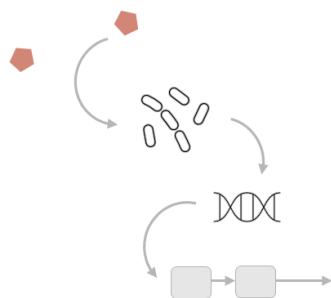


Załącznik nr 3

# Autoreferat

dr Dorota Krzyżanowska



Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2023



**1. Imię i nazwisko.**

Dorota Magdalena Krzyżanowska (Dorota M. Krzyżanowska)

ORCID: 0000-0003-0177-377X; LinkedIN: 59370533

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

2015	Doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed Tytuł rozprawy: „Antagonizm szczepu <i>Pseudomonas</i> P482 względem bakteryjnych patogenów roślin z rodzajów <i>Pectobacterium</i> i <i>Dickeya</i> w warunkach <i>in vitro</i> i <i>in planta</i> ”
2009	Magister, kierunek Biotechnologia Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
2007	Licencjat, kierunek Biotechnologia Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed

**3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.**

01.02.2022- obecnie	Stanowisko typu <i>lab manager</i> Zatrudnienie w projekcie NCN SONATA BIS Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
20.02.2018- 20.12.2021	Adiunkt (stanowisko typu <i>postdoc</i> ) Zatrudnienie w projekcie NCN OPUS13 Zakład Mikrobiologii Roślin Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
07.04.2015- 19.02.2018	Asystent (główny wykonawca w projekcie) Zatrudnienie w projekcie NCN OPUS7 Zakład Mikrobiologii Roślin (wówczas: Pracownia Biologicznej Ochrony Roślin) Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed

01.10.2009- Doktorantka  
07.04.2015 Studium Doktoranckie Chemii i Biochemii przy Wydziale Chemii  
Uniwersytetu Gdańskiego

W okresie kariery zawodowej dwukrotnie przebywałam na urlopie macierzyńskim i rodzicielskim z uwagi na urodzenie dzieci (7 miesięcy na przełomie lat 2012/13 oraz 12 miesięcy na przełomie lat 2020/21).

#### 4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

Jako moje główne osiągnięcie naukowe na potrzeby postępowania habilitacyjnego wskazuję **cykl czterech powiązanych tematycznie publikacji doświadczalnych. We wszystkich pracach składających się na w/w osiągnięcie naukowe jestem pierwszym autorem.** Pozostałe osiągnięcia naukowe z okresu po uzyskaniu stopnia doktora omówiłam w punktach 4.4 oraz 5 niniejszego dokumentu.

##### 4.1. Tytuł cyklu artykułów, spełniających warunek wskazany w art. 219 ust. 1 pkt 2 ppkt (b) ustawy

Wykorzystanie sekwencjonowania następnej generacji oraz metod analizy *in silico* do poznania właściwości wybranych ryzobakterii o potencjale do zastosowania w biologicznej ochronie roślin.

##### 4.2. Wykaz publikacji składających się na główne osiągnięcie, z wyszczególnieniem wkładu kandydatki

IF – współczynnik oddziaływania (Impact Factor) z roku opublikowania pracy.

MEiN/MNiSW – punktacja czasopism wg Ministerstwa Edukacji i Nauki zgodnie z wykazem obowiązującym w okresie ukazania się prac. W różnych okresach obowiązywały różne systemy punktacji czasopism.

#### PUBLIKACJA 1

**Krzyżanowska D.M.**, Maciąg T., Ossowicki A., Rajewska M., Kaczyński Z., Czerwicka M., Rąbalski Ł., Czaplewska P. Jafra S.;

*Ochrobactrum quorumnocens* sp. nov., a quorum quenching bacterium from the potato rhizosphere.

**PLoS ONE 2019**, 14(1): e0210874. DOI: 10.1371/journal.pone.0210874

**IF 2,740; MEiN 100**

**Mój wkład w publikację:**

- *miałam udział w tworzeniu koncepcji badań*
- *przeprowadziłam analizę filogenetyczną w oparciu o parametry ANIb i GGDC oraz tzw. core genome*
- *oznaczyłam krzywe wzrostu bakterii w różnych warunkach hodowli*
- *przeprowadziłam fenotypowanie badanych szczepów metodą BIOLOG GENIII*
- *przeprowadziłam testy inaktywacji cząsteczek sygnałowych typu laktonów acylo-L-homoseryny (AHL)*
- *przeprowadziłam analizę zależności fenotyp-genotyp, w tym porównanie klastrów genowych kodujących ureazę u różnych szczepów *Ochrobactrum* oraz analizę obecności genów kodujących wić*
- *przeprowadziłam analizę porównawczą w zakresie genomu podstawowego i pan-genomu dla różnych szczepów *Ochrobactrum**
- *przygotowałam wszystkie rysunki i tabele*
- *napisałam pierwotną wersję manuskryptu*
- *miałam wiodącą rolę w przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów i uczestniczyłam we wprowadzaniu poprawek do ostatecznie przyjętej wersji pracy*

**PUBLIKACJA 2**

**Krzyżanowska D.M., Supernat A., Maciąg T., Matuszewska M., Jafra S.;**

Selection of reference genes for measuring the expression of *aiiO* in *Ochrobactrum quorumnocens* A44 using RT-qPCR.

**Scientific Reports, 2019, 9, 13129**

**IF 3,998; MEiN 140**

**Mój wkład w publikację:**

- *miałam udział w tworzeniu koncepcji badań, w tym odpowiadałam za wybór właściwego zestawu prób do eksperymentów*
- *uczestniczyłam w projektowaniu starterów.*
- *przeprowadziłam część doświadczeń qPCR i powiązanych analiz (m.in. zakres Cq genów referencyjnych, analiza stabilności ekspresji genów referencyjnych metodami BestKeeper i Normfinder).*
- *przygotowałam wszystkie rysunki i tabele*
- *napisałam pierwotną wersję manuskryptu*
- *miałam wiodącą rolę w przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów i uczestniczyłam we wprowadzaniu poprawek do ostatecznie przyjętej wersji pracy*

### PUBLIKACJA 3

**Krzyżanowska, D.M.**, Iwanicki, A., Czajkowski, R., Jafra, S.;

High-quality complete genome resource of tomato rhizosphere strain *Pseudomonas donghuensis* P482, a representative of a species with biocontrol activity against plant pathogens.

***Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2021, 34:12, 1450-1454**

**IF 3,422; MEiN 140**

#### ***Mój wkład w publikację:***

- *przeprowadziłam analizę genomu pod kątem obecności klastrów kodujących metabolity wtórne (antiSMASH)*
- *przeprowadziłam analizę porównawczą pomiędzy dwoma wersjami genomu P482 uzyskanymi w kilkuletnim odstępie czasu, różnymi metodami*
- *pilotowałam usługę sekwencjonowania*
- *przeprowadziłam submisję danych genomowych do Genbank*
- *przygotowałam wszystkie rysunki i tabele*
- *napisałam pierwotną wersję manuskryptu*

### PUBLIKACJA 4

**Krzyżanowska D.M.**, Jabłońska M., Kaczyński Z., Czerwicka-Pach M., Macur K., Jafra S.

Host-adaptive traits in the plant-colonizing *Pseudomonas donghuensis* P482 revealed by transcriptomic responses to exudates of tomato and maize.

***Scientific Reports*, 2023, 13(1), 9445**

**IF 4,6; MEiN 140**

#### ***Mój wkład w publikację:***

- *uczestniczyłam w opracowaniu metodyki badań oraz koordynowałam prace eksperymentalne*
- *brałam udział w hodowli roślin w warunkach gnotobiotycznych*
- *przygotowałam eksudaty roślin pod kątem analiz*
- *przygotowałam standardy związków chemicznych pod kątem analizy chromatograficznej (GC-MS)*
- *przeprowadziłam hodowlę bakterii w obecności eksudatów oraz izolację RNA*
- *koordynowałam zlecenie usługi RNAseq*
- *przeprowadziłam analizę danych RNAseq po ekspresji różnicowej, w tym analizę wzbogacenia ścieżek metabolicznych oraz sieciowania genów (ang. gene networking)*
- *przeprowadziłam analizę ekspresji genów metodą RT-qPCR*
- *przeprowadziłam submisję danych do bazy NCBI GEO*

- przeprowadziłam eksperyment obejmujący określenie wydajności kolonizacji korzeni roślin przez szczep P482 (eksperyment doniczkowy)
- przygotowałam wszystkie rysunki i tabele
- napisałam pierwotną wersję manuskryptu
- przygotowałam odpowiedzi do recenzentów i wprowadziłam większość poprawek do ostatecznie przyjętej wersji pracy

Dane naukometryczne dla prac wchodzących w skład cyklu:

**Sumaryczny IF: 14,8 (2-letni); 17 (5-letni)**

**Sumaryczna liczba punktów MEiN: 520**

### **4.3. Omówienie celu naukowego prac wymienionych w pkt 4.2 oraz otrzymanych wyników**

#### **4.3.1. Wprowadzenie i przesłanki do podjęcia badań**

Kompozycja mikroflory ma istotny wpływ na kondycję roślin. Szczególną różnorodność mikroorganizmów oraz mnogość interakcji, które pomiędzy nimi zachodzą, można zaobserwować w strefie przykorzeniowej roślin, tzw. ryzosferze. Bywa ona czasem określana mianem *gut inside out*, czyli, z angielskiego, „jelitem wywiniętym na lewą stronę” (Ramírez-Puebla i in., 2013). Szczepy bakterii o pozytywnym wpływie na kondycję i zdrowie roślin określa się wspólnym mianem bakterii PGPR (ang. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Koncepcja wykorzystania pożytecznych mikroorganizmów, w szczególności PGPR, do poprawy plonowania i ochrony roślin przed chorobami roślin ujęła mnie już w trakcie studiów. Sam pomysł nie jest nowy, ale obecnie cieszy się rosnącym zainteresowaniem badawczym i komercyjnym. Wzrosła świadomość społeczeństwa, że nadmierne wykorzystanie chemicznych środków ochrony roślin oraz nawozów ma negatywny wpływ na środowisko i zdrowie ludzi. Równolegle istnieje konieczność zwiększenia produkcji rolnej, w szczególności w ubogich częściach świata. Wyzwanie to utrudniają gwałtownie postępujące zmiany klimatyczne (dane FAO). Zastosowanie mikroorganizmów ma potencjał jako ekologiczna metoda wsparcia rolnictwa. W grę wchodzi aplikacja preparatów zawierających pojedyncze szczepy mikroorganizmów lub ich mieszanin, jak również stosowanie takich odmian roślin i praktyk rolniczych, które prowadzą do ukształtowania się na roślinie korzystnej endemicznej populacji mikroorganizmów (tzw. inżynieria ryzosfery) (Ahkami i in., 2017). W sytuacji, którą można określić jako „święty Graal”, rolnik będzie mógł w prosty sposób dowiedzieć się jaki układ roślina-PGPR (odmiana rośliny i potencjalny inokulant mikrobiologiczny) i w zestawieniu z jakimi praktykami (m.in. nawożenie) zapewni mu wysoki plon w warunkach danego pola uprawnego (właściwości gleby, klimat) oraz przy aktualnie obserwowanej presji ze strony patogenów. Co istotne, **efektywne wykorzystanie mikroorganizmów do poprawy kondycji roślin wymaga gruntownej wiedzy na temat ich**

**funkcjonowania oraz ich losu w docelowym ekosystemie.** Z uwagi na dużą bioróżnorodność mikroorganizmów stowarzyszonych z roślinami oraz stopień skomplikowania badanych układów roślina-mikroorganizmy-środowisko, przejście od poziomu obserwacji układów do poziomu ich projektowania wymaga licznych badań. W odniesieniu do tego **mój wkład w rozwój reprezentowanej dyscypliny naukowej obejmuje poszerzenie wiedzy na temat biologii wybranych mikroorganizmów stowarzyszonych z roślinami, mechanizmów antagonizmu patogen-szczep PGPR, a także możliwości zastosowania mikroorganizmów do biologicznej ochrony roślin przed chorobami.**

Jako moje główne osiągnięcie badawcze na potrzeby postępowania habilitacyjnego **wskazuję cykl czterech powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Są to prace doświadczalne, opisujące wyniki badań prowadzonych przeze mnie po uzyskaniu stopnia doktora (obrona czerwiec 2015). W każdej z przedstawionych prac jestem pierwszym autorem i miałam wiodącą rolę w ich powstaniu. Żadna z publikacji w cyklu nie została wcześniej wykorzystana w postępowaniu o nadanie stopnia doktora lub doktora habilitowanego.** Łącznie jestem współautorką 16 artykułów w czasopiśmie naukowych, jednego rozdziału w książce, 3 przyznanych patentów oraz dwóch manuskryptów na etapie recenzji. Jedenaście z 16 artykułów zostało opublikowanych po mojej obronie pracy doktorskiej. Cztery z jedenastu prac zostały włączone do cyklu (główne osiągnięcie), zaś pozostałe, wraz z innymi osiągnięciami, przedstawiono pokrótce w pkt 4.4 (Pozostałe osiągnięcia naukowe) oraz pkt 5 (Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni).

Rezultatem badań opisanych w przedłożonym cyklu artykułów jest przybliżenie wielu aspektów biologii dwóch Gram-ujemnych izolatów bakterii: ***Ochrobactrum quorumnocens* A44 i *Pseudomonas donghuensis* P482. Te dwa szczepy, choć filogenetycznie odległe, posiadają istotne cechy wspólne.** Obydwa mikroorganizmy zostały **pozyskane z ryzosfery roślin użytkowych z rodziny *Solanaceae*:** szczep *O. quorumnocens* A44 z ryzosfery ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) (Jafra i in., 2006), a szczep *P. donghuensis* P482 z ryzosfery pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) (Krzyżanowska i in., 2012b) (**publikacja z doktoratu**). Ponadto obydwa szczepy **wykazują zdolność do ograniczania symptomów chorobowych powodowanych na roślinach przez bakterie pektynolityczne *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp., obecnie wspólnie zaliczane do grupy SRP (ang. Soft Rot Pectobacteriaceae).** Patogeny SRP powodują mokrą zgniliznę wielu gatunków roślin użytkowych i ozdobnych, prowadząc do istotnych ekonomicznie strat m.in. w plonach ziemniaka (Mansfield i in., 2012). Tymczasem metody kontroli tych patogenów ograniczają się głównie do środków prewencyjnych (Czajkowski i in., 2011b). **Brak środków celowanych do walki z patogenami SRP stał się podstawą do prowadzenia przeze mnie i współpracowników badań nad mikroorganizmami wykazującymi antagonizm względem tych patogenów.**

Izolaty *O. quorumnocens* A44 i *P. donghuensis* P482 mogą chronić tkankę roślinną przed maceracją w wyniku aktywności SRP, jednak mechanizm leżący u podłoża tej aktywności jest różny. **Szczep A44 inaktywuje cząsteczki sygnałowe typu laktony *N*-acylohomoseryny (AHL).** AHL to niskocząsteczkowe związki wydzielane do środowiska i wykrywane przez wiele bakterii Gram-ujemnych w mechanizmie regulacyjnym nazywanym quorum sensing (QS) (Fuqua and Winans, 1994). W QS ekspresja genów docelowych jest



modulowana po wykryciu przez komórkę progowego stężenia cząsteczek sygnałowych w jej bezpośrednim otoczeniu. Wiadomo, że QS reguluje ważne procesy metaboliczne, w tym wytwarzanie czynników wirulencji i tworzenie biofilmu (Papenfort and Bassler, 2016). **Zdolność do inaktywacji AHL umożliwia szczepom takim jak A44 zakłócanie QS, a tym samym QS-zależnych fenotypów u innych gatunków bakterii, w tym patogenów.** Wykazano, że poprzez inaktywację AHL szczep A44 jest w stanie osłabić zależną od QS wirulencję *Pectobacterium parmentieri* i *P. carotovorum*, a tym samym chronić tkankę roślinną przed mokrą zgnilizną powodowaną przez te patogeny (Jafrá i in., 2006).

Szczep *O. quorumnocens* A44, wówczas oznaczany jako ***Ochrobactrum* sp. A44**, po raz pierwszy stał się moim obiektem badawczym na etapie pracy magisterskiej. W ramach realizowanych wówczas zadań m.in. klonowałam gen *aiiO* kodujący hydrolazę AHL z A44 oraz uzyskałam heterologiczną ekspresję kodowanego przez ten gen białka AiiO w systemie *Escherichia coli*. **Uzyskane przeze mnie wyniki zostały włączone do publikacji, w której po raz pierwszy pokazaliśmy mechanizm inaktywacji AHL przez *O. quorumnocens* A44** (Czajkowski i Krzyżanowska i in., 2011a)([publikacja z wyników pracy mgr](#); \*równorzędny wkład autorów).

Po uzyskaniu stopnia doktora wróciłam do badań nad szczepem A44. Moim pierwszym celem było określenie dokładnej przynależności taksonomicznej szczepu A44 raz pozyskanie jego sekwencji genomowej celem umożliwienia dalszych badań z wykorzystaniem narzędzi molekularnych. **Na podstawie analiz przeprowadzonych przeze mnie i współpracowników zaproponowaliśmy wyodrębnienie nowego gatunku *Ochrobactrum quorumnocens* (ze szczepem A44 jako szczepem typowym), a także przedstawiliśmy pierwsze porównanie dla genomów reprezentujących różne gatunki *Ochrobactrum* ([PUBLIKACJA 1](#)).** W ramach w/w publikacji powiązałam również zróżnicowanie fenotypowe wśród analizowanych szczepów w zakresie produkcji ureaz oraz ruchliwości z podłożem genetycznym tych różnic. W kontekście szczepu A44 nurtowało mnie również pytanie czy hydroliza AHL przez białko AiiO, produkowane przez ten szczep, jest główną aktywnością AiiO czy może raczej stanowi przejaw „rozwiązłości substratowej” tego enzymu. Nieznana była również rola AiiO w adaptacji środowiskowej A44. W ramach szerzej zakrojonych badań adresujących te pytania **wraz ze współpracownikami wytypowałam geny ulegające stabilnej ekspresji w szczepie A44 i mogące służyć jako geny referencyjne w badaniach ekspresji genów u tego szczepu metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy poprzedzonej odwrotną transkrypcją (RT-qPCR) ([PUBLIKACJA 2](#)).** Ponadto, w ramach tej samej pracy wykazałam, że ekspresja genu *aiiO* u A44 nie jest indukowana w obecności cząsteczek AHL, tym samym wykazując brak jasnego powiązania pomiędzy AiiO i cząsteczkami AHL jako docelowym substratem tego enzymu.

Warto w tym miejscu wspomnieć, że w 2020 roku Hordt i współpracownicy zaproponowali włączenie rodzaju *Ochrobactrum* do rodzaju *Brucella* (Hördt i in., 2020). Propozycja ta wzbudziła kontrowersje i silny sprzeciw ze strony wielu badaczy (Moreno i in., 2023, Moreno i in., 2022). Z uwagi na to pozostaliśmy przy klasyfikacji uwzględniającej rozdzielność tych dwóch taksonów.

Jak wcześniej wspomniano, drugi badany przeze mnie izolat z ryzosfery roślin, szczep *P. donghuensis* P482, również wykazuje antagonizm względem patogenów SRP. Dzieje się to jednak w oparciu o inny mechanizm niż ten, na którym bazuje aktywność A44. **Mechanizm antagonizmu szczepu P482 względem SRP w warunkach *in vitro* i *in planta* stanowił temat**



mojej pracy doktorskiej. W rezultacie miałam istotny wkład w identyfikację klastra genów warunkującego aktywność przeciwbakteryjną tego szczepu względem SRP (Krzyżanowska i in., 2016) (*praca opublikowana po doktoracie, jednak zawierająca również wyniki z pracy doktorskiej*). Ponadto, w wyniku testów wykonanych przeze mnie i współpracowników na tkankach bulw ziemniaka i liściach główek cykorii, **wykazałam, że zdolność P482 do ochrony tkanki roślinnej zależy od rodzaju chronionej tkanki oraz od szczepu patogennego** (Krzyżanowska i in., 2012b) (*publikacja z doktoratu*), a także **opracowałam metodę przygotowywania preparatów korzeni zasiedlonych przez wyznakowane fluorescencyjnie szczepy bakterii**. Podejście to umożliwia obserwację mikrokolonii na dużych sekcjach korzeni z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego (Krzyżanowska i in., 2012a) (*publikacja z doktoratu*). W trakcie badań prowadzonych przeze mnie **po doktoracie, wraz ze współpracownikami otrzymaliśmy zamknięty genom szczepu P482, porównaliśmy go z otrzymaną kilka lat wcześniej wersją typu draft i zaktualizowaliśmy adnotacje genów, a także wskazaliśmy w genomie P482, przy wykorzystaniu aktualnych narzędzi *in silico*, obecne w genomie klastry kodujące różne metabolity wtórne, receptory typu TonB oraz elementy o charakterze profagów** (**PUBLIKACJA 3**). W dalszej kolejności badałam szczep P482 pod kątem cech umożliwiających tej bakterii kolonizację korzeni różnych gatunków roślin. **W wyniku analizy odpowiedzi transkryptomicznej (RNAseq) szczepu P482 na obecność eksudatów kukurydzy i pomidora, zidentyfikowałam szereg ścieżek metabolicznych, które mogą mieć znaczenie dla tworzenia trwałej asocjacji P482 z różnymi gatunkami roślin i/albo w różnym stanie fizjologicznym** (**PUBLIKACJA 4**). Badania tego typu są kluczowe dla poznania mechanizmów rekrutacji specyficznej mikroflory przez rośliny, a ich wyniki są niezwykle ważne dla rozwoju reprezentowanego przeze mnie obszaru badań. Fakt, że w/w analizy transkryptomiczne przeprowadziłam dla szczepu z rodzaju *Pseudomonas* ma tę dodatkową wartość, że wiele szczepów z tej grupy posiada właściwości PGPR, a co za tym idzie są przedmiotem zainteresowania wielu badaczy.

Istotną rolę w moich badaniach odegrało **wykorzystanie metod opartych na sekwencjonowaniu następnej generacji (NGS; ang. Next Generation Sequencing), narzędzi do analizy danych *in silico* (ang. data mining). Ich zastosowanie stanowi dodatkowy element spajający przedłożony przeze mnie cykl artykułów**. Na okres mojej aktywności naukowej przypadł czas znaczącego postępu w zakresie dostępności usług sekwencjonowania DNA (Pervez i in., 2022) oraz istotny postęp w dziedzinie bioinformatyki. W toku kariery miałam możliwość przejścia od problemu polegającego na niedoborze danych (niska dostępność sekwencji genomów izolatów środowiskowych) do wyzwania, jakie niesie ze sobą ich nadmiar (analizy transkryptomiczne). Z dużym zainteresowaniem wyczekuję kolejnych rozwiązań, jakie w zakresie analizy danych „omicznych” przyniosą narzędzia oparte na sztucznej inteligencji. Szczególnie ważny wydaje mi się tutaj rozwój narzędzi ułatwiających holistyczną interpretację danych w kontekście rosnącego wolumenu badań literaturowych.

#### 4.3.2. Szczegółowe omówienie prac składających się na cykl artykułów

##### PUBLIKACJA 1

**Krzyżanowska D.M.**, Maciąg T., Ossowicki A., Rajewska M., Kaczyński Z., Czerwicka M., Rąbalski Ł., Czaplewska P. Jafra S.; ***Ochrobactrum quorumnocens* sp. nov., a quorum quenching bacterium from the potato rhizosphere. PLoS ONE 2019, 14(1): e0210874. DOI: 10.1371/journal.pone.0210874 (IF 2,740; MEiN 100)**

##### **Wstęp**

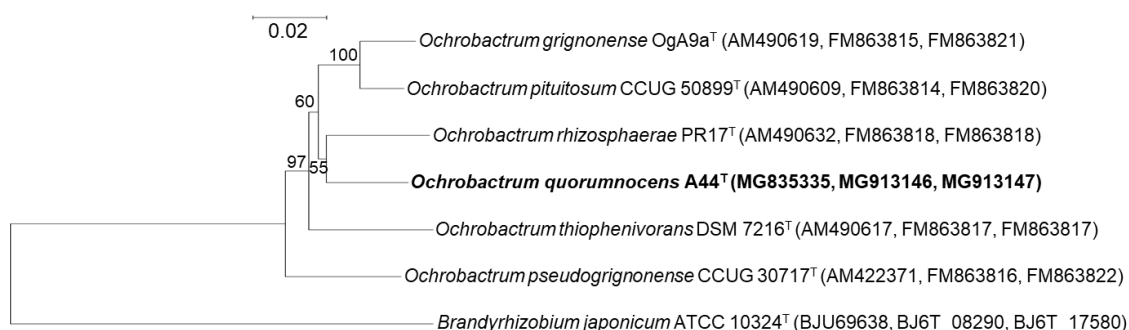
Szczep A44 jest izolatem z ryzosfery ziemniaka zdolnym do inaktywacji laktonów N-acylohomoseryny (AHL) (Czajkowski i Krzyżanowska i in., 2011a). Po jego pozyskaniu szczep A44 został przypisany do rodzaju *Ochrobactrum*, jednak bez dokładnej identyfikacji gatunkowej (Jafra i in., 2006). Rodzaj *Ochrobactrum* należy do klasy *Alphaproteobacteria* i jest blisko spokrewniony z rodzajami *Brucella*, *Agrobacterium* i *Rhizobium*. Najlepiej poznani przedstawiciele *Ochrobactrum* spp. to *O. anthropi* i *O. intermedium* – szczepy mogące powodować oportunistyczne infekcje u ludzi (Velasco i in., 1998, Holmes i in., 1988). Tymczasem bakterie z rodzaju *Ochrobactrum* zasiedlają różne środowiska i były izolowane m.in. z gleby (Lebuhn i in., 2000), ze ścieków (Kämpfer i in., 2008), z próbek roślinnych (Kämpfer i in., 2008, Trujillo i in., 2005) oraz z nicieni i larw (Dirksen i in., 2016, Huang i in., 2012). Zdolność tych mikroorganizmów do metabolizowania ksenobiotyków sprawia, że są potencjalnym źródłem enzymów do wykorzystania w bioremediacji i przemyśle (Qiu i in., 2006, Pozo i in., 2002). *Ochrobactrum* spp. są interesującym obiektem badawczym również z uwagi na ich oddziaływanie z roślinami (Sumayo i in., 2013). Niektóre szczepy, takie jak *O. lupini* LUP21<sup>T</sup> (Trujillo i in., 2005) i *O. cytisi* ESC1<sup>T</sup> (Zurdo-Piñeiro i in., 2007), są zdolne do wytwarzania brodawek na korzeniach i wiązania azotu atmosferycznego, podobnie jak spokrewnione szczepy *Rhizobium* spp.. W okresie powstawania opisywanej publikacji rodzaj *Ochrobactrum* obejmował 18 gatunków (Li i in., 2016), jednak informacje dostępne dla większości szczepów ograniczały się do raportu o ich izolacji i o ustanowieniu gatunku. Różnorodność genetyczna w obrębie *Ochrobactrum* spp. na poziomie całych genomów analizowana była wcześniej jedynie w ramach pojedynczego gatunku, *O. intermedium* (Aujoulat i in., 2014), brakowało zaś analiz międzygatunkowych.

