Medium Optimization for Production of Anti-Phytopathogenic Compound
by Endophytic Fungus *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6
using Response Surface Methodology

Miss Pattharaporn Saengthong B.Sc. (Microbiology)

A Thesis Submitted In Partial Fulfillment of the Requirements for
The Degree of Master of Science (Biotechnology)
School of Bioresources and Technology
King Mongkut's University of Technology Thonburi
2013

Thesis Committee

…… Chairman of Thesis Committee
(Asst. Prof. Phenjun Mekvichitsaeng, Ph.D.)

……. Member and Thesis Advisor
(Lect. Taweerat Vichitsoonthonkul, Ph.D.)

……. Member
(Asst. Prof. Sansanalak Rachdawong, Ph.D.)

……. Member
(Lect. Saengchai Akeprathumchai, Ph.D.)

……. Member
(Vasimon Ruanglek, Ph.D.)

Copyright reserved

Thesis Title	Medium Optimization for Production of Anti-Phytopathogenic Compound by Endophytic Fungus *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6 using Response Surface Methodology
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Pattharaporn Saengthong
Thesis Advisor	Dr. Taweerat Vichitsoonthonkul
Program	Master of Science
Field of Study	Biotechnology
Department	Biotechnology
Faculty	School of Bioresources and Technology
Academic Year	2013

ABSTRACT

NHL-L 6/6 is an endophytic fungus of *Stemona burkillii* which shows high activity against some plant pathogens. In this study, NHL-L 6/6 was identified by comparative analysis of nucleotide sequences of the internal transcribed spacer (ITS) regions of the ribosomal RNA genes. The result showed that NHL-L6/6 has sequence similarlity of 99.79% with *Nodulisporium* sp. CMUUP-E34. Therefore it is reasonable to conclude that NHL-L6/6 is *Nodulisporium* sp. The kinetics of growth and anti-phytopathogenic compound production by *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6 against *Erwinia caratovora* was studied by cultivation in Sucrose Yeast extract (SY) medium. The maximum yield reached 16.01±1.51 AU/mL after 5 days of fermentation at 28 °C, 150 rpm. A rapid growth was exhibited during the period of 2-4 days, with the highest cell dry weight of 4.85 g/L at day 4 of cultivation. The medium components including carbon and nitrogen sources were optimized for production of anti-phytopathogenic compounds using a sequential optimization strategy. Firstly, the suitable carbon and nitrogen sources were selected by one-factor-at-a-time. Yeast extract, whey, sucrose, glucose and cassava starch had significant influences on anti-phytopathogenic compound production. The nitrogen and carbon sources including whey, yeast extract, sucrose and glucose were selected to investigate their effects on antibacterial activity by using fractional factorial design (FFD). The result showed that sucrose and glucose were statistically significant (p<0.05), while yeast extract and whey, were statistically insignificant (p>0.05). However, all constituents, i.e. yeast extract, whey, sucrose, glucose were statistically significant (p<0.05) on biomass production. It was concerned that nitrogen is an essential nutrient for cell growth. Therefore, all variables were chosen for further optimization study. In the steepest ascent experiment, the highest production response (37.61 ± 0.00 AU/mL) was found when the concentrations of yeast extract, whey, sucrose and glucose were 2 g/L, 10 mL/L, 20 g/L and 10 g/L, respectively, after 6th day of cultivation. Finally, central composite design (CCD) was used to optimize the concentration of these components. The optimal concentration were 2.03 g/L yeast

extract, 9.86 mL/L whey, 25.08 g/L sucrose and 12.99 g/L glucose. Antibacterial activity of 42.11 AU/mL was agreement with the prediction observed in validation experiment. In comparison to unoptimized medium using one-factor-at-a-time method, 2.4 folds of antibacterial activity had been obtained. To evaluate *in vitro* antimicrobial susceptibility of crude extracts against test plant pathogens, bacterial pathogens (i.e. *Erwinia caratovora*, *Pseudomonas solanacearum* and *Xanthomonas citrii*) and fungal pathogens (i.e. *Alternaria brassicicola, A. porri, Penicillum* sp., *Fusarium solani, F. oxysporum*, and *Colletotrichum* sp.) were used as test microorganisms. The minimum inhibitory (MIC) concentrations were found in the range of 31.25 to 125 µg/mL. The minimum fungicidal (MFC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations were found in the range of 125 to 500 µg/mL.

