (Output)

### บทความวิจัย

1. **Thawai, C., Rungjindamai, N., Klanbut, K., Tanasupawat, S. 2016.** *Nocardia xestospongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge in the Andaman Sea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** first published on November 4, 2011 as doi:10.1099/ijs.0.035972-0 (In press) (Impact factor = 2.55)

### การนำเสนอผลงานวิจัย

1. **Thawai, C. 2016.** Isolation and characterization of antibiotic producing actinomycetes from the Andaman Sea of Thailand. ISBB 2016, The 14th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, November 6-9, 2016, Saint-Petersburg, Pushkin, Russia.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- Alan, C. W. and Nagamani, B. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria, *Current Option in Microbiology*. 9: 279-286.
- Asolkar, R. N., Schroder, D., Heckmann, R., Lang, S., Wagner-Dobler, L. H. 2004. Helquinoline, a new tetrahydroquinoline antibiotic from *Janibacter limosus* Hel1. *J Antibiot* (Tokyo). 57:17-23.
- Bruntner, C., Binder, T., Pathomaree, W., Goodfellow, M., Bull, A. T., Potterat, O., Puder, C., Horer, S., Schmid, A., Bolek, W. 2005. Frigocyclinone, anovelanguicyclinone antibiotic produced By a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica. *J Antibiot*. (Tokyo). 58:346-349.
- Changsen, C.; Franzblau, S. G.; Palittapongarnpim, P. Antimicrobial activity and structure elucidation from marine *Micromonospora* sp. *Agents Chemother*. 2003. 47, 3682–3687.
- Charan, R. D., Schlingmann, G., Janso, J., Bernan, V., Feng, X., Carter, G. T. 2004. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from marine *Micromonospora* sp. *J Nat Prod*. 67:1431-1433.
- David, J. N., and Gordon, M. C. 2004. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod*. 67: 1216-1238.
- Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Chulay, J. D. 1979. Antimicrob. *Agents Chemother*. 16, 710–718.
- Feling, R. H., Buchanan, G.O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 42:355-357.
- Hernández, I. L. C., Macedo, M. L., Berlinck, R. G. S., Ferreira, A. G. and Godinho, M. J. L. 2004. *J. Braz. Chem. Soc.*, 15, 441
- Itoh, T., Kinoshita, M., Aoki, S., Kobayashi, M. 2003. Komodoquinone A, a novel neutritogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. KS3. *J Nat Prod*. 66:1373-1377.
- Kanoh, K., Matsuo, Y., Adachi, K., Imagawa, H., Nishizawa, M., Shizuri, Y. 2005. Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. *J Antibiot* (Tokyo). 58:289-292.
- Kin, S. L. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Option in Microbiology*. 9:245-251.
- Komagata, K. and Suzuki, K. I. 1987. Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. *Methods in Microbiology*. 19:161-207.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kwon, H. C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. 2006. Marinomycins a-d, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus 'Marinispora'. *J Am Chem Soc* . 128:1622-1632.
- Lam, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*. 9:279-286
- Lorian, V. 1980. Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore: The Williams &Wilkins. pp.161-207.
- Macherla, V. R, Liu, J., Bellows, C., Teisan, S., Lam, K. S., Potts, B. C. M. 2005. Glaciapyrroles A, B and C, pyrrolonesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. Isolated from an Alaskan marine sediment. *J Nat Prod*. 68:780-783.
- Maskey, R. P, Sevvana, M., Uson, I., Helmke, E., Laatsch, H. 2004. Gutingimycin: a highly complex metabolite from a marine streptomycete. *Angew Chem Int Ed Engl*. 43:1281-1283.
- Maskey, R. P., Li, F. C., Qin, S., Fiebig, H. H., Laatsch, H. 2003. Chandranamycins A~C: production of novel anticancer antibiotics from a marine Actinomadura sp. Isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. *J Antibiot (Tokyo)*. 56:622-629.
- Mitchell, S. S., Nicholson, B., Teisan, S., Lam, K. S., Potts, B. C. M. 2004 Aureoverticillactam , a novel 22-atommacrocyclolactam from the marine actinomycete *Streptomyces aureoverticillatus*. *J Nat Prod*. 67:1400-1402.
- Moore, B. S., Kalaitzis, J. A., LONGKUAN X. 2005. Exploiting marine actinomycete biosynthetic pathways for drug discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87:49-57.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. 2000. *Eur. J. Biochem*. 267, 5421-5426.
- Oki, T. 1994. S4-8 Recent Progress of Antibiotics Research *In Application Control of Microorganisms in Asia*. edited by.
- Komagata *et al.*, Japan : International Science and Technology Exchange Center., pp. 258-294.
- Oldfield, C., Wood, N. T., GilbertS, C., Murray, F. D., Faure, F. R. 1998. Desulphurisation of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomycete organisms belonging to the genus *Rhodococcus*, and related taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 74:119-132
- Pimentel-Elardo, S. M., Tobias, A. M., Gulder, J., Hentschel, U., Bringmann, G. 2008. Cebulactams A1 and A2, new macrolactams isolated from *Saccharopolyspora cebuensis*, the first obligate marine strain of the genus *Saccharopolyspora*. *Tetrahedron Letters*. 49:6889-6892.
- Proksch, P., Edrada, R. A., Ebe, R. 2002. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. *Appl. Micr obiol.Biotechnol*. 59: 125-34.

- Recznska-Czoch, W., Mordarski, M. 1989. Actinomycete enzymes. In *actinomycetes in Biotechnology*. Edited by Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M. London: AcademicPress; 988:219-283.
- Riedlinger, J., Reicke, A., Zahner, H., Krismer, B., Bull, A. T., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M., Bister, B. and Bischoff, D. 2004. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucospora* strain AB-18-032. *J Antibiot (Tokyo)*. 57:271-279.
- Rodriguez, J. C., Fernandez Puentes, J. L., Perez, B. J. and Canedo, L. M. 2003. B-00208, a new cytotoxic polycyclicxanthone produced by a marine-derived *Actinomadura*. II .Isolation, physico-chemical properties and structure determination. *J Antibiot (Tokyo)*. 56:318-321.
- Sanchez Lopez, J. M., Martinez, I. M., Perez, B. J., Fernandez, P. J. L. and CanedoHernandez, L. M. 2003. New Cytotoxic indolic metabolites from a marine *Streptomyces*. *J Nat Prod*. 66:863-864.
- Schumacher, R. W., Talmage, S. C., Miller, S. A., Sarris, K. E., Davidson, B. S., Goldberg, A. 2003. Isolation and Structure determination of an antimicrobial ester from a marine-derived bacterium. *J Nat Prod* . 66:1291-1293.
- Shin, J., Seo, Y., Lee, H. S., Rho, J. R., Mo, S. J. 2003. Anewcyclic peptide from a marine derived bacterium of the genus *Nocardiosis*. *J Nat Prod*. 66:883-884.
- Skehan, P., Storeng, R., Scdiero, D., Mark, S. A., McMahan, S., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82: 1107-1112.
- Soria-Mercado, I. E., Prieto-Davo, A., Jensen, P. R., Fenical, W. 2005. Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine actinomycete. *J Nat Prod*. 68:904-910.
- Stritzke, K., Schulz, L. H., Helmke, E. and Beil, W. 2004. Novel caprolactones from amarine streptomycete. *J Nat Prod*. 67:395-401.
- Suchada, J., Tanasupawat, S., Kitakoop, P., Bavovada, R., Kobayashi, H. and Kudo, T. 2006. Identification of *Streptomyces* and *Kitasatospora* strains from Thai soils with geldanamycin production strain . *Actinomycetologica*. 20:10-14.
- Tamaoka, J. 1994. Determination of DNA Base Composition *In Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Edited by M. Goodfellow and A.G. O'Donnell. *John Wiley and Sons Ltd*. pp. 463-470.

