

Streszczenie

Frederick Cohan w 2002 roku zaproponował specjację ekologiczną jako główny proces różnicowania bakterii. Zgodnie z teorią Cohan'a każdy gatunek bakterii zawiera zmienną liczbę ekotypów. Ekotyp bakteryjny jest definiowany jako homogeniczna grupa o wysokim podobieństwie ekologicznym. Poszczególne ekotypy danego gatunku charakteryzują się specyficznymi adaptacjami, pozwalającymi na efektywne wykorzystywanie składników odżywczych lub innych warunków środowiska. Teoria specjacji ekologicznej wśród bakterii została potwierdzona w populacjach *Bacillus subtilis*-*Bacillus licheniformis* pochodzących z Parku Narodowego Doliny Śmierci, sinic z Parku Narodowego Yellowstone oraz *Bacillus simplex* z Izraela. W ramach rozprawy doktorskiej badałam czy naturalne populacje gramdodatnich laseczek *Bacillus cereus sensu lato* wykazują ekotypowy charakter.

Przedstawiciele *B. cereus s.l.* występują powszechnie w środowisku naturalnym i wywierają ogromny wpływ na zdrowie człowieka, przemysł spożywczy oraz rolnictwo i leśnictwo. Te tlenowe, sporulujące laseczki z jednej strony produkują toksyny szkodliwe dla ludzi, zwierząt roślinożernych oraz bezkręgowców, ale też są znane jako producenci enzymów i wtórnych metabolitów, degradujących niebezpieczne związki chemiczne i/lub wspomagających wzrost roślin. Znane są też szczepy *B. cereus s.l.* stosowane jako probiotyki w paszy dla zwierząt. Powyższe właściwości były i są intensywnie badane, jednakże jedynie w odniesieniu do szczepów o szczególnym znaczeniu gospodarczym i medycznym, jak *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis* oraz *B. anthracis*. Tymczasem pokrewieństwo filogenetyczne tych laseczek wciąż budzi wiele kontrowersji. Również podłoże ekologicznej dywersyfikacji w grupie *B. cereus s.l.* nie jest dostatecznie poznane, przede wszystkim z powodu braku informacji na temat szczepów izolowanych z gleby, głównego rezerwuaru tych bakterii.

W ramach rozprawy doktorskiej analizowałam strukturę genetyczną oraz zidentyfikowałam potencjalne ekotypy wśród 297 szczepów *B. cereus s.l.* wyizolowanych z prób gleby pobranych w (i) Narwiańskim Parku Narodowym (Załącznik 1), jak również w (ii) Białowieskim Parku Narodowym, (iii) Biebrzańskim Parku Narodowym oraz (iv) w gospodarstwie rolnym w Jasienówce (Załącznik 2 i 3). Ekologiczna specjacja w grupie *B. cereus* wydaje się być silniejsza, aniżeli zdolność tych bakterii do horyzontalnego transferu genów. W związku z tym założyłam, iż wśród badanych populacji występują ekotypy, jak ekotyp termiczny, cytotoksyczny i melaninowy. W pierwszej kolejności wykazałam, iż termiczne ekotypy (izolaty zdolne do wzrostu w niskich temperaturach) występują wśród naturalnych populacji *B. cereus s.l.* z północno-wschodniej Polski (Załącznik 1, Załącznik 2). Początkowo wykazałam również, iż potencjał cytotoksyczny jest znacząco związany z dwoma liniami filogenetycznymi *B. thuringiensis* (Załącznik 1). Dalsze analizy ujawniły, iż szczepy potencjalnie cytotoksyczne występują przede wszystkim w środowisku, w którym działalność człowieka jest znacząca (gleba uprawna). Ponadto cytotoksyczność nie jest cechą gatunkową i występuje wśród szczepów należących do różnych grup filogenetycznych, co potwierdza oportunistyczny model patogenności grupy *B. cereus s.l.* (Załącznik 2). Następnie zidentyfikowałam potencjalny ekotyp melaninowy, utworzony przez szczepy *B. weihenstephanensis* pochodzące z Białowieskiego Parku Narodowego oraz pola uprawnego w Jasienówce, zdolne do produkcji rozpuszczalnego w wodzie pigmentu (Załącznik 3). Właściwości fizyko-chemiczne tego pigmentu jednoznacznie wskazują, iż jest to melanina. Synteza melaniny może znacząco wpływać na funkcjonowanie mikroorganizmów w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Z tego względu zdolność do syntezy melaniny przez glebowe izolaty *B. weihenstephanensis*, a także ich psychrotroficzny charakter, wydają się być doskonałym dostosowaniem do miejscowych warunków środowiska. Przeprowadzenie analiz w odniesieniu do stosunkowo wysokiej liczby szczepów *B. cereus s.l.* pochodzących z ekologicznie zróżnicowanych środowisk, pozwoliło testować hipotezę stanowiącą, że specyficzne genotypy tych bakterii występują w poszczególnych naturalnych środowiskach (Załącznik 2). Analizy MLST (*ang.* Multi-Locus Sequence Typing) wykazały, iż aż 92% typów sekwencyjnych (ST) jest charakterystyczna dla poszczególnych środowisk. Ponadto 78% badanych izolatów posiadało niezidentyfikowane do tej pory STs. Powyższe wyniki wskazują na istnienie

specyficznych genotypów wśród naturalnych populacji *B. cereus s.l.* Obecność ekologicznie odrębnych genotypów wynika raczej z adaptacji tych bakterii do specyficznych środowisk, aniżeli z przypadkowej kolonizacji.

Taksonomia grupy *B. cereus s.l.* budzi wiele kontrowersji. Na podstawie literatury odnoszącej się głównie do szczepów związanych z działalnością człowieka, założyłam, iż szczepy środowiskowe *B. cereus s.l.* są genetycznie blisko spokrewnione i powinny być sklasyfikowane do jednego gatunku (Załącznik 2). Wprawdzie wykazałam istnienie czterech głównych grup filogenetycznych, obejmujących zmienną liczbę *B. cereus/B. weihenstephanensis*, *B. thuringiensis* i *B. mycoides/B. pseudomycoides*, jednakże tylko niewielka liczba typów sekwencyjnych (ST) zawierała szczepy należące do różnych gatunków. Ponadto, izolaty sklasyfikowane do tego samego gatunku, ale pochodzące z różnych środowisk, wykazywały tendencję do grupowania się w kompleksy klonalne. Powyższe wyniki dały podstawę do wyciągnięcia wniosku, iż środowiskowe izolaty *B. cereus s.l.* nie reprezentują jednego gatunku.

Szczegółowe analizy genetyczne, fenotypowe oraz biochemiczne przeprowadzone w odniesieniu do wysokiej liczby środowiskowych szczepów *B. cereus s.l.*, rzuciły nowe światło na ewolucję oraz ekologiczną adaptację tych bakterii. Ponadto, luki w wiedzy na temat biologii tych tlenowych laseczek, zostały znacząco uzupełnione poprzez uwzględnienie przeze mnie po raz pierwszy *B. mycoides* w badaniach struktury genetycznej *B. cereus s.l.*