

การพิสูจน์เอกลักษณ์และฤทธิ์ต้านจุลชีพของสายพันธุ์แบคทีเรียสเตรปโตมัยซิส อะมัย โคลาทอปซิส  
และคิตะซาโตสปอราจากดิน



นางสาว ปิยาภัทร ศรีไพโรจน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา  
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *STREPTOMYCES*,  
*AMYCOLATOPSIS*, AND *KITASATOSPORA* STRAINS FROM SOILS

Miss Piyapat Sripairoj

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Sciences in Pharmacy Program in Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492299

Thesis Title IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF  
*STREPTOMYCES*, *AMYCOLATOPSIS*, AND *KITASATOSPORA*  
STRAINS FROM SOILS

By Miss Piyapat Sripairoj

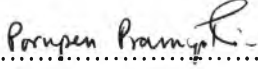
Field of study Microbiology

Thesis Advisor Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.

Thesis Co-advisor Khanit Suwanborirux, Ph.D.


---

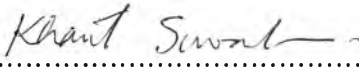
Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in  
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree


..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences  
(Associate Professor Pornpen Pramyotin, Ph.D.)

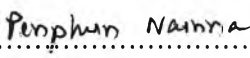
THESIS COMMITTEE

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

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

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

..... Member  
(Somporn Moonmangmee, Ph.D.)

.....Member  
(Instructor Penphun Naenna, M.Sc.)

ปิยาภัทร ศรีไพโรจน์ : การพิสูจน์เอกลักษณ์และฤทธิ์ต้านจุลชีพของสายพันธุ์แบคทีเรียสเตรปโตมัยซิส อะมัยโคลาทอปซิส และคิตะซาโตสปอราจากดิน (IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *STREPTOMYCES*, *AMYCOLATOPSIS*, AND *KITASATOSPORA* STRAINS FROM SOILS) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์, 144 หน้า

ในการศึกษาเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนมัยซิสที่พบว่าสามารถคัดแยกได้ 127 สายพันธุ์ จากดิน 98 ตัวอย่าง ในจังหวัด เชียงราย น่าน พัทลุง สตูล สงขลา ชัยภูมิ และตราด โดยการคัดเลือกขั้นต้นพบว่าส่วนใหญ่สามารถสร้างสารต้าน *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ได้ดี และมีบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารต้าน *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่คัดเลือกได้ 18 สายพันธุ์ พบว่าแบ่งได้เป็นสกุล สเตรปโตมัยซิส (กลุ่มที่ 1) อะมัยโคลาทอปซิส (กลุ่มที่ 2) และคิตะซาโตสปอรา (กลุ่มที่ 3) โดยอาศัยผลจากการศึกษาลักษณะทางพีโนไทป์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA จากผลความคล้ายคลึง (%) ของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ S72-10 และ S76-1 เป็น *Streptomyces termitum* (99.6 และ 99.8% ตามลำดับ) สายพันธุ์ S49-1 เป็น *S. aureoversilis* (99.4%) สายพันธุ์ S1-2 และ S75-5 เป็น *S. hygroscopicus* (99.8%) สายพันธุ์ S38-2 เป็น *S. aureofaciens* (99.4%) สายพันธุ์ S33-3 เป็น *S. xanthocidicus* (99.8%) สายพันธุ์ S55-4 เป็น *S. roseocinereus* (99.9%) สายพันธุ์ S71-1 เป็น *S. mycarofaciens* (99.4%) สายพันธุ์ S75-3 เป็น *S. albospinus* (99.4%) สายพันธุ์ S3-1 และ SB12-1 เป็น *S. spectabilis* (99.6 และ 99.7% ตามลำดับ) ในขณะที่สายพันธุ์ S39-7 ใกล้เคียงกับ *Amycolatopsis albidoflavus* (99.2%) สายพันธุ์ SB7-3 ใกล้เคียงกับ *A. keratinophila* (99.3%) สายพันธุ์ KC19-1 KC20-1 และ K57-1 ใกล้เคียงกับ *A. kentuckyensis* (99.3, 98.1 และ 99.2% ตามลำดับ) ส่วนสายพันธุ์ SB3-2 มีความคล้ายคลึง (98.9%) ของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA กับ *Kitasatospora putterlickiae* จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียในสกุลสเตรปโตมัยซิสและคิตะซาโตสปอรา มี menaquinone หลักเป็น MK-9 (H<sub>9</sub>) และ MK-9 (H<sub>8</sub>) ในขณะที่แบคทีเรียในสกุลอะมัยโคลาทอปซิสมี menaquinone หลักเป็น MK-9 (H<sub>9</sub>) นอกจากนี้ยังพบว่าทุกสายพันธุ์มีปริมาณ G+C ของสาย DNA อยู่ในช่วง 66-76 mol% และพบว่าสเตรปโตมัยซิสมี LL-diaminopimelic acid (DAP) อะมัยโคลาทอปซิสมี meso-DAP ส่วนคิตะซาโตสปอรา มี meso- และ LL-DAP เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ จากผลการคัดเลือกขั้นที่สองได้คัดเลือกสายพันธุ์ *S. spectabilis* S3-1 เพื่อทำการหมักสารทุติยภูมิในอาหารเหลว YM เมื่อนำสิ่งสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทจากน้ำหมักของสายพันธุ์นี้มาทำการสกัดแยกโดยวิธีทางโครมาโทกราฟีพร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธี agar disc diffusion และวิธี bioautographic (Silica gel TLC, ระบบตัวทำละลายเป็น 15% MeOH ใน CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) พบว่าส่วนที่แยกได้ ที่มีค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.8 จะแสดงฤทธิ์ในการต้าน *S. aureus* ATCC 6538, methicillin resistant *S. aureus* 266, 269, 643, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *Ps. aeruginosa* ATCC 27853

