



Uniwersytet w Białymstoku  
Wydział Biologiczno-Chemiczny

Paulina Sylwia Marjańska

**Filogeneza i zmienność genomowa przedstawicieli  
*Bacillus cereus sensu stricto* z gleb Eurazji,  
Afryki i Ameryki Południowej**

*Rozprawa doktorska*

Promotor: prof. dr hab. Izabela Święcicka

Białystok, 2019

## STRESZCZENIE

*Bacillus cereus sensu stricto* (zwane dalej *B. cereus*) to Gramdodatnie, tlenowe i sporulujące bakterie należące do grupy *Bacillus cereus sensu lato*. Laseczki tej grupy charakteryzuje wysokie podobieństwo i zbliżona organizacja struktury chromosomalnego DNA, a różnice dotyczą zasadniczo cech fenotypowych, determinowanych genami o pochodzeniu plazmidowym, co jest główną podstawą klasyfikacji tych bakterii do gatunków. Większość izolatów *B. cereus s.l.* jest zaliczanych do *B. cereus*, bakterii powszechnie występujących w różnorodnych środowiskach naturalnych i sporadycznie powodujących zatrucia pokarmowe i infekcje układu pokarmowego. Duże znaczenie gospodarcze i medyczne ma też *B. anthracis* jako czynnik wywołujący wąglik, groźną chorobę ludzi i przeżuwaczy oraz *B. thuringiensis* produkujący białka owadobójcze stosowane w przemysłowej produkcji biologicznych preparatów owadobójczych, wykorzystywanych w rolnictwie, leśnictwie i ogrodnictwie. Głównym rezerwuarem *B. cereus s.l.* jest gleba, skąd dochodzi do transmisji endospor do produktów spożywczych, kurzu bądź przewodów pokarmowych zwierząt.

Celami badań było określenie (i) stopnia polimorfizmu genetycznego, (ii) struktur genetycznych populacji, (iii) powiązań filogenetycznych oraz (iv) stopnia zmienności genomowej izolatów *B. cereus* z prób gleby pobranych w Argentynie, Kazachstanie, Kenii oraz Polsce. Przeprowadzenie badań umożliwiło pogłębienie wiedzy z zakresu genomiki *B. cereus*. Należy podkreślić, że jednoczesne analizy kilku populacji tych laseczek z różnych lokalizacji z zastosowaniem tak rozbudowanej i nowoczesnej metodologii badawczej nie jest znane w literaturze przedmiotu i pozwoliło na zapoznanie się z właściwościami *B. cereus* w wymiarze międzykontynentalnym.

Analizy mające na celu wyznaczenie polimorfizmu genetycznego wśród czterech odległych geograficznie glebowych populacji *B. cereus* z zastosowaniem typowania na podstawie fragmentów nukleotydowych kilku loci (MLST), wskazują na wysoki stopień zróżnicowania (identyfikacja 354 alleli), przy czym populacja polska ujawniła najwyższy poziom różnorodności (385 miejsc polimorficznych w 40 typach sekwencyjnych). Ilość przypisanych ST w poszczególnych lokalizacjach była zróżnicowana. W tym zakresie wyróżnia się populacja *B. cereus* z Kanii, gdyż wszystkie izolaty sklasyfikowano do oddzielnych, nieopisanych wcześniej typów sekwencyjnych (42 ST). Zestawienia porównawcze pokazały zbliżone tendencje ewolucyjne we wszystkich badanych loci w postaci liczby miejsc polimorficznych, niezależnie

od pochodzenia izolatów. Natomiast wyznaczone przedziały wartości współczynników  $r/m$  wskazują na zmienną częstotliwość zachodzenia rekombinacji w poszczególnych populacjach (od 0,7 wśród izolatów z Argentyny do 3,7 wśród izolatów z Kenii i Polski). Z kolei niskie wartości współczynników  $dN/dS$  (od 0,027 do 0,038), sugerujące klonalność wszystkich populacji, nie znalazły odzwierciedlenia w ich strukturach genetycznych, gdyż spośród 161 *B. cereus*, tylko 37% tworzy kompleksy klonalne. Analizy sekwencji nukleotydowych typów sekwencyjnych za pomocą algorytmu Ecotype Simulation ujawniły występowanie domniemanych ekotypów wśród badanych populacji.

Odtworzenie filogenezy na podstawie fragmentów siedmiu genów metabolizmu podstawowego (łącznie 2829 nukleotydów) ujawniło zróżnicowany stopień pokrewieństwa z szczepami referencyjnymi *B. cereus s.l.*. Laseczki z prób gleby z Argentyny i Kenii nie wykazały pokrewieństwa filogenetycznego ze szczepami psychrotolerancyjnymi, w przeciwieństwie do *B. cereus* z Kazachstanu i Polski, co sugeruje dostosowanie związane z odmiennymi warunkami klimatycznymi. Ustalenie powiązań filogenetycznych w aspekcie międzykontynentalnym ukazały tendencję do formowania pięciu odrębnych linii filogenetycznych (kladów), korespondujących z pochodzeniem izolatów. Jednakże żadna z linii filogenetycznych nie została utworzona przez bakterie wyłącznie z jednego kontynentu.

Na podstawie obecności determinant genetycznych białek replikacji RepA oraz RepX wykazano powszechność nosicielstwa plazmidów typu pXO1 i pXO2 wśród glebowych laseczek *B. cereus*, z przewagą pXO2-pozytywnych izolatów. Względny stopień ekspresji genów kodujących białka replikacji w/w plazmidów na poziomie transkryptomu okazał się bardziej jednolity we wszystkich populacjach w przypadku genu *repA\_N*, kodującego białko replikacji plazmidu pXO2. Analizy porównawcze z replikonem plazmidu pXO2 oraz plazmidów typu pXO2 w *B. cereus* wskazują na taki sam układ poszczególnych elementów, jednak plazmidy *B. cereus* charakteryzują podstawienia nukleotydowe, odróżniające ich replikony od replikonu pXO2 *B. anthracis*.

Wyniki badań zaprezentowane w moim doktoracie znacząco podnoszą zakres wiedzy na temat genetycznych uwarunkowań środowiskowych populacji *B. cereus*.

Białystok, dn. 204.2015  
Pauline Sylwia Hajan'ska