Thesis Title Diversity of Rare Actinomycetes from Soils and Their Antibiotics Production

Author Miss Nareeluk Nakaew

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee
Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Chairperson
Dr. Wasu Pathom-aree Member
Asst. Prof. Dr. Puttinan Meepowpan Member

ABSTRACT

A total of 692 actinomycetes were collected from medicinal plant rhizosphere soils in Nongbualamphu province and cave soils in Phrae and Nan province. The 420 isolates belonging to *Streptomyces* based on long chain spore formation and cell wall amino acid contained LL-DAP. The 272 isolates belong to rare actinomycete group. The soil pH that ranging from 5.24-8.29 was not affected to the number of *Streptomyces* and rare actinomycetes in each sites.

A total of 377 actinomycetes were isolated from 8 soil samples collected from Phatup Cave Forest Park and Phanangkhoi cave in northern Thailand. The 168 rare actinomycete strains (44.56%) were distinguished from streptomycete by spore formation and isomer of DAP. Fifty isolates of all rare actinomycetes belong to genus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Micromonospoara due to its single spore formation. Eleven randomly selected isolates of all rare actinomycetes were identified by using phenotypic data combined with 16S rDNA sequence-based phylogenetic analysis. Phylogenetic tree revealed that 3 of 11 randomly selected isolates might represent a new species. Less explored genera, *Spirillospora*, *Catellatospora* and *Nonomuraea* that less report even in large study areas were also found. This is the first record on isolation of *Spirillospora* and *Nonomuraea* from cave soil. Furthermore, they showed both anti Gram-positive bacteria and anti-cancer activity. These results indicated that cave is a great place to look for new actinomycete species that might be a source of novel bioactive compounds.

All rare actinomycetes obtained were screened for antimicrobial activities. They did not show antimicrobial activities on every test in primary screening step. However, 15 rare actinomycetes were showed anti-Gram-positive and 6 isolates were showed anti-cancer activities when culture in 6 fermentation broth. Because of their interesting phenotypic character and showing strong anti-Gram-positive bacteria and anti-cancer activity, PNK470 and PT708 were selected for identification of their substances. They were identified to species level. On the basis of 16S rRNA gene sequence similarity studies, PNK470 and PT708 were shown to belong to genus *Spirillospora* and *Nonomuraea*, respectively. Furthermore they might be new species of these genera.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Five media components were examined for their significance on antibiotics production using Plackett-Burman design. Glucose and soybean meal was found to promote the antibiotic production of PNK470 and PT708. The optimum concentration or these two media components and culture condition were examined using one-

variable-at-one-a-time design. The result shows that the optimum glucose concentration for PNK470 and PT708 was 40 g/l. The optimum soybean meal for PNK470 and PT708 was 3 g/l. The optimum conditions for PNK470 and PT708 in submerge fermentation were initial pH 7 and incubated at 30 ºC. Optimum incubation period for PNK470 and PT708 was 21 and 15 days respectively.

The minimum inhibitory concentration MIC values of crude extract from PNK470 against *Bacillus subtilis* and Methicillin resistant *Staphylococcus aereus* was 23.1 µg/ml and *Paenibacillus larvae* was 185 µg/ml. The MIC value of crude extract from isolate PT708 against *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus larvae* was 5.79 µg/ml and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was 11.5 µg/ml. Column chromatographic technique (Sephadex LH-20) was used for partial antimicrobial substance purification. However, the crude extract was not enough to separate to get pure compound.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายของแอคติโนไมซีสต์ที่หายากจากดิน และการผลิตสารปฏิชีวนะ

ผู้เขียน นางสาวนารีลักษณ์ นาแก้ว

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. สายสมร ลำยอง	ประธานกรรมการ
ดร. วสุ ปฐมอารีย์	กรรมการ
ผศ. ดร. พุฒินันท์ มีเผ่าพันธุ์	กรรมการ

บทคัดย่อ

แอคติโนไมซิสต์ (Actinomycetes) จำนวน 692 ไอโซเลท แยกได้จากดินรอบรากพืชสมุนไพรในจังหวัดหนองบัวลำภู และดินจากถ้ำในจังหวัดแพร่และน่าน 420 ไอโซเลท คือ จีนัส *Streptomyces* โดยดูจากลักษณะของการสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวและผนังเซลล์มี LL-DAP เป็นส่วนประกอบ 272 ไอโซเลท เป็นกลุ่มแอคติโนไมซิสต์ที่หายาก ตัวอย่างดินมีค่าความเป็นกรดด่าง 5.24-8.29 ซึ่งไม่มีผลต่อปริมาณของจีนัส *Streptomyces* และ กลุ่มของแอคติโนไมซิสต์ที่หายากในแต่ละแหล่ง