Ward, A. C. and Bora, N. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 9:279-286

Williams, P. G. 2008. Planning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends in Biotechnology*. 0167-7799.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดต่อไปนี้เป็นที่เตรียม โดยใช้น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร อาหารส่วนใหญ่นี้หมักเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำร้อน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นการเตรียมน้ำตาลในการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยใช้ความร้อนหมักเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### 1. Sodium-caseinate agar (SCN)

Sodium caseinate	0.2	กรัม
Glucose	0.1	กรัม
$K_2HPO_4$	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
$K_2HPO_4$	0.1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
NaCl	0.1	กรัม

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2	กรัม
$\text{CaCO}_3$	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
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	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
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	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 KNO<sub>3</sub> broth

Peptone	1.0	กรัม
KNO <sub>3</sub>	0.1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
pH 7.0		

8. Carbon utilization medium, ISP medium no. 9

Carbohydrate	1.0	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.264	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.565	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhydrous	0.238	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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 <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.64	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.11	กรัม
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.79	กรัม
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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 <sub>3</sub>	0.1	กรัม
-------------------	-----	------

pH 7.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	กรัม
MgSO <sub>4</sub>	0.05	กรัม
KCl	0.05	กรัม
FeSO <sub>4</sub>	0.001	กรัม
Agar	1.5-1.7	กรัม
pH 7.0-7.2		

19. phosphate buffer

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.680	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.71	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DW. 1 ลิตร  
 \*\*ใช้  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  เป็นตัวปรับพีเอช

20. Humic acid Vitamin Agar

Humic acid	1 กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.5 กรัม
KCl	1.71 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 มิลลิกรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 มิลลิกรัม
$\text{CaCO}_3$	20 มิลลิกรัม
Vitamin B	10 มิลลิลิตร
Agar	15 กรัม
DW.	1 ลิตร
pH 7.3	
เกลือ 3 เปอร์เซนต์	
** 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-Pantptrenate	10 มิลลิกรัม
p-Aminobenzoate	10 มิลลิกรัม
d-Biotin	5 มิลลิกรัม
DW	200 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Close

**Date:** 13/12/2016  
**To:** "Chitti Ihawai" ktchitti@kmitl.ac.th  
**cc:** nr74@kentforlife.net, khanungkan@hotmail.com, somboon.t@chula.ac.th  
**From:** "Amanda L. Jones" amanda.l.jones@northumbria.ac.uk  
**Subject:** Your Submission International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology IJSEM-D-16-00001R2

Ms. No. IJSEM-D-16-00881R2  
*Nocardia xestospongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge in the Andaman Sea  
Chitti Thawai, Assoc. Prof. Dr.; Nattawut Rungjindamai, Ph.D.; Khanungkan Klanbut, Ph.D.; Somboon Tanasupawat, Ph.D.

Dear Assoc. Prof. Dr. Thawai,

Thank you for your submission. I am pleased to tell you that your paper has now been accepted for publication in International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. The Editorial Office will now check that they have all the files needed for publication, and contact you if anything else is required.

Please note that we cannot publish the accepted version of the manuscript without a completed Licence to Publish form. In addition, for papers reporting new sequence data, papers will not be published online until the sequence data are released in public databases.

Thank you for submitting your paper to International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. I hope that you will consider the journal for publication of future papers.

Yours sincerely  
Amanda L. Jones, Ph.D.  
Editor

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

Close

**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**  
**Nocardia xestospongiae sp. nov., isolated from a marine sponge in the Andaman Sea**  
--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	IJSEM-D-16-00881R2
<b>Full Title:</b>	Nocardia xestospongiae sp. nov., isolated from a marine sponge in the Andaman Sea
<b>Article Type:</b>	Note
<b>Section/Category:</b>	New taxa - Actinobacteria
<b>Keywords:</b>	Actinomycetes, Nocardia, Andaman sea, marine sponge
<b>Corresponding Author:</b>	Chitti Thawai, Assoc. Prof. Dr. King Mongkuts Institute of Technology Ladkrabang Bangkok, THAILAND
<b>First Author:</b>	Chitti Thawai, Assoc. Prof. Dr.
<b>Order of Authors:</b>	Chitti Thawai, Assoc. Prof. Dr. Nattawut Rungjindamai, Ph.D. Khanungkan Klanbut, Ph.D. Somboon Tanasupawat, Ph.D.
<b>Manuscript Region of Origin:</b>	THAILAND
<b>Abstract:</b>	<p>The marine sponge-derived actinomycete, strain ST01-07T, was isolated from Xestospongia sp. collected from the Andaman Sea. The strain was characterised taxonomically by polyphasic approach. The strain contained meso-diaminopimelic acid in the peptidoglycan, whole cell sugars were arabinose, galactose, glucose, mannose, and ribose. Mycolic acids that co-migrated with those from the type strain of Nocardia araoensis NBRC 100135T were observed in whole cell extract. MK-8(H4-cycl) was the predominant menaquinone. Major cellular fatty acids were C17:18c, C16:0 and C17:0. The diagnostic phospholipids in cell consisted of diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence showed that strain ST01-07T belonged to the genus Nocardia and was most closely related to N. araoensis IFM 0575T (98.71%), N. niwae W9241T (98.56%), N. beijingensis AS4.1521T (98.41%) and N. arthritis IFM 10035T (98.36%). In addition, low DNA-DNA relatedness values (<math>13.6\% \pm 0.1</math> to <math>40.1\% \pm 0.6</math>) confirmed that the strain represents a novel species, for which the name Nocardia xestospongiae ST01-07T sp. nov., is proposed. The type strain is ST01-07T (=BCC 45622T =NBRC 109069T).</p>

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 ***Nocardia xestospongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge in**  
2 **the Andaman Sea**

3 Chitti Thawai,<sup>1,2</sup> Nattawut Rungjindamai<sup>1,2</sup>, Khanungkan Klanbut<sup>1,2</sup>,  
4 Somboon Tanasupawat,<sup>3</sup>

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

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

10 <sup>3</sup>Departments of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
11 Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

12  
13 **Running title:** *Nocardia xestospongiae* sp. nov.

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

15  
16  
17 **Correspondence**

18 Chitti Thawai

19 Chitti.th@kmitl.ac.th

20  
21  
22  
23 The GenBank accession number for the 16S rRNA and *gyrB* gene sequences of strain  
24 ST01-07<sup>T</sup> are AB973878 and LC169506, respectively.

28 The marine sponge-derived actinomycete, strain ST01-07<sup>T</sup>, was isolated from  
29 *Xestospongia* sp. collected from the Andaman Sea. The strain was characterised  
30 taxonomically by polyphasic approach. The strain contained *meso*-diaminopimelic  
31 acid in the peptidoglycan, whole cell sugars were arabinose, galactose, glucose,  
32 mannose, and ribose. Mycolic acids that co-migrated with those from the type strain  
33 of *Nocardia araoensis* NBRC 100135<sup>T</sup> were observed in whole cell extract. MK-  
34 8(H<sub>4</sub>*m*-cycl) was the predominant menaquinone. Major cellular fatty acids were  
35 C<sub>17:1</sub>ω8c, C<sub>16:0</sub> and C<sub>17:0</sub>. The diagnostic phospholipids in cell consisted of  
36 diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol.  
37 Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence showed that strain ST01-  
38 07<sup>T</sup> belonged to the genus *Nocardia* and was most closely related to *N. araoensis* IFM  
39 0575<sup>T</sup> (98.71%), *N. niwae* W9241<sup>T</sup> (98.56%), *N. beijingensis* AS4.1521<sup>T</sup> (98.41%)  
40 and *N. arthritidis* IFM 10035<sup>T</sup> (98.36%). In addition, low DNA-DNA relatedness  
41 values (13.6% ± 0.1 to 40.1% ± 0.6) confirmed that the strain represents a novel  
42 species, for which the name *Nocardia xestospongiae* ST01-07<sup>T</sup> sp. nov., is proposed.  
43 The type strain is ST01-07<sup>T</sup> (=BCC 45622<sup>T</sup> =NBRC 109069<sup>T</sup>).

## 45 Introduction

46 The genus *Nocardia* established by Trevisan (1889) belongs to the family  
47 *Nocardiaceae* of the order *Corynebacteriales* within the class *Actinobacteria*  
48 (Goodfellow *et al.*, 2012). This genus contains more than 100 species with validly  
49 published names in the List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature  
50 (<http://www.bacterio.net/nocardia.html>). Members of the family *Nocardiaceae* are  
51 frequently isolated from materials collected from terrestrial and aquatic habitats

52 ranging from soil, marine organisms and sediments to wastewater systems (Sazak *et*  
53 *al.*, 2012; Golinska *et al.*, 2013; Abdelmohsen *et al.*, 2014).

54 Members of the genus *Nocardia* were reported from various types of soil  
55 including forest soil (Golinska *et al.*, 2013), saline soil (Nikou *et al.*, 2015) while  
56 some was associated with plants as an endophyte (Ghodhbane-Gtari *et al.*, 2014). For  
57 marine environments, numerous strains of *Nocardia* were isolated from marine  
58 sediment (Peela *et al.*, 2005; Gontang *et al.*, 2007), red alga (*Laurenica spectabilis*)  
59 (El-Gendy *et al.*, 2008), ascidia (*Trididemnum orbiculatum*) (Wyche *et al.*, 2012) and  
60 particularly marine sponges, *Hymeniacidon perleve* (Zhang *et al.*, 2006), *Craniella*  
61 *australiensis*, *Halichondria rugosa*, *Reniochalina* sp., and *Stelletta tenuis* (Zhang *et*  
62 *al.*, 2008).

