การศึกษาเชื้อในตระกูลแอคติโนมัยซีตีสจากดินถ้ำบริเวณภาคกลางของประเทศไทย ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ

นายสมยศ ลออปักษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. ๒๕๒๙

ISBN ๙๗๔-๕๖๖-๒๗๙-๘

012008
i17761219

Studies on Antibiotic-producing Actinomycetes from Cave Soil in Central Region of Thailand

Mr. Somyot Laorpaksa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1986

ISBN 974-566-279-8

Thesis Title Studies on Antibiotic-producing Actinomycetes from Cave Soil in Central Region of Thailand

By Mr. Somyot Laorpaksa

Department Microbiology

Thesis Advisor Associate Professor Aurapin Yingyong, M.Sc. in Pharm

Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfilment of the Requirements for the Master's Degree.

.....Acting Dean of the Graduate School

(Associate Professor Sorachai Bhisalbutra, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Associate Professor Saree Virunhaphol, M.Sc. in Pharm)

.....Member

(Associate Professor Aurapin Yingyong, M.Sc. in Pharm)

.....Member

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Bamrung Tantisewie, B.Sc. in Pharm)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาเชื้อในตระกูลแอคติโนมัยซีตีสจากดินถ้ำบริเวณภาคกลางของประเทศไทยที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ

ชื่อนิสิต นายสมยศ ลออปักษา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ อรพิน ยิ่งยง ภม.

รองศาสตราจารย์ สันติ ถุงสุวรรณ, Ph.D.

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา ๒๕๒๘

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในขั้นตอนแรกของการศึกษาหาเชื้อตระกูลแอคติโนมัยซีตีส ทำโดยการเก็บตัวอย่างดินถ้ำจำนวน ๓๐ ตัวอย่างจากถ้ำ ๖ แห่งในจังหวัดกาญจนบุรี, ราชบุรี และสระบุรี พบว่าสามารถแยกเชื้อนี้ได้จากถ้ำมังกรทอง ๒.๒๓%, ถ้ำเขาแหลม ๓.๙๒%, ถ้ำสาริกา ๗.๓๓%, ถ้ำจอมพล ๐.๑๖%, ถ้ำเขาบิน ๑.๑๖% และถ้ำโพธิสัตว์ ๐.๘๔% คิดเป็นเชื้อตระกูลแอคติโนมัยซีตีสทั้งหมด ๓.๘๑% เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็งที่มีผลยับยั้งต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus faecalis* Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn Hospital, *Escherichia coli* ATCC 10534, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10612 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบเชื้อ ๕๑ ตัวจาก ๑๐๔ ตัว (๔๙.๐๔%) สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ ซึ่งนำมาจำแนกเชื้อตามผลต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบออกได้ ๖ กลุ่ม ในขั้นต่อไปได้คัดเลือกเชื้อ ST-13-2 ที่ให้ผลที่ดีต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบทุกตัวบนอาหารแข็ง มาศึกษาเพื่อจำแนกบ่งชี้เชื้อและศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว พบว่าเชื้อที่คัดเลือก ST-13-2 จัดอยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* โดยมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces parvullus* มากที่สุด การเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ในอาหาร glucose soybean medium ที่มี pH ๗.๐ (ก่อนผ่านการฆ่าเชื้อโดยความดัน) ณ อุณหภูมิ ๒๓^{o} เซลเซียส จะให้ผลในการสร้างสารปฏิชีวนะสูงสุด

