วิศรุต ศรีศักดิ์วรางกูร : การปรับตัวทางวิวัฒนาการในห้องปฏิบัติการเพื่อกระตุ้นการผลิตยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Streptomyces* sp. SSUT88A ต่อแบคทีเรียดื้อยา (Adaptive Laboratory Evolution to Induce Antibiotic Production of *Streptomyces* sp. SSUT88A against Drug-resistant Bacteria) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวรัตน์ นันทพงษ์, 93 หน้า

คำสำคัญ: การปรับตัวทางวิวัฒนาการในห้องปฏิบัติการ, การเลี้ยงร่วม, *Streptomyces*, การผลิตยาปฏิชีวนะ, การศึกษาจีโนมแบบเปรียบเทียบ

ภัยคุกคามจากเชื้อก่อโรคที่ดื้อต่อยาหลายขนาน (multidrug-resistant; MDR) ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ได้เร่งให้เกิดความพยายามในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตยาปฏิชีวนะและพัฒนากลยุทธ์ในการค้นพบสารต้านจุลชีพรูปแบบใหม่ โดยเชื้อ *Streptomyces* ถือเป็นแหล่งสำคัญของสารชีวภาพใหม่ที่มีศักยภาพสูง ในการศึกษานี้ *Streptomyces* sp. SSUT88A ได้ถูกนำมาผ่านกระบวนการปรับตัวในห้องปฏิบัติการ (Adaptive Laboratory Evolution; ALE) ผ่านการเพาะร่วมแบบต่อเนื่องกับเชื้อดื้อยา ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* หรือเชื้อผสมของทั้งสามชนิด หลังผ่านการคัดเลือกนานสูงสุด 9 ครั้ง เชื้อที่ผ่านการปรับตัวแสดงการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์อย่างชัดเจน ทั้งในด้านฤทธิ์ต้านจุลชีพและการสร้างรงควัตถุ โดยสายพันธุ์ SSUT88A^{MR9-16} และ SSUT88A^{Ab9-5} แสดงผลผลิตสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 40% และ 43% ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ SSUT88A^{3P6-7} ซึ่งได้จากการเพาะร่วมกับเชื้อทั้งสามชนิด สูญเสียรงควัตถุสีเหลืองที่เป็นลักษณะเฉพาะ เกิดเป็นโคโลนีสีแดง และสูญเสียฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยสมบูรณ์ นอกจากนี้ SSUT88A^{Ab9-5} ยังสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ได้เร็วที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพยืนยันถึงความแรงที่เพิ่มขึ้นในสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับตัว (โดย MIC/MBC ต่อ MRSA และ MRSE เพิ่มขึ้น 4–8 เท่า) ในขณะที่ SSUT88A^{3P6-7} ไม่มีฤทธิ์ที่สามารถตรวจพบได้ การประกอบจีโนมของทุกสายพันธุ์มีความสมบูรณ์เกิน 99.9% และยังคงความเหมือนทางอนุกรมวิธานกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ไม่พบยีนดื้อยาที่ถูกถ่ายทอดมาหลังการปรับตัว การวิเคราะห์จีโนมเปรียบเทียบพบว่า สายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารต้านจุลชีพได้ทุกสายพันธุ์มี Biosynthetic Gene Cluster (BGC) ร่วมกัน 6 กลุ่ม ซึ่งส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ที่รู้จักหรือคาดการณ์ว่ามีฤทธิ์ต้านจุลชีพ สายพันธุ์ที่ผลิตสารได้สูงเท่านั้นที่พบกลุ่ม NRPS และ T1PKS เฉพาะ ซึ่งอาจมีบทบาทในการเสริมฤทธิ์ดังกล่าว ตรงกันข้าม กลุ่ม BGC ที่พบเฉพาะในสายพันธุ์ดั้งเดิมและ

สายพันธุ์ที่ไม่ออกฤทธิ์มักไม่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านจุลชีพและอาจไม่สำคัญต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้สายพันธุ์ SSUT88A^{3P6-7} ยังขาดกลุ่ม aryl polyene ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับรงควัตถุสีเหลืองสอดคล้องกับฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนไป การวิเคราะห์กลุ่มยีนด้วยลำดับโปรตีนแบบ ortholog โดยใช้ OrthoVenn3 พบว่ามีความอนุรักษ์ของจีโนมในภาพรวม แต่ยังพบกลุ่มเฉพาะ 16 กลุ่มที่มีเฉพาะในสายพันธุ์ที่ผลิตสารได้สูง ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการคลายโครงสร้าง RNA และเมแทบอลิซึมของ trehalose ในทางตรงกันข้าม มีกว่า 600 กลุ่มที่พบเฉพาะในสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตสาร ซึ่งอาจสะท้อนยีนที่ไม่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านจุลชีพ การสร้างแผนภูมิสายวิวัฒนาการจากกลุ่มยีนร่วมสนับสนุนความแตกต่างทางฟีโนไทป์ โดยสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์เพิ่มขึ้นจัดกลุ่มใกล้กัน การวิเคราะห์โครงสร้างจีโนมโดย Breseq ร่วมกับข้อมูลจาก antiSMASH และ OrthoVenn แสดงให้เห็นว่าหลายบริเวณที่หายไปในสายพันธุ์ SSUT88A^{3P6-7} สัมพันธ์กับ BGCs และกลุ่มยีน ortholog ที่ขาดหายไป บ่งชี้ว่า “การสูญเสียยีน” มีส่วนต่อการสูญเสียฟีโนไทป์ Breseq ในโหมด consensus ยังตรวจพบ SNPs ที่มีความน่าเชื่อถือสูงเพียง 3 ตำแหน่ง โดยสองตำแหน่งอยู่ใกล้บริเวณ promoter σ^{70} ที่คาดการณ์ไว้ในสายพันธุ์ที่ผลิตสารได้สูง (ด้านหน้าของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ผนังเซลล์หรือการควบคุมการถอดรหัส) ขณะที่อีกตำแหน่งเป็น SNP แบบ silent ในสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตสาร ซึ่งอาจมีผลทางอ้อมต่อการแปลโปรตีนผ่าน codon usage bias หรือโครงสร้าง mRNA ข้อมูลทั้งหมดนี้สนับสนุนโมเดลที่ฟีโนไทป์ที่สังเกตได้มีที่มาจากการสูญเสียยีนโครงสร้างร่วมกับการปรับระดับการควบคุมทางพันธุกรรม การลบยีนสำคัญอาจทำให้เกิดการสูญเสียฟังก์ชัน ขณะที่การลบยีนที่ไม่จำเป็นอาจลดภาระเมแทบอลิซึมของเซลล์และหันทรัพยากรไปยังการผลิตสารทุติยภูมิ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ALE ผ่านการเพาะร่วมสามารถปรับระดับการแสดงออกของเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตยาปฏิชีวนะได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งถือเป็นแนวทางที่มีศักยภาพสูงสำหรับการพัฒนาสายพันธุ์เชิงอุตสาหกรรมและการค้นพบสารชีวภาพใหม่ในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาปรีคลินิก ลายมือชื่อนักศึกษา พิมุต ศรีสวัสดิ์วงกร

ปีการศึกษา 2567 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

WISSRUT SRIAKVARANGKOOL : ADAPTIVE LABORATORY EVOLUTION TO INDUCE ANTIBIOTIC PRODUCTION OF *STREPTOMYCES* SP. SSUT88A AGAINST DRUG-RESISTANT BACTERIA. THESIS ADVISER : ASST. PROF. NAWARAT NANTAPONG, Ph.D. 93 PP.

Keywords: Adaptive Laboratory Evolution, Co-culture, *Streptomyces*, Antibiotic Production, Comparative Genome Analysis

The growing threat of multidrug-resistant (MDR) pathogens has intensified efforts to enhance antibiotic production and improve antibiotic discovery strategies. *Streptomyces* spp. is a major promising source of novel antibiotics. In this study, *Streptomyces* sp. SSUT88A was subjected to adaptive laboratory evolution (ALE) via serial co-cultivation with drug-resistant pathogens, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, or a mixture of all three. After up to nine cycles of adaptation selection, evolved strains exhibited distinct phenotypic shifts in antimicrobial activity and pigment production. Strains SSUT88A^{MR9-16} and SSUT88A^{Ab9-5} exhibited significantly increased with crude extract yields increasing by 40% and 43%, respectively. While strain SSUT88A^{3P6-7}, isolated from the three-pathogen condition, lost its characteristic yellow diffusible pigment, formed red colonies, and exhibited a complete loss of antimicrobial activity. SSUT88A^{Ab9-5} also demonstrated the earliest onset of bioactive compound production. Bioactivity assays confirmed enhanced potency in adapted strains (4–8-fold stronger MIC/MBC against MRSA and MRSE) while strain SSUT88A^{3P6-7} exhibited no detectable activity. All genome assemblies were >99.9% complete and remained taxonomically identical to the wild-type. No acquired resistance genes were detected in any strain after ALE. Comparative genomic analysis identified six biosynthetic gene clusters (BGCs) shared among all antibiotic producers comprising primarily of classes with known or predicted antimicrobial activity. Only the High-antibiotic-producing strains possessed unique NRPS and T1PKS clusters potentially contribute to enhanced bioactivity. In contrast, clusters present only in the wild-type and non-producing strain were not commonly linked to antibacterial activity and may represent less relevant pathways. The SSUT88A^{3P6-7} strain lacked a yellow colored-associated aryl polyene cluster, consistent

with its phenotype. Orthologous clustering using OrthoVenn3 supported broad genomic conservation across strains but identified 16 unique clusters shared only by high-antibiotic-producing strains, including functions in RNA unwinding and trehalose metabolism. Conversely, over 600 clusters were shared only between the wild-type and non-producer, likely representing traits unrelated to antibiotic production. Phylogenomic analysis based on orthologs reflected phenotypic divergence, with enhanced strains clustering together. To link these patterns to structural variation, BGC predictions were cross-referenced with orthologous clusters and Breseq analysis. Multiple deletions in the non-producing strain overlapped with missing BGCs and ortholog clusters, suggesting that gene loss contributed to phenotypic loss. Breseq consensus mode also identified three high-confidence SNPs: two located near predicted σ^{70} promoter regions in the high-producing strains (upstream of genes involved in cell wall biosynthesis or transcriptional regulation), and one synonymous SNP in the non-producing strain that may subtly affect translation via codon usage bias or translational efficiency. Taken together, these findings support a model in which observable phenotypes arise from a combination of structural gene loss and regulatory fine-tuning. While deletion of functionally important regions can lead to phenotypic loss, gene loss in non-essential regions may reduce metabolic burden and shift cellular resources toward secondary metabolite production. These results demonstrate how ALE via co-cultivation can fine-tune secondary metabolism and enhance antibiotic production, offering a promising strategy for future industrial strain improvement and bioactive compound discovery.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Preclinical Sciences
Academic Year 2024

Student's Signature Wissanut Srisakvarangkool
Advisor's Signature