



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 Świącicka

Białystok, 2019

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi niniejszej rozprawy,
Pani Profesor Izabeli Święcickiej
za ogromną życzliwość, nieprzerwaną wyrozumiałość, cenne wskazówki
oraz nieustające wsparcie na wszystkich etapach pracy doktorskiej.*

SPIS TREŚCI

1.	ROZPOWSZECHNIANIE WYNIKÓW BADAŃ	6
1.1	Prezentacja części wyników badań niniejszej rozprawy	6
1.2	Współautorstwo w innych publikacjach powstałych podczas realizacji studiów doktoranckich.....	6
1.3	Wskaźniki bibliometryczne.....	6
2.	WYKAZ SKRÓTÓW	7
3.	SPIS TABEL	8
4.	SPIS RYCIN	10
5.	STRESZCZENIE	12
6.	ABSTRACT	14
7.	WSTĘP	16
7.1	<i>Bacillus cereus sensu stricto</i>	16
7.2	Filogeneza bakterii.....	17
7.3	Ekotypowy charakter populacji bakteryjnych a filogeneza.....	18
7.4	Zmienność genetyczna a struktura populacji.....	21
8.	CELE BADAWCZE I HIPOTEZY	24
9.	MATERIAŁY I METODY	25
9.1	Odczynniki chemiczne oraz podłoża mikrobiologiczne zastosowane w badaniach.....	25
9.2	Szczepy bakteryjne.....	31
9.3	Metody.....	33
9.3.1	Startowe kultury bakterii.....	33
9.3.2	Izolacja DNA genomowego.....	33
9.3.3	Wyznaczenie stopnia polimorfizmu genetycznego, struktur populacji oraz filogenezy <i>B. cereus</i> na podstawie fragmentów sekwencji nukleotydowych siedmiu genów metabolizmu podstawowego.....	34
9.3.3.1	Amplifikacja fragmentów genów metabolizmu podstawowego.....	34
9.3.3.2	Sekwencjonowanie.....	35
9.3.3.3	Analiza sekwencji nukleotydowych.....	36
9.3.4	Podział glebowych izolatów <i>B. cereus</i> na domniemane ekotypy.....	36

9.3.5	Elektroforeza fragmentów genomowego DNA <i>B. cereus</i> w zmiennym pulsowo polu elektrycznym.....	37
9.3.5.1	Przygotowanie bloczków agarozowych z genomowym DNA.....	37
9.3.5.2	Trawienie genomowego DNA i rozdział elektroforetyczny.....	37
9.3.6	Projektowanie sekwencji starterów PCR.....	38
9.3.7	Oszacowanie frekwencji wybranych genów.....	38
9.3.7.1	Frekwencja genów białek replikacji plazmidów typu pXO1 i pXO2	38
9.3.7.2	Frekwencja genów kodujących determinanty wirulencji <i>B. anthracis</i>	39
9.3.8	Szacowanie względnego poziomu ekspresji wybranych genów metodą ilościowego PCR.....	40
9.3.8.1	Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja.....	40
9.3.8.2	Ilościowy PCR (qPCR).....	41
9.3.8.3	Analiza uzyskanych wyników.....	42
9.3.9	Struktura replikonu plazmidów typu pXO2.....	42
9.3.10	Analizy bioinformatyczne.....	43
9.3.11	Analizy statystyczne.....	44
10.	WYNIKI	45
10.1	Polimorfizm genetyczny glebowych populacji <i>B. cereus</i>	45
10.1.1	Polimorfizm genetyczny glebowych izolatów <i>B. cereus</i> z Argentyny.....	45
10.1.2	Polimorfizm genetyczny glebowych izolatów <i>B. cereus</i> z Kazachstanu.....	46
10.1.3	Polimorfizm genetyczny <i>B. cereus</i> z gleby pobranej w Kenii.....	48
10.1.4	Polimorfizm genetyczny <i>B. cereus</i> z Polski.....	49
10.1.5	Polimorfizm genetyczny <i>B. cereus</i> w aspekcie międzykontynentalnym.....	50
10.2	Struktura genetyczna glebowych populacji <i>B. cereus</i>	54
10.2.1	Struktura genetyczna populacji <i>B. cereus</i> z gleby pobranej w Argentynie.....	54
10.2.2	Struktura genetyczna populacji <i>B. cereus</i> z gleby pobranej w Kazachstanie.....	55

10.2.3	Struktura genetyczna glebowej populacji <i>B. cereus</i> z Kenii.....	56
10.2.4	Struktura genetyczna populacji <i>B. cereus</i> z gleby pobranej w Polsce.....	57
10.2.5	Struktura genetyczna populacji <i>B. cereus</i> w aspekcie międzykontynentalnym.....	58
10.3	Filogeneza glebowych izolatów <i>B. cereus</i>	59
10.3.1	Filogeneza izolatów <i>B. cereus</i> z Argentyny.....	59
10.3.2	Filogeneza izolatów <i>B. cereus</i> z Kazachstanu.....	60
10.3.3	Filogeneza izolatów <i>B. cereus</i> z Kenii.....	62
10.3.4	Filogeneza izolatów <i>B. cereus</i> z Polski.....	63
10.3.5	Filogeneza glebowych izolatów <i>B. cereus</i> w aspekcie międzykontynentalnym.....	65
10.4	Domniemane ekotypy wśród glebowych izolatów <i>B. cereus</i>	68
10.5	Profile genomowe <i>B. cereus</i> a przynależność filogenetyczna	70
10.6	Polimorfizm <i>B. cereus</i> na podstawie wybranych genów	72
10.6.1	Frekwencja i stopień ekspresji genów białek replikacji plazmidów typu pXO1 i pXO2.....	72
10.6.2	Heterogeniczna natura replikonu plazmidów typu pXO2 wśród izolatów <i>B. cereus</i>	74
10.6.3	Determinanty węgliką wśród izolatów <i>B. cereus</i>	77
11.	DYSKUSJA	78
12.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	88
13.	BIBLIOGRAFIA	90
14.	ZAŁĄCZNIKI	101

1. ROZPOWSZECHNIANIE WYNIKÓW BADAŃ

1.1. Prezentacja części wyników badań niniejszej rozprawy

Kamińska P.S., Yernazarova A., Drewnowska J.M., Zambrowski G., Święcicka I., 2015.

The worldwide distribution of genetically and phylogenetically diverse *Bacillus cereus* isolates harbouring *Bacillus anthracis*-like plasmids. *Environmental Microbiology Reports* 7: 738-745.

IF₂₀₁₅ = 3,500; MNiSW₂₀₁₅ – 35 pkt

1.2. Współautorstwo w innych publikacjach powstałych podczas realizacji studiów doktoranckich

Kamińska P.S., Yernazarova A., Murawska E., Święcicki J., Fiedoruk K., Bideshi D. K.,

Święcicka I., 2014. Comparative analysis of quantitative reverse transcription real-time PCR and commercial enzyme immunoassays for detection of enterotoxigenic *Bacillus thuringiensis* isolates. *FEMS Microbiology Letters* 357: 34-39.

IF₂₀₁₄ = 2,121; MNiSW₂₀₁₄ – 20 pkt

Kamińska P.S., Fiedoruk K., Jankowska D., Mahillon J., Nowosad K., Drewicka E.,

Zambrzycka M., Święcicka I., 2015. One-day pulsed-field electrophoresis protocol to rapid determination of emetic *Bacillus cereus* isolates. *Electrophoresis* 36: 1051-1054.

IF₂₀₁₅ = 2,482 MNiSW₂₀₁₅ – 30 pkt

Bartoszewicz M., Marjańska P.S., 2017. Milk-originated *Bacillus cereus sensu lato* strains

harbouring *Bacillus anthracis*-like plasmids are genetically and phenotypically diverse. *Food Microbiology* 67: 23-30.

IF₂₀₁₇ = 3,759; MNiSW₂₀₁₅ – 35 pkt

1.3. Wskaźniki bibliometryczne

Łączny IF prac, w których jestem współautorem - 11,862

Łączna punktacja czasopism według MNiSW - 120 pkt

2. WYKAZ SKRÓTÓW

CC	kompleks klonalny (<i>ang.</i> clonal complex)
cDNA	komplementarny DNA (<i>ang.</i> complementary DNA)
ddH₂O	woda podwójnie destylowana
dN/dS	stosunek mutacji niesynonimowych do synonimowych
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (<i>ang.</i> deoxyribonucleic acid)
dNTP	5'-trifosforan 2'-deoksynukleozydu
HTG	horyzontalny transfer genów (<i>ang.</i> horizontal gene transfer)
kpz	tysiąc par zasad
MLST	typowanie na podstawie sekwencji wielu loci (<i>ang.</i> multi-locus sequence typing)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>ang.</i> polymerase chain reaction)
PE	domniemany ekotyp (<i>ang.</i> putative ecotype)
PFGE	elektroforeza w pulsowo zmiennym polu elektrycznym (<i>ang.</i> pulsed-field gel electrophoresis)
pz	para zasad
qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>ang.</i> quantitative PCR)
r/m	współczynnik rekombinacji do mutacji
RNA	kwas rybonukleinowy (<i>ang.</i> ribonucleic acid)
RT PCR	reakcja odwrotnej transkrypcji (<i>ang.</i> reverse transcriptase PCR)
ST	typ sekwencyjny (<i>ang.</i> sequence type)
UwB	Uniwersytet w Białymstoku

3. SPIS TABEL

Tabela 1	Bufory.....	25
Tabela 2	Agarozy	26
Tabela 3	Wzorce wielkości fragmentów DNA.....	26
Tabela 4	Podłoża mikrobiologiczne.....	26
Tabela 5	Enzymy.....	27
Tabela 6	Inne odczynniki.....	27
Tabela 7	Zestawy odczynników.....	28
Tabela 8	Pary starterów PCR zastosowane w badaniach.....	29
Tabela 9	Pochodzenie oraz liczba izolatów <i>B. cereus</i> poddanych badaniom.....	31
Tabela 10	Szczepy referencyjne <i>B. cereus s. l.</i> zastosowane w badaniach.....	32
Tabela 11	Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej przy amplifikacji DNA w MLST.....	34
Tabela 12	Skład mieszaniny reakcyjnej PCR sekwencyjnego.....	35
Tabela 13	Parametry elektroforezy w zmiennym pulsowo polu elektrycznym.....	38
Tabela 14	Profile termiczne reakcji amplifikacji genów <i>repA_N</i> i <i>repX</i>	39
Tabela 15	Skład mieszaniny w reakcji odwrotnej transkrypcji.....	40
Tabela 16	Skład mieszaniny reakcyjnej ilościowego PCR.....	41
Tabela 17	Profile termiczne reakcji ilościowego PCR.....	41
Tabela 18	Zróźnicowanie fragmentów genów metabolizmu podstawowego wśród izolatów <i>B. cereus</i> z gleby pobranej w Buenos Aires.....	45

Tabela 19	Prawdopodobieństwa substytucji nukleotydów genów metabolizmu podstawowego argentyńskich izolatów <i>B. cereus</i>	46
Tabela 20	Zróżnicowanie fragmentów genów metabolizmu podstawowego wśród izolatów <i>B. cereus</i> z gleby pobranej w Kazachstanie.....	47
Tabela 21	Prawdopodobieństwa substytucji nukleotydów genów metabolizmu podstawowego kazachskich izolatów <i>B. cereus</i>	47
Tabela 22	Zróżnicowanie fragmentów genów metabolizmu podstawowego wśród izolatów <i>B. cereus</i> z gleby pobranej w Kenii.....	48
Tabela 23	Prawdopodobieństwa substytucji nukleotydów genów metabolizmu podstawowego kenijskich izolatów <i>B. cereus</i>	49
Tabela 24	Zróżnicowanie fragmentów genów metabolizmu podstawowego wśród izolatów <i>B. cereus</i> z gleby pobranej w północno-wschodniej Polsce.....	49
Tabela 25	Prawdopodobieństwa substytucji nukleotydów wśród genów metabolizmu podstawowego polskich izolatów <i>B. cereus</i>	50
Tabela 26	Parametry obrazujące historię ewolucyjną populacji <i>B. cereus</i>	70
Tabela 27	Frekwencja genów <i>repA_N</i> i <i>repX</i> wśród glebowych izolatów <i>B. cereus</i>	73
Tabela S1	Charakterystyka glebowych izolatów <i>B. cereus</i> z Argentyny, Kazachstanu, Kenii i Polski oraz szczepów referencyjnych.....	103

4. SPIS RYCIN

Rycina 1	Zmiany nisz ekologicznych jako konsekwencje horyzontalnego transferu genów.....	20
Rycina 2	Ilościowy rozkład alleli genów metabolizmu podstawowego izolatów badanych populacji <i>B. cereus</i>	51
Rycina 3	Procentowy udział miejsc polimorficznych w genach metabolizmu podstawowego izolatów <i>B. cereus</i>	52
Rycina 4	Zakres wartości współczynnika r/m w glebowych populacjach <i>B. cereus</i>	53
Rycina 5	Struktura genetyczna populacji <i>B. cereus</i> z gleby pobranej w Argentynie.....	54
Rycina 6	Struktura genetyczna populacji <i>B. cereus</i> z gleby pobranej w Kazachstanie.....	55
Rycina 7	Struktura genetyczna populacji <i>B. cereus</i> z gleby pobranej w Kenii.....	56
Rycina 8	Struktura genetyczna populacji <i>B. cereus</i> z prób gleby pobranej w Polsce.....	57
Rycina 9	Struktura genetyczna populacji <i>B. cereus</i> z Argentyny, Kazachstanu, Kenii i Polski	58
Rycina 10	Drzewo filogenetyczne <i>B. cereus</i> wyizolowanych z prób gleby pobranej w Buenos Aires oraz szczepów referencyjnych <i>B. cereus s.l.</i>	60
Rycina 11	Drzewo filogenetyczne <i>B. cereus</i> wyizolowanych z prób gleby pobranej w okolicach Almaty oraz szczepów referencyjnych <i>B. cereus s.l.</i>	61
Rycina 12	Drzewo filogenetyczne <i>B. cereus</i> wyizolowanych z prób gleby pobranej w Kenii oraz szczepów referencyjnych <i>B. cereus s.l.</i>	62
Rycina 13	Drzewo filogenetyczne <i>B. cereus</i> wyizolowanych z prób gleby pobranych w północno-wschodniej Polsce oraz szczepów referencyjnych <i>B. cereus s.l.</i>	64
Rycina 14	Udział izolatów <i>B. cereus</i> z różnych części świata w poszczególnych kładach filogenetycznych.....	66

Rycina 15	Drzewo filogenetyczne 161 izolatów <i>B. cereus</i> oraz ośmiu szczepów referencyjnych <i>B. cereus s.l.</i>	67
Rycina 16	Filogeneza na podstawie sekwencji nukleotydowych ST i podział na domniemane ekotypy (PE) izolatów <i>B. cereus</i> z prób gleby pobranej w Argentynie (a), Kazachstanie (b), Kenii (c) i Polsce (d).	68
Rycina 17	Pulsotypy genomowego DNA trawionego enzymem <i>NotI</i> izolatów <i>B. cereus</i> i szczepu referencyjnego <i>B. thuringiensis</i> HD73.....	71
Rycina 18	Pulsotypy genomowego DNA trawionego enzymem <i>NotI</i> izolatów <i>B. cereus</i>	71
Rycina 19	Pulsotypy genomowego DNA trawionego enzymem <i>NotI</i> izolatów <i>B. cereus</i>	72
Rycina 20	Zakres ekspresji genów <i>repA_N</i> i <i>repX</i> wśród izolatów <i>B. cereus</i> względem szczepów referencyjnych oszacowany metodą Real-time PCR.....	74
Rycina 21	Organizacja replikonu plazmidów typu pXO2 oraz alignment sekwencji nukleotydowych fragmentu genu <i>repA_N</i> oraz regionu CT wśród izolatów <i>B. cereus</i> i dwu izolatów <i>B. thuringiensis</i>	76
Rycina S1	Filogeneza na podstawie sekwencji nukleotydowych ST i podział na domniemane ekotypy (PE) glebowych izolatów <i>B. cereus</i> z różnych lokalizacji geograficznych w aspekcie międzykontynentalnym.....	101
Rycina S2	Pokrewieństwo genetyczne <i>repA_N</i> -pozytywnych izolatów <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> BPN2/2, <i>B. thuringiensis</i> JAS63/5 oraz szczepu <i>B. anthracis</i> AMES wyznaczone metodą „łączenia sąsiadów” na podstawie sekwencji nukleotydowych: a) odcinka <i>origin</i> , b) regionu CT oraz c) genu <i>repA_N</i>	102

5. 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 (kłądów), 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*.

6. ABSTRACT

Bacillus cereus sensu stricto (*B. cereus*) are Gram-positive, aerobic and spore-forming bacteria belonging to *Bacillus cereus sensu lato* (*B. cereus* group). Members of the group display a high degree of genetic similarity, but different phenotypic features, mainly transferred on plasmids, will allow them to be classified into separate species. The highest number of *B. cereus s.l.* isolates are classified as *B. cereus*, bacilli widely distributed in various environments. These bacilli sporadically cause food poisoning and intestinal infections. *B. anthracis*, another member of the group, is a very important in the area of human economy and health as a factor causing anthrax – dangerous disease of human and ruminants. In turn, *B. thuringiensis* producing insecticidal proteins, is used in biopesticides. The main reservoir of *B. cereus s.l.* is the soil, from endospores are transmitted to foodstuffs, dust or animal digestive tracts. Until now the occurrence of the gene transfer process (for example virulence genes) between members of the *B. cereus* group has been repeatedly revealed.

The aims of this PhD thesis were determine (i) the degree of genetic polymorphism, (ii) genetic populations structures, (iii) reconstruction of phylogenetic relationships and (iv) determination of genome variability of *B. cereus* isolates from soil samples collected in Argentina, Kazakhstan, Kenya and Poland. This analysis made it possible to get acquainted with the properties of the above bacteria in the aspect of the specific geographical location and in the intercontinental dimension.

The application of typing based on nucleotide fragments of several loci (MLST) allowed to obtain molecular data for the study of genetic differentiation and phylogeny of *B. cereus* isolates. Analyzes of nucleotide sequence by Ecotype Simulation algorithm made it possible to designate putative ecotypes among the studied populations. Additionally, on the basis of the presence of genetic determinants of the RepA and RepX replication proteins, the frequency of the pXO1- and pXO2-like plasmids of *B. anthracis* among soil *B. cereus* isolates were estimated. In turn, the sequencing of replicons of pXO2 plasmids enabled the comparison of their organization and nucleotide structures.

Analyzes aimed at estimating genetic polymorphism among four geographically distinct soil populations of *B. cereus* showed a high degree of differentiation in all of them (identification of 354 alleles), while the Polish population revealed the highest level of diversity (385 polymorphic sites among 40 sequence types). The number of assigned STs in individual locations was differentiated, with all Kenyan isolates classified into separate,

previously unwritten sequence types (42 STs). Comparative analysis showed similar evolutionary tendencies in all examined loci in the form of the number of polymorphic sites, regardless of the origin. However, the determined ranges of r/m coefficients indicate a variable frequency of recombination occurrence in individual populations (from 0,70 among the isolates from Argentina to 3,70 among the isolates from Kenya and Poland). On the other hand, low values of dN/dS factors (from 0,027 to 0,038) suggesting the clonality of all populations was not reflected in their genetic structures, because only 37% isolates from 161 *B. cereus* form clonal complexes.

The reconstruction of phylogeny in individual populations revealed a different degree of relationship with the *B. cereus sensu lato* reference strains. Bacilli from Argentina and Kenya did not show phylogenetic relationships with psychrotolerant strains, unlike to *B. cereus* from Kazakhstan, which suggests the ecotypic nature of the *B. cereus* populations, probably associated with different climatic conditions. Establishing phylogenetic relationships in the intercontinental aspects showed a tendency to form five separate clades, corresponding to the origin of the isolates. Importantly, none of them created bacteria from only one continent.

The ubiquity of the carriage of pXO1- and pXO2-like plasmids among soil *B. cereus* has been demonstrated in all studied populations. The frequency of pXO2-like positive isolates in all cases exceeding the number of pXO1-like positive bacilli. The relative degree of expression of the genes encoding the replication proteins of these plasmids at the transcriptome level has been proved more homogenous in all populations in the case of the *repA_N* gene, carried on pXO2-like plasmids. Comparative analyzes with the replicon of *B. anthracis* pXO2 plasmid revealed the same arrangement of its elements. However, the nucleotide sequences of *B. cereus* replicons revealed the presence of characteristic nucleotide substitutions among soil isolates, distinguishing their replicons from the *B. anthracis*.

The study presented in the doctoral thesis expand our knowlege on the genetic nature of environmental *B. cereus* populations.

7. WSTĘP

7.1. *Bacillus cereus sensu stricto*

B. cereus sensu stricto (zwany dalej *B. cereus*) to Gramododatnia, tlenowa i sporulująca laseczka (Duport i wsp., 2016). Ze względu na formowanie przetrwalników opornych na działanie niekorzystnych czynników zewnętrznych, ta bakteria jest szeroko rozpowszechniona w różnorodnych środowiskach, przez co w istotny sposób wpływa na zdrowie oraz gospodarkę człowieka. Między innymi sporadycznie wywołuje zatrucia pokarmowe oraz infekcje biegunkowe u ludzi (Dierick i wsp., 2005; Logan 2011; Michelet i wsp., 2006; Tewari i Abdullah, 2015). Oprócz gleby, formy przetrwalne *B. cereus* przedostają się do produktów spożywczych, osadów sedymentacyjnych zbiorników wodnych i kurzu (Brillard i wsp., 2015; Ceuppens i wsp., 2013; Jensen i wsp., 2003; Rosenquist i wsp., 2005). Zasadlają też przewody pokarmowe kręgowców i bezkręgowców (Święcicka i Mahillon, 2006; Święcicka, 2008).

B. cereus, ze względu na dynamikę genomu (Bartoszewicz i Marjańska, 2017; Hoffmaster i wsp., 2004) oraz stopień pokrewieństwa z gatunkami zaliczanymi do *Bacillus cereus sensu lato* (dalej *B. cereus s.l.* lub grupa *B. cereus*) jest doskonałym modelem badań struktur populacji oraz zależności filogenetycznych mikroorganizmów. Ta grupa bakterii, oprócz *B. cereus*, obejmuje między innymi (i) *B. anthracis*, czynnik etiologiczny wąglika, groźnej choroby ludzi i przeżuwaczy (Fouet 2009), (ii) *B. thuringiensis*, entomopatogen, zdolny do formowania białkowych toksyn owadobójczych stosowanych w produkcji naturalnych środków ochrony roślin (Schnepf i wsp., 1998; Rodríguez i wsp., 2015), (iii) termotolerancyjne i chorobotwórcze *B. cytotoxicus* oraz (iv) *B. toyonensis*, używany obecnie w wytwarzaniu probiotyków dla zwierząt (Guinebretiére i wsp., 2013; Kantas i wsp., 2014). Dodatkowo, grupę *B. cereus* stanowi (v) psychrotolerancyjny *B. mycoides*, który wspomaga wzrost roślin szpilkowych oraz hamuje rozwój grzybów z rodzaju *Fusarium*, jak też obniża jakość w artykułów spożywczych przechowywanych w warunkach chłodniczych (Czaban i wsp., 2004), a wraz z (vi) *B. pseudomycoides*, wyróżniają się ryzoidalnym wzrostem kolonii na podłożach agarowych. Najwięcej wątpliwości budzi przynależność do grupy psychrotolerancyjnego (vii) *B. weihenstephanensis*, charakteryzującego się obecnością specyficznych sekwencji w obrębie 16S rRNA oraz genu *cspA* (Lechner 1998). Ostatnie analizy porównawcze szczepów *B. weihenstephanensis* DSM11821T oraz *B. mycoides* DSM2048T rzuciły nowe światło na rozróżnianie ich jako oddzielnych gatunków. Na

postawie porównań genomów i profili metabolicznych zaproponowano reklasyfikację *B. weihentephanensis* do *B. mycoides* (Liu i wsp., 2018). Z kolei analizy bioinformatyczne wskazują na związek pomiędzy typem białek rybosomalnych *B. cereus s.l.* a adaptacjami do różnych nisz termicznych tych bakterii (Fiedoruk i wsp., 2017). Interpretacja składu aminokwasowego tych białek pozwoliła na wyznaczenie prawdopodobnej ścieżki dywergencji pomiędzy członkami tej grupy, zależnej od doboru naturalnego związanego z temperaturą środowiska bytowania.

Podczas gdy badania dotyczące chorobotwórczości grupy *B. cereus* oraz zróżnicowania genetycznego bakterii z pojedynczych środowisk są często podejmowane (Drewnowska i Świącicka, 2013; Dréan i wsp., 2015; Ko i wsp., 2004; Thorsen i wsp., 2015), to wieloaspektowe analizy wielu populacji, w szczególności z odległych lokalizacji, są niedostateczne.

7.2. Filogeneza bakterii

Droga rozwoju rodowego, pochodzenie i zmiany ewolucyjne organizmów (zwykle gatunków) są przedmiotem badań filogenetycznych. Zrekonstruowanie relacji ewolucyjnych pomiędzy mikroorganizmami służy zrozumieniu procesów ewolucyjnych, mechanizmów narastania zmienności oraz udziela odpowiedzi na zasadnicze pytania dotyczące dystrybucji specyficznych cech w obrębie badanej grupy, jak też ich dyspersji w środowisku. Na podstawie filogenezy możliwe jest przewidywanie kierunków dalszego różnicowania się cech genotypowych i fenotypowych bakterii oraz ich ewentualnych skutków. Uzyskane dane są cennym źródłem informacji nie tylko w obszarze naukowym, ale także w wielu dziedzinach związanych z gospodarką i zdrowiem człowieka. Jednakże odtworzenie zależności filogenetycznych bakterii jest bardzo trudnym wyzwaniem. Pierwsze próby wyznaczenia powiązań filogenetycznych pomiędzy bakteriami opierały się na porównywaniu morfologii i/lub cech metabolizmu (Sobczyński i wsp., 2005). Wkrótce okazało się, że to błędna ścieżka, ponieważ analizowane cechy fenotypowe są plastyczne i wykazują zmienność w zależności od warunków środowiska. Te niedogodności w drugiej połowie XX wieku stały się powodem intensywnego poszukiwania i rozwoju technik umożliwiających wyznaczenie stopnia pokrewieństwa bakterii. Rozpoczęto nową erę ustalania powiązań filogenetycznych w oparciu o dane molekularne, tj. izoenzymy (Selander i wsp., 1986), sekwencje nukleotydów kwasów nukleinowych (RNA i/lub DNA) (Seo i Yokota, 2003) oraz aminokwasów w łańcuchach białkowych (Pastor i wsp., 1990). Opracowywanie kolejnych technik pokazało, że najbardziej miarodajne dane uzyskuje się poprzez analizę sekwencji genów kodowanych na chromosomie

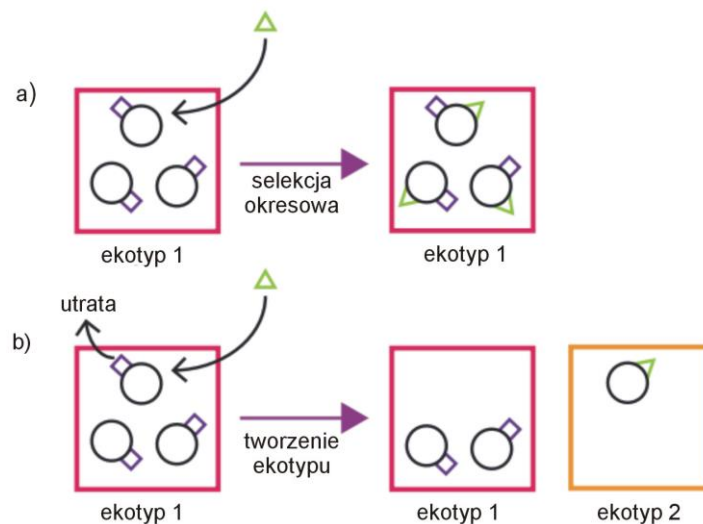
bakteryjnym, w tym typowania na podstawie składu nukleotydowego kilku genów metabolizmu podstawowego (*ang.* Multi Locus Sequence Typing) (Maiden i wsp., 1998).

Koncepcja MLST opiera się na sekwencjonowaniu fragmentów siedmiu genów metabolizmu podstawowego, przy czym u różnych gatunków są analizowane inne loci. Następnie każdej nowej, unikatowej sekwencji w obrębie każdego z genów nadawany jest numer allelu. Kombinację konkretnych alleli ze wszystkich loci łączy się w tzw. profil alleliczny i przypisuje numeryczne oznaczenie typu sekwencji (*ang.* sequencing type, ST). Wszystkie nowe allele analizowanych fragmentów genów oraz typy sekwencyjne są deponowane w ogólnodostępnej bazie MLST (www.mlst.net). Udostępnianie tego typu sekwencji umożliwiło m.in. porównywanie i analizowanie zgromadzonych danych w aspekcie międzykontynentalnym. MLST jest doskonałym narzędziem do analizowania powiązań filogenetycznych, polimorfizmu genetycznego oraz struktury genetycznej badanej populacji (Drewnowska i Świąćicka, 2013; Tanabe i wsp., 2007) i z tego względu zostały zastosowane w niniejszej pracy.

7.3. Ekotypowy charakter populacji bakteryjnych a filogeneza

Bakterie charakteryzuje naturalna zmienność sekwencji DNA chromosomu bakteryjnego., czego efektem jest dynamiczna i zróżnicowana pula genowa, umożliwiająca przetrwanie komórek bakteryjnych w warunkach stresowych. Jednym z czynników, oprócz m.in. rekombinacji i mutacji, wpływających na kompozycję nukleotydową chromosomu bakteryjnego, jest oddziaływanie czynników środowiskowych (Cohan i Koeppel, 2008; Connor i wsp. 2010). Dotychczasowe badania udowodniły, że wpływ na kształtowanie zmienności w obrębie populacji glebowych mają m.in. poziom zasolenia, potencjał wodny, ilość substancji organicznych w podłożu lub ekspozycja na światło (Ceuppens i wsp., 2013; Cohan i Koeppel, 2008; Drewnowska i Świąćicka, 2013). Zatem w celu zrozumienia powiązań filogenetycznych wynikających z różnorodności genetycznej, należy uwzględnić czynniki ekologiczne oddziałujące na badaną grupę. Takie podejście umożliwia ujawnianie ekologicznych aspektów wczesnych rozbieżności w historii ewolucyjnej badanej grupy oraz pomaga w wyjaśnianiu źródeł różnorodności bakteryjnej (Connor i wsp., 2010).