ผลการศึกษาสารปฏิชีวนะของเชื้อ ST-13-2 โดย bioautograph ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* แสดงว่าจัดอยู่ใน water-soluble basic antibiotics นอกจากนี้ สารปฏิชีวนะสามารถให้ผลการยับยั้งต่อเชื้อมากกว่า ๑ จุด และพบว่ามีอย่างน้อย ๑ จุดมีค่า Rf เท่ากับยาปฏิชีวนะ cloxacillin (Rf = ๐.๒๖) ในการตรวจสอบผลของสารปฏิชีวนะของเชื้อ ST-13-2 ทางห้องปฏิบัติการที่มีต่อเชื้อโรค *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Klebsiella pneumoniae* ชนิดละ ๓๐ ตัวอย่างแยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาล พบว่าให้ผลดียับยั้งต่อเชื้อทุกตัว ยกเว้น *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งให้ผลเพียงบางส่วนเท่านั้น

Thesis Title	Studies on Antibiotic-producing Actimomycetes from Cave Soil in Central Region of Thailand
Name	Mr. Somyot Laorpaksa
Thesis Advisor	Associate Professor Aurapin Yingyong, M.Sc. in Pharm
	Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.
Department	Microbiology
Academic Year	1985

Abstract

In the first step of screening for actinomycetes, thirty soil samples collected from six caves in Kanchanaburi, Rajburi and Saraburi were used. The percentage of actinomycetes isolated from Mungkorn-tong, Kao-lam, Sarika, Jom-pon, Kao-bin and Pothisat were 2.23, 3.92. 7.33, 0.16, 1.16 and 0.84 respectively. The net actinomycetes was 3.81%. Screening for antibiotic-producing strains was carried out by the streak plate method using *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus faecalis* Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn Hospital, *Escherichia coli* ATCC 10534, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10612 and *Candida albicans* ATCC 10231 as test organisms, 51 active ones out of 104 strains (49.04%) produced antibiotics. They were classified into 6 groups according to their antibiotic activity. The selected strain ST-13-2 which gave high antibiotic activity in plate assay against all test organisms was selected for further taxonomic study and antibiotic production in liquid media. Taxomomic studies revealed its identity as a closely related to *Streptomyces parvullus*. Fermentation for antibiotic

production in glucose soybean medium, pH 7.0 (before sterilization), at temperature 23°C was the optimum.

The bioautographic detection of biological activity of antibiotic substances from strain ST-13-2 against *Staphylococcus aureus* was suggested that they were water-soluble basic antibiotics. The inhibition spot showed more than one and one was identical to cloxacillin (Rf = 0.26). The in vitro study of crude antibiotic solution of strain ST-13-2 was evaluated on 30 strains of each pathogenic *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from the patients. It showed a good activity against all organisms except *Ps. aeruginosa* that provided some resistibility.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acknowledgements

I would like to express my profound gratitude to my advisor Associate Professor Aurapin Yingyong and to Associate Professor Dr. Santi Thoongsuwan my co-advisor, for their excellent instruction, encouragement and guidance throughout the period of my thesis.

My sincere appreciation is also express to Miss Areerat Pongsopida, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for her extensive counsel and assistance for the completeness of this thesis.

My grateful thanks are due to Dr. Chertsak Dhiraputra, Miss Amornrut Leelaporn and Mrs. Angkana Chaiprasert from Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital for their helpful suggestion and providing me the microorganisms.

I am very thankful to Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University for support of some equipments.

Thanks are also extended to Department of Microbiology, Bangkok Christian Hospital for partial support in some microorganisms.

I wish to extend my sincere thanks to all of those whose names have not been mentioned for their kindness and assistances.

Finally, a greatful acknowledgement goes to the Chulalongkorn University Graduate School which provided partly financial support for this thesis.

