การพิสูจน์เอกลักษณ์และฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนมัยซีทส์จากดินบริเวณเกาะเสม็ด

นางสาว วิจิตรา อนันต์ศิริวัฒนา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1528-5

IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ACTINOMYCETES FROM SOIL AT SAMED ISLAND

Miss Wijittra Anansiriwattana

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences in Pharmacy

Department of Microbiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-1528-5

Thesis Title	Identification and antimicrobial activity of actinomycetes from soil at Samed Island
By	Miss Wijittra Anansiriwattana
Field of study	Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Mr. Khanit Suwanborirux, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor
(Mr. Khanit Suwanborirux, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Surattana Amnuoypol, M.Sc. in Pharm.)

วิจิตรา อนันต์ศิริวัฒนา : การพิสูจน์เอกลักษณ์และฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนมัยซีทส์จากดินบริเวณเกาะเสม็ด (IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ACTINOMYCETES FROM SOIL AT SAMED ISLAND) อ. ที่ปรึกษา รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์; 125 pp. ISBN 974-17-1528-5

ในการศึกษาเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และคัดเลือกเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนมัยซีทส์ 100 ไอโซเลตที่แยกจากดิน 35 ตัวอย่างจากบริเวณชายฝั่งของเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ พบว่าเชื้อที่แยกได้ 80 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียสกุลสเตรปโตมัยซีส และอีก 20 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียสกุลไมโครโมโนสปอร่า การคัดเลือกขั้นต้นพบว่าสเตรปโตมัยซีส 55 ไอโซเลตและไมโครโมโนปอร่า 14 ไอโซเลตสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ โดยส่วนใหญ่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ดีและมีบางไอโซเลตสามารถสร้างสารต้านเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ การคัดเลือกขั้นที่สองพบว่าสายพันธุ์ PC 4-3 ที่ให้ผลดีในการต้านการเจริญของเชื้อจุลชีพถูกคัดเลือกเพื่อการหมักสารทุติยภูมิ สายพันธุ์นี้มี L-diaminopimelic acid เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16S rDNA และสายวิวัฒนาการพบว่ามีความใกล้เคียงกับสเตรปโตมัยซีสสายพันธุ์ NRRL B-1865 สิ่งสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทจากน้ำหมักของสายพันธุ์นี้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ เมื่อทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟฟีพร้อมการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพสามารถแยกได้สารในกลุ่ม ansamycins ที่เคยพบแล้ว 2 ชนิด คือ geldanamycin และ 17-*O*-demethylgeldanamycin การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารนี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลUV, IR, MS และ NMR spectroscopy ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมา สาร geldanamycin แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *C. albicans* ATCC 10231

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4376614333 : MAJOR MICROBIOLOGY

KEY WORD : ACTINOMYCETES/ ANSAMYCIN/ ANTIMICROBIAL ACTIVITY/ IDENTIFICATION/ *MICROMONOSPORA*/ SAMED ISLAND/ *STREPTOMYCES*

WIJITTRA ANANSIRIWATTANA: IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ACTINOMYCETES FROM SOIL AT SAMED ISLAND. THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: MR. KHANIT SUWANBORIRUX, Ph.D. 125 pp. ISBN 974-17-1528-5

In the course of identification and screening of antimicrobial activity of 100 actinomycetes isolates from 35 soil samples collected from shore of Samed Island, Rayong province based on morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics, 80 isolates were identified as *Streptomyces* and 20 isolates were identified as *Micromonospora*. On primary screening, 55 isolates of *Streptomyces* sp. and 14 isolates of *Micromonospora* sp., most of these isolates showed the antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Candida albicans* ATCC 10231, while the activities against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 could be observed in few isolates. On secondary screening, the strain PC 4-3 with good antimicrobial activity was selected for secondary metabolite fermentation. This strain contained L-diaminopemelic acid in cell wall. Sequencing of 16S rDNA and phylogenetic analysis of PC 4-3 was similar to the *Streptomyces* strain NRRL B-1865. The ethyl acetate extract from fermentation broth of this strain showed antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633 and *C. albicans* ATCC 10231. Antimicrobial assay-guided fractionation of the ethyl acetate extract yielded 2 known ansamycins, including geldanamycin and 17-*O*-demethylgeldanamycin. The chemical structures of the isolated compounds were elucidated through extensive analyses of UV, IR, MS and NMR spectroscopic data and comparison with the literatures. Geldanamycin exhibited antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 25923 and *C. albicans* ATCC 10231.

Department	Microbiology	Student's signature..Wijittra Anansiriwattana
Field of study	Microbiology	Advisor's signature..Somboon Tanasupawat
Academic year	2002	Co-advisor's signature....Khanit Suwanborirux

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my grateful appreciation to those who assisted me in the research as followed:

To Associate Professor Dr. Somboon Tanasupawat, my advisor, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkron University, for his guidance, suggestion, encouragement, and kindness throughout the research study.

To Dr. Khanit Suwanborirux, my co-advisor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkron University, for his valuable advice, and kindness throughout the research study.

To Associate Professor Pintip Pongpech and staffs of Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their helpful suggestion, encouragement, and kindness throughout the research study.

To Associate Professor Surattana Amnuoypol, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for giving a hand finding academic resources from Japan, which are important for my thesis.

To Dr. Prasat Kittakoop, National Center for Genetic Engineering and Biotecnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA) for Mass spectroscopy analysis.

To Miss Suchada Jongrungruangchok, Miss Sarin Tadtong and Mr. Jitti Thawai for help and suggestion, which are the most important for my thesis.

Finally, I wish to express my infinite gratitude to my family and friends for their love, understanding and encouragement.

CONTENTS

CONTENTS (continued)

Page

CONTENTS (continued)

Page

LIST OF TABLES

LIST OF TABLES (continued)

Table Page

LIST OF FIGURES

LIST OF SCHEMES

ABBREVIATIONS

$[\alpha]^{25}_{D}$	=	specific rotation at 25° and sodium D line (589 nm)
ATCC	=	American Type Culture Collection, Monassas,VA, USA
brs	=	broad singlet
°C	=	degree celsius
$CDCl_3$	=	deuterated chloroform
$CHCl_3$	=	chloroform
cm	=	centrimeter
^{13}C-NMR	=	carbon-13 nuclear magnetic resonance
d	=	doublet
dd	=	doublet of doublets (for NMR spectra)
DMSO	=	dimethysulfoxide
DMSOd_6	=	deuterated dimethysulfoxide
δ	=	chemical shift
EIMS	=	Electron Impact Mass Spectrum
EtOAc	=	Ethyl acetate
ϵ	=	molar absorptivity
g	=	gram
µg	=	microgram
µl	=	micro liter
hr.	=	hour
^{1}H-NMR	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
Hz	=	Hertz
IR	=	infrared
J	=	coupling constant
L	=	liter
λ_{max}	=	wavelength at maximal absorption
M^+	=	molecular iron

µg	=	microgram
mg	=	milligram
min	=	minute
µl	=	micro liter
ml	=	milliliter
MHz	=	megahertz
m/z	=	mass to charge ratio
MS	=	mass spectrometry
µm	=	micrometer
mm	=	millimeter
nm	=	nanometer
MeOH	=	methanol
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
ppm	=	part per million
rpm	=	round per minute
RT	=	room temperature
s	=	singlet
TLC	=	Thin Layer Chromatography
UV	=	ultraviolet