63 However, some species of *Nocardia* are opportunistic pathogens to humans  
64 while some are plant pathogens (Wilson, 2012). *Nocardia* usually threatens  
65 immunocompromised patients by causing a disease called nocardiosis which affects  
66 various human organs including lungs, brains and skin. However, some of them can  
67 cause local infection in immunocompetent individuals and some cause systemic  
68 infections of immunocompromised patients (Cesar Salinas-Carmona *et al.*, 2012). The  
69 taxonomy of *Nocardia* continues to evolve with numerous new species as described  
70 (Sazak *et al.*, 2012; Ghodhbane-Gtari *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2014; Lasker *et al.*,  
71 2014; Vaddavalli *et al.*, 2014; Nikou *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

72 *Nocardia* is a Gram-stain-positive, aerobic, weakly acid-fast and non-motile  
73 actinobacterium. Reproductive hypha only observed microscopically is almost always  
74 present while substrate hypha can be fragmented into coccoid to rod-shaped elements.  
75 Although *Nocardia* is an acid-fast bacterial genus, it exhibits varying degrees of acid-  
76 fastness, depending on the type of strain used and mycolic acid in their cell wall.

77 Colonial appearances differ considerably; may be smooth to granular and irregular to  
78 wrinkled. Carotenoid-like pigments confer on various shades of orange, pink or  
79 yellow to colonies growing on solid media.

80 The genus *Nocardia* is a rich source of bioactive secondary metabolites  
81 (Abdelmohsen *et al.*, 2014). Various biological active substances produced by  
82 *Nocardia* spp. such as brasilicardin A, a potent immunosuppressive compound  
83 (Komatsu *et al.*, 2004), chrysophanol 8-methyl ether, asphodelin, justicidin B and  
84 ayamycin which demonstrated antimicrobial activities against fungi, Gram-stain-  
85 positive and Gram-stain-negative bacteria (El-Gendy *et al.*, 2008) and nocardichelins  
86 with high cytotoxic activity to human cell lines (Schneider *et al.*, 2007) were reported.

87 In this study, we describe the isolation and taxonomic characterisation of a novel  
88 strain of *Nocardia* sp. ST01-07<sup>T</sup> which was isolated from a marine sponge  
89 *Xestospongia* sp. collected from the Andaman Sea.

90

91 Strain ST01-07<sup>T</sup> was isolated from a marine sponge (*Xestospongia* sp.) collected from  
92 the Andaman Sea, Phuket Province, Thailand. First, a *Xestospongia* sample was  
93 rinsed twice with sterilised seawater and was cut into small pieces. Then, five pieces  
94 of samples were dried on sterilised filter paper follow by grinding in sterilised mortar  
95 with 2 ml 0.01% tween 80 in sterilised seawater. Next, 1 ml of the suspension was  
96 transferred to another 9 ml sterilised seawater and was serially ten-fold diluted to 10<sup>-3</sup>.

97 One hundred microlitres of the suspension were spread onto modified starch-casein  
98 nitrate seawater agar containing 10 g soluble starch, 1 g sodium caseinate, 0.5 g  
99 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub> and 18 g agar in 1 L of seawater, pH 8.3, supplemented with  
100 50 mg nalidixic acid l<sup>-1</sup> and 200 mg nystatin l<sup>-1</sup>. The isolation plate was incubated at  
101 30°C for 21 days. Actinobacterium isolate was purified on ISP 2 seawater medium.

102 Strain ST01-07<sup>T</sup> was grown on modified starch-casein nitrate seawater agar for 21  
103 days at 30°C and observed by light microscopy and scanning electron microscopy  
104 (model JSM-5410 LV; JEOL). Samples for scanning electron microscopy were  
105 prepared as described previously (Itoh *et al.*, 1989). Acid-alcohol-fastness staining  
106 was conducted using the Kinyoun method (Chapin & Murray, 1999).

107

108 Cultural characteristics were performed using 14 day cultures grown at 30 °C on  
109 various International *Streptomyces* Project (ISP) media i.e. yeast extract-malt extract  
110 agar (ISP2), oatmeal agar (ISP3), inorganic salt-starch agar (ISP4), glycerol-  
111 asparagine agar (ISP5), peptone-yeast extract iron agar (ISP6), tyrosine agar (ISP7)  
112 (Shirling & Gottlieb, 1966) including glucose-asparagine agar (ISP5 with 1% glucose  
113 replacing glycerol), Czapek's sucrose agar (Waksman, 1961) and nutrient agar  
114 (Difco) at 30°C for 14 days. The colour designation of substrate mycelium and aerial  
115 mycelium was determined using the ISCC-NBS Colour Charts standard sample no.  
116 2106 (Kelly, 1964). The decomposition of various compounds and acid production  
117 from carbon sources were examined using the basal medium recommended by  
118 Gordon *et al.* (1974). The tolerance to NaCl (0-10% w/v, interval of 1 unit), pH (4-12,  
119 interval of 1 unit) and temperature (15-50°C) for growth were determined on ISP2  
120 seawater medium for 2 weeks. Gelatin liquefaction, peptonisation of milk, nitrate  
121 reduction and starch hydrolysis were performed through cultivation on various media  
122 as described by Arai (1975) and Williams & Cross (1971). The physiological and  
123 biochemical results are indicated in detail in the species description and Table 1. The  
124 Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) test strips (Liofilchem®) including  
125 amikacin, ceftriaxone, cefotaxime, ciprofloxacin, clarithromycin, imipenem, linezolid  
126 and minocycline were used for the antimicrobial susceptibility testing. The MICs for

127 antibiotic mentioned above were determined using the recommended breakpoints for  
128 nocardiae (CLSI, 2003).

129 Chemotaxonomic analyses were conducted using the freeze-dried cells obtained from  
130 culture grown in ISP 2 seawater broth on rotary shaker (200 r.p.m.) at 30°C for 7  
131 days. The isomer of diaminopimelic acid in the peptidoglycan was determined by the  
132 method of Staneck & Roberts (1974). The reducing sugars of whole-cell hydrolysate  
133 were judged by the cellulose TLC method of Komagata & Suzuki (1987). The  
134 membrane phospholipids were performed as described previously (Minnikin *et al.*,  
135 1984). Fatty acid methyl ester analysis was performed by GLC according to the  
136 instructions of the Microbial Identification System (MIDI, version 6.0) (Sasser, 1990;  
137 Kämpfer & Kroppenstedt, 1996) with the TSBA6 MIDI database. The presence of  
138 mycolic acids in cell was investigated by using the method of Minnikin *et al.* (1980).  
139 Menaquinones were extracted by the method of Collins *et al.* (1977) and were  
140 analysed by reverse phase HPLC (Cosmosil 5C<sub>18</sub> column, 4.6 × 150 mm; Nacalai  
141 Tesque). The solvent system was methanol:2-propanol (2:1, v/v) at a flow rate of 0.6  
142 mL/min.

143 Genomic DNA was extracted from cells grown in ISP 2 seawater broth according to  
144 the method of Tamaoka (1994). The method of Tamaoka & Komagata (1984) was  
145 used for analysis of G+C content (mol %) of the genomic DNA. Lambda DNA  
146 (Invitrogen, USA) was used as the standard. DNA–DNA hybridisation was carried out  
147 using the report of Ezaki *et al.* (1989). DNA–DNA relatedness (%) was determined by  
148 the colorimetric method (Verlander, 1992). PCR-mediated amplification of the 16S  
149 rRNA gene was conducted using the universal primers, 27F (5'-  
150 AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-  
151 TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). The temperature profile for

152 PCR was as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min; 35 cycles of 94 °C for 30  
153 s, 56 °C for 30 s and 72 °C for 90 s; and final extension at 72 °C for 5 min. The PCR  
154 products were sequenced using universal primers as described previously (Thawai,  
155 2015). The amplification and sequencing of *gyrB* gene fragment was performed using  
156 the method described by Takeda *et al* (2010). The 16S rRNA and *gyrB* gene  
157 sequences were aligned with selected sequences obtained from the  
158 GenBank/EMBL/DDBJ databases using the CLUSTAL W programme version 1.81  
159 (Thompson *et al.*, 1994). The phylogenetic trees were constructed using the  
160 neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) with genetic distances computed by Kimura's  
161 2-parameter model, (Kimura, 1980), maximum parsimony (Fitch, 1971) and  
162 maximum-likelihood (Felsenstein, 1981) methods in the MEGA 6 software (Tamura  
163 *et al.*, 2013). Bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) with 1,000 resamplings was used  
164 for calculation of confidence values. Sequence similarity values were reported using  
165 the EzTaxon-e server (<http://eztaxon.ezbiocloud.net/>; Kim *et al.*, 2012).  
166  
167 The marine *Nocardia* strain, ST01-07<sup>T</sup>, formed abundant extensively branched  
168 substrate hyphae but the aerial hyphae was not observed on all media tested. The  
169 globose bodies and the rod-shaped elements (Fig. 1) were observed directly on the  
170 substrate mycelium. The strain grew on 0-7 % w/v NaCl, at pH 6-12, and at 20-40 °C.  
171 Nitrate reduction and coagulation of milk were positive but hydrolysis of starch,  
172 gelatin liquefaction and peptonisation of milk were negative. The strain produced  
173 acid from D-cellobiose, D-fructose, D-galactose, D-ribose, D-sucrose and D-sorbose.  
174 The colour of colonies was grayish yellow to dark grayish yellow on the ISP2  
175 seawater agar, light orange yellow on ISP3, ISP4, ISP6 and ISP7, light orange yellow  
176 to moderate orange yellow on Czapek's sucrose and glucose-asparagine agars. Pale

177 orange yellow to light orange yellow colonies were observed on ISP5 and nutrient  
178 agar. Yellowish brown soluble pigment was produced on the ISP2 seawater agar  
179 (Table S1). The result of antimicrobial susceptibility testing exhibited that strain  
180 ST01-07<sup>T</sup> was susceptible to amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin, imipenem,  
181 linezolid and minocycline. Intermediate resistance was observed to ceftriaxone and  
182 cefotaxime (Table S2).