##### **Cel badań**

Celem pracy było ustalenie dokładnej pozycji taksonomicznej szczepu *Ochrobactrum* sp. A44, uzyskanie dla tego szczepu oraz szczepów spokrewnionych sekwencji genomowych, a także określenie różnic i podobieństw w obrębie badanej grupy szczepów na drodze analiz biochemicznych oraz analizy porównawczej genomów. Dodatkowo planowano powiązać wybrane różnice fenotypowe z ich podłożem genetycznym.

## Opis wyników i ich znaczenia

Aby ustalić pozycję filogenetyczną *Ochrobactrum* sp. A44 zastosowałam wraz ze współpracownikami sekwencję metod o rosnącym stopniu rozdzielczości. Najpierw przeprowadziliśmy analizę sekwencji genu 16S rRNA dla A44 i 18 szczepów typowych dla znanych ówczesznie gatunków. Na podstawie tej analizy grupę szczepów najbliższ spokrewnionych z A44 zawężono do *O. thiopenivorans* DSM 7216<sup>T</sup>, *O. pseudogrignonense* CCUG 30717<sup>T</sup>, *O. grignonense* OgA9a<sup>T</sup>, *O. rhizosphaerae* PR17<sup>T</sup> i *O. pituitosum* CCUG 50899<sup>T</sup>. Aby uzyskać wyższą rozdzielczość filogenetyczną w obrębie tej grupy, zastosowaliśmy analizę typu MLSA (ang. *Multilocus Sequence Analysis*) opartą na połączonych sekwencjach genów 16S rRNA, *gyrB* i *groEL*. Otrzymane wyniki sugerowały, że najbliższym krewnym A44 jest *O. rhizosphaerae* PR17<sup>T</sup> (Rysunek 1). Trzecia z zastosowanych metod filogenetycznych opierała się o analizy sekwencji genomowych. Obliczyłam parametry ANI i GGDC dla porównań pomiędzy A44 i szczepami spokrewnionymi. ANI (ang. *Average Nucleotide Identity*) jest miarą podobieństwa genomowego na poziomie nukleotydów między regionami kodującymi dwóch genomów, podczas gdy GGDC (ang. *Genome-To-Genome Distance Calculator*) to narzędzie do przeprowadzania hybrydizacji dwóch genomów metodą *in silico*. Najwyższe wartości podobieństwa ANI i GGDC uzyskałam dla porównań pomiędzy A44 a *O. pituitosum* CCUG 50899<sup>T</sup> (ANI=87,31%, GGDC=35,6%), a następnie *O. rhizosphaerae* PR17<sup>T</sup> (ANI=86,80%, GGDC=34,3%), *O. grignonense* OgA9a<sup>T</sup> (ANI=86,30%, GGDC=33,6%), *O. pseudogrignonense* CCUG 30717<sup>T</sup> (ANI=82,23%, GGDC=26,5%), *O. thiopenivorans* DSM 7216<sup>T</sup> (ANI=81,04%, GGDC=25,3%), *O. anthropi* ATCC 49188<sup>T</sup> (ANI=77,51%, GGDC=23%) i *O. intermedium* LMG 3301<sup>T</sup> (ANI=77,26%, GGDC=22,5%). Żadna z uzyskanych wartości nie przekroczyła progu podobieństwa wymaganego dla zaliczenia dwóch szczepów do jednego gatunku. Przyjęte wartości wynoszą odpowiednio 95% dla ANI i 70% dla GGDC, co wskazywało, że A44 to osobny gatunek. **Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowaliśmy wyodrębnienie nowego gatunku *Ochrobactrum quorumnocens* ze wskazaniem szczepu A44<sup>T</sup> jako szczepu typowego.** Zaproponowana przez nas nazwa gatunkowa „*quorumnocens*” odnosi się w języku łacińskim do zdolności szczepu do zaburzania komunikacji *quorum sensing*. Zgodnie z wymaganiami formalnymi, kultury szczepu zostały zdeponowane w kolekcjach międzynarodowych (= LMG 30544<sup>T</sup> = PCM 2957<sup>T</sup>).



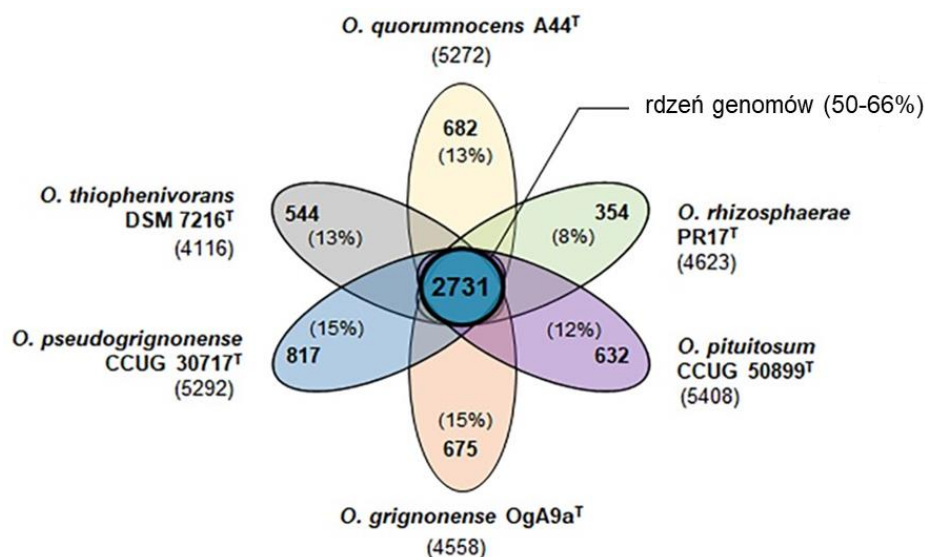
**Rysunek 1.** Drzewo filogenetyczne dla szczepu A44 oraz spokrewnionych gatunków *Ochrobactrum*, otrzymane na podstawie analizy MLSA dla trzech genów: 16S rRNA (1335 pz), *groEL* (1165 pz) i *gyrB* (1012 pz).

**W momencie prowadzenia opisywanych badań dostępne były sekwencje genomowe jedynie dla 2 z 18 opisanych szczepów typowych *Ochrobactrum* spp., a dokładnie dla szczepu *O. anthropi* ATCC 49188<sup>T</sup> i *O. intermedium* LMG 3301<sup>T</sup>. Stanowiło to barierę dla zastosowania metod filogenetycznych opartych o sekwencje genomowe do filogenezy w obrębie tego rodzaju, a także uniemożliwiało analizy z zakresu genomiki porównawczej. W związku z tym w ramach opisywanych badań uzyskaliśmy sekwencję genomu szczepu A44<sup>T</sup> oraz pięciu w/w szczepów blisko spokrewnionych.** Kompletną sekwencję genomu A44<sup>T</sup> uzyskano poprzez hybrydowe składanie danych z Illumina HiSeq2500 i PacBio RS (BaseClear B.V., Holandia). Dla pozostałych szczepów otrzymano sekwencje w formie draftów (WGS – *Whole Genome Shotgun*).

Kompletny genom A44 składa się z czterech replikonów: chromosomu głównego (2585,393 kbp) z klasycznym systemem replikacji, chromidu (2008,185 kbp) niosącego system replikacji typu plazmidowego oraz część genów niezbędnych w metabolizmie podstawowym oraz dwóch plazmidów: pOqn1 (1032,012 kbp) i pOqn2 (19,701 kbp). Obecność wielu replikonów, w tym chromidów i megaplazmidów, jest powszechna wśród bakterii z klasy Alphaproteobacteria (Dziewit and Bartosik, 2015).

Aby zweryfikować, czy w bazie NCBI dostępne są dane dla innych szczepów, które mogłyby zostać zakwalifikowane do ratunku *O. quorumnocens*, **przeprowadziłam analizę porównawczą (parametr ANI) pomiędzy genomem A44 a 65 dostępnymi wówczas (czerwiec 2018) sekwencjami WGS dla różnych szczepów, dla których zadeklarowano przynależność do rodzaju *Ochrobactrum*.** Na podstawie ww. analiz nie zidentyfikowałam w tej grupie szczepów innych przedstawicieli *O. quorumnocens*. Najwyższy wynik ANI (87,54%) uzyskano pomiędzy A44 a szczepem SJY1, oznaczonym jako *O. rhizosphaerae*. Dodatkowo stwierdziliśmy, że wartość ANI dla *O. rhizosphaerae* SJY1 i PR17<sup>T</sup> – szczepu typowego dla gatunku *O. rhizosphaerae*, wynosi 86,10%, a zatem jest poniżej progu dla pojedynczego gatunku. Wskazaliśmy, że szczep SJY1 powinien być klasyfikowany nie jako *O. rhizosphere*, ale jako *O. pituitosum* (ANI=96,97%). **Dane opublikowane przez nas w omawianej publikacji będą pomocne w przypisaniu wielu izolatów do odpowiednich gatunków w oparciu o szybką analizę *in silico*.**

Uzyskanie sekwencji genomu A44 i 5 szczepów pokrewnych umożliwiło mi przeprowadzenie porównawczej analizy genomów przy użyciu EDGAR (Blom i in., 2009). **Przeprowadzona przeze mnie analiza wykazała, że na rdzeń genomów, tworzony przez geny współdzielone przez wszystkie 6 szczepów, składa się 2731 sekwencji kodujących, co stanowi pomiędzy 50–66% zawartości indywidualnych genomów (Rysunek 2) oraz 27% zawartości pangenu (10296 CDS).** Odsetek genów unikatowych dla poszczególnych szczepów wahał się od 8–15%. Fakt, że każdy z analizowanych szczepów wnosił do puli pangenu nowe geny sugeruje, że **pangenom *Ochrobactrum* spp. jest „otwarty” w rozumieniu Guimarães i wsp. (Carlos Guimaraes i in., 2015).**



**Rysunek 2. Rdzeń genomu (w centrum) oraz geny unikatowe dla poszczególnych szczepów (ukazane na „płatkach”) dla grupy sześciu analizowanych szczepów *Ochrobactrum* spp.. Rysunek stanowi polskie tłumaczenie Fig. 2 w omawianej publikacji.**

Standardy przyjęte w taksonomii bakterii zakładają, że oficjalnie przyjęta identyfikacja taksonomiczna z propozycją nowego gatunku nie może bazować jedynie na danych *in silico*. Z uwagi na to przeprowadziliśmy porównanie szczepu A44 oraz szczepów spokrewnionych pod kątem markerów chemotaksonomicznych (profilu estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME) oraz profili białkowych dla całych komórek uzyskanych spektrometrią mas). Przeanalizowaliśmy również cechy morfologiczne komórek i hodowli, liczne cechy biochemiczne, zakres temperatur i wartości pH permissywnych dla wzrostu, a także zdolność szczepów do ruchu. Otrzymane dane zostały opublikowane w dużej części w materiałach dodatkowych.

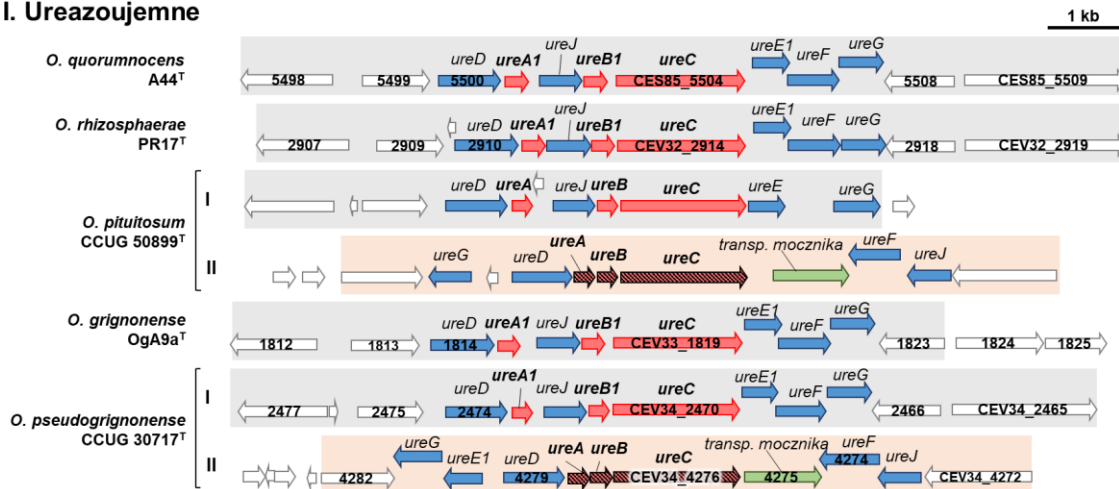
**W omawianej pracy podjęłam się również próby powiązania wybranych cech biochemicznych analizowanych szczepów (a dokładnie – obserwowanych pomiędzy tymi szczepami różnic) z ich podłożem genetycznym. Wydawało mi się to nie tylko ciekawe, ale także odpowiadało na częsty zarzut pod kątem analiz genomowych w ówczesnym czasie, mówiący o tym, że często ograniczają się one do przedstawiania „suchych” zbiorów danych liczbowych. W omawianej pracy wyszliśmy poza ten schemat, analizując podłoże genetyczne obserwowanych różnic w zakresie produkcji ureaz oraz ruchliwości.**

#### Produkcja ureaz

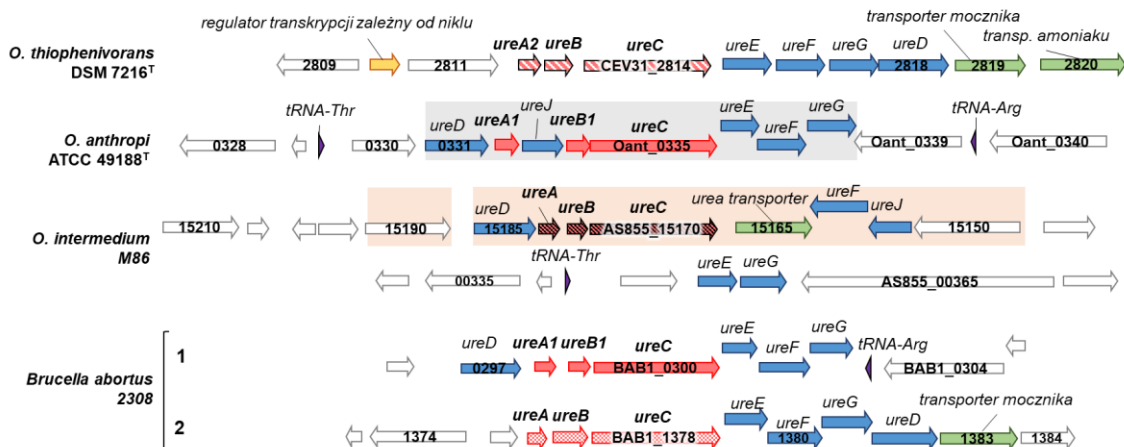
Wyniki wcześniejszych badań pokazywały, że aktywność ureazy może być różna dla poszczególnych szczepów *Ochrobactrum* (Teyssier i in., 2005). W przedstawianej pracy wraz ze współpracownikami wykazałam, że szczep A44 oraz szczepy typowe dla *O. pseudogrignonense*, *O. rhizosphaerae*, *O. grignonense* i *O. pituitosum* dają ujemny wynik w powszechnie stosowanym teście diagnostycznym na produkcję ureazy, podczas gdy szczep *O. thiophenivorans* DSM 7216<sup>T</sup>, dla którego nie były dostępne żadne wcześniejsze dane dotyczące aktywności ureazy, dał wynik pozytywny.

Ureazy to enzymy katalizujące hydrolizę mocznika do amoniaku i dwutlenku węgla. Ureazy bakteryjne to złożone enzymy, których synteza wymaga trzech genów strukturalnych, *ureABC*, kodujących odpowiednio podjednostki gamma, beta i alfa, oraz czterech genów pomocniczych, *ureDEFG* (Hausinger i in., 2001). **Przeanalizowałam obecność i względną pozycję genów *ureABCDEFGG* w sześciu nowo zsekwencjonowanych genomach *Ochrobactrum* spp. i wykazałam, że wszystkie analizowane szczepy, niezależnie od tego, czy były ureazododatnie czy ureazoujemne, posiadały homologi genów operonu ureazy. Jednakże organizacja i kontekst genomowy tychże genów wykazywały dużą różnorodność (Rysunek 3).**

### I. Ureazoujemne



### II. Ureazododatnie



**Rysunek 3. Klastry kodujące homologi genów ureazy w genomie *O. quorumnocens* A44, blisko spokrewnionych szczepach typowych *Ochrobactrum* spp., a także *O. anthropi* ATCC 49188T, *O. intermedium* M86 i *Brucella abortus* 2308.** Klastry podzielono na dwie grupy w zależności od tego, czy zostały zidentyfikowane w szczepach ureazoujemnych w teście diagnostycznym (I) czy w ureazododatnich (II). Poszczególne kolory ORF reprezentują: geny strukturalne (czerwony), geny dodatkowe (niebieski), geny transportowe (zielony), geny związane z metabolizmem niklu (żółty), regiony kodujące tRNA (fioletowy). Allele genów strukturalnych *ureC*, *ureA* i *ureB*, w zależności od stopnia podobieństwa, wyróżniono odpowiednio podobnym lub różnym deseniem. Podobieństwo w skali całego klastra zaznaczono podobnym kolorem tła. Rysunek stanowi polskie tłumaczenie Fig. 6 z omawianej publikacji w PLoS ONE.



Wśród szczepów ureazoujemnych, *O. quorumnocens* A44, *O. rhizosphaerae* PR17<sup>T</sup> i *O. grignonense* OgA9a<sup>T</sup> posiadają pojedynczy klaster ureazy (zwany dalej typem I) o podobnej organizacji genów. Z kolei *O. pituitosum* CCUG 50899<sup>T</sup> i *O. pseudogrignonense* CCUG 30717<sup>T</sup> posiadają w genomie dwa klastry ureazowe – jeden typu I i drugi, kodowany przez odrębny operon (typ II). **Wykazałam także, że białka strukturalne UreA, UreB i UreC wykazują wyższy poziom identyczności dla homologów pochodzących z tego samego typu klastrów, chociaż z różnych szczepów (95-98%), niż między homologami z różnych typów klastrów w obrębie jednego szczepu (66-71%).**

Dodatkowo przeanalizowałam organizację klastrów ureazowych u trzech ureazododatnich izolatów klinicznych: *O. anthropi* ATCC 49188<sup>T</sup>, *O. intermedium* M86 i *Brucella abortus* 2308. Szczep *O. anthropi* ATCC 49188<sup>T</sup> zawiera pojedynczy klaster przypominający ten typu I, jednak osadzony w odmiennym kontekście genetycznym, zaś operon *ure* z *O. intermedium* M86 jest podobny do operonu typu II z *O. pituitosum* i *O. pseudogrignonense*. Zarówno klaster typu I, jak i typu II, zidentyfikowane u analizowanych szczepów *Ochrobactrum*, nie przypominały żadnego z dwóch klastrów ureazowych w *B. abortus* 2308.

Jedynym ureazododatnim szczepem *Ochrobactrum* w grupie najbliższej spokrewnionych z A44 był *O. thiophenivorans* DSM 7216<sup>T</sup>. **Bardzo ciekawym odkryciem było wykazanie przeze mnie, że genom *O. thiophenivorans* koduje pojedynczy klaster ureazowy, jednak zupełnie innego typu niż te występujące w pozostałych analizowanych *Ochrobactrum* spp.** (Rysunek 3). Nieoczekiwanie białko UreA z *O. thiophenivorans* DSM 7216<sup>T</sup> wykazało wysoki poziom identyczności względem homologów występujących w grupie szczepów Alphaproteobacteria izolowanych z wód słonych: *Pseudoruegeria* sp. SK021, *Marteella mediterranea* i *Nitratireductor* sp. OM-1, przy znacznie niższej identyczności do homologów z innych *Ochrobactrum* spp.. **Dalsza analiza wykazała, że fragment o wielkości prawie 7 kb zawierający klaster ureazy z *O. thiophenivorans* wykazuje 91% pokrycia i 78% identyczność na poziomie sekwencji nukleotydowej z analogicznym klastrem z *Pseudoruegeria* sp. SK021 – szczepie wyizolowanym z osadów Morza Północnego (Pohlner i in., 2017). Jest zatem prawdopodobne, że unikalny w grupie *Ochrobactrum* spp. klaster ureazowy został uzyskany przez *O. thiophenivorans* na drodze horizontalnego transferu genów.**

W omawianej pracy mogłam jedynie spekulować, że *O. quorumnocens* A44 i szczepy pokrewne są ureazoujemne pomimo posiadania operonów kodujących ureazę z powodu mutacji punktowych, przesunięć ramek odczytu lub delecji/insercji, które nagromadziły się w klastrach genowych. Nie do wykluczenia są również powody takie jak aktywacja ekspresji genów w bardzo specyficznych warunkach. Jak wspomniano powyżej, ureazy to enzymy katalizujące hydrolizę mocznika do amoniaku i dwutlenku węgla. Wytwarzanie amoniaku w wyniku aktywności ureazy powoduje wzrost pH środowiska. W przypadku patogenów ludzkich takich jak *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica* i *Brucella* sp. aktywność ureazy zwiększa przeżywalność tych bakterii w kwaśnym środowisku żołądka (Sangari i in., 2007). Analogiczną funkcję zaproponowano dla ureaz wytwarzanych przez kliniczne izolaty *Ochrobactrum* spp., które, podobnie jak *H. pylori*, również można wykryć w biopsjach z tego organu (np. (Kulkarni i in., 2013)). Jednak niepatogenne mikroorganizmy glebowe, w tym spokrewnione z *Ochrobactrum* szczepy *Rhizobium* spp. (Toffanin i in., 2002), również wytwarzają ureazy. Powodem tego może być nie tylko konieczność zmiany pH w otoczeniu komórki. Bakterie Gram-ujemne potrafią pozyskiwać azot zarówno ze związków organicznych, takich jak aminokwasy, jak i z nieorganicznego amoniaku – produktu rozkładu mocznika. Z punktu widzenia obiegu azotu w przyrodzie mineralizacja azotu z mocznika przez mikroflorę glebową,



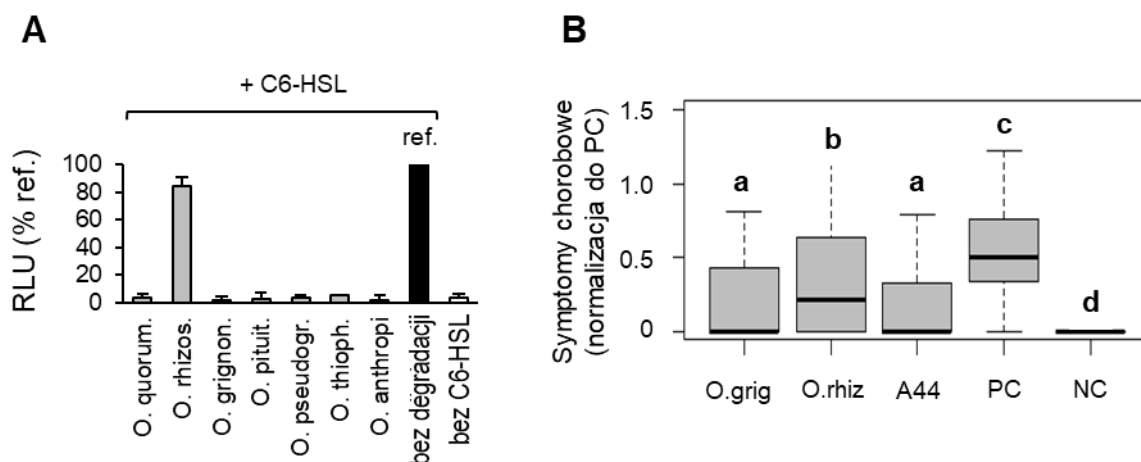
możliwa dzięki aktywności ureaz, czyni go bardziej dostępnym dla roślin i jest niezbędna do dokończenia cyklu azotowego. Dotyczy to zarówno mocznika naturalnie występującego w środowisku, jak również mocznika pochodzącego z nawozów na bazie mocznika – najczęściej stosowanych nawozów azotowych w rolnictwie (<http://faostat.fao.org>).

### Ruchliwość

Porównaliśmy ruchliwość szczepu A44 i szczepów blisko z nim spokrewnionych. **Wraz ze współpracownikami wykazałam, że zdolność do ruchu w grupie analizowanych szczepów jest zróżnicowana i wykazuje zależność od składu podłoża hodowlanego (warunków środowiska).** A44 wykazywał zdolność do ruchu we wszystkich testowanych warunkach, podobnie jak *O. rhizosphaerae* PR17<sup>T</sup> i *O. grignonense* OgA9a<sup>T</sup>. Natomiast *O. pseudogrignonense* CCUG 30717<sup>T</sup> był ruchliwy jedynie w obecności kwasów kazaminowych, a *O. thiophenivorans* DSM 7216<sup>T</sup> był niezdolny do ruchu niezależnie od badanych warunków. Z kolei *O. anthropi* ATCC 49188<sup>T</sup> był ruchliwy tylko w obecności glukozy (zarówno z kwasami kazaminowymi jak i bez), ale nie gdy źródłem węgla był glicerol, chyba że podłoże zostało uzupełnione kwasami kazaminowymi.