แอคติโนไมซิสต์ทั้งหมด 377 ไอโซเลท แยกได้จากดินในวนอุทยานถ้ำผาตูบและถ้ำผานางคอย พบแอคติโนไมซีสต์ที่หายาก 168 ไอโซเลท (44.56%) เป็นจีนัส *Micromonospora* 50 ไอโซเลท แอคติโนไมซีสต์ที่หายากที่มีลักษณะโคโลนีต่างกัน11ไอโซเลทได้รับการคัดเลือกแบบสุ่มเพื่อนำมาจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางเคมีร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสในยีน 16S rRNA จาก Phylogenetic tree พบว่า 3 จาก 11 ไอโซเลทอาจจะเป็นแอคติโนไมซีสต์สายพันธุ์ใหม่ นอกจากนี้ยังพบจีนัสที่มีรายงานการพบไม่บ่อย เช่น *Spirillospora Catellatospora* และ *Nonomuraea* ซึ่งไม่พบการรายงานแม้ในการศึกษาในพื้นที่ที่มีขนาดใหญ่ การวิจัยครั้งนี้เป็นการรายงานการแยกเชื้อ *Spirillospora* และ *Nonomuraea* จากดินในถ้ำเป็นครั้งแรก ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าถ้ำเป็นแหล่งที่ดีในการค้นหาแอคติโนไมซิสต์สายพันธุ์ใหม่ๆซึ่งอาจจะเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะใหม่ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในขั้นตอนการคัดเลือกขั้นต้น แอคติโนไมซิสต์ที่หายากที่แยกได้ทั้งหมดถูกนำไปคัดเลือกหาความสามารถในการผลิตสารฏิชีวนะ ไม่พบความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะในกลุ่มของแอคติโนไมซิสต์ที่หายากเลย อย่างไรก็ตาม 15 ไอโซเลทของกลุ่มของแอคติโนไมซิสต์ที่หายากมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรัมบวก และ 6 ไอโซเลทมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารหมัก 6 ชนิด เนื่องจากการมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่น่าสนใจ และความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และแบคทีเรียกรัมบวกได้ดี จึงคัดเลือก PNK470 และ PT708 เพื่อทำการศึกษาชนิดของสารที่ผลิตได้ และ จัดจำแนกชนิดจนถึงระดับสปีชีส์ โดยข้อมูลลำดับเบสใน 16S rRNA ยืนชี้ให้เห็นว่า PNK470 และ PT708 จัดอยู่ในจีนัส *Spirillospora* และ *Nonomuraea* ตามลำดับ และมีโอกาสเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิดถูกนำมาวิเคราะห์ผลที่มีต่อการผลิตสารปฏิชีวนะโดยใช้ Plackett-Burman design พบว่าน้ำตาลกลูโคสและถั่วเหลืองบดมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะโดย PNK470 และ PT708 มีผลในทางบวก ความเข้มข้นที่เหมาะสมของส่วนประกอบของอาหารทั้งสองอย่างและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะถูกวิเคราะห์โดย one-variable-at-one-a-time design ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับ โดย PNK470 และ PT708 คือ 40 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของถั่วเหลืองบดที่เหมาะสมคือ 3 กรัมต่อลิตร สภาวะที่เหมาะสมสำหรับ PNK470 และ PT708 ในการหมักในอาหารเหลว คือ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมสำหรับ PNK470 และ PT708 คือ 21 และ 15 วันตามลำดับ

ผลการประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (MIC) ของสารสกัดที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อจาก PNK470 ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* และ Methicillin resistant *Staphylococcus aereus* เท่ากับ 23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และต่อ *Paenibacillus larvae* เท่ากับ 185 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า MIC ของสารสกัดที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อจาก PT708 ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Paenibacillus larvae* เท่ากับ 5.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและต่อ Methicillin resistant *Staphylococcus aereus* เท่ากับ 11.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทำให้สารสกัดจากเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟีแบบคอลัมน์ (Sephadex LH-20) อย่างไรก็ตามปริมาณสารสกัดไม่เพียงพอที่จะทำให้ได้สารบริสุทธิ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved