Thesis Title Biodiversity and Secondary Metabolites of Actinomycetes from Rhizosphere Soils of Some Medicinal Plants

Author Miss Sutthinan Khamna

Degree Doctor of Philosophy (Biodiversity and Ethnobiology)

Thesis Advisory Committee Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Chairperson
Prof. Dr. John F Peberdy Member
Asst. Prof. Dr. Panuwan Chantawannakul Member

ABSTRACT

Soil samples were collected from the rhizospheres of 16 medicinal plants. They were dried and treated using two methods; the first involved a pretreatment with 6% yeast extract and 0.05% sodium dodecylsulfate (YE:SDS) and the second was a pretreatment with 1.5% phenol. Humic acid vitamin (HV) agar, oat meal (OM) agar and starch casein (SC) agar were used as selective media for the isolation of actinomycetes. A total of 445 isolates were obtained from the soil samples. Based on morphology, chemotaxonomy and 16S rRNA gene sequences 89% of the isolates were assigned to the genus *Streptomyces* and 11% were non-*Streptomyces* and identified to the genera *Actinomadura, Amycolatopsis, Micromonospora,*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Nocardia, Pseudonocardia, Lentzea and *Saccharothrix.* Three isolates were unclassified. The number of *Streptomyces* spp. from soil samples pretreated with YE:SDS was higher than from those pretreated with 1.5% phenol but the non-*Streptomyces* were isolated in higher numbers from soils pretreated with 1.5% phenol. HV agar was the best for the isolation irrespective of the pretreatments used. The largest number and diversity of actinomycetes were isolated from *Curcuma mangga* rhizosphere soil.

All of the actinomycete isolates were evaluated for their ability to produce antimicrobial metabolites using cross streak and dual culture methods. Eighty nine (20%) of all isolates were active against at least one of the test bacterial and fungal pathogens: *Bacillus subtilis*, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhimurium* and *Candida albicans. Streptomyces glomeratus* CMU-PA517, isolated from the rhizosphere soil of pandanus palm (*Pandanus amaryllifolius*) showed high ability to inhibit six of the test organisms. The active isolates were cultivated in three fermentation liquid media; Bennett's medium (BN), Emerson's medium (EM) and AHU-5 medium. The supernatants were analyzed for antimicrobial activity using a paper disc agar diffusion assay method. Sixty-two isolates showed activity against at least one of six pathogenic bacteria and fungi. BN medium was the best fermentation medium for antimicrobial metabolite production.

Twenty-seven (6.1%) of all isolates were active against at least one of the six pathogenic fungi: *Alternaria brassicicola, A. porri*, *Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium oxysporum, Penicillium digitatum* and *Sclerotium rolfsii. S. spectabilis* CMU-PA101, recovered from soil associated with pandanus palm (*Pandanus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

amaryllifolius), was very effective in producing bioactive metabolites against the pathogenic fungi used in the screen. The culture filtrate from isolate CMU-PA101 was extracted using various solvents (*n*-hexane, diethyl ether, ethyl acetate, chloroform and *n*-butanol). The *n*-butanol extract contained the highest activity against the test fungi, the range of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of the crude extract was 0.781-3.125 mg/ml. The culture filtrate of this strain was most effective against *A. porri* on shallot (*Allium ascalonicum* L.) in greenhouse conditions. All the active isolates, which had the ability to inhibit the six plant pathogenic fungi, were evaluated for their ability to produce the extracellular hydrolytic enzymes amylase, cellulase, chitinase and protease. Nineteen isolates produced amylase, 6 produced cellulase, 2 produced chitinase and 6 produced protease. *S. spectabilis* CMU-PA101 produced all four enzymes.

The 140 actinomycete isolates were screened by PCR for the biosynthetic genes which controlled the production of nonribosomal peptide and polyketide antibiotics; type I polyketide synthases (PKS-I), type II polyketide synthases (PKS-II) and nonribosomal peptide synthetases (NRPS) genes using three pairs of specific primers. In PCR screening, the high frequencies of positive PCR amplification were obtained for NRPS (37%), PKS-I (28.6%) and PKS-II (7.1%) sequences.

Siderophore production was found in 45 (27.5%) of all actinomycete isolates. *S. phoeniceus* sp. nov. CMU-SK126 isolated from *Curcuma mangga* rhizosphere soil showed a high ability to produce mixed types of siderophores.

Thirty-six (8.08%) of all actinomycete isolates produced indole acetic acid (IAA). *S. viridochromogenes* CMU-H009, recovered from soil associated with lemongrass was very effective in producing IAA. The highest level of production was

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

achieved at 30°C, pH 7.0 with shaking at 125 rpm for 3 days using 2 mg/ml L-tryptophan. The culture filtrate from the strain stimulated a significant increase in germination and root elongation of maize (*Zea mays*) and cow pea (*Bruguiera parviflora*) seeds.

Thirty (6.74%) out of 445 actinomycete isolates showed L-asparaginase activity. The range of enzyme production was 0.03-1.50 units/ml. *Amycolatopsis kerataniphila* CMU-H002 isolated from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) rhizosphere soil showed highest enzyme activity. The L-asparaginase activity was maximal (3.05 unit/ml) when strain CMU-H002 cultivated in asparagine dextrose salts broth amended with soluble starch (0.2%) and yeast extract (1.5%), pH 7.0 and incubated at 30°C with shaking at 125 rpm for 7 days.

Keywords: Medicinal plant rhizosphere soil, actinomycetes, antimicrobial activity, siderophores, indole acetic acid, L-asparaginase production, S*treptomyces phoeniceus* sp. nov. CMU-SK126

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายทางชีวภาพและเมแทโบไลต์ทุติยภูมิของแอกติโนไมซีสต์จากดินรอบรากพืชสมุนไพรบางชนิด

ผู้เขียน นางสาวสุทธินันต์ คำนา

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ความหลากหลายทางชีวภาพและชีววิทยาชาติพันธุ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ. ดร. สายสมร ลำยอง ประธานกรรมการ
Prof. Dr. John F Peberdy กรรมการ
ผศ. ดร. ภานุวรรณ จันทวรรณกูร กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการนำดินรอบรากพืชสมุนไพร 16 ชนิด มาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท โดยใช้ 6% yeast extract และ 0.05% sodium dodecylsulfate (SDS) pretreatment และ ใช้ 1.5% phenol pretreatment โดยใช้อาหารแยกเชื้อ humic acid vitamin (HV) agar, oat meal (OM) agar และ starch casein (SC) agar พบเชื้อแอกติโนมัยซีททั้งหมด 445 ไอโซเลท จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ และยีนส่วน 16S rRNA สามารถจัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ 7 จีนัส โดย 89% ของเชื้ออยู่ในจีนัส *Streptomyces* และ 11% จัดอยู่ในกลุ่ม non-*Streptomyces* ประกอบด้วยจีนัส *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Lentzea* และ *Saccharothrix* ส่วน 3 ไอโซเลทไม่สามารถจัดจำแนกได้ โดยเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* แยกได้จากดินที่ผ่าน YE:SDS pretreatment มากกว่าดินที่ผ่าน 1.5% phenol pretreatment ส่วนเชื้อในกลุ่ม non-*Streptomyces* จะแยกได้จากดินที่ผ่านวิธี 1.5% phenol pretreatment มากกว่าดินที่ผ่าน YE:SDS pretreatment และ HV agar เป็นอาหารที่แยกจำนวนชนิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินที่ผ่านการ pretreatment ทั้งสองวิธีได้หลากหลายและมากที่สุด และพบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright by Chiang Mai University
All rights reserved

แยกจากดินรอบรากต้นขมิ้นขาว (*Curcuma mangga*) มีจำนวนและความหลากหลายของเชื้อแอกติโนมัยซีทสูงสุด