Contents

		Page
Thai Abstract		iv
English Abstract		vi
Acknowledgements		viii
Contents		ix
Abbreviations		xi
List of Tables		xiii
List of Figures		xiv
Chapter 1	Introduction	1
Chapter 2	Review of Literature	3
	I. Actinomycetes	3
	II. The search of antibiotics	18
Chapter 3	Materials and Methods	29
	I. The isolation methods	29
	II. Screening of cultures for antibiotic production	30
	III. Taxonomic studies of selected strain	31
	IV. Development of methods for submerged-culture antibiotic production	38
	V. Determination of antibiotic substances by thin-layer chromatography (TLC)	41
	VI. Laboratory evaluation of antibiotic producing to isolated pathogenic organisms from patients	44
Chapter 4	Results	49
	I. Isolation of actinomycetes from cave soil	49
	II. Determination of antibiotic producing actinomycetes	50
	III. Taxonomic studies of strain ST-13-2	52

Page

IV. Antibiotic production in liquid culture.... 55

V. Determination of antibiotic substances by TLC 61

VI. Laboratory evaluation of antibiotics from strain ST-13-2..... 67

Chapter 5 Discussion..... 72

Chapter 6 Conclusion..... 78

References..... 80

Appendix..... 93

Vita..... 110

Abbrevations

Baci	=	Bacitracin
BuOH	=	Butynolic extract
^{o}C	=	degree celsius
Cefo	=	Cefotaxime
Clox	=	Cloxacillin
cm	=	centrimeter
Doxy	=	Doxycycline
Ery	=	Erythromycin
EtOH	=	Ethanolic extract
fig	=	figure
Fra	=	Framycetin
gm	=	gram
Kana	=	Kanamycin
µg	=	microgram
µl	=	microliter
hr	=	hour
IsoPrOH	=	Iso-propanolic extract
I	=	Intermediate susceptible strain
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
nm	=	nanometer
No.	=	number
NSS	=	normal saline solution
Pen G	=	Penicillin G
R	=	Resistant strain

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

S	=	Susceptible strain
TLC	=	Thin layer chromatography
Tobra	=	Tobramycin
UV	=	Ultraviolet

List of Tables

Table		Page
1.	The cave soil samples and their sources.....	29
2.	Solvent systems for TLC.....	43
3.	The antibiotic discs used for each test organism....	46
4.	Zone diameter interpretive standards.....	48
5.	Microbiological population of cave soil.....	49
6.	Classification of 51 active strains of actinomycetes	50
7.	Cultural characteristics of strain ST-13-2.....	52
8.	Carbon utilization pattern of strain ST-13-2.....	54
9.	Biochemical properties of strain ST-13-2.....	54
10.	Antibiotic production of strain ST-13-2 in various media.....	55
11.	The results of antimicrobial susceptibility test of *S. aureus*.....	68
12.	The results of antimicrobial susceptibility test of *E. coli*.....	69
13.	The results of antimicrobial susceptibility test of *Ps. aeruginosa*.....	70
14.	The results of antimicrobial susceptibility test of *K. pneumoniae*.....	71
15.	The antibiotic susceptibility test of various pathogenic organisms.....	75
16.	The range of inhibition zone of antibitics from strain ST-13-2 against pathogenic organisms.....	76

List of Figures

Figure		Page
1.	Photograph showing secondary screening of strain ST-13-2 producing antibiotics on assay plate.....	51
2.	Photomicrograph of strain ST-13-2 (on oatmeal agar, x 100).....	53
3.	Scanning electronmicrograph of spore surface of strain ST-13-2 (on oatmeal agar, 30°C, 7 days).....	53
4.	Fermentation of antibiotic from strain ST-13-2 in various pH at 23°C.....	57
5.	Fermentation of antibiotic from strain ST-13-2 in various pH at 30°C.....	58
6.	Fermentation of antibiotic from strain ST-13-2 in various pH at 33°C.....	59
7.	The comparison of antibiotic production pattern of strain ST-13-2 in various pH and temperature.....	60
8.	Bioautographic detection of antibiotic on paper, prepared as "reprints" from thin-layer chromatoplate.....	63
9.	Thin-layer chromatogram of antibiotics sprayed with 10% $KMnO_4$ solution and 0.2% Bromphenol blue solution.....	64
10.	Bioautographic detection for primary identification unknown antibiotics on paper, prepared as "reprints" from thin-layer chromatoplate.....	65-66