

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การประเมินกิจกรรมการกระตุ้นการงอกและการปกป้องแขนงประสาทของ
สารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกไมโครไบสพอราที่แยกจากขมิ้นและ
ตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื้อนั้น

Evaluation of neuritogenic and neuroprotection activities of
crude extract from endophytic *Microbispora* strains isolated
from *Curcuma longa* and their taxonomic position

โดย

ผศ.ดร. จิตติ ทำไฉ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปี 2558

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร. จิตติ ทำไฉ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	การประเมินกิจกรรมการกระตุ้นการงอกและการปกป้องแขนง ประสาทของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกไมโครไบสปอราที่ แยกจากขมิ้นและตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื้อนั้น
(ภาษาอังกฤษ)	Evaluation of neuritogenic and neuroprotection activities of crude extract from endophytic <i>Microbispora</i> strains isolated from <i>Curcuma longa</i> and their taxonomic position
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก	ทุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี	วันที่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558
ผู้ดำเนินการวิจัย	ผศ.ดร. จิตติ ท้าไว สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
โทรศัพท์	02-3298400 ต่อ 235

บทคัดย่อ

เชื้อแอกติโนมัยสีทจำนวน 22 ไอโซเลต ถูกแยกได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชตระกูลขิง เชื้อไอโซเลตเหล่านี้ถูกนำมาจัดกลุ่มโดยลักษณะทางพีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ ได้เป็น 4 กลุ่ม จากลักษณะตำแหน่งบน phylogenetic tree ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางพีโนไทป์ของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มแสดงว่าเชื้อเหล่านี้เป็นสมาชิกของเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* และ *Phytohabitans* เชื้อแอกติโนมัยสีทกลุ่มที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora hainaensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.7 เชื้อแอกติโนมัยสีทกลุ่มที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.8 เชื้อแอกติโนมัยสีทกลุ่มที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora bryophytorum* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.6 เชื้อแอกติโนมัยสีทกลุ่มที่ 4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Phytohabitans houttuyniae* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.04

การวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อไอโซเลต BR3-1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานเคมีคล้ายกับเชื้อสกุล *Phytohabitans* แต่มีลักษณะทางจีโนไทป์และพีโนไทป์ที่แตกต่างไปจากเชื้อสปีชีส์มาตรฐานทั้งหมดที่เป็นสมาชิกในสกุล *Phytohabitans* ดังนั้นเชื้อไอโซเลต BR3-1 จึงถูกตัดสินให้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Phytohabitans* โดยให้ชื่อว่า *Phytohabitans kaempferae* sp. nov. นอกจากนี้ น้ำหมักที่ได้จากเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและนำไปทดสอบกิจกรรมการกระตุ้นการแตกแขนงของระบบประสาท พบว่า เชื้อจำนวน 9 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 40.90 ที่แสดงฤทธิ์ได้ดีมากที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากเชื้อแอกติโนมัยสีทจากเนื้อเยื่อพืชที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแตกแขนงของระบบประสาทที่แยกได้ในครั้งนี้ย่อมมีศักยภาพต้องการการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไป

Abstract

One hundred and four actinomycete strains were isolated from tissue of zingiberaceous plants. These strains were grouped using phenotypic, chemotypic and genotypic characteristics into 10 groups. Phylogenetic position, chemotaxonomic analyses including some phenotypic characterisation revealed that the representative strains in each group belonged to the members of the genera *Microbispora* and *Phytohabitans*. The actinomycetes in group I were closely related to *Microbispora hainaensis* (99.7%). Group II were closely related to *Microbispora rosea subsp. rosea* (99.8%). Group III were closely related to *Microbispora bryophytorum* (99.6%). Group IV exhibited the closest relative to *Phytohabitans houttuyniae* (99.04%). Here, we found the strain BR3-1 showing morphological and chemotaxonomic characteristics typical of members of the genus *Phytohabitans* but which was genotypically and phenotypically distinguishable from all recognized *Phytohabitans* species. Therefore, the strain BR3-1 were judged to represent the novel species of the genus *Phytohabitans* for which the name *Phytohabitans kaempferae* sp. nov. is proposed. Furthermore, the fermentation broths of these representative strains were extracted with ethyl acetate and were tested for neuritogenic and neuroprotection activities. In this study, nine actinomycete isolates displayed the significant neuritogenic and neuroprotective activities (40%) at the concentration of 1 ng/ml. Potential use to these endophytic actinomycete isolates need further study for drug development.

สารบัญ

หน้า	
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ	6
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	12
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	41

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC = American Type Culture Collection

B. subtilis = *Bacillus subtilis*

C. albicans = *Candida albicans*

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

E. coli = *Escherichia coli*

EtOAc = ethyl acetate

ISP = International *Streptomyces* Project

M. luteus = *Micrococcus luteus*

MHA = Mueller-Hinton Agar

MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

nm = nanometer

Ps. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

TSB = Tryptic soy broth

UV = Ultraviolet

VRE = vancomycin-resistant enterococci

μL = microlitre

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

จากแนวโน้มที่ประชากรกลุ่มผู้สูงอายุมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นปัญหาที่เกี่ยวกับโรคผู้สูงอายุ เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน ย่อมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งจากปัญหาดังกล่าว นำไปสู่ความพยายามที่จะค้นคว้าวิจัยหาชนิดใหม่ เพื่อให้ได้ผลการรักษาที่ดีมีประสิทธิภาพและปลอดภัยกว่าที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยแนวทางการวิจัยแนวทางหนึ่ง คือการหาชนิดใหม่จากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติทั้งจากพืช สัตว์หรือจุลินทรีย์ เพื่อนำมาใช้รักษาและบรรเทาโรคต่างๆ สำหรับจุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งที่มีความสนใจอย่างยิ่งในปัจจุบัน การผลิตสารปฏิชีวนะเป็นประโยชน์ด้านหนึ่งที่สำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 1 สารสำคัญที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์นอกจากแสดงฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะแล้ว ยังมีรายงานว่ายังสามารถแสดงฤทธิ์ด้านต่างๆ ด้วยเช่น สารเจลดานามัยซินที่แยกจากเชื้อ *Streptomyces* sp. สามารถแสดงฤทธิ์การกระตุ้นการออกของเซลล์ประสาทได้ที่ความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ (Tadtong et al. 2007) สารสำคัญที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีความหลากหลายทั้งทางโครงสร้างและการออกฤทธิ์ รวมทั้งสามารถเพิ่มผลผลิตได้ง่ายโดยการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ หนึ่งในจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันคือจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเซลล์พืชหรือที่เรียกว่าเอนโดไฟต์ ตารางที่ 1 แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆโดยประมาณ (Bérdy, 2005)

Source	Antibiotics	“Other bioactive” metabolites	Total bioactive metabolites	Practically used (in human therapy)	Inactive metabolites
Bacteria	2900	900	3800	10~12(8~10)	3000 to 5000
Actinomycetales	8700	1400	10100	100~120(70~75)	5000 to 10000
Fungi	4900	3700	8600	30~35(13~15)	2000 to 15000
Total	16500	6000	22500	140~160 (~100)	20000to 25000

เอนโดไฟต์ เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในหรือช่องว่างของเซลล์พืชโดยไม่มีผลทำลายเซลล์ของพืช เอนโดไฟต์บางชนิดสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และเป็นประโยชน์ต่อพืชที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติได้ ซึ่งสารบางชนิดก็สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เกษตรกรรม และอุตสาหกรรม ปัจจุบันพบว่าเอนโดไฟต์มีบทบาทสำคัญในการสร้างสารที่ช่วยปกป้องพืชจากการถูกทำลายด้วยแมลง ช่วยให้พืชทนทานต่อโรคและสภาวะต่างๆ นอกจากพืชที่มีระบบท่อลำเลียงแล้วเรายังสามารถพบเอนโดไฟต์ได้ในสาหร่ายทะเล มอสและเฟิร์นอีกด้วย เอนโดไฟต์ถือว่าเป็นอีกแหล่งหนึ่งให้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย มีการประมาณการว่าในพืชแต่ละชนิดจะมีเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ไม่ต่ำกว่าหนึ่งชนิด ดังนั้นถ้ามีการศึกษาพืชทุกชนิดที่มีอยู่ในโลก คาดว่าน่าจะพบเชื้อเอนโดไฟต์ไม่ต่ำกว่าล้านสปีชีส์ โอกาสที่จะพบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ก็จะมีมากขึ้น จากรายงานการเปรียบเทียบการแยกสารจากแบคทีเรียที่ได้จากดินกับเอนโดไฟต์จำนวน 135 สายพันธุ์ พบว่า สารที่ผลิต

จากเอนโดไฟต์เป็นสารที่มีโครงสร้างใหม่ถึง 51% ขณะที่สารจากแบคทีเรียที่แยกจากดินเป็นสารใหม่ 38% นอกจากนี้ยังพบว่าสารสำคัญที่แยกได้จากเอนโดไฟต์กว่า 80% ที่แสดงฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ (Barbara et al. 2002) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า เอนโดไฟต์เป็นแหล่งธรรมชาติอีกแหล่งหนึ่งที่มีศักยภาพในการจะนำมาศึกษาวิจัยเพื่อค้นคว้าหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปใช้เป็นสารต้นแบบในการพัฒนายาใหม่ อันจะก่อให้เกิดประโยชน์มหาศาลทางด้านสาธารณสุขต่อไป นอกจากนี้ การที่ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง พืชสมุนไพรที่มีในประเทศจึงเป็นแหล่งสำคัญที่น่าจะมีศักยภาพสูงในการเป็นแหล่งของเชื้อเอนโดไฟต์ที่ผลิตสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

Microbisporae เป็นแอคติโนมัยสิทกลุ่มหนึ่งที่สามารถเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชได้ คาดว่าการอาศัยในเนื้อเยื่อพืชของเชื้อ *Microbispora* เป็นการช่วยส่งเสริมให้พืชนั้นต้านทานต่อโรคพืชได้ เนื่องจากเชื้อ *Microbispora* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลากหลาย โดยปกติแล้วเชื้อ *Microbispora* มักกระจายตัวอยู่ในดิน เศษใบไม้ ใบหญ้า และสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติอื่นๆ ประชากรและชนิดของเชื้อ *Microbispora* ในระบบนิเวศขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีววิทยาของสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นๆ การเพิ่มโอกาสเพื่อค้นพบเชื้อ *Microbispora* ชนิดใหม่จึงควรเริ่มจากการศึกษาแหล่งธรรมชาติแหล่งใหม่ที่มีลักษณะทางระบบนิเวศแตกต่างจากแหล่งธรรมชาติทั่วไป พืชสมุนไพรไทยที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีจัดเป็นแหล่งที่น่าสนใจต่อการค้นหาเชื้อ *Microbispora* ด้วยความหวังว่าจะพบเชื้อ *Microbispora* ที่แสดงลักษณะจำเพาะที่โดดเด่นต่างไปจากจุลินทรีย์ที่พบในสิ่งแวดล้อมทั่วไปและแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีและเหมือนกับสารที่พบในพืชสมุนไพรอื่นๆ เพื่อใช้เป็นแหล่งทดแทนในการสร้างสารที่มีศักยภาพในการบำบัดโรคเหมือนที่พบในพืชสมุนไพร ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการวิจัยทางด้านความหลากหลาย และอนุกรมวิธานหลายส่วน เพื่อศึกษาการแยก คัดเลือกเชื้อ และศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการงอกและการปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดหยาบออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อ *Microbispora* ตลอดจนเก็บรวบรวมสายพันธุ์ *Microbispora* ที่มีประโยชน์จากแหล่งดังกล่าวในการนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการศึกษาและวิจัยเชิงพัฒนาต่อไป ดังนั้นการศึกษาวิจัยในโครงการนี้อาจทำให้เกิดการค้นพบเชื้อ *Microbispora* ชนิดใหม่หรือสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารต้นแบบต่อการพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ ตลอดจนช่วยพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยกเพาะเลี้ยง อนุกรมวิธานและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อ *Microbispora* อีกทั้งช่วยเพิ่มขีดความสามารถและเป็นทางเลือกของนักวิจัยไทย ในการเรียนรู้การวิจัยเกี่ยวกับการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งทรัพยากรในประเทศเพื่อเป็นการบริหารจัดการสิ่งแวดล้อมและกาพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพอีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อแยก คัดเลือก และศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ *Microbispora* ที่แยกได้จากต้นขมิ้น ตลอดจนคัดเลือกเชื้อ *Microbispora* ที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.2.2 เพื่อทำการเลี้ยงและสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อ *Microbispora* และทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการงอกและปกป้องเซลล์แขนงประสาท

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้จะเริ่มจากการนำสมุนไพรที่มีรายงานว่าสามารถแสดงฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาทได้มาทำการแยก คัดเลือก ศึกษาอนุกรมวิธาน และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อ *Microbispora* หรือเชื้อกลุ่มใกล้เคียงในเนื้อเยื่อพืชนั้น ขอบเขตของโครงการวิจัยนี้คือ สามารถแยกเชื้อ *Microbispora* หรือเชื้อกลุ่มใกล้เคียงในเนื้อเยื่อสมุนไพรได้อย่างน้อย 20 ไอโซเลต ทำการจัดกลุ่มเชื้อเหล่านั้นด้วยลักษณะทางพีโนไทป์ จากนั้นนำเชื้อตัวแทนมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบจากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์การกระตุ้นการงอกและปกป้องเซลล์แขนงประสาท และคัดเลือกสายพันธุ์ที่แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุดมาศึกษาเพื่อให้ทราบลักษณะทางอนุกรมวิธานในระดับสกุลและ สปีชีส์ของเชื้อนั้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของโครงการวิจัย

1.4.1 สามารถแยกเชื้อ *Microbispora* หรือเชื้อกลุ่มใกล้เคียงที่แสดงฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาท

1.4.2 สามารถเก็บรวบรวมความรู้ทางด้านอนุกรมวิธานของ *Microbispora* หรือ เชื้อกลุ่มใกล้เคียง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาวิจัยด้านอื่นต่อไป

1.4.3 สามารถสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อของ *Microbispora* ที่คัดเลือก

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (neurodegenerative disorders) เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) พบได้มากขึ้นในปัจจุบัน ส่งผลให้ผู้ป่วยประสบปัญหาทางด้านการรับรู้และความเข้าใจ (cognitive dysfunction) ซึ่งอุบัติการณ์การเกิดโรคที่สำคัญอย่างหนึ่งของโรคอัลไซเมอร์เกิดจากการที่เซลล์ประสาทถูกทำลายจากอนุโมลิสระที่เพิ่มขึ้นจากการเหนี่ยวนำของเบต้า-อะไมลอยด์ (β -Amyloid (β)- induced oxidative stress) ดังนั้นการป้องกันการเกิดโรคนี้อาจมุ่งไปที่การต้านอนุโมลิสระที่จะเกิดขึ้น (Kim *et al.*, 2001) ตัวอย่างสารที่มีการค้นพบว่ามีฤทธิ์ช่วยปกป้องเซลล์ประสาท เช่น สารกลุ่ม curcuminoids 3 ชนิด ที่พบในขมิ้นชัน ได้แก่ curcumin demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ได้ดีกว่าวิตามินอี หรือ α -tocopherol และสามารถป้องกันเซลล์ PC12 และ HUVEC จากการกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress ของ β A (1-42) โดยวิธี MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay พบว่า ED₅₀ ของ curcumin, demethoxycurcumin, และ bisdemethoxycurcumin ต่อ PC12 cell ได้แก่ 7.1 ± 0.3 , 4.7 ± 0.1 , 3.5 ± 0.2 μ g/ml และต่อ HUVEC cell ได้แก่ 6.8 ± 0.4 , 4.2 ± 0.3 , และ 3.0 ± 0.3 μ g/ml ตามลำดับ ในขณะที่ α -tocopherol ที่ความเข้มข้น 50 μ g/ml ไม่สามารถป้องกันเซลล์ PC12 และ HUVEC จากการกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress ของ β A (1-42) ได้ (Kim *et al.*, 2001) สารที่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทมีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลิสระที่เกิดจากสภาวะ oxidative stress ซึ่งส่งผลให้เซลล์ประสาทถูกทำลาย ดังเช่นที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นการเลือกนำเอาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลิสระที่สามารถจับอนุมูลิสระได้ดี น่าจะส่งผลให้สารเหล่านั้นมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทที่ดีด้วยเช่นกัน การงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) มีผลต่อการทำงานของระบบประสาท โดยจะช่วยเพิ่มการส่งสัญญาณประสาทได้ (Lin *et al.*, 2009) โดยในร่างกายจะมีสาร nerve growth factor (NGF) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นให้มีการสร้าง microtubule และช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) (Yang *et al.*, 2008) สารชนิดนี้จะทำให้เซลล์ประสาทมีแขนงประสาทเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ระบบประสาทสามารถเกิด synapse ได้มากขึ้น การส่งสัญญาณประสาทก็จะเกิดได้ดีขึ้น การค้นหาสารที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ NGF นี้จะสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (neurodegenerative disorders) ได้ การศึกษาเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) นั้นนิยมใช้เซลล์เพาะเลี้ยง เช่น PC12 (Zhang, 2007), PC12D (Wang *et al.*, 2006) และ N2A (Mak *et al.*, 2000) เป็นแบบจำลองในการทดสอบ โดยจะวัดผลจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และการเกิดแขนงประสาทขึ้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการนำเอาเซลล์เพาะเลี้ยง P19 ซึ่งเป็น murine embryonic carcinoma cell มากระตุ้นด้วยวิตามินเอให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทมาใช้เป็นแบบจำลองในการทดสอบฤทธิ์ ดังกล่าวได้อีกด้วย (Mak *et al.*, 2000) ตัวอย่างสารที่มีการค้นพบว่ามีฤทธิ์ช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) เช่น scoparone เป็นสารที่แยกได้จากเปลือกของต้น *Liriodendron tulipifera* พบว่าสาร scoparone ความเข้มข้น 200 μ M สามารถทำให้เซลล์ PC12

เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) ได้ (Lin *et al.*, 2009) สาร panaxynol ที่แยกได้จาก *Panax notoginseng* ก็สามารถทำให้เซลล์ PC12D เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) ได้เช่นกัน โดยความเข้มข้นที่ให้ผลที่ดีที่สุดคือ 8 μM เนื่องจากสามารถทำให้แขนงประสาทที่เกิดขึ้นมีความยาวมากที่สุดอีกด้วย (Zhang, 2007) สาร 1,4,5,6-tetrahydroxy-7,8-di(3-methylbut-2-enyl) xanthone ที่แยกได้จากเนื้อไม้ *Garcinia xanthochymus* ความเข้มข้น 10 μM ก็สามารถทำให้เซลล์ PC12D เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) ได้เช่นกัน (Wang *et al.*, 2006)

การค้นพบแอคติโนมัยสียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endophytic actinomycetes) ถูกค้นพบมากขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบัน และกระจายอยู่ในหลายสกุลหลายสปีชีส์ เชื้อส่วนใหญ่ที่ค้นพบเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ เช่น *Microbispora Actinoallomurus acaciae* (Thamchaipenet *et al.*, 2010), *Actinoallomurus oryzae* (Indananda *et al.*, 2011), *Actinophytocola oryzae* (Indananda *et al.*, 2010), *Amycolatopsis samaneae* (Duangmal *et al.*, 2011), *Kineococcus gynurae* (Duangmal *et al.*, 2008), *Leifsonia soli* (Madhaiyan *et al.*, 2010), *Micromonospora tulbaghia* (Kirby and Meyers, 2010), *Nocardioides caricicola* (Song *et al.*, 2011), *Pseudonocardia adelaidensis* (Kaewkla and Franco., 2010), *Rhodococcus cercidiphylli* (Li *et al.*, 2008), *Saccharopolyspora endophytica* (Qin *et al.*, 2008), *Streptomyces alni* (Liu *et al.*, 2009), *Streptosporangium oxazolinicum* (Inahashi *et al.*, 2011) การค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสียที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เป็นแหล่งที่อยู่และความทนทานต่อสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นในเซลล์ แอคติโนมัยสียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่ถูกค้นพบมีแนวโน้มเป็นเชื้อสกุลและสปีชีส์ใหม่สูง จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาเพื่อได้มาซึ่งสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงจากการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยสียในเนื้อเยื่อพืช พบว่ามีเชื้อบางสกุลสามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และบางชนิดมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคได้ สารสำคัญที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์นอกจากแสดงฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะแล้ว ยังมีรายงานว่ายังสามารถแสดงฤทธิ์ด้านต่างๆ ด้วยเช่น สารเจลตานามัยซินที่แยกจากเชื้อ *Streptomyces* sp. สามารถแสดงฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาทได้ที่ความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ (Tadtong *et al.* 2007)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ (สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล - คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ และการคัดเลือกเชื้อ

3.1.1.1 ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในการแยกเชื้อ *Microbispora*

พืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยได้แก่ ขมิ้น (*Curcuma longa*) ซึ่งมีรายงานค้นพบสารที่มีฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาท โดยเลือกพืชสมุนไพรที่มีการปลูกโดยไม่ใช้สารเคมี ในเขตจังหวัดราชบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างลำต้นใต้ดิน ลำต้นเหนือดิน และใบของพืชที่โตเต็มที่แล้วมาล้างด้วยน้ำสะอาด เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงขั้นตอนการแยกเชื้อ

3.1.1.2 การแยกเชื้อ

นำตัวอย่างพืชจากข้อ 13.1.1.1 มาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1 x 1 เซนติเมตร และแช่ในสารละลาย 0.1% Tween 20 เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง นำชิ้นส่วนพืชแช่ลงใน 95% (v/v) ethanol เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาย้ายตัวอย่างพืชมาแช่ในสารละลาย 1% sodium hypochlorite เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (หรืออาจปรับกรรมวิธีตามความเหมาะสม) ชิ้นส่วนพืชที่ได้จะถูกนำมาบดในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร และเกลี่ยลงบนอาหาร starch casein agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ นำจานอาหารมาบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เมื่อครบเวลาทำการเลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยไซต์ โดยตรวจสอบลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ระยะการทำงานสูง (Long working distance lens) จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract-Malt extract agar และเก็บเชื้อไว้ในหลอดอาหารเลี้ยง (YM slant) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ (สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล - คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อดังนี้

3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (ISP) ชนิดต่างๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring and Gottlieb, 1966) ตรวจสอบผลโดยการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจสอบลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายโคติน การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท

(Arai, 1975) การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง และการใช้แหล่งคาร์บอน (Shiring and Gottlieb, 1966) จากการศึกษาจะสามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อหรือเชื้อที่มีคุณสมบัติเด่นแต่ละกลุ่มมาศึกษาในขั้นต่อไป

3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ (Komagata and Suzuki, 1987)

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

3.2.2.1 การวิเคราะห์ผนังเซลล์

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

3.2.2.2 การวิเคราะห์ Whole cell sugar

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

3.2.2.3 การวิเคราะห์ Polar lipid

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

3.2.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid)

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

3.2.2.5 การวิเคราะห์ Isoprenoid quinone

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

3.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการ

วิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (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/DBJ โดยใช้ BLAST program และ alignment software (ในกรณีนี้ใช้ CLUSTAL W program package) จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ใน MEGA software program version 2.1 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้

3.2.4 การวิเคราะห์ DNA base composition (Tamaoka,1994.)

3.2.4.1 การแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์

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

3.2.4.2 การวิเคราะห์

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

3.2.5 Photobiotin labeling DNA-DNA Hybridization

3.2.5.1 Immobilization of DNA in microtiter plate

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

3.2.5.2 DNA labeling with photobiotin (DNA probe)

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

3.2.5.3 Prehybridization

หยดสารละลาย prehybridization ลงแต่ละหลุมของ plate บ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิสำหรับ hybridize แล้วเทสารละลายนี้ทิ้ง

3.2.5.4 Hybridization

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

3.2.5.5 Detection of biotinylated-DNA annealing to immobilized-DNA

เมื่อทดสอบละลาย hybridize ทั่วแล้ว ล้างด้วย 0.2xSSC 3 ครั้ง เติมน้ำละลาย I (Bovine serum albumin (Fraction V) , Triton X - 100, PBS) บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทดสอบละลาย I ทั่ว

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

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

ผลจากการศึกษา DNA relatedness จะสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อได้ หากเชื้อที่พบเป็นเชื้อที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานไว้จำเป็นต้องศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อใหม่ต่อไป โดยใช้วิธีการดังที่กล่าวมา

3.3 การหมักเชื้อเพิ่มปริมาณเพื่อผลิตสารและการสกัดแยกสาร (สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล - คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรที่น่าสนใจ ซึ่งได้จากโครงการย่อยที่ 1 ใน Seed medium (Yeast extract - Malt extract broth; pH 7.3) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium (Yeast extract - Malt extract broth ที่เติม 0.1% CaCO₃; pH 7.3) โดยเติม 1% inoculum ของ seed medium ลงใน production medium บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) ในส่วนของเซลล์นำมาแช่ใน MeOH และ CH₂Cl₂ ตามลำดับ จากนั้นระเหยภายใต้ความดัน และนำส่วนที่เหลือมาทำการสกัดด้วย EtOAc 3 ครั้ง จะได้สารสกัดหยาบในส่วน of เซลล์ เปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบในส่วน of น้ำใสและส่วน of เซลล์ จากนั้นเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีนำไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.4.1 ฤทธิ์กระตุ้นการงอกและการปกป้องเซลล์แขนงประสาท

3.4.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทพิลิบแก้ว

งานวิจัยนี้จะนำเอาเซลล์ประสาทพิลิบแก้วมาใช้เป็นแบบจำลองในการทดสอบ

การเพาะเลี้ยงเซลล์พิลิบแก้ว

- เซลล์พิลิบแก้วจะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM (alpha minimal essential medium) ที่ทำการเติม 7.5% newborn calf serum (NCS) และ 2.5% fetal bovine serum (FBS) ในบรรยากาศ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการ subculture ทุก 2-3 วัน(29)

การเหนี่ยวนำให้เซลล์พิลิบแก้วเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทพิลิบแก้ว

- นำเซลล์พิลิบแก้วที่เจริญเป็นผืนเดียวกันบนผิวภาชนะเพาะเลี้ยงมาเติม trypsin ให้กลายเป็นเซลล์เดี่ยว นำเซลล์มา 2×10^6 cells/ml เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ α -MEM ที่ทำการเติม 5% FBS และ 0.5 μ M RA ใน petridish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100-mm บรรยากาศ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C เซลล์จะรวมกลุ่มกันมีลักษณะเป็น embryoid bodies ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน(29)

- หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ทำการกระจาย embryoid bodies ให้กลายเป็น เซลล์เดี่ยวด้วยไปเปิด แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบน microtiter plate ที่ทำการเคลือบผิวภาชนะด้วย poly-L-lysine (ใช้ 50 μ g/mL poly-L-lysine ที่ละลายใน sterile phosphate buffer solution เติมลงในแต่ละหลุมของ plate เป็นเวลา 1 คืน แล้วค่อยนำสารละลายออกปล่อยให้แห้งภายใต้รังสี UV ใน laminar flow hood เป็นเวลา 30 นาที) โดยเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 7×10^4 cells/mL (150 μ L/well สำหรับ 96-well plate ในการตรวจวัดอัตราการรอดชีวิตด้วย XTT และ 1.5 mL/well สำหรับ 6-well plate ในการตรวจดูแขนงประสาทภายใต้กล้องจุลทรรศน์) โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเป็น α -MEM ที่ทำการเติม 10% FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในบรรยากาศ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C

- เติม 10 μ M cytosine arabinoside (Ara-C) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2-3 วัน เซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท ที่สมบูรณ์พร้อมใช้ในการทดสอบในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง(29,30)

3.4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ในการงอก ปกป้อง และเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท

เตรียมสารทดสอบฤทธิ์ในการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท

- นำสารทดสอบแต่ละชนิดมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อเตรียม ความเข้มข้นตั้งต้น (stock concentration) ที่ 2 mg/ml และ 20 ng/ml สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป และใช้ตัวทำละลายเป็นกลุ่มควบคุม

ทดสอบหาฤทธิ์ในการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท

- นำสารละลายที่เตรียมขึ้นที่ความเข้มข้นดังกล่าว มาทดสอบกับเซลล์ประสาทพิลิบแก้วที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำเซลล์พิลิบแก้วซึ่งเป็น embryonic carcinoma cells ด้วย all trans-retinoic acid ให้เกิดการ differentiate ไปเป็น เซลล์ประสาทพิลิบแก้วแล้วตรวจดูอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทด้วยวิธี XTT reduction assay โดยใช้ตัวทำละลายเป็นกลุ่มควบคุม ความเข้มข้นในการทดสอบคือ 100 μ g/ml เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทใน เบื้องต้นและที่ความเข้มข้น 1 ng/ml เพื่อประเมินอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท ทำการทดสอบ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำการทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ

- หากที่ความเข้มข้นที่ 1 ng/ml นี้สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิต

(% cell viability) มากกว่าหรือเท่ากับ 100% จะนำมาทดสอบต่อโดยการสังเกตลักษณะทางกายภาพของเซลล์ โดยสังเกตการเพิ่มขึ้นของแขนงเซลล์ประสาท และ/หรือ ความยาวที่เพิ่มขึ้นของแขนงประสาท ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนับจำนวนแขนงประสาท และ/หรือความยาวของแขนงประสาทจำนวน 30 เซลล์ จากการสุ่มบริเวณเพื่อตรวจวัดอย่างน้อย 3 บริเวณที่ไม่ซ้ำกัน แล้วนำมาเฉลี่ยรายงานเป็นจำนวนแขนงประสาทเฉลี่ย และความยาวเฉลี่ย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการเติมสารทดสอบ โดยใช้สาร geldanamycin ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานว่า เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาทเป็นชุดควบคุมทางบวก ผู้วิจัยมีสารมาตรฐานชนิดนี้อยู่แล้ว

- หากสารสกัดชนิดใดสามารถกระตุ้นให้เกิดการงอกของแขนงประสาทได้จะ นำมาทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทต่อไป โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ครอบคลุมความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท ทำการทดสอบ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำการทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ แล้วรายงานเป็น ค่าเฉลี่ย IC50 เพื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับ therapeutic index (TI)

บทที่ 4
ผลการดำเนินการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างขมิ้นชันจากจังหวัด ราชบุรี นนทบุรี กาญจนบุรี พระนครศรีอยุธยาและสระบุรี นำมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสัท พบว่าได้เชื้อแอกติโนมัยสัททั้งหมด 22 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของพืชตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอกติโนมัยสัทที่แยกได้

ชนิดของพืช		จังหวัด	รหัสเชื้อ
ชื่อทั่วไป	ชื่อวิทยาศาสตร์		
ขมิ้นชัน	<i>Curcuma Longa</i> Linn.	ราชบุรี	RT1-1-1, RT1-1-2, RT1-1-3
ขมิ้นชัน	<i>Curcuma Longa</i> Linn.	นนทบุรี	NT2-5-1, NT2-5-2, NT2-5-3
ขมิ้นชัน	<i>Curcuma Longa</i> Linn.	อยุธยา	AT1-1-1, AT1-1-2, AT1-1-3, AT1-1-4
ขมิ้นชัน	<i>Curcuma Longa</i> Linn.	กาญจนบุรี	KR2-2-1, KR2-2-2, KR2-2-3, KR2-2-4
ขมิ้นชัน	<i>Curcuma Longa</i> Linn.	นนทบุรี	NT2-7-1, NT2-7-2, NT2-7-3
ขมิ้นชัน	<i>Curcuma Longa</i> Linn.	สระบุรี	SR3-3-1, SR3-3-2, SR3-3-3, SR3-3-4
เอื้องหมายนา	<i>Kaempferia larsenii</i>	อุบลราชธานี	KK1-3

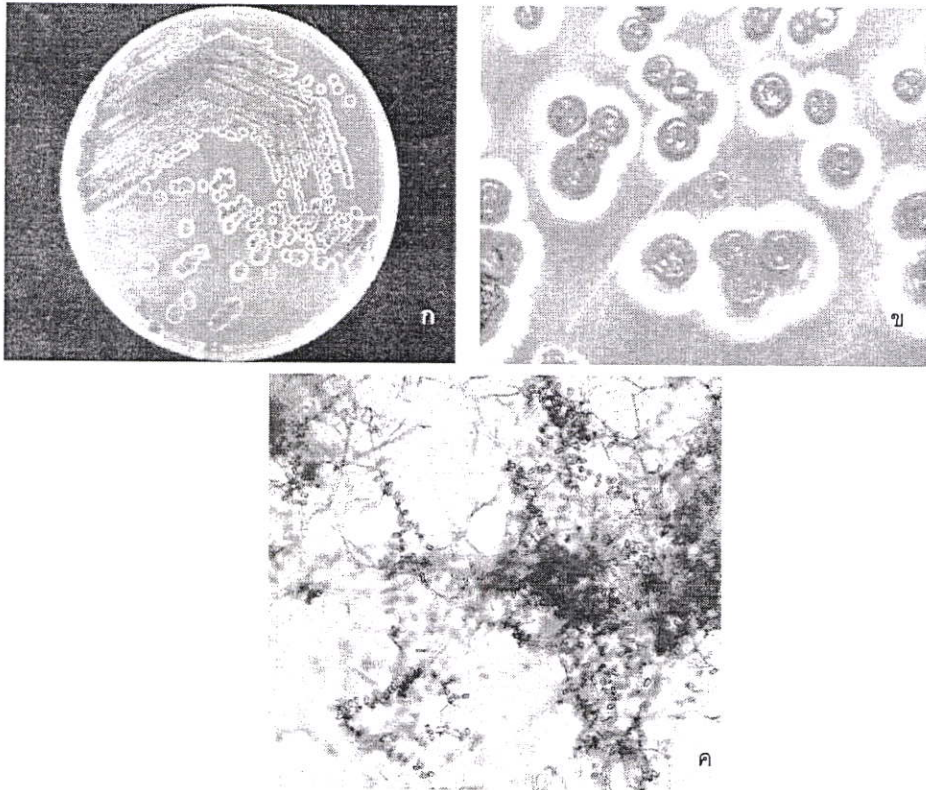
4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีท

4.2.1 ลักษณะทางฟิโนไทป์

ในจำนวนเชื้อแอกติโนมัยสีททั้งหมด 22 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟิโนไทป์ได้ 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดเชื้อออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมชมพูและเส้นใยอาหารน้ำตาลเข้ม ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร และสร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่เกิดบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 1) เชื้อในกลุ่มนี้ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ISP3 และ Nutrient agar เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 9 ไอโซเลต ได้แก่ RT1-1-1, RT1-1-2, RT1-1-3, NT2-7-1, NT2-7-2, NT2-7-3, NT2-5-1, NT2-5-2 และ NT2-5-3

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 ในช่วงพีเอช 5 ถึง 10 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน แต่สามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนม รวมถึงไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 3)



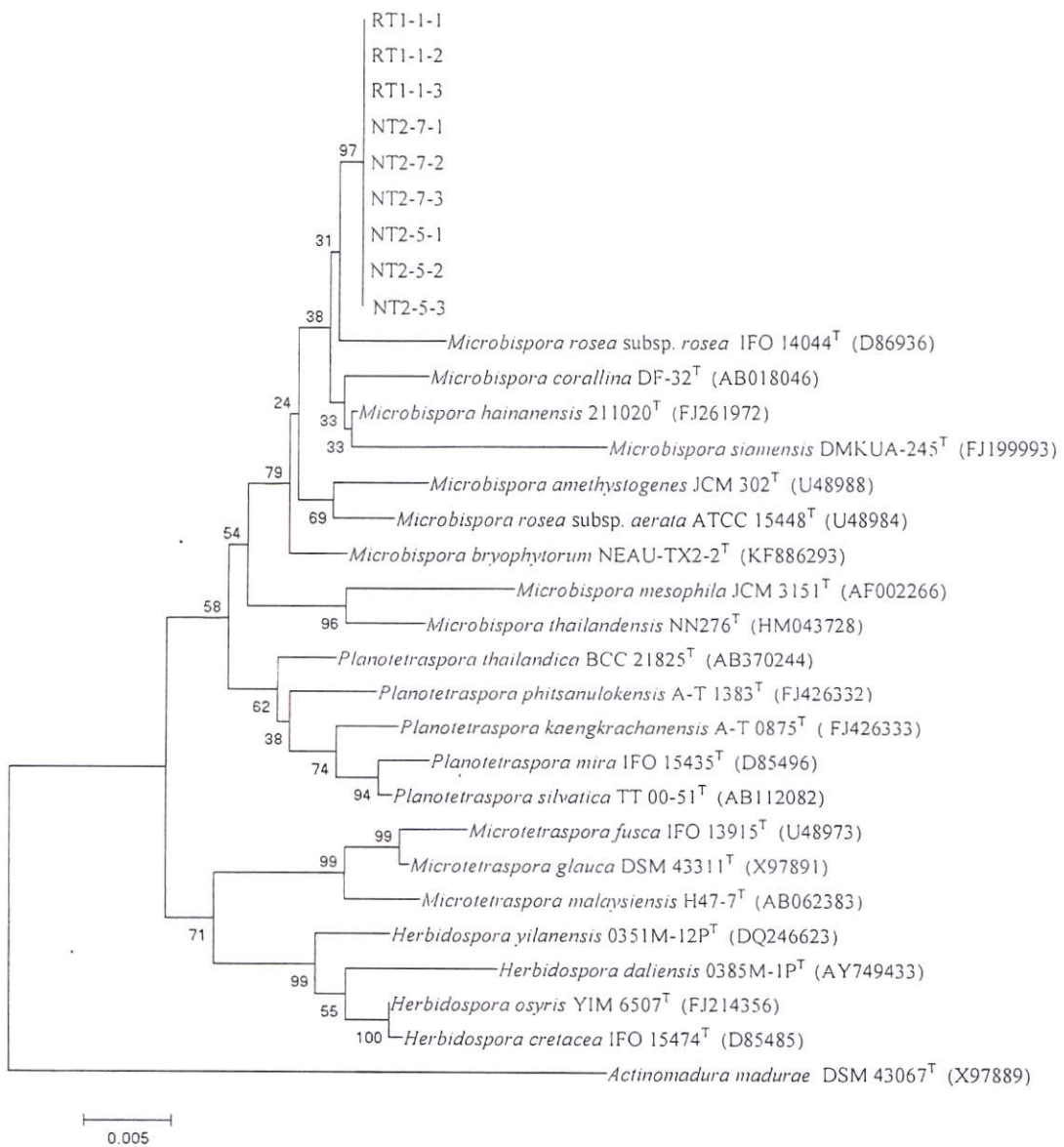
รูปที่ 1 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต RT1-1-1 บนอาหาร ISP2
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 1

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไขมันพหุเมิลิกแบบ *meso* พบน้ำตาลไรโบส แมนโนส ไซโลส กลูโคส และมาดูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ พบ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาร์ลิปิดชนิดที่ 4) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Microbispora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต RT1-1-1

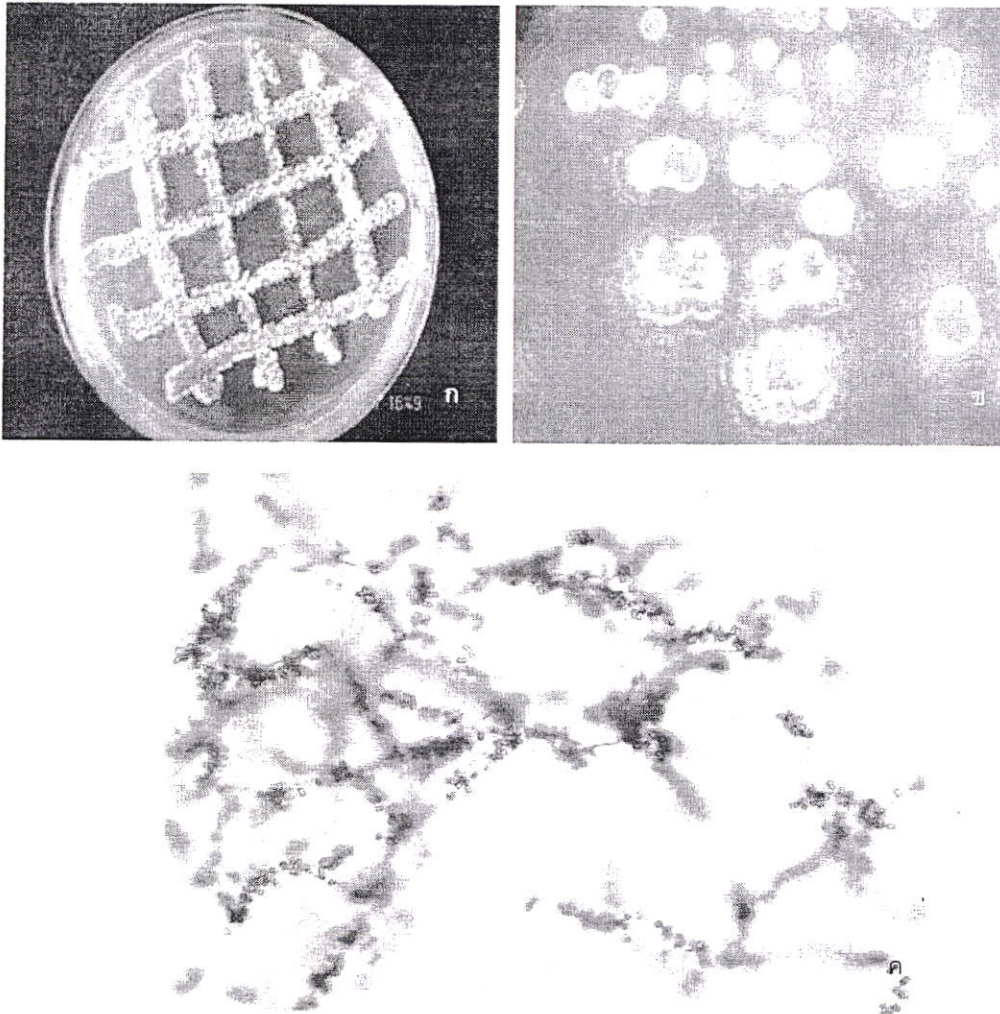
ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยสิท พบว่าเชื้อไอโซเลต RT1-1-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora hainanensis* 211020^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.7 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 38 (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต RT1-1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสิท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมชมพูและเส้นใยอาหารเหลืองอมชมพู ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร และสร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่เกิดบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 3) เชื้อในกลุ่มนี้ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 8 ไอโซเลต ได้แก่ SR3-3-1, SR3-3-2, SR3-3-3, SR3-3-4, KR2-2-1, KR2-2-2, KR2-2-3 และ KR2-2-4

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 ในช่วงพีเอช 5 ถึง 10 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน แต่สามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนม รวมถึงไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 3)



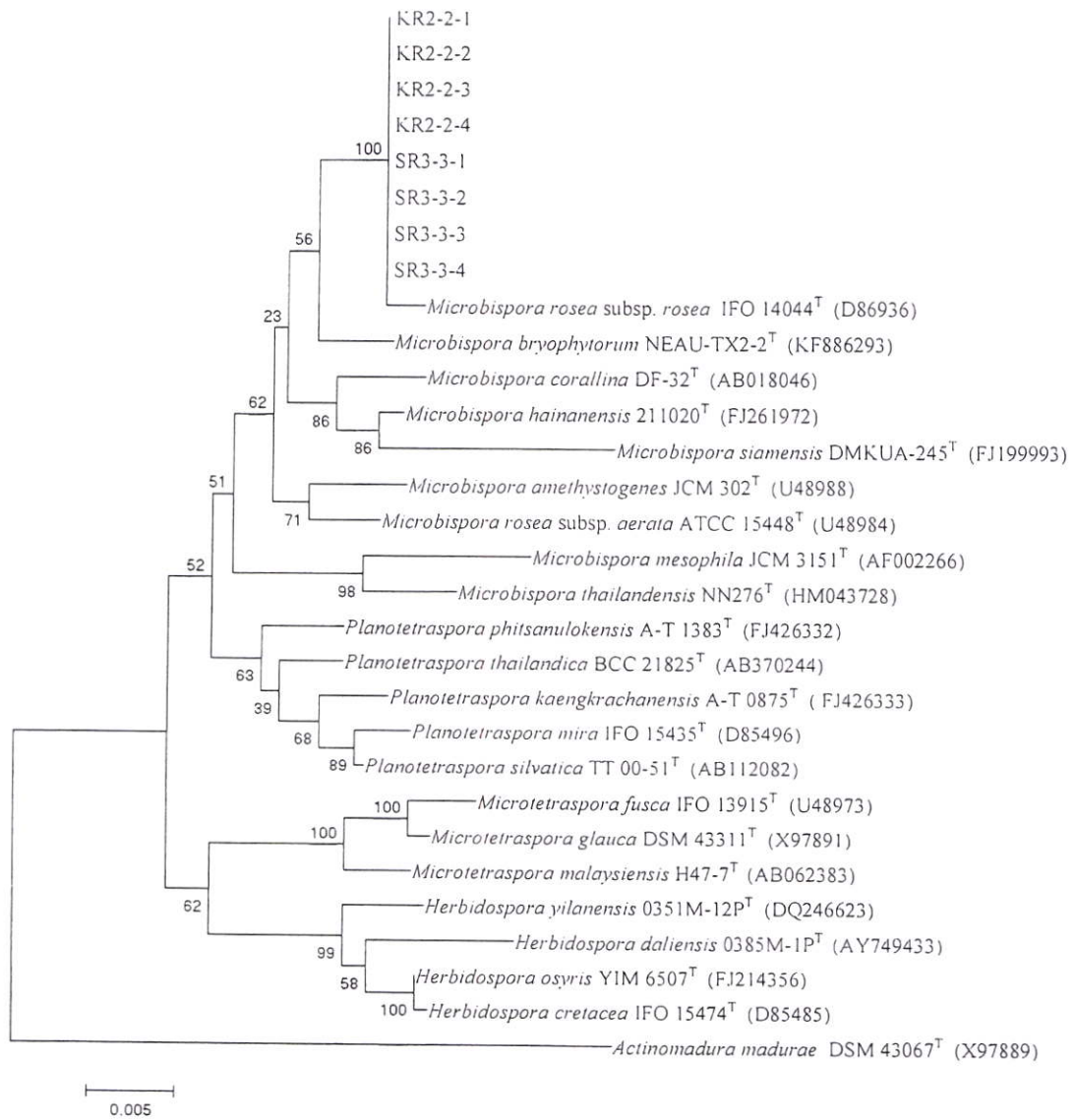
รูปที่ 3 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต SR3-3-1 บนอาหาร ISP2
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมติกแบบ meso พบน้ำตาลไรโบส แมนโนส ไซโลส กลูโคส และมาตูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ พบ diposphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาร์ลิปิดชนิดที่ 4) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Microbispora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต SR3-3-1

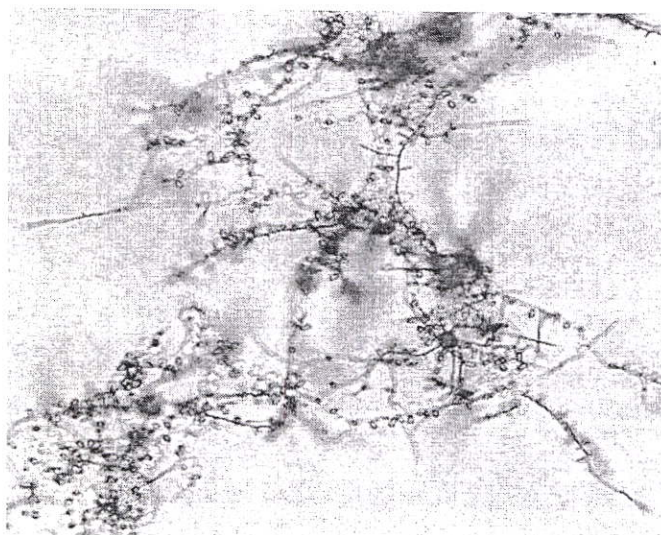
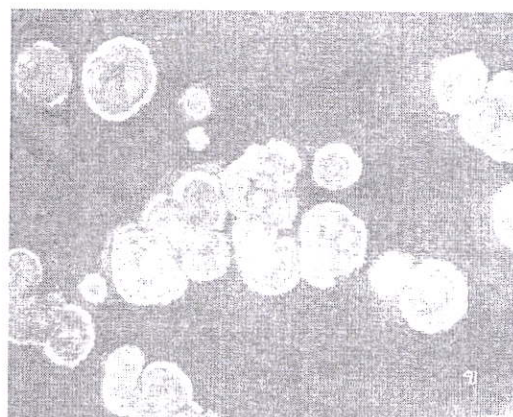
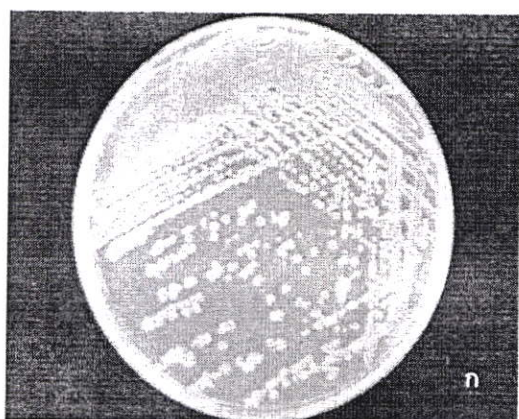
ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยสิต พบว่าเชื้อไอโซเลต SR3-3-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.8 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ ร้อยละ 100 (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต SR3-3-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสิท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมชมพู และเส้นใยอาหารชมพูส้ม ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร และสร้างสปอร์มีลักษณะต่อกันเป็นคู่เกิดบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 5) เชื้อในกลุ่มนี้ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ ISP3 เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 4 ไอโซเลต ได้แก่ AT1-1-1, AT1-1-2, AT1-1-3 และ AT1-1-4

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 3 ในช่วงพีเอช 5 ถึง 10 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน แต่สามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนในนม รวมถึงสามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 3)



