

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ปกป้องแขนงประสาทของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
จากเชื้อแอคติโนมัยซีทและตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื้อที่คัดเลือก

The neuroprotection secondary metabolite of the
actinomycetes and the taxonomic position of the
selected strain

โดย

รศ.ดร. จิตติ ทาไว

คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปี 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ปกป้องแขนงประสาทของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
จากเชื้อแอคติโนมัยซีทและตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื้อที่คัดเลือก

The neuroprotection secondary metabolite of the
actinomycetes and the taxonomic position of the
selected strain

โดย

รศ.ดร. จิตติ ท้าไว

คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปี 2560

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากทุนรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
คุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

รศ.ดร. จิตติ ท่าไว

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ปกป้องประสาทของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอกติโนมัยสีทและตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื้อที่คัดเลือก
(ภาษาอังกฤษ)	The neuroprotection secondary metabolite of the Actinomycetes and the taxonomic position of the selected strain
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก	ทุนรายได้ คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปี 2560	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี	จำนวนเงิน 408,000 บาท
ผู้ดำเนินการวิจัย	เดือนตุลาคม 2559 ถึง กันยายน 2560
	รศ.ดร. จิตติ ท่าไว
	สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
โทรศัพท์	02-3298400 ต่อ 235

บทคัดย่อ

แอกติโนมัยสีทจำนวน 60 ไอโซเลต ถูกแยกได้จากตัวอย่างดินในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์ ประเทศไทย เชื้อไอโซเลตเหล่านี้ถูกนำมาจัดกลุ่มโดยลักษณะทางพีโนไทป์ เคโมไทป์ และจีโนไทป์ ได้เป็น 4 กลุ่ม จากลักษณะตำแหน่งบน phylogenetic tree ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางพีโนไทป์ของเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มแสดงว่าเชื้อเหล่านี้เป็นสมาชิกของเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* *Micromonospora* *Microbispora* และ *Pseudonocardia* การวิจัยครั้งนี้พบว่าเชื้อไอโซเลต NW8-21 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานเคมีคล้ายกับเชื้อสกุล *Pseudonocardia* แต่มีลักษณะทางจีโนไทป์และพีโนไทป์ที่แตกต่างไปจากเชื้อสปีชีส์มาตรฐานทั้งหมดที่เป็นสมาชิกในสกุล *Pseudonocardia* ดังนั้นเชื้อไอโซเลต NW8-21 จึงถูกตัดสินให้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Pseudonocardia* โดยให้ชื่อว่า *Pseudonocardia soli* นอกจากนี้ น้ำหมักที่ได้จากเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและนำไปทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์พบว่า เชื้อจำนวนมากกว่าร้อยละ 45 แสดงกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์และปกป้องเซลล์ประสาทได้เป็นอย่างดี น้ำหมักเชื้อของเชื้อตัวแทนไอโซเลต NW8-32 ถูกสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีได้สารบริสุทธิ์ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็นสารเจลดานามัยซิน (geldanamycin)

Abstract

Sixty actinomycete strains were isolated from soil samples collected in Mae Wong National Park of Nakornsawan province, Thailand. These strains were grouped using phenotypic chemotypic and genotypic characteristics into 4 groups. Phylogenetic position, chemotaxonomic analyses including some phenotypic characterisation revealed that the representative strains in each group belonged to the members of the genera *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora* and *Pseudonocardia*. Here, we found the strain NW8-21 showing morphological and chemotaxonomic characteristics typical of members of the genus *Pseudonocardia* but which was genotypically and phenotypically distinguishable from all recognized *Pseudonocardia* species. Therefore, the strains NW8-21 was judged to represent a novel species of the genus *Pseudonocardia* for which the name *Pseudonocardia soli* was proposed. Furthermore, the fermentation broths of these representative strains were extracted with ethyl acetate and were tested for anti-microbial activity. The results showed that more than 45% of actinomycete strains exhibited the anti-microbial and neuroprotective activities. Antimicrobial assay-guided fractionation of the ethyl acetate extract of representative actinomycete isolate NW8-21 yielded the known compounds, Geldanamycin.

สารบัญ

หน้า	
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ	6
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	13
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	45
เอกสารอ้างอิง	48

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PP8-1 บนอาหาร ISP2	15
2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PP8-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	16
3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต NW8-32 บนอาหาร ISP2	17
4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต NW8-32 บน phylogenetic tree (NJ method)	19
5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BW3-3 บนอาหาร ISP2	20
6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต BW3-3 บน phylogenetic tree (NJ method)	22
7 แสดงลักษณะโคโลนีการเจริญของเชื้อไอโซเลต NW8-21 บนอาหาร ISP2	23
8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต NW8-21 บน phylogenetic tree (NJ method)	24
9 ขั้นตอนการสกัดสารจากน้ำหมักของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. NW8-32	38
10 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. NW8-32	39
11 แสดงลักษณะโครงสร้างของสาร NW3-2A	40

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้	13
2 แสดงรายละเอียดการกระจายของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้	14
3 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ	25
4 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต	27
5 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอกติโนมัยสีทในแต่ละไอโซเลต	34
6 ^1H และ ^{13}C NMR spectral (in CDCl_3) ของสาร ST1-11A และ Geldanamycin	41
7 แสดงผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดจากเชื้อ actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ	42
8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ neuroprotective activity ของสารสกัดจากเชื้อ actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ	43

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC = American Type Culture Collection

B. subtilis = *Bacillus subtilis*

C. albicans = *Candida albicans*

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

E. coli = *Escherichia coli*

EtOAc = ethyl acetate

ISP = International *Streptomyces* Project

M. luteus = *Micrococcus luteus*

MHA = Mueller-Hinton Agar

nm = nanometer

NSA = Non-Streptomycete Actinomycetes

Ps. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

TSB = Tryptic soy broth

UV = Ultraviolet

μL = microlitre

MRSA = *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

ปัจจุบัน ประเทศไทยมีการตื่นตัวในการนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มาพัฒนาต่อเป็นยาหรือเภสัชภัณฑ์มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ในเรื่องของทรัพยากรธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งทรัพยากรธรรมชาติทั้งจากพืช สัตว์หรือจุลินทรีย์ ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมามากมายตั้งแต่สมัยอดีตจนถึงปัจจุบัน สำหรับจุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างยิ่งในปัจจุบัน

เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทจัดเป็นทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญเนื่องจากสามารถสร้างสารต้นแบบที่มีโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย และมีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด และจากรายงานการแยกสารจากแบคทีเรียที่ได้จากดินพบว่าสารสำคัญที่แยกได้จากมากกว่า 80% แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงยาหลายชนิดที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะมีจุดเริ่มต้นจากการศึกษาความหลากหลายและการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้นแบบจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งสิ้น ยกตัวอย่างเช่น amphotericin B gentamicin erythromycin chloramphenicol streptomycin เป็นต้น ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นแหล่งธรรมชาติอีกแหล่งหนึ่งที่มีศักยภาพในการจะนำมาศึกษาวิจัยเพื่อค้นคว้าหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปใช้เป็นสารต้นแบบในการพัฒนาใหม่ อันจะก่อให้เกิดประโยชน์มหาศาลทางด้านสาธารณสุขต่อไป จากแนวโน้มที่ประชากรกลุ่มผู้สูงอายุมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นปัญหาที่เกี่ยวกับโรคผู้สูงอายุ เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน ย่อมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งจากปัญหาดังกล่าว นำไปสู่ความพยายามที่จะค้นคว้าวิจัยหาชนิดใหม่ เพื่อให้ได้ผลการรักษาที่ดีมีประสิทธิภาพและปลอดภัยกว่าที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยแนวทางการวิจัยแนวทางหนึ่ง คือการหาชนิดใหม่จากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติทั้งจากพืช สัตว์หรือจุลินทรีย์ เพื่อนำมาใช้รักษาและบรรเทาโรคต่างๆ แอคติโนมัยซีท (actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการสร้างเส้นใย (filamentous bacteria) และสามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ ทั้งแบบที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้มสปอร์ เรียกว่า โคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) หรือโคนิเดีย (conidia) และแบบที่มีถุงหุ้มสปอร์ (sporangium) เรียกว่า สปอแรงเกอไอสปอร์ (sporangiospore) สปอร์ที่สร้างนี้ทนความร้อนได้ไม่มาก (ขึ้นอยู่กับแต่ละสกุล) แต่สามารถทนต่อความแห้งได้ดีจึงสามารถมีชีวิตรอดอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน ประโยชน์ของแอคติโนมัยซีทที่รู้จักกันดี คือความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากเชื้อแอคติโนมัยซีทถึงร้อยละ 45 เชื้อราร้อยละ 38 และแบคทีเรียชนิดอื่นร้อยละ 17 (Bérdy, 2005) เชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล Streptomyces ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ร้อยละ 70 (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีททั้งหมด รองลงมา คือ เชื้อสกุล Micromonospora ผลิตได้ร้อยละ 5 (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น เช่น Streptoverticillium Kitasatospora Actinomadura Saccharothrix Microbispora Microtetraspora Nonomurea Actinoplanes Dactylosporangium Thermomonospora Thermoactinomyces Nocardia Saccharopolyspora Amycolatopsis Kibdellosporangium Pseudonocardia Actinosporangium Streptosporangium Spirillospora

Planobispora และ Planomonospora เป็นต้น (Bérdy, 2005) จากข้อมูลดังกล่าวพบว่า การค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อ แอคติโนมัยสีทหายากสกุลอื่นๆ นั้นยังมีค่อนข้างน้อยมาก เมื่อเทียบกับเชื้อสกุล Streptomyces ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการขาดการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคในการแยกให้ได้เฉพาะเชื้อสกุลนั้นๆ รวมทั้งขาดการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อจากแหล่งธรรมชาติ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นค้นหาเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากสกุลอื่นๆ รวมทั้งสกุล Streptomyces เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ สารสำคัญที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์นอกจากแสดงฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะแล้ว ยังมีรายงานว่ายังสามารถแสดงฤทธิ์ด้านต่างๆ ด้วยเช่น สารเจลลิตานโมัยซินที่แยกจากเชื้อ Streptomyces sp. สามารถแสดงฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาทได้ที่ความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ (Tadtong et al. 2007) ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ไม่ว่าจะเป็นพันธุ์ไม้ สัตว์ หรือจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จึงมีความเป็นไปได้ว่า จุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทนั้นน่าจะมีการกระจายตัวอยู่มากในหลายพื้นที่และมีสายพันธุ์ที่หลากหลายเช่นกัน แอคติโนมัยสีท สามารถพบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ในดิน แหล่งน้ำ ทะเลและเนื้อเยื่อพืช ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการวิจัยทางด้านความหลากหลาย และอนุกรมวิธานหลายส่วน เพื่อศึกษาการแยก คัดเลือกเชื้อ และศึกษาสารทุติยภูมิที่แสดงฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยสีท ตลอดจนเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีประโยชน์จากแหล่งดังกล่าวในการนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการศึกษาและวิจัยเชิงพัฒนาต่อไป ดังนั้นการศึกษาวิจัยในโครงการนี้อาจทำให้เกิดการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทชนิดใหม่หรือสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารต้นแบบต่อการพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ ตลอดจนช่วยพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยก เพาะเลี้ยง อนุกรมวิธานและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีท อีกทั้งช่วยเพิ่มขีดความสามารถและเป็นทางเลือกของนักวิจัยไทย ในการเรียนรู้การวิจัยเกี่ยวกับการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งทรัพยากรในประเทศเพื่อเป็นการบริหารจัดการสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพอีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อแยก คัดเลือก และศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนมัยสีทจากดิน

1.2.2 เพื่อทำการเลี้ยงและสกัดสารสกัดหายากจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์แขนงประสาท

1.2.3 เพื่อทำการแยกสารออกฤทธิ์จากสารสกัดหายากออกเป็นส่วนๆ นำส่วนที่แสดงฤทธิ์มาใช้ประโยชน์ ตลอดจนทำการแยกสารบริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารที่อยู่ในส่วนที่แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุด

1.2.4 เพื่อทดสอบ ฤทธิ์ปกป้องเซลล์แขนงประสาทของสารจากแอคติโนมัยสีท

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้จะเริ่มจากการนำดินบริเวณป่าธรรมชาติที่สมบูรณ์ เช่น อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ มาทำการแยก คัดเลือก ศึกษาอนุกรมวิธาน และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยไซต์ ขอบเขตของโครงการวิจัยนี้คือ สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัย ไซต์ได้อย่างน้อย 60 ไอโซเลต ทำการจัดกลุ่มเชื้อเหล่านั้นด้วยลักษณะทางพีโนไทป์ และศึกษาเพื่อให้ทราบลักษณะทางอนุกรมวิธานในระดับสกุลของเชื้อในแต่ละกลุ่ม จากนั้นคัดเลือกเชื้อตัวแทนเชื้อในกลุ่มที่น่าสนใจคือมีแนวโน้มเป็นเชื้อชนิดใหม่มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานจนถึงระดับสปีชีส์ ตลอดจนนำเชื้อตัวแทนของกลุ่มที่แสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์แขนงประสาทที่ดีที่สุด มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบและทำการแยกสารให้เป็นสารบริสุทธิ์ ตลอดจนศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ปกป้องเซลล์แขนงประสาท

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคอุบัติใหม่ที่พบมากในกลุ่มผู้สูงอายุในปัจจุบันและพบได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โรคอัลไซเมอร์เกิดจากการที่เซลล์ประสาทถูกทำลายจากอนุโมลติสสะที่เพิ่มขึ้นจากการเหนี่ยวนำของเบต้า-อไมลอยด์ (β -Amyloid (β A)- induced oxidative stress) ดังนั้นการป้องกันการเกิดโรคจึงมุ่งไปที่การต้านอนุโมลติสสะที่จะเกิดขึ้น (Kim *et al.*, 2001) สารที่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทมีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุโมลติสสะที่เกิดจากสภาวะ oxidative stress ซึ่งส่งผลให้เซลล์ประสาทถูกทำลาย ดังเช่นที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นการเลือกนำเอาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุโมลติสสะที่สามารถจับอนุโมลติสสะได้ดี น่าจะส่งผลให้สารเหล่านั้นมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทที่ดีด้วยเช่นกัน การงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) มีผลต่อการทำงานของระบบประสาท โดยจะช่วยเพิ่มการส่งสัญญาณประสาทได้ (Lin *et al.*, 2009) โดยในร่างกายจะมีสาร nerve growth factor (NGF) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นให้มีการสร้าง microtubule และช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) (Yang *et al.*, 2008) สารชนิดนี้จะทำให้เซลล์ประสาทมีแขนงประสาทเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ระบบประสาทสามารถเกิด synapse ได้มากขึ้น การส่งสัญญาณประสาทก็จะเกิดได้ดีขึ้น การค้นหาสารที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ NGF นี้จะสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (neurodegenerative disorders) ได้ การศึกษาเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) นั้นนิยมใช้เซลล์เพาะเลี้ยง เช่น PC12 (Zhang, 2007), PC12D (Wang *et al.*, 2006) และ N2A (Mak *et al.*, 2000) เป็นแบบจำลองในการทดสอบ โดยจะวัดผลจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และการเกิดแขนงประสาทขึ้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการนำเอาเซลล์เพาะเลี้ยง P19 ซึ่งเป็น murine embryonic carcinoma cell มากระตุ้นด้วยวิตามินเอให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทมาใช้เป็นแบบจำลองในการทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวได้อีกด้วย (Mak *et al.*, 2000) ตัวอย่างสารที่มีการค้นพบว่ามีฤทธิ์ช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) เช่น scoparone เป็นสารที่แยกได้จากเปลือกของต้น *Liriodendron tulipifera* พบว่าสาร scoparone ความเข้มข้น 200 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 μ M เนื่องจากสามารถทำให้แขนงประสาทที่เกิดขึ้นมีความยาวมากที่สุดอีกด้วย (Zhang, 2007) สาร 1,4,5,6-tetrahydroxy-7,8-di(3-methylbut-2-enyl)xanthone ที่แยกได้จากเนื้อไม้ *Garcinia xanthochymus* ความเข้มข้น 10 μ M ก็สามารถทำให้