Wykazany przez nas brak ruchliwości u *O. thiophenivorans* DSM 7216<sup>T</sup> był w zgodzie z obserwacją ujętą w pierwszym doniesieniu o tym gatunku (Kampfer i in., 2008). W celu zgłębienia podłoża genetycznego tego fenotypu, przeszukałam genomy wszystkich sześciu szczepów *Ochrobactrum* pod kątem genów zaangażowanych w tworzenie wici. W puli badanych szczepów wykryliśmy łącznie 25 takich genów, z czego 24 były obecne w każdym szczepie zdolnym do ruchu. **Wykazałam, że nieruchliwy szczep *O. thiophenivorans* DSM 7216<sup>T</sup> nie posiadał aż 12 z 25 genów zaangażowanych w produkcję wici, z którym co najmniej 24 były obecne w innych analizowanych szczepach *Ochrobactrum*.** Brakujące geny obejmują *fliC* kodujący flagelinę, a także *flgE*, *flgK*, *fliF*, *fliQ* i *fliR*. **W szczepach ruchliwych wspomniane 11 genów występuje w formie klastra (geny sąsiadujące), co wskazuje na to, że utrata ruchliwości przez *O. thiophenivorans* jest spowodowana delecją sporego regionu DNA, zaangażowanego w powstawanie wici.**

Dodatkową analizą przeprowadzoną przeze mnie i opisana w przedstawionej publikacji było określenie zdolności badanych szczepów *Ochrobactrum* spp. do inaktywacji cząsteczek sygnałowych typu AHL, a dokładnie cząsteczki C6-HSL. Uzasadnieniem dla eksperymentu był fakt, że szczep A44 był wcześniej badany głównie pod kątem jego zdolności do inaktywacji cząsteczek sygnałowych. Stosując biosensor AHL *E. coli* pSB401 (Winson i in., 1998) i test opisany przez Jafra i van der Wolf (Jafra and van der Wolf, 2004) **wykazałam, że wszystkie badane szczepy były zdolne do inaktywacji C6-HSL, jednak za wyjątkiem *O. rhizosphaerae* PR17<sup>T</sup> (Rysunek 4A).** W zgodzie z tym odkryciem szczep *O. rhizosphaerae* PR17<sup>T</sup> wykazywał znacząco niższy, w porównaniu z A44, potencjał do ograniczania symptomów mokrej zgnilizny powodowanej przez *P. parmentieri* SCC3193 (Rysunek 4B). Jest to tym bardziej ciekawe z uwagi na to, że szczep *O. rhizosphere* jest szczepem typowym bardzo blisko spokrewnionym z A44 i również pochodzi z ryzosfery ziemiaka. **Powyższa obserwacja nie została przeanalizowana pod kątem podłoża genetycznego w omawianej pracy, jednak stała się przyczynkiem do przeprowadzenia dalszych szczegółowych badań molekularnych w ramach pracy magisterskiej wykonywanej pod moją opieką. Wyniki tych badań, po przeprowadzeniu niezbędnych eksperymentów uzupełniających, zostaną opublikowane w ramach innej publikacji.**



**Rysunek 4** Inaktywacja AHL (C6-HSL) przez szczep *O. quorumnocens* A44 i szczepy spokrewnione (A) oraz skala symptomów mokrej zgnilizny na plastrach bulw ziemniaka koinokulowanych patogenem *P. parmentieri* oraz A44 lub jednym z pozostałych analizowanych szczepów (B). Różnice wyników dla grup danych oznaczonych różnymi literami wskazują się statystycznie istotne (poziom istotności 0,05). PC – kontrola pozytywna dla powstania symptomów chorobowych (sam patogen). NC – kontrola negatywna (bez patogenu). Panele stanowią polskie tłumaczenia odpowiednio Fig. 4 i 5 w omawianej publikacji.

Podsumowując, w przedstawianej pracy na podstawie analiz sekwencji *in silico* oraz analiz fenotypowych, wraz ze współpracownikami zaproponowałam wyodrębnienie nowego gatunku *Ochrobactrum quorumnocens* ze szczepem A44 jako szczepem typowym. Szczep posiada charakterystyczny dla tego rodzaju genom wieloreplikonowy. Przed opublikowaniem omawianych badań dostępne były sekwencje genomów dla jedynie 2 z 18 *Ochrobactrum* spp. szczepów typowych *Ochrobactrum*. Upublicznienie przez nas genomu A44 i pięciu spokrewnionych szczepów typowych znacząco przyczyniło się do ułatwienia badań taksonomicznych w oparciu o nowoczesne narzędzia *in silico* w obrębie rodzaju *Ochrobactrum*. Wg mojej wiedzy była to również pierwsza publikacja, w której przeprowadzono analizę porównawczą genomów przedstawicieli różnych gatunków *Ochrobactrum*. Ponadto, analiza powiązań fenotyp-genotyp ujawniła genetyczne podłoże braku ruchliwości u *O. thiophenivorans* DSM 7217<sup>T</sup> oraz wykazała zróżnicowanie organizacji klastrów ureazy w badanej grupie *Ochrobactrum* spp.. Dodatkowo opublikowane badania stały się przyczynkiem do prowadzonych później badań nad podłożem utraty zdolności do degradacji AHL przez szczep *O. rhizosphaerae* PR17<sup>T</sup> (badania w toku).

## PUBLIKACJA 2

Krzyżanowska D.M., Supernat A., Maciąg T., Matuszewska M., Jafra S.; **Selection of reference genes for measuring the expression of *aiiO* in *Ochrobactrum quorumnocens* A44 using RT-qPCR. *Scientific Reports*, 2019, 9, 13129 (IF 3,998; MEiN 140)**

## Wstęp

Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją (RT-qPCR) jest najczęściej stosowanym podejściem do analizy ekspresji genów (Wagner, 2013). Metoda ta jest niezmiernie użyteczna, jednak obejmuje liczne kroki na etapie doświadczalnym jak również na etapie transformacji danych celem ich interpretacji, stąd poprawne jej zastosowanie wymaga dużej świadomości eksperymentatora. Jedną z kluczowych decyzji, które należy podjąć podczas przeprowadzania eksperymentu RT-qPCR, jest wybór genów referencyjnych o stabilnej ekspresji w celu późniejszej normalizacji danych dla genów badanych. W przypadku organizmów modelowych lub innych dobrze poznanych, wybór odpowiednich genów referencyjnych jest ułatwiony z uwagi na dostępność wyników wcześniejszych badań. Na bazie literatury wytypować można listę genów-kandydatów na geny referencyjne o potencjalnie ogólnym zastosowaniu w analizie ekspresji genów u bakterii z uwagi na występowanie ich ortologów u wielu gatunków bakterii. Do najpopularniejszych należą *rho*, 23S rRNA, *rpoD*, *gyrB*, *recA*, 16S rRNA, *dnaK*, *rpoB*, *groEL*, *gyrA*. Jednak ww. geny nie sprawdzają się tak samo dobrze dla wszystkich mikroorganizmów niosących te geny i we wszystkich warunkach eksperymentalnych. Wiadomo również, że włączenie nieodpowiednich genów do współczynnika normalizacji może znacząco wpłynąć na wyniki (DeLorenzo and Moon, 2018). Z uwagi na to należy zweryfikować stabilność ekspresji zestawu genów-kandydatów przy pierwszym zastosowaniu RT-qPCR w danych (mikro)organizmach (Rocha i in., 2015, Kałużna i in., 2017). W 2009 roku opublikowano zbiór wytycznych MIQE (*ang. Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments*)(Bustin i in., 2009). Jego celem było ujednoczenie jakości wyników RT-qPCR publikowanych w czasopismach naukowych, przede wszystkim w opracowaniach medycznych. W momencie publikacji omawianej pracy dążenie do spełnienia standardów MIQE w badaniach obejmujących ekspresję genów u Prokaryota było znacznie słabsze niż w badaniach medycznych. Pomimo chlubnych wyjątków, w wielu pracach ekspresja badanych genów prokariotycznych była normalizowana do arbitralnie wybranych genów referencyjnych, bez walidacji co do stabilności ich ekspresji lub nawet bez jasnego wyjaśnienia wyboru danych genów na geny referencyjne.

Jednym z rodzajów bakterii, dla których nie było dostępnych danych na temat odpowiednich genów referencyjnych, były bakterie z rodzaju *Ochrobactrum*. W opisywanej publikacji wraz ze współpracownikami skupiłam się na szczepie A44 z gatunku *Ochrobactrum quorumnocens* (Krzyżanowska i in., 2019a) – izolacie z ryzosfery ziemniaka (Jafra i in., 2006). W wyniku działania hydrolazy AiiO, komórki szczepu A44 inaktywują szerokie spektrum bakteryjnych cząsteczek sygnałowych z grupy laktonów N-acylohomoseryny (AHL) (Czajkowski i Krzyżanowska i in., 2011a). W literaturze opisano liczne enzymy inaktywujące AHL (Czajkowski and Jafra, 2009, Grandclément i in., 2016). Odkrycie wielu z nich, w tym AiiO ze szczepu A44, było wynikiem badań przesiewowych mających na celu selekcję nowych czynników zaburzających działanie QS. Co ciekawe, nie jest jasne czy inaktywacja AHL przez bakterie jest podstawową funkcją enzymów zaangażowanych w reakcję inaktywacji (Roche i in., 2004). Dla niektórych z tych enzymów zidentyfikowano dodatkowe, niezwiązane z inaktywacją AHL funkcje u produkujących je mikroorganizmów, co wskazuje na to, że inaktywacja AHL może być efektem rozwiążności katalitycznej tych enzymów (Grandclément i in., 2016, Roche i in., 2004). Dla przykładu pokazano, że BlcC (AttM) z *Agrobacterium*

*tumefaciens* bierze udział w metabolizmie gamma-aminomaślanu (Khan and Farrand, 2009), a enzym PvdQ z *Pseudomonas aeruginosa* jest niezbędny w procesie formowania sideroforu piowerdyny (Nadal Jimenez i in., 2010). Nawet przyjmując założenie, że główną funkcją niektórych z opisanych enzymów jest rzeczywiście inaktywacja AHL, przewidywany biologiczny cel tej aktywności nie będzie jednorodny. W zależności od tego, czy szczep inaktywujący AHL wytwarza równoległe własne AHL, potencjalne funkcje biologiczne inaktywacji AHL mogą obejmować między innymi samoregulację własnego QS, wykorzystanie AHL jako źródła składników odżywczych oraz zapewnienie danemu szczepowi przewagi w środowisku nad konkurentami produkującymi AHL (Grandclément i in., 2016). Również w przypadku *O. quorumnogens* A44 rola enzymu degradującego AHL (AiiO) w metabolizmie i konkurencyjności środowiskowej tego mikroorganizmu pozostaje niejasna.

### Cel badań

Pierwszym z celów prezentowanej pracy był wybór genów *O. quorumnogens* A44 podlegających stabilnej ekspresji w wielu warunkach środowiskowych i w różnych fazach wzrostu tak, aby geny te mogły służyć jako geny referencyjne w analizie ekspresji genów metodą RT-qPCR u szczepu A44. Drugim z celów było zastosowanie RT-qPCR do pomiaru zmian poziomu ekspresji *aiiO* u szczepu A44 w odpowiedzi na AHL oraz inne czynniki środowiskowe, takie jak faza wzrostu, temperatura, pH oraz dodatek ekstraktu z korzeni ziemniaka. Drugi z celów był częścią naszych szerszej zakrojonych dociekań dotyczących roli AiiO w metabolizmie i konkurencyjności środowiskowej A44.

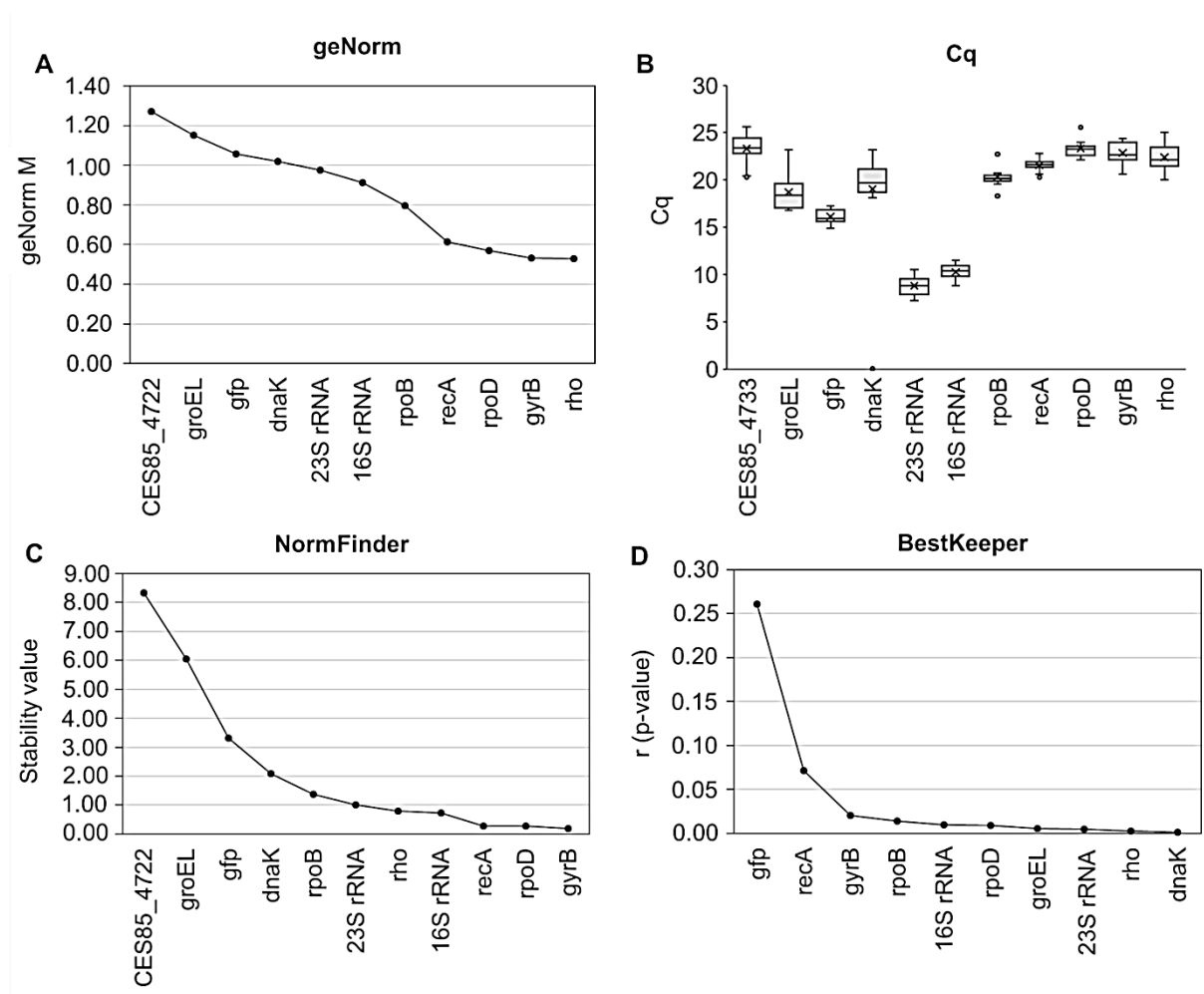
### Opis wyników i ich znaczenia

**W ramach przedstawianej publikacji opracowaliśmy test RT-qPCR do badania poziomu ekspresji genu *aiiO* w *O. quorumnogens* A44.** Aby wytypować odpowiednie geny referencyjne (RG; ang. *reference genes*), przetestowaliśmy stabilność ekspresji 11 genów-kandydatów. W optymalnym układzie stabilność ekspresji potencjalnego genu referencyjnego jest weryfikowana we wszystkich warunkach eksperymentalnych dla docelowego eksperymentu (Gomes i in., 2018). W przypadku A44, w teście pilotażowym, oceniliśmy stabilność ekspresji 11 genów w 10 różnych warunkach hodowli, na próbkach pochodzących z pojedynczego eksperymentu. W następnym etapie zweryfikowaliśmy działanie zawężonej puli najlepszych genów-kandydatów w eksperymencie z 11 warunkami, w trzech powtórzeniach biologicznych. Strategia zastosowania testu pilotażowego w celu wybrania najbardziej obiecujących kandydatów jest w zgodzie z MIQE (Taylor i in., 2010).

Stabilność ekspresji genów-kandydatów oceniono przy użyciu geNorm (Vandesompele i in., 2002) oraz dwóch innych popularnych algorytmów, NormFinder (Andersen i in., 2004) i BestKeeper (Pfaffl i in., 2004), z których każdy opiera się na innym podejściu statystycznym (Rysunek 5). Według geNorm najbardziej stabilnymi kandydatami na RG u A44 były *rho*, *gyrB* i *rpoD*. Geny te znalazły się również wśród pięciu najlepszych genów według NormFinder. Ranking stabilności genów sugerowany przez Bestkeeper różnił się od sugerowanego przez pozostałe dwa algorytmy. Ta metoda dała również najmniejszą rozdzielczość, przypisując dobrą wydajność większości testowanych genów. Co ciekawe, *recA*, wymieniony wśród 4

najlepszych genów według geNorm i 3 najlepszych genów przez NormFinder, znalazł się wśród dwóch z najgorszymi rankingami według BestKeeper. Rozbieżność między wynikami z BestKeeper a wynikami zarówno z geNorm, jak i NormFinder można zaobserwować także w innych badaniach (Martínez-Giner i in., 2013). Powodem tego są różne dane wejściowe (surowe wartości Cq dla BestKeeper vs. względne wartości ekspresji dla geNorm i NormFinder) oraz różne kryteria stabilności uwzględniane przez te trzy programy.

Opierając się na zestawieniu zbiorczym wyników z genNorm, NormFinder i BestKeeper, wraz ze współpracownikami wybrałam geny *rho*, *rpoD* i *gyrB* jako najbardziej obiecujących kandydatów do zastosowania do normalizacji danych RT-qPCR w *O. quorumnocens* A44. Co ważne, geny te nie należą do wspólnej grupy funkcjonalnej, co zmniejsza szanse na to, że są koregulowane. Nasze badania stanowią również ważny przykład tego, że gen kodujący 16S rRNA, często wykorzystywany u bakterii do normalizacji ekspresji bez odpowiedniej walidacji, nie jest odpowiedni jako gen referencyjny dla wszystkich gatunków. W ramach przeprowadzonych doświadczeń pokazaliśmy również, że dla naszych wyników stanowiło niewielką różnicę czy do normalizacji ekspresji wykorzystano 2 czy 3 geny referencyjne.

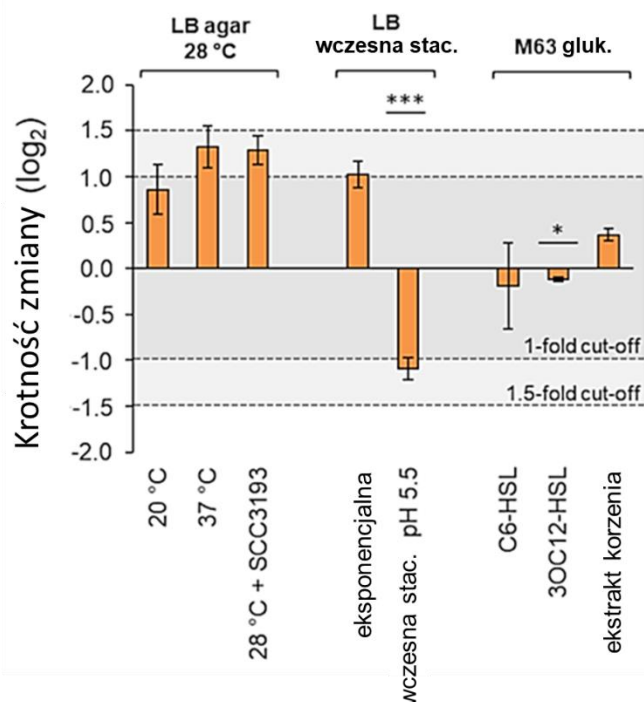


Rysunek 5 Stabilność ekspresji genów-kandydatów na geny referencyjne *O. quorumnocens* A44, określona przy użyciu algorytmów: geNorm (A), NormFinder (C) i BestKeeper (D). Panel B przedstawia

**wartości Cq świadczące o poziomie ekspresji bazowej badanych genów.** Stabilność ekspresji badano w 10 różnych warunkach hodowli. Rysunek stanowił Fig. 1 w omawianej publikacji.

W przedstawianej pracy, w ramach szerszych badań nad rolą AiiO w metabolizmie i sprawności środowiskowej szczepu A44, wraz ze współpracownikami zastosowałam RT-qPCR z nowo ustalonymi genami referencyjnymi aby zbadać, czy ekspresja *aiiO* w A44 jest zmieniona po ekspozycji na AHL oraz czy poziom tej ekspresji jest zależny od innych wybranych warunków hodowlanych, takie jak faza wzrostu, temperatura, pH oraz dodatek ekstraktu z korzeni ziemniaka. Wiadomo, że ekspresja niektórych genów kodujących enzymy może znacznie wzrosnąć w obecności docelowego substratu(ów). Wykazanie takiej zależności to przekonujący argument dla powiązania danego związku (substratu) z funkcją białka. Na przykład wykazano, że ekspresja *pelD*, liazy pektynianowej, może być indukowana ponad 10-krotnie w fazie stacjonarnej, gdy obecny jest jej substrat poligalakturonian (Hommais i in., 2011).

**Zastosowanie RT-qPCR pozwoliło na wykazanie, że ekspresja *aiiO* w *O. quorumnocens* A44 nie jest indukowana po suplementacji syntetycznymi AHL, dokładnie C6-HSL lub 3OC12-HSL, ani w obecności naturalnie produkowanych 3OC8-HSL i 3OC6-HSL oraz innych związków wydzielanych do medium przez *P. parmentieri* SCC3193 (Rysunek 6).** Dla porównania w literaturze nie wykazano indukcji po dodaniu AHL także dla genów *aiiB* i *blcC* kodujących dwa inne enzymy inaktywujące AHL z grupy laktonaz, pochodzące z *A. tumefaciens* (Khan and Farrand, 2009, Haudecoeur i in., 2009). Indukcja tych enzymów została natomiast zaobserwowana w obecności związków pochodzenia roślinnego: semialdehydu bursztynowego, gamma-hydroksymaślanu, gamma-butyrolaktonu, gamma-aminomaślanu i kwasu salicylowego w przypadku *blcC* oraz ekstraktów roślin wzbogaconych w agrocynopiny w przypadku *aiiB* (Khan and Farrand, 2009, Haudecoeur i in., 2009, Lang i Faure, 2014). W naszym badaniu w ramach jednego z warunków eksperymentalnych sprawdziliśmy ekspresję *aiiO* w obecności ekstraktu z korzeni ziemniaka, jednak dodatek ten nie miał wpływu na ekspresję *aiiO*.



**Rysunek 6 Różnice w poziomie ekspresji genu *aiiO* w różnych warunkach eksperymentalnych.** Jako geny referencyjne wykorzystano *rho*, *gyrB* i *rpoD*. Zmianę poziomu ekspresji obliczano dla każdego z podłoży osobno (LB agar, LB i M63 0.4% glukoza) SCC3193 – wzrost w obecności AHL i innych związków prod. przez *P. parmentieri* SCC3193; wczesna stac. – wczesna stacjonarna faza wzrostu; ekspozycyjna – faza wzrostu ekspozycyjnego; C6-HSL, 3OC12-HSL – po ekspozycji 90 min. na syntetyczne AHL (50 μM·mL<sup>-1</sup>); ekstrakt korzenia – ekstrakt wodny z korzeni ziemniaka 25%. \*p < 0.05 \*\*\*p < 0.0005. Rysunek stanowi polskie tłumaczenie Fig. 4 w omawianej publikacji.

Chociaż ekspresja *aiiO* nie uległa istotnej zmianie w żadnym z warunków uwzględnionych w tym badaniu, nie możemy wykluczyć, że takie warunki istnieją. Niektóre geny mogą być konserwowane w genomach bakteryjnych, podobnie jak homologi *aiiO* wydają się być obecne w genomach różnych *Ochrobactrum* spp. (Czajkowski i Krzyżanowska i in., 2011a, Mei i in., 2010), pomimo że konserwowane geny są przydatne tylko w bardzo określonej niszy lub tylko w obecności pewnego stresu środowiskowego (Rohmer i in., 2011). Szczepy z rodzaju *Ochrobactrum* izolowano z różnych środowisk, w tym z gleby, roślin oraz organizmów żyjących w glebie, takich jak nicienie *Caenorhabditis elegans* i larwy *Holotrichia parallela* (Huang i in., 2012). Niektóre gatunki *Ochrobactrum* mogą powodować infekcje oportunistyczne u ludzi, a dla jednego ze szczepów wykazano, że powoduje chorobę u grzybów (Wu i in., 2016). Możliwe jest, że indukcja ekspresji *aiiO* zachodzi w bardzo specyficznej niszy/gospodarzu lub w obecności określonego ksenobiotyku. Funkcjonalne i strukturalne podobieństwa między enzymami degradującymi cząsteczki sygnałowe bakterii a enzymami degradującymi ksenobiotyki/antybiotyki zostały wcześniej wskazane w kilku badaniach (Elias and Tawfik, 2012, Tannières i in., 2013).

Podsumowując, w opisanej pracy pokazaliśmy, że *rho*, *gyrB* i *rpoD* to odpowiednie geny referencyjne do analiz ekspresji genów w *O. quorumnogens* A44. Według naszej wiedzy było to pierwsze badanie mające na celu identyfikację genów referencyjnych do analiz RT-qPCR w rodzaju *Ochrobactrum*. Wytypowanie przez nas stabilnych genów referencyjnych może stanowić duże ułatwienie w trakcie typowania genów referencyjnych u bakterii spokrewnionych, a skrupulatny opis przyjętej strategii krok-po-kroku (metodyka) może być pomocny w typowaniu takich genów także u innych gatunków bakterii. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono także, że ekspresja *aiiO* nie jest wyraźnie indukowana przez obecność AHL. Stanowi to przesłankę, że AHL nie są głównym substratem AiiO, a tym samym ich inaktywacja (wyciszenie QS) nie jest główną funkcją tego enzymu.