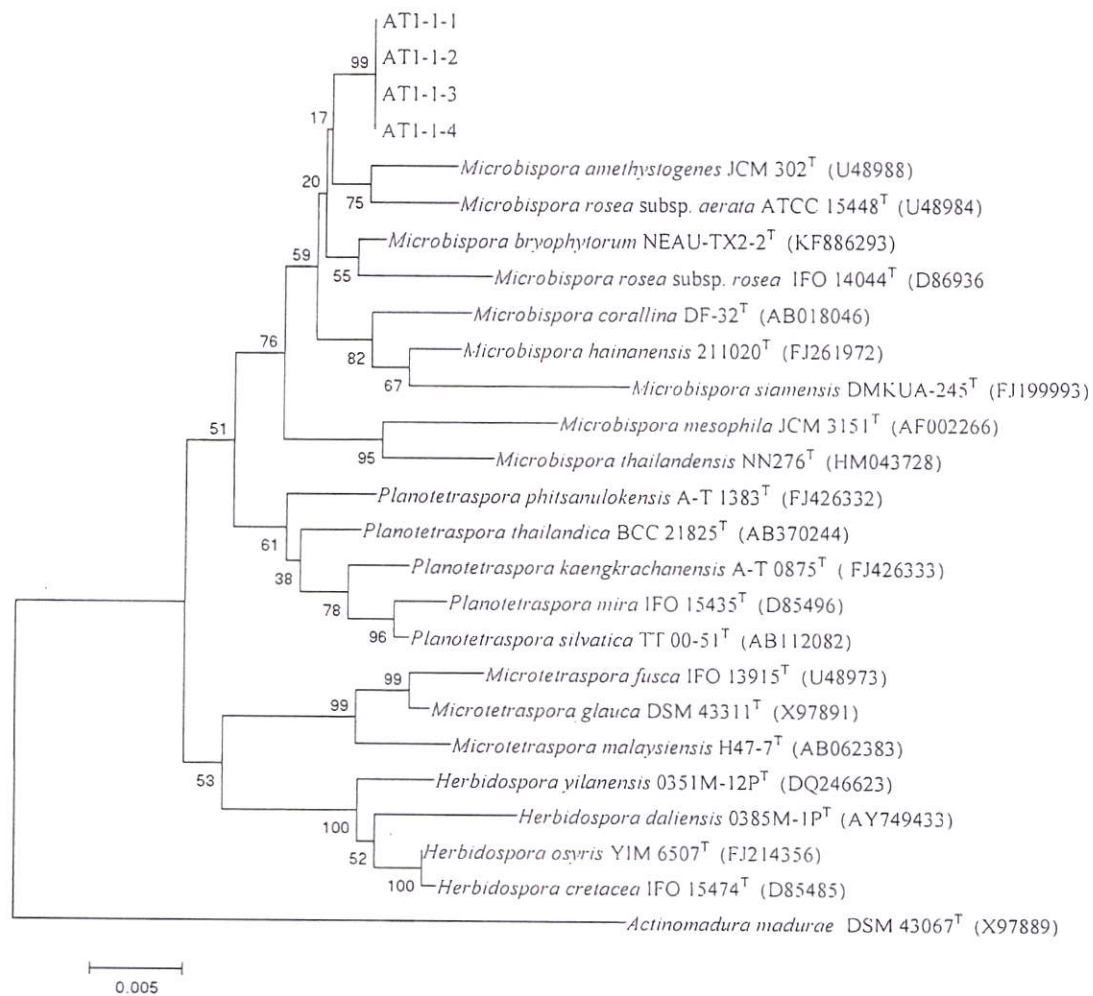
รูปที่ 5 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต AT1-1-4 บนอาหาร ISP2
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมอิกแบบ meso พบน้ำตาลไรโบส แมนโนส ซิโลส กลูโคส และมาตูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ พบ diposphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาร์ ลิปิดชนิดที่ 4) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Microbispora*

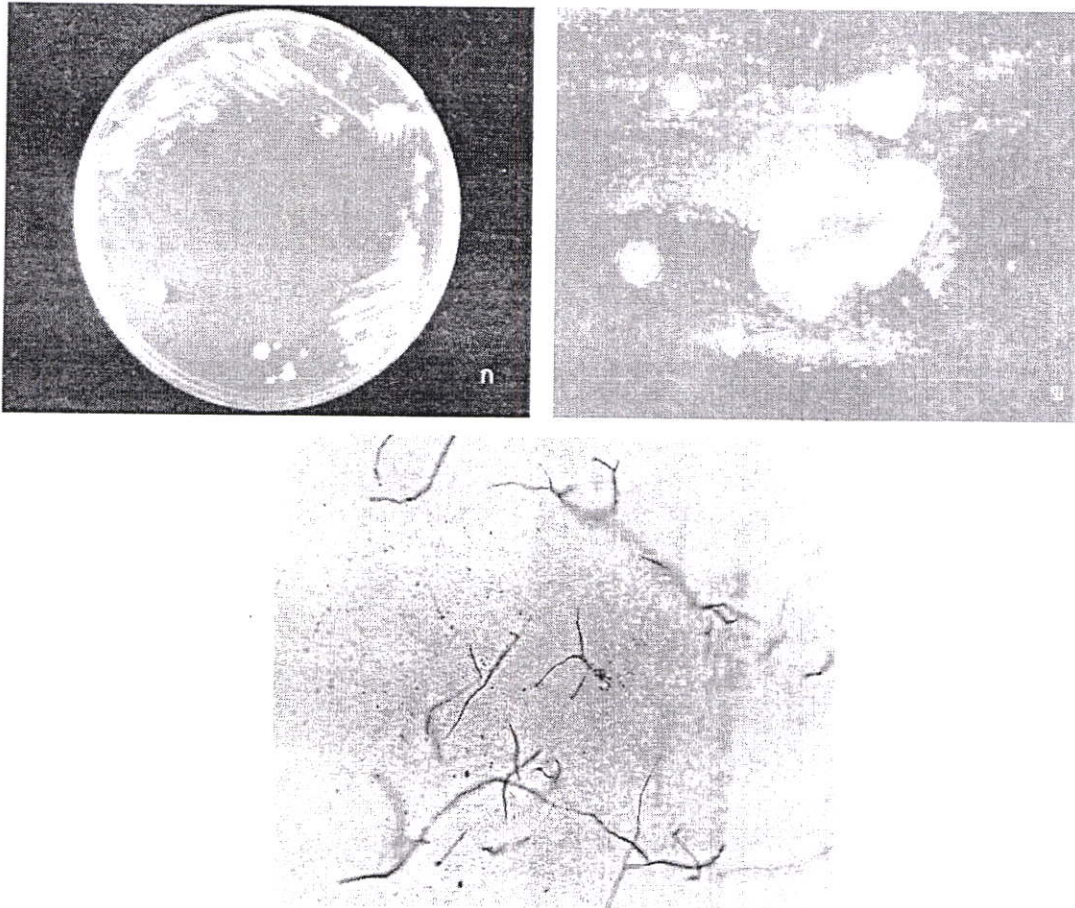
การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต AT1-1-4

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยสีท พบว่าเชื้อไอโซเลต AT1-1-4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora bryophytorum* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.6 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 20 (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AT1-1-4 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวและสร้างเส้นใยอาหารสีเหลือง สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหารสีเหลืองจาง สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นสายยาวและเดี่ยว (รูปที่ 7) เชื้อในกลุ่มนี้ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2, ISP 3, ISP 6 และ nutrient agar เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 1 ไอโซเลต ได้แก่ KK1-3 เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 ในช่วงพีเอช 5 ถึง 10 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน แต่สามารถย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนม รวมถึงไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ (ตารางที่ 4)



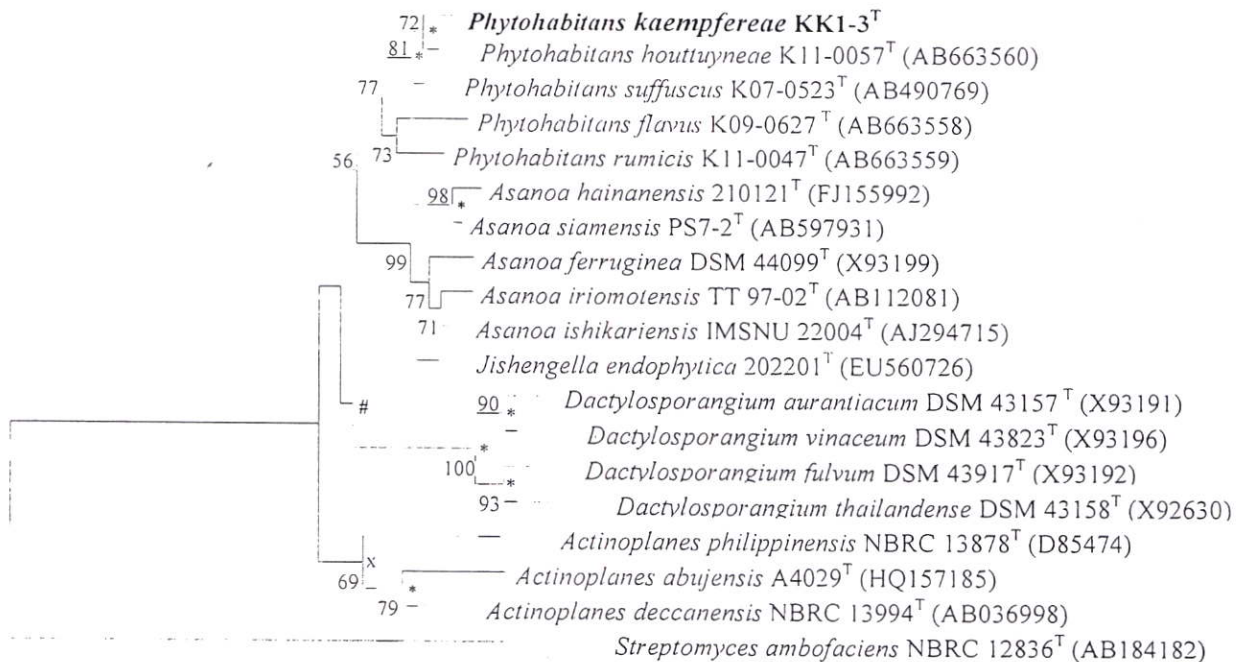
รูปที่ 7 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต KK1-3 บนอาหาร ISP2
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 4

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไฮโซเมอร์ของกรดไคโตะมีโนพิเมติกแบบ *meso* และ OH-*meso* และ Lysine พบน้ำตาล glucose, mannose, rhamnose, ribose และ xylose เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ พบ diposphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylinositol mannosides ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Phytohabitans*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต KK1-3

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อไอโซเลต KK1-3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Phytohabitans houttuyniae* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.04 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 72 (รูปที่ 8) ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต KK1-3 และเชื้อ type strain ของสกุล *Phytohabitans* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree มีค่าอยู่ในช่วง $14.7\% \pm 4.1$ - $38.1\% \pm 0.9$ จากข้อมูลสามารถสรุปได้ว่าเชื้อไอโซเลต KK1-3 เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Phytohabitans* จึงได้ทำการตีพิมพ์ manuscript สำหรับตีพิมพ์ในวารสาร International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) ในหัวข้อเรื่อง *Phytohabitans kaempferae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the leaf of *Kaempferia larsenii*



รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต KK1-3 บน phylogenetic tree (NJ method)

ตารางที่ 3 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้

Isolate no.	Starch hydrolysis	Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Skim milk	
				Peptonization	Coagulation
RT1-1-1	+	-	-	+	+
RT1-1-2	+	-	-	+	+
RT1-1-3	+	-	-	+	+
NT2-5-1	+	-	-	+	+
NT2-5-2	+	-	-	+	+
NT2-5-3	+	-	-	+	+
NT2-7-1	+	-	-	+	+
NT2-7-2	+	-	-	+	+
NT2-7-3	+	-	-	+	+
SR3-3-1	+	-	-	+	-
SR3-3-2	+	-	-	+	-
SR3-3-3	+	-	-	+	-
SR3-3-4	+	-	-	+	-
KR2-2-1	+	-	-	+	-
KR2-2-2	+	-	-	+	-
KR2-2-3	+	-	-	+	-
KR2-2-4	+	-	-	+	-
AT1-1-1	+	-	+	+	-
AT1-1-2	+	-	+	+	-
AT1-1-3	+	-	+	+	-
AT1-1-4	+	-	+	+	-
KK1-3	+	-	-	+	+

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์แยกได้

Isolate no.	NaCl tolerance (%)											pH tolerance										Growth at (°C)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	4	5	6	7	8	9	10	20	25	30	37	40	45	50	55	60	65
ATI-1-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
ATI-1-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
ATI-1-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
ATI-1-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
KEI-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิตินัมยีสที่บนอาหารต่างๆ

Isolate no.	Media	Growth	Color of upper surface (aerial mycelium)	Color of reverse surface (substrate mycelium)	Color of soluble pigment
RT1-1-1	ISP2	Good	Medium white	Dark Reddish brown	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Grayish Reddish Orange	–
	ISP4	Poor	Medium Gray	Medium brown	–
	ISP5	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP6	Moderate	–	Light Olive Gray	–
	ISP7	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Glu.A.	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Cz.sucrose	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	N.A.	Moderate	White	Light Olive Gray	–
RT1-1-2	ISP2	Good	–	Dark Reddish Gray	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Grayish Reddish Orange	–
	ISP4	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP5	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP6	Moderate	–	Light Olive Gray	–
	ISP7	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Glu.A.	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Cz.sucrose	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	N.A.	Moderate	White	Light Olive Gray	–
RT1-1-3	ISP2	Good	–	Dark Reddish Gray	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Grayish Reddish Orange	–
	ISP4	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP5	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP6	Moderate	–	Light Olive Gray	–
	ISP7	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Glu.A.	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Cz.sucrose	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	N.A.	Moderate	White	Light Olive Gray	–

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสโคดีโนมัยสีทบนอาหารต่างๆ (ต่อ)

Isolate no.	Media	Growth	Color of upper surface (aerial mycelium)	Color of reverse surface (substrate mycelium)	Color of soluble pigment
NT2-5-1	ISP2	Good	–	Dark Reddish Gray	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Grayish Reddish Orange	–
	ISP4	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP5	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP6	Moderate	–	Light Olive Gray	–
	ISP7	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Glu.A.	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Cz.sucrose	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	N.A.	Moderate	White	Light Olive Gray	–
NT2-5-2	ISP2	Good	–	Dark Reddish Gray	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Grayish Reddish Orange	–
	ISP4	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP5	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP6	Moderate	–	Light Olive Gray	–
	ISP7	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Glu.A.	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Cz.sucrose	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	N.A.	Moderate	White	Light Olive Gray	–
NT2-5-3	ISP2	Good	–	Dark Reddish Gray	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Grayish Reddish Orange	–
	ISP4	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP5	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP6	Moderate	–	Light Olive Gray	–
	ISP7	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Glu.A.	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Cz.sucrose	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	N.A.	Moderate	White	Light Olive Gray	–

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิตินัมยีสีบนอาหารต่างๆ (ต่อ)

Isolate no.	Media	Growth	Color of upper surface (aerial mycelium)	Color of reverse surface (substrate mycelium)	Color of soluble pigment
NT2-7-1	ISP2	Good	–	Dark Reddish Gray	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Grayish Reddish Orange	–
	ISP4	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP5	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP6	Moderate	–	Light Olive Gray	–
	ISP7	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Glu.A.	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Cz.sucrose	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	N.A.	Moderate	White	Light Olive Gray	–
NT2-7-2	ISP2	Good	–	Dark Reddish Gray	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Grayish Reddish Orange	–
	ISP4	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP5	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP6	Moderate	–	Light Olive Gray	–
	ISP7	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Glu.A.	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Cz.sucrose	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	N.A.	Moderate	White	Light Olive Gray	–
NT2-7-3	ISP2	Good	–	Dark Reddish Gray	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Grayish Reddish Orange	–
	ISP4	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP5	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	ISP6	Moderate	–	Light Olive Gray	–
	ISP7	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Glu.A.	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	Cz.sucrose	Poor	Medium Gray	Medium Gray	–
	N.A.	Moderate	White	Light Olive Gray	–

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสโคดีโนมัยสีทบนอาหารต่างๆ (ต่อ)

Isolate no.	Media	Growth	Color of upper surface (aerial mycelium)	Color of reverse surface (substrate mycelium)	Color of soluble pigment	
SR3-3-1	ISP2	Abundant	Pinkish White	Strong Yellowish Pink	-	
	ISP3	Good	Pinkish White	Dark Yellowish Pink	-	
	ISP4	Poor	White	White	-	
	ISP5	Poor	White	White	-	
	ISP6	Good	Pinkish Gray	Grayish Yellowish Pink	-	
	ISP7	Poor	White	White	-	
	Glu.A.	Poor	White	White	-	
	Cz.sucrose	Poor	Yellowish White	Yellowish White	-	
SR3-3-2	N.A.	Good	Pinkish White	Pinkish Gray	-	
	SR3-3-3	ISP2	Abundant	-	Strong Yellowish Pink	-
		ISP3	Good	Pinkish White	Dark Yellowish Pink	-
		ISP4	Poor	White	White	-
		ISP5	Poor	White	White	-
		ISP6	Good	Pinkish Gray	Grayish Yellowish Pink	-
		ISP7	Poor	White	White	-
		Glu.A.	Poor	White	White	-
Cz.sucrose		Poor	Yellowish White	Yellowish White	-	
N.A.	Good	Pinkish White	Pinkish Gray	-		

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิตินมัยสีทบนอาหารต่างๆ (ต่อ)

Isolate no.	Media	Growth	Color of upper surface (aerial mycelium)	Color of reverse surface (substrate mycelium)	Color of soluble pigment
SR3-3-4	ISP2	Abundant	–	Strong Yellowish Pink	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Dark Yellowish Pink	–
	ISP4	Poor	White	White	–
	ISP5	Poor	White	White	–
	ISP6	Good	Pinkish Gray	Grayish Yellowish Pink	–
	ISP7	Poor	White	White	–
	Glu.A.	Poor	White	White	–
	Cz.sucrose	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	N.A.	Good	Pinkish White	Pinkish Gray	–
KR2-2-1	ISP2	Abundant	–	Strong Yellowish Pink	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Dark Yellowish Pink	–
	ISP4	Poor	White	White	–
	ISP5	Poor	White	White	–
	ISP6	Good	Pinkish Gray	Grayish Yellowish Pink	–
	ISP7	Poor	White	White	–
	Glu.A.	Poor	White	White	–
	Cz.sucrose	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	N.A.	Good	Pinkish White	Pinkish Gray	–
KR2-2-2	ISP2	Abundant	–	Strong Yellowish Pink	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Dark Yellowish Pink	–
	ISP4	Poor	White	White	–
	ISP5	Poor	White	White	–
	ISP6	Good	Pinkish Gray	Grayish Yellowish Pink	–
	ISP7	Poor	White	White	–
	Glu.A.	Poor	White	White	–
	Cz.sucrose	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	N.A.	Good	Pinkish White	Pinkish Gray	–

