

# Verspreiding, diversiteit en activiteit van antibiotica-producerende *Pseudomonas* spp.

Jorge T. de Souza

Op 1 oktober 2002 promoveerde Jorge T. de Souza aan de Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld '*Distribution, diversity and activity of antibiotic-producing Pseudomonas spp.*' Dit onderzoek werd gefinancierd door CAPES (Brazilië). Promotor was Prof. Dr. Ir. P.J.G.M. de Wit en co-promotor Dr. J.M Raaijmakers, beiden werkzaam bij de leerstoelgroep Fytopathologie van Wageningen Universiteit.

## Inleiding

*Pseudomonas* bacteriën zijn potentiële antagonisten van diverse plantenpathogene schimmels en oömyceten. De productie van antibiotica speelt een belangrijke rol in de activiteit van diverse *Pseudomonas* isolaten tegen plantenpathogenen. Ondanks het feit dat er gedurende de laatste decennia veel informatie is verkregen over de biosynthese en regulatie van antibioticaproductie, is er nog relatief weinig bekend over de verspreiding en diversiteit van antibiotica-producerende *Pseudomonas* spp. in natuurlijke milieus. Kennis over de diversiteit van natuurlijke populaties van antibiotica-producerende *Pseudomonas* spp. kan bijdragen aan een verbetering van biologische bestrijding middels de identificatie van stammen die ecologisch meer competent zijn. De doelstelling van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het bestuderen van de verspreiding, diversiteit en activiteit van antibiotica-producerende *Pseudomonas* spp. in de rhizosfeer. Er wordt specifiek ingegaan op *Pseudomonas* spp. die de antibiotica 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG), phe-

nazines (PHZ), pyrrolnitrin (PRN), pyoluteorin (PLT), en oppervlakte-actieve antibiotica produceren.

## Pyrrolnitrine en pyoluteorine

De diversiteit, phylogenie en frequentie van *Pseudomonas* en *Burkholderia* spp. die pyrrolnitrine (PRN) of pyoluteorine (PLT) produceren werd uitvoerig bestudeerd. Primers werden ontwikkeld op basis van geconserveerde sequenties in de biosynthetische loci van elk van beide antibiotica. De primers maakten detectie mogelijk van een grote collectie van *Pseudomonas* en *Burkholderia* spp. die PRN of PLT of beide antibiotica produceren. Met behulp van RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) analyse van het geamplificeerde *pltC* fragment konden geen polymorfismen worden aangetoond tussen PLT-producerende *Pseudomonas* stammen. De polymorfismen in het geamplificeerde *prnD* fragment maakten het echter wel mogelijk om de diversiteit tussen PRN-producerende *Pseudomonas* en *Burkholderia* spp. te bepa-

len zelfs tot een vergelijkbaar niveau als verkregen met behulp van RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analyse. Tevens tonen de phylogenetische analyses aan dat de *prn* genen van *B. pyrrocinia* meer verwant zijn met die van PRN-producerende *Pseudomonas* stammen dan met die van andere *Burkholderia* stammen, hetgeen mogelijk kan wijzen op uitwisseling van *prn* genen tussen beide genera. PRN- en PLT-producerende *Pseudomonas* en *Burkholderia* spp. waren niet detecteerbaar in de rhizosfeer van tarwe geteeld op vijf landbouwgronden verzameld in Nederland, waarvan tenminste twee gronden ziekteverend zijn tegen het pathogeen *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Deze resultaten suggereren dat deze antibiotica-producerende *Pseudomonas* spp. waarschijnlijk niet bijdragen aan de natuurlijke ziektevering van deze twee gronden.

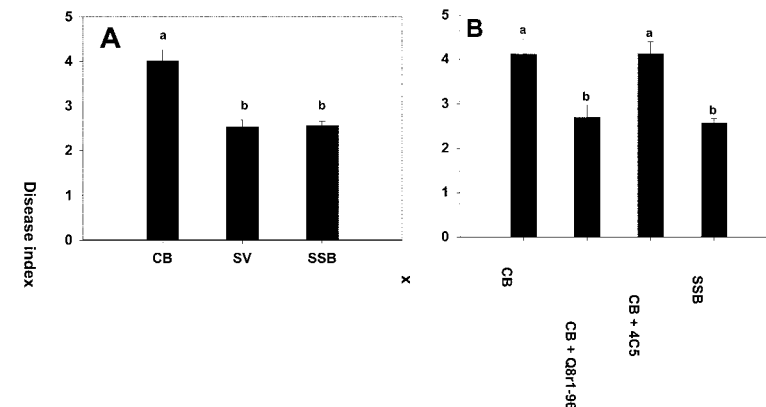
## Rol van antibiotica-producerende *Pseudomonas* spp. in ziekteverende gronden

Ziektevering van bodems tegen de halm-doder *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* komt wereldwijd voor en algemeen wordt aangenomen dat verschillende microbiële

genera verantwoordelijk zijn voor de ziektevering in bodems van diverse geografische oorsprong. Met behulp van populatiestudies, bio-toetsen en het gebruik van antibiotica-deficiënte mutanten werd aangetoond dat *Pseudomonas* spp. die 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) produceren een sleutelrol spelen in de ziektevering van twee Nederlandse gronden (Figuur 1). Hieruit blijkt dat ook in bodems die fysisch-chemisch verschillend zijn van de ziekteverende bodems van Washington State (USA), 2,4-DAPG-producerende *Pseudomonas* spp. een sleutelrol spelen. Het is tevens de eerste keer, sinds de beschrijving van Nederlandse ziekteverende gronden in 1968 door Dr. Thijs Gerlagh, dat tenminste een deel van de mechanismen en micro-organismen die een rol spelen in de ziektevering zijn geïdentificeerd. Ondanks sterke overeenkomsten in populatiedichtheden en activiteit, zijn de populaties van 2,4-DAPG-producerende *Pseudomonas* spp. in de Nederlandse ziekteverende gronden genotypisch sterk verschillend van de populaties gevonden in de ziekteverende gronden van Washington State.

## Activiteit van 2,4-DAPG

De activiteit van het antibioticum 2,4-DAPG werd in detail bestudeerd in de oömyceet *Pythium*. Er bleek aanzienlijke variatie in gevoeligheid voor 2,4-DAPG te bestaan tussen verschillende *Pythium* soorten, met *P. deliense* als de minst gevoelige. Ook diverse structuren van *P. ultimum* var. *sporangiferum* (*Pu.s.*), die deel uitmaken van de asexuele fase van de levenscyclus, verschillen aanzienlijk in hun gevoeligheid voor 2,4-DAPG. Mycelium was de meest resistente structuur gevolgd door zoösporangia, geëncysteerde zoösporen en tot slot zoösporen. Transmissie-elektronen-microscopie (TEM) toonde aan dat 2,4-DAPG verschillende



Figuur 1 (A) Ziektevering van drie Nederlandse gronden (CB, SV, en SSB) tegen de halmdoder *G. graminis* var. *tritici*. Aan de gronden werd een inoculum van het tarwe-pathogeen toegevoegd en na vier weken werd de ziekteontwikkeling op tarwewortels bepaald op een schaal van 0 tot 8 (0 = gezond en 8 betekent een volledig aangetast wortelstelsel). De gronden SV en SSB bleken ziekteverend te zijn. (B) Toevoeging van 2,4-DAPG-producerend *Pseudomonas* isolaat Q8r1-96 aan de ziekteverende CB-grond resulteerde in herstel van de ziekteverendheid tot hetzelfde niveau als in de SSB-grond. Toevoeging van 4C5, een mutant van isolaat Q8r1-96 die geen 2,4-DAPG produceert, resulteerde niet in herstel van de ziekteverendheid. Gemiddelden ( $n=5$ ) met dezelfde letter zijn niet significant verschillend ( $P=0.05$ ).

stadia van desorganisatie veroorzaakt in hyphen van *Pu.s.*, inclusief veranderingen (terugtrekking en disruptie) van de plasmamembraan, vacuolisatie en desintegratie van de inhoud van de cel. Daarnaast wordt voor de eerste keer beschreven dat de pH een significant effect heeft op de activiteit van 2,4-DAPG, met een hogere activiteit bij lage pH. Tevens bleek dat de mate van acetylering van phloroglucinol bepalend is voor de activiteit.

## Oppervlakte-actieve antibiotica

Het testen van een grote collectie *Pseudomonas* spp. resulteerde in de ontdekking van isolaten die oppervlakte-actieve antibiotica (biosurfactants) produceren met lytische activiteit tegen zoösporen van meerdere oömycete pathogenen. In samenwerking met Dr. Marjan de Boer (PPO-sectie bloembollen) werd aangetoond dat toediening van celsuspensies van een biosurfactant-producerend isolaat van *P. fluorescens* aan grond en hyacinthenbollen resulteerde in bescherming tegen wortelrot veroorzaakt

door *Pythium intermedium*. Vijf mutanten van *P. fluorescens*, verkregen met behulp van mutagenese, hadden het vermogen om zoösporen te lyseren verloren. Genetische karakterisatie van twee mutanten toonden aan dat de mutaties gelocaliseerd waren in condensatie-omeinen van peptidessynthases. Een mutant was niet meer in staat om hyacint te beschermen tegen *Pythium* wortelrot. In samenwerking met Dr. Teris van Beek (Organische Chemie, WU) en Dr. Pieter de Waard (NMR-Centrum, WU) werden acht fracties geïsoleerd waarvan vijf oppervlakte-actief waren en lysis van zoösporen veroorzaakten. Gezamenlijk geven deze resultaten sterke aanwijzingen dat oppervlakte-actieve metabolieten geproduceerd door *P. fluorescens* een belangrijke rol spelen in interacties met zoösporen van oömyceten en in bestrijding van *Pythium*-wortelrot van hyacint. Het huidige onderzoek bij de sectie Moleculaire Ecologie van de leerstoelgroep Fytopathologie richt zich op de rol van oppervlakte-actieve stoffen in interacties tussen *P. fluorescens* en andere oömyceten waaronder *Phytophthora infestans*.

PROMOTIES