



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Volatile compounds from Actinobacteria as mediators of microbial interactions

Avalos Garcia, M.

Citation

Avalos Garcia, M. (2019, September 24). *Volatile compounds from Actinobacteria as mediators of microbial interactions*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/78556>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/78556>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/78556> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Avalos Garcia, M.

Title: Volatile compounds from Actinobacteria as mediators of microbial interactions

Issue Date: 2019-09-24

Micro-organismen in de bodem ondergaan vele complexe interacties. Ze concurreren om voedingsstoffen en ruimte, wat soms resulteert in de productie van moleculen met antimicrobiële activiteit. We zijn inmiddels gewend aan de vele oplosbare antibiotica die geproduceerd worden door micro-organismen, waarvan penicilline ongetwijfeld de bekendste is. Naast antibiotica produceren ze nog veel meer bioactieve natuurstoffen. Wat veel minder bekend is, is dat hieronder ook vele vluchtige verbindingen (*volatile compounds* in het Engels, afgekort VC's) vallen. VC's hebben een laag molecuulgewicht en dampdruk, waardoor ze gemakkelijk verdampen en door bijvoorbeeld grondporiën, water en lucht kunnen diffunderen. Bacteriën die tot de zogenaamde streptomyceten behoren tot de meest voorkomende bodembacteriën en zijn tevens de belangrijkste producenten van bioactieve stoffen, waaronder ook vele vluchtige verbindingen.

In dit proefschrift worden de diversiteit en functies bestudeerd van door *Streptomyces* geproduceerde VC's. De hier beschreven experimenten laten zien dat zelfs zeer kleine VC's als antibiotica kunnen fungeren wanneer ze maar in voldoende grote hoeveelheden worden geproduceerd. Eén van deze moleculen is ammoniak. Ammoniak wordt geproduceerd door de afbraak van het aminozuur glycine, wat vaak wordt geassocieerd met de exudaten van planten en daarmee ook bodemomgevingen. Mutanten die verstoord zijn in de afbraak van glycine kunnen geen grote hoeveelheden ammonia meer produceren en dus ook geen andere bacteriën doden. Dit is niet alleen het geval wanneer streptomyceten gegroeid worden op voedingsbodems, maar hetzelfde zien we als we ze in grond groeien. Vele centimeters boven de grond worden bacteriële groei van *Escherichia coli* nog geremd. Dit geeft aan dat ammoniak in de natuur daadwerkelijk als antibioticum kan functioneren. Het ligt voor de hand dat de productie van dit soort bioactieve stoffen ook een reactie in de getroffen bacteriën teweegbrengt, als een vorm van resistentie. Onze resultaten laten inderdaad zien dat *E. coli* reageert op hoge concentraties ammoniak en andere VC's door het aantal porines in de buitenmembraan te reduceren en zo de import van toxische stoffen in de cel te verminderen.

Streptomyceten produceren ook een breed scala aan terpenen en terpenoïden. Hoewel twee van deze moleculen (met name geosmin en 2-methylisoborneol) al tientallen jaren bekend zijn, blijft hun functie onbekend. Het vluchtige karakter van deze moleculen wijst erop dat ze een rol spelen in het moduleren van interspecies interacties op grote afstand. Dit is bijvoorbeeld bekend van plantenterpenen. Desondanks zijn er slechts enkele voorbeelden van bacteriën die deze moleculen gebruiken voor communicatiedoeleinden. De productie van grote hoeveelheden terpenen onder verschillende groeiomstandigheden wijst op hun mogelijke rol als intra- en of interspecies communicatiesignalen. Het werk in dit proefschrift toont aan dat deze moleculen niet essentieel zijn voor de groei en ontwikkeling van *Streptomyces*. In plaats daarvan beïnvloeden ze de ontwikkeling onder omstandigheden van hoge osmolariteit. Mutanten die geen geosmin en 2-methylisoborneolsynthase meer kunnen produceren vertonen een andere morfologie in vloeibare cultures, waarbij de typische pellet structuur van de mycelia wordt verbroken, wat resulteert in mycelia met een open structuur die makkelijk kunnen fragmenteren.

VC's is ook een rol toegedicht als afvalproducten of als een manier om van een overmaat aan koolstof af te komen. Wanneer de gasfase in vloeibare cultures van mutanten werd geanalyseerd, zagen we echter nauwelijks nog VC's. Er is weinig of niets bekend van hoe de productie van VC's wordt gecontroleerd, en het is dan ook belangrijk om de studie van VC's voort te zetten met het doel hun biosynthese, regulatiemechanismen en hun biologische functie beter te begrijpen. De experimenten beschreven in dit proefschrift laten een zeer interessant fenomeen zien, namelijk dat er een sterke toename is van zwavelhoudende VC's als dimethyldisulfide (DMDS) en dimethyl-trisulfide (DMTS) in mutanten die geen 2-methylisoborneol of de gerelateerde 2-methyleenbornaan en 2-methyl-2-bornene meer kunnen produceren. Deze verrassende koppeling tussen de biosynthese van terpenen en van zwavelhoudende VC's wijst op een mogelijk direct verband tussen deze totaal verschillende en niet-gerelateerde biosyntheseroutes, die nog niet eerder waren geconstateerd. Een hypothese die nader moet worden onderzocht is of de methyltransferase welke gecodeerd wordt door het gencluster voor 2-methylisoborneol (2-MIB) ook een rol speelt bij de methylering van

sulfiden, wat nodig is voor de vorming van DMDS en DMTS. Als er geen 2-MIB meer wordt gevormd, zou het enzym zich in plaats daarvan kunnen richten op de productie van DMDS en DMTS. Van vele VC's is aangetoond dat ze antimicrobiële activiteit hebben. In dit kader correleert de stimulering van de productie van diverse sulfide VC's sterk aan de verhoogde antischimmelactiviteit van mutanten die geen 2-MIB kunnen produceren. Het antischimmeleffect van dimethyldisulfide en dimethyltrisulfide is algemeen bekend en dat is verdere validatie van de verkregen resultaten. We lieten daarnaast zien dat de VC's ook bioactiviteit hebben tegen protisten, de meest voorkomende predatoren van bacteriën in de bodem. Door *Streptomyces* geproduceerde VC's induceren de vorming van cysten in protisten, met name wanneer een mengsel van VC's aanwezig is in de gasfase boven de cultures. Geosmin, 2-methyleenbornaan en dimethyldisulfide werden ook getest als zuivere stoffen, geproduceerd door organische synthese, wat hun remmende effect op de proliferatie van protisten bevestigde. Deze observaties stroken met de in vivo anti-protistactiviteit, waardoor we kunnen veronderstellen dat deze moleculen cumulatief werken in termen van hun bioactiviteit. Hoewel de anti-protistactiviteit van bacteriële VC's een nieuw concept is, lijkt dit vanuit ecologisch perspectief logisch, aangezien bacteriën de belangrijkste prooi zijn van protisten. Dit zou tevens een extra reden zijn voor bacteriën om zo'n breed scala aan VC's te produceren.

Concluderend, het werk gepresenteerd in dit proefschrift toont het potentieel van VC's aan als antimicrobiële middelen. Meer onderzoek is noodzakelijk om de rol van VC's in microbiële interacties beter te begrijpen en om hun biosyntheseroute en genetische controle verder op te helderen. Deze belangrijke klasse van verbindingen zal in de toekomst wellicht haar weg gaan vinden naar klinische of agrarische toepassingen.