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยสีทบนอาหารต่างๆ (ต่อ)

Isolate no.	Media	Growth	Color of upper surface (aerial mycelium)	Color of reverse surface (substrate mycelium)	Color of soluble pigment
KR2-2-3	ISP2	Abundant	–	Strong Yellowish Pink	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Dark Yellowish Pink	–
	ISP4	Poor	White	White	–
	ISP5	Poor	White	White	–
	ISP6	Good	Pinkish Gray	Grayish Yellowish Pink	–
	ISP7	Poor	White	White	–
	Glu.A.	Poor	White	White	–
	Cz.sucrose	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	N.A.	Good	Pinkish White	Pinkish Gray	–
KR2-2-4	ISP2	Abundant	–	Strong Yellowish Pink	–
	ISP3	Good	Pinkish White	Dark Yellowish Pink	–
	ISP4	Poor	White	White	–
	ISP5	Poor	White	White	–
	ISP6	Good	Pinkish Gray	Grayish Yellowish Pink	–
	ISP7	Poor	White	White	–
	Glu.A.	Poor	White	White	–
	Cz.sucrose	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	N.A.	Good	Pinkish White	Pinkish Gray	–
AT1-1-1	ISP2	Abundant	White	Moderate Yellowish Pink	–
	ISP3	Abundant	Pinkish White	Grayish Yellowish Pink	–
	ISP4	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	ISP5	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	ISP6	Good	–	Grayish Yellow	–
	ISP7	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	Glu.A.	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	Cz.sucrose	Poor	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	–
	N.A.	Moderate	White	Pale Greenish Yellow	–

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยสีทบนอาหารต่างๆ (ต่อ)

Isolate no.	Media	Growth	Color of upper surface (aerial mycelium)	Color of reverse surface (substrate mycelium)	Color of soluble pigment
AT1-1-1	ISP2	Abundant	White	Moderate Yellowish Pink	–
	ISP3	Abundant	Pinkish White	Grayish Yellowish Pink	–
	ISP4	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	ISP5	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	ISP6	Good	–	Grayish Yellow	–
	ISP7	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	Glu.A.	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	Cz.sucrose	Poor	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	–
	N.A.	Moderate	White	Pale Greenish Yellow	–
AT1-1-2	ISP2	Abundant	White	Moderate Yellowish Pink	–
	ISP3	Abundant	Pinkish White	Grayish Yellowish Pink	–
	ISP4	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	ISP5	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	ISP6	Good	–	Grayish Yellow	–
	ISP7	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	Glu.A.	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	Cz.sucrose	Poor	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	–
	N.A.	Moderate	White	Pale Greenish Yellow	–
AT1-1-3	ISP2	Abundant	White	Moderate Yellowish Pink	–
	ISP3	Abundant	Pinkish White	Grayish Yellowish Pink	–
	ISP4	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	ISP5	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	ISP6	Good	–	Grayish Yellow	–
	ISP7	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	Glu.A.	Poor	Yellowish White	Yellowish White	–
	Cz.sucrose	Poor	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	–
	N.A.	Moderate	White	Pale Greenish Yellow	–

ตารางที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอสคิตินมัยสีทบนอาหารต่างๆ (ต่อ)

Isolate no.	Media	Growth	Color of upper surface (aerial mycelium)	Color of reverse surface (substrate mycelium)	Color of soluble pigment
AT1-1-4	ISP2	Abundant	White	Moderate Yellowish Pink	-
	ISP3	Abundant	Pinkish White	Grayish Yellowish Pink	-
	ISP4	Poor	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP5	Poor	Yellowish White	Yellowish White	-
	ISP6	Good	-	Grayish Yellow	-
	ISP7	Poor	Yellowish White	Yellowish White	-
	Glu.A.	Poor	Yellowish White	Yellowish White	-
	Cz.sucrose	Poor	Pale Greenish Yellow	Pale Greenish Yellow	-
	N.A.	Moderate	White	Pale Greenish Yellow	-
KK1-3	ISP2	Abundant	White	Yellow	Pale Yellow
	ISP3	Abundant	White	Grayish Yellow	Pale Yellow
	ISP4	Poor	White	Yellow	-
	ISP5	Poor	White	Yellowish White	-
	ISP6	Good	White	Grayish Yellow	-
	ISP7	Poor	White	Yellow	-
	Glu.A.	Poor	White	Yellow	-
	Cz.sucrose	Poor	White	Pale Greenish Yellow	-
	N.A.	Moderate	White	Pale Greenish Yellow	Pale Yellow

4.3 ผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes

สารสกัดที่แสดงศักยภาพในการทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% ได้แก่สารสกัดจากเชื้อไอโซเลต RT1-1-1 (ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml), SR3-3-1(ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml), AT1-1-1(ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml), KK1-3(ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml) และเมื่อพิจารณาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทพบว่าสารสกัด RT1-1-1 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทที่ต่ำ ($IC_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบ therapeutic index (TI) ระหว่างความเข้มข้นที่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตได้มากกว่า 100% กับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทแล้ว จึงเลือกเพียง RT1-1-1 มาทำการศึกษาความสามารถในการกระตุ้นการงอกของแขนงประสาทที่ความเข้มข้น 1 ng/ml ต่อไป

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดจากเชื้อ actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ

สารสกัดของเชื้อ	ความเข้มข้น (ร้อยละการรอดชีวิต \pm SEM)	
	เพิ่มอัตราการรอดชีวิต	ความเป็นพิษ
RT1-1-1 (กลุ่มที่ 1)	1 ng/ml (142.37 \pm 2.03%)	> 10 µg/ml (75.02 \pm 4.01%)
SR3-3-1 (กลุ่มที่ 2)	10 ng/ml (102.11 \pm 1.07%)	> 10 µg/ml (110.25 \pm 3.22%)
AT1-1-1 (กลุ่มที่ 3)	10 ng/ml (101.01 \pm 1.00%)	> 10 µg/ml (95.36 \pm 2.33%)
KK1-3 (กลุ่มที่ 4)	10 µg/ml (99.78 \pm 6.44%)	> 10 µg/ml (129.78 \pm 6.44%)

4.3 ผลการทดสอบ neuritogenic activity ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes

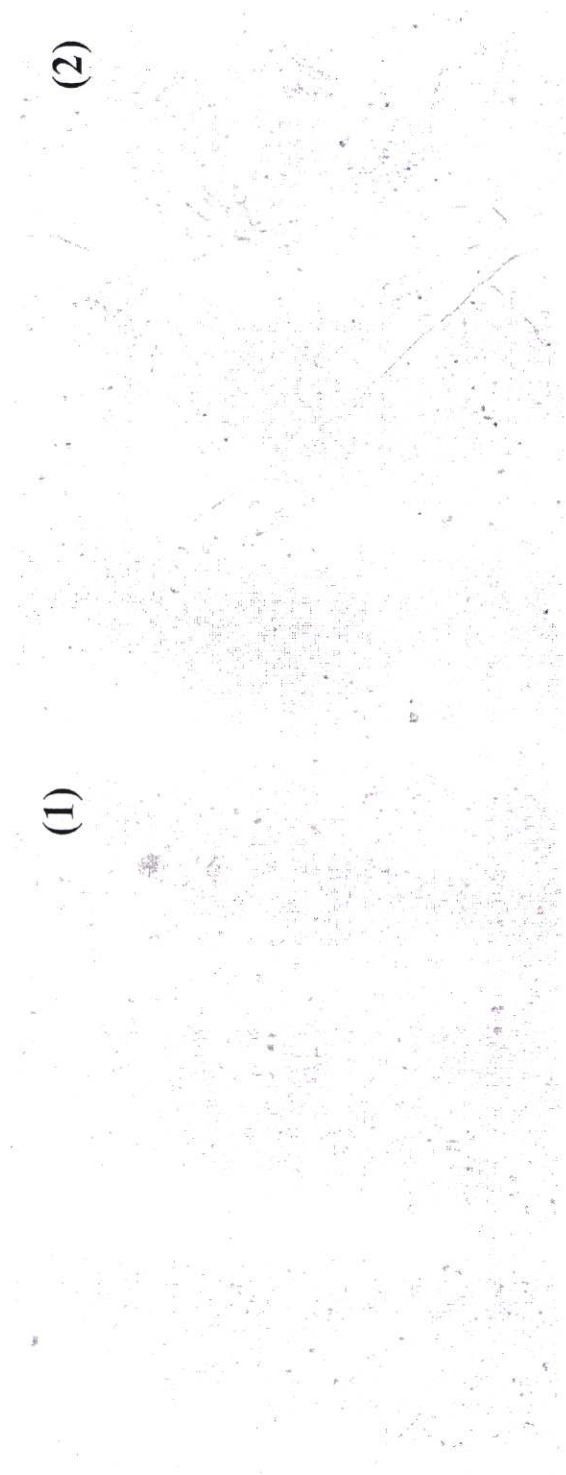
ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบ neuritogenic activity ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ

สารสกัด	neuritogenicity	
	ความยาวของแขนงประสาท (μm) \pm SEM	จำนวนของแขนงประสาท (เส้น) \pm SEM
RT1-1-1 (1 ng/ml) [†]	100.60 \pm 4.56*	3.07 \pm 0.22***
SR3-3-1 (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง	
AT1-1-1 (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง	
KK1-3 (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง	
1 nM geldanamycin	102.11 \pm 9.06***	3.12 \pm 0.11***
0.5%DMSO in α -MEM + 10%FBS	59.43 \pm 6.12	1.98 \pm 0.12
Control (α -MEM + 10%FBS)	42.89 \pm 3.59	1.1 \pm 0.15

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

[†] จะทำการทดสอบเนื่องจาก TI กว้าง; ใช้ geldanamycin เป็น positive control

จากข้อมูลพบว่า สารสกัดของเชื้อไอโซเลต RT1-1-1 ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml มีฤทธิ์กระตุ้นการงอกและเพิ่มจำนวนแขนงประสาท (neuritogenicity) โดยสารสกัดสามารถเพิ่มจำนวนของแขนงประสาทได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวทำลายควบคุม และสามารถทำให้แขนงประสาทยาวมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 11 แสดงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ประสาทที่สืบกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100 เท่า) ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในบรรยากาศ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อทดสอบด้วย (1) ไม่เติมสารทดสอบ [control] (2) 1 ng/mL RTI-1-1

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ neuroprotective activity ของสารสกัดจากเชื้อ actinomycetes

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ neuroprotective activity ของสารสกัดจากเชื้อ actinomycetes ตัวแทน ในกลุ่มต่างๆ

สารสกัด	ร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท \pm SEM
RT1-1-1 (กลุ่มที่ 1) (1 ng/ml)	74.37 \pm 1.14***
SR3-3-1 (กลุ่มที่ 2) (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง
AT1-1-1 (กลุ่มที่ 3) (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง
KK1-3 (กลุ่มที่ 4) (10 μ g/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ
0.5% DMSO in α -MEM	31.16 \pm 3.63*
α -MEM	41.18 \pm 3.23*
0.5%DMSO in α -MEM + 10%FBS	100.22 \pm 1.21*
Control (α -MEM + 10%FBS)	100.00 \pm 0.00

จากข้อมูลสรุปได้ว่าสารสกัด RT1-1-1 ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotective) โดยสารสกัดทุกชนิดสามารถป้องกันเซลล์ประสาทไม่ให้ตายจากการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีซีรัม (serum deprivation) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมซีรัม และกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมซีรัม และจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถยืนยันได้ว่ากลไกการเกิดฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดทั้งหมดนี้ ไม่ได้เกิดมาจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidation) ของสารสกัดจากเชื้อ actinomycetes

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidation) ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ

สารสกัด	% Inhibition at 50 $\mu\text{g/ml} \pm$ SD	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
RT1-1-1 (กลุ่มที่ 1)	12.53 \pm 0.11	มากกว่า 50 $\mu\text{g/ml}$
SR3-3-1 (กลุ่มที่ 2)	10.26 \pm 1.01	มากกว่า 50 $\mu\text{g/ml}$
AT1-1-1 (กลุ่มที่ 3)	24.99 \pm 3.55	มากกว่า 50 $\mu\text{g/ml}$
KK1-3 (กลุ่มที่ 4)	12.00 \pm 1.21	มากกว่า 50 $\mu\text{g/ml}$
500 $\mu\text{g/ml}$ gallic acid	94.21 \pm 0.33	ไม่ได้ทำการทดสอบ

จากข้อมูลสรุปได้ว่าสารสกัดของเชื้อตัวแทนทุกกลุ่มแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยมากเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid จากข้อมูลพบว่าสารสกัดของเชื้อตัวแทนกลุ่มที่ 3 (AT1-1-1) นั้นแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ตามด้วยสารสกัดของเชื้อตัวแทนกลุ่มที่ 1 (RT1-1-1) กลุ่มที่ 4 (KK1-3) และกลุ่มที่ 2 (SR3-3-1) ตามลำดับ ดังนั้นแสดงว่าฤทธิ์การกระตุ้นการแตกแขนงและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดทั้งหมดนี้ ไม่ได้เกิดจากกลไกทางด้านการต้านอนุมูลอิสระแต่อย่างใด

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างต้นขมิ้น สามารถทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลต และได้ทำการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อพบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้นั้นสามารถเจริญได้ดีในอาหาร yeast extract malt extract agar และสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ในโทนสีขาว สร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ในโทนสีส้ม เหลือง และน้ำตาล ลักษณะของสปอร์ที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายของภาพ 1,000 เท่า ส่วนใหญ่มีลักษณะต่อกันเป็นคู่เป็น บางชนิดเป็นสปอร์เดี่ยวและเส้นสาย ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทออกเป็น 4กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมชมพู เส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมเหลือง ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบสองสปอร์ต่อกันเป็นคู่ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora hainanensis* 211020^T มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.70

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมชมพู เส้นใยอาหารสีเหลืองอมชมพู ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบสองสปอร์ต่อกันเป็นคู่ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* IFO 14044^T มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.80

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาว เส้นใยอาหารสีชมพูส้ม ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบสองสปอร์ต่อกันเป็นคู่ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora bryophytorum* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.60

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาว เส้นใยอาหารสีเหลือง มีการสร้างรงควัตถุสีเหลืองจาง สร้างสปอร์เป็นแบบสปอร์เดี่ยวและเส้นสาย พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Phytohabitans houttuyniae* มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.04

สำหรับฤทธิ์การกระตุ้นการแตกแขนงและการปกป้องของระบบประสาท พบว่า สารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสีททุกกลุ่มสามารถแสดงฤทธิ์ดังกล่าวได้ โดยเฉพาะเชื้อในกลุ่มที่ 1 (RT1-1-1) ที่สามารถแสดงฤทธิ์ดังกล่าวได้ในระดับความเข้มข้นต่ำ (1 ng/ml) จากข้อมูลฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ต่ำ แสดงว่าฤทธิ์การกระตุ้นการแตกแขนงและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดทั้งหมดนี้ ไม่ได้เกิดจากกลไกทางด้านการต้านอนุมูลอิสระแต่อย่างใด

จากงานวิจัยนี้ทำให้เห็นความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยสีทจากเนื้อเยื่อต้นขมิ้นถือเป็นทรัพยากรที่สำคัญ และสามารถนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาได้ต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยครั้งนี้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถกระตุ้นการแตกแขนงและปกป้องเซลล์ประสาทได้เป็นอย่างดี จึงควรมีการวิจัยต่อเพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเหล่านี้ถึงระดับสกุลและสปีชีส์ ตลอดจนควรพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ด้วย

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- Barbara, S., Christine, B., Siegfried, D., Anne-Kartrin, R. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* 106, 996-1004.
- Duangmal, K., Mingma, R., Pathom-aree, W., Thamchaipenet, A., Inahashi, Y., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2011. *Amycolatopsis samaneae* sp. nov., isolated from roots of *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 951-955.
- Duangmal, K., Thamchaipenet, A., Ara, I., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2008. *Kineococcus gynurae* sp. nov., isolated from a Thai medicinal plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2493-2442.
- Igarashi, Y., Trujillo, M. E., Molina, E. M., Yanase, S., Miyanaga, S., Obata, T., Sakurai, H., Saiki, I., Fujita, T. and Furumaia, T. 2007. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 3702-3705.
- Inahashi, Y., Matsumoto, A., Ōmura, S. and Takahashi, Y. 2011. *Streptosporangium oxazolinicum* sp. nov., a novel endophytic actinomycete producing new antitrypanosomal antibiotics, spoxazomicins. *J. antibiot.* 64, 297-302.
- Indananda, C., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Takahashi, Y., Duangmal, K. and Thamchaipenet, A. 2010. *Actinophytocola oryzae* gen. nov., sp. nov., isolated from the roots of Thai glutinous rice plants, a new member of the family *Pseudonocardiaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1141-1146.
- Indananda, C., Thamchaipenet, A., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Duangmal, K. and Takahashi, Y. 2011. *Actinoallomurus oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from roots of a Thai jasmine rice plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61, 737-741.
- Kaewkla, O. and Franco, C. M. M. 2010. *Pseudonocardia adelaidensis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of a grey box tree (*Eucalyptus microcarpa*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 105-109.
- Kim, D.S., Park, S.Y., and Kim, J.Y. 2001. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from β A (1-42) insult. *Neurosci. Lett.* 303: 57-61.
- Kirby, B. M. and Meyers, P. R.. 2010. *Micromonospora tulbaghia* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1328-1333.
- Li, J., Zhao, G. Z., Chena, H. H., Qin, S., Xu, L. H., Jiang, C. L. and Li, W. J. 2008. *Rhodococcus cercidiphylli* sp. nov., a new endophytic actinobacterium isolated from a *Cercidiphyllum japonicum* leaf. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 108-113.
- Lin, L., Lesnick, T.G., Maraganore, D.M., and Isacson, O. 2009. Axon guidance and