## **PUBLIKACJA 3**

**Krzyżanowska, D.M., Iwanicki, A., Czajkowski, R., Jafra, S.; High-quality complete genome resource of tomato rhizosphere strain *Pseudomonas donghuensis* P482, a representative of a species with biocontrol activity against plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2021, 34:12, 1450-1454 (IF 3,422; MEiN 140)**

### **Wstęp**

*Pseudomonas* spp. stanowią grupę Gammaproteobacteria znaną ze swojej zdolności do adaptacji do różnych środowisk, metabolizowania wielu źródeł węgla, a także wytwarzania szerokiej gamy metabolitów wtórnych (Gross and Loper, 2009). Chociaż do rodzaju *Pseudomonas* przynależą niektóre znane patogeny, takie jak *P. aeruginosa* (patogen ludzi i zwierząt) lub *P. syringae* (patogen roślin), to jednak większą część *Pseudomonas* spp. stanowią organizmy nieszkodliwe lub pożyteczne z punktu widzenia ludzi (Peix i in., 2018). Dla licznych szczepów wykazano, że promują one wzrost roślin i/lub chronią swoich gospodarzy przed szkodliwym działaniem patogenów, co zalicza je do grupy ryzobakterii promujących wzrost roślin (PGPR) (Lugtenberg i Kamilova, 2009). Co istotne, mechanizm w oparciu o który dany przedstawiciel *Pseudomonas* sp. wykazuje aktywność PGPR może się różnić w zależności od badanego gatunku, a nawet szczepu. Fakt ten jest związany z tym, że *Pseudomonas* sp. posiadają relatywnie duże genomy, z których znacząca część to geny, które nie są współdzielone (nie posiadają swoich odpowiedników) we wszystkich przedstawicielach całej grupy (Silby i in., 2011, Loper i in., 2012). Szczepy *Pseudomonas* spp. zaliczane do PGPR cieszą się zainteresowaniem pod kątem ich zastosowania w biologicznej ochronie roślin (Mercado-Blanco, 2015).

W momencie publikacji omawianej pracy gatunek *P. donghuensis* obejmował cztery szczepy: P482, HYS<sup>T</sup>, SVBP6 i 22G5 (Gao i in., 2015, Agaras i in., 2018, Krzyżanowska i in., 2016, Tao i in., 2020). Dla każdego z tych szczepów wykazano antagonizm względem patogenów roślin. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe szczepów *P. donghuensis* przypisuje się głównie, choć nie wyłącznie, produkcji związku przeciwdrobnoustrojowego i wychwytyjącego żelazo, 7-hydroksytropolonu (7-HT). 7-HT nie jest metabolitem typowym dla grupy *Pseudomonas* spp. Klaster genów *nfs* niezbędny do jego produkcji wykryto dotychczas u *P. donghuensis* (Yu i in., 2014, Krzyżanowska i in., 2016, Muzio i in., 2020, Tao i in., 2020) oraz dwóch gatunków blisko spokrewnionych: *P. qingdaonensis* i *P. wadenswilerensis* (Muzio i in., 2020). Wcześniej wytwarzanie tego metabolitu opisano u *Pseudomonas lindbergii* ATCC31099 (Korth i in., 1981) i *Streptomyces neyagawaensis* (Kirst i in., 1982). W tym ostatnim przypadku badano zdolność 7-HT do obniżania oporności drobnoustrojów na antybiotyki aminoglikozydowe poprzez hamowanie adenylotransferazy aminoglikozydowej (Allen i in., 1982).

W 2014 roku pozyskaliśmy i upubliczniliśmy wersję draft (WGS) genomu szczepu *P. donghuensis* P482 (Krzyżanowska i in., 2014) (**publikacja spoza cyklu**). W tamtym czasie jakość danych i dostępne oprogramowanie nie pozwalały na połączenie odczytów z sekwencjonowania w jedną cząsteczkę (chromosom), stąd na wersję draft składało się 69 kontigów. Sekwencjonowanie genomów trzech pozostałych znanych ówczynie

przedstawicielei *P. donghuensis* (HYS<sup>T</sup>, SVBP6 i 22G5), przeprowadzone przez inne grupy, również nie dało zamkniętego chromosomu (Tabela 1).

**Tabela 1.** Szczepy z gatunku *P. donghuensis* i stopień złożenia danych genomowych dla tych szczepów w momencie publikacji omawianej pracy (rok 2021).

Szczep	Pochodzenie	Stopień złożenia (Liczba kontigów)	Nr akcesji GenBank	Wielkość (pz)	G+C %	ANI % <sup>A,B</sup>	Referencja (genom)
P482	Ryzosfera pomidora, Polska	Kompletny (1)	CP071706	5 656 185	62.36	99.47 <sup>B</sup>	Ta praca
		WGS (69)	JHTS00000000.1	5 623 997	62.38	99.47	(Krzyżanowska i in., 2014)
HYS <sup>T</sup>	Woda jeziorna, Chiny	WGS (231)	AJJP00000000.1	5 646 028	62.42	100	(Gao i in., 2012)
SVBP6	Gleba z pola uprawnego, Argentyna	WGS (43)	NWCB00000000.1	5 701 342	62.37	99.45	(Agaras i in., 2018)
22G5	Ryzosfera chwastów, Chiny	WGS (3185)	RWIB00000000.1	6 546 541	60.74	99.41	(Tao i in., 2020)

<sup>A</sup> ANI przeliczone względem szczepu typowego HYS<sup>T</sup> z użyciem narzędzia ChunLab's online Average Nucleotide Identity (ANI) calculator (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) (Yoon i in., 2017)

<sup>B</sup> ANI obliczone pomiędzy wersją kompletną a WGS z 2014 roku wynosiło 99.98%

<sup>T</sup> szczep typowy dla gatunku

## Cel badań i ich uzasadnienie

Głównym celem pracy było uzyskanie zamkniętej sekwencji genomowej dla szczepu *P. donghuensis* P482 wraz z adnotacją. Dodatkowym celem pracy było określenie, metodami *in silico*, potencjału szczepu P482 do produkcji metabolitów wtórnych, obecności w genomie receptorów odpowiedzialnych za pozyskiwanie żelaza oraz obecności profagów.

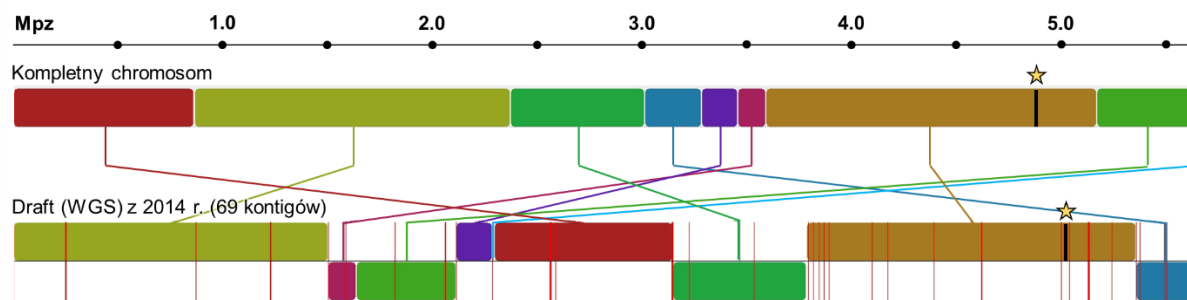
## Syntetyczny opis wyników

**W ramach opisanej pracy wraz ze współpracownikami, otrzymałam zamkniętą sekwencję chromosomu szczepu *P. donghuensis* P482. Była to pierwsza kompletna sekwencja genomu dla szczepu z gatunku *P. donghuensis*.** Sekwencjonowanie genomowego DNA zostało zlecone firmie Oligo.pl. Usługa obejmowała wykorzystanie dwóch platform: Illumina MiSeq (pokrycie 69 x) i Oxford Nanopore GridION (pokrycie 109 x), po czym przeprowadzono hybrydowe składanie danych. Niejasności i błędy sekwencji wyeliminowano z wykorzystaniem metody PCR i sekwencjonowania Sangera. Uzyskany kompletny genom szczepu P482 zawiera jeden kolisty chromosom o długości 5 656 185 par zasad, ze średnią zawartością par G+C wynoszącą 62,36%. Nie wykryto plazmidów. Sekwencję adnotowaliśmy za pomocą NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP), wersja z marca 2021 r. (Li i in., 2021). Stwierdziliśmy, że genom zawiera 5 258 ORF, wśród których znajduje się 5 158 CDS

(sekwencje kodujące), 74 tRNA, 22 rRNA, 3 ncRNA i 1 tmRNA. **Uzyskanie zamkniętej wersji genomu było ważne z uwagi na to, że wersje typu draft (WGS) (w tym uzyskana dla P482 w 2014 roku), w których informacja genomowa znajduje się w licznych fragmentach (kontigach), chociaż bardzo pomocne w badaniach nad danym mikroorganizmem, jednak mają swoje ograniczenia. W wersjach WGS nie jest znana wzajemna orientacja (układ liniowy) genów. Szczególnie problematyczne są regiony znajdujące się przy końcach kontigów. Co miało dla mnie także istotne znaczenie, jedynie zamknięte genomy są systematycznie zaciągane do użytecznych baz danych (m.in. KEGG metabolic pathways browser, BioCyc), pozwalając na korzystanie z dodatkowych narzędzi w trakcie analiz.**

Nowa adnotacja przeprowadzona dla kompletnego genomu P482 dała nam korzyść w postaci aktualnej adnotacji funkcji białek. Jednak minusem ponownej adnotacji genomu jest otrzymanie nowego zestawu oznaczeń *loci* (ang. *locus tags*) dla wszystkich genów. **Miałam na uwadze, że niektóre już opublikowane prace, a także badania będące wówczas w toku, bazują na oznaczeniach *loci* ze wcześniejszej wersji genomu. Aby uniknąć nieporozumień dotyczących oznaczeń genów, przeprowadziliśmy mapowanie krzyżowe CDS między wersją WGS z 2014 roku a nowo otrzymanym, kompletnym genomem P482.** Mapowanie przeprowadzono na poziomie białek przy użyciu BLASTP 2.11.0+ (Altschul, 1997). Próg dla uznania sekwencji za tożsame ustalono na wartość  $E \leq 0,001$  i identyczność  $\geq 96\%$ . W rezultacie udało się przenieść oznaczenia *locus* ze starej wersji genomu na nową w przypadku 4942 genów kodujących białka (95,8%). Białka kodowane przez 4433 zmapowane CDS wykazały 100% identyczności między wersjami, 487 wykazało identyczność 99%, a 22 wykazały identyczność pomiędzy 96-98%. Wszystkie pozostałe geny, w tym geny niekodujące białek, oznaczono nowymi pięciocyfrowymi znacznikami *locus* z nowej adnotacji.

**Przeprowadzone przeze mnie porównanie zamkniętej wersji genomu *P. donghuensis* P482 z wersją draft wykazało, że kompletny chromosom zawiera o 32 188 par zasad więcej niż wersja WGS. Rysunek 7 przedstawia kolejność i orientację zawartości genomu w zamkniętym chromosomie w odniesieniu do wersji typu draft.** Analizę przeprowadziłam przy użyciu metody ProgressiveMauve (Darling i in., 2010). Ten sam program ujawnił 519 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (zmiany pojedynczych par zasad) między pełnym genomem a wersją roboczą. Mapowanie krzyżowe *loci* ujawniło w wersji WGS 188 sekwencji kodujących białka, których nie można było zmapować do zamkniętego chromosomu P482. Większość niezmapowanych genów kodowała białka hipotetyczne lub domniemane (w sumie 92%), a tylko 4 (2,1%) z pozostałych *loci* można było przypisać funkcję za pomocą KEGG przy użyciu BlastKOALA (Kanehisa i in., 2016). Z drugiej strony, 118 sekwencji kodujących białka, obecnych w nowej adnotacji zamkniętego genomu, nie mogło zostać zmapowanych do wersji WGS. Z tego zbioru 11 *loci* (13%) otrzymało identyfikator KEGG KO. Wśród tych ostatnich znalazły się takie geny, jak *recC*, *recD* i *pqqA*. Różnice w wykrytych ORF pomiędzy pełnym genomem a wersją WGS mogą mieć różnorodne podłoże, w tym wynikać z różnic w otrzymanej sekwencji, faktu, że niektóre ORF nie zostały zidentyfikowane w wersji WGS ze względu na fragmentację genomu na 69 kontigów, a także z zastosowania innego algorytmu do adnotacji genów.



**Rysunek 7. Kolejność i orientacja zawartości genomu pomiędzy zamkniętym chromosomie *P. donghuensis* P482 (niniejsza praca) a wcześniejszą wersją WGS (64 kontigi).** Każdy blok reprezentuje region w zamkniętym genomie posiadający odpowiednik w wersji WGS. Czerwone pionowe linie oznaczają granice kontigów. Gwiazdkami wskazują genomową lokalizację homologa klastra genów *nfs* kodującego produkcję 7-hydroksytropolonu – ważnego związku przeciwdrobnoustrojowego wytwarzanego przez szczepy *P. donghuensis*. Rysunek odpowiada Fig. 1 umieszczonej w omawianej publikacji.

W trakcie realizacji pracy doktorskiej przeanalizowałam wersję WGS sekwencji genomu P482 pod kątem obecności genów kodujących wytwarzanie metabolitów wtórnych przy użyciu antiSMASH 2.0 (Blin i in., 2013, Krzyżanowska i in., 2016). Wówczas program wykazał obecność 23 skupisk (klastrów) genów, które mogą być zaangażowane w syntezę metabolitów wtórnych, w tym tylko 5 z jakąkolwiek sugestią dla ich funkcji: dwie nierybosomalne syntazy peptydowe („NRPS”), jedna „bakteriocyna” i dwa klastry z adnotacją „Inne”, a także 18 domniemanych (hipotetycznych) klastrów. W zakresie narzędzi do predykcji funkcji genów *in silico* nastąpił jednak znaczący postęp pomiędzy uzyskaniem i analizą draftu genomu P482 a uzyskaniem pełnego genomu. **Dlatego w ramach omawianej pracy przeanalizowałam genom P482 za pomocą antiSMASH 6.0 beta (Blin i in., 2021).** Nowsza wersja antiSMASH, z wykorzystaniem zamkniętej sekwencji genomu P482 jako danych wejściowych, rozpoznała w genomie P482 regiony podobne do tych, co do których wiadomo, że są zaangażowane w syntezę takich związków jak pseudopyronina (podobieństwo klastra 62%), arylopolien Vf (40%), fragin (37%), lipopolisacharydy (27%, 5%), antygeny O (19% i 14%), piowerdyna (17%, 11%, 6%), lankacydyna C (13%) i chejuenolid (7%). Co zastanawiające, choć wyniki te były znacznie bardziej konkretne niż dla analiz antiSMASH 2.0, to jednak antiSMASH 6.0, nawet przy najbardziej rozluźnionych parametrach przeszukiwania (tj. dających największą liczbę trafień, w tym hipotetycznych), nie przewidział w genomie P482 klastra, o którym obecnie wiadomo, że koduje syntezę przeciwdrobnoustrojowego 7-HT. Klaster ten odnajdywany był, chociaż bez przypisanej funkcji, przez starszą wersję oprogramowania (Krzyżanowska i in., 2016) i znajduje się fizycznie w nowej wersji genomu (Rysunek 7).

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* posiadają system wychwytu żelaza ze środowiska oparte na zależnych od TonB receptorach błony zewnętrznej, rozpoznających, w charakterze ligandów, siderofory związane z żelazem lub hem (Cornelis, 2010). Przeprowadzona przez nas analiza genomu P482 wykazała obecność 43 genów kodujących receptory zależne od TonB, spośród których 21 opisano jako receptory sideroforowe zależne od TonB, a 3 jako receptory z rodziny hemoglobiny/transferyny/laktoferyny zależne od TonB. Żelazo jest mikroelementem niezbędnym dla funkcjonowania komórek organizmów żywych. W wielu środowiskach jego

zasoby w biodostępnej formie są ograniczone, limitując wzrost komórek. Posiadanie licznych receptorów zależnych od Ton-B może dawać *Pseudomonas donghuensis* P482 przewagę w kolonizacji zajmowanej niszy ekologicznej (np. ryzosfery roślinnej lub gleby) i zwiększyć ich konkurencyjność w środowisku ubogim w żelazo.

Genom P482 przeszukaliśmy także pod kątem obecności sekwencji profagów przy użyciu narzędzia Prophage Hunter (<https://pro-hunter.genomics.cn>). **Analiza zaowocowała odkryciem sekwencji pojedynczego, przypuszczalnie nienaruszonego (aktywnego) profaga o długości 57 737 bp, zlokalizowanego pomiędzy pozycjami 2812547 i 2870283.** Genom odnalezionego profaga zawiera niezbędne dla funkcjonowania bakteriofagów geny, takie jak integraza, regulatory regulujące przejście między cyklem życiowym litycznym i lizogennym, geny kodujące holinę i lizynę oraz białka strukturalne. Według PHASTER (Zhou i in., 2011) profag ten jest filogenetycznie najbardziej podobny do faga pochodzącego z *Pseudomonas* sp. YMC/01/01/P52\_PAE\_BP (Jeon i in., 2012). Na podstawie genów strukturalnych przewidujemy, że wykryty profag należy do rzędu *Caudovirales* i rodziny *Siphoviridae*. Rola obecności tego profaga w genomie P482, możliwość jego wybudowania i infekcji innych komórek (spektrum gospodarzy), pozostają interesującym tematem do przyszłej eksploracji.

## PUBLIKACJA 4

**Krzyżanowska D.M., Jabłońska M., Kaczyński Z., Czerwicka-Pach M., Macur K., Jafra S.; Host-adaptive traits in the plant-colonizing *Pseudomonas donghuensis* P482 revealed by transcriptomic responses to exudates of tomato and maize. *Scientific Reports*, 2023, 13(1), 9445 (IF 4,6; MEiN 140)**

### **Wstęp**

Strefa przykorzeniowa roślin (ryzosfera) charakteryzuje się znacznie bogatszą mikroflorą niż gleba znajdująca się w oddaleniu od roślin. Podłożem tego zjawiska jest wydzielanie przez korzenie roślin mieszanin związków organicznych, mogących stanowić pożywienie dla mikroorganizmów. Wydzieliny korzeniowe, zwane eksudatami, zawierają metabolity pierwotne, takie jak kwasy organiczne, aminokwasy, cukry, a także metabolity wtórne o właściwościach bioaktywnych lub sygnalizacyjnych. Dokładny skład chemiczny eksudatów zależy od gatunku rośliny i jej stanu fizjologicznego, przy czym ten ostatni zależy od licznych czynników, w tym fazy rozwoju, dostępności składników pokarmowych, a także obecności czynników stresogennych (Chaparro i in., 2014). Skład wydzielin korzeniowych oraz odporność wrodzona rośliny mają kluczowe znaczenie w procesie kształtowania składu i aktywności mikroflory korzeniowej (Bever i in., 2012).

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* mogą bytować w różnych niszach ekologicznych, w tym na korzeniach roślin. Ta zdolność do przetrwania w różnorodnych środowiskach przypisywana jest elastyczności metabolicznej *Pseudomonas* spp. oraz ich zdolności do wytwarzania szerokiej gamy metabolitów wtórnych, w tym związków przeciwdrobnoustrojowych i związków wychwytyjących żelazo (sideroforów) (Loper i in.,

2012). Wiele szczepów *Pseudomonas* spp. stowarzyszonych z roślinami korzystnie wpływa na wzrost roślin (Haas i Défago, 2005). Nie ma jednak kompleksowych badań nad spektrum gatunkowym roślin, które dane szczepy *Pseudomonas* mogą kolonizować. Wiadomo jednak, że niektóre szczepy okazały się skuteczne jako środki biologicznej ochrony roślin po aplikacji na gatunkach roślin innych niż te, z których zostały wyizolowane, co sugeruje, że pojedyncze szczepy *Pseudomonas* spp. mogą kolonizować różnych gospodarzy roślinnych (Dekkers i in., 1998).

Wykazano, że różne gatunki roślin posiadają mikroflorę o różnym składzie populacyjnym, przy czym uważa się, że gospodarze bardziej odlegli filogenetycznie „rekrutują” zespoły mikroorganizmów o bardziej różniącym się składzie (Imam i in., 2016, Bouffaud i in., 2014). Dlatego fakt, że niektóre mikroorganizmy, takie jak *Pseudomonas* spp., mogą kolonizować różnych gospodarzy roślinnych rodzi pytania dotyczące adaptacji metabolicznych, jakich takie szczepy muszą dokonać aby kolonizować danego gospodarza lub utrzymać się w mikrobiomie rośliny-gospodarza pomimo zmian fizjologicznych, przez jakie dana roślina przechodzi. Na pytania te trudno odpowiedzieć na podstawie metaanalizy dostępnych danych z uwagi na fakt, że większość publikacji opisuje interakcje szczep-gospodarz w układach jeden gospodarz-jeden szczep lub jeden gospodarz i większa liczba szczepów. Co więcej, podczas gdy determinanty specyficzności w interakcjach bakteria-gospodarz roślinny zostały dokładnie zbadane w przypadku symbiotycznych bakterii z rodzaju *Rhizobium*, to tej pory niewiele uwagi poświęcono tej tematyce w przypadku mikroorganizmów tworzących mniej „ściśle” związki z roślinami (Droge i in., 2012).

*Pseudomonas donghuensis* P482 to szczep z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Roślin (MWB UG i GUMed) o potencjale do biokontroli, hamujący wzrost kilku bakteryjnych i grzybowych patogenów roślin (Krzyżanowska i in., 2012b, Krzyżanowska i in., 2016, Ossowicki i in., 2017). Bakterie te, choć pierwotnie wyizolowane z ryzosfery pomidora (*Solanum lycopersicum* L.), mogą również kolonizować ryzosferę ziemniaka (Krzyżanowska i in., 2012a) a także, jak wykazano w niżej opisanych badaniach, korzenie odległej filogenetycznie kukurydzy. Spowodowało to, że szczep P482 stał się obiecującym modelem do badania mechanizmów adaptacji bakterii o szerokim spektrum gospodarza do konkretnych gospodarzy roślinnych.

### **Cel badań**

Celem badań było wytypowanie szlaków metabolicznych zaangażowanych w adaptację *Pseudomonas* do różnych gospodarzy roślinnych na drodze identyfikacji genów stanowiących różnicującą (specyficzną dla gospodarza) oraz wspólną (niezależną od gospodarza) odpowiedź transkryptomyczną szczepu *P. donghuensis* P482 na wydzieliny z korzeni dwóch filogenetycznie odległych gatunków roślin: pomidora (roślina dwuliścienna) i kukurydzy (roślina jednoliścienna).

## Syntetyczny opis wyników i ich znaczenia

Posiadane przez nas przesłanki dotyczące tego, że szczep P482, poza ryzosferą pomidora, potrafi kolonizować także korzenie kukurydzy, pochodziły z eksperymentów na roślinach *in vitro* (M. Rajewska, dane nieopublikowane). Z uwagi na to w ramach badań wstępnych przeprowadziłam eksperyment doniczkowy, w którym zweryfikowałam zdolność P482 do kolonizacji pomidora (*Solanum lycopersicum* L., odmiana Saint Pierre) oraz kukurydzy (*Zea mays* L., odmiana Bejm) rosnących w glebie. Rośliny były inokulowane na etapie nasion, poprzez ich opłaszczanie. Aby umożliwić selektywną re-izolację P482 z korzeni, w badaniach wykorzystano spontanicznie rifampicinooporny wariant szczepu P482. Wykazaliśmy, że P482 jest obecny na korzeniach 18-dniowych roślin zarówno kukurydzy jak i pomidora, chociaż średnia liczebność populacji na korzeniach pomidora była wyższa niż ta dla kukurydzy (odpowiednio  $1,54 \times 10^7$  jtk  $g^{-1}$  i  $2,35 \times 10^6$  jtk  $g^{-1}$ )<sup>1</sup>.

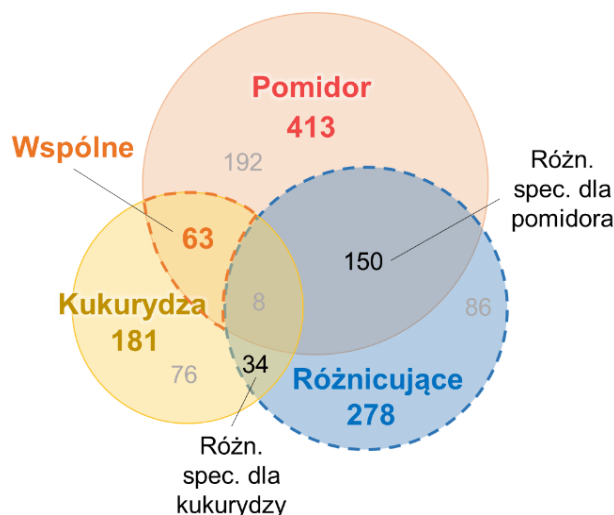
Aby porównać odpowiedź transkryptomyczną badanego szczepu na eksudaty obu gatunków roślin, hodowałam komórki szczepu *P. donghuensis* P482 w pożywce mineralnej z jednym źródłem węgla suplementowanej eksudatami kukurydzy lub pomidora lub bez dodatku eksudatów (kontrola). Następnie wyizolowałam z prób całkowity RNA, który został sekwencjonowany w ramach usługi zewnętrznej. **Różnicowa analiza ekspresji genów wykazała, że dodatek eksudatów pomidora spowodował zmianę ekspresji 413 genów (8%), podczas gdy eksudaty kukurydzy spowodowały zmianę ekspresji 181 genów (3,5 %) w odniesieniu do pożywki niesuplementowanej. Większa liczba genów, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem eksudatów pomidora sugeruje, że odpowiedź transkryptomiczna P482 na związki wydzielone przez pomidora była szersza niż ta na związki z kukurydzy.** Pozostaje jednak otwartym pytaniem czy ma to związek z faktem, że szczep ten wyizolowano z pomidora a nie z kukurydzy. **Na podstawie analizowanych danych wykazałam także, że odpowiedź różnicująca pomiędzy dwoma typami eksudatów jest szerzej zakrojona (złożyło się na nią więcej genów) niż odpowiedź wspólna, tj. analogiczna dla eksudatów niezależnie od źródła ich pochodzenia.** Na zbiór genów odpowiedzi różnicującej składało się 278 genów (5,38% transkryptomu), a na zbiór genów odpowiedzi wspólnej 63 geny (1,22% transkryptomu) (Rysunek 8).

---

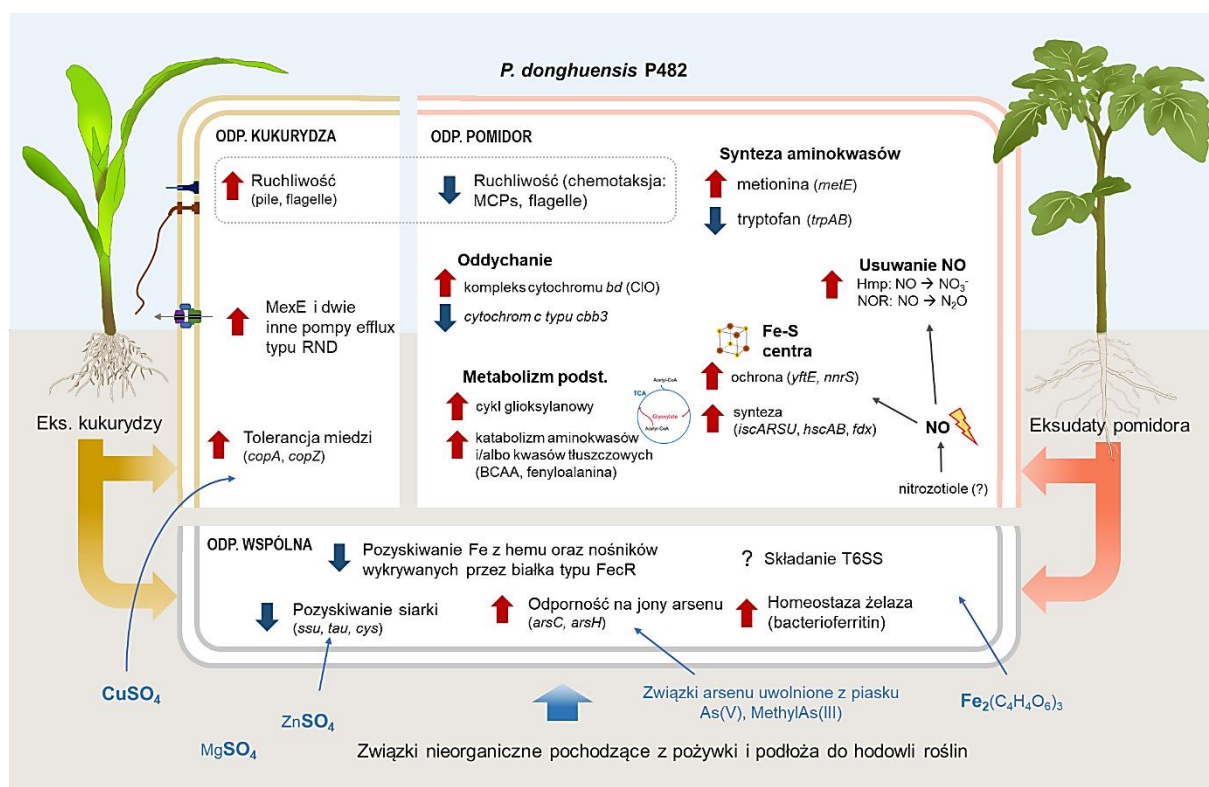
<sup>1</sup> jtk – jednostki tworzące kolonie (ang. *colony forming units*; CFU)



**Rysunek 8. Diagram Venna przedstawiający podzbiory genów w transkryptomie *P. donghuensis* P482 ulegające zmienionej ekspresji w odpowiedzi na eksudaty pomidora (423), kukurydzy (181), a także geny różnicujące pomiędzy obiema odpowiedziami (278). Geny odpowiedzi wspólnej (63) to geny, których ekspresja została zmieniona w podobny sposób przez oba typy eksudatów, niezależnie od źródła tych eksudatów. Dodatkowe podzbiory ujawnione w wyniku nałożenia ww. grup to geny różnicujące specyficzne dla pomidora (150) i specyficzne dla kukurydzy (34), które należały jednocześnie do genów różnicujących i takich, których ekspresja zmieniana była tylko przez jeden rodzaj eksudatów. Kryteria zastosowane do uznania różnicy w ekspresji za istotną:  $p < 0,05$  (pady/FDR; korekta Benjamini-Hochberg);  $\log_2FC > 1,5$ . Rysunek stanowi polskie tłumaczenie Fig. 1, panel A, zamieszczonej w omawianej publikacji.**



W dalszej kolejności przeprowadziłam, dla puli genów odpowiedzi różnicującej i odpowiedzi wspólnej, analizę pod kątem wzbogacenia ścieżek metabolicznych (KEGG), wzbogacenia w zakresie klastrów grup ortologicznych białek (COG) oraz pod kątem wzbogacenia klastrów genowych o przypisanej funkcji i sieciowania genów (STRING). Zbiorcza analiza otrzymanych danych oraz szeroko zakrojony przegląd literatury dotyczący możliwych powiązań pomiędzy wytypowanymi ścieżkami metabolicznymi pozwoliły mi na charakterystykę odpowiedzi transkryptomowej P482 na eksudaty badanych roślin. Poniżej przedstawiam skrótowy opis uzyskanych wyników w podziale na odpowiedź wspólną (analogiczną dla dwóch typów eksudatów) oraz odpowiedzi charakterystyczne dla eksudatów pomidora i kukurydzy. Schemat podsumowujący najważniejsze wyniki znajduje się na [Rysunku 9](#). Dodatkowo w ramach opisywanej pracy przeprowadzono analizę chemiczną składu obu typów eksudatów metodami chromatografii gazowej (GC-MS), magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), i chromatografii cieczowej z wybiórczym monitorowaniem spektrometrią mas (LC-SRM), próbując powiązać obecność niektórych podstawowych metabolitów z odpowiedzią transkryptomową P482.



**Rysunek 9. Aspekty odpowiedzi transkryptycznej bakterii *P. donghuensis* P482 na eksudaty korzeniowe pomidora i kukurydzy - odpowiedzi wspólne oraz specyficzne dla danego gospodarza roślinnego.** Czerwone strzałki skierowane w górę wskazują podniesioną ekspresję genów zaangażowanych w dany szlak metaboliczny, podczas gdy niebieskie strzałki skierowane w dół wskazują na obniżoną ekspresję. Rysunek stanowi polskie tłumaczenie Fig. 4 zamieszczonej w omawianej publikacji.

### Odpowiedź wspólna

Wykazałam, że odpowiedź P482 wspólna dla obu typów eksudatów obejmuje takie aspekty metabolizmu jak asymilacja siarki, metabolizm arsenu, pozyskiwanie żelaza z ksenosideroforów i związków hemu, homeostaza żelaza i regulacja powstawania szóstego systemu sekrecyjnego (T6SS). Pomimo tego, że korzenie roślin były płukane w wodzie przed zbiorem eksudatów, w mojej opinii zakres odpowiedzi wspólnej stanowi wypadkową odpowiedzi na same eksudaty jak również specyficznych warunków hodowli roślin zastosowanych w naszym eksperymencie. W szczególności mam tu na myśli potencjalny wpływ przeniesienia na/w korzeniach i do eksudatów mikroelementów pochodzących z pożywki hodowlanej (sole Hoagland'a) oraz substratu (gruboziarnisty piasek akwarystyczny).

Suplementacja podłoża wzrostowego eksudatami, niezależnie od źródła ich pochodzenia, spowodowała obniżenie ekspresji genów w obrębie nakładających się szlaków metabolizmu siarki i transporterów ABC. Obejmowało to zarówno geny zaangażowane w pozyskiwanie siarki ze źródeł nieorganicznych i cysteiny (*cysW* i *cysA*) jak i genów zaangażowanych w asymilację alternatywnych organicznych źródeł siarki, takich jak alkanosulfoniany, w tym tauryna (wybrane geny operonów *ssu* i *tau*). Obniżenie poziomu ekspresji genów *ssu* lub zarówno genów *ssu* jak i genów *tau* zaobserwowała także inna grupa

dla 6 z 8 *Pseudomonas* spp. poddanych wpływowi eksudatów korzeniowych trawy *Brachypodium distachyon* (Mavrodi i in., 2021).

Dodatek eksudatów zwiększył natomiast u P482 poziom ekspresji genów *arsC* i *arsH*. Oba geny są powiązane z metabolizmem arsenu, wysoce toksycznego metaloidu. Arsen jest wszechobecny w środowisku, w tym w glebie i piasku. Z uwagi na to bakterie wykształciły różne mechanizmy jego przetwarzania. W ramach wyjaśnienia wzrostu ekspresji genów *ars* u P482 sformułowałam hipotezę, że zwiększona ekspresja *arsC* i *arsH* w P482 mogła zostać wywołana przez arsenian i organiczne związki arsenu przeniesione na korzenie z piaszczystego substratu wykorzystanego do hodowli pomidorów i kukurydzy.

Jedną z „dwufunkcyjnych” kategorii COG wzbogaconych w ramach wspólnej odpowiedzi była kategoria „Transport i metabolizm jonów nieorganicznych / Transdukcja sygnału”. U P482 w odpowiedzi na eksudaty reprezentowało ją siedem genów podobnych do *fecR*. Ekspresja wszystkich była obniżona. Białka FecR są sensorami transbłonowymi zaangażowanymi w przekazywanie sygnału, zaangażowanych u bakterii w proces wychwytu cząsteczek związanych z żelazem, takich jak cytrynian, ale też inne związki, w tym cząsteczki produkowane przez konkurujące mikroorganizmy celem pozyskania żelaza ze środowiska (ksenosiderofory) (Visca i in., 2002). Innym źródłem żelaza, z którego mogą korzystać *Pseudomonas* spp., są cząsteczki hemu uwalniane z hemoprotein. U P482 poddanego działaniu eksudatów zaobserwowano obniżoną ekspresję licznych genów zaangażowanych w wychwytywanie i metabolizm hemu (*BV82\_0056*, *hasR*, *hemO*, *hmuU*, *hmuV*, *hasD*). Równolegle eksudaty nie wpłynęły na ekspresje genów zaangażowanych u P482 w syntezę sideroforów piowerdyny oraz 7-HT. Brak wzrostu ekspresji piowerdyny zaobserwowano także w innych badaniach dla ośmiu szczepów *Pseudomonas* poddanych działaniu eksudatów *B. distachyon* (Mavrodi i in., 2021). W cytowanej pracy zwiększenie ekspresji jakichkolwiek genów związanych z pozyskiwaniem żelaza zaobserwowano tylko w przypadku połowy tych szczepów. W innej pracy ekspresja genów związanych z pozyskiwaniem hemu i syntezą piowerdyny u *P. protegens* CHA0 była stosunkowo niska w odpowiedzi na metabolity pszenicy (pochodzenie roślinne) w porównaniu z ekspresją tych genów obserwowaną podczas infekcji owadów przez *P. protegens* CHA0 (Vesga i in., 2020).

W przeciwieństwie do genów zaangażowanych w pozyskiwanie żelaza, u P482, w odpowiedzi na eksudaty, zwiększonej ekspresji ulegał gen *bfr* zaangażowany w wewnątrzkomórkową homeostazę żelaza. Bfr pełni funkcję „magazynu żelaza”, które, jeśli występuje w nadmiarze w postaci wolnej, może powodować stres oksydacyjny w komórkach poprzez wytwarzanie reaktywnych form tlenu. Zwiększenie poziomu syntezy Bfr u P482 to kolejna przesłanka za tym, że same eksudaty korzeniowe, pobrane z roślin hodowanych w warunkach gnotobiotycznych, nie ograniczają dostępności żelaza dla P482. Warto jednak podkreślić, że w warunkach eksperymentalnych zarówno naszych, jak i stosowanych przez Mavrodi i in. (2021), którzy zaobserwowali podobną tendencję dla części *Pseudomonas* spp., szczepy hodowane były w postaci monokultur. Jest wysoce prawdopodobne, że P482 musiałby wykorzystać swój bogaty arsenał metod do pozyskiwania żelaza w obecności konkurujących drobnoustrojów.

Po ekspozycji P482 na eksudaty korzeniowe zaobserwowaliśmy podwyższoną ekspresję *tagQ*, *pppA* i *crp*. U bakterii *P. aeruginosa* geny *tagQ* i *pppA* biorą udział w kaskadzie regulacyjnej kontrolującej aktywację T6SS, przy czym *pppA* uważa się za negatywny regulator T6SS (Silverman i in., 2011). Trzeci z genów, *crp*, koduje receptor cAMP. Doniesienia na temat

roli Crp w regulacji T6SS są nieliczne i dotyczą *Vibrio cholerae*, gdzie sugerowano, że Crp jest pozytywnym regulatorem T6SS (Ishikawa i in., 2009). Reasumując, otrzymane przeze mnie i współpracowników wyniki sugerują, że obecność eksudatów korzeniowych ma pewien wpływ na T6SS w P482, jednak kierunek tego oddziaływania wymaga jednak dalszych badań. Można również założyć, że ekspresja genów związanych z T6SS byłaby inna w obecności konkurujących (mikro)organizmów. T6SS umożliwia bakteriom wstrzykiwanie białek do innych komórek prokariotycznych lub eukariotycznych, a sam system jest znany ze swojej roli w konkurencji międzybakteryjnej (Boak i in., 2022).

#### Odpowiedź specyficzna dla eksudatów pomidora

**Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazałam, że szczep P482 traktowany eksudatami pomidora wykazuje objawy stresu spowodowanego tlenkiem azotu (inaczej stresu nitrozacyjnego).** Tlenek azotu jest rodnikiem, który wywiera toksyczne działanie na komórki. Aby przeciwdziałać stresowi nitrozacyjnemu, u bakterii istnieje kilka ścieżek przekształcania NO w mniej reaktywne cząsteczki, takie jak N<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub> lub amoniak (Vine i Cole, 2011). W przypadku ekspozycji P482 na eksudaty pomidora zaobserwowaliśmy znaczne zwiększenie ekspresji genu *hmp* (6,13 log<sub>2</sub>FC<sup>2</sup>). W warunkach tlenowych Hmp katalizuje reakcję NO z tlenem, w wyniku czego powstaje jon azotanowy (NO<sup>3-</sup>) (D'Autréaux i in., 2002). Podwyższoną ekspresję zaobserwowaliśmy również dla *norD*, *norC* i *norB*, kodujących reduktazę tlenku azotu (NOR). Ten zintegrowany z błoną enzym katalizuje redukcję tlenku azotu (NO) do podtlenku azotu (N<sub>2</sub>O) (Shiro, 2012). Hmp i NOR są dobrze udokumentowanymi komponentami mechanizmu odpowiedzialnego za detoksykację NO u bakterii.

Tlenek azotu działający na komórkę bakteryjną może pochodzić ze środowiska lub być wytwarzany endogennie przez komórki w procesie denitryfikacji w komórkach doświadczających ograniczonej dostępności tlenu. **Na podstawie analizy ekspresji genów zaangażowanych w denitryfikację u P482 wywnioskowałam, że przyczyną aktywacji szlaków detoksykacji NO u P482 nie jest denitryfikacja, ale raczej radzenie sobie z toksycznością tlenku azotu obecnego w środowisku wzrostu.**

Szkodliwe działanie NO na komórkę wynika głównie z inaktywacji białek zawierających jako kofaktory centra żelazowo-siarkowe (Fe-S) (Philippot, 2005, Davis i in., 2019). Centra Fe-S występują powszechnie w organizmach żywych i są zaangażowane w wiele podstawowych procesów biochemicznych (Shi i in., 2021). **W komórkach P482 eksponowanych na eksudaty pomidora następowało wyraźne zwiększenie ekspresji *yftE* (6,36 log<sub>2</sub>FC) – genu znanego ze swojej roli w metabolizmie/ naprawie centrów Fe-S.** Homologi *yftE* są obecne u licznych bakterii, a indukcja ekspresji tego genu w odpowiedzi na NO została wcześniej udokumentowana (Bowman i in., 2011). Dane literaturowe pokazują, że białko YftE przyczynia się do przeżycia *Yersinia pseudotuberculosis* w śledzienie po stresie nitrozacyjnym i przyczynia się do zjadliwości tego ludzkiego patogenu (Davis i in., 2019). Innym genem, którego ekspresja była istotnie indukowana przez eksudaty pomidora był gen *nnrS*, kodujący białko, dla którego wykazano rolę w ochronie centrum Fe-S przed NO u *Vibrio cholerae* (Stern i in., 2013). Warto zauważyć, że u P482 geny *yftE* i *nnrS* są kodowane w obrębie jednego klastra z genami kodującymi NOR i dwoma regulatorami: *norR* i *dnr*. **Równolegle aktywowane były**

---

<sup>2</sup> log<sub>2</sub>FC – log<sub>2</sub> fold change; logarytm o podstawie dwa z krotności zmiany

**także geny *iscR*, *iscS*, *iscU*, *iscA*, *hscB*, *hscA* i *fdx*, kodujące białka związane z biogenezą klastrów Fe-S (Rysunek 10).**

Organizmy eukariotyczne mogą wytwarzać tlenek azotu w ramach obrony podczas infekcji (Stevanin i in., 2005). Natomiast rośliny wykorzystują NO jako cząsteczkę sygnałową w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny, ale także w ramach licznych procesów fizjologicznych, takich jak kiełkowanie, kwitnienie i starzenie się (Pande i in., 2021). Ponieważ NO jest wysoce reaktywny, w roślinach magazynowany w formie S-nitrozotoli (SNO), które pełnią rolę rezerwuarów NO *in vivo* (Pande i in., 2021). **NO odgrywa rolę w odpowiedzi roślin na patogeny, ale jest również kluczowy dla ustanowienia interakcji symbiotycznych między ryzobiami a roślinami strączkowymi (Spiro, 2007). Warto też zwrócić uwagę, że chociaż testowane przez nas eksudaty pomidora powodowały u P482 stres nitrozacyjny, to jednak ich dodatek do hodowli nie wpływał negatywnie na tempo wzrostu P482 *in vitro*. Sugeruje to, że P482 jest dobrze przystosowany do radzenia sobie z tego rodzaju stresem środowiskowym.**

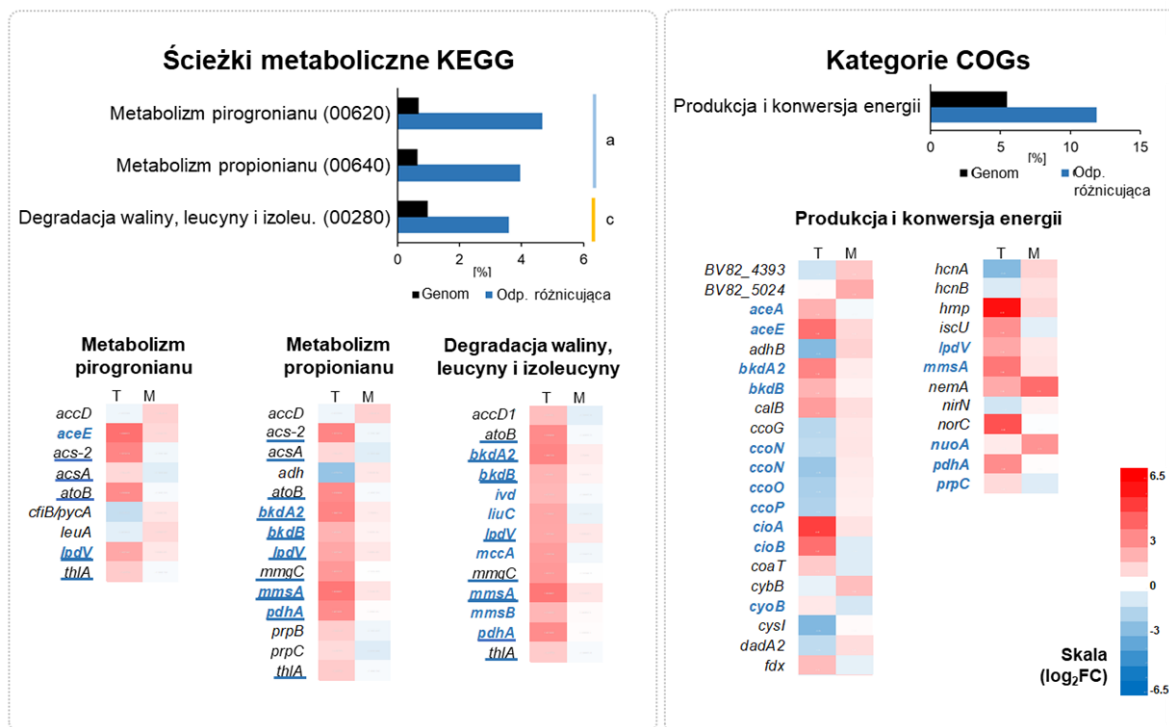
Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* dysponują rozgałęzionym łańcuchem oddechowym. U bakterii *P. aeruginosa* występuje pięć różnych oksydaz, umożliwiając optymalizację szlaku transportu elektronów pod kątem warunków środowiskowych (Arai, 2011). **Wykazałam, że u P482, w odpowiedzi na eksudaty pomidora, obniżeniu ulega ekspresja genów *ccoN*, *ccoO*, *ccoQ* oraz *ccoP* kodujących podjednostki oksydazy cytochromu c typu *ccb3*, natomiast indukcja ekspresji zachodzi dla genów *cioA* i *cioB*, kodujących oksydazę niewrażliwą na cyjanki cytochromu *bd* (CIO; ang. *cyanide insensitive oxidase*) (Rysunek 10).** Mikroorganizmy, które potrafią przejść na wykorzystanie CIO, są w stanie przeżyć w obecności wysokich stężeń cyjanowodoru, który blokuje oddychanie wykorzystujące oksydazy cytochromu c (Quesada i in., 2007). Chociaż geny *cio* opisano po raz pierwszy w kontekście cyjanowodoru, inne czynniki również mogą modulować ich ekspresję. Z danych literaturowych wynika, że cytochrom *bd* odgrywa rolę m.in. w tolerancji bakterii na stres oksydacyjny i nitrozacyjny (Giuffrè i in., 2014). Co ciekawe, u szczepu *Pseudomonas* sp. WCS365 opisano udział genów *cioA* w unikaniu reakcji obronnej gospodarza podczas interakcji z *Arabidopsis thaliana* (Liu i in., 2018).





inhibitorów *bc1* jest znacząco wzmacniane przez jednoczesne dodanie donorów NO, czemu bakterie te próbowały przeciwdziałać przechodząc na szlak cytochromu *bd* (Zeng i in., 2021).

**Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie analiz wykazaliśmy także, że eksudaty pomidora mają wpływ na metabolizm podstawowy szczepu P482.** W ramach odpowiedzi różnicującej następowało wzbogacenie dla trzech nakładających się szlaków KEGG: „metabolizm pirogronianu”, „metabolizm propionianu” oraz „degradacja waliny, leucyny i izoleucyny”. Geny zaangażowane w te ścieżki w dużej mierze pokrywają się z tymi wchodzącymi w skład również wzbogaconej kategorii COG „produkcja i konwersja energii” (Rysunki 10 i 11).



**Rysunek 11. Ścieżki KEGG i kategorie COG wzbogacone w obrębie różnicującej odpowiedzi transkryptomycznej P482 na eksudaty z korzeni pomidora i kukurydzy.** Dla poszczególnych genów w obrębie szlaków: czerwony i niebieski kolor wskazują, odpowiednio, podniesioną i obniżoną ekspresję genów; lewa kolumna pokazuje zmiany ekspresji (log<sub>2</sub>FC) po dodaniu eksudatów pomidora (litera T – ang. *tomato*), a prawa kolumna po dodaniu eksudatów kukurydzy (litera M – ang. *maize*). Kategorie KEGG: a – metabolizm węglowodanów, b – przetwarzanie informacji o środowisku, c – metabolizm aminokwasów. Geny pokazane pogrubioną czcionką występują równolegle we wzbogaconych szlakach KEGG i COG. Podkreślone geny pokrywają się pomiędzy różnymi kategoriami w obrębie szlaków KEGG. Rysunek jest polskim tłumaczeniem Fig. 2, panele C i D, w omawianej publikacji.

**W ramach odpowiedzi P482 na eksudaty pomidora zaobserwowaliśmy zwiększony katabolizm aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach bocznych (BCAA; ang. *branched chain amino acids*), tj. waliny, leucyny i izoleucyny.** Eksudaty pomidora zwiększyły ekspresję *lpdV*, *bkdB*, *bkdA2* i *pdhA*. Ogólną funkcją kompleksów kodowanych przez te geny jest konwersja alfa-ketokwasów do acylo-CoA i CO<sub>2</sub>. Alfa-ketokwasy mogą powstawać m.in. w wyniku oksydacyjnej deaminacji aminokwasów i odwrotnie, są prekursorami do ich syntezy



(Ævarsson i in., 1999). Dehydrogenaza 2-oksoizowalerianianu kodowana przez *bkdA2* i *pdhA* jest enzymem biorącym udział w BCAA (Namba i in., 1969). Jednocześnie zaobserwowaliśmy indukcję genów *mmsA* i *mmsB*, zaangażowanych w metabolizm waliny u *P. aeruginosa* (Steele i in., 1992).

Profil ekspresji genów P482 sugerował także aktywację katabolizmu trzech innych aminokwasów: fenyloalaniny (geny *phhA*, *phhB* i *phhC*), glicyny (*gcvH* i *gcvP*) i metioniny (*aceE/mdeB*, *mdeA*). Inne zmiany metaboliczne w P482 związane ze zwiększonym katabolizmem aminokwasów i/lub kwasów tłuszczowych obejmowały zwiększenie aktywności dwóch dehydrogenaz katalizujących  $\alpha,\beta$ -dehydrogenację estrów acylo-CoA (Swigonová i in., 2009). **Ponadto, zwiększonej ekspresji ulegała liaza izocytrynianu kodowana przez *aceA*, co sugeruje aktywację cyklu glioksydanowego (GS; ang. *glyoxylate shunt*). Wiele bakterii aktywuje GS, gdy acetylo-CoA, powstały w wyniku katabolizmu aminokwasów lub kwasów tłuszczowych, stanowi główne źródło węgla dostępne dla komórki** (Ahn i in., 2016). Klasyczny cykl kwasów trkarboksylowych (TCA) nie może asymilować węgla z odtworzeniem cytrynianu gdy acetyl-CoA jest jedynym dostępnym źródłem węgla. Dzieje się to z uwagi na utratę CO<sub>2</sub> i niemożność odtworzenia szczawiooctanu. GS pozwala na prowadzenie metabolizmu z pominięciem problematycznych etapów TCA. Oprócz istotnej roli w metabolizmie podstawowym, cykl glioksydanowy prawdopodobnie odgrywa wciąż słabo poznaną rolę w obronie przed stresem oraz w procesie patogenezy. Znane są doniesienia, że cykl ten ma kluczowe znaczenie dla wzrostu i zjadliwości *P. aeruginosa* podczas infekcji, gdy bakteria preferencyjnie wykorzystuje kwasy tłuszczowe (Crousilles i in., 2018). Co więcej wykazano, że ukierunkowanie metabolizmu na wykorzystanie aminokwasów zwiększa oporność *P. aeruginosa* na antybiotyki (Mielko i in., 2020).

W tym miejscu warto odnieść się do opisanej w pracy analizy składu chemicznego wykorzystywanych eksudatów, a dokładnie w kierunku analizy LC-SRM wykonanej specyficznie pod kątem zawartości aminokwasów. Walina i leucyna występowały w przybliżeniu w ilości 4 razy większej w eksudatach kukurydzy niż w tych z pomidora, a zawartość izoleucyny była porównywalna w obydwu próbach. Zawartość fenyloalaniny i tryptofanu była odpowiednio 4,5 i 2,3 razy wyższa w przypadku kukurydzy w porównaniu do eksudatów pomidora. Zawartość metioniny w obu typach eksudatów nie różniła się. Zatem nie jest tak, że aminokwasy, których katabolizm jest zwiększony w przypadku komórek rosnących w obecności eksudatów pomidora (w tym BCAA), są w tych eksudatach obecne w większym stężeniu. **Z uwagi na to w opisywanej pracy wysnułam przypuszczenie, że przejście P482 na katabolizm aminokwasów w próbach traktowanych eksudatami pomidora miała na celu zwiększenie odporności komórek na czynniki stresowe w podobny sposób, jak opisano dla *P. aeruginosa* w modelach infekcji u ludzi** (Crousilles i in., 2018)(Mielko i in., 2020). Obecność NO, powodując uszkodzenie klastrów Fe-S w centrach aktywnych niektórych enzymów, może zaburzać niektóre szlaki metaboliczne. W takim przypadku zaobserwowana zmiana w metabolizmie podstawowym P482 nie byłaby spowodowana preferencją tej bakterii względem określonych źródeł węgla i ich dostępnością w eksudatach, ale raczej wyborem szlaków metabolicznych nieulegających upośledzeniu w wyniku aktywności czynników stresowych. W próbach pochodzenia roślinnego obecność takich czynników (wiązków) może być specyficzna dla gatunku lub związana ze stanem fizjologicznym danej rośliny. Trafność tego wyjaśnienia dla obserwowanych wyników wymaga dalszych badań.

W kontekście wpływu eksudatów pomidora na metabolizm aminokwasów u P482 warto wspomnieć, że aktywacja pewnych ścieżek metabolicznych może również mieć mniej

bezpośrednie/oczywiste przyczyny. W literaturze dostępne są doniesienia, że u *P. fluorescens* enzym 4-hydroksylaza fenyloalaniny (PAH) bierze udział nie tylko w katabolizmie fenyloalaniny, ale także w biosyntezie posiadającej przeciwutleniające właściwości melatoniny z tryptofanu (Ma i in., 2017, Jiao i in., 2021). Wykazano również, że dostępność tryptofanu, metioniny, tyrozyny i fenyloalaniny, dobrze znanych prekursorów wtórnych metabolitów roślin, może przyczyniać się do zwiększenia odpowiedzi odpornościowej roślin (Tünnermann i in., 2022). **W świetle tych doniesień można by spekulować, że P482, poprzez rozkład fenyloalaniny i zmniejszenie syntezy tryptofanu może próbować modulować to, co zawartości eksudatów „interpretuje” jako odpowiedź immunologiczną rośliny.**

#### Odpowiedź specyficzna dla kukurydzy

**Eksudaty kukurydzy spowodowały wzrost ekspresji trzech podjednostek MFP (ang. *Membrane Fusion Protein*) dla trzech eksporterów RND (ang. *Resistance-Nodulation-Division*): *mexE*, BV82\_1337 oraz BV82\_1618.** Eksportery RND to rodzina pomp typu *efflux* powiązanych z opornością bakterii i procesem nodulacji. Pompy *efflux* z rodziny RND, wraz z białkami Omp, tworzą kompleksy, które umożliwiają Gram-ujemnym bakteriom eksportowanie szkodliwych związków bezpośrednio na zewnątrz komórki, a nie, jak w przypadku innych systemów *efflux*, do przestrzeni peryplazmatycznej. Sprawia to, że pompy RND są ważnymi determinantami oporności wielolekowej u bakterii (Nikaido i Takatsuka, 2009). Istnieją doniesienia, że u *P. aeruginosa* operon *mexEF-oprN* zawierający *mexE* nadaje tej bakterii oporność na chinolony, chloramfenikol i trimetoprim (Köhler i in., 1999). Jednakże prawdopodobne jest, że oporność na antybiotyki syntetyczne jest jedynie skutkiem ubocznym oporności na naturalne metabolity wtórne. **Możliwe zatem, że podwyższona ekspresja *mexE* u P482 w odpowiedzi na eksudaty kukurydzy ma związek z opornością bakterii na obecność określonych metabolitów wtórnych specyficznych dla tego gospodarza roślinnego.** Co ważne, geny jedynie wybranych transporterów RND zostały indukowane w obecności kukurydzy. Zwiększenie poziomu ekspresji *czcA* i *mdtA*, również kodujących pompy RND, zachodziło w obecności eksudatów pomidora. Wiadomo, że kukurydza i inne trawy (*Poaceae*) wytwarzają i wydzielają biobójcze benzoksazynoidy – związki o dużej proponowanej roli w kształtowaniu mikrobiomu roślinnego (Cotton i in., 2019, Kudjordjie i in., 2019). Zbadanie roli transporterów RND w tolerancji niektórych bakterii na tę grupę związków wydaje się ciekawym tematem badawczym.

**Oba badane typy eksudatów zwiększały u P482 ekspresję genów *copA* i *copZ*, jednakże indukcja tych genów była znacząco wyższa w odpowiedzi na kukurydżę. CopA jest zakotwiczoną w błonie ATPazą odpowiedzialną za usuwanie jonów  $\text{Cu}^+$  dostarczanych przez cytoplazmatyczne białko CopZ. Obydwa białka są elementami dobrze scharakteryzowanych systemów tolerancji jonów miedzi.** Miedź jest niezbędnym pierwiastkiem śladowym dla wszystkich organizmów, jednakże jej nadmiar jest toksyczny. Miedź w postaci  $\text{CuSO}_4$  jest składnikiem pożywki hodowlanej Hoaglanda, zastosowanej w opisywanych badaniach do hodowli zarówno roślin pomidora jak i kukurydzy. Stąd fakt, że indukcja genów tolerancji na miedź jest istotnie silniejsza w odpowiedzi na eksudaty kukurydzy musi być spowodowany czynnikami zależnymi od rośliny-gospodarza, wpływającymi na dostępność lub toksyczność miedzi. Mavrodi i wsp. wykazali znaczące podwyższenie ekspresji jednego lub więcej genów *cop* związanych z tolerancją miedzi u 5 z 8 badanych *Pseudomonas* spp., traktowanych eksudatami *B. distachyon* (Mavrodi i in., 2021). Zarówno kukurydza jak i *B. distachyon* są

trawami, a w ramach prowadzonych eksperymentów w obydwu przypadkach rośliny testowe hodowane były na pożywce Hoaglanda.

**Na poziomie ekspresji genów, ruchliwość komórek P482 była zwiększana przez eksudaty kukurydzy, a obniżana przez eksudaty pomidora.** Eksudaty kukurydzy zwiększały ekspresję genu kodującego białko FimV, zaangażowane w tworzenie pili typu IV. Struktury te biorą udział w przyleganiu, tworzeniu biofilmu, ale także w określonych rodzajach ruchu komórek bakteryjnych. W innych badaniach wykazano, że pili typu IV są niezbędne dla endofitycznej kolonizacji ryżu przez endofita wiążącego azot – szczep *Azoarcus* sp. BH72 98. Co ciekawe, ekspresja *pilK*, innego genu zaangażowanego w syntezę pili, była obniżona u *P. aeruginosa* w odpowiedzi na eksudaty buraka (Mark i in., 2005), co sugeruje, że eksudaty buraka hamują tworzenie pili u *P. aeruginosa*, w przeciwieństwie do stymulującego wpływu eksudatów kukurydzy na ich formowanie u *P. donghuensis* P482. Co więcej, eksudaty kukurydzy powodowały zwiększenie ekspresji genu *fliS*, co sugeruje zwiększenie u P482 syntezy wici odpowiedzialnych za pływanie. Wici są niezbędne niektórym szczepom *Pseudomonas* do skutecznej kolonizacji żywicieli. Szczep *P. fluorescens* F113 z uszkodzonym genem *fliS* był nieruchliwy i niezdolny do konkurowania ze szczepem typu dzikiego o kolonizację wierzchołka korzenia lucerny (Capdevila i in., 2004).

W kontekście przewidywanej zdolności bakterii do ruchu eksudaty pomidora powodowały u P482 zwiększoną ekspresję genu w *locus* BV82\_3459, przypuszczalnie kodującego negatywny regulator operonu zaangażowanego w syntezę wici. Wykazano, że chociaż wici mogą zapewnić komórkom przewagę w środowisku, ich obecność może mieć również negatywne konsekwencje. Rozpoznanie specyficznych antygenów wici może wywołać reakcję nadwrażliwości u rośliny-gospodarza i tym samym doprowadzić do śmierci komórek bakteryjnych. Ograniczenie syntezy wici uważa się za ważny mechanizm wykorzystywany przez bakterie do unikania odpowiedzi obronnej rośliny (Rossez i in., 2015). Dodatkowo badania prowadzone na szczepie *P. putida* KT2440 wykazały, że mutant tego szczepu niezdolny do produkcji wici charakteryzuje się krótszą fazą lag w czasie wzrostu i jest bardziej odporny na stres oksydacyjny niż szczep typu dzikiego (Martínez-García i in., 2014). W przytaczanych badaniach zasugerowano, że brak wydatku metabolicznego związanego z wytwarzaniem wici może zapewnić komórkom nadwyżkę energii, którą komórki mogą przeznaczyć na inne cele, w tym do walki ze stresem egzogennym. **Wydaje się zatem, że w przypadku P482 traktowanego eksudatami pomidora zalety obniżonej ekspresji genów związanych z syntezą wici przewyższają potencjalne koszty obniżonej ruchliwości.** Warto również wspomnieć, że eksudaty pomidora powodowały także obniżenie poziomu ekspresji dwóch genów kodujących białka chemotaksji akceptujące metyl (MCP, ang. *methyl-accepting chemotaxis proteins*), pełniące rolę chemoreceptorów u bakterii i archeonów (Salah Ud-Din and Roujeinikova, 2017).

Reasumując, **eksudaty kukurydzy zwiększyły u P482 ekspresję genów związanych z ruchliwością, podczas gdy eksudaty pomidora odnosiły skutek przeciwny. Pozostaje do wyjaśnienia, czy różnice te mają związek ze zróżnicowanym znaczeniem ruchliwości dla zdolności P482 do kolonizacji tych dwóch roślin, czy też raczej to stan fizjologiczny pomidora, z którego pobrano w naszym badaniu próbki eksudatów, spowodował, że ekspresja genów związanych z ruchliwością była dla P482 niekorzystna.**

### Podsumowanie

Zrozumienie interakcji roślina-drobnoustroje jest kluczowe do pełnego wykorzystania potencjału drobnoustrojów do wspierania zdrowia roślin. Badanie tych interakcji w bardzo złożonych, naturalnych systemach, pozostaje wyzwaniem technicznym. Dlatego uproszczone układy eksperymentalne, choć obarczone wadami, poprzez izolację wybranych interakcji są nadal pomocne w uzyskiwaniu danych naukowych (Mavrodi i in., 2021, Yi i in., 2017). W ramach przedstawianych badań zidentyfikowaliśmy aspekty metabolizmu *P. donghuensis* P482, które w różny sposób modulowane są w obecności eksudatów korzeniowych dwóch różnych gospodarzy roślinnych: pomidora i kukurydzy. Skład badanych eksudatów, a co za tym idzie, ich wpływ na P482, najprawdopodobniej wynika zarówno z genotypu badanych roślin, jak i ich stanu fizjologicznego. **Na podstawie wykonanych analiz uważam, że niniejsze aspekty metabolizmu: katabolizm aminokwasów rozgałęzionych, oporność na tlenek azotu, elastyczność w zakresie łańcucha oddechowego, synteza metioniny i selektywna aktywacja pomp *efflux* typu RND, zasługują na szczególną uwagę pod kątem ich roli w zapewnieniu bakteriom *Pseudomonas* zdolności do kolonizacji różnorodnych gospodarzy roślinnych, jak i pozostania w obrębie mikroflory danego gospodarza pomimo zachodzących w roślinie zmian fizjologicznych.**

Uważam, że w temacie formowania składu mikrobiomu wiele uwagi poświęca się pozytywnym interakcjom pomiędzy rośliną a drobnoustrojami. W tym ujęciu roślina, poprzez eksudaty, zapewnia mikroorganizmom źródła węgla i umożliwia danej grupie mikroorganizmów „wygodne życie”, stąd są one niejako do niej „przyciągane”. W opozycji do tego trendu, większość szlaków specyficznych dla gospodarza roślinnego, które opisaliśmy w P482, jest związana z odpornością na stres. Pomimo tego pokazaliśmy, że w czasie wzrostu *in vitro* dodatek eksudatów stymulował, a nie hamował wzrost P482. **Sądzę, że zróżnicowana odporność niektórych drobnoustrojów stowarzyszonych z roślinami na określone czynniki stresogenne może prowadzić do zmian w składzie populacjach drobnoustrojów związanych z roślinami, szczególnie u roślin z aktywowanymi systemami obronnymi.** W analogii do ludzkich interakcji społecznych, to właśnie tolerancja na negatywne zachowania naszych współlokatorów może mieć kluczowe znaczenie dla faktu, czy damy radę pozostać członkiem danej społeczności.

W zakresie mechanizmów interakcji roślina-mikroorganizmy pozostaje wiele niewiadomych. **Otrzymane przeze mnie i współpracowników wyniki dają ogromny potencjał do podjęcia nowych inicjatyw badawczych, skupiających się w sposób bardziej szczegółowy na zidentyfikowanych aspektach metabolizmu P482, zaangażowanych w interakcję z roślinami.**

#### **4.4. Pozostałe osiągnięcia naukowe z okresu po uzyskaniu stopnia doktora**

Moja kariera naukowa jest silnie związana z Międzyuczelnianym Wydziałem Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku. Od roku obrony (2015) pracuję na Wydziale w różnych projektach naukowych jako **pracownik kontraktowy (zatrudnienia na czas określony), na różnych stanowiskach. Charakter mojego zatrudnienia odegrał istotną rolę w kształtowaniu mojego dorobku z ostatnich 8 lat** (okres od obrony bez odjęcia okresów oficjalnych przerw w pracy naukowej). Zaletą takiego zatrudnienia była na pewno możliwość **zdobycia**

**różnorodnego doświadczenia naukowego dzięki pracy w więcej niż jednym zespole badawczym, a także doświadczenia administracyjno-organizacyjnego** (zatrudnienie w charakterze *lab manager'a*). Z drugiej strony mój dorobek może być uboższy w zakresie, w którym jest on budowany w ramach obowiązków przydzielanych pracownikom na stałych etatach uczelniach. Na gromadzenie przeze mnie dorobku naukowego wpłynął również fakt, że w **okresie kariery zawodowej dwukrotnie zostałam mamą – najpierw pod koniec doktoratu (2013), a potem ponownie w okresie po doktoracie (2020)**. Wiązało się to z typowymi okresami absencji i spowolnieniem w pracy naukowej.

Cztery prace doświadczone z pierwszym autorstwem, włączone przeze mnie do cyklu artykułów powiązanych tematycznie na potrzeby postępowania habilitacyjnego, stanowią wyraz jedynie części mojej aktywności naukowej po doktoracie. Wykazałam się w tym czasie także innymi osiągnięciami. W okresie po obronie zostałam również współautorem 7 opublikowanych prac doświadczalnych nieuwzględnionych w cyklu, w tym jednej powstałej jako rezultat odbycia przeze mnie stażu zagranicznego (opis w punkcie 5). Dodatkowo jestem współautorem rozdziału w książce oraz dwóch manuskryptów oczekujących na recenzje w docelowych czasopismach. Jestem także w gronie twórców 3 opatentowanych wynalazków.

Na szczególną uwagę wśród prac spoza cyklu zasługują moim zdaniem trzy prace dotyczące **mieszaniny pięciu bakterii antagonistycznych, nazwanych przez nas „Wielka Piątka”, efektywnie hamująca symptomy mokrej zgnilizny powodowane przez *Pectobacterium* i *Dickeya* spp. (szczepy SRP) na bulwach ziemniaka w warunkach przechowywania**. Badania miały charakter aplikacyjny. Wraz ze współpracownikami przetestowałam zestaw losowo skomponowanych mieszanin mikroorganizmów wykazujących różnego typu antagonizm względem SRP, a następnie metodą testowania względem kilku gatunków patogenów z tej grupy wyłoniliśmy skuteczną mieszaninę ochronną **(Krzyżanowska i in., 2019b)(publikacja spoza cyklu)**. Przyjęta strategia komponowania i testowania konsorcjum do wykorzystania w biologicznej ochronie roślin była na ten czas nowatorska. Ponadto, w ramach przeprowadzonych badań, wraz ze współpracownikami opracowałam kilka **formulacji biopreparatu** na bazie ww. konsorcjum. Następnie trwałość półkowa preparatów była testowana w okresie 12 miesięcy. **Dla najbardziej obiecującej formulacji dowiedliśmy, w półrocznym teście przechowalniczym przeprowadzonym w skali półtechnicznej, że preparat jest skuteczny w zastosowaniu do ochrony bulw ziemniaka przed SRP (Maciag i in., 2020)(publikacja spoza cyklu)**. Dodatkowo przeprowadziliśmy sekwencjonowanie genomów szczepów opracowanego konsorcjum „Wielka Piątka” i **poprzez analizy genomiczne typu *data mining* wykazaliśmy, że w genomach badanych bakterii nie ma genów znanych z produkcji toksyn, które mogłyby kolidować z zastosowaniem w/w konsorcjum w ochronie bulw ziemniaka (Maciag i in., 2022)(publikacja spoza cyklu)**. Rezultatem omawianych badań są trzy publikacje naukowe. W dwóch z nich jestem drugim autorem, w jednej zaś pierwszym autorem na prawach równorzędnych z pierwszym autorem, panem Tomaszem Maciągiem. Wspomniane prace zostały wykorzystane przez pana Maciągę w postępowaniu o nadanie stopnia doktora. Poza publikacjami rezultatem wyżej wspomnianych badań dotyczących „Wielkiej Piątki” są **3 przyznane patenty, w tym jeden europejski**. Dodatkowo jestem współtwórcą jednego wynalazku z zakresu prezerwacji komórek mikroorganizmów (odczynnik zwiększający przeżywalność podczas liofilizacji)

(zgłoszenie patentowe P.428215). Poniżej znajduje się szczegółowy opis mojego wkładu w trzy w/w publikacje oraz lista przyznanych patentów. W wymienionych patentach wszyscy twórcy mają zadeklarowany równy wkład w powstanie wynalazków objętych ochroną.

- **Krzyżanowska D.M.\***, Maciąg T\*, Siwińska J., Krychowiak M., Jafra S., Czajkowski R. Compatible mixture of bacterial antagonists developed to protect potato tubers from soft rot caused by *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. **Plant Disease (2019)** (IF 3,809; MEiN 70)

**Mój wkład w publikację:** uczestniczyłam w pracach koncepcyjnych, brałam udział we wszystkich opisanych w pracy eksperymentach (w tym testy patogeniczności na dużą skalę, przeprowadzenie których wymagało kooperacji 2-3 osób), uczestniczyłam w opracowaniu danych, przygotowaniu rysunków, pisaniu manuskryptu i przygotowaniu odpowiedzi do recenzentów.

\*równy wkład współautorów

- Maciąg, T., **Krzyżanowska, D.M.**, Jafra, S., Siwińska J. Czajkowski R. **The Great Five— an artificial bacterial consortium with antagonistic activity towards *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp.: formulation, shelf life, and the ability to prevent soft rot of potato in storage. *Applied Microbiology and Biotechnology (2020)* (IF 4,81, MEiN 100)**

**Mój wkład w publikację:** uczestniczyłam w opracowaniu metodologii prowadzenia eksperymentów, brałam udział we wszystkich opisanych pracach eksperymentalnych, brałam udział w pisaniu manuskryptu oraz w przygotowaniu rysunków.

- Maciąg T., **Krzyżanowska D. M.**, Rąbalski Ł., Jafra S., Czajkowski R. **Complete genome sequences of five Gram-negative bacterial strains comprising synthetic bacterial consortium "The Great Five" with antagonistic activity against plant pathogenic *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions (2022)* (IF 3,5; MEiN 140)**

**Mój wkład w publikację:** uczestniczyłam w konceptualizacji oraz redakcji manuskryptu.

#### Patent 1

Numer	Data Udzielenia	Kraj zgłoszenia
EP3495510	21.07.2021	Europejski Urząd Patentowy

Nowe bakterie antagonistyczne *Serratia plymuthica* szczep A294, *Enterobacter amnigenus* szczep A167, *Rahnella aquatilis* szczep H145, *Serratia rubidaea* szczepy H440, *Serratia rubidaea* szczep H469, ich mieszanina, zastosowanie i sposób nanoszenia na materiał roślinny

Czajkowski Robert, Jafra Sylwia, **Krzyżanowska Dorota**, Maciąg Tomasz, Siwińska Joanna

**Patent 2**

Numer	Data Udzielenia	Kraj zgłoszenia
238148	12.07.2021	Polska

Biopreparaty do ochrony roślin przed zakażeniem bakteryjnym

Czajkowski Robert, **Krzyżanowska Dorota**, Maciąg Tomasz, Jafra Sylwia

**Patent 3**

Numer	Data Udzielenia	Kraj zgłoszenia
236445	11.01.2021	Polska

Mieszanina szczepów bakterii antagonistycznych *Serratia plymuthica* szczep A294, *Enterobacter amnigenus* szczep A167, *Rahnella aquatilis* szczep H145, *Serratia rubidaea* szczepy H440, *Serratia rubidaea* szczep H469 i zastosowanie do ochrony lub leczenia zakażeń roślin powodowanych przez bakterie *Pectobacterium* i *Dickeya*

Czajkowski Robert, **Krzyżanowska Dorota**, Maciąg Tomasz, Jafra Sylwia, Siwińska Joanna

Dodatkowo, w okresie badań nad w/w mieszaniną (konsorcjum) mikroorganizmów „Wielka piątka”, zostałam współautorem rozdziału w monografii naukowej. Tematem rozdziału jest wykorzystanie konsorcjów mikroorganizmów w biologicznej ochronie roślin przed chorobami.

- Robert Czajkowski, Tomasz Maciąg, **Dorota M. Krzyżanowska**, Sylwia Jafra; Tytuł rozdziału: **Biological Control Based on Microbial Consortia–From Theory to Commercial Products**; Tytuł książki: *How Research Can Stimulate the Development of Commercial Biological Control Against Plant Diseases*; **2020**, str. 183-202, Springer, Cham

**Mój wkład w napisanie rozdziału:**

*Opisanie różnych strategii doboru mikroorganizmów podczas tworzenia konsorcjów mikroorganizmów do zastosowania w biologicznej ochronie roślin*

W ramach mojej aktywności po doktoracie zostałam także współautorką publikacji dotyczącej metody przeznaczonej do określania zdolności bakterii do tworzenia biofilmu w cewnikach i innych rurkach o zastosowaniu medycznym (Borowicz i in., 2023)([publikacja spoza cyklu](#)), a także będącego w recenzji manuskryptu opisującego rezultaty badań nad zależnością pomiędzy produkcją 7-HT a produkcją sideroforu piowerdyny u szczepu P482 i tym, jakie znaczenie ma ta zależność dla aktywności przeciwdrobnoustrojowej P482 w różnych typach podłoży wzrostowych (Jafra i in., [manuskrypt w recenzji](#)).



- Borowicz M., **Krzyżanowska D.M.**, Jafra S.. **Crystal violet-based assay for the assessment of bacterial biofilm formation in medical tubing.** *Journal of Microbiological Methods* (2023) (IF 2,2; MEiN 70)

**Mój wkład w publikację:** uczestniczyłam w pisaniu manuskryptu oraz pracy koncepcyjnej nad jego zawartością. Przygotowałam jeden z rysunków oraz brałam udział w ustaleniu ostatecznego wyglądu pozostałych.

- Jafra S., Jabłońska M., Maciąg T., Matuszewska M., Borowicz M., Prusiński M., Żmudzisińska W., Theil M., Czaplewska P., **Krzyżanowska D.M.**, Czajkowski R.. **An iron fist in a velvet glove: The cooperation of a novel pyoverdine from *Pseudomonas donghuensis* P482 (PVDP482) with 7-hydroxytropolone is pivotal for its antibacterial activity (w recenzji)**

**Mój wkład w manuskrypt:** opisanie genów kodujących syntezę piowerdyny u szczepu P482, wykonanie oznaczenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej szczepu P482 i jego mutantów w podłożu CAA przy różnej dostępności żelaza

Aktualnie poszerzam swoje zainteresowania badawcze o nową tematykę. Z uwagi na zmianę grupy badawczej, w której jestem zatrudniona, miałam możliwość zostać współautorem publikacji dotyczącej genów warunkujących oporność *Dickeya solani* 2222 (szczep SRP) na infekcję fagiem  $\phi$ D5 oraz kosztów ekologicznych tej oporności (Sokolova i in., 2023) ([publikacja spoza cyklu](#)). Zaangażowałam się również w badania dotyczące tailocin – wysokocząsteczkowych bakteriocyn o budowie przypominającej ogonki fagowe – produkowanych przez patogeny SRP. W ramach tych ostatnich badań powstał manuskrypt ([w recenzji](#)), którego jestem współautorem, a którego pierwszym autorem jest pan Marcin Borowicz, którego pracy doktorskiej jestem kopromotorem.

- Sokolova, D., Smolarska, A., Bartnik, P., Rąbalski L., Kosiński M., Narajczyk M., **Krzyżanowska D.M.**, Rajewska M., Mruk I., Czaplewska P., Jafra S., Czajkowski R. **Spontaneous mutations in *hlyD* and *tuf* genes result in resistance of *Dickeya solani* IPO 2222 to phage  $\phi$ D5 but cause decreased bacterial fitness and virulence *in planta*.** *Scientific Reports* (2023) 13, 7534. DOI: 10.1038/s41598-023-34803-7 (IF 4.6; MEiN 140)

**Mój wkład w publikację:** przeprowadziłam eksperymenty w zakresie izolacji i rozdziału lipopolisacharydów oraz przygotowałam rysunek z wynikami ww. eksperymentu.

- Borowicz M., **Krzyżanowska D.M.**, Narajczyk M., Sobolewska M., Rajewska M., Czaplewska P., Węgrzyn K., Czajkowski R.; **Soft rot pathogen *Dickeya dadantii* 3937 produces tailocins resembling the tails of *Enterobacteria* bacteriophage P2; (w recenzji; dostępny w bioRxiv)**

**Mój wkład w manuskrypt:** wykonanie analizy porównawczej pomiędzy klastrem kodującym tailocynę a innymi dostępnymi sekwencjami w bazie danych, w tym genomem bakteriofaga P2, przygotowanie wybranych rysunków i udział w edycji pozostałych, udział w pisaniu manuskryptu.

W nadchodzących latach planuję rozwijać moja karierę naukową, w tym m.in. dalej angażować się w prace nad tailocynami, opublikować wyniki dotyczące podłoża molekularnego braku zdolności szczepu *O. rhizosphere* PR17 do inaktywacji AHL (kontynuacja wątku badawczego z PUBLIKACJI 1), a także rozpocząć badania szczegółowe nad aspektami metabolizmu zaangażowanego u *P. donghuensis* P482 w odpowiedzi na gospodarza roślinnego (kontynuacja wątku badawczego z PUBLIKACJI 4) – w tym ostatnim przypadku preferencyjnie po uzyskaniu przeze mnie osobnego źródła finansowania dla zaplanowanych badań. Do wnioskowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego motywuje mnie m.in. idąca za tym możliwość sprawowania samodzielnej opieki nad doktorantami, a także możliwość bardziej czynnego udziału w funkcjonowaniu jednostki macierzystej dzięki członkostwu w Radzie Wydziału.

#### **5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej**

W toku kariery zawodowej odbyłam **3 staże w zagranicznych ośrodkach naukowych**. Każdy ze staży odbyłam w innej jednostce, **za każdym razem angażując się w prace naukowe w tematyce goszczącej mnie grupy**.

W 2008 roku, dzięki inicjatywie ERASMUS, odbyłam **3-miesięczny staż w Plant Research International (obecnie Wageningen Plant Research, WUR) w zespole Dr Jana van der Wolfa**. W trakcie stażu brałam udział w badaniach nad izolacją i identyfikacją bakteryjnych patogenów roślinnych z grupy SRP. Staż ten był dla mnie ważny z perspektywy ugruntowania moich zainteresowań badawczych, nauki użytecznych metod, a także nawiązanie profesjonalnych relacji, które zaowocowały w późniejszych latach.

Pod koniec 2014 roku, na kilka miesięcy przed obroną doktoratu, odbyłam **3-miesięczny staż w grupie dr Paoliny Garbeva w Nederlands Instituut voor Ecologie (NIOO-KNAW)**. Środki na sfinansowanie wyjazdu pozyskałam z Narodowego Centrum Nauki, będąc laureatką stypendium ETIUDA1 (UMO-2013/08/T/NZ9/01049). W ramach stażu brałam udział w **badaniach nad związkami lotnymi (ang. *volatile organic compounds*, VOCs) produkowanymi przez bakterie z rodzaju *Collimonas* oraz nad wpływem tych związków na mikroorganizmy potencjalnie koegzystujące (konkurujące) z *Collimonas* spp. w środowisku glebowym**. W trakcie stażu brałam również udział w licznych seminariach dot. badań prowadzonych w NIOO-KNAW.

**Wymiernym rezultatem w/w stażu jest moje współautorstwo w publikacji ([spoza cyklu](#)):**

Song C., Schmidt R., de Jager V., **Krzyżanowska D.**, Jongedijk E., Cankar K., Beekwilder J., van Veen A., de Boer W., van Veen J., Garbeva P.: **Exploring the genomic traits of fungus-feeding bacterial genus *Collimonas*, *BMC Genomics***, vol. 16, 2015, s. 1-17 (IF 3,867)

**Mój wkład w publikację:** utworzenie konstruktów plazmidowych umożliwiających heterologiczną ekspresję syntetazy terpenów z *Collimonas* sp. *Ter91* oraz przeprowadzenie testu aktywności przeciwbakteryjnej puli związków lotnych (VOCs). Opisałam także wyniki przeprowadzonych doświadczeń na potrzeby manuskryptu.

W 2018 roku odbyłam 1-miesięczny staż w **Centro Nacional de Biotechnologia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC)**, Madryt, Hiszpania. **Środki na wyjazd pozyskałam z Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.** Pochodziły one z dodatkowej dotacji wyjazdowej, którą mogli otrzymać laureaci przyznanego mi w drodze konkursowej stypendium **START (edycja 2017)**. W ramach wyjazdu uczestniczyłam w badaniach prowadzonych w **Laboratorium Biologii Syntetycznej, kierowanego przez Prof. Victora de Lorenzo**. Badania dotyczyły wykorzystania systemu opartego na **CRISPR/Cas9** do wprowadzania mutacji u bakterii *Pseudomonas putida* szczep **KT2440** oraz szczepów pochodnych (tj. mutantów szczepu **KT2440**). Uczestniczyłam także w badaniach mających na celu przybliżenie mechanizmu umożliwiającego działanie ww. systemu u badanej bakterii. Poza prowadzeniem eksperymentów brałam udział w seminariach grupy goszczącej, w tym wygłosiłam własną prezentację dot. badań prowadzonych przeze mnie na **MWB UG-GUMed**. **Jednym z rezultatów tego stażu było pozyskanie przeze mnie wielu przydatnych wektorów i szczepów z bazy SEVA** (Standard European Vector Architecture), które zostały włączone do kolekcji szczepów Zakładu Mikrobiologii Roślin. Zostałam również **polecona przez profesora de Lorenzo na jednego z uczestników projektu europejskiego w ramach COST Action**. Wniosek o finansowanie projektu pt. **Bringing Synthetic Biology standards to end-users** (akronim **STAND\_HARD**) został złożony w 2020 roku przez Mireię Alonso-Monasterio Fernández. Niestety złożony projekt nie uzyskał finansowania.

Dodatkowo w trakcie kariery zawodowej odbyłam **5-dniową wizytę studyjną** w Institute of Plant Sciences, Ornamental Horticulture Dep. ARO, The Volcani Center, Bet-Dagan (Izrael), w grupie Dr Iris Yedidia (rok **2015**).

Posiadam również w swoim dorobku jednomiesięczny **staż krajowy w komercyjnym laboratorium diagnostycznym** (Bruss, grupa **ALAB**) (rok **2007**).

## 6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

### 6.1. Aktywność dydaktyczna

W trakcie kariery zawodowej nie byłam zatrudniona na stałej pozycji badawczo-dydaktycznej ani dydaktycznej. Kontraktowy charakter mojego zatrudnienia sprawił, że **prowadzenie zajęć ze studentami nie było dla mnie obligatoryjne. Uważam jednak, że dzielenie się wiedzą z młodymi ludźmi i wspomaganie ich na drodze do indywidualnego rozwoju to ważny obszar działalności naukowca.** Konieczność przygotowania zajęć stanowi również dobrą okazję do usystematyzowania własnej wiedzy. Z uwagi na te przesłanki, gdy pojawiała się taka możliwość, zawsze podejmowałam się realizacji zadań o charakterze dydaktycznym, czy to na podstawie oficjalnych zleceń czy też w ramach mniej sformalizowanych pracowni indywidualnych dla zainteresowanych studentów. Dzięki temu **pomimo braku obowiązku dydaktycznego udało mi się zgromadzić dorobek w tym zakresie obejmujący szeroki wachlarz aktywności, od prowadzenia zajęć ujętych w programie studiów na kierunku „Biotechnologia”, poprzez kierowanie pracami studentów w ramach praktyk indywidualnych, po promotorstwo prac licencjackich, magisterskich i ko-promotorstwo realizowanego obecnie doktoratu.** Jestem również współautorem skryptu do ćwiczeń.

#### Opieka nad dyplomantami i studentami

- Od marca 2023 roku – promotor pomocniczy doktoratu pana mgr Marcina Borowicza
- Promotor dwóch doświadczalnych prac magisterskich: pana Pawła Gutowskiego (2017) oraz pana Pawła Płaszewskiego (2019)
- Promotor dwóch prac licencjackich typu „projekt badawczy”: pani Anny Kocięba oraz pana Marcina Borowicza (obydwie w 2020 r).
- Recenzentka pracy magisterskiej pani Darii Pośpiech (2016)
- Członek komisji na 5 egzaminach magisterskich, trzech w 2017 i dwóch w 2019 r.
- Osoba kierująca pracą studentów wykonujących pracownię indywidualną lub praktyki w laboratorium, w tym studentów z wymian międzynarodowych:
  - praktykantka z USA, pani Lilian Antunes, wakacje 2012
  - praktykantka z USA, pani Jackie Rocha, wakacje 2016
  - studenci pracujący w laboratorium w ramach pracowni rotacyjnej: pan Stijn De Moor i pani Aleksandra Jurkiewicz (rok akad. 2015/2016), panie Joanna Mancewicz, Alicja Januchowska i pan Patryk Mucha (rok akad. 2018/2019), pan Robert Burzyński (2019/2020)
  - magistrantka Nathalie Lammens, wykonującą pracę magisterską łączoną pomiędzy Vrije Universiteit Brussel (Belgia) a Uniwersytetem Gdańskim (rok akad. 2016/2017)
  - student III roku I MSU na pracowni indywidualnej, pan Kamil Moskał, semestr letni 2018/2019

- student I MSU Politechniki Łódzkiej wykonujący praktyki wakacyjne (1 miesiąc), pan Bartosz Kopka (2019)
- studentka I MSU na pracowni indywidualnej, pani Joanna Klasa, początek roku 2020 – pracownia przerwana z uwagi na COVID19

### **Przedmioty nauczone w toku kariery zawodowej**

- Zajęcia laboratoryjne w ramach przedmiotu „Mikrobiologia przemysłowa” na kierunku Biotechnologia MWB UG i GUMed. Lata 2010-2013 (łącznie 205 h), rok akad. 2021/2022 (45 h)
- Proseminarium z przedmiotu „Biomolekuły – budowa, synteza i właściwości” na kierunku Biotechnologia MWB UG i GUMed. Rok akad. 2019/2020 (30 h)
- Seminarium i ćwiczenia z przedmiotu Podstawy Biotechnologii – Wprowadzenie, Sekcja: Organizmy modelowe i ich zastosowania w nauce, Zakres: bakterie. Rok akad. 2019/2020 (5 h)

*W roku akademickim 2023/2024 jestem przewidziana jako prowadzący ćwiczenia laboratoryjne, ćwiczenia audytoryjne oraz wykład w łącznym wymiarze 24 h.*

### **Współautor skryptu**

„Mikrobiologia przemysłowa – materiały do ćwiczeń” (2014). Praca zbiorowa pod redakcją Sylwii Jafra; współautorzy: Robert Czajkowski, Tomasz Maciąg, Marta Matuszewska, **Dorota Krzyżanowska**, Adam Ossowicki, Aleksandra Królicka, Magdalena Rajewska.

### **6.2. Aktywność popularyzująca naukę lub sztukę**

- Organizacja stanowiska zatytułowanego Fascynujące fakty z życia bakterii na XI Bałtyckim Festiwalu Nauki (2013)
- Udzielenie wywiadu pt. „Dobre bakterie ratują ziemniaki przed mokrą zgnilizną”, opublikowanego na portalu „Nauka w Polsce” (2017)
- Opieka nad uczennicą dwudziestego liceum ogólnokształcącego w Gdańsku w ramach Dnia Przedsiębiorczości (20.03.2019)

### **6.3. Aktywność organizacyjna**

- Przygotowanie wniosków o zamknięte użycie GMM kat. II dla Pracowni Biologicznej Ochrony Roślin oraz Zakładu Badania Związków Biologicznie Czynnych, a także jednego zgłoszenia dot. zamkniętego użycia GMM kat. I pod kątem projektu realizowanego przez studentów MWB UG i GUMed (konkurs iGEM)
- Wprowadzenie w Zakładzie Badania Związków Biologicznie Czynnych MWB UG i GUMed systemu FLUICS przeznaczonego do profesjonalnego zarządzania zasobami laboratoryjnymi, umożliwiającego katalogowanie i łatwą lokalizację odczynników oraz próbek, w tym z użyciem aplikacji mobilnej

- Prowadzenie szkoleń stanowiskowych dla studentów zaczynających praktykę w laboratorium i prowadzenie stosownej dokumentacji (BHP)
- Dokonywanie zamówień i przygotowanie dokumentacji przetargowych na potrzeby realizacji wybranych projektów badawczych
- Koordynowanie czynności serwisowych/napraw dla wybranych sprzętów będących na stanie Instytutu Biotechnologii

**7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**

**7.1. Nagrody**

- **Nagroda naukowa zespołowa I stopnia** przyznana przez **Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego** za badania nad biologią Laseczki siennej i jej praktycznym wykorzystaniem (2014)

**7.2. Stypendia**

- **Stypendium START** przyznane w drodze konkursu przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej (2017). Dodatkowo przyznano środki na 1-miesięczny staż w Hiszpanii.
- Roczne **stypendium ETIUDA1 (UMO-2013/08/T/NZ9/01049)** przyznawane przez Narodowe Centrum Nauki (2013/2014). Poza stypendium finansowany był 3-miesięczny staż w Holandii.
- **Stypendium Pomorskiej Specjalnej Strefy Ekonomicznej (PSSE)**, przyznane w drodze konkursu na podstawie wniosków złożonych w ramach V edycji programu InnoDoktorant (2013).
- **Roczne stypendium w ramach projektu „Kształcimy najlepszych – kompleksowy program rozwoju doktorantów, młodych doktorów i akademickiej kadry dydaktycznej Uniwersytetu Gdańskiego”**. Przyznane w drodze konkursu. Projekt finansowany z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki (2011/2012).
- Roczne **stypendium z tzw. "dotacji projakościowej"**, przyznawane **grupie najlepszych doktorantów** realizujących projekty doktorskie na MWB-UG i GUMed (lata 2013/2014, 2012/2013, 2011/2012).
- Roczne **stypendium naukowe dla najlepszych doktorantów SD Chemii i Biochemii** przy Wydziale Chemii UG (lata 2014/2015, 2013/2014, 2012/2013, 2010/2011).

.....  
(podpis wnioskodawcy)

**Bibliografia**

- ÆVARSSON, A., SEGER, K., TURLEY, S., SOKATCH, J. R. & HOL, W. G. J. 1999. Crystal structure of 2-oxoisovalerate and dehydrogenase and the architecture of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes. *Nature Structural Biology*, 6, 785-792.
- AGARAS, B. C., IRIARTE, A. & VALVERDE, C. F. 2018. Genomic insights into the broad antifungal activity, plant-probiotic properties, and their regulation, in *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6. *PLoS ONE*, 13, e0194088-e0194088.
- AHKAMI, A. H., WHITE III, R. A., HANDAKUMBURA, P. P. & JANSSON, C. 2017. Rhizosphere engineering: enhancing sustainable plant ecosystem productivity. *Rhizosphere*, 3, 233-243.
- AHN, S., JUNG, J., JANG, I.-A., MADSEN, E. L. & PARK, W. 2016. Role of glyoxylate shunt in oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 11928-11938.
- ALLEN, N. E., ALBORN, W. E., HOBBS, J. N. & KIRST, H. A. 1982. 7-Hydroxytropolone: An inhibitor of aminoglycoside-2"-O-adenylyltransferase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22, 824-831.
- ALTSCHUL, S. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- ANDERSEN, C. L., JENSEN, J. L. & ØRNTOFT, T. F. 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64, 5245-5250.
- ARAI, H. 2011. Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, 2, 103.
- AUJOULAT, F., ROMANO-BERTRAND, S., MASNOU, A., MARCHANDIN, H. & JUMAS-BILAK, E. 2014. Niches, population structure and genome reduction in *Ochrobactrum* intermedium: clues to technology-driven emergence of pathogens. *PLoS one*, 9, e83376.
- BEVER, J. D., PLATT, T. G. & MORTON, E. R. 2012. Microbial Population and Community Dynamics on Plant Roots and Their Feedbacks on Plant Communities. *Annual Review of Microbiology*, 66, 265-283.
- BLIN, K., MEDEMA, M. H., KAZEMPOUR, D., FISCHBACH, M. A., BREITLING, R., TAKANO, E. & WEBER, T. 2013. antiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic acids research*, 41, W204-12.
- BLIN, K., SHAW, S., KLOOSTERMAN, A. M., CHARLOP-POWERS, Z., VAN WEZEL, G. P., MEDEMA, MARNIX H. & WEBER, T. 2021. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*.
- BLOM, J., ALBAUM, S. P., DOPPMEIER, D., PÜHLER, A., VORHÖLTER, F.-J., ZAKRZEWSKI, M. & GOESMANN, A. 2009. EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC bioinformatics*, 10, 154-154.
- BOAK, E. N., KIROLOS, S., PAN, H., PIERSON, L. S., 3RD & PIERSON, E. A. 2022. The Type VI Secretion Systems in plant-beneficial bacteria modulate prokaryotic and eukaryotic interactions in the rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 13, 843092.
- BOROWICZ, M., KRZYŻANOWSKA, D. M. & JAFRA, S. 2023. Crystal violet-based assay for the assessment of bacterial biofilm formation in medical tubing. *Journal of Microbiological Methods*, 204, 106656.
- BOUFFAUD, M.-L., POIRIER, M.-A., MULLER, D. & MOËNNE-LOCCOZ, Y. 2014. Root microbiome relates to plant host evolution in maize and other Poaceae. *Environmental Microbiology*, 16, 2804-2814.



- BOWMAN, L. A., MCLEAN, S., POOLE, R. K. & FUKUTO, J. M. 2011. The diversity of microbial responses to nitric oxide and agents of nitrosative stress close cousins but not identical twins. *Adv Microb Physiol*, 59, 135-219.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J. & WITTEWER, C. T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611-622.
- CAPDEVILA, S., MARTINEZ-GRANERO, F. M., SANCHEZ-CONTRERAS, M., RIVILLA, R. & MARTIN, M. 2004. Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology-Sgm*, 150, 3889-3897.
- CARLOS GUIMARAES, L., BENEVIDES DE JESUS, L., VINICIUS CANARIO VIANA, M., SILVA, A., THIAGO JUCA RAMOS, R., DE CASTRO SOARES, S. & AZEVEDO, V. 2015. Inside the pan-genome-methods and software overview. *Current genomics*, 16, 245-252.
- CHAPARRO, J. M., BADRI, D. V. & VIVANCO, J. M. 2014. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J*, 8, 790-803.
- CORNELIS, P. 2010. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 1637-1645.
- COTTON, T. E. A., PÉTRACQ, P., CAMERON, D. D., MESELMANI, M. A., SCHWARZENBACHER, R., ROLFE, S. A. & TON, J. 2019. Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. *The ISME Journal*, 13, 1647-1658.
- CROUSILLES, A., DOLAN, S. K., BREAR, P., CHIRGADZE, D. Y. & WELCH, M. 2018. Gluconeogenic precursor availability regulates flux through the glyoxylate shunt in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 293, 14260-14269.
- CZAJKOWSKI, R. & JAFRA, S. 2009. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta biochimica Polonica*, 56, 1-16.
- CZAJKOWSKI, R., KRZYŻANOWSKA, D., KARCZEWSKA, J., ATKINSON, S., PRZYSOWA, J., LOJKOWSKA, E., WILLIAMS, P. & JAFRA, S. 2011a. Inactivation of AHLs by *Ochrobactrum* sp. A44 depends on the activity of a novel class of AHL acylase. *Environmental microbiology reports*, 3, 59-68.
- CZAJKOWSKI, R., PÉROMBELON, M. C. M., VAN VEEN, J. A. & VAN DER WOLF, J. M. 2011b. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology*, 60, 999-1013.
- D'AUTRÉAUX, B., TOUATI, D., BERSCH, B., LATOUR, J.-M. & MICHAUD-SORET, I. 2002. Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 16619-16624.
- DARLING, A. E., MAU, B. & PERNA, N. T. 2010. Progressivemaue: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE*, 5, e11147-e11147.
- DAVIS, K. M., KRUPP, J., CLARK, S. & ISBERG, R. R. 2019. Iron-Sulfur Cluster Repair Contributes to *Yersinia pseudotuberculosis* Survival within Deep Tissues. *Infect Immun*, 87.
- DEKKERS, L. C., BLOEMENDAAL, C. J. P., DE WEGER, L. A., WIJFFELMAN, C. A., SPAINK, H. P. & LUGTENBERG, B. J. J. 1998. A Two-Component System Plays an Important Role in the Root-Colonizing Ability of *Pseudomonas fluorescens* Strain WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 45-56.
- DELORENZO, D. M. & MOON, T. S. 2018. Selection of stable reference genes for RT-qPCR in *Rhodococcus opacus* PD630. *Scientific Reports*, 8, 6019-6019.
- DIRKSEN, P., MARSH, S. A., BRAKER, I., HEITLAND, N., WAGNER, S., NAKAD, R., MADER, S., PETERSEN, C., KOWALLIK, V., ROSENSTIEL, P., FÉLIX, M.-A. & SCHULENBURG, H.

2016. The native microbiome of the nematode *Caenorhabditis elegans*: gateway to a new host-microbiome model. *BMC Biology*, 14, 38-38.
- DROGUE, B., DORÉ, H., BORLAND, S., WISNIEWSKI-DYÉ, F. & PRIGENT-COMBARET, C. 2012. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Res Microbiol*, 163, 500-10.
- DZIEWIT, L. & BARTOSIK, D. 2015. Comparative analyses of extrachromosomal bacterial replicons, identification of chromids, and experimental evaluation of their indispensability. *Bacterial Pangenomics: Methods and Protocols*, 15-29.
- ELIAS, M. & TAWFIK, D. S. 2012. Divergence and convergence in enzyme evolution: parallel evolution of paraoxonases from quorum-quenching lactonases. *The Journal of biological chemistry*, 287, 11-20.
- FUQUA, W. C. & WINANS, S. C. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journal of bacteriology*, 176, 2796-806.
- GAO, J., XIE, G., PENG, F. & XIE, Z. 2015. *Pseudomonas donghuensis* sp. nov., exhibiting high-yields of siderophore. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107, 83-94.
- GAO, J., YU, X. & XIE, Z. 2012. Draft genome sequence of high-siderophore-yielding *Pseudomonas* sp. strain HYS. *Journal of bacteriology*, 194, 4121-4121.
- GIUFFRÈ, A., BORISOV, V. B., ARESE, M., SARTI, P. & FORTE, E. 2014. Cytochrome bd oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837, 1178-1187.
- GOMES, A. É. I., STUCHI, L. P., SIQUEIRA, N. M. G., HENRIQUE, J. B., VICENTINI, R., RIBEIRO, M. L., DARRIEUX, M. & FERRAZ, L. F. C. 2018. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Klebsiella pneumoniae* using Reverse Transcription Quantitative real-time PCR. *Scientific Reports*, 8, 9001-9001.
- GRANDCLÉMENT, C., TANNIÈRES, M., MORÉRA, S., DESSAUX, Y. & FAURE, D. 2016. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 86-116.
- GROSS, H. & LOPER, J. E. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural product reports*, 26, 1408-46.
- HA, S., SHIN, B. & PARK, W. 2018. Lack of glyoxylate shunt dysregulates iron homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)*, 164, 587-599.
- HAAS, D. & DÉFAGO, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews. Microbiology*, 3, 307-19.
- HAUDECOEUR, E., TANNIÈRES, M., CIROU, A., RAFFOUX, A., DESSAUX, Y. & FAURE, D. 2009. Different Regulation and Roles of Lactonases AiiB and AttM in *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 529-537.
- HAUSINGER, R. P., COLPAS, G. J. & SORIANO, A. 2001. FEATURES-Urease: A Paradigm for Protein-Assisted Metallocenter Assembly-Assembling the nickel active site involves several protein interacting to bind apoprotein, hydrolyze GTP, incorporate CO. *ASM News-American Society for Microbiology*, 67, 78-84.
- HOLMES, B., POPOFF, M., KIREDJIAN, M. & KERSTERS, K. 1988. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from Human Clinical Specimens and Previously Known as Group Vd. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38, 406-416.
- HOMMAIS, F., ZGHIDI-ABOUZID, O., OGER-DESFEUX, C., PINEAU-CHAPELLE, E., VAN GIJSEGEM, F., NASSER, W. & REVERCHON, S. 2011. lpxC and yafS are the Most Suitable Internal Controls to Normalize Real Time RT-qPCR Expression in the Phytopathogenic Bacteria *Dickeya dadantii*. *PLoS ONE*, 6, e20269-e20269.
- HÖRDT, A., LÓPEZ, M. G., MEIER-KOLTHOFF, J. P., SCHLEUNING, M., WEINHOLD, L.-M., TINDALL, B. J., GRONOW, S., KYRPIDES, N. C., WOYKE, T. & GÖKER, M. 2020. Analysis

- of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria. *Frontiers in microbiology*, 11, 468.
- HUANG, S., SHENG, P. & ZHANG, H. 2012. Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 2563-2577.
- IMAM, J., SINGH, P. K. & SHUKLA, P. 2016. Plant Microbe Interactions in Post Genomic Era: Perspectives and Applications. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- ISHIKAWA, T., ROMPIKUNTAL, P. K., LINDMARK, B., MILTON, D. L. & WAI, S. N. 2009. Quorum sensing regulation of the two hcp alleles in *Vibrio cholerae* O1 strains. *PloS one*, 4, e6734.
- JAFRA, S., PRZYSOWA, J., CZAJKOWSKI, R., MICHTA, A., GARBEVA, P. & VAN DER WOLF, J. M. 2006. Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone. *Canadian journal of microbiology*, 52, 1006-15.
- JAFRA, S. & VAN DER WOLF, J. M. 2004. Fast screening method for detection of acyl-HSL-degrading soil isolates. *Journal of microbiological methods*, 57, 415-20.
- JEON, J., KIM, J.-W., YONG, D., LEE, K. & CHONG, Y. 2012. Complete genome sequence of the bacteriophage YMC01/01/P52 PAE BP, which causes lysis of verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase-producing, carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Soc Microbiol*.
- JIAO, J., XIA, Y., ZHANG, Y., WU, X., LIU, C., FENG, J., ZHENG, X., SONG, S., BAI, T., SONG, C., WANG, M. & PANG, H. 2021. Phenylalanine 4-Hydroxylase Contributes to Endophytic Bacterium *Pseudomonas fluorescens*' Melatonin Biosynthesis. *Front Genet*, 12, 746392.
- KALUŽNA, M., KURAS, A. & PUŁAWSKA, J. 2017. Validation of reference genes for the normalization of the RT-qPCR gene expression of virulence genes of *Erwinia amylovora* in apple shoots. *Scientific Reports*, 7, 2034-2034.
- KÄMPFER, P., SESSITSCH, A., SCHLOTER, M., HUBER, B., BUSSE, H.-J. & SCHOLZ, H. C. 2008. *Ochrobactrum rhizosphaerae* sp. nov. and *Ochrobactrum thiophenivorans* sp. nov., isolated from the environment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58, 1426-31.
- KAMPFER, P., SESSITSCH, A., SCHLOTER, M., HUBER, B., BUSSE, H. J. & SCHOLZ, H. C. 2008. *Ochrobactrum rhizosphaerae* sp. nov. and *Ochrobactrum thiophenivorans* sp. nov., isolated from the environment. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 58, 1426-1431.
- KANEHISA, M., SATO, Y. & MORISHIMA, K. 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of Molecular Biology*, 428, 726-731.
- KHAN, S. R. & FARRAND, S. K. 2009. The BlcC (AttM) lactonase of *Agrobacterium tumefaciens* does not quench the quorum-sensing system that regulates Ti plasmid conjugative transfer. *Journal of bacteriology*, 191, 1320-9.
- KIRST, H. A., MARCONI, G. G., COUNTER, F. T., ENSMINGER, P. W., JONES, N. D., CHANEY, M. O., TOTH, J. E. & ALLEN, N. E. 1982. Synthesis and characterization of a novel inhibitor of an aminoglycoside-inactivating enzyme. *The Journal of Antibiotics*, 35, 1651-1657.
- KOHLER, T., EPP, S. F., CURTY, L. K. & PECHÈRE, J.-C. 1999. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 181, 6300-6305.
- KORTH, H., PULVERER, G., RÖMER, A. & BUDZIKIEWICZ, H. 1981. 7-Hydroxytropolon aus *Pseudomonas* sp.[1]/7-Hydroxy Tropolone from *Pseudomonas* sp.[1]. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 36, 728-729.

- KRZYŻANOWSKA, D. M., OBUCHOWSKI, M., BIKOWSKI, M., RYCHŁOWSKI, M. & JAFRA, S. 2012a. Colonization of potato rhizosphere by GFP-tagged *Bacillus subtilis* MB73/2, *Pseudomonas* sp. P482 and *Ochrobactrum* sp. A44 shown on large sections of roots using enrichment sample preparation and confocal laser scanning microscopy. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12, 17608-19.
- KRZYŻANOWSKA, D. M., OSSOWICKI, A. & JAFRA, S. 2014. Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain P482, a Tomato Rhizosphere Isolate with Broad-Spectrum Antimicrobial Activity. *Genome announcements*, 2.
- KRZYŻANOWSKA, D. M., OSSOWICKI, A., RAJEWSKA, M., MACIĄG, T., JABŁONSKA, M., OBUCHOWSKI, M., HEEB, S. & JAFRA, S. 2016. When Genome-Based Approach Meets the "Old but Good": Revealing Genes Involved in the Antibacterial Activity of *Pseudomonas* sp. P482 against Soft Rot Pathogens. *Front Microbiol*, 7, 782.
- KRZYŻANOWSKA, D. M., POTRYKUS, M., GOLANOWSKA, M., POLONIS, K., GWIZDEK-WISNIEWSKA, A., LOJKOWSKA, E. & JAFRA, S. 2012b. Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. strains. *Journal of Plant Pathology*, 94, 367-378.
- KRZYŻANOWSKA, D. M., MACIĄG, T., OSSOWICKI, A., RAJEWSKA, M., KACZYŃSKI, Z., CZERWICKA, M., RĄBALSKI, Ł., CZAPLEWSKA, P. & JAFRA, S. 2019a. *Ochrobactrum quorumnocens* sp. nov., a quorum quenching bacterium from the potato rhizosphere, and comparative genome analysis with related type strains. *PLOS ONE*, 14, e0210874-e0210874.
- KRZYŻANOWSKA, D. M., MACIĄG, T., SIWINSKA, J., KRYCHOWIAK, M., JAFRA, S. & CZAJKOWSKI, R. 2019b. Compatible mixture of bacterial antagonists developed to protect potato tubers from soft rot caused by *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. *Plant Disease*, PDIS-10-18-1866-RE.
- KRZYŻANOWSKA, D. M., OSSOWICKI, A., RAJEWSKA, M., MACIĄG, T., JABŁONSKA, M., OBUCHOWSKI, M., HEEB, S. & JAFRA, S. 2016. When Genome-Based Approach Meets the "Old but Good": Revealing Genes Involved in the Antibacterial Activity of *Pseudomonas* sp. P482 against Soft Rot Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- KUDJORDJIE, E. N., SAPKOTA, R., STEFFENSEN, S. K., FOMSGAARD, I. S. & NICOLAISEN, M. 2019. Maize synthesized benzoxazinoids affect the host associated microbiome. *Microbiome*, 7, 1-17.
- KULKARNI, G., DHOTRE, D., DHARNE, M., SHETTY, S., CHOWDHURY, S., MISRA, V., MISRA, S., PATOLE, M. & SHOUCHE, Y. 2013. Draft genome of *Ochrobactrum intermedium* strain M86 isolated from non-ulcer dyspeptic individual from India. *Gut pathogens*, 5, 7-7.
- LANG, J. & FAURE, D. 2014. Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in plant science*, 5, 14-14.
- LEBUHN, M., ACHOUAK, W., SCHLOTER, M., BERGE, O., MEIER, H., BARAKAT, M., HARTMANN, A. & HEULIN, T. 2000. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 50, 2207-2223.
- LI, L., LI, Y.-Q., JIANG, Z., GAO, R., NIMAICHAND, S., DUAN, Y.-Q., EGAMBERDIEVA, D., CHEN, W. & LI, W.-J. 2016. *Ochrobactrum endophyticum* sp. nov., isolated from roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Archives of Microbiology*, 198, 171-179.
- LI, W., O'NEILL, K. R., HAFT, D. H., DICUCCIO, M., CHETVERNIN, V., BADRETDIN, A., COULOURIS, G., CHITSAZ, F., DERBYSHIRE, M. K., DURKIN, A. S., GONZALES, N. R., GWADZ, M., LANCZYCKI, C. J., SONG, J. S., THANKI, N., WANG, J., YAMASHITA, R. A., YANG, M., ZHENG, C., MARCHLER-BAUER, A. & THIBAUD-NISSEN, F. 2021. RefSeq: Expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation. *Nucleic Acids Research*, 49, D1020-D1028.

- LIU, Z., BESKROVNAYA, P., MELNYK, R. A., HOSSAIN, S. S., KHORASANI, S., O'SULLIVAN, L. R., WIESMANN, C. L., BUSH, J., RICHARD, J. D., HANEY, C. H. & LINDOW, S. E. 2018. A Genome-Wide Screen Identifies Genes in Rhizosphere-Associated *Pseudomonas* Required to Evade Plant Defenses. *mBio*, 9, e00433-18.
- LOPER, J. E., HASSAN, K. A., MAVRODI, D. V., DAVIS, E. W., LIM, C. K., SHAFFER, B. T., ELBOURNE, L. D. H., STOCKWELL, V. O., HARTNEY, S. L., BREAKWELL, K., HENKELS, M. D., TETU, S. G., RANGEL, L. I., KIDARSA, T. A., WILSON, N. L., VAN DE MORTEL, J. E., SONG, C., BLUMHAGEN, R., RADUNE, D., HOSTETLER, J. B., BRINKAC, L. M., DURKIN, A. S., KLUEPFEL, D. A., WECHTER, W. P., ANDERSON, A. J., KIM, Y. C., PIERSON, L. S., PIERSON, E. A., LINDOW, S. E., KOBAYASHI, D. Y., RAAIJMAKERS, J. M., WELLER, D. M., THOMASHOW, L. S., ALLEN, A. E. & PAULSEN, I. T. 2012. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS genetics*, 8, e1002784-e1002784.
- LUGTENBERG, B. & KAMILOVA, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-56.
- MA, Y., JIAO, J., FAN, X., SUN, H., ZHANG, Y., JIANG, J. & LIU, C. 2017. Endophytic Bacterium *Pseudomonas fluorescens* RG11 May Transform Tryptophan to Melatonin and Promote Endogenous Melatonin Levels in the Roots of Four Grape Cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- MACIAG, T., KRZYŻANOWSKA, D. M., JAFRA, S., SIWINSKA, J. & CZAJKOWSKI, R. 2020. The Great Five-an artificial bacterial consortium with antagonistic activity towards *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp.: formulation, shelf life, and the ability to prevent soft rot of potato in storage. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104, 4547-4561.
- MACIAG, T., KRZYŻANOWSKA, D. M., RABALSKI, L., JAFRA, S. & CZAJKOWSKI, R. 2022. Complete Genome Sequences of Five Gram-Negative Bacterial Strains Comprising Synthetic Bacterial Consortium "The Great Five" with Antagonistic Activity Against Plant-Pathogenic *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35, 711-714.
- MANSFIELD, J., GENIN, S., MAGORI, S., CITOVSKEY, V., SRIARIYANUM, M., RONALD, P., DOW, M., VERDIER, V., BEER, S. V., MACHDO, M. A., TOTH, I., SALMOND, G. & FOSTER, G. D. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 614-629.
- MARK, G. L., DOW, J. M., KIELY, P. D., HIGGINS, H., HAYNES, J., BAYSSE, C., ABBAS, A., FOLEY, T., FRANKS, A., MORRISSEY, J. & O'GARA, F. 2005. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 17454-9.
- MARTÍNEZ-GARCÍA, E., NIKEL, P. I., CHAVARRÍA, M. & DE LORENZO, V. 2014. The metabolic cost of flagellar motion in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol*, 16, 291-303.
- MARTÍNEZ-GINER, M., NOGUERA, J. L., BALCELLS, I., FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A. & PENA, R. N. 2013. Selection of Internal Control Genes for Real-Time Quantitative PCR in Ovary and Uterus of Sows across Pregnancy. *PLoS ONE*, 8, e66023-e66023.
- MAVRODI, O. V., MCWILLIAMS, J. R., PETER, J. O., BERIM, A., HASSAN, K. A., ELBOURNE, L. D. H., LETOURNEAU, M. K., GANG, D. R., PAULSEN, I. T., WELLER, D. M., THOMASHOW, L. S., FLYNT, A. S. & MAVRODI, D. V. 2021. Root Exudates Alter the Expression of Diverse Metabolic, Transport, Regulatory, and Stress Response Genes in Rhizosphere *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- MEI, G.-Y., YAN, X.-X., TURAK, A., LUO, Z.-Q. & ZHANG, L.-Q. 2010. AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-acetylhomoserine lactonase. *Applied and environmental microbiology*, 76, 4933-42.

- MERCADO-BLANCO, J. 2015. Pseudomonas Strains that Exert Biocontrol of Plant Pathogens. In: RAMOS, J.-L., GOLDBERG, J. B. & FILLoux, A. (eds.). Dordrecht: Springer Netherlands.
- MIELKO, K., JABŁOŃSKI, S., WOJTOWICZ, W., MILCZEWSKA, J., SANDS, D., LUKASZEWICZ, M. & MŁYNARZ, P. 2020. Possible metabolic switch between environmental and pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains: 1H NMR based metabolomics study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 188, 113369.
- MORENO, E., BLASCO, J. M., LETESSON, J. J., GORVEL, J. P. & MORIYÓN, I. 2022. Pathogenicity and its implications in taxonomy: the *Brucella* and *Ochrobactrum* case. *Pathogens*, 11, 377.
- MORENO, E., MIDDLEBROOK, E. A., ALTAMIRANO-SILVA, P., AL DAHOUK, S., ARAJ, G. F., ARCE-GORVEL, V., ARENAS-GAMBOA, Á., ARIZA, J., BARQUERO-CALVO, E. & BATELLI, G. 2023. If You're Not Confused, You're Not Paying Attention: *Ochrobactrum* Is Not *Brucella*. *Journal of Clinical Microbiology*, 61, e00438-23.
- MUZIO, F. M., AGARAS, B. C., MASI, M., TUZI, A., EVIDENTE, A. & VALVERDE, C. 2020. 7-hydroxytropolone is the main metabolite responsible for the fungal antagonism of *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6. *Environ Microbiol*, 22, 2550-2563.
- NADAL JIMENEZ, P., KOCH, G., PAPAIOANNOU, E., WAHJUDI, M., KRZESLAK, J., COENYE, T., COOL, R. H. & QUAX, W. J. 2010. Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. *Microbiology (Reading, England)*, 156, 49-59.
- NAMBA, Y., YOSHIZAWA, K., EJIMA, A., HAYASHI, T. & KANEDA, T. 1969. Coenzyme A- and nicotinamide adenine dinucleotide-dependent branched chain alpha-keto acid dehydrogenase. I. Purification and properties of the enzyme from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 244, 4437-47.
- NIKAIIDO, H. & TAKATSUKA, Y. 2009. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1794, 769-781.
- OSSOWICKI, A., JAFRA, S. & GARBEVA, P. 2017. The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PLOS ONE*, 12, e0174362-e0174362.
- PANDE, A., MUN, B.-G., LEE, D.-S., KHAN, M., LEE, G.-M., HUSSAIN, A. & YUN, B.-W. 2021. NO Network for Plant-Microbe Communication Underground: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- PAPENFORT, K. & BASSLER, B. L. 2016. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 576-588.
- PEIX, A., RAMÍREZ-BAHENA, M. H. & VELÁZQUEZ, E. 2018. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. Elsevier B.V.
- PERVEZ, M. T., ABBAS, S. H., MOUSTAFA, M. F., ASLAM, N. & SHAH, S. S. M. 2022. A comprehensive review of performance of next-generation sequencing platforms. *BioMed Research International*, 2022.
- PFAFFL, M. W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C. & NEUVIANS, T. P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26, 509-515.
- PHILIPPOT, L. 2005. Denitrification in pathogenic bacteria: for better or worst? *Trends Microbiol*, 13, 191-2.
- POHLNER, M., MARSHALL, I., SCHREIBER, L., CYPIONKA, H. & ENGELN, B. 2017. Draft Genome Sequence of *Pseudoruegeria* sp. SK021, a Representative of the Marine Roseobacter Group, Isolated from North Sea Sediment. *Genome announcements*, 5.
- POZO, C., RODELAS, B., DE LA ESCALERA, S. & GONZALEZ-LOPEZ, J. 2002. D,L-Hydantoinase activity of an *Ochrobactrum anthropi* strain. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 1028-1034.

- QIU, X. H., BAI, W. Q., ZHONG, Q. Z., LI, M., HE, F. Q. & LI, B. T. 2006. Isolation and characterization of a bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with methyl parathion mineralizing activity. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 986-994.
- QUESADA, A., GUIJO, M. I., MERCHÁN, F., BLÁZQUEZ, B., IGEÑO, M. I. & BLASCO, R. 2007. Essential role of cytochrome bd-related oxidase in cyanide resistance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Appl Environ Microbiol*, 73, 5118-24.
- RAMÍREZ-PUEBLA, S. T., SERVÍN-GARCIDUEÑAS, L. E., JIMÉNEZ-MARÍN, B., BOLAÑOS, L. M., ROSENBLUETH, M., MARTÍNEZ, J., ROGEL, M. A., ORMEÑO-ORRILLO, E. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2013. Gut and root microbiota commonalities. *Applied and environmental microbiology*, 79, 2-9.
- ROCHA, D. J. P., SANTOS, C. S. & PACHECO, L. G. C. 2015. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108, 685-693.
- ROCHE, D. M., BYERS, J. T., SMITH, D. S., GLANSDORP, F. G., SPRING, D. R. & WELCH, M. 2004. Communications blackout? Do N-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing? *Microbiology (Reading, England)*, 150, 2023-8.
- ROHMER, L., HOCQUET, D. & MILLER, S. I. 2011. Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Trends in microbiology*, 19, 341-8.
- ROSSEZ, Y., WOLFSON, E. B., HOLMES, A., GALLY, D. L. & HOLDEN, N. J. 2015. Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS pathogens*, 11, e1004483.
- SALAH UD-DIN, A. I. M. & ROUJEINIKOVA, A. 2017. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74, 3293-3303.
- SANGARI, F. J., SEOANE, A., RODRÍGUEZ, M. C., AGÜERO, J. & GARCÍA LOBO, J. M. 2007. Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infection and immunity*, 75, 774-80.
- SHI, R., HOU, W., WANG, Z. Q. & XU, X. 2021. Biogenesis of iron-sulfur clusters and their role in DNA metabolism. *Front Cell Dev Biol*, 9, 735678.
- SHIRO, Y. 2012. Structure and function of bacterial nitric oxide reductases: Nitric oxide reductase, anaerobic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817, 1907-1913.
- SILBY, M. W., WINSTANLEY, C., GODFREY, S. A. C., LEVY, S. B. & JACKSON, R. W. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, 35, 652-80.
- SILVERMAN, J. M., AUSTIN, L. S., HSU, F., HICKS, K. G., HOOD, R. D. & MOUGOUS, J. D. 2011. Separate inputs modulate phosphorylation-dependent and -independent type VI secretion activation. *Molecular Microbiology*, 82, 1277-1290.
- SOKOLOVA, D., SMOLARSKA, A., BARTNIK, P., RABALSKI, L., KOSINSKI, M., NARAJCZYK, M., KRZYŻANOWSKA, D. M., RAJEWSKA, M., MRUK, I. & CZAPLEWSKA, P. 2023. Spontaneous mutations in *hlyD* and *tuf* genes result in resistance of *Dickeya solani* IPO 2222 to phage  $\phi$ D5 but cause decreased bacterial fitness and virulence in planta. *Scientific Reports*, 13, 1-16.
- SPIRO, S. 2007. Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *FEMS Microbiol Rev*, 31, 193-211.
- STEELE, M. I., LORENZ, D., HATTER, K., PARK, A. & SOKATCH, J. R. 1992. Characterization of the *mmsAB* operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAO encoding methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 13585-13592.



- STERN, A. M., LIU, B., BAKKEN, L. R., SHAPLEIGH, J. P. & ZHU, J. 2013. A novel protein protects bacterial iron-dependent metabolism from nitric oxide. *J Bacteriol*, 195, 4702-8.
- STEVANIN, T. M., MOIR, J. W. & READ, R. C. 2005. Nitric oxide detoxification systems enhance survival of *Neisseria meningitidis* in human macrophages and in nasopharyngeal mucosa. *Infect Immun*, 73, 3322-9.
- SUMAYO, M., HAHM, M.-S. & GHIM, S.-Y. 2013. Determinants of Plant Growth-promoting *Ochrobactrum lupini* KUDC1013 Involved in Induction of Systemic Resistance against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Tobacco Leaves. *The Plant Pathology Journal*, 29, 174-181.
- SWIGONOVÁ, Z., MOHSEN, A. W. & VOCKLEY, J. 2009. Acyl-CoA dehydrogenases: Dynamic history of protein family evolution. *J Mol Evol*, 69, 176-93.
- TANNIÈRES, M., BEURY-CIROU, A., VIGOUROUX, A., MONDY, S., PELLISSIER, F., DESSAUX, Y. & FAURE, D. 2013. A Metagenomic Study Highlights Phylogenetic Proximity of Quorum-Quenching and Xenobiotic-Degrading Amidases of the AS-Family. *PLoS ONE*, 8, e65473-e65473.
- TAO, X., ZHANG, H., GAO, M., LI, M., ZHAO, T. & GUAN, X. 2020. *Pseudomonas* species isolated via high-throughput screening significantly protect cotton plants against verticillium wilt. *AMB Express*, 10, 1-12.
- TAYLOR, S., WAKEM, M., DIJKMAN, G., ALSARRAJ, M. & NGUYEN, M. 2010. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50, S1-S5.
- TEYSSIER, C., MARCHANDIN, H., JEAN-PIERRE, H., DIEGO, I., DARBAS, H., JEANNOT, J.-L., GOUBY, A. & JUMAS-BILAK, E. 2005. Molecular and phenotypic features for identification of the opportunistic pathogens *Ochrobactrum* spp. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 945-953.
- TOFFANIN, A., CADAHIA, E., IMPERIAL, J., RUIZ-ARGÜESO, T. & PALACIOS, J. 2002. Characterization of the urease gene cluster from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Archives of Microbiology*, 177, 290-298.
- TRUJILLO, M. E., WILLEMS, A., ABRIL, A., PLANCHUELO, A.-M., RIVAS, R., LUDEÑA, D., MATEOS, P. F., MARTÍNEZ-MOLINA, E. & VELÁZQUEZ, E. 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Applied and environmental microbiology*, 71, 1318-27.
- TÜNNERMANN, L., COLOU, J., NÄSHOLM, T. & GRATZ, R. 2022. To have or not to have: expression of amino acid transporters during pathogen infection. *Plant Molecular Biology*, 1-13.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3, RESEARCH0034-RESEARCH0034.
- VELASCO, J., ROMERO, C., LOPEZ-GONI, I., LEIVA, J., DIAZ, R. & MORIYON, I. 1998. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 759-768.
- VESGA, P., FLURY, P., VACHERON, J., KEEL, C., CROLL, D. & MAURHOFER, M. 2020. Transcriptome plasticity underlying plant root colonization and insect invasion by *Pseudomonas protegens*. *The ISME Journal*, 14, 2766-2782.
- VINE, C. E. & COLE, J. A. 2011. Unresolved sources, sinks, and pathways for the recovery of enteric bacteria from nitrosative stress. *FEMS Microbiol Lett*, 325, 99-107.

- VISCA, P., LEONI, L., WILSON, M. J. & LAMONT, I. L. 2002. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology*, 45, 1177-90.
- WAGNER, E. M. 2013. Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR. *Lipoproteins and Cardiovascular Disease: Methods and Protocols*, 19-45.
- WINSON, M. K., SWIFT, S., FISH, L., THROUP, J. P., JØRGENSEN, F., CHHABRA, S. R., BYCROFT, B. W., WILLIAMS, P. & STEWART, G. S. 1998. Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS microbiology letters*, 163, 185-192.
- WU, Z., PENG, W., HE, X., WANG, B., GAN, B. & ZHANG, X. 2016. Mushroom tumor: a new disease on *Flammulina velutipes* caused by *Ochrobactrum pseudogrignonense*. *FEMS Microbiology Letters*, 363, fnv226-fnv226.
- YI, Y., DE JONG, A., FRENZEL, E. & KUIPERS, O. P. 2017. Comparative Transcriptomics of *Bacillus mycoides* Strains in Response to Potato-Root Exudates Reveals Different Genetic Adaptation of Endophytic and Soil Isolates. *Front Microbiol*, 8, 1487.
- YOON, S. H., HA, S. M., KWON, S., LIM, J., KIM, Y., SEO, H. & CHUN, J. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 1613-1617.
- YU, X., CHEN, M., JIANG, Z., HU, Y. & XIE, Z. 2014. The two-component regulators GacS and GacA positively regulate a nonfluorescent siderophore through the Gac/Rsm signaling cascade in high-siderophore-yielding *Pseudomonas* sp. HYS. *Journal of bacteriology*, JB.01756-14-.
- ZENG, S., ZHANG, J., SUN, M., ZHANG, X., COOK, G. M. & ZHANG, T. 2021. Nitric Oxide-Dependent Electron Transport Chain Inhibition by the Cytochrome bc(1) Inhibitor and Pretomanid Combination Kills Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 65, e0095621.
- ZHOU, Y., LIANG, Y., LYNCH, K. H., DENNIS, J. J. & WISHART, D. S. 2011. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic acids research*, 39, W347-W352.
- ZURDO-PIÑEIRO, J. L., RIVAS, R., TRUJILLO, M. E., VIZCAÍNO, N., CARRASCO, J. A., CHAMBER, M., PALOMARES, A., MATEOS, P. F., MARTÍNEZ-MOLINA, E. & VELÁZQUEZ, E. 2007. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57, 784-8.