เซลล์ PC12D เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) ได้เช่นกัน (Wang et al., 2006)

สารที่ช่วยทำให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาทนอกจากจะพบได้ในพืชแล้ว ยังมีรายงานการค้นพบสารเหล่านี้จากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แอคติโนมัยซิส ได้เช่นกัน แอคติโนมัยซิสที่อาศัยอยู่ในดินที่ถูกค้นพบมีแนวโน้มเป็นเชื้อสกุลและสปีชีส์ใหม่สูง จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาเพื่อได้มาซึ่งสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง จากการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซิสในดิน พบว่ามีเชื้อบางสกุล เช่น *Streptomyces* สามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และบางชนิดมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคได้ เช่น สาร Geldanamycin (Tadtong et al. 2007) Coprismycin A และ B (Kim et al., 2011) 3-Normeridamycin (Summers et al., 2006)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ และการคัดเลือกเชื้อ

ตัวอย่างที่เก็บ ได้แก่ ดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 5 อย่าง คาดว่าจะสามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทได้อย่างน้อย 60 ไอโซเลต การเก็บตัวอย่างดินจะทำการเก็บตัวอย่างดินปริมาณ 500 กรัม และรักษาตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงกระบวนการแยกเชื้อ และทำการวัด pH ของดินตามวิธีของ Enokita et al. (1986) และจะทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อที่จะนำมาทำการศึกษาต่อไป

3.1.2 การแยกเชื้อ

การแยกเชื้อแอกติโนมัยสีท ทำโดยนำตัวอย่างดินมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและผ่านกระบวนการ physical treatment และ chemical treatment ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละสกุลนั้นๆ จากนั้นทำการแยกเชื้อทำโดยวิธี Spread plate (Tortora et al., 1995) โดยนำตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเจือจางถึงระดับ 100 และ 1000 เท่า จุดสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ยบนอาหาร humic acid-vitamin agar และ/หรืออาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในแต่ละสกุลซึ่งผสมสารปฏิชีวนะ บ่มไว้ในอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 21 วัน เลือกเก็บโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละสกุล ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract – Malt extract agar

3.1.3 การเก็บรักษาเชื้อที่บริสุทธิ์

ทำการเก็บรักษาเชื้อในรูปแบบอาหารเอียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษาด้วยกระบวนการ deep freeze ใน 20% glycerol

3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อดังนี้

3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (ISP) ชนิดต่างๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring and Gottfried, 1966) ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจสอบลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายไคติน การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ในเตรท (Arai, 1975) การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง และการใช้แหล่งคาร์บอน (Shiring and Gottlieb, 1966) จากการศึกษานี้จะสามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาศึกษาในขั้นต่อไป

3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ (Komagata and Suzuki, 1987)

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

3.2.2.1 การวิเคราะห์ผนังเซลล์

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

3.2.2.2 การวิเคราะห์ Whole cell sugar

นำเซลล์แห้งมาไฮโดรไลส์ด้วย 1N H₂SO₄ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วจึงเติม Ba(OH)₂ และปรับ pH อยู่ในช่วง 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดเอาสารละลายส่วนบน (supernatant) มาทำให้แห้ง ละลายซ้ำด้วยน้ำ จากนั้น spot ลงบน cellulose TLC plate develop ด้วย butanol - water - pyridine - toluene (10:6:6:1) 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 แล้วสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ แล้ววิเคราะห์ด้วย gas liquid chromatography

3.2.2.5 การวิเคราะห์ Isoprenoid quinone

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

3.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

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

3.2.4 การวิเคราะห์ DNA base composition (Tamaoka, 1994)

3.2.4.1 การแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเชื้อใน Yeast extract - Malt extract broth เป็นเวลา 4-5 วัน 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 µl heated DNA (1 mg/ml) ด้วย 10 µl nuclease P1 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และไฮโดรไลส์ต่อด้วย 10 µl 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 µl ของสารละลาย heat – denatured DNA (1 µg DNA / well) ของ type strain, control DNA (calf thymus หรือ E. coli) และ DNA ของเชื้อ unknown บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง แล้วเทสารละลาย DNA นั้นทิ้ง ล้างด้วย PBS ปล่อยให้แห้งที่ 45-60 องศาเซลเซียส

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 บั่นด้วย vortex บั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm นาน 20 นาที นำสารละลายชั้นบนทิ้ง เติม n-butanol และบั่นเหวี่ยงอีกครั้ง 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

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

Colorimetric method : เติมสารละลาย streptavidin-peroxidase ใน PBS กับ 0.5 % BSA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง และล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้น เติมสารละลาย 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 การหมักเพื่อผลิตสารและการสกัดแยกสาร

ทำการเลี้ยงเชื้อใน Seed medium (Yeast extract – Malt extract broth; pH 7.3) ที่เตรียมโดยใช้น้ำกลั่น บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1% CaCO₃; pH 7.8 และ Yeast extract – glucose broth; pH 7.8) 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 แล้วนำไปประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทและอีกส่วนนำไปตรวจสอบลักษณะทางเคมีเบื้องต้น

3.4 การสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 14.3 ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและนำมาสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี และเมื่อได้สารออกเป็นส่ว หรือสารบริสุทธิ์แล้ว จึงนำไปตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ต่อไป

3.5 การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีและกำหนดเอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโตรสโคปี รวมทั้งหาเอกลักษณ์และหาค่าคงที่ทางกายภาพที่สำคัญ เช่น จุดหลอมเหลว เป็นต้น เทคนิคทางสเปกโตรสโคปีที่จะนำมาใช้ในการศึกษา ได้แก่

3.5.1 Ultraviolet – Visible (UV) spectrophotometry

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

3.5.2 Infrared spectrophotometry (IR)

วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความถี่คลื่น infrared (400-4000 cm⁻¹) ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นของแสงที่สามารถทำให้โมเลกุลเกิดการสั่นสะเทือน และสามารถบอกถึงหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ซึ่งมีการสั่นสะเทือนในรูปแบบจำเพาะเมื่อได้รับพลังงานจากแสงที่มีความยาวคลื่นหนึ่ง นอกจากนี้จะใช้ในการศึกษาหมู่ฟังก์ชันที่ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงแล้วสเปกตรัมที่ได้จะนำมาใช้อ้างอิงเพื่อช่วยในการหาเอกลักษณ์ของสารแต่ละชนิด เนื่องจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสารแต่ละชนิดจะมีเอกลักษณ์ที่เฉพาะตัว และใช้เป็น finger print ของสารนั้นๆ ได้

3.5.3 Mass spectrometry (MS)

หาน้ำหนักโมเลกุล เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร

3.5.4 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

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

3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้

3.6.1 ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

การเพาะเลี้ยงเซลล์ฟีลิบเก้า

เซลล์ฟีลิบเก้าจะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM (alpha minimal essential medium) ที่ทำการเติม 7.5% newborn calf serum (NBCS) และ 2.5% fetal bovine serum (FBS) ในบรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการ subculture ทุก 2-3 วัน

การเหนี่ยวนำให้เซลล์ฟีลิบเก้าเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทฟีลิบเก้า

นำเซลล์ฟีลิบเก้าที่เจริญเป็นผืนเดียวกันบนผิวภาชนะเพาะเลี้ยงมาเติม trypsin ให้กลายเป็นเซลล์เดี่ยว นำเซลล์มา 2×10^6 cells/mL เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ α -MEM ที่ทำการเติม 5% FBS และ $0.5 \mu\text{M}$ all trans-retinoic acid (RA) ใน petridish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100-mm บรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C เซลล์จะรวมกลุ่มกันมีลักษณะเป็น embryoid bodies ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ทำการกระจาย embryoid bodies ให้กลายเป็นเซลล์เดี่ยวด้วยไปเปต แล้วนำเซลล์ที่ได้ไป เพาะเลี้ยงบน microtiter plate ที่ทำการเคลือบผิวภาชนะด้วย poly-L-lysine (ใช้ $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ poly-L-lysine ที่ละลายใน sterile phosphate buffer solution เติมลงในแต่ละหลุมของ plate เป็นเวลา 1 คืน แล้วค่อยนำสารละลายออก ปล่อยให้แห้งภายใต้รังสี UV ใน laminar flow hood เป็นเวลา 30 นาที) โดยเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 7×10^4 cells/mL ($150 \mu\text{L}/\text{well}$ สำหรับ 96-well plate และ $1.5 \text{ mL}/\text{well}$ สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเป็น α -MEM ที่ทำการเติม 10% FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน บรรยากาศ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นทำการเติม $10 \mu\text{M}$ cytosine arabinoside (Ara-C) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2-3 วัน เซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทชนิดโคลิเนอร์จิก ที่สมบูรณ์พร้อมใช้ในการทดสอบในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท

เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทรวมทั้งเพื่อหาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาทต่อไป โดยทำการทดสอบดังนี้

-นำสารทดสอบแต่ละชนิดมาละลายด้วย 10% DMSO/H₂O เพื่อเตรียมความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ความเข้มข้น ดังนี้คือ 200 μ M, 20 μ M, 2 μ M, 0.2 μ M, 0.02 μ M สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป โดยความเข้มข้นสุดท้ายที่เป็น ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบคือ 10 μ M, 1 μ M, 0.1 μ M, 0.01 μ M, 0.001 μ M และความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้เป็นกลุ่มตัวทำละลายควบคุมคือ 0.5% DMSO

-นำสารละลายที่เตรียมขึ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ข้างต้น มาทดสอบกับเซลล์ประสาทพีลิวแก้ว แล้วบ่มเซลล์ที่ 37 °C ในบรรยากาศ 5% CO₂ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นตรวจดูอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทด้วยวิธี XTT reduction assay โดยใช้กลุ่มที่ไม่ได้รับสารทดสอบเป็นกลุ่มควบคุมและกำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของกลุ่มควบคุมคิดเป็น 100% ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ (n = 3, triplicate)

การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

-นำเอาความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิต (% cell viability) มากกว่า 100% มาทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท โดยจะทำให้เซลล์ประสาทเกิดสภาวะ oxidative stress ด้วยวิธี serum deprivation ทำการเติมสารละลายสารทดสอบในความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบลงไป ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เติมซีรัม แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ในบรรยากาศ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย XTT reduction assay โดยกำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมแต่ไม่ได้รับสารทดสอบ (กลุ่มควบคุม) มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็น 100% ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ (n = 3, triplicate)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติการวิเคราะห์โดยวิธี student's t-test เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบและกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมซีรัมและไม่ได้รับสารทดสอบ กำหนดค่า p < 0.05 จึงถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างดิน ดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์ นำมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทหายากและนำตัวอย่างดินมาวัดความเป็น กรด-เบส พบว่าได้เชื้อแอกติโนมัยสีททั้งหมด 60 ไอโซเลต จากดินตัวอย่างที่มีระดับความเป็นกรด-ด่างในช่วง 6.72- 7.21 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้

ชนิดของ ตัวอย่าง	จังหวัด	พีเอช	รหัส ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ดิน	นครสวรรค์	6.84	NW8	NW8-21, NW8-22, NW8-23, NW8-24, NW8-25, NW8-26, NW8-27, NW8-28, NW8-29, NW8-30, NW8-31, NW8-32, NW8-33, NW8-34, NW8-35, NW8-36, NW8-37, NW8-38, NW8-39, NW8-40, NW8-41, NW8-42, NW8-43, NW8-44, NW8-45, NW8-46, NW8-47, NW8-48, NW8-49, NW8-50
เศษใบไม้ที่ย่อย สลาย	นครสวรรค์	6.72	BR3	BR3-1, BR3-2, BR3-3, BR3-4, BR3-5, BR3-6, BR3-7, BR3-8, BR3-9, BR3-10, BR3-11, BR3-12, BR3-13
ดินทราย	นครสวรรค์	7.21	S2	S2-1, S2-2, S2-3, S2-4, S2-5, S2-6, S2-7, S2-8, S2-9, S2-10
ดินน้ำขัง	นครสวรรค์	7.18	PP8	PP8-1, PP8-2, PP8-3, PP8-4, PP8-5, PP8-6, PP8-7

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดการกระจายเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้

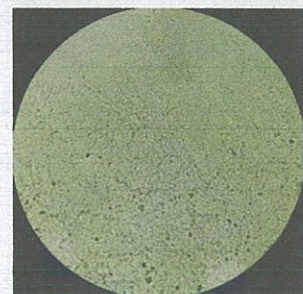
ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัด	รหัสเชื้อ	รายละเอียดเชื้อ
ดิน	นครสวรรค์	NW8-21	<i>Pseudonocardia</i>
เศษใบไม้ที่ย่อยสลาย	นครสวรรค์	BR3-1, BR3-2, BR3-3	<i>Microbispora</i>
ดิน/ดินทราย	นครสวรรค์	S2-1, S2-2, S2-3, S2-4, S2-5, S2-6, S2-7, S2-8, S2-9, S2-10, PP8-1, PP8-2, PP8-3, PP8-4, PP8-5, PP8-6, PP8-7, NW8-38, NW8-39, NW8-40, NW8-41, NW8-42, NW8-43, NW8-44, NW8-45, NW8-46, NW8-47	<i>Micromonospora</i>
ดิน/ดินน้ำขัง	นครสวรรค์	NW8-22, NW8-23, NW8-24, NW8-25, NW8-26, NW8-27, NW8-28, NW8-29, NW8-30, NW8-31, NW8-32, NW8-33, NW8-34, NW8-35, NW8-36, NW8-37, NW8-48, NW8-49, NW8-50, BR3-4, BR3-5, BR3-6, BR3-7, BR3-8, BR3-9, BR3-10, BR3-11, BR3-12, BR3-13	<i>Streptomyces</i>

4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีท

4.2.1 ลักษณะทางพีโนไทป์

ในจำนวนเชื้อแอกติโนมัยสีททั้งหมด 60 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางพีโนไทป์ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดเชื้อออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศแต่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มและกลายเป็นสีดำเมื่อสร้างสปอร์ ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวเกิดบนเส้นใยอาหาร เจริญได้บนอาหาร ISP2 (yeast extract – malt extract agar) เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ 27 ไอโซเลต ได้แก่ S2-1, S2-2, S2-3, S2-4, S2-5, S2-6, S2-7, S2-8, S2-9, S2-10, PP8-1, PP8-2, PP8-3, PP8-4, PP8-5, PP8-6, PP8-7, NW8-38, NW8-39, NW8-40, NW8-41, NW8-42, NW8-43, NW8-44, NW8-45, NW8-46, NW8-47 เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 4 ความเป็นกรดต่าง 6 ถึง 9 ตลอดจนสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้ง เจลาติน โปรตีนในนม และรีดิวซ์ไนเตรทได้



รูปที่ 1. ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต PP8-1 บนอาหาร ISP2