W wyznaczaniu powstawania linii filogenetycznych ważne jest identyfikowanie pierwszych zmian ekologicznych odróżniających rozbieżne ścieżki ewolucyjne. Propozycją, która ułatwia zrozumienie tego zagadnienia było wprowadzenie pojęcia *ekotypu* (Cohan i Perry, 2007), mającego na celu podkreślenie ekologicznego wymiaru specjacji. Przyjęto, że ekotyp to ekologicznie jednorodna subpopulacja danego gatunku, której różnorodność jest ograniczana siłą kohezji, selekcją okresową i/lub dryfem genetycznym (Wiedenbeck i Cohan, 2011). Powstawanie nowych ekotypów jest następstwem zachodzenia korzystnych zmian (rekombinacji, mutacji) w obrębie genotypu, pozwalających na zajęcie nowej niszy ekologicznej. Co więcej, dywergencja nowego wariantu ekotypu możliwa jest po przejściu kompromisu z wyjściowym ekotypem w zakresie dostosowania. W konsekwencji nie dochodzi do konkurencji z ekotypem macierzystym w starej niszy (Wiedenbeck i Cohan, 2011). Należy jednak mieć na względzie, że działająca na ekotypy selekcja okresowa faworyzuje warianty (tzw. mutanty adaptacyjne) najlepiej dostosowane do warunków środowiska (Ward 2006). Wynikiem działania tego zjawiska, oprócz usuwania różnorodności w obrębie ekotypu, jest dominacja osobników nowego typu. Co istotne, nie wpływa to na polimorfizm innych ekotypów, ponieważ odrębne ekotypy ze sobą nie konkurują. Dodatkowo, cykl selekcji okresowych zapewnia istnienie siły kohezji (spójności) i w efekcie utrzymywanie integralności w obrębie każdej subpopulacji. W dywergencji nowych ekotypów ważną rolę odgrywa horyzontalny transfer genów (HTG) (Wiedenbeck i Cohan, 2011). Badania pokazały, że zyskanie nowej, przydatnej funkcji ekologicznej przez biorcę (*ang. recipient*) w wyniku tego zjawiska, może być przyczyną wystąpienia selekcji okresowej, utrwalającej tę cechę (Ryc. 1a). Niewykluczone, że w innym wariantcie nabyta cecha jest bardziej korzystna od już istniejącej (Ryc. 1b). W konsekwencji prowadzi to do rozdzielania się osobników o zróżnicowanych cechach przystosowawczych do osobnych ekotypów.



Ryc. 1. Zmiany nisz ekologicznych jako konsekwencje horizontalnego transferu genów. Na podstawie Wiedenbeck i Cohan'a 2011.

Jednymi z pierwszych organizmów prokariotycznych, dla których wykazywano adaptację do konkretnych mikrosiedlisk były bakterie *Bacillus simplex* i *Bacillus subtilis-Bacillus licheniformis* izolowane z gleby z północnego oraz południowego stoku tzw. „Kanyon Ewolucyjnego” w północnym Izraelu. W tych badaniach, kształtowanie oddzielnych ekotypów zależało od ekspozycji słonecznej stoku oraz tekstury/rodzaju gleby stoków (Cohan i Koeppel, 2008). Co ważne, oprócz izolatów glebowych, analizowano także inne bakterie pod kątem przystosowania do różnorodnych środowisk w celu potwierdzenia teorii ekotypów, m.in. *Synechococcus* z gorących źródeł Parku Yellowstone (Ward 2006) czy *Mycobacterium tuberculosis* od różnych gospodarzy (Smith i wsp., 2006).

Przypisanie poszczególnych izolatów do swoistych domniemanych ekotypów wymaga dodatkowych analiz. W 2008 roku Koeppel i współpracownicy wykazali, że rozdział bakterii do osobnych ekotypów nie może zostać przeprowadzony tylko i wyłącznie na podstawie drzewa filogenetycznego. Powodem była niejasność, na którym poziomie pokrewieństwa można oszacować czy odrębne badane izolaty można już sklasyfikować jako ekologicznie odrębne subpopulacje. Tym samym zaproponowano stosowanie m.in. algorytmu Ecotype Simulation (ES), w celu wyodrębniania w badanej grupie bakterii oddzielnych ekotypów. Założono, że podstawą jest oszacowanie powiązań filogenetycznych pomiędzy analizowanymi bakteriami na podstawie sekwencji nukleotydowych. Algorytm przewiduje historię ewolucyjną badanych organizmów z uwzględnieniem stopnia formowania ekotypów

(ang. ecotype formation, EF), selekcji okresowej (ang. periodic selection, PS) oraz dryfu genetycznego (ang. drift, D). Na podstawie danych poddanych symulacji za pomocą algorytmu ES, przewidywane są substytucje nukleotydowe w obrębie danego kladu a następnie rozdział jego członków na domniemane ekotypy (PE). Stwierdzono, że szczególnie ważne jest stosowanie teorii ekotypów dla trudnych do odróżnienia i bliskospokrewnionych bakterii np. w obrębie grupy *B. cereus* (Cohan i Perry, 2007; Drewnowska i Świąćicka, 2013). Jednakże należy pamiętać, że ekologiczna odrębność, którą się obserwuje, jest zawsze ściśle związana z środowiskiem/sposobami życia.

7.4. Zmienność genetyczna a struktura populacji

W przystosowywania się bakterii do zmieniających się warunków środowiska, poza mutacjami i rekombinacjami, istotną funkcję pełnią inne mechanizmy modulujące ich zmienność genomową. Oprócz zwiększania lub zmniejszania ilości informacji genetycznej w obrębie genomu, bardzo ważną rolę odgrywają też rearanżacje genetyczne.

Jednym z podstawowych i rozpowszechnionych mechanizmów umożliwiającym nabywanie nowych genów jest horyzontalny transfer genów (ang. horizontal gene transfer, HTG). Polega na wprowadzaniu do genomu elementów genetycznych od innych bakterii lub z otoczenia na drodze koniugacji, transdukcji albo transformacji (Kasprzykowska i Sobieszkańska, 2014). Dane literaturowe wskazują, że u bakterii ogromne znaczenie odgrywa proces koniugacji, podczas którego dochodzi do wymiany mobilnych elementów genomu, czyli plazmidów. Pomimo że, plazmidy nie są niezbędne do przeżycia „gospodarzy”, to przenoszą geny warunkujące wiele istotnych cech ułatwiających przystosowanie do warunków środowiskowych oraz konkurencję z innymi bakteriami w danej niszy (Dziewit i Bartosik, 2011). Dotychczas wykazano, że pomiędzy laseczkami *B. cereus s.l.* również dochodzi do przepływu plazmidów (Adams i wsp., 2014). O nasileniu koniugacji w tej grupie bakterii świadczy występowanie homologów plazmidów typu pXO1 i pXO2 *B. anthracis* u innych przedstawicieli *B. cereus s.l.* z różnych środowisk (Świąćicka i wsp., 2013; Adams i wsp., 2014; Bartoszewicz i Marjańska, 2017). Przepływ tego rodzaju plazmidów budzi pewnego rodzaju obawę, gdyż u *B. anthracis* zlokalizowane są na nich geny kodujące determinanty zjadliwości węglkowej (odpowiednio: pXO1 – czynnik obrzęku (EF), letalnego (LF) i antygen ochronny (PA); pXO2 – otoczka poli-D-glutaminowa). Zauważono, że doskonałym sposobem na identyfikację obecności tego typu plazmidu w genomie bakteryjnym jest potwierdzenie obecności genów kodujących białka inicjacji ich replikacji, tj. *repX* dla pXO1 oraz *repA_N* dla pXO2 (Mock i Fouet, 2001). Badania wykazały, że akurat

ten region plazmidów charakteryzuje się wysokim poziomem konserwatywności i jest celnym markerem molekularnym do wyznaczania frekwencji plazmidów typu pXO1 i pXO2.

Badania natury plazmidów pXO2 (przenosi jedną z głównych determinant zjadliwości węglikowej – gen kodujący otoczkę poli-D-glutaminową - która chroni bakterie *B. anthracis* w organizmie gospodarza przed fagocytozą) ujawniły, że należy on do dużej rodziny plazmidów koniugacyjnych pAM β 1, charakteryzujących się systemem replikacji typu *theta*. Zawsze rozpoczyna się ona w miejscu inicjacji replikacji zwanym *ori* (*ang.* origin) (Bruand i wsp., 1993). Co więcej, przeprowadzone dotychczas badania regionu odpowiadającego za powielenie tego plazmidu, ujawniły, że kolejnym elementem niezbędnym do tego procesu jest tzw region CT, regulujący transkrypcję genu *repA_N* na zasadzie antysensownego RNA (Bruand i Ehrlich, 1998). Dotychczasowe analizy molekularne (Tinsley i wsp., 2004; Tinsley i Khan, 2007) pokazały, jak zorganizowany jest całe replikon plazmidu typu pXO2. Jednakże dotychczas nie przeprowadzono badań replikonu typu plazmidów u środowiskowych izolatów *B. cereus*, w odróżnieniu do plazmidów typu pXO1 (Bahl i Rosenberg, 2010).

Efektom działania procesów ewolucyjnych i czynników ekologicznych jest kształtowanie genetycznej struktury populacji (Greenbaum i Fefferman, 2017). MLST, bazujące na sekwencjach nukleotydowych fragmentów genów metabolizmu podstawowego, to bardzo dobre źródło informacji o architekturze genetycznej badanych populacji bakteryjnych (Song i wsp., 2016; Liu i wsp., 2017). Analiza składu nukleotydowego umożliwia również uzyskanie odpowiedzi na pytanie, jakie procesy wpływają na ukształtowanie charakterystycznych dla badanej grupy powiązań genetycznych. W tym zakresie szczególne znaczenie ma zaproponowany przez Feila i współpracowników (2004) algorytm eBURST. Zastosowanie go do analizy danych MLST umożliwia wyznaczenie genotypu założycielskiego i wyznaczenie kompleksów klonalnych w obrębie analizowanej populacji (na kompleks klonalny składa się genotyp dominujący i inne blisko z nim spokrewnione genotypy – typy sekwencyjne posiadające sześć lub siedem identycznych alleli w obrębie badanych genów metabolizmu podstawowego). Wyznaczenie w ten sposób struktury genetycznej populacji bakteryjnej zyskało ogromne uznanie wśród naukowców. Umożliwiło zbadanie sposobu różnicowania się klonów i identyfikację kompleksów klonalnych o szczególnym znaczeniu klinicznym m.in. *Streptococcus pneumoniae* bądź *Campylobacter jejuni* (Feil i wsp., 2004).

Przeprowadzone dotychczas badania w obrębie grupy *B. cereus* wykazywały występowanie zarówno kompleksów klonalnych (*ang.* clonal complex, CC) oraz singletonów (S) (Cardazzo i wsp., 2008; Drewnowska i Świąćicka, 2013; Bartoszewicz i Marjańska, 2017). Badania nad *B. cereus* izolowanymi z żywności przez Cardazzo i współpracowników (2008) ujawniły, że

przejawiają one podobną tendencję zarówno do tworzenia kompleksów klonalnych jak też też singletonów (izolaty posiadające mniej niż sześć wspólnych alleli genów metabolizmu podstawowego). Wartości współczynników asocjacji (I_A^S) oraz współczynników mutacji niesynonimowych do synonimowych (dN/dS) otrzymane w badaniach Drewnowskiej i Święcickiej (2013) jednoznacznie sugerowały klonalną strukturę genetyczną glebowych izolatów z grupy *B. cereus*. Pozostawało to w sprzeczności z wynikami uzyskanymi za pomocą algorytmu eBURST, który wyznaczył również dużą ilość singletonów (19 kompleksów klonalnych i 80 singletonów) oraz różnorodnością ekologiczną pomiędzy blisko spokrewnionymi izolatami. Jest to najprawdopodobniej wynik genetycznej dywersyfikacji umożliwiającej przystosowywanie się do różnych nisz ekologicznych. Co ważne, podobne obserwacje co do ekotypowej struktury populacji wykazała także Hu wraz z współpracownikami (2009 a).

Ze względu na szeroką płaszczyznę oddziaływania izolatów *B. cereus* z wieloma dziedzinami życia człowieka, wyznaczenie zależności filogenetycznych pomiędzy przedstawicielami tego gatunku z różnych lokalizacji jest konieczne. Dodatkowo, dzięki rekonstrukcji filogenetycznej można wyznaczyć różnorodność w obrębie oraz pomiędzy badanymi populacjami (Ramette i wsp., 2009). Ostatnie badania mające na celu oszacowanie powiązań w obrębie omawianej grupy dowodzą, jak nadal ważne do ustalenia oraz istotne jest to zagadnienie (Liu i wsp., 2017; Yang i wsp., 2017; Méric i wsp., 2018).

8. CELE BADAWCZE I HIPOTEZY

Najczęstszym celem badań *B. cereus* są właściwości patogenne oraz aktywność biochemiczna w produktach spożywczych, głównie mleku oraz jego przetworach. Z tego względu w literaturze przedmiotu zazwyczaj są opisywane pojedyncze szczepy, powiązane z przypadkami chorobowymi. Tymczasem w odniesieniu do badań populacyjnych analizowane są jedynie pojedyncze, najczęściej małe populacje. W istocie obecnie brak jest wyczerpujących danych na temat zmienności genomowej i powiązań filogenetycznych pomiędzy środowiskowymi laseczkami *B. cereus* w aspekcie międzykontynentalnym. Jest to niezmiernie istotne zagadnienie ze względu na powszechność ich występowania i potencjalne znaczenie sanitarno – epidemiologiczne oraz wpływ na zdrowie człowieka.

Głównymi celami badań przeprowadzonych na czterech izolowanych geograficznie glebowych populacjach *B. cereus* z różnych kontynentów było oszacowanie stopnia polimorfizmu genetycznego, struktur genetycznych poszczególnych populacji oraz rekonstrukcja powiązań filogenetycznych tych bakterii także w ujęciu międzykontynentalnym. Dodatkowym celem było ustalenie domniemanych ekotypów. W biologii *B. cereus* dużą rolę odgrywają plazmidy. Z tego względu za cel postawiono też oszacowanie frekwencji i wybranych właściwości plazmidów typu pXO1 i pXO2 wśród badanych izolatów *B. cereus*.

W celu realizacji powyższych zadań, założono następujące hipotezy badawcze:

Hipoteza 1:

Odległe geograficznie glebowe izolaty *B. cereus* są polimorficzne i wykazują tendencję do formowania odrębnych linii filogenetycznych.

Hipoteza 2:

Izolaty *B. cereus* z różnych lokalizacji geograficznych są nosicielami plazmidów typu pXO1 i pXO2 charakterystycznych dla *B. anthracis*. U izolatów *B. cereus* odległych geograficznie struktura replikonu plazmidów typu pXO2 jest zbliżona.

9. MATERIAŁY I METODY

9.1. Odczynniki chemiczne oraz podłoża mikrobiologiczne zastosowane w badaniach

Tabela 1. Bufory

Oznaczenie	Bufor	Skład ^a
B1	TBE	100 mM kwas borowy 0,2 mM EDTA 100 mM Tris
B2	TE pH=7,5	1 mM EDTA 10 mM Tris
B3	SE pH=7,5	25 mM EDTA N ₂ 75 mM NaCl
B4	Bufor lizujący	2 mM EDTA 20 mg/ml lizozym 20 mM Tris-HCl pH=8,0 1,2% Triton X-100
B5	Bufor lizujący PFGE pH=9,5	500 mM EDTA 1% N-laurosarkozyl

^a do przygotowania buforów zastosowano odczynniki Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone.

Tabela 2. Agarozy

Oznaczenie	Agaroza	Producent
A1	Agaroza Basica LE	Prona, Hiszpania
A2	Agaroza Plus	Prona, Hiszpania
A3	LMP (<i>ang.</i> Low Melting Point)	Sigma-Aldrich

Tabela 3. Wzorce wielkości fragmentów DNA

Oznaczenie	Marker	Producent
W1	GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific ^a
W2	GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
W3	Lambda PFG Ladder	NEB ^b
W4	Yeast Chromosome PFG Marker	NEB

^aThermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone;

^bNew England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts, Stany Zjednoczone.

Tabela 4. Podłoża mikrobiologiczne

Oznaczenie	Podłoże mikrobiologiczne	Producent
P1	Agar Luria-Bertani (agar LB)	A&A Biotechnology, Gdynia, Polska
P2	Bulion Luria-Bertani (bulion LB)	A&A Biotechnology
P3	Podłoże do przechowywania izolatów bakteryjnych (bulion odżywczy i glicerol, v:v 1:1)	Biocorp, Warszawa, Polska Sigma-Aldrich

Tabela 5. Enzymy

Oznaczenie	Enzym	Producent
E1	<i>NotI</i>	Thermo Fisher Scientific
E2	lizozym	Sigma-Aldrich
E3	proteaza	Sigma-Aldrich
E4	polimeraza Taq	Thermo Fisher Scientific
E5	RNAza	Thermo Fisher Scientific

Tabela 6. Inne odczynniki

Oznaczenie	Odczynnik	Producent
O1	Anode Buffer Container 3500 Series	Applied Biosystems, Kalifornia, Stany Zjednoczone
O2	Cathode Buffer Container 3500 Series	Applied Biosystems
O3	dNTP	Thermo Fisher Scientific
O4	etanol	Sigma-Aldrich
O5	izopropanol	Sigma-Aldrich
O6	Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics Europe, Dueren, Niemcy
O7	Polimer POP-7	Applied Biosystems
O8	woda jałowa	A&A Biotechnology

Tabela 7. Zestawy odczynników

Oznaczenie	Nazwa zestawu	Producent
Z1	Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Z2	CleanUp	A&A Biotechnology
Z3	DNeasy Blood & Tissue kit	Qiagen
Z4	ExTerminator	A&A Biotechnology
Z5	High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Z6	HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen
Z7	SYBR® Green PCR Master Mix	A&A Biotechnology
Z8	Total RNA Mini Kit	A&A Biotechnology
Z9	Ion Xpress Plus Fragments Library Kit	Applied Biosystems
Z10	E-Gel Size Select 2%	Applied Biosystems
Z11	Ion Library Quantitation Kit	Applied Biosystems
Z12	Ion PGM Template OT2 200 Kit	Applied Biosystems
Z13	Ion PGM Enrichment Beads	Applied Biosystems
Z14	Ion PGM 200 Sequencing Kit	Applied Biosystems
Z15	Ion 314 Chip Kit v2	Applied Biosystems

Tabela 8. Pary starterów PCR zastosowane w badaniach

Para	Nazwa genu	Sekwencja startera ^a	Temperatura przyłączenia (°C)	Wielkość produktu (pz)	Referencje
Startery zastosowane do typowania szczepów metodą MLST					
S1	<i>glpF</i>	5'-GCGTTTGTGCTGGTGTAAGT-3' 5'-CTGCAATCGGAAGGAAGAAG-3'	59	372	http://www.mlst.net
S2	<i>gmk</i>	5'-ATTTAAGTGAGGAAGGGTAGG-3' 5'-GCAATGTTCACCAACCACAA-3'	56	504	http://www.mlst.net
S3	<i>ilvD</i>	5'-CGGGGCAAACATTAAGAGAA-3' 5'-GGTTCTGGTCGTTTCCATTC-3'	58	393	http://www.mlst.net
S4	<i>pta</i>	5'-GCAGAGCGTTTAGCAAAAGAA-3' 5'-TGCAATGCGAGTTGCTTCTA-3'	56	414	http://www.mlst.net
S5	<i>pur</i>	5'-CTGCTGCGAAAAATCACAAA-3' 5'-CTCACGATTCGCTGCAATAA-3'	56	348	http://www.mlst.net
S6	<i>pycA</i>	5'-GCGTTAGGTGGAAACGAAAG-3' 5'-CGCGTCCAAGTTTATGGAAT-3'	57	363	http://www.mlst.net
S7	<i>tpi</i>	5'-GCCCAGTAGCACTTAGCGAC-3' 5'-CCGAAACCGTCAAGAATGAT-3'	58	435	http://www.mlst.net
Startery zastosowane do wyznaczenia frekwencji analizowanych determinant genetycznych i/lub ich ekspresji:					
S8	<i>udp^b</i>	5'ACTAGAGAAACTTGGAATGATCG-3' 5'-GACGCTTAATTGCACGGAAC-3'	57	101	Reiter i wsp., 2011
S9	<i>repA^b</i>	5'-GGACARGCTTCTCACTGGAC-3' 5'-GGCATTCTGAAGAAVCCAAA-3'	58	346	Kamińska i wsp., 2015
S10	<i>repX^b</i>	5'-CAGTTGTTGCAGGACTTCCA-3' 5'-TCTTTGCTGGTTGTGAATCG-3'	57	188	Kamińska i wsp., 2015
S11	<i>repX^c</i>	5'-CCATATCGTGCGATTCTTG-3' 5'-GATAATTTCTTCTTTGYTGGTTGTGA-3'	54	1163	Hu i wsp., 2009
S12	<i>repX^c</i>	5'-CCATATCGTGCGATTCTTG-3' 5'-GAGCAAATTCACCTCGCATCA-3'	52	583	Hu i wsp., 2009 (b)
S13	<i>repA^c</i>	5'-TAAATCTAAAAAYTCRAAAGCTG-3' 5'-GTGTAAAGTATAGCACAGGT-3'	52	1183	Hu i wsp., 2009 (b)

S14	<i>repA</i> ^c	5'-GGACARGCTTCTCACTGGA-3' 5'-GGCATTCTGAAGAAVCCAAA-3'	58	386	Hu i wsp., 2009 (b)
S15	<i>cap</i> ^c	5'-GAAATAGTTATTGCGATTGG-3' 5'-GGTGCTACTGCTTCTGTACG-3'	57	873	Fasanella i wsp., 2001
S16	<i>cya</i> ^c	5'-CAGCATGCGTTTTCTTTAGC-3' 5'-CCCTTAGTTGAATCCGGTTT-3'	60	929	Fasanella i wsp., 2001
S17	<i>lef</i> ^c	5'-GGATATGAACCCGTA CTTGTA A-3' 5'-TAAATCCGCACCTAGGGTTGC-3'	60	993	Fasanella i wsp., 2001
S18	<i>pag</i> ^c	5'-CAGAATCAAGTTCCCAGGGG-3' 5'-TCGGATAAGCTGCCACAAGG-3'	64	747	Fasanella i wsp., 2001

^a W=A lub T; Y=C lub T; R=A lub G; V=A lub G lub C; H=A lub C lub T; D=A lub G lub T; S=G lub C;
K=G lub C; N=A lub G lub C lub T; B=G lub C lub T;

^b analizy ekspresji genu metodą qPCR;

^c obecność i frekwencja genu.

9.2. Szczepy bakteryjne

Łącznie badano 161 losowo wybrane izolaty z puli 713 *B. cereus sensu stricto* (zwanymi dalej *B. cereus*), wyizolowanych z prób gleby pozyskanych z różnych lokalizacji geograficznych (Tabela 9) i zdeponowanych w Kolekcji Mikroorganizmów Zakładu Mikrobiologii UwB, stosując oznaczenia: Argentyna (AR), Kazachstan (AY), Park Narodowy Shimba Hills (SH), Park Narodowy Tsavo East (TE), Biebrzański Park Narodowy (BB), Białowieski Park Narodowy (BPN), gospodarstwo rolne w Jasienówce (JAS). Do analiz włączono siedem szczepów referencyjnych *B. cereus s.l.* z kolekcji międzynarodowych i jeden szczep referencyjny z kolekcji Zakładu Mikrobiologii UwB (Tabela 10).

Szczegółowy wykaz szczepów poddanych badaniom wraz z informacjami o pochodzeniu i charakterystycznych cechach zamieszczono w Tabeli S1 w załącznikach.

Tabela 9. Pochodzenie oraz liczba glebowych izolatów *B. cereus* poddanych badaniom

Pochodzenie prób gleby	Liczba izolatów ^a
Argentyna	200 (23)
Kazachstan	199 (46)
Kenia	211 (42)
Polska	103 (50)

^a w nawiasach podano liczbę izolatów zastosowanych w badaniach polimorfizmu genetycznego, struktury populacji oraz filogenezy.

Tabela 10. Szczepy referencyjne *B. cereus s.l.* zastosowane w badaniach

Szczep	Gatunek ^a	Pochodzenie
ATCC10987	<i>B. cereus sensu stricto</i>	American Type Culture Collection
ATCC14579	<i>B. cereus sensu stricto</i>	American Type Culture Collection
IS195	<i>B. thuringiensis</i>	Kolekcja Zakładu Mikrobiologii UwB
DSMZ12442	<i>B. pseudomycooides</i>	German Collection of Microorganism and Cell Collection
HD1	<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus</i> Genetic Stock Centre
HD73	<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus</i> Genetic Stock Centre
DSMZ11821	<i>B. weihenstephanensis</i>	German Collection of Microorganism and Cell Collection
WSBC10364	<i>B. weihenstephanensis</i>	Weihnstephan <i>Bacillus</i> Collection

^a w najnowszych danych literaturowych (Liu i wsp., 2018) zaproponowano reklasyfikację *B. weihenstephanensis* do *B. mycooides*. Jednak ze względu na (i) małą ilość doniesień literaturowych oraz (ii) przypisywanie w trakcie wcześniejszych badań szczepom wówczas obowiązujących nazw gatunkowych przy zgłoszeniach sekwencji nukleotydów do bazy MLST, w pracy posługiwano się dotychczas stosowaną nomenklaturą.

9.3. Metody

9.3.1. Startowe kultury bakterii

Izolaty i szczepy bakteryjne przechowywane w temperaturze -80°C w podłożu P3 (Tabela 4) wysiewano na podłoże P1 (Tabela 4), stosując posiew redukcyjny i inkubowano ok. 16h w temperaturze 30°C . Kultury bakterii przechowywano w 4°C , stosując do kolejnych eksperymentów. Kultury płynne uzyskiwano poprzez posiew bakterii z podłoża P1 do 3 ml podłoża P2 (Tabela 4) i inkubację przez 12-16h (w zależności od wykonywanych analiz) przy wytrząsaniu 180 obr./min. W celu uzyskania odpowiedniej gęstości optycznej OD (*ang.* optical density), próby rozcieńczano sterylną pożywką P2. Wartość OD wyznaczano przy użyciu spektrofotometru V-670 (Jasco International Corporation, Japonia) przy długości fali świetlnej 600 nm.

9.3.2. Izolacja DNA genomowego

Genomowe DNA analizowanych izolatów i szczepów szczepów *B. cereus* izolowano z płynnych kultur bakteryjnych za pomocą zestawu Z3 (Tabela 7), zgodnie z instrukcją dla bakterii Gram-dodatnich. Izolację DNA rozpoczynano od wirowania 2,5 ml nocnej kultury badanych bakterii (10 minut, $2\ 000 \times g$) i zawieszenia osadu komórek w 180 μl buforu B4 (Tabela 1). Zawiesinę bakterii inkubowano przez 30 minut w 37°C , po czym do mieszaniny dodawano 200 μl buforu AL (dołączony do zestawu) oraz 25 μl proteinazy K (dołączona do zestawu) i worteksowano. Ponownie przeprowadzano 30 minutową inkubację w 56°C , po której dodawano 200 μl 96% etanolu (O4, Tabela 6) i worteksowano. Otrzymane mieszaniny przenoszono na kolumny ze złożem krzemionkowym (dołączone do zestawu) i wirowano (1 min.; $6\ 000 \times g$). Następnie DNA osadzone na złożu płukano buforami dołączonymi do zestawu według następującej kolejności: (1) 0,5 ml buforu AW1, wirowanie 1 minutę przy prędkości $6\ 000 \times g$; (2) 0,5 ml buforu AW2, wirowanie 3 minuty przy prędkości $20\ 000 \times g$. DNA wypłukiwano z oczyszczonych złożów krzemionkowych poprzez naniesienie do kolumn 200 μl buforu AE (dołączony do zestawu) i wirowanie przez 1 minutę przy prędkości $6\ 000 \times g$. Stężenie i czystość wyizolowanego DNA oceniano spektrofotometrem NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

9.3.3. Wyznaczenie stopnia polimorfizmu genetycznego, struktur populacji oraz filogenezy *B. cereus* na podstawie fragmentów sekwencji nukleotydowych siedmiu genów metabolizmu podstawowego

9.3.3.1. Amplifikacja fragmentów genów metabolizmu podstawowego

W celu wyznaczenia sekwencji nukleotydowych fragmentów siedmiu genów metabolizmu podstawowego (*glpF* – gen kodujący glikoproteinę AGP, *gmk* – gen kodujący kinazę guanylową, *ilvD* – gen kodujący dehydratazę dihydroksykwasów, *pta* – gen kodujący acetylotransferazę fosforanową, *pur* – gen kodujący transformylazę AICAR, *pycA* – gen kodujący karboksylazę pirogronianową, *tpi* – gen kodujący izomerazę triozyfosforanową), zastosowano schemat MLST opracowany dla *B. cereus s.l.* i dostępny w bazie danych pod adresem <http://www.mlst.net/>. Amplifikację DNA metodą PCR przeprowadzano w termocyklerze Veriti 96-Well (Applied Biosystems). Skład mieszanin reakcyjnych przygotowywano zgodnie z opisem w Tabeli 11. Profil termiczny reakcji PCR dla wszystkich siedmiu fragmentów genów różnił się temperaturami przyłączania starterów dla poszczególnych genów (Tabela 8) i miał następujący schemat: 95°C - 3 min.; 30x (95°C - 1 min., T_{przył.} - 1 min., 72°C - 1 min.); 72°C - 2 min.; 4°C - ∞. W badaniach MLST, w przypadku szczepów *B. cereus* wyizolowanych z gleby pobranej w Polsce, wykorzystano sekwencje nukleotydowe opisane przez Drewnowską i Świącicką (2013) zdeponowane w bazach danych pod adresem <https://pubmlst.org/bcereus/>. Z tej samej bazy pobrano też sekwencje nukleotydowe genów *szcepów* referencyjnych.

Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej przy amplifikacji DNA w MLST

L.p.	Składnik mieszaniny reakcyjnej	Objętość (μl)
1	woda podwójnie destylowana (ddH ₂ O)	10,75
2	MgCl ₂ (roztwór 25 mM)	2,0
3	dNTP (roztwór 10 mM w ddH ₂ O)	2,5
4	bufor Taq (10x stężony)	2,5
5	startery przedni (roztwór o stężeniu 10 μM w 10 mM Tris)	2,5
6	startery wsteczny (roztwór o stężeniu 10 μM w 10 mM Tris)	2,5
7	polimeraza Taq (stężenie 1,25 U/μl)	0,25
8	genomowe DNA (1 μg)	2,0
	Całkowita objętość próby	25,0

9.3.3.2. Sekwencjonowanie

Produkty PCR oczyszczono za pomocą zestawu Z2 (Tabela 7) zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta. Do mieszaniny reakcyjnej zawierającej produkt PCR dodawano 125 μl roztworu G (dołączonego do zestawu) i worteksowano. Następnie, całą objętość mieszaniny nanoszono na kolumnkę ze złożem krzemionkowym i wirowano przez 30 s przy prędkości 15 000 x g. Po zakończeniu wirowania, DNA na złożu krzemionkowym dwukrotnie przepłukiwano roztworem płuczającym A1 (dołączony do zestawu) według kolejności: (1) 600 μl i wirowanie 30 s przy 15 000 x g; (2) 300 μl i wirowanie 3 min. przy 15 000 x g. W celu wypłukania DNA ze złoża, na membranę nanoszono 30 μl ddH₂O. Po 3 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, odwirowywano kolumnkę przez 1 min. przy 15 000 x g. W celu potwierdzenia obecności i czystości DNA, 2 μl oczyszczonego produktu PCR rozdzielano elektroforetycznie w 1% agarozie A1 (Tabela 2) i w buforze B1 (Tabela 1). Wielkość otrzymanych fragmentów DNA kontrolowano poprzez stosowanie do elektroforezy wzorca wielkości fragmentów DNA W1 (Tabela 3). W celu detekcji fragmentów DNA do żelu dodawano odczynnik O6 (Tabela 6) w stężeniu zgodnym z zaleceniami producenta. Oczyszczone DNA stanowiło matrycę do PCR sekwencyjnego, który przeprowadzano w termocyklerze Veriti 96-Well, stosując zestaw odczynników Z1 (Tabela 7) o składzie mieszaniny reakcyjnej przedstawionej w Tabeli 12. Stosowano profil termiczny PCR sekwencyjnego o następujących parametrach: 96°C - 2 min.; 30 x (95°C - 30 s, 50°C - 10 s, 60°C - 4 min.); 4°C - ∞ .

Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR sekwencyjnego

L.p.	Składnik mieszaniny reakcyjnej	Objętość (μl)
1	woda podwójnie destylowana (ddH ₂ O)	4,0
2	bufor reakcyjny (5x stężony)	1,0
3	mieszanina reakcyjna (2,5x stężona)	2,0
4	starter (roztwór 3,2 μM w ddH ₂ O)	1,0
5	matryca DNA (produkt PCR)	2,0
	Całkowita objętość próby	10,0

Produkty PCR oczyszczano za pomocą zestawu Z4 (Tabela 7). Procedurę rozpoczynano od dodania do mieszaniny reakcyjnej 5 μ l roztworu Mix Blue (dołączony do zestawu) oraz 100 μ l roztworu wiążąco-płuczającego WP (dołączony do zestawu), po czym delikatnie mieszano przez pipetowanie. Następnie, całą objętość próby przenoszono na kolumnę i odwirowywano przez 30 s przy 15 000 x g i ponownie płukano DNA na złożu krzemionkowym 400 μ l roztworu wiążąco-płuczającego WP. Po 2 minutowym odwirowaniu przy 15 000 x g, na złoże наносzono 25 μ l wody wolnej od nukleaz (dołączona do zestawu) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 minuty. Ostatnie wirowanie (1 min., 15 000 x g) umożliwiała wypłukanie DNA z podłoża. Oczyszczony produkt PCR sekwencjonowano w sekwencjonatorze kapilarnym ABI3500 (Applied Biosystems), przy użyciu buforów O1 i O2 oraz odczynnika O7 (Tabela 6).

9.3.3.3. Analiza sekwencji nukleotydowych

W celu oszacowania stopnia polimorfizmu genetycznego badanych sekwencji zastosowano program DNASp5 v.5.0. Z kolei wyznaczenie struktur genetycznych populacji odbyło się za pomocą programu PHYLoViZ v.1.0. Sekwencje nukleotydowe badanych fragmentów genów analizowano również za pomocą programów Chromas Lite 2.1 i BioEdit v.7.0.5. Typy sekwencyjne ST (*ang.* sequence type) wyznaczono w systemie dostępnym pod adresem <http://www.mlst.net/>. Alignmenty połączonych fragmentów siedmiu genów o łącznej długości 2829 par zasad (pz) posłużyły konstrukcjom drzew filogenetycznych metodą „łączenia sąsiadów” (*ang.* neighbour-joining) przy zastosowaniu programu MEGA6. Szacowanie wiarygodności uzyskanych wyników przeprowadzono testem samopróbkowania (*ang.* bootstrap) przy 1 000 przyrównań sekwencji (replikacji). Szczep *B. pseudomycooides* DSMZ12442 stosowano we wszystkich analizach filogenetycznych jako grupę zewnętrzną (*ang.* outgroup).

9.3.4. Podział glebowych izolatów *B. cereus* na domniemane ekotypy

Sekwencje nukleotydowe typów sekwencyjnych (ST) *B. cereus* oraz szczepu referencyjnego *B. pseudomycooides* DSMZ12442 (sekwencja nukleotydowa ST pobrana z bazy danych PubMLST pod adresem <http://pubmlst.org/bcereus>), poddano dwuetapowej analizie za pomocą algorytmu Ecotype Simulation (<http://fcohan.web.wesleyan.edu/ecosim/>; Koepfel i wsp., 2008). W pierwszym etapie obliczono wartości współczynników σ (częstości selekcji okresowej), Ω (formowania ekotypów), d (dryfu genetycznego) oraz n (liczbę domniemanych ekotypów) z 95% przedziałem ufności, zgodnie z wytycznymi Koepfela i współpracowników (2008). Następnie wyselekcjonowano domniemane ekotypy (PE) na podstawie zaleceń Cohana i Perry’ego (2007).

9.3.5. Elektroforeza fragmentów genomowego DNA *B. cereus* w zmiennym pulsowo polu elektrycznym

9.3.5.1. Przygotowanie bloczków agarazowych z genomowym DNA

Płynne, nocne kultury szczepów *B. cereus* przesiewano do 10 ml podłoża P2 (Tabela 4) i inkubowano 4h w 30°C, przy rotacji 180 obr./min. Po tym czasie kultury odwirowywano (10 min.; 2 000 x g), a osad komórek zawieszano w buforze B3 (Tabela 1) i ponownie odwirowywano (10 min., 2 000 x g). Czynność tę powtarzano dwukrotnie. Po ustaleniu gęstości zawiesiny bakteryjnej na poziomie OD₅₉₀=2 (spektrofotomer Jasco V-670), zawiesinę bakterii mieszano z 2% agarozą A3 (Tabela 2) o temperaturze 50°C w stosunku objętościowym 1:1. Otrzymanymi mieszaninami napełniano sterylne foremki PFGE (Bio-Rad, Stany Zjednoczone). Po spolimeryzowaniu agarozы otrzymywano bloczki agarozowe z komórkami bakterii, które inkubowano w 1,5 ml buforu B3 (Tabela 1) z lizozymem (E2, Tabela 5) o stężeniu 3 mg/ml w 37°C przez 18h. Po zakończeniu inkubacji bloczki płukano trzykrotnie po 30 minut w 2 ml buforu B2 (Tabela 1) i w temperaturze 4°C. Następnie, przepłukane bloczki inkubowano w 50°C przez 18h w 1,5 ml buforu B5 (Tabela 1) z dodatkiem proteazy (E3, Tabela 5) o stężeniu 1 mg/ml. Po zakończeniu inkubacji usuwano bufor lizujący, a bloczki ponownie płukano trzykrotnie po 30 minut w 2 ml buforu B2 w temperaturze 4°C. Przygotowane w ten sposób bloczki przechowywano do dalszych analiz w buforze B2 w temperaturze 4°C około 3 tygodni.

9.3.5.2. Trawienie genomowego DNA i rozdział elektroforetyczny

DNA badanych bakterii, zawieszane w bloczkach agarozowych (2,5 x 8 mm), poddawano działaniu 30 U enzymu restrykcyjnego E1 z dodatkiem buforu (Tabela 5). Restrykcję prowadzono przez 2,5h w 37°C w objętość próby 50 µl, po czym działanie enzymu blokowano przez zastąpienie mieszaniny reakcyjnej 1 ml buforu B2 i 5 min. inkubacją w 50°C. Fragmenty DNA rozdzielano elektroforetycznie w 1% agarozie A2 (Tabela 2) oraz w 0,5-krotnie stężonym buforze B1 (Tabela 1) w temperaturze 14°C, w obecności markerów W3 i W4 (Tabela 3) w aparacie Cheef Mapper® XA (Bio-Rad). Parametry elektroforezy przedstawiono w Tabeli 13. Po zakończeniu rozdziału żele barwiono 15 min. w roztworze (1 µg/ml) odczynnika O6 (Tabela 6), a następnie płukano w wodzie destylowanej w celu usunięcia odczynnika nieprzyłączonego do DNA. Ułożenie fragmentów DNA obrazowano w aparacie GelDoc® XR System (BioRad).

Tabela 13. Parametry elektroforezy w zmiennym pulsowo polu elektrycznym

Parametr	Wartość parametru
napięcie (V/cm ³)	5,3
czas (h)	22,0
kąt reorientacji (°)	120,0
początkowy czas pulsu (s)	10,0
końcowy czas pulsu (s)	130,0

9.3.6. Projektowanie sekwencji starterów PCR

Startery do amplifikacji badanych genów (frekwencja i ekspresja genów *repA_N* i *repX* szacowana odpowiednio metodą PCR i qPCR) zostały zaprojektowane na podstawie pełnej sekwencji w/w genów dostępnych w bazie danych NCBI (National Center for Biotechnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) przy użyciu funkcji Primer-BLAST. Jakość otrzymanych par starterów oceniano za pomocą programu Primer3 v.0.4.0 w celu wyeliminowania nieprawidłowości i wyboru właściwych parametrów (fragmenty komplementarne, zawartość procentowa par guanina-cytozyna, temperatura topnienia).

9.3.7. Oszacowanie frekwencji wybranych genów

9.3.7.1. Frekwencja genów białek replikacji plazmidów typu pXO1 i pXO2

W celu oszacowania frekwencji genów *repX* i *repA_N*, kodujących białka replikacji plazmidów *B. anthracis* odpowiednio typu pXO1 i pXO2, wśród glebowych izolatów *B. cereus*, przeprowadzono reakcje amplifikacji z polimerazą E4 (Tabela 5) w termocyklerze Veriti 96-Well z parami starterów opisanymi w Tabeli 8. Zastosowano profile termiczne opisane przez Świącicką i wsp. (2013) według schematu przedstawionego w Tabeli 14. W amplifikacji zastosowano mieszaninę reakcyjną o składzie opisanym w punkcie 9.3.3.1. Produkty amplifikacji analizowano w elektroforezie kapilarnej QIAxcel (Qiagen).

Tabela 14. Profile termiczne reakcji amplifikacji genów *repA_N* i *repX*

Para starterów ^a	Wstępna denaturacja	Amplifikacja (30 cykli)	Końcowa elongacja	Przechowywanie
S11	95°C – 5 min.	95°C – 1 min., 54°C – 1 min., 72°C – 1 min. 30 s	72°C - 10 min	4°C - ∞
S12	95°C – 5 min.	95°C – 1 min., 52°C – 1 min., 72°C – 30 s	72°C - 10 min	4°C - ∞
S13	95°C – 3 min.	95°C – 1 min., 52°C – 1 min., 72°C – 1 min. 30 s	72°C - 10 min	4°C - ∞
S14	95°C – 3 min.	95°C – 1 min., 58°C – 1 min., 72°C – 30 s	72°C - 10 min	4°C - ∞

^a numer pary starterów zgodny z Tabelą 8.

9.3.7.2. Frekwencja genów kodujących determinanty wirulencji *B. anthracis*

W celu oszacowania frekwencji genów kodujących czynniki wirulencji *B. anthracis* wśród izolatów *B. cereus repA_N* i/lub *repX*-pozytywnych, wykonano PCR z parami starterów S15, S16, S17 i S18 (Tabela 8). Do przeprowadzenia reakcji zastosowano profile termiczne wg Fasanella i wsp. (2001) oraz mieszaniny reakcyjne o składzie przedstawionym w Tabeli 11. Detekcję produktów amplifikacji przeprowadzono zgodnie z opisem w punkcie 9.3.3.2. Kontrolą pozytywną był wynik reakcji PCR dla w/w par starterów z DNA *B. anthracis* otrzymanego od prof. Jacquesa Mahillona (Universite Catholique de Louvain, Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Louvain-la-Neuve, Belgium)

9.3.8. Szacowanie względnego poziomu ekspresji wybranych genów metodą ilościowego PCR

9.3.8.1. Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja

RNA badanych szczepów uzyskano z 2 ml płynnej kultury nocnej, poddanej wirowaniu (10 min., 2 600 x g; 4°C). RNA izolowano z osadu komórek za pomocą zestawu Z8 (Tabela 7), stosując roztwory i kolumny krzemionkowe dołączone przez producenta. Do osadu komórek dodawano 0,8 ml fenzolu, delikatnie mieszano i inkubowano 5 min w 50°C. Następnie mieszaninę uzupełniano 200 µl chloroformu i ponownie mieszano. Po 5-cio minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, próby wirowano 10 min. przy 15 000 x g, a następnie pobierano 450 µl górnej frakcji supernatantu i łączono z 250 µl izopropanolu. Następnie mieszaninę nanoszono na minikolumny. Po minutowym wirowaniu przy 15 000 x g, dwukrotnie przepłukiwano RNA na złożu minikolumny buforem A1, według kolejności: (1) 700 µl i wirowanie 1 min. przy 15294 x g, (2) 200 µl i wirowanie 2 min. przy 15 000 x g. Na oczyszczone złoża nanoszono 50 µl wody wolnej od RNAz i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 3 minuty. W wyniku odwirowania przez 1 minutę przy 15 000 x g uzyskiwano całkowite RNA. Jakość (stężenie i czystość) wyizolowanego RNA oceniano za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), po czym niezwłocznie przystępowano do reakcji odwrotnej transkrypcji. Przepisanie sekwencji nukleotydów z RNA na cDNA wykonywano za pomocą zestawu Z5 (Tabela 7), stosując mieszaninę reakcyjną o składzie przedstawionym w Tabeli 15. Reakcje przeprowadzano w termocyklerze Veriti 96-Well z profilem termicznym o następujących parametrach: 25°C – 10 min.; 37°C – 120 min.; 85°C – 5 min.; 4°C – 15 min.

Tabela 15. Skład mieszaniny w reakcji odwrotnej transkrypcji

L.p.	Składnik mieszaniny transkrypcyjnej	Objętość (µl)
1	woda podwójnie destylowana wolna od nukleaz	4,2
2	bufor RT (10x stężony)	2,0
3	dNTP (mieszanina 25x stężona; 100µM)	0,8
4	startery (10x stężone)	2,0
5	odwrotna transkryptaza	1,0
6	RNA (2 µg)	10,0
	Całkowita objętość próby	20,0

9.3.8.2. Ilościowy PCR (qPCR)

Ilościowy PCR przeprowadzono zgodnie z wcześniej opracowanym przeze mnie protokołem (Kamińska i wsp., 2014) w termocyklerze Step One Plus Real-Time System (Thermo Fisher Scientific), stosując mieszaninę reakcyjną zestawu Z7 (Tabela 7) o końcowym składzie przedstawionym w Tabeli 16. Profile termiczne reakcji ustalano osobno dla każdego z badanych genów (Tabela 17). Analizę wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej ilościowego PCR

L.p.	Składnik mieszaniny transkrypcyjnej	Objętość (μl)
1	Master Mix SYBR A (2x stężony)	10,0
2	dd H ₂ O (wolna od nukleaz)	4,0
3	startery (przedni i tylny osobno; 10 μM roztwory w 10 mM Tris)	2,0
5	cDNA (1-10 μg)	2,0
	Całkowita objętość próby	20,0

Tabela 17. Profile termiczne reakcji ilościowego PCR

Para starterów ^a	Wstępna denaturacja	Amplifikacja zakończona detekcją fluorescencji (40 cykli)
S8	95°C – 2 min.	95°C – 30 s
		57°C – 30 s
		72°C – 1 min.
S9	95°C – 3 min.	95°C – 30 s
		58°C – 30 s
		72°C – 1 min.
S10	95°C – 3 min.	95°C – 15 s
		57°C – 30 s
		72°C – 45 s

^a numer pary starterów zgodny z Tabelą 8.

9.3.8.3. Analiza uzyskanych wyników

Szacowanie względnego poziomu ekspresji poszczególnych badanych genów przeprowadzono względem szczepów referencyjnych i genu referencyjnego *udp* (fosforylaza urydynowa) wg modelu Pfaffla (Pfaffl, 2001) w arkuszu kalkulacyjnym Excel (Microsoft, USA). Przyjęto, że wartość ekspresji danego genu dla szczepu referencyjnego wynosi 1.

9.3.9. Struktura replikonu plazmidów typu pXO2

Do sekwencjonowania genów *repA_N* oraz ich otoczenia zastosowano sekwencjonowanie następnej generacji Ion Torrent PGM (Life Technologies). W pierwszym etapie wyizolowano plazmidy *B. cereus repA_N*-pozytywnych (N=18) zestawem Z6 (Tabela 7), zgodnie z protokołem producenta oraz z zastosowaniem odczynników O4 i O5 (Tabela 6). RNA z zawiesiny plazmidów usunięto za pomocą enzymu E5 (Tabela 5). Dodatkowo, tej samej procedurze w celach porównawczych poddano dwa szczepy *repA_N*-pozytywne *B. thuringiensis* (*B. thuringiensis* BPN2/2, *B. thuringiensis* JAS63/5) z kolekcji Zakładu Mikrobiologii UwB (Tabela S1 w Załącznikach). Uzyskane DNA pocięto na fragmenty ok. 200 pz zasad za pomocą ultrasonikatora M220 Focused-ultrasonicatorTM (Covaris). Produkty cięcia posłużyły do przygotowania bibliotek z zastosowaniem zestawów Z9, Z10 i Z11 (Tabela 7). Następnie zamplifikowane biblioteki zostały wzbogacone w emulsyjnym PCR z zastosowaniem zestawów Z12 i Z13 (Tabela 7). W ostatnim etapie sekwencjonowano plazmidy zgodnie z instrukcją producenta Ion Torrent PGM za pomocą zestawów Z14 oraz Z15 (Tabela 7). Składanie i analizę porównawczą sekwencji nukleotydowych wykonano z zastosowaniem programów CLC Genomics Workbench v.5, MIRA assembler v.3.4.0, Glimmer3 i Aretmis v.14.0.0 oraz serwisu RAST. Oszacowanie pokrewieństwa genetycznego na podstawie uzyskanych sekwencji wyznaczono metodą opisaną w punkcie 9.3.3.3. Sekwencją referencyjną była sekwencja nukleotydowa plazmidu pXO2 *B. anthracis* pobrana z ogólnodostępnej bazy danych NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

9.3.10. Analizy bionformatyczne

Zmienność genomową oraz strukturę badanych populacji badano stosując następujące programy bionformatyczne:

BioEdit v.7.0.5 – przygotowywanie alignmentów (zestawień) sekwencji nukleotydowych do dalszych analiz.

Program dostępny na stronie internetowej: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>.

Chromas Lite 2.1 – analiza uzyskanych sekwencjonogramów. Program dostępny na stronie internetowej: <https://chromas-lite.software.informer.com/2.1/>.

ClonalFrame – wyznaczenie współczynnika r/m (rekombinacji do mutacji) w oparciu o dane uzyskane w typowaniu wielu loci (Vos i Didelot, 2009). Program dostępny na stronie internetowej: <http://www.xavierdidelot.xtreemhost.com/clonalframe.htm?i=1>.

DNASp5 v.5.0 (*ang.* DNA Sequence Polymorphism) – oszacowanie frekwencji alleli, liczby miejsc polimorficznych oraz współczynników mutacji niesynonimowych do synonimowych (dN/dS). Ponadto, ten program zastosowano do wyznaczenia stopnia zróżnicowania ogólnej ilości mutacji i mutacji wspólnych (Libardo i Rozas, 2009). Program dostępny jest na stronie: <http://www.ub.edu/dnasp/>.

Ecotype Simulation – rozgraniczanie prawdopodobnych ekotypów w obrębie populacji. Algorytm dostępny na stronie: <http://fcohan.web.wesleyan.edu/ecosim/>.

MEGA6 – ustalenie powiązań filogenetycznych pomiędzy organizmami, jak też szacowanie stosunku ilości tranzycji i transwersji w sekwencjach, wzoru substytucji nukleotydów oraz prawdopodobieństwa ich zajścia (Tamura i wsp., 2013). Program dostępny na stronie: <https://www.megasoftware.net>.

PHYLoViZ v.1.0 – wyznaczenie kompleksów klonalnych i struktury genetycznej populacji bakteryjnych za pomocą algorytmu goeBURST (Feil i wsp., 2004; Francisco i wsp., 2012). Program dostępny na stronie: <http://www.phyloviz.net>.

Baza danych MLST (*ang.* Multi-locus Sequence Typing) - oznaczenie alleli zsekwencjonowanych fragmentów genów metabolizmu podstawowego i typów sekwencyjnych oraz deponowanie nowych alleli oraz typów sekwencyjnych. Baza danych dostępna pod adresem: <https://pubmlst.org/bcereus/>.

GLIMMER3 (Microbial Gene Finding System, *ang.* Gene Locator and Interpolated Markov ModelER) - poszukiwania genów w sekwencjach DNA. Program dostępny pod adresem internetowym: <http://ccb.jhu.edu/software/glimmer/index.shtml>.

Aretmis v.14.0.0 – analiza sekwencji nukleotydowych, wyznaczanie ramek odczytu oraz analizy porównawcze sekwencji nukleotydowych (Carver i wsp., 2012).

CLS Genomics Workbench v.5 – analiza i wizualizacja danych otrzymanych w sekwencjonowaniu następnej generacji.

MIRA assembler v.3.4.0 – składanie i mapowanie sekwencji nukleotydowych uzyskanych w sekwencjonowaniu następnej generacji. Program dostępny pod adresem internetowym: <http://sourceforge.net/projects/mira-assembler/>.

RAST (*ang.* Rapid Annotation using Subsystem Technology) – serwis do anotacji całych genomów prokariotycznych (Aziz i wsp., 2008). Program dostępny pod adresem internetowym: <http://rast.nmpdr.org/>.

9.3.11. Analizy statystyczne

Program R v.3.0.2 został zastosowany do wyznaczenia testem χ^2 (z poprawką Bonferroni) różnic proporcji izolatów z plazmidami typu pXO1 i pXO2 pomiędzy różnymi populacjami glebowych *B. cereus*.

10. WYNIKI

10.1. Polimorfizm genetyczny glebowych populacji *B. cereus*

W celu oszacowania stopnia zróżnicowania genetycznego *B. cereus* z różnych lokalizacji geograficznych, wyznaczono profile alleliczne sekwencji nukleotydowych fragmentów siedmiu genów metabolizmu podstawowego populacji tych bakterii z prób gleby pobranej w Argentynie, Kazachstanie, Kenii i Polsce. Dodatkowo, bazując na unikatowej kombinacji alleli, określono typy sekwencyjne izolatów (ST). Nowe typy sekwencyjne zdeponowano w bazie pubMLST.

10.1.1. Polimorfizm genetyczny glebowych izolatów *B. cereus* z Argentyny

Analizę sekwencji nukleotydowych genów metabolizmu podstawowego izolatów *B. cereus* z gleby pobranej w parku miejskim w Buenos Aires, przedstawiono w Tabeli 18.

Tabela 18. Zróżnicowanie fragmentów genów metabolizmu podstawowego wśród izolatów *B. cereus* z gleby pobranej w Buenos Aires

Gen	Miejsca polimorficzne ^a	Liczba alleli ^b
<i>glpF</i>	23 (6,2)	10 (2)
<i>gmk</i>	42 (8,3)	7 (0)
<i>ilvD</i>	69 (17,5)	8 (2)
<i>pta</i>	29 (7,0)	11 (3)
<i>pur</i>	49 (14,1)	9 (1)
<i>pycA</i>	57 (15,7)	7 (1)
<i>tpi</i>	12 (2,8)	9 (1)
Łącznie	281 (9,9)	13 (8)^c

^a liczba miejsc polimorficznych; w nawiasie podano procentowy udział miejsc polimorficznych w badanym fragmencie genu;

^b w nawiasie podano liczbę nowych alleli oznaczonych w trakcie badań;

^c liczba typów sekwencyjnych (ST); w nawiasie podano liczbę nowych ST.

Tabela 19. Prawdopodobieństwa substytucji nukleotydów genów metabolizmu podstawowego argentyńskich izolatów *B. cereus*

	A	T	C	G
A	-	3,78	2,32	12,84
T	4,5	-	16,0	3,38
C	4,5	26,12	-	3,38
G	17,09	3,78	2,32	-

Udział miejsc polimorficznych w genach metabolizmu podstawowego *B. cereus* z gleby pobranej w Argentynie wahał się od 2,8% do 17,5%. Najmniejszą liczbę miejsc polimorficznych stwierdzono dla *tpi* (12 z 435 pozycji nukleotydowych), a najwyższą dla *ilvD* (69 z 393 pozycji nukleotydowych). Największą liczbą homologów (11, w tym trzy oznaczone po raz pierwszy) opisano dla *pta*. Pozostałe geny miały zbliżoną ilość odmian, tj. *glpF* – 10 (dwa nowe), *ilvD* – osiem (dwa nowe), *pur* – dziewięć (jeden nowy), *pycA* – siedem (jeden nowy) oraz *tpi* – dziewięć (jeden nowy). Łączna liczba alleli wyniosła 61. Argentyńskim izolatom przypisano 13 typów sekwencyjnych; osiem z nich wyznaczono po raz pierwszy (Tabela S1).

Współczynnik tranzycji do transwersji wyniósł 3,801 pomiędzy purynami (k_1) i 6,902 (k_2) pomiędzy pirymidynami. Analiza prawdopodobieństwa substytucji nukleotydów genów metabolizmu podstawowego izolatów *B. cereus* z Argentyny przedstawiona w Tabeli 19, wskazuje na zachodzenie w genach metabolizmu podstawowego *B. cereus* z Argentyny głównie mutacji typu tranzycje.

10.1.2. Polimorfizm genetyczny glebowych izolatów *B. cereus* z Kazachstanu

Cechy charakterystyczne sekwencji nukleotydowych loci metabolizmu podstawowego izolatów *B. cereus* z prób gleby pobranej w Kazachstanie (okolice Almaty), przedstawiono w Tabeli 20. Udział miejsc polimorficznych w badanych genach zawarł się w przedziale od 4,1% (18 z 435 pz, gen *tpi*) do 19,3% (76 z 393 pz, gen *ilvD*). Najwięcej homologów stwierdzono dla *glpF* (n=15), *ilvD* (n=15) oraz *pycA* (n=15), a pozostałe geny wykazały podobną ilość odmian, tj. *gmk* – 11 (dwa nowe), *pta* – 11 (trzy nowe), *pur* – 13 (pięć nowych) oraz *tpi* – 10 (cztery nowe). Największą liczbę nowych alleli wyznaczono dla *ilvD* (n=8). Łącznie zidentyfikowano 90 alleli. Szczepy bakteryjne zaklasyfikowano do 23 ST (91% ST opisano po raz pierwszy; Tabela S1).

Tabela 20. Zróżnicowanie fragmentów genów metabolizmu podstawowego wśród izolatów *B. cereus* z gleby pobranej w Kazachstanie

Gen	Miejsca polimorficzne ^a	Liczba alleli ^b
<i>glpF</i>	31 (8,3)	15 (7)
<i>gmk</i>	48 (9,5)	11 (2)
<i>ilvD</i>	76 (19,3)	15 (8)
<i>pta</i>	23 (5,5)	11 (3)
<i>pur</i>	49 (14,1)	13 (5)
<i>pycA</i>	57 (15,7)	15 (6)
<i>tpi</i>	18 (4,1)	10 (4)
Łącznie	306 (10,8)	23 (21)^c

^a liczba miejsc polimorficznych; w nawisie podano procentowy udział miejsc polimorficznych w badanym fragmencie genu;

^b w nawisie podano liczbę nowych alleli oznaczonych w trakcie badań;

^c liczba typów sekwencyjnych (ST); w nawisie podano liczbę nowych ST.

Analizy rozkładu substytucji nukleotydów w badanych genach wskazują na zwiększoną częstotliwość tranzycji, w szczególności pomiędzy cytozyną i tyminą, niż mutacji pozostałych typów (Tabela 21). Współczynnik tranzycji do transwersji wyniósł 1,087 pomiędzy purynami (k_1) i 4,369 (k_2) pomiędzy pirymidynami.

Tabela 21. Prawdopodobieństwa substytucji nukleotydów genów metabolizmu podstawowego kazachskich izolatów *B. cereus*

	A	T	C	G
A	-	6,0	3,68	5,76
T	7,12	-	16,06	5,30
C	7,12	26,23	-	5,30
G	7,74	6,0	3,68	-

10.1.3. Polimorfizm genetyczny *B. cereus* z gleby pobranej w Kenii

Dane dotyczące loci metabolizmu podstawowego *B. cereus* z gleby pobranej w dwu parkach narodowych w Kenii, przedstawiono w Tabeli 22. Udział miejsc polimorficznych w badanych genach tych izolatów wahał się w przedziale od 4,8% do 21,3%. Najmniejszą liczbę miejsc polimorficznych zaobserwowano dla *tpi* (21 z 435 pozycji nukleotydowych), a najwyższą dla *ilvD* (84 z 393 pozycji nukleotydowych). Natomiast największą liczbą homologów opisano dla *glpF*, *pta* oraz *pur*. W każdym przypadku zidentyfikowano po 19 odmian tych genów, przy czym dla *glpF* i *pur* opisano po sześć nowych alleli, zaś dla *pta* – dziewięć. Pozostałe geny wykazywały zmienną liczbę homologów, tj. *gmk* – 13 (dwa nowe), *ilvD* – 16 (trzy nowe), *pycA* – 16 (pięć nowych) oraz *tpi* – 17 (dziewięć nowych). Łącznie opisano 119 alleli. Istotną cechą, wyróżniającą izolaty z Kenii, było zaklasyfikowanie każdego z nich do osobnego oraz wcześniej nieopisanego typu sekwencyjnego (Tabela S1).

Tabela 22. Zróżnicowanie fragmentów genów metabolizmu podstawowego wśród izolatów *B. cereus* z gleby pobranej w Kenii

Gen	Miejsca polimorficzne ^a	Liczba alleli ^b
<i>glpF</i>	36 (9,6)	19 (6)
<i>gmk</i>	48 (9,5)	13 (2)
<i>ilvD</i>	84 (21,3)	16 (3)
<i>pta</i>	31 (7,4)	19 (8)
<i>pur</i>	58 (16,6)	19 (6)
<i>pycA</i>	64 (17,6)	16 (5)
<i>tpi</i>	21 (4,8)	17 (3)
Łącznie	342 (12,1)	42 (42)^c

^a liczba miejsc polimorficznych; w nawisie podano procentowy udział miejsc polimorficznych w badanym fragmencie genu;

^b w nawisie podano liczbę nowych alleli oznaczonych w trakcie badań;

^c liczba typów sekwencyjnych (ST); w nawisie podano liczbę nowych ST.

