

**mgr Aleksandra Rajnisz-Mateusiak**

**Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.: „Charakterystyka przeciwbakteryjnych właściwości wtórnego metabolitu wytwarzanego przez wybrany szczep, reprezentujący nowoopisany gatunek promieniowca z rodzaju *Streptomyces*.”**

**Promotor: dr hab. Jolanta Solecka, prof. NIZP PZH - PIB**

Oporność bakterii na antybiotyki stała się poważnym problemem współczesnej medycyny i zdrowia publicznego o zasięgu globalnym. Sukcesywny wzrost liczby antybiotykoopornych szczepów bakterii prowadzi do ograniczenia możliwości skutecznego leczenia infekcji, zwiększonych kosztów terapii oraz zwiększającej się śmiertelności z powodu zakażeń. Postęp w badaniach nad nowymi antybiotykami jest zależny m. in. od efektów poszukiwań bioaktywnych substancji wytwarzanych przez mikroorganizmy. Bakterie rodzaju *Streptomyces* produkują metabolity wtórne, które stanowią bogate źródło substancji wykazujących aktywność biologiczną, w tym również działanie przeciwbakteryjne.

Głównym celem przedstawionej pracy było odkrycie nowego gatunku promieniowca wytwarzającego metabolity wtórne o najprawdopodobniej nieopisanej strukturze chemicznej, które hamują wzrost bakterii Gram-ujemnych takich jak: *Klebsiella pneumoniae* oraz *Escherichia coli* i w przyszłości mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w medycynie.

W niniejszej pracy, z trzydziestu trzech próbek gleby, pobranych w krajach Azji, Ameryki Południowej, Ameryki Środkowej, Afryki oraz Europy, wyizolowano 166 szczepów promieniowców. Po przeprowadzeniu skriningu pod kątem wytwarzania metabolitów wtórnych o aktywności przeciwbakteryjnej uzyskano 49 izolatów, których zatężone supernatanty hodowli hamowały wzrost bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC® 43300 (MRSA) lub *Escherichia coli* ATCC® BAA-198 (ESBL). Następnie na podstawie stref zahamowania wzrostu bakterii *Escherichia coli* ATCC® BAA-198 lub *Staphylococcus aureus* ATCC® 43300 przez zatężone supernatanty, wynoszących odpowiednio >0 lub  $\geq 40$  mm, wybrano 13 spośród 49 izolatów. W kolejnym etapie niniejszej pracy określono sekwencje genu 16S rRNA dwunastu izolatów. Analiza BLAST pozwoliła na określenie przynależności rodzajowej izolatów oraz określenie gatunków promieniowców blisko z nimi spokrewnionych. Ustalono, że jeden izolat należy do rodzaju *Kitasatospora*, zaś pozostałe 11 do rodzaju *Streptomyces*. Z dalszych badań taksonomicznych wykluczono 6 izolatów promieniowców, ponieważ na podstawie analizy podobieństwa sekwencji 16S rRNA zidentyfikowano powyżej dziesięciu gatunków blisko z nimi spokrewnionych. Pokrewieństwo filogenetyczne sześciu pozostałych szczepów oraz blisko spokrewnionych z nimi gatunków

promieniowców badano na podstawie sekwencji 16S rRNA przy zastosowaniu trzech algorytmów: „przyłączania sąsiadów” (neighbour –joining), największej wiarygodności (maximum –likelihood) oraz analizy bayesowskiej i otrzymano trzy drzewa pokrewieństwa filogenetycznego analizowanych szczepów.

Wartość podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA jednego z badanych szczepów, *Streptomyces* sp. RM1 wynosiła poniżej wartości granicznej 98,67% wobec wszystkich gatunków *Streptomyces* znajdujących się w bazie EzBioCloud. Dlatego szczep *Streptomyces* sp. RM1 został zakwalifikowany jako nowy gatunek bez konieczności ustalenia podobieństwa pełnogenomowych sekwencji DNA z najbliższym z nim spokrewnionym gatunkiem. Natomiast wartość podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA pozostałych pięciu szczepów promieniowców oraz blisko z nimi spokrewnionych gatunków wynosiła powyżej wartości granicznej 98,67%. W związku z tym konieczne było przeprowadzenie analizy porównawczej ich pełnogenomowych sekwencji z najbliższymi spokrewnionymi z nimi gatunkami. Określono pełnogenomowe sekwencje szczepów: *Streptomyces* sp. PL1, *Streptomyces* sp. SO3 oraz *Kitasatospora* sp. PL4, a następnie z bazy danych EzBioCloud uzyskano sekwencje pełnogenomowe najbliższych spokrewnionych z nimi gatunków. Na podstawie przeprowadzonej cyfrowej hybrydyzacji dDDH przy użyciu narzędzia internetowego Genome to Genome Distance Calculator wersja 3.0 określono wartość podobieństwa pełnogenomowych sekwencji, która wynosiła pomiędzy *Streptomyces* sp. PL1 oraz *Streptomyces orinoci* NBRC 13466 26,1%; pomiędzy *Kitasatospora* sp. PL4 oraz *Kitasatospora aureofaciens* ATCC® 10762 32,5% i pomiędzy *Streptomyces* sp. SO3 oraz *Streptomyces kasugaensis* M338-M1 27,3%. Wszystkie uzyskane wartości były poniżej wartości granicznej 70%, dlatego badane szczepy *Streptomyces* sp. PL1, *Kitasatospora* sp. PL4 oraz *Streptomyces* sp. SO3 zostały uznane za nowe gatunki. Ze względu na największą wartość strefy zahamowania wzrostu bakterii *Escherichia coli* ATCC® BAA-198 do dalszych badań taksonomicznych oraz optymalizacji procesu biosyntezy wybrano *Streptomyces* sp. PL1 sp. nov.