Keywords: Antimicrobial Activity / Anti-phytopathogenic Compounds / Medium Optimization / *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารต้านเชื้อสาเหตุโรคพืชจากราเอนโดไฟท์ *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6 โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นางสาวภัทราภรณ์ แสงทอง
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล
หลักสูตร	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
คณะ	ทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ NHL-L 6/6 ของต้นหนอนตายหยาก (*Stemona burkillii*) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ได้ถูกจำแนกชนิดในการศึกษานี้ โดยใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวของ NHL-L 6/6 คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของรา *Nodulisporium* sp. CMUUP-E34 คิดเป็นร้อยละ 99.79 ดังนั้น ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ NHL-L 6/6 จึงเป็นราในสกุล *Nodulisporium* เมื่อทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์ระหว่างการหมักในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสและสารสกัดจากยีสต์ พบว่า สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อก่อโรคพืช *Erwinia caratovora* ในอาหารดังกล่าวได้สูงสุดที่ 16.01 หน่วย/มิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการหมัก เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 2 ถึง วันที่ 4 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 4.85 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที ในการศึกษาเพื่อหาส่วนประกอบของอาหารได้แก่ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารต้านเชื้อสาเหตุโรคพืช ด้วยวิธีการศึกษาทดลองทีละปัจจัย พบว่า สารสกัดจากยีสต์ หางนม น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และแป้งมันสำปะหลัง มีอิทธิพลต่อการผลิตสารต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืช *Erwinia caratovora* อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น สารสกัดจากยีสต์ หางนม น้ำตาลซูโครส และน้ำตาล จึงถูกนำไปศึกษาอิทธิพลต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการออกแบบการทดลองเศษส่วน

เชิงแฟคทอเรียล (Fractional Factorial Design) ผลการทดลองแสดงว่า น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคส มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ขณะที่สารสกัดจากยีสต์และหางนม ไม่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) อย่างไรก็ตาม เมื่อศึกษาอิทธิพลของสารสกัดจากยีสต์ หางนม น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคส ต่อการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟท์ พบว่า ทุกปัจจัยมีผลต่อการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟท์อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์เพื่อผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ ไนโตรเจนเป็นสารอาหารจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของรา ดังนั้น ทั้งสี่ปัจจัย ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ หางนม น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคส จึงถูกเลือกไปทำการทดลองด้วยวิธี steepest ascent เพื่อหาทิศทางไปสู่สภาวะที่ทำให้เชื้อราสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อสูงสุด พบว่า ในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ 2 กรัม/ลิตร หางนม 10 มิลลิลิตร/ลิตร ซูโครส 20 กรัม/ลิตร และกลูโคส 10 กรัม/ลิตร ทำให้รา *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6 สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อสูงถึง 37.61 หน่วย/มิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้น Central Composite Design จึงถูกนำมาใช้เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยเพื่อให้ได้ปริมาณสารยับยั้งการเจริญของเชื้อสูงสุด พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ 2.03 กรัม/ลิตร หางนม 9.86 มิลลิลิตร/ลิตร ซูโครส 25.08 กรัม/ลิตร และกลูโคส 12.99 กรัม/ลิตร ทำให้เชื้อราสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อสูงสุดเท่ากับ 42.11 หน่วย/มิลลิลิตรในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อในวิธีการศึกษาทดลองทีละปัจจัยถึง 2.4 เท่า นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองศึกษาความไวของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคพืชต่อสารยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยสารสกัดหยาบ เชื้อก่อโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพประกอบด้วยแบคทีเรีย (ได้แก่ *Erwinia caratovora, Pseudomonas solanacearum* และ *Xanthomonas citrii*) และเชื้อรา (ได้แก่ *Alternaria brassicicola, A. Porri, Penicillum* sp., *Fusarium solani, F. oxysporum* และ *Colletotrichum* sp.) พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) อยู่ในช่วงของ 31.25 ถึง 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และเชื้อรา (MFC) อยู่ในช่วง 125 ถึง 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

คำสำคัญ: การหาสูตรอาหารที่เหมาะสม / ฤทธิ์ต้านจุลชีพ / สารต้านเชื้อสาเหตุโรคพืช / *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank all people who have advised me during my master degree study.