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....ปิยาภัทร ศรีไพโรจน์  
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา.....2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4876586933 : MAJOR MICROBIOLOGY

KEY WORD: ACTINOMYCETES / *STREPTOMYCES* / *AMYCOLATOPSIS* / *KITASATOSPORA* / IDENTIFICATION / ANTIMICROBIAL ACTIVITY

PIYAPAT SRIPAJOJ : IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *STREPTOMYCES*, *AMYCOLATOPSIS*, AND *KITASATOSPORA* STRAINS FROM SOILS.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D., THESIS

COADVISOR : KHANIT SUWANBORIRUX, Ph.D., 144 pp.

In the course of identification and screening of antimicrobial activity of 127 actinomycetes were isolated from 98 soil samples collected from Chiangrai, Nan, Phatthalung, Satun, Songkhla, Chaiyaphum, and Trat provinces. On the primary screening, most of these strains showed the antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Micrococcus luteus* ATCC 9341, while few strains showed activities against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida albicans* ATCC 10231. Eighteen selected strains which showed good antimicrobial activity belong to *Streptomyces* (Group I), *Amycolatopsis* (Group II), and *Kitasatospora* (Group III) based on their phenotypic and chemotaxonomic characteristics including phylogenetic analysis using 16S rDNA sequences. The percentage of 16S rDNA sequence similarity revealed that S72-10 and S76-1 should be identified as *Streptomyces termitum* (99.6 and 99.8%, respectively), S49-1 as *S. aureoverisilis* (99.4%), S1-2 and S75-5 as *S. hygroscopicus* (99.8%), S38-2 as *S. aureofaciens* (99.4%), S33-3 as *S. xanthocidicus* (99.8%), S55-4 as *S. roseocinereus* (99.9%), S71-1 as *S. mycarofaciens* (99.4%), S75-3 as *S. albospinus* (99.4%), S3-1 and SB12-1 as *S. spectabilis* (99.6 and 99.7%, respectively). S39-7 was closely related to *Amycolatopsis albidoflavus* (99.2%). SB7-3 was closely related to *A. keratinophila* (99.3%). KC19-1, KC20-1, and K57-1 were closely related to *A. kentuckyensis* (99.3, 98.1 and 99.2%, respectively). SB3-2 was closely related to *Kitasatospora putterlickiae* (98.9%). *Streptomyces* and *Kitasatospora* strains contained MK-9 (H<sub>8</sub>) and MK-9 (H<sub>8</sub>), whereas *Amycolatopsis* contained MK-9 (H<sub>4</sub>) as major menaquinones. The DNA G+C contents of the strains ranged from 66 to 76 mol%. *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, and *Kitasatospora* strains contained LL-diaminopimelic acid, meso-DAP and LL- and meso-DAP in cell wall, respectively. On secondary screening, *S. spectabilis* S3-1 was selected for secondary metabolite fermentation. The ethyl acetate extract was fractionated by chromatographic method and the fractions were tested for antimicrobial activity by agar disc diffusion and bioautographic methods. The active spot found at R<sub>f</sub> value 0.8 (Silica gel TLC, solvent system 15% MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) was active against *S. aureus* ATCC 6538, methicillin resistant *S. aureus* 266, 269, 643, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 and *Ps. aeruginosa* ATCC 27853.