Szczep *Streptomyces* sp. PL1 sp. nov. został wyizolowany z gleby pobranej z lasu w Indiach. Najbliższymi spokrewnionymi ze *Streptomyces* sp. PL1 sp. nov. gatunkami promieniowców ustalone poprzez rybotypowanie to: *Streptomyces orinoci* DSM 40571, *Streptomyces lilacinus* DSM 40254, *Streptomyces varsoviensis* DSM 40346, *Streptomyces morookaense* DSM 40503 oraz *Streptomyces abikoensis* DSM 40831. Na podstawie porównania cech fenotypowych potwierdzono odrębność szczepu *Streptomyces* sp. PL1 sp. nov. od pięciu blisko spokrewnionych z nim gatunków *Streptomyces*. Ustalona optymalna temp. do wzrostu

*Streptomyces* sp. PL1 sp. nov. wynosi od 20°C do 37°C, natomiast optymalne wartości pH podłoża wynoszą od 6,0 do 8,0. Wzrost szczepu *Streptomyces* sp. PL1 sp. nov. obserwowano w podłożu z dodatkiem NaCl o stężeniu do 4%. Szczep wykorzystywał do wzrostu jako źródło węgla D-glukozę, D-laktozę, D-fruktozę, D-mannozę, glicerol albo rafinozę. Wyniki badań markerów chemiotaksonomicznych tj. profilu kwasów tłuszczowych, lipidów polarnych, menachinononów oddechowych, cukrów oraz obecności kwasu LL-diaminopimelinowego stanowiły dodatkowe potwierdzenie przynależności rodzajowej *Streptomyces* sp. PL1 sp. nov. Wielkość genomu *Streptomyces* sp. PL1 sp. nov. wynosiła 7 133 684 pz, zaś zawartość G+C była równa 70,7%. Szczep wytwarzał metabolity wtórne o aktywności przeciwbakteryjnej, które hamowały wzrost następujących bakterii: *Escherichia coli* ATCC® BAA-198 (MIC=2,5 µl/ml), *Escherichia coli* ATCC® 25922™ (MIC=2,5 µl/ml), *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 13882 (MIC=1,25 µl/ml), *Salmonella enterica* ATCC® 10708™ (MIC=1,25 µl/ml), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 (MIC=20 µl/ml), *Proteus mirabilis* ATCC® 12453 (MIC=50 µl/ml), *Proteus vulgaris* ATCC® 6896™ (MIC=200 µl/ml) oraz *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC® 13637™ (MIC=200 µl/ml). Wartości MIC supernatantów wobec szczepów klinicznych *Escherichia coli* wytwarzających ESBL wynosiły 2,5 lub 5 µl/ml. Z kolei analiza pełnogenomowej sekwencji *Streptomyces* sp. PL1 sp. nov. z wykorzystaniem programu antiSMASH wykazała obecność 44 klastrów genów potencjalnie odpowiedzialnych za biosyntezę metabolitów wtórnych. Żaden z wykrytych klastrów nie był odpowiedzialny za biosyntezę znanej substancji przeciwbakteryjnej, co pozwala przypuszczać, że metabolity wtórne o aktywności przeciwbakteryjnej wytwarzane przez badany szczep mają nieopisaną do tej pory strukturę chemiczną. Ponadto, analiza HPLC-MS nie wykazała obecności w supernatancie hodowli aminoglikozydów pochodzenia mikrobiologicznego: streptomycyny, kanamycyny, spektynomycyny, neomycyny oraz tetracykliny, oksatetracykliny i chlorotetracykliny, tym samym można uznać, że nie są wytwarzane przez badany szczep.

Kolejne nowe gatunki promieniowców uzyskane w niniejszej pracy, wytwarzające metabolity wtórne o aktywności przeciwbakteryjnej to *Streptomyces* sp. RM1, *Kitasatospora* sp. PL4 oraz *Streptomyces* sp. SO3. Wielkość genomu szczepów *Streptomyces* sp. SO3, *Streptomyces* sp. RM1 oraz *Kitasatospora* sp. PL4 wynosiła odpowiednio: 9 138 864 pz, 6 406 756 pz oraz 8 499 943 pz. Analiza antiSMASH pełnogenomowych sekwencji szczepów *Streptomyces* sp. RM1 sp. nov., *Streptomyces* sp. SO3 sp. nov. oraz *Kitasatospora* sp. PL4 sp. nov. wykazała obecność odpowiednio: 29 klastrów, 74 klastrów oraz 50 klastrów genów

potencjalnie odpowiedzialnych za biosyntezę metabolitów wtórnych. Żaden z wykrytych klastrów nie był odpowiedzialny za biosyntezę znanego związku przeciwbakteryjnego.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań naukowych w celu określenia struktur chemicznych bioaktywnych metabolitów wtórnych wytwarzanych przez szczepy *Streptomyces* sp. PL1 sp. nov., *Streptomyces* sp. RM1 sp. nov., *Kitasatospora* sp. PL4 sp. nov. oraz *Streptomyces* sp. SO3 sp. nov., a następnie uzyskanie związków na drodze syntezy chemicznej i przeprowadzeniu dokładnej charakterystyki ich właściwości biologicznych oraz analiz toksykologicznych.