Tabela 23. Prawdopodobieństwa substytucji nukleotydów genów metabolizmu podstawowego kenijskich izolatów *B. cereus*

	A	T	C	G
A	-	3,67	2,27	13,39
T	4,36	-	15,91	3,30
C	4,36	25,77	-	3,30
G	17,72	3,67	2,27	-

W genach metabolizmu podstawowego kenijskich izolatów *B. cereus* zaobserwowano nasiloną częstotliwość tranzycji (Tabela 23). Wartość współczynników tranzycji/transwersji dla puryn kształtowała się na poziomie $k_1=4,061$, a dla pirymidyn $k_2=7,013$.

10.1.4. Polimorfizm genetyczny *B. cereus* z Polski

W populacji *B. cereus* z Polski udział miejsc polimorficznych w badanych genach wahał się w przedziale od 5,0% do 24,4% (Tabela 24).

Tabela 24. Zróżnicowanie fragmentów genów metabolizmu podstawowego wśród izolatów *B. cereus* z gleby pobranej w północno-wschodniej Polsce

Gen	Miejsca polimorficzne^a	Liczba alleli^b
<i>glpF</i>	37 (9,9)	19 (7)
<i>gmk</i>	61 (12,1)	16 (8)
<i>ilvD</i>	96 (24,4)	19 (10)
<i>pta</i>	46 (11,1)	25 (10)
<i>pur</i>	61 (17,5)	20 (8)
<i>pycA</i>	62 (17,0)	21 (8)
<i>tpi</i>	22 (5,0)	19 (3)
Łącznie	385 (13,6)	40 (32)^c

^a liczba miejsc polimorficznych; w nawisie podano procentowy udział miejsc polimorficznych w badanym fragmencie genu;

^b w nawisie podano liczbę nowych alleli oznaczonych w trakcie badań;

^c liczba typów sekwencyjnych (ST); w nawisie podano liczbę nowych ST.

Najmniejszą liczbę miejsc polimorficznych w polskiej populacji *B. cereus* stwierdzono dla *tpi* (22 z 435 pozycji nukleotydowych), a najwyższą dla *ilvD* (96 z 393 pozycji nukleotydowych). Największą liczbą alleli (n=25) ustalono dla *pta*. Pozostałe geny wykazały zbliżoną ilość odmian, tj. *glpF* – 19 (siedem nowych), *gmk* – 16 (osiem nowych), *ilvD* – 19 (dziesięć nowych), *pur* – 20 (osiem nowych), *pycA* – 21 (osiem nowych) oraz *tpi* – 19 (trzy nowe). Łączna liczba wszystkich alleli wyniosła 139. Polskim izolatom przypisano 40 typów sekwencyjnych (wcześniejsze analizy wykonane przez J. Drewnowską; Drewnowska i Świącicka, 2013; Tabela S1).

Rozkład zmienności nukleotydów w analizowanych sekwencjach nukleotydowych wskazuje na większą częstotliwością mutacji typu tranzycje, w szczególności pomiędzy cytozyną i tyminą (Tabela 25). Wartość współczynników tranzycje/transwersje wyniosły $k_1=4,199$ dla puryn oraz $k_2=6,945$ dla pirymidyn.

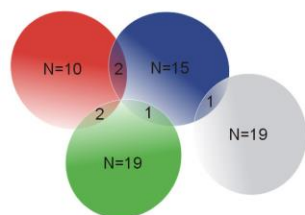
Tabela 25. Prawdopodobieństwa substytucji nukleotydów wśród genów metabolizmu podstawowego polskich izolatów *B. cereus*

	A	T	C	G
A	-	3,68	2,25	13,42
T	4,37	-	15,65	3,20
C	4,37	25,58	-	3,20
G	18,34	3,68	2,25	-

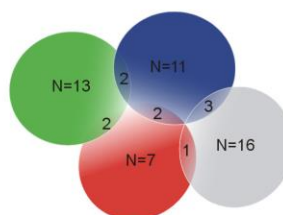
10.1.5. Polimorfizm genetyczny *B. cereus* w aspekcie międzykontynentalnym

W badanych populacjach *B. cereus* stwierdzono łącznie 354 alleli genów metabolizmu podstawowego. Pomimo odrębnego pochodzenia izolatów, niektóre warianty genów występowały w różnych populacjach (Ryc. 2). Przykładowo, w trzech populacjach jednocześnie stwierdzono te same homologii genów *ilvD* (allel 35), *pur* (allele 2 i 96), *pycA* (allel 4) oraz *tpi* (allel 26). Dodatkowo, wykazano kilka wspólnych alleli wszystkich siedmiu genów wśród izolatów argentyńskich i kenijskich. Jednakże nie zidentyfikowano „uniwersalnej” sekwencji genów, która byłaby obecna we wszystkich populacjach.

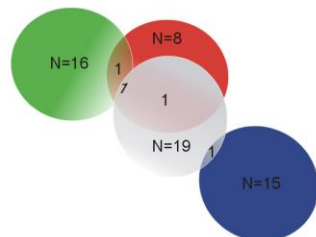
a) *glpF*



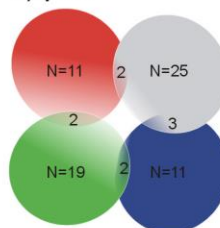
b) *gmk*



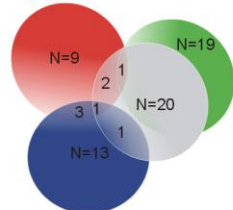
c) *ilvD*



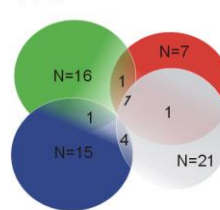
d) *pta*



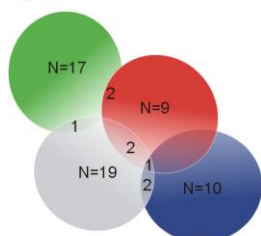
e) *pur*



f) *pycA*



g) *tpi*



 Argentyna

 Kazachstan

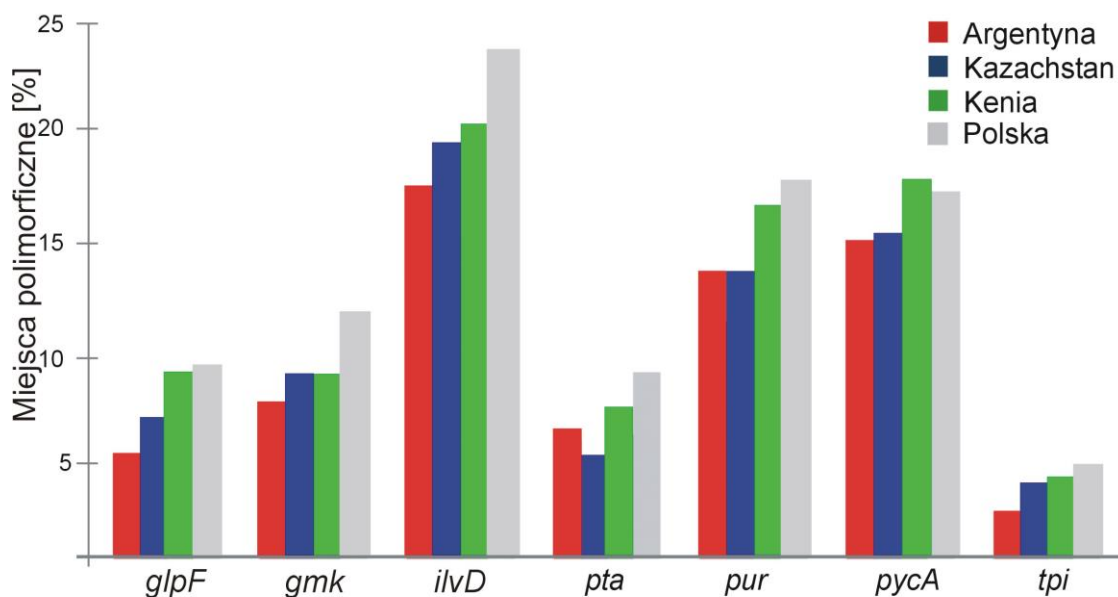
N - liczba alleli

 Kenia

 Polska

Ryc. 2. Ilościowy rozkład alleli genów metabolizmu podstawowego izolatów badanych populacji *B. cereus*.

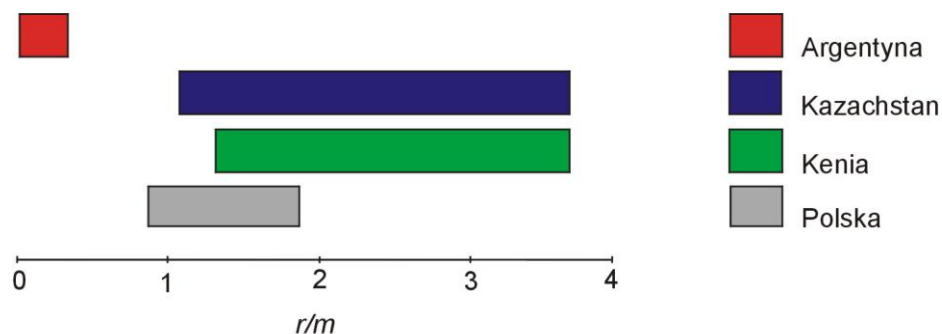
Cyfry na pokrywających się polach wskazują liczbę wspólnych alleli.



Ryc. 3. Procentowy udział miejsc polimorficznych w genach metabolizmu podstawowego izolatów *B. cereus*.

Największą liczbę miejsc polimorficznych dla badanych genów zanotowano wśród polskich izolatów *B. cereus* (n=385). Niemniej we wszystkich populacjach stwierdzono zbliżone tendencje w zmienności poszczególnych loci (Ryc. 3). Najbardziej zmiennym okazało się locus *ilvD*, gdzie miejsca polimorficzne obejmowały od 17,5% (izolaty z Argentyny) do 24,4% (izolaty z Polski) sekwencji nukleotydowej, a najbardziej konserwatywny charakter przejawiał gen *tpi* (miejsca polimorficzne od 2,7% w populacji argentyńskiej do 5% w populacji polskiej).

Ważnym parametrem zmienności genów jest współczynnik r/m , obrazujący częstotliwość zachodzenia rekombinacji w stosunku do mutacji. Przedziały wartości tego wskaźnika dla łącznej sekwencji nukleotydowej fragmentów badanych genów metabolizmu podstawowego (2 829 pz) przy 95% przedziale ufności, przedstawia Ryc. 4. Wśród *B. cereus* częstotliwość zachodzenia rekombinacji jest zróżnicowana w zależności od badanej populacji, np. izolaty kenijskie i kazachskie charakteryzuje największa częstotliwość rekombinacji, co obrazują wartości otrzymanych współczynnik r/m w przedziale od 1,32 do 3,70 (populacja kenijska) oraz od 1,18 do 3,70 (populacja kazachska). Polskie izolaty charakteryzował średni poziom współczynnika r/m (od 0,85 do 1,90), a dla izolatów argentyńskich osiągał wartość nie przekraczającą 0,70.



Ryc. 4. Zakres wartości współczynnika r/m w glebowych populacjach *B. cereus*.

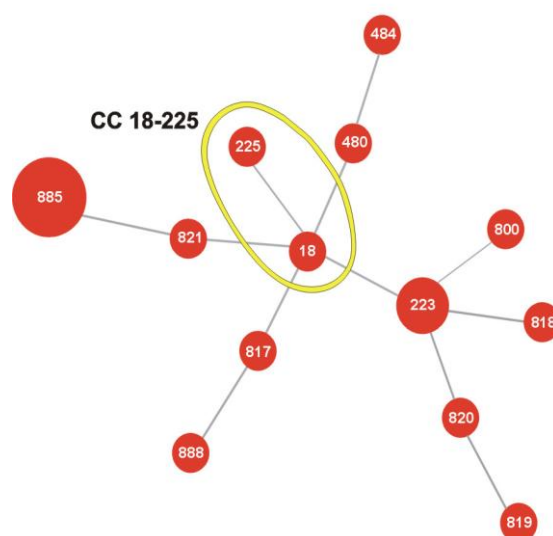
Wśród badanych *B. cereus* opisano 116 ST (Tabela S1), z czego niemal 89% zidentyfikowano po raz pierwszy. Aż 86% ST wystąpiło jednokrotnie. Analizy statystyczne (test Fishera) wykazały znaczące różnice w proporcjach pomiędzy nowymi a wcześniej opisanymi typami sekwencyjnymi wśród badanych populacji ($p=3,1e^{-4}$). Natomiast porównania pomiędzy populacjami (testem χ^2 z poprawką Bonferroni) ukazały różnice statystyczne w proporcjach nowych i starych typów sekwencyjnych jedynie pomiędzy izolatami argentyńskimi i kenijskimi ($p=0,022$) oraz kenijskimi i polskimi ($p=0,013$). Zaobserwowano dwa identyczne typy sekwencyjne w osobnych populacjach, tj. ST294 (populacja kazachska i polska) oraz ST885 (populacja argentyńska i kenijska).

10.2. Struktura genetyczna glebowych populacji *B. cereus*

Struktury genetyczne populacji *B. cereus* wyznaczono na podstawie profili allelicznych typów sekwencyjnych izolatów. Dane analizowano za pomocą algorytmu goeBUSRT, umożliwiającego wyznaczenie kompleksów klonalnych (CC), tj. grup izolatów posiadających co najmniej sześć lub siedem identycznych alleli spośród siedmiu wchodzących w skład typu sekwencyjnego.

10.2.1. Struktura genetyczna populacji *B. cereus* z gleby pobranej w Argentynie

W argentyńskiej populacji *B. cereus* 84% typów sekwencyjnych tworzy tzw. singletony (Ryc. 5), czyli ST różniące się między sobą dwoma lub więcej allelami. Zaledwie dwa spośród trzynastu ST tworzą kompleks klonalny CC 18-225, grupujący zaledwie dwa izolaty, AR13-9 i AR15-3.

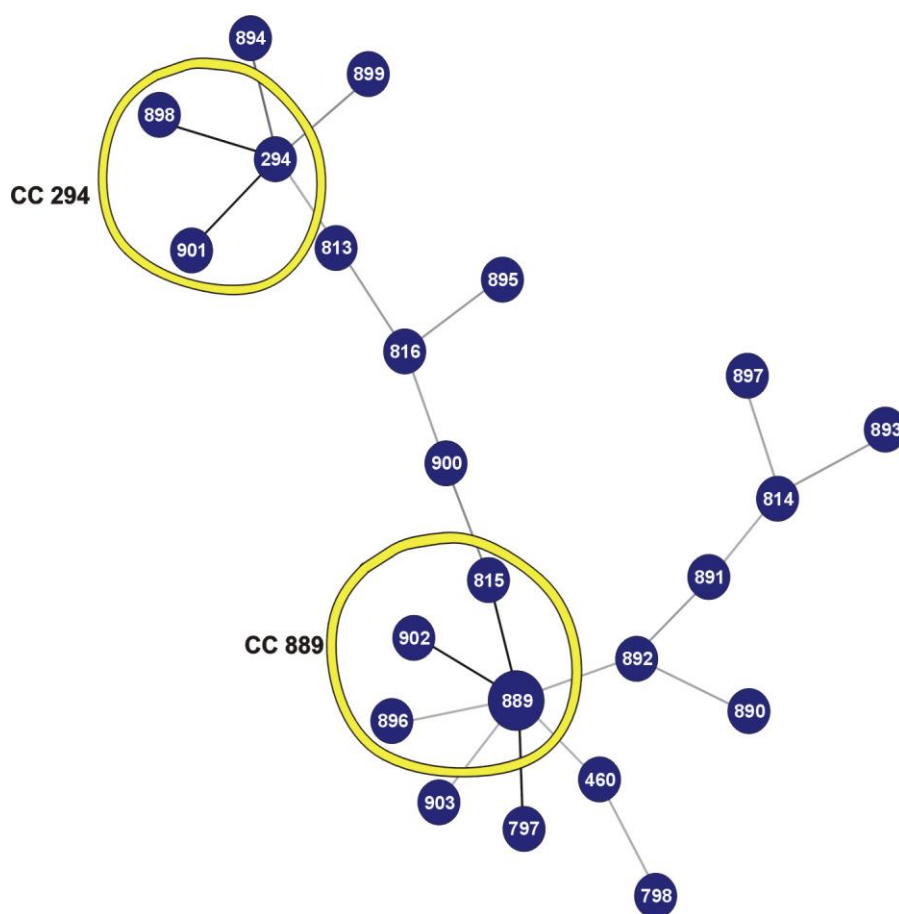


Ryc. 5. Struktura genetyczna populacji *B. cereus* z gleby pobranej w Argentynie.

Dendrogram wyznaczono za pomocą algorytmu goeBURST. Numery w poszczególnych polach oznaczają typy sekwencyjne (ST), zaś żółtą obwódką oznaczono jedyny kompleks klonalny (CC). Wielkość poszczególnych pól koreluje z częstością danego ST. Szczegółowe informacje na temat izolatów zawarto w Tabeli S1 w Załącznikach.

10.2.2. Struktura genetyczna populacji *B. cereus* z gleby pobranej w Kazachstanie

W strukturze genetycznej kazachskiej populacji *B. cereus* wyróżniają się dwa kompleksy klonalne, CC 294 obejmujący 9% izolatów (AY5-1, AY9-4, AY14-9 i AY15-7), którym przypisano trzy typy sekwencyjne (ST294, ST898, ST901) oraz kompleks C 889 z 22 izolatami *B. cereus* (48% izolatów kazachskich), zaklasyfikowanych do czterech ST (ST815, ST889, ST896, ST902) (Ryc. 6). Pozostałe typy sekwencyjne, ze względu na duże zróżnicowanie alleliczne zostały sklasyfikowane do 16 singletonów.

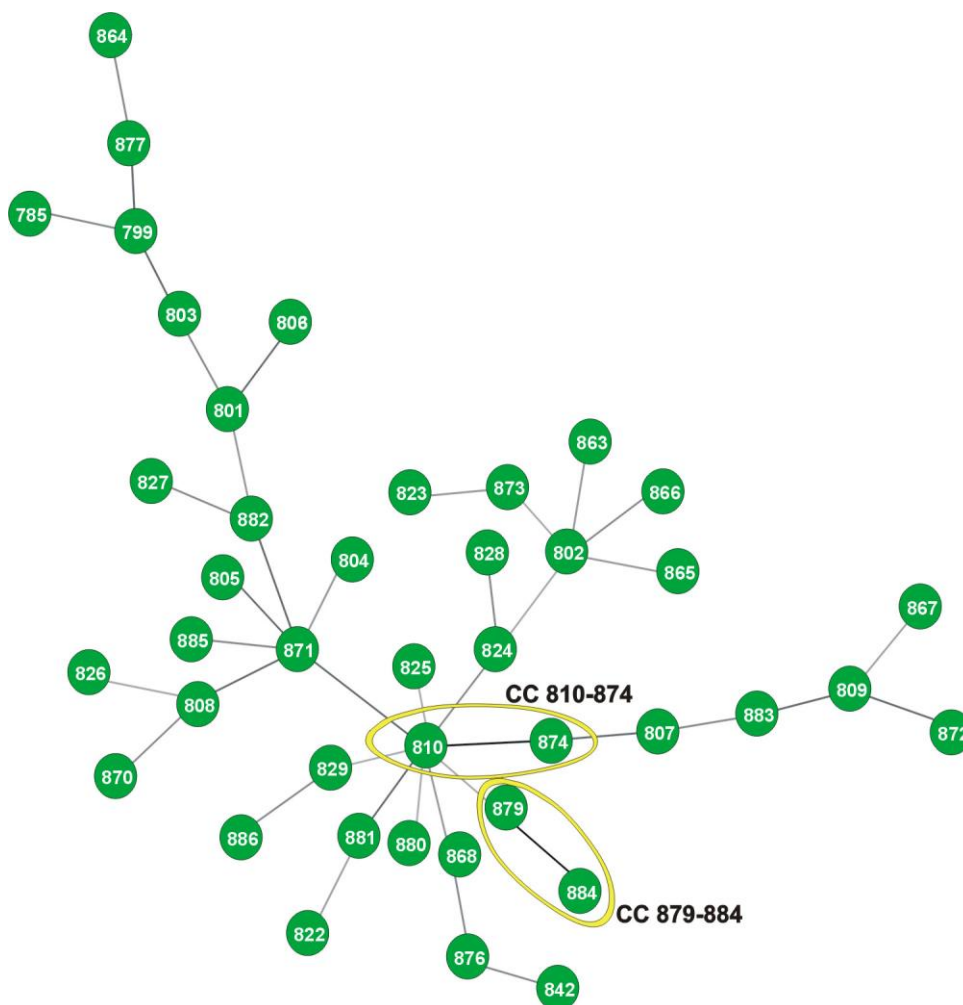


Ryc. 6. Struktura genetyczna populacji *B. cereus* z gleby pobranej w Kazachstanie.

Dendrogram wyznaczono za pomocą algorytmu goeBURST. Numery w poszczególnych polach oznaczają typy sekwencyjne (ST), zaś żółtą obwódką oznaczono kompleksy klonalne (CC). Wielkość poszczególnych pól koreluje z frekwencją danego ST. Szczegółowe informacje na temat izolatów zawarto w Tabeli S1 w Załącznikach.

10.2.3. Struktura genetyczna glebowej populacji *B. cereus* z Kenii

W strukturze genetycznej populacji kenijskich *B. cereus* stwierdzono tendencję do formowania singletonów (Ryc. 7). Dwa wyróżnione kompleksy klonalne (CC 810-874 i CC 879-884) obejmują zaledwie cztery izolaty.

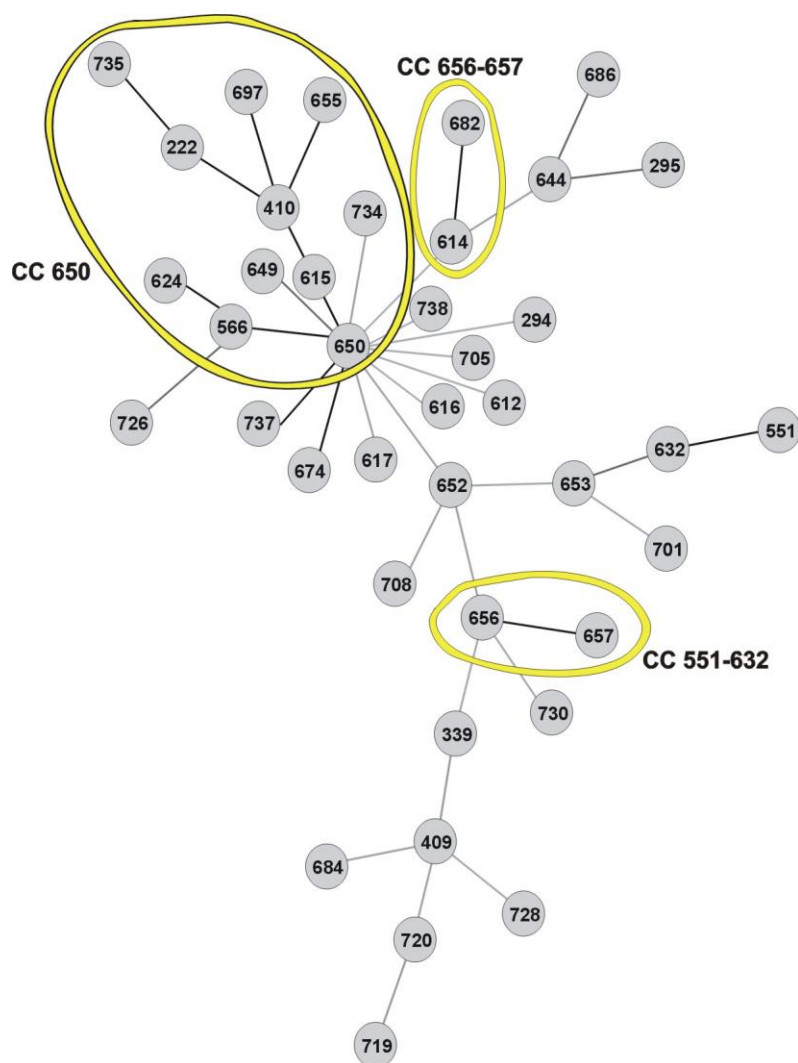


Ryc. 7. Struktura genetyczna populacji *B. cereus* z gleby pobranej w Kenii.

Dendrogram wyznaczono za pomocą algorytmu goeBURST. Numery w poszczególnych polach oznaczają typy sekwencyjne (ST), zaś żółtą obwódką oznaczono kompleksy klonalne (CC). Wielkość poszczególnych pól koreluje z frekwencją danego ST. Szczegółowe informacje na temat izolatów zawarto w Tabeli S1 w Załącznikach.

10.2.4. Struktura genetyczna populacji *B. cereus* z gleby pobranej w Polsce

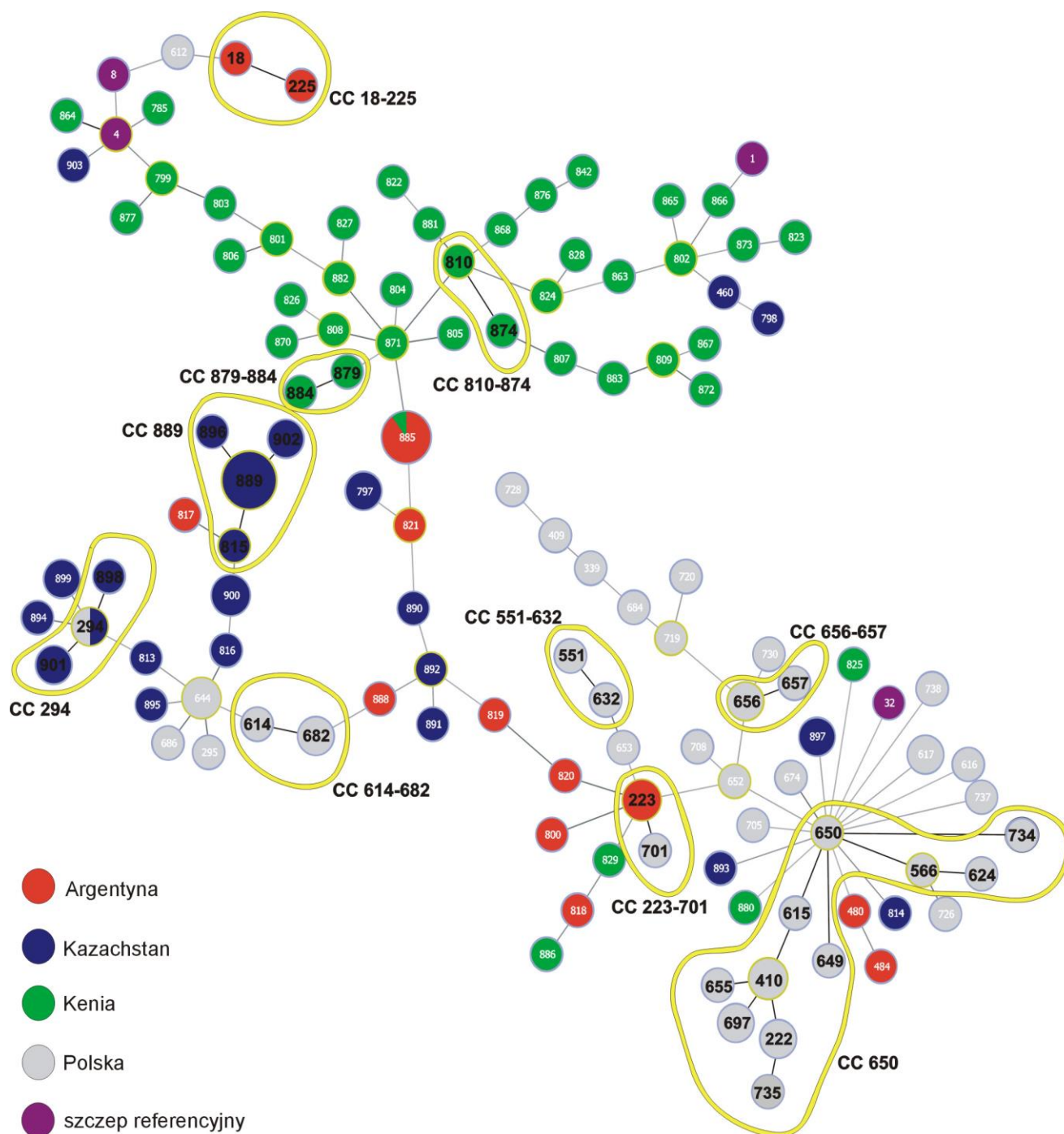
W polskiej populacji *B. cereus* stwierdzono trzy kompleksy klonalne oraz 25 singletonów (Ryc. 8). Kompleks CC 650 grupuje szczepy reprezentujące 11 typów sekwencyjnych przypisanych 15 izolatom. Pozostałe, mniej liczne kompleksy, CC 656-657 i CC 51-632, obejmują po trzy izolaty.



Ryc. 8. Struktura genetyczna populacji *B. cereus* z gleby pobranej w Polsce.

Dendrogram wyznaczono za pomocą algorytmu goeBURST. Numery w poszczególnych polach oznaczają typy sekwencyjne (ST), zaś żółtą obwódką oznaczono kompleksy klonalne (CC). Wielkość poszczególnych pól koreluje z frekwencją danego ST. Szczegółowe informacje na temat izolatów zawarto w Tabeli S1 w Załącznikach.

10.2.5. Struktura genetyczna populacji *B. cereus* w aspekcie międzykontynentalnym



Ryc. 9. Struktura genetyczna glebowych populacji *B. cereus* z Argentyny, Kazachstanu, Kenii i Polski.

Dendrogram wyznaczono za pomocą algorytmu goeBURST. Numery w poszczególnych polach oznaczają typy sekwencyjne (ST), zaś żółtą obwódką oznaczono kompleksy klonalne (CC). Wielkość poszczególnych pól koreluje z frekwencją danego ST. Szczegółowe informacje na temat izolatów zawarto w Tabeli S1 w Załącznikach. Na podstawie Kamińska i wsp., 2015.

Wśród badanych szczepów *B. cereus* (N=161) wyodrębniono 10 kompleksów klonalnych (CC) obejmujących 59 izolatów (37%) reprezentowanych przez 32 typy sekwencyjne oraz 88 singletonów (Ryc. 9). Większość CC (osiem z 10) została utworzyła izolaty z tej samej lokalizacji (CC 18-225, N=2; CC 810-874, N=2; CC 879-884, N=2; CC 889, N=21; CC 614-682, N=3; CC 551-632, N=3; CC 656-657, N=3; CC 650, N=15). Jedynie dwa CC skupiają szczepy z odrębnych populacjach, tj. CC 294 (N=4) objął izolaty z Kazachstanu i z Polski oraz CC 223-701 (N=4) z Argentyny i Polski.

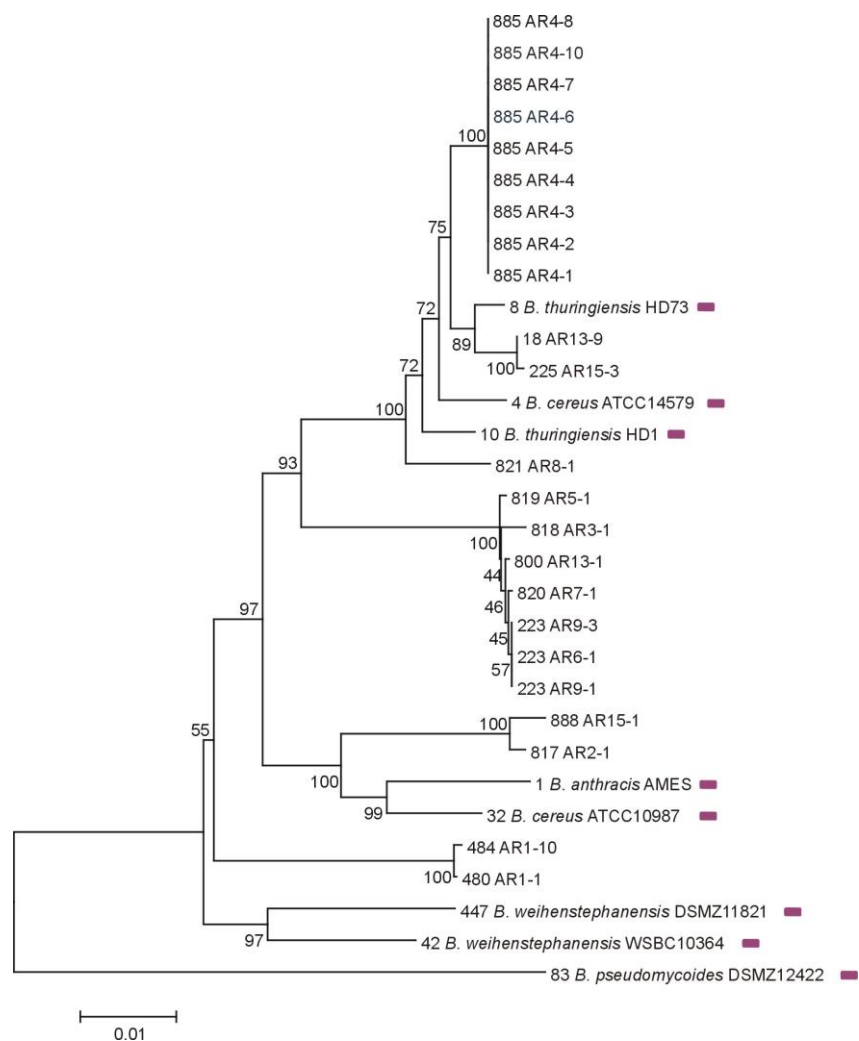
Pomimo tendencji do tworzenia kompleksów klonalnych obejmujących niską liczbę szczepów lub występowania izolatów w formie singletonów, niski współczynnik mutacji niesynonimowych do synonimowych (dN/dS) sugeruje klonalny charakter badanych populacji. Wartość tego współczynnika wyniosła 0,029, 0,038, 0,027 oraz 0,031, odpowiednio dla populacji *B. cereus* z Argentyny, Kazachstanu, Kenii i Polski.

10.3. Filogeneza glebowych izolatów *B. cereus*

Pokrewieństwo filogenetyczne *B. cereus* wyznaczono w oparciu o sekwencje nukleotydowe typów sekwencyjnych i zobrazowano dendrogramami przedstawiającymi dystans genetyczny pomiędzy izolatami. Do analiz włączono osiem szczepów referencyjnych *B. cereus s.l.*.

10.3.1. Filogeneza izolatów *B. cereus* z Argentyny

Pokrewieństwo filogenetyczne argentyńskich *B. cereus* testowano dla 23 losowo wybranych izolatów oraz szczepów referencyjnych (Ryc. 10). Jak wykazały wcześniejsze analizy, dziewięciu izolatom przypisano ten sam typ sekwencyjny (ST885). W analizie filogenetycznej te szczepy tworzą monomorficzną grupę, nie wykazującą bliskiego pokrewieństwa z żadnym z zastosowanych w badaniach szczepów referencyjnych. Podobnie laseczki o ST223 (w bazie MLST od 2006 roku, zgłoszone przez R.J. Ellisa) przejawiały podobieństwo wyłącznie do innych glebowych *B. cereus* z Argentyny. Pozostałe izolaty uplasowały się w różnych częściach dendrogramu, prezentując zróżnicowany stopień pokrewieństwa filogenetycznego pomiędzy sobą i szczepami referencyjnymi. Trzy izolaty (AR13-9, AR15-3, AR8-1) ujawniły wysokie podobieństwo do szczepów referencyjnych *B. thuringiensis* HD1 i *B. thuringiensis* HD73 oraz *B. cereus* ATCC14579. Odległe filogenetycznie dla wszystkich badanych izolatów okazały się być szczepy referencyjne *B. weihenstephanensis* DSMZ11821 oraz WSBC10364.



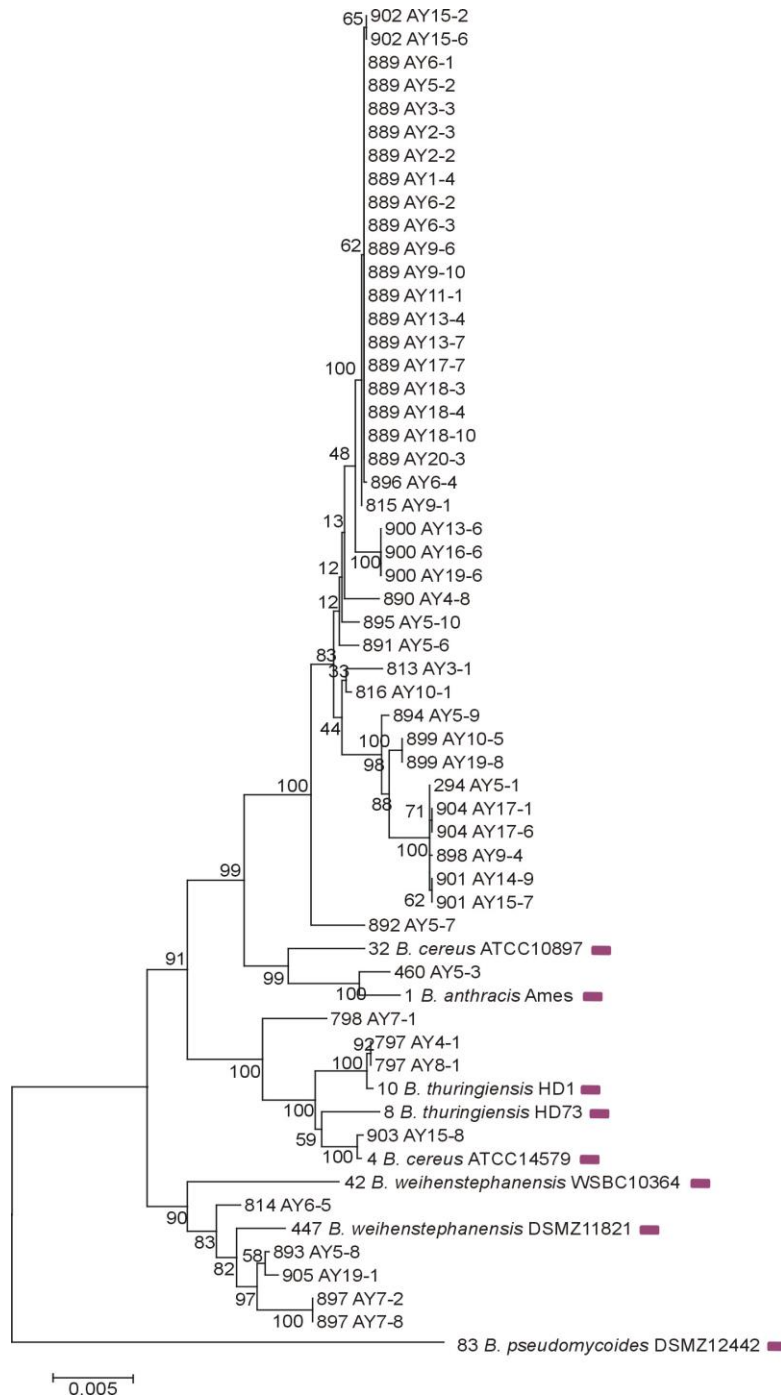
Ryc. 10. Drzewo filogenetyczne *B. cereus* wyizolowanych z prób gleby pobranej w Buenos Aires oraz szczepów referencyjnych *B. cereus* s.l.

Drzewo wykonane metodą „łączenia sąsiadów”. Obok nazwy szczepu podano numer ST. Szczepy referencyjne wyróżniono fioletowym znacznikiem. Liczby przy poszczególnych węzłach oznaczają wartość testu Bootstrap przy 1000 powtórzeniach.

10.3.2. Filogeneza izolatów *B. cereus* z Kazachstanu

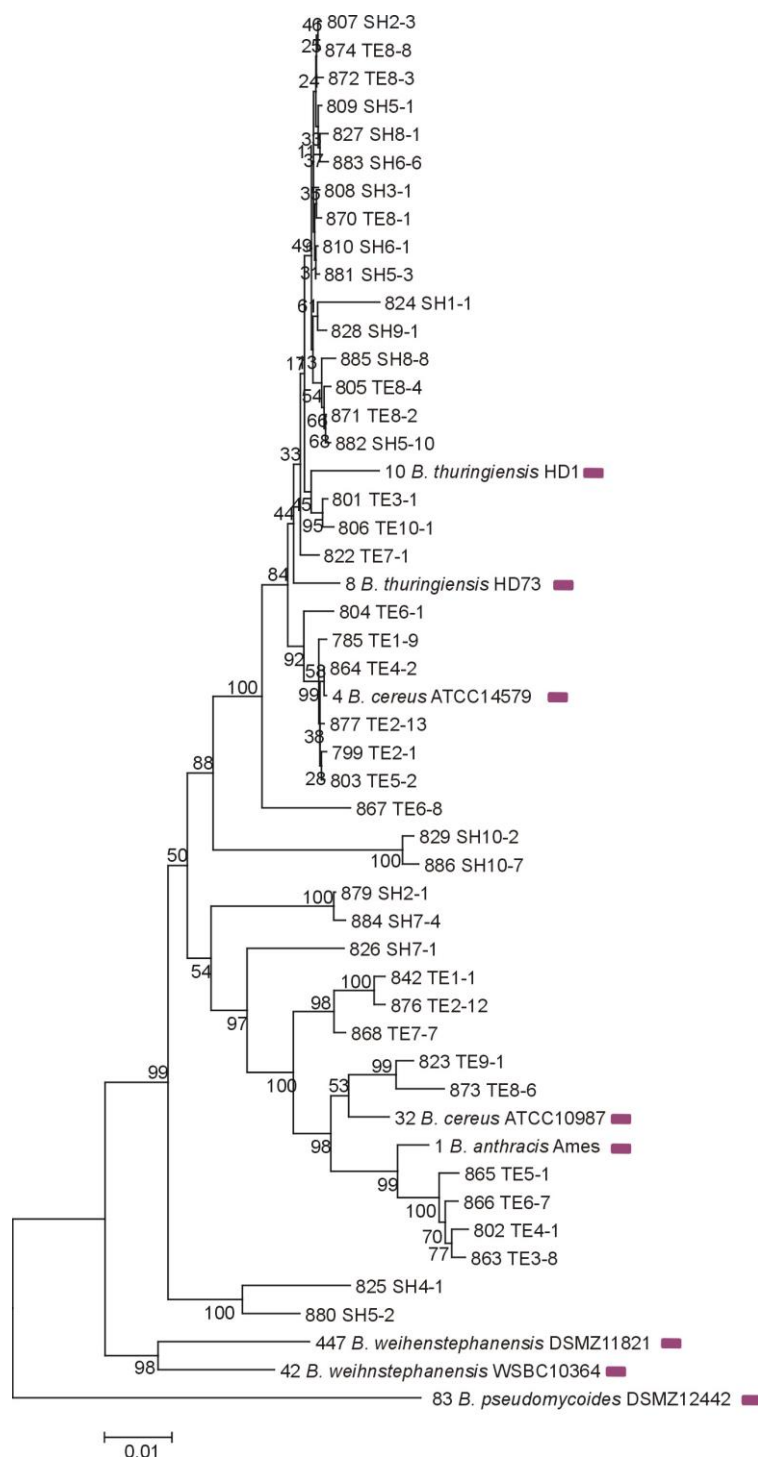
Izolaty *B. cereus* z prób gleby z Kazachstanu (N=46) wykazały zróżnicowany stopień dystansu genetycznego. Laseczki o ST 889 stanowią 39% wszystkich szczepów tej populacji (Ryc. 11) i tworzą homogeniczną grupę blisko spokrewnioną z izolatami o ST902 (AY15-2, AY15-6) oraz ST896 (AY6-4). Wraz z 18 innymi szczepami o różnych ST konstytuują wspólną gałąź o dużym dystansie genetycznym w stosunku do szczepów referencyjnych. Pozostałe 21% kazachskich izolatów są blisko filogenetyczne powiązane ze szczepami referencyjnymi. Izolat AY5-3 (ST460) tworzy wspólną gałąź z *B. anthracis* Ames oraz *B. cereus* ATCC10987, a AY4-1 (ST797), AY8-1 (ST797) i AY15-8 (ST903) wykazują pokrewieństwo do *B. thuringiensis* HD1 i *B. thuringiensis* HD73 oraz *B. cereus* ATCC14579. Oddzielną gałąź dendrogramu stanowią

AY6-5 (ST814), AY5-8 (ST893), AY7-2 (ST897), AY7-8 (ST897) i AY19-1 (ST905), blisko spokrewnionych jedynie z *B. weihenstephanensis* DSMZ11821 oraz WSBC10364.



Ryc. 11. Drzewo filogenetyczne *B. cereus* wyizolowanych z prób gleby pobranej w okolicach Almaty oraz szczepów referencyjnych *B. cereus* s.l. Drzewo wykonane metodą „łączenia sąsiadów”. Obok nazwy szczepu podano numer ST. Szczepy referencyjne wyróżniono fioletowym znacznikiem. Liczby przy poszczególnych węzłach oznaczają wartość testu Boostrap przy 1000 powtórzeniach.

10.3.3. Filogeneza izolatów *B. cereus* z Kenii



Ryc. 12. Drzewo filogenetyczne *B. cereus* wyizolowanych z prób gleby pobranej w Kenii oraz szczepów referencyjnych *B. cereus* s.l.

Drzewo wykonane metodą „łączenia sąsiadów”. Obok nazwy szczepu podano numer ST. Szczepy referencyjne wyróżniono fioletowym znacznikiem. Liczby przy poszczególnych węzłach oznaczają wartość testu Bootstrap przy 1000 powtórzeniach.

Losowo wybrane kenijskie glebowe izolaty *B. cereus* w liczbie 42, tworzą trzy odrębne gałęzie filogenetyczne (Ryc. 12). Pierwszą z nich stanowi 28 laseczek, wykazujących zróżnicowany dystans genetyczny względem siebie i szczepów referencyjnych *B. thuringiensis* HD1 i *B. thuringiensis* HD73 oraz *B. cereus* ATCC14579. Z kolei bakterie drugiej gałęzi (N=12), wykazują bliskie pokrewieństwo z szczepami referencyjnymi *B. cereus* ATCC10897 (TE9-1, TE8-6) oraz *B. anthracis* Ames (TE5-1, TE6-7, TE4-1, TE3-8). Zaledwie dwa izolaty z parku Shimba Hills (SH4-1, SH5-2) charakteryzują się odrębnością filogenetyczną i tworzy oddzielną gałąź dendrogramu. Warto zauważyć, że żaden z tych izolatów nie łączy się z szczepami referencyjnymi *B. weihenstephanensis* DSMZ11821 (ST447) oraz WSBC10364 (ST42).

10.3.4. Filogeneza izolatów *B. cereus* z Polski

Losowo wybrane izolaty *B. cereus* z prób gleby z Polski (N=50) utworzyły dwie linie filogenetyczne (Ryc. 13). Pierwsza z nich obejmuje 66% badanych bakterii, wykazujących zróżnicowany stopień pokrewieństwa ze szczepami referencyjnymi *B. weihenstephanensis* DSMZ11821 (ST447) oraz WSBC10364 (ST42). Najmniejszy dystans genetyczny w stosunku do nich przejawiają bakterie wyizolowane z prób gleby z gospodarstwa rolnego z Jasienówki. Pozostałe laseczki formują drugą grupę filogenetyczną, w której znajdują się także szczepy referencyjne *B. cereus* ATCC10987, *B. cereus* ATCC14579, *B. anthracis* Ames oraz *B. thuringiensis* HD1 i *B. thuringiensis* HD73. Jednakże, bliskie pokrewieństwo w stosunku do *B. thuringiensis* HD73 ujawniono jedynie dla izolatu JAS24/2.

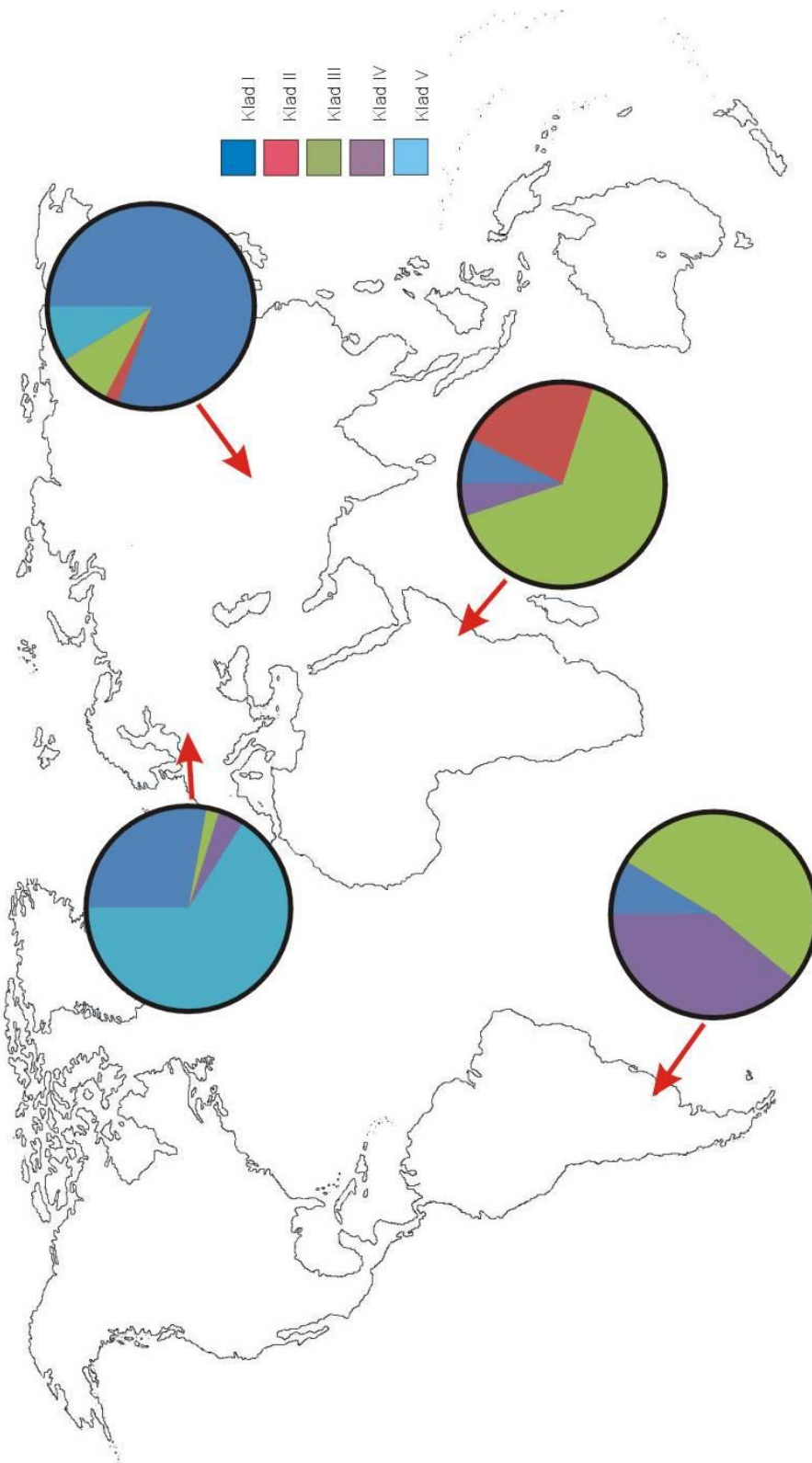


Ryc. 13. Drzewo filogenetyczne *B. cereus* wyizolowanych z prób gleby pobranych w północno-wschodniej Polsce oraz szczepów referencyjnych *B. cereus* s.l. Drzewo wykonane metodą „łączenia sąsiadów”. Obok nazwy szczepu podano numer ST. Szczepy referencyjne wyróżniono fioletowym znacznikiem. Liczby przy poszczególnych węzłach oznaczają wartość testu Bootstrap przy 1000 powtórzeniach.

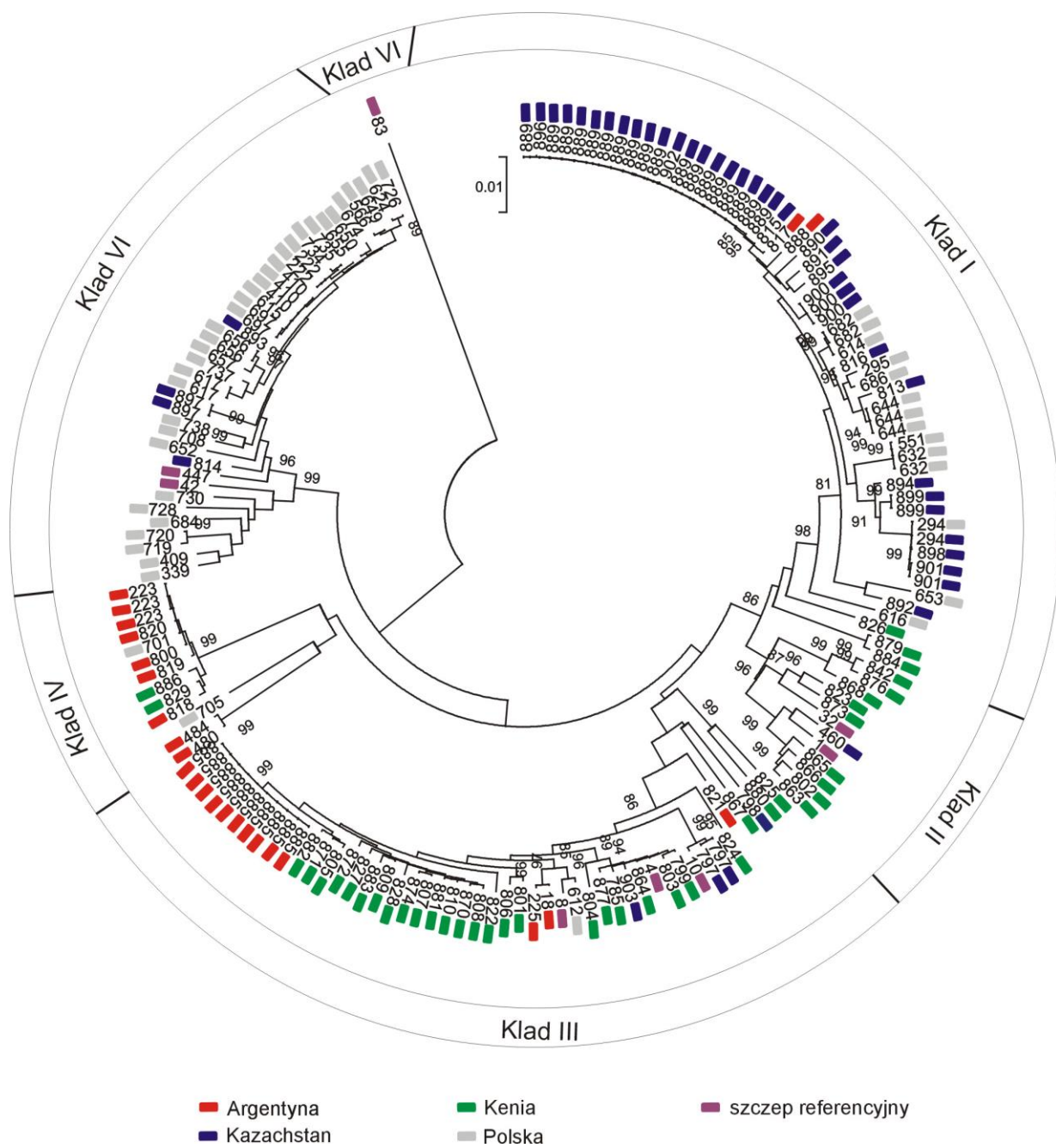
10.3.5. Filogeneza glebowych izolatów *B. cereus* w aspekcie międzykontynentalnym

Izolaty *B. cereus* przejawiają tendencję do formowania odrębnych linii filogenetycznych, korelujących z ich pochodzeniem (Ryc. 14). Na drzewie przedstawiającym powiązania filogenetyczne 161 szczepów z prób gleby z Argentyny (N=23), Kenii (N=42), Kazachstanu (N=46) oraz Polski (N=50) wyróżnia się pięć kładów (Ryc. 15).

W kładzie I, obejmującym 33% wszystkich badanych izolatów (N=56), liczbowo dominują bakterie z Kazachstanu (N=37). Bliski stopień spokrewnienia genetycznego w stosunku do nich zaprezentowały także pojedyncze szczepy argentyńskie (AR2-1, AR15-1) oraz kenijskie (SH2-1, SH7-1, SH7-4). Natomiast znaczną część tego kładu stanowią izolaty *B. cereus* z Polski (N=14), ale charakteryzują się małym dystansem genetycznym w stosunku do bakterii kazachskich. Kład II jest najmniej liczny (N=12) i obejmuje izolaty z prób gleby z Kenii (N=9) i jeden izolat z Kazachstanu. Laseczki tego kładu cechuje bliski stopień pokrewieństwa z chorobotwórczymi referencyjnymi szczepami *B. anthracis* Ames (ST1) oraz *B. cereus* ATCC10987 (ST32). Odmienną kompozycją charakteryzuje się kład III (N=48), skupiający w różnych proporcjach izolaty ze wszystkich badanych prób gleb oraz szczepy referencyjne *B. thuringiensis* (HD1 i HD73) jak również *B. cereus* ATCC14579. W tym kładzie przeważają szczepy kenijskie, wykazujące podobieństwo filogenetyczne do pojedynczych typów sekwencyjnych laseczek z odległych lokalizacji geograficznych (Kazachstan – ST797, ST798; Polska – ST612; Argentyna – ST18, ST225, ST821, ST885). Podobnymi właściwościami cechuje się kład IV (N=13). Pomimo niskiej liczebności, grupują się w nim *B. cereus* zarówno z Argentyny, Kenii i Polski. W strukturze kładu V (N=39), dominują liczbowo polskie izolaty (N=33). Kład ten obejmuje też bakterie z prób gleby pobranej w Kazachstanie (N=4), którym przypisano trzy typy sekwencyjne (ST814, ST897, ST893) oraz dwa szczepy referencyjne *B. weihenstephanensis* WSBC10364 (ST42) oraz DSMZ11821 (ST447).



Ryc. 14. Udział izolatów *B. cereus* z różnych części świata w poszczególnych kładach filogenetycznych.

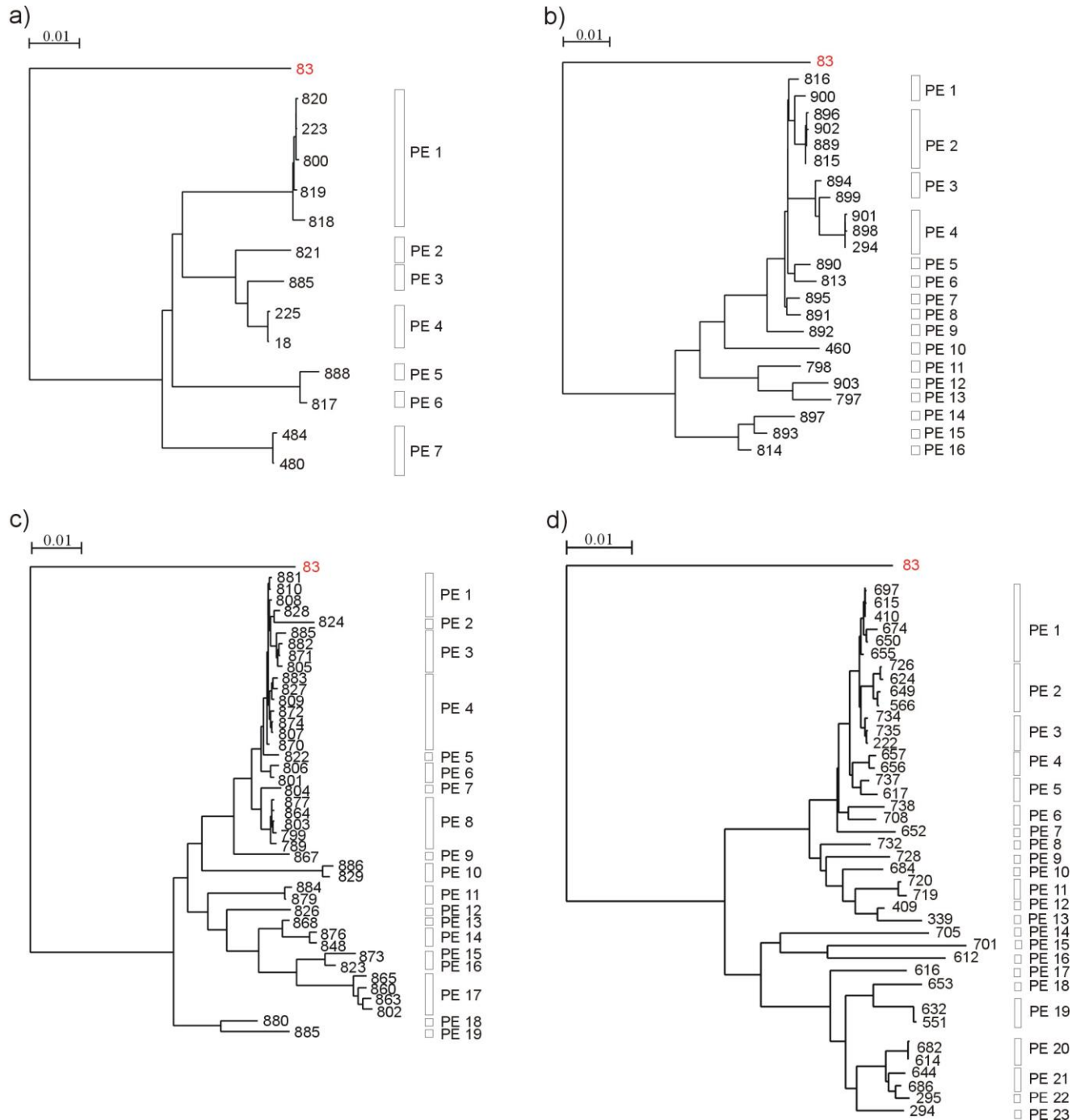


Ryc. 15. Drzewo filogenetyczne 161 izolatów *B. cereus* oraz ośmiu szczepów referencyjnych *B. cereus* s.l.

