

Thesis Title	Detection and Characterization of Plasmids Isolated from <i>Lactobacillus</i> spp.	
Author	Miss Panitnart Auputinan	
Degree	Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)	
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Narumol Thongwai	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Yingmanee Tragoolpua	Co-advisor

ABSTRACT

Biochemical tests were used for identification of 105 isolates of lactobacilli isolated from 24 fermented foods. The dominant species were *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum* and *L. brevis*. To investigate the distribution of plasmids in lactobacilli, isolation of plasmids was performed. Twelve bacterial isolates containing plasmids were detected (11.43 %), these isolates were confirmed by 16S rRNA gene sequencing for identification. It was found that the plasmid profiles of tested isolates had variable patterns. The plasmid bands detected were ranging from six to eight.

To characterize these 12 plasmid containing bacterial isolates, antibiotic susceptibility test, bacteriocin production, substrate utilization, plasmids digestion

by restriction enzymes for dendrogram construction and plasmid sequencing were determined. An antibiotic susceptibility test was performed with 21 antibiotics by paper disc diffusion method. Interestingly, all bacterial isolates were resistant to bacitracin, ciprofloxacin, fusidic acid, kanamycin, nalidixic acid, norfloxacin, streptomycin and vancomycin. In contrast, all of them were sensitive to ampicillin, cefotaxime, chloramphenicol, erythromycin and rifampicin. Various antibiotic susceptibility profiles were found when tested lactobacilli against ceftiofur, cephalothin, clindamycin, penicillin G, polymyxin B and tetracycline.

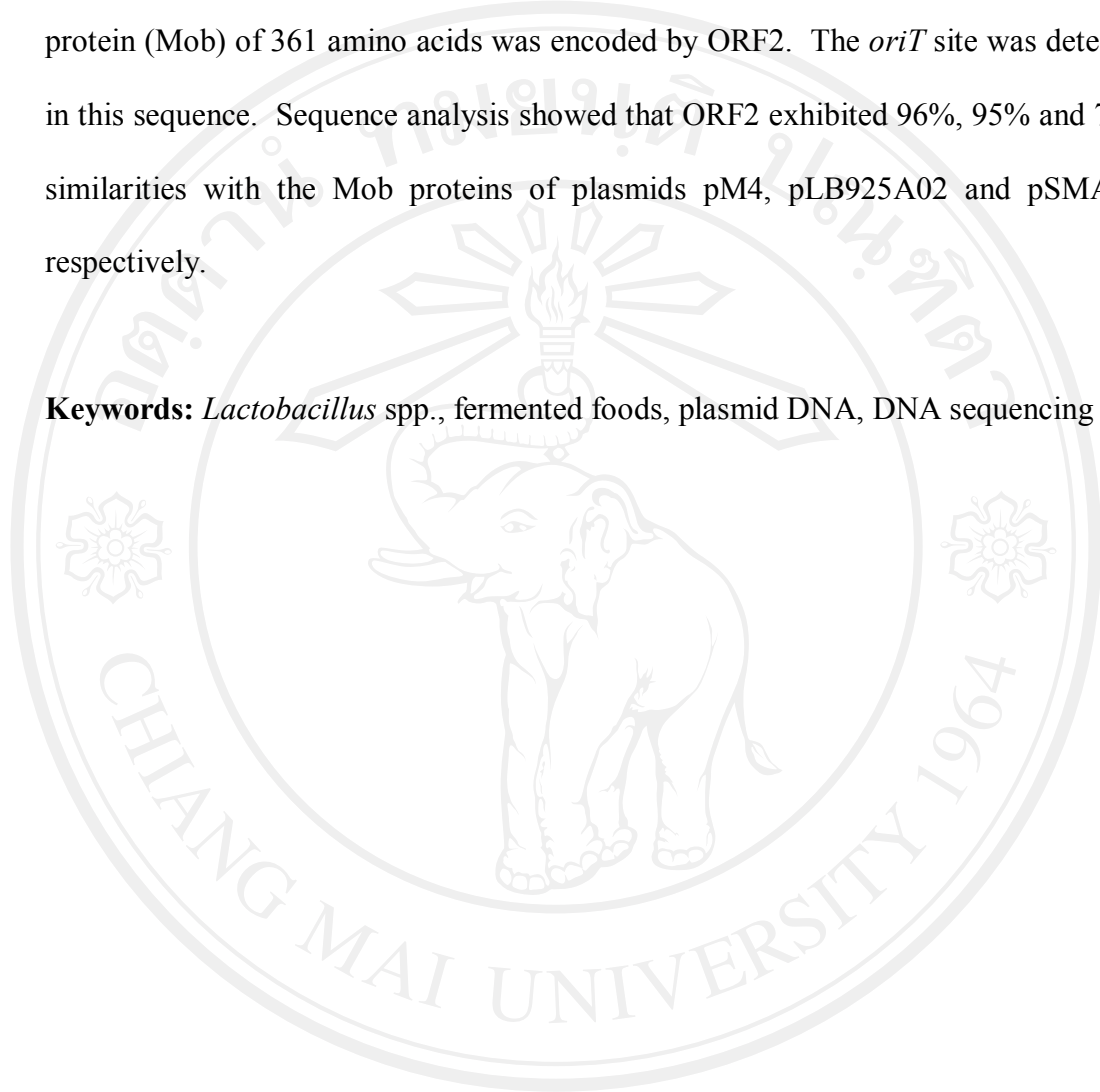
Bacteriocin production was evaluated by a well-diffusion technique. The results showed that all tested lactobacilli could not inhibit the growth of all pathogenic strains tested. The results indicated that the occurred inhibition zone was from acid produced in culture broth not from bacteriocins.

The ability to utilize several substrates including soluble starch, CMC, colloidal chitin, inulin, gelatin, citrate, phenylalanine and tryptophan was analyzed. All tested *Lactobacillus* spp. could not grow and produce lactic acid when growing in the broths containing those substrates mentioned above. However, six *L. plantarum* could grow on all solid media containing each substrate while six *L. brevis* could grow only in media containing CMC, colloidal chitin, inulin, citrate and tryptophan with no change of culture pH. All *Lactobacillus* spp. showed no clear zone on any solid media tested.

The smallest fragment of plasmid from *Lactobacillus brevis* D11 (pSD11) was selected to sequence and characterize. It consisted of a 3325 bp in length circular molecule with a G+C content of 38.32 mol%. The plasmid pSD11 was predicted to contain two putative ORFs, in which ORF1 shared 100%, 98% and 97% homology

with the Rep protein of plasmids pM4, pF8801 and pWCFS101, respectively, which are members of the rolling circle replication (RCR) pC194 family. A mobilization protein (Mob) of 361 amino acids was encoded by ORF2. The *oriT* site was detected in this sequence. Sequence analysis showed that ORF2 exhibited 96%, 95% and 71% similarities with the Mob proteins of plasmids pM4, pLB925A02 and pSMA23, respectively.

Keywords: *Lactobacillus* spp., fermented foods, plasmid DNA, DNA sequencing



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การตรวจหาและการหาลักษณะของพลาสมิดที่แยกจากเชื้อ <i>Lactobacillus</i> spp.	
ผู้เขียน	นางสาวพนิดนาฏ อุ่พุดินันท์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. นฤมล ทองไว	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ. ดร. สุมาลี พุกขากกร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

Lactobacillus spp. จำนวน 105 ไอโซเลทถูกแยกจากอาหารหมักดอง 24 ชนิด เมื่อนำไปจำแนกชนิดโดยวิธีทางชีวเคมี พบว่า สปีชีส์เด่นคือ *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum* และ *L. brevis* เมื่อศึกษาการแพร่กระจายของพลาสมิดใน *Lactobacillus* spp. ทั้งหมดพบว่า มีเพียง 12 ไอโซเลทที่มีพลาสมิด (11.43%) ทั้ง 12 ไอโซเลทนี้ถูกนำไปยืนยันชนิดโดยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene Plasmid profiles ของแต่ละไอโซเลทที่พบนี้มีหลากหลาย แต่ละไอโซเลทมีแถบ DNA ของพลาสมิดระหว่าง 6 ถึง 8 แถบ

Lactobacillus spp. ที่มีพลาสมิดนี้ถูกนำไปทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 21 ชนิด พบว่าทุกไอโซเลทคือต่อ bacitracin ciprofloxacin fusidic acid kanamycin nalidixic acid norfloxacin streptomycin และ vancomycin แต่ไวต่อ ampicillin cefotaxime chloramphenicol erythromycin และ rifampicin ถ้าหรีบ cefoxitin cephalothin clindamycin penicillin G polymyxin B และ tetracycline นั้น ผลการทดลองมี profile ที่หลากหลาย

เมื่อนำ *Lactobacillus* spp. ที่มีพลาสมิดมาทดสอบการผลิตแบคทีริโอซิน โดยวิธี well-diffusion technique พบว่า ทุกไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า การยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้น เกิดจากกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่ใช่เกิดจากแบคทีริโอซิน

การวิเคราะห์ความสามารถในการใช้ soluble starch, CMC, colloidal chitin, inulin, gelatin, citrate, phenylalanine และ tryptophan ของ *Lactobacillus* spp. ที่มีพลาสมิด ผลการทดลองพบว่าทุกไอโซเลทไม่สามารถเจริญและผลิตกรดแลคติกเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี substrate ข้างต้น อย่างไรก็ตาม *L. plantarum* ทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้บนอาหารแข็งทุกชนิด ในขณะที่ *L. brevis* ทุกไอโซเลท สามารถเจริญได้เฉพาะในอาหารแข็งที่มี CMC, colloidal chitin, inulin, citrate และ tryptophan เป็น substrate เท่านั้นแต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดต่าง และบนอาหารแข็งนี้ ทุกไอโซเลทไม่เกิดวงใสของการยับยั้ง

ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดนั้น ได้เลือกแถบ DNA ที่มีขนาดเล็กที่สุดของ *L. brevis* D11 (pSD11) ผลการวิจัยพบว่า pSD11 มีขนาด 3225 bp มีรูปร่างเป็นวงกลม มี G+C content อยู่ที่ 38.32 mol% pSD11 ประกอบด้วย 2 ORF โดย ORF1 มีความเหมือนกับ Rep protein ของพลาสมิด pM4 pF8801 และ pWCFS101 เท่ากับ 100% 98% และ 97% ตามลำดับ ซึ่งพลาสมิดทั้งหมดนี้อยู่ในกลุ่ม rolling circle replication (RCR) plasmid ที่อยู่ใน pC194 family ส่วน ORF2 คือ Mobilization protein ซึ่งมีกรดอะมิโน 361 ตัวและพบตำแหน่ง *oriT* ใน sequence นี้ ORF2 มีความเหมือนกับ Mob protein ของพลาสมิด pM4 pLB925A02 และ pSMA23 เท่ากับ 96% 95% และ 71% ตามลำดับ

คำสำคัญ: *Lactobacillus* spp., อาหารหมักดอง, พลาสมิดดีเอ็นเอ, การหาลำดับนิวคลีโอไทด์