

**ISOLATION OF A NEW COMPOUND FROM  
SOIL ACTINOMYCETES AND TAXONOMIC STUDY OF A NEW  
ACTINOMYCETE SPECIES BY A POLYPHASIC APPROACH**



**WATSAPON WATTANASUEPSIN**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright © 2017 Mahidol University

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

**ISOLATION OF A NEW COMPOUND FROM SOIL ACTINOMYCETES AND TAXONOMIC STUDY OF A NEW ACTINOMYCETE SPECIES BY A POLYPHASIC APPROACH**

WATSAPON WATTANASUEPSIN 5937831 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: WATANALAI PANBANGRED, D.Eng., PUNCHAPAT SOJIKUL, Ph.D., NISA PATIKARNMONTHON, Ph.D.

**ABSTRACT**

This thematic research is divided into two parts. The first part is concerned with isolation of bioactive compounds from actinomycetes, whilst the latter part centres on taxonomic study of a new non-*Streptomyces* species.

A total of 474 actinomycete strains were isolated from the rhizospheres of local plants in Trang Province. Primary screening was conducted using a co-culture method against the phytopathogenic indicator strains *Colletotrichum gloeosporioides* DoA d0762, *C. gloeosporioides* DoA c1060, *C. capsici* DoA c1511, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*). Thereafter, crude extracts from nineteen selected isolates were obtained by organic solvent extraction and subsequently monitored *via* disc diffusion susceptibility assay to ascertain their inhibitory potency for secondary screening. High-performance liquid chromatography (HPLC) technique was also employed to analyse components within the crude mixtures. The crude extracts with bioactivity from isolates SWW177, SWW225, SWW368 and SWW455 were purified by chromatographic approaches based on bioassay-guided fractionation methodology prior to characterisation by a range of spectroscopic techniques for their chemical structures. 1-Methoxypyrrole-2-carboxamide produced by *Streptomyces griseocarneus* SWW368 was elucidated as a new antibacterial pyrrole derivative. This compound, however, needs further improvement and validation before being put into practical use.

A non-*Streptomyces* actinomycete designated as strain S265<sup>T</sup> was isolated from the rhizosphere collected under an elephant ear plant (*Colocasia esculenta*) in Bangkok, Thailand. The taxonomic position of this strain was determined by a polyphasic approach. Strain S265<sup>T</sup> formed single globose spores on long branching aerial hyphae. It produced abundant aerial mycelia with green colour. The cell wall contained *meso*-DAP, and the diagnostic whole-cell sugars were arabinose and galactose. Phosphatidylethanolamine and diphosphatidylglycerol were detected as the predominant polar lipids, whereas mycolic acids were not found. The major menaquinone was MK-9(H<sub>4</sub>) and principal cellular fatty acids were C<sub>15:1</sub> B, iso-C<sub>16:1</sub> H, anteiso-C<sub>15:0</sub> and C<sub>15:0</sub> 2-OH. The DNA G+C content was 69 mol%. According to phylogenetic analysis, strain S265<sup>T</sup> was clustered with *Saccharomonospora glauca* K62<sup>T</sup> (98.1%) and *S. viridis* DSM 43017<sup>T</sup> (97.1%) despite its 16S rRNA gene sequence showing the highest similarity value to that of *S. azurea* NA-128<sup>T</sup> (98.6%). DNA–DNA relatedness values between the strain S265<sup>T</sup> and these closely related strains were in the range of 7–50%, thus strengthening the evidence derived from the polyphasic study that the strain S265<sup>T</sup> represents a novel species within the genus *Saccharomonospora*, for which the name *S. colocasiae* sp. nov. is proposed. The type strain is S265<sup>T</sup> (= TBRC 7235<sup>T</sup> = NBRC 112945<sup>T</sup>). The potential application of the new *Saccharomonospora* species still requires further investigation.

**KEY WORDS: ACTINOMYCETES / ANTIBACTERIAL / BIOASSAY-GUIDED FRACTIONATION / POLYPHASIC APPROACH / RHIZOSPHERE**

204 pages

การแยกสารใหม่จากเชื้อแอคทีโนมัยซีทที่แยกจากดิน และการศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคทีโนมัยซีทสปีชีส์ใหม่โดยวิธี Polyphasic

ISOLATION OF A NEW COMPOUND FROM SOIL ACTINOMYCETES AND TAXONOMIC STUDY OF A NEW ACTINOMYCETE SPECIES BY A POLYPHASIC APPROACH

วรรณพล วัฒนสืบสิน 5937831 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, D.Eng., ปัญจภัทร โสจิกุล, Ph.D., นิสา ปฏิการมณฑล, Ph.D.