Drzewo wykonane metodą "łączenia sąsiadów". Liczby przy węzłach oznaczają wartość testu Bootstrap przy 1000 powtórzeniach. Izolaty i szczepy referencyjne są reprezentowane przez numery ST. Szczegółowe informacje na temat izolatów i szczepów referencyjnych zamieszczono w Tabeli S1 w Załącznikach. Na podstawie Kamińska i wsp., 2015.

10.4. Domniemane ekotypy wśród glebowych izolatów *B. cereus*

Domniemane ekotypy w populacjach *B. cereus* wyznaczono algorytmem Ecotype Simulation (Koeppel i wsp., 2008) (Ryc. 16).



Ryc. 16. Filogeneza na podstawie sekwencji nukleotydowych ST i podział na domniemane ekotypy (PE) izolatów *B. cereus* z prób gleby pobranej w Argentynie (a), Kazachstanie (b), Kenii (c) i Polsce (d).

Drzewa filogenetyczne (metoda „łączenia sąsiadów”) oraz podział na domniemane ekotypy zostały wykonane algorytmem Ecotype Simulation (Koeppel i wsp., 2008). Izolaty oznaczono typem ST.

Polska populacja *B. cereus* charakteryzowała się największą liczbą ekotypów (N=23; przedział ufności od 10 do 41), zaś w populacjach kazachskiej i kenijskiej wyróżniono ich odpowiednio 16 (przedział ufności od 11 do 23) i 19 (z przedziałem ufności od 10 do 31) ekotypów. Izolaty argentyńskie zostały sklasyfikowane do siedmiu ekotypów (przedział ufności od 5 do 10). Wyznaczone ekotypy *B. cereus* objęły od jednego do siedmiu izolatów (PE4 w populacji kenijskiej).

W celu zobrazowania dynamiki procesów ewolucyjnych w populacjach *B. cereus*, sekwencje nukleotydowe typów sekwencyjnych 161 izolatów oraz szczepu referencyjnego *B. pseudomycoides* DSMZ12224 (jako grupy zewnętrznej, *ang.* outgroup), poddano dwuetapowej analizie algorytmem Ecotype Simulation (ES). Wyniki tych analiz przedstawiono w Tabeli 26.

Największe różnice zaobserwowano dla współczynnika σ , obrazującego częstość zachodzenia selekcji okresowej. Jego wartości wahały się od 0,334 w populacji kenijskiej do 3,564 w populacji polskiej. We wszystkich analizowanych populacjach współczynnik σ był wyższy od współczynnika Ω , obrazującego tempo tworzenia ekotypów (od 0,014 do 0,038). Cechą wspólną izolatów niezależnie od pochodzenia, była zerowa wartość dryfu genetycznego.

Współczynnik selekcji okresowej dla badanych populacji wyznaczono na poziomie $\sigma=0,937$ (z przedziałem ufności od 0,132 do powyżej 100), a współczynnik tempa tworzenia ekotypów na poziomie $\Omega=0,042$ (z przedziałem ufności od 0,028 do 0,061). Ponadto, całkowitą liczbę domniemanych ekotypów (Ryc. S1 w Załącznikach) oszacowano na 60 (z przedziałem ufności od 52 do 110) z dryfem genetycznym $d=0$. W większości przypadków, poszczególne ekotypy tworzyły bakterie pochodzące z tej samej lokalizacji. Niemniej w ośmiu przypadkach (Ryc. S1) izolaty z różnych lokalizacji zostały przypisane do jednego ekotypu (PE 1, 7, 9, 12, 34, 41, 44, 58). Pomimo, że wiele ekotypów stanowiły pojedyncze izolaty, to wyznaczone też cztery ekotypy obejmujące od 10 do 22 izolatów.

Tabela 26. Parametry obrazujące historię ewolucyjną populacji *B. cereus*

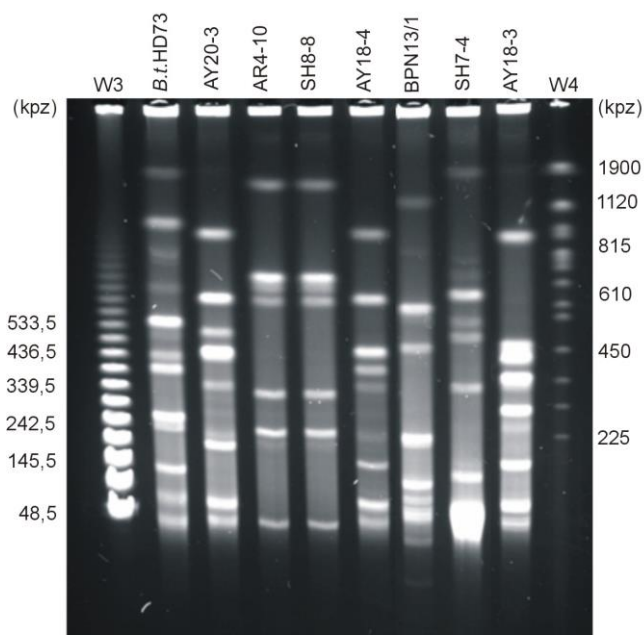
Współ- czynnik ^{a,b}	Pochodzenie izolatów <i>B. cereus</i>				Ogółem
	Argentyna	Kazachstan	Kenia	Polska	
Ω	0,014 (0,004; 0,032)	0,027 (0,012; 0,060)	0,030 (0,013; 0,045)	0,038 (0,026; 0,057)	0,042 (0,028; 0,061)
σ	0,362 (0,035;>100)	3,564 (0,001;>100)	0,334 (0,047; 2,555)	1,058 (0,033; >100)	0,937 (0,132; >100)
d	0 (0; 4,253)	0 (0;>1e7)	0 (0; 0,029)	0 (0,>1e7)	0 (0;>1e7)
n	7 (5; 10)	16 (11; 23)	19 (10; 31)	23 (10; 41)	60 (52; 110)

^a Ω , tworzenie nowych ekotypów; σ , okresowa selekcja; d , dryf genetyczny; n , całkowita liczba domniemanych ekotypów;

^bw nawiasach podano wartości parametrów z 95% przedziałem ufności.

10.5. Profile genomowe *B. cereus* a przynależność filogenetyczna

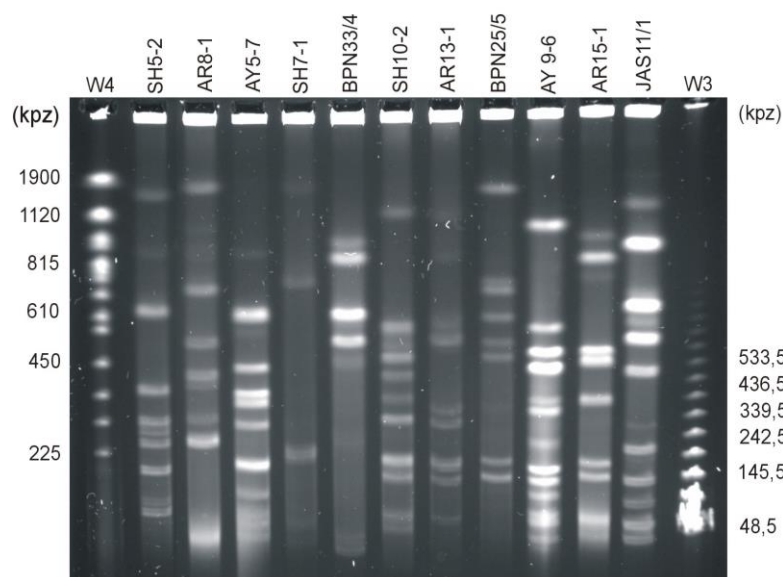
Polimorfizm genomowy wybranych izolatów *B. cereus* wyznaczono na podstawie wzorów elektroforetycznych fragmentów restrykcyjnych genomowego DNA w zmiennym pulsowo polu elektrycznym. Wyniki analiz wykazały dużą różnorodność pulsotypów wśród badanych bakterii. W wyniku trawienia genomowego DNA enzymem *NotI* uzyskano profile obejmujące od pięciu (SH7-1, Ryc. 18) do 14 (JAS11/1, Ryc. 18) odcinków. Wielkości uzyskanych fragmentów DNA również były bardzo zróżnicowane. Część szczepów *B. cereus* wykazywała obecność wspólnych prążków pomimo różnych miejsc pochodzenia, typów sekwencyjnych i przynależności do odmiennych kładów filogenetycznych (np. AR4-4, AR4-10, SH6-1, SH5-3, TE8-1, Ryc. 19). Nie wszystkie laseczki o tym samym ST posiadają jednolity profil elektroforetyczny (np. AY20-3, AY 18-4, AY18-3, Ryc. 17; AY 2-2, AY17-7, Ryc. 19). Niemniej wzory elektroforetyczne szczepów AR4-10 i SH8-8 o identycznym ST885, ale odrębnym pochodzeniu (Argentyna i Kenia) wykazały klonalny charakter (Ryc. 17). Analiza izolatów pod kątem pokrewieństwa filogenetycznego wskazuje na brak charakterystycznych wzorców DNA dla poszczególnych kładów. Pomimo przynależności izolatów do tego samego kompleksu klonalnego, ich wzory pulsotypów mogą różnić się znacząco (np. AY20-3, AY18-4, AY18-3 – CC889; Ryc. 17).



Ryc. 17. Pulsotypy genomowego DNA trawionego enzymem *NotI* izolatów *B. cereus* i szczepu referencyjnego *B. thuringiensis* HD73.

W badania zastosowano wzorce wielkości DNA podane w Tabeli 3.

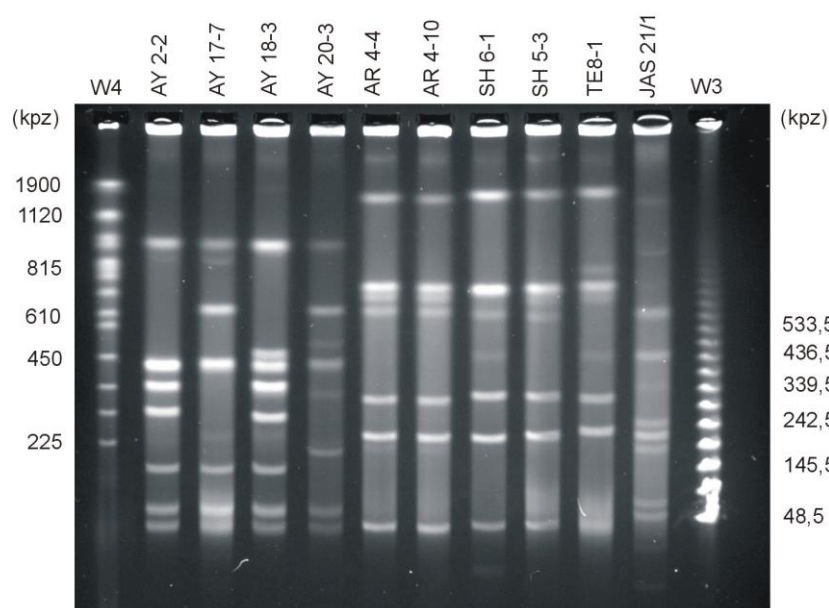
Informacje o izolatach *B. cereus*: **AY20-3**: ST889, kład I; **SH8-8**: ST885, kład III; **AY18-4**: ST889, kład I; **BPN13/1**: ST650, kład V; **SH7-4**: ST884, kład I; **AY18-3**: ST889, kład I.



Ryc.18. Pulsotypy genomowego DNA trawionego enzymem *NotI* izolatów *B. cereus*.

W badania zastosowano wzorce wielkości DNA podane w Tabeli 3.

Informacje o izolatach *B. cereus*: **SH5-2**: ST880, kład III; **AR8-1**: ST821, kład III; **AY5-7**: ST892, kład I; **SH7-1**: ST826, kład I; **BPN33/4**: ST737, kład I; **SH10-2**: ST829, kład IV; **AR13-1**: ST800, kład IV; **BPN25/5**: ST705, kład IV; **AY9-6**: ST889, kład I; **AR15-1**: ST888, kład I; **JAS11/1**: ST682, kład I.



Ryc. 19. Pulsotypy genomowego DNA trawionego enzymem *NotI* izolatów *B. cereus*.

W badania zastosowano wzorce wielkości DNA podane w Tabeli 3.

Informacje o izolatach *B. cereus*: **AY2-2**: ST889, kład I; **AY17-7**: ST889, kład I; **AY18-3**: ST889, kład I; **AY20-3**: ST889, kład I; **AR4-4**: ST885, kład III; **AR4-10**: ST885, kład III; **SH6-1**: ST810, kład III; **SH5-3**: ST881, kład III; **TE8-1**: ST870, kład III; **JAS11/1**: ST566, kład V.

10.6. Polimorfizm *B. cereus* na podstawie wybranych genów

Plazmidy odgrywają znaczącą rolę w biologii bakterii klasyfikowanych do grupy *B. cereus*. Ta przesłanka zadecydowała o wyborze do analiz porównawczych genów kodujących białka replikacji plazmidów typu pXO1 i pXO2 *B. anthracis*.

10.6.1. Frekwencja i stopień ekspresji genów białek replikacji plazmidów typu pXO1 i pXO2

Analizy częstości występowania determinant genetycznych białek replikacji plazmidów typu pXO1 i pXO2 (odpowiednio: gen *repX* i *repA_N*) *B. anthracis* przeprowadzono wśród wszystkich glebowych izolatów *B. cereus* (n=713). Wyniki tych analiz zebrano w Tabeli 27 oraz Tabeli S1 w Załącznikach.

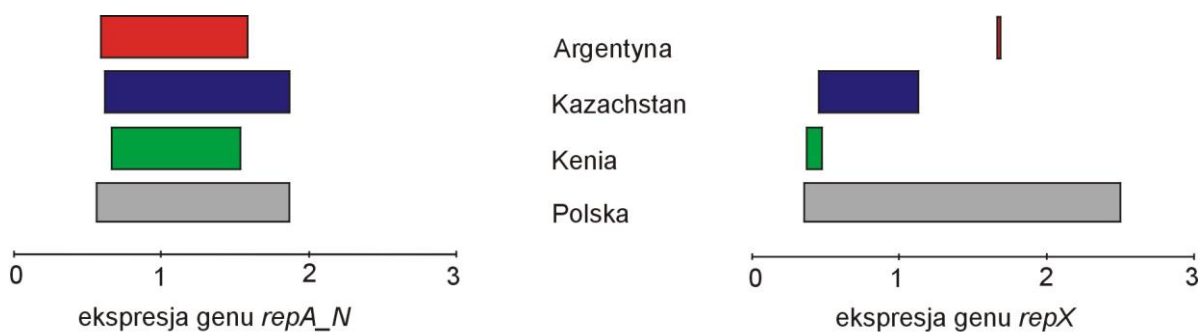
Tabela 27. Frekwencja genów *repA_N* i *repX* wśród glebowych izolatów *B. cereus*

Pochodzenie izolatów	Szczepy <i>repA_N</i> pozytywne ^a	Szczepy <i>repX</i> pozytywne ^a	Szczepy <i>repA_N</i> i <i>repX</i> pozytywne ^a
Argentyna	12 (6%)	1 (0,5%)	-
Kazachstan	21 (10,5%)	16 (8%)	-
Kenia	11 (5,2%)	11 (5,2%)	1 (0,5%)
Polska	35 (34%)	11 (10,6%)	8 (7,7%)

^a w nawiasach podano wartość procentową w odniesieniu do liczebności danej populacji.

Homologi *repA_N* i *repX* najczęściej notowano wśród polskich izolatów *B. cereus*. W tej populacji gen *repA_N* stwierdzono u 35 z 103 szczepów, a u ośmiu izolatów (JAS06/1, kład V; JAS06/3, kład V; JAS74/3, kład V; JAS78/2, kład V; JAS90/2, kład I; JAS94/5, kład V; BPN13/1, kład V; BPN37/1, kład V) zanotowano oba geny kodujące białka replikacji plazmidów typu pXO1 i pXO2. Jednocześnie oba geny stwierdzono jeszcze tylko w jednym szczepie, TE3-8, wyizolowanym z gleby pobranej w parku Tsavo East w Kenii. Warto zauważyć, że izolat TE8-3 wraz z *B. anthracis* Ames należy do kładu II. W pozostałych populacjach częstotliwość występowanie genów *repX* i *repA_N* była znacznie niższa i wahała się od 6,5% (populacja argentyńska, N=13/200) do 18,6% (populacja kazachska, N=37/199). Niemniej jednak dla wszystkich populacji liczba *repA_N*-pozytywnych izolatów przewyższała liczbę szczepów *repX*-pozytywnych. Analizy statystyczne rozkładu izolatów *repA_N*- i/lub *repX*-pozytywnych oraz *repA_N*- i *repX*-negatywnych wykonane testem χ^2 wskazują, że ich proporcje w poszczególnych populacjach różnią się znacząco ($p < 2,2e^{-16}$). Jednakże pomiędzy badanymi populacjami (z poprawką Bonferroni), frekwencje izolatów *repA_N*- i/lub *repX* – pozytywnych, była statystycznie istotna jedynie dla polskich i kazachskich *B. cereus* (p od $9e^{-11}$ do 0,039).

Poziom ekspresji genów *repA_N* (względem szczepu referencyjnego *B. thuringiensis* HD73) i *repX* (względem szczepu referencyjnego *B. thuringiensis* IS195) mierzony za pomocą PCR w czasie rzeczywistym, był zróżnicowany wśród badanych izolatów (Ryc. 20).



Ryc. 20. Zakres ekspresji genów *repA_N* i *repX* wśród izolatów *B. cereus* względem szczepów referencyjnych oszacowany metodą Real-time PCR.

Na podstawie Kamińska i wsp., 2015.

Największą rozpiętość ekspresji *repA_N* stwierdzono w populacjach kazachskiej (od 0,687 dla AY19-6 do 1,809 dla AY15-2) oraz polskiej (0,615 dla *B.c.* 06/1 do 1,895 dla JAS11/1). Natomiast w *B. cereus* pochodzących z prób gleby z Kenii obserwowano pośredni stopień transkrypcji badanej determinanty, zawierający się w granicach od 0,662 (TE8-3) do 1,454 (TE6-8), zaś w populacji argentyńskiej oszacowano poziom ekspresji od 0,642 (AR4-6) do 1,518 (AR1-10).

W odniesieniu do izolatów *repX*-pozytywnych najszerszy zakres ekspresji (od 0,304 dla BPN08/1 do 2,514 dla JAS06/3) wykazywały polskie izolaty. Co ciekawe, jedyny *repX*-pozytywny argentyński izolat AR15-1 ujawnił wyższą ekspresję (1,558) względem szczepu referencyjnego, aniżeli *repX*-pozytywne izolaty kazachskie (0,420 dla AY6-8 do 1,179 dla AY4-8) i kenijskie (od 0,365 dla TE8-1 do 0,483 dla SH10-1) (Ryc. 20).

10.6.2. Heterogeniczna natura replikonu plazmidów typu pXO2 wśród izolatów *B. cereus*

Analizy sekwencji genu kodującego białko replikacji plazmidów typu pXO2 oraz jego otoczenia, obejmujące miejsce inicjacji replikacji tzw. *origin (ori)* oraz region CT regulujący transkrypcję genu *repA_N* na zasadzie antysensownego RNA, ukazały ich niejednorodny charakter wśród badanych izolatów *B. cereus* (Ryc. 21). Replikony plazmidów typu pXO2 *B. cereus* nie są identyczne z replikonem występującym w komórkach *B. anthracis*. Układ nukleotydów w *ori* wskazuje na cechy charakterystyczne replikonu wśród środowiskowych izolatów *B. cereus*. Wśród nich jest 7 substytucji nukleotydowych (nukleotyd 24, 39, 53, 55, 56, 59, 60) u większości izolatów. Substytucje nukleotydowe występują także w miejscu wiązania z białkiem replikacji, które u wszystkich badanych *B. cereus* jest dłuższe o tyminę (Ryc. 21). W replikonie

zauważa się dość konserwatywny charakter sekwencji *origin* do 51 nukleotydu, zaś sekwencja zakończenia tego fragmentu charakteryzuje się większą zmiennością. Jednakże u izolatów AY15-8, AR4-3, AR4-5, AR4-6, AR4-7 i SH8-8 zaobserwowano kilka charakterystycznych podstawień nukleotydowych, co w zestawieniu pokrewieństwa genetycznego na bazie omawianej sekwencji spowodowało przypisanie ich do oddzielnej grupy (Ryc. S2a). Podobną cechę zaprezentowały także pozostałe izolaty kazachskie (AY20-3, AY6-2, AY1-4, AY16-6, AY19-6, AY13-6). Z kolei największą zbieżność z sekwencją inicjacji replikacji plazmidu pXO2 miały izolaty zastosowane w celach porównawczych tj *B.thuringiensis* JAS63/5 oraz *B.thuringiensis* BPN2/2. Zbliżone właściwości, jak zaobserwowane w sekwencjach *origin*, przejawiały również fragmenty CT oraz sekwencje genów *repA_N* (Ryc. 21, Ryc. S2).

10.6.3. Determinaty węgliką wśród izolatów *B. cereus*

Stwierdzenie obecności plazmidów typu pXO1 i pXO2 w części badanych szczepów, pociągnęło za sobą potrzebę zbadania występowania determinant węgliką, czyli genów kodujących czynnik letalny (*lef*), czynnik obrzęku (*cya*), antygen ochronny (*pagA*) oraz otoczki poli-D-glutaminowej (*cap*) wśród izolatów *B. cereus*. Jednakże nie stwierdzono w/w sekwencji nukleotydowych wśród *repA_N*- oraz *repX*-pozytywnych izolatów.

11. DYSKUSJA

Analiza zróżnicowania genetycznego populacji *B. cereus* z czterech lokalizacji została przeprowadzona na podstawie sekwencji nukleotydowych fragmentów genów metabolizmu podstawowego. Uzyskane wyniki generalnie potwierdzają polimorficzną naturę izolatów grupy *B. cereus* i pozostają w zgodzie z wcześniejszymi publikacjami (Helgason i wsp., 2004; Bartoszewicz i Marjańska, 2017). Jednakże, ze względu na unikatowy charakter przeprowadzonych badań, możliwe stało się dokładne oszacowanie i porównanie polimorfizmu genetycznego glebowych populacji *B. cereus* z różnych części świata. Niewątpliwie, szeroki zasięg przeprowadzonych analiz pozwala na rozszerzenie wiedzy o biologii glebowych populacji *B. cereus* oraz stworzenie wspólnej koncepcji o naturze tych bakterii. Jest to niezmiernie istotna kwestia, gdyż to właśnie gleba jest głównym rezerwuarem form przetrwalnikowych *B. cereus*, skąd odbywa się transmisja tych laseczek do zróżnicowanych lokalizacji, w tym produktów spożywczych (Bartoszewicz i Marjańska, 2017; Ceuppens i wsp., 2013).

Z kilkoma wyjątkami, poszczególne typy sekwencyjne *B. cereus* są generalnie swoiste dla konkretnych lokalizacji geograficznych. Warto zauważyć, że liczba szczepów reprezentujących typy sekwencyjne jest zmienna. Doskonałym tego przykładem są bakterie wyizolowane z prób gleby z Afryki, gdzie każdy izolat został sklasyfikowany do oddzielnego ST, podczas gdy w populacji kazachskiej wyodrębniono 23 ST spośród 46 izolatów. Niemniej, pomimo wysokiego polimorfizmu genetycznego we wszystkich populacjach, tylko wśród kenijskich bakterii zaobserwowano tak wysoką heterogeniczność. W literaturze przedmiotu (Drewnowska i Świącicka, 2013; Patiño-Navarette i Sanchis, 2016) za główną przyczynę różnicowania się genotypów w danej niszy, uznaje się wpływ warunków środowiskowych. Stąd też można wnioskować, że specyficzne czynniki naturalne oddziałujące na kenijskie *B. cereus*, m.in. temperatura, poziom wilgotności bądź chemizm gleby, wspomagają utrzymanie tak ogromnego polimorfizmu genetycznego wśród tych bakterii. Warto również zwrócić uwagę na spostrzeżenia Brauna i współpracowników (2015) dotyczące stopnia zmienności blisko spokrewnionych laseczek *B. anthracis* izolowanych z gleby w Parku Narodowym Pollino (południowe Włochy). Zauważono, że występuje pewien stopień polimorfizmu genetycznego wśród zasadniczo monomorficznych *B. anthracis*, izolowanych z prób gleby pochodzących z niewielkich głębokości, gdzie uprzednio zakopywano zwierzęta zmarłe na skutek wąglika. Jako jedną z grup czynników wspierających zróżnicowanie genotypów wskazano sporadyczne kiełkowanie endospor w korzystnych warunkach środowiskowych (lub też w przejściowych wektorach) oraz

replikację i ponowną sporulację. Nawiązując do cyklu życiowego *B. cereus* (Jensen i wsp., 2003) można zatem przypuszczać, że w przypadku izolatów kenijskich występuje podobna dynamika form przetrwalnych w glebie. Natomiast Drewnowska i Świącicka (2013) w pracy na temat eko-struktury genetycznej glebowych przedstawicieli *B. cereus s.l.* z północno-wschodniej Polski, stwierdziły, że obecność ekologicznie odrębnych genotypów jest wyrazem adaptacji do danego siedliska. Co ważne, największą różnorodność wykazano w populacji laseczek *B. cereus s.l.* wyizolowanych z prób gleby z Białowieskiego Parku Narodowego. Za powód uznano brak ingerencji antropogenicznej na tym terenie, co w konsekwencji sprzyja występowaniu mnogości „mikro-nisz ekologicznych” i różnicowaniu się genotypów jako efekt przystosowań do warunków środowiskowych. W nawiązaniu do otrzymanych w niniejszej pracy wyników można wnioskować, że dodatkowo prawdopodobnie mnogość mikro-nisz na terenie kenijskich parków narodowych Shimba Hills i Tsavo-East, pozytywnie oddziałuje na kształtowanie wysokiego poziomu polimorfizmu genetycznego *B. cereus* w tej populacji. Co ciekawe, zupełnie odmienny charakter ujawniły m.in. *Listeria monocytogenes* izolowane z żywności gotowej do spożycia (Wu i wsp., 2016). Na podstawie danych MLST wśród 80 izolatów tych pałeczek, opisano zaledwie cztery nowe ST. Dodatkowo, izolaty *L. monocytogenes* zaprezentowały stosunkowo niski stopień zmienności genetycznej (14 typów sekwencyjnych wśród 80 izolatów), co jest typowe m.in. dla emetycznych *B. cereus* (Yang i wsp., 2017). Zestawienie tych danych z wynikami otrzymanymi dla glebowych *B. cereus* w niniejszej pracy jednoznacznie sugeruje, że znaczący wpływ na stopień polimorfizmu bakterii mają oddziałujące czynniki zewnętrzne.

Pomimo, że populacje *B. cereus* różnią się liczbą typów sekwencyjnych, to poziom zmienności poszczególnych loci przejawia podobne tendencje we wszystkich lokalizacjach (Ryc. 3). Zatem, niezależnie od kontynentu, z którego pochodzą badane bakterie, plastyczność sekwencji genów i ewolucji genotypów *B. cereus* są zbliżone w izolowanych środowiskach. Należy jednak pamiętać, że polimorfizm genetyczny to wypadkowa, m.in. izolacji geograficznej, selekcji okresowej, rekombinacji oraz horyzontalnego transferu genów (Whitaker i wsp., 2003; Doolittle i Zhaxybayeva, 2009). Warto zauważyć, że analizy zmian molekularnych w sekwencjach nukleotydowych (Oliveira i wsp., 2016), wskazują na najczęstsze zachodzenie we wszystkich populacjach mutacji typu tranzycje (Tabele 19, 21, 23, 25). Podobne tendencje zostały zaobserwowane również w badaniach nad *Mycobacterium smegmatis* (Kucukyildirim i wsp., 2016) i *Pseudomonas aeruginosa* (Dettman i wsp., 2016). Hershberg i Petrova (2010), szczegółowo analizując typy mutacji w genomach bakteryjnych, stwierdzili, że najczęstsze są tranzycje G/C do A/T. Autorzy przyczynę tego zjawiska upatrują w podatności cytozyny do

deaminacji, podobnie jak w organizmach eukariotycznych. Ze względu na zbieżność tendencji tego typu mutacji wśród glebowych *B. cereus* z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, można założyć, że ten mechanizm występuje również wśród badanych izolatów *B. cereus* we wszystkich lokalizacjach geograficznych.

Dane płynące z analizy składu nukleotydowego fragmentów genów metabolizmu podstawowego mierzone ilością typów sekwencyjnych, alleli i liczbą miejsc polimorficznych, jednoznacznie wskazują na wysoki poziom polimorfizmu genetycznego glebowych populacji *B. cereus*. W literaturze przedmiotu podkreśla się rolę zróżnicowania genetycznego w zwiększeniu dostosowywania się tych bakterii do różnych mikrosiedlisk oraz w tworzeniu oddzielnych subpopulacji – ekotypów (Cohan i Koeppel, 2008; Cohan i Perry, 2007; Koeppel i wsp., 2013). Jednakże przeciwstawne wnioski nasuwają się po analizie współczynników dN/dS w izolatach badanych populacji. Wartości tego parametru we wszystkich badanych populacjach jednoznacznie wskazują na występowanie selekcji negatywnej wśród testowanych alleli. Konsekwencją tego faktu powinien być klonalny charakter poszczególnych populacji oraz populacji *B. cereus* w aspekcie międzykontynentalnym. Pozostaje to w sprzeczności ze strukturami genetycznymi populacji (Ryc. 5 - 9), wyznaczonymi za pomocą algorytmu goeBURT. Zbieżne wyniki uzyskano w analizach klinicznych i środowiskowych *Vibrio parahaemolyticus* (Lüdeke i wsp., 2015). Wartości współczynnika dN/dS poniżej 1 również nie współgrały z wyznaczoną strukturą genetyczną, gdzie spośród 58 izolatów z przypisanymi 48 rodzajami ST nie wystąpił żaden kompleks klonalny. Cohan (2006) przedstawił tezę, która łączy te pozornie wykluczające się wyniki. Określił to zjawisko jako selekcję okresową (*ang.* periodic selection), a polega na działaniu doboru oczyszczającego we wszystkich badanych loci odrębnych ekotypów w odstępach czasu. Oszacowane niskie wartości współczynników r/m , świadczące o rzadkości zachodzenia procesu rekombinacji, wskazują na „cykliczną” naturę badanych populacji, tzn. przejściowość wysokiego polimorfizmu genetycznego. Spowodowane to jest prawdopodobnie występowaniem selekcji okresowych w pewnych odstępach czasu. Dobrym przykładem na potwierdzenie tego założenia jest obecność wyznaczonych w tej pracy, specyficznych typów sekwencyjnych dla danej lokalizacji geograficznej, np. ST889 wśród szczepów kazachskich bądź ST885 wśród szczepów południowoamerykańskich (Ryc. 9). Według Wiedenbecka i Cohana (2011) właśnie te typy sekwencyjne mogą zapewniać dominację w opanowywaniu danego siedliska. Natomiast klonalność izolatów *B. cereus* z powyższymi typami sekwencyjnymi jest prawdopodobnie następstwem ostatniej selekcji okresowej. Co ciekawe, otrzymane zakresy współczynników r/m pozostają w zgodzie z wynikami otrzymanymi

dla przedstawicieli grupy *B. cereus* we wcześniejszych badaniach (Didelot i wsp., 2009; Zwick i wsp., 2012). Warto zauważyć, że zwiększona częstotliwość zachodzenia rekombinacji została stwierdzona u niektórych patogennych gatunków bakterii, np. *Salmonella enteritica* (Didelot i wsp., 2007) i *Staphylococcus pseudintermedius* (Pires dos Santos i wsp., 2016). Jednakże w odniesieniu do niniejszych badań najbardziej trafny wydaje się argument wskazujący na wpływ zróżnicowanych warunków środowiskowych na częstość zachodzenia procesu rekombinacji.

Dotychczas niejednokrotnie postulowano konieczność uwzględniania w analizach wpływu czynników ekologicznych na zmienność genetyczną oraz systematykę bakterii (Cohan i Koeppel, 2008; Connor i wsp., 2010). Ta propozycja była uwzględniana w badaniach wielu rodzajów bakterii z różnych środowisk, m.in. morskich *Thalassospira* (Lai i wsp., 2014) bądź cyjanobakterii *Synechococcus* spp. pochodzących z gorących źródeł (Melendrez i wsp., 2015). Uzyskane konfiguracje nukleotydowe typów sekwencyjnych glebowych *B. cereus* z różnych lokalizacji geograficznych są także doskonałym źródłem danych do analiz ich dywergencji ekologicznej i tworzenia wspomnianych wcześniej ekotypów. Melendrez i wsp. (2011) zauważyli, że stosowanie sekwencji pojedynczego genu do wyznaczania ekotypów może być niemiarodajnym sposobem na ustalenie ich powiązań (adaptacji) z siedliskami. Natomiast wiarygodność uzyskanych wyników w rozgraniczaniu poszczególnych ekotypów wzrasta po zastosowaniu większej ilości loci, stad też stosowanie sekwencji nukleotydowych fragmentów siedmiu genów metabolizmu podstawowego i wyznaczanie typów sekwencyjnych jest jak najbardziej słuszne. Dotychczasowe badania w obrębie grupy *B. cereus* jednoznacznie wskazywały na występowanie grup ekologicznych w obszarze testowanych populacji. Analizy przeprowadzone na glebowych izolatach *B. thuringiensis* (Święcicka i wsp., 2013) ukazały obecność termicznych ekotypów w związku ze wzrostem w niskiej temperaturze oraz bliskich powiązaniach filogenetycznych z psychrotolerancyjnym szczepem *B. weihenstephanensis*. Ekologiczny wymiar przystosowań genotypów do specyficznych warunków środowiskowych przedstawiono również w odniesieniu do innych członków grupy *B. cereus* (Drewnowska i Święcicka, 2013). Analiza przeprowadzona wśród glebowych m.in. *B. thuringiensis* oraz *B. mycooides* z terenów parków narodowych oraz gleby uprawnej pokazała, że oprócz termicznych przystosowań części izolatów do wzrostu w niskich temperaturach (ekotyp psychrotroficzny), izolaty z prób gleby pobranej w gospodarstwie rolnym charakteryzuje obecność genu kodującego cytotoksynę K (ekotyp cytotoksyczny). Występowanie tej determinanty jedynie wśród części izolatów z prób gleby uprawnej, może mieć związek z oddziaływaniem antropogenicznym. Należy także pamiętać, że gleba jest środowiskiem silnie niejednorodnym

(Chase i wsp., 2018, co sprzyja formowaniu się odrębnych ekotypów. Ze względu na wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia drobnych zmian środowiskowych nawet w obrębie małych przestrzeni, obecność ogromnej różnorodności ekotypowej bakterii w badanym obszarze nie jest niczym zdumiewającym. Ponadto, zróżnicowanie ekotypowe bakterii danego taksonu umożliwia opanowanie większej ilości siedlisk (Moore i wsp., 1998; Chase i wsp., 2018). Jednakże identyfikacja czynników środowiskowych determinujących skład ekotypowy na danym terenie nie jest łatwa do ustalenia, co doskonale obrazują badania Chase'a i wsp. (2018) przeprowadzone na bakteriach z rodzaju *Curtobacterium*. Autorzy wskazują, że na bakterie glebowe oddziałuje wiele czynników fizycznych i chemicznych, stąd też kształtowanie preferencji ekologicznych bakterii może zależeć od wielu z nich jednocześnie oraz od interakcji pomiędzy tymi czynnikami. Dodatkowo, ze względu na specyfikę badań, analizom poddawane są próby gleby, nie zaś cała przestrzeń. Gleba jako środowisko wysoce niejednorodne jest rezerwuarem ogromnej ilości mikrosiedlisk, w związku z czym ekotypy mogą reagować na zmiany środowiskowe nawet w bardzo wąskich skalach przestrzennych (Chase i wsp., 2018). Dlatego też w celu jak najbardziej rzetelnego rozdzielenia badanych izolatów *B. cereus* do osobnych ekotypów oraz oszacowania wartości parametrów dynamiki ewolucyjnej poszczególnych populacji, sekwencje nukleotydowe typów sekwencyjnych poddano analizie w programie Ecotype Simulation (Koeppel i wsp., 2008). Wartości współczynników uzyskane dla poszczególnych lokalizacji geograficznych okazały się zróżnicowane, jednakże ich wspólnym elementem jest wartość dryfu genetycznego oszacowana we wszystkich przypadkach na 0. Okazuje się, że identyczny rezultat uzyskano w badaniach izolatów *B. simplex* i *B. subtilis*-*B. licheniformis* w 2008 (Koeppel i wsp., 2008). Co ciekawe, populacja kazachska wyróżnia się najwyższym tempem selekcji okresowej spośród wszystkich badanych puli izolatów, jednakże nie koreluje to z tempem tworzenia nowych ekotypów. Należy również mieć na uwadze, że izolaty reprezentujące oddzielne ekotypy mogą być niekiedy izolowane jako endospory, które losowo znalazły się w danym siedlisku. Będzie to wówczas zmniejszało moc statystyczną przeprowadzanych analiz (Connor i wsp., 2010).

W 2005 roku Święcicka i Mahillon wskazali, że jednym ze sposobów wyznaczania pokrewieństwa genetycznego pomiędzy przedstawicielami grupy *B. cereus* jest analiza porównawcza ich pulsotypów otrzymanych metodą PFGE. Uzyskane w niniejszej pracy genomowe profile elektroforetyczne wybranych glebowych izolatów *B. cereus* z różnych populacji generalnie nie korelują z wynikami MLST. Unikatowość wzorów PFGE/*NotI* badanych *B. cereus* wykazano zarówno pomiędzy izolatami należącymi do tego samego typu

sekwencyjnego oraz pochodzącymi tej samej lokalizacji. Pomimo rozbieżności, zaobserwowane wyniki są potwierdzeniem wysokiego stopnia polimorfizmu genetycznego badanych bakterii i zmienności genomowej glebowych *B. cereus* we wszystkich badanych lokalizacjach geograficznych.

Genomy *B. cereus* oraz innych laseczek im pokrewnych *B. cereus s.l.* zawierają liczne plazmidy (Murawska i wsp., 2013; Hu i wsp., 2009b; Zwick i wsp., 2012), które w sposób zasadniczy wpływają na zmienność genetyczną tych bakterii. W odniesieniu do *B. cereus* w szczególności zwracają uwagę plazmidy o replikonach typowych dla plazmidów pXO1 i pXO2 w *B. anthracis*. Z tego względu postanowiłam oszacować występowanie tych struktur genetycznych wśród glebowych izolatów *B. cereus* w aspekcie międzykontynentalnym. Obecność plazmidów typu pXO1 i pXO2 *B. anthracis* była wcześniej identyfikowana wśród glebowych populacji *B. cereus s.l.* z Belgii (Hu i wsp., 2009b), Maryland (Zwick i wsp., 2012) oraz w poszczególnych szczepach *B. thuringiensis* (Święcicka i wsp., 2013). W niniejszej pracy zaprezentowano ich występowanie w glebowych izolatach *B. cereus* pochodzących z czterech kontynentów na podstawie obecności genów kodujących homologi białek replikacji plazmidów typu pXO1 i pXO2 – odpowiednio *repX* i *repA_N*. We wszystkich badanych populacjach zidentyfikowano *B. cereus* posiadające w swoim genomach plazmidy typu pXO1 i pXO2. Co ciekawe, frekwencja genu *repA_N* została zanotowana ze znacznie większą częstotliwością aniżeli *repX*, co pozostaje w zgodzie z wynikami prezentowanymi w literaturze (Hu i wsp., 2009b; Bahl i Rosenberg, 2010, Liu i wsp., 2015). Niemniej jednak pod tym względem populacja polskich *B. cereus* jest najbardziej swoista, ponieważ prawie połowa izolatów okazała się nosicielami sekwencji typu *repA_N*, podczas gdy sekwencje homologiczne do *repX* stwierdzono zaledwie u około 10% izolatów. Ponadto, badania ekspresji genów *repA_N* oraz *repX* na poziomie transkryptomu ukazały wyższą ekspresję replikonów plazmidów typu pXO1 wśród polskich *B. cereus*, co może wskazywać na większą liczbę kopii tych plazmidów w genomach. Jednakże determinanty wirulencji wąglikowej kodowane na plazmidach *B. anthracis*, takie jak geny kodujące komponenty egzotoksyny wąglikowej i/lub zaangażowane w biosyntezę otoczki poli-D-glutaminowej, nie zostały znalezione wśród badanych izolatów z żadnej lokalizacji.

Częste występowanie plazmidów typowych dla *B. anthracis* wśród *B. cereus* jest przypuszczalnie związane z warunkami środowiskowymi zwiększającymi prawdopodobieństwo zajścia horyzontalnego transferu genów (Wiedenbeck i Cohan, 2011). Wydaje się, że przewaga *repA_N*-pozytywnych izolatów w geograficznie odległych populacjach może być skorelowana z

częstszym współwystępowaniem tego replikonu z plazmidami koniugacyjnymi. W istocie horyzontalny transfer genów, a w szczególności koniugacji, zachodzi u bakterii zaliczanych do grupy *B. cereus* w różnych warunkach (Hu i wsp., 2009a, Modrie i wsp., 2010). W środowisku naturalnym, gleba bogata w materiał organiczny może stymulować horyzontalny transfer genów (Bizzarii i Bishop, 2007). Niemniej jednak w badaniach własnych uzyskane wyniki ujawniły dyspersję *repA_N*- oraz *repX*-pozytywnych izolatów *B. cereus* we wszystkich populacjach i zróżnicowaną zmienność genomową badanych izolatów. Warto zauważyć, *repA_N*- oraz *repX*-pozytywne *B. cereus* nie przejawiają monofiletycznej natury *B. anthracis* (Cherif i wsp., 2003) i nie tworzą jednej wspólnej linii genetycznej (Ryc. 15). Obecność plazmidów typów pXO1 i pXO2 jako potencjalnych czynników wirulencji wśród testowanych izolatów, nie jest przypisana tylko do konkretnych lokalizacji. Jednakże ich występowanie jest najprawdopodobniej wyrazem ekologicznego przystosowania do warunków środowiskowych (Guinebretière i wsp., 2017).

Ważnym aspektem związanym z funkcjonowaniem plazmidów są ich systemy replikacji. Dotychczasowe badania pXO2 *B. anthracis* akcentują wysoki poziom konserwatywności replikonu tego plazmidu (Tinsley i wsp., 2004; Tinsley i Khan, 2007). Co ważne, zaobserwowano, że po wprowadzeniu zrekombinowanych plazmidów (plazmid pBSCmrepS – 6853 pz) z tym replikonem do innych bakterii, tj *B. cereus*, *B. subtilis* czy *E. coli*, dochodzi do ich powielania (Tinsley i wsp., 2004). Pozytywne i zróżnicowane wyniki ekspresji genu kodującego białko replikacji plazmidów typu pXO2 wśród badanych izolatów, skłoniły do wnikliwej analizy struktury miejsca inicjacji replikacji oraz jego otoczenia. W celu porównania struktury replikonów plazmidów typu pXO2 glebowych izolatów *B. cereus* z replikonem plazmidu pXO2 *B. anthracis*, poddano je procedurze sekwencjonowania. Na tej podstawie stwierdzono organizację identyczną organizację replikonów *B. cereus* oraz pXO2 *B. anthracis*. Jednakże miejsce inicjacji replikacji (*origin*) plazmidów typu pXO2 oraz jego otoczenie (gen *repA_N* oraz region CT) w żadnym izolacie nie są identyczne z fragmentem sekwencji plazmidu pXO2. Co więcej, analiza sekwencji nukleotydowych nie pozwoliła na wyznaczenie podstawień typowych dla danej lokalizacji geograficznej. Uwagę zwraca fakt, że analizy pokrewieństwa pomiędzy izolatami na postawie całego replikonu oraz jego poszczególnych fragmentów wskazują na odrębność sześciu izolatów.

We wszystkich przypadkach topologia dendrogramów opiera się na kilku liniach filogenetycznych, ale tylko izolaty *B. cereus* z gleby pobranej w Polsce, rozdzieliły się na dwie gałęzie. Dodatkowo laseczki z poszczególnych lokalizacji specyficznym łączy się ze szczepami referencyjnymi *B. cereus s.l.* Interesujące, że w populacji kazachskiej i polskiej odnotowano

izolaty wykazujące bliskie pokrewieństwo z psychrotroficznymi szczepami *B. weihenstephanensis* (Ryc. 11 i 13), co jest wyrazem adaptacji ekologicznej do chłodniejszych warunków klimatycznych w tych dwóch lokalizacjach. Już we wcześniejszych badaniach wykazywano obecność psychrotolerancyjnych glebowych izolatów z grupy *B. cereus* pochodzących z prób gleby z północno-wschodniej Polski i Litwy (Święcicka i wsp., 2013). Co ciekawe, podobnych właściwości nie stwierdzono w żadnej populacji w stosunku do szczepu referencyjnego *B. anthracis* Ames. Zaobserwowano zróżnicowany dystans genetyczny w stosunku do tej bakterii, ale najbliższe powinowactwo stwierdzono w puli izolatów z Kazachstanu (jeden izolat) oraz Kenii (cztery izolaty z Parku Narodowego Tsavo East). Otrzymane dane wskazują na zbieżność z danymi literaturowymi (Doganay i Demiraslan, 2015), które wyraźnie eksponują Afrykę jako jeden z terenów endemicznych laseczek wąglika, stąd też prawdopodobnie wynika największa liczebność izolatów zbliżonych filogenetycznie do *B. anthracis*.

W analizach filogenetycznych założono, że badane glebowe izolaty *B. cereus* będą tworzyły oddzielne linie filogenetyczne korelujące z pochodzeniem. Otrzymane wyniki ukazały formowanie przez nie pięciu odrębnych kładów, których kompozycja jest powiązana z przynależnością geograficzną. Otrzymane wyniki doskonale wpisuje się w naturę izolatów z grupy *B. cereus* (Guinebretière i wsp., 2008; Raymond i wsp., 2010). Wyznaczenie powiązań filogenetycznych pomiędzy bakteriami od dawna stanowiło trudne wyzwanie. Wraz z postępem naukowym wykazywano, że powiązania filogenetyczne są cennym źródłem informacji o badanych mikroorganizmach. Poszukiwanie miarodajnej i funkcjonalnej metody przyczyniło się do opracowania szeregu technik molekularnych z powodzeniem używanych w poznawaniu pokrewieństwa pomiędzy badanymi bakteriami. Korelacja pomiędzy dostępnymi danymi literaturowymi a rezultatami rekonstrukcji powiązań filogenetycznych glebowych izolatów *B. cereus* z różnych części świata w niniejszych analizach wyłania zarys tendencji ewolucyjnych tych bakterii oraz umożliwia wyznaczenie prawdopodobnych właściwości wynikających z przynależności poszczególnych izolatów do kładów. Pomimo znacznej liczebności kladu I, w którym skupiły się w większości izolaty kazachskie, nie uplasował się w nim żaden z zastosowanych w badaniach szczepów referencyjnych. Natomiast zgromadzone w kładzie II izolaty afrykańskie wykazały bliskie pokrewieństwo filogenetyczne z szczepami referencyjnymi *B. anthracis* Ames oraz *B. cereus* ATCC10987. Przynależność tych szczepów do kladu II pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi analizami (Priest i wsp., 2004; Cardazzo i wsp., 2008; Hoffmaster i wsp., 2008). Z kolei większość izolatów kenijskich i argentyńskich utworzyły

odpowiednio kłady III oraz IV. Natomiast piąta linia filogenetyczna została uformowana w ogromnej przewadze z polskich izolatów, wykazujących podobne genotypy do psychrotolerancyjnych szczepów referencyjnych *B. weihenstephanensis* WSBC10364 i DSMZ 11821. Pomimo dominujących frakcji w każdym z kładów, żaden z nich nie był monomorficzny i zawierał także izolaty z innych lokalizacji geograficznych. Zaprezentowana architektura kładów jednoznacznie sugeruje formowanie oddzielnych linii filogenetycznych wśród glebowych *B. cereus* sprzężonych z pochodzeniem, ale równocześnie ukazuje występowanie pokrewnych genotypów w oddalonych od siebie populacjach. Związane jest do najprawdopodobniej z transmisją form przetrwalnikowych bakterii pomiędzy różnymi lokalizacjami geograficznymi. Otrzymane wyniki doskonale wpisują się w naturę bakterii *Bacillus* spp., które z powodzeniem migrują między różnymi lokalizacjami geograficznymi, nawet kontynentami (Roberts i Cohan, 1995). Co ważne, podobne tendencje powiązania filogenezy z miejscem pochodzenia ujawniono również w innych grupach bakterii m.in. morskich *Bacillus pumilus* (Liu i wsp., 2013). Przeprowadzone analizy filogenetyczne metodą MLST wśród 76 środowiskowych izolatów tego gatunku wskazują na grupowania się poszczególnych izolatów w osobne zespoły korelujące z w pewnym stopniu z głębokością wody, z której się wywodzą.

Jednym z aspektów wpływających na kształtowanie filogenezy w obrębie grupy *B. cereus* są oddziaływujące czynniki środowiskowe, co skutkuje ekotypowym charakterem populacji *B. cereus* (Cohan i Perry, 2008; Patiño-Navarette i Sanchis, 2016). Analizy przeprowadzone przez Guinebretière i wsp. (2008) oraz Bartoszewicza i wsp. (2009) ukazują, że jednym z nich jest temperatura. Dostosowanie się bakterii do warunków bytowania, modeluje procesy ewolucyjne zachodzące w obrębie *B. cereus s.l.*, co bezpośrednio kształtuje kierunki rozwoju linii ewolucyjnych. Zastosowane w badaniach populacje bakteryjne pochodzące z różnych szerokości geograficznych oraz topologia ich drzew filogenetycznych mogą sugerować dostosowywanie genotypów się do odmiennych warunków termicznych/klimatycznych, jednakże wyjaśnienie tego zagadnienia wymaga dodatkowych badań. Nawiązując do przedstawionych ustaleń, warto odnieść się do analiz przeprowadzonych Fiedoruka i wsp. (2017), wskazujących na bezpośredni związek pomiędzy zmianami w białkach rybosomalnych a termotypami w grupie *B. cereus*. Co ciekawe, zestawienia sekwencji aminokwasowych tych białek pokazały, że wśród psychrotolerancyjnych izolatów występuje preferencja izoleucyny oraz seryny odpowiednio nad waliną i alaniną. Zaproponowano, że za tymi zmianami stoi m.in. pozytywny dobór naturalny związany z panującymi warunkami termicznymi, prowadzący do wzrastania udziału konkretnych aminokwasów w sekwencjach białek rybosomalnych oraz faworyzowanie określonych

wariantów białek rybosomalnych, charakterystycznych dla danego termotypu. Reasumując, wyniki przedstawione w powyższej publikacji wyraźnie sugerują, że temperatura jest czynnikiem wpływającym kształtowanie genotypów bakteryjnych, niezależnie od pozycji filogenetycznej.

Ustalanie stopnia polimorfizmu, filogenezy i zmienności genomowej izolatów *B. cereus* niewątpliwie stanowi ważki problem badawczy ze względu na szerokie rozpowszechnienie tych bakterii i wielowymiarowe oddziaływanie w różnych aspektach życia człowieka. W szczególności właściwości glebowych laseczek *B. cereus*, z powodu łatwości transmisji do różnych środowisk, wymagają dokładnej eksploracji, wyjaśnienia podłoża zmienności i przewidywania dalszych możliwych ścieżek ewolucyjnych. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wyraźnie pokazują ogromną przydatność do tego typu badań analiz MLST. Należy zauważyć, że MLST to doskonałe narzędzie nie tylko do analizowania powiązań filogenetycznych. Na bazie uzyskanych danych przeprowadza się również analizy polimorfizmu genetycznego (Álvarez-Pérez i wsp., 2013) oraz struktury genetycznej badanej populacji (Sorokin i wsp., 2006; Liu i wsp., 2017), co zostało także zastosowane do analiz glebowych *B. cereus* w niniejszej pracy. Poszukiwanie coraz bardziej szczegółowej i rzetelnej charakterystyki blisko spokrewnionych szczepów bakteryjnych doprowadziło do rozpowszechnienia typowania na podstawie kilku sekwencji genów metabolizmu podstawowego. Jego przewaga polega na uwzględnieniu w analizach pionowego i poziomego transferu genów, co w konsekwencji doprowadziło do intensywnego rozwoju i powszechnego uznania zaproponowanej techniki (Maiden i wsp., 2013). Wykazano, że jest ona niezwykle użyteczna w analizach filogenetycznych zróżnicowanych gatunków bakteryjnych m.in. z rodzaju *Staphylococcus* czy też *Neisseria*. Co ważne, pozyskane dane okazały się być cennym instrumentem (tzw. „złoty standard”) w śledzeniu dyspersji bakterii chorobotwórczych w kontekście identyfikacji ognisk chorób czy monitorowaniu trendów epidemiologicznych danego schorzenia w aspekcie krajowym i/lub globalnym (Enright i Spratt, 1999; Urwin i Maiden, 2003). Stało się to możliwe dzięki publikowaniu otrzymywanych danych w ogólnodostępnej bazie co w rezultacie dało sposobność m.in. porównywania i analizowania zgromadzonych informacji.

12. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Wyniki badań zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej umożliwiły szczegółowe zapoznanie się z polimorfizmem, strukturą genetyczną, filogenezą oraz zmiennością genomową glebowych populacji *B. cereus* w aspekcie międzykontynentalnym. Zastosowanie metody typowania na podstawie fragmentów sekwencji nukleotydowych genów metabolizmu podstawowego, umożliwiło wyznaczenie najwyższego poziomu zróżnicowania genetycznego wśród izolatów polskich, przy czym laseczki z pozostałych lokalizacji (Argentyna, Kazachstan, Kenia) przejawiały zbliżone tendencje we wszystkich loci, co zostało potwierdzone analizami techniką PFGE. Jednakże przypisanie poszczególnych izolatów do typów sekwencyjnych pokazało przynależność każdej analizowanej bakterii z prób gleby z Kenii do oddzielnego ST, co wyróżniło tę populację na tle innych. Co ważne, w dwóch populacjach ujawniono charakterystyczne dla nich ST tj ST889 (Kazachstan) oraz ST885 (Argentyna), wskazujące na ich wartość przystosowawczą do warunków środowiskowych właściwych dla tych lokalizacji geograficznych. Uzyskane niskie wartości współczynników dN/dS w badanych pulach *B. cereus*, sugerujące klonalny charakter wszystkich populacji nie znalazły odzwierciedlenia w strukturach genetycznych wyznaczonych algorytmem goeBURST. Z kolei odtworzenie powiązań filogenetycznych pomiędzy 161 analizowanymi izolatami odśloniło formowanie się pięciu oddzielnych kładów, jednakże w żadnym z nich nie skupiły się bakterie wyłącznie z jednego kontynentu. Analiza ich składów umożliwiła wyznaczenie dominującego typu geograficznego w każdym z nich. Co ciekawe, ujawniły one także zróżnicowany stopień pokrewieństwa genetycznego z zastosowanymi w badaniach szczepami referencyjnymi. Uwagę zwraca brak pokrewieństwa południowoamerykańskich i kenijskich *B. cereus* z psychrotolerancyjnymi szczepami referencyjnymi *B. weihenstephanensis*.

Wszystkie badane populacje cechują się obecnością w genomach części izolatów plazmidów typu pXO1 i pXO2 *B. anthracis*, przy czym ich najwyższą frekwencję wyznaczono wśród polskich *B. cereus*. Oszacowanie względnego poziomu ekspresji białek replikacji powyższych plazmidów pokazało, że ich największa rozpiętość występuje wśród laseczek izolowanych z prób gleby z Polski. Natomiast badania konfiguracji fragmentów replikonów plazmidów typu pXO2 ujawniły organizację tożsamą z replikonem plazmidu pXO2 *B. anthracis*. Jednakże porównanie sekwencji umożliwiło wyznaczenie w nich charakterystycznych podstawień nukleotydowych dla środowiskowych *B. cereus*.

Z przeprowadzonych badań płyną następujące wnioski:

1. Glebowe populacje *B. cereus* charakteryzuje wysoki stopień polimorfizmu genetycznego, niezależnie od pochodzenia izolatów. Niemniej bakterie o tym samym typie sekwencyjnym występują w różnych lokalizacjach geograficznych.
2. Pomimo stosunkowo wysokiego polimorfizmu genetycznego, populacje *B. cereus* podlegają selekcji negatywnej o charakterze okresowym.
3. Glebowe izolaty *B. cereus* formują linie filogenetyczne generalnie korelujące z miejscem ich pochodzenia. Jednakże część laseczek z odrębnych geograficznie lokalizacji wykazuje pokrewieństwo filogenetyczne.
4. Glebowe populacje *B. cereus* charakteryzuje ekotypowy charakter o zróżnicowanej liczebności subpopulacji. Część pojedynczych izolatów stanowi oddzielne ekotypy co potwierdza wielość mikronisz obecnych w środowisku glebowym.
5. *B. cereus* zawierają plazmidy typu pXO1 i/lub pXO2. Izolaty z tymi plazmidami występują ze zmienną frekwencją w poszczególnych populacjach i nie przejawiają monofiletycznej natury *B. anthracis*.
6. Pomimo, że struktura replikonu plazmidów typu pXO2 *B. cereus* ma taki sam układ poszczególnych fragmentów jak w plazmidzie pXO2 *B. anthracis*, to różni je zmienność nukleotydowa w miejscach inicjacji replikacji (*origin*) oraz jego otoczeniu.

13. BIBLIOGRAFIA

- Adams V., Li J., Wisniewski J.A., Uzal F.A., Moore R.J., McClane B.A., Rood J.I., 2014.** Virulence plasmids of spore-forming bacteria. *Microbiology Spectrum* 2: 1-24.
- Álvarez-Pérez S., de Vega C., Herrera C.M., 2013.** Multilocus sequence analysis of nektar *Pseudomonas* reveals high genetic diversity and contrasting recombination patterns. *PLoS ONE* 8(10): e75797.
- Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., Gerdes S., Glass E.M., Kubal M., Meyer F., Olsen G.J., Olson R., Osterman A.L., Overbeek R.A., McNeil L.K., Paarmann D., Paczian T., Parello B., Pusch G.D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O., 2008.** The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9: 1-15.
- Bahl M.I., Rosenberg K., 2010.** High abundance and diversity of *Bacillus anthracis* plasmid pXO1-like replicons in municipal wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* 74: 241-247.
- Bartoszewicz M., Bideshi D.K., Kraszewska A., Modzelewska E., Świącicka I., 2009.** Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotropic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1967-1975.
- Bartoszewicz M., Marjańska P.S., 2017.** Milk-originated *Bacillus cereus sensu lato* strains harbouring *Bacillus anthracis*-like plasmids are genetically and phenotypically diverse. *Food Microbiology* 67: 23-30.
- Bizzarri M.F., Bishop A.H., 2007.** The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. *Microbial Ecology* 56: 133-139.
- Brillard J., Dupont C.M.S., Berge O., Dargaignaratz C., Oriol-Gagnier S. Doussan C., Broussolle V., Gillon M., Clavel T., Bérard A., 2015.** The water cycle, a potential source of the bacterial pathogen *Bacillus cereus*. *BioMed Research International*, ID 356928.
- Braun P., Grass G., Aceti A., Serrecchia L., Affuso A., Marino L., Grimaldi S., Pagano S., Hanczaruk M., Georgi E., Northoff B., Schöler A., Schloter M., Antwerpen M., Fasanella M., 2015.** Microevolution of anthrax from a young ancestor (M.A.Y.A.) suggests a soil-borne life cycle of *Bacillus anthracis*. *PLoS One* 10:e0135346.

- Bruand C., Ehrlich S.D., 1998.** Transcription-driven DNA replication of plasmid pAM β 1 in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 30: 135-145.
- Bruand C., Le Chatelier E., Ehrlich S.D., Jannerie L. 1993.** A fourth class of theta replicating plasmids: the pAM β 1 family from Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:11668-11672.
- Cardazzo B., Negrisolo E., Carraro L., Alberghini L., Patarnello T., Giaccone V., 2008.** Multi-locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 850-860.
- Carver T., Harris S.R., Berriman M., Parkhill J., McQuillan J.A., 2012.** Integrated platform for visualisation of analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* 28: 464-469.
- Ceuppens S., Boon N., Uyttendaele M., 2013.** Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology* 83: 433-450.
- Chase A.B., Gomez-Lunar Z., Lopez A.E., Li J., Allison S.D., Martiny A.C., Martiny J.B.H., 2018.** Emergence of soil bacterial ecotypes along a climate gradient. *Environmental Microbiology* 20: 4112-4126.
- Cherif A., Borin S., Rizzi A., Ouzari H., Boudabous A., Daffonchio D., 2003.** *Bacillus anthracis* diverges from related clades of the *Bacillus cereus* group in 16S-23S ribosomal DNA intergenic transcribed spacers containing tRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 33-40.
- Cohan F.M., 2006.** Towards a conceptual and operational union of bacterial systematic, ecology, and evolution. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B* 361: 1985-1996.
- Cohan F.M., Koeppel A.F., 2008.** The origins of ecological diversity in procaryotes. *Current Biology* 18: R1024-R1034.
- Cohan F., Perry E.B., 2007.** A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Current Biology* 17, R373-R386.
- Connor N., Sikorski J., Rooney A.P., Kopac S., Koeppel A.F., Burger A., Cole S.G., Perry E.B., Krizanc D., Field N.C., Slaton M., Cohan F.M., 2010.** Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 1349-1358.

- Czaban J., Księżniak A., Perzyński A., 2004.** An attempt to protect winter wheat against *Fusarium culmorum* by the use of rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus mycoides*. *Polish Journal of Microbiology* 53:175-182.
- Dettman J.R., Szepeanacz J.L., Kassen R., 2016.** The properties of spontaneous mutations in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics* 17:27. doi:10.1186/s12864-015-2244-3.
- Didelot X., Achtman N., Parkhill J., Thomson N., Falush D., 2007.** A bimodal pattern of relatedness between the *Salmonella* Paratyphi A and Typhi genomes: convergence or divergence by homologous recombination? *Genome Research* 17: 61-68.
- Didelot X., Barker M., Falush D., Priest F.G., 2009.** Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 81-90.
- Dierick K., Van Coillie E., Świącicka I., Meyfroidt G., Deylieger H., Meulemans A., Hoedemaekers G., Fourie L., Heyndrickx M., Mahillon J., 2005.** Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 4277-4279.
- Doolittle W.F., Zhaxybayeva O., 2009.** On the origin of prokaryotic species. *Genome Research* 19: 744-756.
- Doganay M., Demiraslan H., 2015.** Human anthrax as a re-emerging disease. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 10: 10-29.
- Dréan P., McAuley C.M., Moore S.C., Fegan N., Fox E.M., 2015.** Characterization of the spore-forming *Bacillus cereus sensu lato* group and *Clostridium perfringens* bacteria isolated from the Australian dairy farm environment. *BMC Microbiology* 15: 38.
- Drewnowska J.M., Świącicka I., 2013.** Eco-genetic structure of *Bacillus cereus sensu lato* populations from different environments in Northeastern Poland. *PLoS ONE* 8: e80175.
- Duport C., Jobin M., Schmitt P., 2016.** Adaptation in *Bacillus cereus*: from stress to disease. *Frontiers in Microbiology* 7: 1550.
- Dziewit Ł., Bartosik D., 2011.** Genomy prokariotyczne w świetle analiz genomicznych. *Postępy Mikrobiologii* 50: 87-96.
- Enright M.C., Spratt B.G., 1999.** Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology* 7: 482-487.
- Fasanella A., Losito S., Trotta T., Adone R., Massa S., Ciuchini F., Chiocco D., 2001.** Detection of anthrax vaccine virulence factors by polymerase chain reaction. *Vaccine* 19: 4214-4218.

- Feil E.J., Li B.C., Aanensen D.M., Hanage W.P., Spratt B.G., 2004.** eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* 186: 1518-1530.
- Fiedoruk K., Drewnowska J.M., Daniluk T., Leszczynska K., Iwaniuk P., Świącicka I., 2017.** Ribosomal background of the *Bacillus cereus* group thermotypes. *Scientific Reports* 7: 46430.
- Fouet A., 2009.** The surface of *Bacillus anthracis*. *Molecular Aspects of Medicine* 30: 374-385.
- Francisco A.P., Vaz C., Monteiro P.T., Melo-Cristino, J., Ramirez M., Carriço J.A. 2012.** PHYLOViZ: Phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics* 13:87.
- Greenbaum G., Fefferman N.H., 2017.** Application of network methods for understanding evolutionary dynamics in discrete habitats. *Molecular Ecology* 26: 2850-2863.
- Guinebretière M.H., Auger S., Galleron N., Contzen M., De Sarrau B., De Buyser M.L., Lamberet G., Fagerlund A., Granum P.E., Lereclus D., De Vos P., Nguyen-The C., Sorokin A., 2013.** *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 31-40.
- Guinebretière M.H., Loux V., Martin V., Nicolas P., Sanchis V., Broussolle V., 2017.** Draft genome sequences of 18 psychrotrophic and 2 thermotolerant strains representative of particular ecotypes in the *Bacillus cereus* group. *Genome Announcements* 5: 1-3.
- Guinebretière M.H., Thompson F.L., Sorokin A., Normand P., Dawyndt P., Egling-Schulz M., Svennson B., Sanchis V., Nguyen-The C., Heyndrickx M., De Vos P., 2008.** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology* 10: 851-865.
- Helgason E., Tourasse N.J., Meisal R., Caugant D.A., Kolsto A.-B., 2004.** Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 191-201.
- Hershberg R., Petrov D.A., 2010.** Evidence that mutation is universally biased toward AT in bacteria. *PLoS Genetics* 6(9): e1001115.
- Hoffmaster A.R., Novak R.T., Marston C.K., Gee J.E., Hesel L., Pruckler J.M., Wilkins P.P., 2008.** Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing. *BMC Microbiology* 8: 191.

- Hoffmaster A.R., Ravel J., Rasko D.A., Chapman G.D., Chute M.D., Marston C.K., De B.K., Sacchi C.T. i wsp., 2004.** Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8449-8454.
- Hu X., Święcicka I., Timmery S., Mahillon J., 2009 (a).** Sympatric soil communities of *Bacillus cereus sensu lato*: population structure and potential plasmid dynamics of pXO1- and pXO2-like elements. *FEMS Microbiol Ecology* 70: 344-355.
- Hu X., Van der Auwera G., Timmery S., Zhu L., Mahillon J., 2009 (b).** Distribution, diversity and potential mobility of extrachromosomal elements related to the *Bacillus anthracis* pXO1 and pXO2 virulence plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 3016-3038.
- Jensen G.B., Hansen B.M., Eilenberg J., Mahillon J., 2003.** The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology* 5: 631-640.
- Kamińska P.S., Yernazarova A., Murawska E., Święcicki J., Fiedoruk K., Bideshi D.K., Święcicka I., 2014.** Comparative analysis of quantitative reverse transcription real-time PCR and commercial enzyme immunoassays for detection of enterotoxigenic *Bacillus thuringiensis* isolates. *FEMS Microbiology Letters* 357: 34-39.
- Kantas D., Papatsiros V.G., Tassis P.D., Giavasis I., Bouki P., Tzika E.D., 2014.** A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) protect against enteric pathogens in postweaning piglets. *Journal of Applied Microbiology* 118: 727-738.
- Kasprzykowska U., Sobieszczńska B.M., 2014.** Plastyczność bakteryjnych genomów – wewnątrzkomórkowy transfer genów. *Postępy Mikrobiologii* 53: 153-163.
- Ko K.S., Kim J.W., Kim J.M., Kim W., Chung S., Kim I.J., Kook Y.H., 2004.** Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene. *Infection and Immunity* 72: 5253–5261.
- Koeppel A.F., Perry E.B., Sikorski J., Krizanc D., Warner W.A., Ward D.M., Rooney A.P., Brambilla E., Connor N., Ratcliff R.M., Nevo E., Cohan F.M., 2008.** Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 2504-2509.
- Koeppel A.F., Wertheim J.O., Barone L., Gentile N., Krizanc D., Cohan F.M., 2013.** Speedy speciation in a bacterial microcosm: new species can arise as frequently as adaptations within a species. *International Society for Microbial Ecology* 7: 1080-1091.

- Kucukyildirim S., Long H., Sung W., Miller S.F., Doak T.G., Lynch M., 2016.** The rate and spectrum of spontaneous mutations in *Mycobacterium smegmatis*, a bacterium naturally devoid of the postreplicative mismatch repair pathway. *Genes Genomes Genetics* 6: 2157-2163.
- Lai Q., Liu Y., Yuan J., Du J., Wang L., Sun F., Shao Z., 2014.** Multilocus sequence analysis for assessment of phylogenetic diversity and biogeography in *Thalassospira* bacteria from diverse marine environments. *PLoS ONE* 9: e106353.
- Lechner S., Mayr R., Francis K.P., Prüß B.M., Kaplan T., Wießner–Gunkel E., Stewart G.S.A.B., Scherer S., 1998.** *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Microbiology* 48: 1373-1382.
- Libardo P., Rozas J., 2009.** DnaSPv5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Liu Y., Lai Q., Dong Ch., Sun F., Wang L., Li G., Shao Z., 2013.** Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLoS ONE* 8: e80097.
- Liu Y., Lai Q., Du J., Shao Z., 2017.** Genetic diversity and population structure of the *Bacillus cereus* group bacteria from diverse marine environments. *Scientific Reports* 7: 689.
- Liu Y., Lai Q., Göker M., Meier-Kolthoff J.P., Wang M., Sun Y., Wang L., Shao Z., 2015.** Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports* 5: 14082.
- Liu Y., Lai Q., Shao Z., 2018.** Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68: 106-112.
- Logan N.A., 2011.** *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology* 112: 417-429.
- Lüdeke C.H.M., Gonzalez-Escalona N., Fischer M., Jones J., 2015.** Examination of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates by multi-locus sequence typing (MLST) and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA). *Frontiers in Microbiology* 6: 564.
- Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G., 1998.** Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of

pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3140-3145.

- Maiden M.C.J., Jansen van Rensburg M.J., Bray J.E., Earle S.G., Ford S.A., Jolley K.A., McCarthy N.D., 2013.** MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews Microbiology* 11: 728-736.
- Melendrez M.C., Becraft E.D., Wood J.M., Olsen M.T., Bryant D.A., Heidelberg J.F., Rusch D.B., Cohan F.M., Ward D.M., 2015.** Recombination does not hinder formation or detection of ecological species of *Synechococcus* inhabiting a hot spring *Cyanobacterial* mat. *Frontiers in Microbiology* 6: 1540.
- Melendrez M.C., Lange R.K., Cohan F.M., Ward D.M., 2011.** Influence of molecular resolution on sequence-based discovery of diversity among *Synechococcus* populations in an alkaline siliceous hot spring microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 1359-1367.
- Méric G., Mageiros L., Pascoe B., Woodcock D.J., Mourkas E., Lamble S., Bowden R., Jolley K.A., Raymond B., Sheppard S.K., 2018.** Lineage-specific plasmid acquisition and the evolution of specialized pathogens in *Bacillus thuringiensis* and the *Bacillus cereus* group. *Molecular Ecology* 27: 1524-1540.
- Michelet N., Granum P.E., Mahillon J., 2006.** *Bacillus cereus* enterotoxins, bi- and tri-component cytolytins and other haemolysins. W: Alonf J., Popoff M. R. (Red.) The comprehensive sourcebook of bacteria toxins. *Academic Press*, London, str. 779-790.
- Mock M., Fouet A., 2011.** Anthrax. *Annual Review of Microbiology* 55: 647-671.
- Modrie P., Beuls E., Mahillon J., 2010.** Differential transfer dynamics of pAW63 plasmid among members of the *Bacillus cereus* group in food microcosms. *Journal of Applied Microbiology* 108: 888-897.
- Moore L.R., Rocap G., Chisholm S.W., 1998.** Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* 393: 464-467.
- Murawska E., Fiedoruk K., Bideshi D.K., Świącicka I., 2013.** Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain IS5056, an isolate highly toxic to *Trichoplusia ni*. *Genome Announcements* 1: e001808-13.
- Oliveira A., Teixeira P., Azevedo M., Jamal S.B., Tiwari S., Almeida S., Silva A., Barh D., Dorneles E.M.S., Haas D.J., Hainemann M.B., Ghosh P., Lage A.P., Figueiredo H., Ferreira R.S., Azevedo V., 2016.** *Corynebacterium tuberculosis* may be under anagenesis

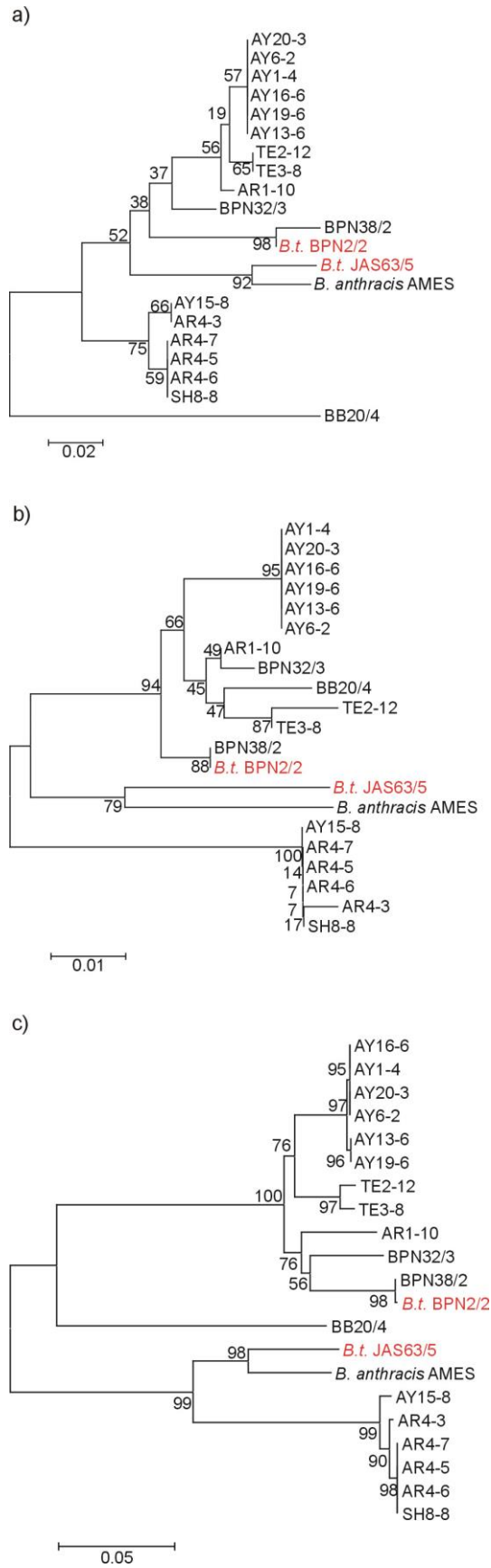
and biovar Equi forms biovar Ovis: a phylogenetic inference from sequence and structural analysis. *BMC Microbiology* 16: 100.

- Pannucci J., Okinaka R.T., Sabin R., Kuske Ch.R., 2002.** *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *Journal of Bacteriology* 184: 134-141.
- Pastor N., Piñero D., Valdés A.M., Soberón X., 1990.** Molecular evolution of class a β -lactamases: phylogeny and patterns of sequence conservation. *Molecular Microbiology* 4: 1957-1965.
- Patiño-Navarette R., Sanchis V., 2016.** Evolutionary process and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. *Research in Microbiology* 168: 309-318.
- Pfaffl M.W., 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45.
- Pires dos Santos T., Damborg P., Moodley A., Guardabassi L., 2016.** Systematic review on global epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: inference of population structure from multilocus sequence typing data. *Frontiers in Microbiology* 7: 1599.
- Priest F.G., Barker M., Baillie L.W.J., Holmes E.C., Maiden M.C.K., 2004.** Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *Journal of Bacteriology* 186: 7959-7970.
- Ramette A., Tiedje J.M., Boetius A., 2009.** Impact of space, time, and complex environments on microbial communities. *Clinical Microbiology and Infection* 15: 60–62.
- Raymond B., Wyres K.L., Sheppard S.K., Ellis R.J., Bonsall M.B., 2010.** Environmental factors determining the epidemiology and population genetic structure of the *Bacillus cereus* group in the field. *PLoS Pathogens* 6: e1000905.
- Reiter L., Kolstø A.B., Piehler A.P., 2011.** Reference genes for quantitative, reverse transcription PCR in *Bacillus cereus* group strains throughout the bacterial life cycle. *Journal of Microbiological Methods* 86: 210-217.
- Roberts M.S., Cohan F.M., 1995.** Recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavenensis*. *Evolution* 49: 1081-1094.
- Rodríguez A.P., Martínez M.G., Barrera-Cortés J., Ibarra J.E., Bustos F.M., 2015.** Bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* spores encapsulated with amaranth derivatized starches: studies on the propagation "in vitro". *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38: 329-339.

- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H., 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.
- Seo P.S., Yokota A., 2003.** The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* and *rpoD1* gene sequences. *The Journal of General and Applied Microbiology* 49: 191-203.
- Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittman T.S., 1986.** Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 873-884.
- Sobczyński M., Mackiewicz P., Mackiewicz D., Smolarczyk K., Cebrat S., 2005.** Nowe spojrzenie na filogenezę z punktu widzenia genomiki. *Biotechnologia* 3: 102-117.
- Song Y., Sun Z., Guo C., Wu Y., Liu W., Yu Y., Menghe B., Yang R., Zhang H., 2016.** Genetic diversity and population structure of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* isolated from naturally fermented dairy foods. *Scientific Reports* 6: 22704.
- Sorokin A., Candelon B., Guilloux K., Galleron N., Wackerow-Kouzova N., Ehrlich S.D., Bourguet D., Sanchis V., 2006.** Multi-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotropic strains. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1569-1578.
- Smith N.H., Kremer K., Inwald I., Dale J., Driscoll J.R., Gordon S.V., van Soolingen D., Hewinson R.G., Smith J.M., 2006.** Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Theoretical Biology* 239: 220-225.
- Święcicka I., Mahillon J., 2005.** The clonal structure of *Bacillus thuringiensis* isolates from North-East Poland does not correlate with their cry gene diversity. *Environmental Microbiology* 7: 34-39.
- Święcicka I., Mahillon J., 2006.** Diversity of commensal *Bacillus cereus sensu lato* isolated from the common sow bug (*Porcellio scaber*, *Isopoda*). *FEMS Microbiology Ecology* 56: 132-140.
- Święcicka I., 2008.** Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in eukaryotic organism: a case of symbiosis. *Biocontrol Science and Technology* 18: 221-239.
- Święcicka I., Bartoszewicz M., Kasulyte-Creasey D., Drewnowska J.M., Murawska E., Yernazarova A., Łukaszuk E., Mahillon J., 2013.** Diversity of thermal ecotypes and potential pathotypes of *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *FEMS Microbiology Ecology* 85: 262-272.

- Tamura K., Stecher G., Peterson D., FilipSKI A., Kumar S., 2013.** MEGA6: molecular evolutionary genetic analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tanabe Y., Kasai F., Watanabe M.M., 2007.** Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Microbiology* 153: 3695-3703.
- Tewari A., Abdullah S., 2015.** *Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective. *Journal of Food Science and Technology* 52: 2500-251.
- Thorsen L. Kando C.K., Sawadogo H., Larsen N., Diawara B., Ouédraogo G.A., Hendriksen N.B., Jespersen L., 2015.** Characteristics and phylogeny of *Bacillus cereus* strains isolated from Maari, a traditional West African food condiment. *International Journal of Food Microbiology* 196: 70-78.
- Tinsley E., Khan S.A., 2007.** A *Bacillus anthracis*-based in vitro systems supports replication of plasmid pXO2 as well as rolling-circle-replicating plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5005-5010.
- Tinsley E., Naqvi A., Bourgogne A., Koehler T.M., Khan S.A., 2004.** Isolation of a replicon of the virulence plasmid pXO2 of *Bacillus anthracis* and characterization of the plasmid-encoded RepS replication protein. *Journal of Bacteriology* 186: 2717-2723.
- Urwin R., Maiden M.C.J., 2003.** Multi-locus sequence typing: a tool for a global epidemiology. *TRENDS in Microbiology* 11: 479-487.
- Ward D.M., 2006.** Microbial diversity in natural environments: focusing on fundamental questions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90: 309-324.
- Wu S., Wu Q., Zhang J., Chen M., Guo W., 2016.** Analysis of multilocus sequence typing and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from chinese retail ready-to-eat food. *Frontiers in Microbiology* 7: 168.
- Vos M., Didelot S., 2009.** A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *The ISME Journal* 3: 199–208.
- Wiedenbeck J., Cohan F.M., 2011.** Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfers and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiology Review* 35: 957-976.
- Whitaker R.J., Grogan D.W., Taylor J.W., 2003.** Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301: 976-978.

- Yang Y., Gu H., Yu X., Zhan L., Chen J., Luo Y., Zhang Y., Zgang Y., Lu Y., Jiang J., Mei L., 2017.** Genotypic heterogeneity of emetic toxin producing *Bacillus cereus* isolates from China. *FEMS Microbiology Letters* 364: fnw237.
- Zwick M.E., Joseph S.J., Didelot X., Chen P.E., Bishop-Lilly K.A., Stewart A.C., Willner K., Nolan N., Lentz S., Thomason M.K., Sozhamannan S., Meteczun A.J., Du L., Read T.D., 2012.** Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Research* 22: 1512-1524.



Ryc. S2. Pokrewieństwo genetyczne *repA_N*-pozytywnych izolatów *B. cereus*, *B. thuringiensis* BPN2/2, *B. thuringiensis* JAS63/5 oraz szczepu *B. anthracis* AMES wyznaczone metodą neighbour-joining na podstawie sekwencji nukleotydowych: a) odcinka *origin*, b) regionu CT oraz c) genu *repA_N*.

Tabela S1. Charakterystyka glebowych izolatów *B. cereus* z Argentyny, Kazachstanu, Kenii i Polski oraz szczepów referencyjnych

Izolat ^a	Kraj ^b	<i>repA</i> ^c	<i>repX</i> ^c	ST ^d	CC ^e	Kład
JAS06/1	PL	+	+	222	CC 650	V
JAS15/2	PL	+		222	CC 650	V
JAS21/1	PL	+		566	CC 650	V
JAS21/5	PL	+		410	CC 650	V
JAS30/3	PL	+		735 ^N	CC 650	V
JAS39/1	PL	+		697 ^N	CC 650	V
JAS78/2	PL	+	+	734 ^N	CC 650	V
JAS83/3	PL	+		615 ^N	CC 650	V
JAS85/1	PL			410	CC 650	V
JAS86/1	PL	+		697 ^N	CC 650	V
BB20/1	PL	+		410	CC 650	V
BPN08/1	PL		+	649 ^N	CC 650	V
BPN13/1	PL	+	+	650 ^N	CC 650	V
BPN37/1	PL	+	+	655 ^N	CC 650	V
BPN60/1	PL	+		624 ^N	CC 650	V
JAS11/1	PL	+		682 ^N	CC 614-682	I
JAS36/3	PL			682 ^N	CC 614-682	I
JAS67/5	PL	+		614 ^N	CC 614-682	I
BB19/4	PL			632 ^N	CC 551-632	I

BB25/1	PL	+		551	CC 551-632	I
BB50/5	PL	+		632 ^N	CC 551-632	I
BPN43/4	PL	+		656 ^N	CC 656-657	V
BPN55/4	PL	+		656 ^N	CC 656-657	V
BPN56/3	PL	+		657 ^N	CC 656-657	V
BB23/4	PL			701 ^N	CC 223-701	IV
JAS06/3	PL	+	+	617 ^N	S	V
JAS24/2	PL	+		612 ^N	S	III
JAS74/1	PL	+		720 ^N	S	V
JAS74/3	PL	+	+	617 ^N	S	V
JAS82/3	PL	+		719 ^N	S	V
JAS84/1	PL	+		684 ^N	S	V
JAS90/2	PL	+	+	294	S	I
JAS92/2	PL	+		616 ^N	S	I
JAS94/5	PL	+	+	726 ^N	S	V
BB04/1	PL	+		644 ^N	S	I
BB20/4	PL	+		686 ^N	S	I
BB22/2	PL	+		339	S	V
BB25/5	PL	+		705 ^N	S	IV
BB33/2	PL	+		409	S	V
BB51/4	PL	+		644 ^N	S	I

BB53/3	PL	+		728 ^N	S	V
BB54/3	PL	+		295	S	I
BB54/4	PL	+		644 ^N	S	I
BPN32/3	PL	+		652 ^N	S	V
BPN33/4	PL		+	653 ^N	S	I
BPN34/4	PL		+	737 ^N	S	V
BPN38/2	PL	+		674 ^N	S	V
BPN42/1	PL	+		730 ^N	S	V
BPN57/3	PL	+		738 ^N	S	V
BPN58/4	PL	+		708 ^N	S	V
SH2-1	KE	+		879 ^N	CC 879-884	I
SH7-4	KE	+		884 ^N	CC 879-884	I
TE8-8	KE		+	874 ^N	CC 810-874	III
SH6-1	KE			810 ^N	CC 810-874	III
TE1-1	KE			842 ^N	S	II
TE1-9	KE		+	785 ^N	S	III
TE2-1	KE			799 ^N	S	III
TE2-12	KE	+		876 ^N	S	II
TE2-13	KE		+	877 ^N	S	III
TE3-1	KE			801 ^N	S	III
TE3-8	KE	+	+	863 ^N	S	II

TE4-1	KE		802 ^N	S	II
TE4-2	KE	+	864 ^N	S	III
TE5-1	KE	+	865 ^N	S	II
TE5-2	KE		803 ^N	S	III
TE6-1	KE		804 ^N	S	III
TE6-7	KE	+	866 ^N	S	II
TE6-8	KE	+	867 ^N	S	III
TE7-1	KE		822 ^N	S	III
TE7-7	KE	+	868 ^N	S	II
TE8-1	KE	+	870 ^N	S	III
TE8-2	KE	+	871 ^N	S	III
TE8-3	KE	+	872 ^N	S	III
TE8-4	KE		805 ^N	S	III
TE8-6	KE	+	873 ^N	S	II
TE9-1	KE		823 ^N	S	II
TE10-1	KE		806 ^N	S	III
SH1-1	KE		824 ^N	S	III
SH2-3	KE		807 ^N	S	III
SH3-1	KE		808 ^N	S	III
SH4-1	KE		825 ^N	S	III
SH5-1	KE		809 ^N	S	III

SH5-2	KE		+	880 ^N	S	III
SH5-3	KE	+		881 ^N	S	III
SH5-10	KE		+	882 ^N	S	III
SH6-6	KE		+	883 ^N	S	III
SH7-1	KE			826 ^N	S	I
SH8-1	KE			827 ^N	S	III
SH8-8	KE	+		885 ^N	S	III
SH9-1	KE			828 ^N	S	III
SH10-2	KE			829 ^N	S	IV
SH10-7	KE	+		886 ^N	S	IV
AR13-9	AR	+		18	CC 18-225	III
AR15-3	AR			225	CC 18-225	III
AR6-1	AR			223	CC 223-701	IV
AR9-1	AR			223	CC 223-701	IV
AR9-3	AR	+		223	CC 223-701	IV
AR1-1	KE			480	S	IV
AR1-10	AR	+		484	S	IV
AR2-1	AR			817 ^N	S	I
AR3-1	AR			818 ^N	S	IV
AR4-1	AR	+		885 ^N	S	III
AR4-2	AR	+		885 ^N	S	III

AR4-3	AR	+		885 ^N	S	III
AR4-4	AR	+		885 ^N	S	III
AR4-5	AR	+		885 ^N	S	III
AR4-6	AR	+		885 ^N	S	III
AR4-7	AR	+		885 ^N	S	III
AR4-8	AR	+		885 ^N	S	III
AR4-10	AR	+		885 ^N	S	III
AR5-1	AR			819 ^N	S	IV
AR7-1	AR			820 ^N	S	IV
AR8-1	AR			821 ^N	S	III
AR13-1	AR			800 ^N	S	IV
AR15-1	AR		+	888 ^N	S	I
AY1-4	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY2-2	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY2-3	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY3-3	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY5-2	KZ		+	889 ^N	CC 889	I
AY6-1	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY6-2	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY6-3	KZ			889 ^N	CC 889	I
AY6-4	KZ			896 ^N	CC 889	I

AY9-1	KZ			815 ^N	CC 889	I
AY9-6	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY9-10	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY11-1	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY13-4	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY13-7	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY15-2	KZ	+		902 ^N	CC 889	I
AY15-6	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY17-7	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY18-3	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY18-4	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY20-3	KZ	+		889 ^N	CC 889	I
AY5-1	KZ		+	294	CC 294	I
AY9-4	KZ		+	898 ^N	CC 294	I
AY14-9	KZ		+	901 ^N	CC 294	I
AY15-7	KZ		+	901 ^N	CC 294	I
AY3-1	KZ			813 ^N	S	I
AY4-1	KZ			797 ^N	S	III
AY4-8	KZ		+	890 ^N	S	I
AY5-3	KZ			460	S	II
AY5-6	KZ		+	891 ^N	S	I

AY5-7	KZ		+	892 ^N	S	I
AY5-8	KZ		+	893 ^N	S	V
AY5-9	KZ		+	894 ^N	S	I
AY5-10	KZ		+	895 ^N	S	I
AY6-5	KZ			814 ^N	S	V
AY7-1	KZ			798 ^N	S	III
AY7-2	KZ		+	897 ^N	S	V
AY7-8	KZ		+	897 ^N	S	V
AY8-1	KZ			797 ^N	S	III
AY10-1	KZ			816 ^N	S	I
AY10-5	KZ		+	899 ^N	S	I
AY13-6	KZ	+		900 ^N	S	I
AY15-8	KZ	+		903 ^N	S	III
AY16-6	KZ	+		900 ^N	S	I
AY19-6	KZ	+		900 ^N	S	I
AY19-8	KZ		+	899 ^N	S	I
AMES	-	+	+	1	S	II
ATCC10987		+		32	S	II
ATCC14579				4	S	III
DSMZ11821				447		V
DSMZ12442				83		VI

HD1			10		III
WSBC10364			42		V
HD73		+	8	S	III
<i>B.t.</i> IS195				+	
<i>B.t.</i> BPN2/2	PL	+	709 ^N		
<i>B.t.</i> JAS63/5	PL	+	622 ^N		

^a *B.c.*, *B. cereus*; *B. weihenstephanensis* DSMZ11821; *B. pseudomycooides* DSMZ12442; *B. weihenstephanensis* WSBC10364; *B. thuringiensis* HD1; *B. thuringiensis* HD73; *B. cereus* ATCC10987; *B. cereus* ATCC14579; *B. anthracis* Ames;

^b PL, Polska; KE, Kenia; AR, Argentyna; KZ, Kazachstan;

^c +, obecność genu *repA_N* i/ lub *repX* w reakcji PCR;

^d ST, typ sekwencyjny. Nowe typy sekwencyjne oznaczono indeksem N. Nowe typy sekwencyjne polskich izolatów zostały oznaczone przez J. Drewnowską (Drewnowska J., Święcicka I., 2013);

^e CC, kompleks klonalny; S, singleton.