Department .....	Microbiology.....	Student's signature.....	Piyapat Sriapiroj
Field of study .....	Microbiology.....	Advisor's signature.....	Somboon Tanasupawat
Academic year.....	2006.....	Co-advisor's signature.....	Khanit Suwanborirux

## ACKNOWLEDGEMENTS

To succeed of this research would not be realize without the support and assistance of some persons and various institutions to whom I would like to express my grateful appreciation as follow:

To Associate Professor Dr. Somboon Tanasupawat, my advisor, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his guidance, kind assistance and valuable advice.

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

To Associate Professor Dr. Pintip Pongpech and Instructor Penphun Naenna, M.Sc., a member of my thesis committee, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their suggestion, encouragement and kindness throughout the research study.

To Dr. Somporn Moonmangmee, a member of my thesis committee, Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), for his suggestion and kindness throughout the research study.

To Dr. Jung-Sook Lee, Korean Collection for Type Cultures (KCTC), Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Korea, for providing the type strains.

To Miss Siraphan Sukonthasingh, Mr. Amnat Pakdeeto, Miss Chutima Petchprayoon, Miss Jiranuch Mingmueng and Mrs. Waree Niyomtham for their help and suggestion.

To staffs of Department of Microbiology and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their kindness throughout the research study.

To Mr. Pitipong Seelacharoen and his family for their suggestion, and encouragement.

To my friends at the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their kindness and excellent working atmosphere.

To facilities of the Department of Microbiology, Pharmacognosy, and Pharmaceutical Research Instrument Center, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

Finally, I wish to express my infinite gratitude to my family (Associate Professor Dr. Prasert Sripairoj, Associate Professor Nipa Sripairoj and Doctor Piyakit Sripairoj) for their love, understanding, and encouragement.

# CONTENTS

	<b>Page</b>
ABSTRACT (Thai) .....	iv
ABSTRACT (English).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF SCHEMES.....	xiii
ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	3
1. Actinomycetes.....	3
1.1 <i>Streptomyces</i> .....	3
1.1.1 Characteristics of <i>Streptomyces</i> .....	3
1.1.2 Antimicrobial compounds from <i>Streptomyces</i> .....	5
1.2 <i>Amycolatopsis</i> .....	9
1.2.1 Characteristics of <i>Amycolatopsis</i> .....	10
1.2.2 Antimicrobial compounds from <i>Amycolatopsis</i> .....	12
1.3 <i>Kitasatospora</i> .....	13
1.3.1 Characteristics of <i>Kitasatospora</i> .....	14
1.3.2 Antimicrobial compounds from <i>Kitasatospora</i> .....	16
1.4 Fermentation .....	16
III EXPERIMENTAL.....	19
1. Sample collection, isolation and primary screening of actinomycetes.....	19
1.1 Sample collection and isolation of strains.....	19
1.2 Primary screening of antimicrobial activity of the strains.....	19
1.3 Bioautographic method on TLC plate.....	20
2. Identification method.....	20
2.1 Morphological and cultural characteristics.....	20

