Thesis Title Diversity and Siderophore Production of Actinomycetes from Eastern Thai Coastal Marine Sediments

Author Miss Pornpan Ruttanasutja

Degree Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)

Thesis Advisory Committee

Dr. Wasu Pathom-aree	Advisor
Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Sakunnee Bovonsombut	Co-advisor
Miss Rattanaporn Srivibool	Co-advisor

ABSTRACT

Four sediment samples from Rayong Province, Thailand were examined for actinomycete diversity by culture independent method. DNA library was constructed using actinomycete specific primers. A total of 153 non chrimeric clones were analyzed. All clones were affiliated in the Class *Actinobacteria* covering 4 subclasses, 4 orders, 9 suborders, 23 families and 39 genera. Dominant actinomycete groups in all 4 samples were members of the genus *Illumatobacter* in the family *Acidimicrobiaceae* and genus *Iamia* in the family *Iamiaceae*. The highest actinomycete diversity in term of species richness and distribution was found in the sediment from Klong–Ta–Guan with Chao's value of 343 ribotypes at species level, Shanon Wiener and Simpson

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

index of 3.76 and 0.26, respectively. Ninety clone sequences (58%) showed less than 97% 16S rRNA similarity to any known actinomycete culture and may represent novel species. These findings suggest that the diversity of actinomycetes in Thai coastal sediments is high and large numbers of actinomycetes remains to be characterized by cultivation for bioprospecting.

An improved isolation method for actinomycetes from coastal marine sediments was developed. Four pretreatments, 3 enrichment broths and 15 selective media were tested for isolation using sediment sample from Klong–Ta–Guan. Pretreatment methods were (1) preparation of soil suspension by tenfold dilution and shaking 10^{-1} dilution of sediment suspension at 125 rpm for 10 minutes (2) 1.5% phenol treatment (3) shaking sediment suspension (1 g: 3 ml) at 125 rpm for 10 minutes and (4) shaking sediment suspension (1 g: 3 ml) at 125 rpm for 60 minutes. Three enrichment broths were (1) Marine Broth (MB) (2) Soil Extract Solution (SES) and (3) Marine Soil Extract Broth (MSB). All isolation plates from 15 selective media were incubated at 25^{o}C for 30 days. Actinomycetes were isolated only from pretreatment (4). Marine broth was found to promote the isolation of actinomycetes with high ratio of total bacteria : actinomycetes (2:1). In general, diluted media or low nutrient media were more effective in the isolation of actinomycetes. A total of 209 isolates of actinomycetes were obtained with colony count ranging from 0–747 cfu/g. Molecular identification based on 16S rRNA gene sequencing revealed that these isolates belonged to 8 genera, namely *Curtobacterium, Dermacoccus, Micromonospora, Microbispora, Pseudonocardia, Rhodococcus, Streptomyces* and *Tsukamurella.* However, results from culture dependent and culture independent studies of Klong-Ta-Guan sediment, showed only 3 overlap genera, namely

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Micromonospora, Rhodococcus and *Streptomyces*. This isolation method was then used to isolate actinomycetes from other 7 sediment samples. In total, 529 isolates were obtained from all sediment samples and were identified to members of 3 genera: *Micromonospora*, *Rhodococcus* and *Streptomyces*. These results showed the highest diversity in Klong–Ta–Guan sample which were in agreement with the results from culture independent study.

The study on 7 basal media for Chrome azurol S (CAS) assay which used for prescreening of siderophore production, indicated that Modified King B Agar (MKBA) (pH 7.0) was the most suitable media for actinomycete growth and siderophore production. A total of 738 isolates were screened for siderophore production by CAS–MKBA (pH 7.0) based medium and all of them produced siderophore. Seventy–nine isolates of *Pseudonocardia* and *Streptomyces* which showed large orange halo zone were selected for determination of type and quantity of produced siderophore by ferric perchlorate assay for hydroxamate type and Arnow's assay for catecholate type. All actinomycete isolates produced hydroxamates type siderophore with more than half (69.62%) produced both hydroxamate and catecholate types. *Streptomyces* sp R1-2A/J806 from Klong–Ta–Guan sample showed the highest yield of 2.03 nmol/l and 0.81 mmol/l for hydroxamate and catecholate types, respectively. The type of siderophore was confirmed by thin layer chromatography which showed similar results with screening in both agar plate and culture broth. Time course study of siderophore production from actinomycetes was carried out using isolates R1–2B/D805 and R1–2B/N205, the highest hydroxamate and catecholate producer, respectively. Actinomycetes were cultured in MKB broth (pH 7.0) and growth and siderophore production were measured. It was found that