183

184 Strain ST01-07<sup>T</sup> contained *meso*-diaminopimelic acid in the peptidoglycan of the cell  
185 wall. Whole cell sugars were arabinose, galactose, glucose, mannose, and ribose  
186 which corresponded to wall chemotype IV (Lechevalier & Lechevalier, 1970). The  
187 presence of mycolic acids was observed in cell (co-migration with the extract of  
188 *Nocardia* type strain, *Nocardia araoensis* NBRC 100135<sup>T</sup>, R<sub>f</sub> value about 0.47). The  
189 polar lipids in cell contained diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine,  
190 phosphatidylinositol, ninhydrin positive phospholipid, ninhydrin positive lipid, two  
191 glycolipids, one unknown phospholipids and four unknown lipids (Figure S1). The  
192 major menaquinone was MK-8(H<sub>4</sub>*α*-cycl). Major cellular fatty acids were C<sub>17:1</sub>ω8c  
193 (21.8%), C<sub>16:0</sub> (20.5%), C<sub>17:0</sub> (14.2%). The minor fatty acids, C<sub>16:1</sub>ω7c (9.2%),  
194 C<sub>18:1</sub>ω9c (8.2%), 10-methyl-C<sub>17:0</sub> (7.7%), C<sub>18:0</sub> (5.6%), 10-methyl-C<sub>18:0</sub> (3.4%),  
195 C<sub>15:1</sub>ω5c (3.4%), C<sub>19:0</sub> (1.8%), iso-C<sub>16:0</sub> (1.5%), C<sub>14:0</sub> (1.3%) and the trace amount of  
196 C<sub>16:0</sub> (0.6%), C<sub>19:1</sub> ω9c (0.5%), C<sub>20:1</sub>ω7c (0.3%) were observed (Table S3). The G+C  
197 content of the strain was 70.2 mol%. These chemotaxonomic characteristics were  
198 similar to those of the members of the genus *Nocardia*.

199

200 An almost-complete 16S rRNA gene sequence (1,399 nucleotides) was obtained from  
201 strain ST01-07<sup>T</sup>. The highest levels of 16S rRNA gene sequence similarity were with

202 *N. araoensis* IFM 0575<sup>T</sup> (98.71%), *N. niwae* W9241<sup>T</sup> (98.56%), *N. beijingensis*  
203 AS4.1521<sup>T</sup> (98.41%) and *N. arthritidis* IFM 10035<sup>T</sup> (98.36%). The neighbour-joining  
204 (NJ) tree shows that strain ST01-07<sup>T</sup> forms a distinct phylogenetic relationship with  
205 various species of *Nocardia* including *N. araoensis* IFM 0575<sup>T</sup>, *N. niwae* W9241<sup>T</sup>, *N.*  
206 *beijingensis* AS4.1521<sup>T</sup> and *N. arthritidis* 203 IFM 10035<sup>T</sup>. This phylogenetic  
207 position was confirmed by each of tree making algorithms and by 69% bootstrap  
208 value (Fig. 2). Analysis of *gyrB* gene sequence exhibited that strain ST01-07<sup>T</sup> formed  
209 a distinct cluster to *N. pneumoniae* JCM 12119<sup>T</sup>, *N. amamiensis* DSM 45066<sup>T</sup> and *N.*  
210 *asiatica* DSM 44668<sup>T</sup> in NJ tree (Fig. S2). The *gyrB* sequence similarity values of the  
211 novel strain are <90.0% with all members of the genus *Nocardia*. This result is  
212 discrepant to the result of 16S rRNA gene analysis. This phenomenon was similarly  
213 found in the case of *N. shinanonensis* (Matsumoto *et al.*, 2016). To differentiate the  
214 distinction between strain ST01-07<sup>T</sup> and its phylogenetic relatives, the experiment of  
215 DNA-DNA hybridisation was conducted. A low level of DNA-DNA relatedness  
216 values (13.6% ±0.1 to 40.1% ±0.6) between strain ST01-07<sup>T</sup> and the related *Nocardia*  
217 species was observed (Table S4). This result is well below the 70% cut-off point  
218 recommended for the assignment of bacterial strains to the same genomic species  
219 (Wayne *et al.*, 1987). The data of morphological, chemotaxonomic and genotypic  
220 characteristics reveal that strain ST01-07<sup>T</sup> belongs to the members of the genus  
221 *Nocardia*. The differential characteristics shown in Table 1 indicate that strain ST01-  
222 07<sup>T</sup> has several different phenotypic properties that discriminated from the closest  
223 related *Nocardia* species such as utilisation of D-cellobiose, D-fructose, D-galactose,  
224 D-sucrose, D-xylose and salicin, gelatin liquefaction, nitrate reduction, starch  
225 hydrolysis, the growth at pH 5, 45°C and on 7% w/v NaCl. Additionally, the result of  
226 cellular fatty acid clearly indicated that strain ST01-07<sup>T</sup> contained C<sub>17:0</sub>, C<sub>15:1ω5c</sub>,

227 C<sub>17:1</sub> ω8c, C<sub>20:1</sub> ω7c and iso-C<sub>16:0</sub> which were not found in other related species. On the  
228 basis of phenotypic, chemotaxonomic and genotypic characteristics, strain ST01-07<sup>T</sup>  
229 is considered to represent a novel *Nocardia* species, for which the name *N.*  
230 *xestospongiae* is proposed.

231

232 **Description of *Nocardia xestospongiae* sp. nov.**

233 *Nocardia xestospongiae* (xes.to.spon'gi.ae. N.L. gen. n. xestospongiae of  
234 *Xestospongia* referring to *Xestospongia*, the source of isolation).

235 Aerobic, Gram-stain-positive, partially acid-fast, non-motile actinomycetes that form  
236 extensively branch substrate hyphae. The strain formed the globose bodies and rod-  
237 shaped elements directly on the substrate mycelium. Aerial mycelium is not observed  
238 on all media tested. The colour of colonies was grayish yellow to dark grayish yellow  
239 on the ISP2 seawater agar, light orange yellow on ISP3, ISP4, ISP6 and ISP7. Pale  
240 orange yellow to light orange yellow colonies were observed on ISP5 and nutrient  
241 agar, and light orange yellow to moderate orange yellow on Czapek's sucrose and  
242 glucose-asparagine agars. Yellowish brown soluble pigment is produced on the ISP2  
243 seawater agar. The strain grows on 0-7% w/v NaCl (optimum NaCl 4% w/v), at pH 6-  
244 12 (optimum pH 8), and at a temperature range 20-40 °C (optimum temperature 30  
245 °C). Nitrate reduction and coagulation of milk are positive but hydrolysis of starch,  
246 gelatin liquefaction, and peptonisation of milk are negative. The strain produces acid  
247 from D-cellobiose, D-fructose, D-galactose, D-ribose, D-sucrose and D-sorbose.  
248 Strain ST01-07<sup>T</sup> was susceptible to amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin,  
249 imipenem, linezolid and minocycline. Strain ST01-07<sup>T</sup> contains *meso*-diaminopimelic  
250 acid in the peptidoglycan of the cell wall. Arabinose, galactose, glucose, mannose,  
251 and ribose are found as whole cell sugars. Mycolic acids were present in cell. The

252 polar lipids in membrane contain diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine,  
253 phosphatidylinositol, ninhydrin positive phospholipid, ninhydrin positive lipid, two  
254 glycolipids, one unknown phospholipids and four unknown lipids. Predominant  
255 menaquinones are MK-8(H<sub>4</sub>*ω*-cycl). The cellular fatty acids are C<sub>17:1</sub>ω8c, C<sub>16:0</sub>, C<sub>17:0</sub>,  
256 C<sub>16:1</sub>ω7c, C<sub>18:1</sub>ω9c, 10-methyl-C<sub>17:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, 10-methyl-C<sub>18:0</sub> and C<sub>15:1</sub>ω5c. The G+C  
257 content of the strain is 70.2 mol%. The type strain is ST01-07<sup>T</sup> (=BCC 45622<sup>T</sup>  
258 =NBRC 109069<sup>T</sup>), isolated from a marine sponge (*Xestospongia* sp.) collected from  
259 the Andaman Sea.

