Thesis Title Phenotypic Characters of *Burkholderia thailandensis* Before and After Infection with Bacteriophage Isolated from *Burkholderia pseudomallei*

Author Ms. Ladawan Sariya

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee
Assoc. Prof. Dr. Nuanchan Chittasophon Chairperson
Dr. Nalinee Prempracha Member
Dr. Poonsook Keelapang Member

ABSTRACT

Burkholderia pseudomallei, a causative agent of melioidosis, is a gram-negative bacillus that is closely related to its avirulent counterpart, *B. thailandensis*. Previous reports suggested that several *B. pseudomallei* species had genomes of phages integrated, as termed prophages. Ninety-two percent of these bacteria were capable to produce phages spontaneously or upon various induction methods. Prophage can induce phenotypic changes of the host bacteria via genetic transfer process that often involves alterations in bacterial cell surface or even pathogenicity. Thus, the objective of this work was to investigate whether phenotypic changes would occur when *B. thailandensis* became lysogens after receiving phages isolated from *B. pseudomallei*.

First, 64 isolates of *B. pseudomallei* which were either isolated from clinical specimens or soil were induced by mitomycin C. The lysates were then reacted on 22 strains of *B. thailandensis* to identify phages that could turn *B. thailandensis* to lysogens. Results showed that 21 isolates (32.81%) of *B. pseudomallei* inducing-lysates were able to lyse some strains of *B. thailandensis* and 3 of them (4.69 %) convert *B. thailandensis* to lysogens, as demonstrated by inhibition reaction. These

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

phages are ΦC2, ΦC13 and ΦC32 that were isolated from *B. pseudomallei* C2, C13 and C32, respectively. Lysogens that generated from *B. thailandensis* T9, T10 and T11 receiving ΦC2 and ΦC13 were designated as T9ΦC2, T9ΦC13, T10ΦC2, T10ΦC13 and T11ΦC13, respectively. Phage ΦC32 lysogenized only *B. thailandensis* T19, resulting in T19ΦC32 lysogen. When induced with mitomycin C, all these lysogens were able to produce phage mimicking their donors. Nucleic acid analysis of these phages indicated that all three phages were DNA viruses. Using transmission electron microscopy, ΦC2 and ΦC13 adopt A1 morphology therefore they could be grouped in *Myoviridae* family. Phage ΦC32 resembled C1 morphotype and could be classified in *Podoviridae* family. In previous studies, phages that isolated from *Burkholderia* spp. belong to *Myoviridae* and *Siphoviridae* family. Thus, ΦC32 phage that belongs to *Podoviridae* family reported here may represent a new family of phages that could be isolated from *Burkholderia* spp.

After 6 lysogens were selected, the phenotypic characters among these lysogens and their *B. thailandensis* recipients were compared. In this study, we focused on the changes in the expression of bacterial protein from whole cell lysates, the ability to multiply in normal human serum (NHS) and basic biochemical characters of the bacteria. To compare the expression levels of proteins, bacterial cells were sonicated under ultrasonic wavelength and the resulting proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results showed that protein profiles of two among the six lysogenic-recipient pairs were difference. The protein profiles of T9ΦC2 lysogen at molecular weight ranging from 5.74 to 18.53 kDa and 28.49 to 30.0 kDa were markedly decreased in intensity when compared with phage-recipient strain T9. As for T10ΦC2 lysogen, the protein bands at molecular weight approximately 20 kDa was also slightly decreased in intensity when compared with its phage-recipient T10. Serum resistance was measured from the abilities to multiply in 30% NHS of lysogens, phage-recipient and phage-donor strains. Comparison showed some difference in only one lysogenic-recepient pair. The lysogenic T10ΦC2 resisted to 30% NHS, while T10 recipient had less ability to multiply which was similar to their phage-donor strain C2. Comparison of biochemical characters by API 20NE kit of lysogens and recipient strains had shown similar profiles in all pairs except T9ΦC2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

lysogen and their phage-recipient T9. Phage-recipient T9 used esculin as energy source but after lysogenization with ΦC2, the T9ΦC2 lysogen was unable to hydrolyze esculin, resemble to the phage-donor strain C2.