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

actinomycetes produced highest siderophore during late log phase or early stationary phase. Each type of siderophore was produced in different growth period. Siderophore producing genes were detected using *desD* gene for hydroxamate type and *entF* gene for catecholate type. All of 79 isolates were detected with *desD* gene which encode desferrioxamine. Comparison of sequence data showed that these *desD* genes were closely related to *desD* genes in various *Streptomyces* sp. Furthermore, the *entF* gene which encodes for enterobactin was not found in all the 55 catecholate producing isolates. This observation suggested that these isolates may contain catecholate type genes other than enterobactin. All siderophore producing actinomyctes were tested for their antibacterial activity against three bacterial pathogens; *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* and *Vibrio parahaemolyticus* by agar well diffusion method on MKBA (pH 7.0), which supported siderophore production and Modified King B Iron Agar (MKBIA) (pH 7.0), which inhibited siderophore production. The antifungal activity was tested with two fungal pathogens; *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* by dual culture method on CAS–MKBA (pH 7.0) and CAS–MKBIA (pH 7.0). A total of 24 isolates (3.25%) showed antibacterial activity against at least one tested pathogenic bacterium and only 7 isolates (0.95%) inhibited all pathogenic bacteria. Seventy-nine isolates (10.70%) showed growth inhibitory activity against all pathogenic fungi, isolate R8-K310 from Had-Sai-Thong sediment showed the highest inhibition of 59% and 61% for *C. gloeosporioides* and 57% and 53% for *F. oxysporum* on CAS–MKBA (pH 7.0) and CAS–MKBIA (pH 7.0), respectively. Both antibacterial and antifungal activities of actinomycetes on MKBA (pH 7.0) and MKBIA (pH 7.0), did not show any statistically difference ($P<0.05$).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

This result suggested that the antagonistic activity was not related to siderophore production but may be due to the inhibitory effect of other secondary metabolites.

Keywords: marine actinomycetes, marine sediment, metagenomic clone library, pretreatment method, enrichment method, selective media, siderophore, antimicrobial agent

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายและการผลิตสารไซเดอโรฟอร์ของแอคติโนมัยซีทจากดินตะกอนชายฝั่งทะเลตะวันออกของไทย