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอคทีโนมัยซีท และการศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ non-*Streptomyces* สปีชีส์ใหม่

ได้แยกเชื้อแอคทีโนมัยซีทจำนวนทั้งหมด 474 ไอโซเลต จากดินบริเวณรากพืชท้องถิ่นในจังหวัดตรัง ใช้วิธี co-culture สำหรับการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ โดยได้ทดสอบการยับยั้งกับเชื้อก่อโรคพืช ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* DoA d0762, *C. gloeosporioides* DoA c1060, *C. capsici* DoA c1511, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) และ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) หลังจากนั้น ได้เตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อที่เลือกมาจำนวน 19 ไอโซเลต โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และตรวจสอบเพื่อยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี disc diffusion susceptibility สำหรับการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ และทำการคัดเลือกรากพืชจากเชื้อแอคทีโนมัยซีท SWW177, SWW225, SWW368 และ SWW455 ซึ่งสามารถผลิตสารออกฤทธิ์บางชนิดมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโตกราฟีโดยอาศัย bioassay-guided fractionation ก่อนนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี พบว่า 1-methoxypyrrole-2-carboxamide จากเชื้อ *Streptomyces griseocarneus* SWW368 จัดเป็นสารใหม่ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ pyrrole ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม ผลดักฤทธิ์ธรรมชาตินั้นต้องได้รับการพัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพก่อนนำไปใช้จริง

ทำการแยกเชื้อแอคทีโนมัยซีทกลุ่ม non-*Streptomyces* สายพันธุ์ S265<sup>T</sup> จากดินบริเวณรากพืชต้นบอน (*Colocasia esculenta*) ในกรุงเทพฯ ประเทศไทย และระบุลำดับทางอนุกรมวิธานของเชื้อสายพันธุ์นี้โดยวิธี polyphasic เชื้อสายพันธุ์ S265<sup>T</sup> สร้างสปอร์เดี่ยว รูปร่างกลม บนเส้นใย aerial มีการสร้างกลุ่มเส้นใย aerial เจริญได้ดีและมีสีเขียว พลังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP และน้ำตาลในเซลล์ทั้งหมดคืออะราบีโนสและกาแล็กโทส พบ polar lipid ชนิด phosphatidylethanolamine และ diphosphatidylglycerol เป็นองค์ประกอบหลัก แต่ไม่พบกรด mycolic นอกจากนี้ menaquinone ชนิดหลักเป็น MK-9(H<sub>4</sub>) และมีกรดไขมันส่วนใหญ่เป็น C<sub>15:1</sub> B, iso-C<sub>16:1</sub> H, anteiso-C<sub>15:0</sub> และ C<sub>15:0</sub>-2-OH รวมทั้งมีปริมาณ G+C ของดีเอ็นเออยู่ 69 mol% จากการวิเคราะห์เชิงวงรีวิวัฒนาการ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ S265<sup>T</sup> ได้รับการจัดกลุ่มอยู่ร่วมกับ *Saccharomonospora glauca* K62<sup>T</sup> (98.1%) และ *S. viridis* DSM 43017<sup>T</sup> (97.1%) แม้ว่าลำดับเบสในช่วงของยีน 16S rRNA ของเชื้อดังกล่าวจะให้ค่าผลความคล้ายคลึงกับ *S. azurea* NA-128<sup>T</sup> (98.6%) สูงที่สุด ผลของความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอระหว่างเชื้อสายพันธุ์ S265<sup>T</sup> และสายพันธุ์ใกล้เคียงอยู่ในช่วง 7–50% จึงสนับสนุนข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี polyphasic ว่าเชื้อสายพันธุ์ S265<sup>T</sup> เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Saccharomonospora* ซึ่งได้รับการเสนอชื่อว่า *S. colocasiae* sp. nov. โดยมีสายพันธุ์ต้นแบบคือ S265<sup>T</sup> (= TBRC 7235<sup>T</sup> = NBRC 112945<sup>T</sup>) การนำเชื้อใหม่ในสกุล *Saccharomonospora* นี้ไปใช้ประโยชน์ยังต้องได้รับการศึกษาต่อไป