In conclusion, comparison of the phenotypic characters of *B. thailandensis* before and after infection with phage induced from *B. pseudomallei* indicated that the phage ΦC2 induced from *B. pseudomallei* altered phenotypic characters of *B. thailandensis* to mimic the pathogenic *B. pseudomallei*. Thus, studies for the relationships of this phage to the pathogenicity of *B. pseudomallei* may be beneficial to the investigation of major virulence factors related to bacterial pathogenicity. Besides, ΦC32 phage in the family *Podoviridae* recovered in this study had never been reported to be isolated from *Burkholderia* spp. Thus, it is interesting to study this phage in more details including its role in the bacterial host cell.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ *Burkholderia thailandensis* ก่อนและหลังจากติดเชื้อ bacteriophage ที่แยกได้จากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
ชื่อผู้เขียน	นางสาวลดาวัลย์ สาริยา
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. นวลจันทน์ ชิตตะโสภณ ประธานกรรมการ อ. ดร. นลินี เปรมประชา กรรมการ อ. ดร. พูนสุข กีฬาแปง กรรมการ

บทคัดย่อ

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดสิส และเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทรงแท่งคล้ายกับเชื้อ *B. thailandensis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อในสปีชีส์ *B. pseudomallei* จำนวนมากมีสารพันธุกรรมจากไวรัสของแบคทีเรียฝังตัวอยู่ในลักษณะที่เรียกว่าโปรฝาจ โดยที่ 92 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อเหล่านี้สามารถสร้างเชื้อไวรัสของแบคทีเรียหรือฝาจได้เองหรือสร้างได้จากการถูกกระตุ้นด้วยวิธีต่างๆ โปรฝาจสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้านได้โดยกระบวนการขนถ่ายยีน ซึ่งมักจะมีผลเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์หรือคุณสมบัติในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นในงานวิจัยเรื่องนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าการที่เชื้อ *B. thailandensis* ได้รับฝาจที่แยกได้จากเชื้อ *B. pseudomallei* แล้วเกิดเป็นไลโซเจนจะส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อแบคทีเรียหรือไม่

ในขั้นแรกได้ทำการกระตุ้นเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 64 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างตรวจของผู้ป่วยโรคเมลิออยโดซิสและจากดินด้วยไมโตมัยซิน ซี แล้วนำไลเซสที่ได้ซึ่งอาจมีฝาจอยู่มาทำปฏิกิริยากับเชื้อ *B. thailandensis* จำนวน 22 สายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกฝาจที่สามารถทำให้เชื้อ *B. thailandensis* กลายเป็นไลโซเจน ผลการทดลองพบว่าไลเซสที่มีฝาจซึ่งสามารถทำลายเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

B. thailandensis บางชนิดได้มาจากเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 21 สายพันธุ์ (32.81 เปอร์เซ็นต์) และจากไลเซสที่มีฝาจนี้พบว่า มี 3 สายพันธุ์ (4.69 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถทำให้เชื้อ *B. thailandensis* เปลี่ยนเป็นไลโซเจนโดยสังเกตจากปฏิกิริยาอินฮิบิชั่น ได้แก่ ฝาจ ϕC2, ϕC13 และ ϕC32 ซึ่งแยกได้จากเชื้อ *B. pseudomallei* C2, C13 และ C32 ตามลำดับ โดยให้ชื่อไลโซเจนที่ได้จากการรับฝาจ ϕC2 และ ϕC13 ของเชื้อ *B. thailandensis* T9, T10 และ T11 ว่า T9ϕC2, T9ϕC13, T10ϕC2, T9ϕC13 และ T11ϕC13 ตามลำดับ ส่วน ฝาจ ϕC32 สามารถทำให้ *B. thailandensis* T19 สายพันธุ์เดียวเกิดเป็นไลโซเจนซึ่งให้ชื่อว่า T19ϕC32 ไลโซเจนทั้ง 6 สายพันธุ์นี้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไมโตมัยซิน ซี พบว่าทุกตัวสามารถสร้างฝาจได้โดยฝาจที่ได้มีคุณลักษณะทางโครงสร้างและสารพันธุกรรมไม่แตกต่างจากฝาจที่ได้จากเชื้อต้นตอ จากการศึกษาชนิดของกรดนิวคลีอิคที่เป็นสารพันธุกรรมของฝาจ ϕC2, ϕC13 และ ϕC32 พบว่าไวรัสทั้ง 3 ชนิดมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ และเมื่อทำการศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนพบว่า ฝาจ ϕC2 และ ϕC13 มีรูปร่างแบบ A1 ดังนั้นจึงสามารถจัดฝาจทั้งสองให้อยู่ใน family *Myoviridae* ส่วนฝาจ ϕC32 ซึ่งมีรูปร่างแบบ C1 สามารถจัดอยู่ใน family *Podoviridae* จากรายงานก่อนหน้านี้ ฝาจที่แยกได้จากเชื้อ *Burkholderia* spp. เป็นเพียงไวรัสที่อยู่ใน family *Myoviridae* และ *Siphoviridae* ดังนั้นการค้นพบฝาจ ϕC32 ซึ่งอยู่ใน family *Podoviridae* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้นับเป็นไวรัสกลุ่มใหม่ที่สามารถแยกได้จากเชื้อ *Burkholderia* spp.

เมื่อคัดเลือกไลโซเจนทั้ง 6 สายพันธุ์ได้แล้ว จึงทำการศึกษาคุณสมบัติที่เปลี่ยนไปของเชื้อเปรียบเทียบกับเชื้อ *B. thailandensis* ก่อนได้รับฝาจ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะเน้นที่การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนชนิดต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรีย ความสามารถในการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อในซีรัมของคนปกติและคุณสมบัติพื้นฐานทางชีวเคมีของเชื้อ การเปรียบเทียบระดับของโปรตีนทำโดยการนำเอาเชื้อแบคทีเรียมาทำให้แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง และนำโปรตีนที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ผลการทดลองพบว่าจากการเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้จากไลโซเจนและเชื้อที่รับฝาจทั้ง 6 คู่ มีเพียง 2 คู่ที่พบความแตกต่าง คือเชื้อไลโซเจน T9ϕC2 มีความเข้มของแถบโปรตีนสองช่วงขนาดคือโปรตีนในช่วงขนาด 5.74 ถึง 18.53 กิโลดาลตัน และช่วงขนาด 28.49 ถึง 30.0 กิโลดาลตัน ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนของเชื้อ T9 ส่วน เชื้อT10ϕC2 จะให้แถบโปรตีนขนาดประมาณ 20 กิโลดาลตันจางลงเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนของเชื้อ T10 การศึกษาความทนต่อซีรัมของเชื้อไลโซเจน โดยการเพิ่มจำนวนในซีรัมคนปกติที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับเชื้อที่รับฝาจและเชื้อที่ให้ฝาจ พบว่ามีเพียงคู่เดียวที่มีความแตกต่าง คือเชื้อไลโซเจน T10ϕC2 ทนต่อซีรัมในขณะที่ T10 ซึ่งเป็นเชื้อที่รับฝาจมีความสามารถในการเจริญได้ไม่ดี การเพิ่มจำนวนของเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

T10ϕC2 เกิดขึ้นได้ดีเช่นเดียวกับเชื้อ C2 ซึ่งเป็นเชื้อที่ให้ฝาจ การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อไลโซเจนกับเชื้อที่รับฝาจโดยทดสอบด้วย API 20NE พบว่าไลโซเจนและเชื้อที่รับฝาจทุกคู่ให้ผลที่เหมือนกัน ยกเว้นในกรณีของไลโซเจน T9ϕC2 และเชื้อที่รับฝาจ T9 กล่าวคือเชื้อ T9 ใช้เอสคูลินเป็นแหล่งพลังงานได้ แต่เมื่อรับฝาจ ϕC2 ทำให้เชื้อไม่สามารถย่อยเอสคูลินได้เช่นเดียวกับเชื้อ C2 ซึ่งเป็นเชื้อที่ให้ฝาจนี้

โดยสรุป จากการเปรียบเทียบฟีโนไทป์ของเชื้อ *B. thailandensis* ก่อนและหลังการได้รับฝาจจากเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่ามีฝาจ ϕC2 ที่กระตุ้นจากเชื้อ *B. pseudomallei* ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ *B. thailandensis* ไปในทางที่คล้ายคลึงกับลักษณะฟีโนไทป์ของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ของฝาจชนิดนี้กับการก่อโรคของเชื้อ *B. pseudomallei* น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาหาปัจจัยสำคัญในการก่อโรครุนแรงของเชื้อ นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังได้รายงานการแยกฝาจ ϕC32 ใน family *Podoviridae* ได้จากเชื้อ *Burkholderia* spp. ซึ่งยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ดังนั้นเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาเพิ่มเติมถึงรายละเอียดของตัวเชื้อและบทบาทของฝาจชนิดดังกล่าวต่อเชื้อแบคทีเรีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved