

ANALISIS KEPELBAGAIAN DAN METAGENOMIK KOMUNITI
BAKTERIA YANG BERSEKUTU DENGAN BEBERAPA
SPESIES DINOFLAGELAT MARIN BERACUN
DARI PERAIRAN MALAYSIA

MUHD DANISH DANIEL BIN ABDULLAH

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

ANALISIS KEPELBAGAIAN DAN METAGENOMIK KOMUNITI BAKTERIA
YANG BERSEKUTU DENGAN BEBERAPA SPESIES DINOFLAGELAT
MARIN BERACUN DARI PERAIRAN MALAYSIA

MUHD DANISH DANIEL BIN ABDULLAH

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH
DOKTOR FALSAFAH

FAKULTI SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
BANGI

2009

DIVERSITY AND METAGENOMICS ANALYSES OF BACTERIA
COMMUNITY ASSOCIATED WITH SOME TOXIC MARINE
DINOFLAGELLATES FROM MALAYSIAN WATERS

MUHD DANISH DANIEL BIN ABDULLAH

THESIS SUBMITTED IN FULFILMENT FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY

FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
BANGI

2009

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.



02 Disember 2009

MUHD DANISH DANIEL BIN ABDULLAH
P30396

PENGHARGAAN

Syukur Alhamdulillah kepada Allah S.W.T kerana memberikan saya kesihatan yang cukup, masa dan kematangan fikiran untuk menyiapkan kajian ini dalam bentuk sebegini rupa. Jutaan terima kasih yang rasanya tidak saya mampu untuk balas kembali hingga ke akhir hayat saya kepada penyelia utama Prof. Dr. Gires Usup atas bantuan yang begitu besar, bimbingan, teguran dan nasihat yang begitu berguna sepanjang kajian ini. Tidak lupa juga kepada penyelia bersama saya iaitu Prof. Madya Dr. Asmat Ahmad atas nasihat dan bimbingan yang banyak membantu menguatkan lagi semangat saya untuk menyiapkan kajian ini. Terima kasih juga saya ucapkan kepada Prof. Dr. Nor Muhammad Mahadi selaku ketua projek yang banyak membantu dari segi kewangan dan bantuan teknikal sepanjang kajian ini.

Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada staf-staf dan rakan-rakan seperjuangan saya dari Makmal Mikrobiologi dan Bioteknologi Marin terutamanya pembantu makmal Pn. Hjh Mimi dan Pn. Siti, senior saya Dr. Leaw Chui Pin, Keni dan Mei Yee serta rakan-rakan makmal, Ah Soon, Weng Ruh, Kok Wah, Siew Ling dan Zaimah atas bantuan, nasihat, kerjasama dan sokongan yang diberikan dalam menjayakan penyelidikan saya. Kepada staf dan rakan dari Institut Genom Malaysia terutamanya En. Mat Nor, Cik Halimah, Pn. Ain, Shireen, Kamal, Patricia King dan Yealing, terima kasih disampaikan atas segala kerjasama dan bantuan yang disalurkan.

Di kesempatan ini, saya juga ingin mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga kepada ahli keluarga saya terutamanya isteri yang tercinta, Pn. Khairil Shazmin Binti Kamarudin dan anak sulung kami yang tersayang, Muhammad Iman Mikail Tai Bin Muhd Danish Daniel atas segala sokongan moral dan fizikal yang diberikan. Tidak lupa juga terima kasih diucapkan kepada ahli keluarga di Johor Bahru, Papa, Mami, dan adik beradik saya serta ahli keluarga di Parit Buntar, Abah, Mama, Ayil, Eein dan Shahmi. Tanpa dorongan, kesabaran, pengorbanan dan doa dari mereka, tesis ini tidak mungkin dapat disiapkan.

Penyelidikan ini telah dibiayai oleh IRPA 09-02-02-008-BTK/ER-36 dan IRPA 02-01-02-SF0203.