260

### 261 Acknowledgments

262 A research grant from Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology  
263 Ladkrabang is gratefully acknowledged. We also thank the Biological Resource  
264 Center, National Institute of Technology and Evaluation, Kisarazu, Chiba, Japan, for  
265 cellular fatty acid analysis. We would like to thank Dr.Khanit Suwanborirux  
266 Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of  
267 Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for the marine sponge  
268 (*Xestospongia* sp.) samples. This study was supported by the Actinobacterial  
269 Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology  
270 Ladkrabang, Thailand.

271

### 272 References

273 **Abdelmohsen, U. R., Yang, C., Horn, H., Hajjar, D., Ravasi, T. & Hentschel, U.**  
274 **(2014).** Actinomycetes from Red Sea sponges: sources for chemical and phylogenetic  
275 diversity. *Mar Drugs* **12**, 2771-2789.

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

278 **Cesar Salinas-Carmona, M., Geovanni Rosas-Taraco, A. & Welsh, O. (2012).**  
279 Systemic increased immune response to *Nocardia brasiliensis* co-exists with local  
280 immunosuppressive microenvironment. *Antonie van Leeuwenhoek* **102**, 473-480.

281 **Chapin, K. C. & Murray, P. R. (1999).** Stains. In *Manual of Clinical Microbiology*,  
282 pp. 1678. Edited by P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover & R. H.  
283 Tenover. Washington, DC: American Society for Microbiology.

284 **CLSI (2003).** Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic  
285 actinomycetes, Approved Standard M24-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory  
286 Standards Institute.

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

289 **El-Gendy, M. A., Hawas, U. W. & Jaspars, M. (2008).** Novel bioactive metabolites  
290 from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000. *J Antibiot* **61**, 379-386.

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

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

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

299 **Fitch, W. M. (1971).** Toward defining the course of evolution: minimum change for a  
300 species tree topology. *Sys Zoo* **20**, 406-416.

301 **Goodfellow, M. & Maldonado, L. A. (2012).** Genus I. *Nocardia*. In: Goodfellow,  
302 M., Kämpfer, P., Busse, H-J, Trujillo, M. E., Suzuki, K-i., Ludwig, W. & Whitman  
303 WB (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology, the Actinobacteria*, 2nd edn,  
304 vol 5. Springer, New York, pp. 376–418.

305 **Ghodhbane-Gtari, F., Nouioui, I., Salem, K., Katari, A., Montero-Calasanz, M.**  
306 **C., Tisa, L. S., Klenk, H. P. & Gtari, M. (2014).** *Nocardia casuarinae* sp. nov., an  
307 actinobacterial endophyte isolated from root nodules of *Casuarina glauca*. *Antonie*  
308 *van Leeuwenhoek* **105**, 1099-1106.

309 **Golinska, P., Wang, D. & Goodfellow, M. (2013).** *Nocardia aciditolerans* sp. nov.,  
310 isolated from a spruce forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek* **103**, 1079-1088.

311 **Gontang, E. A., Fenical, W. & Jensen, P. R. (2007).** Phylogenetic diversity of  
312 gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **73**,  
313 3272-3282.

314 **Goodfellow, M. Kämpfer, P., Busse, H-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K-I., Ludwig,**  
315 **W. & Whitman, W.B. (eds) (2012).** The *Actinobacteria* part A, 2nd edn, pp. 1-1034.  
316 *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer.

317 **Gordon, R. E., Barnett, D. A., Handerhan, J. E. & Pang, C. H. N. (1974).**  
318 *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *Int J Syst*  
319 *Bacteriol* **24**, 54-63.

320 **Itoh, T., Kudo, T., Parenti, F. & Seino, A. (1989).** Amended description of the  
321 genus *Kineosporia*, based on chemotaxonomic and morphological studies. *Int J Syst*  
322 *Bacteriol* **39**, 168-173.

323 **Jones, A. L., Fisher, A. J., Mahida, R., Gould, K., Perry, J. D., Hannan, M. M.,**  
324 **Judge, E. P., Brown, R., Boagey, K. & Goodfellow, M. (2014).** *Nocardia*

325 *kroppenstedtii* sp. nov., an actinomycete isolated from a lung transplant patient with a  
326 pulmonary infection. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 751-754.

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

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

332 **Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y.**  
333 **S., Lee, J. H. & other authors. (2012).** Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S  
334 rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J*  
335 *Syst Evol Microbiol* **62**, 716–721.

336 **Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base  
337 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **6**, 111-  
338 120.

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

341 **Komatsu, K., Tsuda, M., Shiro, M., Tanaka, Y., Mikamid, Y. & Kobayashia, J.**  
342 **(2004).** Brasilicardins B-D, new tricyclic terpenoids from actinomycete *Nocardia*  
343 *brasiliensis*. *Bioorg Med Chem* **12**, 5545-5551.

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

347 **Lasker, B. A., Bell, M., Klenk, H.-P., Sproeer, C., Schumann, P. & Brown, J. M.**  
348 **(2014).** *Nocardia vulneris* sp. nov., isolated from wounds of human patients in North  
349 America. *Antonie van Leeuwenhoek* **106**, 543-553.

350 **Lechevalier, M. P. & Lechevalier, H. (1970).** Chemical composition as a criterion in  
351 the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Evol Microbiol* **20**, 435-443.

352 **Matsumoto, T., Negishi, T., Hamada, M., Komaki, H., Gono, T., Yaguchi, T.**  
353 **(2016).** *Nocardia shinanonensis* sp. nov., isolated from a patient with  
354 endophthalmitis. *Int J Syst Evol Microbiol* doi: 10.1099/ijsem.0.001197

355 **Minnikin, D. E., Hutchinson, I. G., Caldicott, A. B. & Goodfellow, M. (1980).**  
356 Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid-containing bacteria. *J*  
357 *Chromatogr* **188**, 221-233.

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

361 **Nikou, M. M., Ramezani, M., Amoozegar, M. A., Rasooli, M., Harirchi, S.,**  
362 **Fazeli, S. A. S., Schumann, P., Sproeer, C. & Ventosa, A. (2015).** *Nocardia*  
363 *halotolerans* sp. nov., a halotolerant actinomycete isolated from saline soil. *Int J Syst*  
364 *Evol Microbiol* **65**, 3148-3154.

365 **Peela, S., Kurada, B. & Terli, R. (2005).** Studies on antagonistic marine  
366 actinomycetes from the Bay of Bengal. *World J Microb Biot* **21**, 583-585.

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

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

371 **Sazak, A., Sahin, N. & Camas, M. (2012).** *Nocardia goodfellowii* sp. nov. and  
372 *Nocardia thraciensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 1228-  
373 1234.

- 374 **Schneider, K., Rose, I., Vikineswary, S., Jones, A. L., Goodfellow, M., Nicholson,**  
375 **G., Beil, W., Sussmuth, R. D. & Fiedler, H. P. (2007).** Nocardichelins A and B,  
376 siderophores from *Nocardia* strain Acta 3026. *J Nat Prod* **70**, 932-935.
- 377 **Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces*  
378 species. *Int J Syst Bacteriol* **16**, 313-340.
- 379 **Staneck, J. L. & Roberts, G. D. (1974).** Simplified approach to identification of  
380 aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol* **28**, 266-231.
- 381 **Takeda, K., Kang, Y., Yazawa, K., Gono, T. & Mikami, Y. (2010).** Phylogenetic  
382 studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. *J Med Microbiol* **59**, 165-  
383 171.
- 384 **Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. (2013).** MEGA6:  
385 molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725-2729.
- 386 **Tamaoka, J. (1994).** Determination of DNA Base Composition. In *Chemical*  
387 *Methods in Prokaryotic Systematics*, pp. 463-470. Edited by M. Goodfellow & A. G.  
388 O'Donnell. Chichester: John Wiley & Sons.
- 389 **Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984).** Determination of DNA base composition by  
390 reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* **25**,  
391 125-128.
- 392 **Thawai, C. (2015).** *Micromonospora costi* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus*  
393 *speciosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1456-1461.
- 394 **Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gobson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving  
395 the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence  
396 weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids*  
397 *Res.* **22**, 4673-4680.
- 398 **Trevisan, V. (1889).** I Generi e le Specie delle Bacteriaceae. Milano.

