

Badanie wpływu glukozy i glicerolu oraz jonów żelaza na syntezę związków przeciwdrobnoustrojowych i formowanie biofilmu przez *Pseudomonas donghuensis* P482

ABSTRAKT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Marta Matuszewska

promotor: dr hab. Sylwia Jafra, prof. UG

promotor pomocniczy: dr Magdalena Rajewska

Pseudomonas donghuensis P482 jest izolatem bakteryjnym pochodzącym z ryzosfery pomidora. W związku ze swoimi właściwościami, m.in. aktywnością przeciwbakteryjną i przeciwgrybową wobec patogenów roślin oraz zdolnością do kolonizacji korzeni roślin, szczep ten jest badany w kontekście biologicznej ochrony roślin. Dane literaturowe wskazują, że jednymi z istotniejszych czynników wpływających na biosyntezę biobójczych metabolitów wtórnych oraz formowanie biofilmu (niezbędnego do wydajnej kolonizacji roślin) są składniki odżywcze metabolizowane przez bakterie i wchodzące w szereg ścieżek biochemicznych oraz regulujące ekspresję genów. W przypadku bakterii z rodzaju *Pseudomonas* ważną rolę odgrywają źródła węgla oraz żelaza. Aby zbadać ich wpływ na szczep P482 zastosowano dwa często spotykane w literaturze źródła węgla, glukozę i glicerol, a także jony żelaza(II) i żelaza(III), by wykazać zależności i różnice w modulacji aktywności bakteriobójczej P482, biosyntezy biobójczych metabolitów i ekspresji genów za nie odpowiedzialnych, a także formowania biofilmu w warunkach abiotycznych.

W badaniach zastosowano mutanty insercyjne P482 z inaktywacją wyselekcjonowanych genów z trzech regionów odpowiedzialnych za aktywność przeciwdrobnoustrojową P482 (klaster biosyntezy 7-hydroksytropolonu (7-HT), dwa geny odpowiedzialne za biosyntezę piowerdyny oraz „klaster 17.”, odpowiedzialny za syntezę nieznanego czynnika przeciwdrobnoustrojowego), a także regulację metabolizmu żelaza (gen *fur*) i regulację transkrypcji przez system Gac-Rsm (gen *gacA*). Badania antybiozy bezpośredniej w/w mutantów wobec trzech bakteryjnych patogenów roślin (*Dickeya solani* IFB0102, *Pectobacterium brasiliense* Pcb LMG21371 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss762) na podłożach minimalnych z odpowiednim źródłem węgla i żelaza wykazały brak udziału klastra biosyntezy 7-HT w aktywności bakteriobójczej P482, gdy jedynym źródłem węgla jest glicerol. Ważną rolę dla aktywności przeciwbakteryjnej w podłożu z glicerolem pełni natomiast „klaster 17.”. Niezależnie od źródła węgla, geny biosyntezy piowerdyny są wysoce istotne dla aktywności przeciwdrobnoustrojowej P482, a suplementacja żelazem(II) powoduje osłabienie aktywności od nich zależnej.

Ekstrakty zawierające metabolity wtórne (w tym bakteriobójcze) pochodzące z filtratów pochodowlanych P482 i mutantów w podłożach pełnych oraz minimalnych z różnym źródłem węgla poddane zostały analizom z użyciem techniki HPLC-MS. Dzięki tym badaniom identyfikowano różnice pomiędzy metabolomem P482 oraz poszczególnych mutantów w danych warunkach hodowli.

Ekspresja wcześniej wymienionych genów P482 w podłożach minimalnych z glukozą/glicerolem bez żelaza lub z suplementacją jonami żelaza(II)/żelaza(III) została zbadana metodą RT-qPCR. Badania poprzedzono szczegółową selekcją i walidacją genów referencyjnych, z których najwyższą stabilność ekspresji wykazały *gyrB*, *rpoD* oraz *mrdA*. Wykazano, że ekspresja genów związanych z produkcją 7-HT jest znacznie obniżona w P482 hodowanym z glicerolem jako jedynym źródłem węgla w porównaniu do hodowli z glukozą, a suplementacja żelazem (II) obniża ekspresję genów biosyntezy 7-HT oraz piowerdyny.

Analiza zależności formowania biofilmu abiotycznego przez P482 od źródeł węgla i żelaza obecnych w podłożu hodowlanym sugeruje, że suplementacja jonami żelaza(II) ma stymulujący wpływ na formowanie biofilmu przez P482 w podłożu z glicerolem, jednakże wpływ ten jest negatywny w podłożu z glukozą.

Łącznie, przeprowadzone analizy wskazują na wysoką zależność metabolizmu wtórnego i aktywności bakteriobójczej P482 od badanych źródeł węgla i żelaza. Wyniki przeprowadzonych badań podstawowych przyczyniają się do zrozumienia wpływu powyższych substancji odżywczych na mechanizmy działania szczepu P482 o potencjalnym zastosowaniu w biologicznej ochronie roślin uprawnych.