Chapter	Page
2.2 Physiological and biochemical characteristics.....	21
2.3 Chemotaxonomic characteristics.....	23
3. 16S rDNA sequence analysis and phylogenetic tree construction.....	24
3.1 16S rDNA amplication by PCR.....	24
3.2 16S rDNA sequence.....	25
3.3 16S rDNA sequence analysis and phylogenetic tree construction.....	25
3.4 DNA-DNA hybridization.....	25
4. Fermentation of the selected strains for antimicrobial productions.....	27
5. Chromatographic techniques.....	27
5.1 Analytical thin-layer chromatography.....	27
5.2 Column chromatography.....	27
5.3 Solvents.....	28
6. Extraction and fractionation of the extract of <i>S. spectabilis</i> S3-1.....	28
6.1 Extraction.....	28
6.2 Fractionation.....	28
7. Antimicrobial activity.....	31
IV RESULTS AND DISCUSSION.....	33
1. Isolation and primary screening of actinomycetes.....	33
1.1 Isolation of the strains.....	33
1.2 Primary screening for antimicrobial activity of the strains.....	36
2. Identification of strains.....	42
2.1 Morphological and cultural characteristics.....	42
2.2 Physiological and biochemical characteristics.....	80
2.3 Chemotaxonomic characteristics.....	80
3. 16S rDNA amplification and nucleotide sequence analysis.....	88
3.1 16S rDNA sequencing.....	88
3.2 16S rDNA sequence and phylogenetic tree analysis.....	88
3.3 DNA-DNA relatedness of <i>Amycolatopsis</i> strains.....	100
4. Distribution of actinomycetes in soils .....	100



Chapter	Page
5. Fermentation of the selected strains and antimicrobial activity.....	102
6. Extraction and fractionation of the extract of <i>S. spectabilis</i> S3-1.....	105
V CONCLUSION.....	109
REFERENCES.....	111
APPENDICES.....	122
VITA.....	144

## LIST OF TABLES

x

Table	Page
2.1. Antimicrobial compounds from <i>Streptomyces</i> strains.....	5
2.2. Differential characteristics of <i>Amycolatopsis</i> species.....	11
2.3. Antimicrobial compounds from <i>Amycolatopsis</i> strains.....	12
2.4. Differential characteristics of <i>Kitasatospora</i> species .....	15
2.5. Antimicrobial compounds from <i>Kitasatospora</i> strains.....	16
2.6. Composition of media and condition for antibiotics production of <i>Streptomyces</i> , <i>Amycolatopsis</i> , and <i>Kitasatospora</i> strains.....	17
3.1. Fractions obtained from crude extract of S3-1.....	29
3.2. Fractions obtained from S007.....	30
4.1. Sources of soil samples, pH, date of isolation and strain number.....	33
4.2. Antimicrobial activity of actinomycetes strains .....	36
4.3. Morphological and cultural characteristics of the strains on YMA after 14 days incubation.....	43
4.4. Cultural characteristics of the strains on different media after 14 days incubation.....	48
4.5. Physiological characteristics of 18 selected strains .....	81
4.6. Biochemical characteristics of 18 selected strains.....	82
4.7. Utilization of various carbon sources of 18 selected strains .....	83
4.8. Acid production from various carbohydrates of 7 strains in Group II.....	84
4.9. Growth of 18 selected strains on YMA containing novobiocin ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	85
4.10. Diaminopimelic acid, DNA G+C and menaquinone of 18 selected strains .....	86
4.11. Characteristics of <i>Streptomyces</i> strain S3-1.....	87
4.12. Percentage similarities of S72-10, S76-1, S49-1, S1-2, S75-5, S38-2, S33-3 and related taxa.....	91
4.13. Percentage similarities of S55-4, S71-1, S75-3, SB12-1, S3-1 and related taxa.....	93
4.14. Percentage similarities of SB7-3, S39-7, KC19-1, KC20-1, K57-1 and related taxa.....	95
4.15. Differential characteristics of S39-7, SB7-3, KC19-1, KC20-1, K57-1 and the closest <i>Amycolatopsis</i> species.....	96
4.16. Percentage similarities of SB3-2 and related taxa.....	98