First, I would like to express my very great appreciation to my supervisor, Dr. Taweerat Vichitsoonthonkul, for her patience, valuable and constructive suggestions during the planning and development of this research work. Her willingness to give her time so generously has been very much appreciated.

Besides my advisor, I gratefully acknowledge Dr. Saengchai Akeprathumchai for valuable advising in designing and analysis of the statistical experiments.

I would like to thank the rest of my thesis committee: Asst. Prof. Phenjun Mekvichitsaeng, Asst. Prof. Sansanalak Rachdawong, Dr. Vasimon Ruanglek and Dr. Saengchai Akeprathumchai for their encouragement, insightful comments and advising in discussion.

In my daily work I have been blessed with the friendly lab mates. I am grateful for time spent with all my lab mates at the Biodiversity Laboratory which have helped me in research and became my good friends.

Finally, my deepest gratitude goes to my mother, my Hope Church leaders and my friends who deserve special mention for their inseparable support and prayers. They are person who sincerely raised me with their caring and gently love.

CONTENTS

		PAGE
ENGLISH ABSTRACT		ii
THAI ABSTRACT		iv
ACKNOWLEDGEMENTS		vi
CONTENTS		vii
LIST OF TABLES		x
LIST OF FIGURES		xii
LIST OF ABBREVIATIONS		xiv
CHAPTER		
1. INTRODUCTION		1
1.1	Background	1
1.2	Objectives	2
1.3	Scopes	3
1.4	Expected outputs	3
2. LITERATURE REVIEW		4
2.1	Endophytic fungi and plant interaction	4
2.2	Identification of endophytic fungi	5
2.2.1	Morphological identification	6
2.2.2	Molecular based identification	6
2.3	The *Nodulisporium* sp. as producer of bioactive compounds	11
2.3.1	Insecticidal compounds	11
2.3.2	Antimicrobial compounds	12
2.3.3	Antitumor and anticancer compounds	12
2.3.4	Volatile antimicrobial compounds	13
2.4	The influence of culture medium components on production of fungal secondary metabolites	14
2.4.1	Carbon	14
2.4.2	Nitrogen	16
2.5	One-variable-at-a-time-technique versus experimental design	17
2.6	Response surface methodology (RSM)	18
2.6.1	Screening experimental designs	18
2.6.2	Steepest ascent method	21
2.6.3	Optimization experimental designs	21