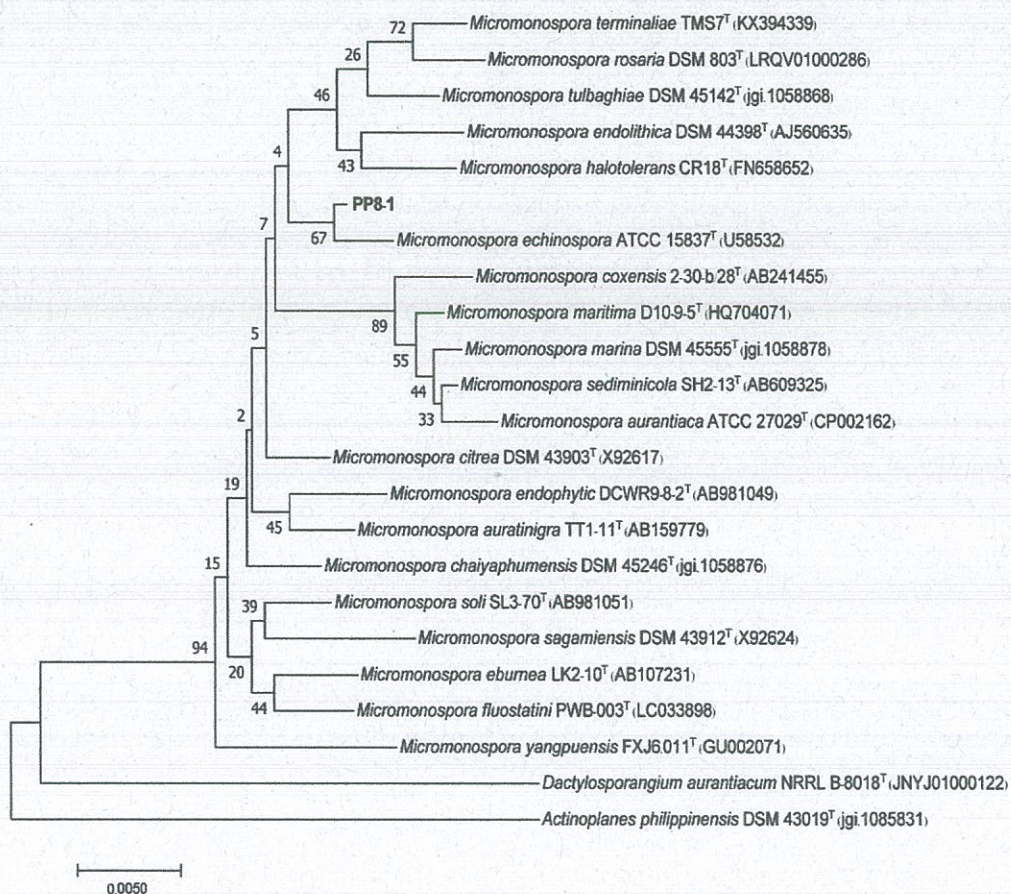
ค รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 1

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมลิกแบบ *meso* (cell wall type II, peptidoglycan type A1 γ) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส กาแลคโตส แรมโนส และ โรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอินซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาติดีลอินซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositol mannosides) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต PP8-1

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยสิท พบว่าเชื้อไอโซเลต PP8-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora echinospora* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.4 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 67 (รูปที่ 2) ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต PP8-1 และเชื้อ type strain ของสกุล *Micromonospora* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Micromonospora echinospora*) มีค่าเท่ากับ 70.8 %



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PP8-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสิท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา และเส้นใยอาหารสีเหลืองอมน้ำตาลอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นตะขอ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 ประกอบด้วยเชื้อ 29 ไอโซเลตคือ NW8-22, NW8-23, NW8-24, NW8-25, NW8-26, NW8-27, NW8-28, NW8-29, NW8-30, NW8-31, NW8-32, NW8-33, NW8-34, NW8-35, NW8-36, NW8-37, NW8-48, NW8-49, NW8-50, BR3-4, BR3-5, BR3-6, BR3-7, BR3-8, BR3-9, BR3-10, BR3-11, BR3-12, BR3-13

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 5 ความเป็นกรดต่างในช่วง 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 42 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้ง โปรตีนในนมและเจลาติน แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรท์ได้ สามารถผลิตกรดได้จากน้ำตาลที่ใช้ทดสอบได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น ดี-ไซโลสและซูโครส สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.subtilis*, *M.luteus*, *S.aureus* และ *C.albicans* ได้



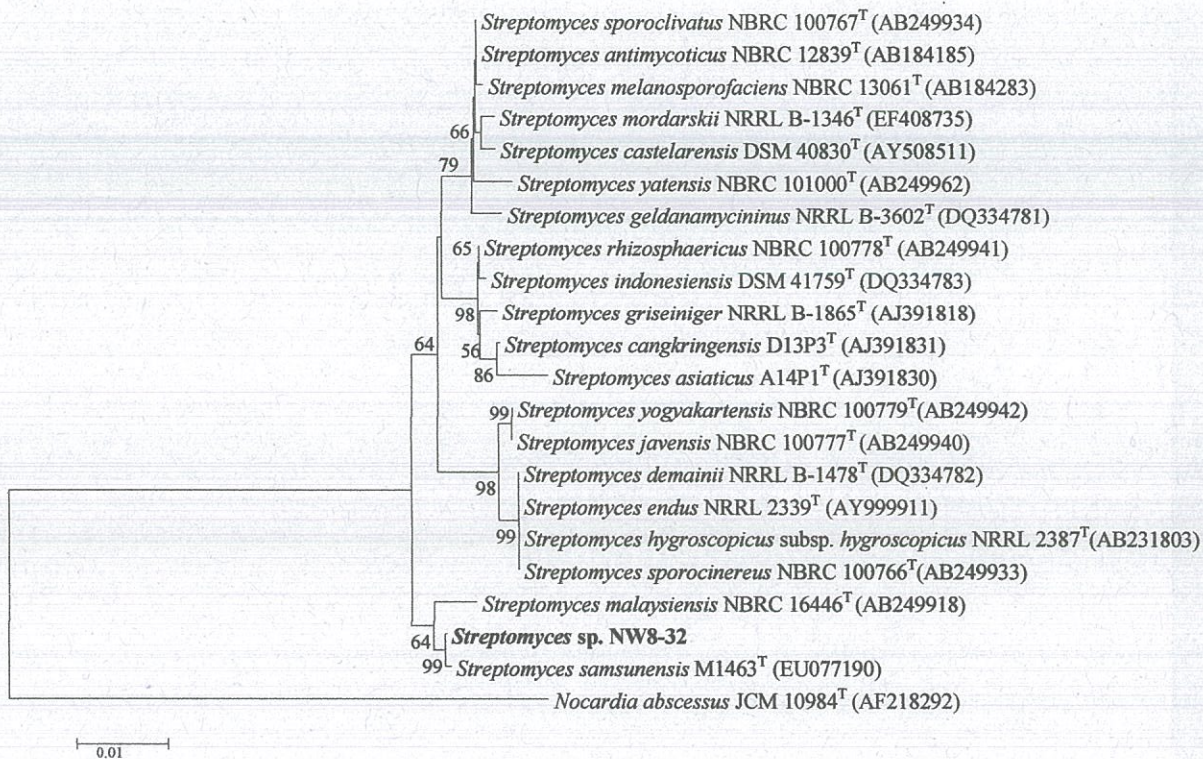
รูปที่ 3 ก แสดงลักษณะโคโลนีและการเจริญของเชื้อไอโซเลต NW8-32 บนอาหาร ISP2
 ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมีโนพีม์ลิกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส กาแลคโตส และอะราบินอส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต NW8-32

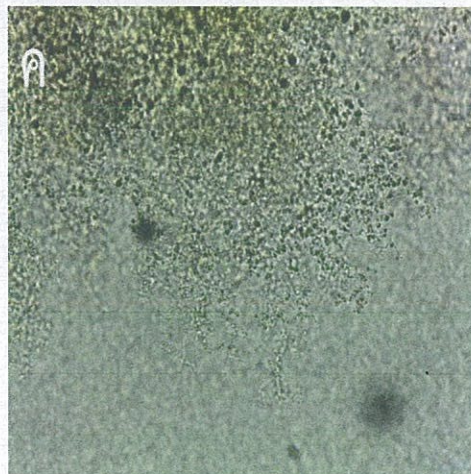
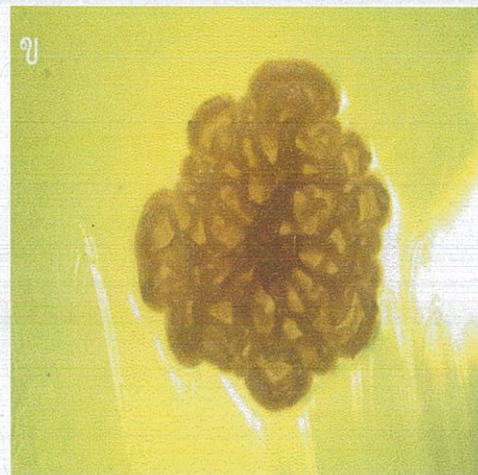
ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต NW8-32 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces samsunensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.9 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต NW8-32 และเชื้อ type strain ของสกุล *Streptomyces* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Streptomyces samsunensis*) มีค่าเท่ากับ 87.2 % จากข้อมูลสามารถสรุปได้ว่าเชื้อไอโซเลต NW8-32 เป็นเชื้อสปีชีส์เดียวกันกับ *Streptomyces samsunensis*



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต NW8-32 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสิท ที่สร้างเส้นใยอากาศชมพูขาว สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมชมพู ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์คู่บนเส้นใยอากาศ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ Oatmeal agar เชื้อในกลุ่มนี้มี 3 ไอโซเลตคือ BR3-1, BR3-2, BR3-3

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 2 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส ริติวซ์ในเตรท ตกตะกอนในนม แต่ไม่สามารถย่อยสลายแป้ง เจลาติน และนมได้



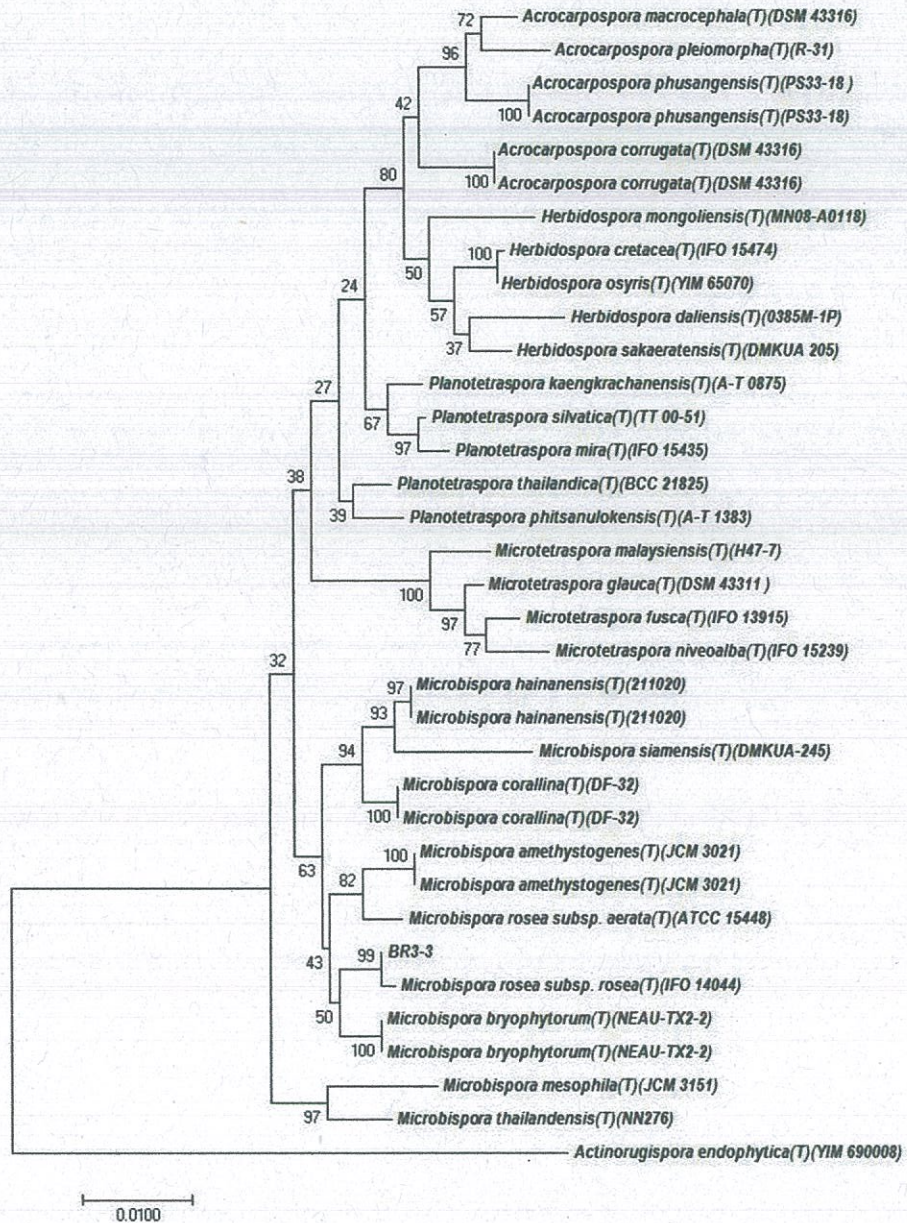
รูปที่ 5 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต BW3-3 บนอาหาร ISP2
 ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดไคโอมิโนพีมิลิกแบบ *meso* (cell wall type II) พบน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส แมนโนส มาดูโรส และโรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอินซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาติดีลอินซิทอลแมนโนไซด์ (phosphatidylinositol mannosides) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Microbispora*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BW3-3

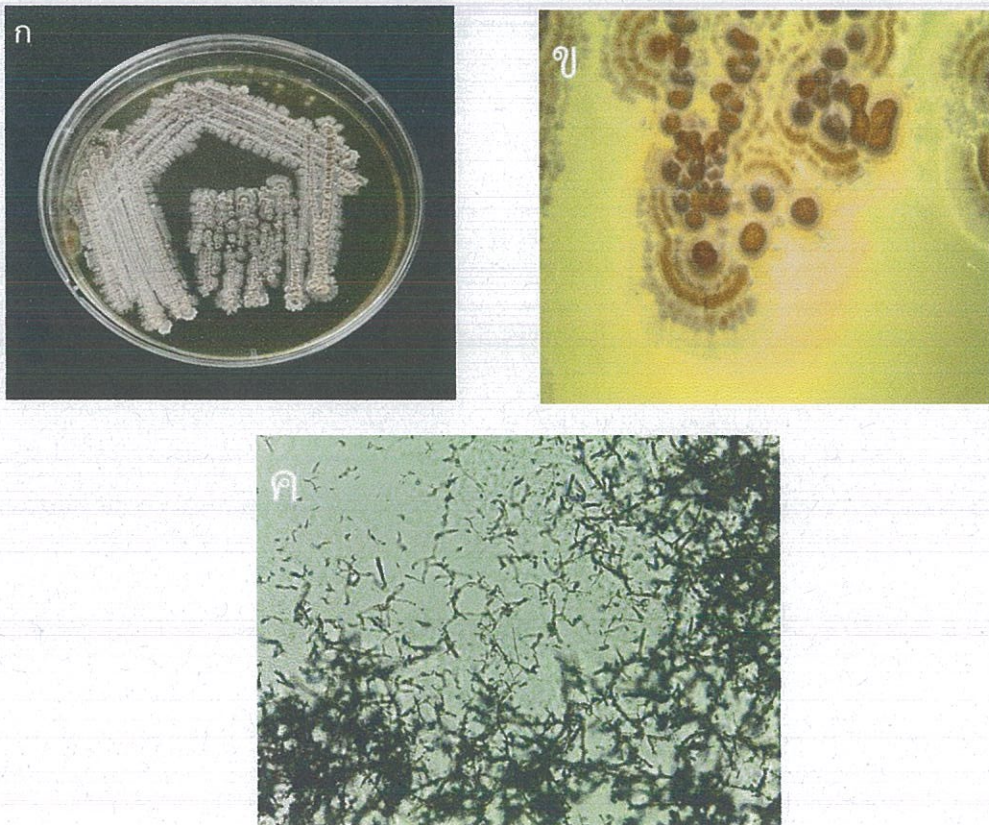
ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BW3-3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.3 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 99



รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต BW3-3 บน phylogenetic tree (NJ method)

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาว สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมน้ำตาล ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์รูปแท่งต่อกันเป็นสายยาวบนเส้นใยอากาศ เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และ Oatmeal agar เชื้อในกลุ่มนี้มี 1 ไอโซเลตคือ NW8-21

เชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดร้อยละ 7 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 35 องศาเซลเซียส ไม่สามารถรื้อตัวขึ้นในเตรท ตกตะกอนในนม เจลาติน และนมได้ แต่สามารถย่อยแป้งได้



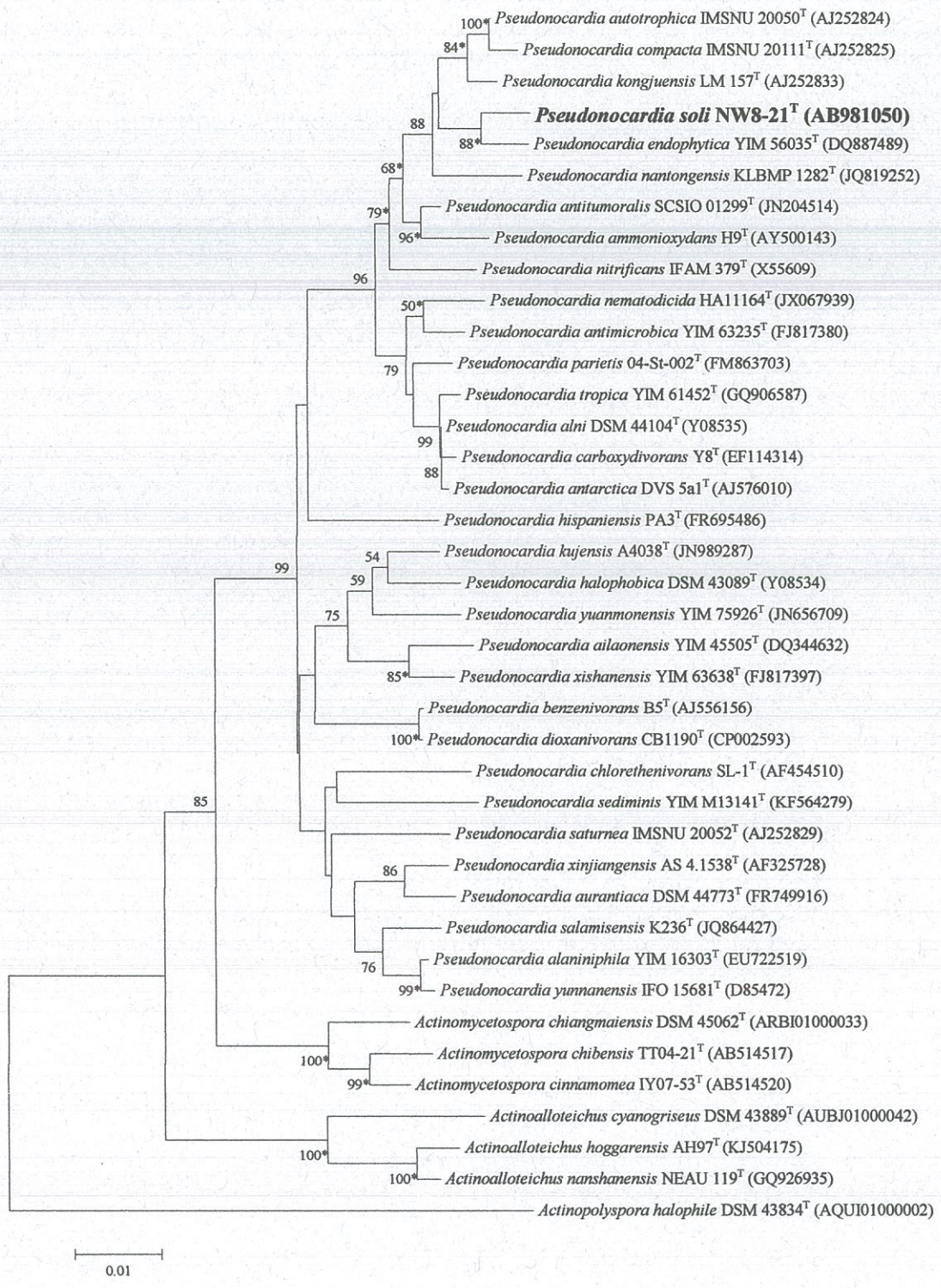
รูปที่ 7 ก และ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลต NW8-21 บนอาหาร ISP2
ข รูปสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ที่มีกำลังขยายสูง (400 เท่า)

ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 4

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพีมัลิกแบบ *meso* (cell wall type II) พบน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส กาแลคโตส และโรโบส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบ ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟติดีลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดีลอินซิทอล (phosphatidylinositol) และฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Pseudonocardia*

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต NW8-21

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต BW3-3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Pseudonocardia endophytica* YIM 56035^T ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.7 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 88 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต NW8-21 และเชื้อ type strain ของสกุล *Pseudonocardia* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree (*Pseudonocardia endophytica*) มีค่าเท่ากับ 39.3 % จากข้อมูลสามารถสรุปได้ว่าเชื้อไอโซเลต NW8-21 เป็นเชื้อคนละสปีชีส์กับ *Pseudonocardia endophytica* จึงได้ทำการตีพิมพ์ในวารสาร Internatioanl Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology โดยใช้ชื่อว่า *Pseudonocardia soli* sp. nov., isolated from the mountainous soil



รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต NW8-21 บน phylogenetic tree (NJ method)

ตารางที่ 3 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
I/PP8-1	Y.M.	ดีมาก	-	ส้ม	-
	O.M.	ดีมาก	-	ส้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	-	ส้ม	-
	T.A.	น้อย	-	เหลืองจาง	-
	Gly.A.	น้อย	-	ส้มจาง	-
	Glu.A.	ดี	-	เหลืองจาง	-
	Cz.sucrose	ดี	-	ส้มจาง	-
	N.A.	ดี	-	ส้ม	-
P.I.A.	ดีมาก	-	ส้ม	-	
II/NW8-32	Y.M.	ดีมาก	ขาวอมเทา	เหลืองอมน้ำตาล	-
	O.M.	ดีมาก	ขาวอมเทา	เหลืองอมน้ำตาล	-
	I.S.	ดีมาก	ขาวอมเทา	เหลืองอมน้ำตาล	-
	T.A.	ปานกลาง	ขาวอมเทา	สีเหลืองอมน้ำตาล	-
	Gly.A.	น้อย	ขาวอมเทา	เหลืองจาง	-
	Glu.A.	ดี	เทา	เหลืองจาง	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาว	เหลืองจาง	-
	N.A.	ดี	ขาวอมเทา	น้ำตาล	-
P.I.A.	ดี	ขาวอมเทา	เหลืองอมน้ำตาล	-	

ตารางที่ 3 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

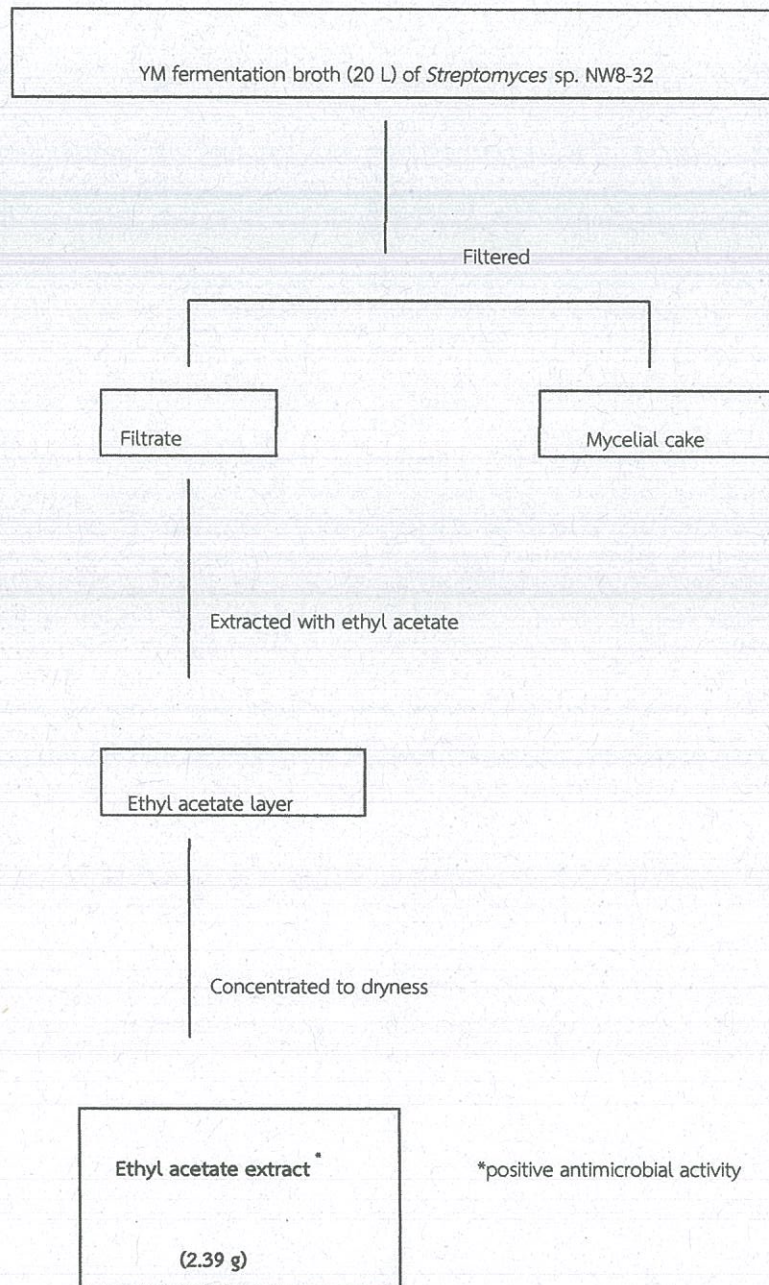
รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สร้างควัตถุ
III/BW3-3	Y.M.	ดีมาก	ขาวอมชมพู	เหลืองอมชมพู	-
	O.M.	ดีมาก	ขาวอมชมพู	เหลืองอมชมพู	-
	I.S.	ดี	ขาวอมชมพู	เหลืองอมชมพู	-
	T.A.	ปานกลาง	ขาว	เหลืองอมชมพู	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ขาวอมชมพู	เหลืองอมชมพู	-
	Glu.A.	ดี	ขาวอมชมพู	เหลืองอมชมพู	-
	Cz.sucrose	น้อย	ขาว	เหลืองอมชมพู	-
	N.A.	ดี	ขาวอมชมพู	เหลืองอมชมพู	-
	P.I.A.	ปานกลาง	ขาวอมชมพู	เหลืองอมชมพู	-
IV/NW8-21	Y.M.	ดีมาก	ขาว	น้ำตาลอ่อน	-
	O.M.	ดีมาก	ขาว	น้ำตาลอ่อน	-
	I.S.	ปานกลาง	ขาวอมเหลือง	เหลืองอมน้ำตาล	-
	T.A.	ดี	ขาวอมเหลือง	เหลืองอ่อน	-
	Gly.A.	ปานกลาง	ขาว	น้ำตาลอ่อน	-
	Glu.A.	ดี	ขาวอมเหลือง	เหลืองอมน้ำตาล	-
	Cz.sucrose	ดี	ขาว	เหลืองจาง	-
	N.A.	ปานกลาง	ขาว	น้ำตาลอ่อน	-
	P.I.A.	ดี	ขาว	น้ำตาลอ่อน	-

ตารางที่ 5 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีทีในแต่ละไฮเลต (ต่อ)

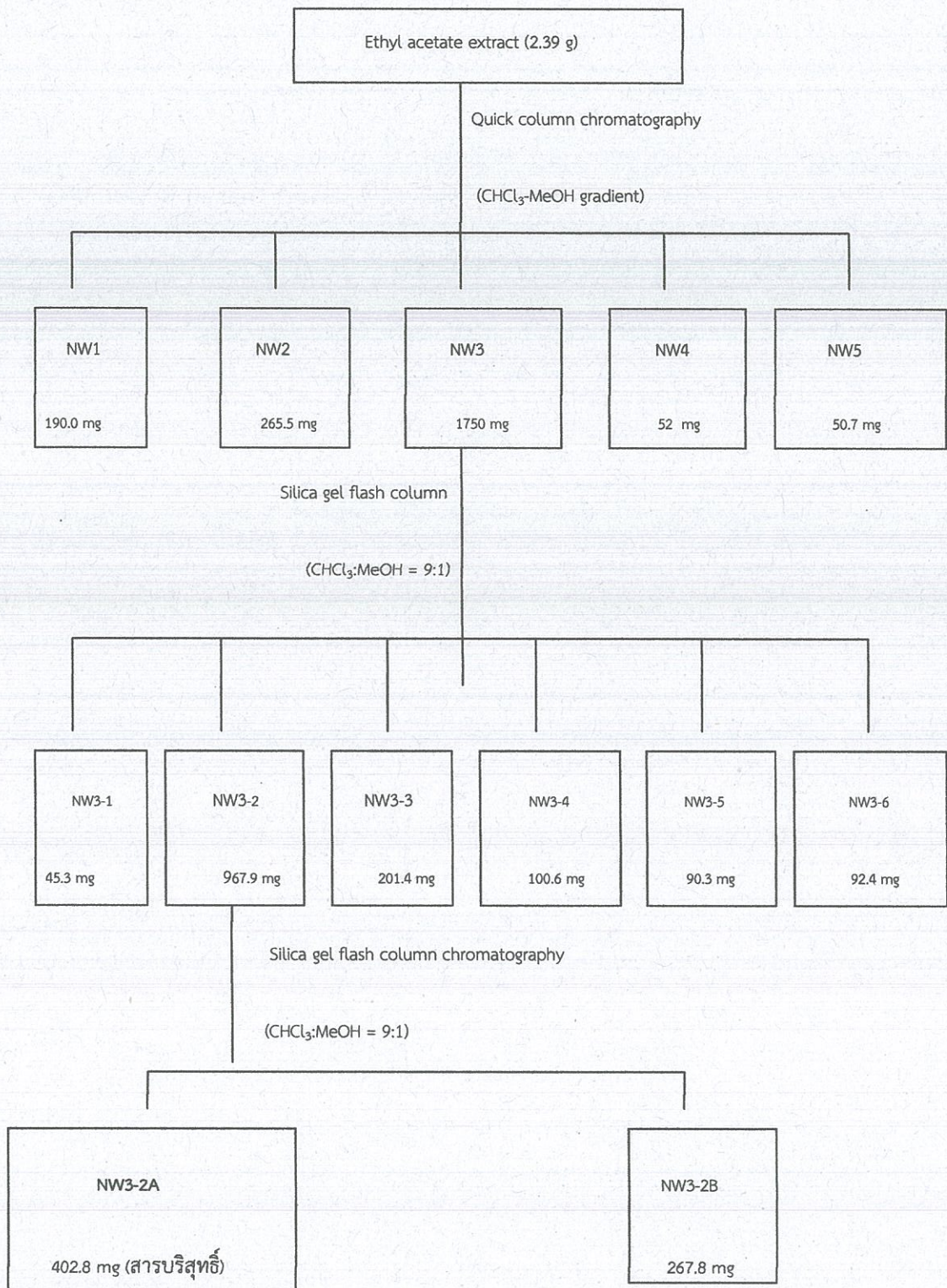
แหล่ง คาร์บอน	กลุ่มที่									
	3					4				
	BW3-1	BW3-2	BW3-3			NW8-21				
Acid production from :										
D-Mannitol	+	+	W			+				
D-Ribose	+	+	W			+				
L-Rhamnose	-	W	W			+				
D-Melibiose	W	+	+			+				
D-Raffinose	W	+	+			+				
Glycerol	-	-	-			+				
Salicin	-	-	-			+				
Lactose	W	+	+			+				
D-Galactose	+	W	+			+				
L-Arabinose	-	-	-			+				
Cellulose	W	+	W			+				
D-Fructose	+	+	+			+				
D-Xylose	+	W	W			+				

การผลิตสารทุติยภูมิ การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีและกำหนดเอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือก

จากเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด 6 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 2 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี จึงเลือกเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract-Malt extract บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 20 ลิตร และนำน้ำหมักเชื้อมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อตัวแทนกลุ่ม 2 ปริมาณ 2.39 กรัม ได้ทำการแบ่งสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์พบว่าสารสกัดแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อยีสต์ทดสอบได้ดี จึงได้นำมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคฟลอสคอลลัมโครมาโตกราฟีโดยใช้ Silica gel 60 ขนาดอนุภาค 0.063-0.2 nm เป็นเฟสคงที่ และใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารบริสุทธิ์ NW3-2A ปริมาณ 402.8 มิลลิกรัม ดังแสดงในรูปที่ 9 จากนั้นได้ทำการนำสาร NW3-2A มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า สารบริสุทธิ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ดี



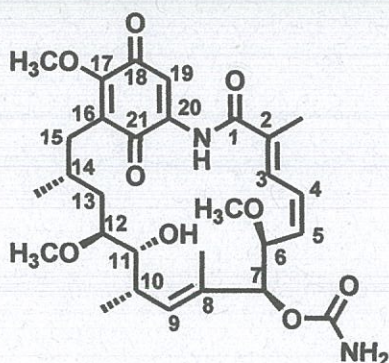
รูปที่ 9 ขั้นตอนการสกัดสารจากน้ำหมักของเชื้อ *Streptomyces* sp. NW8-32



รูปที่ 10 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อ *Streptomyces* sp.

NW8-32

สาร NW3-2A มีลักษณะเป็นผงสีส้มเหลือง เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย ESI-TOF mass ปรากฏ pseudomolecular ion peak ที่ m/z 583.2544 ($M+Na$)+ ซึ่งสามารถระบุสูตรโมเลกุลได้เป็น $C_{29}H_{40}N_2O_9Na$ จากข้อมูลของ IR absorption spectrum แสดงข้อมูลของ $3,452\text{ cm}^{-1}$ (O-H stretching), $1,691\text{ cm}^{-1}$ (C=O stretching) and $1,642\text{ cm}^{-1}$ (C=O stretching, amide I band) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารนี้ด้วยเทคนิค NMR พบว่า ข้อมูลทาง ^1H NMR แสดงให้ทราบว่า สาร NW3-2A ประกอบไปด้วย 4 methyl protons, 3 methoxy protons, 2 methylene protons, 11 methine protons และ 3 exchangeable protons ข้อมูลทาง ^{13}C NMR สรุปได้ว่าสารนี้ประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอนจำนวน 29 อะตอม จากข้อมูลของ DEPT135 และ HMQC สามารถระบุชนิดของคาร์บอนของสาร NW3-2A ได้ว่า สารนี้ประกอบด้วย 4 methyl carbons, 3 methoxy carbons, 2 methylene carbons, 11 methine carbons และ 9 quaternary carbons นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของ ^{13}C NMR พบว่าสารนี้แสดงสัญญาณของ 2 quinone carbonyl carbons, 1 amide carbonyl carbon และ 1 carbamate carbon จากการเปรียบเทียบข้อมูลในฐานข้อมูลสามารถระบุเอกลักษณ์ของสารนี้ได้เป็น สารเจลดานามัยซิน (ตารางที่ 7)



รูปที่ 11 แสดงลักษณะโครงสร้างของสาร NW3-2A

จากการนำสาร NW3-2A มาทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าสารนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Candida albicans* ATCC10231 ที่ระดับความเข้มข้นน้อยที่สุด (MIC) ต่อการเจริญที่ 1, <0.05, 0.12, 7.5 และ 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ตามลำดับ

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบข้อมูลของ ^1H and ^{13}C -NMR ระหว่างสาร NW3-2A และสารเจลดานามัยซิน

Position	NW3-2A ^a		Geldanamycin	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), mult, U in Hz	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), mult ^c
1	168.21	-	169.1	-
2	132.24	-	133.2	-
2-Me	12.31	1.79, 3H, s	12.2	1.91, 3H
3	127.89	6.79, d, (12)	128.4	6.95, d
4	116.11	6.43, t, (12, 11)	125.7	6.56, t
5	132.2	5.23, t, (11, 10)	137.8	5.80, t
6	82.23	4.15, d, (10)	81.6	4.34, d
6-OMe	59.3	3.30, 3H, s	56	3.22, 3H, s*
7	80.62	5.11, brs	80.6	4.86, brs
7-OCONH ₂	154.75	4.75, NH ₂ , brs	156	6.45, NH ₂ , brs
8	128.1	-	132.6	-
8-Me	12.4	1.65, 3H, s	12.5	1.61, 3H, brs
9	134.94	5.72, d, (10)	131.9	5.51, d
10	31.29	2.63, m	32.1	3.61
10-Me	12.66	0.95, 3H, d, (7)	23.3	0.97, 3H, d [#]
11	74.4	3.51, m	71.9	3.29**
11-OH	-	3.11, OH, brs	-	-
12	82.88	3.37, m	80.2	3.07**
12-OMe	56.75	3.33, 3H, s	56.5	3.23, 3 H, s*
13	34.74	1.78, 2H, m	31	1.45, 2H, brs
14	27.97	1.64, brs	26.6	1.91
14-Me	23.04	0.96, 3H, d (6)	13	0.76, 3H [#]
15	32.83	2.49 2H, m	31.7	2.42, 2H, m
16	125.41	-	128.1	2.42, m
17	151.73	-	156.4	-
17-OMe	61.68	4.11 3H, s	61	3.93, 3H, s
18	181.74	-	183.6	-
19	110.6	7.24, s	110.9	7.02, s
20	135.78	-	139.6	-
21	185.62	-	183.1	-
NH	-	8.70, NH, brs	-	9.14, NH, brs

observed in CDCl_3 and recorded at 300 MHz (^1H) and 75 MHz (^{13}C).

observed in $\text{DMSO}-d_6$ (Omura et al., 1979)

observed in $\text{DMSO}-d_6$ (Rinehart, Jr. And Shield, 1976)

*,**,# interchangeable signals

ผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดจากเชื้อ actinomycetes

สารสกัดที่แสดงศักยภาพในการทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% ได้แก่สารสกัดจากเชื้อไอโซเลต NW8-32 (ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml) และเมื่อพิจารณาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทพบว่า สารสกัด NW8-32 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทที่ต่ำ ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบ therapeutic index (TI) ระหว่างความเข้มข้นที่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตได้มากกว่า 100% กับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทแล้ว จึงเลือกเพียง NW8-32 มาทำการศึกษาความสามารถในการกระตุ้นการงอกของแขนงประสาทที่ความเข้มข้น 1 ng/ml ต่อไป

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดจากเชื้อ actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ

สารสกัดของเชื้อ	ความเข้มข้น (ร้อยละการรอดชีวิต \pm SEM)	
	เพิ่มอัตราการรอดชีวิต	ความเป็นพิษ
PP8-1 (กลุ่มที่ 1)	10 ng/ml (52.67 \pm 1.03%)	> 10 $\mu\text{g/ml}$ (85.02 \pm 1.01%)
NW8-32 (กลุ่มที่ 2), สาร NW3-2A	1 ng/ml (128.41 \pm 0.97%)	> 10 $\mu\text{g/ml}$ (7.10 \pm 1.22%)
BW3-3 (กลุ่มที่ 3)	10 ng/ml (68.05 \pm 1.11%)	> 10 $\mu\text{g/ml}$ (78.36 \pm 0.23%)
NW8-21 (กลุ่มที่ 4)	10 $\mu\text{g/ml}$ (89.21 \pm 0.11%)	> 10 $\mu\text{g/ml}$ (42.78 \pm 6.44%)

ผลการทดสอบฤทธิ์ neuroprotective activity ของสารสกัดจากเชื้อ actinomycetes

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ neuroprotective activity ของสารสกัดจากเชื้อ actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ

สารสกัด	ร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท \pm SEM
PP8-1 (กลุ่มที่ 1) (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง
NW8-32 (กลุ่มที่ 2, สาร NW3-2A) (1 ng/ml)	97.23 \pm 1.21
BW3-3 (กลุ่มที่ 3) (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง
NW8-21 (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 NW8-32 ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotective) โดยสารสกัดทุกชนิดสามารถป้องกันเซลล์ประสาทไม่ให้ตายจากการเกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีซีรัม (serum deprivation) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมซีรัม และกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมซีรัม

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทจากตัวอย่างตะกอนดินจากบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์ สามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลต ได้ทำการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ลักษณะ สัณฐานวิทยา การเจริญ สรีระวิทยา ชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอกติโนมัยสีทหายากออกเป็น 4 กลุ่ม คัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาศึกษาลักษณะทางเคโมไทป์ และจีโนไทป์ พบว่า

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีทที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหาร โดยตรง มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Micromonospora*

กลุ่มที่ 2 เชื้อแอกติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอมน้ำตาล ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์ยาวโค้งเป็นตะขอเกิดบนเส้นใยอากาศมีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Streptomyces*

กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศในโทนสีขาวอมชมพู เส้นใยอาหารเหลืองอมน้ำตาล และลักษณะสปอร์เป็นคู่ มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Microbispora*

กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีท ที่สร้างเส้นใยอากาศสีขาว แต่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายในอาหาร สร้างสปอร์สายตรงยาว มีลักษณะทางเคโมไทป์และจีโนไทป์ยืนยันว่าเป็นเชื้อสกุล *Pseudonocardia*

จากเชื้อแอกติโนมัยสีทข้างต้น พบว่าเชื้อไอโซเลต NW8-21 มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบส ในช่วง 16S rRNA gene ใกล้เคียงกับ *Pseudonocardia endophytica* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 98.7 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ที่ร้อยละ 88 เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ เคโมไทป์และจีโนไทป์ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อไอโซเลต NW8-21 นี้เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Pseudonocardia* โดยให้ชื่อว่า *Pseudonocardia soli*

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยสีททั้ง 60 ไอโซเลต ด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ MRSA พบว่า สิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อกลุ่มที่ 2 แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ การศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2 ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด พบว่า เชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2 สามารถผลิตสารเจลดานามัยซิน (Geldanamycin) ได้ นอกจากนี้สาร NW3-2A ที่ได้ในระดับความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ยังแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากสารก่อความเครียด โดยสามารถทำให้เซลล์ประสาทมีชีวิตรอดจากสภาวะความเครียดได้ถึง $97.23\% \pm 1.21$

จากข้อมูลทั้งหมดทำให้ทราบว่าดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดนครสวรรค์ มีคุณค่าในเชิงความหลากหลายของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี การทดลองต่อไปจึงควรค้นหาเชื้อในบริเวณอื่นที่ยังไม่สำรวจ ซึ่งอาจจะค้นพบแอกติโนมัยสีทที่มีความแตกต่างจะแอกติโนมัยสีทเดิมและอาจสร้างสารที่มีโครงสร้างทางเคมีแปลกใหม่กว่าเดิม

ผลผลิตจากงานวิจัย (Output)

บทความวิจัย

1. Thawai, C. 2017. *Pseudonocardia soli* sp. nov., isolated from the mountainous soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (In press) (Impact factor = 2.14)

เอกสารอ้างอิง

- 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.
- Enokita, R., Okazaki, T., Torikata, A. and Arai, M. 1986. Personal communication. Sankyo Fermentation Research Laboratories, Tokyo, Japan.
- Duangmal, K., Mingma, R., Pathom-aree, W., Thamchaipenet, A., Inahashi, Y., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2011. *Amycolatopsis samanae* sp. nov., isolated from roots of *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 951-955.
- Duangmal, K., Thamchaipenet, A., Ara, I., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2008. *Kineococcus gynurae* sp. nov., isolated from a Thai medicinal plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2493-2442.
- 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 A (1-42) insult. *Neurosci. Lett.* 303: 57-61.

- Kim, S.H., Ko, H., Bang, H. S., Park, S. H., Kim, D. G. 2011. Coprismycins A and B, neuroprotective henylpyridines from the dung beetle-associated bacterium, *Streptomyces* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21 . 2011. 5715–5718
- Kirby, B. M. and Meyers, P. R.. 2010. *Micromonospora tulbaghia* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1328–1333.
- Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. *Methods in Microbiology.* 19: 161-207.
- 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. *Streptomycesalni* sp. nov., a daidzein-producing endophyte isolated from a root of *Alnus nepalensis* D. Don. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 254-258.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J-S. Senthilkumar, M., Lee, K. C. and Sundaram, S. 2010. *Leifsonia soli* sp. nov., a yellow-pigmented actinobacterium isolated from teak rhizosphere soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1322-1327.
- 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.
- Summers, M. Y., Leighton, M., Liu, D., Pong, K. and Graziani, E. I. 2006. 3-Normeridamycin: A Potent Non-Immunosuppressive Immunophilin Ligand is Neuroprotective in Dopaminergic Neurons. *J. Antibiot.* 59. 3: 184–189, 2006
- 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.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.

- 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.
- Tamaoka, J. 1994. Determination of DNA Base Composition In *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Edited by M. Goodfellow and A.G. O'Donnell. John Wiley and Sons Ltd. pp. 463-470.
- Thamchaipenet, A., Indananda, C., Bunyoo, C., Duangmal, K., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2010. *Actinoallomurus acaciae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 554-559
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. 1995. *Microbiology, An Introduction*. 5th ed. Bridge Parkway: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- 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.
- Williams, S.T. and Cross, T. 1971. Actinomycetes : Physiological properties In *Method in Microbiology*, 4th edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.
- Williams, S.T. and Cross, T. 1977. Actinomycetes : Slide and coverslip methods In *Method in Microbiology*, 4th edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.
- Yang, Y.J., Lee, H.J., Choi, D.H., Huang, H.S., Lim, S.C., and Lee, M.K. 2008. Effect of scoparone on neurite outgrowth in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 440: 14-18.
- Zhang, W.K., Xu, J.K., Zhang, X.Q., Yao, X.S., and Ye, W.C. 2007. Sphingolipids with neurotogenic activity from *Euphorbia sororia*. *Chem. Phys. Lipids* 148: 77-83.

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

1. Sodium-caseinate agar (SCN)

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

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

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

3. Oatmeal agar, ISP medium no. 3

Oatmeal	2.0	กรัม
Agar	1.8	กรัม

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

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

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

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

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

6. Tyrosine agar, ISP medium no. 7

Glycerol	1.5	กรัม
L-Tyrosine (Difco)	0.05	กรัม
L-Asparagine (Difco)	0.1	กรัม
K_2HPO_4	0.05	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
NaCl	0.05	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
Trace salts solution (A)	0.1	มิลลิลิตร
Agar	2.0	กรัม
pH 7.2-7.4		
Trace salt solution (A)		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

7. Peptone KNO₃ broth

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

8. Carbon utilization medium, ISP medium no. 9

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

9. Boullion gelatin broth

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

10. Peptonization and Coagulation test medium

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

11. Mueller-Hinton agar (Difco)

Beef infusion from	30	กรัม
--------------------	----	------

Casamino acid, Technical	1.75	กรัม
--------------------------	------	------

Starch	0.15	กรัม
--------	------	------

Agar	1.7	กรัม
------	-----	------

pH 7.3

12. Sabouraud's dextrose agar (Difco)

Neopeptone	1.0	กรัม
------------	-----	------

Dextrose	4.0	กรัม
----------	-----	------

Agar	1.5	กรัม
------	-----	------

pH 5.6-5.8

13. Seed medium

Yeast extract	0.4	กรัม
---------------	-----	------

Glucose	0.4	กรัม
---------	-----	------

Malt extract	1.0	กรัม
--------------	-----	------

pH 7.3

14. Production medium

Yeast extract	0.4	กรัม
---------------	-----	------

Glucose	0.4	กรัม
---------	-----	------

Malt extract	1.0	กรัม
--------------	-----	------

CaCO ₃	0.1	กรัม
-------------------	-----	------

pH 7.3

15. Peptone-yeast extract iron agar

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

16. Glucose asparagines agar

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

17. Nutrient agar

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

18. Czapek's sucrose agar

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

19. phosphate buffer

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

**ใช้ KH_2PO_4 เป็นตัวปรับพีเอช

20. Humic acid Vitamin Agar

Humic acid	1 กรัม
Na_2HPO_4	0.5 กรัม
KCL	1.71 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 มิลลิกรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 มิลลิกรัม
CaCO_3	20 มิลลิกรัม
Vitamin B	10 มิลลิลิตร
Agar	15 กรัม
DW.	1 ลิตร

pH 7.3

เกลือ 3 เปอร์เซ็นต์

** Humic acid ละลายใน 10 มล. 0.2N NaOH

**Vitamin B

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

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
Pseudonocardia soli sp. nov., isolated from the mountainous soil
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	IJSEM-D-17-01054
Full Title:	Pseudonocardia soli sp. nov., isolated from the mountainous soil
Article Type:	Taxonomic Description
Section/Category:	New taxa - Actinobacteria
Keywords:	Pseudonocardia, Actinomycetes, 16S rRNA gene, Mountainous soil
Corresponding Author:	Chitti Thawai, Assoc. Prof. Dr. King Mongkuts Institute of Technology Ladkrabang Bangkok, THAILAND
First Author:	Chitti Thawai, Assoc. Prof. Dr.
Order of Authors:	Chitti Thawai, Assoc. Prof. Dr.
Manuscript Region of Origin:	THAILAND
Abstract:	A novel actinomycete strain NW8-21T was isolated from mountainous soil in Mae-Wong National Park, Nakornsawan province, Thailand and was taxonomically characterized using a polyphasic approach. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, the strain reveals the closest relationship to <i>Pseudonocardia endophytica</i> YIM 56035T with the highest 16S rRNA gene sequence similarity value of 98.7% follows by <i>P. nantongensis</i> KLBMP 1282T (98.0%). The chemotaxonomic properties i.e. arabinose and galactose as the diagnostic reducing sugar in cell, MK-8 (H4) as a major menaquinone, iso-C16:0 as the main cellular fatty acid component and phosphatidylethanolamine, phosphatidylmethylethanolamine, diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylcholine as the characteristic phospholipids, confirmed the taxonomic affiliation of the strain that was consistent with those of the genus <i>Pseudonocardia</i> . Several phenotypic differences and DNA-DNA hybridization results (less than 40% relatedness value) indicate that strain NW8-21T is considered to represent a novel species of the genus <i>Pseudonocardia</i> , for which the name <i>Pseudonocardia soli</i> is proposed. The type strain is strain NW8-21T (=BCC 58125T =NBRC 109519T).

1 ***Pseudonocardia soli* sp. nov., isolated from the mountainous soil**

2

3 Chitti Thawai^{1,2}

4

5 ¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology

6 Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

7 ²Actinobacterial Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of

8 Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

9

10 **Running title:** *Pseudonocardia soli* sp. nov.

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

12 **Correspondence**

13 Chitti Thawai

14 Chitti.th@kmitl.ac.th

15

The DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain NW8-21^T is
AB981050.

16

17 A novel actinomycete strain NW8-21^T was isolated from mountainous soil in
18 Mae-Wong National Park, Nakornsawan province, Thailand and was
19 taxonomically characterized using a polyphasic approach. Based on 16S rRNA
20 gene sequence analysis, the strain reveals the closest relationship to
21 *Pseudonocardia endophytica* YIM 56035^T with the highest 16S rRNA gene
22 sequence similarity value of 98.7% follows by *P. nantongensis* KLBMP 1282^T
23 (98.0%). The chemotaxonomic properties i.e. arabinose and galactose as the
24 diagnostic reducing sugar in cell, MK-8 (H₄) as a major menaquinone, iso-C_{16:0}
25 as the main cellular fatty acid component and phosphatidylethanolamine,
26 phosphatidylmethylethanolamine, diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol,
27 phosphatidylinositol, phosphatidylcholine as the characteristic phospholipids,
28 confirmed the taxonomic affiliation of the strain that was consistent with those of
29 the genus *Pseudonocardia*. Several phenotypic differences and DNA-DNA
30 hybridization results (less than 40% relatedness value) indicate that strain NW8-
31 21^T is considered to represent a novel species of the genus *Pseudonocardia*, for
32 which the name *Pseudonocardia soli* is proposed. The type strain is strain NW8-
33 21^T (=BCC 58125^T =NBRC 109519^T).

34 **Key words:** *Pseudonocardia soli* sp. nov., Actinomycetes, 16S rRNA gene,
35 **Mountainous soil**

36

37

38

39

40

41

42 Genus *Pseudonocardia* [1] is the one of important group of actinomycetes because
43 several members in this genus are well-known sources of secondary metabolites that
44 can be developed as a resource for biotechnology [2, 3]. Several *Pseudonocardia*
45 species normally distribute in many varieties of soil [4, 5, 6, 7]. At present time, the
46 genus contains more than 50 species including *P. nigra* [8], the latest novel species.
47 Since mountainous environment differ greatly from another terrestrial habitats, the
48 biological characteristics of actinomycetes and their distribution are expected to be
49 different from those of soil actinomycetes. In the programme for investigation of
50 novel actinomycetes from the mountainous soils, the actinomycetes strain NW8-21^T
51 was isolated. This strain shows the morphological and chemotaxonomic typical of the
52 members of the genus *Pseudonocardia* but the phenotypic and genotypic
53 characteristics are completely separated this strain from all type strains of the genus
54 *Pseudonocardia* species. With these reason, strain NW8-21^T should be judged as
55 novel species of the genus *Pseudonocardia* for which the name *Pseudonocardia soli*
56 sp. nov. is proposed.

57

58 Strain NW8-21^T was isolated from a soil sample collected from the Mae-Wong
59 National Park, Nakornsawan province, Thailand. The soil sample was air-dried at
60 room temperature for 14 days. The dried soil sample was then ground and heated at
61 100 °C for 1 h. The treat soil was serially diluted to the 10⁻³ concentration in 0.01%
62 sterile sodium lauryl sulfate in distilled water and spread on humic acid-salts vitamin
63 agar (HV) [9] supplemented with 20 mg l⁻¹ nalidixic acid and 50 mg l⁻¹ nystatin. The
64 colony of actinomycetes was purified on yeast extract-malt extract agar (International
65 *Streptomyces* Project, ISP2 medium) [10]. The pure culture was preserved by freeze-
66 drying.

67

68 To observe the morphology, strain NW8-21^T was cultivated on soil extract agar at 30
69 °C for 30 days. First, the colonies of this strain were observed by light microscopy. To
70 prepare the samples for observing under scanning electron microscopy, a cultured
71 agar block (3 cm² x 5 cm²) was fixed with the vapor of 2% osmium tetroxide for 2
72 hrs. Then, the samples were gently washed with sterile distilled water. The
73 dehydration step was done through a graded ethanol series [30%, 50%, 70%, 95%
74 each for 10-15 min, finally followed by 100% ethanol (10 min) for three times]. After
75 that, the dehydrated samples were dried using liquid carbon dioxide in critical-point
76 dryer (model EM CPD300; Leica). Finally, the specimens were stuck on the stub and
77 were coated with gold using a sputter coater (model SCD040; Balzers, Germany). The
78 specimens were observed under a scanning electron microscope (model JSM-6610
79 LV; JEOL).

80

81 The cultural characteristics of the strain were examined on several International
82 *Streptomyces* Project (ISP) media (ISP2-7), glucose-asparagine agar (ISP5 with 1%
83 glucose replacing glycerol), Czapek's sucrose agar [11] and nutrient agar (Difco). To
84 determine the colour of substrate mycelium, aerial mycelium and spores, the standard
85 colour charts (ISCC-NBS) was used [12]. To characterize the nitrate reduction, the
86 decomposition of gelatin, starch, casein and the acid production, the strain and the
87 reference strains were cultured on the media preparing by the method of Arai [13],
88 Williams & Cross [14] and Gordon [15]. The growth on various conditions, i.e. the
89 temperature (10-50 °C), NaCl (0-7%, interval of 1 unit) and pH (4-11, interval of 1
90 pH unit) tolerance, were determined on ISP2 agar for 14 days. Urease activities were

91 performed according to the method previously described by Smibert & Krieg [16].

92 The results are showed in the species description and Table 1.

93

94 For chemotaxonomic analyses, strain NW8-21^T was grown in ISP2 broth on rotary
95 shaker (180 r.p.m.) at 30°C for 5 days. The biomass of the strain was prepared by
96 harvesting the cultured broth by centrifugation (8000 x g for 10 min) and then the cell
97 pellets were washed five times with sterile distilled water. The washed cells were
98 dried in the freeze dryer. The cell wall diaminopimelic acid was analysed using the
99 protocol of Hasegawa *et al.* [17]. The acyl type of muramic acid in the peptidoglycan
100 was carried out using the method of Uchida and Aida [18]. Reducing sugars in cell
101 were studied according to the standard protocol of Komagata and Suzuki [19]. The
102 extraction method and two-dimensional TLC technique suggested by Minnikin *et al.*
103 [20] were used for analyzing the polar lipids in membrane. The cellular fatty acids
104 were evaluated according to the protocol of the Microbial Identification System
105 (MIDI) [21; 22] with the TSBA6 MIDI database. Mycolic acids were determined
106 using the method suggested by Minnikin *et al.* [23]. Isoprenoid quinones were
107 extracted according to the method of Collins *et al.* [24] and analysed by HPLC. The
108 HPLC solvent system was methanol/2-propanol (2 : 1, v/v) at a flow rate of 0.6 ml
109 min⁻¹.

110

111 Extraction of genomic DNA and the 16S rRNA gene amplification and sequencing
112 were done as described by Tamaoka [25] and Thawai [26], respectively. The G+C
113 content of the genomic DNA was examined according to the standard HPLC method
114 of Tamaoka and Komagata [27]. DNA-DNA hybridization was done using the
115 fluorometric microwell method suggested by Ezaki *et al.* [28].

116

117 The 16S rRNA gene sequence similarity value of strain NW8-21^T (1,478 bp) was
118 calculated based on the pairwise alignment using the the EzBioCloud server
119 (<http://www.ezbiocloud.net/>) [29]. CLUSTAL W multiple alignment mode within
120 BioEdit program version 7.1.3.0 [30] was used to align the 16S rRNA gene sequences
121 of strain NW8-21^T and the closely related members of the genus *Pseudonocardia*.
122 Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining (NJ) [31], maximum-
123 likelihood (ML) [32] and maximum parsimony methods [33] in the MEGA 6 software
124 [34]. Distances between sequences were calculated by the Kimura's 2-parameter
125 model [35]. A bootstrap analysis (1,000 replicates) was evaluated the robustness of
126 the tree topologies [36].

127

128 Strain NW8-21^T grew well on ISP 2, ISP 3 and ISP 7, moderately on ISP 5, weakly on
129 ISP 4, ISP 6, Czapek's sucrose agar, glucose-asparagine agar and nutrient agar. The
130 colour of substrate hyphae on these media was pale yellowish white to yellowish
131 brown. White aerial mycelium is observed on ISP 2, ISP 3, ISP 4, ISP 5, ISP 7 and
132 Czapek's sucrose agar. Soluble pigment was not produced on any of the media tested.
133 Strain NW8-21^T formed the long chains of rod shaped spores borne on aerial
134 mycelium (Supplementary Fig S1). The morphological characteristic of this strain is
135 similar to those of the spore morphology of genus *Pseudonocardia* [1].

136

137 Several chemotaxonomic data of strain NW8-21^T confirmed the affiliation of this
138 strain to the genus *Pseudonocardia*. The cell walls of strain NW8-21^T contained
139 *meso*-diaminopimelic acid. The acyl type of cell wall peptidoglycan was acetyl. The
140 reducing sugars in whole-cell hydrolysates were arabinose, galactose, glucose and

141 ribose. The two reducing sugars, arabinose and galactose, were generally found in
142 members of the genus *Pseudonocardia* [5, 6, 8]. The menaquinones were MK-8(H₄)
143 (94.9%) and MK-9(H₂) (1.1%). The high amount of MK-8(H₄) is usually observed in
144 *Pseudonocardia* species [6, 8, 37]. The major cellular fatty acids ($\geq 3\%$) were iso-C_{16:0}
145 (68.4%), iso-C_{16:1} H (9.3%) and iso-C_{14:0} (3.6%) (Supplementary Table S1). The fatty
146 acid, iso-hexadecanoic acid (iso-C_{16:0}), is generally reported as major component fatty
147 acid in the members of *Pseudonocardia* [4, 5, 6, 7, 8]. Mycolic acids were absent. The
148 diagnostic phospholipids, diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG),
149 phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylmethylethanolamine (PME),
150 phosphatidylinositol (PI), phosphatidyl choline (PC), were found in this strain. These
151 phospholipids commonly found in the membrane of *Pseudonocardia* species.
152 (Supplementary Fig. S2), [5, 38]. The G+C content (mol%) of the genomic DNA was
153 70.9%.

154
155 Almost complete 16S rRNA gene sequence was obtained for strain NW8-21^T (1,478
156 nt). The strain exhibited a close relationship with members of the family
157 *Pseudonocardiaceae* and formed in the phylogenetic cluster of the genus
158 *Pseudonocardia* (Fig. 1). The phylogenetic position of strain NW8-21^T in NJ, ML and
159 MP tree-making algorithms with high bootstrap values (88-95%) revealed that this
160 strain was most closely related to *P. endophytica* (Supplementary Fig. S3 and S4).
161 The taxonomic position of strain NW8-21^T was confirmed by the value of 16S rRNA
162 gene sequence similarity because this strain shared the highest 16S rRNA gene
163 sequence similarity with *P. endophytica* (98.7%) followed by *P. nantongensis*
164 (98.0%). With these reason, the two closest type strains of the genus *Pseudonocardia*,

165 *P. endophytica* and *P. nantongensis*, were selected for comparing the phenotypic
166 characteristics and DNA-DNA hybridization.