ผู้เขียน นางสาวพรพรรณ รัตนะสัจจะ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร. วสุ ปฐมอารีย์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ. ดร. สายสมร ลำยอง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. สกุณณี บวรสมบัติ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
นส. รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ตัวอย่างดินตะกอนชายฝั่งทะเลทางตะวันออกของประเทศไทยจำนวน 4 ตัวอย่าง นำมาศึกษาความหลากหลายของแอคติโนมัยซีทจากทะเล โดยใช้วิธีการทางด้านอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคไม่เพาะเลี้ยงเชื้อ เมื่อสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ที่จำเพาะเจาะจง ได้จำนวนโคลนทั้งหมด 153 โคลน เมื่อนำมาวิเคราะห์ผล พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นสมาชิกของคลาส Actinobacteria ประกอบด้วย 4 ซับคลาส, 4 ออเดอร์, 9 ซับออเดอร์, 23 แฟมิลี่ และ 39 จีนัส ซึ่งกลุ่มของแอคติโนมัยซีทเด่นที่ตรวจพบในทั้ง 4 ตัวอย่าง คือ จีนัส *Illumatobacter* ในแฟมิลี่ *Acidimicrobiaceae* และจีนัส *Iamia* ในแฟมิลี่ *Iamiaceae* ความหลากหลายของแอคติโนมัยซีทสูงที่สุดทั้งในด้านจำนวนและการกระจายตัวของสปีชีส์ในตัวอย่างดินตะกอนจากคลองตากวน โดยให้ผลการวิเคราะห์ค่า Chao ที่มากถึง 343 ไรโบไทป์ในระดับสปีชีส์ และมีค่าการกระจายตัวจาก Shanon Wiener และ Simpson index เท่ากับ 3.67 และ 0.26 ตามลำดับ ทั้งนี้มีจำนวนโคลนถึง 90 โคลน (58%) ที่มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกันของยีน 16S rRNA ต่ำกว่า 97% กับแอคติโนมัยซีทที่เพาะเลี้ยงได้และมีความเป็นไปได้ว่าอาจจะเป็นสปีชีส์ใหม่ จากผลการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าดินตะกอนชายฝั่งทะเลมีความหลากหลายของแอคติโนมัยซีทสูง และมีแอคติโนมัยซีทอยู่อีกเป็นจำนวนมากที่รอการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ได้ปรับปรุงวิธีการแยกแอคติโนมัยซีทจากดินตะกอนชายฝั่งทะเล โดยใช้วิธีการ Pretreatment 4 แบบ อาหารเหลวสำหรับการ Enrichment จำนวน 3 ชนิด และอาหารแข็งสำหรับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การแยกเชื้อจำนวน 15 ชนิด นำไปทดสอบการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทในดินตัวอย่างจากคลองตากวน ซึ่ง Pretreatment ที่ใช้คือ (1) เขย่าสารละลายตะกอนดินที่เตรียมแบบเจือจางลำดับส่วนที่ความเข้มข้น 10^{-1} ที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที (2) 1.5% phenol treatment (3) การเขย่าสารละลายตะกอนดิน (1 กรัม: 3 มิลลิลิตร) ที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และ (4) การเขย่าสารละลายตะกอนดิน (1 กรัม: 3 มิลลิลิตร) ที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที เป็นเวลา 60 นาที ร่วมกับการใช้อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อในการ Enrichment ทั้ง 3 ชนิด คือ (1) Marine broth (MB) (2) Soil extract solution (SES) และ (3) Marine soil extract broth (MSB) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อจำนวน 15 ชนิด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบการเจริญของแอคติโนมัยซีทเฉพาะตะกอนดินที่ผ่านการ Pretreatment แบบที่ (4) เท่านั้น และตะกอนดินที่ผ่านการ Enrichment ด้วยอาหาร MB พบการเจริญของแอคติโนมัยซีทที่มีค่าอัตราส่วนของจำนวนแอคติโนมัยซีทต่อแบคทีเรียสูงที่สุด คือ 2:1 ทั้งนี้ยังพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจือจางหรือมีปริมาณสารอาหารน้อยมีประสิทธิภาพสูงต่อการแยกแอคติโนมัยซีท ซึ่งได้แอคติโนมัยซีททั้งหมด 209 ไอโซเลท จากจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นับได้ในช่วง 0–747 cfu/g จากการบ่งชี้ชนิดด้วยการหาลำดับยีน 16S rRNA สามารถจำแนกแอคติโนมัยซีทได้ 8 จีนัส ได้แก่*Curtobacterium*, *Dermacoccus*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* และ *Tsukamurella* แต่เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคไม่เพาะเลี้ยงเชื้อของดินตัวอย่างจากคลองตากวน พบว่ามีเพียง 3 จีนัส คือ *Micromonospora*, *Rhodococcus* และ *Streptomyces* ที่พบทั้งในห้องสมุดดีเอ็นเอและการแยกเชื้อ ซึ่งวิธีการแยกเชื้อดังกล่าวถูกนำไปใช้ในการแยกแอคติโนมัยซีทในตัวอย่างดินตะกอนทะเลอื่น ๆ อีก 7 ตัวอย่าง ได้จำนวนไอโซเลทรวมทั้งหมด 529 ไอโซเลท เมื่อนำไปจัดจำแนกพบว่าแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทั้ง 7 ตัวอย่าง เป็นสมาชิกของจีนัส *Micromonospora*, *Rhodococcus* และ*Streptomyces* จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าตัวอย่างดินตะกอนจากคลองตากวนมีความหลากหลายของแอคติโนมัยซีทสูงที่สุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาด้วยวิธีการทางด้านอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคไม่เพาะเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาชนิดของอาหารพื้นฐานจำนวน 7 ชนิด ที่ใช้ในวิธีการทดสอบการสร้างสารไซเดอโรฟอร์เบื้องต้นด้วยวิธีการเฉพาะ Chrome azurol S (CAS) พบว่าอาหารพื้นฐาน Modified King B Agar (MKBA) (pH 7.0) เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญและสร้างสารไซเดอโรฟอร์จากแอคติโนมัยซีท เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมดจำนวน 738 ไอโซเลทมาทำการทดสอบความสามารถในการสร้างสารไซเดอโรฟอร์ด้วยการใช้อาหารแข็งทดสอบ CAS–MKBA (pH 7.0) พบว่าแอคติโนมัยซีททุกไอโซเลทสามารถสร้างสารไซเดอโรฟอร์ได้ แอคติโนมัยซีทในกลุ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Pseudonocardia และ *Streptomyces* จำนวน 79 ไอโซเลทที่มีการสร้างวงสีส้มขนาดกว้างมาทดสอบหาชนิดและปริมาณของไซเดอโรฟอร์ด้วยวิธี ferric perchlorate สำหรับไซเดอโรฟอร์ชนิด hydroxamate และวิธี Arnow สำหรับไซเดอโรฟอร์ชนิด catecholate พบว่าทั้ง 79 ไอโซเลทสร้างไซเดอโรฟอร์ชนิด hydroxamate และไอโซเลทมากกว่าครึ่ง (69.62%) สร้างทั้ง hydroxamate และ catecholate โดยมี *Streptomyces* sp.ไอโซเลท R1–2A/J806 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินตะกอนจากคลองตากวนมีการสร้างสารไซเดอโรฟอร์ทั้งสองชนิดในปริมาณสูงที่สุด คือ 2.03 mmol/l และ 0.81 mmol/l สำหรับไซเดอโรฟอร์ชนิด hydroxamate และ catecholate ตามลำดับ ทั้งนี้ทำการยืนยันชนิดของไซเดอโรฟอร์ที่ผลิตได้ด้วยวิธี thin layer chromatography จากสารสกัดไซเดอโรฟอร์จากส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอย่าง โดยผลที่ได้ยืนยันชนิดของไซเดอโรฟอร์เช่นเดียวกับการตรวจสอบบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว เมื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการสร้างไซเดอโรฟอร์ของแอคติโนมัยซีท โดยคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่มีการสร้างไซเดอโรฟอร์ชนิด hydroxamate และ catecholate สูงสุด คือ ไอโซเลท R1–2B/D805 และ R1–2B/N205 ตามลำดับ เพาะเลี้ยงในอาหาร MKB broth (pH 7.0) วัดการเจริญเติบโตของแอคติโนมัยซีท และปริมาณการสร้างไซเดอโรฟอร์แต่ละชนิด พบว่าแอคติโนมัยซีทสร้างไซเดอโรฟอร์มากที่สุดในช่วงปลายของ log phases หรือเริ่มเข้าสู่ช่วง stationary phases ของการเจริญ ทั้งนี้การสร้างไซเดอโรฟอร์แต่ละชนิดมีการสร้างในช่วงของการเจริญที่แตกต่างกัน จากนั้นทำการตรวจสอบยีนที่ควบคุมการสร้างไซเดอโรฟอร์แต่ละชนิด โดยศึกษายีน *desD* สำหรับการสร้างไซเดอโรฟอร์ชนิด hydroxamate และศึกษายีน *entF* สำหรับการสร้างไซเดอโรฟอร์ชนิด catecholate พบว่า ทั้ง 79 ไอโซเลทมียีนสำหรับการสร้างไซเดอโรฟอร์ชนิด hydroxamate ในกลุ่ม desferrioxamine และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางอณูชีววิทยา พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับยีน *desD* ที่มีรายงานว่าพบมีอยู่ใน *Streptomyces* sp. หลายชนิด ทั้งนี้จากการศึกษาแอคติโนมัยซีทจำนวน 55 ไอโซเลทที่พบมีการสร้างไซเดอโรฟอร์ชนิด catecholate ไม่พบยีน *entF* ซึ่งควบคุมการสร้างไซเดอโรฟอร์ชนิด catecholate ในกลุ่ม enterobactin ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจมีการสร้างไซเดอโรฟอร์ชนิด catecholate กลุ่มอื่นที่ไม่ใช่ enterobactin เมื่อนำแอคติโนมัยซีททั้งหมดที่มีการสร้างไซเดอโรฟอร์มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านจุลชีพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยวิธี agar well diffusion บนอาหาร 2 ชนิด คือ MKBA (pH 7.0) ซึ่งส่งเสริมการสร้างไซเดอโรฟอร์ และ Modified King B Iron Agar (MKBIA) (pH 7.0) ซึ่งยับยั้งการสร้างไซเดอโรฟอร์ และทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรค 2 ชนิด คือ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium oxysporum* ด้วยวิธีการ dual culture บนอาหาร CAS–MKBA (pH 7.0) และ CAS–MKBIA (pH 7.0) ตามลำดับ พบว่าแอคติโนมัยซีทจำนวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

24 ไอโซเลท (3.25%) สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอย่างน้อย 1 ชนิด และมีเพียง 7 ไอโซเลท (0.95%) ที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้ แอคติโนมัยซีทจำนวน 79 ไอโซเลท (10.70%) สามารถสร้างสารยับยั้งราก่อโรค ซึ่งไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสูงสุดคือ R8–K310 จากตัวอย่างดินหาดทรายทอง คือ 59% และ 61% ต่อการยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ 57% และ 53% ต่อการยับยั้ง *F. oxysporum* บน CAS–MKBA (pH 7.0) และ CAS–MKBIA (pH 7.0) ตามลำดับ โดยผลการสร้างสารต้านจุลชีพก่อโรคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญบนอาหารพื้นฐานทั้งสองชนิด ชี้ให้เห็นว่า การสร้างไซเดอโรฟอร์ของแอคติโนมัยซีทไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพก่อโรค แต่น่าจะเกิดจากการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิชนิดอื่น

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีทจากทะเล, ดินตะกอนทะเล, เมทาจิโนมิกซ์ โคลนไลบรารี่, วิธีการ pretreatment, วิธีการ enrichment, อาหารแยกเชื้อ, ไซเดอโรฟอร์, สารต้านจุลชีพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved