



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Solvent tolerance mechanisms in *Pseudomonas putida*

Kusumawardhani, H.

Citation

Kusumawardhani, H. (2021, March 11). *Solvent tolerance mechanisms in Pseudomonas putida*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3151637>

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/1887/3151637>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3151637> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Kusumawardhani, H.

Title: Solvent tolerance mechanisms in *Pseudomonas putida*

Issue Date: 2021-03-11

Ringkasan

Biokatalisis bakteri merupakan upaya keberlanjutan alternatif dalam produksi bahan kimia bernilai tinggi karena melalui proses ini, bahan baku terbarukan dapat dimanfaatkan. Namun, produksi senyawa aromatik dan biopolimer berbasis biologi membutuhkan pabrik sel mikroba tersendiri. Pada umumnya, inang mikroba akan mengalami toksisitas yang disebabkan oleh senyawa-senyawa dengan sifat seperti pelarut (organik) yang timbul sebagai produk, substrat, atau zat antara selama proses produksi. Oleh karena itu, ketahanan terhadap pelarut merupakan sifat penting bagi inang mikroba yang akan digunakan dalam produksi bahan kimia aromatik dan biopolimer berbasis biologi. Penelitian yang diuraikan dalam disertasi ini berfokus pada identifikasi dan karakterisasi beberapa gen/kluster gen yang terlibat dalam pemberian sifat toleransi terhadap pelarut pada bakteri.

Pseudomonas putida S12 secara inheren memiliki sifat tahan terhadap pelarut, sehingga bakteri ini merupakan inang/*platform* yang sesuai untuk memproduksi senyawa aromatik dan biopolimer berbasis biologi (ikhtisar dalam **bab 2**). Genom *P. putida* S12 terdiri dari sebuah kromosom berukuran 5,8-Mbp dan sebuah megaplasmid pTTS12 berukuran 580-kbp. Dalam **bab 3**, analisis sistematis terhadap plasmid pTTS12 mengungkapkan bahwa sebagian besar gen-gen dalam plasmid ini terlibat dalam respons stres, meningkatkan ketahanan terhadap berbagai logam berat dan pelarut. Analisis komparatif ini memberikan pemahaman yang menyeluruh mengenai struktur dan fungsi plasmid pTTS12. Plasmid ini sangat stabil dan mengandung beberapa elemen transposabel kompleks yang berisi kluster-kluster gen resistensi logam berat dan sejumlah jalur degradasi aromatik.

Dalam **bab 4**, kami meninjau kembali peran penting pTTS12 sebagai adaptasi molekuler terhadap stres yang disebabkan oleh pelarut pada *P. putida* S12. Selain pompa ekstrusi pelarut (SrpABC), kami mengidentifikasi modul toksin-antitoksin baru (SlvAT) yang berkontribusi pada toleransi jangka pendek dalam konsentrasi pelarut sedang dan pada stabilitas pTTS12. Pada beberapa penelitian sebelumnya, modul toksin-antitoksin telah diketahui terlibat dalam strategi bertahan hidup seperti respons stres, pembentukan *biofilm*, dan persistensi terhadap antimikroba pada bakteri *Pseudomonas*. Ekspresi toksin SlvT menyebabkan degradasi NAD⁺ yang diikuti dengan terhentinya pembelahan sel. Sebaliknya, ekspresi antitoksin SlvA dapat segera memulihkan kadar NAD⁺ dalam sel. Modul toksin-antitoksin

ini bertindak sebagai respon langsung terhadap stres pelarut dengan menghambat pertumbuhan sel, sehingga memungkinkan sel bakteri beradaptasi dengan cepat terhadap lingkungannya. Kluster gen toleransi pelarut dari plasmid pTTS12 (*slvAT* dan operon *srp*) berhasil diekspresikan dalam beberapa galur *P. putida* dan *Escherichia coli* yang pada mulanya tidak tahan terhadap pelarut. Kedua kluster gen ini dapat meningkatkan toleransi pelarut pada beberapa galur *P. putida* dan *Escherichia coli*.

Penghapusan pTTS12 menyebabkan penurunan yang signifikan terhadap toleransi pelarut pada *P. putida* S12. Dalam **bab 5**, kami dapat memulihkan toleransi pelarut pada *P. putida* S12 yang tidak mengandung plasmid melalui eksperimen evolusi adaptif dalam laboratorium (ALE). Kami menyelidiki lebih lanjut toleransi pelarut intrinsik pada *P. putida* S12 yang tidak mengandung plasmid pTTS12. Melalui analisis pengurutan genom secara menyeluruh, beberapa polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) dan penyisipan *mobile element* yang memungkinkan galur turunan ini beradaptasi dan tumbuh dalam media dengan 10% (vol / vol) toluena dapat diidentifikasi. Mutasi ditemukan pada gen *arpR*, yang merupakan regulator pompa efluks RND, dan menghasilkan peningkatan ekspresi secara konstitutif terhadap pompa ekstrusi antibiotik ArpABC. Beberapa SNP juga ditemukan pada bagian antigen dan subunit ATP sintase, pada subunit RNA polimerase β' , pada sistem pengaturan global dengan dua komponen (gen *gacA/gacS*), dan pada regulator transkripsi gen *afr*. Analisis transkriptom mengungkapkan penurunan regulasi secara konstitutif pada beberapa kluster gen dengan aktivitas yang bergantung pada masuknya proton ke dalam sel; seperti flagela, F0F1 ATP sintase, dan protein transpor membran.

Eksperimen kami menunjukkan pentingnya gen *afr* dalam penghapusan plasmid dan pemulihan toleransi pelarut. Namun, aktivitas protein yang diduga berperan sebagai regulator transkripsi ini belum sepenuhnya dipahami. Dalam **bab 6**, peran protein Afr dikarakterisasi lebih jauh. Analisis transkriptom (RNA-seq) dan eksperimen konfirmasi menggunakan RT-qPCR menunjukkan bahwa Afr mengatur setidaknya 32 loci secara positif. Gen-gen ini mengkodekan protein transpor membran, porin, enzim-enzim dehydrogenase, dan pompa ekstrusi antibiotik MexEF-OprN, yang telah dikenal dalam ekspor aktif antibiotik. Selain itu, mutasi dan interupsi protein Afr dapat mengubah profil resistensi antibiotik sehingga menonjolkan peran Afr sebagai regulator respon stres pada *P. putida* S12.

Penelitian yang dijelaskan dalam disertasi ini bermanfaat untuk meningkatkan pengetahuan dan wawasan kita tentang mekanisme sifat ketahanan terhadap pelarut dalam bak-

teri *P. putida*. Adaptasi terhadap pelarut dalam *P. putida* S12 bergantung pada kemampuan bakteri ini untuk memenuhi kebutuhan energi yang tinggi dari stres yang diakibatkan oleh pelarut. Fleksibilitas metabolik yang melekat pada *P. putida* S12 sebagian dibentuk oleh gen-gen yang didapatkan secara horizontal, seperti jalur degradasi aromatik dan pompa ekstrusi pelarut.