- synaptic maintenance: preclinical markers for neurodegenerative disease and therapeutics. *Trends Neurosci.* 32(3): 142-149.
- Liu, N., Wang, H., Liu, M., Gu, Q., Zheng, W., and Huang, Y. 2009. *Streptomyces alni* sp. nov., a daidzein-producing endophyte isolated from a root of *Alnus nepalensis* D. Don. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 254-258.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J-S. Senthilkumar, M., Lee, K. C. and Sundaram, S. 2010. *Leifsonia soli* sp. nov., a yellow-pigmented actinobacterium isolated from teak rhizosphere soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1322-1327.
- Mak, N.K., Li, W.K., Zhang, M., Wong, R.N.S., Tai, L.S., Yung, K.K.L., and Leung, H.W. 2000. Effect of euxanthone on neuronal differentiation. *Life Sci.* 66(4): 347-354.
- Qin, S., Li, J., Zhao, G. Z. Chen, H. H., Xu, L. H. and Li, W. J. 2008. *Saccharopolyspora endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the root of *Maytenus austroyunnanensis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 352-357.
- Song, G. C., Yasir, M., Bibi, F., Chung, E. J., Jeon, C. O. and Chung, Y. R. 2011. *Nocardioides caricicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from a halophyte, *Carex scabrifolia* Steud. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 105-109.
- Tadtong, S., Meksuriyen, D., Tanasupawat, S., Isobe, M., and Suwanborirux, K. 2007. Geldanamycin Derivatives and Neuroprotective Effect on Cultured P19-derived Neurons. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17(10): 2939-2943.
- Thamchaipenet, A., Indananda, C., Bunyoo, C., Duangmal, K., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2010. *Actinoallomurus acaciae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 554-559
- Wang, Z.J., Nie, B.M., Chen, H.Z., and Lu, Y. 2006. Panaxynol induces neurite outgrowth in PC12D cells via cAMP- and MAP kinase-dependent mechanisms. *Chem. Biol. Interact.* 159:58-64.
- Yang, Y.J., Lee, H.J., Choi, D.H., Huang, H.S., Lim, S.C., and Lee, M.K. 2008. Effect of scoparone on neurite outgrowth in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 440: 14-18.
- Zhang, W.K., Xu, J.K., Zhang, X.Q., Yao, X.S., and Ye, W.C. 2007. Sphingolipids with neuritogenic activity from *Euphorbia sororia*. *Chem. Phys. Lipids* 148: 77-83.

ผลผลิตจากงานวิจัย (Output)

บทความวิจัย

1. Nantawan Niemhom, Chanikul Chutrakul, Chanwit Suriyachadkun, and Chitti Thawai. 2015. *Phytohabitans kaempferae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the leaf of *Kaempferia larsenii*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (Revised) (Impact factor = 2.55)

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
Phytohabitans kaempferae sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the
leaf of Kaempferia larsenii
--Manuscript Draft--

Manuscript Number: IJSEM-D-15-00913

Full Title: *Phytohabitans kaempferae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the leaf of *Kaempferia larsenii*

Short Title: *Phytohabitans kaempferae* sp. nov.

Article Type: Note

Section/Category: New taxa - Actinobacteria

Keywords: *Phytohabitans*; endophytic actinomycete; *Kaempferia larsenii*

Corresponding Author: Chitti Thawai, Asst. Prof. Dr.
King Mongkuts Institute of Technology Ladkrabang
Bangkok, THAILAND

First Author: Nantawan Niemhom

Order of Authors: Nantawan Niemhom
Chanikul Chutrakul, Ph.D.
Chanwit Suriyachadkun, Ph.D.
Chitti Thawai, Asst. Prof. Dr.

Manuscript Region of Origin: THAILAND

Abstract: A novel endophytic actinomycete, designated strain KK1-3T, which formed single spore and long chains spores (more than 10 spores) was isolated from surface-sterilized *Kaempferia larsenii* leaf collected from Ubon Ratchathani province, Thailand. The isolate contained meso-diaminopimelic acid and hydroxyl diaminopimelic acid in the cell-wall peptidoglycan. The whole-cell sugars contained glucose, mannose, rhamnose, ribose and xylose. The characteristic phospholipids were phosphatidylethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine, phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol and phosphatidylinositol mannosides. The predominant menaquinone were MK-10(H8), MK-10(H6) and MK-10(H4). The predominant cellular fatty acids were anteiso-C17:0 and iso-C16:0. The G+C content of the genomic DNA was 71 mol%. Phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequences revealed that strain KK1-3T should be classified in the genus *Phytohabitans*. The similarity value of sequences between this strain and the closely related species, *Phytohabitans houttuyniae* BCC 48147T (99.04%), *Phytohabitans suffuscus* DSM 45306T (98.97%), *Phytohabitans flavus* NBRC 107702T (98.62%) and *Phytohabitans rumicis* BCC 48146T (98.14%). The DNA-DNA hybridization result and some physiological and biochemical properties indicated that strain KK1-3T could be readily distinguished from its closest phylogenetic relatives. On the basis of these phenotypic and genotypic data, this strain represents a novel species, for which the name *Phytohabitans kaempferae* sp. nov. is proposed. The type strain is strain KK1-3T (=BCC 66360T =NBRC 110005T).

1 ***Phytohabitans kaempferae* sp. nov., an endophytic actinomycete**
2 **isolated from the leaf of *Kaempferia larsenii***

3 Nantawan Niemhom,¹ Chanikul Chutrakul,² Chanwit Suriyachadkun,³
4 and Chitti Thawai^{1,4}

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

8 ² Bioassay Laboratory, Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic
9 Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology
10 Development Agency (NSTDA), 113 Thailand Science Park, Phahonyothin Road,
11 Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

12 ³BIOTEC Culture Collection, Bioresources Technology Unit, National Center for
13 Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology
14 Development Agency (NSTDA), 113 Thailand Science Park, Phahonyothin Road,
15 Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

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

18
19 **Correspondence**

20 Chitti Thawai

21 ktchitti@kmitl.ac.th

22

The DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain KK1-3^T is LC031774.

23

24 A novel endophytic actinomycete, designated strain KK1-3^T, which formed single
25 spore and long chains spores (more than 10 spores) was isolated from surface-
26 sterilized *Kaempferia larsenii* leaf collected from Ubon Ratchathani province,
27 Thailand. The isolate contained *meso*-diaminopimelic acid and hydroxyl
28 diaminopimelic acid in the cell-wall peptidoglycan. The whole-cell sugars contained
29 glucose, mannose, rhamnose, ribose and xylose. The characteristic phospholipids
30 were phosphatidylethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine,
31 phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol, phosphatidylinositol and
32 phosphatidylinositol mannosides. The predominant menaquinone were MK-10(H₈),
33 MK-10(H₆) and MK-10(H₄). The predominant cellular fatty acids were anteiso-C_{17:0}
34 and iso-C_{16:0}. The G+C content of the genomic DNA was 71 mol%. Phylogenetic
35 analysis using 16S rRNA gene sequences revealed that strain KK1-3^T should be
36 classified in the genus *Phytohabitans*. The similarity value of sequences between this
37 strain and the closely related species, *Phytohabitans houttuyniae* BCC 48147^T
38 (99.04%), *Phytohabitans suffuscus* DSM 45306^T (98.97%), *Phytohabitans flavus*
39 NBRC 107702^T (98.62%) and *Phytohabitans rumicis* BCC 48146^T (98.14%). The
40 DNA-DNA hybridization result and some physiological and biochemical properties
41 indicated that strain KK1-3^T could be readily distinguished from its closest
42 phylogenetic relatives. On the basis of these phenotypic and genotypic data, this strain
43 represents a novel species, for which the name *Phytohabitans kaempferiae* sp. nov. is
44 proposed. The type strain is strain KK1-3^T (=BCC 66360^T =NBRC 110005^T).

45

46

47 Genus *Phytohabitans* (Inahashi *et al.*, 2010) is an actinomycete that belongs to the
48 family *Micromonosporaceae*. *Phytohabitans suffuscus*, the type species of the genus
49 *Phytohabitans*, was first isolated from the root tissue of orchid and reported as an
50 endophytic actinomycete. After that, the others three new species of the genus
51 *Phytohabitans*, *Phytohabitans flavus*, *Phytohabitans rumicis* and *Phytohabitans*
52 *houttuyniae* were subsequently reported by the same scientist (Inahashi *et al.*, 2012).
53 These three latter species were isolated from the tissue of the root of orchid *Rumex*
54 *acetosa* and *Houttuynia cordata*, respectively. All members of the genus
55 *Phytohabitans* produced branched and not fragmented mycelia with single spore
56 and/or long chains spores (more than 10 spores) directly on their substrate mycelia. D-
57 glutamic acid, glycine, D-alanine, *meso*-diaminopimelic acid and L-lysine are
58 detected as the cell wall peptidoglycan. Galactose, glucose, mannose, ribose and
59 xylose are found in the whole-cell sugars. The acyl type of the peptidoglycan is
60 glycolyl. Phosphatidylethanolamine is the characteristic phospholipid in the cell
61 membrane. Major menaquinones are menaquinones are MK-9(H₆), MK-9(H₈), MK-
62 10(H₄), MK-10(H₆) and/or MK-10(H₈). The range of G+C content of the genomic
63 DNA is 71- 73 mol% (Inahashi *et al.*, 2010 & Inahashi *et al.*, 2012). During
64 investigation of novel endophytic actinomycetes from Zingiberous plant in Thailand,
65 we successfully isolated an endophytic actinomycete strain, designated KK1-3^T,
66 showing morphological and chemotaxonomic characteristics typical of members of
67 the genus *Phytohabitans* but distinguishable from all recognized *Phytohabitans*
68 species by genotypic and phenotypic properties. In this time, we describe the
69 taxonomic characterization of strain KK1-3^T and describe it as a novel species of the
70 genus *Phytohabitans*.

72 Strain KK1-3^T was isolated from a leaf of *Kaempferia larsenii* collected from Ubon
73 Ratchathani province, Thailand. Briefly, a healthy leaf sample of this plant was
74 washed in running tap water for 5 min to eliminate dirt and then a leaf was cut into
75 small pieces. After cutting, the sample was rinsed in sterile 0.1% tween 20 for 30 sec
76 follow by washing in sterile distilled water for two times. The surface-sterilization
77 was carried out by soaking the sample in 95% ethanol for 10 min and subsequently
78 with 1% sodium hypochlorite for 10 min and then washing in sterile distilled water
79 for three times. Finally, the surface-sterilized sample was ground with small amount
80 of sterile distilled water, and the suspension was spread on starch casein agar (SCA)
81 [10 g soluble starch, 2 g KNO₃, 0.3 g casein, 2 g K₂HPO₄, 0.05 g MgSO₄.7H₂O, 2 g
82 NaCl, 0.02 g CaCO₃, 0.01 g FeSO₄.7H₂O, 15 g agar, 1000 ml distilled water, pH: 7.0]
83 supplemented with 25 mg l⁻¹ nalidixic acid, 50 mg l⁻¹ nystatin and 1 mg l⁻¹ terbinafin
84 and incubated at 30°C for 30 days. The final washing water was spread on SCA as the
85 control plates. The pure culture was preserved by freezing at -80 °C and freeze-drying.

86

87 Strain KK1-3^T was cultivated on soil extract agar plate at 30°C for 30 days. The plate
88 were morphologically observed using light and scanning electron microscopy (model
89 JSM-5410 LV; JEOL). The scanning electron microscopic samples were prepared by
90 the method of Thawai *et al.*, 2005.

91

92 Strain KK1-3^T grew well on ISP 2, ISP 3, ISP 6 and nutrient agar, moderately on ISP
93 4, ISP 5 and ISP 7, weakly on czapek's sucrose agar and glucose-asparagine agar. The
94 colour of substrate hyphae on these media was strong orange yellow to brilliant
95 greenish yellow. White aerial hyphae were observed on ISP 7 and czapek's sucrose
96 agar. Pale yellow soluble pigment was produced when strain was cultivated on ISP2

97 agar medium. Strain KK1-3^T formed both single and long chain spores (more than 10
98 spores) on soil extract agar at 30 °C for 30 days (Fig. 1). These morphological data
99 were similar to those reports of Inahashi *et al.*, 2010 and Inahashi *et al.*, 2012.

100

101 Cultural characteristics were tested on several standard media such as International
102 *Streptomyces* Project 2-7 media (ISP2-7 media) (Shirling and Gottlieb, 1966)
103 including glucose-asparagine agar, czapek's sucrose agar and nutrient agar at 30 °C
104 for 14 days. The colour of colonies was determined using the ISCC–NBS Colour
105 Charts standard sample no. 2106 (Kelly, 1964). The hydrolysis of various compounds
106 was examined using the basal medium recommended by Gordon *et al.* (1974). The
107 range of temperature for growth (25, 30, 37, 40, 45 and 50 °C) was performed on yeast
108 extract-malt extract agar [(International *Streptomyces* Project, ISP 2 medium);
109 Shirling & Gottlieb, 1966] for 14 days. The NaCl (0-5% w/v) tolerances were
110 determined on ISP 2 medium at 30 °C for 14 days. The pH (4-10) range for growth
111 was carried out using buffer system described by Xu *et al.* (2005). Carbon source
112 utilization was done using ISP 9 medium (Shirling & Gottlieb, 1966) supplemented
113 with a final concentration of 1% of the carbon sources. Gelatin liquefaction,
114 peptonization of milk, reduction of nitrate and hydrolysis of starch were examined
115 through cultivation on various media described previously (Arai, 1975; Williams &
116 Cross, 1971). The results of cultural, physiological and biochemical characteristics are
117 given in detail in the species description and Table 1.

118

119 Dried cell used for chemotaxonomic analyses were obtained from cultures grown in
120 yeast extract-malt extract broth on a rotary shaker (200 rpm) at 30 °C for 5 days. Cell
121 wall peptidoglycan was prepared and hydrolyzed by the methods of Kawamoto *et al.*

122 (1981), and the isomer of diaminopimelic acid was examined using one-dimensional
123 thin-layer chromatography (Lechevalier & Lechevalier, 1980). The type of acyl group
124 in muramic acid of the peptidoglycan was performed by the method of Uchida & Aida
125 (1984). The reducing sugars from whole-cell hydrolysates were analyzed by the
126 cellulose TLC method of Komagata & Suzuki (1987). Phospholipids in cells were
127 extracted and analyzed according to the methods previously described (Minnikin *et*
128 *al.*, 1984). Cellular fatty acid analysis was performed using GLC according to the
129 instructions of the Microbial Identification System (MIDI) Sherlock version 6.0
130 (Sasser, 1990; Kämpfer & Kroppenstedt, 1996) with the TSBA6 MIDI database.
131 Mycolic acids were investigated using the method of Minnikin *et al.* (1975).
132 Menaquinones were extracted by the method described previously (Collins *et al.*,
133 1977) and analyzed using HPLC equipped with a Cosmosil 5C₁₈ column (4.6 × 150
134 mm; Nacalai Tesque). A mixture of methanol and 2-propanol (2:1, v/v) was used as
135 the elution solvent. The G+C content of the DNA was conducted using the HPLC
136 method of Tamaoka & Komagata (1984). Lambda DNA (Invitrogen, USA) was used
137 as the standard.

138

139 Chemotaxonomic characteristics of strain KK1-3^T were consistent to those of
140 members of the genus *Phytohabitans* (Inahashi *et al.*, 2012). Cell wall of this strain
141 consisted of D-glutamic acid, D-glycine, D-alanine, *meso*-diaminopimelic acid,
142 hydroxydiaminopimelic acid and L-lysine. Glycolyl was the acyl type of cell wall
143 peptidoglycan. Glucose, mannose, rhamnose ribose and xylose were found as the
144 reducing sugars in whole-cell hydrolysates. The major menaquinone was MK-10(H₈)
145 (46.2%), MK-10(H₆) (41.4%) and MK-10(H₄) (12.4%). In this study, we found that
146 anteiso-C_{17:0}, iso-C_{16:0}, anteiso-C_{17:1}, C_{18:0} and iso-C_{16:1} were major cellular fatty acids

147 ($\geq 5\%$) component in cell (Supplementary Table S1). Mycolic acids were absent. The
148 diagnostic phospholipids were diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol,
149 phosphatidylethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine, phosphatidylinositol,
150 phosphatidylinositol mannosides, six unidentified phospholipids and one unidentified
151 lipid (Supplementary Fig. S1). The G+C content (mol%) of the genomic DNA was
152 71%.