399 **Vaddavalli, R., Eddi, S., Kothagauni, S. Y. & Linga, V. R. (2014).** *Nocardia*  
400 *bhagyanesis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the rhizosphere of  
401 *Callistemon citrinus* (Curtis), India. *Antonie van Leeuwenhoek* **105**, 443-450.

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

405 **Wang, Y., Liu, W., Feng, W. W., Zhou, X. Q., Bai, J. L., Yang, B., Ju, X. Y., Cao,**  
406 **C. L., Huang, Y., Jiang, J. H., Lu, A. J. & Qin, S. (2015).** *Nocardia rhizosphaerae*  
407 sp. nov., a novel actinomycete isolated from the coastal rhizosphere of *Artemisia*  
408 Linn., China. *Antonie van Leeuwenhoek* **108**, 31-39.

409 **Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R. & 9 other authors. (1987).** Report of  
410 the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J*  
411 *Syst Bacteriol* **37**, 463-464.

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

414 **Wilson, J. W. (2012).** Nocardiosis: Updates and clinical overview. *Mayo Clinic*  
415 *Proceedings* **87**, 403-407.

416 **Wyche, T. P., Hou, Y., Vazquez-Rivera, E., Braun, D. & Bugni, T. S. (2012).**  
417 Peptidolipins B-F, antibacterial lipopeptides from an ascidian-derived *Nocardia* sp.  
418 *J Nat Prod* **75**, 735-740.

419 **Zhang, H., Lee, Y. K., Zhang, W. & Lee, H. K. (2006).** Culturable actinobacteria  
420 from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity  
421 by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* **90**, 159-169.

422 **Zhang, H., Zhang, W., Jin, Y., Jin, M. & Yu, X. (2008).** A comparative study on  
423 the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine  
424 sponge species. *Antonie van Leeuwenhoek* **93**, 241-248.

425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

456

457 **Figure legend**

458 **Figure 1.** Scanning electron micrograph of strain ST01-07<sup>T</sup> grown on modified  
459 starch-casein nitrate seawater agar for 21 days at 30°C. Bar, 1 µm.

460

461 **Figure 2.** Neighbour-joining tree based on almost-complete 16S rRNA gene  
462 sequences comparing strain ST01-07<sup>T</sup> to *Nocardia* species. *Streptomyces albobacillus*  
463 JCM 4342<sup>T</sup> was used as an outgroup. (\*) indicates the branches of the tree found by  
464 using the neighbour-joining, maximum-parsimony and maximum-likelihood methods;  
465 (#) indicates the branches of the tree found by using the neighbour-joining and  
466 maximum-parsimony methods and (x) indicates the branches of the tree found by  
467 using the neighbour-joining and maximum-likelihood methods. The numbers on the  
468 branches indicate the percentage bootstrap values of 1,000 replicates; only values  
469 >50% are indicated.

470 **Supplementary Figure S1.** Polar lipids appearing on a two-dimensional  
471 phosphomolybdic acid's TLC chromatogram of strain ST01-07<sup>T</sup>.

472 Abbreviation: DPG, diphosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PI,  
473 phosphatidylinositol; NPL, ninhydrin positive phospholipid; PL, unknown  
474 phospholipid; GL, glycolipid; NL, ninhydrin positive lipid; L, unknown lipid.

475 **Supplementary Figure S2.** Neighbour-joining tree based on almost-complete *gyrB*  
476 gene sequences comparing strain ST01-07<sup>T</sup> to *Nocardia* species. *Mycobacterium*  
477 *tuberculosis* ATCC 27294<sup>T</sup> was used as an outgroup.

478

479

480

481 **Table 1.** Differential characteristics of strain ST01-07<sup>T</sup> and the related *Nocardia*  
482 species

483 Strain: 1, ST01-07<sup>T</sup>; 2, *Nocardia araoensis* NBRC 100135<sup>T</sup>; 3, *Nocardia beijingensis*  
484 NBRC 16342<sup>T</sup>; 4, *Nocardia arthritidis* NBRC 100137<sup>T</sup>; and 5, *Nocardia niwae* DSM  
485 45340<sup>T</sup>. +, Positive; -, Negative. All phenotypic data were determined in this study.

487 **Supplementary Table S1.** Cultural characteristics of *Nocardia* sp. ST01-07<sup>T</sup>

488

489 **Supplementary Table S2.** The susceptibility testing for *Nocardia* sp. ST01-07<sup>T</sup>

490 reported in minimum inhibitory concentrations value (MICs) (CLSI, 2003).

491

492 **Supplementary Table S3.** Cellular fatty acid compositions (%) of strain ST01-07<sup>T</sup>

493 compared with the related *Nocardia* species. Strain: 1, ST01-07<sup>T</sup>; 2, *Nocardia*  
494 *araoensis* NBRC 100135<sup>T</sup>; 3, *Nocardia beijingensis* NBRC 16342<sup>T</sup>; 4, *Nocardia*  
495 *arthritidis* NBRC 100137<sup>T</sup>; and 5, *Nocardia niwae* DSM 45340<sup>T</sup>.

496

497 **Supplementary Table S4.** DNA–DNA relatedness among strain ST01-07<sup>T</sup> and

498 related *Nocardia* species. Strain: 1, ST01-07<sup>T</sup>; 2, *N. araoensis* NBRC 100135<sup>T</sup>; 3, *N.*

499 *beijingensis* NBRC 16342<sup>T</sup>; 4, *N. arthritidis* NBRC 100137<sup>T</sup>; 5, *N. niwae* DSM

500 45340<sup>T</sup>; 6, *Nocardia pneumoniae* NBRC100136<sup>T</sup>; 7, *Nocardia asiatica*

501 NBRC100129<sup>T</sup> and 8, *Nocardia amamiensis* NBRC102102<sup>T</sup>.

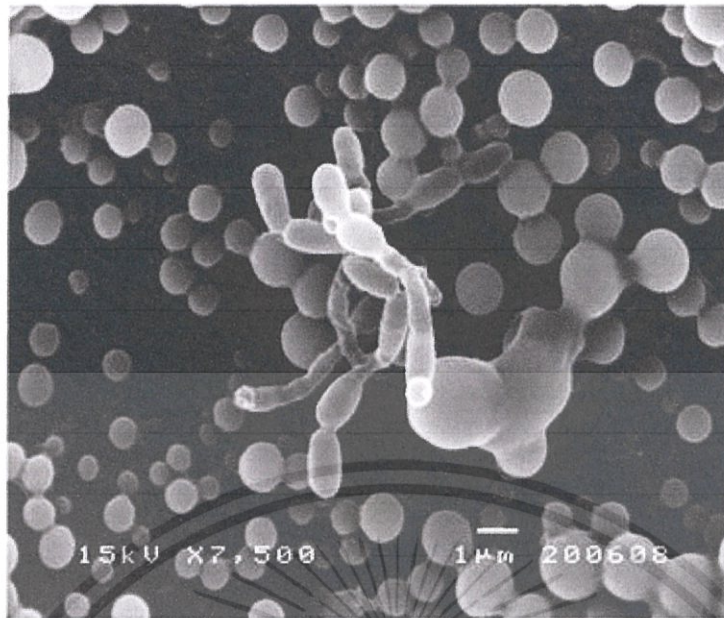


Figure 1. SEM of ST01-07



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

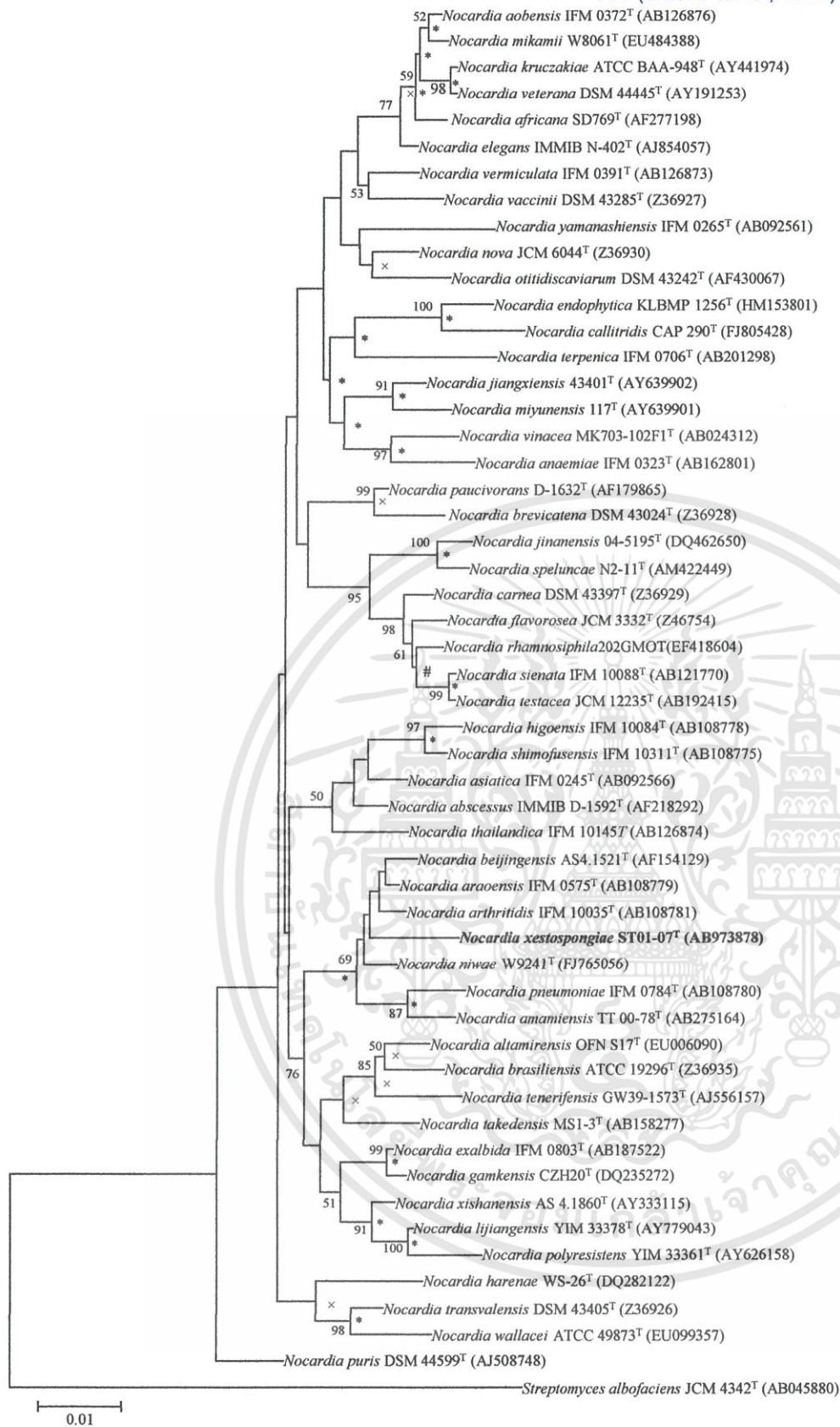


Figure 2.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Table 1.** Differential characteristics of strain ST01-07<sup>T</sup> and the related *Nocardia* species  
 Strain: 1, ST01-07<sup>T</sup>; 2, *Nocardia araoensis* NBRC 100135<sup>T</sup>; 3, *Nocardia beijingensis* NBRC 16342<sup>T</sup>; 4, *Nocardia arthritidis* NBRC 100137<sup>T</sup>; and 5, *Nocardia niwae* DSM 45340<sup>T</sup>. +, Positive; -, Negative. All phenotypic data were determined in this study.

Characteristics	Strains				
	1	2	3	4	5
Starch hydrolysis	-	+	+	+	-
Nitrate reduction	+	-	+	+	+
Gelatin liquefaction	-	+	+	+	+
Peptonization of milk	-	+	+	+	+
Maximum NaCl tolerance (%W/V)	7	6	6	7	6
Growth at 45 °C	-	+	+	+	+
Growth at pH 5	-	+	+	+	+
Acid production from :					
D-cellobiose	+	+	+	+	-
D-fructose	+	+	-	+	-
D-galactose	+	-	-	+	-
D-sucrose	+	-	-	-	-
D-xylose	-	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)****Nocardia xestospongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge in the Andaman Sea**

Chitti Thawai,<sup>1,2</sup> Nattawut Rungjindamai<sup>1,2</sup>, Khanungkan Klanbut<sup>1,2</sup>, Somboon Tanasupawat,<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup>Departments of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Correspondence

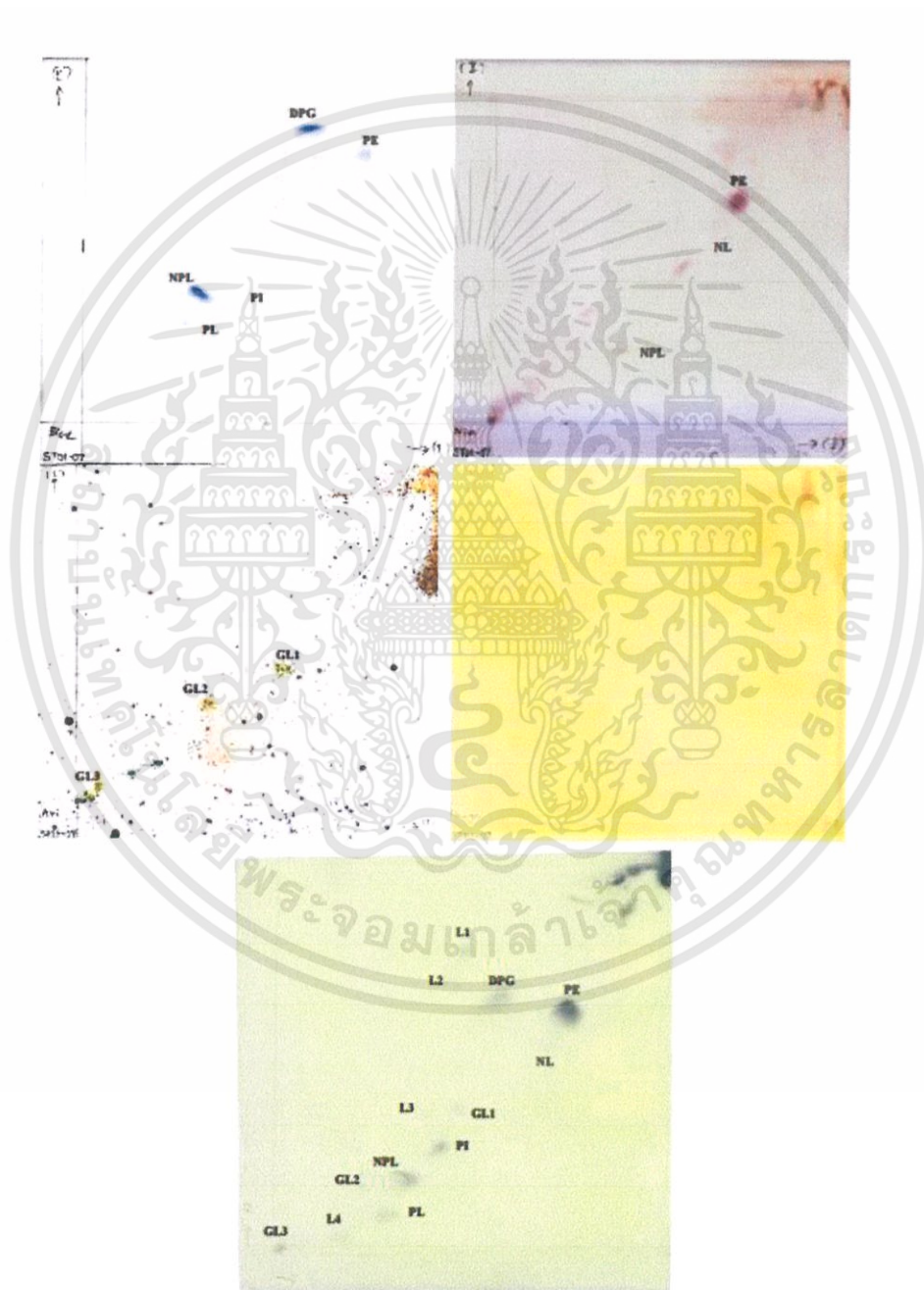
Chitti Thawai

Chitti.th@kmitl.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

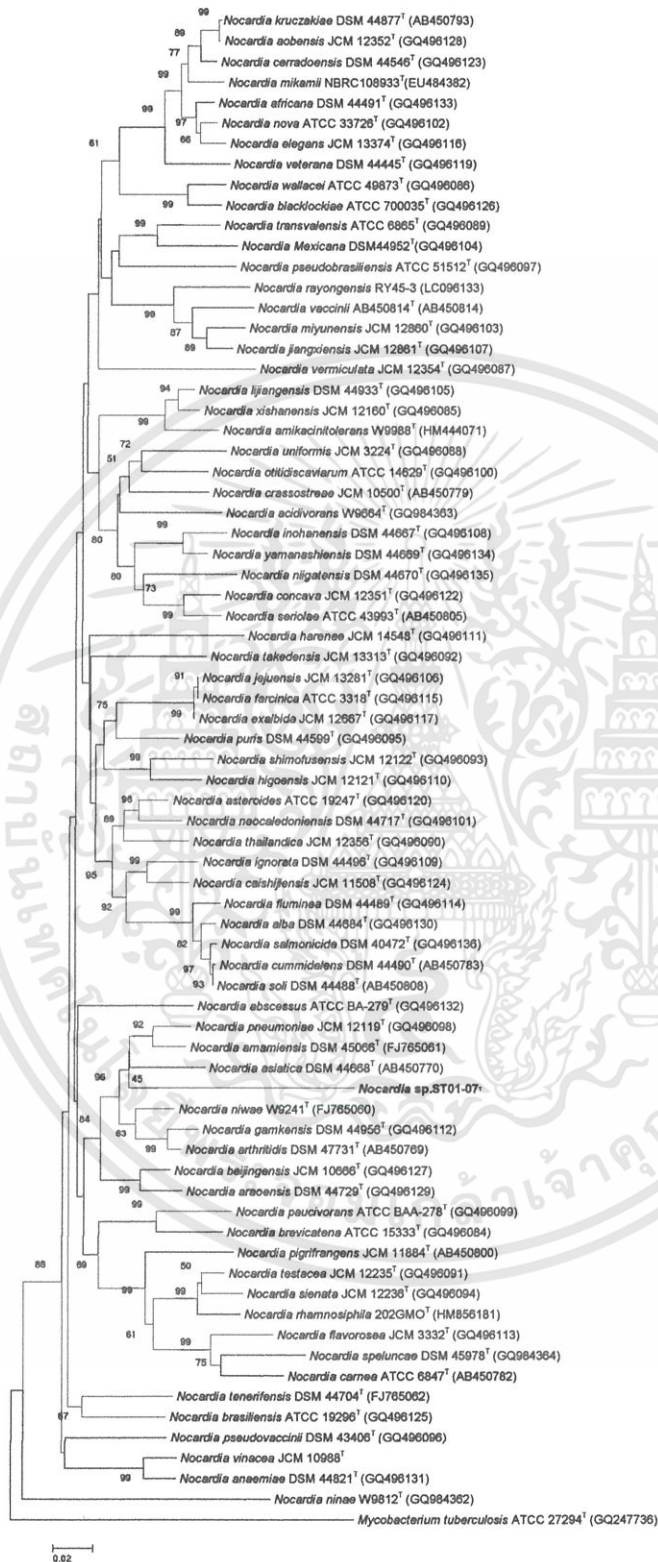
**Supplementary Figure S1.** Polar lipids appearing on a two-dimensional phosphomolybdic acid's TLC chromatogram of strain ST01-07<sup>T</sup>.

Abbreviation: DPG, diphosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; NPL, ninhydrin positive phospholipid; PL, unknown phospholipid; GL, glycolipid; NL, ninhydrin positive lipid; L, unknown lipid.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Supplementary Figure S2.** Neighbour-joining tree based on almost-complete *gyrB* gene sequences comparing strain ST01-07<sup>T</sup> to *Nocardia* species. *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294<sup>T</sup> was used as an outgroup.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Supplementary Table S1.** Cultural characteristics of *Nocardia* sp. ST01-07<sup>T</sup>

Media	Growth	Colour of colony		Soluble pigment
		upper surface	reverse surface	
Yeast extract-malt extract agar (ISP2)	Moderate	Grayish yellow	Dark grayish yellow	Yellowish brown
Oatmeal agar (ISP3)	Poor	Light orange yellow	Light orange yellow	None
Inorganic salt-starch agar (ISP4)	Poor	Light orange yellow	Light orange yellow	None
Glycerol-asparagine agar (ISP5)	Poor	Light orange yellow	Pale orange yellow	None
Peptone-yeast extract iron agar (ISP6)	Poor	Light orange yellow	Light orange yellow	None
Tyrosine agar (ISP7)	Poor	Light orange yellow	Light orange yellow	None
Czapek's sucrose agar	Poor	Moderate orange yellow	Light orange yellow	None
Glucose-asparagine agar	Poor	Moderate orange yellow	Light orange yellow	None
Nutrient agar	Moderate	Light orange yellow	Pale orange yellow	None

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Supplementary Table S2.** The susceptibility testing for *Nocardia* sp. ST01-07<sup>T</sup> reported in minimum inhibitory concentrations value (MICs) (CLSI, 2003).

Antimicrobial agent(s)	MIC ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
Amikacin	0.094
Ceftriaxone	>32
Cefotaxime	>32
Ciprofloxacin	1.5
Clarithromycin	0.047
Imipenem	0.012
Linezolid	0.5
Minocycline	1.5



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Supplementary Table S3.** Cellular fatty acid compositions (%) of strain ST01-07<sup>T</sup> compared with the related *Nocardia* species. Strain: 1, ST01-07<sup>T</sup>; 2, *Nocardia araoensis* NBRC 100135<sup>T</sup>; 3, *Nocardia beijingensis* NBRC 16342<sup>T</sup>; 4, *Nocardia arthritidis* NBRC 100137<sup>T</sup>; and 5, *Nocardia niwae* DSM 45340<sup>T</sup>.

Fatty acids	Strains				
	1	2	3	4	5
<b>Saturated fatty acids</b>					
C <sub>14:0</sub>	1.3	2.8	1.5	2.0	1.2
C <sub>15:0</sub>	-	0.9	2.2	1.0	1.5
C <sub>16:0</sub>	20.5	45.1	30.9	33.2	36.1
C <sub>17:0</sub>	14.2	-	-	-	-
C <sub>18:0</sub>	5.6	9.2	21.8	18.9	20.1
C <sub>19:0</sub>	1.8	0.6	1.5	-	0.5
<b>Unsaturated fatty acids</b>					
C <sub>15:1</sub> ω5c	3.4	-	-	-	-
C <sub>16:1</sub> ω7c	9.2	9.5	12.3	9.0	6.9
C <sub>17:1</sub> ω8c	21.8	-	-	-	-
C <sub>18:1</sub> ω9c	8.2	20.4	13.2	21.2	18.2
C <sub>19:1</sub> ω9c	0.5	1.2	1.5	-	0.8
C <sub>20:1</sub> ω7c	0.3	-	-	-	-
<b>Branched fatty acids</b>					
iso-C <sub>16:0</sub>	1.5	-	-	-	-
<b>10-Methylated fatty acids</b>					
C <sub>16:0</sub>	0.6	-	0.9	0.6	0.9
C <sub>17:0</sub>	7.7	-	0.4	-	-
C <sub>18:0</sub>	3.4	10.3	13.8	14.1	13.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Supplementary Table S4.** DNA–DNA relatedness among strain ST01-07<sup>T</sup> and related *Nocardia* species. Strain: 1, ST01-07<sup>T</sup>; 2, *N. araoensis* NBRC 100135<sup>T</sup>; 3, *N. beijingensis* NBRC 16342<sup>T</sup>; 4, *N. arthritidis* NBRC 100137<sup>T</sup>; 5, *N. niwae* DSM 45340<sup>T</sup>; 6, *Nocardia pneumoniae* NBRC100136<sup>T</sup>; 7, *Nocardia asiatica* NBRC100129<sup>T</sup> and 8, *Nocardia amamiensis* NBRC102102<sup>T</sup>.

Strains	DNA–DNA binding (%) with labelled DNA from:							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	100	40.1 ± 0.6	34.2 ± 0.6	30.4 ± 0.8	35.6 ± 0.4	18.2 ± 0.2	14.2 ± 0.4	18.6 ± 0.4
2	39.2 ± 0.4	100	30.2 ± 1.2	31.4 ± 0.7	29.2 ± 0.3	38.8 ± 0.4	40.9 ± 0.6	31.6 ± 0.9
3	32.5 ± 0.3	29.3 ± 0.9	100	24.1 ± 1.3	14.1 ± 2.2	39.8 ± 0.5	41.1 ± 0.8	17.6 ± 0.7
4	31.1 ± 0.4	30.7 ± 1.3	26.2 ± 0.2	100	31.2 ± 0.8	34.6 ± 0.1	43.6 ± 0.9	23.6 ± 1.4
5	37.2 ± 0.6	27.8 ± 0.4	32.7 ± 0.5	29.1 ± 1.1	100	31.6 ± 0.3	31.4 ± 0.4	40.1 ± 0.6
6	17.1 ± 0.9	38.2 ± 0.1	41.5 ± 0.4	32.6 ± 0.4	30.1 ± 0.2	100	17.8 ± 0.4	42.1 ± 0.5
7	13.6 ± 0.1	40.1 ± 0.4	40.7 ± 0.6	44.1 ± 0.2	30.6 ± 0.7	16.6 ± 0.4	100	11.9 ± 0.1
8	17.4 ± 1.4	30.1 ± 0.1	16.2 ± 0.4	24.2 ± 1.0	39.6 ± 0.4	41.9 ± 0.7	13.4 ± 1.2	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้