เมื่อนำเชื้อแอกติโนมัยซีททั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดโดยวิธี cross streak และวิธี dual culture พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 89 ไอโซเลท (20%) มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ : *Bacillus subtilis,* Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhimurium* และ *Candida albicans* โดยเชื้อ *Streptomyces glomeratus* CMU-PA517 ที่แยกได้จากดินรอบรากต้นเตยหอม (*Pandanus amaryllifolius*) สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด เมื่อนำเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบมาเลี้ยงในอาหารหมัก 3 ชนิด ได้แก่ Bennett’s medium (BN), Emerson’s medium (EM) และ AHU-5 medium และนำ supernatant มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทีย์ทดสอบโดยวิธี paper disc agar diffusion assay พบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 62 ไอโซเลท สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบในอาหารหมัก และส่วนใหญ่เชื้อสร้างสารปฏิชีวนะเมื่อเลี้ยงในอาหารหมัก BN นอกจากนี้พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 27 ไอโซเลท (6.1%) มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อราโรคพืช : *Alternaria brassicicola, A. porri, Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium oxysporum, Penicillium digitatum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *S. spectabilis* CMU-PA101 แยกจากดินรอบรากต้นเตยหอม มีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับเชื้อราก่อโรคทดสอบทุกชนิด เมื่อนำ culture filtrate ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไอโซเลท CMU-PA101 ในอาหารเหลวมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ *n*-hexane, diethyl ether, ethyl acetate, chloroform และ *n*-butanol พบว่า สารที่สกัดจาก *n*-butanol มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคทดสอบ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพ (MIC) ของสารที่สกัดจาก *n*-butanol ต่อเชื้อราก่อโรคทดสอบ มีค่า 0.781-3.125 mg/ml จากการนำ culture filtrate ของเชื้อไอโซเลท CMU-PA101 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *A. porri* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดสีม่วงต่อต้นกล้าหอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) พบว่า culture filtrate มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. porri* ได้ เชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคทดสอบ ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการผลิต extracellular hydrolytic enzymes บางชนิด ได้แก่ เอนไซม์ amylase, cellulase, chitinase และ protease โดยวิธี plate screening method จากการทดสอบพบว่า 19 ไอโซเลท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลิตเอนไซม์ amylase, 6 ไอโซเลทผลิตเอนไซม์ cellulase, 2 ไอโซเลทผลิตเอนไซม์ chitinase และ 6 ไอโซเลทผลิตเอนไซม์ protease. *S. spectabilis* CMU-PA101 มีความสามารถในการผลิต extracellular hydrolytic enzyme ทั้ง 4 ชนิด

เชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 140 ไอโซเลท ถูกคัดเลือกมาศึกษาหา ยีน PKS-I, PKS-II และ NRPS ที่ควบคุมการสร้างสารปฏิชีวนะในกลุ่มสาร polyketide และ peptide antibiotics โดยใช้ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนที่ต้องการศึกษา 3 คู่ จากการทดลองพบ PCR product ของยีน NRPS (37%), PKS-I (28.6%) และ PKS-II (7.1%) ตามลำดับ

เชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 45ไอโซเลท (27.5%) สามารถสร้างสารไซเดอโรฟอร์ และ *S. phoeniceus* sp. nov. CMU-SK126 แยกจากดินรอบรากต้นขมิ้นขาวสามารถสาร ไซเดอโรฟอร์ชนิดผสมได้สูงสุด นอกจากนี้เชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 36 ไอโซเลท (8.08%) สามารถผลิต IAA ได้ โดยเชื้อ *S. viridochromogenes* CMU-H009 ที่แยกจากดินรอบรากต้นตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของ L-tryptophan 2 mg/ml, pH 7.0 เขย่าที่ 30^{o}C ความเร็ว 125 rpm นาน 3 วัน culture filtrate ของเชื้อไอโซเลท CMU-H009 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการงอกและเพิ่มความยาวรากของเมล็ดข้าวโพด (*Zea mays*) และ ถั่วดำ (*Bruguiera parviflora*)

เชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 30 ไอโซเลท (6.74%) มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ L-asparaginase, enzyme activity มีค่า 0.03-1.50 units/ml เชื้อ *Amycolatopsis kerataniphila* CMU-H002 แยกจากดินรอบรากต้นขมิ้นขาวสามารถผลิตเอนไซม์ L-asparaginase ได้สูงสุด (3.05 unit/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว asparagine dextrose salts broth (ADS) ที่ประกอบด้วย soluble starch (0.2%) และ yeast extract (1.5%), pH 7.0 เขย่าที่ 30^{o}C ความเร็ว 125 rpm นาน 7 วัน

คำสำคัญ: ดินรอบรากพืชสมุนไพร, แอกติโนมัยซีท, สารต้านจุลชีพ, ไซเดอร์โรฟอร์, กรดอินโดแอซิติก, การผลิตเอนไซม์ L-asparaginase, *Streptomyces phoeniceus* sp. nov. CMU-SK126

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved