

## Streszczenie

### **Wpływ wysokiego ciśnienia, jako czynnika stresowego, na zmiany zachodzące w polimorfizmie genetycznym i proteomie bakterii fermentacji mlekowej**

Wysokie ciśnienia hydrostatyczne (HHP ang. *High Hydrostatic Pressure*) są wykorzystywane przemysłowo do utrwalania produktów spożywczych oraz minimalizowania ilości drobnoustrojów. Bakterie kwasu mlekowego (LAB ang. *Lactic Acid Bacteria*), ze względu na zdolności adaptacyjne do różnych środowisk, stanowią bardzo ważną grupę mikroorganizmów o znaczeniu przemysłowym. Ponieważ LAB mogą stanowić grupę mikroorganizmów zarówno pożytecznych jak i psujących produkty spożywcze, poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za zdolności adaptacyjne i zachodzące w związku z tym zmiany w proteomie i genomie bakterii, jest niezwykle istotne.

Celem pracy było, ustalenie, czy wywołane przez wysokie ciśnienie hydrostatyczne zmiany na poziomie genetycznym i proteomicznym w bakteriach kwasu mlekowego, są związane z polimorfizmem wybranych genów odpowiedzi na stres HHP, oraz czy zmiany te są na tyle istotne, że mogą w konsekwencji skutkować odmienną identyfikacją tych bakterii.

W pracy wykorzystano szczepy bakterii kwasu mlekowego wyizolowane z produktów spożywczych. Klasyczną metodą posiewów płytkowych określono przeżywalność szczepów po działaniu HHP. Wykorzystując metody molekularne oparte na analizie sekwencji nukleotydowej genu *16S* rDNA i *pheS*, kodującego podjednostkę alfa syntazy fenyloalanylo-tRNA (Phe-tRNA), dokonano identyfikacji szczepów. Aby lepiej zrozumieć mechanizm odpowiedzi na stres HHP, do dalszych analiz wybrano trzy geny uczestniczące w tym procesie (*dnaK*, *ctsR*, *hrcA*).

Następnie, dokonano analizy wpływu HHP na zmiany w proteomie badanych szczepów LAB. Wywołane przez HHP zmiany w profilach widm mas białek, mogą bezpośrednio wpływać na różnicowanie i odmienną identyfikację szczepów metodami opartymi na analizie białek, takich jak MALDI-TOF MS (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*). Przeprowadzona analiza skupień (HCA ang. *Hierarchical Cluster Analysis*) oraz wielowymiarowego skalowania (MDS ang. *Multidimensional Scaling*) demonstrowały znaczące różnice między badanymi szczepami kontrolnymi i ciśnieniowanymi, co uniemożliwiło zgrupowanie bakterii ze względu na przynależność gatunkową lub podział na grupę kontrolną lub ciśnieniowaną.

W celu scharakteryzowania blisko spokrewnionych szczepów bakterii LAB, zastosowano porównanie metod różnicujących o różnej sile dyskryminującej, aby wybrać odpowiednie metody identyfikacji bakterii, co ma szczególne znaczenie dla blisko spokrewnionych szczepów *Lactobacillus* i może korelować ze zmianami w ich fenotypie. Wykazano, że w badanych szczepach LAB, gen *pheS* ma najwyższy stopień homologii (90-98%) i niską siłę dyskryminującą. Otrzymane metodą MALDI-TOF MS zróżnicowane wyniki identyfikacji niektórych szczepów, w porównaniu z wynikami analizy genomowej, opartej na genie *16S* rDNA, dowiodły, że w przypadku analizowanych szczepów, sekwencjonowanie *16S* rDNA było najbardziej wiarygodne i charakteryzowało się największą siłą

dyskryminacyjną spośród analizowanych metod. Stwierdzono, że znacznie większa ilość molekuł zaangażowanych w mechanizm odpowiedzi na HHP i wysoki poziom interakcji pomiędzy cząsteczkami *dnaK*, *ctsR* i *hrcA*, może również wpływać na wyniki identyfikacji oparte na analizie białek.

W trzecim etapie pracy określono wpływ HHP na ekspresję genów *dnaK*, *ctsR*, *hrcA*, gdzie zaindukowane w ekspresji genów zmiany, mogą prowadzić do rozregulowania procesów biologicznych LAB. Otrzymane wyniki wykazały zróżnicowany poziom ekspresji genów, a zaobserwowane różnice wynikające z działania ciśnienia, pozwoliły wyciągnąć wniosek, że badane szczepy zachowują żywotność, ale indukowane są zmiany na poziomie transkryptomu. Zmiany ekspresji *dnaK*, *ctsR*, *hrcA* skorelowano z polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (SNP ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) w tych genach, i określono możliwość oddziaływania pojedynczych mutacji nukleotydowych na funkcjonowanie mechanizmu odpowiedzi na stres i zdolności adaptacyjne bakterii w warunkach działania wysokiego ciśnienia. Wpływ HHP na różnice w rozkładzie efektów przystosowania oraz efekty przystosowania mutacji synonimicznych i niesynonimicznych są ważne dla określenia, które zmiany przyczynią się do adaptacji bakterii do danego środowiska. Uzyskane wyniki SNP miały charakter neutralny, a niski stosunek  $Ka/Ks$  (stosunek podstawień niesynonimicznych do podstawień synonimicznych) wskazywał, że mutacje niesynonimiczne w niewielkim stopniu oddziaływały na żywotność komórek. Jednocześnie, faworyzowanie różnych białek związanych ze zmianami środowiskowymi, może wynikać z reakcji mechanizmu adaptacyjnego. Mutacje synonimiczne i niesynonimiczne wynikające z przystosowania bakterii do zmian środowiska, są ważnym elementem mechanizmu odpowiedzi na stres.

Podsumowując, ustalenie wpływu HHP na stopień polimorfizmu, filogenezę i zmienność genomową i proteomiczną LAB, stanowi ważny problem badawczy ze względu na szerokie rozpowszechnienie tych bakterii i różnorodne ich zastosowanie w przemyśle. Zrozumienie mechanizmów adaptacyjnych LAB pozwoli na właściwe postępowanie z tymi bakteriami, zarówno w celach umożliwiających ich wykorzystanie w biotechnologii i medycynie, ale również tam, gdzie są one niepożądane ze względu na właściwości psujące produkty. Wskazane są dalsze badania nad zmiennością wynikającą z wpływu czynników zewnętrznych oraz analizy dalszych, możliwych dróg ewolucyjnych, szczególnie pod kątem zdolności adaptacyjnych do różnych środowisk. Badania nad mechanizmami adaptacyjnymi LAB na różne warunki stresowe, jak i ich potencjał w trakcie przetwarzania i przechowywania żywności, są bardzo ważne ze względu na określenie podatności na zmiany warunków technologicznych, które mogą mieć poważny wpływ, na jakość i bezpieczeństwo żywności. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wyraźnie pokazują, w jak zróżnicowany sposób LAB reagują na zmiany wywołane działaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Na podstawie przeprowadzonych badań określono, że HHP wpływa na struktury genetyczne i proteomiczne badanych bakterii.

Przeprowadzona analiza polimorfizmu SNP wybranych genów związanych ze stresem pozwoliła stwierdzić, że zaistniałe w wyniku działania HHP mutacje są neutralne i w niewielkim stopniu oddziałują na żywotność komórek.

Zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki badań znacząco podnoszą zakres wiedzy na temat wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na aspekty genetyczne i proteomiczne bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i ich mechanizmów adaptacyjnych. Mogą pomóc w lepszym zrozumieniu działania HHP, jako czynnika utrwalającego żywność, na bakterie kwasu mlekowego i ich zdolności adaptacyjne.

**Słowa kluczowe:** bakterie kwasu mlekowego (LAB), wysokie ciśnienie hydrostatyczne (HHP), polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP), MALDI-TOF MS, gen *dnaK*, *hrcA*, *ctsR*

/mgr inż. Joanna Bucka-Kolendo/