167

168 As summarized in Table 1, strain NW8-21^T was readily distinguished from the closely
169 related species, *P. endophytica* DSM44969^T and *P. nantongensis* NBRC108677^T. The
170 strain, unlike *P. endophytica* DSM44969^T, produced acid from L-arabinose, L-
171 rhamnose, D-raffinose, D-cellobiose, D-mannitol, D-mannose, D-xylose, glycerol and
172 *myo*-insitol. Additional, the maximum temperature for growth of strain NW8-21^T is
173 30°C whereas *P. endophytica* DSM44969^T could grow at 37°C as maximum
174 temperature. In contrast, *P. nantongensis* NBRC108677^T, unlike strain NW8-21^T,
175 reduced nitrate to nitrite, exhibited the urease activity, did not produce acid from D-
176 raffinose, D-cellobiose, D-mannitol, D-mannose, glycerol and *myo*-insitol.
177 Furthermore, the result of DNA-DNA hybridization between strain NW8-21^T and
178 these two closely related species ranged from 30.8 ± 0.4% - 39.3 ± 0.5%, which is
179 well below the 70% cut-off point for the assignment of bacterial strains to the same
180 species [39] (Supplementary Table S2). Thus, on the basis of phenotypic,
181 chemotaxonomic and genotypic data, strain NW8-21^T merits classification as a novel
182 species of the genus *Pseudonocardia*, for which we propose the name
183 *Pseudonocardia soli* sp. nov. The type strain is strain NW8-21^T (=BCC 58125^T =
184 NBRC 109519^T).

185

186 **DESCRIPTION OF *PSEUDONOCARDIA SOLI* SP. NOV.**

187 *Pseudonocardia soli* [*so*'*li* L. gen. n. *soli* of soil, referring to the soil as the isolation
188 source].

189

190 Cells are Gram-stain-positive, mesophilic actinomycete that forms branched substrate
191 mycelium. White aerial mycelium and the long chain of spores are observed on ISP 2-
192 7 media. No soluble pigment is produced in any test media. Hydrolysis of starch is
193 positive. Peptonization of milk, gelatin liquefaction, hydrolysis of tyrosine, the
194 production of urease and nitrate reduction are negative. Acid is produced from D-
195 cellobiose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-mannose, D-mannitol, L-arabinose,
196 L-rhamnose, glycerol, sucrose, D-xylose, D-ribose, D-melibiose, D-raffinose, D-
197 salicin and *myo*-inositol. Optimal temperature for growth is between 25-30 °C. No
198 growth at 35 °C. The maximum NaCl concentration for growth is 7% (w/v). The pH
199 range for growth is 5-10. The cell wall peptidoglycan contains *meso*-diaminopimelic
200 acid. The acyl type of the cell wall is acetyl. The predominant menaquinones is MK-
201 8(H₄) and small amount of MK-9(H₂) is also found. The characteristic whole-cell
202 sugars are ribose, arabinose, glucose and galactose. The phospholipid profile contains
203 diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine,
204 phosphatidylmethylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidyl choline, two
205 unidentified phospholipids and seven unidentified lipids. The fatty acid pattern (>1%)
206 consists of iso-C_{16:0}, iso-C_{16:1} H, iso-C_{14:0}, C_{17:1} ω6c, C_{16:1} ω7c, C_{17:1} ω9c, C_{16:0}, iso-
207 C_{15:0}, iso-C_{17:0}, anteiso-C_{17:0}, iso-C_{18:0}, 10-methyl-C_{16:0}, 10-methyl-C_{17:0}. Mycolic
208 acids are absent. The G+C content of the DNA is 70.9 mol%. The type strain is NW8-
209 21^T (=BCC 46909^T =NBRC 108780^T), which was isolated from soil of the Mae-Wong
210 National Park in Nakornsawan Province, Thailand.

211

212 **Acknowledgements**

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

215

216 **Funding information**

217 This research was supported by Faculty of Science, King Mongkut's Institute of
218 Technology Ladkrabang.

219

220 **Conflicts of interest**

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

222

223 **References**

- 224 1. **Henssen A.** Beiträge zur morphologie und systematik der thermophilen
225 actinomyceten. *Arch Microbiol* 1957;26:373–414.
- 226 2. **Bérdy J.** Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 2005;58:1–26.
- 227 3. **Li S, Tian X, Niu S, Zhang W, Chen Y et al.** Pseudonocardians A–C, New
228 Diazaanthraquinone Derivatives from a Deep-Sea actinomycete *Pseudonocardia*
229 sp. SCSIO 01299. *Marine Drugs* 2011; 9(8):1428-1439
- 230 4. **Prabahar V, Dube S, Reddy GSN, Shivaji S.** *Pseudonocardia antarctica* sp. nov.
231 an Actinomycetes from McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Syst Appl Microbiol*
232 2004;27:66-71.
- 233 5. **Tian XP, Long LJ, Li SM, Zhang J, Xu Y et al.** *Pseudonocardia*
234 *antitumoralis* sp. nov., a deoxyxyboquinone-producing actinomycete isolated from a
235 deep-sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:893-899.
- 236 6. **Sahin N, Veyisoglu A, Tatar D, Spröer C, Cetin D et al.** *Pseudonocardia*
237 *cypriaca* sp. nov., *Pseudonocardia salamisensis* sp. nov., *Pseudonocardia*
238 *hierapolitana* sp. nov. and *Pseudonocardia kujensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J*
239 *Syst Evol Microbiol* 2014;64:1703-1711.

- 240 7. Lee SD, Kim ES, Min KL, Lee WY, Kang SO *et al.* *Pseudonocardia*
241 *kongjuensis* sp. nov., isolated from a gold mine cave. *Int J Syst Evol Microbiol*
242 2001;51:1505-1510.
- 243 8. Trujillo ME, Idris H, Riesco R, Nouioui I, Igual JM *et al.* *Pseudonocardia nigra*
244 sp. nov., isolated from Atacama Desert rock. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;67:2980-
245 2985.
- 246 9. Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the
247 selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* 1987;65:501–509.
- 248 10. Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species.
249 *Int J Syst Bacteriol* 1966;16:313-340.
- 250 11. Waksman SA. *The Actinomycetes, vol. 2, Classification, Identification and*
251 *Description of Genera and Species*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1961.
- 252 12. Kelly KL. *Inter-Society Color Council – National Bureau of Standard Color*
253 *Name Charts Illustrated with Centroid Colors*. Washington, DC: US Government
254 Printing Office; 1964.
- 255 13. Arai T. *Culture Media for Actinomycetes*. Tokyo: The Society for Actinomycetes
256 Japan; 1975.
- 257 14. Williams ST, Cross T. Actinomycetes. In: Booth C (editor). *Methods in*
258 *Microbiology*, vol. 4. London: Academic Press; 1971; pp:295-334.
- 259 15. Gordon RE, Barnett DA, Handerhan JE, Pang CHN. *Nocardia coeliaca*,
260 *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *Int J Syst Bacteriol* 1974;24:54–63.
- 261 16. Smibert RM, Krieg NR. Phenotypic characterization. In: Gerhardt P, Murray
262 RGE, Wood WA, Krieg NR (ed). *Methods for General and Molecular Bacteriology*,
263 Washington, DC: American Society for Microbiology; 1994;pp:607-654.

- 264 17. Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of
265 aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* 1983;29:319–322.
- 266 18. Uchida K, Aida K. An improved method for the glycolate test for simple
267 identification of acyl type of bacterial cell walls. *J Gen Appl Microbiol* 1984;30:31–
268 134.
- 269 19. Komagata K, Suzuki KI. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics.
270 *Methods Microbiol* 1987;19:161-207.
- 271 20. Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M *et al.* An
272 integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar
273 lipids. *J Microbiol Methods* 1984;2:233-241.
- 274 21. Sasser M. *Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty*
275 *acids*. MIDI Technical Note 101. Newark: Microbial ID, Inc; 1990.
- 276 22. Kämpfer P, Kroppenstedt RM. Numerical analysis of fatty acid patterns of
277 coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol* 1996;42:989-1005.
- 278 23. Minnikin DE, Alshamaony L, Goodfellow M. Differentiation of
279 *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of
280 whole-organism methanolysates. *J Gen Microbiol* 1975;88:200–204.
- 281 24. Collins MD, Pirouz T, Goodfellow M, Minnikin DE. Distribution of
282 menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol* 1977;100:221-
283 230.
- 284 25. Tamaoka J. *Determination of DNA Base Composition*. In: Goodfellow M,
285 O'Donnell AG (editors). *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Chichester:
286 John Wiley & Sons; 1994; pp:463-470.
- 287 26. Thawai C. *Micromonospora costi* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus*
288 *speciosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;55:1456-1461.

- 289 27. **Tamaoka J, Komagata K.** Determination of DNA base composition by reversed-
290 phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* 1984;25:125-
291 128.
- 292 28. **Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E.** Fluorometric deoxyribonucleic acid-
293 deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to
294 membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic
295 relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:224-229.
- 296 29. **Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y et al.** Introducing EzBioCloud: A
297 taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst*
298 *Evol Microbiol* 2017; 67:1613-1617.
- 299 30. **Hall TA.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
300 analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95-98.
- 301 31. **Saitou N, Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing
302 phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-425.
- 303 32. **Felsenstein J.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood
304 approach. *J Mol Evol* 1981;17:368-376.
- 305 33. **Fitch WM.** Toward defining the course of evolution: minimum change for a
306 species tree topology. *Sys Zoo* 1972; 20: 406-416.
- 307 34. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** MEGA6:Molecular
308 Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*
309 2013;30:2725-2729.
- 310 35. **Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rates of base
311 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*
312 1980;16:111-120.

- 313 36. **Felsenstein J.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.
314 *Evolution* 1985;39:783-791.
- 315 37. **Huang Y, Goodfellow M.** *Pseudonocardia*. In: *Bergey's Manual of Systematics*
316 *of Archaea and Bacteria*. 2015. pp.1–32.
- 317 38. **Schäfer J, Busse HJ, Kämpfer P.** *Pseudonocardia parietis* sp. nov., from the
318 indoor environment *Int J Syst Evol Microbiol* 2009; 59:2449-2452.
- 319 39. **Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O et al.** Report
320 of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J*
321 *Syst Bacteriol* 1987;37:463-464.
- 322

Table 1.

Characteristics	Strain NW8-21 ^T	<i>P. endophytica</i> DSM44969 ^T	<i>P. nantongensis</i> NBRC108677 ^T
Nitrate reduction to nitrite	-	-	+
Urease activity	-	-	+
Maximum NaCl tolerance (%w/v)	7	5	7
Maximum temperature for growth (°C)	30	37	30
The pH range for growth	5-10	6-8	6-9
Acid production from :			
L-arabinose	+	-	+
L-rhamnose	+	-	+
D-raffinose	+	-	-
D-cellobiose	+	-	-
D-mannitol	+	-	-
D-manose	+	-	-
D-xylose	+	-	+
Glycerol	+	-	-
<i>myo</i> -inositol	+	-	-
Hydrolysis of:			
Starch	+	-	+
Tyrosine	-	+	-

326 **Figure and Table legends**

327 **Fig. 1.** Neighbour-joining tree (Saitou & Nei, 1987) based on almost-complete 16S rRNA
328 gene sequences (1,450 nt) showing the relationships between strain NW8-21^T, the
329 *Pseudonocardia* species with validly-published names and members of the genera
330 *Actinomycetospora*, *Actinoalloteichus*. *Actinopolyspora halophile* was used as an
331 outgroup. Asterisks (*) indicating the branches of the tree that were also found using the
332 maximum-parsimony and maximum-likelihood methods. The numbers on the branches
333 indicate the percentage bootstrap values of 1,000 replicates; only values $\geq 50\%$ are
334 indicated. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

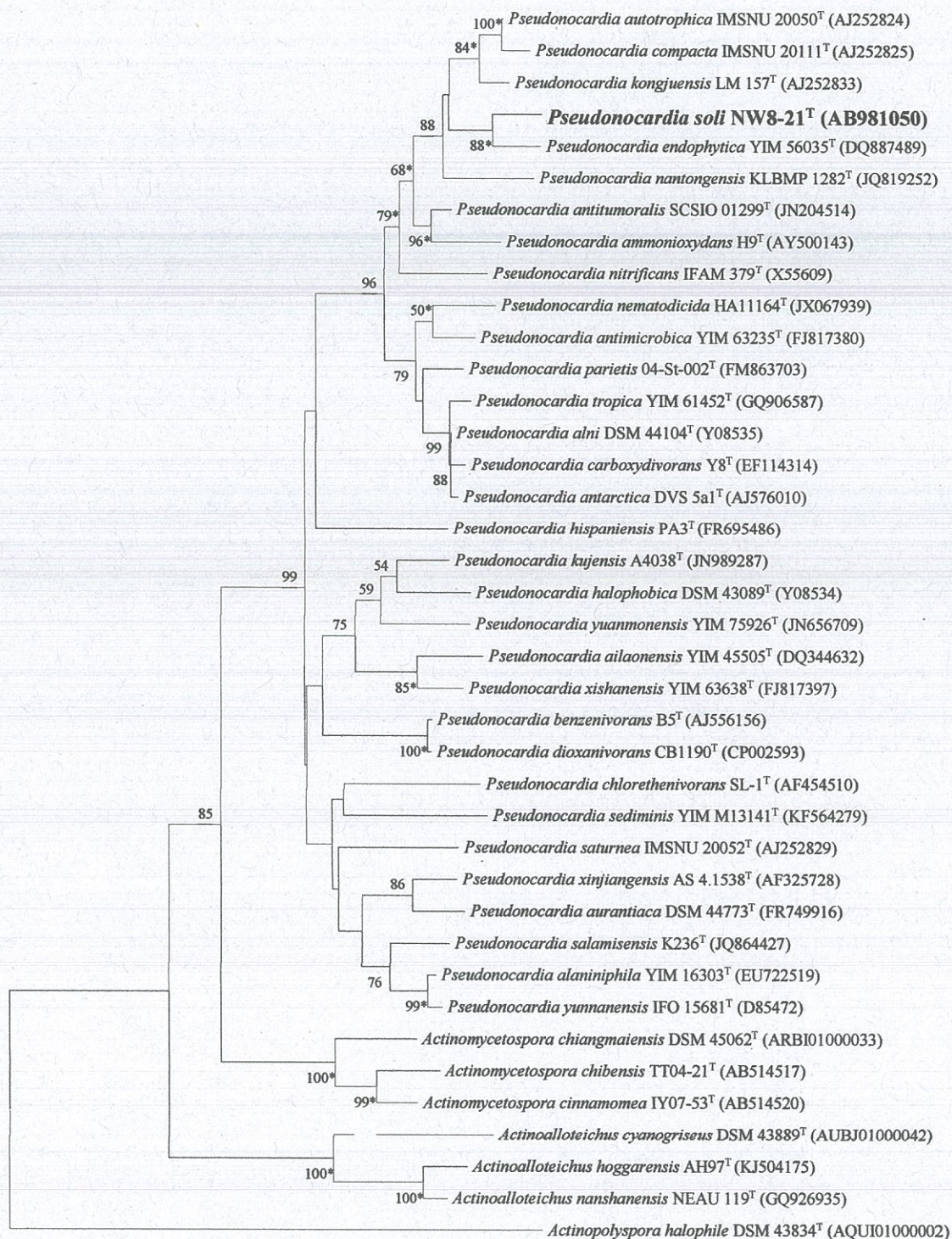
335

336 **Table 1.** Differential characteristics of strain NW8-21^T and the closest phylogenetically
337 relative, *P. endophytica* DSM44969^T and *P. nantongensis* NBRC108677^T.

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

Figure 1 NJ Tree of NW8-21

[Click here to download Figure Submit Fig. 1 Phylogenetic tree of NW8-21.docx](#)



0.01

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)

Pseudonocardia soli sp. nov., isolated from soil

Chitti Thawai^{1,2}

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

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

Running title: *Pseudonocardia soli* sp. nov.

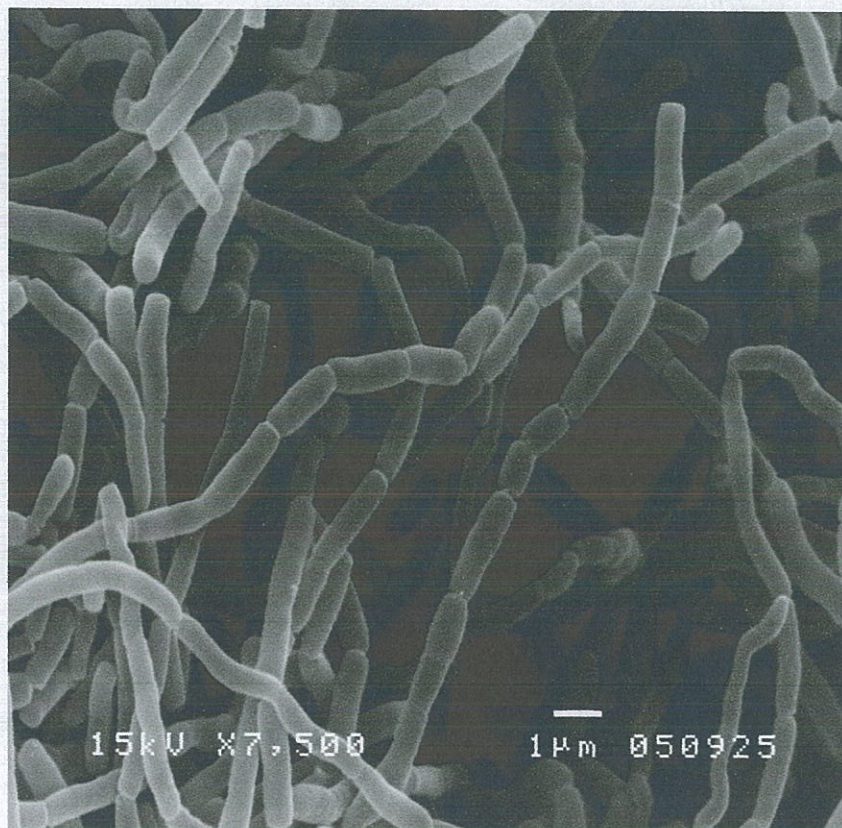
Subject category: New taxa - *Actinobacteria*

Correspondence

Chitti Thawai

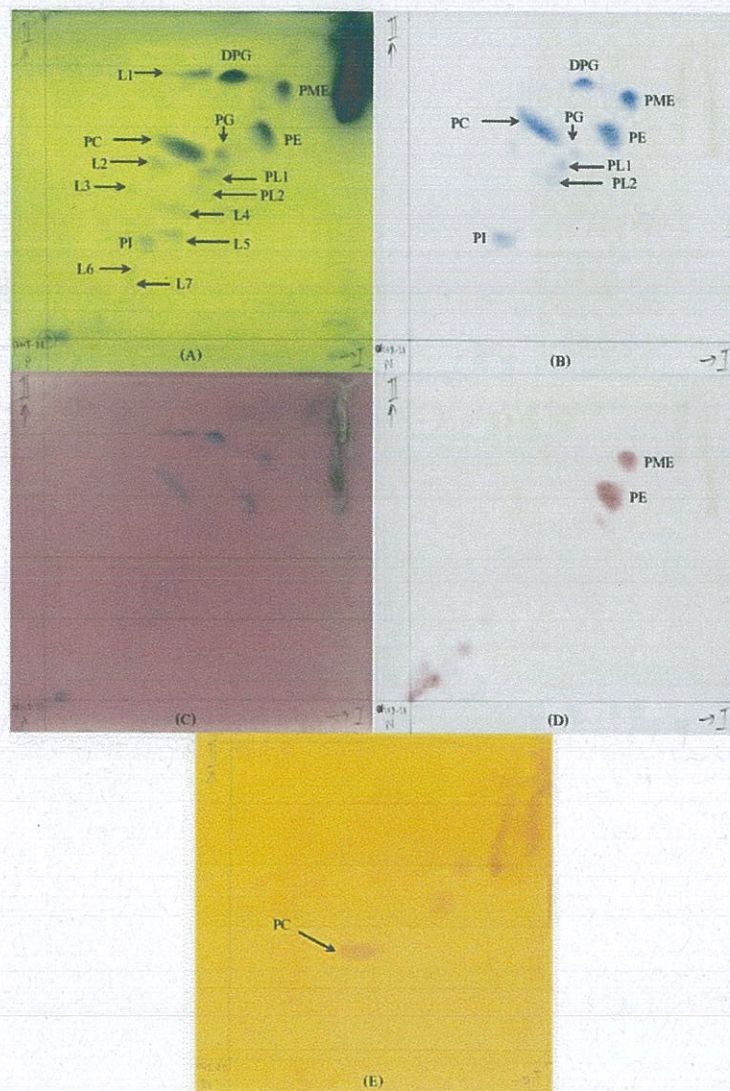
Chitti.th@kmitl.ac.th

Supplementary Fig. S1. Scanning electron micrograph of strain NW8-21^T grown on soil extract agar for 30 days at 30°C. Bar, 1 μm.

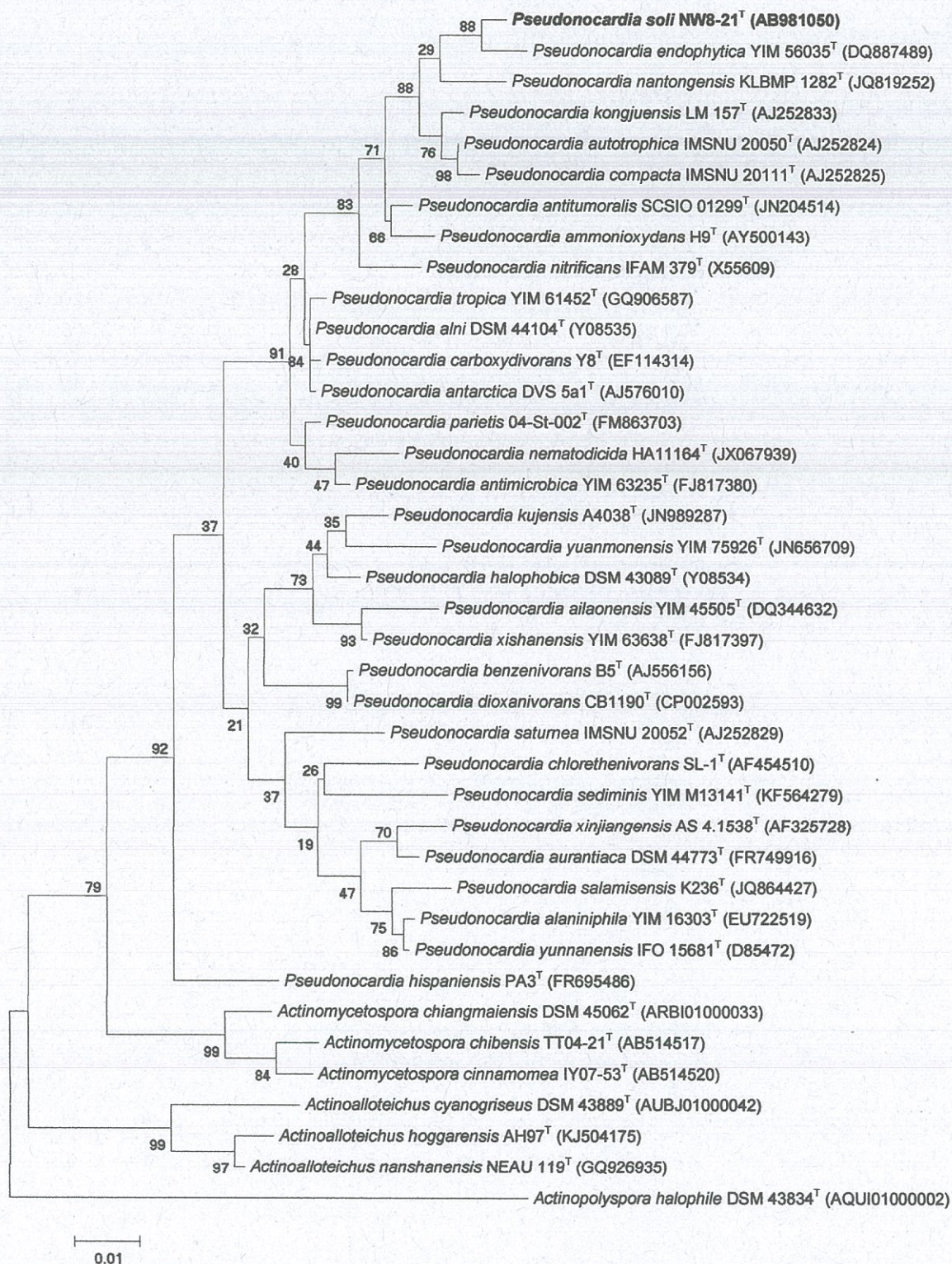


Supplementary Fig. S2 Polar lipid appearing on the two-dimensional thin-layer chromatograms of strain NW8-21^T.

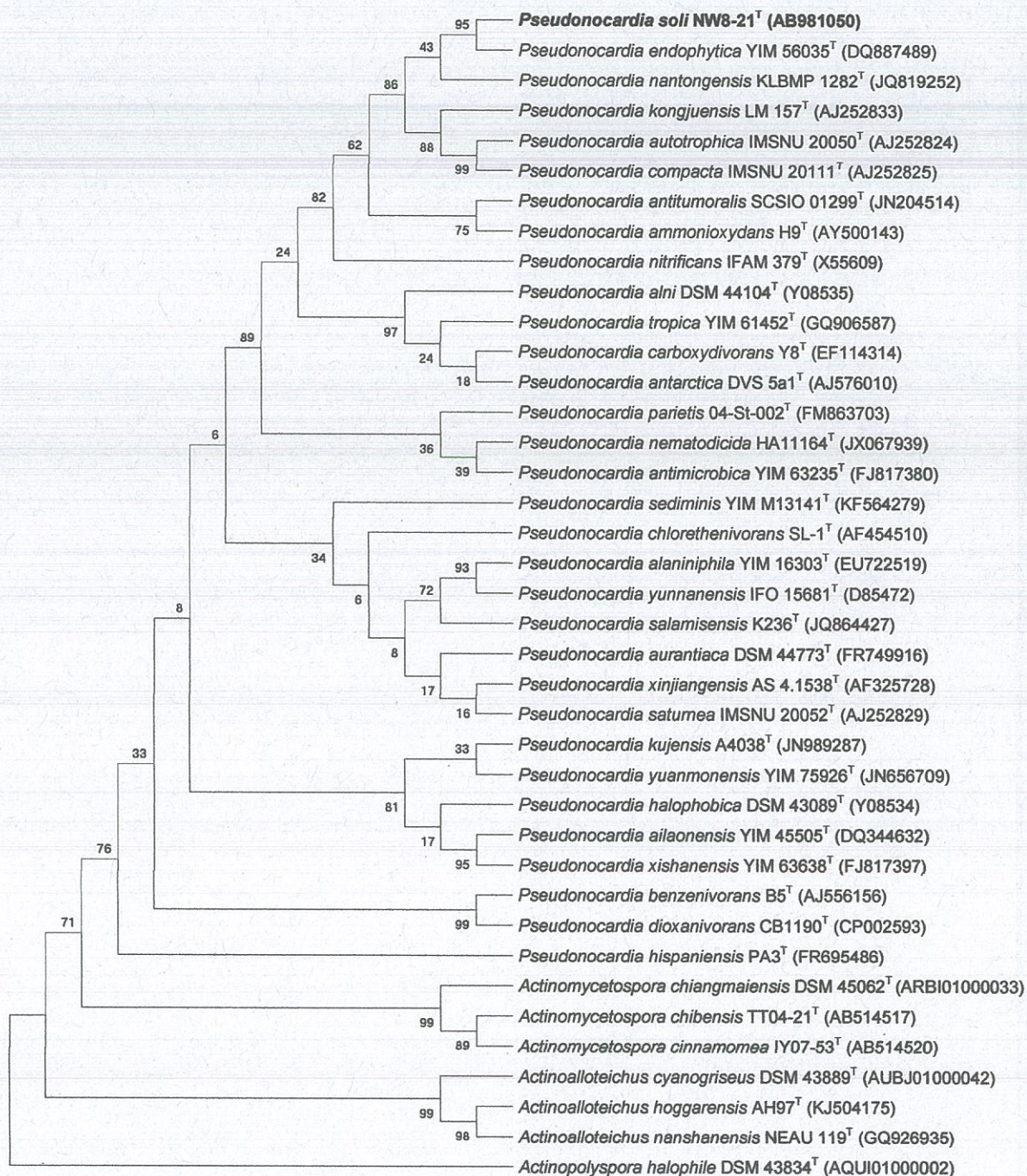
(A) Phosphomolybdic acid's TLC chromatogram; (B) Dittmer & Lester's TLC chromatogram; (C) Anisaldehyde's TLC chromatogram; (D) Ninhydrin's TLC chromatogram; (E) Dragendorff's TLC chromatogram; Abbreviation: DPG, diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PME, phosphatidylmethylethanolamine; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; PI, phosphatidylinositol; PL, phospholipid; L, lipid.



Supplementary Fig. S3 Phylogenetic tree based on the nearly complete 16S rRNA gene sequences (1450 nt) of strain NW8-21^T and other members of the genus *Pseudonocardia*. The tree was reconstructed with the maximum-likelihood method. *Actinopolyspora halophila* DSM43834^T was used as outgroup. Numbers on branches represent the bootstrap values as the percentage of 1000 replicates. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.



Supplementary Fig. S4 Phylogenetic tree based on the nearly complete 16S rRNA gene sequences (1450 nt) of strain NW8-21^T and other members of the genus *Pseudonocardia*. The tree was reconstructed with the maximum-parsimony method. *Actinopolyspora halophile* DSM43834^T was used as outgroup. Numbers on branches represent the bootstrap values as the percentage of 1,000 replicates.



Supplementary Table S1. Cellular fatty acid composition of strain NW8-21^T

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

Fatty acids	Strain NW8-21^T	<i>P. endophytica</i> DSM44969^T
Saturated fatty acids		
C _{12:0} 3-OH	0.4	-
C _{14:0}	0.1	-
C _{16:0}	1.3	1.1
C _{17:0}	0.6	4.2
C _{18:0}	0.3	0.9
Unsaturated fatty acids		
C _{16:1} ω7c	2.3	-
C _{16:1} ω9c	-	2.2
C _{17:1} ω6c	2.4	-
C _{17:1} ω8c	0.7	-
C _{17:1} ω9c	1.0	7.1
C _{18:1} ω9c	0.2	3.2
Branched fatty acids		
iso-C _{12:0}	0.6	-
iso-C _{13:0}	0.2	-
iso-C _{14:0}	3.6	1.8
iso-C _{15:0}	1.4	13.6
anteiso-C _{15:0}	0.2	-
iso-C _{16:0}	68.4	44.0
iso-C _{16:0} 3-OH	0.3	-
iso-C _{16:1} H	9.3	7.2
iso-C _{17:0}	1.2	3.2
anteiso-C _{17:0}	1.7	2.1
iso-C _{18:0}	1.6	2.6
10-methyl-C _{16:0}	1.2	5.1
10-methyl-C _{17:0}	1.0	1.7

Supplementary Table S2. DNA–DNA relatedness among the strain NW8-21^T and its closest phylogenetic neighbours in the genus *Pseudonocardia*.

Strains	DNA–DNA binding (%) with labelled DNA from*:		
	1	2	3
1. NW8-21 ^T	100	38.7 ± 1.1	30.8 ± 0.4
2. <i>P. endophytica</i> DSM44969 ^T	39.3 ± 0.5	100	38.1 ± 0.8
3. <i>P. nantongensis</i> NBRC108677 ^T	31.1 ± 0.2	35.7 ± 0.4	100

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