PAGE

3. METHODOLOGY 24

3.1 Microorganism 24

3.1.1 Endophytic fungal strain 24

3.1.2 Plant pathogenic strains 24

3.2 Preservation of microorganism 24

3.3 Molecular technique based identification of an endophytic fungus 25

3.3.1 Fungal DNA extraction 25

3.3.2 Measurement of DNA concentration 26

3.3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) 26

3.3.4 Purification of PCR products 27

3.3.5 DNA sequencing 27

3.4 Inoculum preparation for liquid culture 27

3.5 Cultivation of NHL-L6/6 in liquid medium 28

3.5.1 Cultivation of NHL-L6/6 in Sucrose Yeast extract medium 28

3.5.2 Screening of the optimal nitrogen and carbon sources for anti-phytopathogenic compound production 28

3.6 Experimental design 29

3.6.1 Selection of the significant components using a fractional factorial design (FFD) 29

3.6.2 Locating the region of optimum response by the steepest ascent design 31

3.6.3 Optimization of the significant components concentrations using a central composite design (CCD) 32

3.7 Antimicrobial activity against bacterial and fungal pathogens of anti-phytopathogenic compounds 35

3.7.1 Anti-phytopathogenic compounds 35

3.7.2 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) 35

3.7.2.1 Antibacterial activity test 35

3.7.2.2 Antifungal activity test 35

3.7.3 Determination of minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC) 36

4. RESULTS AND DISCUSSION 37

4.1 Morphology of an endophytic fungus NHL-L 6/6 37

4.2 Identification of NHL-L 6/6 by using nucleotide sequence of the ITS region of the ribosomal RNA gene 37

4.2.1 Preparation of genomic DNA and ITS regions 38

4.2.2 DNA sequence analysis 39

4.3 Cultivation of *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6 in Sucrose Yeast extract (SY) medium 39

PAGE

4.4	Effect of nitrogen and carbon sources on anti-phytopathogenic compound production	41
4.4.1	Effect of nitrogen sources	42
4.4.2	Effect of carbon sources	45
4.5	Experimental design and optimization by response surface methodology	49
4.5.1	Screening of medium components using fractional factorial design	49
4.5.2	The steepest ascent experiment	53
4.5.3	Central composite design	55
4.6	Antimicrobial activity of anti-phytopathogenic compounds against plant bacterial and fungal pathogens	64
5.	**CONCLUSION AND RECOMMENDATION**	69
5.1	Conclusion	69
5.1.1	Identification of NHL-L 6/6	69
5.1.2	Characteristics of growth and anti-phytopathogenic compound production	69
5.1.3	Effect of nitrogen and carbon sources on anti-phytopathogenic compound production	69
5.1.4	Experimental design and optimization by response surface methodology	70
5.1.5	Antimicrobial activity of anti-phytopathogenic compounds against plant bacterial and fungal pathogens	71
5.2	Recommendation	71
REFERENCES		72
APPENDICES		86
A	Experimental results	87
B	Media and chemical preparation	100
C	Analytical method	104
CURRICULUM VITAE		109

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Primers for amplification of fungal ribosomal RNA genes	10
2.2	Two-level fractional factorial designs with resolution	20
3.1	The selected variables and their corresponding concentrations employed in FFD.	30
3.2	Experimental design of 2^{4-1} fractional factorial design employed.	30
3.3	The concentrations of medium composition along the path of steepest ascent	32
3.4	Levels of variables used in the CCD experiment	33
3.5	The concentrations of composition used in the CCD experiment	34
4.1	Closest matches of fungal ITS sequences	39
4.2	The experimental design and results of 2^{4-1} FFD for biomass and antimicrobial activity at day 6.	51
4.3	Regressive analyses 2^{4-1} FFD using antibacterial activity at day 6 as response.	51
4.4	Analysis of variance (ANOVA) for antibacterial activity	52
4.5	Regressive analyses 2^{4-1} FFD using biomass at day 6 as response.	52
4.6	Analysis of variance (ANOVA) for biomass	52
4.7	Results of antimicrobial activity along the path of steepest ascent	54
4.8	The experimental design and results of CCD for antibacterial activity at day 6.	56
4.9	Regressive analysisof CCD using antibacterial activity at day 6 as response	56
4.10	Analysis of variance (ANOVA) for antimicrobial activity	59
4.11	Plant pathogens and diseases	65
4.12	MIC, MBC and MFC (μg/mL) of crude of *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6 culture broth against plant pathogens	66
4.13	Effect of ethyl acetate extract of *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6 culture broth against plant pathogens	67
5.1	Summary of experimental optimization in this study	70
A.1	Effect of nitrogen sources on anti-phytopathogenic compound production	90
A.2	pH of culture media in preliminary screening of nitrogen sources	90
A.3	Effect of carbon sources on anti-phytopathogenic compound production	91
A.4	pH of culture media in preliminary screening of carbon sources	91
A.5	Corresponding responses of fractional factorial design in terms of biomass	92

TABLE		PAGE
A.6	Corresponding responses of fractional factorial design in terms of antimicrobial activity	93
A.7	The experimental design and results of CCD for antimicrobial activity	96
C.1	Calculation of Natural logarithm of arbitrary unit of Mercury (II) Chloride concentration and corresponding antimicrobial activity against *E. caratovora*	106
C.2	The optical density at 490 nm of glucose concentration between 0-100 µg/mL	107

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	Fungal nuclear ribosomal RNA	8
2.2	Internal transcribed spacer (ITS) region primers map	9
2.3	Schematic representation of CCD for two factors	23
4.1	Colony morphology of fungal endophyte NHL-L6/6 on PDA plate.	37
4.2	(a) The genomic DNA of NHL-L 6/6. (b) The PCR product of ITS region from NHL-L 6/6 DNA using ITS1 and ITS4 as primers. The genomic DNA of about 21 Kb (Lane 1 in Figure 4.2 (a)) and PCR products of about 564 bp (Lane 1 in Figure 4.2 (b)) were observed on 0.8% agarose gel. Lanes M (marker) contained Lambda DNA cut with EcoRI and Hind III restriction enzyme.	38
4.3	Cultivation of *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6 in Sucrose Yeast extract (SY) medium. The experimental data (symbol) for biomass (-○-), antimicrobial activity (-□-), residual sugar (-●-), and pH (-■-) were represented.	41
4.4	Effect of nitrogen sources on anti-phytopathogenic compound production Effect of nitrogen sources on anti-phytopathogenic compound production. The experimental data (symbol) for whey (▬), yeast extract (▨), ammonium sulfate (▬), and urea (▭) were represented.	42
4.5	pH of culture media in preliminary screening of nitrogen sources. The experimental data (symbol) for whey (-●-), yeast extract (-○-), ammonium sulfate (-□-), and urea (-■-) were represented.	44
4.6	Effect of carbon sources on antimicrobial compound production. The experimental data (symbol) for glucose (▬), sucrose (▨), cassava starch (▬), and molasses (▭) were represented.	46
4.7	pH of culture media in preliminary screening of carbon sources. The experimental data (symbol) for sucrose (-●-), glucose (-○-), cassava starch (-□-), and molasses (-■-) were represented.	48
4.8	The path of steepest ascent and results for antimicrobial activity at day 6	54
4.9	Three-dimensional response surface and (b) contour plot of antimicrobial compound production at 28°C under 150 rpm as the combined effect of whey and glucose.	62
4.10	Three-dimensional response surface and (b) contour plot of antimicrobial compound production at 28°C under 150 rpm as the combined effect of yeast extract and whey.	63
A.1	CLUSTAL 2.1 pairwise sequence alignment between internal transcribed spacer of ribosomal RNA gene of NHL-L 6/6 and *Nodulisporium* sp. CMUUP-E34 (accession no. JN558831.1). The asterisk (*) indicates the same base.	87

FIGURE **PAGE**

A.2	CLUSTAL 2.1 pairwise sequence alignment between internal transcribed spacer of ribosomal RNA gene of NHL-L 6/6 and *Nodulisporium* sp. JP3821 (accession no. AF280627.1). The asterisk (*) indicates the same base.	88
A.3	CLUSTAL 2.1 pairwise sequence alignment between internal transcribed spacer of ribosomal RNA gene of NHL-L 6/6 and *Hypoxylon* sp. WHCS-8 (accession no. JQ362418.1). The asterisk (*) indicates the same base, horizontal line (-) represents gap.	89
A.4	Pareto chart of the standardized effect of antimicrobial activity	94
A.5	Normal probability plot of the residual of antimicrobial activity	94
A.6	Pareto chart of the standardized effect of biomass	95
A.7	Normal probability plot of the residual of biomass	95
A.8	Normal plot of residuals of CCD	97
A.9	A sticky brown color crude ethyl acetate extract after evaporation	97
A.10	MBC (µg/mL) of crude extract of *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6 culture broth against plant pathogenic bacteria	98
A.11	MFC (µg/mL) of crude extract of *Nodulisporium* sp. NHL-L 6/6 culture broth against plant pathogenic bacteria	99
C.1	Correlation between natural logarithm of arbitrary unit of mercury (II) Chloride concentration and the square of the distance between the edge of wells and the edge of inhibition zone with corresponding equation of y = 3.3063x-1.1339 (R^2 = 0.9963).	106
C.2	Standard curve of glucose concentration (µg/mL) at optical density 490 nm for total sugar determination.	108

LIST OF ABBREVIATIONS

µL	=	microliter
mL	=	milliliter
L	=	liter
mL/L	=	milliliter per liter
µg	=	microgram
mg	=	milligram
g	=	gram
Kg	=	Kilogram
µg/µL	=	microgram per microliter
µg/mL	=	microgram per milliliter
g/L	=	gram per liter
AU	=	Arbitrary Unit
O.D.	=	optical density
rpm	=	round per minute
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume
ºC	=	degree Celsius
pmol	=	picomole
mM	=	milliMolar
et al.	=	et alli (and others)
i.e.	=	id est (that is)
e.g.	=	exempli gratia (for example)
sp.	=	species
bp	=	base pair