153

154 Chromosomal DNA was isolated from cells grown in yeast extract-malt extract broth
155 according to the method of Tamaoka (1994). DNA–DNA hybridization was carried
156 out in microdilution-well plates, as reported by Ezaki *et al.* (1989). DNA–DNA
157 relatedness (%) was determined by using the colorimetric method (Verlander, 1992).
158 The 16S rRNA gene was amplified using the universal primer, 27F (5'-
159 AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-
160 TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). The temperature profile for
161 PCR was as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min; 40 cycles of 94 °C for 30
162 s, 56 °C for 30 s and 72 °C for 90 s; and final extension at 72 °C for 5 min. The PCR
163 products were sequenced using universal primers 27F (5'-
164 GTTGTGATCCTGGCTCAG-3'), 350F (5'-TACGGGAGGCAGCAG-3'), 780F (5'-
165 GATTAGATACCCTGGTAG-3'), 1100F (5'-GCAACGAGCGCAACCC-3'), 350R
166 (5'-CTGCTGCCTCCCGTAG-3'), 780R (5'-CTACCAGGGTATCTAATCC-3') and
167 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). The nearly complete of
168 16S rRNA gene sequence of this strain was pairwise aligned using the EzTaxon-e
169 database (Kim *et al.*, 2012). Partial sequences of the 16S rRNA genes of recognized
170 species of the genus *Phytohabitans* were obtained from the GenBank/EMBL/DDBJ
171 databases for multiple alignment analyses using the CLUSTALW program, version

172 1.81 (Thompson *et al.*, 1994). The alignment was manually corrected prior to the
173 construction of a phylogenetic tree. The phylogenetic tree was conducted using the
174 neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) with genetic distances computed by using
175 Kimura's 2-parameter model (Kimura, 1980), maximum parsimony (Fitch, 1972) and
176 maximum-likelihood (Felsenstien, 1981) methods in the MEGA 6 software (Tamura
177 *et al.*, 2013). The confidence values for the clusters were calculated using bootstrap
178 analysis (Felsenstein, 1985) with 1,000 resamplings. The values for sequence
179 similarity among all recognized *Phytohabitans* species were determined using the
180 EzTaxon-e database (Kim *et al.*, 2012).

181

182 In order to determine the genotypic properties of strain KK1-3^T, an almost complete
183 16S rRNA gene sequence (1,485 nt) was analyzed. This result showed that strain
184 KK1-3^T belongs to family *Micromonosporaceae* and was a member of the genus
185 *Phytohabitans*. The strain formed a clade with *Phytohabitans houttuyniae* K11-0057^T
186 with moderate bootstrap value (72%) in neighbour-joining tree (Fig. 2). This
187 taxonomic position in phylogenetic tree was supported by the standard tree-making
188 methods, maximum-likelihood (Supplementary Fig. S2) and maximum-parsimony
189 methods (Supplementary Fig. S3). Strain KK1-3^T showed the highest 16S rRNA gene
190 sequence similarity values to *Phytohabitans houttuyniae* BCC 48147^T (99.04%)
191 followed by *Phytohabitans suffuscus* DSM 45306^T (98.97%), *Phytohabitans flavus*
192 NBRC 107702^T (98.62%) and *Phytohabitans rumicis* BCC 48146^T (98.14%). On
193 basis of the morphological, chemotaxonomic and phylogenetic properties, this strain
194 should be judged as a member of the genus *Phytohabitans* and may present a novel
195 species of this genus (Inahashi *et al.*, 2012).

196

197 The phenotypic characteristics and DNA-DNA hybridization experiment of strain
198 KK1-3^T was also determined. Four reference strains of the genus *Phytohabitans*,
199 *Phytohabitans houttuyniae* BCC 48147^T, *Phytohabitans suffuscus* DSM 45306^T,
200 *Phytohabitans flavus* NBRC 107702^T and *Phytohabitans rumicis* BCC 48146^T were
201 selected to compare for these characteristics because of their close phylogenetic
202 relationship with strain KK1-3^T. Distinct phenotypic characteristics between strain
203 KK1-3^T and all closed relatives are shown in Table 1. These results potentially
204 indicate that strain KK1-3^T possesses some distinct characteristics that separate it
205 from other closed related species, *P. houttuyniae* BCC 48147^T, *P. suffuscus* DSM
206 45306^T, *P. flavus* NBRC 107702^T and *P. rumicis* BCC 48146^T. In particular, the type
207 strains of genus *Phytohabitans* contained phosphatidylethanolamine as the diagnostic
208 phospholipid in their cell membrane but strain KK1-3^T presented both of
209 phosphatidylmethylethanolamine and phosphatidylethanolamine in its membrane.
210 Additionally, the ability to reduce nitrate to nitrite, the ability to liquefy gelatin, the
211 maximum NaCl and temperature for growth, the utilization of D-fructose, D-
212 galactose, D-ribose, D-salicin, glycerol, lactose and mannitol are the phenotypic
213 evidences for discrimination between strain KK1-3^T and the closely related species.
214 Furthermore, the DNA relatedness values between strain KK1-3^T and the closely
215 related species, *P. houttuyniae* BCC 48147^T, *P. suffuscus* DSM 45306^T, *P. flavus*
216 NBRC 107702^T and *P. rumicis* BCC 48146^T range from 14.7 ± 4.1% -38.1 ± 0.9%,
217 which is well below 70% cut-off point recommended for the assignment of bacterial
218 strains to the same genomic species (Wayne *et al.*, 1987) (Supplementary Table S2).
219
220 From the phenotypic, chemotaxonomic and genotypic data of strain KK1-3^T
221 mentioned above, it can be distinguished from all recognize *Phytohabitans* species,

222 which supports its classification as a new species of the genus *Phytohabitans*, for
223 which the name *Phytohabitans kaempfereae* is proposed. The type strain is strain
224 KK1-3^T (=BCC 66360^T =NBRC 110005^T).

225

226 **Description of *Phytohabitans kaempfereae* sp. nov.**

227 *Phytohabitans kaempfereae* [ka.emp.fe.re'ae. N.L. gen. n. *kaempfereae* of
228 *Kaempferia*, referring to the generic name of *Kaempferia larsenii* which the strain is
229 isolated].

230

231 Gram-staining-positive, mesophilic actinomycete that forms single spores and long
232 chain spores. The surface of spores is smooth. Pale yellow soluble pigment is
233 produced in ISP2 medium. Utilizes D-cellobiose, D-glucose, D-mannose, D-xylose,
234 L-arabinose, L-rhamnose and sucrose as sole carbon sources, weakly utilizes D-
235 fructose, D-galactose, and lactose, but not D-melibiose, D-ribose, D-salicin, glycerol,
236 mannitol and *myo*-inositol. Peptonization of milk and hydrolysis of starch are
237 positive. Gelatin liquefaction and nitrate reduction are negative. Optimal temperature
238 for growth is between 30-37°C. Maximum temperature for growth is 40°C. The
239 maximum NaCl concentration for growth is 3% (w/v). The pH range for growth is 6-
240 10. The cell wall peptidoglycan contains D-glutamic acid, D-glycine, D-alanine,
241 *meso*-diaminopimelic acid, hydroxydiaminopimelic acid and L-lysine. The acyl type
242 of the cell wall is glycolyl. The predominant menaquinones is MK-10(H₈), MK-
243 10(H₆) and MK-10(H₄). The characteristic whole-cell sugars are glucose, mannose,
244 rhamnose, ribose and xylose. The phospholipid profile contains
245 diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine,
246 phosphatidylmethylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylinositol

247 mannosides, six unidentified phospholipids and one unidentified lipid but
248 phosphatidylcholine is not detected. The fatty acid pattern consists of anteiso-C_{17:0}
249 (32.2%), iso-C_{16:0} (31.4%), anteiso-C_{17:1} (5.7%), C_{18:0} (5.3%), iso-C_{16:1} (5.0%), C_{18:1}
250 ω_{9c} (3.5%), iso-C_{17:0} (3.1%), anteiso-C_{15:0} (2.7%), iso-C_{15:0} (2.5%), iso-C_{18:0} (2.0%),
251 C_{16:1} 2OH (1.9%), C_{16:0} (1.0%), C_{17:0} (0.7%), iso-C_{14:0} (0.7%), C_{17:1} ω_{8c} (0.5%),
252 anteiso-C_{19:0} (0.5%), C_{19:0} (0.2%), 10-methyl C_{17:0} (0.2%), C_{14:0} (0.1%) and C_{18:1} ω_{5c}
253 (0.1%). Mycolic acids are absent. The G+C content of the DNA is 71 mol%. The type
254 strain is KK1-3^T (=BCC 66360^T =NBRC 110005^T), which was isolated from the leaf
255 of *Kaempferia larsenii* collected from Ubon Ratchathani province, Thailand.

256

257 **Acknowledgments**

258 The authors gratefully acknowledge the financial support from Thailand Graduate
259 Institute of Science and Technology (TGIST) to Nantawan Niemhom (TG-22-22-55-
260 004D) and National Science and Technology Development Agency (NSTDA). This
261 study was supported in part by Department of Biology and Actinobacterial Research
262 Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology, Ladkrabang,
263 Bangkok, Thailand. We thank Mrs. Pornpit Sriboran for helping to collect the plant
264 samples and also thank to the Biological Resource Center, National Institute of
265 Technology and Evaluation, Kisarazu, Chiba, Japan for cellular fatty acid analysis.

266

267 **References**

- 268 **Arai, T. (1975).** *Culture Media for Actinomycetes*. Tokyo: The Society for
269 Actinomycetes Japan.
- 270 **Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. (1977).** Distribution
271 of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* **100**, 221-230.

- 272 **Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989).** Fluorometric deoxyribonucleic
273 acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to
274 membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic
275 relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 224-229.
- 276 **Felsenstein, J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum
277 likelihood approach. *J Mol Evol* **17**, 368-376.
- 278 **Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the
279 bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- 280 **Fitch, W. M. (1972).** Toward defining the course of evolution: minimum change for a
281 species tree topology. *Sys Zoo* **20**, 406-416.
- 282 **Gordon, R. E., Barnett, D. A., Handerhan, J. E. & Pang, C. H. N. (1974).**
283 *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *Int J Syst*
284 *Bacteriol* **24**, 54-63.
- 285 **Inahashi, Y., Matsumoto, A., Danbara, H., Omura, S., & Takahashi, Y. (2010).**
286 *Phytohabitans suffuscus* gen. nov., sp. nov., an actinomycete of the family
287 *Micromonosporaceae* isolated from plant roots. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2652-
288 2658.
- 289 **Inahashi, Y., Matsumoto, A., Omura, S., & Takahashi, Y. (2012).** *Phytohabitans*
290 *flavus* sp. nov., *Phytohabitans rumicis* sp. nov. and *Phytohabitans houttuyniae* sp.
291 nov., isolated from plant roots, and emended description of the genus *Phytohabitans*.
292 *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 2717-2723.
- 293 **Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996).** Numerical analysis of fatty acid
294 patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* **42**, 989-1005.

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

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

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

305 **Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base
306 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**,
307 111-120.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

331 **Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984).** Determination of DNA base composition by
332 reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* **25**,
333 25-128.

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

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

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

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

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

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

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

354 **Xu, P., Li, W. J., Tang, S. K., Zhang, T. Q., Chen, G. Z., Chen, H. H., Xu, L. H.,**
355 **Jiang, C. L. (2005).** *Naxibacter alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., a novel member of
356 the family ‘*Oxalobacteraceae*’ isolated from China. *Int J Syst Evol Microbiol*
357 **55**,1149–1153.

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369 **Figure legend**

370

371 **Fig. 1.** scanning electron micrograph of strain KK1-3^T grown on soil extract agar for
372 30 days at 30°C. (a) Single spores; bar, 5 µm. (b) Spore chains; bar, 5 µm.

373 **Fig. 2.** Neighbour-joining tree (Saitou & Nei, 1987) based on almost-complete 16S
374 rRNA gene sequences (1,485 nt) showing the relationships between strain KK1-3^T,
375 the *Phytohabitans* species with validly-published names and members of the genera
376 *Asanoa*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium* and *Jishengella*. *Streptomyces*
377 *ambofaciens* was used as an outgroup. Asterisks (*) indicating the branches of the tree
378 that were also found using the maximum-parsimony and maximum-likelihood
379 methods; hashes (#) indicating the branches of the tree that were found in the
380 maximum-parsimony methods; and crosses (x) indicating the branches of the tree that
381 were found in the maximum-likelihood methods. The numbers on the branches
382 indicate the percentage bootstrap values of 1,000 replicates; only values ≥50% are
383 indicated. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

384 **Table 1.** Differential characteristics of strain KK1-3^T and all type strains of
385 *Phytohabitans* species.

386 *Data for the reference species were taken from Inahashi *et al.* (2010, 2012). All other
387 phenotypic data were determined in this study. +, Positive; -, Negative; w, Weakly
388 reaction; Ara, Arabinose; Glu, glucose; Gal, galactose; Man, mannose; Rha,
389 rhamnose; Rib, ribose; Xyl, xylose.

390

391

392

393

394

395 **Supplementary Fig. S1** Polar lipid appearing on a two-dimensional thin-layer
396 chromatograms of strain KK1-3^T.

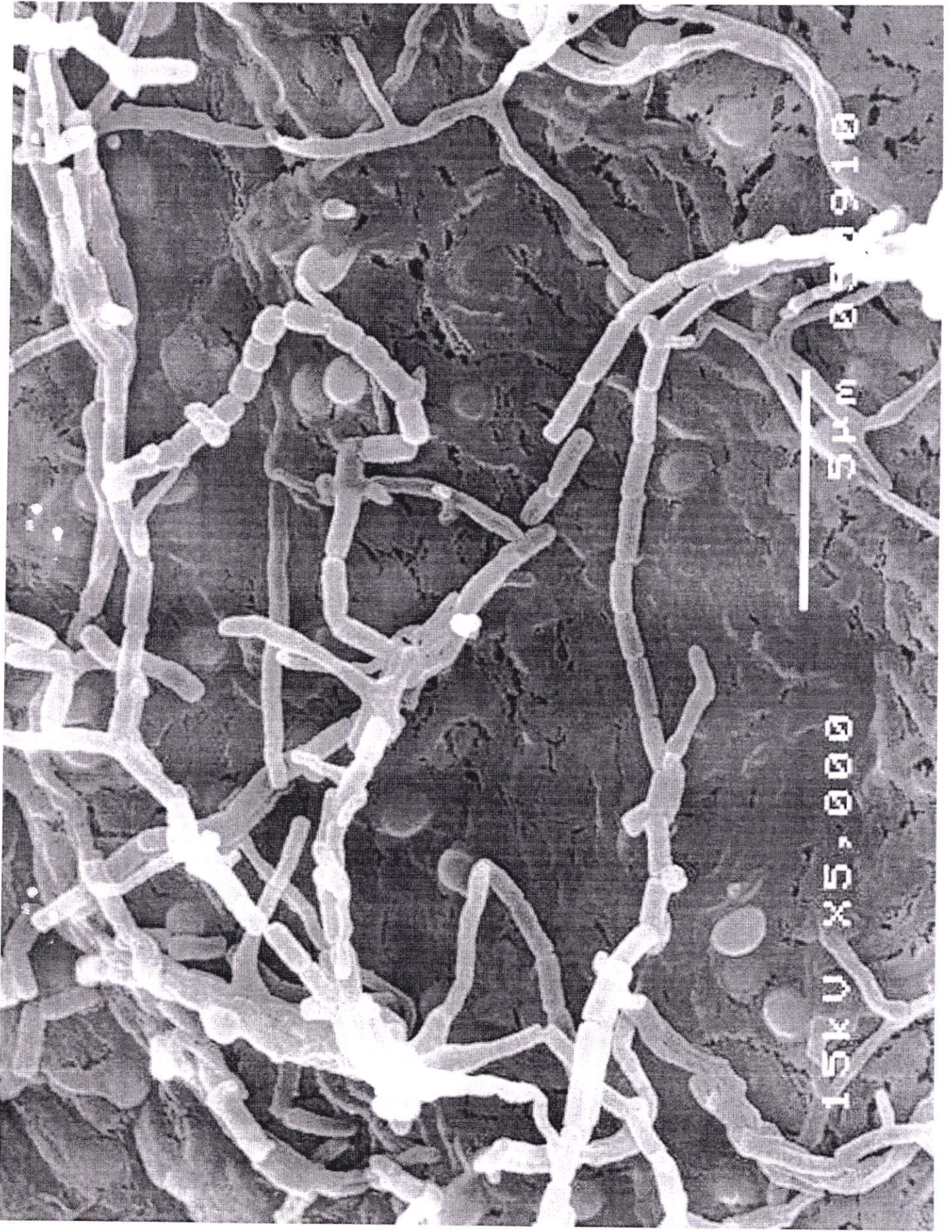
397 (A) Phosphomolybdic acid's TLC chromatogram; (B) Dittmer & Lester's TLC
398 chromatogram; (C) Anisaldehyde's TLC chromatogram; (D) Ninhydrin's TLC
399 chromatogram; (E) Dragendrof's TLC chromatogram; Abbreviation: DPG,
400 diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PME,
401 phosphatidylmethylethanolamine; PE, phosphatidylethanolamine; PI,
402 phosphatidylinositol; PIMs, phosphatidylinositol mannosides; PL, phospholipid; L,
403 lipid.

404 **Supplementary Fig. S2** Phylogenetic tree based on the nearly complete 16S rRNA
405 gene sequences of strain KK1-3^T and other genera of the family
406 *Micromonosporaceae*. The tree was reconstructed with the maximum-likelihood
407 method. *Streptomyces ambofaciens* was used as an outgroup. Numbers on branches
408 represent the bootstrap values as the percentage of 1000 replicates. Only values >
409 50% are shown. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

410 **Supplementary Fig. S3** Phylogenetic tree based on the nearly complete 16S rRNA
411 gene sequences of strain KK1-3^T and other genera of the family
412 *Micromonosporaceae*. The tree was reconstructed with the maximum-parsimony
413 method. *Streptomyces ambofaciens* was used as an outgroup. Numbers on branches
414 represent the bootstrap values as the percentage of 1000 replicates. Only values >
415 50% are shown.

416 **Supplementary Table S1.** Cellular fatty acid compositions of strain KK1-3^T
417 Cultures were grown in yeast extract-malt extract broth (ISP 2) on a rotary shaker
418 (200 rpm) at 30°C for 5 days.

419 **Supplementary Table S2.** DNA–DNA relatedness among the strain KK1-3^T and all
420 type strains of *Phytohabitans* species.
421
422

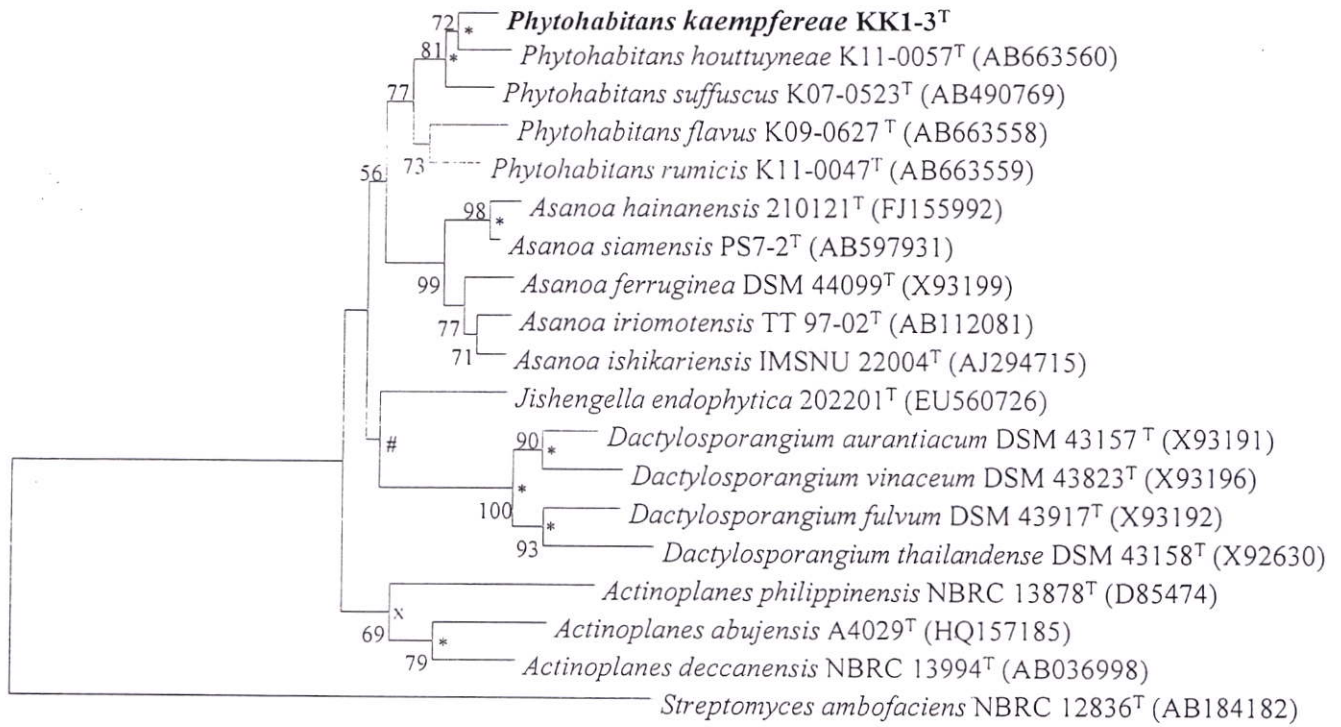


0161500 W15
5µm

000-5X-000
15KV X5.000

Figure 1 (B) SEM pic of KK1-3





0.01

Table 1. Differential characteristics of strain KK1-3^T and all type strains of *Phytolabidans* species.

*Data for the reference species were taken from Inahashi *et al.* (2010, 2012). All other phenotypic data were determined in this study +, Positive; -, Negative; w, Weakly reaction; Ara, Arabinose; Glu, glucose; Gal, galactose; Man, mannose; Rha, rhamnose; Rib, ribose; Xyl, xylose.

Characteristics	Strain KK1-3 ^T	<i>P. houttuyniae</i> BCC 48147 ^T	<i>P. suffuscus</i> DSM 45306 ^T	<i>P. flavus</i> NBRC 107702 ^T	<i>P. ruminis</i> BCC-48146 ^T
The presence of phosphatidylmethylethanolamine *	+	-	-	-	-
Whole-cell sugar*	Glu, Man, Rha, Rib, Xyl	Ara, Gal, Man, Rha, Rib, Xyl	Glu, Gal, Man, Rib, Xyl	Ara, Glu, Gal, Man, Rib, Xyl	Ara, Glu, Gal, Man, Rha, Rib, Xyl
DNA G+C content (mol%)*	71	73	73	71	72
Nitrate reduction	-	-	-	-	+
Gelatin liquefaction	-	w	w	-	w
Maximum NaCl tolerance (%w/v)	3	2	2	1	1
Maximum temperature for growth (°C)	40	40	37	30	30
Carbon utilization :					
D-Fructose	w	+	+	+	+
D-Galactose	w	+	+	w	w
D-Ribose	-	-	-	w	-
D-Salicin	-	w	-	w	-
Glycerol	-	+	+	-	+
Lactose	w	w	-	-	+
Mannitol	-	+	+	+	+

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)

Phytohabitans kaempferae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the leaf of *Kaempferia larsenii

Nantawan Niemhom,¹ Chanikul Chutrakul,² Chanwit Suriyachadkun,³ and Chitti Thawai^{1,4}

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

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

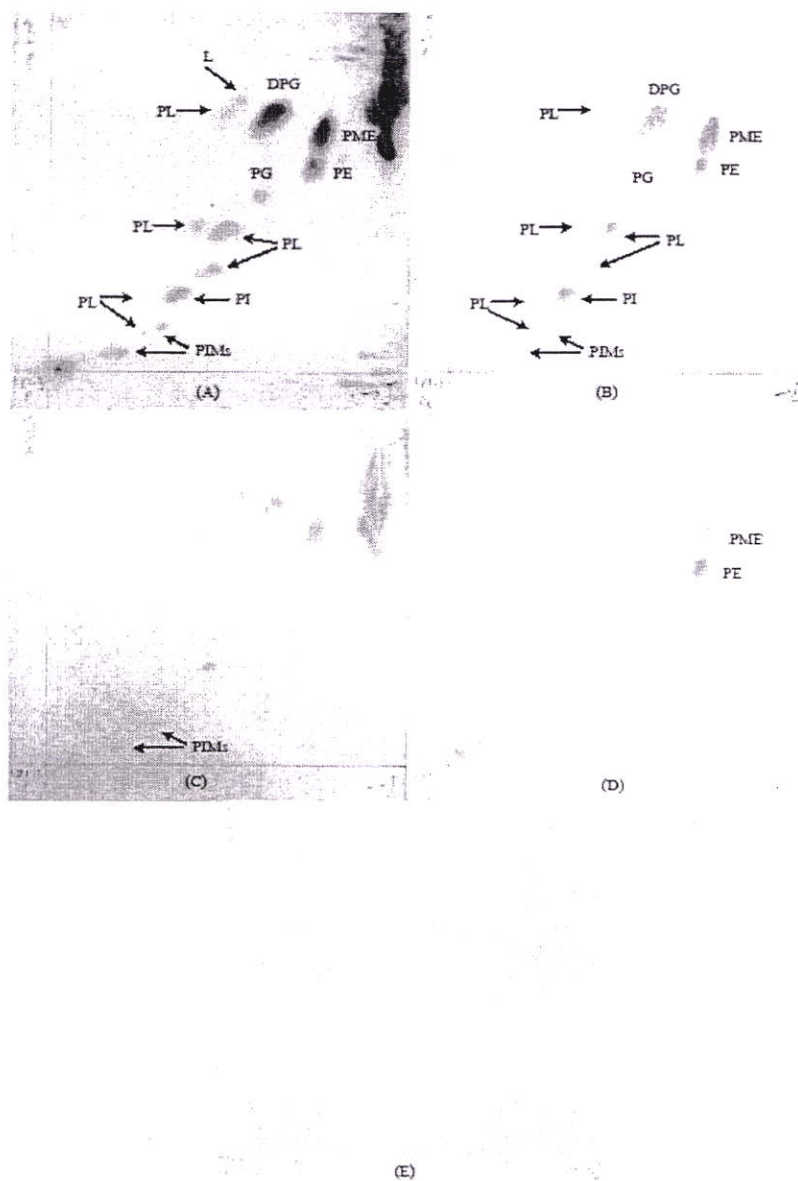
³BIOTEC Culture Collection, Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Thailand Science Park, Phahonyothin Road, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand

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

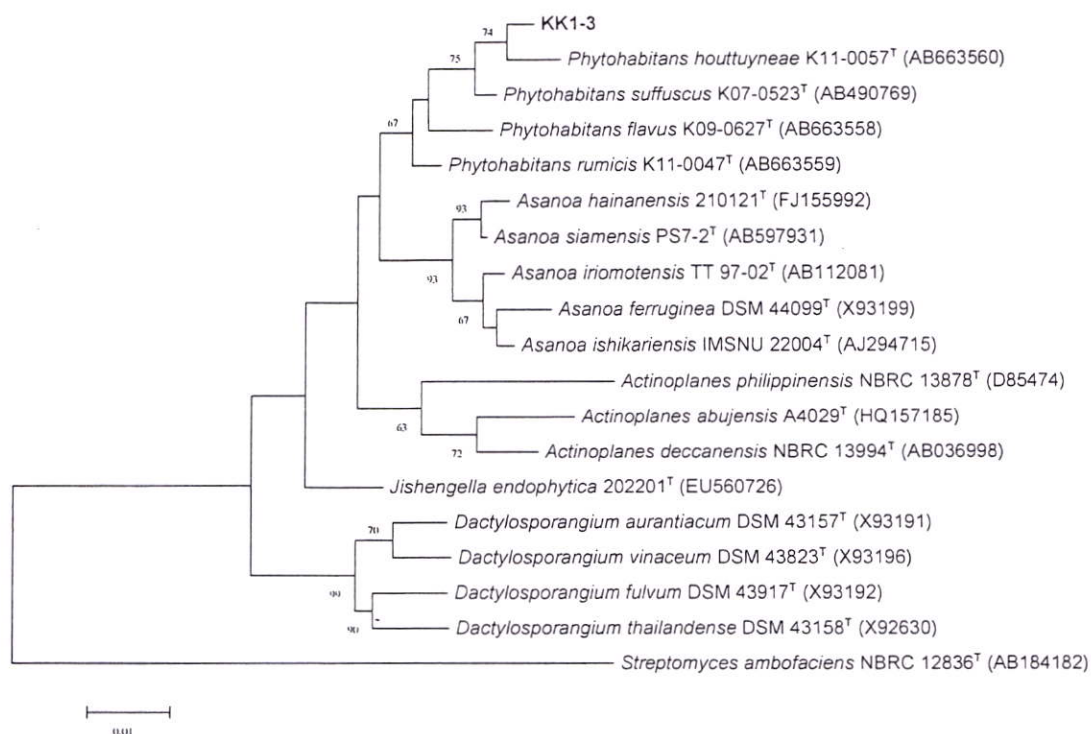
Correspondence

Chitti Thawai

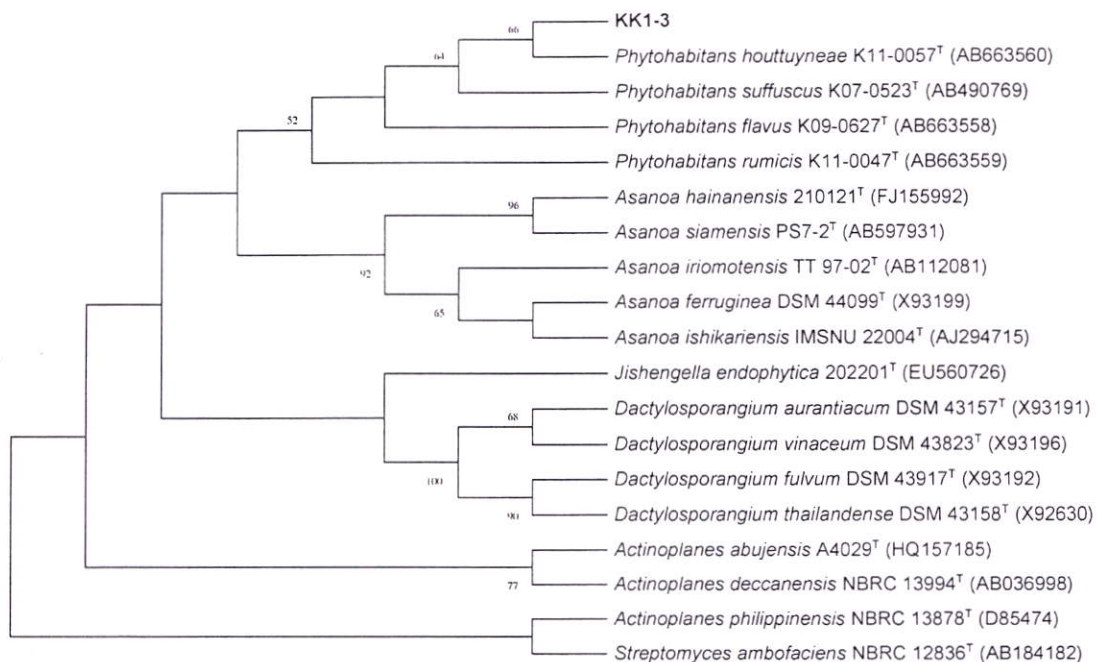
ktchitti@kmitl.ac.th



Supplementary Fig. S1 Polar lipid appearing on a two-dimensional thin-layer chromatograms of strain KK1-3^T. (A) Phosphomolybdic acid's TLC chromatogram; (B) Dittmer & Lester's TLC chromatogram; (C) Anisaldehyde's TLC chromatogram; (D) Ninhydrin's TLC chromatogram; (E) Dragendrof's TLC chromatogram; Abbreviation: DPG, diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PME, phosphatidylmethylethanolamine; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PIMs, phosphatidylinositol mannosides; PL, phospholipid; L, lipid.



Supplementary Fig. S2 Phylogenetic tree based on the nearly complete 16S rRNA gene sequences of strain KK1-3^T and other genera of the family *Micromonosporaceae*. The tree was reconstructed with the maximum-likelihood method. *Streptomyces ambofaciens* was used as an outgroup. Numbers on branches represent the bootstrap values as the percentage of 1000 replicates. Only values > 50% are shown. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.



Supplementary Fig. S3 Phylogenetic tree based on the nearly complete 16S rRNA gene sequences of strain KK1-3^T and other genera of the family *Micromonosporaceae*. The tree was reconstructed with the maximum-parsimony method. *Streptomyces ambofaciens* was used as an outgroup. Numbers on branches represent the bootstrap values as the percentage of 1000 replicates. Only values > 50% are shown.

Supplementary Table S1. Cellular fatty acid compositions of strain KK1-3^T

Cultures were grown in yeast extract-malt extract broth (ISP 2) on a rotary shaker (200 rpm) at 30°C for 5 days.

Fatty acids ^a	KK1-3 ^T
Saturated fatty acids	
C _{14:0}	0.1
C _{16:0}	1.0
C _{17:0}	0.7
C _{18:0}	5.3
C _{19:0}	0.2
Unsaturated fatty acids	
iso-C _{16:1}	5.0
C _{16:1} 2OH	1.9
C _{17:1} ω8c	0.5
C _{18:1} ω5c	0.1
C _{18:1} ω9c	3.5
Branched fatty acids	
anteiso-C _{12:0}	0.1
iso-C _{14:0}	0.7
iso-C _{15:0}	2.5
anteiso-C _{15:0}	2.7
iso-C _{16:0}	31.4
iso-C _{17:0}	3.1
anteiso-C _{17:0}	32.2
anteiso-C _{17:1}	5.7
C _{17:0} 10-methyl	0.2
iso-C _{18:0}	2.0
anteiso-C _{19:0}	0.5

^a Values are percentages of total cellular fatty acids.

Supplementary Table S2. DNA–DNA relatedness among the strain KK1-3^T and all type strains of *Phytohabitans* species.

Strains	DNA–DNA binding (%) with labelled DNA from*:				
	1	2	3	4	5
1. KK1-3 ^T	100	28.9 ± 1.5	33.3 ± 2.2	14.7 ± 4.1	20.4 ± 2.2
2. <i>P. houttuyniae</i> BCC 48147 ^T	31.4 ± 2.4	100	32.8 ± 5.4	27.3 ± 4.3	14.5 ± 1.0
3. <i>P. suffuscus</i> DSM 45306 ^T	38.1 ± 0.9	27.3 ± 1.5	100	31.3 ± 3.5	32.9 ± 3.4
4. <i>P. flavus</i> NBRC 107702 ^T	31.2 ± 0.8	23.5 ± 1.4	29.4 ± 2.9	100	25.5 ± 6.9
5. <i>P. rumicis</i> BCC 48146 ^T	22.9 ± 0.6	19.2 ± 1.1	14.3 ± 3.4	16.2 ± 5.0	100

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