<b>Table</b>	<b>Page</b>
4.17. Differential characteristics of SB3-2 and the closely related <i>Kitasatospora</i> species.....	99
4.18. DNA-DNA relatedness of strains SB7-3, S39-7, KC19-1, K57-1 and related <i>Amycolatopsis</i> species.....	100
4.19. Distribution of actinomycetes strains.....	101
4.20. Antimicrobial activity of 18 selected strains.....	103
4.21. Antimicrobial activity of 18 selected strains against methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	104
4.22. Antimicrobial activity of fractions.....	106

## LIST OF FIGURES

xii

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
3.1. Chromatographic patterns of fractions obtained from the crude extract of S3-1 .....	29
3.2. Chromatographic patterns of fractions obtained from S007.....	30
4.1. Colonial appearance and scanning electron micrograph of S3-1 on YMA medium (14 days).....	70
4.2. Colonial appearance and scanning electron micrograph of S38-2 on YMA medium (14 days).....	71
4.3. Colonial appearance and scanning electron micrograph of S72-10 on YMA medium (14 days).....	72
4.4. Colonial appearance and scanning electron micrograph of S75-5 on YMA medium (14 days).....	73
4.5. Colonial appearance and scanning electron micrograph of SB7-3 on YMA medium (14 days).....	74
4.6. Colonial appearance and scanning electron micrograph of S39-7 on YMA medium (14 days).....	75
4.7. Colonial appearance and scanning electron micrograph of KC19-1 on YMA medium (14 days).....	76
4.8. Colonial appearance and scanning electron micrograph of KC20-1 on YMA medium (14 days).....	77
4.9. Colonial appearance and scanning electron micrograph of K57-1 on YMA medium (14 days).....	78
4.10. Colonial appearance and scanning electron micrograph of SB3-2 on YMA medium (14 days).....	79
4.11. A neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences, showing the position of S72-10, S76-1, S49-1, S1-2, S75-5, S38-2, and S33-3.....	90
4.12. A neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences, showing the position of S55-4, S71-1, S75-3, SB12-1, and S3-1.....	92
4.13. A neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences, showing the position of SB7-3, S39-7, KC19-1, KC20-1 and K57-1.....	94
4.14. A neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences showing the position of SB3-2....	97
4.15 The 300 MHz proton MNR spectrum of fraction code S010 in CDCl <sub>3</sub> .....	108

**LIST OF SCHEMES**

<b>Scheme</b>	<b>Page</b>
3.1. Fermentation and extraction of YM fermentation broth of <i>S. spectabilis</i> S3-1.....	32
4.1. Chromatography of crude extraction from <i>S. spectabilis</i> S3-1.....	107

## ABBREVIATIONS

ATCC	=	American Type Culture Collection, Manassas, USA.
°C	=	Degree Celsius
CFU	=	Colony Forming Unit
cm	=	centrimeter
DDBJ	=	DNA Data Bank of Japan
DSM	=	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EMBL	=	European Molecular Biology Laboratory
g	=	gram
GenBank	=	National Institute of Health genetic sequence database
µg	=	microgram
µl	=	microliter
hr.	=	hour
HPLC	=	High performance liquid chromatography
ISP	=	International <i>Streptomyces</i> project
JCM	=	Japan Collection of Microorganism, Saitama, Japan
M	=	Molar
MEGA	=	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mg	=	miligram
min	=	minutes
ml	=	mililiter
<i>meso</i> -DAP	=	<i>meso</i> -Diaminopimelic acid
MeOH	=	Methanol
mm	=	milimeter
nm	=	nanometer
PBS	=	Phosphate buffer saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
rDNA	=	Ribisomal deoxynucleic acid
rpm	=	Round per minutes
SEM	=	Scanning Electron Microscope
Si Gel	=	Silica gel

Sp.	=	Species
SSC	=	Standard sodium citrate
TLC	=	Thin layer chromatography
UV	=	Ultraviolet