ABSTRAK

Kajian-kajian terdahulu mencadangkan bahawa terdapat komuniti bakteria spesifik wujud bersama dalam fikosfera dinoflagelat marin. Walau bagaimanapun, sifat sebenar interaksi antara bakteria dan dinoflagelat serta peranan bakteria yang berkemungkinan terlibat dalam toksigenesis dinoflagelat masih tidak jelas. Dalam kajian ini, pendekatan konvensional dan metagenomik telah digunakan untuk menentukan kepelbagaian bakteria yang bersekutu dengan beberapa spesies dinoflagelat marin beracun dari perairan Malaysia dan untuk mencari beberapa gen daripada bakteria tersebut. Dinoflagelat tersebut adalah *Alexandrium minutum*, *A. tamiyavanichii* dan *Pyrodinium bahamense* var *compressum*. Analisis kepelbagaian bakteria telah dilakukan dengan memencilkan bakteria ke dalam kultur tulen dan elektroforesis gel berkecerunan penyahasian (DGGE) produk amplifikasi gen 16S rRNA daripada metagenom diikuti dengan penjujukan DNA genotip yang unik. Untuk penemuan gen, satu perpustakaan klon fosmid telah dibina dari metagenom. Penjujukan hujung selitan telah dilakukan terhadap beberapa klon fosmid. Di samping itu, penjujukan selitan lengkap telah dilakukan terhadap satu klon fosmid yang terpilih. Sebanyak 15 pencilan bakteria telah diperolehi di mana 4 adalah daripada kultur *A. minutum*, 7 daripada kultur *A. tamiyavanichii* dan 4 daripada kultur *P. bahamense*. Analisis DGGE telah menghasilkan 25 jalur di mana 6 adalah daripada kultur *A. minutum*, 9 daripada kultur *A. tamiyavanichii* dan 10 daripada kultur *P. bahamense*. Empat belas jalur adalah unik. Analisis jujukan jalur-jalur unik tersebut dan bakteria boleh kultur menunjukkan bahawa 15 genotip adalah daripada α -Proteobakteria, 1 daripada β -Proteobakteria, 4 daripada γ -Proteobakteria, 9 daripada CFB dan 1 daripada Firmicutes. Analisis biokimia dan filogeni molekul 6 pencilan bakteria terkultur menunjukkan bahawa bakteria tersebut berkemungkinan besar adalah spesies baru dalam genus *Marinobacter*, *Thalassospira*, *Alteromonas*, *Oceanicaulis*, *Erythrobacter* dan *Limnobacter*. Hanya 3 daripada 14 jujukan yang diperolehi daripada analisis DGGE mempunyai padanan dengan genera yang diketahui dalam Genbank. Sejumlah 1501 klon fosmid dengan saiz selitan antara 30-40 Kbp telah dihasilkan. Penjujukan hujung selitan 238 klon menunjukkan bahawa 55% gen mempunyai fungsi yang diketahui, 11% adalah fungsi putatif dan 34% adalah gen yang tidak diketahui fungsinya atau tiada padanan dalam Genbank. Penjujukan lengkap klon MgKD02a007C11 menghasilkan satu kontig bersaiz 32.9 Kbp. Dua puluh enam ORF telah diramal di mana 7 terlibat dalam proses metabolisme, 7 terlibat dalam proses sel dan pengisyaratan, 1 terlibat dalam pemprosesan dan penyimpanan maklumat, 3 mempunyai fungsi pelbagai atau fungsi yang diramalkan secara umum sahaja dan 8 tidak diketahui fungsinya atau tiada padanan dalam Genbank. Satu ORF mungkin adalah gen baru memandangkan ia tiada padanan dengan mana-mana jujukan. Gen-gen lain yang telah dikesan termasuklah gen yang mengkodkan glyoxalase I, biosintesis endotoksin dan pengawal transkripsi famili LuxR. Kajian ini telah menunjukkan bahawa komuniti bakteria yang bersekutu dengan dinoflagelat merupakan satu sumber yang berharga untuk menemui spesies bakteria baru serta gen dan produk gen baru.

DIVERSITY AND METAGENOMICS ANALYSES OF BACTERIA COMMUNITY ASSOCIATED WITH SOME TOXIC MARINE DINOFLAGELLATES FROM MALAYSIAN WATERS

ABSTRACT

Previous studies have suggested that a specific community of bacteria coexists within the phycosphere of marine dinoflagellates. However, the exact nature of interaction between the bacteria and the dinoflagellates, as well as the possible roles of bacteria in dinoflagellate toxigenesis, remain unclear. In this study conventional and metagenomics approaches were used to determine the diversity of bacteria associated with some toxic marine dinoflagellates from Malaysian waters and to discover some of the genes of those bacteria. The toxic dinoflagellates were *Alexandrium minutum*, *A. tamiyavanichii* and *Pyrodinium bahamense* var *compressum*. Bacteria diversity was assessed by isolation into pure culture and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of metagenomic 16S rRNA gene amplification products followed by DNA sequencing of unique genotypes. For gene discovery, a fosmid clone library was constructed from the metagenome. Some of the fosmid clones were end-sequenced. In addition, one fosmid clone was selected for complete insert sequencing. A total of 15 culturable isolates were obtained, of which 4 were from *A. minutum* culture, 7 were from *A. tamiyavanichii* culture and 4 from *P. bahamense* culture. DGGE analysis produced a total of 25 bands of which 6 were from *A. minutum* culture, 9 were from *A. tamiyavanichii* culture and 10 were from *P. bahamense* culture. Fourteen of the bands were unique. Sequence analysis of the unique bands and culturable isolates showed that 15 genotypes belonged to the α -Proteobacteria, 1 belonged to β -Proteobacteria, 4 belonged to the γ -Proteobacteria, 9 belonged to CFB and 1 belonged to Firmicutes. Detailed biochemical and molecular phylogenetic analysis of 6 of the cultured isolates showed that they were most probably new species of *Marinobacter*, *Thalassospira*, *Alteromonas*, *Oceanicaulis*, *Erythrobacter* and *Limnobacter*. Only 3 of the 14 sequences obtained from the DGGE analysis had matches to known genera in Genbank. A total of 1501 fosmid clones with insert sizes of 30-40 Kbp were produced. End sequencing of 238 clones showed that 55% of the genes had known functions, 11% were of putative function and 34% were genes of unknown function or had no match in Genbank. Complete sequencing of clone MgKD02a007C11 produced a contig of 32.9 Kbp in size. Twenty-six ORFs were predicted of which 7 were involved in metabolic processes, 7 were involved in cellular processes and signaling, 1 was involved in information storage and processing, 3 were multifunctional or general function prediction only and 8 were function unknown or no match in Genbank. One ORF was probably a novel gene since it had no match to published sequences. Other genes detected include those coding for glyoxalase I, endotoxin biosynthesis and LuxR family of transcriptional regulator. This study have shown that dinoflagellate-associated bacteria community is a valuable source for discovery of novel bacteria species and novel genes and gene products.